

HY

中华人民共和国海洋行业标准

HY/T XXXXX—XXXX

微藻种质资源库构建与运行通则

General rules for construction and operation of microalgae resource biobank

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(报批稿)

(本草案完成时间：2022年03月07日)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国自然资源部 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 资源库规划	1
5 操作程序	2
6 样本管理	4
7 质量与安全管理	5
附录 A（规范性） 藻种库功能分区	6
附录 B（规范性） 微藻资源样本采集环境描述信息表	7
附录 C（资料性） 常用微藻培养基配方	8
附录 D（规范性） 微藻分类鉴定流程	12
附录 E（资料性） 分子标记鉴定引物参考序列	13
附录 F（规范性） 样品保藏号信息卡	14
附录 G（规范性） 藻种保存登记表	15
附录 H（规范性） 样本入库申请登记信息表	17
附录 I（规范性） 样本出库申请登记表	18
参考文献	19

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国自然资源部提出。

本文件由全国海洋标准化技术委员会（SAC/TC 283）归口。

本文件起草单位：青岛微藻产业学会、青岛华大基因研究院、中国科学院烟台海岸带研究所、中国石油大学（华东）、青岛华大智造科技有限责任公司、深圳华大生命科学研究院。

本文件主要起草人：秦松、刘姗姗、孙海翔、孟亮、王萌萌、王寅初、葛保胜、倪鸣、刘心、王博、赵辉、于道永、冯超。

微藻种质资源库构建与运行通则

1 范围

本文件规定了在构建与运行微藻种质资源库时，其场地设施、操作程序、样本管理、质量与安全等方面的要求。

本文件适用于微藻在科学研究、资源应用与产品开发时，微藻种质资源库的构建与运行。不适用于极地和冰川等极端或特殊环境来源的微藻资源。

注：在不引起混淆的情况下，本文件中的“微藻种质资源库”简称为“资源库”。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 5458 液氮生物容器
- GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 7000.2 灯具 第2-22部分：特殊要求应急照明灯具
- GB/T 18883 室内空气质量标准
- GB/T 19001 质量管理体系 要求
- GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求
- GB/T 25915.1-2021 洁净室及相关受控环境 第1部分：按粒子浓度划分空气洁净等级
- GB/T 36066 洁净室及相关受控环境 检测技术分析与应用
- GB 50052 供电系统设计规范
- SC/T 2047 水产养殖用海洋微藻保种操作技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

3.2 微藻 *microalgae*

单一个体尺度范围通常为几微米到几百微米，以单细胞、多细胞群体或丝状体等形式存在，营放氧光合作用的微观藻类。

3.3

3.4 微藻种质 *microalgae culture*

从环境中获得的、在实验室培养条件下可以稳定生长和繁殖、用于保留维护的微藻。

3.5

3.6 微藻藻株 *microalgae strain*

特定微藻种质来源，用人工方法分离纯化出来具有性状均一性的微藻细胞。

3.7

3.8 分离纯化 *isolation and purification*

采用一定的方法和手段从野外采集样品或原有培养液中获取单种或纯系藻株的过程。

4 资源库规划

4.1 功能分区要求

4.1.1 资源库功能分区应符合附录 A 的规定。

4.1.2 应对开展不相容活动的相邻区域进行有效隔离，包括热源区和无热源区、污染区和清洁区等。

4.1.3 各功能区之间应采取措施避免交叉污染。

4.2 环境要求

4.2.1 基本要求

资源库实验操作区的设计应符合GB 19489-2008中6.2的规定，设置独立的紫外或臭氧灭菌系统。

4.2.2 空调与通风系统

资源库空调系统应符合GB 19489的规定，有足够的温度和湿度控制能力，环境温度控制在18℃~26℃，湿度控制在30%rh~70%rh。保藏区温度和湿度应有相应的记录并定期审核复查。通风系统应符合GB/T 18883的规定，室内通风量可根据工作区面积设置滤菌通风口，保证良好的通风，其中保藏区的核心工作区洁净度应符合GB/T 25915.1-2021表1中ISO 8级的洁净等级要求。

4.2.3 水质条件

资源库用水应符合GB/T 6682-2008表1中三级水的规定。

4.2.4 照明条件

资源库照明条件应符合GB 19489的规定。保藏区域光照应符合SC/T 2047的规定。

4.2.5 备用电源

实验区供电系统应符合GB 50052的规定。应安装备用电池或发电机，并符合GB 7000.2的相关要求。备用电源系统应至少支持资源库运行48 h。

4.2.6 安全设备

资源库应设置门禁系统、监控系统、消防系统。资源库的安全设施应符合GB 19489的规定。

4.2.7 污染物处理

资源库产生的微藻残渣、废液等应灭活后无害化处理。危险废物的处置按照GB 19489规定。

4.2.8 环境监测和定期除菌

资源库应按照GB/T 36066要求定期对空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物及物理参数（温度、相对湿度、换气次数、气流速度、压差、噪声等）的监测和控制，应对资源库进行每周除菌。

4.3 人员

资源库人员应通过岗前培训与考核，专业能力满足相应的岗位需求。

5 操作程序

5.1 通用要求

实验过程的装备和管理应符合GB 19489的相关规定。

5.2 藻种来源

5.2.1 野外资源

微藻资源样本采集环境描述信息表应符合附录B规定。样品应经实验室预处理、分离纯化、种属鉴定后保种。

5.2.2 引进资源

从其它有资质的微藻保种单位引进的藻种资源，应经资源库的复核鉴定，再进行后续的研究和保藏工作。

5.2.3 诱变、转基因藻种

经物理方法、化学方法等诱变藻种或基因工程改造藻种，应在资源库专属保藏区保存。

5.3 样品预处理

5.3.1 准备培养基

资源库应预备常用微藻培养液和固体培养基，常用微藻培养基配方见附录C。

5.3.2 分离培养

应根据不同样本选取相应的分离方法进行分离培养：

- a) 微吸管分离法：适用于细胞较大的藻种。在显微镜下用微吸管挑选目标藻细胞，转移到准备好的容器中培养。若存在其他藻体，可多次反复挑选分离，直到没有其他藻体存在为止；
- b) 稀释分离法：适用于目标藻种在样品中已占优势的藻种分离。用培养液稀释藻液至每滴液中只含有一个藻细胞，通过显微镜观察到有目标细胞时，转移至细胞培养板培养；
- c) 平板分离法：适用于所含藻种种类较少的样品。用涂布棒蘸取浓缩液在固体平板培养基上以“Z”字形划线，或稀释适当的水样喷洒在培养基上，同时涂布两个平板，适宜条件下培养一段时间分离出单藻落。

5.4 纯化培养

应将分离筛选出来的藻种先进行96孔或24孔细胞培养板富集培养，使藻细胞增值培养到所需细胞浓度。藻细胞采取显微镜检查进行无菌验证，并用培养物接种到三种不同浓度（1:1, 1:10, 1:100）的微生物检验培养基培养验证。

5.5 鉴定

5.5.1 鉴定流程

微藻分类鉴定流程应符合附录D的规定。

5.5.2 传统分类法

光学或电子显微镜下观察到的藻细胞的外观和形态特征，区分不同的藻种，对难以鉴定到种的，应鉴定到属。形态鉴定发生异议时，应三位及以上具有形态学鉴定经验的专家进行确认。

5.5.3 分子标记鉴定

5.5.3.1 要求

通过分子标记鉴定，将测序结果进行序列比对，确定藻种的种类。常规情况下，单基因测序可实现种属分类的鉴定；对于较难鉴定微藻，可联合几种分子标记法实现多基因数据基础上的鉴定；对于个别特殊微藻，可进一步使用基因组水平的分子标记进行辅助鉴定。

5.5.3.2 测序类型

测序引物应符合附录E。测序分为以下几种类型：

- a) 16S rRNA 基因测序适用于鉴定到属的原核微藻，18S rRNA 基因适用于真核微藻；
- b) ITS 测序适用于需要鉴定到属、种水平的真核微藻；
- c) *COI* 基因测序适用于需要鉴定到属或种的物种；
- d) *rbc L* 基因适用于目、科、属水平的系统发育分析，鉴定到属的物种。

5.5.3.3 基因组水平的分子标记

对于难以用普通单基因或多基因联合标记鉴定的微藻，采用限制性片段长度多态性、简单重复序列间扩增、简化基因组测序和全基因组测序等分子鉴定方式。

5.5.4 结果判定

形态鉴定与分子鉴定结果不一致时，应以分子鉴定结果为最终结果。

5.6 样品保藏号

对已确定鉴定结果的藻种生成独立且可被检索的样品保藏号,可按藻种鉴定时间顺序对样品进行编号,难以确定到种的以鉴定到属的先后顺序编号。长期没有鉴定出结果的藻种暂存于未编号的样品保存区,直到给出鉴定结果再进行编号。样品保藏号信息卡见附录F。

5.7 样本保存

5.7.1 要求

藻种应采用与其保存培养相适宜的保种条件和技术。藻种保存应填写登记表,表格内容见附录G。

5.7.2 保存方法

5.7.2.1 超低温保存

保存在液氮罐中,按藻种的纯度要求可选浸没式或非浸没式保藏方式,保藏温度 $170\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。超低温保存适用于需要长期保存(3年以上),且有对应抗冻保护剂的藻种。

5.7.2.2 极低温保存

藻种经过浓缩后应进行极低温保存。包括温控在 $(-80\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷冻真空干燥保存,温控在 $(-20\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温甘油生理盐水保存。冷冻真空干燥保存适用于需要长期保存(最大年限18年)的藻种,低温甘油生理盐水保存适用于需要中长期保存(3年左右)藻种。

5.7.2.3 低温保存

低温保存应按照SC/T 2047的规定,适用于2个月~3个月较长期需要传代的藻种。保存方式常用液体培养基保存法、固液双相继代保存法、平板保存法、斜面保存法。

5.7.2.4 常温保存

常温保存应按照SC/T 2047的规定,适用于15 d~30 d短期需要传代的藻种。保存方式常用液体培养基保存法和试管中琼脂斜面划线培养。

6 样本管理

6.1 样本存取

6.1.1 样本入库

填报样本入库申请,表格内容见附录H。入库申请表应经管理人员审核通过后,录入样本管理系统。每个样本应至少保存2份备份。

6.1.2 样本存放

样本入库时应采取分区定位的方式进行存放,以保证每个样本位置都对应存放于该处样本的编码。

6.1.3 样本出库

填报样本出库申请表应符合附录I的规定。需经管理人员审核通过后,方可取得藻种样本。非特殊需求及需要,原始样品不应离开资源库。

6.2 样本使用

使用单位索取、购买藻种应进行登记,并签订藻液处理协议,确保不污染环境造成环境危害。

6.3 出库样本处理

已出库样本使用后尚有存余,使用人员应与资源库工作人员沟通后将剩余样本及时销毁。

6.4 日常维护

定期进行活体样本的传代培养,具体方法见5.7.2.4。当备份样本耗尽后,资源库管理人员应对样品进行再次备份。

6.5 信息管理

6.5.1 必备信息包含微藻样本来源信息及样本首次入库时间、存放位置、出入库及使用记录、传代信息、保存条件、培养基、形态学鉴定结果资料、分子鉴定资料等。样本使用耗尽或由于其他意外情况导致丢失以后，应及时对样本存放信息进行注销。

6.5.2 可选信息宜包含经科学研究所产生的样本的遗传信息、生物化学测定成分及应用指导信息等。可选信息应由样本使用人员提供，并由信息系统管理人员在管理系统中定期进行更新维护。

7 质量与安全管理

7.1 质量管理

7.1.1 质量要求

资源库应按照GB/T19001要求运行。

7.1.2 审查

资源库质量管理，应设立内审员定期对资源库的标准操作程序的执行情况、库存系统、监管和安全等问题进行动态审查。

7.1.3 质量控制

定期对资源库中的样本进行抽检，判定微藻保存状态。

7.2 安全管理

7.2.1 环境安全

资源库环境安全要求见4.2.8。

7.2.2 液氮安全

资源库液氮存储装置应符合GB 5458的规定，应每天记录液氮的用量和剩余量，确保液氮量维持运行3d以上。做好防冻措施。

7.2.3 设备安全

资源库使用的设备设施应定期维护，关键设备应经设备负责人授权后方可操作。

7.2.4 应急预案

应建立应急预案制度，应急预案措施应包括生物安全事故应急措施、化学污染应急措施、意外创伤应急措施、其他预防性应急措施等。

附录 A

(规范性)

藻种库功能分区

A.1 接收和分发区域

接收和分发区域为污染区，开展微藻的接收和分发工作，应注意安全防护并避免样本和种质的交叉污染，配备清洁消毒措施。

A.2 实验操作区域

A.2.1 通用要求

资源库实验操作区域设计应符合GB 19489的要求。

A.2.2 培养基制备区

承担微藻培养基配制、灭菌等工作。应具备基本的实验条件与消毒灭菌设备。

A.2.3 纯化接种区

纯化接种区是清洁区，开展微藻的分离纯化与接种维护工作，实验人员应严格遵守实验室标准化操作规程，无菌操作并避免种质之间交叉污染。

A.2.4 显微镜检区

微藻的形态鉴定与质量监测的工作。应配备适合微藻质检所需的设备设施。

A.2.5 分子生物学实验区

微藻的分子生物学鉴定与质量检测的工作。应配备适合分子生物学实验所需的设备设施。

A.2.6 危险化学品保管区

危险化学品指定放置区域。

A.2.7 生物废弃物存放区

生物废弃物的指定放置区域。

A.3 种质保藏区域

种质保藏区域主要用于微藻活体及核酸样本的保藏。设置不同环境要求的保藏空间区隔，设定不同的光照培养环境。

A.4 信息办公区域

A.4.1 信息管理区

承担微藻种质的内部信息化管理与对外服务。应配备与资源库库容量和对外服务业务量相适应的软硬件设施。

A.4.2 综合办公区

日常办公场所。应配备与其工作相适应的设备设施。

附录 B

(规范性)

微藻资源样本采集环境描述信息表

微藻样本采集环境信息描述表，见表B.1。

表 B.1 微藻资源样本采集环境描述信息表

采集基本信息描述：						
采集人		采集人单位				
采集样品编号						
采集时间		采集地点				
采集地坐标						
海拔 m						
采集时季节及气候特征						
采集地环境信息描述						
采集地环境类型						
采集样本类型						
水域	水域性质					
	pH 值		温度 ℃		深度 m	
	盐度		电导率		其他	
	采集样品类型					
污泥	污泥沉积类型					
	pH 值		温度 ℃			
	其他					
土壤	土壤类型		pH 值			
	温度 ℃		湿度 %		其他	
生物体	微藻名称			部位、组织名称、采集样品状态		

附录 C

(资料性)

常用微藻培养基配方

C.1 f/2 培养基

C.1.1 适用范围

f/2培养基适用于硅藻类海洋真核微藻。

C.1.2 f/2 培养基配方

微藻f/2培养基配方，见表C.1。

表 C.1 微藻 f/2 培养基配方

成分	母液	用量 mL
NaNO ₃	75g/L dH ₂ O	1
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5g/L dH ₂ O	1
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30g/L dH ₂ O	1
微量元素母液	—	1
维生素母液	—	0.5
海水	—	1000

C.1.3 微量元素母液

微藻f/2培养基微量元素配方，见表C.2。

表 C.2 微藻 f/2 培养基微量元素配方

成分	初级母液	用量
FeCl ₃ ·6H ₂ O	—	3.15g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	—	4.36g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.8 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.3 g/L dH ₂ O	1 mL
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.0 g/L dH ₂ O	1 mL
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.0 g/L dH ₂ O	1 mL
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180.0 g/L dH ₂ O	1 mL
蒸馏水 (dH ₂ O)	—	1000 mL

C.1.4 维生素母液

微藻f/2培养基维生素配方，见表C.3。

表 C.3 微藻 f/2 培养基维生素配方

成分	初级母液	用量
盐酸硫胺 (维生素B ₁)	—	200 mg
生物素(维生素H)	0.1 g/L dH ₂ O	10 mL
维生素B ₁₂	1.0 g/L dH ₂ O	1 mL
蒸馏水 (dH ₂ O)	—	1000 mL

C.2 BG11 培养基

C.2.1 适用范围

BG11培养基适用于蓝藻通用培养基。

C.2.2 BG11培养基配方

微藻BG11培养基配方见表C.4，可根据不同生长环境选择蒸馏水或灭菌海水。

表 C.4 微藻 BG11 培养基配方

成分	母液	用量
柠檬酸铁溶液	—	1 mL
柠檬酸	6.0 g/L dH ₂ O	—
柠檬酸铁铵	6.0 g/L dH ₂ O	—
大量元素成分		
NaNO ₃	—	1.5 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	40.0 g/L dH ₂ O	1 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O	75.0 g/L dH ₂ O	1 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O	36.0 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ CO ₃	20.0 g/L dH ₂ O	1 mL
微量元素母液	—	1 mL
蒸馏水 (dH ₂ O) 或灭菌海水	—	1000 mL

C.2.3 微量元素母液

微藻BG11培养基微量元素配方，见表C.5。

表 C.5 微藻 BG11 培养基微量元素配方

成分	母液	用量
MgNa ₂ EDTA 3H ₂ O	—	1.000 g
H ₃ BO ₃	—	2.860 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	—	1.810 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	—	0.220 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	79.0 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	—	0.391 g
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	49.4 g/L dH ₂ O	1 mL
蒸馏水 (dH ₂ O)	—	1000 mL

C.3 Prov 培养基

C.3.1 适用范围

Prov适用于部分盐碱性土壤或海水中分离得到的微藻藻株。

C.3.2 微藻Prov培养基配方

微藻Prov培养基配方，见表C.6。

表 C.6 微藻 Prov 培养基配方

成分	母液	用量
NaNO ₃	75g/L dH ₂ O	1 mL
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5g/L dH ₂ O	1 mL
碱性土壤浸出液	—	15 mL
微量元素母液	—	1 mL
维生素母液	—	0.5 mL
海水	—	1000 mL

C.3.3 微藻Prov培养基微量元素配方

微藻Prov培养基微量元素配方，见表C.7。

表 C.7 微藻 Prov 培养基微量元素配方

成分	初级母液	用量
FeCl ₃ 6H ₂ O	—	3.15g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	—	4.36g

表C.7 微藻Prov培养基微量元素配方（续）

成分	初级母液	用量
CuSO ₄ 5H ₂ O	9.8 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6.3 g/L dH ₂ O	1 mL
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22.0 g/L dH ₂ O	1 mL
CoCl ₂ 6H ₂ O	10.0 g/L dH ₂ O	1 mL
MnCl ₂ 4H ₂ O	180.0 g/L dH ₂ O	1 mL
蒸馏水（dH ₂ O）	—	1000 mL

C.3.4 微藻Prov培养基维生素配方

微藻Prov培养基维生素配方，见表C.8。

表C.8 微藻Prov培养基维生素配方

成分	初级母液	用量
盐酸硫胺（维生素B ₁ ）	—	200 mg
生物素（维生素H）	0.1 g/L dH ₂ O	10 mL
维生素B ₁₂	1.0 g/L dH ₂ O	1 mL
蒸馏水（dH ₂ O）	—	1000 mL

C.4 L1培养基

C.4.1 适用范围

L1培养基在f/2培养基的基础上加入了部分微量金属元素，适用于沿海微藻。

C.4.2 微藻L1培养基配方

微藻L1培养基配方，pH范围为8.0~8.2，见表C.9。

表C.9 微藻L1培养基配方

成分	母液	用量 mL
NaNO ₃	75.0 g/L dH ₂ O	1
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5.0 g/L dH ₂ O	1
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30.0 g/L dH ₂ O	1
微量元素母液	—	1
维生素母液	—	0.5
灭菌海水	—	1000

C.4.3 L1培养基微量元素配方

微藻L1培养基微量元素配方，见表C.10。

表C.10 微藻L1培养基微量元素配方

成分	初级母液	用量
FeCl ₃ 6H ₂ O	—	3.15g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	—	4.36g
MnCl ₂ 4H ₂ O	178.10 g/L dH ₂ O	1 mL
ZnSO ₄ 7H ₂ O	23.0 g/L dH ₂ O	1 mL
CoCl ₂ 6H ₂ O	11.9 g/L dH ₂ O	1 mL
CuSO ₄ 5H ₂ O	2.50 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	19.9 g/L dH ₂ O	1 mL
H ₂ SeO ₃	1.29 g/L dH ₂ O	1 mL
NiSO ₄ 6H ₂ O	2.63 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₃ VO ₄	1.84 g/L dH ₂ O	1 mL
K ₂ CrO ₄	1.94 g/L dH ₂ O	1 mL
蒸馏水（dH ₂ O）	—	1000 mL

C. 4. 4 L1培养基维生素配方

微藻L1培养基维生素配方，见表C. 11。

表 C. 11 微藻 L1 培养基维生素配方

成分	初级母液	用量
盐酸硫胺 (维生素B ₁)	—	200 mg
生物素(维生素H)	0.1 g/L dH ₂ O	10 mL
维生素B ₁₂	1.0 g/L dH ₂ O	1 mL
蒸馏水 (dH ₂ O)	—	1000 mL

附录 D

(规范性)

微藻分类鉴定流程

图D.1给出了微藻分类鉴定流程。

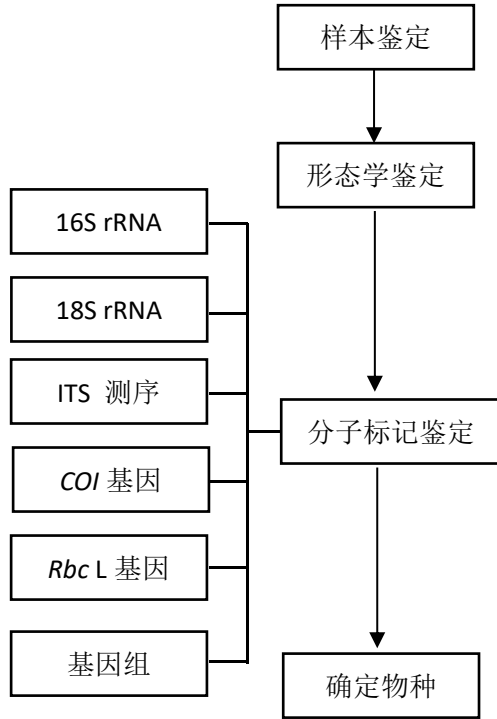


图 D.1 微藻分类鉴定流程

附录 E

(资料性)

分子标记鉴定引物参考序列

E.1 16S rRNA 基因测序引物序列

16S-27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',
 16S-1492R 5'-GGTACCTGTTACGACTT-3';
 16S rRNA基因测序可得到约1500 bp基因片段产物。

E.2 18S rRNA 基因测序引物序列

18S-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3',
 18S-R 5'-CCCGGGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3';
 18S rRNA基因测序可得到1600 bp~1800 bp 基因片段产物。

E.3 ITS 基因测序引物序列

ITS-F: 5'-GGAAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3',
 ITS-R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3';
 采用ITS基因测序扩增可得到600 bp~800 bp 基因片段产物。

E.4 *COI* 基因测序引物序列

COI-F: 5'-ATGAHGGDGCDCWGWAYATG-3',
COI-R 5'-CCWCCHCCHGCDGGRTC-3';
*COI*基因测序, 可得到约420 bp 基因片段。H、A、T、D、W、R为简并碱基, 其中H=A, C or T, D=A, G or T, W=A or T, Y=C or T, R=A or G。

E.5 *rbc L* 基因测序引物序列

rbc L -F: 5'-ATGTCTCAATCTGTAWCAGAACGGACTC-3',
rbc L -R 5'-TAARAAWCKYTCTCTCCAACGCA-3';
rbc L 基因测序, 可得到约660 bp 基因片段产物。W、K、Y为简并碱基, W=A or T, K=G or T, Y=C or T。

附 录 F

(规范性)

样品保藏号信息卡

样品保藏号信息卡，见表F.1。

表 F.1 样品保藏号信息卡

保藏号		原始编码	
学名		中文名	
培养基		培养条件	
来源		分离人	
入库时间		保存位置	
传代信息			

附 录 G
(规范性)
藻种保存登记表

藻种保存登记表格式样图，见表G.1。

表 G.1 样品保藏号信息卡

资源库编号		收到日期		编号日期	
保存位置			档案编号		
中文名		属名		种名加词	
其他保藏中心编号 ^a ：					
委托保藏人对藻种制定的编号：					
该藻种是否模式藻株： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 不是					
该藻种是否新分类单元： <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 不是					
原产国 ^b ：					
藻种转移历史：					
采集方式： <input type="checkbox"/> 自行分离 <input type="checkbox"/> 交换 <input type="checkbox"/> 购买 <input type="checkbox"/> 委托保藏 <input type="checkbox"/> 接受赠送					
采集地点			采集日期		
采集地生境					
水深		经度		纬度	
分离源			分离日期		
分离人		鉴定人		鉴定日期	
建议培养条件：最适培养温度：_____℃；建议光照强度：_____Lx；建议盐度：_____‰					
培养基（成分）：					
建议长期保藏方法： <input type="checkbox"/> 液氮超低温保存 <input type="checkbox"/> 冷冻真空干燥保存 <input type="checkbox"/> 其他 建议的保护剂：					
其它说明事项：					
寄存方式： <input type="checkbox"/> 个人寄存 <input type="checkbox"/> 单位寄存 <input type="checkbox"/> 非公开寄存，保存期限： <input type="checkbox"/> 赠送 <input type="checkbox"/> 公开寄存（公益性共享），公开延迟时间： <input type="checkbox"/> 有限公开寄存，公开延迟时间：					
提供形式： <input type="checkbox"/> 斜面培养物 <input type="checkbox"/> 液体浓缩液 <input type="checkbox"/> 其它					
委托保藏人姓名			单位		
通讯地址					
Tel			Fax		
E-mail			邮编		
委托保藏人签名：					年
					月 日
藻种资源库负责人签名：					年
					月 日
^a 若该藻种被其他保藏中心保藏请填写编号。					

^b 未注明原产国的藻种，将不被接受。如果该藻种的原产国不是中国，应提供详细的资料以及引进国家和引进时间。

附录 H

(规范性)

样本入库申请登记信息表

表H.1给出了样本入库申请登记信息。

表 H.1 样本入库申请登记信息表

样本基本信息描述:			
样本学名		样本中文名	
样本来源			
获取时间		获取人	
分离方式			分离人
鉴定方法			
保存条件			
保存形式			
培养基			
遗传信息 ^a	基因组		
	转录组		
	适当补充		
生物化学信息 ^a	油脂		
	色素		
	脂肪酸		
	适当补充		
应用指导信息 ^a	应用领域		
	开发前景		
	适当补充		
其他情况说明			
申请人姓名		申请单位	
通讯地址			
Tel		Fax	
E-mail		邮编	
申请人签名:	年 月 日		
藻种资源库负责人签名:	年 月 日		
可选。			

附录 I
(规范性)
样本出库申请登记表

表I.1给出了样本出库申请登记信息。

表 I.1 样本出库申请登记表

资源库编号		学名	
样本现有状态			
样本用途		使用范围	
出库样本使用耗尽情况记录:			
其它说明事项:			
样本出库方式:			
申请人姓名		单位	
通讯地址			
Tel		Fax	
E-mail		邮编	
申请人签名			年 月 日
藻种资源库负责人签名			年 月 日

参 考 文 献

- [1] Allen, Mary Mennes, and Roger Yate Stanier. "Growth and division of some unicellular blue-green algae." *Microbiology* 51.2 (1968): 199-202.
- [2] Álvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference[J]. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2003, 29(3): 417-434.
- [3] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae[J]. *Molecular phylogenetics and evolution*, 1992, 1(1): 3-16.
- [4] Becker D, Becker B, Satir P, et al. Isolation, purification, and characterization of flagellar scales from the green flagellate *Tetraselmis striata* (Prasinophyceae)[J]. *Protoplasma*, 1990, 156(1-2): 103-112.
- [5] De Vargas C, Audic S, Henry N, et al. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean[J]. *Science*, 2015, 348(6237): 1261605.
- [6] Evans K M, Wortley A H, Mann D G. An assessment of potential diatom "barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta)[J]. *Protist*, 2007, 158(3): 349-364.
- [7] Group C P W, Hollingsworth P M, Forrest L L, et al. A DNA barcode for land plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [8] Guillard, Robert RL, and John H. Ryther. "Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran." *Canadian journal of microbiology* 8.2 (1962): 229-239.
- [9] Guillard, Robert RL. "Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates." *Culture of marine invertebrate animals*. Springer, Boston, MA, 1975. 29-60.
- [10] Guillard, R. R. L., and P. E. Hargraves. "Stichochrysis immobilis is a diatom, not a chrysophyte." *Phycologia* 32.3 (1993): 234-236.
- [11] *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*[M]. CUP archive, 1979.
- [12] *Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods*[M]. Cambridge University Press, 1978.
- [13] Hamsher S E, Evans K M, Mann D G, et al. Barcoding diatoms: exploring alternatives to COI-5P[J]. *Protist*, 2011, 162(3): 405-422.
- [14] Hasle G R, Syvertsen E E, Steidinger K A, et al. *Identifying marine diatoms and dinoflagellates*[M]. Academic Press, 1996.
- [15] Hasle G R. The biogeography of some marine planktonic diatoms[C]//*Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*. Elsevier, 1976, 23(4): 319IN1-338IN6. 38.
- [16] Hughes, Elvyn O., P. R. Gorham, and A. Zehnder. "Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*." *Canadian Journal of Microbiology* 4.3 (1958): 225-236.
- [17] Lee R E. *Phycology*[M]. Cambridge University Press, 2018.
- [18] Melkonian M, Weber A. Der Einfluß von Kinetin auf das Wachstum von *Fritschiella tuberosa* Lyng. (Chaetophorineae, Chlorophyceae) in axenischer Massenkultur[J]. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1975, 76(2): 120-129.
- [19] Samanta B, Bhadury P. A comprehensive framework for functional diversity patterns of marine chromophytic phytoplankton using rbcL phylogeny[J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 20783.
- [20] Surek B, Melkonian M. CCAC - Culture Collection of Algae at the University of Cologne: A new collection of axenic algae with emphasis on flagellates[J]. *Nova Hedwigia*, 2004, 79(1-2): 77-92.
- [21] Watanabe, Makoto M. "Freshwater Culture." *Algal culturing techniques* (2005): 13.

- [22] 崔翠菊, 张立楠, 王娜, 等. 藻类 DNA 条形码研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(09): 113-117.
- [23] 何培民, 秦松, 严小军, 等. 海藻生物技术及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [24] 赖晓娟, 陈海敏, 杨锐, 严小军. 藻类基因组研究进展[J]. 遗传, 2013, 35(06): 735-744.
- [25] 吉莉, 谢树莲, 冯佳. 藻类植物叶绿体基因组研究进展[J]. 西北植物学报, 2010, 30(01): 208-214.
- [26] 施定基, 段睿, 李世明, 等. 藻类基因组研究进展[J]. 中国生物工程学会第四次会员代表大会暨学术讨论会论文摘要集, 2005.
- [27] 王靖淇, 王书平, 张远, 等. 高通量测序技术研究辽河真核浮游藻类的群落结构特征[J]. 环境科学, 2017, 38(4): 1403-1413.
- [28] 向小果, 王伟. 植物 DNA 条形码在系统发育研究中的应用[J]. 生物多样性, 2015, 23(3): 281-282.
-