



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

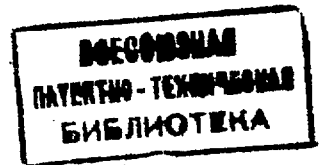
(19) SU (11) 1694084 A1

(51)5 A 01 G 33/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



1

- (21) 4648508/13
(22) 29.12.88
(46) 30.11.91. Бюл. № 44
(71) Институт физиологии растений АН СССР и Северное отделение Полярного института рыбного хозяйства и океанографии
(72) В.И.Мелетьев, О.А.Пронина, А.С.Попов и Р.Г.Бутенко
(53) 584(088.8)
(56) Wan der Meer J.P. et al. Cryopreservation of *Gracilaria tikvahial* (Rhodophyta) and the other macrophytic marine algae - phycologist. 1984, v.123, № 2, p. 195-202.
(54) СПОСОБ ХРАНЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ТАЛЛОМОВ АНФЕЛЬЦИИ С КАРПОСПОРАМИ
(57) Изобретение относится к марикультуре водорослей-макрофитов, а именно к методам хранения и посадки их посевного мате-

2

риала, и может быть использовано при лабораторном и промышленном выращивании водорослей. Целью изобретения является повышение выхода жизнеспособных карпоспор. Выделенные фрагменты талломов с карпоспорами помещают в контейнеры, добавляют диметилсульфоксид с концентрацией сахарозы от 10 до 20%, охлаждают контейнеры со скоростью 0,4-0,5°C/мин. По достижении температуры заморозки раствора осуществляют инициацию образования кристаллов льда, после чего стабилизируют температуру среды, окружающей контейнера, на время, необходимое для выравнивания температуры внутри и снаружи контейнера. Затем контейнеры помещают в жидкий азот и хранят необходимое время. После этого проводят оттаивание контейнера и разбавление криопротектора. 2 табл.

Изобретение относится к марикультуре водорослей - макрофитов, а именно к методам хранения и посадки их посевного материала, в частности спороносных зон талломов, и может быть использовано в лабораторном и промышленном выращивании этих водорослей, а также в селекции новых их форм с целью получения сверхпродуктов и резкого увеличения съема продукции с плантаций и в промышленных цехах.

Морские водоросли - макрофиты таксономически относятся к нескольким разным типам низших растений и отличаются сложным длительным онтогенезом с неоднократным чередованием полового и бесполого размножения и сменой гаметофитного и

спорофитного поколений. Цикл развития занимает несколько лет, а пик выхода карпоспор в условиях естественных зарослей продолжается у анфельции не более двух недель, причем не одновременно у разных растений, и карпоспоры в первые же часы прикрепляются к песку дна, иначе они погибают. Все это затрудняет марикультуру и в особенности лабораторно-промышленное выращивание этих растений и селекционно-генетическую работу с ними. Между тем потребность в такой работе большая, так как природные запасы наиболее ценных для человека видов уже истощены. Это полностью относится и к *Anfeltia plicata*, принадлежащей к типу красных водорослей

(Rhodophyta) и являющейся единственным источником агар-агара – студнеобразующего вещества – важного и дефицитного сырья для медицинской, пищевой и кондитерской промышленности.

Целью изобретения является повышение выхода жизнеспособных карпоспор.

Способ осуществляют следующим образом.

Собирают спороносящие растения анфельции, выделяют фрагменты талломов с карпоспорами, помещают их в контейнер, добавляют раствор криопротектора – диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрации 11,7% с сахарозой в концентрации 10–20%, охлаждают контейнеры со скоростью 0,4–0,5°C/мин. После достижения температуры заморзания раствора инициируют образование кристаллов льда с последующей стабилизацией температуры среды, окружающей контейнеры, на период времени, необходимый для выравнивая температуры внутри и снаружи контейнера. После этого контейнеры помещают в жидкий азот и хранят необходимое время. После этого проводят оттаивание контейнеров и последующее разбавление криопротектора.

По завершении этих операций фрагменты талломов готовы к высаживанию и проращиванию.

Пример. Отбирают женские растения со спорангиями – нематециями в период массового созревания и выхода карпоспор. Талломы растений затем содержат в естественной, постоянно аэрируемой морской воде при 4–8°C и освещении 1500–2000 лк белым светом люминесцентных ламп. Вырезают фрагменты талломов диаметром 0,8–1,2 мм и длиной 2–3 см с нематециями. В состав криопротектора – диметилсульфоксида вводят сахарозу в количестве $15 \pm 5\%$. В опытах используют пастеризованную (стерилизация 35 мин при $68 \pm 1^\circ\text{C}$) естественную морскую воду. Фрагменты вместе с раствором криопротектора переносят в полиэтиленовые контейнеры емкостью 1 мм, которые помещают в ледяную баню. Вкладывают контейнеры в плоские стальные тонкостенные перфорированные кассеты и помещают в камеру программно-замораживателя.

Программа замораживания включает: первоначальное охлаждение со скоростью 0,4–0,5°C/мин до точки заморзания раствора, которая рассчитывается заранее в зависимости от его концентрации. Затем проводят инициацию кристаллизации путем очень быстрого ($0,5 \pm 0,2$ с) погружения кассеты с контейнерами в жидкий азот и

возвращения ее тотчас же обратно в камеру замораживателя, температуру в которой стабилизируют в течение 10–20 мин. Этот период времени необходим для выравнивания температуры в контейнерах, где в момент инициации происходит пик кристаллизации, с температурой в камере замораживателя. Далее контейнеры помещают в жидкий азот. Хранение при столь низких температурах (-196°C) может быть практически неограниченно длительным, так как биохимические процессы и перестройка кристаллов льда полностью исключены.

Оттаивание контейнеров проводят путем встряхивания в воде при 40°C до почти полного исчезновения последнего кристаллика льда, затем их быстро помещают в ледяную баню и переносят в холодильную камеру, где их содержимое постепенно разбавляют в 10–30 раз и фрагменты талломов высаживают в чашки Петри. Выходящие из нематециев фрагментов карпоспоры, пережившие экстремальную процедуру глубокого замораживания, прикрепляются непосредственно к дну чашек, где и прорастают. Через 7–10 дней удаляют фрагменты талломов и полностью меняют воду в чашках. В дальнейшем смену воды производят каждые 10 дней или помещают чашки в культиватор с проточной аэрированной морской водой. Выжившие споры формируют типичные проростковые трубки и диски тетраспорофитов (табл. 1 и 2).

Табл. 1 показывает, что процент проросших спор, формирующих нормальные диски, увеличивается в результате снижения скорости замораживания на первом этапе процесса и благодаря введению в состав криопротектора сахарозы.

Из табл. 1 и 2 видно, что наилучший и высокий (92% проросших карпоспор) результат был получен при скорости замораживания на первом этапе 0,4–0,5°C/мин и при концентрации сахарозы 15%.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет хранить и высаживать фрагменты талломов анфельции с достаточно высокой эффективностью формирования карпоспорами растений-тетраспорофитов. Использование изобретения обеспечит хозяйственников и исследователей посевным материалом анфельции в любое удобное для них время и в необходимых количествах.

Формула изобретения

Способ хранения фрагментов талломов анфельции с карпоспорами, предусматривающий сбор спороносящих растений, выделе-

ние фрагментов талломов с карпоспорами, помещение их в контейнеры, добавление в контейнеры раствора криопротектора, в качестве которого используют диметилсульфоксид, охлаждение контейнеров, помещение их в жидкий азот, оттаивание и последующее разбавление криопротектора, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода жизнеспособных карпоспор, раствор криопротектора содержит

сахарозу в концентрации от 10 до 20%, охлаждение проводят со скоростью 0,4–0,5°C/мин, при этом во время охлаждения после достижения температуры замерзания раствора осуществляют инициацию образования кристаллов льда в растворе с последующей стабилизацией температуры среды, окружающей контейнера, на период времени, необходимый для выравнивания температуры внутри и снаружи контейнера.

Таблица 1

Число карпоспор (%), прорастающих вполне нормально после глубокого замораживания, хранения и оттаивания, в зависимости от скорости охлаждения.

Концентрация сахарозы в растворе криопротектора, %	Скорость замораживания, °С/мин				
	0,4–0,5	1,0	2,0	4,0	7,0
10	80	72	34	0	0
0	76	—	0*	—	0*

* Условия прототипа как по скорости, так и по добавлению ДМСО.

Таблица 2

Число карпоспор (%), прорастающих вполне нормально после глубокого замораживания со скоростью 0,4 – 0,5 °С/мин на первом этапе, в зависимости от концентрации сахарозы в растворе криопротекторов.

Количество карпоспор	Концентрация сахарозы в растворе криопротектора, %
74	25
83	20
92	15
80	10
76	0

Редактор А. Маковская Составитель О. Корженко
Техред М.Моргентал Корректор Т. Колб

Заказ 4102 Тираж Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5