

CONTRIBUCIONES TECNICAS. I. CULTIVO DE ECTOCARPALES (PHAEOPHYCEAE)

POR SUSANA M. PRICE¹

SUMMARY

The basic principles in the culturing of marine algae are briefly considered. Details of zoospore isolation in Ectocarpales, using the *hanging-drop* and *pipette* techniques, are presented, with an assessment of the relative efficacy of these methods. References are given to important modern works in the subject.

INTRODUCCION

El Orden Ectocarpales es uno de los grupos de algas pardas que más se ha cultivado en laboratorio, posiblemente debido a su pequeño tamaño, su rápido crecimiento y gran adaptabilidad. Existen métodos básicos para iniciar y mantener un cultivo unialgal, y numerosas variantes aplicables a géneros o especies particulares. Generalmente, debido en gran parte a las limitaciones impuestas por la editorial, los trabajos científicos presentan la descripción de métodos de trabajo en forma sucinta, frecuentemente tan resumida que resulta imposible interpretar correctamente los pasos seguidos en la práctica.

La presente nota tiene por objetos dar, en primer lugar, una síntesis dedicada a principiantes, de los fundamentos básicos para iniciar y mantener un cultivo unialgal; y en segundo lugar, describir con detalle un método sencillo y práctico, ampliamente utilizado, para aislar y mantener en cultivo unialgal pequeñas ectocarpales.

Las técnicas que se describen están basadas en la experiencia adquirida trabajando en este grupo de algas, y especialmente en lo aprendido en la Facultad de Ciencias de París, en el Hartley Botanical Laboratory, Liverpool, y en The Marine Laboratory, Plymouth.

La autora expresa su profundo agradecimiento a los Doctores Susan Loiseaux, Bernadette Caram, George Russell y Mary Parke, F. R. S. por el tiempo que le dedicaron y la demostración de las técnicas de cultivo.

¹ Department of Botany, Imperial College of Science and Technology, London S.W. 7, England.

El cultivo de *Pilayella littoralis*, que ilustra el presente trabajo, fue realizado en Analytical Cytology Section, Department of Botany, Imperial College of Science and Technology, University of London. Se agradecen las facilidades provistas, y la ayuda de otros miembros de la sección, particularmente, de Mr. A. D. Greenwood y Miss E. Hamlyn.

LO PRIMERO QUE SE DEBE SABER

1. *¿Qué especie se va a cultivar? ¿Dónde crece? ¿En qué estación del año?*

La especie a cultivar depende del tipo de investigación a realizar. En un plan de trabajo que implica el estudio de una especie determinada no hay problemas de selección. Pero, para estudios de otra índole donde una especie en particular no es indispensable, se recomienda comenzar cultivando material que es ampliamente conocido y con el cual otros investigadores han obtenido resultados positivos en su cultivo.

Es necesario conocer la localidad o localidades donde esta especie crece, y en que época del año crece abundantemente y *se reproduce*.

2. *¿Dónde se realizarán los cultivos? ¿Cómo se transportará el material desde el lugar de origen al laboratorio?*

Idealmente, el laboratorio donde se realizarán los cultivos debe estar situado junto o muy cerca del mar, de manera de tener acceso rápido al material a cultivar, estudiar "in situ" su comportamiento en la naturaleza, y tener una fuente continua de agua de mar, utilizada como base en la mayoría de los medios de cultivo. Pero esta situación ideal no siempre es posible, y el hecho de que el laboratorio se encuentre situado a cientos de kilómetros de la costa no es un impedimento para llevar a cabo cultivos con éxito. En este caso es indispensable, antes de comenzar los cultivos, planear de qué forma se resolverán los problemas que la distancia ocasiona.

El aislamiento y posterior cultivo de material recién coleccionado evita una serie de inconvenientes: descomposición por acción bacteriana, pérdida de células reproductoras móviles, excesivo desarrollo de diatomeas y cianofíceas, etc. Cuando el material debe ser transportado durante cierto tiempo es recomendable:

a) Enjuagar varias veces las plantas en agua de mar filtrada (A.M.F.) a fin de eliminar la mayor cantidad posible de fauna y flora intersticial que comúnmente viven asociadas con el alga.

b) Colocar pequeñas cantidades de material en frascos de boca ancha con un gran volumen de A.M.F. (Proporción aproximada 1: 9). No es recomendable el uso de bolsas de polietileno, tan divulgado, conteniendo

muy poca cantidad de agua y cerradas herméticamente pues generalmente estas condiciones favorecen la liberación de células reproductoras móviles antes de que el material llegue al laboratorio.

c) Dejar los frascos destapados, en un lugar fresco, aerado y con escasa luz hasta el momento de partir o despachar el material por correo.

d) Cerrar los frascos herméticamente y embalarlos en pequeñas cámaras refrigeradoras. (Cuando el material se envía por correo es común el uso de termos que mantendrán la temperatura inicial del medio por varias horas. Cuando el material es transportado personalmente lo más sencillo es utilizar una heladera portátil del tipo comúnmente utilizado para camping).

e) Tan pronto como el material llega al laboratorio, renovar el A.M.F. y colocarlo en lugar fresco, poco iluminado.

Generalmente no deben pasar más de 48 hs. desde que el material es coleccionado hasta que se inicia su cultivo. La mayoría de las algas bentónicas, entre ellas las pequeñas pardas, crecen acompañadas por otras muchas especies de algas, especialmente diatomeas y cianofíceas, que desarrollan rápidamente en el ambiente reducido que un frasco provee, enfocando la especie a cultivar. A esto debe sumarse la acción bacteriana que descompone rápidamente el material.

3. ¿Qué tipo de recipiente se utilizará?

El recipiente de cultivo depende del tamaño máximo que puede alcanzar el alga que se va a cultivar. Lo más utilizado son cápsulas de petri, de 9 cm de diámetro, para especies de pequeña talla. Cuando las plantas pueden alcanzar varios centímetros de altura es común el uso de cristalizadores de aproximadamente 9 cm de diámetro y 5 cm de altura. Todos los recipientes de cultivo deben ser de vidrio de buena calidad (tipo PYREX o similar), esterilizables. En ciertos casos es práctico el uso de cápsulas de petri plásticas, que se adquieren en paquetes de seis o doce, con esterilidad garantida.

4. ¿Qué medios de cultivo se ensayarán?

Los medios de cultivo varían desde simplemente agua de mar filtrada a complicadas soluciones artificiales en las cuales la proporción exacta de cada componente es conocida.

Los medios más utilizados son: agua de mar filtrada (Harvey, 1941), solución de Erdschreiber (Hämmerling, 1931; Foyn, 1934), medio de Von Stosch (Ott, 1966), medio de Provasoli (Provasoli, 1968); modificaciones del medio Provasoli (West, 1966; Wynne, 1969), etc.

Cada especie crece y desarrolla mejor en un medio determinado. La única manera de conocer sus preferencias es probar los medios conocidos y variar la proporción de sus componentes hasta obtener resultados satisfactorios. Es conveniente preparar siempre un *cultivo testigo* usando

como medio A.M.F. proveniente del mismo lugar donde se coleccionó el material, para comparar las variaciones que se producen con el uso de otros medios de cultivo.

Un medio muy utilizado, y que generalmente da resultados satisfactorios, es la *Solución de Erdschreiber* (preparada como en The Laboratory, Plymouth, pero con menor proporción de extracto de suelo):

1.500 ml.	A.M.F. y esterilizada en autoclave.	} Mezclados cuando fríos
50 ml.	extracto de suelo esterilizado en autoclave.	
1,5 ml. ...	solución de sales esterilizada en autoclave (200 ml agua destilada, 40 g NO ₃ Na, 4 g PO ₄ HNa ₂).	

5. ¿En qué forma se proveerán la temperatura y luz adecuadas?

Luz y temperatura son dos factores determinantes del éxito de un cultivo. En un laboratorio con pocos recursos el material puede ser cultivado a temperatura ambiente y colocado junto a una ventana donde el sol no incida directamente. Cuando es posible, una buena cámara de cultivos facilita la labor y posibilita resultados más concretos y favorables.

Es importante dar al alga condiciones ambientales semejantes a las que encuentra en la naturaleza. La alternancia de luz/oscuridad, así como la intensidad de luz y temperatura dependen de la especie a cultivar. Como referencia ver Edwards (1969: 64), Boalch (1961 a: 281), Wynne (1969: 4), Baker and Evans (1971: 73), Clayton (1972: 101), Price (1972, en prensa).

En un cultivo de *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm., por ejemplo, que crece en el estuario del río Tamesis, Inglaterra, se ha utilizado una alternancia de 16 hr. luz/8 hr. oscuridad, con una intensidad de luz de 250 ft-c y una temperatura de $10 \pm 1^\circ \text{C}$. Para el cultivo de *Bachelotia antillarum* (Grun.) Gerloff, proveniente de Miramar (Bs. As.), Argentina, se ha utilizado una alternancia de 12 hr. luz/12 hr. oscuridad, con una intensidad de luz de 500 ft-c y una temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Todos estos factores no están reglamentados, y cada investigador deberá encontrar los valores más adecuados para la especie en consideración.

Las cámaras de cultivo poseen una fuente de calor, una de frío, un termostato para regular su funcionamiento, y generalmente están provistas de tubos fluorescentes que emiten "luz de día" (tipo SILVANIA LIFELINE, GENERAL ELECTRIC "cool-white", etc.). Muy buenos resultados se han obtenido con una CONTROLLED ENVIRONMENTALS Ltd. (CANADA) TYPE E 7 GROWTH CHAMBER. Edwards (1969) ha utilizado con excelentes resultados una cámara de cultivos, descrita por Edwards and Van Baalen (1970), que permite el cultivo de algas bentónicas bajo varias combinaciones de intensidad de luz y temperatura, con una alternancia de luz/oscuridad dada.

6. *¿Qué bibliografía relacionada con la especie considerada ha sido publicada?*

Como en todas las ramas de la investigación, antes de iniciar un cultivo es necesario familiarizarse con la bibliografía referente al mismo tema. Este trabajo, que puede parecer tedioso, evita una gran pérdida de tiempo y aporta ideas y métodos de provecho.

COMO INICIAR UN CULTIVO UNIALGAL

Cultivo unialgal es aquél en el cual se encuentra presente una sola especie de algas. Esto excluye todas las otras algas (como diatomeas y cianofíceas que son los contaminantes más comunes), e incluye bacterias y protozoarios.

La presencia de bacterias en pequeña cantidad favorece el desarrollo del alga, pero un exceso bacteriano no solo impide el crecimiento del alga, sino que además enturbia el medio de tal forma que es imposible realizar observaciones de valor. Por lo tanto, es necesario evitar la contaminación bacteriana en el mayor grado posible, aún cuando no se persiga el establecimiento de un *cultivo puro*. La única forma de controlar el desarrollo bacteriano es trabajar con gran limpieza. Todo el material utilizado para manipular o contener los cultivos debe ser esterilizado si es posible, o lavado con detergente y agua caliente, y enjuagado con agua destilada y alcohol.

El primer tratamiento que se aplica al material proveniente de la naturaleza es una sucesión de enjuagues, agitando suavemente cada planta en un cristizador con A.M.F. y esterilizada (A.M.E.). Este procedimiento se repite al menos tres veces, renovando el A.M.E. cada vez. Luego se coloca la planta en una cápsula de petri con A.M.E., bajo la lupa binocular, y se cepilla suavemente, desde la base hacia el ápice, desenredando los filamentos como con un peine y arrastrando la mayor cantidad posible de epífitos y fauna y flora intersticial. El cepillado se realiza con un pincel de acuarelas, de pelo de buena calidad, y su tamaño depende del tamaño del alga y del criterio del investigador. Este procedimiento se repite al menos tres veces, renovando el A.M.E. cada vez, y enjuagando el pincel antes de iniciar un nuevo cepillado.

Por último, se observa el material detenidamente bajo la lupa binocular, con el mayor aumento posible. ¿Qué estructuras cultivables posee esta planta? ¿Qué porciones de las mismas están más limpias de epífitos? Bajo todo punto de vista, en las Ectocarpales, las estructuras más fácilmente aislables son las células reproductoras móviles. Pero en ciertas ocasiones esto no es posible, ya sea por ausencia de cuerpos reproductores o por no vialidad de los mismos aunque estén presentes.

AISLAMIENTO DE PORCIONES DE FILAMENTOS

Este procedimiento fue utilizado con el género *Bachelotia* (Price, 1972) con excelentes resultados. Cortas porciones de filamentos jóvenes, limpios de epífitos, de aproximadamente 1 mm de longitud y conteniendo células meristemáticas, se separan de la planta madre bajo la lupa binocular. Cada porción de filamento se coloca en una cápsula de petri esterilizada conteniendo medio de cultivo (m. c.) y se mantiene bajo condiciones de luz y temperatura adecuadas. En el caso de *Bachelotia*, sobre 36 aislamientos se obtuvieron 6 plantas viables, las cuales a las cuatro semanas estaban fértiles, produciendo células reproductoras móviles que fueron posteriormente aisladas.

AISLAMIENTO DE CELULAS REPRODUCTORAS MOVILES (ZOOSPOROS)

a) ESPORULACIÓN

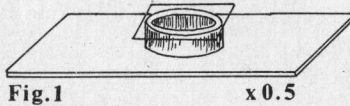
En ciertos casos el material fértil produce zoosporos justamente en el momento en que se desea realizar los aislamientos. Pero, frecuentemente, pese a poseer numerosos zoosporangios, la liberación de zoosporos no se produce. Es común observar, en material sometido a cultivo, la germinación de esporos directamente desde dentro del esporangio, omitiendo el estadio móvil (Cabrera, 1970).

Todo cambio brusco de los factores ambientales en que se encuentra la planta favorece la liberación de células reproductoras móviles (Pringsheim, 1946: 23). Un procedimiento ampliamente utilizado, y con el cual se obtuvieron resultados satisfactorios con los géneros *Bachelotia* y *Pilayella*, consiste en colocar porciones de plantas fértiles, previamente enjuagadas y cepilladas varias veces, en una cápsula de petri sobre papel de filtro apenas embebido en A.M.E. La cápsula de petri cerrada se envuelve en papel aluminio para evitar el paso de la luz, y se coloca a 4° C durante toda la noche. A la mañana siguiente las porciones fértiles se sumergen en un cristizador con A.M.E. fresca y se colocan en cámara de cultivo bajo condiciones de luz y temperatura adecuadas. La liberación de esporos se produce inmediatamente, o a más tardar en un período de 30 min. a 3 hr.

b) GOTA PENDIENTE

La liberación de zoosporos se estudia bajo la lupa binocular y la observación cuidadosa del material facilita la elección de un esporangio que no ha liberado zoosporos todavía, pero que está por hacerlo. Dicho esporangio se separa de la planta madre con una mínima porción de filamento vegetativo y se coloca en gota pendiente.

La preparación de la gota pendiente puede hacerse de varias maneras. Una forma práctica y sencilla, utilizada por S. Loiseaux en Francia, consiste en un simple porta-objetos, un anillo de vidrio o plástico de aproximadamente 18 mm de diámetro externo, 14 mm de diámetro interno y 5 mm de altura; y un simple cubre-objetos (Fig. 1). Los tres elementos se limpian cuidadosamente con alcohol y se secan. Se untan los bordes superior e inferior del anillo con vaselina líquida y se adhiere al porta-objetos. En el centro mismo del cubre-objetos se coloca una gota pequeña y circular de m. c. con una pipeta Pasteur estéril, y en el anillo se vierten 2-3 gotas del mismo m. c. para mantener la atmósfera saturada de humedad en la pequeña camarita.

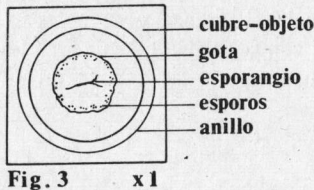


El esporangio aislado se coloca en la gota, y sosteniendo el cubre-objetos con índice y pulgar, se invierte la posición del mismo con un movimiento rápido para evitar que la gota se escurra de su sitio. El cubre-objetos con la gota pendiente se coloca sobre el anillo y con el mango de una aguja de disección se presiona levemente la superficie en contacto con el anillo para distribuir uniformemente la vaselina y sellar la camarita (Fig. 2).



La ventaja de este método de aislamiento consiste en la simplicidad de los elementos requeridos, y en el hecho de que la preparación con la gota pendiente puede observarse bajo el microscopio hasta con un objetivo 40X sin peligro de romper el cubre-objetos.

Cuando los zoosporos son liberados nadan durante un período variable y luego se fijan a la superficie del cubre-objetos, principalmente en el borde de la gota pendiente (Fig. 3).



Cuando una cantidad apreciable de zoosporos se ha fijado al cubre-objetos, el mismo se separa del anillo, cuidando de mantener la gota intacta, y con extremo cuidado se limpian los restos de vaselina con papel absorbente. La limpieza debe ser profunda y ningún resto de vaselina debe

quedar en el cubre-objetos. Luego, sosteniendo nuevamente el cubre-objetos con índice y pulgar, se acerca la gota a la superficie perfectamente limpia de un porta-objetos hasta que la base de la gota toca la misma, pero cuidando que el cubre-objetos no la toque. De esta forma se eliminan los restos de la planta madre y la mayor parte de bacterias concentradas alrededor de la misma, puesto que debido a su peso este material se encuentra en la base de la gota. Luego, con una pipeta Pasteur estéril se enjuaga varias veces el cubre-objetos con m. c. (al menos diez veces) y se coloca en una cápsula de petri esterilizada, con medio de cultivo, con la superficie que contiene los esporos hacia arriba. La cápsula de petri *cerrada* se coloca en cámara de cultivo bajo condiciones adecuadas.

Las figuras 4-10 ilustran el desarrollo de zoosporos liberados de un esporangio plurilocular de *Pilayella littoralis* (Fig. 4) y aislados mediante este método. Las fotografías 4-7 fueron tomadas al material en gota pendiente, con un objetivo 40X.

Comúnmente el procedimiento para observar el desarrollo de las plántulas en la cápsula de petri consiste en realizar un gran número de aislamientos simultáneos, y hacer una preparación con cada uno de los cubre-objetos a intervalos regulares y observarla bajo el microscopio. Las preparaciones que resultan ilustrativas se fijan (solución de formalina 2,5 %) y se montan en gelatina-glicerínada. Este procedimiento es simple, pero involucra un gran número de preparaciones desperdiciadas cuando ninguna variación apreciable puede observarse en el material.

Una forma práctica y simple de seguir el desarrollo de las plántulas es mediante el uso de un *objetivo de inmersión en agua*. La mayor parte de las fábricas de microscopios los producen, aunque su uso no es muy divulgado en la actualidad. El utilizado por la autora es un objetivo de inmersión en agua LOMO 40X, con el cual fueron tomadas las fotografías 8-10.

Cuando se utiliza un objetivo de este tipo el mismo debe limpiarse con alcohol antes y después de cada observación. La cápsula de petri destapada se coloca sobre la platina del microscopio, y previo enfoque con el objetivo 10X, se sumerge el objetivo de inmersión en agua en el medio de cultivo, enfocando el objeto que interesa.

Al mismo tiempo es conveniente hacer preparaciones permanentes de estadíos críticos en el desarrollo de la planta.

c) PIPETEADO

Después de provocar la esporulación según *a*), y si se observa que la producción de zoosporos es masiva, es posible aislar los mismos con una pipeta Pasteur estéril, bajo lupa binocular. El contenido de la pipeta se vuelca en una cápsula de petri esterilizada, conteniendo A.M.E. y con el fondo cubierto de cubre-objetos. Los zoosporos nadan durante un período variable, y eventualmente algunos de ellos se fijarán a los cubre-objetos. A las 6 hr. de realizado el aislamiento, cada cubre-objeto

es enjuagado con m. c., dejando correr suavemente el contenido de una pipeta Pasteur sobre ambas superficies, y colocado en una cápsula de petri esterilizada, con m. c. Las observaciones se realizan a continuación como en el caso anterior.

Una variación consiste en colocar en el fondo de una cápsula de petri algodón estéril embebido en A.M.E. y sobre él una serie de cubre-objetos. El producto del pipeteado se reparte en pequeñas gotas sobre los cubre-objetos, y la cápsula de petri se tapa para mantener una atmósfera de humedad. A las seis horas del aislamiento se procede como en el caso precedente.

La desventaja del método del pipeteado reside en el hecho de que pese a los enjuagues y cepillado, las plantas siempre arrastran epífitos y flora intersticial, de manera que nunca es posible saber si los zoosporos provienen únicamente de los esporangios de la especie considerada, o también de alguna otra alga contaminante (Ver Clayton, 1972: 107).

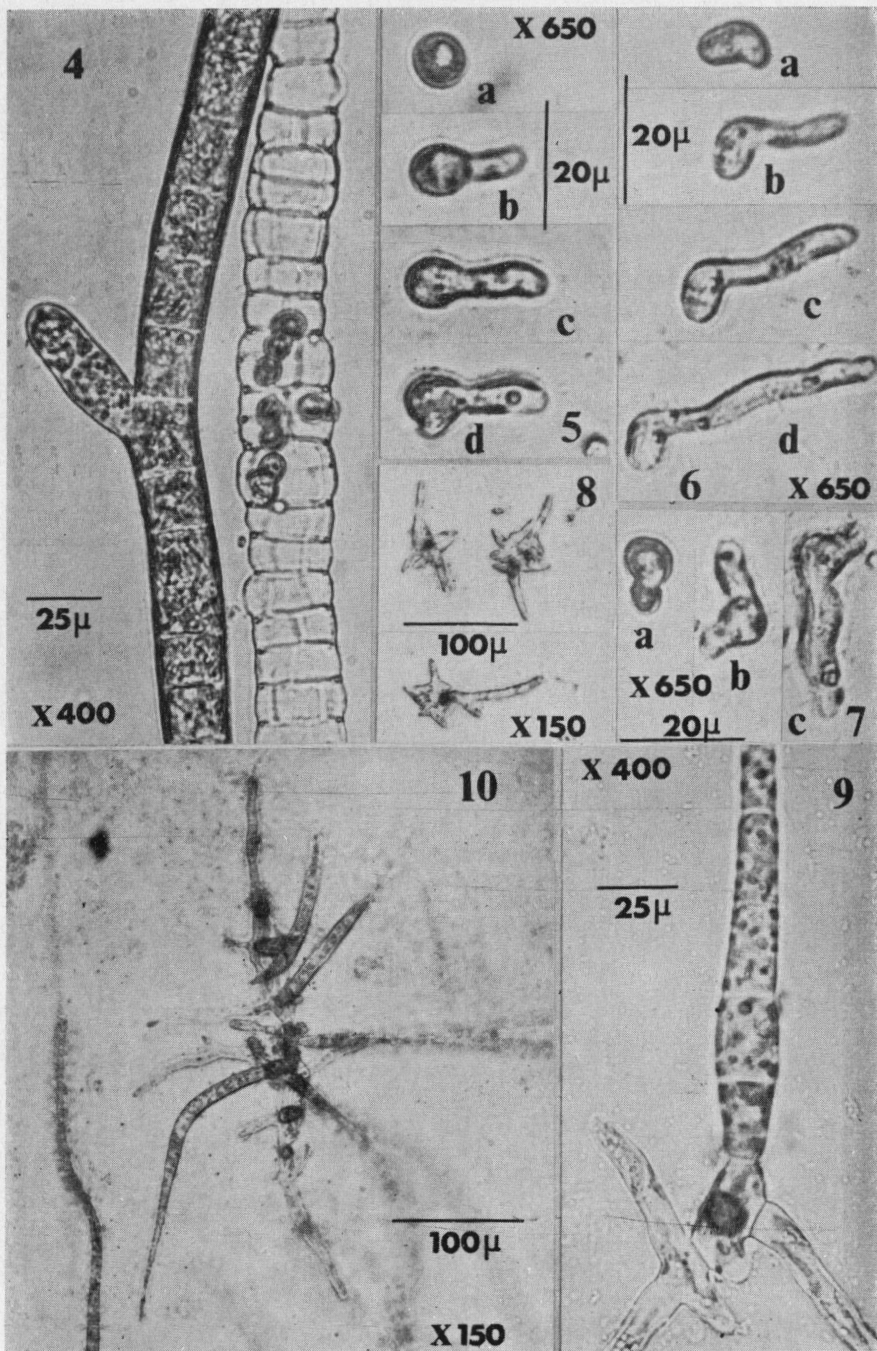
CONTAMINACIONES

Como se ha dicho anteriormente, los principales contaminantes de un cultivo unialgal son las diatomeas y cianofíceas, aparte de un excesivo desarrollo bacteriano. Por regla general, cuando el desarrollo bacteriano es tal que entorpece el normal desenvolvimiento del alga, el cultivo se desecha.

Cuando la presencia de diatomeas es descubierta, si las mismas se encuentran en un gran número es preferible desechar el cultivo desde un principio que malgastar el tiempo tratando de combatir las. Si sólo unas pocas células de diatomeas están presentes, es posible evitar su desarrollo mediante el uso de una solución diluida de dióxido de germanio (Lewin, 1966).

La presencia de cianofíceas en un cultivo es difícilmente eliminable. Se recomienda, nuevamente, desechar un cultivo donde las mismas desarrollan, aunque existen medios para combatir las (Fitzgerald, Gerloff and Skoog, 1952).

Figs. 4-10. — *P. littoralis*. 4, esporangio plurilocular en material coleccionado, y liberación de zoosporos durante el aislamiento. Observación del material en gota pendiente. Film 36/4; 5-7, desarrollo de zoosporos en la superficie del cubre-objeto. Observación del material en gota pendiente. (a) 1 hr. 15 min., (b) 22 hrs., (c) 30 hrs., (d) 46 hrs., después de ser liberados del esporangio. Film 40/9, 11, 13, 15; 8-9, plántulas de siete días creciendo sobre la superficie del cubre-objeto. Observación con objetivo de inmersión en agua. Fig. 8, Film 38/6. Fig. 9, Film 38/1; 10, plántula de catorce días creciendo sobre la superficie del cubre-objeto. Observación con objetivo de inmersión en agua. Film 41/7.



BIBLIOGRAFIA

- BAKER, J. R. J. and EVANS, L. V. 1971. *A myrionemoid variant of Ectocarpus fasciculatus* Harv. Br. phycol. J. 6 (1): 73-80.
- BOALCH, G. T. 1961 a. *Studies on Ectocarpus in culture. I. Introduction and Methods of Obtaining Uni-algal and Bacteria-free cultures.* J. mar. biol. Ass. U.K. 41: 279-286.
- 1961 b. *Studies on Ectocarpus in culture. II. Growth and Nutrition of a Bacteria-free Culture.* J. mar. biol. Ass. U.K. 41: 287-304.
- CABRERA, S. M. 1970. *Sobre el Ciclo Biológico de Giffordia mitchellae* (Harvey) Hamel (Phaeophyta, Ectocarpaceae). Bol. Soc. Arg. Bot. 13 (1): 31-41.
- CLAYTON, M. N. 1972. *The occurrence of variant forms in culture of species of Ectocarpus and Giffordia.* Br. phycol. J. 7 (1): 101-108.
- EDWARDS, P. 1969. *Field and Cultural Studies on the Seasonal Periodicity of Growth and Reproduction of Selected Texas Benthic Marine Algae.* Contr. Marine Science, 14: 59-114.
- EDWARDS, P. and VAN BAALen, C. 1970. *An Apparatus for the Culture of Benthic Marine Algae under varying Regimes of Temperature and Light-Intensity.* Botanica mar. 13: 42-43.
- FITZGERALD, G. P., GERLOFF, G. C. and SKOOG, F. 1952. *Studies on Chemicals with Selective Toxicity to Blue-Green Algae.* Sewages and Industrial Wastes, 24: 888-896.
- FOYN, B. 1934. *Lebenszyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophyceae Cladophora Subriana* Kützing. Arch. Protistenk. 83: 1-56.
- HÄMMERLING, J. 1931. *Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia mediterranea.* Biol. Zentralbl. 51: 633-647.
- HARVEY, H. W. 1941. *On changes taking place in sea water during storage.* J. mar. biol. Ass. U.K., 25: 225-233.
- LEWIN, J. 1966. *Silicon Metabolism in Diatoms. V. Germanium Dioxide, a Specific Inhibitor of Diatom Growth.* Phycologia, 6 (1).
- OTT, F. B. 1966. *A selected listing of xenic algal cultures.* Contr. Systematic Ecology Program, Mar. biol. Lab., Woods Hole, Mass. 72: 1-45 (Mimeo.).
- PRICE, S. M. 1972. *Studies on Bachelotia (Pilayella?) antillarum. I. The occurrence of plurilocular sporangia in culture.* Brit. phycol. J. (en prensa).
- PRINGSHEIM, E. G. 1946. *Pure Cultures of Algae.* Cambridge University Press.
- PROVASOLI, L. 1968. *Media and prospects for the cultivation of marine algae.* En WATANABE, A. and HATTON, A. (eds.), *Cultures and Collections of Algae.* Proc. U.S.-Japan Conference Hakone, September 1966. Jap. Soc. Plant Physiol., pp. 63-75.
- WEST, J. A. 1966. *The life histories of several marine Bangiophycidae and Florideophycidae (Rhodophycophyta, Rhodophyceae) in laboratory culture.* Univ. Washington, Ph. D. Thesis.
- WYNNE, M. J. 1969. *Life History and Systematic Studies of some Pacific North American Phaeophyceae (Brown Algae).* Univ. Calif. Publ. Bot. 50: 1-88.