

包埋脱水法超低温保存萱藻(*Scytosiphon lomentaria*) 丝状体的研究*

庄 琰 宫相忠 高 伟 张文健

(中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要 以本实验室保存的萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体为材料,用包埋脱水法超低温保存萱藻丝状体,研究了蔗糖预培养浓度和时间、胶球含水量、化冻温度以及胶球恢复时间对萱藻丝状体存活率和冻存后生长发育能力的影响。结果显示:(1)萱藻丝状体胶球在 0.4mol/L 的蔗糖溶液中预培养 6h 能获得最高的存活率;(2)萱藻丝状体胶球的最佳含水量较低,为 15%左右,当含水量高于 27%时,冻存后的存活率为 0;(3)40°C 为最适的化冻温度;(4)化冻后,将萱藻丝状体胶球在黑暗条件下恢复 18h 能显著提高存活率;(5)在最佳条件下,萱藻丝状体经冻存后的存活率最高可达 54.79%,恢复后的丝状体与冻存前丝状体并无区别,且经诱导后能够产生正常的孢子囊,放散的孢子可以发育成叶状体。

关键词 萱藻(*Scytosiphon lomentaria*); 丝状体; 包埋脱水法; 超低温保存

中图分类号 Q945 doi: 10.11693/hyhz20131200204

包埋脱水法是一种将生物材料用褐藻酸钠包埋,然后经脱水后投入液氮保存的一种较为广泛使用的种质保存方法,最早被法国学者应用于保存马铃薯茎尖的研究中(Fabre *et al.*, 1990)。与传统的两步法相比,包埋脱水法不仅能获得较高的存活率,而且具有省时省力、无需复杂的设备和仪器、无需使用抗冻保护剂从而避免了其对生物材料的毒性等优点,这无疑是超低温保存技术的一项重大进步(Fabre *et al.*, 1990; 王君晖等, 1999)。近年来,包埋脱水法被广泛应用于植物细胞、组织和器官的保存,在藻类方面,包埋脱水法在诸如坛紫菜自由丝状体(王起华等, 2000)、裙带菜配子体(王起华等, 2005)以及多种微藻(Hirata *et al.*, 1996; 李贺等, 2005)等的保存上取得了初步的成功。

萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)隶属于褐藻门(Phaeophyta),是一种广泛分布于我国北起辽东半岛南至广东省海陵岛之间沿海海域的大型海藻。萱藻不仅口味鲜美、营养价值高,而且具有抗氧化性(Kuda *et al.*,

2005)、抗肿瘤(Noda *et al.*, 1990; 徐年军等, 2001)和抗病毒(Hudson *et al.*, 1999)的特点,是一种经济价值极高的新型海藻。萱藻具有异形世代交替的生活史,由大型的叶状配子体世代和微小的孢子体世代构成。孢子体世代主要有垫状体、类垫状体和丝状体三种形式(邢永泽等, 2010)。萱藻丝状体是实验室扩增的主要对象,而且丝状体能够形成单室孢子囊并释放游孢子,进而发育成叶状体,因此是种质保存的最佳材料。关于萱藻种质保存的研究目前国内外尚未见报道,本研究用包埋脱水法对萱藻丝状体进行保存,探讨了预培养蔗糖浓度和时间、胶球含水量、化冻温度、胶球恢复时间对冻存后萱藻丝状体存活率和生长发育能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

萱藻成熟叶状体于 2012 年 4 月采自长岛自然海

*国家高技术研究发展计划(863 计划), 2012AA10A413 号。庄琰, E-mail: zhuangyan8998@163.com

通讯作者: 宫相忠, 教授, E-mail: gxzhw@163.com

收稿日期: 2013-12-18, 收修改稿日期: 2014-02-15

区。将叶状体用消毒棉棒反复擦洗干净后阴干刺激并放散雌、雄配子,雌、雄配子结合后培养约一周形成黄褐色丝状体,收集丝状体在光照培养箱中扩增培养。培养条件为 $(22.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,光强 $86.4\text{—}97.2\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,L:D=14:10,培养液为 F_1 培养液(高伟等,2012)。当丝状体培养至褐色时即可作为保存材料。

1.2 实验方法

1.2.1 包埋

将上述丝状体材料用搅拌器打碎至约 $500\text{—}600\mu\text{m}$ 长的小段,用消毒筛绢过滤掉培养液,再用灭菌海水冲洗两遍后将丝状体小段与3%的褐藻酸钠溶液混匀。然后用10mL注射器将藻液滴入含有 0.1mol/L CaCl_2 的3%的NaCl溶液中,轻轻摇动混合液,约20min后胶球硬化完成包埋过程。通过控制针头到液面的高度以及藻液滴入的速度,可将胶球的直径控制在3mm左右。

1.2.2 胶球的蔗糖预培养

将完成固定化的胶球置于不同浓度的蔗糖溶液中,在室温 $(22.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 及黑暗条件下预培养不同的时间。蔗糖浓度梯度为0、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mol/L;预培养时间梯度设置为0、2、4、6、8、10、12、24h。

1.2.3 胶球脱水与含水量的测定

胶球在蔗糖溶液中预培养完成后,用吸水纸吸干胶球表面残留的液体。以每60个胶球为一组称量鲜重并置于直径为9cm的培养皿中,将装有胶球的培养皿放在底部铺有干燥硅胶且直径为15cm的大培养皿中,盖上大培养皿盖并用保鲜膜封口,随即放入 21°C 的培养箱中在黑暗条件下干燥脱水。胶球脱水8h过程中,每隔0.5h取出一个培养皿称取胶球脱水后的重量,通过烘干 $(105^{\circ}\text{C}, 4\text{h})$ 可测出胶球的干重。胶球脱水后的含水量计算公式如下:

胶球脱水后的含水量=

$$\frac{\text{胶球脱水后的重量} - \text{胶球干重}}{\text{胶球鲜重}} \times 100\%$$

1.2.4 胶球的冰冻保存及化冻

将脱水后的胶球每15个为一组放入2mL的冻存管中,密封后立即投入液氮中保存。24h后,取出冻存管,迅速放入不同温度的恒温水浴锅中不停搅动,约20s后胶球表面白色消失,化冻完成。化冻温度梯度设置为20、30、40、50、 60°C 。

1.2.5 胶球的恢复、脱固定化与萱藻丝状体的恢复培养

将化冻后的胶球放入装有消毒海水的10mL离心管中在 21°C 黑暗条件下恢复不同的时间,然后用含 0.05mol/L 柠檬酸钠的3%的NaCl溶液对胶球脱

固定,胶球溶解后重新得到含有丝状体小段的混合液。通过对混合液离心 $(2500\text{r}/\text{min}, 3\text{min})$ 得到萱藻丝状体,然后用添加了 F_1 培养液的消毒海水重新悬浮丝状体,再将藻液置于扩增条件下恢复培养。胶球在黑暗条件下恢复时间梯度设为0、6、12、18、24、48h。

1.2.6 存活率的测定

取恢复培养2d的丝状体悬液2mL于离心管中,加入等体积的0.1%的中性红染液进行染色,30min后离心去除染液,并用消毒海水重新悬浮丝状体。在显微镜下进行观测,凡是被染成红色的丝状体细胞即为活细胞。脱水后存活率和冻存后存活率计算公式如下:

脱水后的存活率=

$$\frac{\text{脱水后活细胞数占细胞总数的比例}}{\text{脱水前活细胞数占细胞总数的比例}} \times 100\%$$

冻存后的存活率=

$$\frac{\text{冻存后活细胞数占细胞总数的比例}}{\text{冻存前活细胞数占细胞总数的比例}} \times 100\%$$

上述每组实验至少重复2次,每次实验同一处理均设置三个平行样,每个样品至少计数2000个细胞,文中数据为6个平行样品的平均值。

1.2.7 生长发育能力的鉴定

将完成脱固定化的萱藻丝状体移至扩增条件下培养,定期观察丝状体的生长发育情况。待丝状体长到一定量后置于 $(17.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,L:D=10:14,光强 $(28.0\pm 2.7)\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下诱导孢子囊,阴干刺激孢子囊使其放散孢子,观察孢子的发育情况。

2 结果

2.1 脱水时间与胶球含水量的关系

由图1可知,在胶球脱水8h内,脱水速率逐渐降低,脱水过程大致可分成三个阶段。0—2h,脱水速率较高,胶球含水量从80.42%下降到44.87%,平均脱水速率约为17.78%/h;2—5h,胶球含水量从44.87%降至18.22%,平均脱水速率减小至8.88%/h;5—8h,平均脱水速率进一步降低,约为4.26%/h,8h时含水量为5.45%。从整个脱水过程来看,胶球的平均脱水速率约为9.37%/h。

2.2 胶球含水量对萱藻丝状体存活率的影响

胶球含水量对冻存前、后萱藻丝状体的存活率的影响显著。实验结果显示(图2),随着胶球含水量的降低,冻存前丝状体的存活率呈下降趋势,当含水量降至9.34%时,丝状体存活率仍在50%以上,说明经

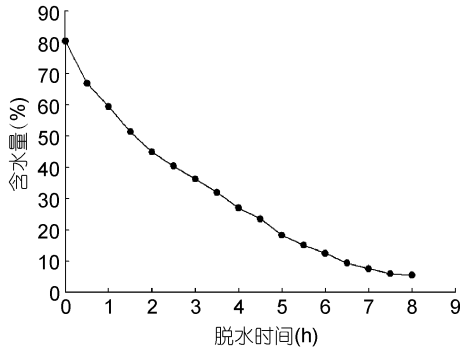


图 1 脱水时间与胶球含水量的关系

Fig.1 The relationship between dehydration time and water content of the beads

蔗糖预培养浓度和时间分别为 0.4mol/L 和 4h, 胶球恢复 12h, 化冻温度为 40°C

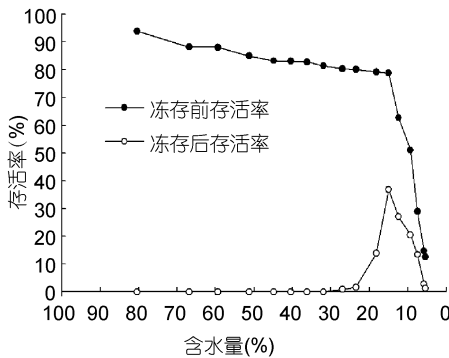


图 2 含水量对冻存前后萱藻丝状体存活率的影响

Fig.2 The effect of water content on survival rate of the filaments of *S. lomentaria* before and after cryopreservation

蔗糖浓度和预培养时间分别为 0.4mol/L 和 4h, 胶球恢复 12h, 化冻温度为 40°C

蔗糖预培养后萱藻的抗脱水能力较强; 随含水量的进一步降低, 冻存前丝状体的存活率大幅度下降, 当含水量为 5.45%时, 冻存前丝状体的存活率只有 12.51%。相比之下, 胶球含水量对冻存后丝状体存活率的影响呈现不同的趋势: 若胶球含水量高于 26.96%, 冻存后丝状体的存活率都为 0; 随着含水量的降低, 冻存后丝状体的存活率逐渐升高, 当胶球含水量为 15.01%时, 存活率达到最高, 约为 36.83%; 之后含水量进一步降低, 冻存后丝状体的存活率也随之降低。因此, 萱藻丝状体胶球含水量为 15%时最有利于其冰冻保存。

2.3 蔗糖预培养浓度对萱藻丝状体存活率的影响

蔗糖是一种“复合型”冻存保护剂, 可提高细胞脱水过程中的存活率并增强其抗冻能力。由实验结果可知(图 3), 蔗糖预培养对冻存前、后萱藻丝状体的存活率影响显著。若不用蔗糖进行预培养, 冻存前、后

丝状体的存活率均为 0。蔗糖浓度在 0.2—0.4mol/L 范围内, 随着蔗糖浓度的升高, 冻存前、后丝状体的存活率均逐渐升高, 并在蔗糖浓度为 0.4mol/L 时达到最大值, 分别为 74.84%和 35.18%。随蔗糖浓度的继续升高, 冻存后的存活率逐渐下降, 0.8mol/L 时仅为 13.15%; 而冻存前的存活率也缓慢下降, 但都保持在 60%以上。因此, 蔗糖预培养的最佳浓度是 0.4mol/L。

2.4 蔗糖预培养时间对萱藻丝状体存活率的影响

图 4 为蔗糖预培养时间对冻存前、后萱藻丝状体存活率的影响。结果表明: 除 0h 时, 冻存前、后丝状体的存活率均为 0 以外, 从 2—24h, 冻存前丝状体的存活率基本一致, 都在 70%左右, 说明萱藻丝状体对高浓度蔗糖有较大的适应性; 而冻存后丝状体的存活率呈现先增大后减小的趋势, 并在 6h 时达到最大值 50.08%。可见, 蔗糖预培养 6h 可大幅度提高冻存

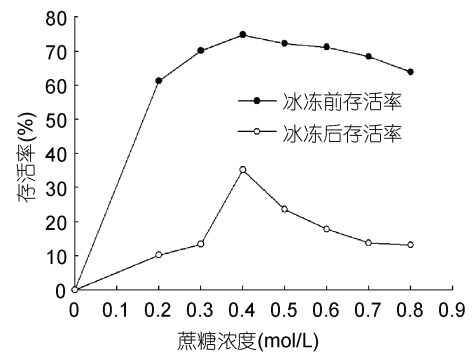


图 3 蔗糖浓度对冻存前后萱藻丝状体存活率的影响

Fig.3 The effect of sucrose concentration on survival rate of the filaments of *S. lomentaria* before and after cryopreservation 胶球含水量为 15%, 蔗糖预培养时间为 4h, 胶球恢复 12h, 化冻温度为 40°C

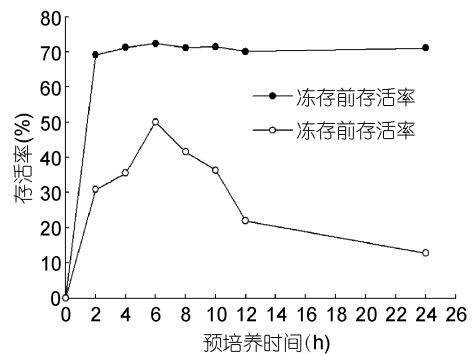


图 4 蔗糖预培养时间对冻存前后萱藻丝状体存活率的影响

Fig.4 The effect of preculture time on survival rate of the filaments of *S. lomentaria* before and after cryopreservation 胶球含水量为 15%, 蔗糖浓度为 0.4mol/L, 胶球恢复 12h, 化冻温度为 40°C

后萱藻丝状体的存活率。

2.5 化冻温度对萱藻丝状体存活率的影响

实验结果显示(图 5), 化冻温度对存活率有极大的影响。若在 20°C 条件下对胶球化冻, 存活率仅为 8.78%; 当化冻温度为 40°C 时, 存活率最高, 可达 50.64%; 而当化冻温度为 60°C 时, 存活率降至 20.53%。由此说明, 化冻温度过高或者过低都会对胶球化冻过程产生不利的影响, 40°C 可达到最佳化冻效果。

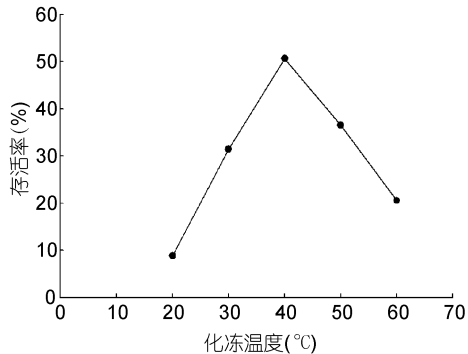


图 5 化冻温度对萱藻丝状体存活率的影响

Fig.5 The effect of thawing temperature on survival rate of the filaments of *S. lomentaria*

胶球含水量为 15%, 蔗糖浓度和预培养时间分别为 0.4mol/L 和 6h, 胶球恢复 12h

2.6 胶球恢复时间对萱藻丝状体存活率的影响

胶球化冻后置于消毒海水中在黑暗条件下进行恢复, 使脱水的胶球进行“复水”。实验结果表明(图 6): 如不对胶球进行恢复, 萱藻丝状体的存活率只有 18.92%; 胶球恢复时间长于或短于 18h 都会降低存活率, 当胶球恢复 18h 时, 萱藻丝状体存活率最高可达 54.79%。因此, 胶球在黑暗条件下恢复 18h 效果最好。

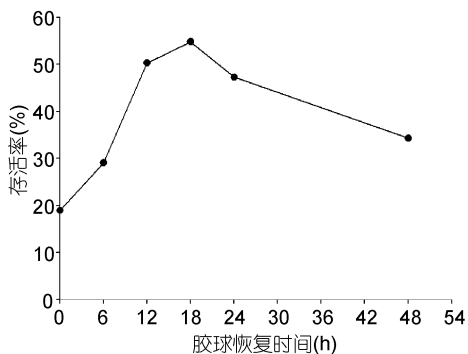


图 6 胶球恢复时间对萱藻丝状体存活率的影响

Fig.6 The effect of recovery time of the beads on survival rate of the filaments of *S. lomentaria*

胶球含水量为 15%, 蔗糖浓度和预培养时间分别为 0.4mol/L 和 6h, 化冻温度为 40°C

2.7 冻存后萱藻丝状体生长发育能力的观测

将脱固定后的萱藻丝状体移入扩增条件下恢复培养, 恢复一个月的萱藻丝状体长势良好, 且与未冻存的萱藻丝状体并无差别(见图 7a, b)。另一方面, 冻存后的萱藻丝状体具有生长发育能力, 能够形成正常的孢子囊并释放孢子, 而且释放的孢子能发育成正常的幼叶状体(见图 7c—f)。由此, 我们认为包埋脱水法适用于萱藻丝状体的种质保存。

3 讨论

在高等植物的种质保存中, 包括两步法、包埋脱水法、玻璃化法以及包埋-玻璃化法等在内的多种超低温保存法均已成功得到运用, 而对于藻类种质保存来说, 更多采用的是两步法和包埋脱水法。就目前各种包埋脱水法的研究来看, 胶球的蔗糖预培养和含水量是影响生物材料冻存后存活率的两个重要因素, 而不同的生物材料对预培养和含水量的要求也不尽相同。

用包埋脱水法保存种质, 细胞须脱水至细胞溶质充分浓缩到热力学的凝固点以下, 避免冰晶的形成(Stillinger, 1995)。细胞若未充分脱水, 则会在冻存和复苏的过程中遭遇冰晶的伤害而降低冻存后的存活率(Day *et al*, 2000)。保存材料的种类不同, 其最适合含水量亦有较大的差异。对高等植物材料来说, 其最适合含水量范围变化较大, 如体胚为 13%—20%, 而茎尖和分生组织多为 20%—40%(王君晖等, 1999)。已报道的几种大型海藻的最适含水量一般在也在 20%—40%左右, 如海带配子体的最适含水量为 40%(Zhang *et al*, 2008), 裙带菜配子体的最佳含水量是 25%(王起华等, 2005), 而坛紫菜自由丝状体在含水量在 16%—40%范围内, 都可保持较高的存活率(王起华等, 2000)。本研究发现, 萱藻丝状体有较宽的脱水范围, 当含水量为 9%时, 其冻存前的存活率仍在 50%左右。但冻存后萱藻丝状体的存活率范围较窄, 只有当含水量低于 27%才可存活, 并且在含水量为 15%时可达最佳效果。

蔗糖是一种“复合型”冻存保护剂, 它既可以作为细胞内也可作为细胞外保护剂。通过对胶球进行蔗糖预培养, 一方面可以使细胞适度脱水, 另一方面又可提高细胞外液的浓度, 减少细胞内冰晶的生长(刘涛等, 2006)。高等植物材料预培养时一般选用的蔗糖浓度为 0.3—0.75mol/L, 有些研究所用的蔗糖浓度甚至高达 1.0mol/L, 但 0.75mol/L 更为常用(王君晖等,

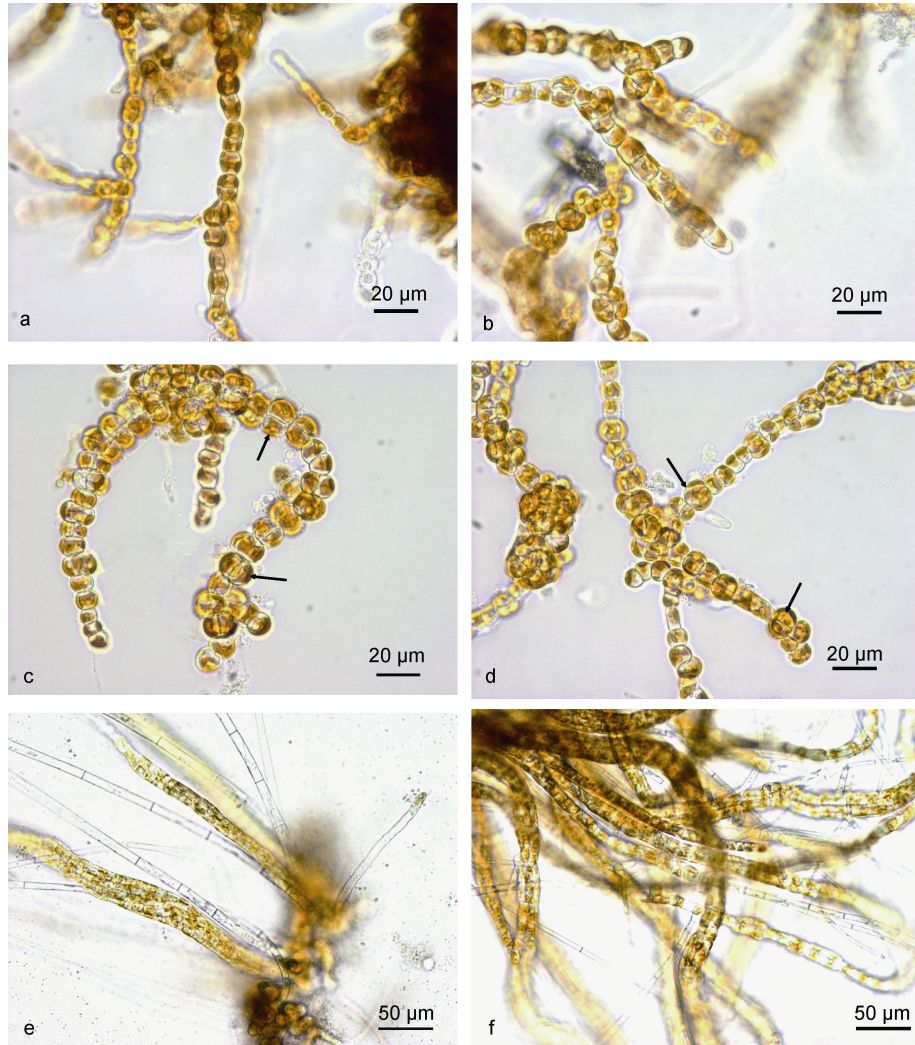


图 7 冻存前后萱藻丝状体生长发育的比较

Fig.7 Comparison between cryopreserved and non-cryopreserved filaments of *S. lomentaria* in the growing development

a. 冻存前萱藻丝状体; b. 冻存后萱藻丝状体; c. 冻存前萱藻丝状体形成的孢子囊; d. 冻存后萱藻丝状体形成的孢子囊; e. 由冻存前萱藻丝状体放散的孢子发育成的幼叶状体; f. 由冻存后萱藻丝状体放散的孢子发育成的幼叶状体

1999)。蔗糖培养时间一般为 1d, 有些可达 3—10d (Mari *et al*, 1995)。关于对藻类进行蔗糖预培养的报道并不多见, 有研究证明掌状海带配子体的最佳蔗糖预培养浓度和时间分别为 0.3—0.4mol/L 和 6h (Vigner *et al*, 1997)。本研究证明, 蔗糖可大幅度提高萱藻丝状体的抗脱水能力和抗冻能力, 对冻存前、后萱藻丝状体胶球的存活率有极大影响。若不用蔗糖进行预培养, 萱藻丝状体会因过度脱水和冻存过程中冰晶的形成而死亡。萱藻丝状体的最佳蔗糖预培养浓度和时间分别为 0.4mol/L 和 6h 左右, 而这与掌状海带配子体具有相似性。

化冻操作对材料的存活率有很大影响 (Dumet *et al*, 2002), 一般采用快速化冻法, 即将冻存的材料迅

速移入 25—40°C 的恒温水浴锅中快速搅动, 直至最后一粒冰晶消失。快速化冻法可有效阻止化冻过程中细胞内冰晶的形成 (Taylor *et al*, 1999)。本研究探讨了 20—60°C 的化冻温度对萱藻丝状体存活率的影响, 证明了 40°C 是最佳的化冻温度, 温度太低会导致化冻过程中冰晶的重新生成而损害细胞, 而温度过高又会对细胞自身产生不利的影响。因此, 选取合适的化冻温度也是包埋脱水法的一个重要环节。

在包埋脱水法中, 对经历了脱水-冰冻-化冻过程的胶球, 在培养之初, 还要经历一个“复水”的过程, 即恢复到正常含水量的过程 (王起华等, 2006)。本研究采取的恢复方法是将其放入海水中在黑暗条件下进行恢复, 在恢复开始时, 细胞会经历一

个快速的复水过程。研究表明: 将化冻的萱藻丝状体胶球恢复 18h, 能有效提高存活率; 恢复时间太短, 会导致“复水”不够充分; 恢复时间太长, 对细胞存活有抑制作用。关于恢复方法对藻类冰冻保存影响的研究鲜有报道(Taylor *et al*, 1999), 还有许多问题需要进一步的探究。

将脱固定后的萱藻丝状体置于正常条件下进行培养, 观察其生长发育能力。研究发现, 冻存后的萱藻在初始生长阶段较多地以团状细胞形式存在, 并且颜色呈较浅的黄褐色, 随着培养时间的延长, 丝状体慢慢从团状细胞伸出。充气培养一个月后, 可见呈褐色念珠状的萱藻丝状体。冻存后的萱藻丝状体与冻存前的丝状体在形态、结构上完全一致, 且经诱导后能够产生孢子囊并释放孢子, 孢子能发育成正常的幼叶状体。以上说明, 包埋脱水法能够成功运用于萱藻的种质保存。

综上所述, 本研究首次采用包埋脱水法成功冻存了萱藻丝状体。研究结果表明: 胶球含水量和蔗糖预培养是影响冻存后萱藻丝状体存活率的关键因素, 为了提高冻存后的存活率, 适宜将胶球脱水至较低的含水量并采用较低的蔗糖浓度和较短的预培养时间。另外, 对胶球进行快速的化冻以及适当的恢复也可在一定程度上提高存活率。冻存后的萱藻丝状体有较高的存活率, 而且经恢复后仍具有生长发育能力。因此, 包埋脱水法是保存萱藻丝状体一种较为理想的方法, 在以后的实验室萱藻种质保存以及萱藻种质库构建过程中可以使用该方法。但是, 本研究中萱藻丝状体的最高存活率与已报道的经包埋脱水冰冻保存后的坛紫菜丝状体(王起华等, 2000)等的最高存活率仍有一定的差距, 如何进一步提高萱藻丝状体经包埋脱水超低温保存后的存活率仍需进一步探究。

参 考 文 献

王君晖, 边红武, 黄纯农, 1999. 植物样品包埋脱水法超低温保存的研究进展. 植物学通报, 16(5): 582—586
 王起华, 刘 明, 程爱华, 2000. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)自由丝状体的胶囊化冰冻保存. 辽宁师范大学学报, 23(4): 387—390
 王起华, 刘艳萍, 张恩栋等, 2005. 包埋脱水法冷冻保存裙带

菜配子体克隆的研究. 海洋学报, 27(2): 154—158
 王起华, 李 莹, 刘艳萍等, 2006. 用包埋脱水法冰冻保存小新月菱形藻. 海洋科学, 30(4): 50—53
 邢永泽, 宫相忠, 尹宝树等, 2010. 萱藻不同发育阶段形态学及生活史的研究. 中国海洋大学学报, 40(8): 98—103
 刘 涛, 张 静, 孟祥红等, 2006. 海带雌雄配子体克隆细胞的超低温保存实验. 海洋学报, 28(2): 175—177
 李 贺, 王起华, 李婷婷等, 2005. 包埋脱水法冻存 3 种饵料金藻的研究. 大连民族学院学报, 7(1): 62—66
 徐年军, 范 晓, 韩丽君等, 2001. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选. 海洋与湖沼, 32(4): 408—413
 高 伟, 宫相忠, 张必达, 2012. 环境因子对萱藻(*Scytosiphon lomentaria*)丝状体孢子放散的影响. 海洋与湖沼, 43(2): 244—248
 Day J G, Fleck R A, Benson E E, 2000. Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. Journal of Applied Phycology, 12(3—5): 369—377
 Dumet D, Grapin A, Bailly C *et al*, 2002. Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: Importance of thawing method in the case of *Pelargonium meristems*. Plant Science, 163(6): 1121—1127
 Fabre J, Dereuddre J, 1990. Encapsulation dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. Cryo-Letters, 11(6): 413—426
 Hirata K, Phunchindawan M, Takamoto J *et al*, 1996. Cryopreservation of microalgae using encapsulation-dehydration. Cryo-Letters, 17(5): 321—328
 Hudson J B, Kim J H, Lee M K *et al*, 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. Journal of Applied Phycology, 10(5): 427—434
 Kuda T, sunekawa M T, Goto H *et al*, 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. Journal of Food Composition and Analysis, 18(7): 625—633
 Mari S, Engelmann F, Chabrillange N *et al*, 1995. Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) in vitro plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. Cryo-Letters, 16: 289—298
 Noda H, Amano H, Arashima K *et al*, 1990. Antitumor activity of marine algae. Hydrobiologia, 204—205(1): 577—584
 Stillinger F A, 1995. A topographic view of supercooled liquids and glass formation. Science, 267(5206): 1935—1939
 Taylor R, Fletcher R L, 1999. A simple method for the freeze-preservation of zoospores of the green macroalga *Enteromorpha intestinalis*. Journal of Applied Phycology, 11(3): 257—262
 Vigneron T, Arbault S, Kass R, 1997. Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria digitata* (L) Lamouroux by encapsulation dehydration. Cryo-Letters, 18(2): 93—98
 Zhang Q S, Cong Y Z, Qu S C *et al*, 2008. Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria japonica* (Phaeophyta) using encapsulation-dehydration with two-step cooling method. Journal of Ocean University of China, 7(1): 65—71

CRYOPRESERVATION OF FILAMENTS OF *SCYTOSIPHON LOMENTARIA* BY ENCAPSULATION-DEHYDRATION

ZHUANG Yan, GONG Xiang-Zhong, GAO Wei, ZHANG Wen-Jian
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract Filaments of *Scytosiphon lomentaria* cryopreserved were used as the materials to study the impacts of encapsulation-dehydration in terms of sucrose concentration, preculture time, water content of the beads, thawing temperature and the recovery time of the beads, on the survival rate and the growth performance of the filaments. The results are followed. The beads of *S. lomentaria* had highest survival rate after precultured in 0.4mol/L sucrose for 6 hours. The optimal water content of the beads was relatively low, only about 15%; the survival rate was zero when water content was higher than 27%. Temperature at 40°C was best for thawing the beads. The survival rate of *S. lomentaria* thawed could be enhanced significantly after recovery in dark for 18h. Under the optimal conditions, the survival rate of the filaments thawed could reach as high as 54.79%, and the recovered filaments were the same to those before cryopreservation. The induced filaments could produce normal sporangia, and the spores released from the sporangia were able to grow into thalli.

Key words *Scytosiphon lomentaria*; filaments; encapsulation-dehydration; cryopreservation