

技术与方法 Techniques and Methods

冰冻保存小新月菱形藻的包埋-玻璃化法

张丽佳, 王起华*, 张恩栋, 刘丽娜

辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029

Cryopreservation of *Nitzschia closterium minutissima* Allen et Netson by Encapsulation-vitrification Method

ZHANG Li-Jia, WANG Qi-Hua*, ZHANG En-Dong, LIU Li-Na

School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China

摘要: 采用包埋-玻璃化法对小新月菱形藻进行冰冻保存, 探讨玻璃化溶液(PVS)配方、装载液浓度和装载时间、脱水时间以及洗涤方法对冰冻保存存活率的影响。结果表明: 小新月菱形藻在0℃预冷后50% PVS2 装载60 min, 100% PVS2 脱水60 min, 1 mol·L⁻¹蔗糖梯度洗涤30 min的条件下存活率最高, 为74.1%。包埋-玻璃化法不需要特殊的冷冻设备, 冰冻程序操作简单, 在藻类种质的超低温保存中有较大的应用潜力。

关键词: 小新月菱形藻; 包埋-玻璃化; 存活率; 冰冻保存

近年来, 随着海洋微藻在鱼、虾、贝类育苗生产中的广泛应用, 有关饵料微藻的超低温保存的研究日益受到重视。小新月菱形藻是海产养殖中的一种优良饵料微藻, 对其超低温保存的探索有重要的应用价值。王起华等(1999)曾采用两步法冰冻保存小新月菱形藻并获得63.1%的较高存活率, 但是他们的方法需要采用特殊的降温设备和较为复杂的冷冻程序, 其实际应用受到很大的限制。玻璃化法和包埋脱水法是近20年来建立的2种超低温保存新技术, 毋需昂贵的降温设备, 冷冻程序比较简单, 在多种植物种质超低温保存中已显示出巨大的应用潜力。近10年来, 新发展的包埋-玻璃化法则结合包埋脱水法和玻璃化法的多种优点于一身, 现已在20余种高等植物的种质保存中获得成功(梁宏和王起华2005; 吴雪梅和汤浩茹2005)。本文采用包埋-玻璃化法冰冻保存小新月菱形藻, 并探讨了玻璃化溶液组成、脱水时间、装载液浓度、装载时间以及洗涤方法对其存活率的影响, 以探求一条不需要特殊设备、操作简便而且存活率较高的冰冻保存小新月菱形藻的方法。

材料与amp;方法

1 材料及其培养

小新月菱形藻(*Nitzschia closterium minutissima*

Allen et Nelson)由辽宁省水产研究所提供, 并由我校藻类生理研究室纯化为单种。取25 mL生长6 d的小新月菱形藻(8.14×10^6 个·mL⁻¹), 接种于含有100 mL f/2培养基(McLachlan 1973)的250 mL的三角烧瓶中。培养条件为(22±1)℃, 光照强度(43±3) μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期(光/暗)为14 h/10 h。取培养10 d的材料(静止期)用于冷冻保存。

2 植物玻璃化溶液(PVS)的组成和配制

以PVS2配方(Sakai等1990)为基础, 通过改变二甲基亚砜(DMSO)的浓度或用聚乙二醇(PEG20000)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP K30)分别代替DMSO, 配成6种不同配方。PVS7配方参照文献(Wu等2003), 并稍作改动。

上述7种PVS配方的组成有: PVS1 [30% 甘油(GLY) (W/V, 单位下同)+15% 乙二醇(EG)+10% DMSO]、PVS2 (30% GLY+15% EG+15% DMSO)、PVS3 (30% GLY+15% EG+20% DMSO)、PVS4 (30% GLY+15% EG+25% DMSO)、PVS5 (30% GLY+15% EG+6% PEG)、PVS6 (30% GLY+15% EG+5% PVP)和PVS7 (50%

收稿 2006-08-16 修定 2006-12-11

资助 国家自然科学基金(30470184)。

*通讯作者(E-mail: qihua_mail@163.com; Tel: 0411-84258039)。

GLY+50%蔗糖)。PVS1~6用含 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的f/2培养基定容, PVS7用f/2培养基定容。

25% PVS 装载的预备实验结果表明, PVS3对小新月菱形藻的冰冻保存效果最好, 因此, 本文的脱水和装载处理均采用PVS3。

3 包埋

取上述培养10 d的小新月菱形藻, 离心后用灭菌海水悬浮至适当密度, 与30‰ NaCl的6%褐藻酸钠溶液等体积混匀后, 制成直径约2.5 mm的胶球, 参照王起华等(2005)的方法。将此胶球置于灭菌海水中, 暗恢复1 d后备用。

4 装载和脱水

装载时, 将每组45个胶球分别置于装有20 mL 25%和50% PVS溶液的50 mL三角瓶中, 在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷后进行装载处理, 时间分别为0、20、40、60、80和100 min。脱水时, 将经过装载的胶球置于装有20 mL 100% PVS溶液的三角瓶中, 在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷后进行脱水处理, 时间分别为0、20、40、60、80和100 min。

5 冰冻、化冻和洗涤

将脱水后的胶球每15个为1组, 移入冻存管中, 加入1 mL新鲜的100% PVS溶液, 快速投入到液氮中保存, 放置24 h后, 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下快速化冻。此操作按王起华等(2005)的方法进行。洗涤:(1)蔗糖梯度洗涤时, 将化冻后的每组胶球移入含20 mL $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的三角瓶中 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡15 min, 然后再加入20 mL f/2培养基振荡10 min, 最后加入20 mL f/2培养基振荡5 min。(2) $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下振荡洗涤30 min。(3) $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下振荡30 min。(4) $1.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下振荡30 min。(5) f/2培养基于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡30 min。除特殊说明外, 均采用蔗糖梯度洗涤。

6 恢复培养和存活率的测定

将洗涤后的每组胶球放入装有20 mL f/2培养基的50 mL三角瓶中, 在与培养材料相同的条件下暗中恢复1 d, 再光照培养4 d后, 用丙酮提取叶绿素计算存活率。具体方法参见王起华等(2005)。

上述实验至少重复2次, 每次实验设置3个平行样品, 文中数据为6个平行样品的平均值和标准差。

结果与讨论

1 PVS3脱水时间对小新月菱形藻冰冻保存存活率的影响

由图1可以看出, 25% PVS3装载的材料在80 min时的存活率最大, 为35.1%; 50% PVS3装载的材料在60 min时达到最大存活率(57.7%)。50% PVS3装载的脱水效果显著好于25% PVS3装载的。玻璃化保护剂脱水时间过短, 藻细胞仍保持较高的含水量, 在降温过程中不能迅速达到玻璃化状态, 因而不易成活; 脱水时间过长, 藻细胞受玻璃化溶液的毒害增大, 成活率反而下降(梁宏和王起华2005)。前人的研究表明, 玻璃化保护液的处理时间与实验材料的性质有关。对于高等植物来说, 悬浮培养物和原生质体要求时间短, 而茎尖等外植体可承受较长的处理时间(梁宏和王起华2005)。近年来, 采用常规玻璃化法保存藻类材料已有几例报道, 最佳脱水时间分别为: 莱茵衣藻5 min(项黎新和邵健忠2001); 小球藻1 h(蔡小宁等2004); 条斑紫菜叶状体细胞的原生质体3 min(Liu等2004)。玻璃化保护液的处理时间还可能与玻璃化保存方法有关。采用新发展的包埋-玻璃化法保存高等植物材料的初步结果表明, 此法的最适脱水时间比常规玻璃化法长得多, 如橄榄树体细胞胚为3 h(Shibli和Aljuboori 2000); 山嵛菜顶端分生组织为70~100 min(Matsumoto等1995)。本文结果与保存高等植物材料的结果相近。采用褐藻胶包埋细胞, 一方面可以减缓渗透性保护剂渗入细胞的速率, 另一方

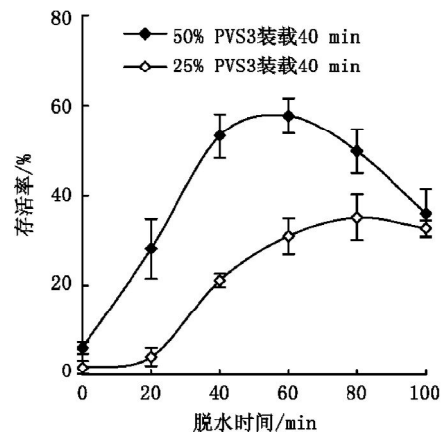


图1 脱水时间对小新月菱形藻存活率的影响

面由于褐藻胶本身是亲水胶体, 在含有藻细胞的胶球脱水时, 褐藻胶可以起缓冲作用, 这些都可以降低脱水速率, 减缓脱水过程中细胞内外的渗透压差, 因而细胞在脱水过程中可以得到保护。

2 PVS3 装载液浓度和装载时间对小新月菱形藻冰冻保存存活率的影响

根据上述最适脱水时间进行装载实验的结果(图2)表明, 25%和50% PVS3 处理下的小新月菱形藻冰冻保存后的存活率都在60 min时达到最高(分别为42.7%和66.4%)。50% PVS3的装载效果显著好于25% PVS3。

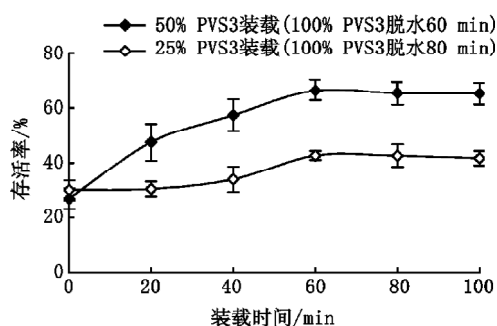


图2 装载时间对小新月菱形藻存活率的影响

在用玻璃化溶液进行脱水处理前, 为避免由于渗透压变化对细胞造成的伤害, 通常有一个装载的过程(梁宏和王起华 2005)。装载溶液大多采用 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油和 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的混合液或稀释的玻璃化溶液(梁宏和王起华 2005)。用常规玻璃化方法保存的装载时间通常都较短, 小球藻为20 min(蔡小宁等2004); 条斑紫菜原生质体为5 min(Liu等2004)。而用包埋-玻璃化法保存材料的装载时间相对要长得多, 如马铃薯分生组织为90 min(Hirai和Sakai 1999)。本文中, 小新月菱形藻的最佳装载时间为60 min, 这也与保存高等植物材料的结果相近, 说明采用包埋玻璃化法保存藻类材料时, 最佳脱水时间和装载时间都比常规玻璃化法明显增长。

3 玻璃化保护液种类对小新月菱形藻冰冻保存存活率的影响

根据上述装载和脱水处理的实验结果, 对适合小新月菱形藻冰冻保存的PVS保护液配方进行筛选的结果(表1)显示, 25% PVS 装载时, 采用

PVS3 可获得最大存活率(42.2%)。而用50% PVS 装载时, PVS2 可获得最大存活率(71.9%)。PVS1~PVS4 四者的差别是DMSO 浓度不同, 依次为10%、15%、20%和25%。PVS1~PVS4 所对应的处理结果如下: 25% PVS 装载下的存活率分别为6.1%、20.3%、42.2%和14.4%; 50% PVS 装载下的存活率分别为11.4%、71.9%、64.3%和18.7%。在我们的实验中, 用15%和20%的DMSO 可获得最高或较高的存活率。此外, 采用PVS7 保护液也有一定的存活率。而PVS5 和PVS6 的存活率都为零。

表1 PVS种类对小新月菱形藻冰冻保存存活率的影响

PVS种类	小新月菱形藻存活率/%	
	25% PVS装载60 min和100% PVS脱水80 min	50% PVS装载60 min和100% PVS脱水60 min
PVS1	6.1 (1.5)	11.4 (2.5)
PVS2	20.3 (4.0)	71.9 (7.1)
PVS3	42.2 (4.5)	64.3 (5.5)
PVS4	14.4 (2.6)	18.7 (1.1)
PVS5	0	0
PVS6	0	0
PVS7	6.7 (2.3)	24.7 (2.5)

括弧内的数值为标准差。

与传统的保存方法不同, 玻璃化法没有繁琐的降温过程, 因此, 玻璃化保护剂的筛选和处理是玻璃化冻存的关键。已有研究表明, 植物的玻璃化保存多数采用PVS2 配方, 即30% GLY+15% EG+15% DMSO, 以含 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的MS 培养基定容(梁宏和王起华 2005), 或在此配方基础上所做的修改, 如莱茵衣藻采用30% GLY+15% DMSO+ $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖(项黎新和邵健忠2001); 小球藻采用30% 蔗糖+15% EG+10% DMSO(蔡小宁等2004)。本文结果表明, PVS2 配方冰冻保存小新月菱形藻可以获得很高的存活率, 而以PEG 或PVP 等非渗透性保护剂代替PVS2 中的渗透性保护剂DMSO 的配方, 即本文中的PVS5 和 PVS6 都不适合于小新月菱形藻的冰冻保存[尽管含有PEG 或PVP 的玻璃化保护剂已经证明是适用于某些植物的冰冻保存(刘云国和王晓云2002)]。PVS7 曾成功地用于冰冻保存苹果茎尖(Wu 等1999)等材料

料, 但本文采用此配方保存小新月菱形藻的效果并不理想。

4 洗涤液中蔗糖浓度和洗涤方式对小新月菱形藻冰冻保存存活率的影响

我们分别采用蔗糖梯度和单一蔗糖浓度的洗涤液对化冻后的胶球进行洗涤的结果(图3)表明, 蔗糖梯度洗涤的存活率最高(74.1%); 其次是1.2 mol·L⁻¹蔗糖洗涤, 其存活率为71.2%。与常规的超低温保存不同, 在玻璃化冻存中, 由于保护剂的浓度很高, 化冻后洗涤是重要的。较常采用的洗涤液是含1.2 mol·L⁻¹蔗糖的培养基, 也有采用不同浓度山梨醇溶液洗涤的(梁宏和王起华2005)。本文采用蔗糖梯度洗涤的效果好于单一浓度蔗糖洗涤的, 这可能是梯度洗涤时细胞内外渗透压逐步改变, 从而可减少细胞的伤害。至于其他因素对洗涤的影响还需进一步研究。

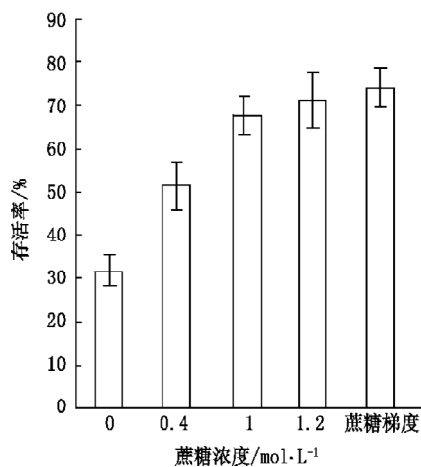


图3 洗涤液中蔗糖浓度和洗涤方式对小新月菱形藻存活率的影响

尽管采用两步法冰冻保存小新月菱形藻可以得到63.1%的较高存活率(王起华等1999), 但由于此法需要比较贵重的降温设备和复杂的冷冻程序, 以致其应用受到限制。近年来, 我们也曾尝试用不需要特殊设备且操作比较简单的包埋脱水法冰冻保存几种海洋饵料硅藻, 但存活率都很低, 如牟氏角刺藻存活率为30% (李莹等2003), 而小新月菱形藻仅为18.3% (未发表资料), 都明显低于两步法冰冻保存的存活率(王起华等1999)。本文采用包埋-玻璃化法保存小新月菱形藻, 毋

需特殊设备, 用简单的冰冻程序也可得到高达74.1%的存活率。表明包埋-玻璃化法在藻类种质的超低温保存中可能有一定的应用潜力。

参考文献

- 蔡小宁, 陈舒泛, 陈俊, 刘少华(2004). 小球藻的玻璃化超低温保存法. 植物生理学通讯, 40 (5): 599~601
- 李莹, 王起华, 李贺, 李婷婷(2003). 用包埋脱水法冰冻保存牟氏角刺藻. 海洋科学, 27 (7): 48~51
- 梁宏, 王起华(2005). 植物种质的玻璃化超低温保存. 细胞生物学杂志, 27: 43~45
- 刘云国, 王晓云(2002). 苹果种质资源玻璃化超低温保存技术. 山东农业大学学报(自然科学版), 33 (1): 32~36
- 王起华, 李贺, 张恩栋, 高艳萍, 李大鹏(2005). 包埋脱水法冷冻保存海洋饵料金藻. 海洋与湖沼, 36 (2): 172~178
- 王起华, 张恩栋, 王冰, 程爱华(1999). 两种海洋饵料硅藻的超低温保存. 辽宁师范大学学报, 22: 310~314
- 吴雪梅, 汤浩茹(2005). 包埋玻璃化法超低温保存植物种植的研究进展. 植物学通报, 22 (2): 238~245
- 项黎新, 邵健忠(2001). 衣藻细胞玻璃化超低温保存技术的研究. 细胞生物学杂志, 23 (2): 110~113
- Hirai D, Sakai A (1999). Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum Tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. Potato Res, 42: 153~160
- Liu HQ, Yu WG, Dai JX, Gong QH, Yang KF, Lu XZ (2004). Cryopreservation of protoplasts of the alga *Prophyra zeoensis* by vitrification. Plant Sci, 166: 97~102
- Matsumoto T, Sakai A, Takahashi C, Yamada K (1995). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. Cryo-Lett, 16: 189~196
- McLachlan J (1973). Growth media-marine. In: Stein JR (ed). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. London: Cambridge University Press, 25~51
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep, 9: 30~33
- Shibli RA, Al-Juboory KH (2000). Cryopreservation of 'Nabali' olive (*Olea europea* L.) somatic embryos by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. Cryo-Lett, 21: 357~366
- Wu YJ, Engelmann F, Zhao YH, Zhou MG, Chen SY (1999). Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. Cryo-Lett, 20: 121~130
- Wu YJ, Huang XL, Xiao JN, Li XJ, Zhou MO, Engelmann F (2003). Cryopreservation of mango (*Mangifera indica* L.) embryogenic cultures. Cryo-Lett, 24: 303~314