



大型海藻類の細胞培養 —褐藻コンブ目植物のプロトプラストの単離・培養と再生パターン—

松村 航

科学技術特別研究員 富山県水産試験場 (936-8536 富山県滑川市高塚 364)

Wataru Matsumura: Cell culture of macroalgae. Isolation, cultivation and regenerative patterns of protoplasts from Laminariales (Phaeophyceae). Jpn. J. Phycol. (Sorui) 50:7-14.

Efficient isolation method using commercial cell-wall degrading enzymes and the cultivation method of viable protoplasts from sporophytes of Laminariales are described. These methods are easy and effective ones for production and cultivation of protoplasts from Laminariales. Three developmental processes for regenerating on normal sporophytes from protoplasts were observed: 1: direct development, 2: indirect development from callus-like mass, 3: indirect development from gametophyte-like filament. Here, clonal mass production of seedlings using protoplasts was performed in Laminariales.

Key Index Words: cell culture, cultivation, Laminariales, protoplast, regeneration pattern, seedling production

Wataru Matsumura: Japan Science and Technology Corporation, Domestic Research Fellow. Toyama Prefecture Fisheries Research Institute, Namerikawa, Toyama 936-8536, Japan. e-mail: wataru-m@marine.email.ne.jp

1980年代より、海藻を材料とした組織培養や細胞培養の研究が盛んに行われるようになり(嵯峨・松永(編)1991)、形態形成の機構などを解明するための基礎技術、あるいは新しい養殖手法を確立するための技術として注目されている。組織培養については、藻体の無菌化、カルス細胞の誘導、葉状体の再生、海中培養などが多く報告されており、プロトプラストを用いた細胞培養についても、体構造の比較的簡単な紅藻アマノリ類や緑藻アオサ類では完全な藻体に再生することが報告され、選抜育種や細胞融合による有用な株の作出も試みられている。しかし、褐藻コンブ目植物を材料とした組織培養では、カルスから正常な孢子体への再分化が起こりにくく、また再生体も奇形となる場合が多いため研究は停滞しており、この方法による養殖用種苗の採苗は実現していない。一方のコンブ目植物の細胞培養についても、容易でしかも確実なプロトプラスト単離法が確立されているとは言いがたく、各研究者が独自に抽出・精製した特殊な酵素液を用いているのが現状である。Butler *et al.*(1989)と Sawabe & Ezura (1996)は、コンブ目植物からプロトプラストを単離し、細胞壁の再生、カルス様の細胞塊の形成や幼孢子体の再生を報告している。しかしながら、プロトプラストから完全な成熟藻体に再生した例はなく、プロトプラストの培養方法が完全には確立されていないことから、現状では単離細胞からの再分化や形態形成に関する基礎的な知見が少ない。

著者らは、これまでに4属7種の北海道産有用コンブ目植物、すなわち、マコンブ *Laminaria japonica* Areschoug, ホンメコンブ *L. religiosa* Miyabe, ミツイシコンブ *L. angustata* Kjellman, ナガコンブ *L. longissima* Miyabe (コンブ属), ガゴ

メ *Kjellmaniella crassifolia* Miyabe (トロロコンブ属), スジメ *Costaria costata* (Turner) Saunders (スジメ属) およびワカメ *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (ワカメ属) の孢子体からプロトプラストを単離・培養し、その発生過程を詳細に観察したほか、得られた種苗の海中養殖により、自然藻体と比べて遜色のない成熟藻体にまで育成することに成功している(Matsumura 1999)。このうち、マコンブとワカメについては既に詳細を報告してある(Matsumura *et al.* 2000, 2001)が、ここでは、著者が用いているプロトプラストの単離・培養手法を中心に解説する。

プロトプラストの単離

1. 準備

器具: 濾過滅菌用フィルター (0.2 μm あるいは0.45 μm) とシリンジ (30 mL), カミソリの刃, ナイロンメッシュ (200 μm , 80 μm), 遠心分離機, プロトプラスト単離用の恒温器あるいは恒温室*, シューカー, 血球計算盤。

* 温度はある程度まで高い方がプロトプラストを単離しやすいが、生物試料の高温に対するストレスを考慮し、約17°Cに設定する。

海水・試薬: オートクレーブ滅菌海水 (121°C, 20分), 抗生物質 (25mg ペニシリンGカリウム, 25mg ストレプトマイシン硫酸塩および2mg ナイスタチン/100mL SW), *細胞壁分解酵素 (2% Abalone acetone powder と2% Cellulase Onozuka RS), **高張液A, B, 生存率測定用の染色液 (エバンスブルーあるいはニュートラルレッド)。

* 酵素液は遠心分離 (8,000 ~ 10,000 RPM, 5°C, 10分) 後,

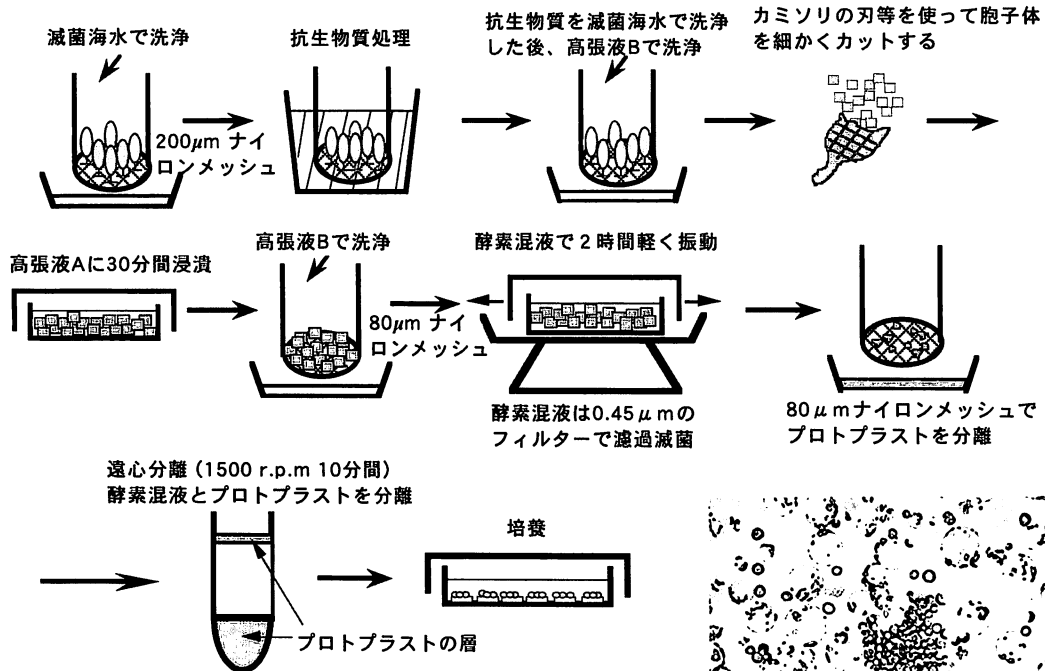


図1 コンブ目植物プロトプラストの単離方法の手順

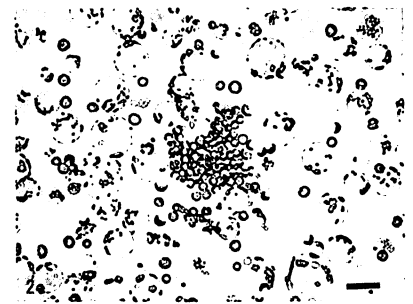


図2 マコンブ幼孢子体から単離したプロトプラスト
スケール=20µm

濾過滅菌して保存する。

**高張液は、細胞の原形質分離を誘発し、プロトプラストが単離しやすくするために用いるもので、Butler *et al.* (1989) が示した次の2種類を用いる。

・高張液A: 700 mmol L⁻¹ NaCl, 30 mmol L⁻¹ MgCl₂, 30 mmol L⁻¹ MgSO₄, 20 mmol L⁻¹ KCl, 20 mmol L⁻¹ EGTA /DW pH 5.5。本液は、コンブの細胞壁主成分であるアルギン酸のカルシウムをキレート化して溶解しやすくするために用いる。

・高張液B: 735 mmol L⁻¹ NaCl, 30 mmol L⁻¹ MgCl₂, 45 mmol L⁻¹ MgSO₄, 15 mmol L⁻¹ KCl, 1 mmol L⁻¹ CaCl₂, 20 mmol L⁻¹ MES /DW pH 6.0。これは、洗浄に用いたり、酵素液を溶解するための基本液である。

2. コンブ孢子体からプロトプラストを単離するための手順
実際のプロトプラスト単離の手順を図1に示した。概要を以下に説明する。

- 1) 孢子体を滅菌海水で数回洗浄する。天然藻体を用いる場合は、特に念入りに付着物を取り除く。
- 2) 抗生物質に30分から1時間程度浸漬する(暗所5℃で保存)。この処理によって、完全な無菌ではないが、細胞壁のないプロトプラスト培養初期を静菌化できる。
- 3) 抗生物質を滅菌海水で洗い流す。
- 4) カミソリの刃などを用いて藻体を細断し、酵素混液が組織内に浸透しやすいようにする。幼孢子体を用いる場合、この処理は省略できる。
- 5) 高張液Aに30分間暗所で浸漬する(17℃)。
- 6) 高張液Bで洗浄する。
- 7) 藻体0.5 g 当たり5 mLの酵素混液を加え、シェー

カーを用いて1~2時間軽く振動する(17℃)。

- 8) プロトプラストが単離されているのを確認し、80µmのナイロンメッシュでプロトプラストのみを分離する。このとき単離したプロトプラストを高張液Bに懸濁する。
- 9) 遠心分離機を用いてプロトプラスト懸濁液を遠心分離し(1500 RPM, 5℃, 10分)、高張液Bを加えながら遠心分離を数回繰り返すことによってプロトプラストと酵素混液を完全に分離し、プロトプラストだけを取り出す。

3. プロトプラストの収量

この単離方法によって、コンブ目植物7種の幼孢子体(0.5g)から約10⁷個のプロトプラストを単離することができた。図2にマコンブの単離例を示した。この方法で単離した直後のプロトプラストの生存率は、すべての種で90%以上である。

この方法は、容易に入手できる市販酵素を用いるために、細胞壁分解酵素混液の調整の手間がかからない。従来法(天然抽出酵素)と収量の比較をしても遜色なく単離可能である。なお、細胞壁分解酵素については、今回用いた Abalone acetone powder (Sigma Chemical Co.) および Cellulase Onozuka RS (Yakult Honsha Co.)のほかに、他の市販酵素 Limpet acetone powder (Sigma Chemical Co.), Laminarinase (Sigma Chemical Co.) も含め、濃度や組み合わせを変え、マコンブ幼孢子体を用い

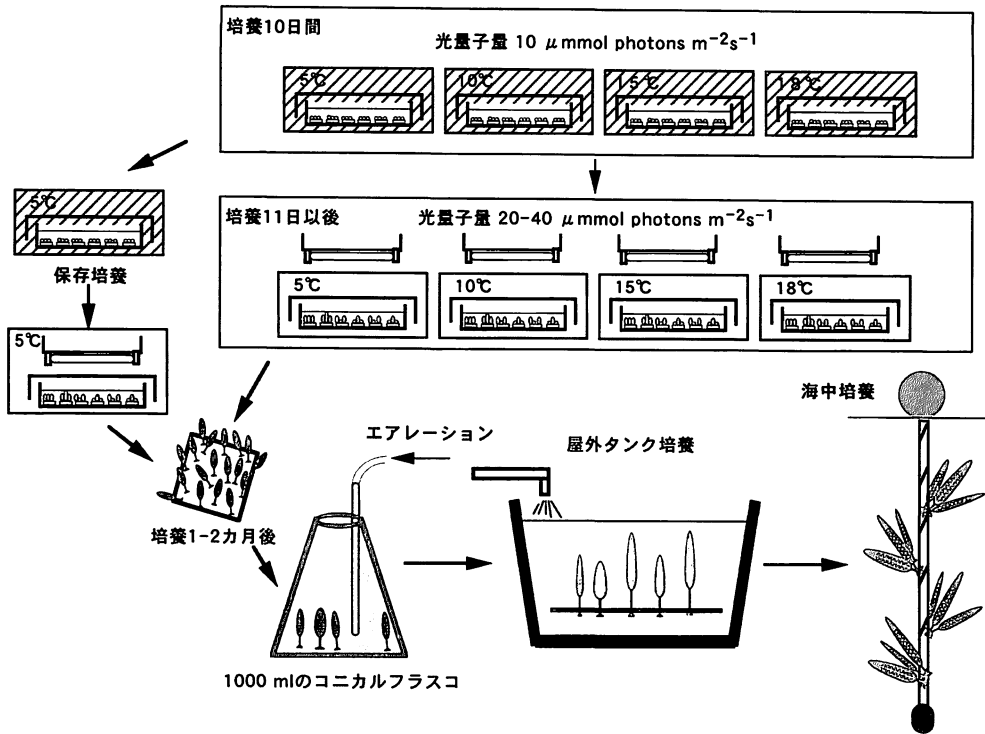


図3 プロトプラストの培養方法の手順

た場合のプロトプラスト収量の比較を行っている(表1)。ここで紹介した酵素の組み合わせは、この結果から最もプロトプラスト収量が多かったものである。

プロトプラストの培養方法

1. 準備するもの

器具:組織培養ディッシュ(直径6cm,Iwaki),スライドガラスの小片(約5mm²),恒温器または恒温室,照明器具,通気培養装置,コニカルフラスコ(1000 mL),蛍光顕微鏡,クレモナローブ,屋外培養用水槽,海中培養施設

試薬:ESS培地(嵯峨・Gibor 1986),PESI培地(Tatewaki 1966),CaCl₂(培養液中に細胞壁再生のためのカルシウムを補うため),高張液B(上記参照),細胞壁の有無を観察するためのカルコフラーホワイトM2R染色液(0.01% w/v, Sigma Chemical Co.)

2. 培養の手順

ここではマコンブ(Matsumura *et al.* 2000)の培養方法(図3)を説明するが,他のコンブ目植物についても基本的に同じ

である。

1) プロトプラストの収容

単離したプロトプラストは,組織培養ディッシュに約4×10⁶個づつ分け,それぞれ高張液B 10 mLに懸濁させ,さらに2 mLの50% ESS培地に5 mmol L⁻¹ CaCl₂を添加した培養液を加える。この時,組織培養ディッシュ上に直接プロトプラストを付着させるよりも,スライドガラス小片を底面に敷きつめ,その上に付着させる方が,プロトプラストの付着率が高く,均等に植付けることができる。

2) 温度・光条件の設定

組織培養ディッシュを恒温器内に収容し,培養する。温度は,著者の場合,5~18°Cの範囲で試験を行ったが,後述のように再生パターンに影響を及ぼすので注意を要する。光条件のうち,光周期については明期:暗期が中日(12時間:12時間),長日(14時間:10時間)のいずれであっても特に結果に違いは見られない。しかし,培養初期のプロトプラストは光強度に対して敏感であるので(Matsumura 1999),培養開始から10日間の光量子量は10μmol photons m⁻²s⁻¹,それ以後は20~40μmol photons m⁻²s⁻¹で培養する。

表1 マコンブプロトプラスト単離に対する様々な細胞壁分解酵素混液の効果

AAP ^{*1} (%)	LAP ^{*2} (%)	Laminarinase ^{*3} (%)	Cellulase ^{*4} (%)	単離数 ^{*5} (cell/0.5g)	単離直後の生存率(%)
2.0	-	-	-	< 10 ³	-
-	-	-	2.0	< 10 ³	-
-	2.5	-	2.0	8 × 10 ⁴	95
1.0	-	-	1.5	5 × 10 ⁵	91
-	-	0.02	1.5	1.7 × 10 ⁶	95
2.0	-	-	2.0	1.6 × 10 ⁷	92

*1 Abalone acetone powder (Sigma), *2 Limpet acetone powder (Sigma), *3 *Penicillium* species (Sigma)から抽出した酵素, *4 Cellulase Onozuka RS, *5 胞子体0.5gから単離したプロトプラスト数

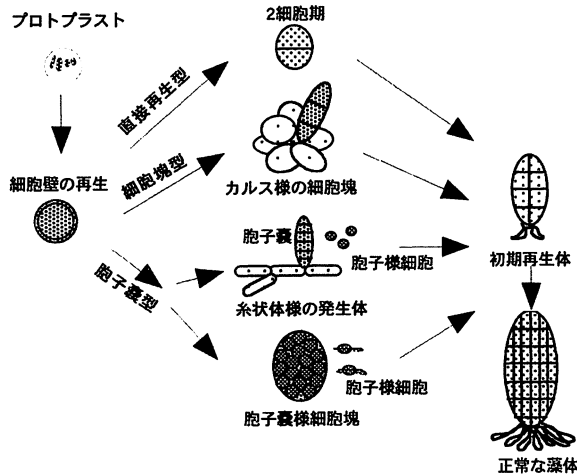


図4 プロトプラストから正常な藻体に再生する発生過程

プロトプラストを保存培養する場合には、水温5℃、光量子量 10μmol photons m⁻²s⁻¹で培養し続けると、生存・発生能力を保持したまま数細胞期の状態で少なくとも3カ月再生を留まらせることが可能である (Matsumura 1999)。

3) 培地の交換

浸透圧の急激な変化によるプロトプラストの破裂を防ぐために、浸透圧を徐々に減少させる。著者の場合は、培養開始から10日間は毎日2~5回、上記の培養液を2mL交換し、その後、20日間は1日おきに、それ以降は2日おきに50%ESS培地(ただし、5 mmol L⁻¹ CaCl₂を含まないもの)を約10 mL交換した。

4) 通気培養

1~2カ月後、再生体が全長0.1~1 cmになった段階で、1000 mLのコニカルフラスコに移植して通気培養し、10℃、PESI培地で成長させる。

再生のパターン

海藻のプロトプラストの再生に関する知見は、表2に示したように、比較的体構造が簡単であるか特に再生能力の高い群について得られている。再生の様式は様々で、図4に示したように、1) プロトプラストから直接再生する様式、2) カルス様の細胞塊を経て再生する様式、3) 糸状体に孢子嚢が

形成され、放出された孢子様の細胞によって発生する様式、または4) プロトプラスト自体が孢子嚢状の細胞塊となり、放出された孢子様の細胞によって発生する様式、などが知られている。

コンブ目植物7種では、得られた全てのサイズのプロトプラスト(直径8~65μm)が上記の室内培養によって細胞壁を再生するが、明らかに再生能力を有しているのは、サイズから判断して表層細胞由来のプロトプラストのみである。また、コンブ目植物のプロトプラストから幼孢子体に至るまでの再生様式については、1) 直接再生型、2) 細胞塊型、3) 糸状体型の3タイプが認められ、各タイプの出現は培養水温と密接な関係があることがわかっている (Matsumura 1999, Matsumura et al. 2000, 2001)。表3に種類ごとの再生様式の出現状況をまとめたが、以下に、各様式について説明する。図5に、ワカメプロトプラストの3つの再生様式について示す。

直接再生型：7種全てで見られる。特にコンブ属4種とガゴメではこの発生様式が主であり、5~18℃の4段階で比較した結果では、5℃の培養で最も多くの再生体が誘発される(図6-9)。この再生型は、コンブ目植物の受精卵の発生様式とほぼ同じで、細胞壁を再生した後(図10)、2~10細胞期に仮根細胞を形成し(図11)、仮根細胞を分化した再生体にも、仮根細胞と反対方向に茎状部や葉状部が形成される(図12)。この葉状部は仮根側から多層域が広がり、やがて多層の葉状部、茎状部、附着器を発達させ、通常の孢子体と区別ができないようになる。しかし、仮根が形成された場合でも、高水温(15℃と18℃)では正常に発達しない個体の割合が高くなり、正常な発達が阻害される。

細胞塊型：この型は、マコンブ、スジメおよびワカメで観察される。カルス様細胞塊は5~18℃の水温で見られ、スジメとワカメでは10℃と15℃でよく発達する(図13)。特にスジメではプロトプラストの殆どがこの型を示す(Matsumura 準備中)が、マコンブでは稀であり発達しない。カルス様細胞塊は不規則な細胞分裂によって発達し、様々な形、サイズの細胞塊で構成されており、1~2カ月後、縁辺の細胞から仮根細胞が分化・形成されると葉状部が出現する。1つのカルス様細胞塊からたくさんの葉状部が成長し(図14)、いずれも正常な孢子体と区別ができないようになる。

糸状体型：スジメとワカメのみで認められ、これら2種は

表2 海藻の細胞培養におけるプロトプラストの再生様式の例

種	再生体	文献
緑藻 <i>Enteromorpha compressa</i>	カルス, 孢子嚢様の細胞塊, 藻体	Reddy & Fujita 1991
<i>Monostroma angicava</i>	カルス, 藻体	Saga & Kudo 1989
<i>Ulva angustata</i>	カルス, 藻体	Polne-Fuller & Gibor 1987
褐藻 <i>Cladosiphon okamuranus</i>	孢子嚢様の細胞塊, 藻体	Uchida & Arima 1992
<i>Sphacelaria</i> sp.	藻体	Ducreux & Kloareg 1988
紅藻 <i>Bangia atropurpurea</i>	藻体	Araki et al. 1994
<i>Gracilaria asiatica</i>	糸状体, カルス, 藻体	Yan & Wang 1993
<i>Grateloupia filicina</i>	糸状体, 藻体	Chen & Chiang 1994
<i>Porphyra crispata</i>	糸状体, カルス, 藻体	Ar Gall et al. 1993

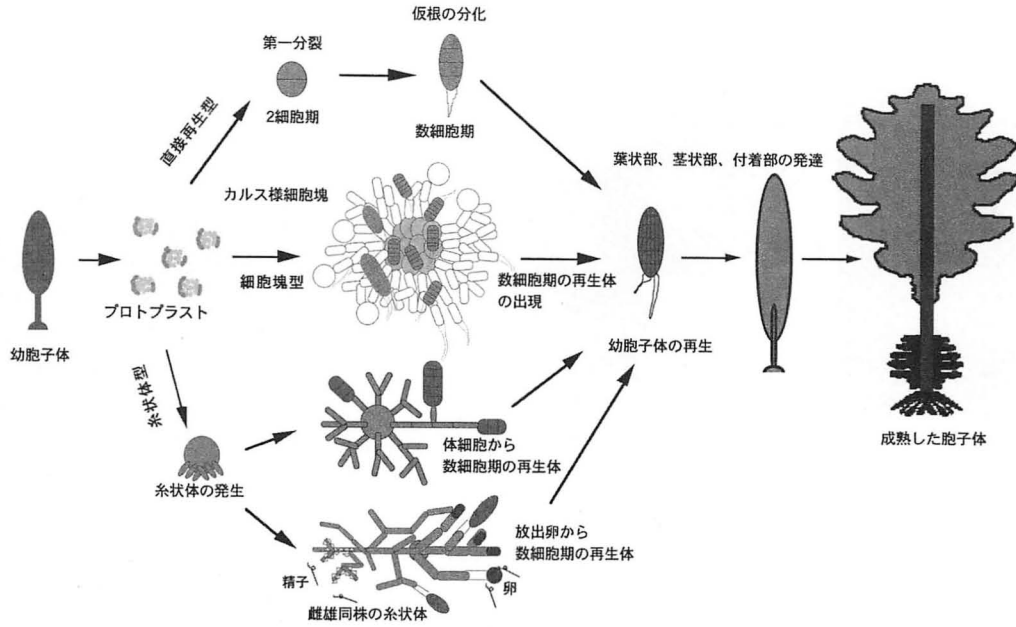


図5 コンブ目植物プロトプラストの3つの再生様式

いずれも1年生の種類であることを考えると興味深い。この糸状体(図15)は、コンブ目の微小な配偶体と酷似しており、プロトプラストを15℃または18℃で2~3ヶ月培養した時に見られ、1~数細胞で分裂を停止した細胞(ワカメの場合)あるいは未発達のカルス様細胞塊(スジメの場合)から形成される。雌雄の配偶体に酷似した糸状体は同じ株に出現し、造精器と生卵器が形成され、精子と卵が放出される。受精の有無は確認できていないが、この放出卵に由来する胞子体(図16,17,18)は、通常雌雄配偶体間で行われる受精によって生じる胞子体と全く同様の発生様式を示す。ワカメの場合、ここで示した糸状体型によって最も多くの胞子体が再生されるが、このほかに、糸状体の体細胞に由来する胞子体(図19)の出現も認められる。

直接発生型において、数細胞の時期に仮根を发出できない

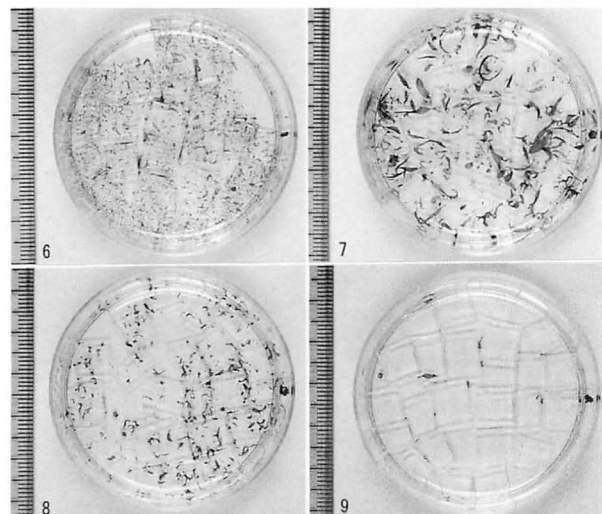


図6-9 培養2ヶ月後のマコンブプロトプラスト再生
6から順に5, 10, 15, 18℃



図10-12 ホソメコンブプロトプラストの再生。直接発生型
図10 細胞壁を再生したプロトプラスト。スケール=25μm
図11 仮根細胞を分化した再生体。スケール=50μm
図12 葉状部が多層化(矢印)した再生体。スケール=300μm

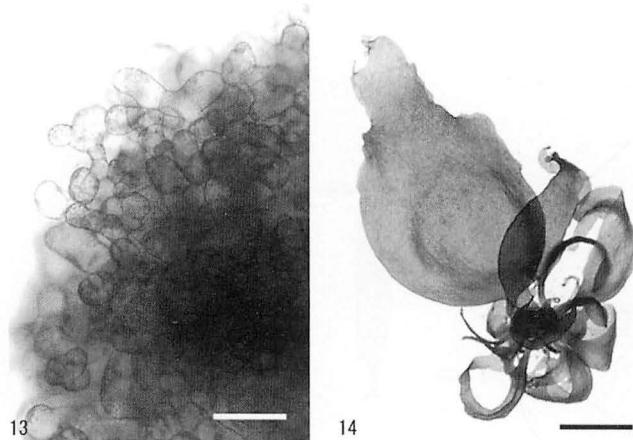


図 13, 14 ワカメプロトプラストの再生。細胞塊型

図 13 発達したカルス様細胞塊。スケール=100 μ m

図 14 1つの細胞塊から多くの再生体が出現。スケール=2mm

発生体は、茎状部、付着器を形成しない単層あるいは多層の葉状部など、種々の奇形を示す。図 20-24 にホソメコンブで認められた奇形の例を示したが、これらはいずれも途中で成長を停止し、枯死する。細胞塊型についても同様で、仮根細胞が形成されない場合には奇形(完全体にならない)を示す。このことから、仮根細胞の分化が胞子体の成長の方向性(極性)を決定するのに不可欠であり、コンブ目植物の初期の形態形成過程で最も重要な段階と位置付けることができる。

海中育成

著者らの研究では、1996年11月から1997年の11月の1年間に、コンブ目植物7種のプロトプラストから再生した幼胞子体と通常の雌雄配偶体から得られた受精卵に由来する幼胞子体(対照)の育成試験を行った。いずれも同時期に屋外タンク培養に移し、北海道南茅部町白尻沖で海中育成を行い、成長と形態の比較を行った(Matsumura 1999, Matsumura *et al.* 2001)。

海中育成方法についてはすでに多くの解説(例えば、秋山・

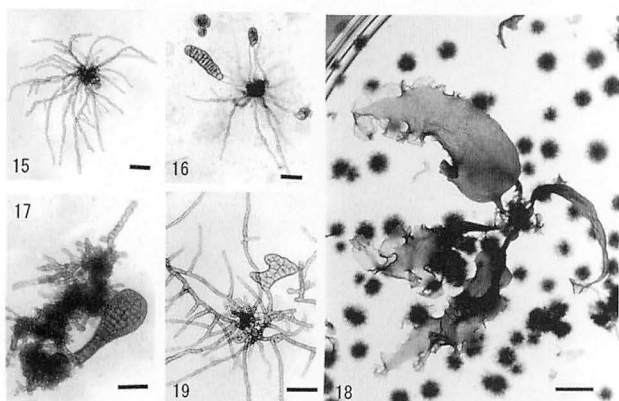


図 15-18 ワカメプロトプラストの再生。糸状体型

図 15 糸状体の発出。スケール=50 μ m

図 16, 17 放出卵からの再生体。スケール=50 μ m

図 18 再生した幼胞子体。スケール=2mm

図 19 糸状体の体細胞から直接発達した再生体。スケール=50 μ m

松岡 1986, 三本菅ら 1986)があるのでここでは詳しく述べないが、著者らは、約10cmに成長した段階で、養殖用のクレモナロープ(直径約2mm)で茎状部を縛り、海水を連続流した屋外タンクでさらに成長させ、海水温に適應させた後、3個体ずつ養殖用ロープ(親縄、直径約5cm)に挟みこんで水深1~5mに垂下させた。

コンブ目植物7種の再生体はいずれも海中育成中に枯死することはなく、1月から6月までの期間(水温15 $^{\circ}$ C以下)、対照と同様、順調に成長した。図 25 には5カ月間海中育成したマコンブのプロトプラスト再生体を示した。7種とも、海中育成5ヶ月後の再生体と対照の胞子体の全長(ワカメの場合は茎長)や葉幅はほぼ同じ(有意差なし)か、対照より長く幅広くなる傾向(主にコンブ属)が認められた。外部、内部形態ともに両者間で違いはなく、コンブ目植物に特有の表層、皮層、髓層からなるラミナリア構造を示していた(Matsumura 1999)。さらに、プロトプラスト由来と受精卵由来のマコンブとホソメコンブでは4~6月(葉状部の先端部)と11月(全域)に、スジメとワカメでは6月にそれぞれ子嚢斑(ワカメの場合は胞子葉)が形成された。また、これらの胞子嚢群から放出された遊走子は、培養の結果、雌雄異株の配偶体に成長し、卵と精子の受精によって正常な胞子体を形成することが確かめられている。

おわりに

褐藻コンブ目植物において、プロトプラストの再生体が天然藻体と同じ形状・大きさに再生することが明らかになった

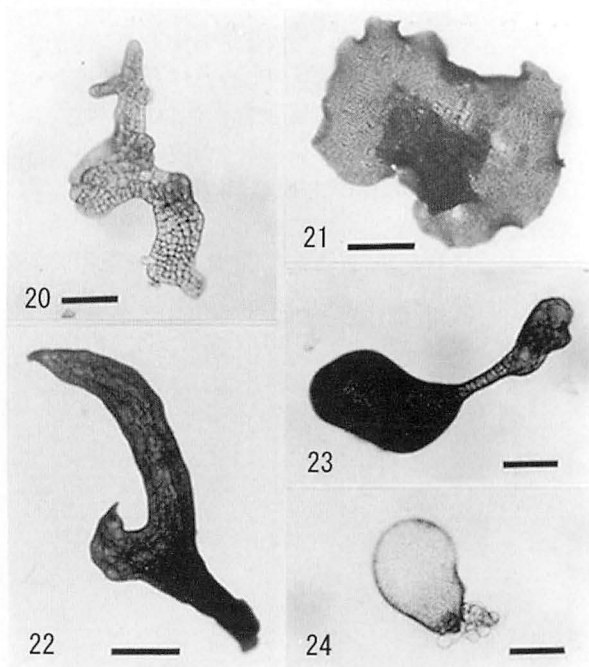


図 20-24 ホソメコンブの仮根細胞未分化の奇形再生体

図 20 単層の再生体。スケール=100 μ m

図 21 多層部分をもつ再生体。スケール=300 μ m

図 22, 23 多層の細胞塊状の再生体。スケール=300 μ m (22), 100 μ m (23)

図 24 カルス様の再生体。スケール=100 μ m

表3 コンブ目植物7種から単離したプロトプラストの再生と発生過程

藻種	再生様式	再生体	成熟	文献
<i>Laminaria japonica</i>	直接再生型	正常な孢子体	○	Matsumura et al. 2000
	細胞塊型	正常な孢子体	-	未発表
<i>L. religiosa</i>	直接再生型	正常な孢子体	○	Matsumura 1999
<i>L. angustata</i>	直接再生型	正常な孢子体	△	Matsumura 1999
<i>L. longissima</i>	直接再生型	正常な孢子体	△	Matsumura 1999
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	直接再生型	正常な孢子体	△	Matsumura 1999
<i>Costaria costata</i>	直接再生型	正常な孢子体	○	Matsumura 1999
	細胞塊型	正常な孢子体	○	Matsumura 1999
	糸状体型	正常な孢子体	○	Matsumura 1999
<i>Undaria pinnatifida</i>	直接再生型	正常な孢子体	○	Matsumura et al. 2001
	細胞塊型	正常な孢子体	○	Matsumura et al. 2001
	糸状体型	正常な孢子体	○	Matsumura et al. 2001

○確認 △未確認

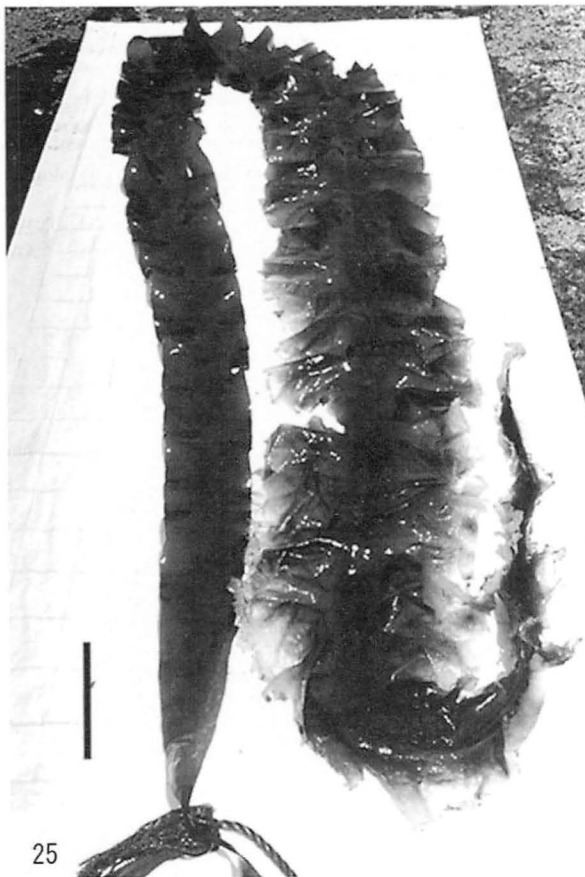


図25 5ヶ月間海中培養し、子嚢斑を形成したマコンブプロトプラスト由来の完全体(約7m)。スケール=20cm

ことにより、有用な形質の遺伝子を持つクローンの培養による品種改良、種苗の生産や保存がある程度実現可能なところまできている(表3)。

著者らの研究で得られた知見では、コンブ目植物の孢子体の成長には仮根の分化が極めて重要であり、これによりその後の成長の方向性が決まってくると考えられる。この仮説が正しければ、仮根を分化できずに成長を停止した発生途中の細胞でも、仮根の分化を人為的に誘導できれば、さらに発生段階を進めることができることになる。仮根分化の促進に

は、ここで示した低水温条件(5℃)のほかに、植物ホルモンによる誘導(山中1990)も有効であろう。もしこのことに成功すれば、高水温(18℃以上)で発生してきた孢子体をうまく育て、高温耐性のあるコンブ目植物の選抜・作出ができるかもしれない。

ワカメとスジメのプロトプラストの再生過程では、配偶体に酷似した雌雄同株の糸状体が観察されたため、これを鉄酢酸ヘマトキシリン溶液によって染色体を観察したところ、糸状体とそれから発生した孢子体はいずれも二倍体であった。このことは無孢子生殖によって二倍体の配偶体から無配生殖によって孢子体が形成されたことになる。観察数が少ないため、今後はフローサイトメリー等の手法を用いて核相の解析を行う必要があるが、結果によっては、コンブ目植物の三倍体、四倍体作出の有効な手段になる。

著者らの研究では、主に培養した幼孢子体を用いている。しかし、孢子体の成長段階(年齢)とともに再生個体数の減少が観察されており、このような藻体のプロトプラストから効率的に再生藻体を導くことが今後の重要な課題である。

以上のように、コンブ目植物の細胞培養には課題も多いが、興味も尽きない。本稿がコンブ目植物のバイオテクノロジーに少しでも役に立てば誠に幸いである。

本研究を行うに当たり、絶えずご指導を頂いた北海道大学大学院水産科学研究科水産増殖学専攻育種生物学講座山本弘敏元教授そして安井肇助教授に感謝申し上げます。また、本稿を取り纏める際に、適切な御助言を頂きました北海道大学大学院育種生物学講座嵯峨直恆教授ならびに、富山県水産試験場藤田大介主任研究員に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 秋山和夫・松岡正義 1986. 浅海養殖. p.541-566. 資源協会(編), 大成出版社, 東京.
- Araki, T., Hayakawa, M., Tamaru, Y., Yoshimatsu, K. & Morishita, T. 1994. Isolation and regeneration of haploid protoplasts from *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) with marine bacterial enzymes. *J. Phycol.* 30: 1040-1046.

- Ar Gall, E., Chiang, Y-M. & Kloareg, B. 1993. Isolation and regeneration of protoplasts from *Porphyra dentata* and *Porphyra crispata*. Eur. J. Phycol. 28: 277-283.
- Butler, D.M., Østgaard, K., Boyen, C., Evans, L.V., Jensen, A. & Kloareg, B. 1989. Isolation conditions for high yield of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). J. Exp. Bot. 40: 1237-1246.
- Chen, L. C. M. & Chiang, Y. M. 1994. Development of protoplasts from *Grateloupia sparsa* and *G. filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta). Bot. Mar. 37: 361-366.
- Ducreux, G. & Kloareg, B. 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). Planta 174: 25-29.
- Matsumura, W. 1999. Development of the protoplasts isolated from 7 species of *Laminariales* (Phaeophyceae). Doctoral Thesis, Graduate School of Fisheries science, Hokkaido University, Hakodate. 1-136.
- Matsumura, W., Yasui, H. & Yamamoto, H. 2000. Mariculture of *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) using protoplast regeneration. Phycol. Res. 48: 169-176.
- Matsumura, W., Yasui, H. & Yamamoto, H. 2001. Successful sporophyte regeneration from protoplasts of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae). Phycologia 40: 10-20.
- Polne-Fuller, M. & Gibor, A. 1987. Callus and callus-like growth in seaweeds: induction and culture. Hydrobiologia 151/152: 131-138.
- Reddy, C.R.K. & Fujita, Y. 1991. Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. J. Appl. Phycol. 3: 265-275.
- Saga, N. & Kudo, T. 1989. Isolation and culture of protoplasts from the marine green alga *Monostroma angicava*. J. Appl. Phycol. 1: 25-30.
- 嵯峨直恆・Gibor, A. 1986. 植物バイオテクノロジー. p.29-43. 山田康行・岡田吉美(編), 東京化学同人, 東京.
- 嵯峨直恆・松永是(編) 1991. ラボマニュアル マリンバイオテクノロジー. 裳華房, 東京.
- 三本菅善昭・鳥居茂樹・佐々木茂 1986. 浅海養殖. p.567-599. 資源協会(編), 大成出版社, 東京.
- Sawabe, T. & Ezura, Y. 1996. Regeneration from *Laminaria japonica* Areschoug (Laminariales, Phaeophyceae) protoplasts isolated with bacterial alginase. Plant Cell Report 15: 892-895.
- Tatewaki, M. 1966. Formation of a crustacean sporophyte with unilocular sporangia in *Scytosiphon lomentaria*. Phycologia 6: 62-66.
- Uchida, T. & Arima, S. 1992. Regeneration of protoplasts isolated from the sporophyte of *Cladosiphon okamuranus* Tokida (Chordariaceae, Phaeophyta). Jpn. J. Phycol. 40: 261-266.
- 山中良一 1990. ワカメの育種. 月刊海洋 22: 743-748.
- Yan, X-H. & Wang, S. 1993. Regeneration of whole plants from *Gracilaria asiatica* Chang et Xia protoplasts (Gracilariaceae, Rhodophyta). Hydrobiologia 260/261: 429-436.