

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE G.C.

DPTO. DE BIOLOGIA

**METODOLOGIA DEL AISLAMIENTO
DE PROTOPLASTOS
DE MACROALGAS MARINAS**

JUAN LUIS GOMEZ PINCHETTI

1993

Memoria que presenta el Lcdo. Juan Luis Gómez Pinchetti en el Dpto.
de Biología de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria para la
obtención de la Suficiencia Investigadora.

Las Palmas de G.C., Mayo de 1993

Indice

1.- INTRODUCCION	1
2.- METODOLOGIA DEL AISLAMIENTO	8
2.1.-Factores que afectan la producción de protoplastos	8
2.1.1.-Enzimas degradadores de la pared celular	8
2.1.2.-Material vegetal de partida	10
2.1.3.-Condiciones de incubación	11
Temperatura y pH	11
Cationes	11
Osmolalidad	12
2.2.-Material y métodos	13
2.2.1.-Preparación del tejido	13
2.2.2.-Tratamiento con ultrasonidos	13
2.2.3.-Pre-plasmolisis	14
2.2.4.-Pre-plasmolisis + agentes quelantes	15
2.2.5.-Incubación en la solución enzimática	15
2.2.6.-Purificación de los protoplastos	15
2.2.7.-Viabilidad y regeneración de la pared celular	16
2.2.8.-Cultivo de protoplastos	17
3.- REFERENCIAS	17

1.- INTRODUCCION

Dentro de las técnicas biotecnológicas aplicadas más frecuentemente en plantas, es el aislamiento de protoplastos una de las preferidas por la cantidad de aplicaciones potenciales que conlleva. La palabra *protoplasto* define a la célula vegetal de la cual la pared celular ha sido separada por métodos físicos o enzimáticos (Cocking 1972). Aunque la obtención de protoplastos por métodos mecánicos ha sido descrita en varias ocasiones, el método preferido para el aislamiento de gran cantidad de protoplastos es la degradación enzimática de la pared celular, desde que Cocking (1960) utilizó un hongo del que obtuvo un extracto crudo que contenía celulasa, para preparar protoplastos de tomate. Desde entonces los protoplastos se han convertido en poderosas herramientas en estudios de fisiología, bioquímica y, más recientemente, en biología molecular e ingeniería genética.

En principio, no hay razón para que las técnicas tantas veces aplicadas en plantas superiores no pudieran ser aplicadas con éxito en macroalgas. Sin embargo, la gran complejidad de las paredes celulares de ciertas macroalgas, curiosamente las de mayor interés comercial, ha dado como resultado el que estas técnicas hayan sido desarrolladas con éxito muy recientemente, con lo cual el vagaje en este área es muy limitado. La digestión ineficaz de las paredes celulares de macroalgas anatómicamente complejas (principalmente de las divisiones Phaeophyta y Rhodophyta) es normalmente debida no sólo a cambios en la constitución celular (y consecuentemente en la producción de protoplastos) con relación a su edad, historia de vida, estado fisiológico y condiciones de cultivo (Kloareg y Quatrano 1988, Björk et al. 1990), como lo es en plantas superiores (Evans y Bravo 1984, Eriksson 1985), sino también a la ausencia de enzimas degradadores de la pared celular suficientemente eficaces. Los métodos para el aislamiento de protoplastos de macroalgas marinas envuelven la extracción, purificación y evaluación de nuevos enzimas,

y también el desarrollo de técnicas para la modificación de los enlaces entre los polímeros que conforman la pared celular (Butler et al. 1990).

El primer artículo que describía la obtención de protoplastos de macroalgas marinas fue publicado por Millner et al. (1979) con el alga verde *Enteromorpha intestinalis*. Desde entonces, nuevos géneros de algas verdes y varios géneros de algas pardas y rojas han sido añadidos a la lista (Tabla 1). Los esfuerzos que se están realizando en este campo de la *Ficotecnología* son grandes y los resultados mejoran gradualmente. Con el avance en el desarrollo de estas técnicas en macroalgas, recientemente se ha incrementado el número de trabajos que describen logros más específicos con la utilización de protoplastos, como son: la regeneración de planta completa (Araki et al. 1987, Chen 1987, Ducreaux y Kloareg 1988, Reddy et al. 1989, Saga y Kudo 1989, Polne-Fuller y Gibor 1990, Waaland et al. 1990), el desarrollo de los procesos de fusión (Saga et al. 1986, Fujita y Saito 1990, Saito y Fujita 1991, Mizukami et al. 1992), la caracterización de proteínas (Amano y Noda 1992) o la determinación de la concentración de oxígeno intracelular (Matsue et al. 1992).

En esta Memoria se describe la metodología para la obtención de gran número de protoplastos de macroalgas marinas por métodos enzimáticos y los factores que pueden afectar en mayor o menor medida el éxito de la aplicación de estas técnicas, siempre teniendo en cuenta que "cuando estamos observando un protoplasto, estamos observando una de las unidades intactas más frágiles de la Naturaleza, y un poderoso sistema experimental para la realización de estudios ficológicos tanto básicos como aplicados" (Coury et al. 1991).

Especie	Pre-	Enzimas	Osmot	pH	T (°C)	t(h)	Rend (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
CHLOROPHYTA									
<i>E. intestinalis</i>	-	4% Driselasa + 0.4% Pectinasa	Sorbitol	6.0	10-12	12-17	?	85-90	Millner et al. 1979
<i>U. linza</i> <i>M. angicava</i>	+ +	4% Celulasa R10 + 2% Pectoliasa	Glucosa	?	?	?	?	73+	Zhang 1983
<i>E. linza</i> <i>M. zostericola</i> <i>U. pertusa</i>	- - -	2% Celulasa R10	Manitol	6.0	20-25	1	> 10 ⁶ 5.0 x 10 ⁶ > 10 ⁴	> 80	Saga 1984
<i>E. linza</i> <i>M. nitidum</i> <i>U. pertusa</i>	- - -	10% Celulasa R10 5% Celulasa R10 10% Celulasa R10	Manitol	5.0	18-20	4 2 4	10 ⁵ -10 ⁶ (0.2 g ⁻¹)	> 45 > 90 > 41	Fugita y Migita 1985
<i>E. intestinalis</i>	-	2% Celulasa R10	Sorbitol	6.0	20	4	4.0 x 10 ⁵	?	Saga et al. 1986
<i>E. intestinalis</i> <i>U. angustata</i>	- -	3% Celulasa RS + 1% Macerozima	?	?	?	1-2	?	?	Polne-Fuller y Gibor 1987
<i>U. pertusa</i> <i>U. fasciata</i> <i>U. conglobata</i>	- - -	<i>Haliotis</i> (EC) + 5% Celulasa R10	Manitol	6.0	20	2.5-4	1.5-6.0 x 10 ⁶	64-99	Reddy et al. 1989
<i>U. pertusa</i>	+	2% Celulasa R10 + 2% Macerozima + 2% Driselasa	Manitol	5.8	20-23	2-3	4.8 x 10 ⁶	90	Fujimura et al. 1989

Especie	Pre-	Enzimas	Osmot	pH	T (°C)	t(h)	Rend (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
<i>M. angicava</i>	+	5% Celulasa R10	Manitol	6.0	5-25	1-10	4.0-5.0 x 10 ⁶	> 80+	Saga y Kudo 1989
<i>E. linza</i>	-	2% Turbo (EC) +	Manitol	6.0	20	3	1.0-3.7 x 10 ⁷	85-90+	Reddy y Fujita 1991
<i>E. compressa</i>	-	3% Celulasa RS				1.0-3.2 x 10 ⁷			
<i>E. prolifera</i>	-					0.2-2.0 x 10 ⁷			
PHAEOPHYTA									
<i>L. japonica</i>	-	<i>S. intermedius</i> (EC)	Manitol	7.0	?	Var	10 ³	< 10	Saga y Sakai 1984
<i>M. pyrifer</i>	-	<i>Haliotis</i> (EC) +	Sorbitol	6.0	20-25	10	2.0 x 10 ⁴	?	Saga et al. 1986
<i>S. muticum</i>	-	1% Macerozima + 1% Pectinasa							
<i>D. dichotoma</i>	+	<i>Haliotis</i> (EC), <i>Batillus</i> (EC), <i>Crassostrea</i> (EC) + 2% Celulasa R10 + 2% Macerozima + 2% Driselasa + 2% Hemicelulasa + 1% Pectoliasa	Manitol	6.0	20-23	3-4	6.1 x 10 ⁶	70-80	Kajiwara et al. 1988
<i>D. prolifera</i>	+						6.1 x 10 ⁶		
<i>D. undulata</i>	+						8.2 x 10 ⁶		
<i>F. distichus</i> (zigotos)	-	1.2-2% Celulasa + 6-10U Alginato liasas <i>Haliotis</i> y <i>Aplysia</i> (EC)	Sucrosa	5.8 7.8	25	8-14 6	>95% cel >95% cel	? ?	Kloareg y Quatrano 1987

Especie	Pre-	Enzimas	Osmot	pH	T (°C)	t(h)	Rend (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
RHODOPHYTA									
<i>P. suborbiculata</i>	-	Turbo (EC) + 2% Celulasa	Glucosa	6.5	32	?	?	?	Tang 1982
<i>P. yezoensis</i>	-	<i>S. intermedius</i> (EC)	Manitol	7.0	?	Var	0.3-1.0 x 10 ⁶	< 10	Saga y Sakai 1984
<i>P. perforata</i>	-	<i>Haliotis</i> spp (EC)	Sorbitol	6.0	20-25	5-10	?	80	Polne Fuller y Gibor 1984
<i>G. tikvahiae</i>	-	2% Celulasa R10	Manitol	5.0	26	2-2.5	0.8-4.2 x 10 ⁵	31	Cheney et al. 1986
<i>G. lemaneiformis</i>	-	+ 3% Macerozima + 1% Agarasa + 0.5% Pectoliasa							
<i>P. leucosticta</i>	-	<i>Littorina</i> (EC) + 1.5% Celulasa R10 + 0.5% Pectinasa	Sorbitol	7.0	15	1	10 ⁴	?	Chen 1987
<i>C. crispus</i>	+	<i>Pseudomonas</i> (EC)+ 1% Celulasa	NaCl	7.0	16	12-18	1.0-8.5 x 10 ⁸	> 90	LeGall et al. 1990
<i>G. corymbifera</i>	-	5U carragenasa	Manitol	7.0	20	2-4	1.5-2.0 x 10 ⁷	> 95	Gross 1990
<i>G. exasperata</i>	-	<i>Pseudomonas</i> +					5.0 x 10 ⁶		
<i>G. harveyana</i>	-	2% Celulasa + 2% Macerozima + 0.2% Pectoliasa					1.0 x 10 ⁶		

Especie	Pre-	Enzimas	Osmot	pH	T (°C)	t(h)	Rend (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
<i>S. muticum</i>	-	2% Celulasa RS + 10% "LAP" (EC)	Sorbitol	6.0	?	24	?	?	Fisher y Gibor 1988
<i>Sphacelaria</i> spp.	-	2% Celulisin + 0.5% Pectoliasa + 0.2% AL (EC)	Manitol	5.8	20	12	260-4600	?	Ducreaux y Kloareg 1988
<i>U. pinnatifida</i>	-	<i>Aplysia</i> (EC) o <i>Haliotis</i> sp (EC)	Manitol	6.2	25	1-1.5	1.5-4.0x 10 ⁵	?	Tokuda y Kawas- hima 1988
<i>M. pyrifera</i>	+	2% Celulasa + 30U AL (EC)	Sorbitol	6.5	22	2-3	10 ⁷ - 10 ⁸	21-76	Kloareg et al. 1989
<i>L. saccharina</i> <i>L. digitata</i>	+ +	2% Celulasa + Alginato liasas (<i>Haliotis</i> 0.5-5U y <i>Pseudomonas</i> 1-2U) (EC)	NaCl	6.5	16	3-8	10 ⁷ - 10 ⁸	>80	Butler et al. 1989
<i>P. littoralis</i>	+	2% Celulasa R10 + 1% Macerozima + 2% Alginato liasa de <i>Aplysia</i> (EC)	Manitol	6.0	12	18	2.0x10 ³ - 9.3x10 ⁵	0-57	Mejjad et al. 1992

Especie	Pre-	Enzimas	Osmot	pH	T (°C)	t(h)	Rend (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
<i>G. lemaneiformis</i> <i>G. sordida</i> <i>G. verrucosa</i> <i>G. tenuistipitata</i>	- - - -	2% Celulisin + 0.01% Agarasa	Manitol	5.8	25	1-4	10 ⁵ - 10 ⁷	?	Björk et al. 1990
<i>P. nereocystis</i>	-	10% Papaína y 2% <i>Haliotis</i> sp (EC)	Manitol	6.0	10	2	0.2-0.3 x 10 ⁶	?+	Waland et al. 1990
<i>C. ocellatus</i>	-	8% <i>Haliotis</i> sp(EC) + 3% Celulasa	Sorbitol	6.0	15	?	10 ⁶	?+	Zhang 1991
<i>P. palmata</i>	+	0.1-0.2% <i>Haliotis</i> (EC) + 3% Celu- lase R10	Manitol	6.0	21	1-1.5	4.0 - 6.0 x 10 ⁷	70 15-20 +	Liu et al. 1992

Tabla 1. Tabla resumen de algunas de las condiciones físicas del aislamiento, rendimiento y viabilidad de los protoplastos obtenidos de macroalgas de las Divisiones Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta. EC= Extracto Crudo. Pre-= Pre-tratamiento previo a la digestión (esterilización, pre-plasmolisis, etc.); Osmot= Agente osmótico; T= Temperatura de incubación; t= Tiempo de incubación; Rend= Rendimiento; Viab= Viabilidad (+ = Regeneración o División celular). "LAP" = Extracto en acetona de *Patella* sp. Para más información ver Butler 1989, García-Reina et al. 1991, Björk 1992.

2.- METODOLOGIA DEL AISLAMIENTO

2.1.- Factores que afectan la producción de protoplastos

2.1.1.- Enzimas degradadores de la pared celular

Con el ánimo de degradar completamente la pared celular, es necesario combinar enzimas que degraden tanto los componentes del esqueleto como los de la matriz. Las celulasas comerciales parecen degradar la celulosa algal con gran efectividad. Sin embargo, las preparaciones de celulasas difieren en sus proporciones relativas y también contienen un amplio espectro de otros enzimas degradadores de la pared como xilanasas, mananasas y glucanasas (Butler et al. 1990). Estos enzimas "contaminantes" pueden ser importantes para la digestión celular, de tal forma que, preparaciones de celulasas comerciales han sido utilizadas, en combinación con otros enzimas, para el aislamiento de protoplastos de algunas especies de *Porphyra* a pesar de que la celulosa no se encuentra presente en su pared celular (ver Tabla 1).

La fuente más común de enzimas degradadores de la pared celular de macroalgas son los organismos marinos que se alimentan de ellas, ya sean moluscos, equinodermos o microorganismos. Como hemos visto en capítulos precedentes estos contienen enzimas capaces de degradar los componentes de la pared. Sin embargo, la composición y actividades específicas de los enzimas presentes en los extractos crudos no habían sido, hasta el momento, cuantificados ni caracterizados, con la excepción de las alginato liasas (Boyen et al. 1990). Este hecho hacía que los datos sobre los efectos de enzimas específicos en el proceso de aislamiento fuesen prácticamente nulos al igual que la reproducibilidad de las técnicas de aislamiento.

La presencia de contaminantes de bajo peso molecular y enzimas como proteasas, lipasas y ribonucleasas podían explicar en cierta manera los bajos rendimientos y viabilidades de los protoplastos obtenidos (Cocking 1972, Fitzsimons y Weyers 1985). Muchos de los problemas asociados al uso de los

extractos crudos podrían ser evitados con el empleo de enzimas purificados, con actividades específicas conocidas en las condiciones óptimas para el aislamiento de protoplastos. Sin embargo, una purificación excesiva de enzimas concretos puede producir una digestión de la pared celular menos efectiva, debido al hecho de que enzimas adicionales que se encuentran en los extractos crudos pueden ser necesarios para completar la digestión (Schenk y Hildebrandt 1969).

Tabla 2. Algunos enzimas comercialmente disponibles utilizados para la digestión de las paredes celulares de macroalgas marinas.

<i>Enzimas purificados</i>	<i>Compañía-Referencia</i>
Agarasa	Sigma A6162
Agarasa	Boehringer Mannheim 1417 223
Agarasa	Calbiochem 121820
Celulasa	Sigma C2415
Celulisin	Sigma C2274
Driselasa	Kyowa Hakko
Hemicelulasa	Sigma H2125
Laminarinasa	Sigma L7758
Macerasa	Calbiochem 441201
Macerozima R10	Yakult
Papaína	Sigma P3125
Pectinasa	Sigma P2401
Pectoliasa	Sigma P3026
Pronasa E	Merck 7433
Proteasa XXIV	Sigma P8163
Lisozima	Sigma L6876
Celulasa Onozuka RS	Yakult
Celulasa Onozuka R10	Yakult
 <i>Extractos crudos</i>	
<i>Haliotis</i> sp. (AAP)	Sigma A7514
<i>Patella</i> sp.	Sigma L1251

2.1.2.- Material vegetal de partida

Características de los tejidos algales tales como condiciones de crecimiento, composición celular, edad, estado del ciclo biológico y estado fisiológico de la planta son capaces de afectar tanto la efectividad del tratamiento enzimático como el desarrollo de los protoplastos (Kloareg y Quatrano 1988, Björk et al. 1990, Butler et al. 1990), como lo hacen en plantas superiores (Evans y Bravo 1984, Eriksson 1985). Características de la pared celular, como por ejemplo su composición, dependen de factores como la zona del alga escogida, la estación de recolección, la localización geográfica o las condiciones de cultivo. Todos estos factores influyen en gran medida la eficacia de acción de los enzimas.

Polne-Fuller y Gibor (1984), distinguieron cuatro áreas diferentes en el tallo de *Porphyra perforata*, caracterizadas por su diferente morfología celular que afectó tanto la capacidad de digestión de la solución enzimática como la habilidad de los protoplastos para regenerar. Diferencias significativas en la producción de protoplastos de *Macrocystis pyrifera* creciendo a diferentes profundidades fueron descritas por Kloareg et al. (1989). Estas diferencias fueron atribuidas a las diferentes proporciones relativas de bloques gulurónico y manurónico entre los frondes. LeGall et al. (1990) obtuvieron los rendimientos más altos digiriendo los ápices en lugar del talo completo, tanto de plantas cultivadas intensivamente como de plantas salvajes de *Chondrus crispus*. Al igual que los resultados mostrados por Björk et al. (1990) con diferentes especies de *Gracilaria*, los rendimientos fueron relacionados positivamente con la tasa de crecimiento del tejido utilizado lo que a su vez refleja diferencias en la composición y estructura de la pared celular. Tasas de crecimiento del 10 al 20% diarias produjeron rendimientos de 10^5 a 10^7 protoplastos gr^{-1} PF en *G. sordida*, *G. tenuistipitata* y *G. lemaneiformis* (Björk et al. 1990).

2.1.3.- Condiciones de incubación

Temperatura y pH

La actividad de los enzimas digestores de la pared celular es fuertemente dependiente tanto de la temperatura como del pH de la solución. Las máximas actividades enzimáticas son frecuentemente encontradas a temperaturas mayores de 30°C, temperaturas por otra parte demasiado altas para la obtención de óptimos resultados en el aislamiento y la viabilidad celular. Los rangos utilizados para la digestión enzimática de macroalgas varían de 10 a 25°C (ver Tabla 1) aunque temperaturas entre 20 y 25°C parecen producir los mejores resultados (Saga y Kudo 1989).

Los valores de pH utilizados para el aislamiento en macroalgas varían entre 6.0 y 7.0 que son mayores que los empleados con plantas superiores (que varían de 5.4 a 6.2) (Evans y Bravo 1984). Las actividades enzimáticas óptimas de algunos de los enzimas utilizados para la digestión pueden ser bastante diferentes, como es el caso de celulasas y alginato liasas (6.0 y 8.0 respectivamente) (Butler et al. 1990). En estos casos, procedimientos como llevar a cabo la digestión en dos pasos (Kloareg y Quatrano 1987) pueden dar buenos resultados, e incluso, ajustar el pH al valor de óptima actividad del enzima determinante en el proceso del aislamiento, como es el caso de la celulasa en la digestión de *Laminaria saccharina* y *L. digitata* (Butler et al. 1989, 1990) a pesar de la pequeña cantidad de celulosa presente en su pared celular.

Cationes

La disociación parcial de los componentes de la matriz celular e intercelular puede ser llevada a cabo por medio de quelantes que reaccionan con cationes como el Ca^{2+} en alginofitas o el K^{+} en carragenofitas, disminuyendo la compactación entre los polímeros y aumentando la accesibilidad de la celulosa, el alginato o el carragenato a los enzimas digestivos (Butler et al. 1989, 1990, LeGall et al. 1990). El alginato rico en ácido gulurónico forma un

gel rígido en presencia de cationes divalentes como el Ca^{2+} al igual que la dimerización de las cadenas de *kappa*-carragenato, aumentando así su agregación, es fuertemente dependiente de la presencia de K^+ .

El tratamiento previo a la digestión enzimática del tejido con un quelante de calcio, el EGTA, en macroalgas como *Macrocystis* o *Laminaria* produjo un incremento en la producción de protoplastos de 4 a 5 veces superior al obtenido con plantas sin tratamiento (Butler et al. 1989, Kloareg et al. 1989). LeGall et al. (1990) obtuvieron un aumento del 50% en el número de protoplastos de *Chondrus crispus* cuando emplearon el Kryptofix 222, un quelante de potasio, previamente a la digestión enzimática. Sin embargo, cuando experimentos similares se llevaron a cabo utilizando EDTA, EGTA o variando las concentraciones de ClK del medio de incubación, no se obtuvieron cambios significativos en las producciones de protoplastos obtenidas.

Osmolalidad

El proceso de aislamiento de protoplastos debe ser llevado a cabo en soluciones hipertónicas para asegurar la estabilidad celular durante la digestión de la pared (Butler et al. 1990). Las células incubadas directamente en la solución enzimática pueden no alcanzar el equilibrio con el agente osmótico antes de que la digestión de la pared ocurra y los protoplastos pueden estallar a través de las zonas más frágiles de la pared celular. Con la pre-plasmólisis del tejido se asegura que la mayoría de las células estén plasmolizadas antes de que la digestión ocurra. Sin embargo, son escasos los trabajos en los que se han estudiado los efectos de la pre-plasmólisis en los procesos de aislamiento de protoplastos en macroalgas marinas (Butler et al. 1989, Björk 1992).

Por otro lado, durante el proceso de plasmólisis los protoplastos también absorben sustancias del medio (Cocking 1972) y la plasmólisis directa en la solución enzimática podría provocar la acumulación de enzimas y agentes contaminantes en el interior de la célula. La pre-plasmólisis previene

la nueva asimilación de productos.

Los factores que influyen en el proceso de plasmolisis y el aislamiento de protoplastos incluyen el potencial osmótico del medio y el agente osmótico utilizado. El ajuste entre 1,000 y 1,700 mOsm kg⁻¹ en las soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de macroalgas (Butler et al. 1989, Björk 1992) es superior al utilizado para plantas superiores (de 300 a 1,000 mOsm kg⁻¹). Los agentes osmóticos utilizados más frecuentemente son mostrados en la Tabla 1.

2.2.- Material y métodos

2.2.1.- Preparación del tejido

Después de haber lavado el material con agua de mar y separado las zonas dañadas o contaminadas, el tejido es troceado en piezas de aproximadamente 1 mm² utilizando una hojilla de afeitar y a continuación lavado repetidamente con una "solución de lavado" (Tabla 3) para remover los mucílago, pigmentos y otras sustancias vertidas al medio. Se distinguen dos zonas principales para escoger el tejido a disgregar: los ápices (zonas de nuevo crecimiento) y el talo (zonas más compactas).

Desde el momento del troceado, todas las operaciones se llevan a cabo en placas Petri estériles y trabajando en una cabina de flujo laminar. Todo el material de vidrio empleado en el proceso debe ser primero pasado por el autoclave (20 min) para su esterilización. Todas las soluciones son filtradas a través de filtros de 0.2 µm (Minisart, Sartorius) en el momento de su utilización.

2.2.2.- Tratamiento con ultrasonidos

En algunos casos se ha observado como la incubación de los explantos (1.0 cm

Tabla 3. Composición de la solución de lavado. ¹Potencial osmótico calculado.

20 mM Bis-Tris	4.18 gr
0.2 M manitol	36.44 gr
agua de mar	1,000 mL
pH	7.0
¹ Osmolalidad	1,100 mOsm kg ⁻¹

de longitud) en agua de mar esteril y su introducción en un baño de ultrasonidos (50 Hz) por períodos no superiores a 2 min, produce una menor compactación del tejido y una mayor efectividad de los tratamientos posteriores.

2.2.3.- Pre-plasmolisis

Para llevar a cabo la pre-plasmolisis del tejido previamente a la incubación enzimática, los fragmentos son incubados durante 30 min en una solución hipertónica (Tabla 4). Los valores del potencial osmótico de todas las soluciones fueron calculados y comparados con los descritos por Butler (1989) y Björk (1992).

Tabla 4. Composición de la solución para la pre-plasmolisis del tejido.

20 mM HEPES	4.77 gr
0.8 M manitol	145.76 gr
agua de mar	1,000 mL
pH	7.0
Osmolalidad	1,700 mOsm kg ⁻¹

2.2.4.- Pre-plasmolisis + agentes quelantes

La incubación del tejido con quelantes como EDTA y EGTA con el objetivo de disgregar los polisacáridos que contienen cationes se lleva a cabo al mismo tiempo que la pre-plasmolisis. Concentraciones entre 20 y 40 mM de cualquiera de los quelantes utilizados pueden dar resultados óptimos, dependiendo del alga. Las condiciones de incubación del tejido fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior.

2.2.5.- Incubación en la solución enzimática

Las soluciones enzimáticas utilizadas, que dependen en gran medida del alga que se va a digerir, suplementadas con manitol (Tabla 5), son agitadas durante 30-60 min a temperaturas entre 0 y 4°C y centrifugadas a 27,000 g durante 10 min. La osmolalidad calculada de estas soluciones es de 1,300 mOsm kg⁻¹. El pH de la solución es ajustado a 6.0 y las soluciones filtradas a través de filtros de 0.8 y 0.2 μm en el momento de su utilización.

1.0 gr de alga troceada es incubado, en la oscuridad, en 10 mL de la solución enzimática. Las placas son situadas en un agitador orbital (80 rpm) en el interior de una cámara de cultivo con una temperatura de 20°C. La producción de protoplastos es controlada a intervalos para tener una idea aproximada de la evolución del proceso de aislamiento.

2.2.6.- Purificación de los protoplastos

Tras la digestión, la solución es filtrada a través de una malla de nylon de 45 μm de poro y la producción de protoplastos estimada, después de dejar reposar la solución, por contaje directo o en una cámara Thoma al microscopio invertido (IMT-2 Olympus). Los recuentos deben ser repetidos un mínimo de tres veces por muestra con el fin de minimizar las desviaciones standards de

Tabla 5. Composición de la solución enzimática. Las unidades de actividad dependen del tipo de extracto y el enzima específico de interés.

Extracto Crudo	? U mL ⁻¹
Celulasa	2.0% (p/v)
Manitol	0.4 M
Bis-Tris	20 mM
pH	5.8-6.0
Agua de mar	50 mL
Osmolalidad	1,300 mOsm kg ⁻¹

las medias. Los rendimientos son expresados normalmente en n° de protoplastos por gr de tejido. La suspensión es entonces lavada con solución de lavado y centrifugada en un rotor basculante a una velocidad de 100 g durante 10 min, utilizando un gradiente de densidad con una solución conteniendo partes iguales de Percoll (Pharmacia) y una solución conteniendo 20 mM Bis-Tris, 1.2 M manitol disueltos en agua de mar a pH 7.0 (1:1). El uso del rotor basculante evita el posible daño que puedan sufrir los protoplastos al chocar con las paredes de los tubos. La banda obtenida es resuspendida en la solución de lavado y el proceso de centrifugado (100 g durante 5 min) y lavado repetido dos veces más para limpiar los restos de enzimas y desechos.

2.2.7.- Viabilidad y regeneración de la pared celular

En general, el aspecto de los protoplastos es completamente esférico, y su tamaño varía dependiendo de la especie desde 8-10 hasta 25-30 μm . La sensibilidad osmótica de los protoplastos es chequeada por inmersión en agua destilada. Otros parámetros controlados para determinar la autenticidad de los protoplastos son su apariencia esférica y la retención de orgánulos y pigmentos (integridad de la membrana).

La viabilidad celular es observada por la habilidad de los protoplastos de acumular diacetato de fluoresceína (FDA, Sigma, concentración final = 35 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Larkin 1976), y la tinción con Calcofluor White (0.01% w/v, 5.0 μL por cada 100 μL de suspensión) (Galbraith 1981) se utiliza para comprobar la ausencia (sin emitir fluorescencia) y regeneración de pared celular.

Otro parámetro utilizado para controlar la viabilidad y el estado de los protoplastos es la medida de la evolución de oxígeno fotosintético con la utilización de un electrodo de oxígeno.

2.2.8.- Cultivo de protoplastos

Los protoplastos son entonces transferidos a placas Petri (5 cm de \varnothing) con medio enriquecido (Provasoli 1968) suplementado con manitol (0.2 M) e incubados a una temperatura entre 15 y 20°C para observar la evolución de la regeneración de la pared celular y la capacidad para dividirse.

3.- REFERENCIAS

- Amano H, Noda H (1992) Proteins of protoplasts from several seaweeds. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 58: 291-299.
- Araki T, Aoki T, Kitamikado M (1987) Preparation and regeneration of protoplasts from wild-type of *Porphyra yezoensis* and green variant of *P. tenera*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 53: 1623-1627.
- Björk M (1992) Protoplast isolation from marine macroalgae and application to studies of inorganic carbon utilization. Ph D Thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 378, Uppsala University
- Björk M, Ekman P, Wallin A, Pedersen M (1990) Effects of growth rate and other factors on protoplast yield from four species of *Gracilaria* (Rhodophyta). Bot. Mar. 33: 433-439.
- Boyen C, Kloareg B, Polne-Fuller M, Gibor A (1990) Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. Phycologia 29: 173-181.

-
- Butler DM (1989) Isolation and culture of protoplasts and tissues of *Laminaria* spp. (Phaeophyta). Ph D Thesis, The University of Leeds, 203 pp.
- Butler DM, Ostgaard K, Boyen C, Evans LV, Jensen A, Kloareg B (1989) Isolation conditions for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). *J. Exp. Bot.* 40: 1237-1246.
- Butler DM, Evans LV, Kloareg B (1990) Isolation of protoplasts from marine macroalgae. In Akatsuka I (ed.), *Introduction to applied phycology*, SPB Academic Publishing, The Hague, 647-668.
- Chen LC-M (1987) Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. *Bot. Mar.* 30: 399-403.
- Cheney DP, Mar E, Saga N, van der Meer J (1986) Protoplast isolation and cell division in the agar-producing seaweed *Gracilaria* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 22: 238-243.
- Cocking EC (1972) Plant cell protoplasts - isolation and development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 29-50.
- Cocking EC (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 962-962.
- Coury DA, Hong Y, Polne-Fuller M (1991) Preparation of protoplasts from *Porphyra*, *Macrocystis* and *Ulva*. *Phycol. Newslett.* December-91: 9-11.
- Ducraux G, Kloareg B (1988) Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria* (Pheophyceae). *Planta* 174: 25-29.
- Eriksson T (1985) Protoplast isolation and culture. En: Fowke LC, Constabel F (eds.), *Plant protoplasts*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp 1-20.
- Evans DA, Bravo JE (1984) Protoplast isolation and culture. En: Evans DA, Sharp DR, Ammirato PV, Yamada Y (eds.) *Handbook of plant cell culture*, Vol. 4, Macmillan Publ. Co. New York, pp. 97-132.
- Fisher DD, Gibor A (1987) Production of protoplasts from the brown alga, *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phaeophyta). *Phycologia* 26: 488-495.
- Fitzsimons PJ, Weyers JDB (1985) Properties of some enzymes used for protoplast isolation. En: Pilet PE (ed.), *The physiological properties of plant protoplasts*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 12-23.

-
- Fujimura T, Kawai T, Shiga M, Kajiwarra T, Hatanaka A (1989) Regeneration of protoplasts into complete thalli in the marine green alga *Ulva pertusa*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 55: 1353-1359.
- Fujita Y, Migita S (1985) Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ. 57: 39-45.
- Fujita Y, Saito M (1990) Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). Hydrobiologia 204/205: 161-166.
- Galbraith DW (1981) Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor white. Physiol. Plant. 53: 111-116.
- García-Reina G, Gómez-Pinchetti JL, Robledo DR, Sosa P (1991) Actual, potential and speculative applications of seaweed cellular biotechnology: some specific comments on *Gelidium*. Hydrobiologia 221: 181-194.
- Gross W (1990) Preparation of protoplasts from the carrageenophyte *Gigartina corymbifera* (Kütz.) J. Ag. (Rhodophyta). J. Microbiol. Methods 12: 217-223.
- Kajiwarra T, Hatanaka A, Fujimura T, Kawai T, Irie M (1988) Isolation of protoplasts from marine brown algae Dictyotaceae plants. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 54: 1255.
- Kloareg B, Quatrano R (1987) Isolation of protoplasts from zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell (Phaeophyta). Plant Sci. 50: 189-194.
- Kloareg B, Quatrano RS (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 26: 259-315.
- Kloareg B, Polne-Fuller M, Gibor A (1989) Mass production of viable protoplasts from *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. (Phaeophyta). Plant Sci. 62: 105-112.
- Larkin PJ (1976) Purification and viability determinations of plant protoplasts. Planta 128: 213-216.
- LeGall Y, Braud JP, Kloareg B (1990) Protoplast production in *Chondrus crispus* gametophytes (Gigartinales, Rhodophyta). Pl. Cell Rep. 8: 582-585.
- Liu QY, Chen LC-M, Taylor ARA (1992) Ultrastructure of cell wall regeneration by isolated protoplasts of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). Bot. Mar. 35: 21-33.

-
- Matsue T, Koike S, Abe T, Itabashi T, Uchida I (1992) An ultramicroelectrode for determination of intracellular oxygen. Light-irradiation-induced change in oxygen concentration in an algal protoplast. *Biochim. Biophys. Acta* 1101: 69-72.
- Mejjad M, Loiseaux-de-Goër S, Ducreux G (1992) Protoplast isolation, development, and regeneration in different strains of *Pilayella littoralis* (L.) Kjellm. (Phaeophyceae). *Protoplasma* 169: 42-48.
- Millner PA, Callow ME, Evans LV (1979) Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Planta* 147: 174-177.
- Mizukami Y, Okauchi M, Kito H (1992) Effects of cell wall-lytic enzymes on the electrofusion efficiency of protoplasts from *Porphyra yezoensis*. *Aquaculture* 108: 193-205.
- 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.
- Polne-Fuller M, Gibor A (1987) Tissue culture of seaweeds. In Bird KT, Benson PH (eds.), *Seaweed cultivation for renewable resources*, Vol. 16. Elsevier, Amsterdam, 219-239.
- Polne-Fuller M, Gibor A (1990) Developmental studies in *Porphyra* (Rhodophyceae). III. Effect of culture conditions on wall regeneration and differentiation of protoplasts. *J. Phycol.* 26: 674-682.
- Provasoli L (1968) Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: Watanabe A, Hattori A (eds.) *Culture and collections of algae*. Jap. Soc. Plant Physiol. pp. 63-75.
- Reddy CRK, Migita S, Fujita Y (1989) Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture. *Bot. Mar.* 32: 483-490.
- Saga N (1984) Isolation of protoplasts from edible seaweeds. *Bot. Mag. Tokyo* 97: 423-427.
- Saga N, Kudo T (1989) Isolation and culture of protoplasts from the marine green alga *Monostroma angicava*. *J. Appl. Phycol.* 1: 25-30.
- Saga N, Sakai Y (1984) Isolation of protoplasts from *Laminaria* and *Porphyra*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50: 1085.

-
- Saga N, Polne-Fuller M, Gibor A (1986) Protoplasts from seaweed: production and fusion. En: Barclay WR, McIntosh RP (eds.), Algal Biomass Technologies: an interdisciplinary perspective, Vol. 83. J. Cramer, Berlin, 37-43.
- Saito M, Fujita Y (1991) Optimization of fusion conditions in the polyethylene glycol and the electric stimulation methods for the protoplasts of *Porphyra*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 57: 919-925.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1969) Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases. Crop Sci. 9: 629-631.
- Tang Y (1982) Isolation and cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *Porphyra suborbiculata* Kjellm. J. Shandong Coll. Oceanol. 12: 38-50.
- Tokuda H, Kawashima Y (1988) Protoplast isolation and culture of a brown alga, *Undaria pinnatifida*. In Stadler T, Mollion J, Verdus M-C, Karamanos Y, Morvan H, Christiaen D (eds.), Algal Biotechnology, Elsevier applied science, London and New York, 151-157.
- Waaland JR, Dickson LG, Watson BA (1990) Protoplast isolation and regeneration in the marine red alga *Porphyra nereocystis*. Planta 181: 522-528.
- Zhang D (1983) Study on the protoplast preparation, culture and fusion of somatic cells from two species of green algae- *Ulva linza* and *Monostroma angicava* Kjellm. J. Shandong Coll. Oceanol. 13: 57-65.
- Zhang Q (1991) Studies on the isolation, culture and regeneration of protoplasts from *Chondrus ocellatus* Holm. J. Ocean Univ. Qingdao 21: 52-62.