

Biotechnologies/*Biotechnologies*
(Physiologie végétale/*Plant Physiology*)

Une méthode pour la cryoconservation des gamétophytes de l'algue alimentaire *Undaria pinnatifida* (Laminariales)

Philippe RENARD, Suzanne ARBAULT, Raymond KAAS et René PÉREZ

Résumé — La tolérance des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* à la congélation dans l'azote liquide (-196°C), en présence de glycérol, a été étudiée selon la procédure suivante : 1. refroidissement progressif ($5^{\circ}\text{C}/\text{mn}$) de la température ambiante (22°C) jusqu'à -30 ou -40°C ; 2. immersion dans l'azote liquide. Les gamétophytes présentent une survie différente selon la température d'immersion dans l'azote liquide et la vitesse de décongélation. Lorsqu'ils sont placés dans l'azote liquide après refroidissement à -30°C , aucun ne se développe si la décongélation est lente mais 50 % d'entre eux retrouvent une croissance normale si la décongélation est rapide. Dans le cas où l'immersion a lieu après une étape à -40°C , quelques gamétophytes révèlent une reprise méristématique après décongélation lente; cette reprise est générale si la décongélation est rapide. On observe alors des zygotes à partir du 7^e jour de culture et des plantules à partir du 9^e. Il n'y a pas de différence notable en ce qui concerne la survie des gamétophytes et/ou leur capacité à donner des plantules pour les concentrations en glycérol utilisées (5 à 30 %).

A method for the cryopreservation of the gametophytes of the food alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales)

Abstract — The freezing was determined for gametophytes of the food alga *Undaria pinnatifida* as a function of glycerol concentration, using a two-step freezing method : 1. cooling ($5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) from room temperature (22°C) to -30° or -40°C ; 2. immersion in liquid nitrogen (-196°C). Survival of gametophytes varied according to the plunge-temperature and thawing rate. Immersed in liquid nitrogen from -30°C , all slowly thawed gametophytes gradually died whereas a fraction of rapidly-thawed gametophytes continued to develop. With a plunge-temperature of -40°C , half the slowly-thawed gametophytes and all the rapidly-thawed gametophytes continued to grow. In the latter case, zygotes were obtained from the 7th day of culture and plantules appeared from the 9th day. There was no influence of glycerol concentration (5 to 30 %).

Abridged English Version — A new gametophyte cultivation technique ([1], [2], [5]) has permitted young food alga *Undaria pinnatifida* production independent of the natural fertility period. Nevertheless, the gametophytes cannot be conserved beyond a couple of months [3]. Seaweed farming would benefit from improved cryopreservation methods. Furthermore, a genetic material with known and desired characteristics for selective cultivation programmes would be a bio-technological advance. In the present investigation, we determine the tolerance of *Undaria pinnatifida* gametophytes to freezing in liquid nitrogen (-196°C) with glycerol as an additive and the ability of frozen gametophytes to produce zygotes and plantules. A cryopreservation method is proposed.

2 ml of suspended gametophytes, placed in cryobiological tubes were centrifuged at 500 rpm for 2 min. in order to remove the suspension medium. Then, gametophytes were progressively (5% steps) mixed with 15, 20, 25 or 30% glycerol for about 45 min. at room temperature. Before cooling, a portion of the cryoprotective medium was removed after centrifugation; the final volume of the suspension was 200-300 μl . Freezing was carried out by a two-step method : first, from the room temperature (22°C) to -30 or -40°C , at $5^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, with a programmable freezing apparatus; second directly to -196°C by plunging the tubes in liquid nitrogen. The samples were stored for 15 min. in liquid nitrogen, after which they were thawed either rapidly by immersion in a 35°C water bath for 30 sec.,

Note présentée par Lucien LAUBIER.

or slowly by keeping the tubes in a 0°C chamber for 30 min. and then at room temperature for 10 min. Cryoprotectant was progressively withdrawn by placing the samples in decreasing glycerol concentration baths (5% steps) for 5-7 min. Thereafter, the gametophytes were rinsed twice in sea water and then incubated in the cryobiological tubes with 2 ml of the cultivation medium, without any aeration, at 22°C and under 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light. The control gametophyte samples were either held at 22°C (control 1) or two-step frozen to -196°C without any cryoprotectant (control 2). The comparative survival of the gametophytes was assessed by light microscope observation of morphology and growth during the following 8-10 days of cultivation. In addition, the ability of frozen gametophytes to produce zygotes and plantules was determined. With the previously described procedure, the gametophytes were progressively cooled in 5, 10, 15 or 20% glycerol to -40°C, then immersed in liquid nitrogen. After a 15 min. storage, they were rapidly thawed, after which cryoprotectant was gradually withdrawn. In order to make the zygotes and plantules readily visible, the gametophytes were incubated in 55 mm Petri dishes. Although gametogenesis usually occurs at 15-16°C and under 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light [5], we decided first to keep the gametophytes for 10 days at 22°C and under 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light. The control sample was held at 22°C.

Uncooled gametophytes (control 1) showed a typical brown coloration of the cells (Fig. 1) which continued to develop all through the cultivation period. On the other hand, cells of unprotected frozen gametophytes were shrunken (Fig. 2) after thawing (J0); they did not exhibit subsequent growth and progressively lost their pigmentation. Plunge-temperature variation (-30 or 40°C) or rapid or slow warming did not change the survival of control 2. Immersed in liquid nitrogen from -30°C (Table I), all the slowly thawed gametophytes revealed shrunken cells immediately after thawing (J0) and then gradually lost their pigmentation on following days. Conversely, some of the rapidly thawed gametophytes were morphologically similar to untreated gametophytes (control 1) and continued to develop during the 10 days of cultivation. All the rapidly thawed gametophytes immersed in liquid nitrogen at -40°C (Table II) appeared morphologically normal at J0 (day 0) and grew during the 8 days of cultivation. On the other hand, when slowly thawed, samples revealed two categories of gametophytes: those that were morphologically normal and developed through the J8 cultivation, and those which shrank immediately after thawing, lost their pigmentation and died. The gametophytes which were immersed in liquid nitrogen at -40°C, rapidly thawed and incubated in Petri dishes, also showed a normal morphology and grew all through the cultivation period. However, although such cultivation conditions usually inhibit gametogenesis, zygotes were observed from the 7th day and plantules appeared from the 9th day, in both cryopreserved and control samples. In all experiments, glycerol concentration did not influence the results.

Our data prove the freezing tolerance of *Undaria pinnatifida* gametophytes and suggest a cryopreservation procedure: addition of glycerol (5 to 30%) as a cryoprotectant, cooling (5°C/min) to -40°C then immersion in liquid nitrogen, and rapid thawing. Contrary to the cryopreservation methods previously tested [4], such a technique does not affect post-thaw growth of gametophytes and gametogenesis. Zygote and plantule early appearance may be explained by differing illumination, which is probably higher in Petri dishes than in the flasks normally used in the laboratory for the gametogenesis induction. In experiments, gametophytes were cryopreserved in low quantity. For the rapid pulverisation of the collectors and the intensive culture of *Undaria pinnatifida*, higher volumes of gametophytes have to be cryopreserved.

INTRODUCTION. — La reproduction sexuée chez *Undaria pinnatifida* n'ayant lieu qu'en mai-juin, des procédés ont été mis au point pour produire les gamétophytes puis les plantules tout au long de l'année ([1], [2]), ce qui permet de cultiver l'algue quelle que soit la saison. Cependant, le maintien de la fertilité des gamétophytes n'excède pas quelques mois [3]. La cryoconservation pourrait constituer une solution à ce problème, une aide pour la gestion des cultures d'algues et un moyen pour la réalisation d'études visant à l'amélioration des espèces : *Undaria pinnatifida*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Porphyra linearis*, etc. Cet article précise la tolérance des gamétophytes d'*Undaria pinnatifida* à la conservation dans l'azote liquide, en présence de glycérol et propose une méthode de cryoconservation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Au laboratoire, les gamétophytes ont été maintenus en suspension dans des ballons en verre de 6 l, avec un milieu enrichi en solutions de Miquel A et B, Provasoli P6, dioxyde de germanium et kanamycine, à 22°C et sous un éclairage continu de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, type « lumière du jour » [5], jusqu'à leur utilisation. 2 ml d'une suspension de gamétophytes, disposés dans des tubes cryobiologiques de 2 ml (Poly Labo, Strasbourg) ont été centrifugés à 500 tr/mn pendant 2 mn. Le surnageant, constitué du milieu de culture, a été retiré et les gamétophytes ont été progressivement mélangés au glycérol à 15, 20, 25 ou 30 % (de 5 en 5 %), pendant environ 45 mn et à température ambiante. Avant d'être refroidis, les échantillons ont été de nouveau centrifugés et une partie du surnageant a été retirée pour ne conserver qu'un culot de 200-300 μl .




Les gamétophytes ont été refroidis jusqu'à -196°C en deux étapes : au cours de la première, les échantillons sont passés progressivement de la température ambiante (22°C) à -30 ou -40°C , à raison de $5^\circ\text{C}/\text{mn}$, au moyen d'un congélateur programmable (Minicool LC 40, Air Liquide, Sassenage); la deuxième étape s'est effectuée en immergeant les tubes directement dans l'azote liquide (LN_2). Après un maintien de 15 mn, les gamétophytes ont été réchauffés, soit rapidement en plaçant les tubes dans un bain-marie à 35°C pendant 30 s, soit lentement en les disposant dans une enceinte thermostatée à 0°C pendant 30 mn puis à température ambiante pendant 10 mn. Immédiatement après le réchauffement, le cryoprotecteur a été retiré par des bains de concentrations décroissantes (de 5 en 5 %), d'une durée de 5-7 mn, puis par deux rinçages dans l'eau de mer. Les gamétophytes gardés dans leur tube ont ensuite été mis en culture dans un milieu nutritif sans bullage, sous un éclairage de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et à une température de 22°C . Deux types de témoins ont été réalisés : dans le premier (témoin 1), les gamétophytes ont été uniquement maintenus à 22°C ; dans le second (témoin 2), ils ont été refroidis jusqu'à -196°C selon les deux étapes décrites précédemment mais en absence de glycérol. La survie a été estimée en comparaison avec les échantillons témoins grâce à un examen au microscope optique de l'aspect morphologique et de la croissance au cours des premiers jours de culture. De par l'impossibilité d'individualiser les gamétophytes, ceux-ci constituant des entités fractionnables, aucun taux de survie n'a pu être effectué.

Dans une deuxième série d'expériences ayant pour but d'évaluer la capacité de gaméto-genèse et l'aptitude à donner des plantules, des gamétophytes ont été congelés dans du glycérol à 5, 10, 15 ou 20 %, jusqu'à -40°C suivi d'une immersion dans LN_2 . Après décongélation rapide, les gamétophytes ont été étalés dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre contenant du milieu nutritif. Pendant 10 jours, ils ont été soumis à des conditions permettant une croissance rapide et suspendant, en principe, la gaméto-genèse (22°C , éclairage continu de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); ils devaient ensuite être expo-


TABLEAU I

Aspect morphologique schématisé des gamétophytes refroidis jusqu'à -30°C puis immergés dans l'azote liquide : effet de la concentration en glycérol et de la vitesse de décongélation (gamétophyte brun normal


 gamétophyte brun avec cellules contractées  ; gamétophyte brun-vert avec cellules contrac-














































tées;  gamétophyte vert avec cellules contractées  ; gamétophyte dépigmenté ).

Schematic morphological aspect of gametophytes cooled to -30°C then immersed in liquid nitrogen: effect of

glycerol concentration and thawing rate (normal brown gametophyte  ; contracted brown gametophyte

 ; contracted brown-green gametophyte  ; contracted green gametophyte  ; unpigmen-

ted gametophyte ).






RECHAU!		TEMPS DE CULTURE				
		J0	J1	J3	J6	J10
témoin 1						
témoin 2	rapide					
	lent					
gly 15%	rapide					
	lent					
gly 20%	rapide					
	lent					
gly 25%	rapide					
	lent					






sés à une situation déclenchant la gamétogenèse ($15-16^{\circ}\text{C}$, éclaircissement continu de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Nous verrons que ce ne fut pas nécessaire.














































RÉSULTATS. — Les résultats de survie des gamétophytes sont présentés dans les tableaux I et II. Les témoins 1 ont gardé une coloration brune (*fig. 1*) ainsi qu'une forte croissance tout au long de leur culture. En revanche, les témoins 2 se sont révélés contractés immédiatement après la décongélation (J0) (*fig. 2*) puis ont pris une coloration verte à J1 et perdu toute pigmentation à J6 sans jamais croître, quelles qu'aient été la température d'immersion dans LN_2 et la vitesse de décongélation. En ce qui concerne les gamétophytes immergés dans LN_2 à partir de -30°C (tableau I), seule une moitié environ des gamétophytes décongelés rapidement a conservé un aspect morphologique identique au témoin 1 et s'est développée jusqu'au 10^e jour de culture. Au contraire, les gamétophytes décongelés lentement ont tous présenté une contraction des cellules à J0 puis ont perdu toute pigmentation à J6. Décongelés rapidement, tous les gamétophytes immergés dans LN_2 à partir de -40°C (tableau II) ont gardé un aspect morphologique

TABLEAU II

Aspect morphologique schématisé des gamétophytes refroidis jusqu'à -40°C puis immergés dans l'azote liquide : effet de la concentration en glycérol et de la vitesse de décongélation (gamétophyte brun normal

 ; gamétophyte brun avec cellules contractées  ; gamétophyte brun-vert avec cellules contractées  ; gamétophyte vert avec cellules contractées  ; gamétophyte dépigmenté ).

Schematic morphological aspect of gametophyte cooled to 40°C then immersed in liquid nitrogen: effect of glycerol concentration and thawing rate (normal brown gametophyte  ; contracted brown gametophyte  ; contracted brown-green gametophyte  ; contracted green gametophyte  ; unpigmented gametophyte ).

RECHAUF		TEMPS DE CULTURE				
		J0	J1	J3	J6	J8
témoin1						
témoin2	rapide					
	lent					
gly 20%	rapide					
	lent					
gly 25%	rapide					
	lent					
gly 30%	rapide					
	lent					

normal et se sont développés jusqu'à J8. En revanche, les gamétophytes décongelés lentement se sont divisés en deux groupes en proportions à peu près identiques : celui constitué de gamétophytes présentant des signes de dégénérescence précoce (J0), aboutissant à la mort dans les jours suivants, et celui présentant des gamétophytes d'aspect normal et se développant jusqu'au 10^e jour de culture.

Tous les gamétophytes incubés dans les boîtes de Pétri ont montré un aspect normal et se sont développés. Des zygotes ont même été observés à partir du 7^e jour de culture et des plantules à partir du 9^e jour, dans tous les lots, y compris les témoins. A la suite de ces observations, le changement des conditions de culture initialement prévu à J10 n'a pas été effectué.

Dans toutes ces expériences, aucune influence de la concentration en glycérol n'a été constatée.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — On sait depuis longtemps que les microalgues peuvent être cryopréservées ([6], [7], [8]). Notre étude démontre que les gamétophytes de l'algue

macrophyte *Undaria pinnatifida* peuvent également l'être sans que les propriétés reproductrices ne soient inhibées grâce à : un refroidissement de 5°C/mm jusqu'à -40°C suivi d'une immersion dans LN₂, une décongélation rapide, et l'emploi du glycérol comme substance cryoprotectrice. Cette technique se révèle plus efficace que d'autres précédemment éprouvées [4]. Il est à noter que des zygotes et des plantules sont apparus dans des conditions de culture supposées empêcher la gamétogenèse [5]. Au laboratoire, la production des gamètes est effectuée dans de grands volumes (6 l) à forte densité de gamétophytes maintenues en suspension dans des ballons de verre. Dans notre expérience, il est possible que les faibles quantités de gamétophytes réparties en fines couches dans les boîtes de Pétri aient reçu un choc lumineux tel que cela ait déclenché précocement la gamétogenèse.

Dans le cadre de culture intensive d'*Undaria pinnatifida* et sans doute d'autres lamina-riales, il serait nécessaire de valider cette technique de cryoconservation sur des quantités plus importantes de gamétophytes pour parvenir à un ensemencement rapide des collecteurs.

Note remise le 5 novembre 1990, acceptée après révisions le 10 septembre 1992.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. PÉREZ, J. Y. LEE et C. JUGE, Science et Pêche, *Bull. Inst. Pêches marit.*, 317, 1981, p. 1-12.
- [2] R. PÉREZ, R. KAAS et O. BARBAROUX, Science et Pêche, *Bull. Inst. Pêches marit.*, 343, 1984, p. 11-15.
- [3] R. KAAS, R. PÉREZ, C. VINOT et P. DURAND, *Société pour l'algologie appliquée*, C24, 14-17 septembre 1987.
- [4] S. ARBAULT, P. RENARD, R. PÉREZ et R. KAAS, *Aquat. Living Resour.*, 3, (3), 1990, p. 207-216.
- [5] R. PÉREZ, R. KASS, O. BARBAROUX, S. ARBAULT, N. LE BAYON, J. Y. MOIGNE, Rapp. IFREMER, 1990, 66 p.
- [6] N. M. SAKS, *Cryobiology*, 15, 1978, p. 563-568.
- [7] A. GILBOA et A. BEN AMOTZ, *Plant. Sci. Letters*, 14, 1978, p. 317-220.
- [8] A. BEN AMOTZ et A. GILBOA, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2, 1980, p. 221-224.

Laboratoire d'Algologie, IFREMER, B.P. n° 1049, Nantes Cedex 01.

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Morphologie externe des gamétophytes non refroidis (témoin 1).

Fig. 1. — *External morphology of uncooled gametophytes (control 1).*

Fig. 2. — Morphologie externe des gamétophytes congelés sans cryoprotecteur (témoin 2).

Fig. 2. — *External morphology of unprotected frozen gametophytes (control 2).*

Fig. 3. — Plantules d'*Undaria pinnatifida* (taille 100 µm).

Fig. 3. — *Plantules of Undaria pinnatifida (size : 100 µm).*

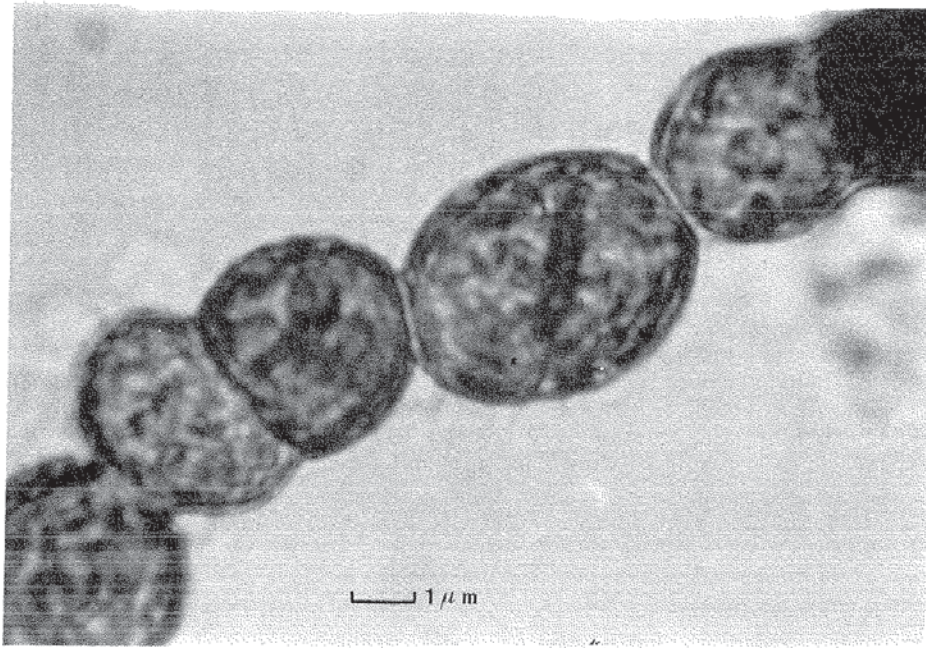


Fig. 1

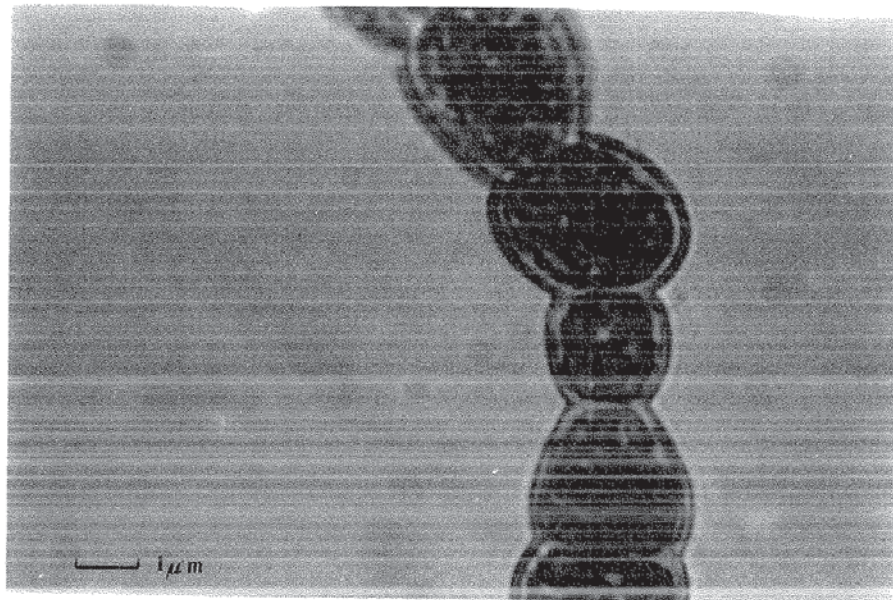


Fig. 2



Fig. 3