

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2017.50767

郑凌凌, 张琪, 李天丽, 宋立荣. 雨生红球藻 FACHB-712 营养细胞和厚壁孢子低温保藏效果及优化[J]. 植物科学学报, 2017, 35(5): 767-773

Zheng LL, Zhang Q, Li TL, Song LR. Effect and optimization of cryopreservation on vegetative cells and akinete of *Haematococcus pluvialis* Flotow FACHB-712[J]. Plant Science Journal, 2017, 35(5): 767-773

雨生红球藻 FACHB-712 营养细胞和厚壁孢子 低温保藏效果及优化

郑凌凌, 张琪, 李天丽, 宋立荣*

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 以高产虾青素的雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* Flotow) FACHB-712 藻株为材料, 研究 2 种细胞形态(营养细胞和厚壁孢子)在低温保藏下的复苏率及其差异原因。结果显示, 采用两步法(先预冻降温后再投入液氮中)冻存其营养细胞, 在不同冻存条件下, 其存活率均低于 5%, 以 10% 甘油作为保护剂、冻存速率为 0.5°C/min、预冻温度为 -40°C、保留 30 min, 然后再投入液氮罐 (-196°C) 中保藏, 其存活率可达到 13.3%。采用两步法冻存厚壁孢子, 其复苏存活率高达 66.13%, 复苏萌发后细胞的生长特性、虾青素含量与液氮保藏前无明显差异($P > 0.05$)。对液氮保藏前后藻细胞形态和超微结构观察结果表明, 超低温保藏后, 营养细胞的结构受到较大损伤, 而厚壁孢子受到的损伤相对较小。当添加不同保护剂后, 直接将厚壁孢子分别冻存在 -20°C、-80°C 低温及液氮中, 发现 -80°C 低温冻存处理组的复苏存活率相对较高, 可达 27%。研究表明采用两步法先预冻降温后再投入液氮中冻存厚壁孢子, 是长期保藏雨生红球藻 FACHB-712 的最佳方法, 也可采用一步法将厚壁孢子冻存于 -80°C 冰箱中。

关键词: 雨生红球藻; 低温保藏; 存活率; 厚壁孢子; 营养细胞中图分类号: Q949.21²

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)05-0767-07

Effect and optimization of cryopreservation on vegetative cells and akinete of *Haematococcus pluvialis* Flotow FACHB-712

Zheng Ling-Ling, Zhang Qi, Li Tian-Li, Song Li-Rong *

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The survival rate of cryopreservation based on vegetative cells and akinetes of *Haematococcus pluvialis* Flotow FACHB-712 were compared. Results showed that in most cases the survival rate of the vegetative cells was lower than 5% in liquid nitrogen with two-step cryopreservation, but the rate increased to 13.3% if the protocol was modified as follows: cell suspensions were added with glycerol as a cryoprotectant (10%), cooled at a rate of 0.5°C / min until -40°C, and then maintained for 30 min before being placed to liquid nitrogen. The survival rate of the akinetes reached 66.13% in liquid nitrogen with the two-step protocol. There were no obvious differences ($P > 0.05$) in the growth characteristics and the astaxanthin content of akinetes before and after preservation in liquid nitrogen. Comparatively, the ultrastructure of the vegetative cells was seriously damaged, whereas that of the akinetes was

收稿日期: 2017-05-02, 退修日期: 2017-05-23。

基金项目: 国家开发投资公司资助项目(Y341151Z09); 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2014AA022001)。

This work was supported by grants from the State Development & Investment Corporation in China (Y341151Z09) and the National High Technology Research and Development Program of China (2014AA022001).

作者简介: 郑凌凌(1980-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为藻类保藏分离技术研究(E-mail: zhengl@ihb.ac.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence): 宋立荣(1961-), 男, 研究员, 从事藻类生理生化研究(E-mail: lrsong@ihb.ac.cn)。

much less damaged after two-step cryopreservation treatment. If directly placed in -20°C, -80°C, or liquid nitrogen, respectively, the highest survival rate of the samples was about 27% in the treatment under -80°C. In conclusion, the two-step cryopreservation protocol in liquid nitrogen using akinete-stage cells was preferable for the long-term preservation of *H. pluvialis* FACHB-712, with the one-step protocol at -80°C also applicable as an alternative approach.

Key words: *Haematococcus pluvialis* Flotow; Cryopreservation; Survival rate; Akinete; Vegetative cells

雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis* Flotow) 是一种单细胞绿藻, 隶属于绿藻门、绿藻纲、团藻目、红球藻科、红球藻属^[1]。该藻的生活史分为游动细胞和厚壁孢子两个阶段。在逆境胁迫时, 该藻以厚壁孢子形式存在。其厚壁孢子能积累经济价值很高的虾青素及其酯类。虾青素是一种红色酮式类胡萝卜素, 具有超强抗氧化活性及增强免疫力等生理功能, 同时具有优良的着色效果, 因此被广泛开发应用于食品、医药、化妆品、水产养殖等行业生产中^[2]。雨生红球藻是至今所知虾青素含量最高的物种, 其含量可达干重的 4%, 是目前最主要的天然虾青素来源。因此, 利用雨生红球藻生产虾青素已成为国内外虾青素研究的热点。制约红球藻开发研究的瓶颈之一是如何保藏优良藻种品系。传统的液体继代保藏藻种的方式存在操作繁琐、工作量大、容易污染, 遗传漂变、藻种优良性状退化等问题。

超低温保藏 (Cryopreservation) 技术是将细胞或组织保藏在超低温环境中 (通常指保藏在液氮中), 最低温度接近-196°C。该技术具有省时、省力、省空间, 设备简单, 维持费用低, 只需定期补充液氮, 省却了定期传代费用, 既安全又经济^[3]等优点, 因此在植物种质保藏中得到广泛应用^[4]。自 20 世纪 60 年代 Holm-Hansen 等^[5]尝试开展蓝绿藻冰冻保存研究以来, 超低温保藏技术陆续应用到各种藻类的保存中^[6-13]。影响保存效果的因素除了保藏方法外, 还包括藻类种类、藻龄, 保护剂类型、浓度、降温速率、预冻温度、预冻时间、解冻温度等因素^[14]。目前有关雨生红球藻长期保藏研究虽有涉及, 但缺乏对保藏条件和不同细胞状态下保藏效果的系统研究。本研究以高产虾青素的雨生红球藻 FACHB-712 藻株为材料, 探讨其营养细胞和厚壁孢子在液氮中的冻存效果及产生差异的原因, 同时比较厚壁孢子直接冻存于液氮、-20°C、

-80°C 的冻存效果, 以期为该藻种的长期保藏寻找合适的方法。

1 材料与方法

1.1 藻株来源及培养条件

雨生红球藻藻株来自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 编号 FACHB-712。将藻种接种于 50 mL 的三角锥形瓶中进行培养, 所用培养基为 BG11, 培养温度为(22 ± 1)°C, 光照强度为 15 ~ 20 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光照周期 12 h : 12 h。取培养 20 d 后的营养细胞以及用 150 μmol · m⁻² · s⁻¹ 光强进行诱导后的厚壁孢子作为实验材料。

1.2 保护剂配制

将渗透性保护剂甲醇、甘油、二甲基亚砜分别溶解于 BG11 培养基中, 分别设置 3 个浓度 (10%、20%、30%), 此浓度为最终使用浓度的 2 倍。所有配制好的保护剂溶液均需经过孔径为 0.22 μm 的 Millipore 过滤器进行过滤灭菌, 然后置冰箱 (4°C) 中保存备用。

1.3 冷冻方法

取培养至 20 d 获得的营养细胞 0.75 mL 以及 150 μmol · m⁻² · s⁻¹ 光强诱导后的厚壁孢子 0.75 mL, 分别放入 1.5 mL 的 NALGENE 冷冻管中, 细胞密度为 6 × 10⁵ 个/mL, 分别加入 0.75 mL 的保护剂, 室温放置 10 min, 然后放入程序降温仪中, 按照一定程序 (冻存速率为 0.5°C/min、1°C/min、3°C/min) 将样品温度预冻至-40°C, 保留 30 min, 再放入液氮罐 (-196°C) 中保存 (即两步法); 另外取一部分厚壁孢子加入保护剂后分别放在 -20°C、-80°C 冰箱及液氮 (-196°C) 中直接冻存。

1.4 化冻及保护剂去除

将液氮罐中保藏 3 个月的实验样品取出, 迅速放入 40°C 水浴中进行化冻, 直至最后一个冰晶消失, 然后置于 Eppendorf 5810R 离心机中进行离

心(3000 min/r, 5 min), 去除保护剂, 离心后去除上清再加入已灭菌的 BG11 培养基进行清洗离心(重复 1 次)。

1.5 存活率检测

参照 Mori 等^[15]的方法, 使用 FDA(fluorescein diacetate)(Sigma, USA) 标记活的藻细胞, 然后用流式细胞仪(BD FACS™ Aria III) 检测冻存藻株的存活率。厚壁孢子冻存后的存活率参照 Canavate 等^[16]的方法进行检测。

1.6 藻细胞电镜样品制备及超微结构观察

取经过冻存以及正常培养的营养细胞和厚壁孢子各 1 mL 于 1.5 mL EP 管, 离心后取上清加入 2.5% 戊二醛固定, 4°C 冰箱过夜后取出直接在 EP 管中进行常规电镜样品固定、脱水和包埋。超薄切片后于日立 HT-7700 透射电子显微镜下观察拍照。

1.7 比生长速率(μ)的测定

将复苏后的营养细胞转接到 50 mL 三角锥形瓶中进行培养, 培养条件如 1.1 所述。接种后, 隔天用岛津分光光度计检测 OD_{680 nm} 值, 按下式计算比生长速率: $\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$, 式中 x_1 、 x_2 分别表示对数生长期起始时间(t_1)和结束时间(t_2)的 OD_{680 nm} 值。

1.8 虾青素含量测定

取一定量(M, mg)经冷冻干燥的藻粉于离心管中, 采用改良的 Boussiba 虾青素测定方法^[17],

使用 5%KOH + 30% 甲醇皂化叶绿素, 再用二甲基亚砜提取虾青素, 测定 492 nm 波长下的吸光度。虾青素浓度 C_1 (mg/mL) = $A_{492} \times 0.0045$, 藻粉中虾青素的含量 C_2 = ($C_1 \times 100/M$) × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同冻存条件对雨生红球藻营养细胞和厚壁孢子超低温保藏的影响

采用甲醇(Mel)、甘油(Gly)、二甲基亚砜(DMSO)3 种不同保护剂对营养细胞和厚壁孢子进行不同条件超低温保藏实验, 结果显示(图 1), FACHB-712 的营养细胞在不同冻存条件下的存活率都较低, 特别是在冻存速率为 3°C/min 的条件下, 其存活率最高仅为 2.3%。在冻存速率为 0.5°C/min、以 10% 甘油作为保护剂预冻至 -40°C, 再放入液氮罐(-196°C) 中保存, 藻株冻存效果优于其他保护剂的冻存效果; 而在冻存速率为 1°C/min、以 5% DMSO 作为保护剂预冻至 -40°C, 再放入液氮罐(-196°C) 中保存, 其冻存效果优于其他保护剂的冻存效果。采用上述两步法对厚壁孢子进行冻存的结果显示(图 2), 藻细胞复苏存活率均有所提高, 多数冻存条件下的存活率大于 10%, 而以 15% 甘油作为保护剂、冻存速率为 1°C/min、预冻至 -40°C, 保留 30 min, 再放入液氮罐(-196°C) 中保存, 其存活率高达 66.13%。

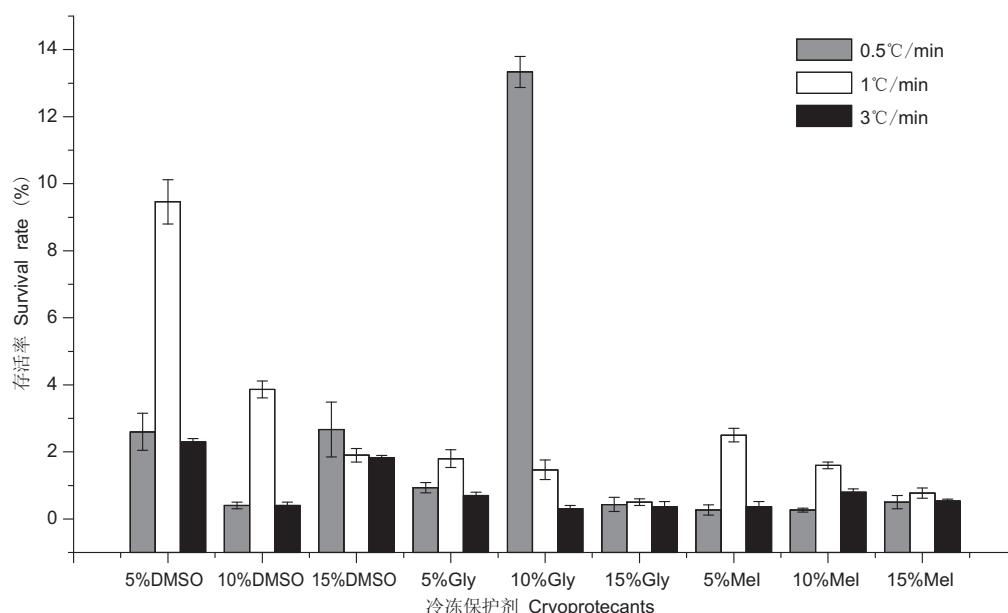


图 1 FACHB-712 营养细胞在冻存速率为 0.5°C/min、1°C/min、3°C/min 下的存活率

Fig. 1 Survival rate of vegetative cells of FACHB-712 with cooling rates of 0.5°C/min, 1°C/min, and 3°C/min

2.2 雨生红球藻的厚壁孢子在不同低温下的保藏效果

将 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 光强诱导后的厚壁孢子分别加入二甲基亚砜、甘油、甲醇 3 种保护剂，每种保护剂设置 5%、10%、15% 三种不同浓度，然后置于 -20°C 、 -80°C 冰箱以及液氮 (-196°C) 中直接冻存，结果显示(图 3)，经 -20°C 低温直接冻存

后，相对其他 2 种低温保藏方式，其复苏存活率均较低，最高仅为 4% 左右；经 -80°C 低温直接冻存后，采用这 3 种不同浓度的保护剂其复苏存活率均相对较高，达 10% 左右，其中以 15% 甘油为保护剂的复苏存活率可达 27%。将藻种直接投入液氮罐 (-196°C) 中进行冻存，其存活率也相对较低，最高仅为 10% 左右。

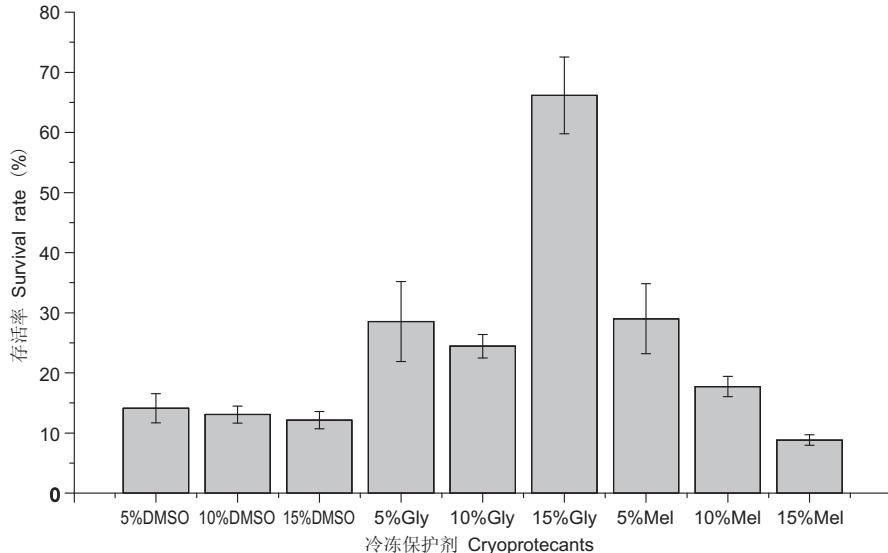


图 2 两步法在液氮中冻存 FACHB-712 厚壁孢子的复苏存活率 (冻存速率 $1^\circ\text{C}/\text{min}$)

Fig. 2 Survival rate of the spores of FACHB-712 after preservation at -196°C with the two-step protocol (cooling rate: $1^\circ\text{C}/\text{min}$)

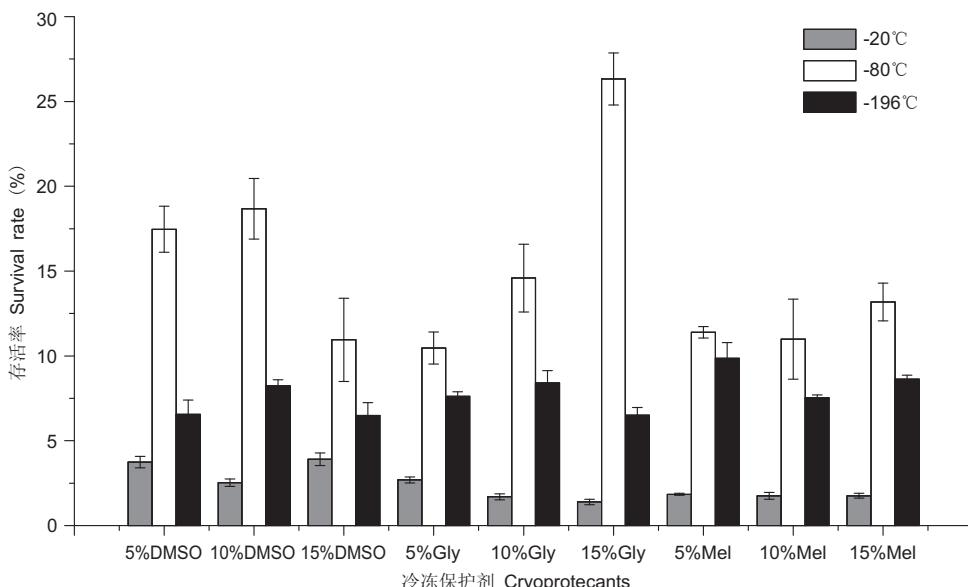


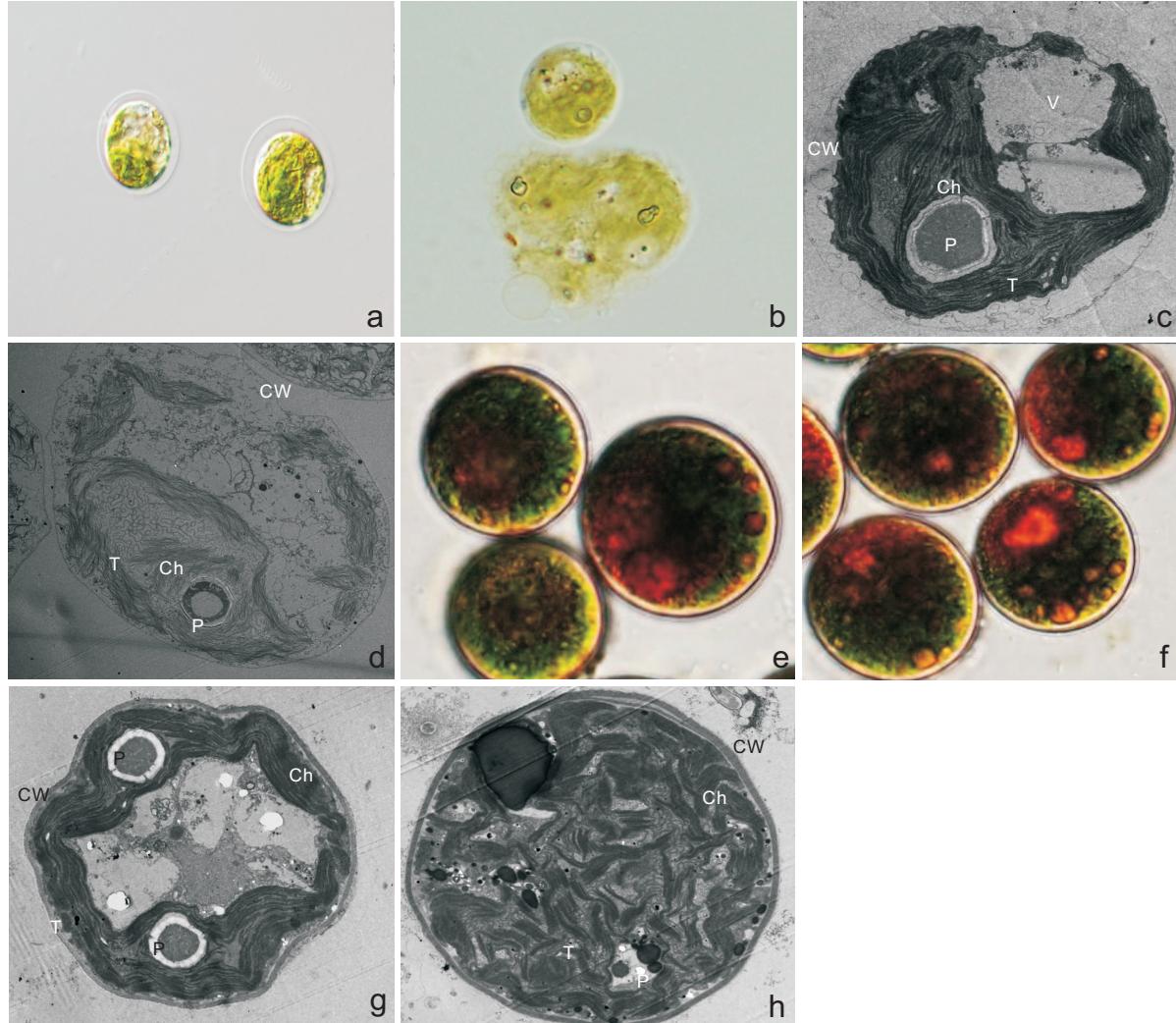
图 3 FACHB-712 厚壁孢子在 -20°C 、 -80°C 和 -196°C 冻存后的复苏存活率

Fig. 3 Survival rate of spores of FACHB-712 after preservation at -20°C , -80°C , and -196°C with the one-step protocol

2.3 雨生红球藻液氮保藏前后细胞形态和超微结构变化

将液氮罐中保藏的营养细胞和厚壁孢子解冻后分别于光学显微镜和透射电子显微镜下观察,结果显示(图4),经超低温冻存后,营养细胞受到较大损伤,其鞭毛脱落,细胞壁破裂,细胞内容物流出

(图4: a、b),与未进行超低温保藏的营养细胞相比,其叶绿体结构受到严重破坏,类囊体断裂、排列疏松,不规则(图4: c、d)。而厚壁孢子经超低温保藏后,其细胞形态未发生明显变化(图4: e、f),从光合作用中心叶绿体的结构来看,部分类囊体也出现断裂,但排列仍较为紧密、规则(图4: g、f)。



a: 液氮保藏前的营养细胞(光镜 10×40)；b: 液氮保藏后的营养细胞(光镜 10×40)；c: 液氮保藏前营养细胞的超微结构(电镜 $\times 1.5$ k)；d: 液氮保藏后营养细胞的超微结构(电镜 $\times 1.2$ k)；e: 液氮保藏前的厚壁孢子(光镜 10×40)；f: 液氮保藏后的厚壁孢子(光镜 10×40)；g: 液氮保藏前厚壁孢子的超微结构(电镜 $\times 1.2$ k)；h: 液氮保藏后厚壁孢子的超微结构(电镜 $\times 1.5$ k)。Ch: 叶绿体; V: 液泡; CW: 细胞壁; T: 类囊体; P: 蛋白核。

a: Vegetative cell before preservation in liquid nitrogen (microscope 10×40) ; b: Vegetative cell after preservation in liquid nitrogen (microscope 10×40) ; c: Ultrastructure of vegetative cell before preservation in liquid nitrogen (transmission electron microscope $\times 1.5$ k) ; d: Ultrastructure of vegetative cell after preservation in liquid nitrogen (transmission electron microscope $\times 1.2$ k) ; e: Akinete before preservation in liquid nitrogen (microscope 10×40) ; f: Akinete after preservation in liquid nitrogen (microscope 10×40) ; g: Ultrastructure of akinete before preservation in liquid nitrogen (transmission electron microscope $\times 1.2$ k) ; h: Ultrastructure of akinete after preservation in liquid nitrogen (transmission electron microscope $\times 1.5$ k) . Ch: Chloroplast; V: Vacuole; CW: Cell wall; T: Thylakoid; P: Pyrenoid.

图4 液氮保藏前后雨生红球藻细胞形态及超微结构

Fig. 4 Microscopic structures and ultrastructures of vegetative cell and akinete before and after preservation in liquid nitrogen

2.4 雨生红球藻液氮保藏前后的生长及虾青素含量变化

对液氮保藏前后的雨生红球藻 FACHB-712 藻株的生长情况进行测定,结果显示(图5),在接种后第4 d,液氮保藏前后的藻株均可进入指数生长期,且比生长速率(μ)无明显差异($P > 0.05$,表1)。将液氮保藏前后的藻种培养25 d后,分别用强光诱导,其虾青素含量均可达到3%以上,且无明显差异($P > 0.05$,表1)。

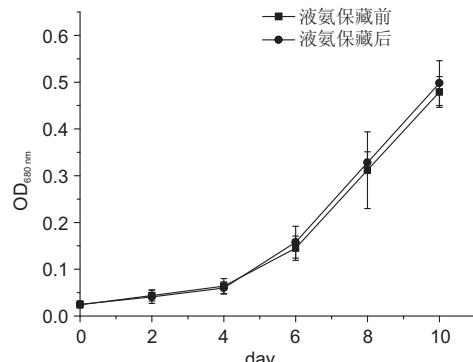


图5 液氮保藏前后雨生红球藻 FACHB-712 的生长曲线

Fig. 5 Growth curve of FACHB-712 before and after preservation at -196°C

表1 雨生红球藻 FACHB-712 在液氮保藏前后生长速率和虾青素含量

Table 1 Growth rate and content of astaxanthin of FACHB-712 before and after preservation at -196°C

生长生化参数 Growth and biochemical parameters	液氮保藏前 Before preservation at -196°C	液氮保藏后 After preservation at -196°C
比生长速率 Growth rate	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.005
虾青素含量(%) Content of astaxanthin	3.17 ± 0.39	3.18 ± 0.55

3 讨论

超低温保藏研究已广泛应用于各种经济微藻的保藏,但对雨生红球藻的相关研究报道较少。影响藻细胞冻存存活率的因素除藻种本身的抗冻性外,与藻种培养温度^[18]、解冻温度密切相关^[19],还与冻存所使用的保护剂及冻存速率、预冻温度等因素有关。在藻类种质冰冻保存中最常用的3种保护剂是二甲基亚砜(DMSO)、甘油和甲醇。其中DMSO的使用最为普遍。这几种保护剂的常用浓度范围为5%~15%^[20-22]。本实验中使用DMSO和甘

油作为保护剂的效果优于甲醇。较慢的降温速率不仅可以减小“冷击”对细胞的伤害,而且可以阻止细胞内结冰,有利于提高存活率。本实验结果也表明采用 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 进行冻存的效果优于 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。且从实验结果可以看出雨生红球藻 FACHB-712 的营养细胞比厚壁孢子对超低温更为敏感,经过超低温保藏后,其营养细胞存活率均较低。Mori等^[15]对团藻目的藻种(包括雨生红球藻)进行液氮保藏实验表明,其存活率也相对较低。这可能与低温对藻细胞结构的伤害有关。Motham等^[23]对螺旋藻在 -80°C 冻存后的细胞超微结构观察结果表明,螺旋藻经超低温保藏后,类囊体出现较大损伤。这可能是导致螺旋藻、雨生红球藻营养细胞等冻存复苏存活率较低的原因。而厚壁孢子由于具有较厚的细胞壁的保护,其细胞结构受到的伤害则较小。

藻类细胞在冰冻过程中最大的伤害来自于较大冰晶的形成。雨生红球藻细胞有较大的液泡,含水分较多,温度低于藻细胞冰点时,水开始结冰。从冰点温度到下降至 -60°C 是细胞内水分子形成有序状态冰晶的危险温度区。细胞内冰晶的形成会使细胞结构受到机械损伤,细胞外结冰会导致细胞失水,引起细胞收缩变形。当温度低于 -60°C 时,有序状态冰晶的形成减少,水分子运动能力减弱。因此在 -80°C 低温冻存后,其复苏存活率相对较高,均可达到10%以上,最高可达27%。而将厚壁孢子直接投入 -196°C 液氮罐中保存,冻存速率太快,细胞内仍会形成大量冰晶,因此,复苏后存活率也仅有10%左右。

4 结论

综上研究表明,对雨生红球藻 FACHB-712 藻株的长期保藏建议以厚壁孢子的方式进行两步法冻存。首先预冻,冻存最佳条件为:15%甘油作为保护剂、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温、预冻温度为 -40°C 、保留时间为30 min;然后再投入液氮罐(-196°C)保藏。实验结果表明雨生红球藻厚壁孢子经液氮保藏后,其虾青素含量、生长速率与液氮保藏前相比并无明显差异。而将厚壁孢子用一步法直接冻存在 -80°C 冰箱中也可获得超过20%的存活率,因此也可作为藻株保藏的一种备选方法。

参考文献:

- [1] 胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类——系统、分类及生态 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] 耿金峰, 张惠敏, 杨建强, 马欣欣, 石蕾, 滕杰, 冯倩, 张凯. 雨生红球藻中虾青素含量的快速测定方法 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(12): 125–128.
- Geng JF, Zhang HM, Yang JQ, Ma XX, Shi L, Teng J, Feng Q, Zhang K. A method for rapid determination of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* [J]. *Food Res Dev*, 2016, 37(12): 125–128.
- [3] 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: 自然科学版, 2002, 32(3): 403–408.
- Pan KH, Zhu BH. Storage techniques of microalgae and their applications [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao: Natural Science Edition*, 2002, 32(3): 403–408.
- [4] 洪森荣, 尹明华, 王艾平. 江西铅山红芽芋胚性愈伤组织的包埋玻璃化超低温保存 [J]. 植物科学学报, 2014, 32(1): 80–87.
- Hong SR, Yin MH, Wang AP. Cryopreservation of Jiangxi Yanshan red bud taro embryogenic calli by encapsulation-vitrification [J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(1): 80–87.
- [5] Holm-Hansen O. Viability of blue-green and green algae after freezing [J]. *Physiol Plantarum*, 1963, 16(3): 530–540.
- [6] Friedl T, Lorenz M. The culture collection of algae at Göttingen University (SAG): a biological resource for biotechnological and biodiversity research [J]. *Procedia Environ Sci*, 2012, 15: 110–117.
- [7] Rhodes L, Smith KF, MacKenzie L, et al. The cawthon institute culture collection of micro-algae: a significant national collection [J]. *New Zeal J Mar Fresh*, 2016, 50(2): 291–316.
- [8] Choi YH, Nam TJ, Kuwano K. Cryopreservation of gametophytic thalli of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyceae) by one-step fast cooling [J]. *J Appl Phycol*, 2013, 25(2): 531–535.
- [9] Day JG. Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 368: 141–151.
- [10] Macdonald SM, Lee RW. A survey of Polytomella (Chlorophyceae, Chlorophyta) strains in public culture collections [J]. *J Phycol*, 2016, 52(4): 656–663.
- [11] Lee YN, Nam KW. Cryopreservation of gametophytic thalli of *Ulva prolifera* (Ulvales, Chlorophyta) from Korea [J]. *J Appl Phycol*, 2016, 28(2): 1207–1213.
- [12] Rhodes L, Smith J, Tervit R, et al. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae [J]. *Cryobiology*, 2006, 52(1): 152–156.
- [13] Chong G, Tsai S, Wang LH, et al. Cryopreservation of the gorgonian endosymbiont *Symbiodinium* [J]. *Sci Rep-UK*, 2016, 6: 18816.
- [14] Robert A. Andersen Algal Culturing Techniques [M]. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005: 165–187.
- [15] Mori F, Erata M, Watanabe MM. Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-collection [J]. *Microbiol Cult Coll*, 2002, 18(1): 45–55.
- [16] Canavate JP, Lubinn LM. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species [J]. *Aquaculture*, 1995, 136(95): 277–290.
- [17] Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32(7): 1077–1082.
- [18] Morris GJ. The cryopreservation of *Chlorella*. 2. Effect of growth temperature on freezing tolerance [J]. *Arch Microbiol*, 1976b, 107(3): 309–312.
- [19] Morris GJ. The cryopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling protective additive and warming rate [J]. *Arch Microbiol*, 1976a, 107(1): 57–62.
- [20] Joseph I, Panigrahi A, Chandra PK. Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectants dimethyl sulfoxide, methanol and glycerol [J]. *Indian J Geo-Mar Sci*, 2000, 29(3): 243–247.
- [21] Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms [J]. *Cryobiology*, 2003, 46(3): 205–229.
- [22] Santarius KA. Freezing of Isolated thylakoid membranes in complex media: X. Interactions among various low molecular weight cryoprotectants [J]. *Cryobiology*, 1996, 33(1): 118–126.
- [23] Motham M, Peerapornpisal Y, Tongsriri S, Vacharapiasophon P, Pumas C. High subzero temperature preservation of *Spirulina platensis* (*Arthrosphaera fusiformis*) and its ultrastructure [J]. *Chiang Mai J Sci*, 2012, 39(4): 554–561.