

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CANARIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

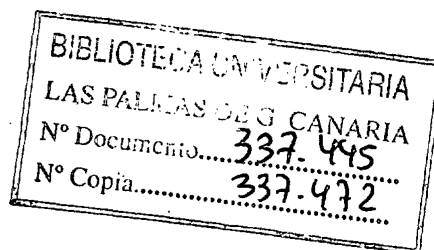
**BIOTECNOLOGÍA DEL CULTIVO "IN VITRO"
DE ALGAS ROJAS (RHODOPHYTA) DE INTERES INDUSTRIAL**

RAFAEL ROBAINA ROMERO

Las Palmas de Gran Canaria, 1988

BIOTECNOLOGIA DEL CULTIVO "IN VITRO" DE ALGAS ROJAS
(RHODOPHYTA) DE INTERES INDUSTRIAL.

Memoria que presenta el Lcdo.
en Biología Rafael Robaina
Romero para aspirar al grado de
Doctor en Ciencias del Mar.
Las Palmas G.C. Noviembre 1988.



El trabajo que presenta el Lcdo en Biología D. Rafael Robaina Romero como memoria de Tesis Doctoral ha sido reliaizado bajo nuestra dirección, ambos lo hemos revisado y se presenta con nuestro Vº Bº.

Angel Luque Escalona.

Guillermo Garcia Reina.



AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer la colaboración prestada en la realización de este trabajo a:

* M.E.C. por haberme concedido la Beca de Formación de Personal Investigados con la que he podido financiar mis estudios de Tercer Ciclo.

* A la Universidad Politécnica por ofrecerme la infraestructura necesaria para la realización del trabajo experimental y la posibilidad de asistir a cursos y congresos que tanto han contribuido en mi formación.

* Al Dr. Gonzalo Pérez Melián por haberme presentado a las personas que posteriormente han dirigido este trabajo.

* A la Dra. Nieves González por haberme "presentado" a las que posteriormente serían mi material vegetal de trabajo.

* Al personal docente e investigador del Dpto. de Biología de la Universidad Politécnica de Canarias por su constante estímulo y apoyo. A los Dres. Angel Luque Escalona y Guillermo Garcia Reina por su PACIENCIA en la corrección del trabajo y por lo que me han enseñado. A Jose Luis Muñoz por sus consejos informáticos.

* Al personal docente-investigador y de mantenimiento del Colegio Universitario de Las Palmas, en cuyas ins-

talaciones ha sido realizado el trabajo. A las histólogas Chicha y Conchi.

* Al personal investigador del Jardín Canario.

* A Geli por sus excelentes dibujos. A Suso y Dioni por sus "milagros" fotográficos. A Fernando por sus "extraídas" correcciones.

Quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de este trabajo, pero que por razones de espacio no puedo nombrar.

Las Palmas G.C. Noviembre 1988.

Rafael Ro Romero.

A Geli (.....), a mis
padres y a mi tío.

INDICE	Página
I. INTRODUCCION.	1
I.1. Cultivo de tejidos. Definición y técnicas básicas	5
I.2. Antecedentes del cultivo de tejidos de macroalgas marinas	12
I.2.1. Problemas de terminología del cultivo de tejidos de macroalgas marinas	15
I.2.2. Problemas metodológicos del cultivo de tejidos de macroalgas marinas	19
I.3. Cultivo de callos, células libres y protoplastos de macroalgas marinas	39
I.3.1. Macroalgas de la División Chlorophyta	40
I.3.2. Macroalgas de la División Rhodophyta	41
I.3.3. Macroalgas de la División Phaeophyta	44
I.4. Objetivos del trabajo	46
II. MATERIAL Y METODOS	
II.1. Generalidades	49
II.2. Descripción de las especies, explantos y zonas de recolección.	51
II.3. Composición y preparación del medio de cultivo	57
II.3.1. Modificaciones del medio de cultivo mESP	64
II.4. Condiciones de cultivo	69
II.4.1. Desinfección del material vegetal	69

II.4.2. Metodología y régimen de cultivo.	77
II.5. Estudio histológico	79
II.6. Indices de crecimiento y desarrollo	82
II.7. Cultivo de tejidos de <u>Laurencia</u> <u>sp</u>	85
II.7.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos	85
II.7.2. Crecimiento y desarrollo del explanto	86
II.7.3. Crecimiento del callo y morfogénesis	92
II.7.4. Cultivo de callos en medio mESP líquido	94
II.8. Cultivo de tejidos de <u>Gelidium Versicolor</u> , <u>Gelidium arbuscula</u> y <u>Gracilaria ferox</u>	96
II.8.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos	96
II.8.2. Crecimiento y desarrollo del explanto	97
II.9. Cultivo de tejidos de <u>Gratelou- pia doryphora</u>	99
II.9.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos	99
II.9.2. Crecimiento y desarrollo del explanto	99
II.9.3. Histología y control del crecimiento gemario	105
II.9.4. Efecto de la luz en la regeneración con glicerol	105
II.9.5. Crecimiento y desarrollo en medio líquido	106

III.RESULTADOS

III.1. Cultivo de tejidos de <u>Laurencia</u> <u>sp</u>	107
III.1.1. Ensayos para el estable- cimiento de cultivos axénicos	107
III.1.2. Crecimiento desarrollo del explanto	108
III.1.3. Crecimiento y morfogé- nesis de los callos	124
III.1.4. Cultivo de callos en medio líquido mESP	129
III.2. Cultivo de tejidos de <u>Gelidium</u> <u>versicolor</u> , <u>Gelidium arbuscula</u> y <u>Gra-</u> <u>cilaria ferox</u>	131
III.2.1. Ensayos para el estable- cimiento de cultivos axénicos	131
III.2.2. Crecimiento y desarrollo del explanto	133
III.3. Cultivo de tejidos de <u>Gratelou-</u> <u>pia doryphora</u>	141
III.3.1. Ensayos para el estable- cimiento de cultivos axénicos	141
III.3.2. Crecimiento y desarrollo del explanto	142
III.3.3. Histología y control del crecimiento en medio mESP70-2,5% glicerol	155
III.3.4. Efecto de la luz sobre la regeneración en medio mESP70-2,5% glicerol	157
III.3.5. Cultivo en medio líquido	157

IV.DISCUSION

IV.1. Establecimiento de cultivos axénicos	161
IV.2. Crecimiento y desarrollo del explanto	168
IV.3. Cultivo en medio líquido	211
V. CONCLUSIONES	216
VI. BIBLIOGRAFIA	220

I. INTRODUCCION

Las algas incluyen una gran variedad de organismos que ocupan los más diversos hábitats, marino (algas marinas) o terrestre (algas de agua dulce). Pueden ser unicelulares (microalgas) o pluricelulares (macroalgas) de las formas más variadas, desde coloniales hasta la formación de un talo como modelo de organización más complejo [19, 76].

Denominaremos macroalgas marinas a las algas pluricelulares de hábitat marino. Evolutivamente son plantas primitivas y posiblemente algunas de ellas dieron lugar a las plantas terrestres actuales [19]. La lejanía evolutiva que presentan generan unas características fisiológicas propias, diferentes a las de las plantas superiores [118].

Las macroalgas marinas acumulan en las paredes celulares y espacios intercelulares determinados compuestos, como el agar-agar y carrageno en algas rojas y los alginatos en pardas, cuyas propiedades físicas los hacen insustituibles en su aplicación industrial [131], siendo productos de importancia estratégica para cualquier economía. La extracción y comercialización de tales compuestos a partir de poblaciones naturales de algas constituye un mercado que mueve miles de millones

de dólares anuales [189]

El valor nutritivo de las algas [5] hace que sean un componente básico de la dieta humana en Oriente [29, 146]. Más generalizado ha sido el uso de las algas como pienso [29].

El metabolismo secundario de las macroalgas genera compuestos de características químicas y propiedades bioactivas únicas en el Reino Vegetal [58], que representan una fuente de compuestos con actividad farmacológica, con efectos antibacteriano, antifúngico, antivírico y antineoplásico [5, 177].

La infrautilización de las zonas oceánicas del planeta, donde se pierde gran parte de la energía solar que llega a la Tierra, hace factible la elaboración de proyectos para la construcción de "granjas" oceánicas en las que cultivar gran cantidad de biomasa algal, transformable en energía por fermentación [88, 175, 200].

Lo expuesto sobre las características y utilidades actuales o potenciales de las macroalgas marinas, justifica los esfuerzos que actualmente se realizan para aumentar el conocimiento de la biología de estos vegetales. Los intereses económicos y la necesidad de buscar sistemas de producción alternativos han potenciado el desarrollo de diversos campos de la Ficología (nutrición, genética, bioquímica) que están permitiendo susti-

tuir la actividad recolectora en poblaciones naturales por el cultivo. La obtención y el cultivo de clones algales selectos que produzcan mayores y mejores cantidades de compuestos orgánicos de interés, posibilitaría el desarrollo de una industria basada en la extracción de productos macroalgales, independientemente de la existencia de grandes poblaciones naturales [47, 87].

La existencia de variabilidad genética es un factor primordial en un programa de selección genética. En este sentido, las macroalgas presentan una gran capacidad de adaptación a las fluctuaciones de diferentes factores ambientales como luz, temperatura y salinidad [90]. Se han detectado mutantes cuya manifestación fenotípica afecta a la pigmentación, alteraciones morfológicas y características sexuales [191].

A la variabilidad genética del material contribuyen, o pueden contribuir, peculiaridades de estos vegetales, como su reproducción. Poseen ciclos de vida donde se suceden o autopropagan diferentes fases morfológicamente y/o genéticamente distintas [103]. La presencia de una fase haploide en el ciclo de vida de algunas macroalgas, posibilita la detección de genes mutados.

En este marco es evidente la necesidad de am-

pliar el conocimiento de las macroalgas en todos los niveles de organización. Desde el punto de vista de la mejora vegetal, son también importantes las características genéticas celulares.

A nivel celular se han descrito procesos de ploidización [141] o recombinación somática, de efectos fenotípicos perceptibles [190]. Estas características genéticas convierten a las macroalgas marinas en un material adecuado para la selección genética a nivel celular. Para ello, la Ficología necesita del desarrollo de técnicas que posibiliten el trabajo con macroalgas marinas a nivel celular, que supongan abrir una puerta a campos actualmente vedados, como la biología celular y molecular. Es preciso mantener células creciendo en un ambiente controlado, con el que poder comprender y regular su desarrollo. El mantenimiento de cultivos celulares con alta tasa de multiplicación celular permitiría la selección genética al poder ejercer presión selectiva sobre un material biológico que se reproduce rápidamente. Los clones seleccionados podrían ser propagados vegetativamente hasta generar plantas de características genéticas iguales a las seleccionadas a nivel celular. Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales, por sus características, podrían constituirse en la "herramienta" de trabajo de la biología celular de las

macroalgas marinas.

I.1. Cultivo de tejidos. Definición y técnicas básicas

El cultivo de tejidos fue ideado y desarrollado para las plantas superiores. Aparte de su aplicación a la selección y propagación, ha supuesto el desarrollo de la biología celular y molecular de las plantas superiores, contribuyendo notablemente al conocimiento de la bioquímica, genética, diferenciación celular, etc. de tales organismos.

En los últimos años, el cultivo de tejidos ha dejado de ser sólo una materia académico-científica para convertirse en una herramienta de la industria, con el nacimiento de una nueva concepción de la utilización de los vegetales y el desarrollo de una tecnología, Biotecnología Vegetal, que utiliza las células vegetales y las "pone a trabajar" (producción de metabolitos, transformación de compuestos químicos etc.) sobre la base del control que podemos ejercer sobre su crecimiento y desarrollo. La contribución se prevé mayor con la combinación del cultivo de tejidos y otras técnicas como la ingeniería genética, la inmovilización celular, etc. [122, 153].

El cultivo de tejidos constituye una técnica, o

conjunto de técnicas, cuya base empírica permite concebir su adaptación a cualquier grupo de vegetales. Su aplicación a las algas pluricelulares marinas puede contribuir a la solución de los dos problemas básicos de la Ficología aplicada: selección genética y propagación.

El cultivo de tejidos se podría definir como el crecimiento de cualquier parte de una planta en condiciones de cultivo controladas. Engloba al conjunto de técnicas conocidas por cultivo de órganos, de tejidos, de callos, de células y de protoplastos [181].

La mayor parte de las plantas superiores pueden ser cultivadas por cultivos de tejidos. Sobre una base metodológica común se han ido desarrollando, de forma empírica, ligeras variaciones para adaptar las técnicas a los diferentes grupos que constituyen las plantas superiores. El empirismo y la base metodológica común son recogidos en la definición que del cultivo de tejidos hace Steward (1983): " Cultivo de tejidos es el arte de crecer, asépticamente y heterotróficamente, partes aisladas de la planta en un medio apropiado."

Los métodos para el establecimiento de condiciones asépticas y el desarrollo de medios de cultivo, con los componentes orgánicos e inorgánicos necesarios para el crecimiento de los vegetales, constituyen el eje central del cultivo de tejidos.

Los medios de cultivo que se emplean no son restrictivos para el crecimiento de otros organismos (bacterias, hongos, etc.). Por ello, es necesario que el material vegetal, el medio de cultivo, así como el ambiente en el que se trabaja mantengan condiciones estrictas de asepsia. Un cultivo establecido en tales condiciones se denomina cultivo aséptico (libre de bacterias, virus y hongos) o axénico (libre de cualquier tipo de contaminante).

Para establecer un cultivo de tejidos, las porciones aisladas de la planta (explantos) se disponen en un medio de cultivo (sólido o líquido), cuya composición genera un ambiente diferente al que poseía el explanto en la planta original que, básicamente, da lugar a dos tipos de patrones de crecimiento: organizado o desorganizado [81].

El patrón de crecimiento organizado es la base de la aplicación del cultivo de tejidos a la propagación vegetal. Cultivando partes de la planta donde se localizan meristemas (meristemas radiculares, puntas de yemas o las propias yemas), se puede conseguir, en poco tiempo, una gran cantidad de plantas de características genéticas iguales a las de la planta madre.

El cultivo de tejidos siguiendo un patrón de

crecimiento organizado representa una vía alternativa de propagación para plantas que no responden a otros métodos (propagación por semillas, esquejes etc.,) y permite la clonación de plantas seleccionadas. Los tejidos meristemáticos empleados se caracterizan, además, por la ausencia, o disminución, de contaminantes de naturaleza endófito (virus, micoplasmas, bacterias), difíciles de eliminar con la utilización de métodos comunes de combate de plagas. La propagación de meristemas por cultivo de tejidos siguiendo un patrón de crecimiento organizado contribuye al saneamiento vegetal, con el consiguiente beneficio para la producción de las cosechas [89].

El patrón de crecimiento desorganizado (callo) es establecido a partir del explanto que, al ser cultivado en condiciones adecuadas, genera una masa celular, cuyas células han perdido las propiedades esenciales (inhibición del crecimiento por contacto o estimulación química) que mantienen y regulan la organización de las mismas en los tejidos. Las células del callo poseen características fisiológicas, morfológicas y, en algunos casos, genéticas diferentes a la planta original. No son células indiferenciadas [139], lo que diferencia al callo de tejidos de la planta con características celulares similares (ej. meristemas). Las células del callo conservan la capacidad regenerativa para orga-

nizarse en estructuras propias de la planta (organogénesis), incluyendo la capacidad de generar estructuras embrionarias (embriogénesis) [61, 81, 179].

El crecimiento celular desorganizado no es exclusivo de la aplicación del cultivo de tejidos. Según Yeoman & Forche (1980), no existe diferencia entre un callo formado en cultivo y el que se puede encontrar en la naturaleza y que es producto de una herida ocasionada en la planta. La única diferencia se establece a nivel del futuro desarrollo de tales callos que es controlado, en cultivo de tejidos por las condiciones especiales ya aludidas, mientras que en la planta, el desarrollo del callo es controlado por la misma, que inmediatamente reestablece las condiciones normales abortando el crecimiento anómalo.

En cultivo de tejidos, dependiendo de las condiciones en las que hagamos crecer el callo, podemos mantener el crecimiento permanentemente desorganizado de las células o, induciendo organogénesis, obtener una planta completa. También, si la estructura del callo permite que sea disgregado (callo friable), podemos establecer un cultivo en medio líquido, donde las células, antes agrupadas, crecen ahora por separado o en pequeños agregados celulares (cultivo de células en

suspensión).

El cultivo de células en suspensión puede ser obtenido directamente a partir de la planta madre por digestión enzimática del tejido vegetal intercelular. Si la digestión se prolonga lo suficiente se pueden obtener protoplastos o células cuyo contenido intracelular queda aislado del exterior sólo por la membrana plasmática, al haber sido digerida por los enzimas la pared celular [17, 51].

El cultivo de células libres y de protoplastos constituyen técnicas básicas del cultivo de tejidos [51]. Su campo de aplicación mas importante es la mejora genética vegetal, mediante la selección de aquellas células que expresen características genéticas adecuadas y que se han mantenido silentes en la estructura del vegetal o hayan sido inducidas por mutagénesis química [62]. La transfomación por ingeniería genética de los protoplastos constituye el campo que más expectativa despierta en la selección genética por cultivo de tejidos. Estas técnicas se añaden a la potencialidad de la apliación del cultivo de tejidos a la mejora vegetal por variación somaclonal o mutación celular, no explicable en base a las tasas de mutación espontánea, que surge en cultivo de callos , células y protoplastos. La variación somaclonal está basada en cambios en la estructura y

número cromosómico de las células del cultivo, en la recombinación somática y en cambios epigenéticos [97, 173].

Volviendo a la definición de Steward, las condiciones o "medio apropiado" que generan los patrones de crecimiento anteriormente señalados, dependen de múltiples factores, desde los intrínsecos a cada planta a las condiciones de luz, temperatura, humedad, etc. en las que se realice el cultivo. Sin embargo, la condición heterotrófica de las células en cultivo hace que sean, fundamentalmente, los componentes del medio de cultivo los que controlen el desarrollo del tejido [81]. Sobre todo las sustancias o factores reguladores del crecimiento vegetal. El descubrimiento de las sustancias reguladoras del crecimiento vegetal y su adición al medio de cultivo representaron el impulso necesario para el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos [181].

Actualmente se añaden a los medios de cultivo reguladores de crecimiento pertenecientes a las clases denominadas auxinas (ácido indolacético, ácido 2-4diclofenoxacético, ácido naftalenacético, ácido indolbutírico), citoquininas (furfurilaminopurina, Zeatina, benciladenina), y en menor proporción giberelinas (ácido

giberélico). Para cada especie vegetal es necesario ajustar empíricamente las concentraciones y combinaciones de reguladores para obtener un patrón de desarrollo determinado. No obstante, los distintos tipos de reguladores poseen efectos generales que permiten predecir cual será la evolución del cultivo. Así, en las combinaciones auxina-citoquinina una mayor concentración de la primera promueve el crecimiento desorganizado, mientras que un balance de concentraciones favorable a la segunda desencadena el proceso organogenético [81].

I.2. Antecedentes del cultivo de tejidos de macroalgas marinas

Si nos ceñimos al significado estricto del término cultivo de tejidos, tales técnicas habrían sido aplicadas a las algas (en general) desde 1957 con el aislamiento de protoplastos de Nitella [95] y Uronema gigas [79], refiriéndonos a las algas eucariotas, siendo anterior la obtención de protoplastos de algas procariotas [1].

La comprensión del estado actual del cultivo de tejidos de macroalgas marinas pasa por revisar los antecedentes bibliográficos abarcando otros aspectos más generales del cultivo de macroalgas en el laboratorio, aclarando el que la aplicación del cultivo de tejidos a

las algas debe entenderse como restringido a las macroalgas marinas.

Gibor (1980) considera el año 1978 como el del inicio de los intentos de aplicación del cultivo de tejidos a las macroalgas, con la propagación de Chondrus crispus [32] en condiciones que se asemejan a las empleadas en el cultivo de tejidos de vegetales superiores. Esta matización es importante por cuanto son sólo los métodos de cultivo (definición de explantos, adición de agar al medio, liberación enzimática de células etc.) los que diferencian la propagación vegetativa en laboratorio de macroalgas por cultivo de tejidos, de la propagación por otros métodos convencionales ampliamente conocidos [80, 178]. Máxime, cuando los resultados obtenidos en Chondrus crispus no reflejan diferencias entre unos métodos y otros. De hecho, el cultivo de tejidos de macroalgas sienta su base metodológica en el cultivo de tejidos de plantas superiores, pero también en los métodos convencionales de cultivo de algas en el laboratorio, de donde se toman ideas para el establecimiento de cultivos axénicos, o se adapta la formulación de los medios de cultivo.

En los últimos años se han ido acumulando resultados en la aplicación del cultivo de tejidos a diferentes

especies algales. Tales resultados han sido recopilados en diferentes revisiones del tema [150, 152, 165].

Los trabajos se centran en algas pluricelulares marinas de las divisiones Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta, fundamentalmente en especies de interés comercial (Gelidium, Porphyra, Laminaria) de estos dos últimos grupos.

Los primeros intentos de propagación por cultivo de tejidos con la inducción de callo, han dado paso a trabajos orientados a la obtención y regeneración de protoplastos, cuyo objetivo final sería la transformación genética de los mismos. En cierta medida, es deducible un cambio en la orientación de la aplicación del cultivo de tejidos hacia la mejora genética de macroalgas. La inducción y mantenimiento de callos podrían contribuir a los métodos de propagación vegetativa, constituyéndose en el "semillero" de los cultivos a gran escala [152].

Según Polne-Fuller & Gibor (1987) los problemas fundamentales del cultivo de tejidos de macroalgas son: a) el establecimiento de cultivos axénicos; b) la digestión del tejido en la obtención de protoplastos c) la inducción de la regeneración y la división de las células y protoplastos aislados. Estos problemas sientan su base en las características diferenciales (morfológi-

cas, fisiológicas, etc.) entre las macroalgas y las plantas superiores que impiden la generalización de la metodología ya desarrollada. Como ejemplo, los métodos comunes de digestión enzimática utilizados en plantas superiores no dan resultados positivos en algas rojas y pardas, debido a la presencia en las mismas de polisacáridos (agar, alginatos) que no son digeribles sino por mezclas enzimáticas complejas de enzimas purificadas o en forma de extracto crudo de tejidos de hervíboros marinos. Incluso, hay quien duda de que los protoplastos aislados de diferentes especies algales, realmente no posean la capa mucilaginosa de la pared celular [34].

La revisión de los términos habitualmente utilizados para la notación de las respuestas de las algas en cultivo de tejidos, así como los métodos usados para la obtención de los resultados descritos, plantea otros problemas del cultivo de tejidos de macroalgas a añadir a los considerados por Polne-Fuller & Gibor (1987).

I.2.1. Problemas de terminología del cultivo de tejidos de macroalgas marinas

Aparte de la duda que genera el trabajo de Chen (1986) acerca de la calificación como protoplastos de las células libres aisladas de diferentes algas, que como el mismo autor reconoce se puede resolver con la comproba-

ción de la ausencia de mucílago por microscopía electrónica, no existe otro término en la bibliografía consultada tan controvertido como el de "callo".

Ningún trabajo de los revisados presenta un estudio histológico detallado de la estructura que describen como callo. La notación "callo" es utilizada, en la mayor parte de los casos, para describir la observación macroscópica de una alteración morfológica del patrón de crecimiento normal del talo. Por ello, en multitud de ocasiones [3, 33, 35, 71, 149, 151], junto al uso estricto de la notación callo, tal estructura es denominada como "semejante a callo", en una traducción literal del término anglosajón "Callus-like". La forma de esta estructura es variable entre las diferentes algas. Un callo o "estructura semejante a callo" puede ser filamentosos, como el de Agardhiella subulata [22] o Egregia menziesii [152] o consistir en masas celulares compactas o friables que surgen en la superficie del explanto, como el de Chondrus crispus [33]. También puede ser todo el explanto sembrado el que se convierta en masa celular amorfa, como lo hicieron las células libres de Porphyra perforata [149] o los explantos de la zona meristemática de la lámina de especies de Laminaria [71].

La cuestión que surge es: ¿Es una estructura descrita como "semejante a callo" un auténtico callo?, que da paso a otra más general : ¿Qué es un callo en cultivo de tejidos de macroalgas?.

Desde el punto de vista estricto del cultivo de tejidos, un callo debe tener las características de desorganización celular y capacidad regenerativa ya descritas. En el caso de las algas pluricelulares, donde la estructura que conforma el talo puede reducirse a la unión de filamentos multicelulares de capacidad limitada o ilimitada de crecimiento [76], quizá (¿?) sea el crecimiento filamentosos el que corresponda al más alto grado de desorganización de un talo. De esta forma, sólo los tipos de crecimiento desorganizado en forma filamentosos serían auténticos callos. De ser así, no haría falta el cultivo de tejidos para la obtención de callos, ya que se ha descrito crecimiento filamentosos de las algas siguiendo métodos convencionales de cultivo en laboratorio [147, 158, 180]. Incluso, no haría falta el cultivo, ya que existen algas cuyo aspecto natural es filamentosos desorganizado, como Lithosiphon pusillus [147], por dar un ejemplo.

El tema es complicado, y se vuelve aún más cuando se tiene en cuenta que las algas pueden regenerar, tal y como se ha descrito, previa formación de callo después

de una herida o corte en el talo [45, 56, 76]. Este callo no tiene estructura filamentosa, sino que constituye una desorganización celular en la zona de corte [56]. Como hemos indicado, Yeoman & Forche (1980) consideran que un callo formado por efecto herida es igual al formado (o al que debe ser formado) en cultivo de tejidos.

Por otra parte, hay que destacar la capacidad natural de desorganización de los talos de las algas, no relacionada con el efecto herida, que es conocida desde 1819 [132]. Tales desorganizaciones o malformaciones han sido relacionadas con infecciones por bacterias, hongos, algas, copépodos, nemátodos o contaminación química marina [186]. Es posible que algunas de las estructuras descritas como callo no sean más que un producto de la infección por algún tipo de contaminante no detectable, por su naturaleza endófito, con los métodos de comprobación de la asepsia que se emplean en cultivo de tejidos.

En posteriores alusiones a los resultados descritos en la bibliografía consultada, haremos referencia como callo a las estructuras descritas como callo o "callus-like". Desde nuestro punto de vista, no existe, a priori, base alguna para desechar la posibilidad de que uno u otro tipo de estructuras constituyan auténti-

cos callos. Aunque consideramos que es conveniente la definición estricta del término callo en macroalgas, para evitar la confusión que el término "callus-like" continua generando [152].

El conocimiento de las características macro y microscópicas de la regeneración en cultivo, así como la determinación de algunos de los parámetros que la controlan, pueden ser la clave para la definición del término callo en el cultivo de tejidos de macroalgas .

I.2.2. Problemas metodológicos del cultivo de tejidos de macroalgas marinas

La descripción de antecedentes del cultivo de tejidos de macroalgas marinas ceñida a los resultados obtenidos por diferentes autores, no refleja el estado actual de desarrollo del cultivo de tejidos. Las diferentes especies algales utilizadas (su variación morfológica, celular) generan diferencias en los métodos a aplicar para el establecimiento de un cultivo celular. Las diferencias en los métodos empleados impiden la generalización de resultados. No sólo se trata de conocer qué resultados se obtuvieron, sino en qué condiciones se produjeron.

Medio de cultivo

En el cultivo de tejidos de macroalgas marinas se

utilizan dos tipos de medios, los artificiales o definidos en los que se formula íntegramente el agua de mar, y los basados en agua de mar enriquecida con elementos inorgánicos y compuestos orgánicos.

No se puede considerar que los medios utilizados en cultivo de tejidos hayan sido elaborados de forma específica para tal fin, ya que la mayor parte de ellos constituyen ligeras modificaciones de medios anteriores, desarrollados inicialmente para el cultivo de algas unicelulares y estados microscópicas (reproductores) de las pluricelulares [129, 154].

La primera aplicación de estos medios se produjo en el cultivo de algas pluricelulares en el laboratorio, sin la utilización de la metodología del cultivo de tejidos. La investigación de aspectos como la nutrición, después del establecimiento de cultivos axénicos o unialgales, permitió el desarrollo de medios que tuvieran en cuenta aspectos como la auxotrofia vitamínica de las algas [65, 66, 68, 69] o la necesidad de determinados requerimientos minerales como nitrógeno, fósforo, bromo, yodo etc. [130, 201]. Estudios que han sido paralelos a los primeros intentos del cultivo de tejidos [72, 73, 123, 137, 198].

El cultivo de tejidos introduce modificaciones

en los medios de cultivo, como la adición de agar para el cultivo de fragmentos de talo, o la adición de determinados compuestos que respondieran al fin que se perseguía con tales técnicas. Así, se han añadido fuentes de carbono como sacarosa [33, 134], glucosa [149], galactosa [33] manitol y sorbitol [164] y extractos vegetales [134, 163, 164]. Se han descrito efectos positivos sobre la formación de callo de extractos de levaduras o de coco [134], del manitol [164] y sobre la regeneración de células libres ha tenido efecto positivo el extracto de Laminaria angustata [163].

A la hora de elegir un medio para el crecimiento de un alga determinada, el éxito obtenido depende más de la suerte que de los conocimientos fisiológicos que se posean [80], entendiéndose que el medio de cultivo es más una "vía para el crecimiento" que un objetivo [129]. El cultivo de tejidos no ha quedado exento de esta filosofía, con la utilización, en la mayor parte de los casos, de medios basados en el agua de mar que se presumen más permisivos al crecimiento de cualquier alga. Aunque, en realidad, tanto los medios de agua de mar enriquecida como los definidos son considerados no específicos para un tipo de alga determinada [156].

En cultivo de tejidos se han detectado diferencias en la capacidad de crecimiento de algas dependiendo

del tipo de medio utilizado. Se han observado diferencias en la inducción y crecimiento de callo [71, 206], y en la capacidad de regeneración de ramificaciones [71, 135]. Tales diferencias no dependen de que el medio sea artificial o de agua de mar enriquecida, habiéndose observado efectos diferentes entre medios pertenecientes a la misma clase.

El estado físico del medio de cultivo, es decir si ha sido solidificado o se usa líquido, parece tener un efecto notorio sobre los patrones de crecimiento de las algas en cultivo de tejidos. Independientemente del tipo de medio, las algas muestran una mayor predisposición a formar callo en medio sólido que en medio líquido [71, 149, 151, 164, 167]. La solidificación del medio de cultivo se ha realizado con agar, a concentraciones entre 0,3 y 2%, detectándose incluso efecto inductor de la formación de callo a concentraciones entre 1% y 2% [164]. El efecto inductor de la formación de callo por el agar puede ser reproducido con otros agentes gelificantes, por lo que no parece probable que sea algún compuesto químico derivado del agar el que fomente tal tipo de respuesta [152]. No se han realizado trabajos en los que se trate el tema del efecto del agar sobre la formación de callo con la

profundidad que merece, limitándose los autores a la descripción de los resultados obtenidos sin adentrarse en las modificaciones que este ficocoloide introduce en el medio de cultivo.

La tabla I.1 recoge la formulación de algunos medios de cultivo utilizados para el cultivo de tejidos de macroalgas marinas. Se describe también la formulación del medio de cultivo MS [138] ampliamente utilizado en el cultivo de tejidos de plantas superiores y que se ha empleado en ocasiones para el cultivo de tejidos de macroalgas, sin resultado satisfactorio [71], o con excelentes resultados, después de modificaciones no descritas y la adición de una "hormona vegetal sintética" (naftenato sódico) [206].

Explantos

En plantas superiores la homogeneidad en los tipos de tejidos permite la distinción clara de la procedencia de un explanto tan sólo definiendo el nombre del tejido de donde fué extraído [139, 202]. En las algas, las diferencias estructurales entre los distintos grupos impide una generalización de ese tipo. Sólo en los casos de algas de organización compleja, con estructuras de fijación de los talos al sustrato, estipe y ramificaciones o lámina, se recurre a la denominación

del explanto por su procedencia dentro de tales partes del talo (Tabla.I.2). El explanto utilizado puede haber sido todo el alga, si ésta o una de las fases morfológicas del ciclo posee estructura simple. Tal fue el caso del microtalo de Dictyosiphon foeniculaceus [164].

Aparte de la organización del alga, que condiciona la procedencia del explanto, son también factores importantes a la hora de definirlo de forma precisa, la fase genética del ciclo (ploidía) del que se extrajo, su forma y tamaño. Son muy pocos los trabajos que definen de esta forma los explantos, limitandose, cuando lo dan a la definición de algunos de ellos (Tabla I.2).

También condiciona el tipo de explanto utilizado el objetivo del trabajo, si la inducción de callo o la obtención de protoplastos o células libres. En algunos casos se han usado los callos previamente inducidos, para el establecimiento de cultivos de células libres [33, 117].

El explanto sembrado puede no coincidir con el inicialmente aislado de la planta, realizandose la esterilización en una pieza de mayor tamaño, para luego extraer los explantos a sembrar [32, 33, 112].

La utilización de explantos procedentes de diferentes zonas del talo ha permitido detectar diferencias que afectan a la viabilidad después de la desinfección,

TABLA I.1. Comparación de medios de cultivo artificiales y de agua de mar enriquecida

	ARTIFICIALES			AGUA DE MAR	ENRIQUECIDA
	Murashige & Skoog, 1962 MS	Provasoli y col., 1957 ASP-6	Provasoli, 1963 ASP-12	Provasoli, 1968 ESP	McLachlan 1973 SWM
<u>MACRONUTRIENTES (mM)</u>					
NaNO ₃		3,53	1,18	8,24E-1	2,00
Na ₂ -Glicerol-fosfato. H ₂ O		3,17E-1	3,17E-2	4,63E-2	
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O				8,95E-3	
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O				8,87E-3	
TRIS		8,25		8,25E-1	5,00
NH ₄ NO ₃	20,60				
KNO ₃	18,80				
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,00	3,75	10,00		
KH ₂ PO ₄	1,25				
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,50	32,50	28,40		
Na ₂ SiO ₃		2,46E-1	5,28E-1		2,00E-1
Fe-EDTA					2,00E-3
Glicilglicina					5,00
NaH ₂ PO ₄					1,00E-1
NaCl		411,00	479,00		
KCl		9,40	9,40		
MgCl ₂			19,70		
K ₃ PO ₄			4,70E-2		
NTA			5,23E-1		
<u>MICRONUTRIENTES (mM)</u>					
Zinc	3,00E-2	7,70E-3	8,00E-4	8,00E-4	3,50E-2
Manganeso	1,00E-1	1,80E-2	7,30E-3	7,30E-3	1,00E-2
Molibdeno	1,04E-3	5,20E-3	5,20E-3		5,00E-3
Cobalto	1,10E-4	1,70E-4	1,70E-4	1,70E-4	3,00E-4
Cobre	1,00E-4	3,20E-4			3,00E-3
Hierro	1,00E-1	3,58E-2	1,80E-3	1,80E-3	2,00E-3
Na -EDTA	1,00E-1		1,34E-2	1,34E-2	4,80E-2
Boro	1,00E-1	1,85E-1	1,85E-1	1,85E-1	4,00E-1
Yodo	5,00E-3		8,00E-5		
Versonal		8,72E-2			
Bromo			1,25E-1		
Estroncio			2,30E-2		
Rubidio			2,30E-2		
Litio			2,88E-2		

TABLA I.1. Continuación.

	<u>ARTIFICIALES</u>			<u>AGUA DE MAR ENRIQUECIDA</u>	
	Murashige & Skoog, 1962 MS	Provasoli y col., 1957 ASP-6	Provasoli, 1963 ASP-12	Provasoli, 1968 ESP	M. S. Lachlan 1973 SWM
<u>VITAMINAS (mg)</u>					
Tiamina-HCl	1,00E-1	2,00	1,00E-1	1,00E-1	5,00E-1
Piridoxina-HCl	5,00E-1	4,00E-1			
Biotina		5,00E-3	1,00E-3	1,00E-3	1,00E-3
B12		5,00E-4	2,00E-4	2,00E-3	1,00E-3
Acido nicotínico	5,00E-1	1,00			1,00E-4
Pantotenato-Ca		1,00			1,00E-4
Acido fólico		2,50E-2			2,00E-3
Timina		8,00			3,00
Mioinositol	100,00	10,00			5,00
Acido p-aminobenzoico		1,00E-2			1,00E-1
Piridoxamina.2HCl		2,00E-1			
Putrescina.2HCl		4,00E-1			
Riboflavina		5,00E-2			
Colina		5,00			
Acido orótico		2,600			
Acido folínico		2,00			
<u>OTROS ADITAMENTOS</u>					
Extracto de suelo (ml)					50
Extracto de hígado (mg)					10
<u>AGUA DESTILADA</u>	1000ml	1000ml	1000ml		
<u>AGUA DE MAR</u>				1000ml	1000ml

capacidad de regeneración, así como, diferencias en la digestibilidad enzimática para la obtención de células libres y protoplastos. Tales diferencias están basadas en el tamaño del explanto o en la madurez (vejez) del mismo [32, 33, 34, 36, 60, 71, 135, 149, 206]s, 1980]. Las células aisladas de diferentes zonas del talo de Porphyra perforata, regeneraron diferentes tipos de estructuras dependiendo de la morfología celular y su localización en la lámina [149].

Métodos de establecimiento de cultivos axénicos

Los primeros trabajos de establecimiento de cultivos axénicos datan de los años 1958-59, por lo que no se puede considerar que la idea y, en cierta medida, los métodos fueran desarrollados específicamente para el establecimiento de cultivos celulares. En 1958 Provasoli estableció cultivos axénicos de Ulva y Enteromorpha, con la desinfección de los talos con antibióticos [155]. En 1959 Fries estableció el cultivo axénico de Gonotrichum elegans que fue utilizado en estudios de nutrición [65].

En 1963, Fries realizó un estudio sobre los métodos de obtención de cultivos axénicos de diferentes algas, comprobando la necesidad de la aplicación de diferente metodología dependiendo del tipo de alga, fundamentalmente de su complejidad estructural. Fries

observó como para algas de estructura multicelular simple como Gonotrichum elegans, y Asterocystis ramosa, entre otras, se obtienen cultivos axénicos con una incubación entre 2 y 10 días en soluciones de antibióticos como penicilina o estreptomicina, mientras que para otras más complejas como Nemalion multidilfilum necesita de un agente como el Jodopax (preparado de yodo), con el que obtuvo un cultivo aparentemente axénico en el que aparecieron posteriormente contaminantes endófitos.

Para el cultivo de tejidos de macroalgas, sobre la base experimental previa, se han desarrollado procedimientos de desinfección que se caracterizan por ser protocolos complejos en los que no se distingue un agente biocida principal. La estrategia general es la de utilizar varios agentes que van eliminando progresivamente todos los organismos asociados al talo de las algas (animales carentes de pared celular, otras algas, hongos y bacterias).

De forma general, los organismos carentes de pared son eliminados con un shock osmótico, como el lavado de las algas o explantos en agua destilada, al que siguen procedimientos que liberan al alga de los epífitos bacterianos y algales asociados al talo, como

limpieza manual o sonicación [148], o como el arrastre por una superficie agarizada, ya usado por Fries para la obtención de cultivos unialgales de Achroetium y Traie-lla [67], que fué incluido en su protocolo de desinfección por Chen & Taylor (1978).

El material pretratado es sometido a la acción de diferentes agentes, de mayor o menor poder biocida dependiendo del tipo de algas. Para las algas rojas, que no resisten tratamientos duros [67], el compuesto más usado es el Betadine [33, 34, 35, 117, 148, 151] de características químicas similares al Jodopax. Para las algas pardas se han usado agentes como hipoclorito [71, 112, 167], alcohol al 70% [71, 206], o yoduro potásico [206].

La desinfección concluye con una incubación en mezcla antibiótica con estreptomycin, neomicina, clo-ramfenicol, penicilina etc., a las que se añaden anti-fúngicos como la nistatina o panfungol y el dióxido de germanio que inhibe el crecimiento de diatomeas [114].

El rango de concentraciones y tipos de antibióti-cos utilizados varían en función de la especie y autor. En algunos casos se han realizado ensayos previos de las concentraciones y tipos de antibióticos óptimos para cada especie [23, 140, 166] habiéndose realizado, en algunos casos, la prueba de las concentraciones y tipos

de antibióticos óptimos para la desinfección, sin dañar el alga [140].

La aparición de contaminantes endófitos sigue siendo un problema en el el cultivo de tejidos de las macroalgas [152]. Los métodos de desinfección superficial no afectan a los contaminantes endófitos que son frecuentes en los talos de las algas [50, 76, 124, 170]. Tales organismos pueden ser detectados después de la desinfección sólo si emergen de los talos cuando los explantos se encuentran sembrados en medios de cultivo para la comprobación de la esterilidad (medios de cultivo normales o agua de mar con fuentes de carbono y enriquecimiento nutritivo que permita el crecimiento de bacterias, hongos y otras algas). De no ser así, puede ocurrir que se produzca la aparición de contaminantes un tiempo después del establecimiento del cultivo y de haberlo considerado como axénico [67, 112].

Los métodos utilizados en la obtención de cultivos axénicos no siempre se han descrito con suficiente claridad, quedando la duda de si realmente los resultados obtenidos lo han sido en condiciones axénicas [3, 24, 36, 55, 134, 169, 203].

Las condiciones no axénicas no han impedido el crecimiento del alga en cultivo [117] e incluso la

TABLA 1.2. Tipos y características de los explantos utilizados en el cultivo de tejidos de macroalgas marinas de las divisiones Rhodophyta y Phaeophyta

	<u>Procedencia en el talo</u>	<u>Fase del ciclo</u>	<u>Tamaño(cm)</u>	<u>Forma</u>	<u>Resultado obtenido</u>	<u>Autores</u>
<u>RHODOPHYTA</u>						
Agardhiella subulata	lámina	?	0,04 ancho 0,14 diam.	disco	callo	Bradley & Cheney, 1986
Chondrus crispus	rama apical	gametofito	3,00 long.	?	propagación	Chen & Taylor, 1978
	fragmento no ramificado	?	1,00 long.	cilindro	callo	Chen, 1982
Porphyra yezoensis	"fragmentos del talo"	gametofito	?	?	protoplastos	Saga & Sakai, 1984
Porphyra perforata	lámina	?	0,3 diam.	disco	protoplastos	Polne & Gibor, 1984
Porphyra miniata	lámina	no fértil	1,0 (*)	?	protoplastos	Chen, 1986
Porphyra leucosticta	lámina	?	1,0 (*)	?	protoplastos	Chen, 1987

<u>PHAEOPHYTA</u>						
Laminaria digitata	meristemo lámina	esporofito	?	?	callo	Fries, 1980
Laminaria angustata	estipe	esporofito	5,00	?	callo	Saga & Sakai, 1983
	meristemo lámina	esporofito	5,00	?	callo	Saga & Sakai, 1983
Laminaria saccharina	lámina	esporofito	?	?	propagación	Brinkhuis y col., 1986
	estipe	esporofito	2,50	?	callo	Lee, 1985
Laminaria japonica	lámina	esporofito	1,0 (*)	?	callo	Zuo-Mei, 1984
Sargassum hetrophyllum	fragmentos zona fijación	?	1,5	?	propagación	Mooney & Van Staden, 1984

TABLA I.2. Continuación.

	<u>Procedencia en el talo</u>	<u>Fase del ciclo</u>	<u>Tamaño (cm)</u>	<u>Forma</u>	<u>Resultado obtenido</u>	<u>Autores</u>
<u>PHAEOPHYTA</u>						
<u>Sargassum muticum</u>	lámina	no fértil	5,00	?	protoplastos	Fisher & Gibor, 1987
	estipe	no fértil	5,00	?	protoplastos	Fisher & Gibor, 1987

?= No descrito

propagación= regeneración sin formación de callo.

(*)= tamaño en mm².

formación de callo [167].

Sustancias reguladoras del crecimiento de las algas

La existencia en las algas de sustancias reguladores del crecimiento , tales como auxinas, citoquininas o giberelinas , que realicen un papel semejante a los que realizan en las plantas superiores es un tema controvertido que ha sido objeto de varias revisiones [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 69, 154]. Los trabajos realizados sobre el tema han seguido dos líneas, la de la detección de sustancias similares a las que actúan en plantas vasculares a partir de extractos algales o la del estudio de los efectos sobre el crecimiento de algas de tales sustancias.

Augier (1976a), cree que las sustancias reguladoras del crecimiento de plantas superiores juegan un papel en la multiplicación, elongación celular, germinación, y morfogénesis de las algas, para lo que se basa en una extenso número de referencias que dan prueba de su presencia y efectos [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

Fries (1973), no descarta la posibilidad de que en las algas existan otras sustancias reguladoras diferentes a las de plantas superiores y Provasoli & Carlucci (1974), sobre la base de los trabajos que demues-

tran la necesidad de bacterias o de extractos algales para un correcto desarrollo morfogénico del alga, creen que realmente existen reguladores de crecimiento propios de las algas.

Los trabajos posteriores han seguido la misma tónica, demostrar la presencia y los efectos de sustancias reguladoras del crecimiento de plantas superiores en macroalgas marinas [21, 91, 101, 102, 136].

Otros trabajos arrojan cierta luz sobre el tema, aportando datos como para que se llegue en un futuro a un consenso, entre la línea de pensamiento que aboga por la existencia de las mismas vías de regulación del crecimiento y desarrollo en macroalgas marinas que la que existe en las plantas vasculares, y la línea de que considera la existencia de una regulación basada en la acción de factores reguladores propios de macroalgas marinas. De entre estos trabajos destacamos: 1) la descripción completa de los procesos que regulan la morfogénesis rizoidal en Caulerpa, que ahora se sabe están basados en un proceso dependiente de la gravedad, desencadenado por la acumulación de amiloplastos posiblemente producida por la acción de las giberelinas [94, 97, 126, 127]. Tales trabajos constituyen una prueba de regulación del crecimiento y desarrollo de un alga.- que

no es estrictamente multicelular, sino cenocítica.-por un proceso físico (gravedad) en el que participa o puede hacerlo un regulador de crecimiento de vegetales superiores.2) El descubrimiento de la rodomorfinina, una hormona de naturaleza proteica que interviene en el proceso de fusión celular reparadora del talo en Griffithsia , con una acción promotora del crecimiento y la diferenciación celular [193, 194, 195, 196], trabajos que constituyen una prueba de la existencia de hormonas típicamente algales. 3) La demostración de efectos sobre crecimiento de las algas de sustancias consideradas como reguladores atípicos del crecimiento de vegetales superiores. El ácido p-fenilacético ha sido considerado como un factor regulador del crecimiento de vegetales superiores después de demostrarse la presencia del mismo en diferentes tejidos. Anteriormente, se había descrito los efectos positivos de este regulador sobre el crecimiento de algunas especies de macroalgas marinas [63, 64, 70] 4) La presencia de la citoquinina 2iP y su ribósido en extractos de bacterias marinas [125]. Los reguladores de crecimiento de vegetales superiores podrían ser suministrados por bacterias asociadas a las algas, idea que no es nueva [154], al mismo tiempo que estas podrían regular su desarrollo con la acción de sustancias endógenas.

Con la aplicación del cultivos de tejidos a las macroalgas marinas el tema adquiere una gran importancia, ya que los reguladores de crecimiento juegan un papel fundamental en el control de la respuesta del vegetal en cultivo.

Se han estudiado los efectos de diversos reguladores del crecimiento vegetal (AIA, NAA, 2-4D, KIN, Zeatina) o sustancias como ácido fenilacético o Naftonato sódico, en el intento de controlar la inducción y la morfogénesis de callo en macroalgas. Los rangos de concentraciones han sido variables y amplios (de $10E^{-3}$ a $10E^{-13}$) habiendose obtenido resultado en los que se observa el efecto positivo de tales sustancias sobre la formación de callo en algunas macroalgas [32, 33, 35, 117, 134, 206] o sobre la regeneración de explantos [32].

Los resultados obtenidos con la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, sean positivos o negativos, por haber sido obtenidos en distintas condiciones, con diferentes especies, de diferentes grupos taxonómicos, no son generalizables.

Sin embargo, la impresión general que se extrae de la bibliografía, que corroboran anteriores revisiones del tema [150, 152, 165], es que los reguladores del

crecimiento de vegetales superiores no tienen en el cultivo de tejidos de macroalgas, la eficacia que poseen en el de plantas vasculares. Tal sensación puede ser producto del hecho de que el cultivo de tejidos de macroalgas se encuentra en una fase inicial de desarrollo. Se busca la efectividad de los tratamientos del material vegetal con reguladores del crecimiento más que la constatación de efectos específicos de los mismos. Como ejemplo, en algunos trabajos los reguladores son añadidos como un enriquecimiento más del medio de cultivo [33, 35].

Por otra parte, tal sensación se convierte en realidad cuando se comprueba que los reguladores de crecimiento, si bien tienen efecto en la inducción de callo, no controlan la morfogénesis de los talos [22, 117], es decir, no actúan como agentes desencadenantes de los cambios de patrón de desarrollo necesarios para el control del sistema. También es cuestionable hasta qué punto participan tales sustancias en la inducción de callo, ya que, como hemos mencionado, se puede producir sin la adición de los mismos, con la mera alteración de las propiedades físicas del medio de cultivo.

Condiciones ambientales del cultivo de tejidos de macroalgas

Existen pocos trabajos que estudien las condiciones óptimas de luz y temperatura para el cultivo de tejidos de una determinada especie. Da la impresión de que las condiciones de cultivo han sido establecidas en base a las condiciones generales que permiten el crecimiento de las algas, habiéndose adaptado en algunos casos las condiciones del cultivo de tejidos a las predeterminadas como óptimas para el crecimiento en el laboratorio de la planta completa [140].

En general, el fotoperiodo comunmente empleado es de 16 horas luz: 8 horas de oscuridad. El rango de temperatura oscila entre 14 y 20 C, y la irradiación entre 20 y 100 uE/m² s.

Respecto a la variación en la respuesta dependiente de la luz o la temperatura, Zhao & Zhan (1981) encuentran mejor desarrollo de las células libres de Porphyra yezoensis en luz continua a 12-13 C. Chen (1986) observa mayor formación y viabilidad de los protoplastos de Porphyra miniata a 10 C, mientras que no parecen existir diferencias a 10, 15 y 20 C con Porphyra leucosticta [35]. Tampoco se encuentran diferencias en la formación de callo de Laminaria japonica y Undaria

pinnatifida entre 10 y 15 C. [206].

Fries (1973) indica, que no hay que olvidar que las algas, independientemente de que pudieran regular su crecimiento y desarrollo químicamente por la acción de reguladores de crecimiento, son muy afectadas por la acción de factores medioambientales, como la luz y temperatura. A estos hay que añadir otros como las condiciones nutritivas, salinidad y oleaje [118]. En este sentido, diversos resultados indican que el comportamiento de las algas en cultivo podría seguir gobernado por los mismos factores o por otros que asemejan sus efectos a los factores naturales. La agitación del medio de cultivo ha condicionado el desarrollo de varias especies macroalgales en cultivo de tejidos [112, 149, 158]. Bradley y colaboradores (1988) controlan el desarrollo morfogénico de Agardhiella subulata, variando la concentración de nitrógeno, aumentando la irradiación y con la agitación del medio de cultivo.

No se ha abordado en profundidad el tema de las condiciones ambientales de cultivo, no se han establecido relaciones entre los factores que condicionan el crecimiento en cultivo de tejidos con aquellos que lo hacen en la naturaleza. No se han estudiado, por ejemplo, la salinidad o, o de forma más general, las condiciones osmóticas a las que se encuentran sometidas las

macroalgas en cultivo de tejidos. En este sentido hay que tener en cuenta que, siguiendo la metodología establecida para el cultivo de tejidos de plantas superiores, se pretende hacer crecer las células algales en medios solidificados (agarizados) donde se encuentran en unas condiciones (hidratación, osmóticas) diferentes a las naturales. Quizá esas condiciones especiales podrían estar relacionadas con los efectos inductores de la formación de callo que tiene el agar añadido al medio de cultivo.

Cuantificación y caracterización del crecimiento

La característica dominante en la bibliografía revisada acerca del cultivo de tejidos de las algas es una carencia generalizada de datos cuantitativos. La mayor parte de los autores describen de forma cualitativa los resultados obtenidos y, sólo en algunos casos, se hace referencia al tiempo transcurrido desde la siembra de los explantos hasta la observación de la respuesta en cultivo.

La mayor parte de los patrones de crecimiento han sido detectados al mes o meses de haber sembrado los explantos. Así, salvo el caso de Gelidium spp y Gracilaria descrito por Misawa (1977), que tardaron dos días en

desarrollar callo y 20 en incrementar más de 10 veces su peso fresco, los explantos de médula de Chondrus crispus tardaron 1 mes en desarrollar nuevo cortex y 3 meses para el desarrollo de ramas. Las ramas del talo de la misma especie tardaron 1 mes en desarrollar callo que creció ligeramente durante 1 mes y medio más hasta que las células se depigmentaron y murieron. En el género Laminaria, Saga & Sakai (1983) observaron la formación de callo en explantos del estipe de L. angustata en un mes, mientras que Lee (1985) detecta la aparición y desarrollo de filamentos internos a los 9 meses de sembrar explantos del estipe de L. saccharina. Los esporofitos de L. digitata, desarrollados in vitro por Fries (1980), alcanzaron una longitud de 12mm en 4 meses. Los resultados más espectaculares en lo que a tasa de propagación se refiere fueron obtenidos por Saga y colaboradores con el alga parda Dyctiosiphon foeniculaceus, la cual propagaron vegetativamente en fase filamentosa (microtalo) con la adición al medio de manitol. Sin embargo, la propagación no trascendió más allá del crecimiento filamentoso con la formación de masas celulares (callo filamentoso, según los autores) de hasta 1cm de diametro. No se obtuvo la regeneración de talos.

A la dificultad en la comparación de resultados

derivada de la utilización de especies diferentes, se añade la inexistencia de datos cuantitativos con los que hacerla. En algunos casos se han descrito los resultados en función de índices cuantitativos, utilizándose porcentajes para expresar la efectividad del tratamiento de desinfección, la viabilidad de los explantos después de la misma o la capacidad regenerativa o de formación de callo. En algas rojas Chen (1982) obtiene un 40% de explantos supervivientes a la desinfección de los cuales un 40% eran axénicos. Chen & Taylor (1978) describen la regeneración del 10% de los explantos sembrados de Chondrus crispus. En algas pardas Saga & Sakai (1983) obtienen un 100% de efectividad del tratamiento de desinfección. Fries (1980) obtuvo un 20% de formación de callo en especies de Laminaria. Mooney & van Staden (1984) describen con porcentajes de regeneración la respuesta de explantos de diferente procedencia del talo de Sargassum heterophyllum, utilizando también como índice de crecimiento el número absoluto de yemas formados por los diferentes tipos de explantos.

La elección y utilización de índices de crecimiento y regeneración adecuados es otro de los campos a desarrollar dentro del cultivo de tejidos de macroalgas marinas. En el cultivo de tejidos de plantas superiores

se han utilizado una gran variedad de índices cuantitativos de crecimiento y desarrollo [46], algunos de los cuales podrían ser adaptados al cultivo de tejidos de macroalgas marinas.

I.3. Cultivo de callos, células libres y protoplastos de macroalgas marinas

Una vez realizadas las consideraciones previas acerca de los de los problemas teminológicos y metodológicos del cultivo de tejidos de macroalgas marinas, podemos abordar la descripción de los resultados más importantes que afectan a la formación de callo, células libres y protoplastos. La exposición de resultados la haremos distinguiendo las especies según pertenezcan a las divisiones Chlorophyta, Rhodophyta o Phaeophyta. Es conveniente aclarar de nuevo que se consideran como callo, indistintamente lo descrito como callo o "callus-like", por las razones aludidas, y que los resultados descritos por los diferentes autores se han obtenido en la variedad de condiciones expuestas en apartados anteriores de esta introducción.

Sólo se han considerado aquellos trabajos cuyo objetivo se centra en la aplicación del cultivo de tejidos a las macroalgas marinas, dejando al margen resultados afines (obtención o descripción de es-

estructuras semejantes a callo) obtenidos con métodos de cultivo no estrictamente clasificables como de cultivo de tejidos.

I.3.1. Macroalgas de la división Chlorophyta (Tabla I.3).

De las especies descritas sólo dos, Enteromorpha intestinalis y Ulva angustata, han formado callo en cultivo. No se debe interpretar con este hecho que las algas verdes muestren poca predisposición a la formación de callo, ya que el uso de las algas de este grupo para el cultivo de tejidos se ha orientado, básicamente, hacia la obtención y regeneración de protoplastos. Las algas verdes se han adaptado perfectamente a la metodología (tipos de enzimas, agentes osmóticos, etc.) del aislamiento de protoplastos de plantas superiores, hecho que se ha relacionado con su proximidad evolutiva [169]. Aparte de los éxitos en el aislamiento de protoplastos, es destacable el que tanto callos como células libres o protoplastos regeneren con facilidad nuevos talos. Estas características del cultivo de tejidos de las algas verdes las convierten en la vanguardia del desarrollo de la biotecnología vegetal marina. Desafortunadamente, los intereses comerciales relacionados con las algas verdes no son tan importantes como los que

TABLA. I.3. Antecedentes del cultivo de tejidos de macroalgas marinas de la división Chlorophyta

<u>Especie</u>	<u>Formación Callo</u>	<u>Desarrollo del callo</u>	<u>Obtención Células libres</u>	<u>Obtención Protoplastos</u>	<u>Desarrollo Celular</u>	<u>Autores</u>
Drapanaldia mutabilis				Sí	Planta	Larpent & Aumaitre, 1987
Enteromorpha intestinalis	Sí	Planta		Sí	No	Millner y col., 1979 Saga, 1984 Fujita & Migita, 1985 Polne-Fuller & Gibor, 1987
Enteromorpha linza				Sí	Planta	Saga, 1984 Fujita & Migita, 1985
Monostroma nitidum				Sí	Planta	Saga, 1984
Prasiola stiptata			Sí		Planta	Bingham & Schiff, 1973 Schiff y col., 1977
Ulva angustata	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987
Ulva pertusa				Sí	Planta	Saga, 1984 Fujita & Migita, 1985
Ulvaria				Sí	Planta	Kapraun, 1987

Desarrollo celular= desarrollo de las células libres o protoplastos obtenidos.
Planta= regeneración de un nuevo talo.

se basan en algas rojas o pardas.

Aunque se traten de algas pluricelulares no marinas, son de mencionar los trabajos de Ohiwa [143, 144, 145] de aislamiento, regeneración e hibridación somática (fusión) de protoplastos de las especies Zygnema extenu, Spyrogira gracilis y Mougeotia sp, ya que corroboran el grado de adaptación de las algas verdes a las técnicas del cultivo de tejidos y suponen los primeros intentos realizados en este campo con algas eucariotas pluricelulares

I.3.2. Macroalgas de la división Rhodophyta (tabla I.4)

En general las algas rojas responden de forma efectiva a la inducción de callo en cultivo. La mayoría de las especies estudiadas son capaces de regenerar masa celulares de aspecto desorganizado. El problema se centra en controlar la regeneración de talos después de la formación del callo. Sólo Agardhiella subulata ha respondido de forma efectiva, pudiendose controlar su desarrollo con variaciones en las condiciones físicas de cultivo (irradiación, nutrientes y agitación del medio). En el resto de las especies la regeneración a partir de callo se produce de forma espontánea.

Respecto al crecimiento del callo, los resultados más sorprendentes son los descritos por Misawa(1977),

que recoge los resultados obtenidos en el cultivo de tejidos de las algas Gelidium amansii , Gelidium subcostatum y Gracilaria confervoides expuestos en una patente japonesa del año 1974. Lo cierto es que no existe constancia de la publicación de tales resultados u otros obtenidos posteriormente a esa fecha. Tales circunstancias generan cierta duda sobre la autenticidad de los mismos, siendo posible que más que resultados experimentales, la patente recogiera una idea a desarrollar.

El aislamiento de células libres y protoplastos de algas rojas requiere de combinaciones enzimáticas complejas o de extractos crudos del sistema digestivo de herbívoros marinos [34, 35, 116, 117, 149, 166].

Las células liberadas del talo de Porphyra yezoensis regeneraron nuevos talos [203]. Las de Porphyra perforata regeneran masas celulares (callo) o nuevos talos dependiendo de si el medio de cultivo fué agitado, en el primer caso, o permaneció sin agitación en el segundo [149]. Las células libres de Porphyra miniata dieron lugar a masas celulares que regeneraron nuevos talos [34].

El control del crecimiento y la regeneración en cultivo de células libres y protoplastos supone un paso esencial antes de poder abordar la transformación gené-

tica de los mismos. Cheney y colaboradores (1986) creen que la incapacidad de regeneración de los protoplastos de especies de Gracilaria podría radicar en la necesidad de los mismos de algún regulador de crecimiento. Liu & Gordon (1978) tampoco tuvieron éxito en la regeneración de protoplastos de especies de Pterocladia. Sólo se ha conseguido la regeneración de masas celulares (callo) y/o plantas en especies del género Porphyra. No obstante no se puede decir que en tales especies se controlara la regeneración de los protoplastos, transcurriendo la misma como un proceso espontáneo [34, 116].

Anteriormente destacábamos los resultados descritos por Misawa (1977) como resultados atípicos en el contexto general de la inducción y cultivo de callos de algas rojas. En el aislamiento y regeneración de protoplastos debemos hacerlo con los resultados de Nichols (1980) quien describe la obtención, regeneración e hibridación somática de protoplastos de diferentes algas rojas. No se tienen conocimiento de la existencia de publicaciones posteriores, referentes a la descripción más detallada de los métodos de aislamiento de protoplastos e hibridación somática empleados por Nichols (1980). Tampoco se describen las especies que se utilizaron para la realización del trabajo.

TABLA I.4. Antecedentes del cultivo de tejidos de macroalgas marinas de la división Rhodophyta

<u>Especie</u>	<u>Formación de callo</u>	<u>Desarrollo del callo</u>	<u>Obtención células libres</u>	<u>Obtención Protoplastos</u>	<u>Desarrollo celular</u>	<u>Autores</u>
Agardhiella subulata	Sí	Planta				Bradley & Cheney, 1986
Chondrus crispus	Sí	Planta				Chen, 1982
Euchema alvarezii	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987
Euchema uncinatum	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987
<u>Gelidium</u>						
G. amansii	Sí	crecimiento				Misawa, 1977
G. subcostatum	Sí	crecimiento				Misawa, 1977
G. robustum	Sí	No				Polne-Fuller & Gibor, 1987
<u>Gracilaria</u>						
G. confervoides	Sí	crecimiento				Misawa, 1977
G. epihippsora	Sí	?	Sí	Sí	callo	Apt, 1984
G. tikvahiae				Sí	No	Cheney y col., 1986
G. lemaneiformis				Sí	No	Cheney y col., 1986
G. papenfussii	Sí	No				Polne-Fuller & Gibor, 1987
<u>Porphyra</u>						
P. yezoensis			Sí	Sí	Planta	Zhao & Zhan, 1981 Saga & Sakai, 1984 Fujita & Migita, 1985
P. perforata	Sí	Planta	Sí		Callo/ Planta	Polne-Fuller y col., 1984 Polne & Gibor, 1984 Polne-Fuller & Gibor, 1987

Tabla I.4 Continuación

<u>Especie</u>	<u>Formación de callo</u>	<u>Desarrollo del callo</u>	<u>Obtención células libres</u>	<u>Obtención Protoplastos</u>	<u>Desarrollo celular</u>	<u>Autores</u>
P. miniata			Sí		Planta	Chen, 1986
P. leucosticta				Sí	Callo/ Planta	Chen, 1987
P. suborbiculata				Sí	Planta	Liu y col., 1984
P. nereocystis	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987
P. lanceolata	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987
<u>Pterocladia</u>						
P. capillacea	Sí	crecimiento	Sí		No	Liu & Gordon, 1987
P. lucida			Sí		No	Liu & Gordon, 1987
P. columbina			Sí		No	Liu & Gordon, 1987
Prionitis lanceolata	Sí	No				Polne-Fuller & Gibor, 1987
Smithora naidadum	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987

Desarrollo celular= desarrollo de células libres y/o protoplastos obtenidos.

No = no desarrollo ulterior a la obtención de regeneración de callo o la liberación de células o protoplastos.

? = no descrito.

Planta= desarrollo de un nuevo talo.

I.3.3. Macroalgas de la división Phaeophyta (tabla 1.5)

El cultivo de tejidos de algas pardas tiene rasgos generales similares a los descritos en algas rojas:

- * Formación de callo en la mayor parte de las especies ensayadas, con la regeneración de plantas a partir del mismo, sin que se conozcan métodos de control de los patrones de crecimiento y desarrollo del callo.

- * Aislamiento de células libres y protoplastos que requiere de la utilización de extractos crudos de sistema digestivo de herbívoros marinos [60, 77, 116, 140, 168] o de bacterias [77].

Las células libres aisladas de Laminaria angustata regeneran espontáneamente nuevos talos, no permitiendo el establecimiento de cultivos celulares en suspensión [163].

No se ha podido regenerar planta a partir de los protoplastos aislados.

Desde el punto de vista de la aplicación genética del cultivo de tejidos en las algas, son destacables los resultados obtenidos por Lee (1986), quien detecta la presencia de diferentes grados de ploidia en células de callo de Laminaria saccharina. Del mismo modo resaltan los resultados de Fang y col. (1979), quienes después de inducir la formación de callo haploide de Laminaria japónica, promueven la diploidización y generan estados

diploides que resultan en plantas esporofíticas normales.

TABLA I.5. Antecedentes del cultivo de tejidos de macroalgas marinas de la división Phaeophyta

<u>Especie</u>	<u>Formación de callo</u>	<u>Desarrollo del callo</u>	<u>Obtención células libres</u>	<u>Obtención Protoplastos</u>	<u>Desarrollo celular</u>	<u>Autores</u>
Cystoseira osmundacea	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987
Dyctiosiphon foeniculaceus	Sí	crecimiento				Saga y col., 1982
Egregia menziesii	Sí	crecimiento				Polne-Fuller & Gibor, 1987
<u>Laminaria</u>						
L. digitata	Sí	Planta				Fries, 1980
L. hyperborea	Sí	Planta				Fries, 1980
L. angustata	Sí	No	Sí		Planta	Saga y col., 1978 Saga & Sakai, 1983 Lee, 1985
L. saccharina	Sí	Planta				
L. japonica	Sí	Planta				Fang y col., 1979 Fang, 1984
L. sinclairii	Sí	Planta				Polne-Fuller & Gibor, 1987
Macrocystis pyrifera	Sí	Planta				Saga & Sakai, 1984 Polne-Fuller & Gibor, 1987 Zuo-Mei, 1984
Pelvetia fastigiata	Sí	No				Polne-Fuller & Gibor, 1987
<u>Sargassum</u>						
S. natans				Sí	?	Neushul, 1983
S. filipendula				Sí	?	Neushul, 1983
S. hystrix	Sí	Planta		Sí	?	Neushul, 1983 Polne-Fuller & Gibor, 1987

TABLA I.5 Continuación.

<u>Especie</u>	<u>Formación de callo</u>	<u>Desarrollo del callo</u>	<u>Obtención células libres</u>	<u>Obtención Protoplastos</u>	<u>Desarrollo celular</u>	<u>Autores</u>
S. pteropleuron				Sí	?	Neushul, 1983
S. muticum	Sí	Planta		Sí	?	Neushul, 1983 Fisher & Gibor, 1987 Polne-Fuller & Gibor, 1987
S. sinicola				Sí	?	Neushul, 1983
S. polyphyllum				Sí	?	Fisher & Gibor, 1987
S. echinocarpum				Sí	?	Fisher & Gibor, 1987
S. fluitans	Sí	No				Polne-Fuller & gibor, 1987
Stypopodium sp	Sí	No		Sí	?	Polne-Fuller y col., 1986
Undaria pinnatifida	Sí	Planta		Sí	No	Zuo-Mei, 1984 Fujita & Migita, 1985
Undaria sp			Sí	Sí	No	Liu y col., 1984

Desarrollo celular= desarrollo ulterior de células y protoplastos obtenidos.
 No = no desarrollo posterior de callo o células.
 ? = no intentado ó no descrito.
 Planta = desarrollo de un nuevo talo.

I.4. Objetivos del trabajo

Las Islas Canarias poseen una gran variedad de especies algales que suponen, a nivel de género, aproximadamente el 40% (14% Phaeophyta; 50% Rhodophyta y 80% Chlorophyta) de los descritos como de máxima utilización en el Mundo [29, 85, 86, 146, 192]. El desarrollo de métodos de cultivo que suplan la carencia de efectivos algales en las poblaciones naturales [28], combinado a la selección genética de especies de interés comercial, hace factible la idea de convertir las algas en un recurso económico más para la economía de las Islas. Se necesita el desarrollo de sistemas de cultivo que no compitan por el espacio físico actualmente dedicado a otros sectores (ej. zonas costeras de explotación turísticas), donde cultivar clones algales selectos.

La selección genética de macroalgas puede abordarse utilizando los métodos de mejora genética convencionales, trabajando con el organismo completo, o a nivel celular aprovechando las características de las macroalgas marinas y las posibilidades que ofrecen las técnicas de cultivo de tejidos. Los antecedentes del cultivo de tejidos que hemos revisado, al mismo tiempo que demuestran la viabilidad de la aplicación de tales técnicas a las macroalgas marinas, sitúan el estado de desarrollo del cultivo celular de macroalgas en los primeros

pasos, donde se describen resultados obtenidos con las diferentes especies sin que se tenga un control total del sistema.

Los objetivos del presente trabajo se centran en el estudio de los problemas que actualmente posee la aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos a las macroalgas, particularmente en los siguientes aspectos:

- * Desarrollar métodos generales para el establecimiento de cultivos axénicos de diferentes especies algales.

- * La caracterización macro y microscópica de las formas de regeneración en cultivo de diferentes especies algales que nos permita establecer la diferencia entre la forma de crecimiento meramente desorganizado y el callo.

- * El estudio de los parámetros intrínsecos (variabilidad entre explantos) y extrínsecos (condiciones físicas y químicas de cultivo) a la planta que controlan el crecimiento y desarrollo en cultivo.

El objetivo final es conseguir la propagación por cultivo de tejidos, centrándonos en la inducción y cultivo de callos de especies algales que sienten la base para poder abarcar, con ciertas garantías de éxito, otros aspectos de las técnicas como el aislamiento y

regeneración de protoplastos y el establecimiento de cultivos celulares en suspensión.

El control del desarrollo celular permitirá la aplicación de las técnicas desarrolladas en la mejora genética de las macroalgas marinas factor primordial para su posible explotación industrial.

II.- MATERIAL Y METODOS

II.1.- Generalidades.

El material vegetal empleado en los experimentos lo constituyeron cinco especies de macroalgas marinas de la división Rhodophyta Laurencia sp, Gelidium versicolor, Gelidium arbuscula, Gracilaria ferox y Grateloupia doryphora.

El material vegetal usado para el cultivo procedía de recolecciones efectuadas en zonas en las que abundaban las diferentes algas. No se utilizó nunca material vegetal cultivado en el laboratorio.

Se recolectaban plantas de alta pigmentación y bajo grado de epifitismo que no mostraban ningún tipo de estructuras reproductoras en el momento de la recogida. Las recolecciones se programaban y efectuaban en las fechas y horas que señalan los calendarios de mareas del Servicio de Publicaciones de la Marina de Guerra Española. La recogida de material se realizaba a primeras horas de la mañana, con lo que se aseguraba que el tratamiento del material recolectado se realizaría el mismo día.

Se procuraba recoger todo el alga, desde las estructuras de fijación hasta el ápice del talo, limpiando

dolas de restos de sustrato. El material recolectado se agrupaba en bandejas de plástico o aluminio con papel, previamente humedecido con agua de mar, en el fondo de las mismas. Las bandejas se transportaban en una nevera portátil con agua de mar en el fondo.

El material de partida para el cultivo lo constituyeron fragmentos (explantos) de diferentes zonas del talo.

A fin de caracterizar de forma precisa la procedencia del explanto se dividió el talo de las algas en diferentes zonas:

Zona terminal: zona distal del talo de donde se aislaban los explantos terminales.

Zona estipe: estipe o eje central del talo de donde se aislaban los explantos estipe.

Zona Fijación: zona basal de fijación del talo al sustrato de donde se aislaban los explantos anclaje y rizoides.

Los criterios usados en la selección de los explantos fueron los de alta pigmentación, como signo de saludable, y bajo grado de epifitismo.

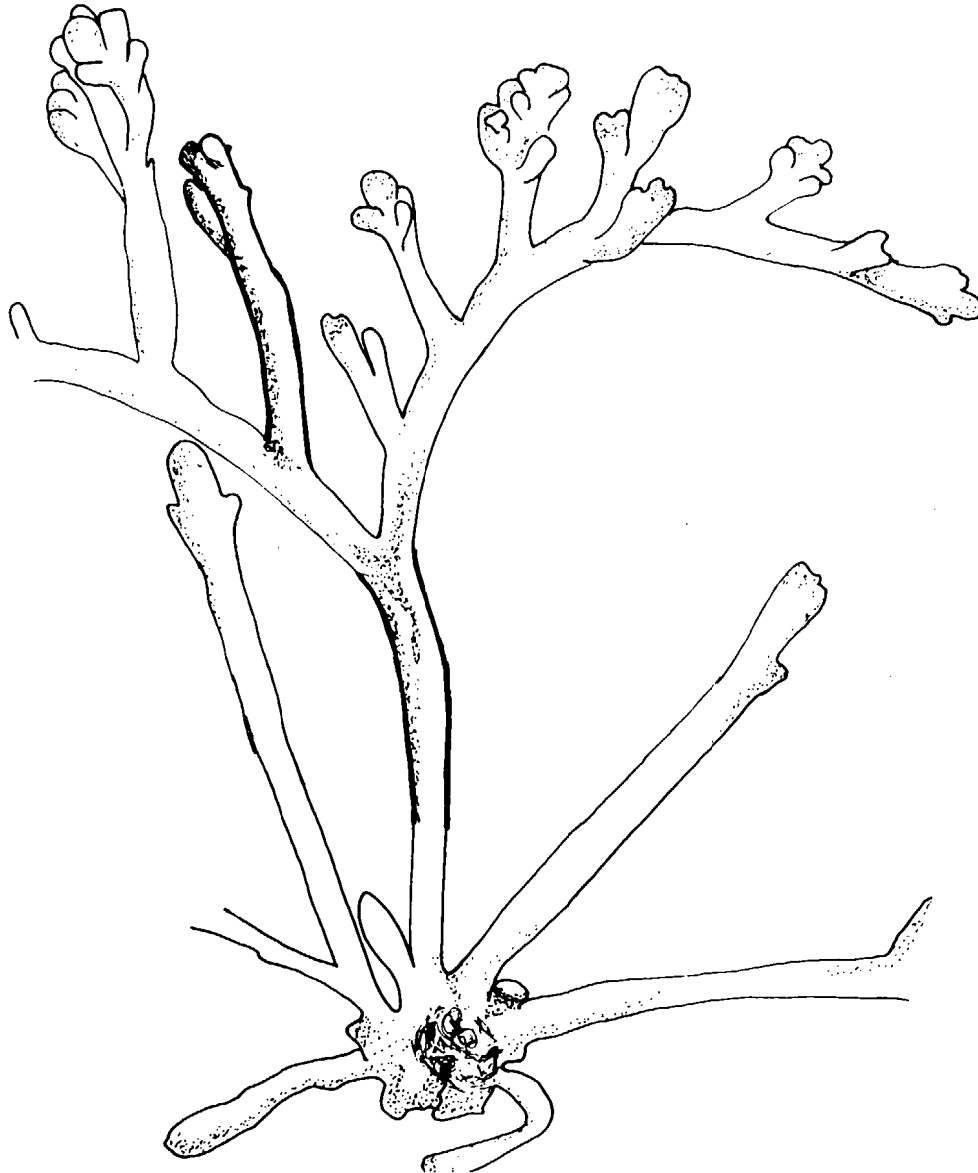
Durante las operaciones de selección y separación del material a cultivar, se mantenía el alga humedecida con frecuentes baños con agua de mar esterilizada por

FIGI.1 LAURENCIA SP

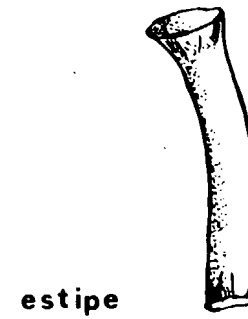
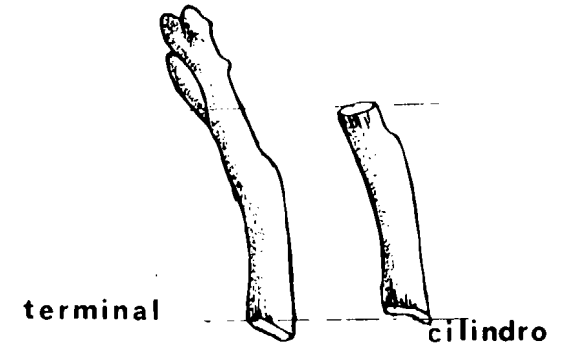
**ZONA
TERMINAL**

**ZONA
ESTIPE**

**ZONA
FIJACION**



EXPLANTOS



autoclavado durante 60 minutos a 120 C y 1 atmósfera de presión.

II.2. Descripción de las especies , explantos y zonas de recolección. [20, 44, 91, 111].

II.2.1. Laurencia sp

Pertenece a la Familia Rhodomelaceae del Orden Ceramiales. Aunque inicialmente fue determinada como Laurencia obtusa, la controversia taxonómica existente con este género de algas nos aconseja dejarla como Laurencia sp.

Es una alga cespitosa de talos de 5-7 cm. de largo, de color rojo-oscuro, incluso negruzco. La ramificación es irregular y tendente a estar en un plano, aunque en las zonas superiores del talo, se acumulan ramas que se disponen radialmente. (Fig.- II.1).

De esta especie se utilizaron los siguientes tipos de explantos: (Fig.- II.1.)

Zona terminal: De la zona terminal se utilizaron los explantos que denominamos:

a) Explanto terminal= ramificación primaria del talo de 1cm de longitud. La polaridad es manifiesta ya que el explanto mantiene el ápice de la ramificación (zona distal del explanto) y la zona de unión de la misma al talo (zona de corte proximal del explanto). El

explanto posee además pequeñas proliferaciones o ramas que surgen en mayor medida hacia la zona distal del mismo. Los explantos terminales elegidos poseían el menor grado de ramificación posible.

b) Explanto cilindro: Era extraído a partir del explanto terminal, escindiendo el ápice y las ramificaciones del mismo. Este explanto tenía forma cilíndrica con dos zonas de corte. La realización de cortes con diferente orientación permitió el control de la polaridad en este explanto, distinguiéndose una zona de corte distal y otra proximal (Fig.- II.1b).

Zona estipe:

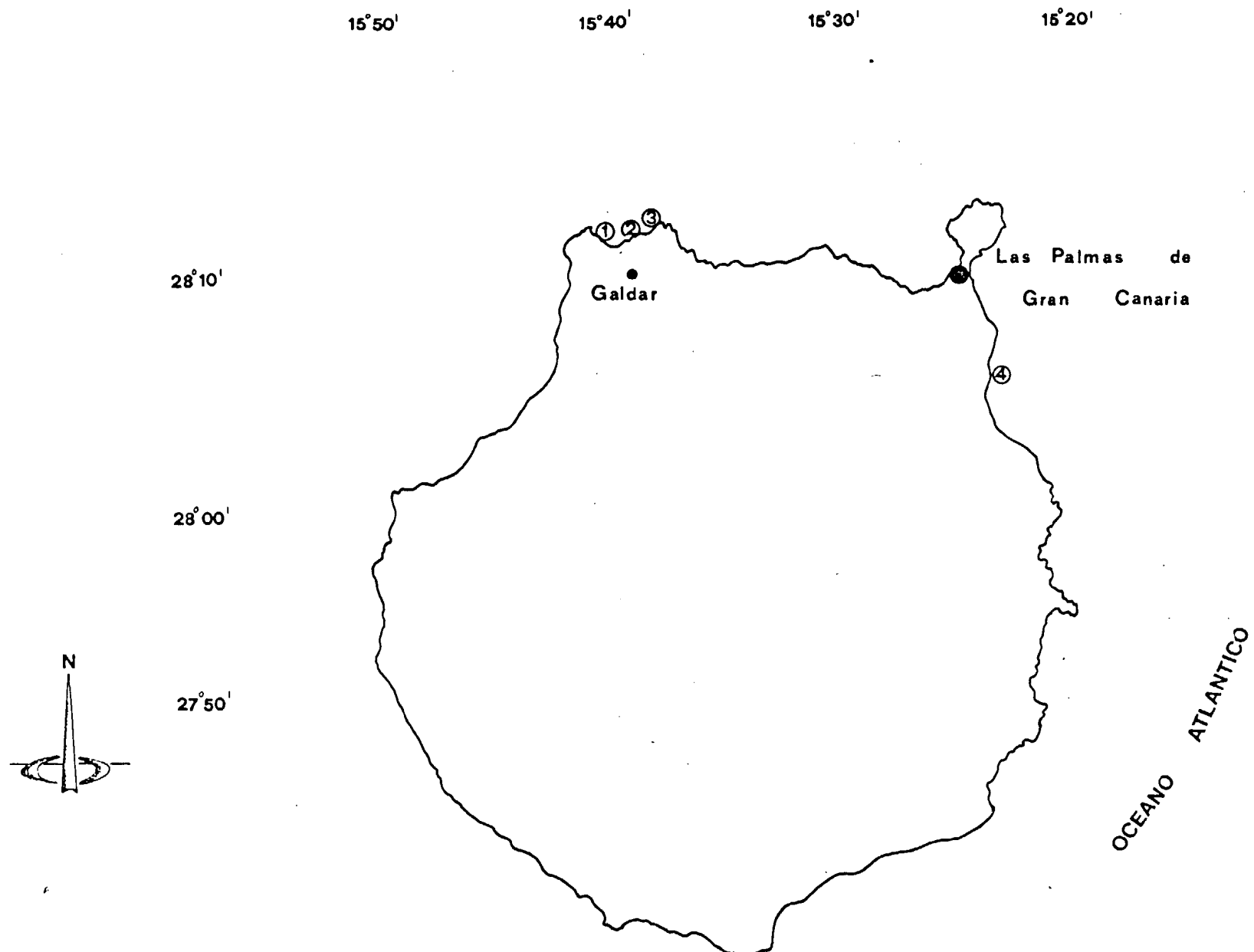
a) Explanto estipe: Fragmento cilíndrico de 1 cm de longitud. Era extraído de la zona del estipe inmediatamente inferior a la de aparición de las primeras ramificaciones.

Zona fijación:

a) Explanto anclaje: Porciones de aproximadamente 0,2 cm² extraídas de la masa amorfa que conforman la base de los talos y que fija los mismos al sustrato.

Laurencia sp se recolectó en La Furnia (Galdar) (Figs.- II.2. II.3). La zona de recolección es una plataforma rocosa donde es posible encontrar el alga recubriendo entrantes rocosos expuestos al oleaje duran-

Fig.II.2.-Mapa localización de las zonas de recolección de las algas: 1.Laurencia sp. 2.Gracilaria ferox. 3.Gelidium versicolor, Gelidium arbuscula. 4.Grateloupia doryphora.



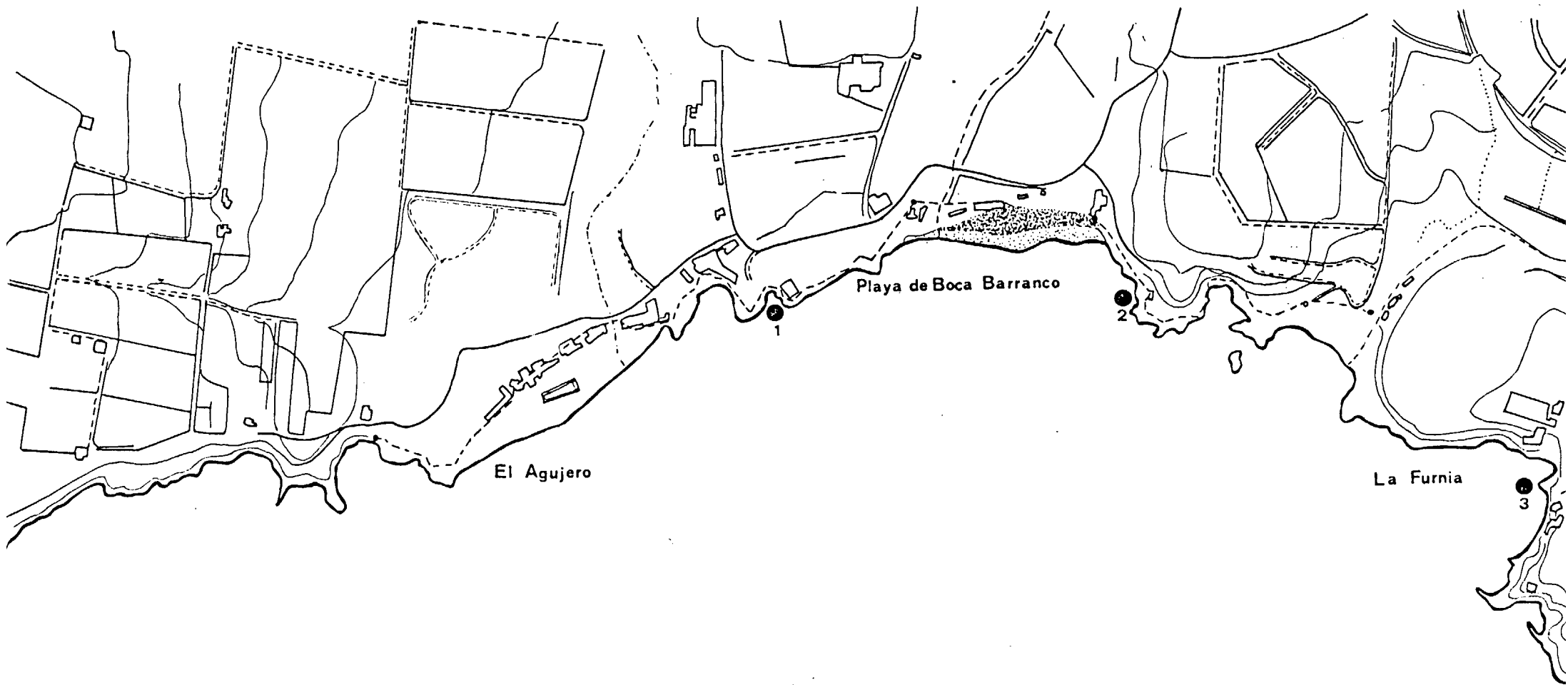


FIG.II.3.-Mapa de localización detallada de las zonas de recolección de Laurencia sp. 3; Gracilaria.2; Gelidium.1.

te la bajamar y cubiertos en la pleamar.

II.2.2. Gelidium versicolor. (S. Gruel) Lamour.

Es un alga perteneciente a la Familia Gelidiaceae del Orden Nemaliales.

Son plantas de color rojo-negrusco y ramificación irregular con ramas de diferentes longitudes. Los talos quedan fijados al sustrato por rizoides que emergen lateralmente en la base del eje principal (Fig.- II.4). A partir de los rizoides, y perpendicularmente, surgen nuevos talos, dando como resultado el que la población pueda ser subdividida en núcleos o "familias" de plantas que agrupan hasta 100 talos, con tamaños variables de hasta 20 cm de longitud.

De esta especie se utilizaron los siguientes tipos de explantos: (Fig.- II.4).

Zona terminal:

a) Explanto terminal: Ramificación primaria de 1cm de longitud que posee ramificaciones pequeñas a lo largo de toda su extensión. Se distinguen dos zonas en el mismo, la distal, que consiste en el ápice de la rama y la proximal o zona de corte por donde se le separa del resto del talo.

Zona estipe:

a) Explanto estipe: porción cilíndrica de 1 cm de

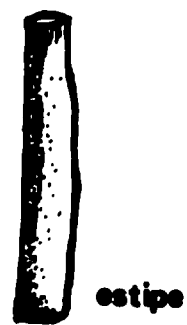
FIG11.4 GELIDIUM VERSICOLOR

**ZONA
TERMINAL**

**ZONA
ESTIPE**

**ZONA
FIJACION**

EXPLANTOS



0.5 cm

longitud extraída de la zona inmediatamente inferior a la de aparición de las primeras ramificaciones.

Zona de fijación:

a) Explanto rizoide: fragmentos de 0,5 cm de rizoides del talo.

Gelidium versicolor se recolectó en El Agujero (Galdar) (Fig.- II.3). La zona de recolección es una plataforma rocosa, cubierta por un manto de Gelidium que abarca prácticamente toda la zona intermareal, pero acumulándose en mayor cantidad hacia el borde inferior más en contacto con el oleaje.

II.2.3. Gelidium arbuscula Bory

Especie perteneciente a la Familia Gelidiaceae del Orden Nemaliales.

Es una especie de morfología similar a G.versicolor, distinguibles, no obstante, por poseer el talo aplanado de color rojo, de tamaño variable de hasta 10 cm y con ramificación a partir de los bordes, localizada, en mayor medida, en las zonas viejas del talo. En la base de los talos surgen rizoides a partir de los cuales se produce la regeneración de nuevos talos (Fig.- II.5)

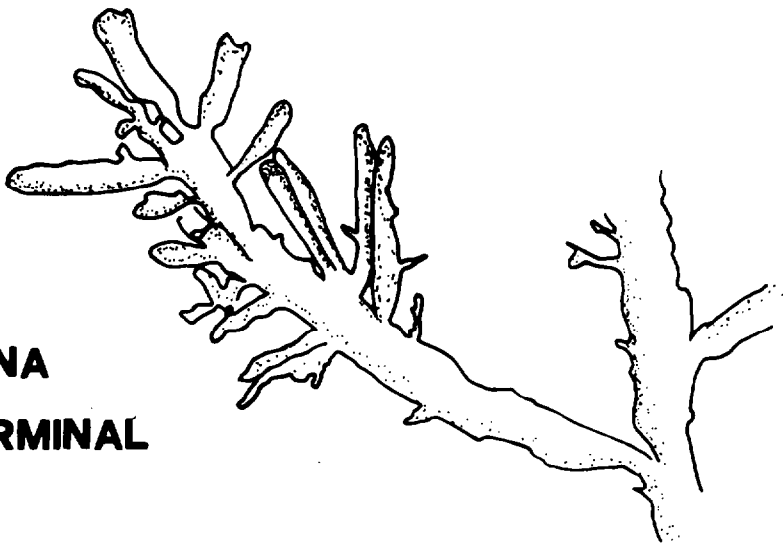
De esta especie se utilizaron los siguientes tipos

FIGI.5 GELIDIUM ARBUSCULA

(A)

EXPLANTOS

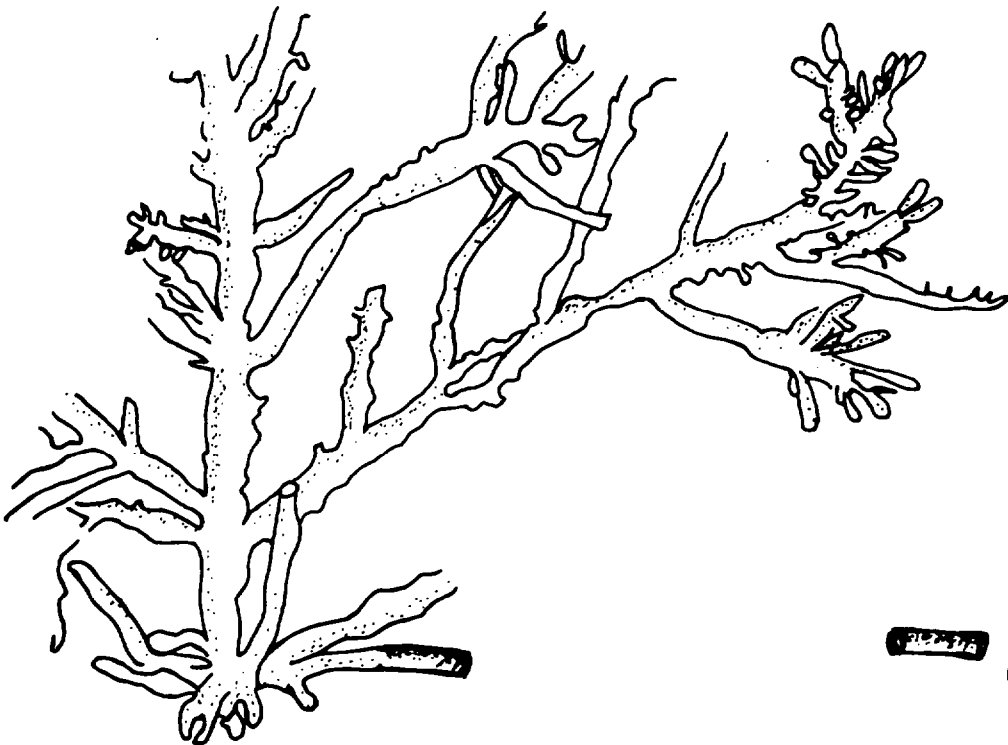
**ZONA
TERMINAL**



0,3 cm

(B)

**ZONA
FIJACION**



rizoide

0,5 cm

de explantos: (Fig.- II.5)

Zona terminal:

a) Explanto terminal: Ramificación primaria de 1cm de longitud, que posee, a su vez, pequeñas ramificaciones a la largo de toda su extensión. El explanto posee ápice (zona distal) y zona de corte (zona proximal).

Zona de fijación:

a) Explanto rizoides: porciones de 0,5 cm de los rizoides del talo.

G. arbuscula se recolectó en El Agujero (Galdar), donde es localizado definiendo una "banda" intermedia entre el nivel del mar y G.versicolor. No obstante, la densidad de talos de G.arbuscula en la zona de recolección es muy inferior respecto a la de G.versicolor.

II.2.4. Gracilaria ferox J. Agardh.

Es una especie perteneciente a la Familia Gracilariaceae del Orden Gigartinales.

Son plantas de talo erecto de 4 a 10 cm., de color rojizo-marron, llegando a ser verdosa dependiendo de la época de recolección. Las ramas surgen en disposición regular a lo largo del talo, dando una apariencia corimbosa en las zonas superiores y con ápices obtusos o agudos.(Fig.- II.6).

La mejor época para la recolección de esta especie coincide con el alga en estado reproductor, gametofito, distinguible por la presencia en el talo de cistocarpos

De esta especie se utilizaron los siguientes tipos de explantos: (Fig II.6)

Zona terminal:

a) Explanto terminal: Ramificación primaria de 1cm de longitud elegida de zonas carentes de cistocarpos. Posee zona distal (ápice de la ramificación) y proximal (zona de corte).

Zona estipe:

a) Explanto estipe: fragmento cilíndrico de 1cm de longitud extraído de la zona inmediatamente inferior a la de aparición de las primeras ramificaciones del eje principal del talo.

G. ferox se recolectó en Bocabarranco (Galdar) (Fig.- II.3). La zona es una plataforma rocosa, donde es posible localizar el alga formando pequeñas poblaciones en el interior de charcos del borde superior de la zona intermareal.

II.2.5. Grateloupia doryphora (Montagne) Howe.

Esta especie pertenece a la Familia Cryptonemiaceae del Orden Cryptonemiales.

Son plantas erectas con un estipe muy pequeño de

FIGII.6 GRACILARIA FEROX

**ZONA
TERMINAL**

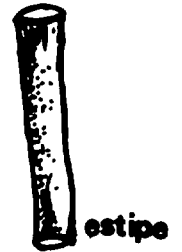


**ZONA
ESTIPE**

EXPLANTOS



terminal



estipe

0,5 cm

color rojo oscuro que se expande en una lámina asimétrica, de color rojo en la base llegando a ser verdosa en las porciones apicales. En los márgenes de la lámina existen pequeñas proliferaciones de la misma.(Fig.-II.7).

La morfología prácticamente laminar de G. doryphora impidió la división del talo en las zonas descritas para las otras algas. En esta especie los explantos utilizados procedieron de la lámina. Tales explantos fueron: (Fig.- II.7).

a) Explanto disco: disco de 0,3 cm de diametro extraido de la zona coloreada de la base de la lámina

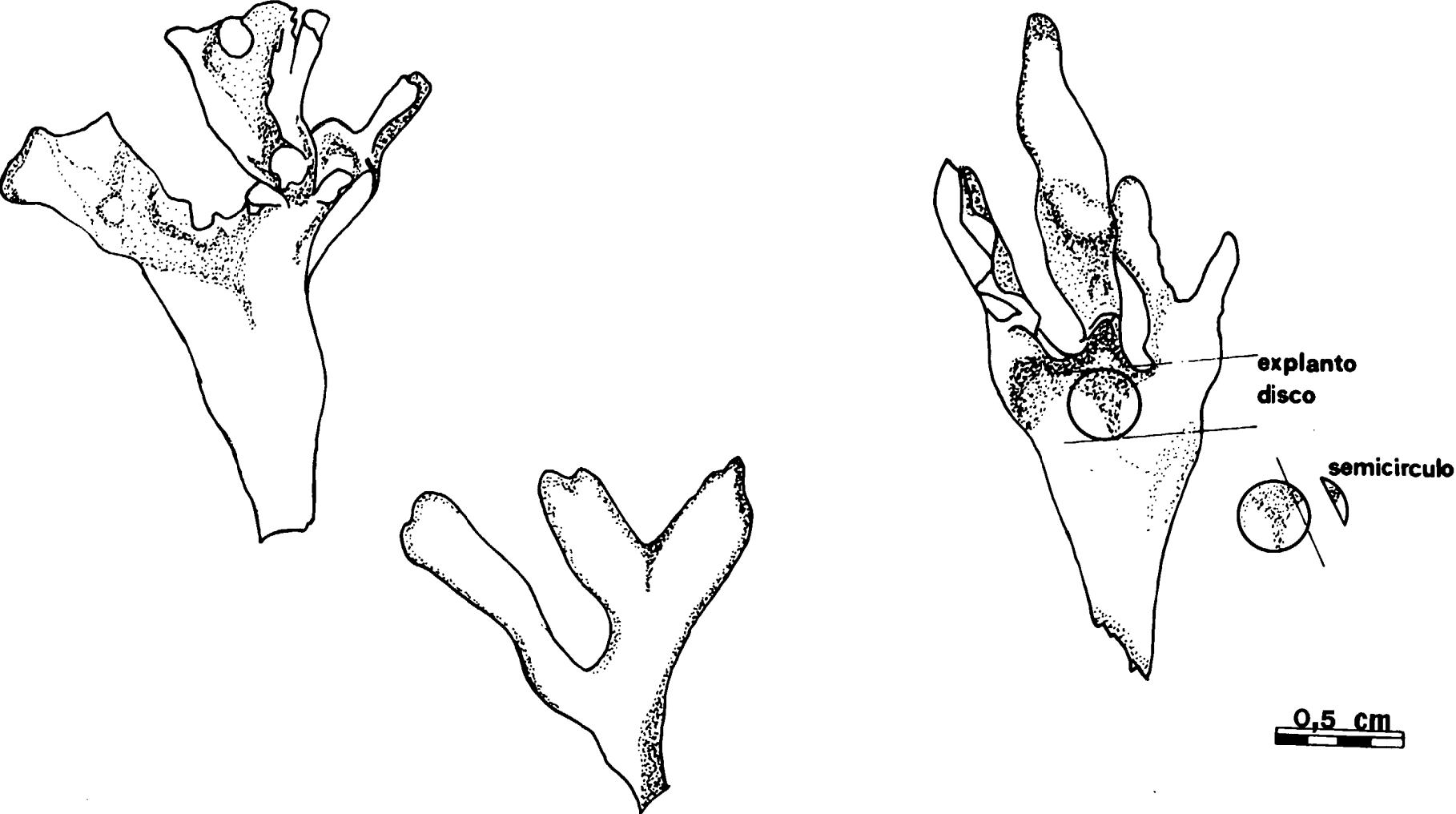
b) Explanto semicírculo: Porción semicircular del borde externo del explanto disco.

G. doryphora se recolectó en Las Palmas G.C (Fig.-II.2). La zona de recolección es una plataforma rocosa (Fig.-II.8), sobre la que se dispone G.doryphora formando grupos de plantas expuestos en la bajamar, o sumergida en charcos poco profundos.

II.3. Composición y preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado es una variación del medio ESP (Enriched seawater Provasoli, Provasoli 1968), con modificaciones que afectan a la concentración de vitaminas, con adición de piridoxina, la eliminación del TRIS y la sustitución de algunas sales por otras,

FIGI.7 GRATELOUPIA DORYPHORA



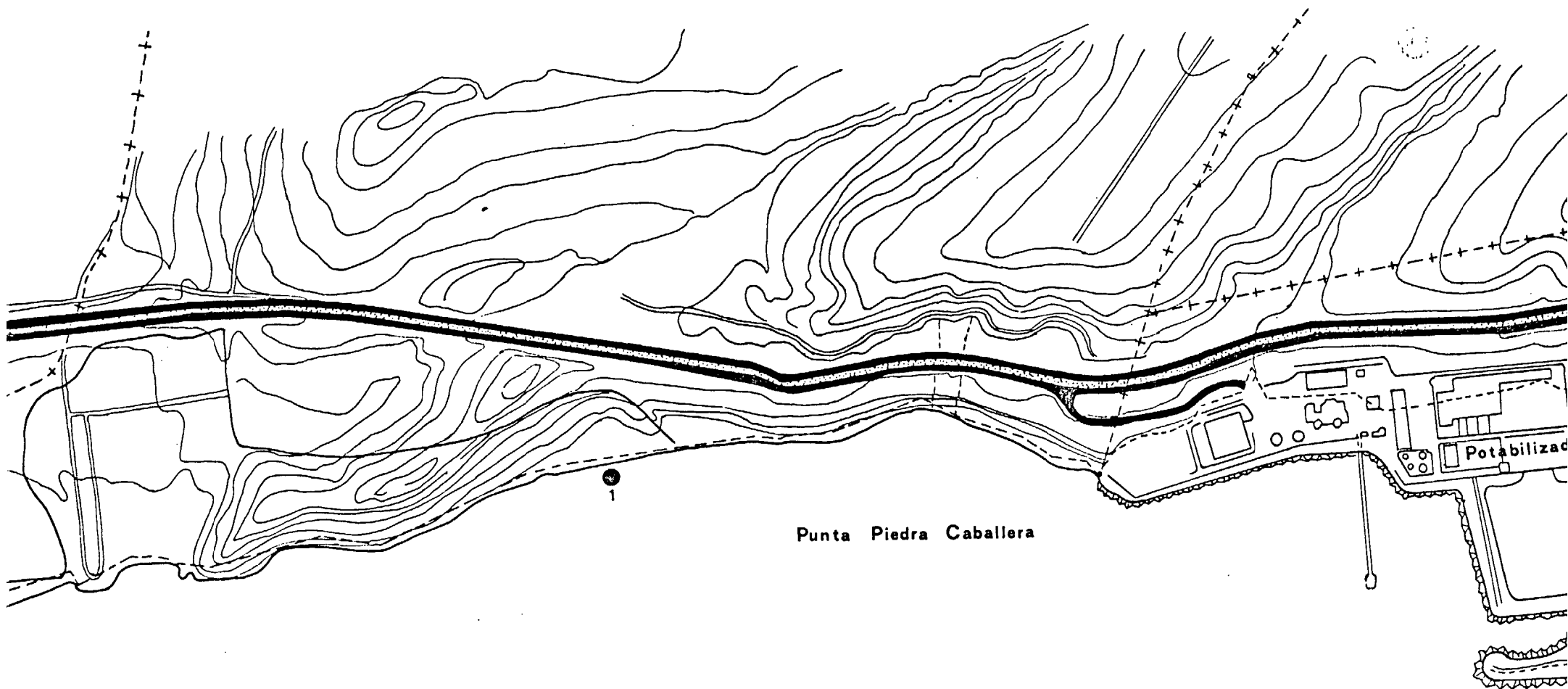


Fig.II.8.-Mapa de localización detallada de la zona de recolección de Grateloupia doryphora. (1).

aunque manteniendo las mismas relaciones molares de los elementos originales del medio de Provasoli.

En la tabla II.1 se compara la composición del medio ESP de Provasoli con el medio utilizado que hemos denominado mESP.

En la elaboración del medio mESP se utilizaban cuatro tipos de soluciones stock:

- A) Agua de mar pretratada.
- B) Solución de micronutrientes (solución PII).
- C) Solución de EDTA-Férrico. (Solución EDTA-Fe).
- D) Solución de vitaminas.

A) Agua de mar pretratada

El agua de mar utilizada para la elaboración del medio de cultivo era recogida por un sistema de bombeo a 7 metros de profundidad y filtrada, a través de tres filtros de 100, 10 y 1 μ m., antes de pasar por tres tubos iluminados con luz U.V. El agua era almacenada en recipientes de plástico oscuro de 50 litros a 4 C durante un periodo máximo de 40 días.

B) Solución de micronutrientes.

Las sales utilizadas en la elaboración de esta solución eran de grado analítico o puro de las marcas BDH o Merck.

TABLA II.1. Comparación de la composición de los medios de cultivo ESP (Provasoli, 1968) y mESP

<u>MACRONUTRIENTES</u>	Concentración (mM)		Peso (mg/l)	
	ESP	mESP	ESP	mESP
NaNO ₃	8,24E-1	8,24E-1	70	70
Na ₂ -Glicerol-fosfato.H ₂ O	4,63E-2	4,63E-2	10	10
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O.	8,95E-3	-	3,51	-
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	8,87E-3	8,87E-3	3,30	3,30
FeSO ₄ .7H ₂ O.	-	8,18E-3	-	2,45
TRIS	8,25E-1	-	100	-
<u>MICRONUTRIENTES</u>				
FeCl ₃ .6H ₂ O	9,27E-4	-	0,245	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,83E-4	-	0,110	-
H ₃ BO ₃	9,22E-2	9,22E-2	5,70	5,70
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,00E-3	-	0,82	-
CoSO ₄ .7H ₂ O	8,54E-5	-	0,024	-
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	1,43E-2	1,34E-2	5,00	5,00
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	8,99E-4	-	0,25
ZnCl ₂	-	3,85E-4	-	0,052
MnSO ₄ .H ₂ O.	-	3,61E-3	-	0,61
CoCl ₂	-	1,54E-4	-	0,020
<u>VITAMINAS</u>				
Tiamina-HCl	2,96E-4	2,96E-3	0,1	1,0
Piridoxina	-	4,86E-5	-	0,01
Biotina	4,09E-6	4,09E-5	0,001	0,01
B12	1,48E-6	1,48E-5	0,002	0,02
<u>AGUA DE MAR</u>			1000ml	1000ml

Para evitar precipitaciones en la preparación de la solución, las sales se pesaban y añadían una a una hasta estar completamente disueltas. El Cl_2Zn y el ClCo eran añadidos, ya disueltos, a partir de una solución madre 10 veces más concentrada (Tabla.- II.2)

La solución de micronutrientes se almacenaba en frascos de 50ml a -18C .

C) Solución de EDTA Ferrico (Solución EDTA-Fe).

Esta solución contiene 1 mg. de Fe por ml. La relación molar Fe:EDTA es 1:1 (Tabla.- II.2). En su elaboración, al igual que para la solución de micronutrientes, las sales se añadían una a una hasta estar disueltas.

La solución EDTA-Fe se almacenaba en frascos de 50 ml. a -18C .

D) Solución de vitaminas

Para la preparación de la solución madre de vitaminas la biotina, piridoxina y B12 eran añadidas a partir de soluciones aún más concentradas (Tabla.- II.2.).

La solución de vitaminas y las soluciones stock a partir de las cuales se preparaba se almacenaban a -18C .

En la tabla II.3. se recogen las cantidades añadidas de las diferentes soluciones para la preparación

del medio mESP. Además se añadían, por litro de medio, 70 mg de NaNO_3 y 10 mg de Glicerol fosfato.

Si el medio de cultivo se requería sólido se añadían 8 g/l de agar. En algunos ensayos se añadieron 3 y 15 g/l de agar.

La preparación del medio finalizaba ajustando el pH a 7,8 y esterilizando, en el interior de los recipientes de cultivo, si el medio era líquido o en los recipientes de preparación si era sólido. El medio sólido se vertía, después de la esterilización, en placas de petri en el interior de la cámara de flujo laminar (Glatt Labortecnic).

El medio de cultivo se esterilizaba con un paso por autoclave de 20 minutos a 120 C y 1 Kg/cm² de presión. Tal procedimiento de esterilización causa un incremento constante de 0,5 unidades de pH. La adición de TRIS no impide tal oscilación, que es además independiente del volumen de medio de cultivo autoclavado. (Tabla.- II.4).

Tabla II.2. Composición de las diferentes soluciones madre usadas la elaboración del medio mESP

Solución Micronutrientes

<u>Metal</u>	<u>Peso metal</u>	<u>Peso sal</u>	<u>Sal</u>
Fe	10,41 mg	50,34 mg	FESO4.7H2O
B	0,20 g	1,14 g	H3BO3
Mn	40,00 mg	122,9 mg	SO4Mn.H2O
Zn	5,00 mg	10,48 mg	ZnCl2
Co	1,00 mg	4,03 mg	CoCl2
EDTA.		1000 mg	Na2-EDTA.2H2O
Agua	200ml.	agua DESTILADA	

Solución de Cl2Zn y Cl2Co

<u>Sal</u>	<u>Peso sal</u>	<u>Adición a PII</u>
ZnCl2	104,8 mg	1 ml
CoCl2	40,3 mg	1 ml
agua	10 ml	DESTILADA.

Solución EDTA-Fe

<u>Sal</u>	<u>Peso sal</u>
Fe SO4.7H2O	245 mg
Na2-EDTA.2H2O	330 mg
Agua	50 ml DESTILADA

solución de vitaminas

<u>Vitamina</u>	<u>Peso</u>
Tiamina-HCl	100 mg
Biotina	1 mg
Piridoxina	1 mg
B12	0,2 mg
agua	100ml DESTILADA.

TABLA II.2. (Cont.).

Soluciones de biotina, piridoxina y B12

<u>Vitamina</u>	<u>Peso</u>	<u>Volumen añadido a solución de vitaminas</u>
Biotina	10 mg	10 ml
Piridoxina	10 mg	10 ml
B12	1 mg	20 ml
Agua	100ml DESTILADA	

Tabla II.3. Composición final del medio de cultivo mESP

Na NO ₃	70 mg
Na ₂ -glicerol-P	10 mg
Micronutrientes	1 ml
Solución EDTA-Fe	0.5 ml
Solución Vitaminas	1 ml
Agua	HASTA 1000ml con AGUA MAR PRETRATADA
pH	7.8

TABLA II.4. Variación del pH del medio mESP y mESP + TRIS (100mg/autoclavado)

<u>volumen de medio(*)</u>	<u>pH ajustado</u>	<u>pH 24 horas</u>	<u>pH 72 horas</u>
100 ml	7,8	8,25	8,30
250 ml	7,8	8,24	8,30
500 ml	7,8	8,28	8,30
100 ml	8,0	-	8,41
250 ml	8,0	-	8,58
500 ml	8,0	-	8,51
100 ml+TRIS	8,0	-	8,50
250 ml+TRIS	8,0	-	8,50
500 ml+TRIS	8,0	-	8,57

(*) Valores de pH medio de 2-3 muestras por volumen.

II.3.1. Modificaciones del medio de cultivo mESP

En el transcurso del trabajo experimental se utilizaron modificaciones del medio mESP, que alteraron su composición química, o sus propiedades físicas. Tales alteraciones fueron:

Adición de extractos algales

Extracto lipofílico e hidrofílico

Constituyen dos fracciones de extracto aisladas de Laurencia sp siguiendo los métodos generales de Fries (1984).

Se maceraron en mortero con vertido de nitrógeno líquido, 10 gramos de peso fresco de las porciones superiores del talo del alga Laurencia sp. El polvo obtenido se agitó durante 24 horas a 4 C. en una mezcla de éter de petróleo (fracción 40-60) y metanol, en proporción 15ml:30ml respectivamente.

Después de 24 horas se recogieron las dos fases:

Fase Hidrofílica: (Extracto hidrofílico) Se obtuvo un volumen ligeramente superior a los 30 ml. Se eliminó el metanol en rotavapor (Selecta, Heidolph) al vacío (-800 mbar) a 65 C., recogiendo un volumen de aproximadamente 2 ml de fase acuosa, que se diluyó en 200ml. de mESP.

Fase lipofílica:(Extracto lipofílico) Se evaporó el eter de petroleo en rotavapor al vacio a 60 C. durante 5 minutos. El producto fue un residuo sólido , que se recogió con dilución en 2ml de etanol absoluto. El producto final se diluyó en 200ml de mESP hasta dar una emulsión acuosa.

Los extractos y soluciones madre obtenidas de fases hidrofílicas y lipofílicas derivadas de los procesos de extracción fueron almacenadas en botes oscuros a -18 C. Los extractos se añadieron al medio de cultivo en cantidades variables, de 0,025ml hasta 12,5ml, antes de ajustar el pH y autoclavar.

Extracto seco

Se secaron 100g de las porciones superiores del talo de Laurencia sp en estufa a 60 C hasta peso constante. El alga desecada fue molida en un micromolinillo "Culatti", obteniendose un polvo fino del alga, que fue pesado y añadido al medio mESP antes de ajustar el pH y autoclavar.

Extracto acuoso

Se homogeneizaron 10g de las porciones superiores del talo de Laurencia sp, en mortero con 30 ml (volumen final) de mESP. Este extracto fue filtrado a través de filtros Millipore de 0,2 μ m y diluido en 200ml. de mESP

esterilizado con autoclavado. El extracto fue añadido al medio de cultivo en cantidades variables de 0,025 a 12,5 ml después de autoclavar.

Adición de factores reguladores del crecimiento vegetal

Los tipos de reguladores de crecimiento utilizados fueron los de uso común en la aplicación del cultivo de tejidos a vegetales superiores. Se añadieron ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (Kin), benziladenina (BA) (Sigma).

Además, se utilizó un agente, naftenato sódico (Na-naften. Pfalz & Bauer INC. N00910), descrito como promotor del crecimiento en Laminaria japonica [206].

Los reguladores de crecimiento fueron añadidos al medio a partir de soluciones madre, preparadas previa disolución del agente regulador en 0,5 ml de etanol absoluto (2,4-D), o en ClH 0.5N (BA y Kin), y posterior adición de mESP (lentamente) hasta el volumen de solución stock deseado.

Las soluciones stock se preparaban inmediatamente antes de su uso.

Para la preparación de la solución madre de naftenato sódico se disolvían 30mg en 5ml de etanol absoluto. Se enrasaban hasta 50 ml con mESP lo que da

lugar a una emulsión acuosa que se agitaba fuertemente antes de tomar los volúmenes a añadir al medio de cultivo.

Los reguladores de crecimiento y el naftenato sódico se añadieron al medio junto con el resto de las soluciones que lo componen. Posteriormente se ajustaba el pH y se añadía el agar, si el medio a elaborar era sólido, esterilizándose por autoclavado a 120 C. y 1Kg/cm² durante 20 minutos.

Adición de agentes osmóticamente activos

Se alteró la concentración del agua de mar en la preparación del medio mESP diluyendo con agua destilada. Los medios resultantes se denominaron, para la dilución al 50%, mESP50; para la dilución al 70% de agua de mar, mESP 70. El medio de cultivo mESP normal fue denominado siguiendo la misma notación como mESP100, en alusión a la cantidad de agua de mar (100%) utilizada en la preparación del mismo.

Se añadieron a todos los tipos de medio anteriormente señalados cantidades variables de agentes osmóticos como el NaCl, manitol o glicerol. Se midió la osmolaridad alcanzada por los mismos en un osmómetro Autostat TM mod. OM 6010 Daiichi Kogaku Co Ltd. (Tabla.- II.5).

TABLA II.5. Variación de la osmolalidad del medio de cultivo mESP dependiente de la concentración de osmótico

<u>Medio de cultivo</u>	<u>Osmótico Añadido</u>	<u>gr/l</u>	<u>osmolalidad (Os/Kg)</u>	
			<u>Teórica(*)</u>	<u>Real(**)</u>
Agua mar	-	-	1,009	1,095
mESP50	NaCl	0,0	0,504	0,562
		6,0	0,696	0,756
		16,0	1,013	1,076
		30,0	1,466	1,522
		40,0	0,704	0,796
mESP70	Manitol	85,0	1,014	1,065
		146,5	1,450	1,320
		0,0	0,706	0,770
	NaCl	10,0	1,025	1,094
		24,0	1,470	1,537
		50,0	0,996	1,091
	Glicerol	116,3	1,466	1,416
		25,0	0,966	1,079
		30,0	1,043	1,167
		40,0	1,162	1,307
		50,0	1,286	1,455
		60,0	1,414	1,544
		50,0	0,998	1,091
	Fructosa	60,0	1,061	1,141
		70,0	1,125	1,211
85,0		1,225	1,311	
100,0		1,328	1,442	
50,0		1,001	1,081	
60,0		1,065	1,118	
70,0		1,131	1,181	
Glucosa	85,0	1,230	1,303	
	100,0	1,328	1,442	
	0,0	1,009	1,099	
	15,0	1,478	1,612	
	Manitol	73,5	1,450	1,567

(*) Weast & Astle, 1981.

(*) Valores medios de 2 medidas (DS= 0,023).

Se estimó la osmolalidad teórica que alcanzarían los medios al añadir los mismos agentes y otros, tales como la fructosa o glucosa. La estimación de la osmolalidad se basó en las premisas:

* La osmolalidad del agua de mar de 35% de salinidad es de 1,009 Os/Kg [197].

* La osmolalidad del medio mESP es igual a la osmolalidad del agua de mar + la osmolalidad de los componentes añadidos en el enriquecimiento .

* Si se considera insignificante la aportación osmótica de los compuestos añadidos al agua de mar en la formulación básica del mESP, la osmolalidad del medio dependería sólo de la del agua de mar y de la osmolalidad de cualquier otro agente que se le añada.

La similitud entre los valores de osmolalidad teórica y real obtenida, con independencia del tipo de agente osmótico utilizado, permitió la estimación de la osmolalidad del medio de cultivo, sin recurrir al valor empírico, siempre que se conocieran las propiedades osmóticas del agente utilizado. Tales estimaciones se realizaron cuando se añadieron al medio compuestos como la sacarosa y glicerol a determinadas concentraciones.

II.4. Condiciones de cultivo

II.4.1. Desinfección del material vegetal.

En ensayos preliminares se probaron diferentes procedimientos de desinfección con Laurencia sp (Tabla.- II.6).

Los resultados obtenidos con tales procedimientos mostraron la necesidad de desarrollar protocolos de desinfección basados en la caracterización de los contaminantes asociados a las algas con las que trabajamos, así como, en un conocimiento de la resistencia de las mismas a diferentes agentes biocidas.

Estudio de resistencia de explantos y contaminantes a diferentes procedimientos de desinfección

Se usaron agentes esterilizantes como:

- * Peroxido de hidrogeno (H₂O₂). (Panreac. Grado puro).
- * Alcohol 96 (comercial).
- * Hibitane (solución comercial al 5% de bigluconato de clorohexidina. ICI Farma Lab.)
- * Betadine (Betadine comercial al 10% de providona yodada. Sarget Lab.)
- * Hipoclorito sódico (Codex. 8% Cl activo).

También se utilizaron antibióticos cuyas características fundamentales se recogen en la tabla II.7.

TABLA II.6. Resultados del ensayo preliminar de desinfección de explantos de *Laurencia sp*

<u>Procedimiento</u>	<u>Descrito por:</u>	<u>Efecto en <i>Laurencia sp</i></u>
Arrastre por Agar al 0,8%	Fries, 1963 Chen y col., 1978	Explantos viables inefectivo
Hipoclorito Sódico 1%	Lee, 1985	Decoloración y muerte explantos
Alcohol 70% 1-2 segundos	Saga y col., 1983	Decoloración y muerte explantos

Tales antibióticos fueron combinados en diferentes tipos de soluciones. Las más utilizadas fueron las denominadas soluciones GAN y GAP, cuyas composiciones fueron:

Solución GAN: GeO₂ 0.5mg/l; ampicilina (Amp) 10mg/l; nistatina (Nis) 2mg/l.

Solución GAP: solución GAN + penicilina (Pen) 0.3g/l; estreptomicina (Strep) 0.1g/l.

Se emplearon 140 explantos terminales de cada una de las especies Laurencia sp , G.versicolor y G.ferox, que fueron sometidos a los procedimientos de desinfección:

* Sonicación durante 30 segundos en agua destilada esterilizada y 1,5 minutos en agua de mar esterilizada (dos veces). El sonicador era un baño de ultrasonidos modelo S-512 Selecta, comunmente usado en óptica y microscopía para la limpieza de las lentes.

* Sonicación + Betadine (10 y 100%) durante 7 minutos.

* Sonicación + Betadine (10 y 100%) durante 7 minutos e incubación durante 5 días en soluciones GAN ó GAP.

* Sonicación + Hibitane (0,4 y 2%) durante 7 minutos.

* Sonicación + Hibitane (0,4 y 2%) durante 7

minutos e incubación durante 5 días en soluciones GAN ó GAP.

Se realizó un control donde los explantos no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento de desinfección.

El número de explantos por tratamiento fue de 10 que fueron cultivados, después de la desinfección, en medio mESP sólido.

Después de 20 días en cultivo se tomaron alícuotas del halo bacteriano que rodeaba a dos de los explantos sometidos a cada uno de los tratamientos de desinfección. Las alícuotas fueron transferidas a medio líquido Brain Heart (Difco). Se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 días. Para separar las colonias bacterianas se sembraron diluciones de muestras tomadas del medio líquido, en medio sólido Brain Heart. A partir de las colonias separadas, se procedió a la determinación de las bacterias que las componen siguiendo los métodos standard API20 E, para enterobacterias, y API20 NE para no enterobacterias.

La tabla II.8 muestra los tipos de contaminantes asociados a los explantos después de la desinfección con los diferentes procedimientos descritos.

La viabilidad de los explantos, determinada en función de la pigmentación de los mismos fue muy reduci-

TABLA II.7. Características de los biocidas utilizados y resistencia de las algas

<u>Biocida</u>	<u>Efecto</u>	<u>Resistencia(*)de las algas hasta concentración de:</u>		
		<u>Laurencia sp</u>	<u>G.versicolor</u>	<u>G.ferox</u>
Ampicilina	bactericida	50 mg/l	30 mg/l	50 mg/l
Penicilina	bactericida	500 mg/l	500 mg/l	500 mg/l
Estreptomina	bactericida	-	100 mg/l	50 mg/l
Panfungol	fungicida	100 mg/l	-	50 mg/l
Nistatina	fungicida	50 mg/l	50 mg/l	50 mg/l
GeO2	antidiatomeas	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
Agua destilada	shock osmótico	9 minutos	9 minutos	9 minutos
Betadine	antiséptico	10%	10%	10%

(*) resistencia= mínimo 20% en el %regeneración después desinfección.

TABLA II.8. Tratamientos de desinfección y tipos de contaminantes asociados a los explantos de *Laurencia sp* y *G.versicolor* y *G.ferox*

<u>Procedimiento</u>	<u>Laurencia sp</u>		<u>G. versicolor</u>		<u>G.ferox</u>	
	<u>%S</u>	<u>Contaminant.</u>	<u>%S</u>	<u>Contaminant.</u>	<u>%S</u>	<u>Contaminant.</u>
No esterilización	100	NFB, Pas	100	Fla, H, St	100	Vi
Sonicación(son)	100	Vi, H, Ps	100	NFB, H, Vi, St	100	H, Vi, Pas
Son+Hib0,4%	100	H, St, Fla	100	NFB, Pas	0	H
Son+Hib2%	100	H	100	NFB, Vi	0	H, Ps
Son+Hib0,4%+GAN	100	Ps	100	NFB	0	Bact.
Son+Hib2%+GAN	100	NFB	100	NFB	0	Alga.
Son+Hib0,4%+GAP	90	Alga	100	Bact.	0	Alga.
Son+Hib2%+GAP	100	Bact.	100	Bact.	0	Alga.
Son+Bet 10%	100	H, St, Fla	100	NFB, H	0	Alga, H.
Son+Bet100%	0	H, Pa	0	Bact.	0	Alga, H
Son+Bet10%+GAN	80%	Ps	100	Bact.	0	Alga
Son+Bet100%+GAN	0	Ps	0	Bact.	0	AXENICO
Son+Bet10%+GAP	100	Alga	0	Diato.	0	Alga
Son+Bet100%+GAP	0	Alga	0	AXENICO	0	Alga.

%S=explantos pigmentados/Sembrados.

Bact= bacteria no identificada.

Fl= Flavobacterium odoratum.

Pa= Pasteurella pneumotropica

H= hongos

Vi= Vibrio alginolyticus

Diato.=Diatomeas

NFB= bacteria no fermentativa

St= Staphylococcus sp

Ps= Pseudomonas sp

Alga= algas filamentosas. Entre ellas

Endoderma viride y Phaeophyla sp

da en algunos procedimientos en los que se combinan a diferentes concentraciones los agentes biocidas. Se detecta además que la aparición de algas como Endoderma viride o Phaeophyla sp coincide con la aplicación de tratamientos complejos de desinfección. (Tabla.- II.8).

Para la determinación de la resistencia a los distintos agentes por separado, se continuó la experiencia con la desinfección de 360 explantos terminales de Laurencia sp, 400 explantos estipe de Gracilaria ferox y 250 explantos estipe de Gelidium versicolor con los distintos agentes por separado. El material seleccionado fue esterilizado con agua destilada (baños de 1, 3, 5, 7, 9 minutos); Betadine (soluciones al 2, 3, 5, 7 y 10% con 0,02% tween); H₂O₂ (0,2; 0,3; 0,6; 1,6; 2,3; 3,3 % a partir de solución pura al 30% de H₂O₂). Se estudió la resistencia del material a incubaciones durante 5 días en soluciones con ampicilina (10, 30 y 50 mg/l); streptomomicina (0,05; 0,1 y 1g/l); penicilina (0,1; 0,3 y 0,5 g/l); Panfungol (0,05; 0,1 y 1g/l); nistatina (10, 25 y 50 mg/l) y GeO₂ (0,5; 5 y 10 mg/l).

La resistencia de los explantos fue evaluada considerando si eran capaces de regenerar (mínimo considerado= 20% explantos sembrados) después de un tratamiento de desinfección. Los resultados obtenidos

se recogen en la tabla II.7.

Tras los resultados de los ensayos preliminares, el establecimiento de cultivos axénicos se convierte en uno de los objetivos del trabajo.

En los ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos se elaboraron protocolos de desinfección combinando, a diferentes concentraciones, los distintos agentes biocidas empleados en las experiencias preliminares. En los ensayos de intento de establecimiento de cultivos axénicos se comprobó la asepsia del material, sembrando los explantos en medio MCE, después de la desinfección. La composición del medio MCE fue:

Glucosa	0,05%
Sacarosa	0,1 %
Hidrolisado de caseína	0,05%
Lactosa bacteriológica	0,1 %
bactopeptona 3g/l	
bacto-beef 5g/l	
bacto-lactosa 5g/l	
mESP	100ml

El medio MCE era normalmente utilizado en forma solidificada. Los métodos de preparación fueron los mismos que para la elaboración del medio mESP sólido. El medio MCE sólo permitió comprobar la ausencia/presencia de contaminantes bacterianos, fúngicos y algales. Las referencias posteriores a la asepsia de los

explantos ("axénicos") debe entenderse como la ausencia en la superficie del talo de tales tipos de contaminantes.

Decidimos que paralelamente a los ensayos a realizar para el establecimiento de cultivos asépticos de las diferentes algas, y mientras no se lograra tal objetivo, se utilizaría un método de desinfección superficial que afectara lo menos posible la viabilidad de los explantos. El procedimiento a seguir reduciría el crecimiento de los contaminantes durante periodo de experimentación. Se procedió a la desinfección superficial de los explantos siguiendo el protocolo:

- 1) Lavado del material a sembrar durante 2 minutos en agua destilada.

- 2) Sonicación del material en agua de mar esterilizada durante 1,5 minutos, operación que se repetía 3 veces, cambiando el agua cada vez.

- 3) Se sumergían los explantos, durante 7 minutos, en una solución al 1% de Betadine en agua de mar esterilizada.

- 4) Incubación del material vegetal durante 5 días en solución de antibióticos GAN.

La limpieza de los explantos era reforzada añadiendo antibióticos al medio de cultivo mESP. Esta va-

riante del medio de cultivo se preparaba añadiendo los antibióticos a partir de una solución madre, cuya composición es la que se expresa en la tabla II.9.

Tabla II.9. Solución madre de antibióticos añadidos al medio mESP

<u>Antibiotico</u>	<u>Peso sol. madre</u>	<u>Peso medio mESP</u>
Ampicilina	500 mg	10 mg
Nistatina	100 mg	2 mg
Dioxido Germanio GeO ₂	25 mg	0.5 mg
Agua	100 ml Agua mar	1000 ml mESP

La concentración de antibióticos en el medio de cultivo, era igual a la de la solución de incubación GAN, y se obtenía añadiendo 2 ml de la solución madre de antibióticos por litro de mESP. La adición de antibióticos al medio de cultivo se realizaba antes de dispensar el medio, si era sólido, o directamente sobre los recipientes de cultivo con medio líquido autoclavado. En cualquier caso, la operación se realizaba cuando el medio de cultivo había alcanzado la temperatura ambiental.

En la mayor parte de los ensayos realizados se practicó el procedimiento de desinfección descrito, por lo que tal circunstancia no será recogida en la descripción del diseño experimental de los diferentes ensayos. Sólo se hará mención al método de desinfección utilizado en los casos en que los explantos hubiesen sido sometidos a otro procedimiento diferente al señalado (ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos, de re-desinfección de callos, etc.)

II.4.2. Metodología y régimen de cultivo

Las operaciones de siembra fueron realizadas en condiciones asépticas, aunque las condiciones de cultivo no lo fueran. Para tal fin se trabajaba en cámara de flujo laminar.

El material de laboratorio usado en la siembra era esterilizado antes de ser utilizado con paso por autoclave o con flameado en alcohol en el interior de la cámara de flujo.

El material vegetal sembrado fue mantenido durante el periodo de experimentación en la cámara de cultivo a 22 ± 2 C y $27 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiación de amplio espectro emitida por tubos fluorescentes Sylvania GroLux. El fotoperiodo fue regulado a 18 horas luz: 6 horas oscuridad.

El material en cultivo era transferido a medio de cultivo nuevo con una periodicidad variable según el ensayo, pero comúnmente de 15 días.

De acuerdo con las recientes normas de la Tissue Culture Association (TCA) [174] para el uso de los términos más comunes en cultivo de tejidos, utilizaremos el término "recultivo" para señalar la transferencia de todo el material sembrado a nuevo medio. Denominaremos "subcultivo" a la transferencia en la que el material era subdividido antes de pasar a medio de cultivo nuevo.

II.5. Estudio histológico

Se realizaron estudios histológicos de la estructura de los tipos de regeneración aparecidas en cultivo de Laurencia sp, Gracilaria ferox, Gelidium versicolor y Grateloupia doryphora.

Los métodos fijación, inclusión, corte y tinción fueron:

Fijación

Se sumergía material vegetal durante 4 horas a temperatura ambiente en una solución al 2,5% de glutaraldehído en tampón cacodilato sódico 0,1M ; 0,6M NaCl a pH 7,4. El procedimiento continuaba con 2 lavados, de 30 minutos cada uno, con agitación periódica de las muestras en la misma solución anterior sin glutaraldehído.

Las muestras se almacenaban en tampón cacodilato-sódico 0,1M; 0,6M NaCl.

Antes de la inclusión, se sumergía el material durante 30 minutos en tampón cacodilato sódico 0,1M, sin NaCl y sin glutaraldehído a pH 7,4.

Para microscopía electrónica se añadía al procedimiento general, después del glutaraldehído, un paso de postfijación en una solución al 2% de tetroxido de osmio en tampón cacodilato sódico 0,1M a pH 7,4. La fijación

acaba con tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampón cacodilato sódico 0,1M, pH 7,4. Las muestras quedaban almacenadas en esta misma solución a 4C, hasta su inclusión.

Inclusión

El material fijado fue incluido en dos tipos de soporte, parafina y, para la obtención de cortes semifinos y ultrafinos, en plástico o resina Epon.

La inclusión en parafina se realizaba previa deshidratación del tejido en una serie alcohólica al 70%, 90% y 100%, con dos baños de 1 hora en cada uno de los tipos de alcohol, para finalizar con un baño de 10 minutos en etanol-benceno 1:1, y otro, de 20 minutos, en benceno puro.

La inclusión en parafina se continuó con tres baños de 2 horas cada uno en parafina líquida, hasta la obtención de un bloque a partir del que se obtenían los cortes histológicos.

Para la inclusión en resina, se comenzaba también por la deshidratación del tejido en una serie alcohólica, con baños de 10 minutos en etanol 20%, 50%, 70%, 90%, 96%, y dos baños de 20 minutos en etanol 100. Se sumergía el material deshidratado en óxido de propileno durante 20 minutos (dos veces) y, posteriormente, en óxido de propileno-Epon 1:1, durante 3 horas.

El proceso terminaba con un baño de 12 a 24 horas en Epon y el endurecimiento de la resina durante 24 horas a 40 C y otras 24 a 60 C.

Corte y tinción

Con las muestras incluidas en parafina se obtuvieron secciones de 6µm de grosor, en microtomo R.Jung. Los cortes se mantuvieron en estufa al menos 24 horas, eliminando la parafina con un baño de xilol de 5 minutos o por calentamiento a 60 C.

La hidratación del tejido se realizó con baños de 5 minutos en etanol 100%, 90% y de 10 minutos en etanol 70%. Se utilizaron como colorantes: a) azul de tolouidina al 1% en 1% solución acuosa de Borax; b) hematoxilina (0,2% en agua de una solución alcohólica al 10% de hematoxilina); c) azul alcian (0.1% de azul alcian en agua).

Para la obtención de preparaciones permanentes, el material teñido era deshidratado con un lavado de 5 minutos en etanol 70% y 90%, y dos lavados, de 5 minutos cada uno, en etanol 100 y xilol. La preparación se sellaba con bálsamo (EUKITT).

El material incluido en resina permitió la obtención de cortes semifinos, utilizados para microscopía óptica, y ultrafinos usados para microscopía electrónica

de transmisión. La sección del material fue realizada en ultramicrotomo Om U3 Reichert.

Los cortes semifinos fueron teñidos, sin desplas-tificar, con azul de toluidina.

Los cortes ultrafinos (400 A) se montaron en las rejillas y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 301, usando película Negrapan 21 para las fotografías.

Microscopía electrónica de barrido

A partir de varias muestras de formas de crecimen-to en cultivo de Grateloupia doryphora se obtuvieron imagenes en un microscopio electrónico de barrido modelo SuperIII AK marca ICI. Se obtuvieron fotografías con película Hilford HP5.

II.6. Indices de crecimiento y desarrollo.

En cultivo de tejidos de plantas superiores se han utilizado diversos índices con los que se puede contro-lar y cuantificar el crecimiento del material en culti-vo. La utilización de un índice u otro depende del tipo de crecimiento que se quiera caracterizar. Así, son validos índices como el incremento en peso fresco o seco para cuantificar crecimiento de un callo o el recuento del número de yemas para expresar el valor de la morfo-génesis obtenida en cultivo [46].

Atendiendo a las características del material con el que trabajamos y los objetivos planteados, se eligieron diferentes índices con los que medir tanto, el tipo de respuesta obtenida a partir de explantos extraídos de la planta madre, como el crecimiento y patrón de desarrollo que seguían tales respuestas en cultivo.

Para la cuantificación del crecimiento y desarrollo de los explantos extraídos de la planta madre se utilizaron los índices:

%Regeneración: Número de explantos regenerantes/ Total explantos sembrados

%Callo: Número de explantos que forman callo/ Total explantos sembrados

%Yema: Número de explantos que forman yemas/ Total explantos sembrados.

Para la aplicación de los índices se consideró regeneración a cualquier estructura de neoformación que surgía del explanto. Si macroscópicamente tal regeneración tenía aspecto organizado, comúnmente en forma de fase inicial de desarrollo de una nueva rama del talo, era considerada como yema. Si, por el contrario, el aspecto de la regeneración emitida por el explanto constituía una pérdida de la morfología normal del mismo, apreciándose cierto grado de desorganización, era considerada como callo.

La cuantificación del crecimiento posterior de las respuestas obtenidas en cultivo, debido a las características del mismo, se basó en la capacidad morfogénética (cuantificación de la emisión de yemas). Para ello se utilizaron índices , ya usados por otros autores, como: Número de yemas/ Número explantos sembrados [27, 109]. Este índice se uso para medir la morfogénesis tanto de callos como de explantos, expresandose en cada caso dependiendo del material utilizado. La abreviatura para este índice será Y/S.

Número de yemas/ Número de callos morfogénéticos o índice morfogénético de Kurtz & Lineberger (1983), que fue utilizado tal cual, o con una variación que consistió en la expresión del mismo por explanto morfogénético en el caso de que el material vegetal sembrado no fueran callos, sino explantos. La abreviatura para este índice será IM.

Cuando el tamaño de los explantos o de las estructuras regeneradas lo permitió, se controló su crecimiento atendiendo a la variación en peso fresco o longitud.

II.7. Cultivo de Tejidos de Laurencia sp.

II.7.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos

Partiendo de los resultados obtenidos en las experiencias preliminares de caracterización de contaminantes y resistencia de las algas a los distintos agentes biocidas, se utilizaron dos procedimientos de desinfección, de alta y baja concentración, que consistieron en:

- * Limpieza mecánica de los explantos, bajo lupa y con pincel

- * Lavado de los explantos en agua destilada (20 explantos por cada 50 ml de agua) durante 5 a 9 minutos.

- * Sonicación (20 explantos por 50 ml de agua de mar) tres veces durante 1,5 minutos, cambiando el agua cada vez.

La desinfección finalizaba con la incubación en betadine y soluciones de antibióticos cuyas concentraciones fueron:

Procedimiento de baja concentración:

- *Betadine al 5% (0,02% Tween 80) en agua de mar durante 7 minutos.

- * Incubación durante 5 días de los explantos en 10 ml de solución antibiótica compuesta de ampicilina (30 mg/l); nistatina (25mg/l); penicilina (0,3g/l) y GeO₂ (5

mg/l) en agua de mar.

Procedimiento de alta concentración:

* Betadine al 10% (0,02% Tween 80) en agua de mar durante 9 minutos.

*Incubación durante 5 días en 10 ml de solución antibiótica compuesta de ampicilina (50mg/l), nistatina (50 mg/l), penicilina (0,5 g/l) y GeO₂ (10 mg/l) en agua de mar.

Se desinfectaron superficialmente siguiendo los dos procedimientos anteriormente señalados 100 explantos cilindro de dos tamaños 0,2 y 0,5 cm (50 explantos de cada tamaño). Se realizaron controles sin desinfección (10 explantos de cada tamaño) . Se controló el desarrollo y tipo de contaminantes crecidos en medio de control de la esterilidad (MCE), donde fueron sembrados los explantos inmediatamente después de la desinfección y donde permanecieron durante 7 días, para posteriormente pasar a medio mESP hasta los 30 días.

II.7.2. Crecimiento y desarrollo del explanto.

Influencia del tipo de explanto

Se recolectaron talos durante los meses de Febrero-Abril. Dos horas después de la recogida, se extrajeron a partir del talo, tres tipos diferentes de explantos:

1) Explantos terminales: 567 explantos de los cuales 426 procedían de ramas largas ampliamente ramificadas y 141 procedían de ramas cortas, escasamente ramificadas que surgían directamente de la zona de fijación.

2) Explantos estipe: 24 explantos.

3) Explantos anclaje: 23 explantos.

Se sembraron 10 explantos "terminales" de rama larga en medio líquido mESP . El resto de los explantos fueron sembrados en medio mESP sólido.

Los explantos se recultivaron cada 15 días, excepto 101 explantos terminales de rama larga que no fueron recultivados durante los 45 días que duró la experiencia.

Los resultados obtenidos fueron evaluados siguiendo los índices: %Regeneración, %Callo y %Yema. Se controló la localización de las diferentes estructuras regeneradas en el explanto "terminal", distinguiéndose la regeneración de la zona proximal y distal de la que tenía lugar a largo del explanto. Se realizó el estudio histológico de diferentes tipos de estructuras regenerativas.

Efecto de la adición al medio de cultivo de factores reguladores del crecimiento en vegetales superiores

Este ensayo fue realizado con material recolectado durante el mes de Diciembre. Dos horas después de la recolección se separaron 180 explantos "terminales" que fueron sembrados en medio mESP sólido al que se habían añadido KIN, BA y 2,4-D a concentraciones de 2 y 5 mg/l de cada una. Se realizó un control sin reguladores de crecimiento.

El número de explantos fue de 30 por tratamiento. Se sembraron también 30 explantos en mESP con 5mg/l de naftenato sódico.

Al término de la experiencia se evaluaron los índices: %Regeneración, %Callo y %Yema. Se controló la aparición de estructuras regenerantes diferentes a las comúnmente detectadas en cultivo.

Efecto de la adición de extractos algales al medio de cultivo mESP

Se realizaron dos ensayos en los que se añadieron al medio de cultivo diferentes tipos y concentraciones de extractos del alga Laurencia sp.

La primera experiencia fue realizada con material vegetal recolectado durante los meses de Septiembre y

Octubre. Dos horas después de la recolección se extrajeron 1001 explantos "terminales" que fueron sembrados en medio mESP sólido al que se había añadido diferentes cantidades de los distintos extractos.

Se ensayaron los efectos de extractos lipofílico (12,5; 6,25; 2,5; 1,25 y 0,625 ml/l de mESP) hidrofílico y acuoso (12,5; 6,25; 2,5; 1,25; 0,625 y 0,25 ml/l de mESP). Del extracto seco se añadieron 500; 250; 100; 50 y 25 mg por litro de mESP. Se sembraron 30 a 45 explantos por tratamiento con ensayos control sin la adición de extractos (26-30 explantos).

Los explantos fueron recultivados cada 15 días. A los 45 días se evaluaron los índices: %Regeneración, %Callo y % Yema obtenidos en los diferentes extractos y concentraciones. Los resultados se expresaron como porcentajes de los obtenidos en los ensayos control sin extracto.

En el segundo ensayo de extractos se utilizaron 480 explantos "cilindro" extraídos, después de la desinfección, de explantos terminales de talos recolectados durante el mes de Febrero.

Los explantos fueron sembrados en medio mESP sólido, al que se habían añadido 12,5; 1,25; 0,25 y 0,025ml/l de medio de cultivo de extractos Lipofílicos, Hidrofílico y Acuoso. Del extracto seco se añadieron

250, 50 y 10 mg/l de medio de cultivo. Se sembraron 30 explantos por tratamiento con un ensayo control sin extractos.

Los explantos fueron recultivados cada 15 días durante los 45 días que duró la experiencia.

Los resultados fueron evaluados siguiendo los índices: %Callo, y como medida de la morfogénesis se utilizó el índice Número de yemas /Número de explantos sembrados. Se controló la polaridad en la regeneración del callo entre las zonas proximal y distal del explanto "cilindro".

Efecto del potencial hídrico del medio de cultivo

El material vegetal para la realización de esta experiencia fue recolectado entre los meses de Noviembre y Febrero. A partir de explantos "terminales" se extrajeron, después de la desinfección, explantos "cilindro" que fue el material utilizado en esta experiencia .

Se estudió por separado el efecto del componente osmótico y matricial del potencial hídrico. El potencial osmótico fue ajustado por incremento en la concentración del NaCl del medio de cultivo y la dilución, con agua destilada, del agua de mar. El efecto específico del NaCl se controló con la adición de manitol hasta que el

medio de cultivo alcanzara la misma osmolalidad. (Tabla II.10). En los distintos tratamientos de osmolalidad se mantuvo constante la concentración de agar del medio (8 g/l).

El potencial matricial del medio de cultivo se reguló variando la concentración de agar (Deberg, 1981; 1983) entre 3, 8 y 15 g/l de medio. La osmolalidad de estos medios fue de 1,0 Os/kg.

La variabilidad en la formación de callo en experiencias con número pequeño de muestra (10 explantos), fijó en 195 la cantidad mínima de explantos por tratamiento, para tener un 85% de certeza al 5% de significación.

Se utilizaron, por tanto, 195 explantos por tratamiento de osmolalidad y concentración de agar, con controles de la variabilidad estacional del material vegetal mediante la siembra en mESP100 de 195 explantos.

El tiempo de experimentación fue de 30 días, con recultivo cada 15, al final del cual se evaluaron los índices: %Regeneración, %Callo y %Yema. Los resultados se expresaron como porcentajes de los obtenidos en los ensayos control de la variabilidad estacional.

Se controló la polaridad en la regeneración de callo y yema de los explantos.

TABLA II. 10.Osmolalidades y tipos de medio de cultivo utilizados en el ensayo del efecto del potencial osmotico sobre la regeneracion.

<u>Osmolalidad (Os/kg)</u>	<u>Medio de Cultivo</u>	<u>Número de Explantes</u>
0,5	mESP50	195
0,7	mESP50+6g/lNaCl	"
	ESP50+40g/lManitol	"
	mESP70	"
1,0	mESP50+16g/lNaCl	"
	mESP50+85g/lManitol	"
	mESP70+10g/lNaCl	"
	mESP70+50g/Manitol	"
	mESp100	"
1,5	mESP50+30g/lNaCl	"
	mESP50+146,5g/lManitol	"
	mESP70+24g/lNaCl	"
	mESP70+116,3g/lManitol	"
	mESP100+15g/lNaCl	"
	mESP100+73,5g/lManitol	"

II.7.3. Crecimiento del callo y morfogénesis

Caracterización del crecimiento de los callos

Se utilizaron 141 callos formados en zonas de corte proximal de explantos terminales. El material de partida, aunque denominado callo, poseía, en este ensayo y en los posteriores, una porción del explanto "terminal".

Los callos, inicialmente morfogénéticos y no morfogénéticos fueron sembrados en medio mESP sólido. El tamaño del callo permitió la siembra de hasta 21 callos por placa de Petri.

Después de 15 días en cultivo se evaluó el número de callos morfogénéticos y no morfogénéticos, con control de la morfogénesis en base a los índices Número de yemas/Número de callos sembrados y Número de yemas/Número de callos morfogénéticos.

Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal.

Se utilizaron callos formados en la zona proximal de explantos "terminales" crecidos en mESP sólido.

Se sembraron 24 callos en medio de cultivo mESP con 5; 10 y 15 mg/l de 2,4-D. Se realizó un control de 7 callos en medio mESP sin regulador. Se controló el número inicial y final de callos morfogénéticos, expre-

sandose los resultados obtenidos en función de los índices: Número de yemas/Número de callos sembrados y Número de yemas /Número de callos morfogénéticos.

Se cultivaron 62 callos en medio de cultivo mESP al que se había añadido cantidades de 2 y 10 mg/l de KIN. Se realizó un control sembrando callos en mESP carente de regulador. Se estudió también el efecto del naftenato sódico, sembrando 11 callos en medio de cultivo con 5mg/l.

A los 30 días en cultivo (recultivo cada 15 días), se evaluaron los resultados obtenidos siguiendo la evolución de los índices: Número de yemas/ Número de callos sembrados y Número de yemas /Número de callos morfogénéticos

Efecto de la concentración de agar en el medio de cultivo

Se cultivaron 8 callos por tratamiento en medio de cultivo mESP solidificado con cantidades de 3 y 8 g/l de agar. A los 15 días se evaluaron los resultados siguiendo la evolución del índice Número de yemas /Número de callos sembrados.

II.7.4. Cultivo de callos en medio mESP líquido.

Se utilizaron 303 callos aislados de explantos "terminal".

Antes del recultivo a medio líquido, los callos fueron desinfectados superficialmente empleando diferentes modificaciones de los métodos descritos para el explanto inicial. Así:

* Se limpiaron y desinfectaron con sonicación (3 veces, 1,5 minutos cada vez) y Betadine al 1% (7 minutos) 60 callos.

* Se desinfectaron con sonicación +Betadine, en las mismas condiciones anteriores que fueron ampliadas con una incubación durante 5 días en solución GAN 84 callos.

* Se incubaron durante 5 días en solución de antibióticos GAP 61 callos.

* Se desinfectaron siguiendo el procedimiento de baja concentración 20 callos.

* Se sembraron directamente sin desinfección 78 callos.

Inicialmente los callos fueron sembrados en placas de Petri con 20ml de mESP líquido (7 días), para posteriormente pasar a botellones con 200 ml de medio de cultivo, donde fueron recultivados cada 15 días. Se sembraron 10 callos por placa y botellón.

Los resultados son expresados a los 15 días, 30 y 80 días en cultivo.

Se controló cualitativamente y cuantitativamente (peso fresco) el crecimiento de los callos.

II.8.Cultivo de tejidos de *Gelidium versicolor*, *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox*.

II.8.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos.

Gelidium versicolor

Se desinfectaron un total de 82 explantos "estipe", 39 explantos de 0,2 cm y 35 explantos de cm, siguiendo los procedimientos de baja y alta concentración utilizados con *Laurencia sp*, con controles sin desinfección (8 explantos). Se analizó el desarrollo y tipo de contaminante en medio de control de la esterilidad (MCE), donde fueron sembrados los explantos inmediatamente después de la desinfección y donde permanecieron durante 7 días, para posteriormente pasar a medio mESP hasta los 30 días.

En un ensayo posterior se esterilizaron 14 explantos "estipe" de 0,5cm de longitud de *G.versicolor*, siguiendo el procedimiento de baja concentración. Después de la esterilización los explantos fueron sembrados en medio mESP con una concentración de vitaminas 10 veces superior a la normal. Se controló el crecimiento y tipo de contaminantes desarrollados a los 30 días de la desinfección.

Se desinfectaron superficialmente siguiendo el

procedimiento de baja concentración 60 explantos "rizoide". Se siguió el desarrollo y tipo de contaminantes en medios MCE y mESP, donde fueron sembrados los explantos después de la desinfección.

Gelidium arbuscula

Se desinfectaron superficialmente 22 explantos "rizoide" siguiendo el procedimiento de baja concentración. Se siguió el desarrollo y tipo de contaminante en medios MCE y mESP, donde fueron sembrados los explantos después de la desinfección.

Gracilaria ferox

Se desinfectaron 20 explantos "estipe" siguiendo el procedimiento de baja concentración, con controles sin desinfección. Después de la desinfección se siguió el desarrollo de contaminantes en medio MCE, durante los 7 primeros días, y en mESP hasta los 30 días.

II.8.2. Crecimiento y desarrollo del explanto.

Influencia del tipo de explanto.

El material vegetal para la realización de este ensayo fue recolectado durante el mes de Febrero. Dos horas después de la recolección se extrajeron: 60 explantos de G.versicolor (30 terminales y 30 estipe), 30 de G. arbuscula (15 terminal y 15 estipe) y 68 de G.fe-

rox (38 terminales y 30 estipe).

Los explantos se sembraron en medio mESP realizandose recultivos cada 15 días. A los 30 días se evaluaron los resultados siguiendo los índices : %Regeneración, %Callo y %Yema.

Se realizó el estudio histológico de las diferentes formas de regeneración y crecimiento desorganizado.

Efecto del potencial hidrico del medio de cultivo sobre la regeneración de G.versicolor

Esta experiencia fue realizada con material recolectado entre los meses de Noviembre y Febrero. Dos horas después de la recolección se extrajeron explantos "estipe" que fueron sembrados en la gama de medios con distintas osmolalidades y potencial matricial utilizados en el ensayo con Laurencia sp (Tabla.- II.10). Se controló la variabilidad estacional del material vegetal mediante la siembra de 195 explantos en medio mESP100.

A los 15 días de cultivo se evaluaron los índices %Regeneración, %Callo y %Yema. Los resultados se expresaron como porcentajes de los valores obtenidos en los ensayos de control de la variabilidad estacional.

II.9. Cultivo de tejidos de Grateloupia doryphora.

II.9.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos.

Los explantos "disco" se desinfectaron superficialmente con los procedimientos de baja concentración (80 explantos) y alta concentración (34 explantos), con variantes sin Betadine (15 explantos) y sin incubación (8 explantos). Se realizó un control sin desinfección (5 explantos).

Se siguió el desarrollo y tipo de contaminantes en medio MCE durante 7 días y en mESP hasta los 30 días.

A los 30 días se evaluó el crecimiento de los explantos no contaminados siguiendo los índices %Regeneración, %Callo y %Yema.

II.9.2. Crecimiento y desarrollo del explanto.

Se cultivaron 28 explantos "disco", extraídos de talos recolectados durante el mes de Septiembre que fueron sembrados en medio mESP tras los tratamientos habituales de desinfección.

A los 30 días en cultivo se evaluaron los resultados obtenidos siguiendo los índices %Regeneración, %Callo y %Yema.

Se realizó el estudio histológico de las

diferentes formas de regeneración y crecimiento desorganizado.

Efecto del potencial hídrico del medio de cultivo.

Se relizaron dos experiencias para el estudio del efecto del potencial hídrico del medio de cultivo sobre la regeneración de G.doryphora.

En el primer ensayo se cultivaron explantos "disco" en la gama de medios de cultivo con diferentes osmolalidades y potencial matricial utilizados con Laurencia sp y Gelidium versicolor (Tabla.- II.10). Se realizaron controles de la variabilidad estacional del material vegetal sembrando 195 explantos en medio mESP100.

A los 15 días en cultivo se evaluaron los resultados siguiendo los índices %Regeneración, %Callo y %Yema. Los resultados fueron expresados como porcentajes de los valores obtenidos en los ensayos control de la variabilidad estacional.

El segundo ensayo se realizó para comprobar las posibles diferencias en el comportamiento del alga generadas por el agente osmótico utilizado. En este ensayo la osmolalidad del medio de cultivo se ajustó con la dilución del agua de mar y la adición de glicerol como agente osmóticamente activo. El material vegetal en

este ensayo fueron explantos "semicírculo" extraídos de explantos "disco" cultivados asépticamente en mESP.

Se cultivaron un total de 50 explantos en medios con osmolalidades (Os/Kg) de 0,7 (mESP70), 1,0 (mESP70 + 2,5% glicerol, mESP100) y 1,5 (mESP70 + 7,5% glicerol, mESP100 + 4,5% glicerol).

A los 20 días en cultivo se evaluaron los resultados siguiendo los índices %Yemas, y Número de yemas/Número de explantos sembrados y Número de yemas/Número de explantos morfogénéticos.

A continuación se recultivaron los explantos en medios con 1,5 Os/Kg (mESP70 + 7,5% glicerol y mESP100 + 4,5% glicerol) a medio con 1,0 Os/Kg (mESP70 + 2,5% glicerol). A los 20 días del recultivo se evaluaron los resultados siguiendo los índices descritos anteriormente.

Efecto del potencial matricial del medio mESP 70 2,5% glicerol

Se cultivaron 15 explantos "semicírculo" por tratamiento en medio mESP 70 + 2,5% glicerol con 3, 8 y 15 g/l de agar.

A los 20 días en cultivo se evaluaron los resultados siguiendo los índices %Yema, Número de yemas/Número de explantos sembrados y Número de

yemas/Número de explantos morfogénéticos.

Efecto comparativo de la adición de sacarosa y glicerol al medio de cultivo

Se emplearon 61 explantos "semicírculo" extraídos a partir de explantos "disco" cultivados asépticamente en medio mESP durante 30 días. Los explantos se cultivaron en medio mESP 70 con sacarosa al 9% (23 explantos) y glicerol al 2,5% (14 explantos), isoosmóticos con el medio mESP 100 en el que se sembraron 24 explantos.

A los 12 días en cultivo se evaluaron los resultados siguiendo los índices %Yemas, Número de yemas/Número de explantos sembrados y Número de Yemas/Número de explantos morfogénéticos.

A los 20 días se recultivaron los explantos en medios mESP100 y mESP70 + 9% sacarosa a medio mESP70 + 2,5%glicerol volviéndose a evaluar los mismos índices a los 20 días del recultivo.

Regeneración a partir de células libres.

El estudio de la regeneración de células libres en cultivo se realizó partiendo de dos tipos celulares distintos:

Crecimiento y regeneración de carposporas

Las carposporas fueron recolectadas de la superficie de explantos "disco" de gametofito cultivados durante 30 días en medio mESP100 sin bacterias pero con endófitos.

Las esporas se recogieron con una lanceta metálica flameada en alcohol y se sembraron en mESP70 + 2,5% glicerol. Durante la siembra se separaron, en la medida de lo posible, las esporas de los filamentos del endófito.

Se realizaron controles de crecimiento a los 15, 25 y 50 días de la implantación en el medio, sin hacer recultivo del material.

A los 25 días se recultivaron 4 masas celulares formadas por las esporas en medio sólido, al mismo medio mESP70 2,5% glicerol líquido. Se mantuvieron en agitación orbital a 1000 r.p.m., controlándose las características del crecimiento y desarrollo de estas masas celulares a los 15 y 50 días.

Se realizó el estudio histológico de las estructuras regeneradas por las carposporas.

Crecimiento y regeneración de células aisladas enzimáticamente del talo

El material de partida fue 75 mg de peso fresco,

de talos de alga regenerada en medio mESP70 + 2,5% glicerol. El material se sometió a una digestión en 3 ml. de mESP70 + 2,5% glicerol a pH 6.0 con 0.3% celulasa y 0,15% agarasa. La digestión transcurrió en agitación a 70 r.p.m. durante 2,5 horas.

Después de la digestión el material fue homogeneizado manualmente y doblemente filtrado por mallas de 170 μm 100 μm de tamaño de poro. El material vegetal retenido por la primera malla fue devuelto a la solución de digestión, prolongándose la misma hasta las 6 horas.

La malla de 100 μm junto con el material retenido, fue cultivada en medio mESP70 + 2,5% glicerol sólido a pH normal (7.8).

El líquido filtrado a través de la malla de 100 μm , previsiblemente contenía células o agregados celulares, por lo que fue centrifugado a 100 g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 3ml de mESP 70 2,5% glicerol pH 7.8. Se tomaron volúmenes para sembrar en medio líquido mESP70 con glicerol ,1ml / 50 ml de medio,(dos repeticiones), una alícuota para recuento celular en cámara de contaje, y el resto, aproximadamente 1ml, se cultivo en medio sólido con glicerol. Todas las operaciones fueron realizadas en el interior de la cámara de flujo laminar y se

repitearon a las 6 horas de digestión.

Se controló periódicamente el crecimiento en medio sólido y líquido.

II.9.3. Histología y control del crecimiento gemario

Características del crecimiento en medio de cultivo mESP70 + 2,5% glicerol

Se realizó un estudio histológico de la regeneración de los explantos "semicírculo".

Se extrajeron yemas regeneradas en medio mESP por explantos disco asépticos y se cultivaron en medios mESP70 + 2,5% glicerol y mESP. A los 30 días se evaluaron los resultados siguiendo el desarrollo y la elongación de las yemas.

II.9.4. Efecto de la luz en la regeneración con glicerol

Se utilizaron 30 explantos "semicírculo", extraídos de explantos "disco" cultivados asépticamente en medio mESP70 +2,5% glicerol, de los cuales 15 explantos fueron cultivados en condiciones de oscuridad y los otros 15 en las condiciones habituales de iluminación.

A los 20 días se transfirieron a luz los cultivados en en oscuridad, comprobándose el efecto a los 20 días de la transferencia siguiendo los índices Número de

yemas/Número de explantos sembrados y Número de yemas/Número de explantos morfogénéticos.

II.9.5. Crecimiento y desarrollo en medio líquido

Se tomaron 12 explantos crecidos en medio sólido mESP70-2,5% glicerol y se subcultivaron en medios líquidos mESP100 y mESP70-2,5% glicerol. Se sembraron 3 explantos en 50 ml de medio de cultivo en agitación orbital a 1000 r.p.m.

Los explantos fueron recultivados cada 15 días, tomándose medidas del peso fresco, en balanza analítica. Los resultados se expresan en peso fresco por frasco a los 15, 30 y 45 días.

III. RESULTADOS

III.1 . Cultivo de tejidos de Laurencia sp

III.1.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos

Independientemente del tipo de tratamiento y del tamaño de los explantos, estos permanecieron libres de contaminantes durante un periodo de 15 días (7 en medio MCE y 7 en medio mESP) con una efectividad de los tratamientos del 90%. Posteriormente se detectó la presencia de halos bacterianos de morfología y pigmentación, normalmente uniforme en un mismo explanto, aunque variable entre los distintos explantos sembrados.

La contaminación bacteriana iba acompañada por la de algas filamentosas sobre la superficie del explanto.

A los 30 días los explantos estaban totalmente cubiertos por los contaminantes. Los sometidos al procedimiento de baja concentración, que habían permanecido pigmentados, se decoloraron y murieron. Los desinfectados según el procedimiento de alta concentración se depigmentaron inmediatamente después de la desinfección.

Los explantos no desinfectados mostraron un alto grado de contaminación bacteriana a los 3-4 días de sembrados en medio MCE.

III.1.2. Crecimiento y desarrollo del explanto.

Influencia del tipo de explanto.

Los valores más altos del %Regeneración se observaron en los explantos "terminales" (50%), menor en los explantos "estipe" (37%), mientras que los explantos "anclaje" no regeneraron (Tabla III.1). Los explantos "terminales" se decoloraron progresivamente, quedando coloreada al final del ensayo sólo la estructura regenerada. Los explantos "estipe" y "anclaje" permanecieron pigmentados durante toda la experiencia.

Los explantos "terminales" regeneraron en mayor medida callo (35%) que yemas (14%) (Tabla III.1). El callo se produce en igual medida en el ápice distal que en la zona de corte proximal del mismo, pudiendo coexistir ambas en un mismo explanto regenerante. La regeneración de yemas es preferencialmente distal (78% de los regenerantes yemas).

Los explantos "estipe" regeneraron en mayor medida yemas (33%) que callo (4%). Emitieron yemas en las zonas de corte y sobre la superficie del explanto.

Variabilidad dentro de un mismo tipo de explanto.

Los explantos "terminales" de rama corta se decoloraron a los pocos días de la siembra en mESP, no

regenerando en cultivo (Tabla III.1).

Se observó un %Regeneración del 37% en los explantos "terminales" no recultivados, frente al 50% de los explantos "terminales" recultivados. No se detectaron diferencias en la regeneración de callo y yemas en los explantos "terminales" no recultivados (%Callo = %Yema = 17%).

Las yemas regeneradas por los explantos "terminales" no recultivados se elongaron considerablemente hasta contactar con el fondo de la placa de cultivo, desarrollando algunas un disco de fijación en el ápice, perfectamente visible a través de la base de la placa. Todos los explantos "terminales" de rama larga sembrados en medio líquido regeneraron yemas (%Regeneración = %Yema = 100%). Las yemas fueron emitidas en las zonas de corte de los explantos junto a filamentos de naturaleza rizoidal que surgen de la médula (Foto 9). Los explantos presentaban un alto grado de pigmentación y elongación en el extremo distal (ápice) del mismo.

Características de la regeneración

Callo:

La formación de callo en el extremo distal del explanto "terminal" constituía un engrosamiento de la totalidad o parte del ápice del explanto. El aspecto era

compacto, aunque presentaban zonas de textura friable. A partir del callo se producía en algunos casos la regeneración de yemas (Foto 1).

Al microscopio óptico se observó en el callo desarrollado en el ápice, la alternancia de capas celulares organizadas y desorganizadas (Foto 2).

En la zona de corte proximal del explanto terminal el callo era una masa celular semiesférica y altamente pigmentada que recubría prácticamente toda la zona de corte. Tales características eran compartidas por los callos detectados en la zona de corte del explanto "estipe". A partir del callo se produce la regeneración de yemas (Foto 3). Histológicamente no se distinguen capas en la estructura del callo. Las células presentan una disposición desorganizada que hace que aparezcan en los cortes histológicos células de morfología variable. El callo presenta una cutícula gruesa que aísla las células periféricas del exterior, constituyendo, por tanto, una estructura compacta.

La característica celular más relevante de los callos formados en la zona de corte proximal era la intensa granulación de las células. Se pudo apreciar la disminución de la granulación intracelular a medida que las células del callo se organizaban para formar las yemas. (Foto 6).

El estudio histológico con microscopía electrónica de transmisión, demostró que los gránulos presentaban la estructura típica de acúmulos de almidón lo que corrobora la tinción de los mismos con lugol. Las células presentan vesículas de contenido mucopolisacárido, mitocondrias y cloroplastos funcionales, con la estructura tilacoidal típica de algas rojas (Fotos 7 y 8).

Yema: Macroscópicamente las yemas poseían la misma estructura independientemente del lugar de formación de las mismas.

En las zonas de corte la regeneración de yemas "compite" con la regeneración de callo. A los 30 días en cultivo era posible distinguir un tipo de regeneración de otro.

A diferencia de los callos, las yemas se organizaban sin que macroscópicamente pudiera distinguirse una zona desorganizada previa a la emisión de yemas. Tal característica distingue la regeneración organizada de la regeneración de callos morfogénéticos (Foto 9).

Al microscopio se observó, incluso en yemas emitidas en medio líquido, que la regeneración de éstas no se produce directamente a partir de las células medulares, sino a partir de una capa de células que se desarrolla entre la médula del talo y la base de las yemas regene-

radas. Todas las yemas quedan conectadas entre sí y con la médula del talo por esta capa celular. La morfología y disposición de las células en esta zona de transición eran similares a las del callo (Foto 10).

TABLA III.1. Regeneración de Laurencia sp en cultivo. Variabilidad dependiente del tipo de explanto

<u>Tipo explanto</u>	<u>Procedencia en talo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Número Explantos</u>	<u>%Regeneración</u>	<u>%Callo</u>	<u>%Yema</u>
Terminal	rama larga	recultivo	315	50	35	14
		No recultivo	101	34	17	17
	rama corta	recultivo	141	0	0	0
Estipe	zona estipe	recultivo	24	37	4	33
Anclaje	zona fijación	recultivo	23	0	0	0

Efecto de reguladores del crecimiento

A una concentración de 2 mg/l todos los reguladores ensayados, KIN, BA y 2-4D, aumentan la capacidad de regeneración de los explantos "terminales" que alcanzan valores de %Regeneración superiores al ensayo control. Tal incremento afecta tanto al %Callo como %Yema en todos los tratamientos (Tabla III.2).

No se produjo en ningún caso la alteración de los patrones de regeneración descritos para el explanto "terminal", mostrando la regeneración desorganizada y organizada la misma estructura y capacidad de crecimiento en todos los tratamientos.

Todos los reguladores inhibieron la regeneración a una concentración de 5 mg/l. Se obtuvieron los mismos resultados con 5 mg/l de naftenato sódico.

TABLA III.2. Efecto de reguladores del crecimiento vegetal sobre la regeneración en cultivo de Laurencia sp

<u>Concentración Regulador</u>	<u>Medio de Cultivo</u>	<u>Número de Explantos</u>	<u>%Regeneración</u>	<u>%Callo</u>	<u>%Yema</u>
0 mg/l	mESP	30	37	23	13
2mg/l	mESP+KIN	30	60	50	20
	mESP+BA	30	57	27	30
	mESP+2,4-D	30	90	60	33
5mg/l	mESP+KIN	30	0	0	0
	mESP+BA	30	0	0	0
	mESP+2,4-D	30	0	0	0
	mESP+Na-Naft.	30	0	0	0

Efecto de extractos algales

La adición de extractos algales incrementó la capacidad de regeneración de los explantos, alcanzándose valores del %Regeneración superiores a los de los ensayos control en todas las concentraciones de extracto hidrofílico (Fig III.1B) y seco (Fig III.1C) y en las concentraciones bajas (1,25; 0,625 y 0,250 ml/l) de extracto acuoso (fig III.2D). A concentraciones altas (12,5; 6,25 y 2,5 ml/l) de extracto acuoso se obtuvieron los mismos resultados o valores ligeramente superiores del %Regeneración obtenido en el ensayo control (Fig III.1D). La adición de extracto lipofílico fue inhibitoria para la regeneración de los explantos, produciendo la decoloración de los mismos a altas concentraciones (12,5; 6,5 y 2,5 ml/l) o valores del %Regeneración similares al del control a baja concentración (1,25 ml/l) (Fig III.1A).

La adición de extractos hidrofílico , acuoso y seco a altas concentraciones provocó la regeneración de yemas altamente pigmentados, y callos también pigmentados y en su mayor parte morfogenéticos.

Los tipos de regeneración de los explantos "terminales" (callo o yema) variaron aleatoriamente, sin que

se detectara correlación entre los valores de los índices %Callo y %Yema con tipos o concentraciones de un extracto determinado. Hubo incluso variación en la formación de callo y yema entre los dos ensayos control sin extracto, observándose un %Callo del 2% y %Yema de 17% en el primer ensayo control (control 1. Tabla III.3) y un 19% de formación de callo y 9% de yema en el segundo ensayo control (control 2. Tabla III.3).

La mayor homogeneidad de los explantos "cilindro" que carecen de las pequeñas ramificaciones del explanto terminal y de ápices, nos permitieron comprobar que no existen diferencias significativas entre la formación de callo de los explantos sembrados en medios con extractos y los sembrados en medio control sin extractos (Fig III.2 A,B,C,D). Por contra, el Número de yemas/ Número de explantos sembrados fue superior al control en todos los explantos "cilindro" cultivados en medios con extractos, excepto en el extracto seco a concentración de 10 mg/l y lipofílico a 12,5ml/L (Fig III.3 A,B,C,D).

La regeneración de callo en el explanto "cilindro" fue polar, observándose en todos los tipos de medios de cultivo que del 80 al 90% de los explantos que formaron callo lo hicieron en la zona de corte proximal del explanto.

TABLA III.3. Valores de %callo y %yema dependientes del tipo y concentración de extractos

<u>Tipo de Extracto</u>	<u>Concentración</u>	<u>Numero Explantos</u>	<u>%Callo</u>	<u>%Yema</u>
Concentracion Alta				
Control 1	-----	26	2	17
Hidrofílico	6,25ml/l	45	33	11
Acuoso	2,5ml/l	45	26	24
Seco	250mg/l	45	69	35
Concentración Baja				
Control 2	-----	30	19	9
Hidrofílico	1,25ml/l	45	51	7
	0,625ml/l	45	42	33
Acuoso	1,25ml/l	45	66	0
	0,625ml/l	45	60	7

Control 1= mESP sin extractos control efecto altas concentraciones
 Control 2= mEsp sin extractos control efecto bajas concentraciones

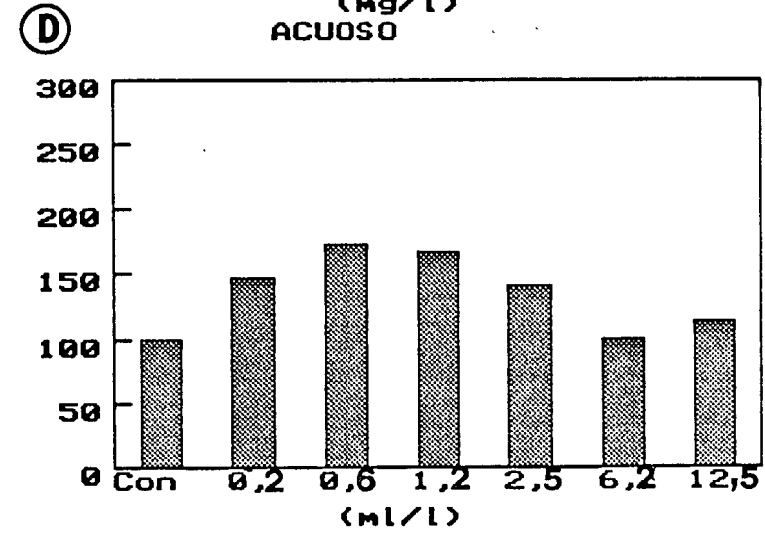
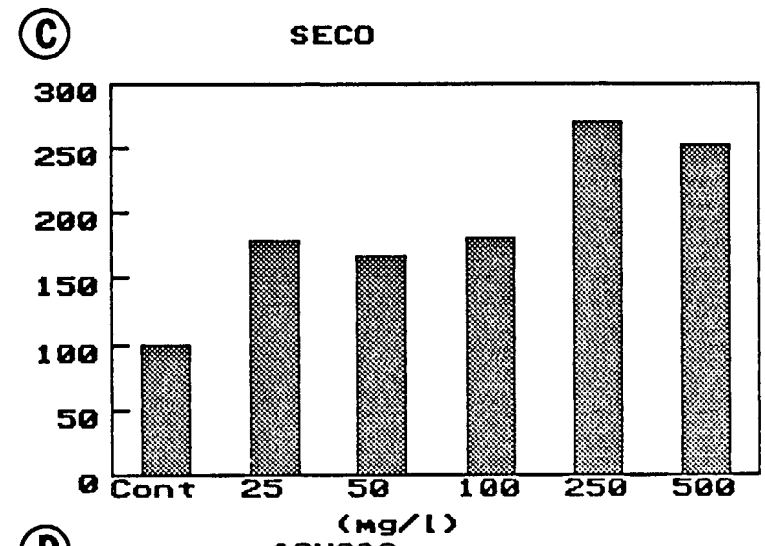
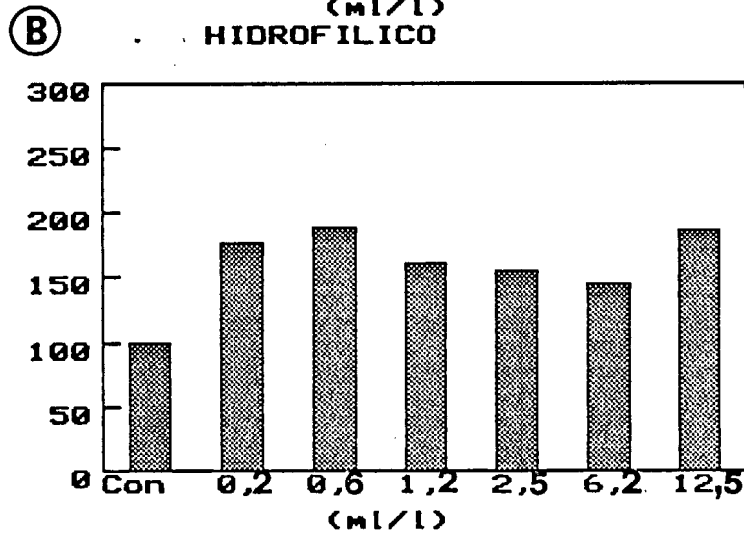
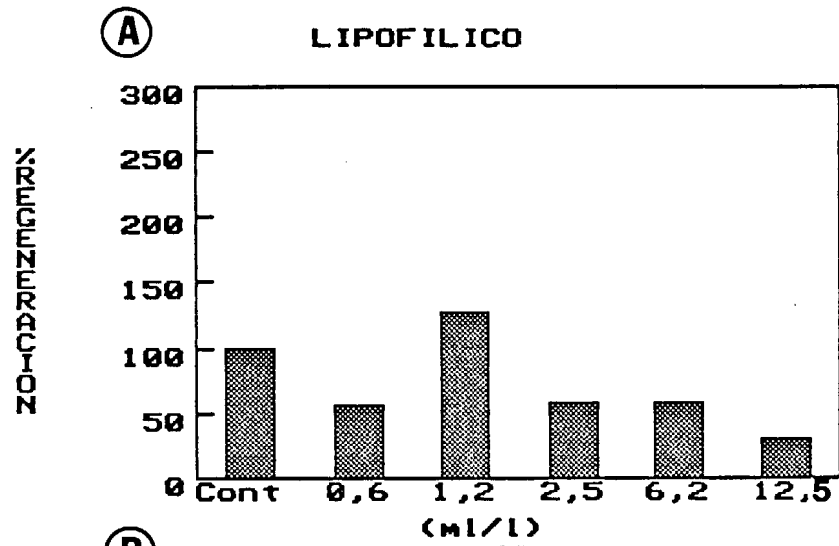


FIG III.1. Efecto de la adición de extractos de Laurencia sp sobre el %Regeneración de explantos "terminales" de Laurencia sp.

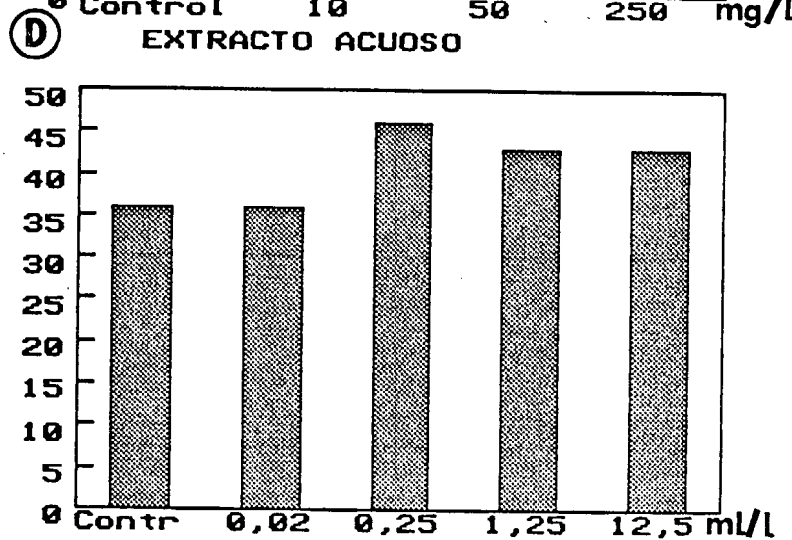
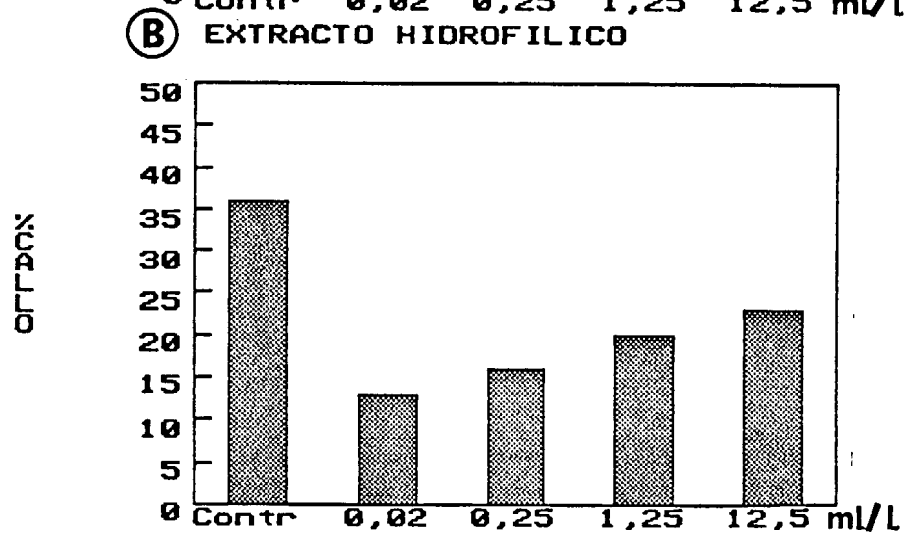
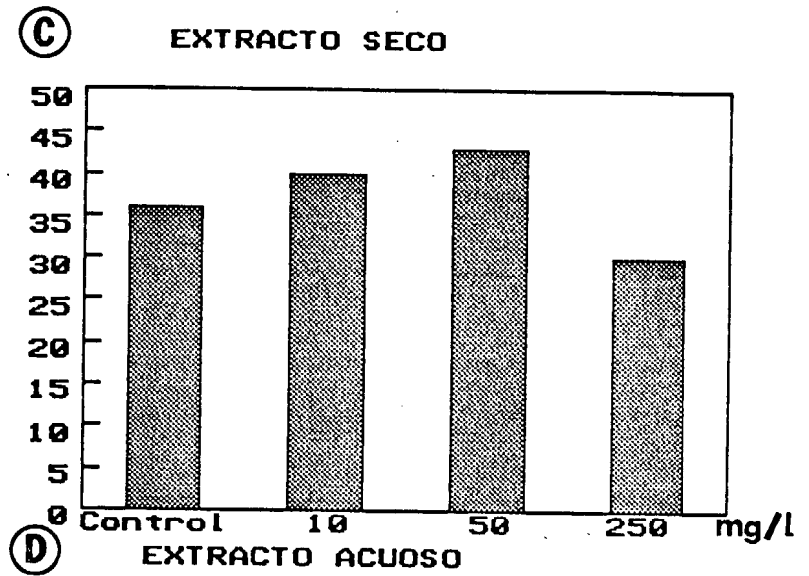
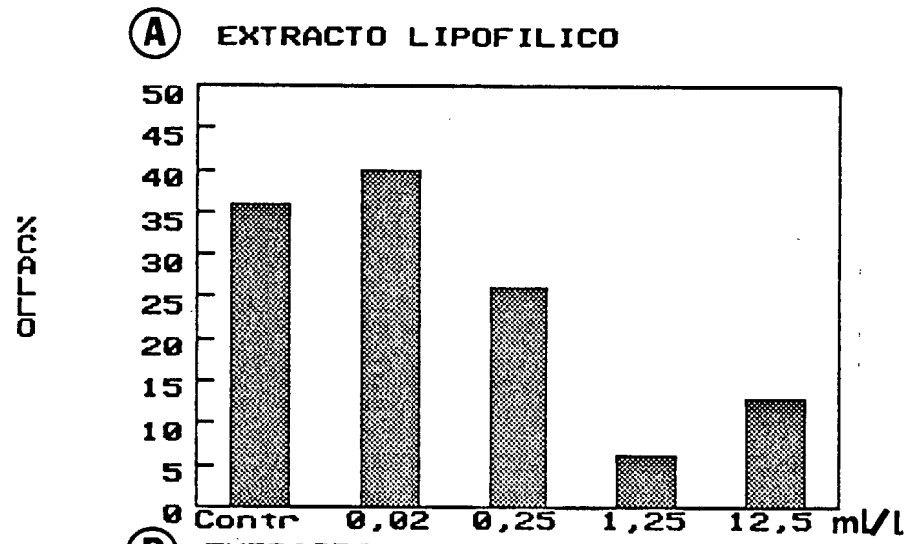


FIG III.2. Efecto de la adición de extractos de Laurencia sp sobre el %Callo de explantos "cilindro" de Laurencia sp.

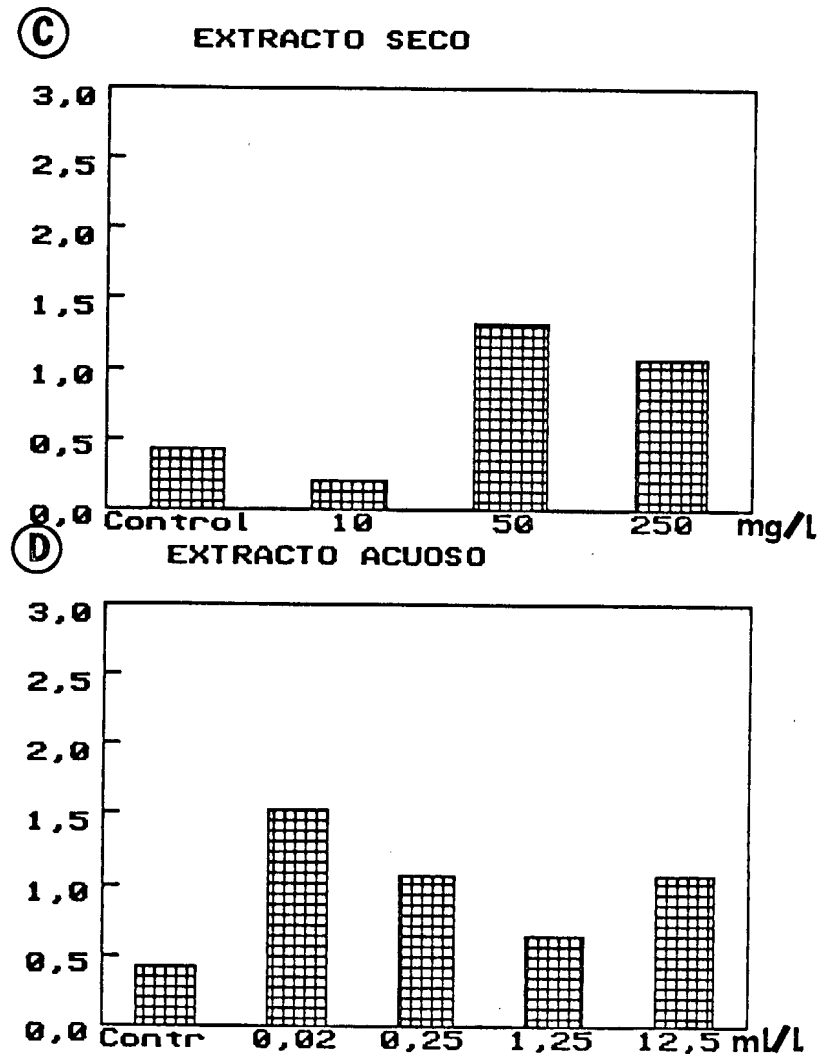
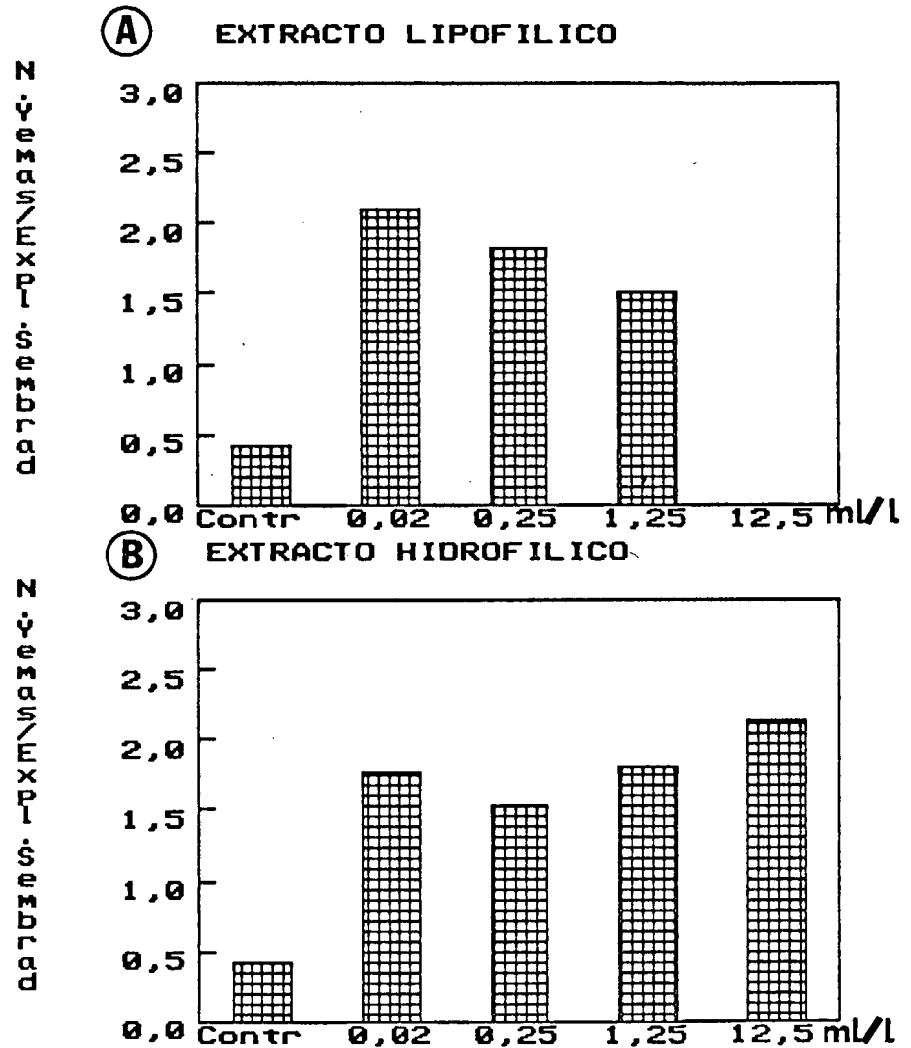


FIG III.3. Efecto de la adición de extractos de Laurencia sp sobre la morfogénesis de explantos "cilindro" de Laurencia sp.

Efecto del potencial hídrico del medio de cultivo

Independientemente de la osmolalidad del medio de cultivo o la concentración de agar del mismo se detectaron diferencias significativas en la formación de callo y yemas entre los extremos proximal y distal, siendo la formación de callo superior en el extremo proximal y la de yemas superior en el distal (Tabla III.4). El análisis del efecto del potencial hídrico sobre la regeneración de esta especie se centró para el callo en el extremo proximal y para la regeneración de yema en el extremo distal.

Potencial osmótico

La adición de manitol al medio de cultivo provocó un rápido crecimiento de los contaminantes que inhibieron la regeneración de los explantos.

El potencial osmótico del medio de cultivo disminuyó la capacidad regenerativa de los explantos en todos los tipos de medios con osmolalidad inferior 0,7 Os/Kg y superior a 1,0 Os/Kg, con valores de %Regeneración del 0 al 5% del obtenido en el ensayo control (Fig III. 4A). A osmolalidades entre 0,7 y 1,0 Os/kg los resultados varían dependiendo del tipo de medio. En medios de cultivo tipo mESP50 se observaron diferencias en el %Regeneración obtenido en osmolalidades de 0,7 (41%) y

1,0 Os/kg (55%). En medios tipo mESP70 los valores del %Regeneración fueron similares (30% en 0,7 Os/Kg y 34% en 1,0 Os/Kg) (Fig III.4A).

La formación de callo (%Callo) en el extremo proximal y de yema (%Yema) en el distal se ven afectadas por el potencial osmótico en la misma medida que la regeneración total, disminuyendo a osmolalidades inferiores a 0,7 Os/Kg y superiores a 1,0 Os/Kg. (%Callo y %Yema 0 a 5% del obtenido en el ensayo control) (Fig III.4B).

El comportamiento en la formación callo (%Callo) de los explantos entre osmolalidades de 0,70s/Kg y 1,0 Os/Kg fue diferente dependiendo del tipo de medio, no existiendo diferencias significativas en medio mESP50 (%Callo 42% del control en 0,7 y 35% del control en 1,0 Os/Kg), mientras que existen diferencias en la formación de callo en medio mESP70, siendo significativamente menor en 0,7 Os/Kg (%Callo = 11% del control en 0,7 y de 39% del control en 1,0 Os/kg) (Fig III.4B).

El %Yema no varió entre 0,7 Os/Kg y 1 Os/Kg en mESP50 con valores del 26% del ensayo control en medio con 0,7 Os/Kg y un 28% del control en 1,0 Os/Kg. En mESP70 los %Yema en 0,7 Os/Kg fue superior (76%) al obtenido en 1 Os/Kg (62%) (Fig III.4C).

Al mismo valor de osmolalidad (1,0 Os/Kg) entre los distintos tipos de medios, la reducción en la concentración de agua de mar afectó a la regeneración total (%Regeneración) con menor valor en mESP70 (34% del control) y mayor valor en mESP100 (100%) (Fig III.4A).

La formación de callo aumenta con la concentración de agua de mar observándose valores de %Callo bajos en medios mESP50 y mESP70 (35% y 39% respectivamente) con respecto al mESP100 (100%). (Fig III.4B).

La formación de yemas fue también superior en medio mESP100 (100%) que en el resto, aunque en este caso la regeneración de yemas fue considerable en mESP50 (%Yema en mESP50 = 62% del control; en mESP70 = 26% del control) (Fig III.4C).

Potencial matricial

El aumento de la concentración de agar del medio mESP100 disminuyó la capacidad regenerativa de los explantos (%Regeneración. Fig III.5) aunque se observó distinto comportamiento dependiendo del tipo de regeneración.

La disminución en la concentración de agar a 3 g/l redujo la formación de callo a valores de %Callo del 18% frente a los observados en medios con 8 y 15 g/l de agar (100% y 102% respectivamente) (Fig III.5).

La disminución de la concentración de agar aumentó la capacidad de regeneración de yemas con valores del %Yema de 215% en 3g/l, 100% en 8g/l y 45% en 15 g/l de agar (Fig III.5).

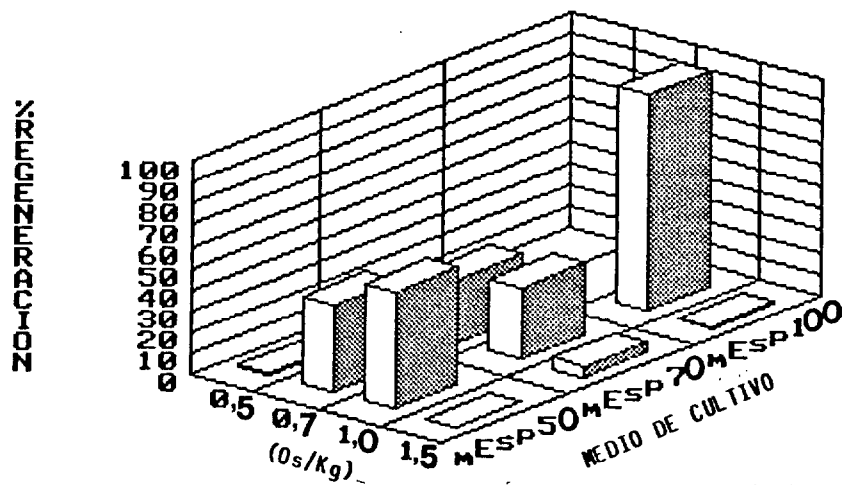
TABLA III.4. Efecto del potencial hídrico del medio de cultivo sobre la regeneración de Laurencia sp

Medio de Cultivo	Número de Explantos	%regeneración	% C A L L O		% Y E M A	
			proximal	distal	proximal	distal
mESP50	195	0,5	0	0	0	0,5
mESP50-6NaCl	195	17	10	1	5	13
mESP70	195	12	2	0,5	5	5
mESP100	195 (*)	41	23	3	1	17

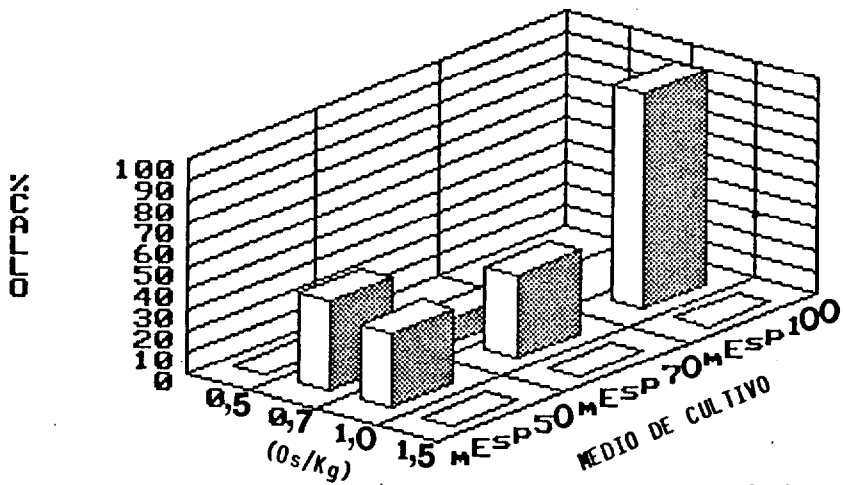
mESP50-16NaCl	195	31	9	1	15	18
mESP70-10NaCl	195	19	10	0,5	3	8
mESP50-30NaCl	195	0	0	0	0	0
mESP70-24NaCl	195	2	0	0	2	1,5
mESP100-15NaCl	195	0,5	0	0	0	0,5
mESP100-3agar	195	87	5	1	66	72
mESP100-8 agar	195 (**)	55	25	5	8	29
mESP100-15agar	195	43	26	5	2	13

TOTAL	2553	24	8	1	8	14
			ts= 13,36		ts= 6,91	

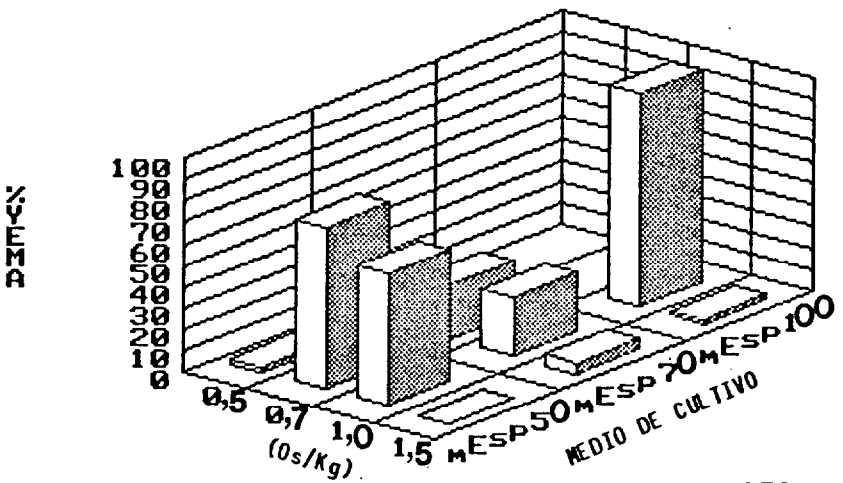
(*) Ensayo control primera experiencia.
 (**) Ensayo control segunda experiencia.
 Concentración de los compuestos en gramos/litro.



(A)



(B)



(C)

FIG III.4. Efecto de la osmolalidad del medio de cultivo sobre la regeneración de explantos "cilindro" de *Laurencia* sp. (A) Efecto sobre el %Regeneración. (B) Efecto sobre el %Callo. (C) Efecto sobre el %Yema. Osmolalidad (Os/Kg): 0,5 (mESP50); 0,7 (mESP50+6 g/l NaCl, mESP70); 1,0 (mESP50+16 g/l NaCl, mESP70+10 g/l NaCl, mESP100); 1,5 (mESP50+30 g/l NaCl, mESP70+24 g/l NaCl, mESP100+15 g/l NaCl)

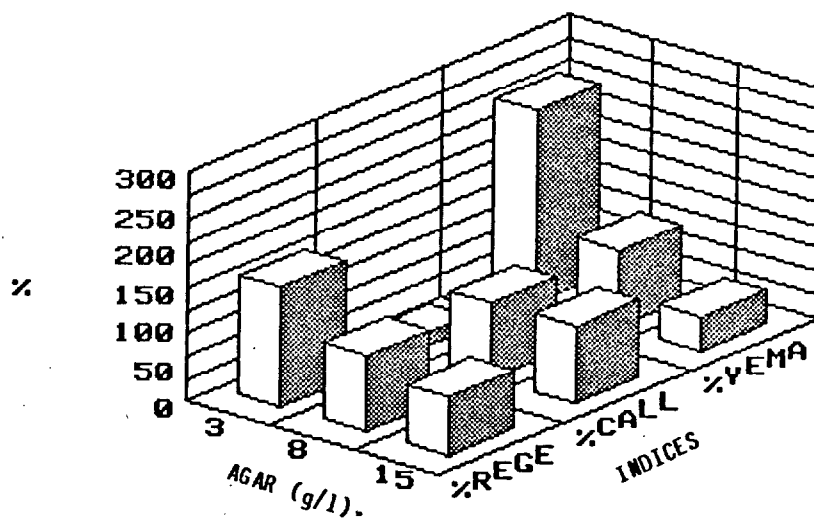


FIG III.5. Efecto de la concentración de agar del medio de cultivo ESP100 sobre la regeneración de explantos "cilindro" de *Laurencia* sp. (%REGE= %Regeneración; %CALL= %Callo).

III.1.3. Crecimiento y morfogénesis de los callos.

Los callos formados en el polo distal del explanto terminal (ápice), pueden regenerar una o varias yemas antes o después de ser aislados. Sin embargo, después de su separación del explanto "terminal" se decoloran adoptando una pigmentación verdosa, hasta quedar completamente blancos.

Las experiencias preliminares realizadas para el cultivo del callo de zona de corte, indicaron la necesidad de cierta porción del explanto inicial, por pequeña que fuera. Normalmente, el fragmento de explanto estaba totalmente depigmentado en el momento del aislamiento del callo, por lo que se descartó la posibilidad de que el callo dependiera de tal porción para su crecimiento. En todas las experiencias realizadas con callos nunca se observó ni la repigmentación del fragmento de explanto, ni la regeneración a partir del mismo.

Los callos de la zona de corte pueden ser separados del explanto siendo morfogénéticos o no morfogénéticos. A los 15 días de cultivo pudo apreciarse como los callos no morfogénéticos han pasado a ser morfogénéticos. Se observaron diferencias significativas entre los valores iniciales y finales del índice Número de Yemas/ Número de callos sembrados (Tabla III.5). No se observa-

ron diferencias entre los valores iniciales y finales del índice Número de yemas/Número de callos morfogénicos (Tabla III.5), lo que es indicativo de la existencia de un número constante de yemas por callo morfogénico.

TABLA III.5. Evolución de la capacidad morfogenética de los callos de Laurencia sp

<u>Muestra</u>	<u>NUMERO DE CALLOS</u> Morfogeneticos			<u>Yemas/sembrado (Y/S)</u>		<u>Yemas/morfogenético (IM)</u>	
	<u>Total</u>	<u>Dia 0</u>	<u>Dia 15</u>	<u>Dia 0</u>	<u>Dia 15</u>	<u>Dia 0</u>	<u>Dia 15</u>
1	17	11	15	2,11	3,00	3,27	3,40
2	18	15	18	1,72	2,55	2,06	2,55
3	17	13	15	1,76	1,70	2,30	1,93
4	21	13	20	2,09	4,28	3,38	4,50
5	16	2	7	0,31	1,12	2,50	2,57
6	21	17	21	2,61	3,23	3,23	3,23
7	14	4	13	1,07	2,14	3,75	2,30
8	17	7	14	1,41	2,35	3,42	2,85
TOTAL:	141	82	123				

$\overline{Y/S}$ Dia 0 = 1,63±0,76 $\overline{Y/S}$ Dia 15 = 2,54±0,97 (**)

\overline{IM} Dia 0 = 2,98±0,61 \overline{IM} Dia 15 = 2,91±0,79 n.s

(**) 0,01 > P > 0,001
n.s no significativa.

Efecto de reguladores del crecimiento sobre la morfogénesis de callos

La adición de 2-4D al medio de cultivo a concentración de 5 mg/l no tuvo efecto sobre la morfogénesis de los callos, observándose valores de los índices Número de yemas/Número de callos sembrados y Número de yemas/Número de callos morfogénéticos similares al del ensayo control (Tabla III.6).

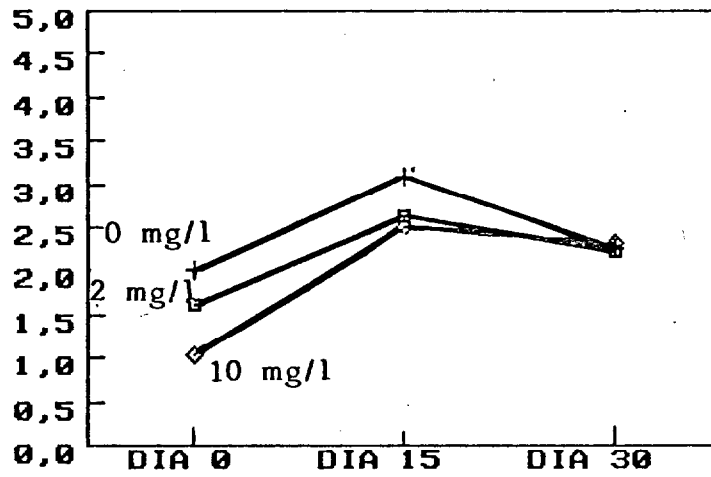
La adición de 2,4-D a concentraciones de 10 y 15 mg/l tuvo un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los callos. Las yemas de los callos inicialmente morfogénéticos, y algunos callos, se depigmentaron totalmente.

La adición de KIN a 2 y 10 mg/l no tuvo efecto sobre la regeneración de los callos, observándose resultados similares a los obtenidos en el ensayo control sin regulador. El número de yemas/ Número de callos sembrado aumentó hasta el día 15, disminuyendo o permaneciendo constante del día 15 al 30 (Fig III.6A). El Número de yemas/Número de callos morfogénéticos permaneció prácticamente constante durante los 30 días (Fig III.6B).

TABLA III.6. Efecto del 2,4-D sobre la morfogénesis de los callos de Laurencia sp

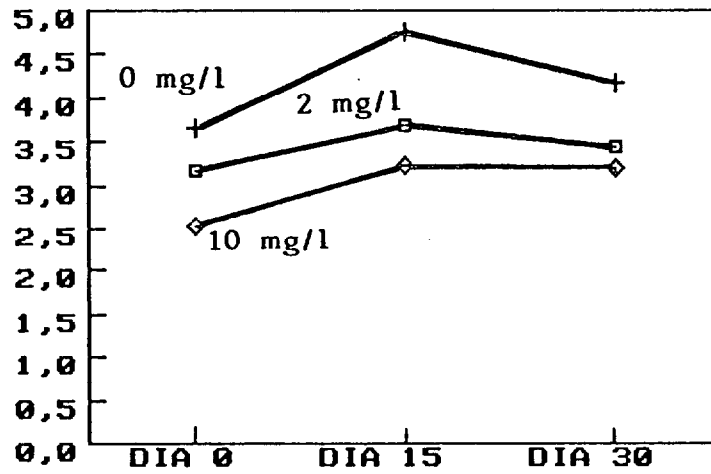
<u>2,4-D</u> <u>(mg/l)</u>	<u>Numero de callos</u>		<u>Yemas/sembrado</u>		<u>Yemas/morfogenético</u>		
	<u>Total</u>	<u>Morfogenéticos</u> <u>Día 0</u>	<u>Día 15</u>	<u>Día 0</u>	<u>Día 15</u>	<u>Día 0</u>	<u>Día 15</u>
0	7	4	4	1,14	2,71	2,00	4,75
5	8	3	6	0,63	2,00	1,66	2,67
10	8	4	3	1,25	0,50	2,50	1,33
15	8	3	2	1,38	0,38	3,66	1,50

Yemas/Callos sembrados



(A)

Yemas/Callos morfogenéticos



(B)

FIG III.6. Efecto de Kinetina (2 y 10 mg/l de mESP) sobre la morfogénesis de callos de *Laurencia* sp. (A) Evolución del índice Yemas/ N. Callos sembrados (Y/S). (B) Evolución del índice Yemas/N. Callos morfogenéticos (IM).

Efecto de la concentración de agar del medio de cultivo sobre la morfogénesis de los callos

La concentración de agar del medio de cultivo no afectó a la capacidad morfogénica de los callos, observándose a los 15 días de cultivo en medios con 3 y 8 g/l de agar valores del índice Número de yemas/Número de callos sembrados de 1,83 y 1,73 respectivamente. Sin embargo, los callos cultivados en medio con 3 g/l de agar formaron yemas que mostraron mayor elongación.

III.1.4. Cultivo de callos en medio líquido

Los yemas de los callos morfogénicos no resistieron la desinfección con métodos como la sonicación+ Betadine y las incubaciones con antibióticos. Tales tratamientos provocan la depigmentación de las yemas y el desarrollo de gran cantidad de contaminantes, detectables desde los primeros días de la siembra en placas de Petri con medio mESP.

Sólo un 23% de los callos no desinfectados sembrados pudieron crecer y desarrollar plantas con yemas de hasta 1cm de largo y con un incremento de 22 veces el peso fresco inicial (Foto 11 y 12). La viabilidad de los callos dependió en gran medida del control y eliminación

manual de los contaminantes algales desarrollados. El crecimiento de los contaminantes fue incontrolado a los 80 días de cultivo, muriendo los callos al quedar totalmente cubiertos por algas epífitas.

Foto 1.- Callo morfogénético de zona distal del explanto "terminal" de Laurencia sp (10X).

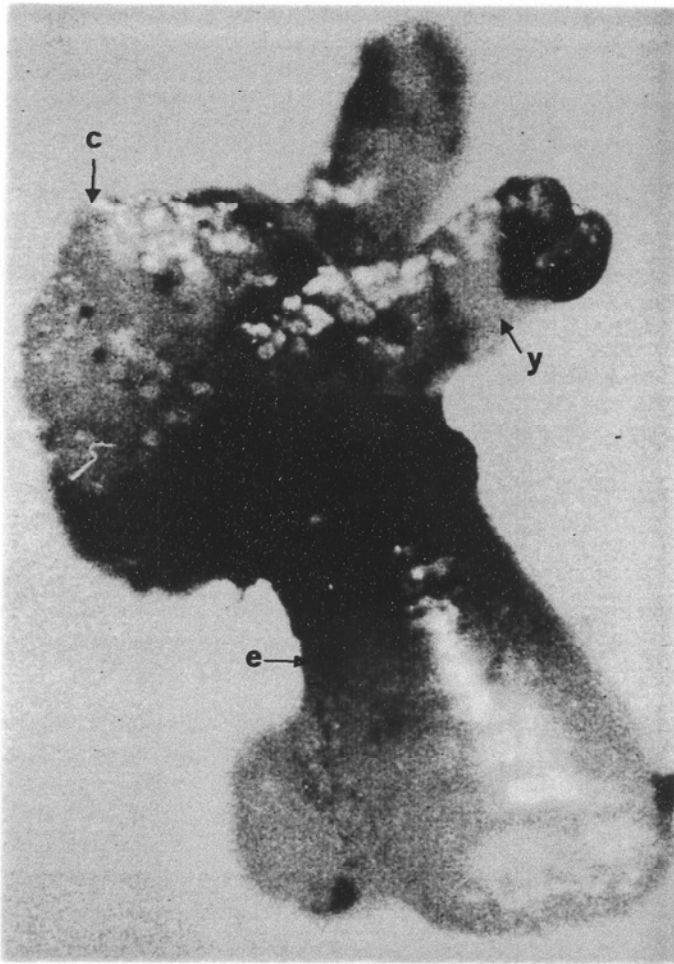
Foto 2.- Corte semifino de callo de zona distal del (1100X).

Foto 3.- Callo no morfogénético de zona de corte proximal del explanto "terminal" de Laurencia sp (10X).

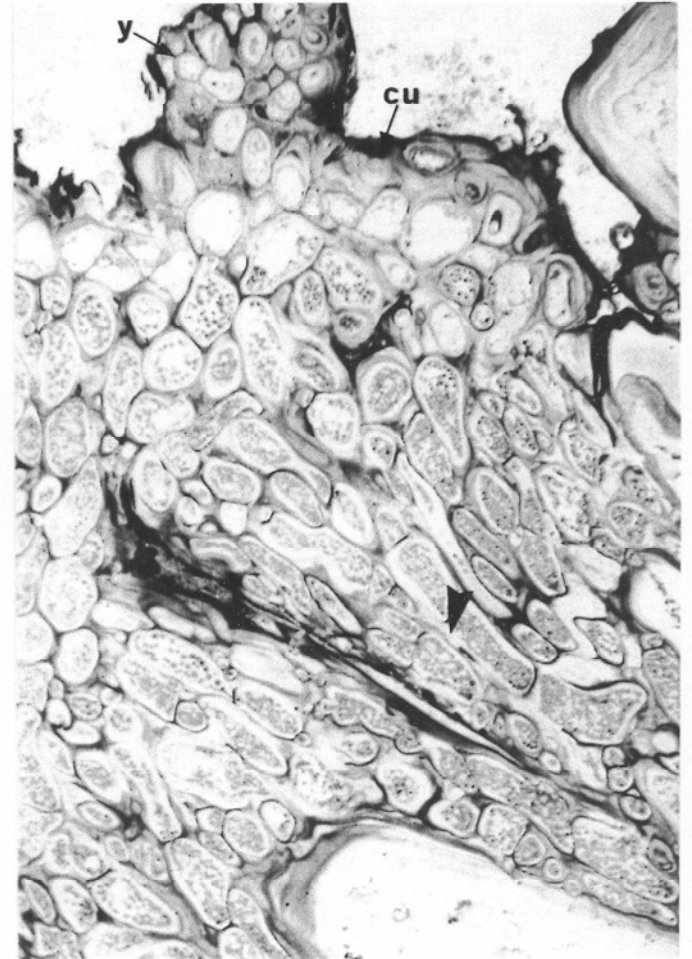
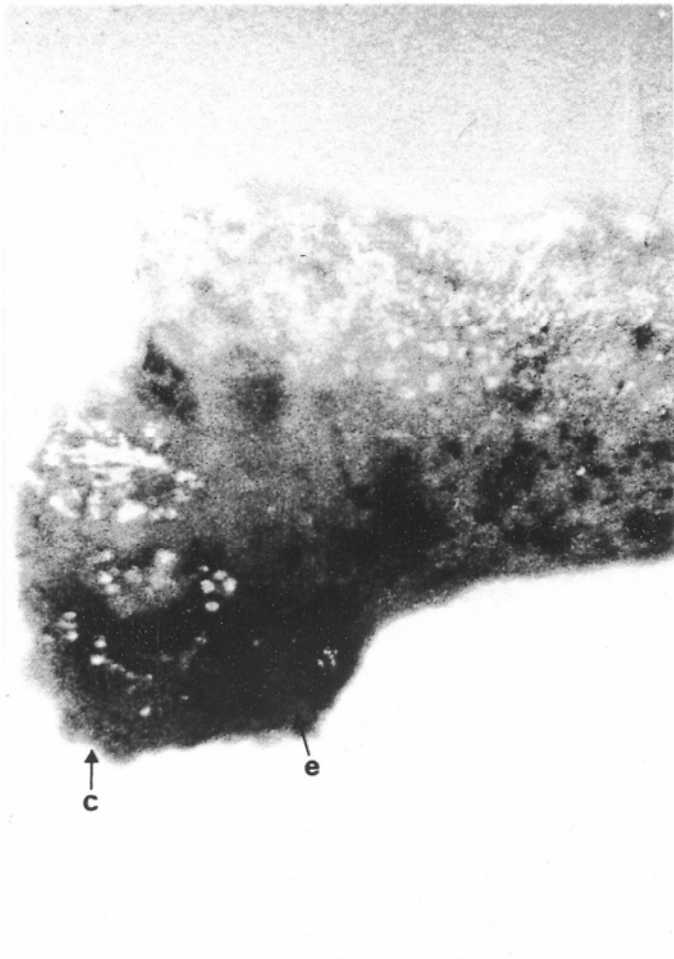
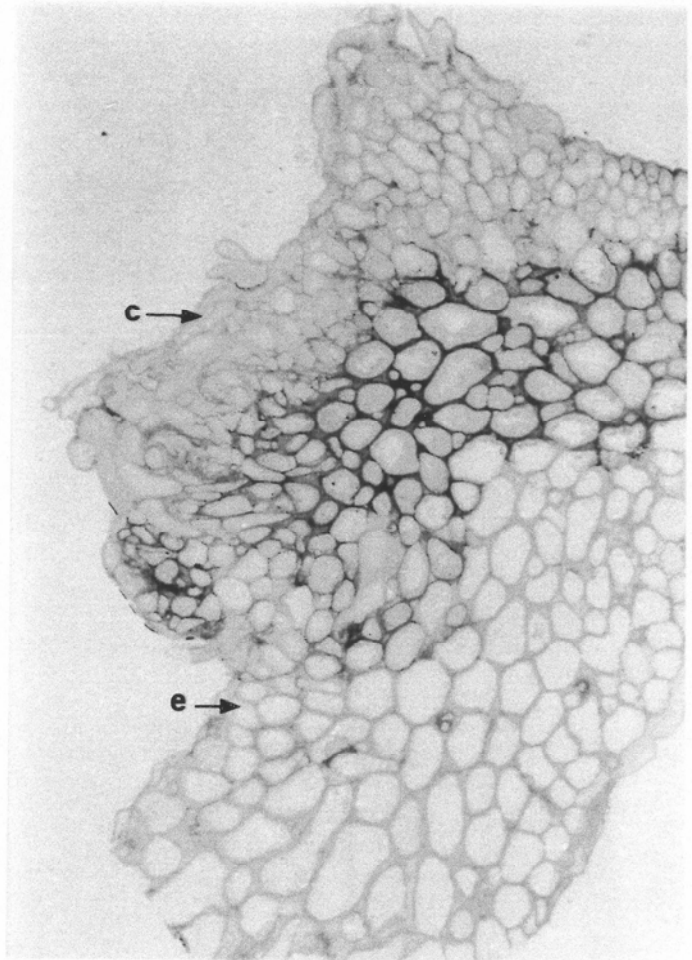
Fotos 4 .- Corte semifino de callo morfogénético de zona de corte proximal. Nótese las células elongadas (flecha) (1750X).

(c=callo, cu=cutícula, e=explanto, y=yemas)

1



2



3

4

Fotos 5 .- Corte semifino de callo morfogénico de zona de corte proximal. Nótese las células elongadas (flecha) (1750X).

Foto 6.- Corte semifino de callo proximal del explanto "terminal" de Laurencia sp. Vista de campo de células con gránulos de almidón de florideas (flecha) (4000X).

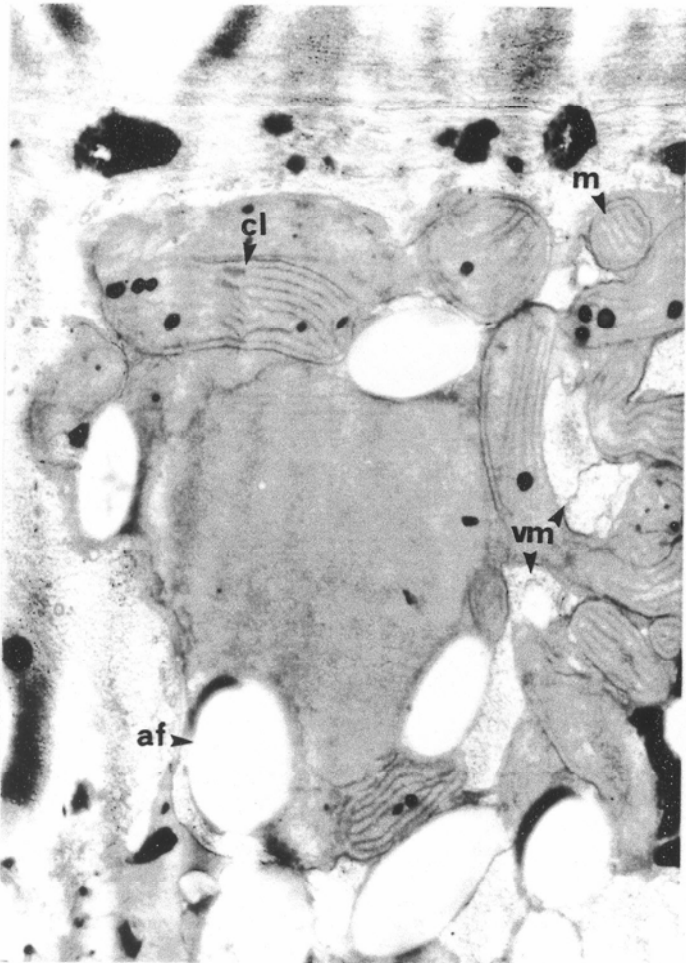
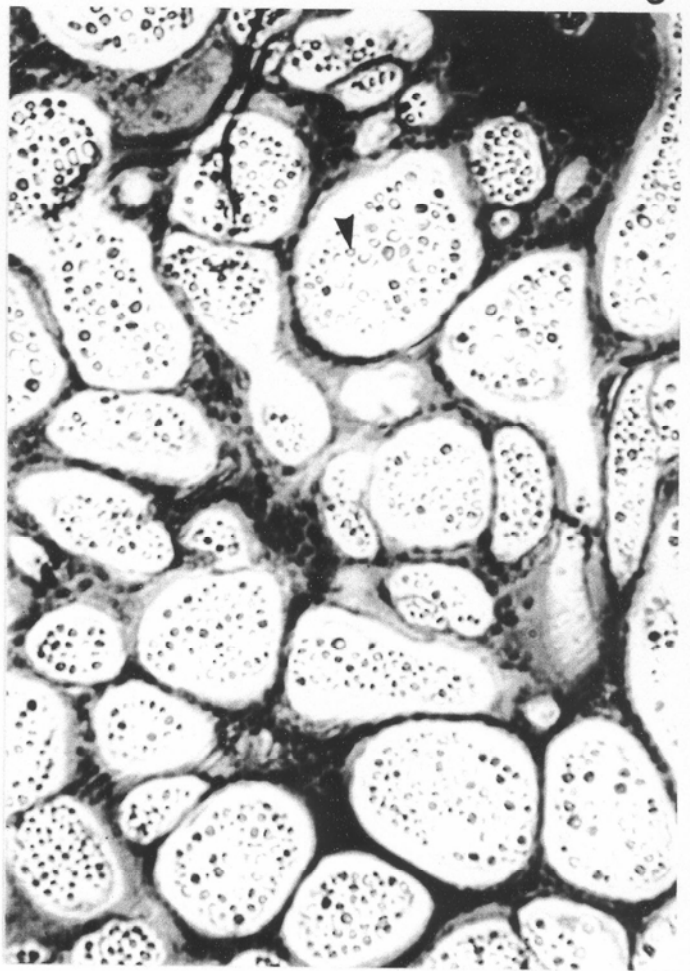
Foto 7 y 8.- Campo intracelular en callo de zona de corte proximal (13000X).

(af=almidón de florideas, cl=cloroplasto, m=mitocondrias, v.m=vesículas de contenido mucilaginoso).

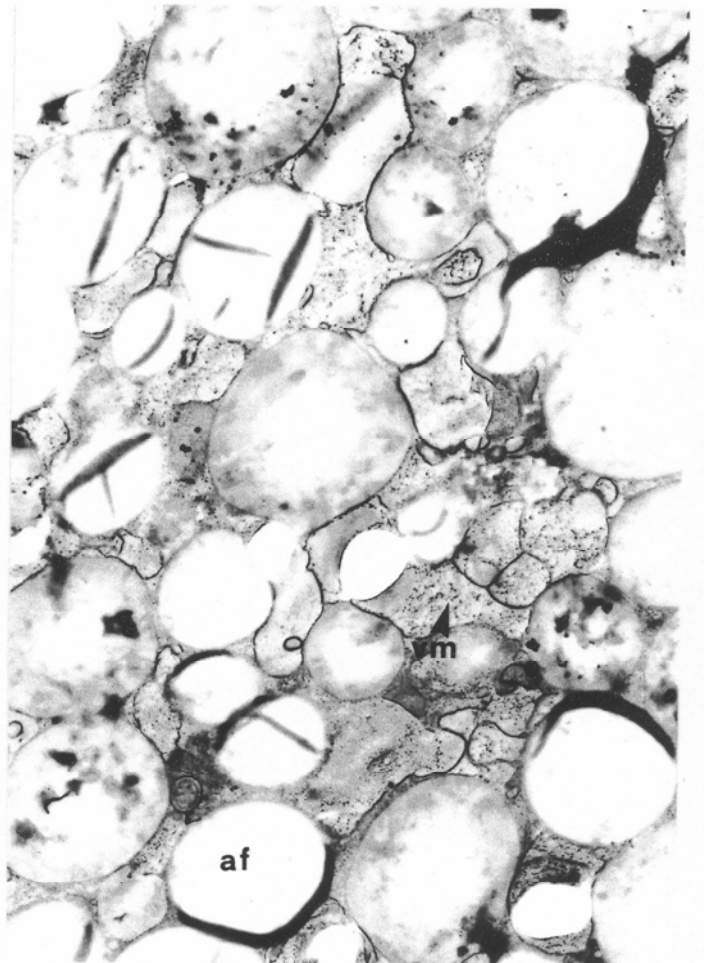
5



6



7



8

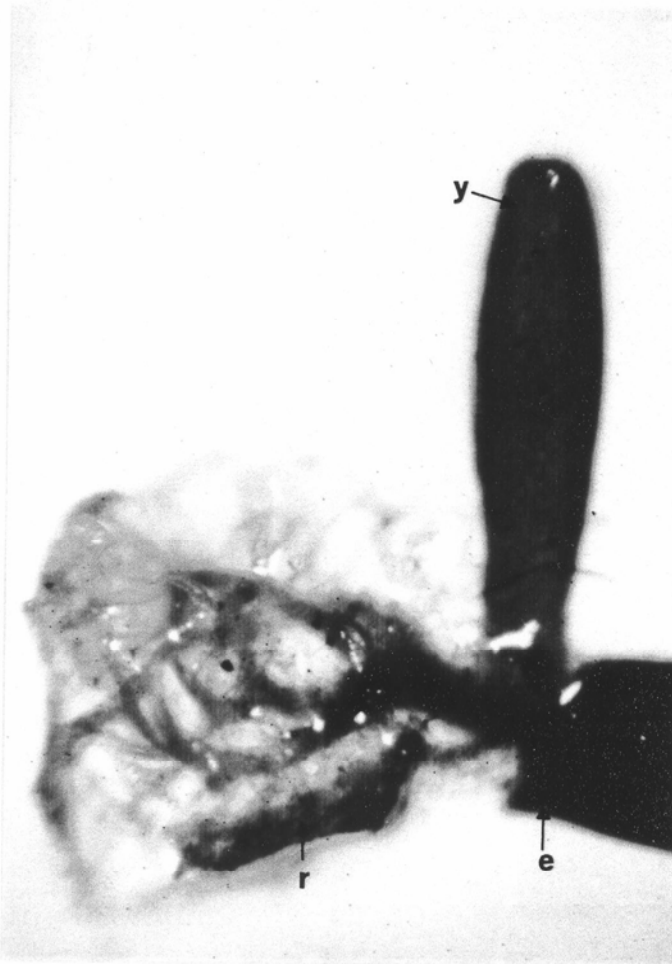
Foto 9.- Regeneración de yemas y rizoides a partir de zona de corte proximal del explanto "terminal" de Laurencia sp cultivado en medio líquido (10X).

Foto 10.- Corte histológico de zona de regeneración de yemas mostrando la capa celular intermedia entre las células del corte y la base de las yemas (flecha) (1100X).

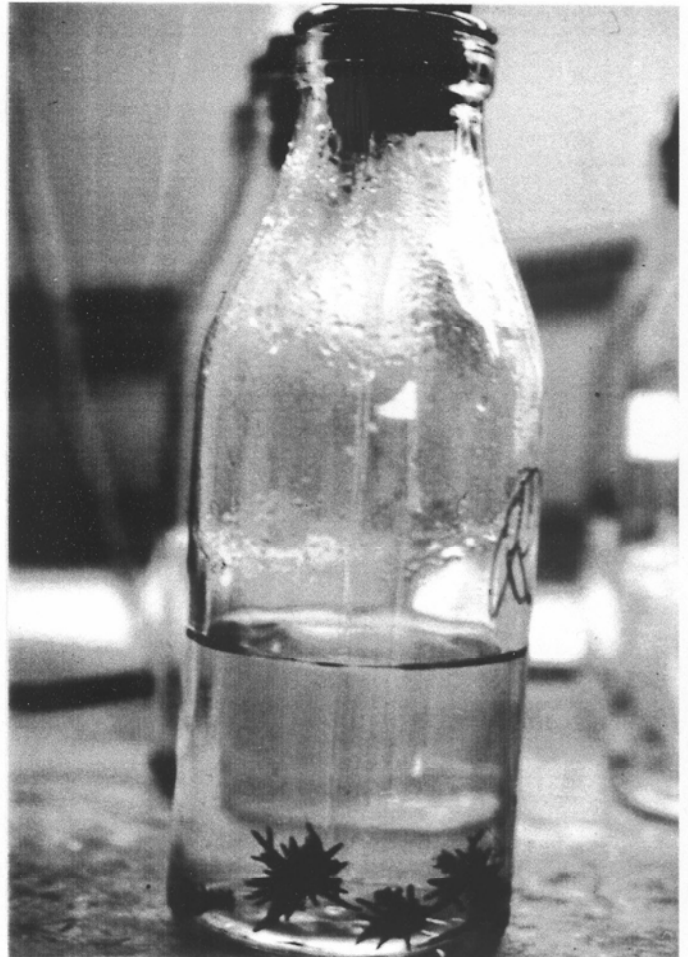
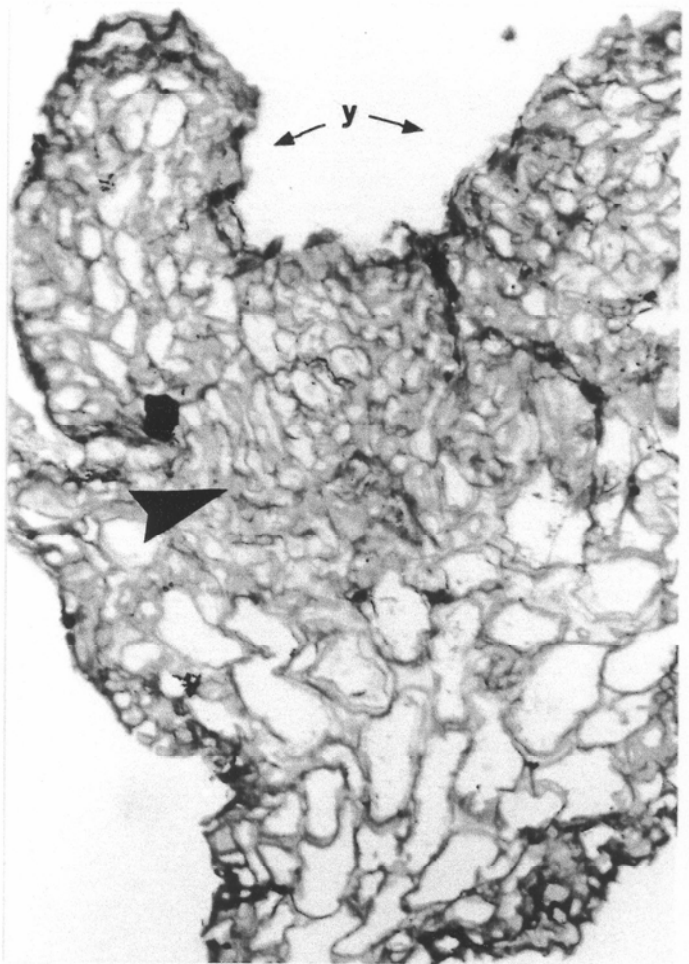
Foto 11 y 12.- Plántulas formadas a partir de callos cultivados en medio líquido.

(e=explanto, r=rizoides, y=yemas).

9



10



11

12

III.2. Cultivo de tejidos de Gelidium versicolor, Gelidium arbuscula y Gracilaria ferox

III.2.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos

Gelidium versicolor

Los resultados obtenidos en los ensayos de desinfección de explantos "estipe" fueron independientes del tamaño de los explantos. A los 30 días de la desinfección permanecían axénicos un 25% de los desinfectados con el procedimiento de baja concentración y un 17 % con el de alta concentración. Los explantos axénicos mostraban una pigmentación normal, pero sin regenerar.

A los 60 días se observaron filamentos de contaminantes algales sobre la superficie de los explantos, acompañados , en algunos casos, por colonias bacterianas de morfología y pigmentación homogénea en un mismo explanto, aunque variable entre explantos. No se detectó la emisión de estructuras regenerantes.

Los explantos "estipe" no desinfectados mostraron un alto grado de contaminación bacteriana a los pocos días de su siembra en medio MCE.

Un 70% de los explantos "estipe" desinfectados con

los procedimiento de baja concentración y sembrados inicialmente en mESP con la concentración de vitaminas aumentada 10 veces, se mantuvieron axénicos y pigmentados durante 30 días, sin que se observara regeneración alguna. El cultivo posterior de los explantos dio lugar a la aparición de contaminantes algales. A los 60 días los explantos estaban totalmente cubiertos por contaminantes, sin que se observara la emisión de estructuras regenerantes.

Un 20% de los explantos "rizoide" desinfectados siguiendo el procedimiento de baja concentración permanecían axénicos a los 20 días de la desinfección. A los 45 días los explantos mostraban alta contaminación y una progresiva depigmentación.

Los explantos "rizoide" no desinfectados mostraron un alto grado de contaminación bacteriana a los pocos días de su siembra en MCE.

Gelidium arbuscula

Un 42% de los explantos "rizoide" desinfectados siguiendo el procedimiento de baja concentración permanecían axénicos a los 20 días de la desinfección. A los 45 días los explantos mostraban alta contaminación y una progresiva depigmentación.

Los explantos "rizoide" no desinfectados mostraron

un alto grado de contaminación bacteriana a los pocos días de su siembra en MCE.

Gracilaria ferox

Un 30% de los explantos "estipe" desinfectados siguiendo el procedimiento de baja concentración permanecían axénicos a los 10 días de la desinfección. A los 28 días los explantos mostraban alta contaminación y una progresiva depigmentación.

Los explantos "estipe" no desinfectados mostraron un alto grado de contaminación bacteriana a los pocos días de su siembra en MCE.

III.2.2. Crecimiento y desarrollo del explanto

Influencia del tipo de explanto

Gelidium versicolor

Los explantos "terminal" y "estipe" presentaron la misma capacidad regenerativa, con valores del %Regeneración de 90% y 93% respectivamente (tabla III.7) . La única forma de regeneración detectada en ambos tipos de explanto fue la regeneración de yemas.

Los explantos "terminales" regeneraron yemas por toda la superficie de los mismos, no regenerando en las zonas de corte.

Los explantos "estipe" regeneraron yemas en las zonas de corte proximal y distal.

Gelidium arbuscula

Se detectaron diferencias en el %Regeneración entre los distintos tipos de explantos, con valores superiores en los explantos "terminales" (93%) que en los explantos "estipe" (53%) (tabla III.7). La única forma de regeneración detectada en ambos tipos de explantos fue la regeneración de yemas.

Los explantos "terminales" regeneraron yemas a lo largo toda la superficie de los mismos, no detectándose regeneración en la zona de corte.

Los explantos "estipe" regeneraron yemas en las zonas de corte proximal y distal.

Gracilaria ferox

No se detectaron diferencias en los valores del %Regeneración entre los explantos "terminal" y "estipe" (74% y 80% respectivamente) (Tabla III.7). Ambos tipos de explantos regeneraron tanto callo como yemas.

Los valores del %Callo y %Yema en los explantos "terminales" fueron los mismos (37%) (Tabla III.7). Ambas formas de regeneración se localizaron a lo largo del explanto. No hubo regeneración en la zona de corte. El valor del %Callo en explantos "estipe" fue de un

36%. El %Yema fue de un 43%. (Tabla III.7). Ambas formas de regeneración se localizaron en las zonas de corte, fundamentalmente la distal (90% de los regenerantes).

Características de la regeneración

Gelidium versicolor

Yema: En el explanto "terminal" consistían en protuberancias que se extendían a lo largo de toda la superficie del explanto, mientras que en el explanto "estipe" surgían de las zonas de corte proximal y distal.

El estudio histológico de la regeneración en la zona de corte, puso de manifiesto que la base de la yema o yemas regeneradas representan una continuación de los tejidos de la capa medular del talo (Foto 17).

Gelidium arbuscula

Las características de las yemas regeneradas en esta especie coincidieron con las de G.versicolor, manteniendo la regeneración las características de pigmentación, forma y tamaño que diferencia a ambas especies.

Gracilaria ferox

El aspecto de las yemas era similar en el explanto "terminal" y "estipe".

En el explanto "terminal" las yemas surgían de forma regular en determinadas zonas del mismo. En el

explanto "estipe" las yemas surgían a lo largo del borde de la zona de corte, hasta que la recubrían totalmente (Foto 14).

El estudio histológico de la regeneración en la zona de corte puso de manifiesto la implicación tanto de la capa cortical como medular en la regeneración de yemas. No se detectó la existencia de una capa celular intermedia entre las células de la base de la yema y las de la zona de corte del explanto (Foto 18).

A los 30 días de cultivo, aproximadamente un 50% de las yemas regeneradas por los explantos "terminales" y "estipe" se desorganizaron completamente dando lugar a un callo (Fotos 15 y 16). No se observó la regeneración de nuevas yemas a partir del callo. Al aislarlo del explanto inicial se depigmentaba hasta quedar totalmente blanco.

Al microscopio óptico fue posible distinguir en los callos la existencia de una organización celular en capas celulares corticales y medulares (Foto 19).

TABLA III.7. Influencia del tipo de explanto sobre el crecimiento y desarrollo de Gelidium versicolor, Gelidium arbuscula y Gracilaria ferox

<u>Especie</u>	<u>Tipo de Explanto</u>	<u>Número de Explantos</u>	<u>%Regeneración</u>	<u>%Callo</u>	<u>%Yema</u>
Gelidium versicolor	Terminal	30	90	0	90
	Estipe	30	93	0	93
Gelidium arbuscula	Terminal	15	93	0	93
	Estipe	15	53	0	53
Gracilaria ferox	Terminal	38	74	37(*)	37
	Estipe	30	80	36(*)	43

(*) callo formado a partir de yema regenerada.

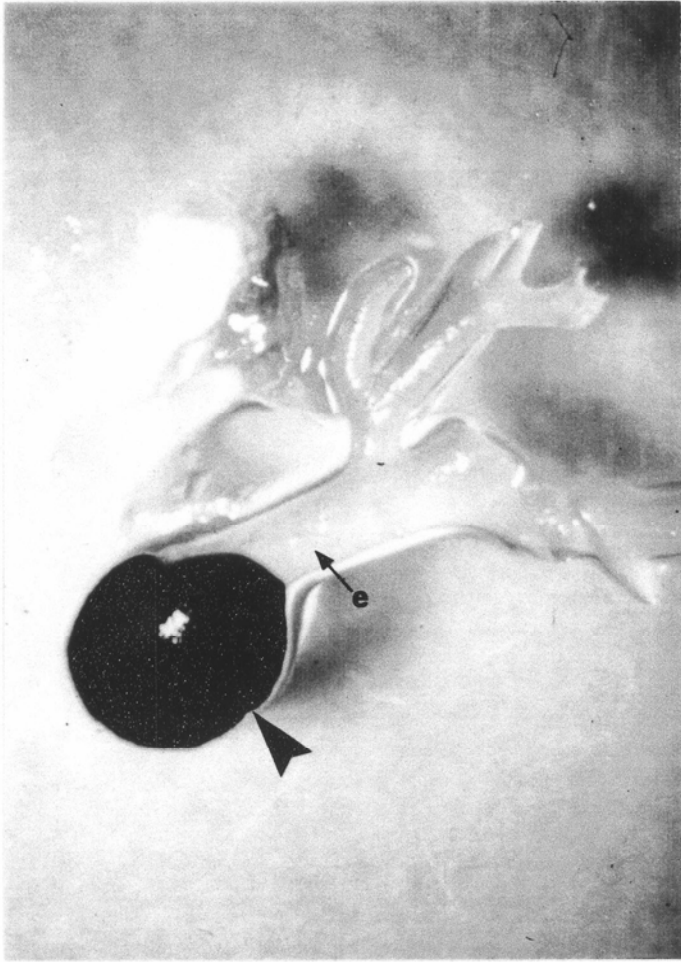
Foto 13.- Contaminante algal surgiendo de explanto decolorado de Gracilaria ferox (flecha) (7X).

Foto 14.- Formación de yemas a partir de zona de corte del explanto "estipe" de Gracilaria ferox (10X).

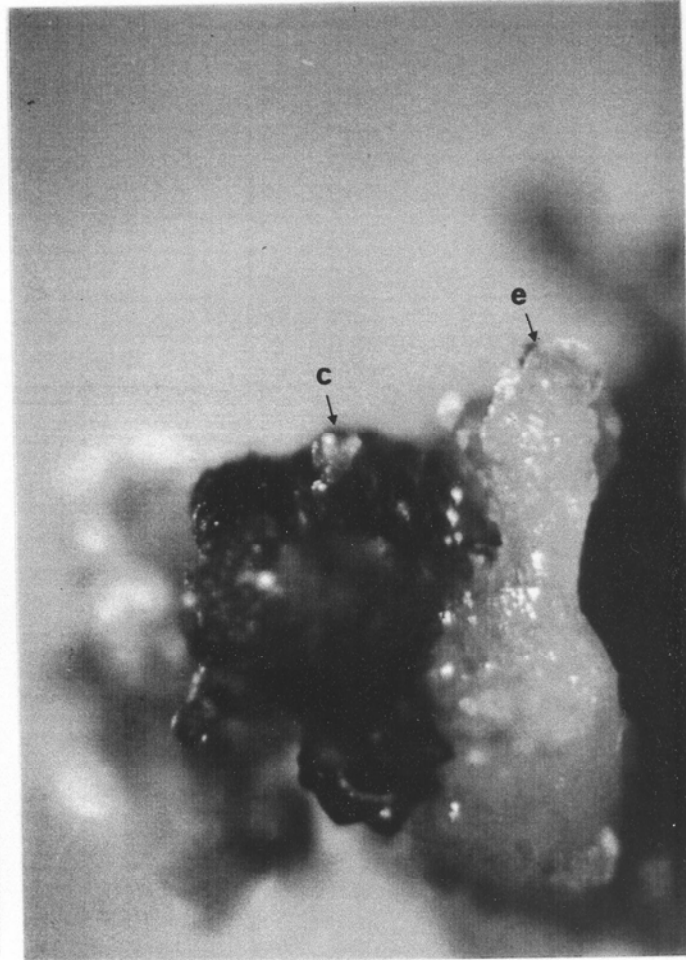
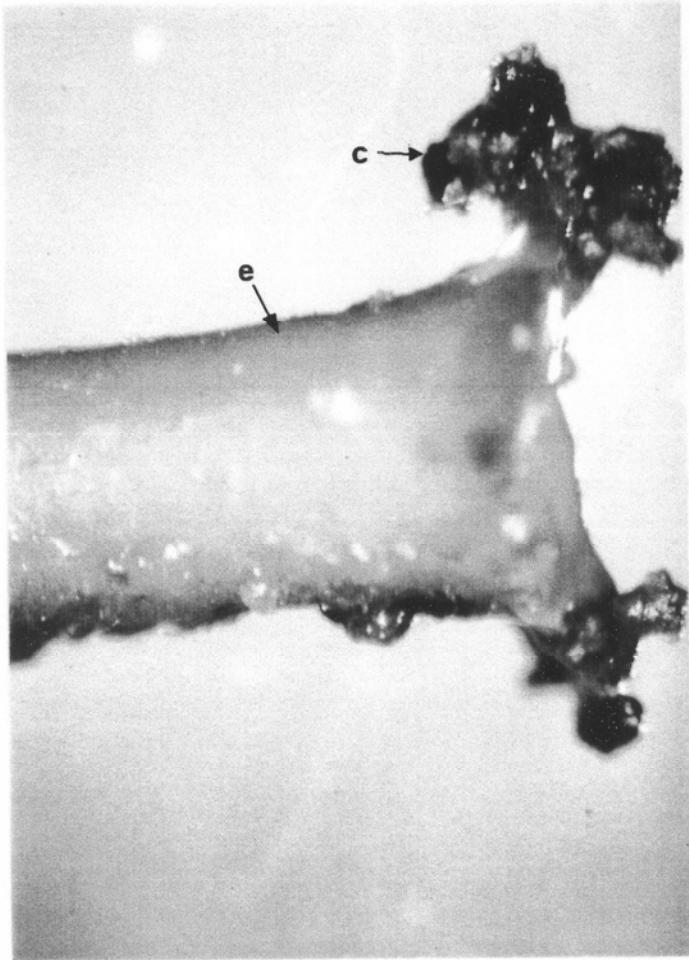
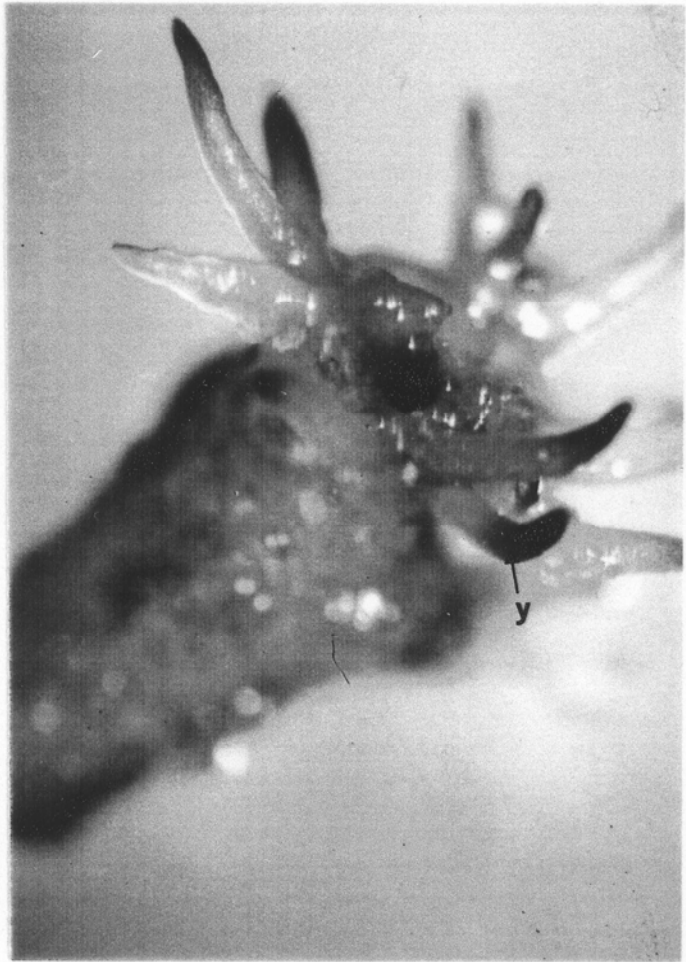
Foto 15 y 16.- Desorganización de las yemas regeneradas en la zona de corte del explanto "estipe" de Gracilaria ferox (foto 15 10X, foto 16 20X).

(c=callo, e=explanto, y=yema)

13



14



15

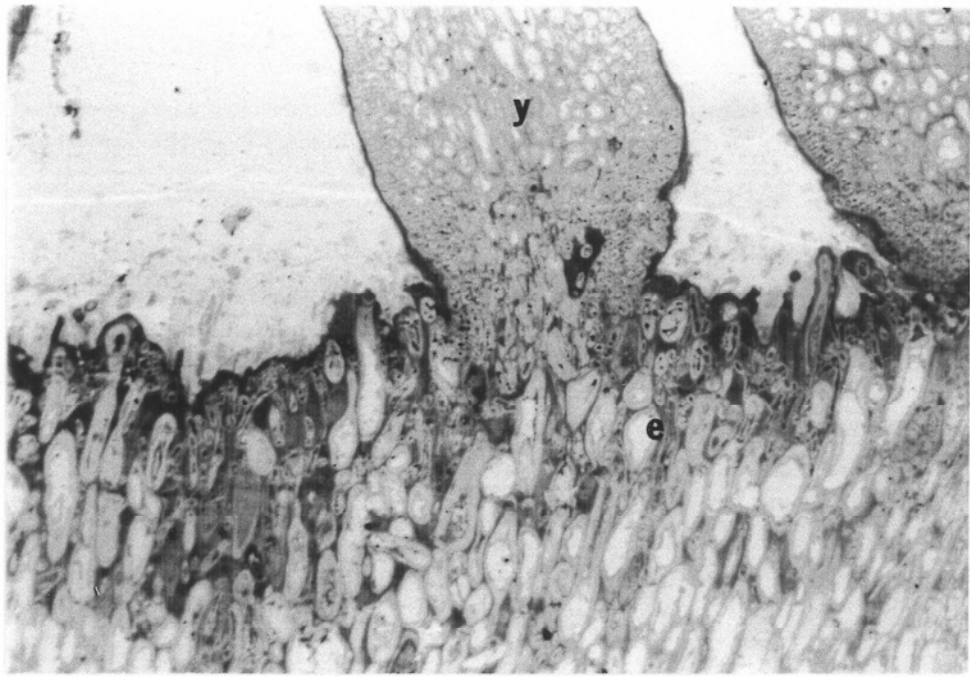
16

Foto 17.- Corte semifino de la zona de regeneración de yemas en el explanto "estipe" de G.versicolor (1100X).

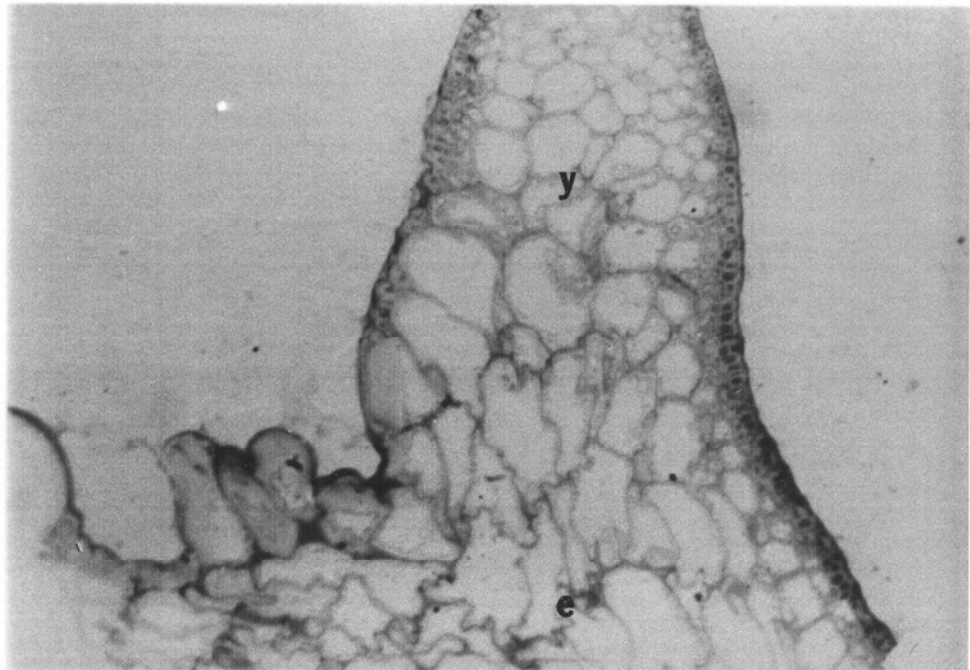
Foto 18.- Corte semifino de la zona de regeneración de yemas en el explanto "estipe" de Gracilaria ferox (1100X).

Foto 19.- Corte semifino de la desorganización apical de yema regenerada en la zona de corte de Gracilaria ferox (1100X).

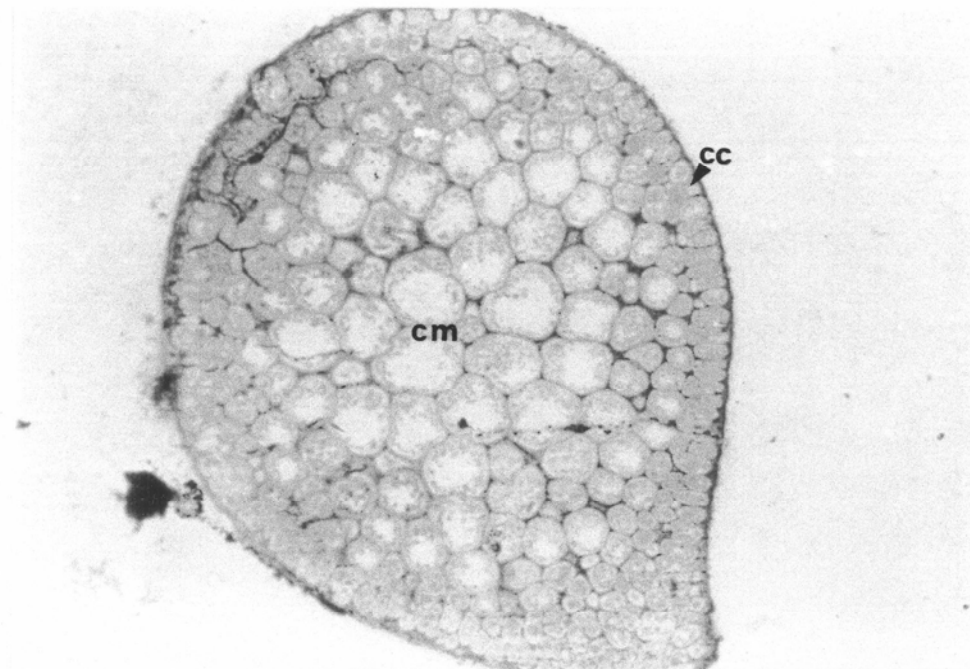
(cc=capa cortical, cm=capa medular, e=explanto, y=yema).



17



18



19

REGENERACIÓN (%)

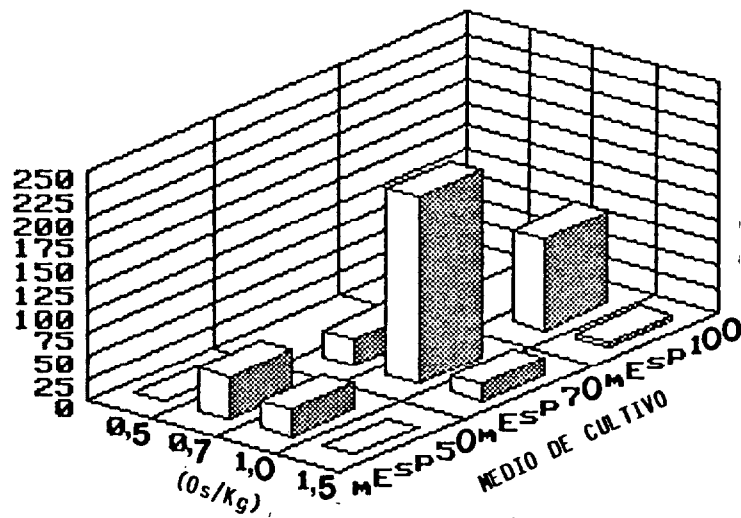


FIG III.7. Efecto de la osmolalidad del medio de cultivo sobre el % Regeneración de explantos "estipe" de Gelidium versicolor. Osmolalidad (Os/Kg): 0,5 (mESP50); 0,7 (mESP50+6 g/l NaCl, mESP70); 1,0 (mESP50+16 g/l NaCl, mESP70+10 g/l NaCl mESP100); 1,5 (mESP50+30 g/l NaCl, mESP70+24 g/l NaCl, mESP100+15 g/l NaCl).

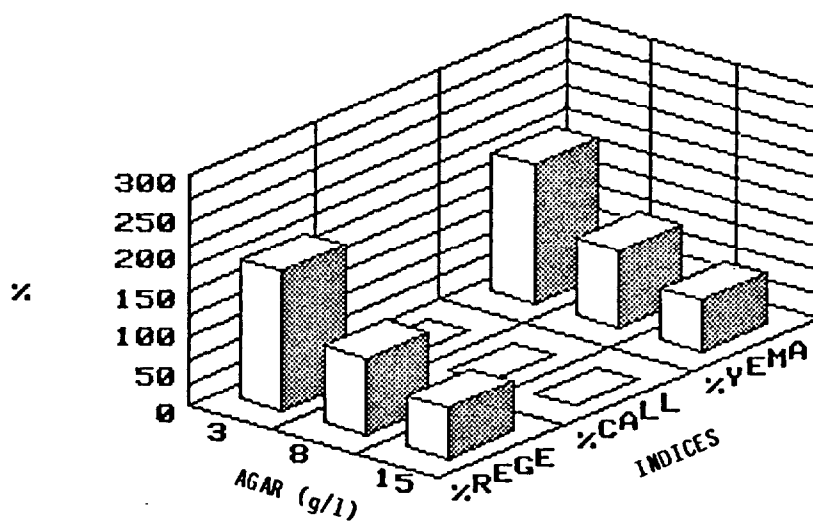
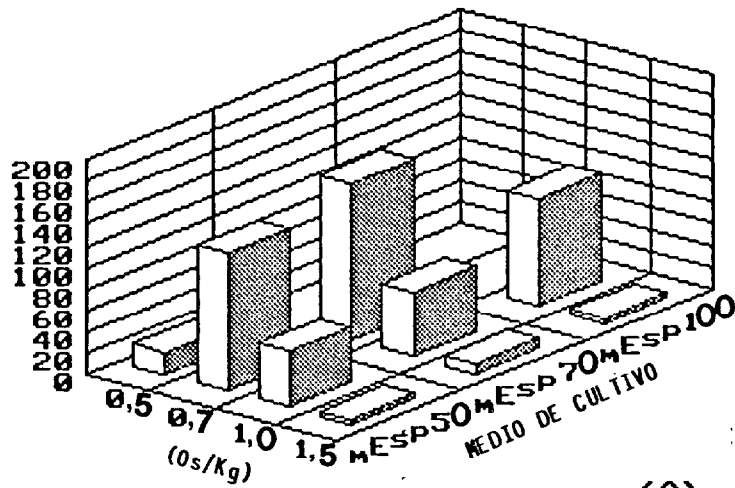


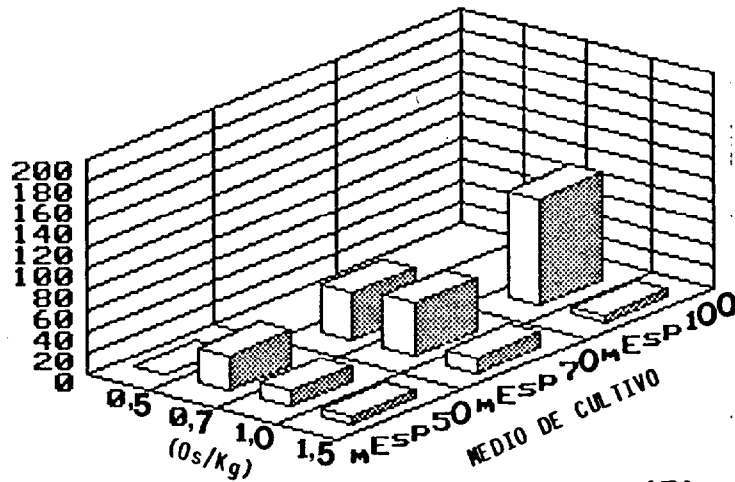
FIG III:8. Efecto de la concentración de agar del medio ESP100 sobre la regeneración de explantos "estipe" de Gelidium versicolor. (%REGE= %Regeneración, %CALL= %Callo)

REGENERACIÓN



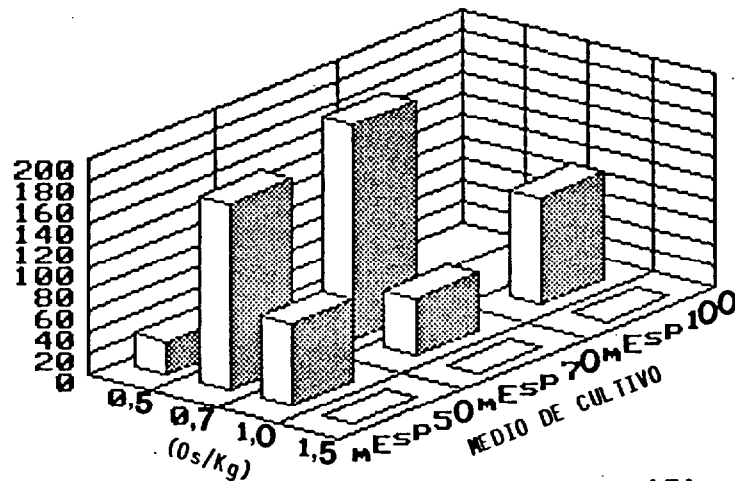
(A)

CALLO



(B)

YEMA



(C)

FIG III.9. Efecto de la osmolalidad del medio de cultivo sobre la regeneración de explantos "disco" de *Grateloupia doryphora*. (A) Efecto el %Regeneración. (B) Efecto sobre el %Callo. (C) Efecto sobre el %Yema. Osmolalidad (Os/Kg): 0,5 (mESP50); 0,7 (mESP50+6 g/l NaCl, mESP70); 1,0 (mESP50+16 g/l NaCl, mESP70+10 g/l NaCl, mESP100); 1,5 (mESP50+30 g/l NaCl, mESP70+24 g/l NaCl, mESP100+15 g/l NaCl).

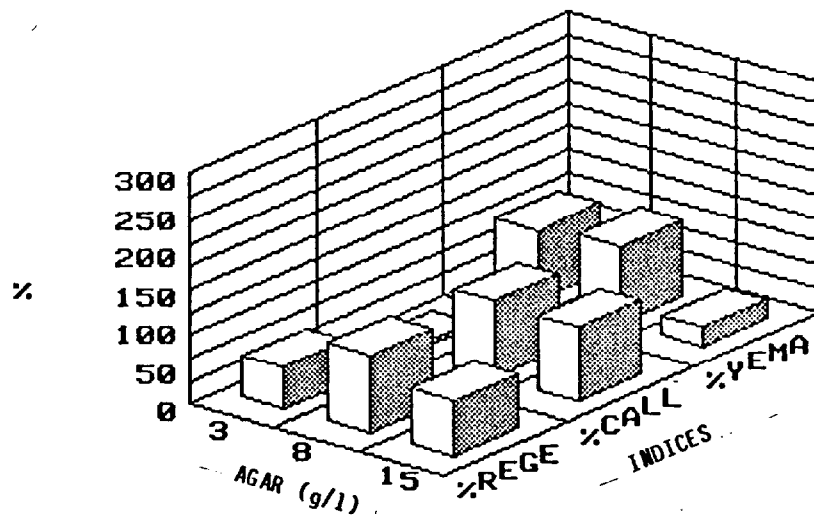


FIG III.10. Efecto de la concentración de agar del medio μ ESP100 sobre la regeneración de explantos "disco" de *Grateloupia doryphora*. (%REGE= %Regeneración, %CALL= %callo).

Efecto del potencial hídrico del medio de cultivo sobre la regeneración de *Gelidium versicolor*

Potencial osmótico

La adición de manitol al medio de cultivo favoreció el crecimiento de los contaminantes que inhibieron la regeneración de los explantos.

El potencial osmótico del medio de cultivo disminuyó la capacidad de regeneración de los explantos a osmolalidades inferiores a 0,7 Os/Kg y superiores a 1,0 Os/Kg. (%Regeneración de 0 a 19% del ensayo control) (Fig III.7). Entre 0,7 Os/Kg y 1 Os/Kg la regeneración de los explantos dependió del tipo de medio. En medios de cultivo tipo mESP50 se observaron valores del %Regeneración superiores en 0,7 Os/kg (47%) mientras que en medios tipo mESP70 los mayores valores se apreciaron en 1,0 Os/kg (204%) (Fig III.7).

Para un mismo valor de la osmolalidad (1 Os/Kg) en todos los medios de cultivo, la menor regeneración se obtiene en medio mESP50 (30% del control) y la mayor en medio mESP70 (204% del control) (Fig III.7).

La regeneración observada en todos los tratamientos de osmolalidad fue del tipo yemas (%Regeneración=%Yemas) (tabla III.8).

Potencial matricial

El aumento de la concentración de agar del medio de cultivo provocó la disminución en la capacidad regenerativa de los explantos, observándose menores valores del %Regeneración a medida que la concentración de agar pasa de 3 a 8 hasta 15 g/l (%Regeneración= 181% del control en 3 g/l; 100% en 8 g/l y 67% en 15 g/l). (Fig III.8).

La regeneración observada en todas las concentraciones de agar fue del tipo yemas (%Regeneración = %Yemas) (Tabla III.8) (Fig III.8).

TABLA III.8. Efecto del potencial hídrico del medio de cultivo sobre la regeneración de Gelidium versicolor.

<u>Medio de Cultivo(#)</u>	<u>Osmolalidad Os/Kg</u>	<u>Número de Explantos</u>	<u>R E G E N E R A N T E S</u>		
			<u>Total</u>	<u>Callo</u>	<u>Yemas</u>
mESP50	0,5	195	0	0	0
mESP50-6NaCl	0,7	195	22	0	22
mESP70	0,7	195	14	0	14
mESP100	1,0	195 (*)	46	0	46

mESP50-16NaCl	1,0	195	17	0	17
mESP70-10NaCl	1,0	195	104	0	104
mESP100	1,0	195 (**)	51	0	51

mESP50-30NaCl	1,5	195	0	0	0
mESP70-24NaCl	1,5	195	16	0	16
mESP100-15NaCl	1,5	195	6	0	6
mESP100-3agar	1,0	195	156	0	156
mESP100-8agar	1,0	195 (***)	86	0	86
mESP100-15agar	1,0	195	58	0	58

- (*) Ensayo control primera experiencia.
 (**) Ensayo control segunda experiencia.
 (***) Ensayo control tercera experiencia.
 (#) Concentración de NaCl y agar en g/l.

III.3. Cultivo de tejidos de Grateloupia doryphora

III.3.1. Ensayos para el establecimiento de cultivos axénicos.

La desinfección superficial de los explantos "disco" siguiendo los procedimientos de baja y alta concentración permitió el establecimiento de cultivos axénicos con una efectividad similar en los dos tratamientos y cercana al 50% de los explantos desinfectados. La eliminación del Betadine en el procedimiento de desinfección de baja concentración redujo la efectividad a un 25%.

Los explantos desinfectados siguiendo el procedimiento de baja concentración sin incubación y los explantos no desinfectados, mostraron un alto grado de contaminación bacteriana a los pocos días del cultivo en medio MCE.

Los explantos desinfectados con el procedimiento de baja concentración, con y sin Betadine, mostraron una pigmentación normal en medio de cultivo MCE y en mESP. Tales explantos emitieron estructuras regenerantes tipo callo y yema en los bordes de los discos con %Regeneración del 100%, %Callo del 33% y %Yema del 66%.

Los explantos sometidos al procedimiento de alta concentración se decoloraron después de la desinfección.

ción. A los 30 días en cultivo se detectó la repigmentación de determinadas zonas de los bordes e interior del disco de algunos explantos que, posteriormente, dieron lugar a la regeneración de yemas con %Regeneración del 100% y %Yema 100%.

El recultivo a mESP de los explantos no contaminados permitió la detección en algunos de la emisión de filamentos de color pardo negruzco, bastante diferentes a las formas normales de regeneración (callo y yema). Los filamentos surgieron a partir de zonas necrosadas en el interior del explanto disco.

La estructura de los cloroplastos (agrupación de tilacoides y ausencia de ficobilisomas) demostró que los filamentos eran algas pardas endófitas y no una forma de regeneración de G.doryphora.

Aproximadamente a los 60 días de la detección en los explantos "disco" de los filamentos del alga parda, podían observarse algunos que ya estaban totalmente recubiertos. Otros, al contrario, permanecían pigmentados y regenerando callo y/o yemas y no eran afectados por el crecimiento del endófito.

III.3.2. Crecimiento y desarrollo del explanto.

A los 30 días de cultivo se detectaron valores del %Regeneración de 39%, con formación de callo (%Ca-

llo) en el 14% de los explantos "disco" sembrados y de yemas (%Yemas) en el 32%.

A diferencia de los explantos crecidos en condiciones axénicas, los cultivados en las condiciones de este ensayo mostraban cierto grado de depigmentación, con una coloración verdosa-amarillenta.

Características de la regeneración

Los tipos de regeneración, callo y yema, detectados en condiciones axénicas y no axénicas de cultivo tenían las mismas características morfológicas.

Callo: Consistió en una masa celular de aspecto friable constituida por protuberancias de la superficie del talo en las zonas del borde del disco, recubiertas por filamentos multicelulares decolorados. Después de 20 días, los filamentos se organizaban en masas semiesféricas pigmentadas (rojas) que recubrían gran parte de las zonas donde habían surgido (Foto 20). Estas masas filamentosas no prosperaron al ser separadas del explanto. La forma y tamaño, así como el posterior desarrollo de este tipo de filamentos, los distinguía claramente de los del alga parda contaminante.

Yema: Las yemas surgieron a lo largo del borde del explanto "disco" (Foto 20).

Al microscopio se observó como la formación de

yemas comenzaba con la regeneración de la capa cortical de células en el borde del explanto "disco". La proliferación de células corticales en el borde ocasionaba un engrosamiento del mismo. A partir de esa zona ensanchada se producía la regeneración de las yemas, cuya estructura celular interna era igual a la del explanto (Foto 21).

Efecto del potencial hídrico del medio de cultivo

Potencial osmótico

La adición de manitol al medio de cultivo favoreció el crecimiento de los contaminantes que inhibieron la regeneración de los explantos.

La osmolalidad del medio de cultivo afectó a la capacidad regenerativa de los explantos, disminuyendo el %Regeneración a osmolalidades superiores a 1,0 Os/Kg (%Regeneración en 1,5 Os/Kg = 5 - 9% del control en todos los tipos de medios) (Fig III.9A). Se observó un %Regeneración de 31% del control en 0,5 Os/Kg. Entre osmolalidades de 0,7 Os/Kg y 1,0 Os/Kg se detectó, independientemente del tipo de medio, un mayor %Regeneración en 0,7 Os/Kg (%Regeneración en 0,7 Os/kg = 128% del control en mESP50 y 146% del control en mESP70; %Regeneración en 1,0 Os/Kg= 52% en mESP50 y 61% en mESP70) (Fig III.9A).

El %Callo se vio afectado por la osmolalidad del medio de cultivo, disminuyendo a osmolalidades inferiores al 0,7 Os/Kg en medio mESP50 (0% del control) (Fig III.9B). Valores de osmolalidad superiores al 1,0 Os/Kg causan una ligera disminución en la formación de callo en medio mESP50 (15% del control en 1,0 Os/kg y 7% del control en 1,5 Os/Kg), mientras que en medio mESP70 (%Callo = 50% a 1,0 Os/Kg y 14% a 1,5 Os/Kg) y mESP100 (100% en 1,0 Os/Kg y 7% en 1,5 Os/kg) la formación de callo fue significativamente inferior (Fig III.9B). Entre osmolalidades de 0,7 Os/Kg y 1,0 Os/kg el %Callo es diferente dependiendo del tipo de medio. En medios de cultivo tipo mESP50 el %Callo fue superior a osmolalidad de 0,7 Os/Kg (33%), mientras que en medios tipo mESP70 fue similar en ambas osmolalidades (44%-50%) (Fig III.9B).

La regeneración de yemas disminuye significativamente en medios con osmolalidades inferiores a 0,7 Os/Kg (%Yema=31% del control en 0,5 Os/Kg) y superiores a 1,0 Os/Kg (%Yema= 0% del control en todos los tipos de medios) (Fig III.9C). Entre osmolalidades de 0,7 Os/Kg y 1 Os/kg, independientemente del medio, el mayor valor del %Yema correspondió a 0,7 Os/Kg (%Yema = 174% en mESP50; 216% en mESP70; 100% en mESP100). (Fig III.9C).

Para un mismo valor de osmolalidad entre los distintos tipos de medios (1,0 Os/Kg), la reducción en la concentración del agua de mar disminuye el el %Regeneración (%Regeneración = 52% en mESP50; 61% en mESP70 y 100% en mESP100) (Fig III.9A). El %Callo sigue la misma tónica del %Rgeneración, con el mayor valor en medio mESP100 y el menor en medio mESP50 (%Callo = 15% en mESP50; 50% en mESP70; 100% en mESP100) (Fig III.9B). Lo mismo ocurre con el %Yema, que posee valores superiores en medio mESP100 (100%), pero en este caso, el medio mESP50 posee valor de %Yema (77%) significativamente superior al medio mESP70 (53%) (Fig III.9C).

Efecto del potencial matricial en medios mESP100

La concentración de agar del medio de cultivo mESP100 provoca variaciones en la capacidad regenerativa de los explantos detectándose mayor valor del %Regeneración en medio con 8 g/l de agar y menor en medio con 3 g/l de agar (%Regeneración = 54% en 3 g/l; 100% en 8 g/l y 72% en 15 g/l) (Fig III.10).

El %Callo aumenta a medida que se incrementa la concentración de agar, no detectándose formación de callo en medio con 3 g/l, mientras que ésta fue similar en los medios con 8 y 15 g/l. (%Callo = 100% y 96% respectivamente) (Fig III.10).

La formación de yemas fue similar en los medios con 3 y 8 g/l de agar (%Yema = 91% y 100% respectivamente), disminuyendo significativamente con 15 g/l (%Yema = 25%) (Fig III.10).

Efecto de la osmolalidad del medio de cultivo en función de la concentración de glicerol

Independientemente del tipo de medio, se detectaron porcentajes similares de regeneración de yemas a osmolalidades entre el 0,7 Os/kg y 1,0 Os/kg (Fig III.11A). A osmolalidad de 1,5 Os/Kg los explantos no regeneraron (Fig III.11A).

A los 20 días se detectaron valores del Número de yemas/Número explantos sembrados superiores a los iniciales en los medios con osmolalidad de 0,7 y 1,0 Os/Kg, permaneciendo prácticamente invariables en medios con osmolalidad de 1,5 Os/Kg (Tabla III.9) (Fig III.11B). El Número de yemas/Número de explantos morfogénéticos siguió la misma evolución que el índice anterior en medios con osmolalidad de 0,7 Os/kg y 1,0 Os/Kg (Tabla III.9). En medios con osmolalidad de 1,5 Os/Kg el Número de yemas/Número de explantos morfogénéticos aumenta ligeramente, motivado por la muerte de los explantos más que por el incremento en el número de yemas (Tabla III.9).

En las figuras III.11B y III.11C se observa que

para una misma osmolalidad del medio de cultivo (1,0 Os/Kg) se detectan valores de los índices Número de yemas/Número de explantos sembrados y Número de yemas/Número de explantos morfogénéticos muy superiores en medio mESP70-2,5% glicerol que en medio mESP100, siendo el valor de los índices en el primer medio superior al doble del detectado en el segundo (Número de yemas/Número explantos sembrados=16,13 en mESP70-2,5% glicerol y 7,2 en mESP100; Número de yemas/Número explantos morfogénéticos= 17,28 en mESP70-2,5%Glicerol y 7,20 en mESP100).

Los explantos cultivados en mESP70-2,5% glicerol tomaron una pigmentación anaranjada desde los primeros días en cultivo, creciendo y regenerando yemas, fundamentalmente a partir del borde del explanto, que mostraron fototropismo positivo. Uno de los explantos sembrados en este medio no regeneró yemas sino que creció considerablemente, hasta que no fue posible reconocer la forma del explanto "semicírculo" inicial.

El crecimiento y la regeneración de yemas de los explantos "semicírculo" en medios mESP100 y mESP70 tenían las características típicas observadas en anteriores ensayos con explantos "disco".

El recultivo a medio mESP70-2,5% glicerol de los

explantos cultivados en mESP70-7,5% glicerol y mESP100-4,5% glicerol aumentó la capacidad regenerativa de los explantos que permanecieron viables después de la siembra en tales medios, detectándose, a los 20 días, valores del Número de yemas/Número explantos sembrados superiores o similares (52,1 en los procedentes de mESP70-7,5% glicerol y de 17,42 en los de mESP100-4,5% glicerol) a los obtenidos con explantos sembrados en mESP7-2,5% glicerol inicialmente (Fig III.12A).

El Número de yemas/Número explantos morfogénéticos fue muy superior en los explantos recultivados de mESP70-7,5% glicerol y mESP100-4,5% glicerol, que el detectado en explantos sembrados inicialmente en medio mESP70-2,5% glicerol (Número de yemas/Número explantos morfogénéticos= 86,83 en los procedentes de mESP70-7,5% glicerol; Número de yemas/Número explantos morfogénéticos=61 en los procedentes de mESP100-4,5% glicerol) (Fig III. 12B).

TABLA III.9. Efecto de la osmolaridad del medio de cultivo sobre la regeneración de yemas de explantos semicirculo de G.doryphora

<u>Osmolaridad</u>	<u>Medio de Cultivo</u>	<u>Numero de explantos Morfo geneticos</u>			<u>Yemas/sembrado(Y/S)</u>		<u>Yemas/morfo genético</u>	
		<u>Total</u>	<u>Dia 0</u>	<u>Dia 20</u>	<u>Dia 0</u>	<u>Dia 20</u>	<u>Dia 0</u>	<u>Dia 20</u>
0,7	mESP70	6	2	6	1,00	7,10	3,00	7,16
1,0	mESP70-2,5Gli	15	9	14	1,06	16,13	1,77	17,28
	mESP100	5	3	5	1,40	7,2	2,33	7,20
1,7	mESP70-7,5Gli	10	8	6	2,30	2,60	2,87	4,33
	mESP100-4,5Gli	14	6	4	1,21	1,51	3,50	5,25

Gli=Glicerol

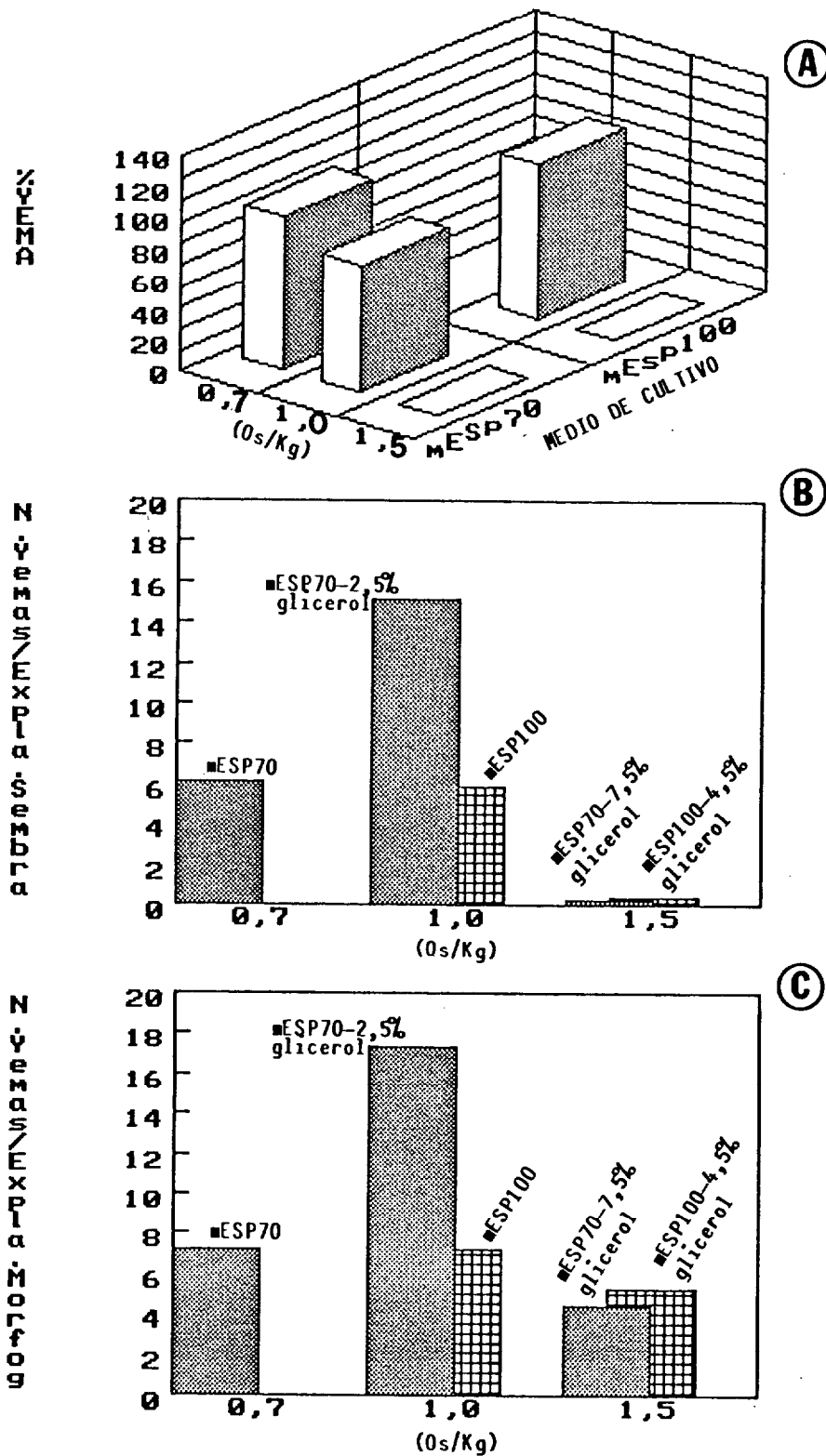


FIG III.11. Efecto de la osmolalidad del medio de cultivo sobre la regeneración de explantos "semicirculo" de *Gratelouppia doryphora*. (A) Efecto sobre el %Yema. (B) Efecto sobre el Num. Yemas/ Num.Explantos sembrados (Y/S). (C) Efecto sobre el Num.Yemas/Num.Explantos morfogenéticos (IM). Osmolalidad (Os/kg): 0,7 (■ESP70); 1,0 (■ESP70+2,5% glicerol, ■ESP100); 1,5 (■ESP70+7,5% glicerol, ■ESP100+4,5% glicerol).

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

0 10 20 30 40 50 60 70 80 90

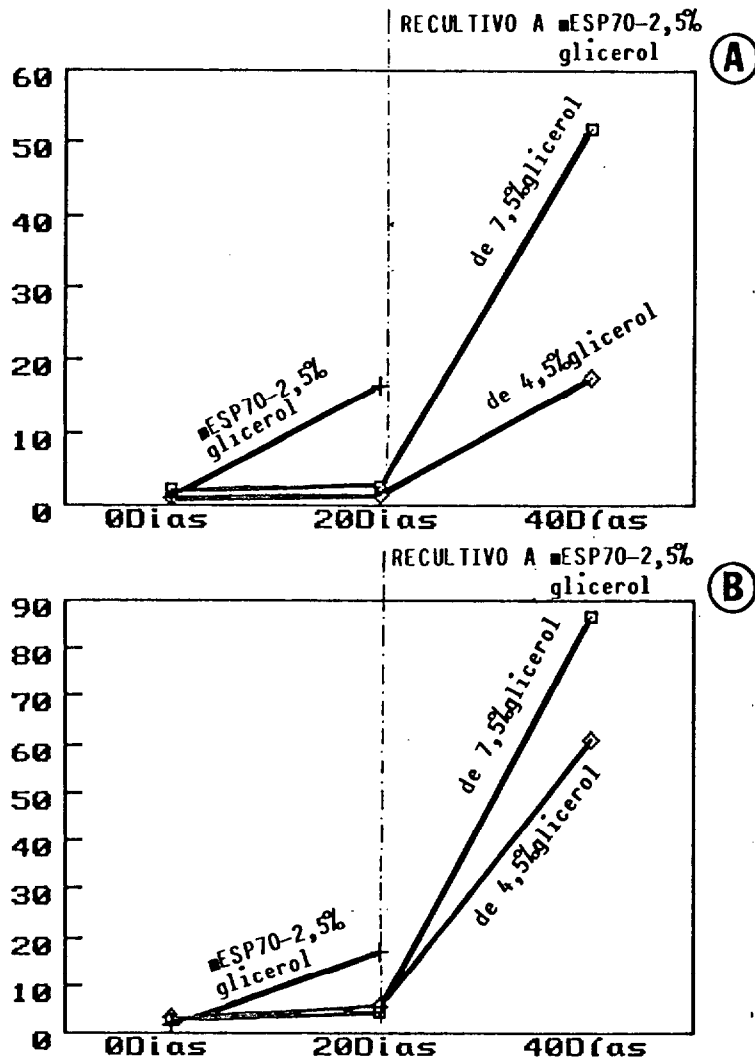


FIG III.12. Evolución del número de yemas formadas por explantos "semicírculo" de *Gnetoloupia doryphora* recultivados a los 20 días de medios con alta concentración de glicerol (mESP70+7,5% glicerol, mESP100+4,5% glicerol. 1,5 Os/Kg) a medio con baja concentración de glicerol (mESP70+2,5% glicerol. 1,0 Os/Kg). (A) Evolución del Num.Yemas/Num. Explantos sembrados. (B) Evolución del Num.Yemas/Num. Explantos morfogénéticos.

Efecto del potencial matricial del medio mESP70-
2,5% glicerol

La concentración de agar del medio de cultivo afectó a la regeneración de yemas de los explantos "semicírculo", observándose menor valor del %Yema en medios con 8 y 15 g/l de agar (13%) que en medio con 3 g/l de agar (27%).

Los explantos, inicialmente no morfogénicos, alcanzaron a los 20 días en cultivo, valores del índice Número de yemas/Número explantos sembrados de 2,73 en 3 g/l de agar, de 1,06 en 8 g/l de agar y de 0,6 en 15 g/l de agar. El Número de yemas/Número explantos morfogénicos fue de 10,25; 8,00 y 4,50 en 3, 8 y 15 g/l de agar, respectivamente (Fig III.13).

Todos los explantos regenerantes en medio con 3 g/l de agar crecieron y regeneraron yemas (%Regeneración = %Yema), mientras que en medio de cultivo con 8 g/l de agar se observó cómo un 20% de los sembrados crecía sin emitir yemas. En medio con 15 g/l de agar el porcentaje de los explantos que crecieron sin emitir yemas fue de 47% (Foto 24).

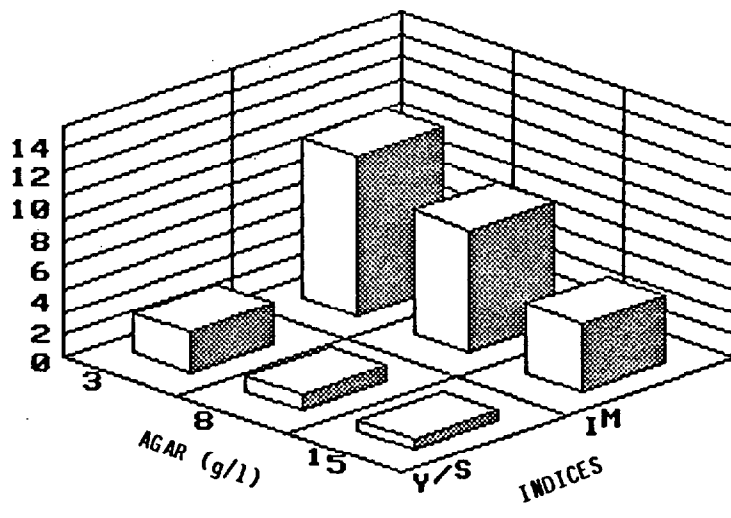


FIG III.13. Efecto de la concentración de agar del medio de cultivo ■ESP70+2,5% glicerol sobre el Num.Yemas/Num.Explantos sembrados (Y/S) y Num.Yemas/Num.Explantos morfogénéticos (IM) de explantos "semicírculo" de Grateloupia doryphora.

Influencia de la fuente de carbono orgánico

A los 12 días de cultivo se observaron valores del %Yemas de 37,5% en mESP100; 50% en mESP70-9% sacarosa y del 92% en mESP70-2,5% glicerol. Los índices morfogénéticos tomaron valores respectivos de 0,75; 1,00 y 4,21 para el Número de yemas/Número explantos sembrados (Fig III.14A) y 2,00; 1,91 y 4,53 para el Número yemas/Número explantos morfognéticos (Fig III.14B).

A los 20 días de la siembra todos los explantos sembrados, con independencia del tipo de medio, habían regenerado yemas. Los índices, en este caso, fueron de Número de yemas/Número explantos sembrados= 1,72 en mESP100; 2,4 en mESP70-9% sacarosa y 16,13 en mESP70-2,5% glicerol (FigIII.14A). El Número de yemas/Número explantos morfogénéticos fue de 2,53 en mESP100; 2,82 en mESP70-9% sacarosa y 17,28 en mESP70-2,5% glicerol (Fig III.14B).

El recultivo a medio mESP70-2,5% glicerol de los explantos crecidos en medios mESP100 y mESP70-9% sacarosa, ocasionó un rápido aumento en la formación de yemas, alcanzándose valores del Número de yemas/Número explantos sembrados = 18,18 para los procedentes de medio mESP100 y 23,00 para los procedentes de mESP70-9% sacarosa, a los 20 días del recultivo (Fig III.14A). El

Número de yemas/Número explantos morfogénéticos alcanzó valores de 20,00 para los procedentes de medio mESP100 y de 24,21 para los procedentes de mESP70-9% sacarosa (Fig III.14B).

Regeneración en cultivo de células libres

Crecimiento y regeneración de carposporas

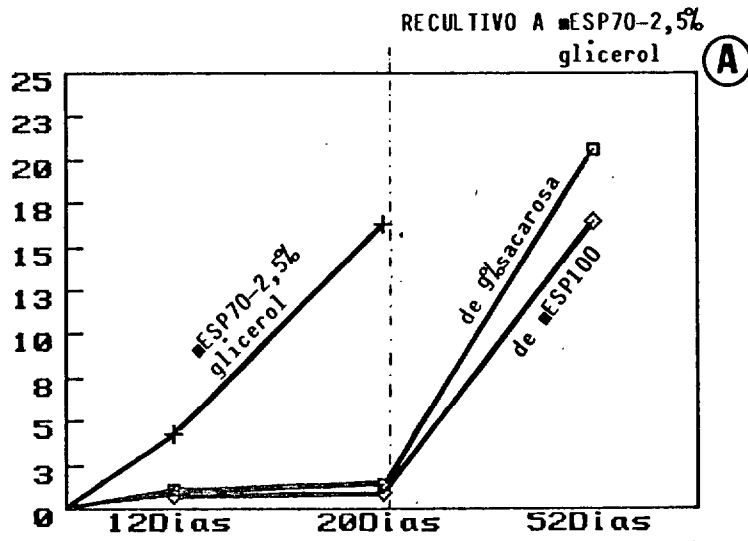
A los 25 días de cultivadas en medio mESP70-2,5% glicerol las carposporas desarrollaron masas celulares lobuladas de hasta 2mm de diámetro, que se disgregaban con facilidad dando lugar a fragmentos que regeneraban nuevas masas celulares lobuladas (Foto 28). A los 25 días se habían formado 20 masas celulares lobuladas, aumentando a 38 a los 50 días.

El recultivo de las masas celulares lobuladas a medio líquido mESP70-2,5% glicerol, provocó la elongación de los lóbulos, que adoptaron una morfología similar a las de las yemas formadas por los explantos "disco" o "semicírculo". Las 4 masas celulares recultivadas dieron lugar a 13 masas a los 25 días del recultivo.

El crecimiento de las carposporas en medio mESP70-2,5% glicerol coincidió con la inhibición del crecimiento de los filamentos del endófito que las acompañaba.

En medio mESP sólido las carposporas no originan

0000702-PPXFE\N0304-N



0000702-PPXFE\N0304-N

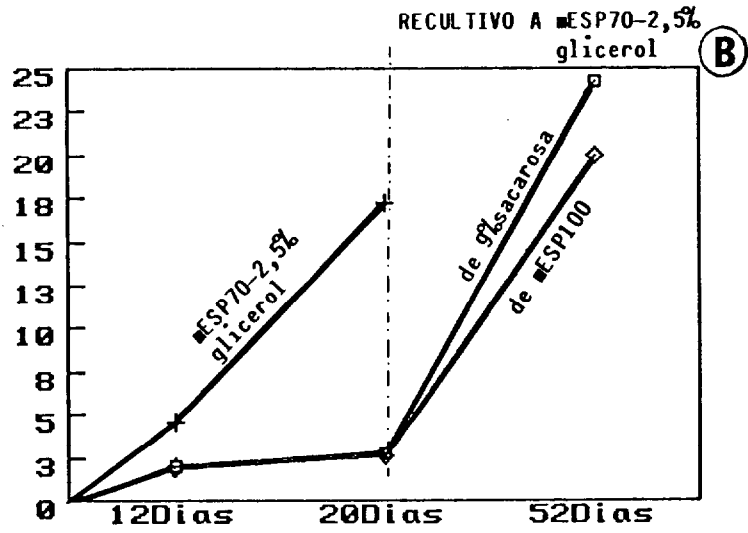


FIG III.14. Evolución del número de yemas formadas por explantos "se-micirculo" de *Grateloupia doryphora* recultivados a los 20 días de medios \square ESP70+9% sacarosa (□) y \diamond ESP100 (◇) a medio \square ESP70+2,5% glicerol (+). (A) Evolución del Num. Yemas/ Num.Explantos sembrados. (B). Evolución del Num. Yemas/Num.Explantos morfo-genéticos.

masas celulares lobuladas, sino que permanecen pigmentadas sin dar regeneración alguna. En medio mESP líquido las carposporas originan masas celulares lobuladas similares a las observadas en medio líquido mESP70-2,5% glicerol, pero de tamaño muy inferior.

El estudio histológico de las masas celulares lobuladas puso de manifiesto la existencia de capas celulares corticales y medulares que interconectaban los lóbulos. La morfología y disposición celular en los lóbulos era muy diferente al hallado en los talos de G.doryphora (Foto 29).

Crecimiento y regeneración de células liberadas enzimáticamente del talo

Los enzimas usados se mostraron poco efectivos en la disgregación del tejido, necesitando 6 horas de incubación para causar un ablandamiento adecuado del tejido. Se aislaron células (16 E16/ml) y agregados celulares con el tratamiento mecánico posterior a la digestión enzimática.

A los 70 días se habían formado en medio líquido mESP70-2,5% glicerol, 8 talos de aproximadamente 1cm de longitud. Se obtuvo idéntico resultado en la repetición del ensayo. En medio sólido mESP70-2,5% glicerol, por el contrario, no se obtuvo ningún tipo de regeneración.

III.3.3. Histología y control del crecimiento en mESP70-2,5% glicerol

A los pocos días de iniciar el cultivo los explantos adoptan una pigmentación anaranjada. El número de yemas inducidas y su velocidad de crecimiento es muy superior en este medio al detectado en medio mESP (Foto 22).

Algunos explantos "semicírculo" cultivados en medio sólido mESP70-2,5% glicerol no regeneran yemas, sino que crecen deformándose completamente. La microscopía electrónica de barrido demostró que estos explantos deformados mantienen la cohesión celular. Además, poseen zonas en las que es posible distinguir la iniciación del crecimiento gemario (Foto 27).

El estudio histológico con microscopio óptico revela que las yemas y zonas de crecimiento de los explanto en medio mESP70-2,5% glicerol poseen una estructuración celular similar a la del talo, distinguiéndose claramente las células corticales y medulares filamentosas y estrelladas y la transición entre tales tipos celulares (Foto 23).

A los 20-30 días de cultivo los explantos comienzan a depigmentarse, adoptando una coloración verdosa

que comienza por zonas hasta abarcar la totalidad del explanto. El subcultivo a medio sólido o líquido, antes de la aparición de las primeras zonas decoloradas permite el mantenimiento de los explantos hasta que nuevamente han alcanzado un tamaño determinado donde se requiere otra vez el subcultivo. El recultivo de los explantos no evita la pérdida de coloración, que prosigue hasta que quedan completamente blancos. La adición de una delgada capa de medio de cultivo líquido sobre la base sólida permite el mantenimiento de los explantos durante varios días sin que se decoloren, pero al poco tiempo comienza nuevamente la aparición de las zonas depigmentadas.

Las medidas de pH realizadas en las zonas de crecimiento de los explantos en las placas de cultivo, demuestra que no existe variación de pH en las mismas. Tampoco se observó la emisión de sustancias al medio. Comparativamente, los explantos sembrados en medio mESP sólido pueden permanecer durante largo tiempo (meses) sin subcultivo o recultivo.

Efecto morfogénético del glicerol

El cultivo de yemas en medio mESP70-2,5% glicerol demostró la acción promotora de la morfogénesis del glicerol. En medio de cultivo mESP las yemas crecen en longitud, detectándose diferencias significativas en el

incremento de la longitud de las yemas sembradas. Por el contrario, en medio mESP70-2,5% glicerol las yemas inician el desarrollo gemario sin cambios significativos en su longitud (Tabla III.10).

III.3.4. Efecto de la luz sobre la regeneración en medio mESP70-2,5% glicerol

Los explantos sembrados en régimen de luz u oscuridad muestran claras diferencias en la respuesta al glicerol. Cuando son sembrados en oscuridad, el medio mESP70-2,5% glicerol parece no tener efecto sobre el crecimiento y la regeneración de los explantos. Estos permanecen en el mismo estado en el que fueron sembrados. (Foto 25). La respuesta de los explantos en luz fue la normalmente detectada en este medio de cultivo.

La transferencia de los explantos en oscuridad a condiciones de luz desencadenó el patrón de desarrollo normal en este medio de cultivo, alcanzando los explantos a los 20 días valores de Número de yemas/Número explantos sembrados = 22,66 y de Número de yemas/Número explantos morfogénéticos = 26,15.

III.3.5. Cultivo en medio líquido.

Se detectaron diferencias en el comportamiento de los explantos cultivados en medios líquidos mESP100 y mESP70-2,5% glicerol. El aumento del peso fresco de los

explantos en el medio mESP70-2,5% glicerol, fue significativamente superior al obtenido en el medio mESP100 (Tabla III.11). Los valores medios de peso fresco en cada ensayo demuestran una progresión exponencial del incremento en biomasa en el medio mESP70-2,5% glicerol frente a un crecimiento lineal en medio mESP100 (Fig III.15). Los dos tipos de medio también afectan a la morfología de los explantos. En medio mESP70-2,5% glicerol, los talos desarrollados poseían una pigmentación verdosa y morfología irregular con gran cantidad de yemas. En medio mESP100 los explantos desarrollaron talos con pigmentación y morfología normal (Foto 30). A los 30 días en cultivo en medio mESP100 se observó la emisión de filamentos del alga parda endófito detectada en medio sólido. El crecimiento del endófito no afectó al aumento en peso fresco de los explantos (Tabla III.11).

TABLA III.10. Comparación del crecimiento y morfogénesis de las yemas a los 30 días de sembradas en medio mESP70- 2,5% glicerol y mESP100

Muestra	Incremento en longitud(mm)		Número de yemas	
	<u>mESP70-2,5% glicerol</u>	<u>mESP100</u>	<u>mESP70-2,5% glicerol</u>	<u>mESP100</u>
1	7	22	12	0
2	3	25	12	4
3	7	28	14	4
4	9	12	9	2

Total	26	87	47	10
Incermento medio: Longitud	mESP70-2,5%glicerol= 6,5+2,17 (*) mESP100 = 21,7+6,01			
Número de yemas medio	mESP702,5%glicerol= 11,7+2,06 (* *) mESP100 = 2,5+1,91			

(*) diferencia significativa 0,05 > P > 0,01
 (* *) diferencia significativa 0,01 > P > 0,001

TABLA III.11. Diferencias en el incremento en el peso fresco de los explantos en medio de cultivo mESP70-2,5% glicerol y mESP100

Peso fresco inicial		Peso fresco 15 días		Peso fresco 30 días		Peso fresco 45 días	
<u>mESP100</u>	<u>mESP70gli</u>	<u>mESP100</u>	<u>mESP70gli</u>	<u>mESP100</u>	<u>mESP70gli</u>	<u>mESP100</u>	<u>mESP70gli</u>
7	8	14	34	30 (E)	99	53	215
9	6	16	27	25 (E)	88	41	182
7	7	12	32	28	93	48	218
7	7	9	29	20	90	36	160
8,25+0,82 (n.s)		12,7+2,6 (*)		26,0+3,7 (**)		44,5+6,5 (**)	
7,25+0,82		30,9+2,7		92,5+4,15		193,7+24,0	

mESP70gli = mESP70-2,5% glicerol

(E) Desarrollo de endófito a los 30 días en cultivo.

(n.s) no significativa

(*) diferencia significativa 0,01 > P > 0,001

(**) diferencia significativa 0,001 > P

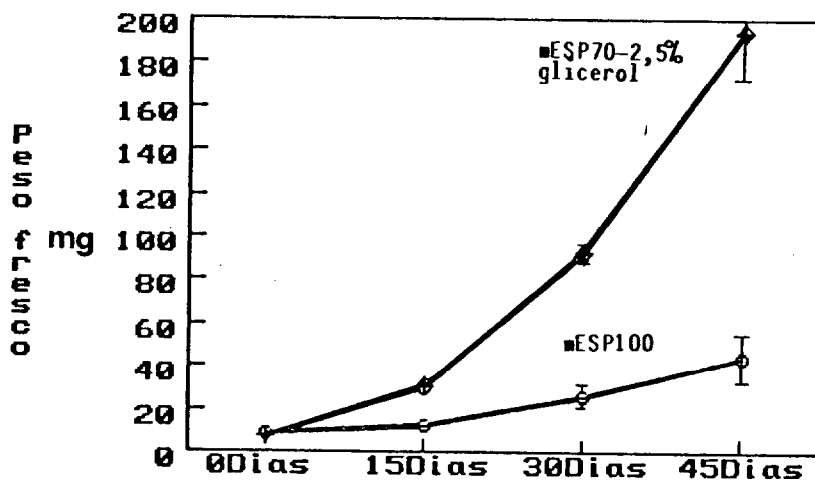


FIG III.15. Evolución del peso fresco de explantos de *Grateloupia doryphora* subcultivados de medios de cultivo ESP70+2,5% glicerol sólido a medios ESP70+2,5% glicerol y ESP100 líquidos. (barra vertical= D.S.).

Foto 20.- Fragmento de explanto "disco" de Grateloupia doryphora regenerando yemas y callo filamentososo (10X).

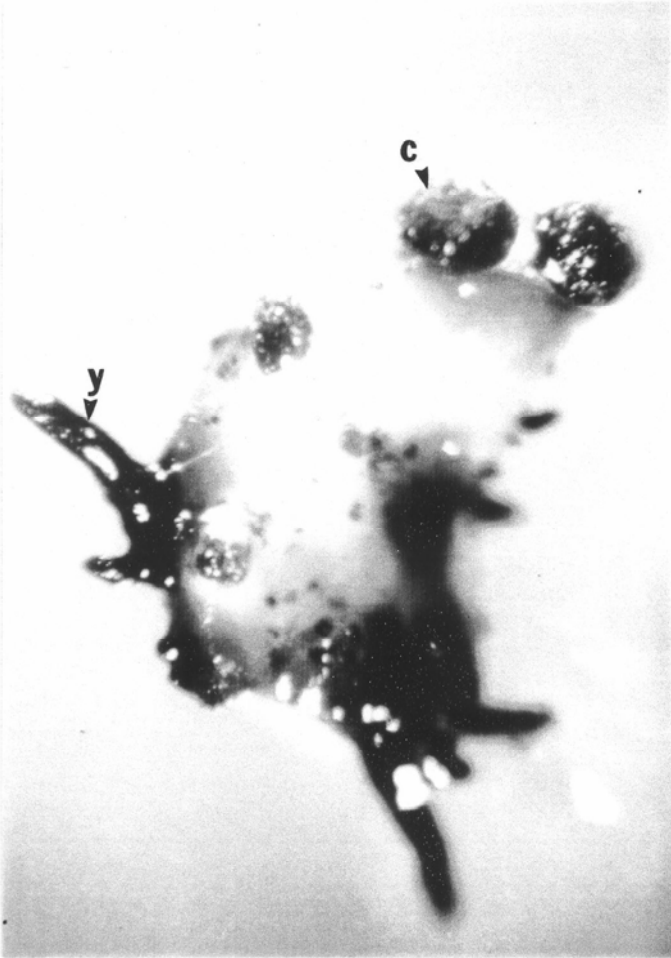
Foto 21.- Corte histológico longitudinal de la zona del borde del explanto "disco" de Grateloupia doryphora (1100X).

Foto 22.- Aspecto del explanto "semicírculo" de Grateloupia doryphora cultivado en medio mESP70-2,5% glicerol 8 g/l agar (10X).

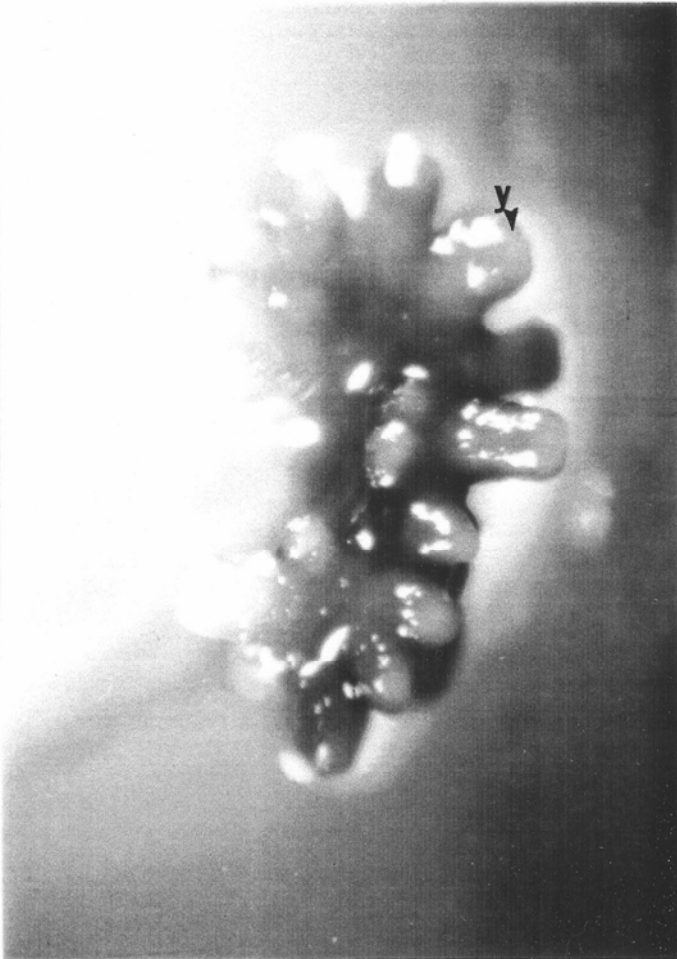
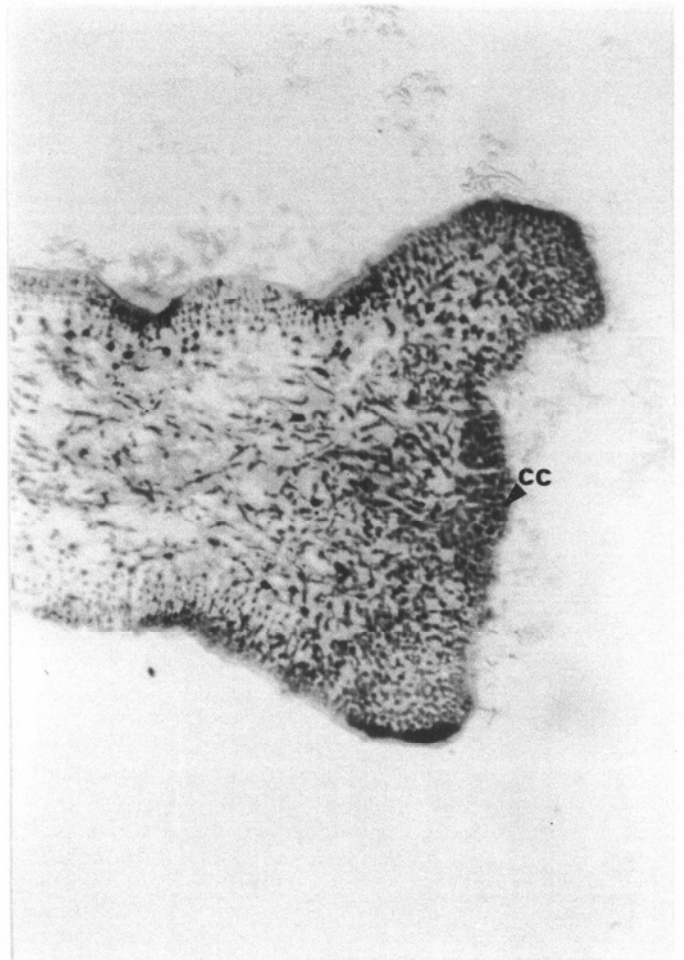
Foto 23.- Corte histológico de yema regenerada por explanto "semicírculo" en medio mESP70-2,5% glicerol (1100X).

(c=callo, cc=capa cortical, ce=células estrelladas, y=yemas).

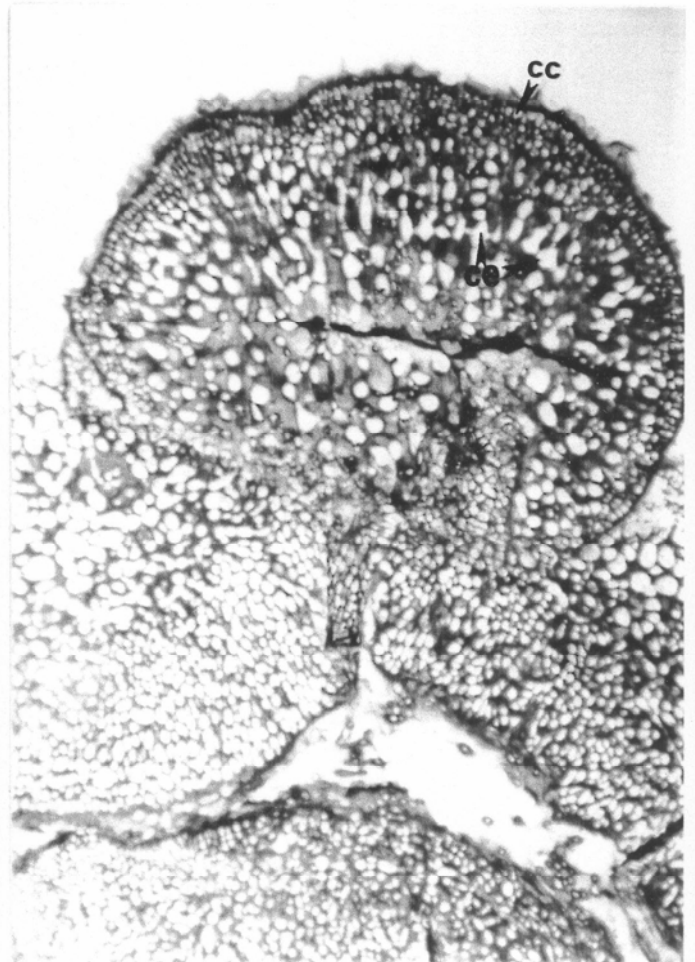
20



21



22



23

Foto 24.- Aspecto de un explanto "semicírculo" cultivado en medio mESP70-2,5% glicerol con 15 g/l de agar (10X).

Foto 25.- Aspecto de un explanto "semicírculo" cultivado en medio mESP70-2,5% glicerol en condiciones de oscuridad (10X).

Fotos 26 y 27.- Aspecto de los patrones de crecimiento y desarrollo de explantos "semicírculo" en medio mESP70-

2,5% glicerol 8 g/l agar y en condiciones de luz.

26: regeneración de yemas.

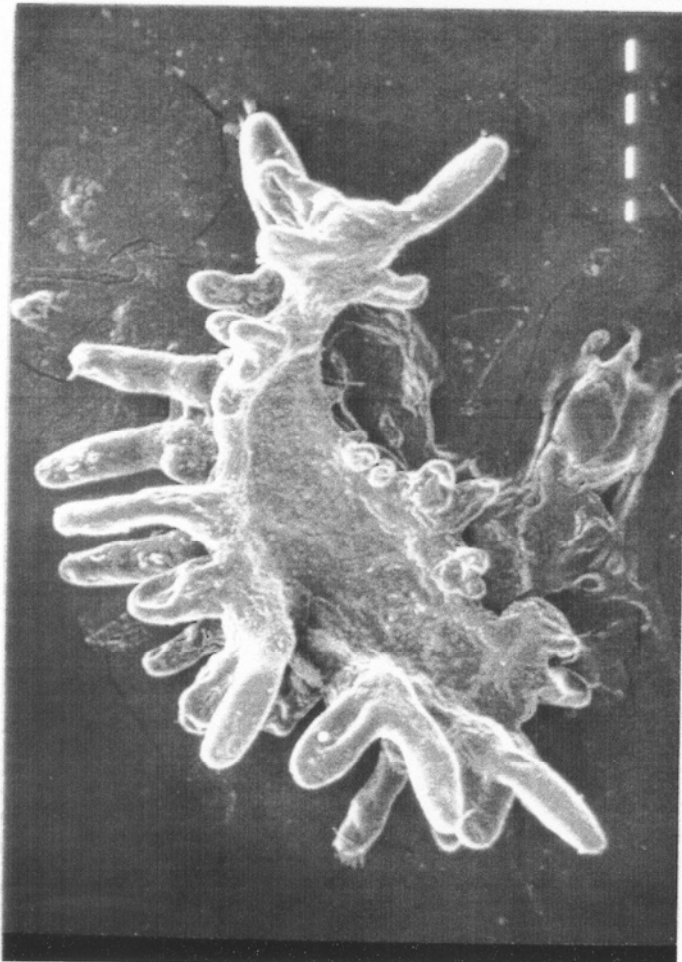
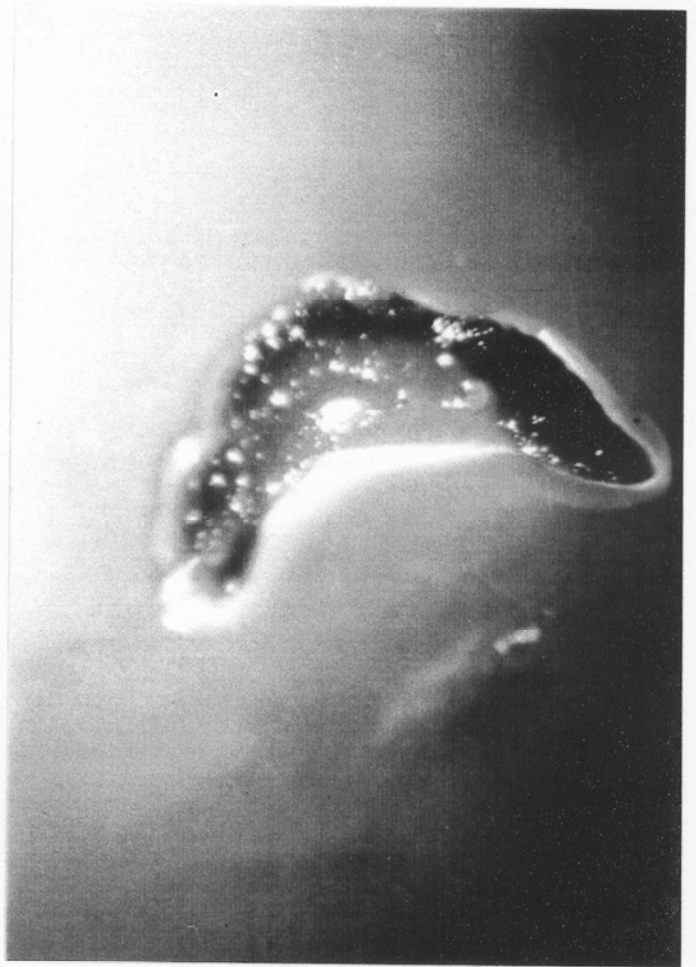
27: desorganización del explanto con pequeñas yemas (flechas).

(barra clara= 7 mm).

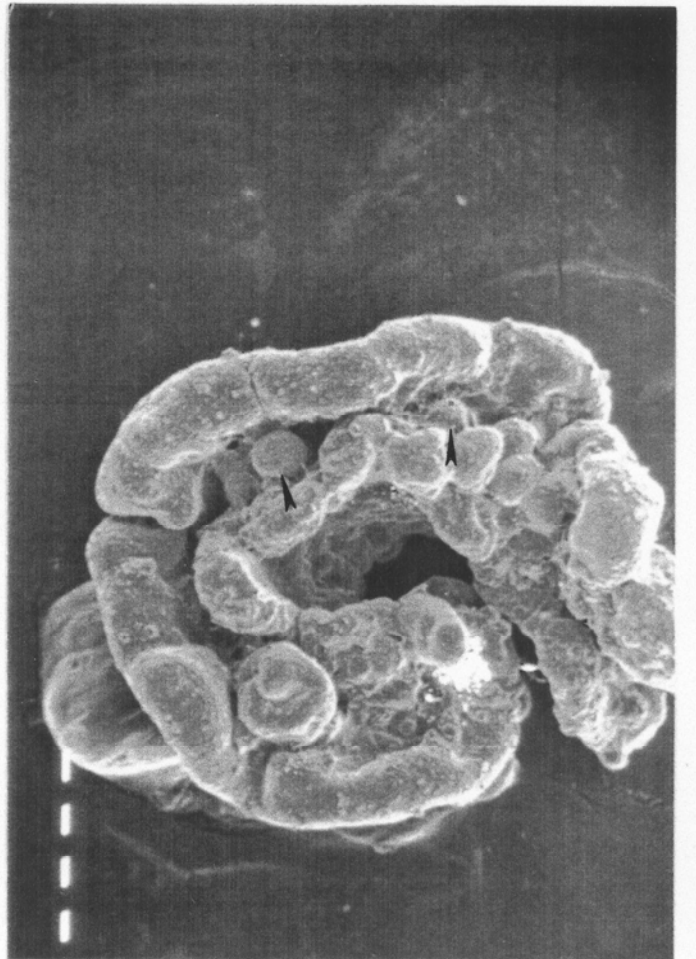
24



25



26



27

Foto 28.- Masa celular lobulada formada por carposporas de Grateloupia doryphora cultivadas en medio mESP70-2,5% glicerol. Nótese la zona de fragmentación de la masa celular (flecha) (10X).

Foto 29.- Corte histológico de una masa celular lobulada (1100 X).

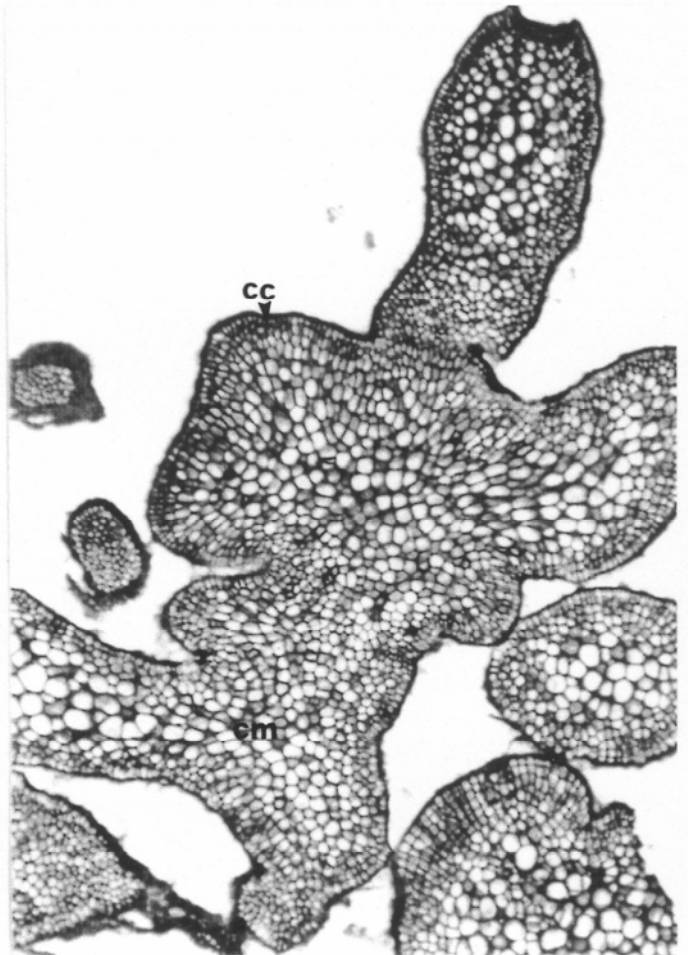
Foto 30.- Plántulas formadas por explantos subcultivados a medios líquidos mESP100 (a) y mESP70-2,5% glicerol (b).

(cc= capa cortical, cm=capa medular).

28



29



30

IV. DISCUSION

IV.1. Establecimiento de cultivos axénicos

Los resultados obtenidos en las experiencias de desinfección permiten hacer una valoración de los métodos de desinfección superficial en el cultivo de tejidos de algas que, como se ha señalado, sigue siendo uno de los problemas básicos a resolver para el desarrollo de estas técnicas [152].

En el cultivo de tejidos de macralgas marinas, la metodología común para la comprobación de la asepsia del material vegetal desinfectado consiste en la siembra en medios de cultivo [32, 67, 151] cuya composición sólo permite la detección de contaminantes bacterianos, fúngicos y algales. Los cultivos establecidos siguiendo esta metodología son descritos como axénicos, aunque no se haya descartado la existencia de contaminantes diferentes (micoplasmas, virus, etc.) a los detectables.

Por otra parte, el periodo de tiempo que se dedica a la comprobación de la esterilidad del material, puede no ser suficiente como para detectar la presencia de contaminantes. Es común la observación de la aparición de contaminantes al tiempo de haber sido establecido el cultivo "axénico". El retraso en el desarrollo de los

contaminantes ha sido interpretado en base a la naturaleza endófito de los mismos [69, 112].

Los métodos de desinfección superficial, por definición, no permiten el establecimiento de cultivos axénicos a partir de material con contaminantes endógenos. La existencia de algas, hongos, bacterias y virus endófitos es un hecho común en las algas marinas [50, 76, 170, 124]. Por ello, el problema al que se enfrentan los intentos de establecimiento de cultivos axénicos de macroalgas marinas es la imposibilidad de eliminar los contaminantes endófitos utilizando métodos de desinfección superficial. El éxito del establecimiento de cultivos axénicos depende del estado de contaminación endofítica que posea el material vegetal de partida en las experiencias.

La imposibilidad de establecer cultivos axénicos permanentes de las especies estudiadas puede atribuirse a dos causas:

- 1) La inefectividad química de los tratamientos de desinfección empleados, por la presencia de contaminantes resistentes.

- 2) La inefectividad física por la naturaleza endofítica de los contaminantes asociados.

Los tratamientos de desinfección que hemos

empleados son similares a los utilizados por la mayor parte de los autores para el establecimiento de cultivos axénicos de macroalgas marinas. Constituyen métodos de desinfección con propiedades antisépticas generales, por lo que descartamos la posibilidad de que existieran, en todos las especies algales y explantos utilizados, contaminantes resistentes.

Además, los tratamientos de desinfección no fueron del todo inefectivos. Sin que influyera el tamaño del explanto, el resultado comúnmente obtenido fue un retraso en el desarrollo de los contaminantes, en aquellos que fueron sometidos a la desinfección, frente al desarrollo en los explantos no desinfectados. El periodo de tiempo transcurrido entre la desinfección y la observación del crecimiento de contaminantes varió entre especies, siendo el mínimo de 10 días en G.ferox y de 60 días en G.doryphora (Tabla III.11). Podemos decir que se establecieron cultivos temporalmente libres de contaminantes bacterianos, fúngicos y algales.

La recolección de las algas en dieferentes zonas y las diferencias morfológicas entre las mismas pudo condicionar el grado de contaminación del material de partida, dando lugar a las diferencias interespecíficas detectadas [161, 176].

Hechos como el que los explantos contaminados

mostrarán contaminantes algales y bacterianos de características uniformes en un mismo explanto, aunque pudieran ser diferentes entre explantos, o de forma más clara, el hecho de que la contaminación se manifestara en explantos totalmente decolorados (Foto 13), donde es evidente que el tratamiento de desinfección fue lo suficientemente fuerte como para afectar a los contaminantes superficiales, nos hace pensar en la naturaleza endófitas de los contaminantes detectados. En el caso de los contaminantes algales, ya desde las experiencias preliminares de desinfección se detectaron algas de hábitat endo-epífitas como Endoderma y Phaeophyla. El seguimiento del desarrollo de tales contaminantes muestra en multitud de casos la emergencia de los talos del alga contaminante de las capas celulares internas del explanto. El caso más claro es quizá el del alga parda endófitas de Grateloupia doryphora, cuyo desarrollo comienza en el interior del explanto (perceptible en zonas depigmentadas del mismo) con la aparición de zonas necrosadas, detectándose posteriormente la emisión de los filamentos.

La conclusión de los resultados obtenidos es que, en nuestros intentos de establecimiento de cultivos axénicos de algas, fue inefectivo el procedimiento de

desinfección superficial "per se" y no los biocidas y sus concentraciones. La observación de explantos libres de contaminantes (como los de G.doryphora) no implica que fueran axénicos, ya que no es comprobable la ausencia de contaminantes de naturaleza endófito. Por ello, pensamos que el término axénico no puede ser usado para definir un cultivo, a menos que se tenga conocimiento de la ausencia total de cualquier tipo de contaminante en el exterior e interior del explanto sembrado. La siembra de los explantos en medios como el MCE después de la desinfección, no es una prueba definitiva de la ausencia de contaminantes, por lo que hasta el momento en el que dispongamos de medios más estrictos de comprobación de la asepsia, la definición de un cultivo de tejidos algales como axénico o aséptico debe referirse a la ausencia permanente de contaminantes en los explantos, después del crecimiento en medios de detección de contaminantes bacterianos, fúngicos y algales.

Se obtuvieron los mismos resultados en los ensayos de desinfección de los callos de Laurencia sp que los expuestos para el explanto inicial. Antes de la desinfección los callos muestran un grado de contaminación superior al del explanto, lo que justifica los resultados obtenidos. La desinfección superficial ocasiona la depigmentación de las yemas, resultado que es explicable

si se tiene en cuenta la inmadurez del tejido que las conforma. Tras la muerte de los callos o parte del tejido del callo (yemas) los contaminantes algales y fúngicos afloran sin el posible control del crecimiento de los mismos que ejercería el alga [59, 176] y sin competencia con otros microorganismos que habrían sido eliminados por el tratamiento de desinfección. Este hecho explica el crecimiento incontrolado de los contaminantes en los callos sometidos a desinfección.

Un tratamiento adicional de desinfección, aunque se trate de estructuras regeneradas en cultivo, no constituye una alternativa al establecimiento de cultivos axénicos a partir de explantos del talo del alga. Este hecho es conocido desde los primeros intentos de establecimiento de cultivos axénicos de las algas [67].

Si en cultivo de tejidos de vegetales superiores el saneamiento vegetal se realiza sembrando partes de la planta carentes de contaminantes, en algas se podría adoptar la misma estrategia, sembrando partes del alga donde sea fácilmente demostrable la ausencia de los mismos. Los resultados obtenidos con la siembra de carposporas de Grateloupia doryphora, muestran el crecimiento en medio con glicerol de las mismas frente a la

inhibición de los filamentos del endófito, al mismo tiempo, se comprobó que las carposporas eran fácilmente separables de las células del endófito. Las células reproductoras de las algas (carposporas, tetraesporas etc.) tienen un origen tisular interno en el que es previsible la ausencia de contaminantes epífitos. Los contaminantes endófitos extracelulares serían eliminables con la dispersión de las células en las placas de cultivo. Tales métodos, que presentamos como alternativos para el establecimiento de cultivos de tejidos axénicos, han sido utilizados para tal fin en la aplicación de métodos convencionales de cultivo de algas en laboratorio [48, 166, 201].

IV.2. Crecimiento y desarrollo del explanto.

Influencia del tipo de explanto.

Los resultados obtenidos en las experiencias de control de la regeneración de los distintos explantos de Laurencia sp, Gelidium versicolor, Gelidium arbuscula y Garcilaria ferox, muestran que su procedencia de diferentes zonas del talo tiene un marcado efecto sobre la regeneración.

La mayor capacidad de regeneración de los explantos "terminales" frente a la de los explantos "estipe" y "anclaje" en Laurencia sp y G.arbuscula (Tablas III.1 y III.7) podrían atribuirse a la existencia de diferencias fisiológicas en las distintas partes del talo que afectan a la capacidad de regeneración de las células en tales zonas (Litter & Arnold, 1981).

En todas las especies estudiadas existen explantos de regeneración localizada (ej. zona de corte o ápice en los explantos "terminal" de Laurencia sp, "estipe" de G.versicolor y G.arbuscula y G.ferox) y explantos de regeneración deslocalizada ("terminal" en G.versicolor ,G.arbuscula y G.ferox y "estipe" en Laurencia sp).

La construcción de los talos de las algas puede ser simplificada, reduciendo la estructura global del

talo a una agregación de filamentos, entre los que podemos distinguir los de crecimiento ilimitado y los de crecimiento limitado. El crecimiento del alga dependerá de la mayor o menor proporción de filamentos de un tipo u otro. En el crecimiento uniaxial el eje principal del talo es el único que posee filamentos de crecimiento ilimitado. En el multiaxial todos los filamentos poseen crecimiento ilimitado [19, 118]. Todas las especies estudiadas poseen crecimiento apical de tipo uniaxial, dependiendo las ramificaciones de ejes de crecimiento limitado que surgen a partir del eje principal [76]. Las diferencias encontradas en la localización de las estructuras regeneradas por los distintos explantos pueden ser ocasionadas por la distribución diferencial de los ejes de crecimiento a lo largo de la estructura del talo.

Las variaciones en la capacidad de regeneración dependiente de la procedencia del explanto de diferentes zonas del talo, expuestas en nuestros resultados, coinciden con las detectadas por otros autores en el cultivo de tejidos de algas rojas y pardas [32, 33, 34, 36, 60, 71, 135, 151, 206].

La distinción puramente terminológica de los explantos, de acuerdo con su procedencia de diferentes zonas del talo, ha resultado en la detección de

diferencias de comportamiento en la regeneración en cultivo, por lo que no es lo mismo comenzar un cultivo a partir de una zona u otra del talo. Tal distinción comienza a dar forma al término "tejido" en un tipo de vegetal tradicionalmente considerado carente de diferenciación celular más allá de las células corticales y medulares. Las diferencias en la capacidad de regeneración de células morfológicamente diferentes del talo de Porphyra, que fueron detectadas por cultivos de tejidos, fueron posteriormente correlacionadas con variaciones en la composición proteínica de tales células [98]. Igualmente existen diferencias en la capacidad de digestión de la pared celular por los mismos enzimas y en la viabilidad de los protoplastos aislados, dependientes de la procedencia de diferentes zonas del talo del material digerido [34, 60, 151].

La variación en la respuesta detectada en Laurencia sp, cuyos explantos "terminales" extraídos de las ramas cortas del talo no resistieron el tratamiento de desinfección (Tabla III.1) puede ser atribuible al grado de madurez (grosor de la pared y espacios intrecelulares) de las células en tales zonas, tal y como señalan [33, 71]. Los explantos "terminales" de rama corta de Laurencia sp proceden de ramas jóvenes del

talo, distinguibles por su pequeño tamaño y escasa ramificación. En tales tejidos se produce, probablemente, una mayor penetración de los agentes biocidas que llegan a dañar las células.

Influencia de las condiciones de cultivo

Los resultados obtenidos con los explantos "terminales" de Laurencia sp cuando fueron sometidos a diferentes condiciones de cultivo coinciden con resultados precedentes [71, 149, 151, 164, 167], que señalan la mayor predisposición de las macroalgas a formar callo en medio sólido y yemas en medio líquido. A nuestro entender, tales resultados dependen de cómo actúan las características físicas del medio de cultivo sobre los diferentes patrones de crecimiento y desarrollo del explanto.

Los explantos "terminales" de Laurencia sp mostraron menores valores de %Callo y mayor elongación de las yemas regeneradas que los explantos "terminales" recultivados (Tabla III.1). Desde nuestro punto de vista, el recultivo no tendría ningún efecto si no se hubiese producido la "explosión" de contaminantes bacterianos que se observó en los explantos sometidos a este tratamiento. El crecimiento de bacterias pudo alterar la composición química del medio de cultivo (transformación

de los componentes del mismo o exudación de compuestos bacterianos). También pudo influir la alteración de las propiedades físicas del medio de cultivo, ya que se apreció la licuación del mismo al final de la experiencia. Como dato comparativo, Grateloupia doryphora en condiciones "axénicas" puede permanecer durante meses sin recultivo cuando crece en medio sólido, sin que se observe la disminución de la viabilidad o capacidad de regeneración de los explantos.

Características del crecimiento en cultivo

Todas las especies utilizadas, excepto las del género Gelidium, mostraron la capacidad de regenerar en cultivo estructuras desorganizadas, aunque las características macro y microscópicas, así como la formación de las mismas, siguieron patrones diferentes en las distintas algas.

Los explantos "terminales" de Laurencia sp regeneran callo en la zona de corte proximal y distal que alternan con la regeneración de yemas. Las características macroscópicas y microscópicas de los dos tipos de estructuras desorganizadas detectadas son notablemente diferentes. El callo formado en la zona de corte proximal constituye una proliferación celular desorganizada. El callo distal representa un hinchamiento del

ápice del explanto, en el que es posible distinguir zonas con células dispuestas desorganizadamente y zonas que mantienen la organización celular igual a la que se detecta en el explanto.

Los explantos "terminales" no recultivados de Laurencia sp no mostraron un incremento en la formación de callo. Aparentemente, el grado de contaminación que alcanzan tales explantos en cultivo no afectó a la formación del mismo. Por el contrario, se detectó mayor formación de yemas. Las yemas regeneradas por dichos explantos desarrollaron, una vez establecían contacto con la base de la placa de cultivo, discos de sujeción al sustrato. Este hecho demuestra la plasticidad morfológica de los ápices de crecimiento de esta especie. Los discos de agarre al sustrato representan, por ser una masa celular amorfa, un tipo de crecimiento macroscópicamente desorganizado. Es ampliamente conocida la capacidad de determinadas especies de algas para sujetar el talo mediante la diferenciación de hapteros en determinadas zonas del talo, que pueden ser ramas especializadas [19, 76], como es el caso de Laurencia perforata, ser el ápice de crecimiento el que desarrolle un disco de "anclaje" una vez que contacta con el sustrato [76]. En base a lo anteriormente expuesto, pensamos que la

desorganización detectada en el ápice del explanto "terminal" de Laurencia sp representa una fase del desarrollo de una estructura de sujeción al sustrato. De hecho, en más de una ocasión se observó como las pequeñas ramas que forman el explanto "terminal" desarrollaban, también en el ápice, un hinchamiento similar que terminaba diferenciándose en un disco de sujeción, con el que se fijaban a la superficie del explanto.

La regeneración en las zonas de corte de los talos de las algas puede dar lugar a la regeneración directa de nuevas ramas [45, 52, 53, 78, 87, 118] o a la formación de un callo previo a la regeneración de tales ramas [45, 56, 118]. La regeneración de yemas en cultivo por los explantos terminales de Laurencia sp no se produce directamente a partir de las células en la zona de corte, sino que tal regeneración transcurre mediante la formación de una capa celular intermedia que posteriormente desarrolla las yemas (Foto 10). El hecho de que las características de esa zona de transición sean las mismas que las de las células del callo detectado en la zona basal y que los callos sean posteriormente morfogenéticos, nos hace pensar que la regeneración de yemas a partir de zonas de corte en Laurencia sp sigue un patrón similar al descrito como de efecto herida, con

la regeneración de una capa celular de tejido desorganizado que formará las yemas. Por tanto, debemos considerar tal masa celular como un auténtico callo [202].

La regeneración de yemas a partir de las zonas de corte de los explantos "estipe" de Gelidium versicolor, Gelidium arbuscula, Gracilaria ferox y disco de Grateloupia doryphora se realiza sin la formación de una capa celular desorganizada de naturaleza similar a la encontrada en Laurencia sp. Sin embargo, en G.ferox se observa la desorganización macroscópica de algunas de las yemas regeneradas (Fotos 15 y 16) y en G. doryphora, la regeneración de yemas alterna con la regeneración de estructuras desorganizadas filamentosas de consistencia tisular dudosa (Foto 20). Las estructuras desorganizadas formadas por tales especies no son morfogenéticas, y no prosperan en cultivo después de ser aisladas del explanto. Además, en G.ferox la desorganización macroscópica no implica la desorganización microscópica del tejido, detectándose la misma disposición celular en los talos que en el tejido desorganizado formado por las yemas.

De acuerdo con Murashige (1974), las estructuras desorganizadas observadas en G.ferox no se ajustan a la definición de un callo.

Las masas filamentosas desarrolladas por G.doryphora no se ajustan a las características del callo filamentoso morfogenético de Agardhiella subulata [22, 23].

La formación de tejidos desorganizados compactos, como los desarrollados por explantos de G.ferox, puede ser debida a la capacidad natural de desorganización de los talos o ser provocada por las condiciones a las que se somete al alga en el cultivo de tejidos.

La capacidad natural de los talos para formar estructuras desorganizadas (malformaciones o agallas) ha sido relacionada con procesos infectivos del talo por bacterias, hongos, algas, copépodos, nemátodos o por la acción de contaminantes industriales [45, 118, 132, 186]. La revisión de los casos en los que se detectan la regeneración de malformaciones, demuestra que no existen, salvo en pocos casos, evidencias claras de la participación de otros organismos en la formación de tales agallas. En la bibliografía revisada sólo Apt (1988) demuestra, con la reinfección de talos sanos, que el alga Streblonema sp es el agente causante de las agallas detectadas en Neurocystis y Macrocystis. En la bibliografía restante, se atribuye la formación de agalla a la mera presencia del organismo en el interior de las mismas [2, 15, 16, 31, 105, 172, 187]. En algunos

casos se ha desechado la posibilidad de que el agente causante de las agallas fuera otro organismo, concretamente bacterias, aunque se detectaran en el interior de las mismas [56, 128].

El hecho de que la regeneración de las algas se llevara a cabo en condiciones no axénicas nos impide desechar la posibilidad de un origen infectivo para los estructuras desorganizadas compactas detectadas en cultivo. Pero, por otra parte, los resultados de las experiencias de desinfección nos indican que nunca habríamos podido separar la regeneración de la existencia de contaminantes, ya que parece indudable la presencia de contaminantes de naturaleza endófito.

Fellicini y Perrone (1972) descartan la posibilidad del origen bacteriano de las estructuras desorganizadas detectadas en Pterocladia capillacea, en base a la detección de polaridad en la regeneración de la misma, argumentando que un proceso infectivo no debería ser restrictivo a una zona del alga. De acuerdo con lo expuesto por tales autores, podemos acumular pruebas (factores implicados, estructura, polaridad etc.,) que nos permitan dilucidar cuál es el origen de las estructuras desorganizadas formadas por las diferentes algas.

La emisión de filamentos, como los que componen las estructuras desorganizadas de G.doryphora, también tiene parangón en la naturaleza, ya que es conocida la capacidad de determinadas algas de emitir a partir del talo filamentos (pelos, hifas) [45, 57, 76, 118, 142], en alguna ocasión relacionados con actividades secretoras o de absorción de nutrientes [45, 84, 118].

Efecto de aditamentos al medio de cultivo sobre la regeneración y crecimiento de las estructuras regeneradas

Factores reguladores del crecimiento y extractos

Los explantos "terminales" de Laurencia sp cultivados con 2mg/l de Kin, BA y 2,4-D, mostraron mayor capacidad de regeneración que los del ensayo control (Tabla III.2), pero no se observó la inducción de estructuras regenerativas diferentes a los explantos del ensayo sin regulador. Por otra parte, las condiciones no axénicas nos impiden predecir si el efecto sobre la capacidad de regeneración de los explantos por los reguladores fue directo o si medió la transformación de los mismos por las bacterias o cualquier otro contaminante del cultivo. En este sentido, debemos mencionar que los explantos de Grateloupia, libres de contaminantes bacterianos, fúngicos y algales no respondieron al tratamiento con varias concentraciones (2 y 5 mg/l) de BA, 2,4-D, Kin (resultados no expuestos en el trabajo), aunque fueron cultivados en medio mESP70-2,5% glicerol donde los explantos poseen una tasa de crecimiento superior a la normal.

Los reguladores de crecimiento Kin, BA y 2,4-D a

concentración de 5mg/l poseen efecto inhibitorio sobre la regeneración de los explantos "terminales" de Laurencia sp (Tabla III.2). El Naftenato sódico, que tuvo efecto positivo sobre la formación de callo en Laminaria [206], fue también inhibitorio a esta concentración.

A nuestro entender, si bien existe un efecto (promotor o inhibidor del crecimiento) de los reguladores sobre la regeneración de los explantos, no se puede concluir que estos alteren los patrones normales (callo o yema) de regeneración detectados para los explantos "terminales" de Laurencia sp.

Los reguladores del crecimiento no tuvieron efecto sobre la morfogénesis de los callos de Laurencia sp (Tabla III.6) (Fig III.6). El control del crecimiento de los callos de Laurencia sp en base a los índices morfogénéticos Número de yemas/Número de callos sembrados (Y/S) y Número de yemas/Número de callos morfogénéticos (IM) demuestra que, en condiciones normales de cultivo, el incremento en Y/S, producto del incremento en el número de yemas por la aparición de nuevos callos morfogénéticos (Tabl III.5) no es acompañado por el aumento en el IM que permanece constante. Aparentemente, existe un "máximo" en la regeneración de yemas por los callos cercano a 3. El IM de los callos es, por tanto, el índice a controlar para la observación de cualquier

efecto sobre la morfogénesis de los mismos.

La Kinetina a concentraciones de 2 y 10 mg/l no tuvo efecto sobre el IM de los callos, que permaneció constante durante 30 días después de la siembra. El 2,4-D no tuvo efecto o fue inhibitorio para la morfogénesis de los callos.

En cultivo de tejidos de otras especies algales se ha descrito que los reguladores de crecimiento vegetal no afectan a la morfogénesis de los callos, aunque se hayan constatado efectos a nivel del crecimiento de los mismos [22] incluso con la alteración de la morfología celular [117]. En la bibliografía consultada no hemos encontrado ninguna referencia en la que se contralara cuantitativamente la morfogénesis de los callos con índices como los que hemos utilizado. Tampoco existen referencias que indiquen la existencia de un "máximo" morfogenético de los callos como el detectado en Laurencia sp.

Nuestros resultados nos permiten destacar que los reguladores de crecimiento no han tenido el efecto que de ellos se esperaba. A nuestro nivel, no es tan importante el hecho de que los reguladores aumenten la capacidad regenerativa de los explantos, como el que induzcan cambios en el patrón de desarrollo normal de los

mismos. En este sentido, los resultados obtenidos nos indican que, en Laurencia sp, los reguladores de crecimiento afectan únicamente a la capacidad regenerativa global (callo + yema) de los explantos. Una vez formado el callo, éste siguió un desarrollo morfogénético ya marcado al que no afectaron los reguladores probados.

En alguna medida, el explanto condiciona el desarrollo del callo después de que éste es aislado del mismo. La posibilidad de que fuera un estímulo químico endógeno el que condicionara la inducción y morfogénesis de los callos, se intentó probar con los ensayos de extractos. Los resultados de tales experiencias (Fig III.1, III.2, III.3) muestran que los extractos probados tienen efecto sobre la capacidad regenerativa de los explantos que, al igual que con los reguladores del crecimiento se manifiesta, de forma general, con un aumento en la formación de callo y yemas. No obstante, los resultados en la Tabla III.3. muestran que algunos tipos y concentraciones de extractos parecen tener mayor efecto sobre la regeneración de callo que de yemas.

Los resultados obtenidos, cuando se utilizan explantos "cilindro", demuestran que la regeneración de callo a partir de zona de corte no obedece a ningún estímulo químico que pudieran poseer los extractos. Los porcentajes de formación de callo no son significativa-

mente superiores a los obtenidos en el ensayo control (Fig III.2A, B, C, D). Dentro de la "normalidad" de los valores de %Callo en los explantos "cilindro", ocurre que los extractos aumentan la capacidad morfogénica de los explantos, observándose mayor formación de yemas (Fig III.3A, B, C, D).

La regeneración de yemas, a nivel macroscópico, "compite" con la de callo. Depende del grado de desarrollo de la capa intermedia entre la zona de corte y la base de las yemas para que una manifestación regenerativa sea considerada como callo o yemas. Tal circunstancia, en explantos sometidos a tratamientos donde poseen una mayor capacidad regenerativa, puede hacer fluctuar los valores "normales" (los del ensayo control) de formación de callo. Así se explican resultados como los obtenidos en el extracto hidrofílico que, aparentemente, inhibe la formación de callo a bajas concentraciones, aumentando los valores del %Callo a medida que aumenta la concentración (Fig III.2B).

Los resultados obtenidos con las dos experiencias de extractos ponen de manifiesto, en primer lugar, la existencia de variabilidad en los explantos "terminales" de Laurencia sp que responden formando callo o yema aleatoriamente, por ser explantos no

homogéneos con pequeñas ramas, ápices (obviamente con potencialidad regenerativa diferente) y zonas de corte. La potencialidad regenerativa de estas zonas en el mismo explanto es diferente lo que, unido a la baja frecuencia de regeneración simultánea, hace que la manifestación regenerativa final del explanto (callo o yema) sea variable entre explantos.

La variación del explanto "terminal" pudo condicionar también la regeneración preferencial de un tipo u otro de estructuras (callo o yema) detectado en el ensayo con reguladores de crecimiento (tabla III.2).

Los extractos pueden ser una forma de enriquecimiento del medio de cultivo para especies que no respondan a los métodos de enriquecimiento convencionales en cultivo de tejidos.

Los resultados obtenidos con los extractos lipofílico e hidrofílico a baja concentración coinciden con los obtenidos por Fries (1980) trabajando con extractos de Fucus vesiculosus y Laminaria digitata en cultivo de Enteromorfa compressa, aunque en su caso el efecto de los extractos fue evaluado con el incremento en el peso fresco del alga. El encontrar los principios activos responsables de los efectos beneficiosos que los extractos tuvieron sobre la regeneración de los explan-

tos, puede constituir una línea de investigación que contribuya a la mejora de los métodos de cultivo, con la adecuación de las tasas de propagación a las requeridas en cultivo de tejidos.

Efecto de potencial hídrico sobre la regeneración en cultivo

Antes de la discusión de los resultados obtenidos en las experiencias de control del efecto del potencial hídrico sobre la regeneración de las algas, consideramos necesario aclarar el significado de los diferentes términos que utilizaremos. Siguiendo la terminología de Lobban y colaboradores (1985), el potencial hídrico (Ψ) es igual a la suma de los potenciales osmótico (π) (dependiente de la concentración de solutos en el agua), y matricial (Ψ_m) (dependiente de la presencia de partículas que retengan agua). En el agua de mar o en el medio de cultivo las células poseen un potencial hídrico suma de los potenciales antes expuestos. Si el medio es líquido se añade al potencial hídrico la contribución del potencial de presión al que responde la célula con la presión de turgor. La contribución del potencial de presión es despreciable si el medio es sólido, en tal caso la presión de turgor celular equilibra las diferencias entre los potenciales hídricos del medio y las células. La presión osmótica hace referencia a la concentración de soluto (Osmolalidad), comportándose de forma inversa al potencial de presión.

Las experiencias preliminares de control de la

osmolalidad del medio de cultivo pusieron de manifiesto que tal propiedad depende de la cantidad de agua de mar del mismo y de la concentración del agente osmótico añadido, lo que nos permite incluso estimar la osmolalidad final del medio de cultivo preparado. Al utilizar medio de cultivo solidificado, se añade el componente matricial al potencial hídrico [25, 41, 42]. A pesar de las referencias señaladas en la Introducción, en las que se demuestran las implicaciones de la solidificación del medio de cultivo en la capacidad de formación de callo de las macroalgas, en la bibliografía revisada no hemos encontrado trabajos en los que la regeneración de las algas se llevara a cabo en condiciones de potencial hídrico controladas.

Efecto del Potencial osmótico

La osmolalidad del medio de cultivo afectó a la regeneración de los explantos de las tres especies ensayadas (Fig III.4A, B, C; III.7 y III.9A, B, C). Los aspectos más destacados del efecto de la osmolalidad del medio de cultivo fueron:

- 1) A osmolalidades inferiores a 0,7 Os/Kg y superiores a 1,0 Os/Kg los explantos sufren una disminución drástica de la capacidad regenerativa que afecta en la misma medida a la formación de callo que a la formación de

yemas.

2) A valores de osmolalidad entre 0,7 y 1,0 se observan diferencias interespecíficas. Los mayores valores del %Regeneración, %Callo y %Yema en explantos de Laurencia sp se observaron a osmolalidades de 1,0 Os/Kg en medio mESP100. G.versicolor posee los mayores valores de %Regeneración y %Yema a osmolalidades de 1,0 Os/Kg en medio mESP70-10g/l NaCl. G.doryphora mostró los mayores valores del %Regeneración y %Yema a osmolalidad de 0,7 Os/Kg en medio mESP70, mientras que el %Callo fue superior en medio mESP100 a osmolalidad de 1,0 Os/Kg.

3) La regeneración de callo en Laurencia sp y G.doryphora en medios de cultivo de osmolalidad 1,0 Os/Kg aumenta a medida que se incrementa la concentración de agua de mar de los medios de cultivo del 50% al 100%. La regeneración de yemas en las tres especies es mayor en medios mESP100 y notable en medios mESP50-16g/NaCl.

Efecto del Potencial matricial

La formación de callo en Laurencia sp y G.doryphora fue inferior en medios con 0,3% de agar que en medios con 0,8% y 1,5% de agar, sin que existan diferencias entre estos últimos (Fig III.5; III.10). La regeneración de yemas en las tres especies ensayadas disminuye a medida que aumenta la concentración de agar del medio de

cultivo (Fig III.5; III.8; III.10).

Los resultados obtenidos con las tres especies ensayadas son claros en la demostración de los efectos de los tratamientos de osmolalidad y concentración de agar del medio de cultivo sobre la regeneración de los explantos. Las diferencias detectadas en la capacidad regenerativa de los explantos en las distintas osmolalidades del medio de cultivo pueden ser interpretadas sobre la base de un efecto osmótico de la concentración de NaCl o disminución de la proporción de agua de mar, o sencillamente, debidas a la existencia de deficiencias nutritivas por la disminución del agua de mar y el establecimiento de relaciones iónicas diferentes entre los distintos tratamientos. En este sentido, el enriquecimiento en nitrógeno, fósforo y micronutrientes del medio mESP, que fue añadido a cada uno de los medios utilizados, es superior o igual a las cantidades de dichos nutrientes en el agua de mar. Se deduce, por tanto, que en ningún tratamiento hubo diferencias nutritivas que permitan hablar de carencias. Por otra parte, la comparación de los balances iónicos existentes en los diferentes medios demuestra que existen medios con relaciones iónicas iguales donde la regeneración fue muy diferente (Tabla IV.1). Tal es el caso de los medios mESP50 que poseen relaciones iónicas iguales al mESP70 y

mESP100, pero donde los explantos no regeneraron. De igual forma, el medio mESP100-15 g/lNaCl, donde los explantos no regeneraron, posee balances iónicos iguales al mESP70-10g/l NaCl y mESP50-6 g/l NaCl. Consiguientemente, los efectos de la disminución de la proporción de agua de mar y la adición de NaCl deben ser considerados como efectos osmóticos. Se concluye que los explantos no regeneran en medios con osmolalidades inferiores a 0,7 Os/Kg y superiores a 1,0 Os/Kg.

TABLA IV.1. Balances iónicos (catiónicos) de los medios de cultivo con diferentes osmolalidades

<u>RELACION IONICA (meq/meq)</u>			<u>Medio de Cultivo</u>	<u>Osmolalidad Os/Kg</u>
<u>Na /K</u>	<u>Na /Mg</u>	<u>Na /Ca</u>		
47	4	23	mESP50	0,5
			mESP70	0,7
			mESP100	1,0
69	6	34	mESP50-6g/lNaCl	0,7
			mESP70-10g/lNaCl	1,0
			mESP100-15g/lNaCl	1,5
104	9	51	mESP50-16g/lNaCl	1,0
			mESP70-24g/lNaCl	1,5
151	14	74	mESP50-30g/lNaCl	1,5

A la osmolalidad del medio de cultivo hay que añadir los efectos de la concentración de agar que disminuye la capacidad regenerativa a medida que se aumenta su concentración.

A nuestro entender el efecto final de las características del medio de cultivo es un efecto combinado de potencial osmótico y matricial. Esto explicaría el que G.doryphora regenere en mayor medida en un medio con osmolalidad de 0,7 Os/Kg, inferior a la del agua de mar (1,0 Os/kg), ya que en las condiciones hídricas finales influye el agar del medio de cultivo (8 g/l) que reduciría el potencial hídrico hasta valores (más negativos) similares a los encontrados en el agua de mar.

Si son sólo las condiciones osmóticas y matriciales del medio de cultivo las que influyen en el crecimiento y regeneración de los explantos, no parece lógico que exista diferente capacidad de regeneración en medios con igual osmolalidad y concentración de agar. Las condiciones físicas finales del medio de cultivo no son las mismas en los diferentes medios. El agar es una ficocoloide que no necesita de iones para la gelificación, pero sus propiedades (rigidez, fuerza) se alteran si, durante el proceso de gelificación, existen agentes que bloquean la formación de puentes de hidrogeno entre las cadenas lineales de polisacáridos [6]. La adición de

Na (en forma de NaCl), o disminución de Mg y Ca disminuyen la rigidez y fuerza del agar [199].

Las relaciones iónicas o las concentraciones absolutas de los diferentes iones, que se establecen en los diferentes medios de cultivo, si bien no afectan directamente al crecimiento de los explantos, podrían variar las condiciones físicas de cultivo. La variación en los balances iónicos de los medios se produce por la eliminación de agua de mar (disminución del contenido en Mg y Ca) y la adición de Na (en forma de ClNa) para aumentar o disminuir la osmolalidad. El aumento en los valores de los balances iónicos disminuye la rigidez y dureza del agar del medio de cultivo. Se concluye que aunque posean la misma osmolalidad y concentración de agar, la existencia de balances iónicos diferentes entre los distintos medios hace que las condiciones hídricas finales sean diferentes. El efecto de los balances iónicos debe ser similar al de la concentración de agar. Experimentalmente se comprueba que los diferentes medios de cultivo poseen diferentes propiedades físicas, siendo notable las diferencias en rigidez y dureza del agar en los medios tipo mESP50 con respecto al resto. Se observa como en tales tipos de medios existe un aumento en la formación de yemas, el mismo efecto que posee la re-

ducción de la concentración de agar. (Fig.- III.4A, B, C ; III.7; III.9 A, B, C).

Las condiciones hídricas del medio de cultivo afectan a la capacidad regenerativa de los explantos y a los patrones de crecimiento (callo o yema) que desarrolla. La retención de agua por el medio de cultivo puede afectar a la difusión de nutrientes hacia el interior de los talos lo que provocaría la emisión de filamentos por los explantos de G.doryphora . En medios con menor osmolalidad y concentración de agar la regeneración se orienta hacia la formación de yemas. Cuando disminuye el potencial hídrico (aumento de la osmolalidad o concentración de agar) los explantos emiten filamentos. Se concluye que las masas filamentosas no sólo no se adaptan a la definición de un callo, como hemos señalado anteriormente, sino que además su formación está relacionada con la existencia de condiciones hídricas estresantes para el alga, corroborando la idea de que la emisión de filamentos a partir de los talos de las algas está implicada en la absorción de nutrientes o agua [45, 56, 84, 118].

En Laurencia sp puede encontrarse cierta implicación de las propiedades hídricas del medio de cultivo en la regeneración si se tiene en cuenta que:

*La regeneración de estructuras desorganizadas consti-

tuye un paso previo a la regeneración de las yemas.

*El callo tiene un patrón de desarrollo morfogénético homogéneo que aparentemente adquiere desde su formación por el explanto y que no es alterado por compuestos químicos como los reguladores del crecimiento de vegetales superiores. El único efecto sobre la morfogénesis del callo se observó al cultivarlos en medio mESP con menor concentración de agar (0,3%) , que provoca la elongación de las yemas.

* La polaridad en la regeneración de los explantos depende de la existencia de polaridad en la organización del talo. La reorganización durante la regeneración en la zona proximal del explanto en condiciones hídricas estresantes puede dar lugar a la mayor desorganización de la capa celular intermedia entre las yemas y la zona de corte. La formación de callo en Pterocladia capillacea se ha descrito en términos de reorganización de la polaridad celular en la zona de corte proximal del explanto [56].

*La microcopia electrónica de los callos de Laurencia sp puso de manifiesto la existencia de una gran actividad celular con la aparición de gránulos de almidón, vesículas con contenido mucilaginoso, cloroplastos activos y mitocondrias. Las mismas características presentan

las células implicadas en determinados aspectos de la biología de las algas, como la formación de células reproductoras o la división de las células apicales del talo [38, 43, 76, 157, 188]. La acumulación de gránulos de almidón ha sido relacionada con la necesidad energética de tales procesos [38, 43, 76, 188]. La acumulación de gránulos de almidón en las células del callo, combinado con la intensa actividad metabólica detectada podrían ser necesarias para la formación de las yemas, proceso que necesita de un aporte energético.

El almidón de algas rojas (almidón de florideas) posee una estructura similar a la fracción amilopectina del almidón de plantas superiores [118]. En la bibliografía consultada no hemos encontrado referencias a la acumulación de gránulos de almidón en el interior de las células de los callos de macroalgas. En cultivo de tejidos de plantas superiores la acumulación de almidón en las células de los callos de tabaco ha sido relacionada con las necesidades energéticas de la morfogénesis [184, 185, 162], pero también, el estudio de los acontecimientos celulares en la formación de yemas en tales callos asignan un papel osmótico a los componentes derivados de la degradación de dichos gránulos [14, 25, 26, 182, 183]. Tales compuestos dan lugar a cambios en la presión de turgor de las células, necesarios para su

crecimiento [37, 204, 205].

En plantas superiores, el efecto inhibitor de la formación de yemas por la concentración de agar en la que crecen los callos [25, 41, 42] ha sido interpretado sobre la base del efecto del agar sobre el potencial hídrico del medio de cultivo. Al ser un sustrato que no penetra en el interior de las células, estas no pueden equilibrarse osmóticamente con el medio, con lo que no pueden alcanzar la presión de turgor necesaria para el crecimiento [25]. Agentes como la sacarosa, que penetra en el interior celular, puede complementar las propiedades hídricas celulares necesarias para la regeneración de yemas. De la misma forma podrían actuar los productos derivados de la degradación del almidón que acumulan los callos [25].

Las pruebas bibliográficas aportadas acerca del funcionamiento de la regeneración en sistemas que comparten ciertas características (acumulación de almidón, inhibición de la regeneración de yemas por agar) con las del callo de Laurencia sp permiten formular la hipótesis de que la formación de callo en esta especie podría ser consecuencia de las propiedades hídricas del medio de cultivo. El potencial hídrico altera la reorganización celular en la zona proximal, haciendo que las células

crezcan desorganizadamente y acumulen el almidón necesario para la generación de las yemas. Los productos derivados de la degradación del almidón servirían como aporte energético del proceso, al mismo tiempo que generarían las condiciones osmóticas necesarias para el crecimiento y división celular.

Una forma de probar que la regeneración de Laurencia sp es regulada por las propiedades hídricas del medio, sería el estudio del comportamiento de los explantos al añadir compuestos osmoticamente activos, al mismo tiempo que implicados en la regulación osmótica de las células algales.

El ambiente en el que viven las algas marinas, sobre todo si alternan periodos de exposición con periodos en las que se encuentran sumergidas, requiere de mecanismos de regulación de las propiedades osmóticas. La regulación osmótica depende, entre otros, de compuestos carbonados simples [40]. Dentro de las algas rojas las algas Ceramiales (como Laurencia sp) regulan las propiedades osmóticas celulares con el digeneaside (manosa-glicerol) y el resto de los grupos lo hacen con floridoside o isofloridoside (formas isoméricas de compuestos galactosa-glicerol), todos ellos productos de la actividad fotosintética celular [99, 100, 106, 118, 159, 160]. 1979, Reed, 1985; Reed y Col, 1980, Kauss, 1967a,

1967b).

Las condiciones no axénicas de cultivo impidieron el que pudieramos añadir compuestos, como la manosa o el glicerol, al medio de cultivo, para comprobar así su efecto de tales sobre la regeneración de las yemas y la formación de callo por los explantos de Laurencia sp. El establecimiento de cultivos libres de contaminantes bacterianos y fúngicos de G. doryphora nos permitió el estudio de los efectos del glicerol sobre la regeneración de los explantos.

Efecto osmótico del glicerol

A osmolalidades superiores de 1,0 Os/Kg el glicerol tiene el mismo efecto que el NaCl, impidiendo la regeneración de yemas por los explantos semicírculo de G.doryphora (Fig III.11). Esto es un prueba más del efecto osmótico del NaCl. Al mismo valor de osmolalidad 1,0 Os/Kg, si bien los explantos muestran la misma capacidad de regeneración (%Yema) (Fig III.11A), se produce un crecimiento notable de los mismos con la regeneración de gran cantidad de yemas que marcan los valores de los índices Número de yemas/Número de explantos sembrados (Y/S) y Número de yemas/Número de explantos morfogenéticos (IM), muy superiores al encontrado en los

explantos sembrados en medio mESP100 (Fig III.11B, C). El glicerol en las células algales combina un papel osmótico, en forma de galactosa-glicerol, y de fuente de carbono [107]. Las características del crecimiento de los explantos en medio mESP70-2,5% glicerol sólo es explicable si el glicerol es utilizado por los explantos como fuente de carbono.

Los explantos sembrados en medio mESP70-2,5% glicerol respondieron de forma homogénea desarrollando un patrón de crecimiento morfogenético. Sólo un explanto no regeneró yemas en la misma medida que el resto, perdiendo la estructura normal del explanto con la deformación del mismo por crecimiento. Los resultados obtenidos en el experimento de caracterización del crecimiento de pequeñas yemas en medio mESP70-2,5% glicerol demuestran que el crecimiento en este medio transcurre con la inducción de la morfogénesis, mientras que en medio mESP100 las yemas crecen en longitud (Tabla III.10).

Aparentemente, el glicerol no sólo actúa como fuente de carbono que permita una alta tasa de propagación, sino que además canaliza el crecimiento hacia un patrón de crecimiento morfogenético. Los resultados obtenidos con el recultivo de los explantos cultivados en medio con alta concentración de glicerol son bastante

clarificadores (FigIII.12 A, B). Teóricamente, al existir mayor concentración de glicerol en el medio de cultivo se acumula mayor cantidad del mismo en las células. Cuando se recultivan los explantos a medio donde puedan crecer (Osmolaridad 1,0 Os/Kg) se produce un crecimiento mayor al detectado en medio mESP70-2,5%glicerol. Ocurre además que el crecimiento de los explantos transferidos sigue el mismo patrón morfo-genético señalado para el glicerol, pero en este caso los valores de los índices morfo-genéticos, sobre todo el Número de yemas/Número de explantos morfo-genéticos (ya que algunos explantos no sobrevivieron en medio con alta osmolalidad), fueron muy superiores al detectado en los explantos sembrados desde el principio de la experiencia en medio mESP70-2,5% glicerol. El efecto morfo-genético del glicerol es, por tanto, acumulativo.

Este hecho solo es explicable si el efecto osmótico del glicerol, combinado al efecto como fuente de carbono resultara, según lo argumentado por Brown y col (1979) y bajo la hipótesis del turgor [37, 204, 205], en la alteración de la presión de turgor de las células implicadas de tal forma que el patrón de crecimiento se orientara a la formación de yemas.

Los resultados obtenidos al aumentar la concentración de agar del medio de cultivo mESP70-2,5%Glicerol

(Fig III.13) corroboran esta idea, en tanto, la regeneración de yemas disminuye a medida que se incrementa la concentración de agar. En todas las concentraciones de agar se observó el incremento en tamaño de los explantos sembrados. A medida que la concentración de agar se incrementa existe un mayor porcentaje de explantos que crecen de forma desorganizada sin emitir yemas, que sería lo esperado si el glicerol mantiene su efecto como fuente de carbono, sin poder equilibrar las características hídricas del medio de cultivo necesarias para la regeneración de yemas. El comportamiento de los explantos de G.doryphora frente a las variaciones en la concentración del glicerol y agar del medio de cultivo tiene un marcado paralelismo con el detectado en callos de tabaco en su respuesta a variaciones en la concentración de sacarosa y agar [25]. La única diferencia entre los dos "sistemas" radica en que en tabaco el efecto osmótico-matricial sólo es posible observarlo en callos morfogénéticos que son inducidos con la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo. En los explantos de G.doryphora la regulación de la capacidad morfogénica por el sistema glicerol-agar se produce sin la necesidad de reguladores de crecimiento que induzcan previamente la respuesta morfogénica. Aparen-

temente, los factores que regulan la morfogénesis en ambos vegetales alteran su importancia relativa en su contribución a la misma.

No hemos encontrado referencias en la que se destaque un efecto similar de una fuente de carbono sobre el crecimiento de las algas. No se han descrito efectos sobre la tasa de propagación de un alga en cultivo de tejidos como el demostrado para el glicereol y, por otra parte, no se han utilizado índices de crecimiento que permitan la observación del fenómeno.

Nuestros resultados con el glicerol contrastan con la idea de Reed y colaboradores (1982) que consideran que el floridoside (Galactosil (1-2)glicerol) serviría para la osmoaclimatación de las células algales sin participar en la regulación del turgor. Sus resultados están basados en la acumulación de este producto después de someter las algas a condiciones estresantes de salinidad, no en la acción directa que tiene el glicerol.

Los resultados obtenidos con el cultivo de explantos "semicírculo" en medio mESP70-2,5% glicerol demuestran que el glicerol no tiene ningún efecto sin la presencia de la luz. La iluminación de los explantos pudo condicionar la absorción de glicerol o regular la metabolización del mismo. En este sentido, el efecto fotomorfogénico, puesto de manifiesto en determinados

aspectos de la biología de las algas [39, 49, 119, 120, 121], ha sido descrito como un fenómeno poco conocido en el que la luz actúa como una señal que afecta al metabolismo de hidratos de carbono y proteínas [120].

A los efectos reguladores del potencial hídrico del medio de cultivo sobre la regeneración de G.doryphora y la acción como fuente de carbono y agente morfogénico del glicerol, se añade la regulación que ejerce la luz sobre el funcionamiento del sistema. Aparte de la fotomorfogénesis, otro punto de conexión entre tales parámetros lo constituye el que la síntesis de compuestos galactosil-glicerol transcurre con la adición de UDP-galactosa a glicerol-fosfato producidos por la fotosíntesis [99].

La utilización de las técnicas de cultivo de tejidos para la propagación de Grateloupia doryphora ha puesto de manifiesto la interacción de parámetros como las relaciones hídricas del medio de cultivo y células y la luz en los patrones de regeneración del alga en cultivo.

A nuestro entender, el control que podemos ejercer sobre tales parámetros nos puede llevar, a su vez, al control del sistema. Desde el punto de vista de la efectividad de las técnicas de cultivo de tejidos da

igual controlar la regeneración de las algas en cultivo de forma química, con la adición de reguladores de crecimiento, que física, con la alteración cualitativa y cuantitativa de luz y potencial hídrico.

Los resultados obtenidos con Laurencia sp indican que existe la posibilidad de que la regulación de los patrones de regeneración por parámetros físicos no sea una característica exclusiva de Grateloupia doryphora. Subyace la idea de Fries (1973) de que, independientemente que las algas pudieran regular su crecimiento y desarrollo por la acción de reguladores del crecimiento (propios o similares a los de plantas vasculares), estos vegetales son muy afectados por las condiciones físicas medioambientales (luz, temperatura, etc.).

La capacidad de algunos explantos de crecer en medio con glicerol sin regenerar yemas, pero deformándose completamente, hecho que es más perceptible en medio con concentración elevada de agar (1,5%); junto al hecho de que tales desorganizaciones macroscópicas no se corresponden con desorganizaciones de la estructura interna del talo, nos remiten nuevamente al tema de la discusión de las deformaciones naturales y su relación con las detectadas en cultivo.

La existencia en la zona de recolección de poca biomasa algal de Gracilaria ferox impidió la realización

de ensayos con los que probar los efectos de la osmolaridad y la concentración de agar del medio de cultivo sobre tales deformaciones. Por esta razón, poco podemos aclarar acerca del origen de las mismas que no sea a través de la comparación de los hechos que concurren en la formación de tales deformaciones y las de las otras algas ensayadas. La deformación completa de un explanto creciendo en medio con glicerol, libre de contaminantes bacterianos y fúngicos e inhibido el crecimiento del "posible" endófito que posean, nos indica que en cultivo de tejidos de G.doryphora la aparición de las deformaciones no está relacionada con la presencia de contaminantes. En la misma medida la aparición de las deformaciones en G.ferox podría no ser debida a los contaminantes que portan los explantos, sino, al igual que en Laurencia sp y Grateloupia doryphora de las condiciones de cultivo. El hecho de que las deformaciones sólo aparezcan en yemas regeneradas en cultivo indica que las condiciones de cultivo inducirían las características fisiológicas necesarias para el crecimiento macroscópicamente desorganizado. En este sentido, Brown y col., (1980) demuestran que, antes de la aparición de las características histológicas que preceden la formación de yemas en callos de tabaco, se produce una adap-

tación de las propiedades hídricas de las células que las preparan para la morfogénesis .

El glicerol como fuente de carbono eficaz para la propagación vegetativa por cultivo de tejidos

En cultivo de tejidos se intenta el crecimiento heterotrófico de las células , para lo que en vegetales superiores el medio de cultivo es enriquecido con fuentes de carbono. La más común la sacarosa [81].

Como se ha señalado en la Introducción, también en el cultivo de tejidos de algas se han añadido a los medios fuentes de carbono. Nuestros resultados muestran que al ser los compuestos carbonados agentes osmóticos, o bien se añaden a bajas concentraciones (glucosa 0,01%. [149]), con lo que es previsible que no tengan efecto sobre el crecimiento, o se añaden a concentraciones elevadas donde, por sus efectos osmóticos, pueden inhibir la regeneración de los explantos (Manitol 10%. [164]). Si se trabaja con medios de cultivo con agua de mar enriquecida, la mejor solución es disminuir la salinidad del medio de cultivo con la dilución con agua destilada, añadiendo los mismos nutrientes y equilibrando la osmolalidad con la concentración del azúcar. Si se trabaja con medios de cultivo sintéticos el potencial hídrico puede ser controlado en la formulación del

mismo [129].

El efecto del glicerol como fuente de carbono no puede ser reemplazado por la sacarosa en las mismas condiciones osmóticas de cultivo (Fig III.14). En la línea de lo argumentado por otros autores que observan resultados similares a los nuestros, creemos que tal efecto es debido a diferencias metabólicas entre las plantas superiores y las algas [69, 164].

En la bibliografía consultada no hemos encontrado ninguna referencia en la que se demuestre para otras algas rojas una tasa de propagación vegetativa similar a la observada en G.doryphora en medio de cultivo con glicerol. Saga y colaboradores (1982) consiguen, con manitol, una tasa elevada de propagación del alga parda Dyctiosiphon foeniculaceus, pero trabajando con la fase microtalo que solo pudieron mantener en forma de masa filamentosa (Callo, según los autores).

El glicerol tiene los mismos efectos sobre los explantos semicirculo que sobre las carposporas o las células liberadas del talo por digestión enzimática. El haber encontrado una fuente de carbono eficaz para el crecimiento de las células algales posibilitó el que se intentara con éxito la regeneración a partir de otras zonas del talo. Aunque ha sido descrito la propagación de diferentes especies algales a partir de células libe-

radas del talo (Tabl I.1,I.2, I.3) no existen referencias en la bibliografía consultada donde se describa la utilización de fuentes de carbono efectivas en la propagación de las mismas. La mejora en los métodos de obtención y regeneración de las células liberadas del talo en medio líquido y sólido puede llevarnos al establecimiento de cultivos a partir de células o grupos de células con la posibilidad, incluso, de separar tipos celulares diferentes.

La tasa de propagación elevada que se obtiene con medios de cultivo enriquecidos en glicerol (Fig III.14) permitirá reducir el tiempo necesario para la obtención de talos y el estudio de la fisiología de células liberadas del talo. Al mismo tiempo, la separación de células posibilitaría la mutagénesis y su estudio con la comprobación de los resultados en un corto espacio de tiempo.

El aspecto más destacable de la regeneración de las células libres fué el que estas desarrollaran nuevos talos y no permanecieran creciendo y dividiéndose hasta dar un cultivo celular en suspensión. Opinamos que para esto puede ser necesario el control químico (reguladores de crecimiento) o físico (parámetros ambientales en los que crecen las células).

La regeneración a partir de carposporas presenta hechos como la formación de masas celulares lobuladas que se disgregan fácilmente, tanto en medio sólido como líquido, sin llegar a adoptar la estructura típica de un talo. La organización interna es también diferente, no encontrándose tipos celulares típicos de los talos de esta especie. Es conocido que la formación de talos a partir de carposporas es un proceso controlado por parámetros medioambientales cuya acción específica permanece aún pobremente entendida [118]. La propagación de carposporas de G.doryphora por cultivo de tejidos permitirá el estudio de la relación de tales parámetros con la morfogénesis de los talos a partir de las mismas. El control del sistema hará de las carposporas, combinadas con técnicas como la encapsulación un sistema ideal para la construcción de "semillas de algas".

IV.3. Cultivo en medio líquido

Uno de los fines fundamentales de la propagación por cultivos de tejidos es que, al final, la planta mantenida en el laboratorio crezca en el ambiente natural [139]. El ambiente natural de un alga marina es el agua de mar, por lo que las plantas cultivadas en el laboratorio, aplicando las técnicas de cultivos de tejidos, deben dar lugar a plantas normales susceptibles de ser cultivadas en agua de mar o en medio de composición similar a la misma. Este último paso es absolutamente necesario si las técnicas de cultivo de tejidos son aplicadas para la obtención de clones selectos de algas.

Los callos de Laurencia sp pudieron ser cultivados en medio líquido en el que desarrollaron plántulas de hasta 1cm de longitud y donde permanecieron creciendo durante mas de dos meses. Sin embargo, la contaminación de los explantos hace que al tiempo de cultivo disminuya la viabilidad de los mismo, por lo que, en cierta medida este resultado es ocasional, no por ello menos importante ya que demuestra lo adecuado de tal estructura como forma propagativa de esta especie.

Los resultados más destacados en el cultivo a medio líquido se obtuvieron con Grateloupia doryphora, observándose como los explantos que habían crecido en

medio sólido mESP70-2,5% glicerol se adaptaron perfectamente al crecimiento en medio líquido mESP100 donde desarrollaron plántulas de pigmentación y morfología normal (Foto 30). La compatibilidad entre el medio sólido con glicerol y líquido mESP100 constituye un paso importante, ya que la propagación a alta tasa en medio con glicerol hubiese sido poco efectiva si, al final, los explantos no se habituaran a las condiciones normales de crecimiento (agua de mar o mESP). En la obtención de estos resultados el control de la osmolalidad del medio de cultivo con glicerol permitió la adaptación de los explantos, ya que estos crecieron siempre en condiciones isoosmóticas.

La propagación a medio de cultivo mESP70-2,5% glicerol líquido permitió el mantenimiento de la alta tasa de propagación de los explantos en medio mESP70-2,5% glicerol sólido. Los explantos desarrollaron "plantulas" de aspecto deforme, compuestas de gran cantidad de yemas y pigmentación anormal. En cierta medida, el crecimiento en medio con glicerol líquido siguió las mismas características detectadas en medio sólido.

Un aspecto importante en la propagación en medio mESP70-2,5% glicerol tanto sólido como líquido es el aspecto de los explantos al tiempo de cultivo. A lo 20

días de sembrados en medio sólido mESP70-2,5% glicerol los explantos comienzan a depigmentarse, sin que se observara la emisión de sustancias, o la alteración de propiedades del medio de cultivo como el pH.

En cultivo de tejidos de plantas superiores la disminución de la tasa de crecimiento de los callos que hace necesario el subcultivo es debida a la aparición de gradientes en la toma de nutrientes por las células del mismo (George & Sherrington, 1984). La depigmentación de los explantos de G.doryphora comienza en las yemas más separadas de la superficie del agar y rápidamente se extiende a otras zonas del explanto. El hecho de que la depigmentación pueda evitarse con el subcultivo, nos indica que el crecimiento a alta tasa que sufren los explantos en medio sólido mESP70-2,5% glicerol impide la difusión de nutrientes del medio de cultivo hacia las células más separadas del mismo. El que se detecte la depigmentación de explantos en medio líquido mESP70-2,5% glicerol indica que la deformación de los explantos puede condicionar también la difusión de nutrientes.

Sin embargo, no es descartable que el metabolismo del glicerol por las células del talo de G.doryphora produzca la acumulación de productos nocivos para el crecimiento celular. Las vías degradativas del glicerol en el interior celular es un aspecto a estudiar al que

puede ser muy útil como "herramienta" de trabajo las técnicas de propagación por cultivo de tejidos desarrolladas para G.doryphora.

No hemos encontrado referencias en la que se describa la propagación completa de un alga, desde el establecimiento de cultivos "axénicos", la propagación a alta tasa en medio sólido y líquido hasta la adecuación de los explantos a las condiciones normales de crecimiento del alga en medio similar al agua de mar.

Con la obtención de plántulas normales del alga Grateloupia doryphora hemos completado el proceso de propagación de la misma por cultivo de tejidos. A partir de este alga se pueden establecer cultivos libres de contaminantes bacterianos y fúngicos si se parte de fragmentos del talo y de contaminates endófitos algales si se parte de células libres. Los explantos pueden ser mantenidos el tiempo necesario creciendo a una tasa normal (la del alga en el laboratorio) o ser propagado a alta tasa si se siembra en medio con glicerol. Para la propagación sólo es necesario tomar una mínima parte del explanto disco. El desarrollo morfogénico del explanto en medio sólido con glicerol, puede ser continuado en medio líquido, también con glicerol. El explanto o partes del explanto crecidos en medio con glicerol se

adaptan perfectamente a medio de cultivo mESP de propiedades similares al agua de mar, con lo que se obtienen plántulas de morfología y aspecto normal (natural) de la especie. Tales plántulas son susceptibles de constituirse en fuente de material vegetal que inicie el ciclo nuevamente.

El sistema de propagación por cultivo de tejidos desarrollado para Grateloupia doryphora es útil para la inducción de mutaciones, por la biomasa celular que podemos desarrollar con el glicerol, la propagación de los mutantes en un tiempo razonable, y la obtención a partir de los mismos de plántulas normales. Estas podrían ser cultivadas en el mar u otros sistemas de cultivo para el desarrollo de talos de clones selectos, o sencillamente ser mantenidas en el laboratorio utilizando las mismas técnicas, hasta su posterior propagación.

V. CONCLUSIONES

1) El establecimiento de cultivos axénicos a partir de explantos depende de la probabilidad de encontrar material vegetal libre de contaminantes endófitos y del desarrollo de métodos para la comprobación de la ausencia de contaminantes distintos a las bacterias, hongos y algas.

Alternativamente, demostramos la utilidad de las células reproductoras (carposporas) de G.doryphora para el establecimiento de cultivos libres de contaminantes bacterianos, fúngicos y algales extracelulares.

2) La procedencia del explanto de diferentes zonas del talo de Laurencia sp, Gelidium versicolor, Gelidium arbuscula y Gracilaria ferox tiene una marcada influencia en los patrones de crecimiento y desarrollo del alga en cultivo. También, las condiciones de cultivo de un mismo tipo de explanto pueden alterar su respuesta.

3) Todas las especies estudiadas desarrollan patrones de crecimiento organizado (yema) en cultivo. Todas las especies estudiadas, excepto las del género Gelidium combinan la regeneración organizada con la formación de estructuras desorganizadas. Sólo el tipo de crecimiento

desorganizado detectado en la zona de corte de explantos de Laurencia sp se ajusta a la definición de una callo.

4) El crecimiento y desarrollo de explantos "terminal" y "cilindro" de Laurencia sp es afectado por reguladores del crecimiento en vegetales superiores y extractos, que inhiben o aumentan la capacidad regenerativa global del explanto (callo + yema) sin que induzcan específicamente la formación de callo, ni afecten a su capacidad morfo-genética.

5) El potencial hídrico del medio de cultivo afecta a la capacidad regenerativa de los explantos de Laurencia sp, Gelidium versicolor y Grateloupia doryphora, observándose la existencia de condiciones óptimas diferentes para la regeneración en cultivo de las distintas especies. El componente osmótico del potencial hídrico disminuye la regeneración a osmolalidades inferiores o superiores a 0,7-1,0 Os/Kg. El componente matricial disminuye la capacidad morfogénica de los explantos a concentraciones de agar superiores a 8 g/l.

6) Las características histológicas del callo de Laurencia sp, y las pruebas bibliográficas aportadas acerca del funcionamiento de la morfogénesis en callos de otras especies vegetales, permiten formular la

hipótesis de la implicación del potencial hídrico del medio de cultivo en la génesis del callo, actuando la acumulación de almidón en los mismos como una fuente de carbono y osmótica en el proceso morfogénético posterior que sufre el callo.

7) La masa filamentosa desarrollada por los explantos de Grateloupia doryphora representa extensiones del talo producidas, probablemente, con el intento de paliar las malas condiciones hídricas-nutritivas que sufre el alga en cultivo en medio agarizado debidas a la baja difusión de nutrientes y a la fuerte retención de agua.

8) Los resultados obtenidos indican también que las deformaciones de las yemas formadas por los explantos de Gracilaria ferox podrían ser generadas por las condiciones hídricas de cultivo.

9) En el crecimiento y desarrollo de explantos "semicírculo" de Grateloupia doryphora en medio mESP70-2,5% glicerol, el glicerol combina un efecto de fuente de carbono que aumenta la tasa de propagación normal de los explantos y un efecto osmótico que induce la morfogénesis. Las condiciones hídricas del medio de cultivo mESP70-2,5% glicerol, siempre que los explantos

se cultiven en condiciones de luz, pueden generar el crecimiento morfogénico de los explantos o el crecimiento macroscópicamente desorganizado.

10) Se ha completado la propagación por cultivo de tejidos del alga Grateloupia doryphora con el establecimiento de cultivos libres de contaminantes epífitos, partiendo de explanto, y endófitos, partiendo de carposporas. Los explantos pueden ser mantenidos creciendo a una tasa de propagación normal en medio mESP o a alta tasa en medio mESP70-2,5% glicerol. El desarrollo morfogénico en medio sólido con glicerol puede ser continuado en medio líquido, también con glicerol. El explanto, o partes del mismo, cultivado en glicerol da lugar a plantas de morfología normal que pueden constituirse en fuente de material vegetal para iniciar nuevamente la propagación siguiendo la metodología desarrollada para el cultivo de tejidos de esta especie.

- **1) ADAMICH M., HEMMINGSEN B.B., (1980). Protoplast and spheroplast production. pp.153-159 En: Handbook of phyco-logical methods. Developmental and cytological methods. Gantt E. (eds). Cambridge Uni. Press, Cambridge.
- **2) ANDREWS J.H., (1976). Observations on the pathology of seaweeds in the Pacific Northwest. CAN. J. BOT. 55:1019-1027
- **3) APT K.E., (1984). Callus-like growths of Gracilaria epihippisora Hoyle (Rhodophyta). J. PHYCOL. 20:
- **4) APT K.E., (1988). Etiology and development of hyperplasia induced by Streblonema sp. (Phaeophyta) on members of the Laminariales (Phaeophyta). J. PHYCOLOGY. 24:28-34
- **5) ARASAKI S., ARASAKI T., (1983). Vegetables from the sea. Japan Publications, Inc., Tokyo.
- **6) ARMISEN R., GALATAS F., (1987). Production, properties and uses of agar. pp 1-50. En: Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO, Roma.
- **7) AUGIER H., (1976a). Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. I. Recherche et tentatives d'identification des auxines. BOTANICA MARINA. 19:127-143
- **8) AUGIER H., (1976b). Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. II. Recherche et tentatives d'identification des giberellines, des cytokinines et de diverses autres substances de nature hormonale. BOTANICA MARINA. 19:245-254
- **9) AUGIER H., (1976c). Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. III. Role des hormones dans le modalites de croissance et de developpement des thallus. BOTANICA MARINA. 19:351-377
- **10) AUGIER H., (1977a). Les hormones des algues. Etat actuel des connoissances. IV. Role des hormones dans les divers metabolismes cellulaires et dans les macanismes de reproduction sexuee et asexuee; role ecologique. BOTANICA MARINA. 20:1-11

- **11) AUGIER H., (1977b). Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. V Index alphabetique des travaux de caracterisation des hormones endogenes. BOTANICA MARINA. 20:187-203
- **12) AUGIER H., (1977c). Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. VI. Index alphabetique par especes des travaux sur le role des hormones dans la vie des algues. BOTANICA MARINA. 20:363-379
- **13) AUGIER H., (1978). Les hormones des algues. Etat actuel des connaissances. Applications, conclusions, bibliographie. BOTANICA MARINA. 21:175-197
- **14) BARG R., UMIEL N., (1977). Effects of sugar concentration on growth, greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco. Z. PFLANZENPHYSIOL. 81:161-166
- **15) BARTON E.S., (1891). On the occurrence of galls in Rhodymenia palmata. BOTANY. 29:65-69
- **16) BARTON E.S., (1892). On malformations of Ascophyllum and Desmarestia. MURRAY'S PHYCOL. MEMOIRS. pp.21-24
- **17) BERLINER M.D., (1981). Protoplasts of eukaryotic algae. INTERNATIONAL REVIEW OF CYTOLOGY. 73:1-19
- **18) BINGHAM S.E., SCHIFF J.A., (1973). Conditions for attachment of single cells released from mechanically-disrupted thalli of Prasiola stiptata Suhr. BIOL. BULL. 145:425
- **19) BOLD H.C., WYNNE M.J., (1985). Introduction to the algae. Prentice Hall. Inc., New Jersey.
- **20) BORGESSEN F., (1972). Rhodophyceae. Part II. Cryptonemiales, Gigartinales and Rhodymeniales. En: Marine algae from the Canary Islands. Linneus Press, Amsterdam.
- **21) BOROWCZAK E, KENTZER T, POTULSKA-KLEIN B., (1977). Effect of gibberellin and Kinetin on the regeneration ability of Fucus vesiculosus L. BIOLOGIA PLANTARUM (PRAHA). 10(6):405-412
- **22) BRADLEY P.M., CHENEY D.P., (1986). Morphogenetic variation in tissue cultures of a red seaweed. PLANT

**23) BRADLEY P.M., CHENEY D.P., SAGA N., (1988). One step antibiotic disk method for obtaining axenic cultures of multicellular marine algae. PLANT CELL, TISSUE, AND ORGAN CULTURE. 12:55-60

**24) BRINKHUIS B.H., LEVINE H.G., ROWLAND R.G., COLLANTES G., (1986). Tissue culture of Laminaria saccharina. pp. 13. En: Abstract for the meeting of the Ame. Soc. of Limnol. and Oceanogr. Phycol. Soc. America.

**25) BROWN D.C., LEUNG D.W., THORPE T.A., (1979). Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. PHYSIOL. PLANTARUM. 46:36-41

**26) BROWN D.C., THORPE T.A., (1980). Changes in water potential and its component during shoot formation in tobacco callus. PHYSIOL. PLANTARUM. 49:83-87

**27) CASSELS A.C., (1979). The effect of 2,3,5-Triiodobenzoic acid in a callus cultures of tomato and Pelargonium. PHYSIOL. PLANTARUM. 46:159-169

**28) CATASTRO ALGOLOGICO DEL ARCHIPIELAGO CANARIO, (1982). TOMOS I-II. Dpto botánica Univ. La Laguna-Consellería de Agricultura y Pesca del Gobierno de Canarias.

**29) CHAPMAN V.J., CHAPMAN D.J., (1980). Seaweeds and their uses. Chapman and hall, London.

**30) CHEMIN E., (1931). Sur la presence de galles chez quelques floridees. BOTAN. TIDSKR. 51:315-325

**31) CHEMIN E., (1937). Role des bacteries dans la formation des galles. BOTAN. TIDSKR. 19:61-72

**32) CHEN L.C.M., TAYLOR A.R.A., (1978). Medullary tissue culture of the red alga Chondrus crispus. CAN. J. BOT. 56:883-886

**33) CHEN L.C.M., (1982). Callus-like formation from Irish moss. pp. 63-67 En: Biological Bulletin National Taiwan Normal University, Miu T.S. (edts). Biological Association, Taipei.

**34) CHEN L.C.M., (1986). Cell development of Porphyra miniata (Rhodophyceae) under axenic culture. BOTANICA MARINA 29:435-439

- **35) CHEN L.C.M., (1987).Protoplast morphogenesis of Porphyra leucosticta in culture BOTANICA MARINA 30:399-403
- **36) CHENEY D.P., MAR E., SAGA N., VAN DER MEER J., (1986).Protoplasts isolation and cell division in the agar-producing seaweed Gracilaria (Rodophyta). J.PHYCOL. 22:238-243
- **37) CLELAND R., (1971).Cell wall extension. ANN. REV. PLANT PHYSIOL. 22:197-222
- **38) COLE K., SHEATH R.G., (1980).Ultrastructural changes in major organelles during spermatial differentiation in Bangia (Rhodophyta). PROTOPLASMA. 102:253-279
- **39) COSSON J., (1975).Actio des conditions d'eclairiment sur la croissance des gametophytes de Laminaria digitata (L.) Lamouroux (Pheophyceae, Laminariales) SOC. PHYCOL. DE FRANCE 20:50-54
- **40) DAVISON I. A., REED R.H., (1985).The physiological significance of mannitol accumulation in brown algae: the role of mannitol as a compatible cytoplasmic solute. PHYCOLOGIA. 24:449-457
- **41) DEBERGH P., HARBAOUI Y., LENNEUR R., (1981).Mass propagation of globe artichoke (Cynara Scolymus) : evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. PHYSIOL. PLANTARUM. 53:181-187
- **42) DEBERGH P.C., (1983).Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. PHYSIOL. PLANTARUM. 59:270-276
- **43) DELIVOPOULUS S.G., TSEKOS I., (1985).Ultrastructure of the fusion cell in Gracilaria verrucosa (Huds) Papenfuss (Rhodophyta, Gigartinales). NEW PHYTOLOGY. 101:605-612
- **44) DIXON P.S., IRVINE L. M., (1977). Rhodophyta. Part I. Introduction, Nemaliales, Gigartinales. En:Seaweeds of the British Isles.British Museum, London.
- **45) DIXON P.S., (1973).cell structure and function. pp.38-44 En:Biology of the Rhodophyta,Oliver, Boyd. Edimburgo.

- **46) DOLLS J., ROBERT L., (1982).Quantitation of tissue culture procedures. pp. 149-161 En:Experiments in plant tissue culture.Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- **47) DOTY M.S., (1986).Biotechnological and economic approaches to industrial development based on marine algae in Indonesia. pp. 31-34. En:Workshop on marine algae biotechnology. Summary Report, Jakarta, Indonesia. Natinal Academic Press. Washington.
- **48) DRUEHL L.D., HSIAO S.I.C., (1969).Axenic culture of Laminariales in defined media. PHYCOLOGIA. 8(1):47-49
- **49) DRUEHL L.D., HSIAO S.I., (1971).Environmental control of gametogenesis in Laminaria saccharina I. The effect of light and culture media. CAN. J. BOT. 49:1503-1508
- **50) DUCKER S.C., KNOX R.B., (1984).Epiphytism at the cellular level with special reference to algal epiphytes 17:113-133 En:Encyclopedia of plant Physiology: Cellular interaction, Linsken H.F., Heslop-Harrison J.(edts). Springer-Verlag,Berlin.
- **51) EVANS D.A., BRAVO J.E., (1983).Protoplasts isolation and culture. pp.124-176 En:Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding,Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y.(edts).Macmillan Publ. Comp.,N.Y..
- **52) FAGERBERG W.R., DAWES C.J., (1976).Studies on Sargassum I.a light microscopic examination of the wound regeneration process in mature stipes of S.filipendula. AMER.J.BOT. 63(1):110-119
- **53) FAGERBERG W.R., DAWES C.J., (1977).Quantitative ultrastructural changes in differentiated stipe cells during wound regeneration and regrowth. PROTOPLASMA. 92:211-227
- **54) FANG T.C., (1984).Some genetic features revealed from culturing the haploid cells of kelps. HYDROBIOLOGIA. 116/7:317-318
- **55) FANG Z., CHI-SUN T., YU-LIN, CHIN-CHIN T., CHEN T.C., (1979).Some genetic observations on the monoploid breeding of Laminaria japonica. OCEANIC SELECTION. 2:1-10

**56) FELICINI G.P., PERRONE C., (1972). Sulla formazione di galle nella rigenerazione di Pterocladia capillacea (Gmel.) Born et Thor. in coltura. GIORN. BOT. ITAL. 106:351-358

**57) FELICINI G.P., PERRONE C., (1986). Une etude en lumiere polarisee sur le parcours des hyphes dans le thalle de Pterocladia capillacea (Gelidiacea, Rhodophyta). PHYCOLOGIA. 25:37-46

**58) FENICAL W., (1982). Natural products chemistry in the marine environment SCIENCE 215:923-927

**59) FILION-MYKLEBUST C., NORTON T.A., (1981). Epidermis shedding in the brown seaweed Ascophyllum nodosum (L.) Le Jolis, and its ecological significance. MARINE BIOLOGY LETTERS. 2:45-51

**60) FISHER D.D., GIBOR A., (1987). Production of protoplasts from the brown alga Sargassum muticum (Yendo) Fensholt (Phaeophyta). PHYCOLOGIA 26:488-495

**61) FLICK C.E., EVANS D.A., SHARP W.R., (1983). Organogenesis. pp.13-81, En: Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding., Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (edts). Macmillan Publ. Comp., N.Y..

**62) FLICK C.E., (1983). Isolation of mutants from cell culture. pp.393-441 En: Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding, Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (edts). Macmillan Publ. Comp., N.Y.

**63) FRIES L, IWASAKI H., (1976). P-hydroxyphenylacetic acid and other phenolic compounds as growth stimulators of the red alga Porphyra tenera. PLANT SCIENCE LETTERS. 6:299-307

**64) FRIES L, ABERG S., (1978). Morphogenetic effects of phenylacetic and p-OH-phenylacetic acid on the green alga Enteromorpha compressa (L.) Grev. in axenic culture. Z. PFLANZENPHYSIOL. 88:383-388

**65) FRIES L., (1959). Goniotrichum elegans: a marine red alga requiring vitamin B12. NATURE. 183:558-559

- **66) FRIES L., (1961). Vitamin requirements of Nemalion multifidum. EXPERIENTIA 17: 75.
- **67) FRIES L., (1963). On the cultivation of axenic red algae. PHYIOL. PLANTARUM. 16:695-708
- **68) FRIES.L., (1964). Polysiphonia urceolata in axenic culture. NATURE 202:110
- **69) FRIES.L., (1973). Requirements for organic substances in seaweeds. BOTANICA MARINA. 16:19-31
- **70) FRIES L., (1977). Growth regulating effects of phenylacetic acid and p-hydroxy-phenylacetic acid on Fucus spiralis L. (Phaeophyceae, Fucales) in axenic culture. PHYCOLOGIA. 16(4):451-455
- **71) FRIES L., (1980). Axenic tissue cultures from the sporophytes of Laminaria digitata and Laminaria hyperborea (Phaeophyta). J. PHYCOL. 16:475-477
- **72) FRIES.L., (1982a). Vanadium an essential element for some marine macroalgae. PLANTA. 154:393-396
- **73) FRIES.L., (1982b). Selenium stimulates growth of marine macroalgae in axenic culture. 18:328-331
- **74) FRIES L., (1984a). Induction of plantlets in axenically cultivated rhizoids of Fucus spiralis. CAN.J.BOT. 62:1616-1620
- **75) FRIES L., (1984b). D-vitamins and their precursors as growth regulators in axenically cultivated marine macroalgae. J. PHYCOL. 20:62-66
- **76) FRITSCH F.E., (1965). The structure and reproduction of the algae. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- **77) FUJITA Y., MIGITA S., (1985). Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. pp. 39-46 En: Bulletin of the Faculty of Fisheries. Nagasaki University, Nagasaki.
- **78) FULCHER R.G., MCCULLY M.E., (1969). Histological studies on the genus Fucus. IV. Regeneration and adventive embryony. CAN.J.BOT. 47:1643-1649
- **79) GABRIEL M.I., (1970). Formation, growth and regeneration of protoplasts of the green alga Uronema gigas.

**80) GALLAGHER S.B., HUMM H.J., (1983).Techniques of laboratory cultivation of marine algae. Gas research Institute, Florida.

**81) GEORGE E.F., SHERRINGTON P.D., (1984).Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Eversley.

**82) GIBOR, A., POLNE M., BINIAMINOV M., NEUSHUL M., (1982).Exploratory studies of vegetative propagation of marine algae: procedure for obtaining axenic tissues.pp. 587-593 En:Proceeding Xth International Seaweed Symposium.,Levring T.(edts).Walter de Gruyter Co,Berlin..

**83) GIBOR A., (1980).Studies on vegetative propagation of benthic marine algae. pp.152-156 En: ,Abott I.A., Foster M., Eklund L.F.(edts).Calif.Sea Grant Coll.Pro.,

**84) GIBSON M.T., WHITTON B.A., (1987).Hairs, Phosphate activity and environmental chemistry in Stigeoclonium, Chaetophora and Drapanaldia (Chaetophorales). BR. PHYCOLOGY J. 22:11-22

**85) GIL-RODRIGUEZ M.C., HAROUN-TABRAUE R., AFONSO-CARRILLO J., WILDPRET DE LA TORRE W., (1985). Adiciones al catálogo de algas marinas betónicas para el Archipiélago Canario II. VIERAEA 15: 101-112.

**86) GIL-RODRIGUEZ M.C., AFONSO-CARRILLO J., (1980). Catálogo de las algas marinas bentónicas para el Archipiélago Canario. Yuste L. (edt). Aula de Cultura de Tenerife, Sta Cruz de Tenerife.

**87) GOLDSTEIN M.E., (1973).Regeneration and vegetative propagation of the agarophyte Gracilaria debilis (Forsskal) Borgesen (rhodophyceae). BOTANICA MARINA. 16:226-228

**88) HABIG C., RYTHER J.H., (1983). Methane production from the anaerobic digestion of some marine macrophytes. RESOURCES AND CONSERVATION 8:271-279

**89) HU C.Y., WANG P.J., (1983).Meristem shoot tip, and bud culture. pp. 177-227 En:Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding,Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y.(edts).Macmillan Publ. Comp.,N.Y..

- **90) INNES D.J., (1984). Genetic differentiation among populations of marine algae. HELGOLANDER MEERSUNTERS. 38:401-417
- **91) IRVINE L., (1983). Rhodophyta. Part IIa. Cryptonemiales (sensu stricto), Palmariales, Rhodymeniales. En: Seaweeds of the British Isles. British Museum, London.
- **92) JACOBS W.P., FALKENSTEIN K., HAMILTON R.H., (1985). IAA from extracts of Caulerpa paspaloides (Siphonales). PLANT PHYSIOLOGY. 78:844-848
- **93) JACOBS W.P., OLSON J., (1980). Developmental changes in the algal coenocyte Caulerpa prolifera (siphonales) after inversion with respect to gravity. ANN. J. BOT. 67(2):141-146
- **94) JACOBS W., DAVIS W., (1983). Effects of gibberellic acid on the rhizome and rhizoids of the algal coenocyte, Caulerpa prolifera in culture. ANN. BOTANY. 52:39-41
- **95) KAMILLA N., KURODA K., (1957). Cell operation in Nitella. 1. Cell amputation and effusion of the endoplasm. PROC. JAPAN. ACAD. 33:149-195
- **96) KAPRAUN D., (1987). Marine biologist clones seaweeds cells. GENETIC ENGINEERING NEWS 17: 42-43.
- **97) KARP A., BRIGHT W.J., (1985). On the causes and origins of the somaclonal variation. pp. 199-234 En: Plant molecular and cell biology, Mifflin B.J. (edts). Oxford University Press, Oxford.
- **98) KASKA D.D., POLNE-FULLER M., GIBOR A., (1988). Developmental studies in Porphyra (Bangioephyceae). II. Characterization of the major lectin binding glycoproteins in differentiated regions of the Porphyra perforata thallus. J. PHYCOLOGY. 24:102-107
- **99) KAUSS H., (1967). Metabolism of isofloridoside (o-D-galacopyranosyl (1-1) Glycerol and osmotic balance in the fresh water alga Ochromonas malha mensis. NATURE. 214:1129-1130
- **100) KAUSS H., (1967b). Isofloridoside und osmoregulation bei Ochromonas malhamensis. Z. PFLANZENPHYSIOL. 56:453-465

- **101) KENTZER T., BOROWZAK E., SZCZEPKOWSKA E., (1975). On the cultivation and growth regulators of some multicellular red and brown algae. POL. ARCH. HYDROBIOL. 22(3):413-427
- **102) KENTZER T., SYNAC R., BURKIEWICZ K., BANAS A., (1980). Cytokinin-like activity in sea water and Fucus vesiculosus L. BIOLOGIA PLANTARUM(PRAHA). 22(3):218-225
- **103) KHAN M., (1983). Algae today. Bishen Sun. Mah. Pal. Sin, Dehra Dun.
- **104) KIRST G.O., BISSON M.A., (1979). Regulation of turgor pressure in marine algae: ions and low molecular-weight organic compounds J. PLANT PHYSIOLOGY. 6:539-556
- **105) KOHLMAYER J., DEMOULIN V., (1981). Parasitic and symbiotic fungi on the marine algae. BOTANICA MARINA. 24:9-18
- **106) KREMER B.P., (1978). Patterns of photoassimilatory products in pacific Rhodophyceae. CAN.J.BOT. 56:1655-1659
- **107) KREMER B.P., (1979). Photoassimilatory products and osmoregulation in marine Rhodophyceae. Z. PFLANZEN-PHYSIOL. 93:139-147
- **108) KURTZ S.M., LINEBERGER D.R., (1983). Genotypic differences in morphogenetic capacity of cultured leaf explants of tomato. J. AMER. SOC. HORT. SCIENCE. 108:710-714
- **109) LANGHE (DE) E., BRUIJNE (DE) E., (1976). Continuous propagation of tomato plants by means of callus cultures. SCI. HORTICULTURAE. 4:221-227
- **110) LARPENT-GOURGAUD M., AUMAITRE M.P., (1987). Production et regeneration de protoplastes chez Draparnaldia mutabilis (Chaetophorales, Chlorophyta). CRYPTOLOGIE ALGOLOGIE 8(2):101-106
- **111) LAWSON G.W., JOHN D.M., (1982). The Marine Algae and coastal environment of tropical West Africa. Cramer J.(edts). Nova Hedwigia, .
- **112) LEE T.F., (1985). Aposporous gametophyte formation in stipe explants from Laminaria saccharina (Phaeophyta). BOTANICA MARINA. 28:179-185

- **113) LEE T., (1986). Callus development from Laminaria saccharina sporophytes derived from gametophytes of aposporous origin. pp. 75 En: Abstract for the Meeting of the American Soc. Limnol. and Oceanogr. Phycol. Soc. America.
- **114) LEWIN J., (1966). Silicon metabolism in Diatoms. V. germanium dioxide, a specific inhibitor of Diatom growth. PHYCOLOGIA. 6(1):1-12
- **115) LITTLER M.M., ARNOLD K.E., (1980). Sources of variability in macroalgal primary productivity and interpretative problems. AQUATIC BOTANY 8:141-156
- **116) LIU W.S., TANG Y.L., LIU X.W., FANG T.C., (1984). Studies on the preparation and on the properties of sea snail enzymes. HYDROBIOLOGIA. 116/7:319-320
- **117) LIU X-W., GORDON M.E., (1987). Tissue and cell culture of New Zealand Pterocladia and Porphyra species HYDROBIOLOGIA 151/2:147-154
- **118) LOBBAN C.S., HARRISON P.J., DUNCAN M.J., (1985). The physiological ecology of the seaweeds. Cambridge Uni. Press, N.Y.
- **119) LUNNING K., DRING M.J., (1975). Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of Laminaria saccharina grown in blue and red light. MARINE BIOLOGY. 29:195-200
- **120) LUNNING K., (1981a). Light. pp. 326-355 En: The biology of seaweeds, Lobban C.S., Wynne M.J. (eds). Blackwell, Oxford.
- **121) LUNNING K., (1981b). Egg release in gametophytes of Laminaria saccharina: Induction by darkness and inhibition by light and U.V. BR. PHYCOLOGY J. 16:379-393
- **122) MANTELL S.H., SMITH H., (1983). Plant biotechnology. Cambridge Uni. Press, Cambridge.
- **123) MARKHAM J.W., KREMER B.P., SPERLING K.R., (1980). Effects of cadmium on Laminaria saccharina in culture. MAR. ECOL. PROGRESS SERIES. 3:31-39
- **124) MARTIN E.L., BENSON R.L., (1982). Algal viruses, pathogenic bacteria and fungi: Introduction and biblio-

graphy. pp. 793-798 En:Selected Topics in Phycology., Rosowsky I.R., Tauber B.C.(eds).

**125) MARUYAMA A, MAEDA M, SIMIDU U., (1986).Ocurrence of plant hormone (cytokinin)-producing bacteria in the sea. APPLIED BACTERIOLOGY. 61:569-574

**126) MATILSKY M.B., JACOBS W.P., (1983a).Accumulation of amyloplasts on the botton of normal and inverted rhizome tips of Caulerpa prolifera(Forsskal) lamouroux. PLANTA. 159:189-192

**127) MATILSKY M.B., JACOBS W.P., (1983b).Regeneration in the coenocytic marine alga, Caulerpa, with respect to gravity. AMER. J. BOT. 70(4):635-638

**128) MCBRIDE D.L., KUGRENS P., WEST J.A., (1974).Light and electron microscopic observations on red algal galls. PROTOPLASMA 79:249-264

**129) MCLACHLAN J., (1973).Growth Media-Marine. pp. 25-52 En:Phycological methods.Culture methods and growth measurements, Stein J.R.(eds).Cambridge Univ. Press,Cambridge.

**130) MCLACHLAN J., (1977).Effects of nutrient on growth and development of embryos of Fucus eden tatus Pyl. (Phaeophyceae, Fucales). PHYCOLOGIA 16:329-338

**131) MCLACHLAN J., (1985).Macroalgae(seaweeds): industrial resources and their utilization. PLANT AND SOIL. 89:137-157

**132) MEROLA A, (1956).Le galle nelle algehe. ANNALI DI BOTANICA. 25:260-281

**133) MILLNER P.A., CALLOW M.E., EVANS L.V., (1979).Preparation of protoplasts from the green alga Enteromorpha intestinalis (L.) Link. PLANTA 147:174-177

**134) MISAWA M., (1977).Production of natural substances by plant cell cultures described in japanese patents. pp.15-26 En:Plant tissue culture and its biotechnological applications, Barzw, Reinhard E., Zenk M.H. (eds).Springer-Verlag, Berlin.

**135) MOONEY P.A., VAN STADEN J., (1984).In vitro plantlet formation and multiple shoot induction in Sargassum heterophyllum. SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY.

51:41-44

**136) MOONEY P.A., VAN STADEN J., (1987). Tentative identification of cytokinins in Sargassum hetero phyllum (phaeophyceae). BOTANICA MARINA. 30:323-325

**137) MOTOMURA T, SAKAI Y., (1981). Efect of chelated iron culture media on oogenesis in Laminaria angustata. 47(12:1535-1540

**138) MURASHIGE T, SKOOG F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. PHYSIOL. PLANTARUM. 15:473-497

**139) MURASHIGE T., (1974). Plant propagation through tissue cultures. ANN. REV. PLANT PHYSIOLOGY. 25:135-166

**140) NEUSHUL M., (1983). Marine algal tissue culture. Gas Research Institute, Chicago.

**141) NICHOLS W.H., (1980). Polyploidy in algae pp.151-161. En: Polyploidy. Biological relevance, Lewis W.H. (edts). Plenum Press, N.Y..

**142) OATES B.R., COLE K.M., (1978). Ultrastructure and ontogeny of hair filaments in the subtidal saccate alga Hydroclathrus clathratus (Phaeophyta, Scytosiphonales). CAN. J. BOT. 65:1687-1693

**143) OHIWA T., (1977). Preparation and culture of Spirogyra and Zygnema protoplasts. CELL STRUCTURE AND FUNCTION. 2:249-255.

**144) OHIWA T., (1978). Behavior of cultured products from Zygnema and Spirogyra protoplasts. PROTOPLASMA 97:185-200

**145) OHIWA T., (1981). Intergeneric fusion of Zygnemataceae protoplasts. BOT. MAG. TOKYO. 94:261-271

**146) OKAZAKI A., (1971). Seaweeds and their uses in Japan. Tokai Univ. Press, .

**147) PEDERSEN M., (1968). Ectocarpus fasciculatus: marine brown alga requiring Kinetin. NATURE. 218:776

**148) POLNE M., GIBOR A., NEUSHUL M., (1980). The use of ultrasound for the removal of macro-algal epiphytes. BOTANICA MARINA 23:731-734

- **149) POLNE-FULLER M., BINIAMINOV M., GIBOR A., (1984).Vegetative propagation of Porphyra perforata. HYDROBIOLOGIA 116/7:308-313
- **150) POLNE-FULLER M., SAGA N., GIBOR A., (1986).Algal cells, callus, and tissue cultures and selection of algal strains. BEIHEFTE ZUR NOVA HEDWIGIA 83:30-36
- **151) POLNE-FULLER M., GIBOR A., (1984).Developmental studies in Porphyra. I. Blade differentiation in Porphyra perforata as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. J. PHYCOL. 20:609-616
- **152) POLNE-FULLER M., GIBOR A., (1987).Callus and callus-like growth in seaweeds :induction and culture. HYDROBIOLOGIA 151/2:131-138
- **153) PRENTIS S., (1985).Biotechnology: A new industrial revolution. Orbis Publishing Ltd.,London..
- **154) PROVASOLI L., CARLUCCI A.F., (1974).Vitamins and growth regulators. pp. 741-787 En:Algal Physiology and biochemistry.,Steward W.D.P.(edts).Botanical Monographs,
- **155) PROVASOLI L, PINTNER J., (1980).Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of Ulva lactuca (Chlorophyceae). 16:196-201
- **156) PROVASOLI L., (1968).Media and prospects for the cultivation of marine algae. pp. 63-75 . En: Cultures and collections of algae. Watanabe A., Hattori A. (edts). Jap. Soc. Plant Physiol.
- **157) PUESCHEL C.M., (1979).Ultrastucture of tetrasporogenesis in Palmaria palmata (Rhodophyta) J.PHYCOLOGY. 15:409-424
- **158) RAMUS J., (1972).Differentiation of the green alga Codium fragile. AMER.J.BOT. 59(5):478-482
- **159) REED R.H., COLLINS J.C., RUSELL G., (1980). Effects of salinity upon the galactosyl-glycerol content and concentration of the marine red alga Porphyra purpurea. J.EXP.BOTANY. 31:1539-1554
- **160) REED R.H., (1985).Osmoacclimatation in Bangia atropurpurea (Rhodophyta, Bangiales): the osmotic role of floridoside. BR.PHYCOLOGY. J. 20:211-218

- **161) ROBINSON J.M., RHEINHEIMER G., (1985). Comparison of bacterial population from the Kiel Fjord in relation to the presence or absence of benthic vegetation. BOTANICA MARINA. 28:29-39
- **162) ROSS M.K., THORPE T.A., (1973). Physiological gradients and shoot initiation in tobacco callus cultures. PHYSIOL. PLANTARUM. 27:365-369
- **163) SAGA N., UCHIDA T., SAKAI Y., (1978). Clone Laminaria from single isolated cell. BULL. JAPANESE SOC. SCI. FISH. 44:87
- **164) SAGA N., MOTOMURA T., SAKAI Y., (1982). Induction of callus from the marine brown alga Dictyosiphon foeniculaceus. PLANT AND CELL PHYSIOLOGY. 23:727-730
- **165) SAGA N., POLNE-FULLER M., GIBOR A., (1986). Protoplasts from seaweeds: Production and fusion. BEIHEFTE ZUR NOVA HEDWIGIA 83:37-43
- **166) SAGA N., SAKAI Y., (1982). A new method for pure culture of macroscopic algae, the one step selection method. JAPAN J. PHYCOL. 30:40-43
- **167) SAGA N., SAKAI Y., (1983). Axenic tissue culture and callus formation of the marine brown alga Laminaria angustata. BULL. JAPANESE SOC. SCI. FISH. 49:1561-1563
- **168) SAGA N., SAKAI Y., (1984). Isolation of protoplasts from Laminaria and Porphyra. BULL. JAPANESE SOC. OF SCIEN. FISH. 50(6):1085
- **169) SAGA N., (1984). Isolation of protoplasts from edible seaweeds. BOT. MAG. TOKYO. 97:423-427
- **170) SCHATZ S., (1980). Degradation of Laminaria saccharina by higher fungi: a preliminary report. BOTANICA MARINA. 13:617-622
- **171) SCHIFF J.A., QUATRANO R.S., HARRIS G.C., LEGG M., STALEY J., (1977). Development of single cell from mechanically-disrupted thalli of Prasiola stipitata. BIOL. BULL. 143:476
- **172) SCHMITZ F., (1892). Knollchenartige auswuchse an den sprossen einiger florideen. BOTANIK TIDSKRIFTER. 50:624-630

- **173) SCOWCROFT W.R., LARKIN P.J., (1982). Somaclonal variation: A new option for plant improvement. En: Plant improvement and somatic cell genetics., (eds). Academic Press, N.Y..
- **174) SHAEFTER W., (1983). Usage of vertebrate, invertebrate and plant cell tissue and organ culture terminology. TCA REPORT. 47(4):19-23
- **175) SHOW I.T., (1981). Marine plants. pp.471-498 En: Handbook of biosolar resources, Zaborsky O.R., McClure T.A., Lipinsky E.S. (eds). CRC Press Inc., Florida.
- **176) SIEBURTH J., TOOTLE J., (1981). Seasonality of microbial fouling on *Ascophyllum nodosum* (L.) Lejol., *Fucus vesiculosus* L., *Polysiphonia lanosa* (L.) Tandy and *Chondrus crispus* Stackh PHYCOLOGIA 17:57-64
- **177) STEIN J.R., BORDEN C.A., (1984). Causative and beneficial algae in human disease conditions: a review PHYCOLOGIA 23(4):485-501
- **178) STEIN J.R., (1973). Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- **179) STEWARD F.C., (1983). Reflections on aseptic culture pp. 1-10 En: Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding, Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (eds). Macmillan Publ. Comp., N.Y..
- **180) TATEWAKI.M, PRAVASOLI.L., (1977). Phylogenetic affinities in *Monostroma* and related genera in axenic culture. J.PHYCOLOGY. 13:67
- ** 181) THOMAS E., DARVEY M.R., (1975). From single cells to plants .En: The Wykeham Science Series, Mott N., Noakes G.R., Yapp W.B. (eds). Wykeham Publications Ltd., London.
- **182) THORPE T.A., RICHARD W.J., LEUNG D.W., (1986). Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. PHYSIOL. PLANTARUM. 66:58-62
- **183) THORPE T.A., MURASHIGE T., (1970). Some histological changes underlying shoot initiation in tobacco cultures. SCIENCE. 160:421-422
- **184) THORPE T.A., MEIER D.D., (1972). Starch metabo-

lism, respiration and shoot formation in tobacco callus cultures. *PHYSIOL. PLANTARUM*. 27:365-369

**185) THORPE T.A., (1974). Carbohydrate availability and shoot formation in tobacco callus cultures. *IBID.* 30:77-81

**186) TOKIDA J., (1958). A review on galls in seaweed. *BULL. JAPAN. SOC. PHYCOL.* :93-99

**187) TSEKOS I., (1982a). Tumour-like growths induced by bacteria in the thallus of a red alga, Gigartina tedii (Roth) Lamour. *ANN. BOT.* 49:123-126

**188) TSEKOS I., (1982b). Plastid development and floridean starch grain formation during carposporogenesis in the red algae Gigartina teedii. *CRYPTOGAMIE: ALGOLOGIE* 3(2):91-103

**189) TUCKER J.B., (1985). Biotechnology goes to sea. *HIGH TECHNOLOGY* :34-44

**190) VAN DER MEER J.P., TODD E.R., (1977). Genetics of Gracilaria sp (Rhodophyceae, Gigartinales) IV. Mitotic recombination and its relationship to mixed phases in the live history. *CAN. J. BOT.* 55:2810-2817

**191) VAN DER MEER J.P., (1986). Genetic contribution to research on seaweed. pp. 1-38 En: *Progress in phycological research*, Roud, Chapman. (eds). Biopress Ltd., .

**192) VIERA-RODRIGUEZ M.A., AUDIFRED P.A.J., GIL-RODRIGUEZ M.C., PRUDHOMME VAN REINE, AFONSO-CARRILLO J., (1987). Adiciones al catálogo de algas marinas bentónicas para el Archipiélago Canario III. *VIERAEA* 17: 227-235.

**193) WAALAND S.D., CLELAND R.E., (1974). Cell repair through cell fusion in the red alga Griffithsia pacifica. *PROTOPLASMA*. 79:185-196

**194) WAALAND S.D., WATSON B.A., (1980). Isolation of a cell-fusion hormone from Griffithsia pacifica Kylin, a red alga. *PLANTA* 149:493-497

**195) WAALAND S.D., (1975). Evidence for specie-specific cell fusion hormone in red algae. *PROTOPLASMA*. 86:253-261

- **196) WATSON B.A., WAALAND S.D., (1983). Partial purification and characterization of a glycoprotein cell fusion hormone from Giffitshia pacifica, a red alga. PLANT PHYSIOL. 71:327-332
- **197) WEAST R.C., ASTLE M.J., (1981). Handbook of chemistry and physics. CRC Press, Florida.
- **198) WHEELER A.E, COX E.R, IRGOLIC K.J, BOTTINO N.R, LEWIS G.H, ZINGARO R.A., (1980). The effect of selenium on the growth of six unicellular marine algae. PHYCOLOGY. 16:173
- **199) WHYTE J.N.C., ENGLAR J.R. HOSFORD S.P.C., (1984). Factors affecting profile evaluation of agar gels. BOTANICA MARINA 27: 63-69.
- **200) WILCOX A., (1979). Prospects for farming the open ocean. pp. 235-259 En: The biosaline concept. An approach to the utilization of under exploited resources., Hollander, Aller, Epstein, San pietro, Zaborsky (eds). Plenum Press, London.
- **201) WOOLERY M.L., LEWIN R.A., (1973). Influence of iodine on growth and development of the brown alga Ectocarpus siliculo sus in axenic culture. PHYCOLOGIA 12:131-138
- **202) YEOMAN M.M., FORCHE E., (1980). Cell proliferation and growth in callus cultures. pp. 1-21 En: International Review of Cytology. Perspectives in plant cell and tissue culture., Vasil I.K. (eds). Academic Press, N.Y..
- **203) ZHAO H., ZHAN X., (1981). Isolation and cultivation of the vegetative cells of Porphyra. J. SHANGDONG COLL. OCEAN. 2:61-66
- **204) ZIMMERMANN U., (1978). Physics of turgor and osmoregulation. ANN.REV.PLANT PHYSIOLOGY. 29:121-148
- **205) ZIMMERMANN U., STEUDLE E., (1978). Physical aspects of water relations of plant cells. ADV. BOTANICAL RESEARCH. 6:45-117
- **206) ZUO-MEI Y., (1984). Studies on tissue culture of Laminaria japonica and Undaria pinnatifida. HYDROBIOLOGIA 116/7:314-316