

# 大型海藻的组织培养及其应用

刘树霞, 邹定辉\*, 徐军田

汕头大学海洋生物研究所广东省海洋生物重点实验室, 广东汕头 515063

## Tissue Culture and Its Application in Marine Macroalgae

LIU Shu-Xia, ZOU Ding-Hui\*, XU Jun-Tian

Marine Biology Key Laboratory of Guangdong, Marine Biology Institute, Shantou University, Shantou, Guangdong 515063, China

摘要: 文章对大型海藻组织培养中愈伤组织和原生质体的获得、除菌效果以及植物生长调节物质的选用的研究进展进行了概述, 并对其应用和研究前景作了分析和展望。

关键词: 大型海藻; 组织培养; 应用

大型海藻是海洋植物中的重要组成成分, 分为绿藻、褐藻、红藻等 3 个门类, 许多都有重要的经济价值, 是提供食品、饲料和药物的天然原料, 也可以用来作为提炼藻酸盐、琼脂、角叉胶、卡拉胶的工业原料。在过去的几十年中, 随着组织培养技术在高等植物中的成功应用(史忠礼 1980; 罗士韦 1983; 何卓培 1983), 大型海藻的组织培养研究也开始逐年受到人们的重视。最早从事这方面研究的是 Chen 和 Taylor (1978), 他们是以皱波角叉菜(*Chondrus crispus*)开始的。以后对经济海藻种类(如能够产生藻胶的海藻种类石花菜、海带和江蓠等和可食用的海藻种类如紫菜、麒麟菜和裙带菜等)进行组织培养的研究。在高等植物中, 组织培养的原始意义是指愈伤组织培养, 但随着发展范围的日益扩大, 组织培养的内涵已进一步丰富, 它包括植物本身以及它的离体器官、不同组织、细胞和原生质体的无菌培养、体细胞杂交及突变体等。海藻的组织培养虽然起步较晚, 但也相应地包括以上几方面内容。其中原生质体不仅是研究基础生理学过程中的一个非常有用的工具, 并且利用这种工具也是进行杂交和遗传操纵的一种手段。将源自原生质体的细胞进行悬浮培养, 不仅能为研究有关课题提供大量的同种细胞, 还可以得到完整藻体所不具有的一些特性, 如一些特殊基因的表达(Roeder 等 2005)。

本文介绍海藻组织培养的研究进展及其应用现状, 并对今后这方面的研究作了展望。

### 1 大型海藻的组织培养

在早期大型海藻组织培养主要是对海藻组织或切段进行离体培养, 以后随着组织培养技术的成熟和发展以及研究的不断深入, 近几十年来, 又较多地进行了细胞、原生质体以及愈伤组织培养的研究, 并取得了较大进展。

**1.1 愈伤组织和原生质体** 植物的任何器官和任何组织在离体培养中, 其细胞会发生分裂和脱分化, 持续不断分裂成多细胞团, 进一步发展成不受外植体影响的愈伤组织。愈伤组织在高等植物中, 被认为是已分化或未分化的组织细胞受到损伤后所表现出的无序生长的一种现象, 对于这个定义, 如果应用到缺乏有序组织的海藻中则易引起混淆, 因此, 这个概念在海藻中还存在一定的争议, 一般常用“类愈伤组织”(callus-like)一词来代替(Garcia-Reina 等 1991)。原生质体是植物细胞除去细胞壁后裸露的球形细胞, 它具有全能性, 可在人工控制条件下进行大量快速繁殖, 也可诱导其融合, 形成杂种细胞, 为体细胞杂交提供实验材料。从藻体分离出原生质体的方法有: 机械法、微生物法、酶法等, 一般认为酶法是比较理想而常用的方法。

在海藻组织培养中, 愈伤组织诱导技术与原

收稿 2007-01-26 修定 2007-05-22

资助 国家自然科学基金(30470343 和 30670396)和广东省科技计划(2006B20601005)。

\* 通讯作者(E-mail: dhzhou@stu.edu.cn; Tel: 0754-2903280)。

生质体分离技术可用来选择和培育人们想要得到的植株品系,这是海藻组织培养中特别引起重视和兴趣的2个问题。表1是近年来有关绿藻、褐藻、红藻种类的原生质体分离及其进一步发育的研究情况;表2是近年来褐藻、红藻外植体愈伤组织的诱导情况,绿藻中愈伤组织可以从原生质体或单个细胞中获得(如缘管浒苔和扁浒苔,Reddy和Fujita 1991),但从完整的外植体中还未获得成功。

由表1可看出,绿藻中由原生质体发育为愈伤组织的报道相对较少,但其重建为完整的新个体则在很多种类中都有报道;在褐藻中由藻体得到原生质体的报道较少,而在一些藻种类中从外植体诱导形成愈伤组织已获得成功(表2),并且大多数的研究材料用的是生产藻胶的藻类,如海带属、马尾藻属和昆布属等,另外还有网地藻属的种类(表1和2);在红藻中,原生质体主要是从紫菜属中得到的,而在几个藻种类中由原生质体发育为愈伤组织或新植株个体也多有报道。在获得原生质体的其他一些种类(如江蓠和角叉菜)中,也有关于其发育为愈伤组织或新植株的报道(张全启 1991;Yan和Wang 1993)。紫菜属中由完整的外植体形成愈伤组织的报道较少,而在石花菜属、江蓠属和麒麟菜属中则很常见(表2)。

对于海藻的愈伤组织,有两点值得考虑,即愈伤组织形成的百分率及其大小。海藻的愈伤组织与高等植物相比通常生长较慢并且较小(直径1~3 mm),海藻中愈伤组织产生是比较少的,并且其产生百分率也很低,如麒麟菜(*Eucheuma uncinatum*)为0.9% (Polne-Fuller和Gibor 1987),圈扇藻(*Zonaria tournefortii*)为1% (Aguirre-Lipperheide 1993)。另外,在不同的实验条件下同种海藻可产生愈伤组织,如Yan (1984)的研究表明,裙带菜(*Undaria pinnatifida*)外植体愈伤组织的生长需要植物生长调节物质,而Kawashima和Tokuda (1993)在缺乏植物生长调节物质的条件下同种海藻中则可获得愈伤组织(表2)。这说明获得愈伤组织的条件并不是确定的,而且愈伤组织的产生并不取决于任何特殊的实验条件,外植体本身固有的内部因素比外部培养条件更加重要。

**1.2 无菌和有菌材料** 组织培养实验中所需要的材料往往是要求无菌的,无菌材料通常是通过物理或化学方法对外植体进行灭菌处理而得到。在早期的研究中遇到的最突出的问题之一就是获得无菌藻体组织十分困难。自从发现抗生素并工业化生产以后,海藻组织培养的污染问题得到了部分解决,许多成功的海藻无菌培养主要是通过抗生素

表1 近年来报道的有关从绿藻、褐藻、红藻中分离出原生质体及其进一步发育形成愈伤组织或叶状体的情况

植物种类	发育情况	参考文献
坛紫菜( <i>Porphyra haitanensis</i> )	愈伤组织、叶状体	Dai等1990
甘紫菜( <i>Porphyra tenera</i> )	愈伤组织、叶状体	Araki和Morishita 1990
条斑紫菜( <i>Porphyra yezoensis</i> )	愈伤组织、叶状体	Araki和Morishita 1990
<i>Porphyra lanceolata</i> , <i>P. nereocystis</i> , <i>P. perforata</i>	愈伤组织、叶状体	Polne-Fuller和Gibor 1990
<i>Porphyra schizophylla</i> , <i>P. pseudolinearis</i>	愈伤组织、叶状体	Fujita和Saito 1990
角叉菜( <i>Chondrus ocellatus</i> )	丝状体、愈伤组织、叶状体	张全启 1991
扁浒苔( <i>Enteromorpha compressa</i> )	愈伤组织、叶状体	Reddy和Fujita 1991
硬石莼( <i>Ulva rigida</i> )	愈伤组织	Della-Pieta等1991
孔石莼( <i>Ulva pertusa</i> )	愈伤组织、叶状体	Reddy等1992
<i>Pilayella littoralis</i>		Mejjad等1992
<i>Gracilaria asiatica</i>	丝状体、愈伤组织、叶状体	Yan和Wang 1993
蜈蚣藻( <i>Grateloupia filicina</i> )	丝状体、叶状体	Chen和Chiang 1994
稀疏蜈蚣藻( <i>Grateloupia sparsa</i> )	丝状体、叶状体	Chen和Chiang 1994
宽礁膜( <i>Monostroma Latissimum</i> )	叶状体	Chen 1998
裂叶石莼( <i>Ulva fasciata</i> )	叶状体	Chen和Shih 2000
海带( <i>Laminaria japonica</i> )	孢子体	Matsumura等2000
脐状小网藻( <i>Microdictyon umbilicatum</i> )	叶状体	Kim等2002

表2 褐藻和红藻外植体愈伤组织的诱导

种类	生长调节物质	培养条件				参考文献
		培养基	温度/	光强/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	光/暗时间/h	
穴昆布( <i>Ecklonia cava</i> )	—	—	8~23	160	24/0, 0/24	Kawashima 和 Tokuda 1990
辐射昆布( <i>Ecklonia radiata</i> )	+	M&S (固体)	15~25	50	0/24	Lawlor 等 1990
<i>Cystophora retorta</i>	+	M&S (固体)	15~25	50	0/24	Lawlor 等 1990
<i>Cystophora siliquosa</i>	+	M&S (固体)	15~25	50	0/24	Lawlor 等 1990
<i>Cystophora retroflexa</i>	+	M&S (固体)	15~25	50	0/24	Lawlor 等 1990
<i>Cystophora expensa</i>	+	M&S (固体)	15~25	50	0/24	Lawlor 等 1990
昆布( <i>Ecklonia kurome</i> )	—	PES	15	20~40	14/10	Notoya 等 1992
<i>Eckloniopsis radicata</i>	—	PES	15	20~40	14/10	Notoya 等 1992
一种孔叶藻( <i>Agarum cribosum</i> )	—	PES	15	20~40	14/10	Notoya 等 1992
裙带菜( <i>Undaria pinnatifida</i> )	—	PESI	13	80	10/14	Kawashima 和 Tokuda 1993
一种圈扇藻( <i>Zonaria tournefortii</i> )	-	PES (固体)	18	12~20	12/12	Aguirre-Lipperheide 1993
羊栖菜( <i>Hizikia fusiformis</i> )	—	PESI (固体)	18	40	12/12	Jin 等 1997
海带( <i>Laminaria japonica</i> )	+	PESI	10	30	10/14	王希华等 1999
麒麟菜( <i>Euclima denticulatum</i> )	×	ESS (固体)	18~26	20~160	12/12	Dawes 和 Koch 1991
长心卡帕藻( <i>Kappaphycus alvarezii</i> )	×	ESS (固体)	18~26	20~160	12/12	Dawes 和 Koch 1991
鲎生蜈蚣藻( <i>Grateloupia doryphora</i> )	—	PES (固体)	20	27	18/6	Robaina 等 1990
脐形紫菜( <i>Porphyra umbilicalis</i> )	+	La (液体)	18	20~35	12/12	Liu 和 Kloereg 1991
凹顶藻( <i>Laurencia</i> sp.)	—	PES (固体)	20	27	18/6	Robaina 等 1992
蜈蚣藻( <i>Grateloupia filiformis</i> )	—	VS	—	—	—	Yokoya 等 1993
江篱( <i>Gracilaria verrucosa</i> )	+	ASP6F2	18	2~4	16/8	Kaczyna 和 Megner 1993
<i>Ochtodes secundiramea</i>	+	ASP12	25	10	12/12	Maliakal 等 2001
长心卡帕藻( <i>Kappaphycus alvarezii</i> )	+	PES (固体)	22	5~35	12/12	Reddy 等 2003
长心卡帕藻( <i>Kappaphycus alvarezii</i> )	+	PES (固体)	26	5~10	12/12	Muñoz 等 2006

+: 刺激愈伤组织形成; -: 测试但未证明有影响; —: 未研究; ×: 只有在其存在时才生长。

处理而获得的。1978年, Chen和Taylor采用无菌的皱波角叉菜髓部组织获得了愈伤组织并诱导形成植株。但抗生素的使用也并不是必不可少的(Lawlor等1991)。王希华等(1999)比较海带愈伤组织诱导过程中几种除菌方法效果的结果表明, 用1.5% KI和无菌水处理海带组织块的抑菌效果比较理想; 硫酸卡那霉素处理海带小孢子体除菌的效果虽然明显, 但处理时间不宜过长。杀菌过程中的损伤会抑制愈伤组织的形成和减少可育的原生质体数量, 如果用抗生素的话, 在确保能够得到无菌外植体的前提下, 应尽量用最小浓度的抗生素才能保证材料的生育能力(Aguirre-Lipperheide和Evans 1993)。迄今为止, 大型海藻的无菌化依然是一个较为困难的事。另外, 有报道表明, 许多无菌条件下培养的海藻不能正常发育, 而是形成畸形的叶状体, 且生长受到阻碍; 当加入分离

的污染物后, 培养的藻即可恢复正常生长。很早就证明, 有菌材料表面的微生物会给它们的宿主提供促进生长的物质。早在1953年, Ericsson和Lewis的实验就表明, 维生素可由细菌转运给藻。Chandramohan(1971)的研究表明, 生活在肠浒苔表面的细菌可以将色氨酸合成生长素(IAA)。但由于迄今还没有可以得到无菌材料的可靠方法, 因而海藻中促进生长的物质还未得到彻底的阐明。

**1.3 植物生长调节物质和海藻组织培养** 植物激素是植物体内自然产生的对植物的生长发育起调控作用的化学物质, 尽管藻类的形态结构比高等植物简单, 但其发育与高等植物类似, 海藻的发育也受化学物质的调节。植物中的五大类激素在海藻中均已检测到, 同时, 也已分离鉴定出一些具有激素活性的其他物质。海藻生长调节物质的分离

和鉴定是海藻组织培养研究进一步发展和广泛应用的关键。

高等植物生长一般受植物生长调节物质的控制, 在一些高等植物种类中, 没有植物生长调节物质(但存在外源糖类)但可得到愈伤组织, 并在培养一段时间后愈伤组织的生长会停止, 只有植物生长调节物质存在的条件下细胞才能增殖(Fitch 1993)。许多大型海藻组织培养的研究表明, 外加植物生长调节物质对愈伤组织的形成、细胞和组织分化以及藻体的形态建成是必需的(Bradley和Cheney 1990; Liu和Kloareg 1991)。海藻对植物生长调节物质的反应是多种多样的, 一般来说, 红藻比褐藻对植物生长调节物质具有更大的依赖性。高等植物与海藻的培养基中经常需加入一些作用原理还不清楚的提取物(椰子或土壤浸出物)以促进生长, 如Schreiber (1935)研究发现, 在网地藻的培养基中加入同种藻的提取物和从凹顶藻类提取的可溶性提取物都可以促进其生长, 这些物质还可以提高同种植物外植体愈伤组织的形成(Robaina等1992)。Bradley (1991)研究发现, 植物生长调节物质 $\alpha$ -萘乙酸(NAA)和细胞分裂素类似物(6-BA)可以促进愈伤组织的诱导和重建。张亚萍等(2002)报道, 高等植物组织培养中常用的2种生长调节物质NAA和6-BA对紫菜细胞生长有明显的促进作用。其他生长调节物质(如多胺和精胺)的研究则较少, 但也有报道认为它们有促进细胞分裂(Cohen等1984)和形态发生(Garcia-Jimenez等1998)以及促进孢子生长和发育的作用(Guzman-Uriostegui等2002; Sacramento等2004)。Yokoya等(2004)的研究表明, IAA、2,4-D和激动素(K)对2种江蓠(*Gracilaria tenuistipitata*和*Gracilaria perplexa*)的生长和形态建成有调节作用, K可促进*G. tenuistipitata*藻体中间部分的生长速率, 而2,4-D (1.0  $\mu\text{mol}$ )和K (10.0  $\mu\text{mol}$ )可分别促进*G. perplexa*藻体顶端和中间部分的生长速率, 并且这2种江蓠所表现出的不同反应与它们种的发育系统相关。

高等植物中生长调节物质及其作用模式已经很清楚, 但海藻中尚待进一步研究。大型海藻和陆生高等植物有许多相似之处, 因此可以借鉴陆

生高等植物中成熟的组织培养技术进行海藻组织培养的研究, 但不能完全照搬, 应作深入而具体的研究。

## 2 海藻组织培养的应用

**2.1 作为生理、生化和遗传研究的手段** 在离体的器官、组织和切段的培养中, 以它们为研究对象比研究整体藻体更加方便、快捷, 易于取得结果。例如, 以原生质体为研究对象进行生理生化研究(如细胞壁的生物合成, 细胞质膜的结构与功能, 物质运转、能量转换、信息转换、细胞识别、细胞间的相互关系以及激素的作用等), 可以获得完整藻体所不具备的功能。从将掌状海带(*Laminaria digitata*)原生质体与孢子体的表达序列标签(ESTs)比较得知, 掌状海带原生质体比完整的藻体可表达更多的胁迫基因, 在抵抗活性氧胁迫的细胞保护中胁迫基因可编码的蛋白有硫氧还蛋白、硫氧还蛋白过氧化物酶以及谷胱甘肽转移酶(Roeder等2005)。

**2.2 苗种生产** 植物组织培养的一个重要的应用就是通过植物离体快速繁殖进行大规模的苗种生产。离体快速繁殖具有取材少、繁殖速度快和易于人工控制等优点, 尤为适合于珍稀良种、濒危植物的育种工作。海藻细胞组织培养有许多方面都与高等植物相同, 例如用海带的雌性细胞能在未受精前发育成单倍体, 紫菜细胞融合的种间杂交, 绿藻属间细胞融合等都反映海藻生物技术可在其育种中的应用。在经济海藻的苗种生产中也取得了一定的进展。如刘凤贤(1990)用壳聚多糖可将鹧鸪菜切段长成再生苗, 朱仲嘉等(1992)的羊栖菜组织培养芽生苗, 裴鲁青等(1993)的石花菜切段再生, 贺丽虹等(2004)的条斑紫菜单细胞固体培养成苗以及曾庆国等(2004)以坛紫菜单个体细胞克隆培养获得的叶状体用组织培养技术形成纯合丝状体再进行海上养殖等, 这些都为海藻养殖苗的培育提供了新途径。但与高等植物组织培养和离体快速繁殖相比, 海藻快速繁殖的实际应用还有一定的差距, 所以应重视离体快速繁殖在经济海藻中的应用研究, 以促进海藻快速繁殖的产业化。

**2.3 生产有用的化学成分** 植物能生产蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱以及其他活性

化合物等多种天然有机化合物, 这些化合物都是在细胞内合成的, 因此用组织或细胞进行大规模培养就有可能生产这些化合物。直至1995年为止, 人们从植物组织和细胞培养获得的产物已超过140种(Stöckigt等1995)。这些产物多数为发酵培养的微生物所不能合成的, 但海洋植物与普通高等植物不同, 两者所要求的生长环境也不一样, 它们含有特殊的成分(范晓和严小军1996), 在工业和医药中有特殊的利用价值。例如温带红藻 *Agardhiella subulata* 含有稀有的通过脂肪氧化代谢产生的类花生酸(Graber等1996)和具有抗滤过性病原体活性的磺酸盐半乳糖体(Witvrouw等1994); 热带红藻 *Ochtodes secundiramea* 含有的多种卤化类砷化合物(Maliakal等2001)可以通过月桂烯合成酶(Wise等2002)和海洋溴过氧化物酶(Rorrer等2001)产生。另外, 从海藻组织培养中还可以生产有用的药物或其他活性物质如胡萝卜素、红藻色素等。

### 3 结语

海藻组织培养是一门起步较晚而富有生命力的技术, 迄今为止, 海藻组织培养的研究已取得了可喜的成绩, 并在工业原料生产、养殖业苗种生产、医学药物生产中表现出广阔的应用和发展前景。今后, 海藻组织培养中需要解决的问题可能有:(1)寻找获得无菌材料的可靠方法。实验中海藻组织处理即其中的杀菌过程通常会改变材料的生理功能, 如海藻的光合作用下降和光敏感度增高, 另外, 这同时也是研究海藻中促进生长的物质的前提条件。(2)研究海藻中生长调节物质的作用及其作用模式。有研究表明, 从海藻中已可以分离到并已经鉴定的各种存在于高等植物体中的植物激素, 但有关这些激素在海藻中的生理作用看法还不统一, 其作用模式也不清楚, 这些问题如能获得突破, 则海藻组织培养的研究将会进入一个快速发展时期。(3)海藻生长调节过程的研究以及促进海藻生长和分化因素的识别与分离的研究。(4)迄今, 藻类外植体对外源糖类需要的研究还很少, 海藻如何吸收外部物质(如糖类和植物生长调节物质)以及外界物理条件变化对其吸收的影响也值得研究。

### 参考文献

- 范晓, 严小军(1996). 海藻化学研究与展望. 海洋科学, (2): 24~25
- 贺丽虹, 沈颂东, 黄鹤忠(2004). 条斑紫菜单细胞固体培养的初步研究. 海洋通报, 23 (5): 40~45
- 何卓培(1983). 植物组织培养生产有用化合物的潜力与问题. 植物生理学通讯, (4): 8~13
- 刘凤贤(1990). 鹧鸪菜再生苗育苗养成技术的研究. 水产学报, 14 (3): 219~226
- 罗士韦(1983). 植物细胞和组织培养的应用与展望. 植物生理学通讯, (2): 1~6
- 裴鲁青, 骆其君, 费志清(1993). 筛选石花菜切段育苗的附着基试验. 浙江水产学报, 12 (2): 92~96
- 史忠礼(1980). 植物组织培养在林业上的应用. 植物生理学通讯, (1): 11~15
- 王希华, 秦松, 曾呈奎(1999). 海带愈伤组织的高效率诱导. 海洋与湖沼, 30 (6): 652~656
- 曾庆国, 刘必谦, 杨锐, 骆其君, 王亚军(2004). 坛紫菜单个体细胞克隆的丝状体途径. 中国水产科学, 11 (6): 549~553
- 张全启(1991). 角叉菜(*Chondrus ocellatus* Holm)原生质体分离、培养与再生的研究. 中国海洋大学学报, 21: 52~62
- 张亚萍, 于文功, 戴继勋, 管华诗(2002). 植物激素在条斑紫菜原生质体固体培养中的作用. 海洋湖沼通报, 4: 56~62
- 朱仲嘉, 谭立佐, 翟世宽(1992). 羊栖菜马尾藻组织培养芽生苗. 水产学报, 16 (3): 273~277
- Aguirre-Lipperheide M (1993). Tissue culture studies in the Dictyotales (Phaeophyceae) [Ph. D. thesis]. Leeds: Leeds University, 112
- Aguirre-Lipperheide M, Evans LV (1993). Sterilization protocol for the Dictyotales (Phaeophyceae). J Phycol, 29: 243~251
- Araki T, Morishita T (1990). Fusion of protoplasts from wild type *Porphyra yezoensis* and green type *P. tenera* thalli (Rhodophyta). Nippon Suisan Gakkaishi, 56: 1161
- Bradley PM (1991). Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. J Phycol, 27: 317~321
- Bradley PM, Cheney DP (1990). Some effects of plant growth regulators on tissue cultures of the marine alga *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). Hydrobiologia, 204/205: 353~360
- Chandramohan D (1971). Indole acetic acid synthesis in sea. Proc Indian Acad Sci Ser B, 73: 105~109
- Chen LCM, Taylor ARA (1978). Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. Can J Bot, 56: 883~886
- Chen YC (1998). Development of protoplasts from holdfasts and vegetative thalli of *Monostroma latissimum* (Chlorophyta, Monostromataceae) for algal seed stock. J Phycol, 34: 1075~1081
- Chen YC, Chiang YM (1994). Development of protoplasts from *Grateloupia sparsa* and *G. filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta). Bot Mar, 37: 361~366

- Chen YC, Shih HC (2000). Development of protoplasts of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) for algal seed stock. *J Phycol*, 36: 608~615
- Cohen E, Shoshana A, Heimer YH, Mizrahi Y (1984). Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of *Chlorella*. *Plant Physiol*, 74: 385~388
- Dai J, Zhang Q, Zhenmin B, Yu B, Zhon H (1990). Studies on the pure line culture, mutagenization and interspecific fusion of *Porphyra* protoplasts. *Oceanol Limnol Sin*, 21: 293~296
- Dawes CJ, Koch EW (1991). Branch micropropagule and tissue culture of the red algae *Euclidean denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* farmed in the Philippines. *J Appl Phycol*, 3: 247~257
- Della-Pieta F, Balestri E, Cinelli F (1991). Preliminary results on production of protoplasts from two green marine algae: *Enteromorpha linza* (L.) J. Agardh and *Ulva rigida* C. Agradh. *Int J Mar Biol Biotech*, 17: 553~560
- Ericsson LE, Lewis L (1953). On the occurrence of vitamin B<sub>12</sub> factors in marine algae. *Ark Kem*, 6: 427~442
- Fitch MMM (1993). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 32: 205~212
- Fujita Y, Saito M (1990). Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204/205: 161~166
- Garcia-Jimenez P, Rodrigo M, Robaina RR (1998). Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *J Appl Phycol*, 10: 95~100
- Garcia-Reina G, Gómez-Pinchetti JL, Robledo DR, Sosa P (1991). Actual potential and speculative applications of seaweed cellular biotechnology: some specific comments on *Gelidium*. *Hydrobiologia*, 221: 181~194
- Graber MA, Gerwick WH, Cheney DP (1996). The isolation and characterization of agardhilactone, a novel oxylipin from the marine red alga *Agardhiella subulata*. *Tetrahedron Lett*, 37: 4635~4638
- Guzman-Uriostegui A, Garcia-Jimenez P, Marian F, Robledo D, Robaina R (2002). Polyamines influence maturation in reproductive structures of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Phycol*, 38: 1169~1175
- Jin HJ, Seo GM, Cho YC, Hwang EK, Sohn CH, Hong YK (1997). Gelling agents for tissue culture of the seaweed *Hizikia fusiformis*. *J Appl Phycol*, 9: 489~493
- Kaczyna F, Megnet R (1993). The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Hydrobiologia*, 268: 57~64
- Kawashima Y, Tokuda H (1990). Callus formation in *Ecklonia cava* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta). *Hydrobiologia*, 204/205: 375~380
- Kawashima Y, Tokuda H (1993). Regeneration from callus of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta). *Hydrobiologia*, 260/261: 358~359
- Kim GH, Klotchkova TA, West JA (2002). From protoplasm to swarmer: regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the multicellular marine green alga *Microdictyon umbilicatum* (Chlorophyta). *J Phycol*, 38: 174~183
- Lawlor HJ, McComb JA, Borowitzka MA (1990). Tissue culture of brown seaweeds. *Aust J Biotechnol*, 4: 260~264
- Lawlor HJ, McComb JA, Borowitzka MA (1991). A rapid and inexpensive method for surface sterilisation of *Ecklonia radiata* (Phaeophyceae) for tissue culture. *Bot Mar*, 34: 261~264
- Liu XW, Kloareg B (1991). Tissue culture of *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). I. The effects of plant hormones on callus induction from tissue explants. *C R Acad Sci Paris, Ser III*, 312: 517~522
- Maliakal S, Cheney DP, Rorrer GL (2001). Halogenated monoterpene production in regenerated plantlet suspension cultures of the macrophytic red alga *Ochtodes secundiramea*. *J Phycol*, 37: 1010~1019
- Matsumura W, Yasui H, Yamamoto H (2000). Mariculture of *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) using protoplast regeneration. *Phycol Res*, 48: 169~176
- Mejjad M, Loiseaux-de-Goër S, Ducreaux G (1992). Protoplast isolation, development, and regeneration in different strains of *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm. (Phaeophyceae). *Protoplasma*, 169: 42~48
- Muñoz J, Cahue-López AC, Patiño R, Robledo D (2006). Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *J Appl Phycol*, 18: 209~218
- Notoya M, Nagashima M, Aruga Y (1992). Influence of light intensity and temperature on callus development in young sporophytes of three species of Laminariales (Phaeophyta). In: Chapman ARO, Brown MT, Lahave M (eds). Abstracts from the XIV International Seaweed Symposium. August, 16~21, Brest and St Malo (No. 225)
- Polne-Fuller M, Gibor A (1987). Calluses and callus-like growth in seaweeds: induction and culture. *Hydrobiologia*, 151/152: 131~138
- Polne-Fuller M, Gibor A (1990). Developmental studies in *Porphyra* (Rhodophyceae). III: Effect of culture conditions on wall regeneration and differentiation of protoplasts. *J Phycol*, 26: 674~682
- Reddy CRK, Fujita Y (1991). Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. *J Appl Phycol*, 3: 265~275
- Reddy CRK, Iima M, Fujita Y (1992). Induction of fast growing and morphologically different strains through intergenetic

- protoplast fusions of *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta). *J Appl Phycol*, 4: 57~65
- Reddy CRK, Raja Krishna Kumar G, Siddhanta AK, Tewari A, Eswaran K (2003). *In vitro* somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) doty (Rhodophyta, Gigartinales). *J Phycol*, 39: 610~616
- Robaina RR, Garcia-Reina G, Luque A (1990). The effects of the physical characteristics of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue culture. *Hydrobiologia*, 204/205: 137~142
- Robaina RR, Garcia-Reina G, Luque A (1992). The growth pattern and structure of callus from the red alga *Laurencia* sp (Rhodophyta, Ceramiales) compared to shoot regeneration. *Bot Mar*, 35: 267~272
- Roeder V, Collén J, Rousvoal S, Corre E, Leblanc C, Boyen C (2005). Identification of stress gene transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *J Phycol*, 41: 1227~1235
- Rorrer GL, Tucker MP, Cheney DP, Maliakal S (2001). Bromoperoxidase activity in microplantlet suspension cultures of the macrophytic red alga *Ochtodes secundiramea*. *Biotechnol Bioeng*, 74: 389~395
- Sacramento A, Garcia-Jimenez P, Alcazar R, Tiburcio A, Robaina R (2004). Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *J Phycol*, 40: 887~894
- Schreiber E (1935). Über die Kultur und Geschlechtsbestimmung von *Dictyota dichotoma*. *Planta*, 24: 265~275
- Stöckigt J, Obitz P, Falkenhagen H, Lutterbach R, Endreß S (1995). Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 43: 97~109
- Wise ML, Rorrer GL, Polzin JJ, Croteau R (2002). Biosynthesis of marine natural products: isolation and characterization of a myrcene synthase from cultured tissues of the marine red alga *Ochtodes secundiramea*. *Arch Biochem Biophys*, 400: 125~132
- Witvrouw M, Este JA, Mateu MQ, Reymen D, Andrei G, Snoeck R, Ikeda S, Pauwels R, Bianchini NV, Desmyter J et al (1994). Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Agardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chem Chemother*, 5: 297~303
- Yan X, Wang S (1993). Regeneration of whole plants from *Gracilaria asiatica* Chang et Xia protoplasts (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 260/261: 379~383
- Yan ZM (1984). Studies on tissue culture of *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Hydrobiologia*, 116/117: 314~316
- Yokoya NS, West JA, Luchi AE (2004). Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycol Res*, 52: 244~254
- Yokoya XH, Guimaraes SMPB, Handro W (1993). Development of callus-like structures and plant regeneration in thallus segments of *Grateloupia filiformis* Kützinger (Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 260/261: 407~413