

Principles and methods on the cryopreservation of macroalgae germplasm

张玉荣^{1,3}, 李大鹏², 于子山¹

(1. 中国海洋大学 生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071;
3. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100)

中图分类号: Q178

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)07-0107-06

海洋藻类的保存工作起始于 20 世纪初期对海洋微藻的保护, 国际著名的海洋微藻保存机构 CCAP、SAG、UTEX、COBRA 等主要进行海洋微藻种质资源的保存, 其种质保存的数量超过了 2000 多种, 种质收集范围也从早期的区域性海藻种类发展到世界范围内海藻种质采集工作。上述国际海藻种质资源保存主要以微型藻类为主, 很少有关大型海藻种质保存的报道, 种质保存的方式以细胞继代培养为主, 仅 CCAP 报道了超低温保存。

中国已经发展和建立了一系列大型海藻种质资源保存技术, 收集和保存了大量具有生产应用价值的海藻遗传资源, 为大型海藻的种质保存做出了较为突出的贡献。目前, 已经建立低温弱光保存技术、固体保存技术、组织(愈伤)培养、单倍体克隆和超低温保存技术, 实现了包括海带、紫菜、裙带菜的种质资源库建设。为了更好地发展海洋藻类保存技术, 深入开展海洋种质资源保护工作, 作者就大型海藻低温保存的原理和方法展开讨论, 希望对进一步开展该方面的研究有所裨益。

1 大型海藻种质冷冻保存的方法和原理

1.1 大型海藻种质冷冻保存的方法

目前大型海藻种质保存技术按照保存温度可分两大类: 传统的低温弱光保存(一般为 8~12 ℃)和以低温(4 ℃)、冷冻(-40 ℃)、低温真空冷冻干燥和超低温(-196 ℃)为主的冷冻保存。下面将对海藻种质保存的方法作简要阐述。

1.1.1 传统的低温弱光保存

传统的低温弱光保存是目前较常用的一种大型海藻种质保存的方法, 该方法是在适宜的光照、

温度条件下, 利用液体培养基保存海藻细胞。低温弱光条件下海藻细胞的代谢水平较低, 能够在一定程度上实现海藻种质的长期保存。现在海带、紫菜和裙带菜等大型藻的种质保存一般采用这种方法。

1.1.2 冷冻保存

生物材料之所以在低温下能够长期保存, 是因为低温能抑制生物细胞的生化活动, 尤其在超低温条件下, 细胞的整个代谢活动等几乎完全停止, 可排除遗传性状的变异, 同时保存细胞活力。因此该方法能有效解决海藻种质保存中的污染、混杂和变异问题, 有望实现藻类种质的长期保存。目前用于大型海藻低温冷冻保存的方法主要有以下几种。

1.1.2.1 低温(4 ℃)保存

4 ℃的低温能够在一定程度上抑制生物细胞的生化活动、保持生物细胞活力, 是一种常见的海藻种质保存方法。

1.1.2.2 冷冻(-40 ℃)保存

-40 ℃低温能够抑制生物细胞的生化活动、可排除遗传性状的变异, 可用于多数海藻种质保存, 对于冷敏感的海藻细胞除外。

1.1.2.3 低温真空冷冻干燥法

1967 年 Holm-Hansen 用该法成功保存了 2 种蓝绿藻和 4 种绿藻。低温真空干燥技术的基本方法是先将生物材料低温冻结, 然后用真空技术将物料

收稿日期: 2007-10-20; 修回日期: 2008-01-10

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA09Z421)

作者简介: 张玉荣(1984-), 江苏铜山人, 硕士, 从事大型藻种质保存研究, E-mail: yurongzhang2008@yahoo.com.cn; 李大鹏, 通信作者, E-mail: dpli@ms.qdio.ac.cn

中的水分抽干,使之干燥。

1.1.2.4 超低温(-196)保存

超低温保存是指在低共熔点(eutectic point,约为-135~-139)以下的温度保存材料,通常采用液态氮作冷媒。超低温保存能够长期保持生物遗传稳定性,是目前保存活体生物材料最为有效的方法^[1]。超低温保存藻类的研究开始于20世纪60年代,之后的20年里主要对各种淡水、海洋微藻的保存进行了较为深入的研究^[2],但很少有关于保存大型海藻的报道。直到进入20世纪80年代才对大型海藻的超低温保存给予了更多关注,采用的方法主要以两步法为主^[3-13],近年来又发展了胶囊化-脱水法和玻璃化法,并开始应用于大型藻类的冷冻保存^[14-17]。下面将对这几种方法作简要叙述。

1.1.2.4.1 一步法

一步法对早期的冷冻保存方法进行改进,在生物材料中加入甘油或DMSO(二甲基亚砜)后再投入液氮中保存^[18]。但是,一步法对含水量较高的海藻细胞一般不太适合,只适用于少数藻类的保存^[2]。

1.1.2.4.2 两步法

该方法的第一步是在保存材料中加入抗冻保护剂,然后对材料进行预冻。第二步是将预冻过的材料投入液氮中快速冷冻^[2, 19]。Morris^[20]等较早采用两步冷冻法成功地保存了多种藻类。大量研究结果表明,两步法适用于多种微藻及部分大型藻类的保存,目前已成为藻类种质超低温保存最为传统的方法。近年来,运用两步法保存大型海藻已取得了很大进展, van der Meer等^[3]用两步法成功地保存了江蓠属、角叉菜属和石莼属等几种大型海藻;陈国宜^[4-6]对坛紫菜和条斑紫菜的果孢子和其他几种红藻的果孢子的液氮保存作了初步探讨; Ginsburger-Vogel^[7]曾采用过两步冷冻法保存裙带菜配子体, Kuwano等^[8-10]也曾经用该法冷冻保存过条斑紫菜配子体和丝状体,以及海带属包括海带、长海带、*Kjellmaniella crassifolia* Miyabe、*Ecklonia stolonifera* Okamura、裙带菜、鹅掌菜的配子体细胞; Shigeki等^[11]将爱森藻的配子体细胞保存在液氮中,获得了较高的存活率; Taylor等^[12]研究了肠浒苔孢子的冷冻保存技术; Zhang等^[13]研究了海带种质的超低温保存,发现经过24h的保存,50%的孢子在复温后具有活力,并且能够继续发育成配子体克隆或者是孢子体。两步法的缺点主要是在预冻过程中要严格控制降温速率和停留时间,同时要求特殊的设备和技术,而且使用的抗冻保护剂对生物材料有害。

1.1.2.4.3 包埋脱水法

包埋脱水冷冻保存技术于20世纪90年代初建

立,该法运用了细胞固定化方法的原理,将生物材料包埋在褐藻胶基质中,使其胶囊化(固定化),适度脱水后再进行超低温保存。近年来已将该方法用于几种大型藻类的保存,并获得初步成功^[14-16]。该技术操作简单,不需要复杂设备,不使用抗冻保护剂,是对超低温保存技术的一个重大改进,目前需要解决的关键技术是预培养条件、脱水速率和胶球含水量。

1.1.2.4.4 玻璃化法

近十几年来,应用该技术已经成功地保存了100余种植物材料,包括植物茎尖、原生质体、分生组织、合子胚、细胞等。通过借鉴高等植物玻璃化冻存的经验和方法,相信玻璃化法在对大型藻类种质进行超低温保存方面会有很大的应用潜力。采用该方法保存藻类种质已有成功报道^[17]。

为了提高保存效果,可以将玻璃化法和包埋法结合使用^[21],该方法集包埋法和玻璃化法的优点于一身,操作简便,可以对大量材料进行处理,而且与包埋法相比,复温后材料再生较早,存活率较高。虽然目前还没有应用该方法保存大型海藻的报道,但该方法为大型海藻种质保存提供了新的思路。

遗传稳定性是海藻种质保存中最为关键的问题,是选择保存方法、确定保存条件的最重要指标,是判断种质保存技术可行性的重要依据。虽然-40℃的低温保存和-196℃的冷库保存都能够有效地保存生物材料,且设备简单、经济实用,也能在一定程度上保持种质遗传稳定性,但是在以上用于海藻种质长期保存的方法中,超低温保存无疑是长久保持海藻种质遗传稳定性的最好方法。以下将重点讨论超低温保存种质有关内容。

1.2 大型藻种质超低温保存的原理

超低温保存一般以液氮作为冷源,又称液氮(LN-196)保存,理论上讲,超低温保存可以大大减慢,甚至终止细胞代谢和衰老过程,能够最大限度地抑制生理代谢强度,保持生物材料遗传稳定性,从而达到长期保存种质的目的。

从目前对大型海藻种质保存的研究来看,一般选择保存海藻的配子体^[8-11, 14, 16]、果孢子^[4-6]和游孢子^[2]或丝状体^[15]等。对大型海藻种质保存基于曾呈奎等在20世纪70年代的研究,他们通过海藻单倍体的细胞培养探明了海带、紫菜等大型海藻的生活史,并成功分离培养出海藻的雌雄配子体、果孢子、游孢子和丝状体^[22]。因此保存海带、紫菜等大型海藻的单倍体在育种中很有价值,可以用作育种材料,也可以用来研究杂种优势。

据统计,国际上已对 2000 多种株的藻类进行过冷冻保存的研究,这些研究为大型海藻超低温保存提供了有力的理论基础。近年来超低温保存方法的发展已经达到一个新阶段,随着一些新的技术开始用于超低温保存技术的研究中,如天然抗冻保护剂-抗冻蛋白的使用,低温生物显微镜的应用以及玻璃化、包埋脱水法等新的冷冻方法的发展和建立,大型海藻的超低温保存将会有更广阔的前景。

2 影响超低温保存存活率的因素

实验材料本身的抗冻性对存活率有重大的影响^[12,19]。超低温保存操作过程中的每一步失误都可能对细胞造成致死性的伤害,藻类细胞与高等植物相比,含水量、液泡化程度高,在超低温保存中,更易受到细胞内形成冰晶的伤害。因此,优化冷冻保存程序是提高海藻存活率的一个重要途径。

2.1 海藻自身的抗冻性

2.1.1 海藻的种类和株系

海藻的种类和株系差异是决定存活率高低的重要因素。Morris^[20]对不同种、株的小球藻的冷冻保存实验表明,他们的抗冻性差异极大,所以藻的种类和株系差异可能是影响某些藻类存活率的重要因素。

2.1.2 海藻细胞

Morris^[23]的研究表明一般处于静止期的细胞对冻害的敏感性要低于指数期细胞。Benhra^[24]在冷冻保存栅藻时却得到了相反的结果。而 Ben-Amotz^[25]对 12 种藻冷冻保存后观察到细胞年龄与抗冻性无关。因此,细胞年龄对抗冻性的影响可能与细胞的种类有密切关系,不同的材料应选用不同年龄的细胞。

2.1.3 培养条件

2.1.3.1 预培养

可以通过选择适宜的预培养条件提高藻类的抗冻性。某些营养盐的缺乏和营养方式的改变都可以增加抗冻性^[12,19]。已有实验证明,碳酸氢钠和磷酸盐的限制均诱导出了较大的抗冻性^[26]。此外,光强、光周期等培养条件也可显著影响藻类生长发育状态和抗冻性^[27]。

2.1.3.2 零上低温驯化

Ben-Amotz 等^[25]的研究表明,采用零上低温对藻类进行冷驯化是提高其抗冻性的一个重要途径。

2.2 冷冻保存程序(主要针对两步法和包埋法)

2.2.1 两步法

2.2.1.1 冷冻操作前材料的处理

两步法主要依据海藻的种类选择合适的抗冻保护剂,主要使用二甲基亚砜(DMSO)、甘油和甲醇 3 种保护剂,其中 DMSO 的使用最为普遍,而在某些藻类的保存中,采用复合保护剂的保护效果往往优于单一保护剂^[10,28]。另外,保护剂使用浓度对海藻存活率有很大影响^[12,19,28,29],常用浓度范围为 5%~15%。上述几种渗透性保护剂通常在室温下加入,一般需要处理 5~60 min^[12,20]。多数保护剂对细胞有一定的毒性,毒性大小与使用浓度及处理时间相关。因此,进行保护剂毒性预实验,有助于确定保护剂的最佳使用浓度和处理时间^[30]。此外,在冷冻操作前对材料进行适度脱水^[14,15,31]或降低保存液中的盐浓度^[2,3]都已证明可提高存活率。

2.2.1.2 冷冻操作

主要涉及预冻过程中降温速率、预冻终点和终点温度上的停留时间。若降温过快则会引起胞内冰的形成(intracellular ice damage),对大多数藻类来说,采用较慢的降温速率(0.5~4 /min)。但如果降温速率过慢或预冻时间过长,细胞则可能因过度脱水而导致膜损伤和(或)因高盐浓度而造成溶质损伤(solute damage),或称溶液损伤(solution damage)^[12]。因此应选择一个最佳的冷冻速率。除此之外,还应选择合适的预冻终点及在终点温度上的停留时间。在藻类冷冻保存中,预冻温度通常为-30~-60,停留时间一般为 0~60 min^[20,25]。材料经过预冻后需要快速转移到液氮中,通常是将装有实验材料的冻存管(cryotubes)或细塑料管(straws)迅速放入液氮中。采用后者可获得更快的降温速率^[27]。此外,冷冻过程中藻的密度也是影响存活率的重要因素^[28]。

2.2.1.3 化冻操作

不同的化冻操作对存活率有很大影响^[32]。一般采用快速化冻法,即将保存材料迅速移入 25~40 水浴中快速振荡,直至最后一粒冰晶消失。快速化冻法可阻止化冻过程中细胞内冰晶的形成^[12],有关慢速化冻对冷冻保存的影响研究较少^[33]。

2.2.1.4 化冻后的材料处理

材料化冻后要尽快去除抗冻保护剂,目前对保护剂去除方法的研究相对较少,通常采用稀释或先稀释后离心的方法,稀释温度和稀释速率都会显著影响存活率^[2,19,20]。经处理的材料通常要经过一段时间的“恢复”后方可用于存活率的鉴定,研究表明,化冻后材料的再培养条件(光、温和培养液浓度

等)^[29]及存活率的鉴定方法^[27]都会对存活率产生较大影响。

2.2.2 包埋法

2.2.2.1 冷冻操作前材料的处理

首先要对材料进行蔗糖预培养。蔗糖不仅能在脱水过程中稳定细胞膜和蛋白质,还能促进细胞基质的玻璃化,从而提高耐冻性^[34]。包埋法的关键在于所用蔗糖浓度及处理时间^[35]。另外,在高浓度蔗糖预处理时加入其他保护剂也有助于提高存活率^[36, 37]。藻类实验表明,蔗糖预培养是必要的,且宜采用比高等植物较低的蔗糖浓度和较短的培养时间^[14, 16, 31]。

2.2.2.2 冷冻操作

主要是确定适宜的脱水速率与脱水后胶球含水量。最适脱水速率与植物种类有关。Morris^[23]指出每一种藻都有其适宜的脱水速率以达到冷冻后的最大存活率,Hirata^[31]研究发现脱水和投入液氮保存之后的存活率受平均脱水速率的影响。藻类材料的实验结果表明,大型海藻材料脱水速率宜高于微藻的脱水速率^[14-16]。胶球含水量是影响包埋脱水法冷冻保存存活率的另一个重要因素。已报道的几种藻类的最适含水量一般为40%^[14, 15, 31],但也有例外^[15, 16, 31]。

2.2.2.3 化冻操作

王起华等^[16]的研究表明加快化冻速度可显著提高裙带菜配子体克隆的冷冻保存存活率,而且将胶球直接放入溶液中化冻比胶球保留在冻存管中化冻获得更高的化冻速率,由此可以显著地提高存活率。

3 超低温保存后存活率的鉴定

鉴定存活率是超低温保存操作中的重要环节。目前主要采用下列两大类方法:

3.1 细胞(或组织器官)的形态和生理活性的鉴定

已采用的方法有细胞染色法或直接显微镜检法^[5-10, 18, 39];细胞运动能力测定法^[18, 38];光合放氧活性测定法^[25, 26];叶绿素含量测定法^[3, 14, 16, 31];琼脂平板海藻细胞克隆图像分析^[40];细胞分子和生化稳定性测定法^[41]等。这些方法大多可在材料化冻并经过短期恢复之后进行,具有快速简便的优点,但是可靠度通常较低。

3.2 细胞(或组织器官)再生能力的鉴定

目前,鉴定大型藻类存活率的主要方法是组织、器官再生法^[4-6, 12]。该方法在材料经过长时间的

再培养后进行,比较费事、费时,但可靠度较高^[2]。

目前由于不同测定方法的可靠性存在很大差异,给评估保存方法的优劣带来很大困难,这是一个值得重视的问题。藻类长期冷冻保存中所应该达到的最低存活率指标尚无共识,但CCAP采用10%的存活率作为标准^[19]。

4 意义和展望

研究大型海藻的种质保存具有重要的意义。首先,大型海藻具有重要的经济价值,在食品、医药、工业、和农业等领域都具有广泛的应用。有些海藻(海带、石莼、和昆布等)具有丰富的营养价值和良好的药用价值;褐藻中含有的褐藻胶、碘和甘露醇,红藻中含有的琼胶和卡拉胶等,都是工业领域的主要原料;海藻还可以作为农业有机肥料和牲畜的饲料。同时大型海藻也具有重要的生态保护价值,它们是海区重要的初级生产者,维持了海水中氧气、二氧化碳的循环,使他们始终处于平衡状态,可以对营养化海水养殖区进行生物修复。

目前,在生产实践中普遍运用的传统保种方法存在许多弊端。人工养殖的大型海藻在海上保种时往往因自然杂交而引起品种退化,或由于病毒、病菌的侵染而失去良种的价值,从而影响了海藻养殖业的健康持续发展。因此,如何保护好大型海藻的优良种质成为目前需要重点解决的问题。大型海藻的超低温保存,从理论上讲可以为低温生物学领域提供新的资料,从实践上讲可以有效地解决藻类种质保存中的污染、混杂和变异等问题,有望实现藻类种质的永久保存,对藻类养殖和发展具有重要意义。

经过30多年的探索和研究,大型海藻的种质超低温保存工作已经取得了一定的进展,并且已经把分子生物学手段应用于紫菜^[42]和裙带菜^[43]等的种质鉴定中。但现阶段的大型海藻的种质超低温保存仍存在一定缺陷:超低温保存的条件一般是建立在经验的基础上,没有一套标准的方法,导致较大的实验风险和人力物力浪费;对低温条件要求较高,增加保存成本。因此,降低实验成本和提高种质存活率是目前亟待解决的问题。

参考文献:

- [1] Rybczynski J. Cryopreservation - a tool for long-term storage of cells, tissues and organs from in vitro culture derive[J]. *Biotechnologia*, 2006, 4: 145-163.

- [2] Taylor R , Fletcher R . Cryopreservation of eukaryotic algae-a review of methodologies[J] . **J Phycol** , 1999 , 10 : 481-501 .
- [3] van der Meer J P , Simpson F J . Cryopreservation of *Gracilaria tikvahiae* Rhodophyta and other macrophytic marine algae[J] . **Phycologia** , 1984 , 23 : 195-202 .
- [4] 陈国宜 , 阙求登 . 红藻-坛紫菜果孢子的液氮保存[J] . 植物生理学通讯 , 1988 , 2 : 32-34 .
- [5] 陈国宜 . 条斑紫菜果孢子的液氮保存[J] . 水产学报 , 1989 , 13 : 356-359 .
- [6] 陈国宜 , 阙求登 . 几种红藻孢子的超低温保存[J] . 热带海洋 , 1989 , 8(1) : 67-72 .
- [7] Ginsburger-Vogel T , Arbault S , Perez R . Ultrastructural study of the effect of freezing-thawing on the gametophyte of the brown alga *Undaria pinnatifida*[J] . **Aquaculture** , 1992 , 106 : 171-181 .
- [8] Kuwano K , Aruga Y , Saga N . Cryopreservation of the conchocelis of the marine alga *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta) in liquid nitrogen[J] . **Plant Science** , 1993 , 94 : 215-225 .
- [9] Kuwano K , Aruga Y , Saga N . Cryopreservation of the conchocelis phase of *Porphyra* (Rhodophyta) by applying a simple prefreezing system[J] . **J Phycol** , 1994 , 30 : 566-570 .
- [10] Kuwano K , Aruga Y , Saga N . Cryopreservation of clonal gametophytic thalli of *Porphyra* (Rhodophyta) [J] . **Plant Science** , 1996 , 116 : 117-124 .
- [11] Shigeki K , Kuwano K . Cryopreservation of *Eisenia bicyclis* (Laminariales , Phaeophyta) in liquid nitrogen[J] . **Journal of Marine Biotechnology** , 1998 , 6(4) : 220-223 .
- [12] Taylor R , Fletcher R L . A simple method for the freeze-preservation of zoospores of the green macroalga *Enteromorpha intestinalis*[J] . **J Phycol** , 1999 , 11 : 257-262 .
- [13] Zhang Quan Sheng , Cong Yi Zhou . A simple and highly efficient method for the cryopreservation of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae) germplasm[J] . **European Journal of Phycology** , 2007 , 42(2) : 209 - 213 .
- [14] Vignerot T , Arbeult S , Kaas R . Cryopreservation of gametophytes of *Laminaria digitata* Lamouroux by encapsulated dehydration[J] . **Cryo-Letters** , 1997 , 18 : 93-98 .
- [15] 王起华 , 刘明 , 程爱华 . 坛紫菜自由丝状体的胶囊化冷冻保存[J] . 辽宁师范大学学报 , 2000 , 4 : 387-390 .
- [16] 王起华 , 刘艳萍 . 包埋脱水法冷冻保存裙带菜配子体克隆的研究[J] . 海洋学报 , 2005 , 27 (2) : 154-159 .
- [17] Liu Hongquan , Yu Wengong , Yang Kunfeng , et al . Cryopreservation of protoplasts of the algae *Porphyra yezoensis* by vitrification[J] . **Plant Science** , 2004 , 166(1) : 97-102 .
- [18] Holm-Hansen O . Viability of blue-green and green algae after freezing[J] . **J Phycol** , 1963 , 16 : 530-540 .
- [19] McLellan M R , Cowling A J , Turner M . Maintenance of Algae and Protozoa[A] . Kirsop B E , Doyle A . Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells[C] . London : Academic Press , 1991.201-206 .
- [20] Morris G J . The cryopreservation of *Chlorella* . I . Interactions of rate of cooling , protective additive and warming rate[J] . **Arch Microbiol** , 1976 , 107 : 57-62 .
- [21] 伊华林 , 邓秀新 . 植物种质离体保存技术研究进展[J] . 植物学通报 , 1999 , 16 (5) : 574-581 .
- [22] 曾呈奎 . 中国经济海藻志[M] . 北京:科学出版社, 1962. 66-79 .
- [23] Morris G J . Cryopreservation of 250 strains of *Chlorococcales* by the method of two- step cooling[J] . **Br Phycol J** , 1978 , 13 : 15-24 .
- [24] Benhra A , Ferard J F , Vasseur P . Factorial design to optimize the viability of the alga *Scenedesmus subspicatus* after cryopreservation[J] . **Cryo-Letters** , 1994 , 15 : 269-279 .
- [25] Ben-Amotz A , Gilboa A . Cryopreservation of marine unicellular algae . I . A survey of algae with regard to size , culture age , photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio[J] . **Marine Ecol Prog Ser** , 1980 , 2 : 157-161 .
- [26] Mortain-Bertrand A , Etchart F , Boucaud M T . A method for the cryoconservation of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae): effect of glycerol and cold adaptation[J] . **J Phycol** , 1996 , 32:346-352 .
- [27] Canavate J P , Lubian L M . Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species[J] . **Aquaculture** , 1995 , 136 : 277-290 .
- [28] Day John G . Cryopreservation fundamentals , mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture

- collections[J]. *Nova Hedwigia*, 2004, **79** (1-2): 191-205.
- [29] Brand Jerry J, Diller Kenneth R. Application and theory of algal cryopreservation[J]. *Nova Hedwigia*, 2004, **79** (1-2): 175-189.
- [30] Tzovenis I, Triantaphyllidis G. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain[J]. *Aquaculture*, 2004, **230**(1-4): 457-473.
- [31] Hirata K, Phunchindawan M, Takamoto J, et al. Cryopreservation of microalgae using encapsulation-dehydration [J]. *Cryo-Letters*, 1996, **17**: 321-328.
- [32] Dumet D, Grapin A, Bailly C, et al. Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: Importance of thawing method in the case of *Pelargonium meristems*[J]. *Plant Science*, 2002, **163**(6): 1121-1127.
- [33] Canavate J P, Lubian L M. Effect of slow and rapid warming on the cryopreservation of marine microalgae[J]. *Cryobiology*, 1997, **35**: 143-149.
- [34] Hornung R, Domas R, Lynch T. Cryopreservation of plumular explants of coconut (*Cocos nucifera* L) to support programmes for mass clonal propagation through somatic embryogenesis [J]. *Cryo-Letters*, 2001, **22**: 211-220.
- [35] Gonzalez-Amao M T, Moreira T. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation - vitrification [J]. *Cryo - Letters*, 1996, **17**: 141-148.
- [36] Matsumoto T, Sakai A. Cryopreservation of in vitro - grown apical [J]. *Cryo - Letters*, 1995, **16**: 299 - 306.
- [37] Phunchindawan M, Hirata K, Sakai A. Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, **16**: 469-473.
- [38] Fenwick C, Day J G. Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes[J]. *J Phycol*, 1992, **4**: 105-109.
- [39] Fleck Roland A, Pickup Roger W, Day John G, et al. Using flow-cytometry and cryomicroscopy[J]. *Cryobiology*, 2006, **52** (2): 261-268.
- [40] Osorio Hugo C, Laranjeiro C N, Santos Lilia M A, et al. First attempts to cryopreserve strains from the Coimbra collection of Algae (ACOI) and the use of image analysis to assess viability[J]. *Nova Hedwigia*, 2004, **79** (1-2): 227-235.
- [41] Day J G, Benson E E. Cryopreservation and conservation of microalgae: The development of a pan-European scientific and biotechnological resource[J]. *CryoLetters*, 2005, **26**(4): 231-238.
- [42] Weng Manli, Liu Bo. Identification of 27 *Porphyra* (Rhodophyta) by DNA fingerprinting and molecular markers[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2005, **17**(1): 91-97.
- [43] Wang Di, Wang Xiuliang. The genetic analysis and germplasm identification of the gametophytes of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) with Rapid method[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2006, **18**(6): 20-23.

批注 [微软用户1]:

(本文编辑: 张培新)