

Développement D'un Stock De Semences (Seedstocks) De L'algue Rouge *Gelidium Corneum* (Gelidiaceae, Rhodophyta)

Houda Chiheb

Groupe Algologie–Mycologie Appliquées, Laboratoire d'Ecologie,
Biodiversité et Environnement, Département de Biologie, Faculté des
Sciences de Tétouan, Université Abdelmalek Essaâdi,

M'hannech II, Tétouan, Maroc.

Département de Biologie, Faculté de sciences de la mer, Université de Las
Palmas de Gran Canaria, Juan de Quesada, Espagne

Pilar García-Jiménez

Rafael R. Robaina

Département de Biologie, Faculté de sciences de la mer, Université de Las
Palmas de Gran Canaria, Juan de Quesada, Espagne

Mustapha Hassoun

Hassane Riadi

Groupe Algologie–Mycologie Appliquées, Laboratoire d'Ecologie,
Biodiversité et Environnement, Département de Biologie, Faculté des
Sciences de Tétouan, Université Abdelmalek Essaâdi,

M'hannech II, Tétouan, Maroc.

Doi: 10.19044/esj.2018.v14n6p112 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2018.v14n6p112](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2018.v14n6p112)

Abstract

Gelidium corneum is a species of red algae notable for its commercial important as an agarophyte in Morocco. Several regions from the Moroccan Atlantic show that this alga is an endangered species due to the excessive tearing. Hence, the repopulation of these areas is necessary. The *in vitro* culture of the species was carried out in three media: enriched seawater medium (PES medium (Provasoli Enriched Seawater, Provasoli 1968)), medium with seawater (SW) and medium with artificial seawater, with the addition of polyamines (putrescine (put), spermidine (spd), and spermine (spr)) as a growth regulator in the three media. The results obtained are very significant, especially in PES medium with a growth rate of 95%. Rhizoid formation and attachment of explants have been noted, especially in PES + Put medium.

Keywords: Agarophyte, Atlantic Coast, *Gelidium corneum*, *in vitro* culture, overexploitation

Résumé

La grande partie de la masse algale destinée à l'exportation est formée essentiellement par un mélange d'algues rouges de la famille des Gelidiaceae et dont la principale espèce reste l'agarophyte *Gelidium corneum*. L'exploitation du *Gelidium corneum* pour l'extraction de l'agar a considérablement augmenté dernièrement, ce qui a conduit à un épuisement remarquable des gisements de cette espèce. Entre 1999 et 2004 littoral marocain a perdu plus de 40% de ses réserves, dont la culture *in vitro* pourrait ouvrir de nouvelles possibilités pour repeupler les zones côtières endommagées. La culture *in vitro* de l'espèce a été effectuée dans trois milieux : milieu à base d'eau de mer enrichie (milieu PES (Provasoli Enriched Seawater, Provasoli 1968)), milieux avec l'eau de mer (SW) et milieu avec eau de mer artificielle, avec l'addition de polyamines (putrescine (put), spermidine (spd), et spermine (spr)) en tant que régulateur de croissance dans les trois milieux. Les résultats obtenus sont très significatifs surtout en milieu PES avec un taux de croissance de 95%, de telle façon qu'on a remarqué la formation des rhizoïdes et la fixation des explants notamment en milieu PES + Put, alors que un taux de fixation de 80% a été obtenu dans le milieu SW contenant de la putrescine, et pour les boîtes de Pétri contenant de l'eau de mer artificielle aucune fixation n'a été signalé.

Mots clés: *Gelidium corneum*, agarophyte, surexploitation, côte atlantique, culture *in vitro*

Introduction

L'intérêt porté aux algues marines est en progression continue. elles sont connues depuis longtemps et constituent un important réservoir de molécules bioactives dont les domaines d'application sont nombreux. Ces algues étaient depuis longtemps utilisées en alimentation, en agro-alimentaire, cosmétique, pharmaceutique. Ces dernières années, elles font sujet de plusieurs recherches pharmacologiques et médicales (Chiheb *et al.* 2009; Bouhlal *et al.* 2010, 2011, 2013; De los Reyes *et al.* 2013; Zbakh *et al.* 2012, 2014; El Wahidi *et al.* 2015; Metidji *et al.* 2015; Boujaber *et al.* 2017).

Les algues constituent une part très importante de la biodiversité et une des base principale des réseaux trophiques des eaux douces, saumâtres et marines. Diverses espèces sont utilisées pour l'alimentation humaine, l'agriculture ou l'industrie (Bleakley *et al.* 2017). Elles contribuent ainsi au développement des activités socio-économiques mondiales.

L'un des groupes les plus importants est celui des algues rouges dont on extrait du polygalactane dénommé agar, produit qui forme des gels utilisés dans plusieurs industries (Cole & Sheath, 1990; Sebaaly *et al.* 2012; Balouiri, 2016; Hockett & Baltrus, 2017).

L'exploitation des algues sur la côte atlantique marocaine a vu le jour durant la période de protectorat en 1949 à El Jadida, surtout la cueillette des algues rouges de la roche médiolittorale ou leur ramassage en épave (Riadi, 1998). L'intérêt devenait plus grand pour le *Gelidium corneum* (Hudson) J. V. Lamouroux dont les gisements sont importants entre El Jadida et Essaouira et son rendement en agar de 25% à 30% du poids sec (Sabour, 2012) est industriellement exploitable. L'agar est un polysaccharide pariétal des parois des algues rouges, un produit à forte valeur ajoutée, utilisé dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques, agro-alimentaires et pour divers usages, notamment dans des produits bio en vogue actuellement dans les pays développés (Villanueva *et al.* 2010).

L'exploitation du *Gelidium corneum* au Maroc a précédé toutes recherches scientifiques et malgré la réglementation, le volume de l'exploitation et d'exportation n'a cessé d'augmenter. Une des conséquences de l'arrachage manuel accru est la régénération difficile de l'espèce, ce qui a entraîné une réduction des étendues initiales sur le médiolittoral et infralittoral supérieur. Son biotope est alors affecté d'où son confinement à des profondeurs plus grandes et par conséquent une nécessité de plonger pour l'atteindre (Riadi, 1998; Givernaud *et al.* 2005).

Malgré les intentions gouvernementales pour protéger l'espèce, les impacts causés représentent une réelle menace sur les richesses spécifiques et éco-systémiques. En effet, cette algue est la seule de la flore marine marocaine, que la loi essaye de protéger de l'intense exploitation destructive. Pour sa protection, deux arrêtés ont déjà été publiés (l'arrêté du 20 octobre 1950, BO N° 1983, et l'arrêté n° 1118-93 publié le 1er décembre 1993, BO N° 423) (ONEM, 2006).

Pour participer à la protection de ces algues, des études scientifiques de pointe doivent être entreprises notamment des études de culture *in vitro* et *in vivo* pour le repeuplement des zones atlantiques dans un contexte de développement durable.

La culture *in vitro* pourrait ouvrir de nouvelles possibilités pour repeupler les aires côtières endommagées. Ces techniques concernent les macroalgues marines dotées d'une valeur économique ou sociale et dont les stocks naturels sont insuffisants pour répondre à une demande croissante en produits de la mer notamment les phycocolloïdes.

Au Maroc, les études sur le *Gelidium* ont concerné les rendements en agar et la valorisation des résidus d'extraction (Ouhssine *et al.* 2006, 2007; Hanif *et al.* 2014). Vu la place économique et sociale de l'espèce, la présente

recherche a été initiée dans le cadre du projet "Observatoire Marin Atlantique Iles Canaries-Maroc" (OMARAT).

Matériel et Méthodes

Collecte de l'espèce et préparation des explants axéniques

Le *Gelidium corneum* a été collectée sur la côte atlantique durant le mois de septembre 2011, à 15 km de la ville de Larache, sur la côte rocheuse de Lahyayda (35 ° 05'15.7 "N, 6 ° 12'51.4" W) (fig. 1). Les échantillons récoltés (fig. 2 A) ont été nettoyés en premier à l'eau courante afin d'éliminer toutes les impuretés possibles (sels, sables et coquilles), puis on a procédé à la suppression des épiphytes sous une loupe binoculaire à l'aide d'une brosse ou d'une spatule (Robaina *et al.* 1990a-b; García-Jiménez *et al.* 1999; Yong *et al.* 2011).

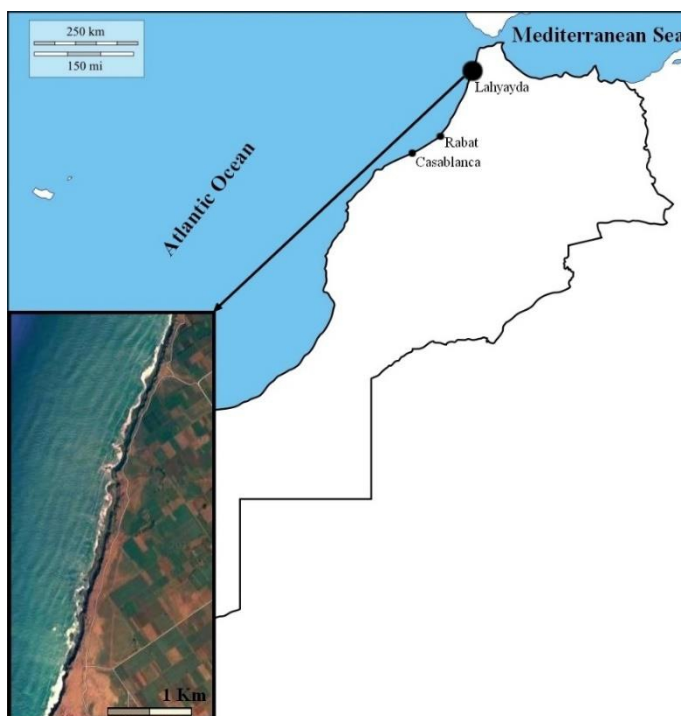


Figure 1: Carte géographique de la région du Lahyayda (Larache, Maroc)

Le matériel a été lavé par la suite, à l'eau de mer stérilisée jusqu'à l'obtention d'une matière propre. Les échantillons ont été mis dans des sacs en plastique et elles ont été ensuite transportées au département de biologie à l'université de Las Palmas des Iles Canaries à l'état frais dans un réfrigérateur.

Les 72 explants ont été prélevés, traités à l'eau de mer stérile, de la bétadine à 5% et une goutte de Tween 80. Ils ont été par la suite mis dans un bain à ultrason durant 7 min puis lavés à l'eau de mer stérilisée afin d'éliminer

toutes traces de la Bétadine. Après lavage, les explants ont été coupés, par une lame chirurgicale stérile, en segments de 1 cm de longueur (fig. 2 B).

Culture des explants

Six explants axéniques (fig. 2 B) ont été déposés dans 4 boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre contenant soit, le milieu PES (Provasoli *et al.* 1957), soit un milieu contenant de l'eau de mer artificielle, soit le milieu avec de l'eau de mer. Tous ces milieux sont additionnés de polyamines avec ou sans présence de mailles. L'expérience a été répétée 3 fois (24 x 3 fois x traitement).

L'ensemble des boites est incubé dans une chambre de culture pendant une semaine à une température de 19 ± 2 °C. La photopériode est de 18 heures de lumière et 6 heures d'obscurité, l'intensité de la lumière blanche est de $30 \text{ pE m}^{-2} \text{ S}^{-1}$ (Sylvania Grolux) (fig. 2C).

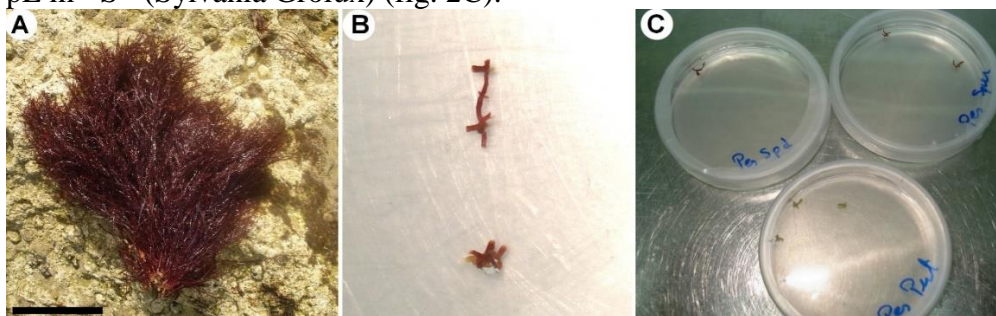


Figure 2 : A. Thalle de *Gelidium corneum* collecté sur la côte Atlantique marocaine, B. Les explants après la stérilisation, C. Les explants dans des boîtes de Pétri prêts à être cultivés. Échelles : A= 10 cm

Analyses statistiques des données

Les données sur le taux de croissance des explants ont été testées pour la normalité et l'homogénéité de la variance en utilisant StatGraphics Centurion XVI.

Une analyse ANOVA a été réalisée pour déterminer le coefficient de corrélation ($P < 0,05$) entre les milieux utilisés et les taux de croissance.

Résultats

Le taux de croissance spécifiques pour 24 explants répétés 3 fois avec ou sans présence de mailles à une température de 19 ± 2 °C variés de 0% à 95%. Une régénération des pousses a été observée à partir des extrémités des explants qui ont été cultivée dans les trois milieux : milieu à base d'eau de mer enrichie (milieu PES (Provasoli Enriched Seawater), milieu avec l'eau de mer (SW) et milieu avec eau de mer artificielle.

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 1, 2, 3. On remarque la formation des pousses et des pousses latérales (fig. 3 B) dans les différents milieux utilisés, notamment ceux qui contiennent les polyamines de

types spermine et spermidine. Cependant, sur les milieux ne contenant que la putrescine, on observe la formation de rhizoïdes et la fixation des explants sur les mailles (fig. 3 A-C).

Des proliférations latérales ont été observées au niveau des extrémités des explants cultivés sur les milieux PES + Spd et PES + Spm durant les 7 jours suivant la culture et un pourcentage de 50 % de régénération a été observé (fig. 3 B).

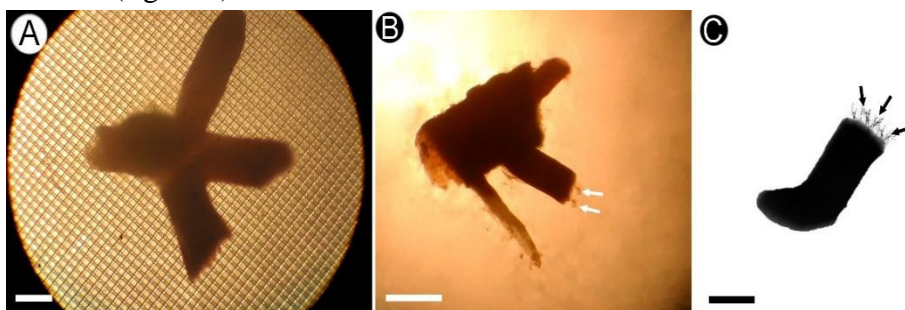


Figure 3 : A. Fixation de l'explant en présence de maille, B. Formation de pousses latérales (flèches), C. Formation des rhizoïdes (flèches). Échelles : A, B et C = 200 µm

Sur le milieu PES + Put, il est remarqué la formation des rhizoïdes et la fixation des explants sur les mailles (tab. 1), avec un pourcentage de régénération de 95 %.

La fixation des explants a été obtenue seulement dans les milieux (PES, SW) contenant la putrescine (tab. 1 et 2), alors qu'aucune fixation n'a été observée chez les explants cultivés sur les milieux ne contenant que de l'eau de mer artificielle (tab. 3).

Tableau 1: Résultats obtenus après l'utilisation de milieu PES additionné de polyamines (spermidine, putrescine, spermine) (100% = 72 explants)

Milieux	Mailles	Observations	Croissance et fixation (%)
PES+Spm ($10^{-3}M$)	+	Formation des pousses latérales	50
PES+Put ($10^{-3}M$)	+	Formation des rhizoïdes (Fixation des explants)	95
PES+Spd ($10^{-3}M$)	+	Formation des pousses + pousses latérales	50

Mailles: Types de substrats de culture in vitro préalablement stérilisé, pour favoriser l'ancrage des rhizoïdes, + : Présence de mailles ; - : Absence de mailles

Tableau 2: Résultats obtenus après l'utilisation de milieux à base d'eau de mer additionnée de polyamines de type putrescine (100% = 72 explants)

Milieu	Mailles	Observations	Croissance et fixation (%)
SW+Spm ($10^{-3}M$)	+	Formation des pousses latérales	50
SW+Spd ($10^{-3}M$)	+	Formation des pousses	53

SW+Put ($10^{-3}M$)	+	Formation des rhizoïdes (Fixation des explants)	80
SW+Spm ($10^{-3}M$)	-	Formation des pousses	50
SW+Spd ($10^{-3}M$)	-	Formation des pousses latérales	53
SW+Put ($10^{-3}M$)	-	Formation des rhizoïdes	80

Tableau 3: Résultats obtenus après l'utilisation de milieux contenant que de l'eau de mer artificielle additionnée de polyamines (100% = 72 explants)

Milieu	Mailles	Observations	Croissance et fixation (%)
H ₂ O+ NaHCO ₃ +CaCl ₂ +Spd ($10^{-3}M$)	+	Formation de pousses latérales	1
H ₂ O+ NaHCO ₃ +CaCl ₂ +Spm ($10^{-3}M$)	+	Formation de pousses latérales	1
H ₂ O+ NaHCO ₃ +CaCl ₂ +Put ($10^{-3}M$)	+	Formation de pousses latérales	0
H ₂ O+ NaHCO ₃ +CaCl ₂ +Spd ($10^{-3}M$)	-	Formation de pousses latérales	23
H ₂ O+ NaHCO ₃ +CaCl ₂ +Spm ($10^{-3}M$)	-	Formation de pousses latérales	28
H ₂ O+ NaHCO ₃ +CaCl ₂ +Put ($10^{-3}M$)	-	Formation de pousses latérales	32

Discussion

Nos essais de la culture *in vitro* du *Gelidium corneum* ont donné des résultats prometteurs. La composition chimique du milieu de culture et les régulateurs de croissance utilisés ont influencé la croissance des explants cultivés

Composition chimique du milieu de culture

Dans notre cas , le milieu de culture idéal pour la croissance et la régénération des explants de *G. corneum* est le PES avec lequel on a obtenu un taux de croissance de 95% , en plus il a permis la formation des rhizoïdes et la fixation des explants notamment en milieu PES + Put. Ce résultat est similaire à ce qui a été obtenu par Yong et al. (2013) sur la propagation des Rhodophycées. Les mêmes résultats ont été signalés sur le même milieu par Jong et al. (2015) sur les explants de *Gracilaria changii*. Mais D'autres études se sont intéressées aux conditions optimales pour la croissance de l'espèce commerciale *Kappaphycus alvarezii*, algue rouge de l'ordre des Gigartinales, et ont montré que le milieu PES donne d'excellents résultats en le combinant avec différents paramètres (Baweja *et al.* 2009; Yong *et al.* 2011, 2013)

Effet des régulateurs de croissance

Les résultats que nous avons obtenus avec les régulateurs de croissance montrent que les polyamines de type spermine et spermidine favorisent la

formation des pousses et pousses latérales alors que la putrescine favorise la rhizogénèse.

Les régulateurs de croissance, putrescine, spermidine et la spermine, ont été testés sur la culture *in vitro* axénique de *Grateloupia doryphora*, spermine a induit la formation d'une masse désordonnée de cellules à partir du tissu organisé de carpospores, la putrescine et la spermidine ont transformé les carpospores en masse cellulaire qui a produit des pousses. La combinaison de la putrescine, spermidine et la spermine a conduit à une plus grande taille de la masse cellulaire qui a conduit à son tour à une plus grande quantité de pousses (García Jiménez *et al.* 1998; Marián *et al.* 2000; Sacramento *et al.* 2004). Le même résultat a été obtenu par Muñoz *et al.* (2006) sur la culture de *Kappaphycus alvarezii*.

Le rôle des polyamines dans ce travail était de contribuer à l'adhésion des algues au substrat, étant donné de la nature polycationique de ces molécules qui favorisent l'interaction des groupes sulfatés et neutres des polysaccharides constitutifs du mucilage et les parois cellulaires des algues (García Jiménez *et al.* 1998). Les résultats de ce travail nous ont permis de discerner les traitements qui favorisent la rhizogénèse, et le développement des pousses latéraux en une période très courtes.

Conclusion

Les expériences menées dans cette étude, ont permis d'avoir une certitude sur les traitements qui favorisent la rhizogénèse, le développement de pousses et de pousses latérales chez le *Gelidium corneum*. Dans la présente étude, la plus forte prolifération a été observée dans les milieux qui contiennent de la putrescine dans la semaine suivant la culture et s'est avérée meilleure comparativement aux autres milieux où on a remarqué la prolifération des pousses.

Cette étude a permis de conclure que la composition chimique de milieu additionné de régulateurs de croissance de types putrescine, spermidine et spermine, et l'utilisation d'explants axéniques viables permettent l'obtention de plantules avec des rhizoïdes, des pousses et des pousses latérales.

References:

1. CHIHEB, I., H. RIADI, J. MARTINEZ-LOPEZ, J.F. DOMINGUEZ SEGLAR, J.A. GOMEZ VIDAL, H. BOUZIANE & M. KADIRI - 2009- Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr. J. Biotechnol.* 8(7): 1258-1262.

2. BOUHLAL, R., H RIADI & N. BOURGOUGNON -2010- Antiviral activities of Morocco seaweeds extracts. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 7968-7975.
3. BOUHLAL, R., C. HASLIN, J.C. CHERMANN, S. COLLIEC-JOUAULT, C. SINQUIN, G. SIMON, S. CERANTOLA, H. RIADI & N. BOURGOUGNON -2011- Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Mar. Drug.* 9(7): 1187-1209.
4. BOUHLAL, R., H. RIADI & N. BOURGOUGNON -2013- Antibacterials of the extracts of Rhodophyceae from the Atlantic and the Mediterranean coasts of Morocco. *J. Microbiol Biotechnol. Food Sci.* 2(6): 2431–2439.
5. DE LOS REYES, C., ZBAKH, H., V. MOTILVA & E. ZUBÍA -2013- Antioxidant and anti-inflammatory meroterpenes from the brown alga *Cystoseira usneoides*. *J. Nat. Product.* 76(4): 621–629.
6. ZBAKH, H., CHIHEB, H., BOUZIANE, H., V. MOTILVA & H. RIADI -2012- Antibacterial Activity of Benthic Marine Algae Extracts from the Mediterranean Coast of Morocco. *J. Microbiol., Biotechnol. Food Sci.* 2(1): 219-228.
7. ZBAKH, H., CHIHEB, I., V. MOTILVA & H. RIADI -2014- Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potentials of *Cladophora prolifera* (Roth) Kutzing extract from the Mediterranean coast of Morocco. *Am. J. Phytomed. Clin. Ther.* 2 (10): 1187-1199.
8. EL WAHIDI, M., EL AMRAOUI, B., M. EL AMRAOUI & T. BAMHAOU D -2015- Screening of antimicrobial activity of macroalgae extracts from the Moroccan Atlantic coast. *Ann Pharm.* 73(3):190-196. doi: 10.1016/j.
9. METIDJI H., DOB T., TOUMI M., KRIMAT S., A. KSOURI & A. NOUASRI -2015- *In vitro* screening of secondary metabolites and evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of *Gelidium sesquipedale* Thuret et Bornet red seaweed from Algeria. *J. Mater. Environ. Sci.* 6(11): 3184-3196.
10. BOUJABER, N, OUMASKOUR, K, O. ASSOBEI & S. ETAHIRI -2017-Antimicrobial activity of different fractions obtained from *Gelidium sesquipedale* and *Laminaria ochroleuca*. *J. Bio. Innov.* 6(3): 306-312.
11. BLEAKLEY, S. & M. HAYES -2017-. Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*, 6(5), 33.
12. COLE, K.M. & R.G. SHEATH -1990- *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, 517 pp.

13. SEBAALY, C., KARAKI, N., CHAHINE, N., EVIDENTE, A., YASSINE A., J. HABIB & H. KANAAN -2012- Polysaccharides of the red algae “*Pterocladia*” growing on the Lebanese coast: Isolation, structural features with antioxidant and anticoagulant activities. *J. App. Pharm. Sci.* 2(10): 1-10.
14. BALOUIRI, M., M. SADIKI & S. K. IBNSOUDA -2016- Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharmac. Anal.* 6(2): 71-79.
15. HOCKETT, K. L. & D. A. BALTRUS -2017- Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J. Visual. Exper: JoVE*, (119). doi:10.3791/55064.
16. RIADI, H. -1998- Biodiversité des algues et phytoplancton marin du Maroc. Rapport biodiversité au Maroc. Programme des nations unies pour l’environnement (PNUE). Ministère de l’environnement du Maroc.
17. SABOUR, B. -2012- *L’algue rouge agarophyte Gelidium sesquipedale ou ‘rbiâa’ de la côte des Doukkala*. Ed. Livre des Prestige de la ville d’El Jadida. 38 p.
18. VILLANUEVA, R.D., SOUSA, A.M.M., GONÇALVES, M.P., M. NILSSON & L. HILLIOU -2010- Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 22: 211–220.
19. GIVERNAUD, TH., SQALI, N., BARBAROUX, O., ORBI, A., SEMMAOUI, Y., REZZOUM, N., A. MOURADI & R. KAAS -2005- Mapping and biomass estimation for a harvested population of *Gelidium sesquipedale* (Turn.) Thuret (Rhodophyta, Gelidiales) along the Atlantic coast of Morocco. *Phycologia* 44(1): 66-71.
20. ONEM. -2006 - Étude Nationale sur la Biodiversité. Algues Marines. Observatoire National de l’Environnement du Maroc, 95.
21. OUHSSINE. K., M. OUHSSINE & M. EL YACHIOUI -2006- Caractérisation chimique et microbiologique des déchets de *Gelidium sesquipedale* avant et après fermentation. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 145: 31-40.
22. OUHSSINE. K., M. OUHSSINE & M. EL YACHIOUI -2006- L’application des déchets traités de l’algue *Gelidium sesquipedale* dans la culture du Maïs. *Afr. Sci.* 03(2): 259 – 270.
23. HANIF N., CHAIR M., M.C. IDRISSE & T. NAOKI -2014- L’exploitation des algues rouges *Gelidium* dans la région d’El-Jadida: Aspects socio-économiques et perspectives. *Afr. Sci.* 10(1): 103–126.
24. ROBAINA, R.R., P. GARCÍA-JIMÉNEZ & A. LUQUE -1990a- Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. *J. Appl. Phycol.* 2: 137–143.

25. ROBAINA, R.R., G. REINA & A. LUQUE -1990b- The effects of the physical characteristics of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue culture. *Hydrobiologia* 204/205: 137 – 142.
26. GARCÍA-JIMÉNEZ, P., MARIÁN, F.D., M. RODRIGO & R.R. ROBAINA -1999- Sporulation and sterilization method for axenic culture of *Gelidium canariensis*. *J. Biotech.* 70: 227-229.
27. YONG, W.T.L., TING, S.H., CHIN, W.L., K.F. RODRIGUES & A. ANTON -2011- *In vitro* Micropropagation of *Eucheuma Seaweeds*. In: International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS), 01-03 April 2011, Bali Island, Indonesia.
28. PROVASOLI, L., J.A. MCLAUGHLIN & M.R. DROOP -1957- The development of artificial media for marine algae. *Arch. Microbiol.* 25(4): 392–428.
29. YONG, Y.C. & J.J. ZHONG -2013- Regulation of aromatics biodegradation by rhl quorum sensing system through induction of catechol meta-cleavage pathway. *Bio. Tech.* 136: 761-765.
30. JONG, L.W., V.Y. THIEN, Y.S. YONG, K.F. RODRIGUES & W.T.L. YONG -2015- Micropropagation and protein profile analysis by SDS-PAGE of *Gracilaria changii* (Rhodophyta, Solieriaceae). *Aqu. Rep.* 1: 10-14.
31. BAWEJA, P. & D. SAHOO -2009- Regeneration Studies in *Grateloupia filicina* (J.V. Lamouroux) C. Agardh – An Important Carrageenophyte and Edible Seaweed. *Algae* 24(3): 163-168.
32. GARCIA JIMENEZ, P., M. RODRIGO & R. ROBAINA -1998- Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia* cultured *in vitro*. *J. App. Phyc.* 10: 95–100.
33. MARIÁN, F.D., P. GARCÍA-JIMÉNEZ & R.R. ROBAINA -2000- Polyamines in marine macroalgae, levels of putrescine, Spermidine and spermine in thalli and changes in their concentration during glycerol-induced cell growth *in vitro*. *Physiol. Plant.* 110: 530 -534.
34. SACRAMENTO, A.T., P. GARCÍA-JIMÉNEZ & R. ROBAINA - 2004- Influence of polyamines on the sporulation of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 40: 887–894.
35. MUÑOZ, J., A.C. CAHUE-LÓPEZ, R. PATIÑO & D. ROBLEDO - 2006- Use of plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *J. App. Phycol.* 18(2): 209-218.
36. PREECE, J.E. -1995- Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators. *Pl. Tissue Cult. Biotech.* 1: 26-37.
37. CARL, M.R. & R.W. RICHARD -2002- Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro. Cell. Dev. Bio - Plant* 38: 116-124.

38. MAALEJ, M., A. R. CHAARI & N. DRIRA -2006- Contribution to the improvement of olive tree somatic embryogenesis by mineral and organic analysis of zygotic embryos. *Euphytica* 151: 31-37.
39. KARIMI, G., M. GHORBANLI, H. HEIDARI, R.A. KHAVARINEJAD & M.H. ASSAREH -2005- The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. *Biol. Plant.*, 49(2): 301-304.
40. GOLDSTEIN, M.E. -1973- Regeneration and vegetative propagation of the agarophyte *Gracilaria debilis* (Forsskal) Borgesen (Rhodophyceae). *Bot. Mar.* 16: 226-228.
41. BULA-MEYER, G. -1989 - Experimental culture in the sea of the red macroalgae *Grateloupia filicina*. In: de Oliveira E. C. & N. Kautsky (Eds.), pp. 101-104. *Cultivation of Seaweeds in Latin American*. Sao Sebastiao, Brazil.
42. HURTADO-PONCE, A.Q. -1990- Vertical rope cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) using vegetative fragments. *Bot. Mar.* 133: 477-481.
43. GARCÍA-JIMÉNEZ, P., M. RODRIGO & R. ROBAINA -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.
44. BAWEJA, P. & D. SAHOO -2009- Regeneration Studies in *Grateloupia filicina* (J.V. Lamouroux) C. Agardh – An Important Carrageenophyte and Edible Seaweed. *Algae* 24(3): 163-168.