

冷藏保护剂对坛紫菜幼苗冷藏效果的影响

陈昌生, 翁琳, 纪德华, 谢潮添, 储修好, 徐燕, 柳佩娟, 王凤霞

(集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:对采用不同冷藏保护剂保护的坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)幼苗,经不同冷藏时间后的存活与生长发育情况进行研究,探讨影响冷藏效果的一些相关因素。结果显示:(1)在常温下,不同浓度梯度的胞内保护剂(甘油、DMSO)比胞外保护剂(葡萄糖、蔗糖)对坛紫菜幼苗成活的影响大,幼苗分别在20% DMSO和35%甘油中培养48 h,其成活率为15%和0%;(2)从单一冷藏保护剂的作用来看,甘油的冷冻保护效果优于DMSO,幼苗在20%~25%甘油保护剂作用下冷藏30 d,成活率为100%,冷藏90 d的成活率为25%~35%;葡萄糖和蔗糖作为单一的冷藏保护剂,冷藏15 d后幼苗全部死亡;(3)甘油+DMSO两种胞内保护剂混合冷藏30 d,成活率为85%;(4)甘油+DMSO+葡萄糖不同浓度组合的冷藏效果较好,冷藏180 d后仍达到95%以上的成活率;(5)盐度和藻体细胞壁的厚度与冷藏效果有关。当盐度为25时,冷藏藻体的细胞成活率高于其他盐度实验组;藻体细胞壁的厚薄对保存效果有影响,同一品系的藻体,细胞壁厚的比细胞壁薄的细胞更耐低温,成活率较高;(6)同株藻体不同部位冷藏30 d后成活率存在差异。[中国水产科学,2007,14(3):450—456]

关键词:坛紫菜;低温冷藏;保护剂;成活率;生长

中图分类号:S968

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)03-0450-07

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是中国南方重要的紫菜养殖品种,约占全国紫菜养殖总产量的80%。目前,藻类学者对坛紫菜及其他藻类的冷藏保种开展了相关方面的研究。陈国宜等^[1-2]报道了几种条斑紫菜果孢子在不同保护剂作用下成活率的变化,以及单独使用DMSO超低温保存坛紫菜果孢子和其他红藻孢子的效果。Bajai^[3]报道了同种保护剂对不同藻类孢子的冷冻效果不同。王汉清等^[4]对条斑紫菜冷藏网开展了研究。

紫菜的孢子比较小,一般为十几微米,冷冻时不容易操作与观察,若用幼芽或幼苗作为冷藏对象容易判断藻体的成活。目前,坛紫菜叶状体幼苗通常采用阴干低温冷藏,但是在实验室内进行坛紫菜遗传育种研究时,经常需要大批量处理每次实验结束后的幼芽或幼苗。由于幼苗比较小且较脆弱,冷冻前的分离和阴干工作比较麻烦、工作量大。能否采用幼苗带水直接冷藏,并达到与叶状体阴干冷藏相同的效果,已经引起藻类学者的关注。目前,有关紫菜叶状体的鲜活带水冷藏,尚未见过报道。笔者通过在海水

中添加冷藏保护剂,提高幼苗冷藏过程中的成活率,旨在解决目前幼苗阴干低温冷藏方式存在的不足。本研究探讨了坛紫菜幼苗的冷藏保护剂对其成活和生长的影响,旨在为坛紫菜的低温生物学研究和叶状体冷藏应用研究提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

由集美大学水产学院坛紫菜种质改良实验室提供的野生选育品系1和改良型品系2。挑选藻体完整、颜色正常、有光泽、弹性好、无烂孔的3 cm左右长度的健康幼苗作为实验材料。

1.2 坛紫菜幼苗在不同保护剂作用下的存活实验

实验用的冷藏保护剂分为胞内与胞外保护剂2类:前一类包括甘油和二甲基亚砜(DMSO),后一类为葡萄糖和蔗糖。将甘油、DMSO和葡萄糖分别溶解于盐度为28的过滤海水中,其质量分数设为0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%。然后在常温下加入坛紫菜叶状体进行存活的预实验,根

收稿日期:2006-08-21; 修订日期:2006-11-20.

基金项目:国家海洋“863”资助项目(2006AA10A413);福建省科技重大专项资助项目(2004NZ03).

作者简介:陈昌生(1957-),男,教授,主要从事水产增养殖与育种技术的研究. E-mail:cschen@jmu.edu.cn

据其存活的情况确定各保护剂的适宜浓度范围。培养条件为:温度 20~21 ℃,光照 2 000~2 500 lx。

1.3 单一保护剂的冷藏实验

根据上述 1.2 的实验结果,甘油的质量分数设为 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%;DMSO 的质量分数设为 5%、10%、15%、20%;每组的实验藻体为 30 株。幼苗长度测定后,分别投入不同浓度保护剂中,迅速转入-20 ℃冰箱中冷藏,冷藏时间为 15 d、30 d 和 90 d。冷藏后迅速将紫菜幼苗在 20 ℃水浴中解冻复温,然后在 20℃、光照强度 3 000 lx 左右的恒温光照培养室下进行单株培养,每隔 2 d 更换培养液 1 次,每次更换 1/2~2/3,每 5 天测量藻体的长度和质量各 1 次。同时,采用中性红染色,通过镜检观察其细胞死亡数量判定其细胞成活率^[5]。以上实验均设置了 2 个平行组,并且每组进行一次重复实验。

1.4 二种胞内保护剂(甘油和 DMSO)混合冷藏实验

以甘油和 DMSO 两种胞内保护剂的 3 种浓度进行混合冷藏实验,其浓度与混合方式见表 1。冷藏时间设为 15 d、30 d 和 90 d。藻体的处理方式同 1.3。

1.5 胞内与胞外保护剂(甘油+DMSO+葡萄糖)的混合冷藏实验

从上述的实验中挑选适宜的甘油+DMSO 混合浓度与胞外保护剂(葡萄糖)混合,分别设为混合 1~混合 4(Mix₁~Mix₄),共 4 组(表 1),冷藏时间设 15 d、30 d、90 d、180 d、360 d。

表 1 混合保护剂的成分构成

Tab. 1 Composition of mix cryoprotectant %			
分组 Group	甘油 Glycerin	二甲亚砜 DMSO	葡萄糖 Glucose
Mix ₁	10	5	15
Mix ₂	10	10	15
Mix ₃	15	15	15
Mix ₄	10	10	20

1.6 不同盐度的冷藏实验

分别用盐度为 15、20、25、30 和 35 的海水配制 20%甘油和 10% DMSO,以不加保护剂的各个盐度海水作为对照,冷藏 30 d 后观察藻体细胞成活率。

1.7 不同品系和不同藻体部位冷藏实验

20%甘油和 10% DMSO 各自单独作为保护剂,海水的盐度为 28,选择坛紫菜的厚叶和薄叶品

系(品系 1 和品系 2),分别选取长度为 1 cm、10 cm、50 cm 和 100 cm,冷藏前测定相应大小藻体细胞厚度以及细胞壁厚度。取相应藻体的基部、中部和尖部进行冷藏实验,并且以不加保护剂的海水作为对照,冷藏 30 d 后观察藻体细胞成活率。

1.8 数据的计算及处理

按如下方法进行成活率统计,随机抽取的藻体用中性红染色,染成红色的为活细胞,未染色的为死亡细胞^[5]。其中,将藻体基部不溃烂,90%以上细胞能够继续生长视为藻体存活。观察的藻体基部和中部细胞数为 300 个以上。鲜质量以纱布吸干藻体表面水分所测质量为准。数据分析采用 SPSS for Window 统计软件。

计算公式:

$$\text{①平均日增长量} = (E_t - E_0) / t;$$

$$\text{②平均日增长率} = [(E_t / E_0)^{1/t} - 1] \times 100\%;$$

$$\text{③平均日增重} = (W_t - W_0) / t;$$

$$\text{④平均日增重率} = [(W_t / W_0)^{1/t} - 1] \times 100\%;$$

$$\text{⑤细胞成活率} = \text{成活细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$$

t :两次测量的间隔时间,天; E_t :培养 t 天后的藻体长度; E_0 :初始藻体长度; W_t :培养 t 天后的藻体鲜质量; W_0 :藻体的初始鲜质量。

2 结果与分析

2.1 不同保护剂对坛紫菜细胞存活的影响

坛紫菜幼苗在 20% DMSO 作用下,6 h 内出现较低的成活率,48 h 后成活率降至 15%;与 DMSO 相似,35%的甘油是影响成活率的起始浓度,1 h 后紫菜就出现部分死亡,成活率为 80%,48 h 后幼苗全部死亡;15%~40%质量分数的葡萄糖对幼苗细胞成活率没有影响(表 2)。

2.2 单一保护剂冷藏实验

2.2.1 不同保护剂冷藏保护后坛紫菜幼苗细胞的成活率 不加保护剂直接冷藏紫菜幼苗,细胞全部死亡(表 3)。加入保护剂后,细胞成活率明显提高。冷藏 30 d 时,甘油的冷藏保护效果优于 DMSO。20%和 25%甘油下藻体细胞的成活率为 100%,冷藏 90 d 后,成活率降至 35%和 25%;DMSO 浓度为 5%和 10%的实验组,幼苗冷藏 30 d 时细胞的成活率仅分别为 57.5%和 40%,15% DMSO 实验组藻体细胞全部死亡;单一加入葡萄糖作为胞外保护剂冷藏幼苗,冷藏 15 d 后细胞全部死亡。

表2 3种保护剂在不同作用时间内对细胞成活率的影响

Tab. 2 Cells viability of *P. haitanensis* under three cryoprotectant in different reaction time

%

保护剂 Cryoprotectant	质量分数/% Concentration	作用时间/h Action time								
		1	3	6	12	24	48	72	96	120
甘油 Glycerin	15	100	100	100	100	100	100	100	100	100
DMSO		100	100	100	95	95	95	95	95	90
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100
甘油 Glycerin	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
DMSO		100	100	100	90	80	80	50	0	0
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100
甘油 Glycerin	25	100	100	100	100	100	100	100	100	100
DMSO		100	100	100	90	80	80	50	0	0
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100
甘油 Glycerin	30	100	100	100	100	100	100	100	100	100
DMSO		50	50	50	30	30	15	10	0	0
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100
甘油 Glycerin	35	100	100	90	90	40	30	0	0	0
DMSO		0	0	0	0	0	0	0	0	0
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100
甘油 Glycerin	40	100	90	90	80	40	0	0	0	0
DMSO		0	0	0	0	0	0	0	0	0
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100
甘油 Glycerin	45	80	80	60	40	40	0	0	0	0
DMSO		0	0	0	0	0	0	0	0	0
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100
甘油 Glycerin	50	80	80	50	0	0	0	0	0	0
DMSO		0	0	0	0	0	0	0	0	0
葡萄糖 Glucose		100	100	100	100	100	100	100	100	100

表3 加入各种保护剂冷藏后坛紫菜叶状体细胞成活率

Tab. 3 Cell viability of *P. haitanensis* after cold storage in different cryoprotectant

%

保护剂 Cryoprotectant	冷藏时间/d Storage time	保护剂质量分数/% Concentration								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
甘油 Glycerin	15	0	0	35	60	100	100	65	35	0
	30	0	0	0	65	100	100	40	0	0
	90	0	0	0	0	35	25	10	0	0
二甲亚砜 DMSO	15	0	65	100	95	0	0			
	30	0	57.5	40	0	0	0			
	90	0	50	0	0	0	0			

2.2.2 不同冷藏保护剂对坛紫菜幼苗生长的影响

图1、2、3、4是幼苗在不同浓度的DMSO和甘油中冷藏15 d、30 d、90 d后,分别经过培养1~5 d和6~10 d的生长数据。可以看出,DMSO组冷藏15 d后,10%浓度组的平均长度日增长量和平均日增重高于其他浓度组。随着冷藏时间越长,其平均日

生长量和平均日增重逐渐减小。从图3、4可知,甘油组冷藏15 d后,25%浓度组藻体的平均日增长量和平均日增重高于其他浓度组。15%甘油组在冷冻30 d后细胞死亡较多,冷冻90 d藻体细胞全部死亡。根据SPSS统计分析结果,不同浓度保护剂冷藏后幼苗生长的差异极显著($P < 0.01$)。

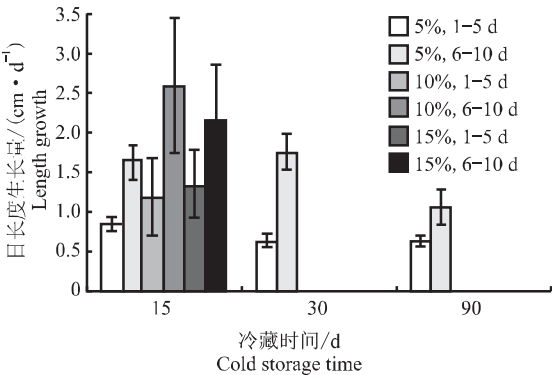


图 1 不同浓度 DMSO 冷藏保护后坛紫菜的日长度生长量

Fig. 1 Length growth of *P. haitanensis* after cold storage at different concentration of DMSO

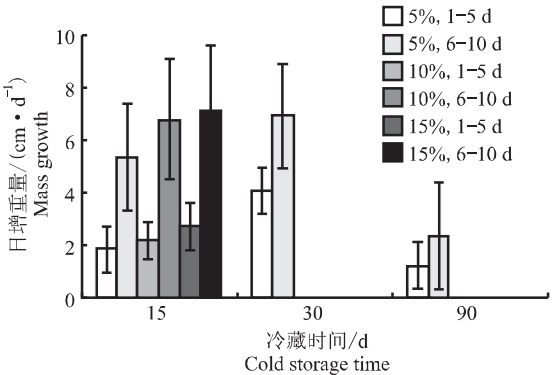


图 2 不同浓度 DMSO 冷藏保护后坛紫菜的日增重量

Fig. 2 Mass growth of *P. haitanensis* after cold storage at different concentration of DMSO

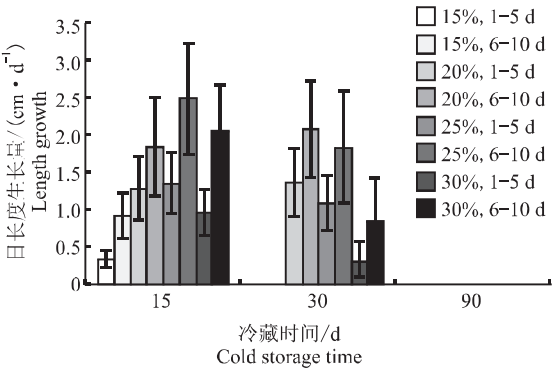


图 3 不同浓度甘油冷藏保护后坛紫菜的日长度生长量

Fig. 3 Length growth of *P. haitanensis* after cold storage at different concentration of glycerin

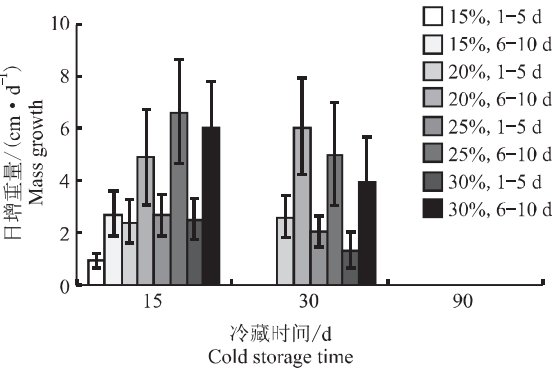


图 4 不同浓度甘油冷藏保护后坛紫菜的日增重量

Fig. 4 Mass growth of *P. haitanensis* after cold storage at different concentration of glycerin

2.3 甘油+DMSO 混合冷藏保护剂的保护效果

20%甘油和 5%DMSO 混合冷藏后藻体生长良好,冷藏 30 d 藻体成活率为 85%,5%甘油和 5%

DMSO 混合冷藏后生长效果较差,冷藏 30 d 时成活率为 35%(表 4)。

表 4 保护剂甘油+DMSO 混合冷藏保护后坛紫菜的细胞成活率与生长

Tab. 4 Cell viability and growth of *P. haitanensis* after cold storage in mix cryoprotectant(DMSO plus glycerin)

DMSO/%	冷藏 时间/d Storage time	5%甘油 Glycerin			10%甘油 Glycerin			20%甘油 Glycerin		
		成活率/%	日增长	日增重/g	成活率/%	日增长	日增重/g	成活率/%	日增长	日增重/g
		Surviral rate	度/cm Daily growth	Daily gain	Surviral rate	度/cm Daily growth	Daily gain	Surviral rate	度/cm Daily growth	Daily gain
5	15	60	0.153	0.031	23	0.097	0.190	100	0.245	0.551
	30	35	0	0.013	0	0	0	85	0.187	0.265
10	15	68	0.200	0.408	90	0.227	0.444	35	0.035	0.288
	30	10	0	0	80	0.114	0.028	0	0	0
15	15	63	0.184	0.378	58	0.154	0.360	80	0.159	0.040
	30	5	0	0	30	0.019	0.022	45	0.159	0.032

2.4 甘油+DMSO+葡萄糖混合冷藏保护剂的保护效果

混合保护剂冷藏 30 d 后藻体成活率较高(图 5), Mix_1 、 Mix_2 、 Mix_3 和 Mix_4 组的成活率依次为 100%、97%、95% 和 100%; 经过 90 d 和 180 d 冷藏后, Mix_1 、 Mix_2 、 Mix_4 组的细胞成活率远高于 Mix_3 组。在生长方面, 随着冷藏时间的延长, 各组的生长速度相应减小。冷藏 180 d 后, Mix_3 在恢复培养时藻体溃烂严重(图 6、7)。

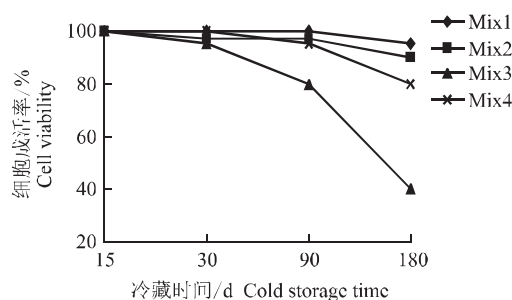


图 5 不同混合保护剂冷藏保护后坛紫菜细胞的成活率
Fig. 5 Viability of *P. haitanensis* cells in different mix cryoprotectant

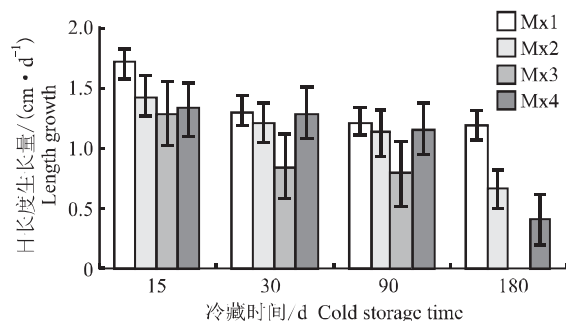


图 6 不同混合保护剂冷藏保护后坛紫菜的日长度生长量
Fig. 6 Length growth of *P. haitanensis* in different mix cryoprotectant

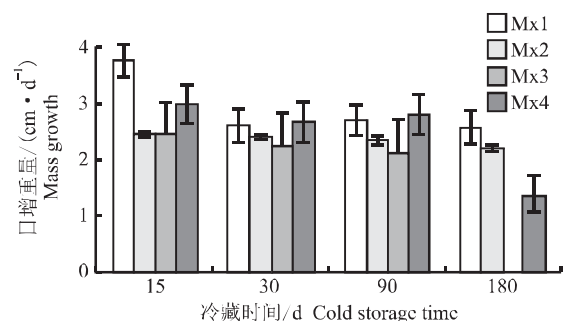


图 7 不同混合保护剂冷藏保护后坛紫菜的日增重量
Fig. 7 Mass growth of *P. haitanensis* in different mix-cryoprotectant

2.5 不同盐度对冷藏效果的影响

在盐度 25 时, 甘油组藻体的细胞成活率高达 90%, 盐度 20 时成活率降为 80%; 盐度 15 和 35 时细胞成活率较低, 而各盐度下不加冷藏保护剂的组细胞成活率多数为 0(表 5)。

表 5 不同盐度及不同保护剂冷藏下藻体细胞的成活率
Tab. 5 Cell viability of *P. haitanensis* after cold storage in different cryoprotectant and salinity %

盐度 Salinity	分组 Group		
	对照 Control	10%二甲亚砜 10% DMSO	20%甘油 20% Glycerin
15	0	0	60
20	0	25	85
25	5	30	90
30	0	30	60
35	0	25	40

2.6 将藻体的不同部位冷藏对藻体成活率的影响

由于藻体不同部位细胞大小和细胞壁厚度不一, 导致冷冻后细胞成活率存在差异。由表 6 可见, 细胞壁厚的藻体细胞成活率高于细胞壁薄的藻体; 即使同一株藻体, 不同部位冷藏 30 d 后成活率也存在差异, 基部成活率大于尖部。同时实验还发现, 不同品系冷藏效果也不一致, 甘油对品系 1 的冷藏效果优于品系 2。对照组基部细胞壁厚, 冷藏成活率高达 70%。

3 讨论

3.1 不同冷藏保护剂的作用

很多学者认为低温冷冻伤害来自细胞内外水在降温过程中结冰而产生的机械损伤。在冰点温度下, 随着时间的延长, 冰晶不断生长。当冰晶生长到足够大时, 会刺穿细胞膜, 使细胞破裂死亡。国内外学者对一些藻类的孢子开展了一系列超低温保存的研究^[6-15]。冷藏保护剂分为胞内保护剂和胞外保护剂。胞内保护剂(甘油、DMSO 等)又称是渗透性保护剂, 其特点是很快渗入细胞, 然后占有细胞容积。胞外保护剂(葡萄糖等)的作用是增加胞外溶液黏性, 减缓细胞脱水速度, 从外界环境避免细胞脱水过度, 从而提高细胞的成活率^[5]。鲜湿的坛紫菜幼苗不加保护剂直接冷藏, 在数天内, 细胞就大量死亡。而冷藏时加入甘油或 DMSO, 细胞的成活率就明显提高。甘油和 DMSO 对坛紫菜幼苗细胞成活率的影响不同, 在相同的浓度和作用时间内, 甘油的

毒性作用较 DMSO 小。胞外保护剂—葡萄糖,在常温下对坛紫菜幼苗成活率影响较小,即使在 40%葡萄糖浓度下培养 120 h,也未发现细胞死亡;但是,鲜湿的坛紫菜幼苗在低温冷藏时加入单一的葡萄糖作为保护剂,对细胞不起保护作用,冷藏 15 d 后细胞全部死亡。此外,根据实验的结果,单独使用 DMSO 冷藏 90 d,细胞全部死亡,单独使用甘油也

只能存活 30 d,可以看出仅仅使用胞内保护剂效果也不理想。虽然胞外保护剂—葡萄糖,单独使用不能起到保护细胞存活的作用,可是当它与胞内保护剂混合使用时,其作用就会显著增强。本实验混合使用 2 种保护剂,冷藏幼苗 6 个月以上,成活率高达 95%,冷藏 1 年以上成活率仍达到 85%以上。

表 6 藻体的不同部位细胞特征及在不同保护剂冷藏后的成活率

Tab. 6 The cells variety of <i>P. haitanensis</i> with different size cell-wall after cold storage in different cryoprotectant							
品系 Strain	长度/cm Size	部位 Part	细胞厚度/ μm Cell width	细胞壁厚度/ μm Cell wall width	成活率/% Survival rate		
					对照 Control	10% DMSO	20%甘油 Glycerin
品系 1 Strain1	100	基部 Root	50	11.25	70	99	85
		中部 Midst	32.5	3.75	35	95	82.5
		尖部 Tip	27.5	2.5	0	80	55
	50	基部 Root	42.5	7.5	35	99	100
		中部 Midst	25	3.75	0	92.5	80
		尖部 Tip	25	2.5	0	87.5	80
	10	基部 Root	42.5	7.5	15	50	99
		中部 Midst	30	3	0	0	99
		尖部 Tip	22.5	2.5	0	0	95
	1	基部 Root	35	5	0	10	87.5
		中部 Midst	22.5	2.5	0	0	75
		尖部 Tip	22.5	2.5	0	0	70
品系 2 Strain2	100	基部 Root	43.75	8.75	0	95	95
		中部 Midst	25	3.75	0	95	65
		尖部 Tip	20	1.25	0	95	60
	50	基部 Root	40	7.5	0	99	80
		中部 Midst	30	3.75	0	95	5
		尖部 Tip	27.5	2.5	0	95	0
	10	基部 Root	22.5	3	0	97	0
		中部 Midst	22.5	3	0	95	0
		尖部 Tip	21.5	1.25	0	90	0
	1	基部 Root	20	2.5	0	100	40
		中部 Midst	17.5	2.5	0	95	0
		尖部 Tip	17.5	1.25	0	90	0

3.2 保护剂的盐度大小与冷藏的关系

在保护剂的溶剂方面,尚未有人考虑溶剂的海水盐度大小。如何根据不同海藻的生态习性来确定适盐范围,以达到良好的冷藏效果,这是值得探讨的问题。本实验针对坛紫菜适应盐度的高低进行冷藏效果的探讨。实验结果表明,盐度 25 组具有较好的冷藏效果。一般情况下,紫菜处于高盐度时,细胞会脱水收缩;处于低盐度时,细胞会吸水膨胀。本实验

将藻体置于用盐度 25 的海水配制的保护液中,在冷冻过程中起到很好的保护作用;然而当盐度低于 15,致使细胞结冰前吸水,细胞内冰晶体增多,从而降低了结冰后保护剂的作用。

3.3 藻体细胞壁的厚薄与冷藏的关系

早期紫菜细胞壁比较薄,纤维含量低;中后期紫菜细胞壁中的纤维含量增多,细胞壁逐渐增厚。此外不同物种和不同品系的紫菜细胞壁也不一样。条

斑紫菜的藻体厚度一般为20~35 μm ,坛紫菜为40~80 μm ;同一株藻体,往往是日龄越大,细胞壁越厚。从本实验的结果可以看出,不同细胞壁厚度的藻体,冷藏效果不一样;改良型的坛紫菜品系2,细胞壁一般为2.5~8.7 μm ,冷藏对细胞冻害的影响较大;对于细胞壁较厚的品系1(细胞壁厚5~11 μm),冷藏的成活率高于品系2。此外,藻体越老、细胞壁越厚,保护剂对其冷藏的保护效果就越好。这一点,从同株藻体的细胞壁厚薄冷藏的实验可以看出(表6),藻体基部细胞的厚度一般比中上部细胞厚35%~65%,冷藏的成活率也高出15%~30%。

参考文献:

- [1] 陈国宜,阙求登.红藻-坛紫菜果孢子的液体保存[J].植物生理通讯,1988(2):32-34.
- [2] 陈国宜,阙求登.几种红藻孢子的超低温保存[J].热带海洋,1988,8(1):67-72.
- [3] Bajai Y P S. Technology and prospects of cryopreservation germplasts[J]. Euphytica, 1979, 88: 267-285.
- [4] 王汉清,吉传礼,张礼明,等.条斑紫菜冷藏网栽培试验[J].水产养殖,1997(6):19-20.
- [5] 王素娟.海藻生物技术[M].上海:上海科技出版社,1994.
- [6] 王起华,张恩栋,李大鹏,等.盐生杜氏藻和青岛大扁藻的超低温保存[J].植物学报,2000,42(4):399-402.
- [7] 潘克厚,朱葆华.微藻的保种技术及其应用[J].青岛海洋大学学报,2002,32(3):403-408.
- [8] 王起华,张恩栋,王冰,等.两种海洋饵料硅藻的超低温保存[J].辽宁师范大学学报,1999(22):310-314.
- [9] 李纯,李军,薛钦昭.海洋生物种质细胞低温保存与机理[J].海洋科学,2000(24):12-15.
- [10] 马志珍,张继红.海产饵料微藻超低温保种技术的研究[J].中国水产科学,1997,4(4):13-17.
- [11] 王起华,石若夫,程爱华.3种饵料金藻的超低温保存研究[J].中国水产科学,1999,6(2):89-92.
- [12] Holm-Hanson O. Viability of blue-green algae after freezing[J]. Physical Plant, 1963, 16: 530-539.
- [13] Norman M S. The preservation of salt malt alga by controlled Liquid nitrogen freezing[J]. Cryobiol, 1978, 15: 563-588.
- [14] Sakai, A. Cryopreservation of apical meristem[J]. Horticult. Rev, 1984, 6: 357-372.
- [15] Tsuru S. Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying[J]. Cryobiol, 1973, 10: 445-452.

Effects of cryoprotective agent on cold storage of *Porphyra haitanensis* larva

CHEN Chang-sheng, WENG Lin, JI De-hua, XIE Chao-tian, CHU Xiuhao, XU yan, LIE Pei-juan, WANG Feng-xia

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: This article reports the cell survival and growth of *Porphyra haitanensis* after different cold storage time using different cryoprotectants, and discusses some correlative factors which may affect storage effect. Results are as follows: (1) In normal temperature, there was lower cell survival of *P. haitanensis* at different concentrations of Glycerin and DMSO than that of Glucose and Sucrose. *P. haitanensis* were cultured in 20% DMSO and 35% Glycerin, and the survival rates were 15% and 0%, respectively. (2) Refrigerated in Glycerin, it had higher survival rate than at the same concentration of DMSO. Refrigerated in Glycerin for 30 d, the survival rate was 100%; refrigerated in Glycerin for 90 d, the survival rate was 25%—35%. Refrigerated in Glucose and Sucrose for 15 d, the survival rate was 0%. (3) Refrigerated in combination of DMSO and Glycerin for 30 d, the survival rate was 85%. (4) Different combination of DMSO, Glycerin and Glucose showed relatively good refrigeration effect. After 180 d refrigeration, the cell survival rate got to 95%. (5) Salinity and thickness of cell wall had some bearing on refrigeration effect. When salinity was 25, the cell viability was comparably higher than that at other salinity. The thickness of cell wall had some impact on the storage effect. In the same strain, the cells with thick cell wall possessed stronger low-temperature resistance and higher survival rate than those with thin cell wall refrigerated for 30 d. (6) In the different part of the same plant, some difference of survival rate also existed after refrigeration for 30 d. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 450—456]

Key words: *Porphyra haitanensis*; cold storage; cryoprotective agent; survival rate; growth