

## 萱藻丝状体的种质保存技术

庄 琰<sup>1</sup>, 宫相忠<sup>1\*</sup>, 张文健<sup>1</sup>, 高 伟<sup>1</sup>, 张必达<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 长岛爱华海藻食品有限公司, 山东 烟台 265800)

**摘要:** 采用液体保存法和胶囊化低温保存法对萱藻丝状体进行保存, 探讨了液体培养法中温度、光照强度以及胶囊化低温保存法中胶球含水量对萱藻丝状体种质保存的影响。结果显示: (1) 在液体保存法中, 温度对萱藻丝状体的保存影响较小, 当光强为  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,  $6 \sim 18 \text{ }^\circ\text{C}$  均可实现萱藻丝状体的长期保存; (2) 光照强度对萱藻丝状体的液体保存影响显著,  $16.2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  及以上的光强不利于种质的保存,  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  对萱藻丝状体的液体保存最有利; (3) 在  $6 \sim 18 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下保存萱藻丝状体 60 d 后, 萱藻丝状体细胞状态良好且存活率仍在 97% 以上; (4) 胶球含水量过高或过低均会降低萱藻丝状体胶囊化低温保存后的存活率, 15% 是萱藻丝状体胶球的最适含水量, 在该条件下, 萱藻丝状体保存 1 个月后的存活率仍在 50% 以上。研究证明, 在适宜条件下, 液体保存法和胶囊化低温保存法均可实现萱藻丝状体的种质保存。

**关键词:** 萱藻; 丝状体; 温度; 光照强度; 液体保存; 胶囊化低温保存

**中图分类号:** S 917.3

**文献标志码:** A

藻类植物是具有叶绿素、能进行光合作用的叶状体植物。海洋藻类不仅是海洋植物的主要组成部分, 也是海洋生态系统维持平衡的重要因素<sup>[1]</sup>。此外, 海洋藻类还具有极其重要的经济价值。近年来, 海洋藻类种质保存技术的研究日益受到重视, 我国已经发展和建立了一系列海藻种质资源保存技术, 收集和保存了大量具有生产应用价值的海藻遗传资源<sup>[2]</sup>。在大型海藻的种质保存技术中, 液体保存法将种质置于液体培养基中在低温弱光下培养, 是一种适合海藻丝状体扩增培养且较为实用和常规的种质保存方法<sup>[3]</sup>; 而胶囊化低温保存法是胶囊化超低温保存法的一项改进技术, 即将生物材料经褐藻酸钠包埋并脱水后投入  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存的一种方法, 胶囊化低温保存法不仅操作简便, 而且能够有效维持种质在保存过程中的稳定性并减少污染, 陈昌生等<sup>[4]</sup>运用该技术成功保存了坛紫菜 (*Pyropia haitanensis*) 丝状体, 郭金耀等<sup>[3]</sup>也应用该方法对

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) 的保存进行了研究。

萱藻 (*Scytosiphon lomentaria*) 隶属于褐藻门 (Phaeophyta)、褐藻纲 (Phaeosporae)、萱藻科 (Scytosiphonaceae), 广泛分布于我国辽东半岛至广东省海陵岛之间沿海海域, 是一种具有抗氧化<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6-7]</sup>和抗病毒<sup>[8]</sup>等特性的新型经济海藻。目前, 萱藻的育苗和工厂化栽培已初具规模, 极具发展前景。萱藻具有由大型的叶状配子体世代和微小的孢子体世代构成的异形世代交替的生活史, 其中孢子体世代主要有垫状体、类垫状体和丝状体 3 种形式<sup>[9]</sup>。丝状体是萱藻生活史中一个重要的阶段, 可以形成单室孢子囊并释放游孢子, 进而发育成大型的叶状配子体, 因此对具有良好性状的萱藻丝状体加以保存对萱藻种质库的构建和工厂化育苗至关重要。本研究运用液体保存法和胶囊化低温保存法对萱藻丝状体进行保存, 探究了液体保存法中温度、光照强度和胶囊化

收稿日期: 2014-01-11 修回日期: 2014-03-17

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2012AA10A413)

通信作者: 宫相忠, E-mail: gxzhw@163.com

低温保存法中胶球含水量对萱藻丝状体保存后存活率等方面的影响。通过对 2 种萱藻丝状体种质保存技术的探讨,期望实现对萱藻良种进一步开发、利用和长期保存的目的。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

研究所用萱藻丝状体由本实验室萱藻种质库提供。将实验材料置于光照培养箱中扩增培养备用,培养条件为 $(22.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,光强 $86.4 \sim 97.2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,L:D = 14:10,培养液为  $F_1$  培养液<sup>[10]</sup>。

### 1.2 萱藻丝状体的液体保存

**温度实验** 将上述萱藻丝状体用搅拌机打碎至约 400 ~ 500  $\mu\text{m}$  长的小段,用筛绢过滤后再用消毒海水冲洗 2 遍,然后置于吸水纸上除去多余的水分。称取一定量的萱藻丝状体并用  $F_1$  培养液悬浮,使萱藻丝状体的密度达到 1.2 mg/mL。为保证每个锥形瓶中萱藻丝状体的质量相等,先将获得的萱藻丝状体藻液充分摇匀,然后再量取 120 mL 藻液于 150 mL 的锥形瓶中,分别置于 6、12、15、18、21  $^\circ\text{C}$  下培养,其他条件相同,均为 L:D = 12:12,光强 $(5.4 \pm 0.9) \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。每个条件设置 3 个平行样。

实验周期为 60 d,在不更换培养液的条件下,每隔 10 d 用移液器抽取各锥形瓶中藻液 10 mL,每次抽取前要充分摇匀,检测不同条件下 3 个平行样中萱藻丝状体的日增重率,并用 0.1% 的中性红染液染色,鉴定萱藻丝状体细胞的存活率,被染成红色者即为活细胞。存活率和日增重率计算公式如下:

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{活细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100$$

$$\text{日增重率}(\%) = \frac{\frac{\text{结束质量} - \text{起始质量}}{\text{起始质量}}}{\text{实验天数}} \times 100$$

**光强实验** 光强实验设置 5 个梯度,分别为 5.4、16.2、27.0、36.0、45.0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,其他条件为 12  $^\circ\text{C}$ ,L:D = 12:12。每个梯度设置 3 个平行样。

实验方法和检测方法同温度实验。

### 1.3 萱藻丝状体的胶囊化低温保存

**材料的处理** 将本实验室培养的萱藻丝状体用搅拌机打碎至约 400 ~ 500  $\mu\text{m}$  长的小段,用

筛绢过滤并用消毒海水冲洗 2 遍,然后用  $F_1$  培养液悬浮后置于 $(22.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,光强 $42.0 \sim 50.0 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,L:D = 14:10 条件下恢复培养 2 d 即可作为实验材料。

**萱藻丝状体胶球的制备** 取一定量经过恢复培养的萱藻丝状体,滤掉培养液后与 3% 的褐藻酸钠溶液混匀,然后用带有针头的 10 mL 注射器将藻液滴入含有 0.1 mol/L  $\text{CaCl}_2$  的 3% 的 NaCl 溶液中轻轻摇动,约 20 min 后胶球变硬完成包埋过程。通过控制针头与液面的距离以及藻液滴入的速度,可将胶球的直径控制在 3 mm 左右。

**萱藻丝状体胶球的蔗糖预培养、脱水及含水量的测定** 将制备好的胶球滤出后放入 0.4 mol/L 的蔗糖溶液中预培养 6 h,培养完成后用吸水纸吸干胶球表面残余的液体,称量鲜重,然后将 480 个胶球平均放入 8 个直径为 9 cm 的小培养皿中,将小培养皿放在铺有一层干燥硅胶且直径为 15 cm 的大培养皿中,盖上大培养皿盖并用保鲜膜封口,随即放入 21  $^\circ\text{C}$  环境中,在黑暗条件下脱水。脱水 0、1、2、3、4、5、6、7 h 时分别取出 1 个培养皿,称量胶球脱水后的重量,通过烘干(105  $^\circ\text{C}$ ,4 h)可测出胶球的干重。胶球脱水后的含水量计算公式如下:

$$\text{胶球脱水后的含水量}(\%) = \frac{\text{胶球脱水后的质量} - \text{胶球干重}}{\text{胶球鲜重}} \times 100$$

**萱藻丝状体胶球的低温保存、脱固定及存活率的测定** 将经过脱水处理的胶球放入冻存管中,直接投入冰箱中低温(-20  $^\circ\text{C}$ )保存。每隔 10 d 天取出冻存的胶球 15 个,经 40  $^\circ\text{C}$  快速化冻后,放入消毒海水中在黑暗条件下恢复 12 h,然后置于 20 mL 含 0.05 mol/L 柠檬酸钠的 3% 的 NaCl 溶液中脱固定,通过对混合液离心(2 500 r/min,3 min)重新得到萱藻丝状体,用  $F_1$  培养液重新悬浮萱藻丝状体并置于扩增条件下恢复培养 12 h 后,用 0.1% 的中性红染液染色,鉴定萱藻丝状体细胞冻存后的存活率,被染成红色的丝状体细胞即为活细胞。计算公式如下:

$$\text{脱水后的存活率}(\%) = \frac{\text{脱水后活细胞数占细胞总数的比例}}{\text{脱水前活细胞数占细胞总数的比例}} \times 100$$

$$\text{冻存后的存活率}(\%) = \frac{\text{冻存后活细胞数占细胞总数的比例}}{\text{冻存前活细胞数占细胞总数的比例}} \times 100$$

## 2 结果

### 2.1 萱藻丝状体的液体保存

**温度对萱藻丝状体液体保存的影响** 温度对萱藻丝状体的液体保存具有一定的影响。研究发现,萱藻丝状体保存 60 d 后,各温度梯度下的存活率较高,均在 95% 以上。当温度为 6 和 12 °C 时,萱藻丝状体的日增重率随保存时间的延长逐渐增大,保存 60 d 后日增重率分别为 3.08% 和 3.11%;当温度为 15 和 18 °C 时,萱藻丝状体的日增重率都呈现先增大后减小的趋势,但保存 60 d 的过程中日增重率变化并不显著 ( $P > 0.05$ ),分别稳定在 2.52%~2.81% 和 2.37%~2.93% 范围内;此外,在 6、12、15 以及 18 °C,  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下保存 60 d 后的萱藻丝状体细胞原生质体充

盈,颜色呈褐色,与保存前并无差别,说明在  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , 6~18 °C 条件下萱藻丝状体细胞能够健康生长,并且新陈代谢及生长速度较慢,营养物质消耗相对缓慢,有利于保存(表 1)。当温度为 21 °C 时,萱藻丝状体的日增重率在第 10 天达到最大值,且明显高于同期其他温度条件下萱藻丝状体的日增重率 ( $P < 0.05$ ),但之后随保存时间的延长逐渐减小,并且在第 50 天时出现负值,在不更换培养液的条件下,日增重率继续减小,在第 60 天时已降至 -0.92%,另外,萱藻丝状体细胞在色泽上较保存前颜色变浅,说明 21 °C 条件下,细胞代谢以及营养盐的消耗速度较快,不利于萱藻丝状体的液体保存。可见,在实验设置条件下,萱藻丝状体对温度的要求并不严格,6~18 °C 均可实现萱藻丝状体的长期保存。

表 1 温度对萱藻丝状体日增重率的影响

温度/°C temperature	时间/d time					
	10	20	30	40	50	60
6	1.58 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.30 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.08 ± 0.16 <sup>a</sup>
12	2.48 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.49 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.53 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.25 <sup>a</sup>	3.09 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.21 <sup>a</sup>
15	2.52 ± 0.33 <sup>b</sup>	2.63 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.68 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.81 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.28 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.13 <sup>a</sup>
18	2.70 ± 0.20 <sup>b</sup>	2.85 ± 0.34 <sup>a</sup>	2.93 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.75 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.25 <sup>a</sup>
21	3.64 ± 0.23 <sup>c</sup>	1.58 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.15 <sup>b</sup>	-0.38 ± 0.04 <sup>b</sup>	-0.92 ± 0.35 <sup>b</sup>

注:同一列数据中相同字母代表数据之间无显著差异性 ( $P > 0.05$ ),不同字母代表数据之间差异显著 ( $P < 0.05$ ),下同

Notes: the same letters in each column mean no significant differences ( $P > 0.05$ ), the different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ), the same as below

**光照强度对萱藻丝状体液体保存的影响** 光照强度对萱藻丝状体存活率有较大的影响,在所设光强梯度下,萱藻丝状体细胞的存活率均随保存时间的延长逐渐降低(图 1)。当光强为  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,萱藻丝状体保存 60 d 后的存活率仍在 98% 以上,而且细胞在形态和色泽上与保存前差别不大,说明较低的光照强度有利于萱藻丝状体的液体保存;当光强为  $16.2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,萱藻丝状体保存 60 d 后的存活率为 93.51%,虽然与光强为  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),但萱藻丝状体细胞已因缺乏营养变为浅褐色,部分细胞原生质体收缩;当光强为 27.0、36.0、54.0  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,保存后的萱藻丝状体存活率均在 90% 以下,显著低于光强为  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  条件下的存活率 ( $P < 0.05$ ),且光强越高存活率越低,细胞原生质体高度收缩,颜色变浅,并伴有叶状体出现,说明在这

些条件下会导致萱藻丝状体产生单室孢子囊并散孢子,从而对保存产生不利的影响,尤其在  $54.0 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  下培养 60 d 时,存活率已降至 78.92%,且细胞因缺乏营养逐渐中空,颜色呈淡黄色或无色。

光强为  $5.4 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,萱藻丝状体的日增重率呈逐渐增大的趋势,但变化范围不大,各值之间差异并不显著 ( $P > 0.05$ ),说明在该条件下萱藻丝状体细胞生长缓慢,有利于保存;当光强为  $16.2 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,萱藻丝状体的日增重率呈先增大后减小的趋势,且变动范围较大,说明在该条件下,萱藻丝状体细胞在保存的前 20 d 生长较快,第 30 天时已因营养物质不足而代谢和生长速度减慢;当光强高于  $27.0 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  时,萱藻丝状体的日增重率均呈减小的趋势,且日增重率的变化幅度随光强的升高而增大,第 10 天时,日增重率均较高,分别为 6.53%、6.79% 和

7.14%,显著高于同期其他光强条件下萱藻丝状体的日增重率( $P < 0.05$ ),说明在培养的初始阶段,营养盐充足,萱藻丝状体细胞生长较快,但在第60天时已分别降至2.09%、1.46%和1.21%。可见,若保存时间继续延长,日增重率将降为0%。因此,萱藻丝状体细胞在较高的光照强度下代谢快,营养物质消耗较多,不利于种质的长期保存,5.4  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 是保存萱藻丝状体的最适光强(表2)。

## 2.2 萱藻丝状体的胶囊化低温保存

萱藻丝状体胶球在7 h的脱水过程中,脱水速率逐渐减小,整个脱水过程的平均脱水速率为10.73%/h(图2)。

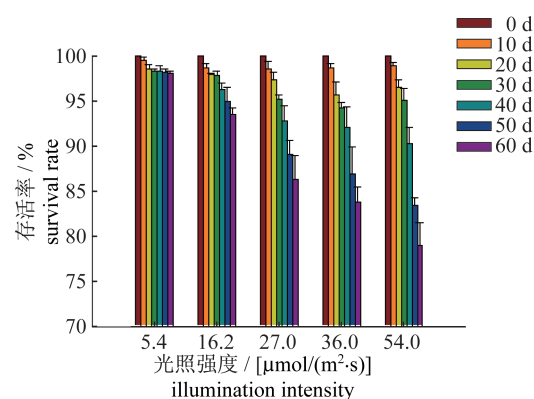


图1 光照强度对萱藻丝状体存活率(%)的影响

Fig.1 Effects of illumination intensity on survival rate of the filaments of *S. lomentaria*

表2 光照强度对萱藻丝状体日增重率的影响

Tab.2 Effects of illumination intensity on rate of weight gain of the filaments of *S. lomentaria* %

光强/[ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ] illumination intensity	时间/d time					
	10	20	30	40	50	60
5.4	2.48 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.49 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.53 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.25 <sup>a</sup>	3.09 ± 0.23 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.21 <sup>a</sup>
16.2	4.96 ± 0.28 <sup>b</sup>	7.27 ± 0.33 <sup>b</sup>	6.72 ± 0.34 <sup>b</sup>	5.88 ± 0.41 <sup>b</sup>	4.57 ± 0.48 <sup>b</sup>	4.07 ± 0.28 <sup>a</sup>
27.0	6.53 ± 0.13 <sup>c</sup>	5.43 ± 0.44 <sup>c</sup>	2.97 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.71 ± 0.37 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.17 <sup>ac</sup>	2.09 ± 0.27 <sup>ab</sup>
36.0	6.79 ± 0.21 <sup>c</sup>	3.91 ± 0.11 <sup>ac</sup>	2.33 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.81 ± 0.25 <sup>ad</sup>	1.46 ± 0.21 <sup>b</sup>
54.0	7.14 ± 0.17 <sup>c</sup>	3.74 ± 0.35 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.91 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.23 <sup>dc</sup>	1.21 ± 0.21 <sup>b</sup>

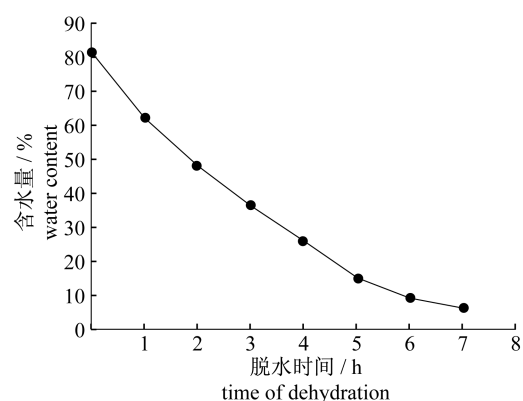


图2 脱水时间与萱藻丝状体胶球含水量的关系

Fig.2 The relationship between dehydration time and water content of the beads of the filaments of *S. lomentaria*

胶球的含水量对萱藻丝状体保存前后的存活率有较大的影响。一方面,经蔗糖预培养的萱藻丝状体胶球抗脱水能力较强,胶球脱水0~5 h,含

水量高于15.02%时,存活率基本在80%以上;当胶球脱水6 h,含水量约为9.26%时,萱藻丝状体冻存前的存活率仍高于50%;但胶球脱水7 h,含水量为6.34%时,萱藻丝状体冻存前的存活率大幅度下降,仅为9.28%。另一方面,当胶球脱水0、1、7 h时,萱藻丝状体冻存30 d后的存活率都为0;当胶球脱水2和6 h时,萱藻丝状体冻存10 d后的存活率分别为28.35%和20.86%,但在第20天时都降至0;当胶球脱水3~5 h,萱藻丝状体在第10天均具有较高的存活率,但随保存时间的延长,存活率逐渐下降,数据显示当胶球脱水5 h,含水量为15%左右时,萱藻丝状体冻存后的存活率变化较小,均在50%左右,冻存30 d后其存活率显著高于其他含水量条件下萱藻丝状体的存活率( $P < 0.05$ ) (表3)。因此,较高和较低的含水量都不利于萱藻丝状体的胶囊化低温保存,15%是萱藻丝状体胶球保存的最佳含水量。

表3 胶球含水量对萱藻丝状体存活率的影响  
Tab.3 Effects of water content of the beads on survival rate of the filaments of *S. lomentaria*

脱水时间/h time of dehydration	存活率/% survival rate			
	冻存前 before cryopreserving	冻存 10 d cryopreserve for 10 days	冻存 20 d cryopreserve for 20 days	冻存 30 d cryopreserve for 30 days
0	95.09 ± 1.54 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
1	93.65 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
2	90.17 ± 2.91 <sup>abc</sup>	28.35 ± 4.22 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
3	84.48 ± 2.18 <sup>bcd</sup>	46.43 ± 4.74 <sup>c</sup>	21.59 ± 1.51 <sup>b</sup>	15.97 ± 4.52 <sup>b</sup>
4	81.27 ± 2.02 <sup>cde</sup>	59.11 ± 2.13 <sup>d</sup>	45.43 ± 4.30 <sup>c</sup>	35.59 ± 2.64 <sup>c</sup>
5	79.40 ± 0.98 <sup>de</sup>	56.71 ± 2.86 <sup>d</sup>	52.59 ± 3.05 <sup>d</sup>	50.25 ± 2.61 <sup>d</sup>
6	50.94 ± 5.09 <sup>f</sup>	20.86 ± 2.92 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
7	9.28 ± 2.49 <sup>g</sup>	0.19 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>

### 3 讨论

研究大型海藻的种质保存技术具有重要意义。目前,国内外学者已成功运用多种方法对大型海藻进行了保存,如裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 配子体的包埋-玻璃化保存<sup>[11]</sup>,条斑紫菜原生质体的玻璃化保存<sup>[12]</sup>以及海带 (*Laminaria japonica*) 配子体和裙带菜配子体的胶囊化超低温保存<sup>[13-15]</sup>等。在目前所有的大型海藻种质保存方法当中,液体保存法是在适宜的温度和光照条件下,利用液体培养基保存海藻细胞的一种较为传统的方法,低温弱光条件下海藻细胞代谢缓慢,能够在一定程度上实现海藻种质的长期保存<sup>[2]</sup>,但不同的种质对温度和光照强度的要求亦有一定的差别。包埋脱水超低温保存法是目前一种较为常规的方法,该方法已被成功运用于多种植物的种质保存<sup>[16]</sup>,包埋脱水-20℃低温保存法是对包埋脱水超低温保存法的改进,保存材料经脱水后不是投入液氮中冻存,而是直接放入-20℃冰箱中保存。这种方法操作简单,无需复杂的低温设备以及会对细胞产生毒性的抗冻保护剂,并且能在最大程度减少污染的情况下长期保持种质的遗传稳定性,因此具有一定的应用前景。

在液体保存法中,温度和光照强度是影响种质保存的关键因素,一般来说,较低的温度和光强有利于种质的长期保存。据报道,坛紫菜丝状体生长的低温极限是7℃<sup>[17]</sup>,本研究发现萱藻丝状体不仅能耐6℃的低温,而且在该温度下生长良好,说明萱藻丝状体细胞具有比坛紫菜丝状体更强的耐低温能力。本研究证明,当光照强度为

5.4 μmol/(m<sup>2</sup>·s)时,温度不是影响萱藻丝状体液体保存的决定性因素,在6~18℃范围内,萱藻丝状体的生长及新陈代谢速度均比较缓慢,消耗的营养物质较少,即使在不更换培养液的情况下保存60d,日增重率仍在2.30%以上,细胞存活率高于97%,细胞在形态和色泽上也与保存前基本一致;但当温度升至21℃时,萱藻丝状体培养至50d时日增重率已出现负值,说明在21℃下藻细胞代谢较快,不利于保存。崔竞进等<sup>[18]</sup>曾初步探究了弱光条件对海带配子体保存的影响,发现不同遗传性的海带配子体对弱光具有不同的反应,并在弱光条件下实现了对海带配子体的长期保存。本研究证明,在12℃条件下,光照强度高于16.2 μmol/(m<sup>2</sup>·s)时,萱藻丝状体细胞代谢较快,保存60d存活率大幅度下降,细胞原生质体收缩,说明较高的光强下细胞光合作用效率增强,细胞的生长及新陈代谢速度加快,营养物质消耗快,需要更换培养液的时间间隔短,增大了种质污染的几率,也将耗费更多的人力和物力。因此,较高的温度和光强会对萱藻丝状体的保存产生不利的影响,6~18℃,光照强度5.4 μmol/(m<sup>2</sup>·s)下细胞生长缓慢,代谢水平低,营养物质消耗慢,可实现萱藻丝状体的长期保存。进一步的研究表明,经液体培养法保存60d的萱藻丝状体能够随时高效、快速的恢复到扩增状态,能够满足萱藻养殖基地规模化育苗的需要。此外,根据实验室保种经验,经液体培养法保存2年的萱藻丝状体仍有很高的存活率,经恢复后具有正常的生长发育能力。但是,关于液体保存法对萱藻种质长期保存的具体影响还有待深入的研究。

本研究采用的胶囊化低温保存法是将脱水后

的材料置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中保存,而不是投入液氮中保存,这是与所报道的胶囊化超低温保存法的主要不同之处。胶球含水量是影响冻存效果的关键因素,细胞须脱水至细胞溶质凝固点充分降到热力学的凝固点以下,才能避免冰晶的形成<sup>[19]</sup>。细胞若未充分脱水,则会在冻存和复苏的过程中遭遇冰晶的伤害而影响冻存效果<sup>[20]</sup>。据报道,用胶囊化低温保存法保存条斑紫菜自由丝状体,其最适含水量为 20% 左右<sup>[3]</sup>。本研究发现,高于 25% 或低于 15% 的胶球含水量都会导致萱藻丝状体冻存后死亡,15%~25% 的含水量可有效提高萱藻丝状体冻存后的存活率。有研究证明,单细胞藻类冻存 1 天与 1 个月的存活率变化不大,但冻存 1 年后,存活率大幅度降低<sup>[21]</sup>。本研究在萱藻丝状体的包埋脱水低温保存中发现,当胶球的含水量为 15% 左右时,萱藻丝状体在保存 30 d 过程中,存活率没有发生显著变化,基本保持在 50% 以上。另一方面,本研究在脱水前对胶球进行了蔗糖预培养,提高了萱藻丝状体的抗脱水能力和耐低温性能,对冻存后的胶球采取了快速化冻的方法,防止了冰晶形成后对细胞的伤害,并将化冻后的胶球置于海水中,在黑暗条件下进行了恢复,这都在一定程度上起到了积极的作用<sup>[22-24]</sup>。

综上所述,一方面,在较低温度和光照强度下,液体保存法可满足对萱藻丝状体种质保存的需要;另一方面,通过控制胶囊化低温保存中胶球的含水量,也可在保持种质遗传稳定性的前提下达到对萱藻丝状体的保存目的。但如何减少萱藻丝状体液体保存中杂藻的污染以及进一步提高胶囊化低温保存后的存活率,仍需进一步探究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Yang Y F, Song J M, Lin X T, *et al.* Seaweed cultivation and its ecological roles in coastal waters [ J ]. *Marine Environmental Science*, 2005, 24 ( 2 ): 77 - 80. [ 杨宇峰,宋金明,林小涛,等.大型海藻栽培及其在近海环境的生态作用.海洋环境科学,2005,24(2):77-80. ]
- [ 2 ] Zhang Y R, Li D P, Yu Z S. Principles and methods on the cryopreservation of macroalgae germplasm [ J ]. *Marine Sciences*, 2009, 33 ( 7 ): 107 - 112. [ 张玉荣,李大鹏,于子山.大型海藻种质保存的原理和方法.海洋科学,2009,33(7):107-112. ]
- [ 3 ] Guo J Y, Yang X L. Preservation of free-living conchocelis of *Porphyra yezoensis* [ J ]. *Food Science*, 2010, 31 ( 7 ): 117 - 122. [ 郭金耀,杨晓玲.条斑紫菜自由丝状体保存研究.食品科学,2010,31(7):117-122. ]
- [ 4 ] Chen C S, Ji D H, Wang Q H, *et al.* Studies on the methods of conservation of conchocelies germplasm of *Porphyra haitanensis* [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2005 29 ( 6 ): 745 - 750. [ 陈昌生,纪德华,王秋红,等.坛紫菜丝状体种质保存技术的研究.水产学报,2005,29(6):745-750. ]
- [ 5 ] Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, *et al.* Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan [ J ]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18 ( 7 ): 625 - 633.
- [ 6 ] Noda H, Amano H, Arashima K, *et al.* Antitumor activity of marine algae [ J ]. *Hydrobiologia*, 1990, 204 - 205 ( 1 ): 577 - 584.
- [ 7 ] Xu N J, Fan X, Han L J, *et al.* Screening marine algae from Shandong coast for antitumor activity [ J ]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2001, 32 ( 4 ): 408 - 413. [ 徐年军,范晓,韩丽君,等.山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选.海洋与湖沼,2001,32(4):408-413. ]
- [ 8 ] Hudson J B, Kim J H, Lee M K, *et al.* Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities [ J ]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 10 ( 5 ): 427 - 434.
- [ 9 ] Xing Y Z, Gong X Z, Yin B S, *et al.* The morphology and life history of *Scytosiphon lomentaria* [ J ]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40 ( 8 ): 98 - 103. [ 邢永泽,宫相忠,尹宝树,等.萱藻不同发育阶段形态学及生活史的研究.中国海洋大学学报:自然科学版,2010,40(8):98-103. ]
- [ 10 ] Gao W, Gong X Z, Zhang B D. Effect of environmental factors on spore releasing of filaments of *Scytosiphon lomentaria* [ J ]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2012, 42 ( 2 ): 244 - 248. [ 高伟,宫相忠,张必达.环境因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体孢子放散的影响.海洋与湖沼,2012,42(2):244-248. ]
- [ 11 ] Wang B, Zhang E D, Gu Y, *et al.* Cryopreservation of brown algae gametophytes of *Undaria pinnatifida* by encapsulation-vitrification [ J ]. *Aquaculture*, 2011, 317 ( 1 - 4 ): 89 - 93.
- [ 12 ] Liu H Q, Yu W G, Dai J X, *et al.* Cryopreservation of protoplasts of the alga *Porphyra yezoensis* by vitrification [ J ]. *Plant Science*, 2004, 166 ( 1 ): 117 - 122.

- 97 - 102.
- [13] Vigneron T, Arbault S, Kass R. Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria Diditata* (L) by encapsulation-dehydration[J]. Cryo-Letters, 1997, 18(2):93 - 98.
- [14] Liu T, Zhang J, Meng X H, *et al.* Studies on of ultralow cryopreserving female gametophytes clone of *Laminaria japonica* [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 28(2):175 - 177. [刘涛, 张静, 孟祥红, 等. 海带雌性配子体克隆细胞的超低温保存实验. 海洋学报: 中文版, 2006, 28(2):175 - 177.]
- [15] Wang Q H, Liu Y P, Zhang E D, *et al.* Cryopreservation of clonal gametophytes of *Undaria pinnatifida* by encapsulation-dehydration [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 27(2):154 - 158. [王起华, 刘艳萍, 张恩栋, 等. 包埋脱水法冷冻保存裙带菜配子体克隆的研究. 海洋学报: 中文版, 2005, 27(2):154 - 158.]
- [16] Wang J H, Bian H W, Huang C N. Advances in research on cryopreservation of plant materials by encapsulation-dehydration method [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1999, 16(5):582 - 586. [王君晖, 边红武, 黄纯农. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. 植物学通报, 1999, 16(5):582 - 586.]
- [17] Ren G Z, Cui G F, Fei X G, *et al.* The effect of temperature on the growth and development of the conchocelis of *Porphyra yezoensis* ueda [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 1979, 10(1):28 - 38. [任国忠, 崔广法, 费修纛, 等. 温度对条斑紫菜丝状体生长发育的影响. 海洋与湖沼, 1979, 10(1):28 - 38.]
- [18] Cui J J, Ou Y L. Preliminary experiment on the preservation of gametophytes of *Laminaria japonica* under low light [J]. Periodical of Ocean University of China, 1979, 1:132 - 137. [崔竞进, 欧毓麟. 弱光保存海带配子体的初步实验. 山东海洋学院学报, 1979, 1:132 - 137.]
- [19] Stillinger F H. Topographic view of supercooled liquids and glass formation [J]. Science, 1995, 267(5206):1935 - 1939.
- [20] Day J G, Fleck R A, Benson E E. Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury [J]. Journal of Applied Phycology, 2000, 12(3 - 5):369 - 377.
- [21] Chen G Y, Que Q D. The cryopreservation of spores of several red algae [J]. Tropic Oceanology, 1989, 8(1):67 - 72. [陈国宜, 阙求登. 几种红藻孢子的超低温保存. 热带海洋, 1989, 8(1):67 - 72.]
- [22] Zhang Q S, Cong Y Z, Qu S C, *et al.* Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria japonica* (Phaeophyta) using encapsulation-dehydration with two-step cooling method [J]. Journal of Ocean University of China, 2008, 7(1):65 - 71.
- [23] Taylor R, Fletcher R L. Cryopreservation of eukaryotic algae-a review of methodologies [J]. Journal of Applied Phycology, 1998, 10(5):481 - 501.
- [24] Wang Q H, Li Y, Liu Y P, *et al.* Cryopreservation of *Nitzschia closterium minutissima* by encapsulation-dehydration [J]. Marine Sciences, 2006, 30(4):50 - 53. [王起华, 李莹, 刘艳萍, 等. 用包埋脱水法冰冻保存小新月菱形藻. 海洋科学, 2006, 30(4):50 - 53.]

## Studies on the preservation technology of filaments of *Scytosiphon lomentaria*

ZHUANG Yan<sup>1</sup>, GONG Xiangzhong<sup>1</sup>, ZHANG Wenjian<sup>1</sup>, GAO Wei<sup>1</sup>, ZHANG Bida<sup>2</sup>

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Changdao Aihua Seaweed Foodstuff Co., Ltd., Yantai 265800, China)

**Abstract:** In the present research, the effects of temperature and illumination intensity in liquid preservation as well as the water content of the beads in encapsulation cryopreservation on the preservation of the filaments of *S. lomentaria* were studied, mainly to find out some appropriate techniques and the optimal situations to realize the effective preservation of germplasm of *S. lomentaria*. The filaments of *S. lomentaria* were preserved under various temperature and illumination intensity in the incubator for 60 days in liquid preservation. In encapsulation cryopreservation, filaments of *S. lomentaria* were stored in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  refrigerator for 30 days after being encapsulated into the beads and dehydrated with silica gel. The experimental results showed that: (1) In liquid preservation, temperature was not the key factor on the preservation of the filaments of *S. lomentaria*, and the filaments of *S. lomentaria* could achieve long-term preservation under the condition of  $5.4\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ,  $6 - 18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; (2) The illumination intensity had a significant impact on the liquid preservation of the filaments of *S. lomentaria*, any illumination intensity higher than  $16.2\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  was not conducive to the preservation of the germplasm,  $5.4\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  was the most helpful condition; (3) After being preserved at  $6 - 12\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and  $5.4\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  for 60 days, the cells of the filaments of *S. lomentaria* were still in good condition and the survival rates were higher than 97%; (4) The survival rates of the filaments of *S. lomentaria* after encapsulation cryopreservation were reduced whether the water content of the beads was too high or too low, and 15% was the optimal water content at which the survival rate of the filaments of *S. lomentaria* preserved for one month could still be higher than 50%. The research demonstrated that, in appropriate situations, filaments of *S. lomentaria* could be successfully preserved both by the methods of liquid preservation and encapsulation cryopreservation.

**Key words:** *Scytosiphon lomentaria*; filaments; temperature; illumination intensity; liquid preservation; encapsulation cryopreservation

**Corresponding author:** GONG Xiangzhong. E-mail: gxzhw@163.com