

УДК 57.086.13

## ОПЫТ СОЗДАНИЯ КРИБАНКА ВОДОРΟΣЛЕЙ-МАКРОФИТОВ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2015 г. Г.М. Воскобойников<sup>1</sup>, И.В. Голяк<sup>1</sup>, Е.Ю. Зубова<sup>1</sup>, Е.О. Кудрявцева<sup>2</sup>

Поступила 10.04.2015

Представлены положительные результаты по криоконсервации и длительному хранению в жидком азоте репродуктивного материала *Laminaria saccharina* = *Saccharina latissima* (Баренцево море). Сохранность жизнеспособности экспериментального материала обеспечили: 1) предварительная обработка криопротектором диметилсульфоксидом перед закладкой на хранение в жидкий азот; 2) многоступенчатый режим охлаждения со скоростью 0,1–0,2 град/мин и с периодами температурной стабилизации через каждые 5 °С до –30 °С; 3) охлаждение ниже –30 °С в форсированном режиме до –70 °С. Жизнеспособность определялась подвижностью спор после выхода в окружающую среду и прорастанием после оседания на предметное стекло. При хранении в жидком азоте суспензия спор показала большую сохранность, чем спорогенная ткань. Максимальное количество жизнеспособных спор после реконсервации – 15% от осевших на предметное стекло – оставалось неизменным в течение двух лет хранения в жидком азоте.

**Ключевые слова:** криобанк, репродуктивный материал ламинариевых водорослей, биотехнология, аквакультура, однородный посевной материал.

### ВВЕДЕНИЕ

Интерес к созданию криобанка растительных организмов, получивший свое развитие в 1990-е гг., сохранился до настоящего времени. Для морских макрофитов это связано с проблемой сохранения генофонда, как и в случае с высшими растениями, а также с наличием круглогодичного посевного материала для аквакультуры водорослей с целью получения на плантации растений с заданными свойствами. Ряд морских водорослей-макрофитов являются продуцентами биологически активных веществ (БАВ), сырьем для биотехнологической промышленности, используются в лечебно-профилактической практике. В полной мере это относится к ламинариевым водорослям Баренцева моря, признанным объектом аквакультуры [1], содержащих в большом количестве моно- и полисахариды, липиды, спектр микроэлементов и витаминов. Показана большая гетерогенность у талломов ламинарии из природных зарослей, когда рядом произрастающие

растения могут значительно различаться по содержанию БАВ, по размерно-массовым характеристикам. Данный факт создает большую проблему для промышленного использования ламинариевых, особенно биотехнологических процессов, где требуется однородное сырье. Одним из направлений решения данной задачи является создание криобанка ламинариевых для получения однородного посевного материала при плантационном выращивании.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Талломы *Laminaria saccharina* = *Saccharina latissima* со зрелой (3-я стадия) спорогенной тканью [2] собирались в губе Зеленецкой Баренцева моря с глубины 3–5 м. Фрагменты спорогенной ткани площадью 1 см<sup>2</sup>, вырезанные скальпелем, перед охлаждением жидким азотом выдерживались в течение 1 ч в морской воде с криопротектором – 10%-ным диметилсульфоксидом (ДМСО) при температуре +5... +8° С, а затем размещались в пластиковых эпендорфах. В данной концентрации ДМСО оказался наиболее эффективным для защиты морских макрофитов от гибели при охлаждении [3].

Суспензию спор ламинарии получали из зрелой спорогенной ткани [2]. Споры перед опытами в

<sup>1</sup> Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН (Murmansk Marine Biological Institute, Kola Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Russian Federation), 183010, г. Мурманск, ул. Владимирская, 17.

<sup>2</sup> Мурманский государственный гуманитарный университет (Murmansk State Humanities University, Russian Federation), 183038, г. Мурманск, ул. Егорова, 15.

эпандорфах осаждали центрифугированием, надосадочную жидкость убирали пипеткой. Для экспериментов по воздействию отрицательной температуры споры, предварительно также обработанные криопротектором (концентрация 10%, время – 1 ч), помещали в камеру программной заморозки, позволяющей охлаждать материал в разных режимах.

Заморозка проводилась на установке с программным блоком, позволяющим охлаждать материал в разных режимах. Наилучшие результаты были получены при многоступенчатом режиме охлаждения со скоростью 0,1–0,2 °С/мин и с периодами температурной стабилизации по 30 мин через каждые 5 °С до –30 °С. Для достижения температуры ниже –30 °С охлаждение шло в форсированном режиме продувкой паров жидкого азота через камеру до –70 °С, после чего эпандорфы со спорогенной тканью и суспензией спор погружались в дюары с жидким азотом, где хранились в течение 4 лет. Часть замороженного репродуктивного материала хранилась в криобанке Института цитологии РАН.

Реконсервация экспериментального материала и тесты на жизнеспособность повторялись каждые четыре месяца в первый год содержания в жидком азоте и один раз в год в последующие три года. Пробирки помещались в воду при температуре 37 °С до появления капли внутри пробирки, затем на 20–30 мин в воду при температуре от +5 до +7 °С. Далее фрагменты спорогенной ткани помещались в чашки Петри с морской водой, где на дне находились предметные стекла. В таких же чашках Петри осуществлялся посев спор.

Основным тестом на жизнеспособность у спорогенной ткани и суспензии спор является способность спор к движению после выхода в окружающую среду и прорастанию после оседания. Наблюдения за подвижностью, прорастанием спор проводились с помощью микроскопа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первые контрольные испытания влияния криоконсервации на жизнеспособность спор ламинарии были проведены через сутки после эксперимента. После стимуляции спорогенной ткани [2] в чашках Петри оказались не только споры, но и фрагменты спорангиев. Около 96–98% вышедших спор были неподвижны, 2–4% спор были подвижны – преимущественно медленно вращались на одном месте. Через 3–5 суток (лаг-фаза) около 30% из осевших и закрепившихся спор проросли и образовали трубку, однако дальнейшее развитие до стадии молодого спорофита наблюдалось лишь у 6–7% из числа осевших спор. В течение трех лет хранения степень

жизнеспособности спорового материала, полученного из замороженной ткани, не менялась. На четвертый год все вышедшие споры из спорогенной ткани были неподвижны, прорастание наблюдалось через 8–10 дней у 1–2% из осевших спор, дальнейшего же развития спор не последовало.

Реконсервация спор после пребывания в течение суток в жидком азоте показала отсутствие подвижности практически у всех спор. Доля проросших спор среди осевших и закрепившихся на предметном стекле составила около 15%. Через 5 суток часть спор (2–3%) образовали трубку, а через 8 суток число проросших достигло 14–15%. Такие результаты сохранялись в течение двух лет хранения материала в жидком азоте. К концу третьего года число спор, способных к прорастанию, оказалось не более 2%. Причем дальнейшего развития спор не наблюдалось. Посев спор на четвертый год не выявил наличия жизнеспособного материала.

Ранее нам удалось выявить среди исследованных 15 массовых видов водорослей-макрофитов Баренцева моря растения *Fucus vesiculosus* и *Palmaria palmata*, апексы которых сохраняли высокую степень жизнеспособности после двухлетнего хранения в жидком азоте. Было отмечено, что при неизменности степени жизнеспособности наблюдалось увеличение продолжительности лаг-фазы после реконсервации [4]. В опытах с ламинарией этого эффекта не обнаружено.

Таким образом, сохранение жизнеспособного спорогенного материала в жидком азоте в течение длительного времени, т.е. создание криобанка репродуктивного материала ламинарии, как и вегетативного материала некоторых других представителей фитобентоса, возможно. Количество сохраненного материала в жидком азоте может обеспечить потребности в однородном материале при посеве при плантационном выращивании. Вместе с тем положительное заключение по использованию криобанка для выращивания однородного материала требует исследования всего цикла развития водорослей – от посева спор после хранения в жидком азоте и реконсервации до взрослого спорофита.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воскобойников Г.М., Макаров В.Н., Макаров М.В., Шошина Е.В. 1999. Технология культивирования и перспективы рационального использования ламинариевых водорослей. В кн.: *Современные технологии и прогноз в полярной океанологии и биологии*. Апатиты, изд-во КНЦ РАН: 100–124.
2. Макаров В.Н. 1987. *Поведение зооспор и ранние стадии развития Laminaria saccharina (L.) Lamour. Белого*

- и Баренцева морей. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ленинград: 23 с.
3. Воскобойников Г.М., Зубова Е.Ю. 1998. Сохранение жизнеспособности морских водорослей в условиях отрицательных температур. В кн.: *Промысловые и перспективные для использования водоросли и беспозвоночные Баренцева и Белого морей*. Апатиты, изд-во КНЦ РАН: 243–249.
4. Воскобойников Г.М. 2006. *Механизмы адаптации, регуляции роста и перспективы использования макрофитов Баренцева моря*. Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. Мурманск, изд-во ММБИ КНЦ РАН: 45 с.

## THE EXPERIENCE OF DEVELOPMENT OF THE BARENTS SEA ALGAE – MACROPHYTES CRYOBANK

G.M. Voskoboynikov, I.V. Golyak, E.Yu. Zubova, E.O. Kudryavtseva

Positive results on the cryopreservation and long-term storage in liquid nitrogen of reproductive material of *Laminaria saccharina* = *Saccharina latissima* (the Barents Sea) are presented. Preservation of viability of the experimental material was provided by: 1) pre-treatment of cryoprotector of dimethylsulfoxide prior the storage in liquid nitrogen; 2) a multi-stage cooling mode at the speed of 0.1–0.2 dg/min and with temperature stabilization periods every 5 °C to –30 °C; 3) cooling below –30 °C in the forced mode to –70 °C. The viability was determined by the mobility of the spores after the release into the environment and germination after settling on a glass slide. When stored in liquid nitrogen, the spore suspension showed a greater preservation than a sporogenous tissue. The maximum number of viable spores after re-preservation – 15% of the settled on a glass slide – remained unchanged for two years of storage in liquid nitrogen.

**Key words:** cryobank, reproductive material of laminaria algae, biotechnology, aquaculture, homogeneous planting material.

## REFERENCES

1. Voskoboynikov G.M., Makarov V.N., Makarov M.V., Shoshina E.V. 1999. [Technology of cultivation and prospects of rational use of laminaria algae]. In: *Sovremennye tekhnologii i prognoz v polyarnoy okeanologii i biologii. [Modern technologies and prediction in polar oceanography and biology]*. (Ed. G.G. Matishov). Apatity, KSC RAS Publ.: 100–124. (In Russian).
2. Makarov V.N. 1987. *Povedenie zoospor i rannie stadii razvitiya Laminaria saccharina (L.) Lamour Belogo i Barentseva morey. [The behaviour of the zoospores and the early development of Laminaria saccharina (L.) Lamour of the White and the Barents Seas]*. Leningrad, AS USSR Publ.: 23 p. (In Russian).
3. Voskoboynikov G.M., Zubova E.Yu. 1998. [The viability of algae in the conditions of negative temperatures]. In: *Promyslovye i perspektivnye dlya ispol'zovaniya vodorosli i bespozvonochnye Barentseva i Belogo morey. [Commercial and exploitation promising algae and invertebrates of the Barents and White Seas]*. (Ed. G.G. Matishov). Apatity, KSC RAS Publ.: 243–249. (In Russian).
4. Voskoboynikov G.M. 2006. *Mekhanizmy adaptatsii, regulyatsii rosta i perspektivy ispol'zovaniya makrofitov Barentseva morya. [Mechanisms of adaptation, regulation of growth and exploitation prospects of macrophytes of the Barents Sea]*. Murmansk, MMBI KSC RAS Publ.: 45 p. (in Russian).