UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE EXTRACTOS DIGESTIVOS DE FICÓFAGOS Y SU APLICACIÓN FICOTECNOLÓGICA EN EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE MACROALGAS MARINAS

JUAN LUIS GÓMEZ PINCHETTI

Las Palmas de Gran Canaria, mayo de 1993

34-1992/93

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo.Sr.Rector Magfco. de esta Universidad, el aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el Doctorando las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal,éste calificó dicho trabajo con la nota de <u>APTO CUM LAUSE (VNANIMISA</u>)

Las Palmas de G. C., a 9 de Julio de 1993. El Presidente: Dr.D. Angel Luque Escalona,

El Secretario: Dr. D. Santiago Hernández León,

La Vocal: Drª Da Marianne-Pedersen.

El Vocal: Dr. D. Francisco Valdés González,

La Vocal: Dr^a D^a Nieves González Henríquez,



El Doctorando: D. Juan-Juis Gomez, Pinchetti,

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN CIENCIAS DEL MAR DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA PROGRAMA DE BIOLOGIA VEGETAL



TITULO DE LA TESIS

CARACTERIZACION ENZIMATICA DE EXTRACTOS DIGESTIVOS DE FICOFAGOS Y SU APLICACION FICOTECNOLOGICA EN EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE MACROALGAS MARINAS.

Tesis Doctoral presentada por D. Juan Luis Gómez Pinchetti Dirigida por el Dr. D. Guillermo García Reina

El Director

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, a 28 de Mayo de 1993



CARACTERIZACION ENZIMATICA DE EXTRACTOS DIGESTIVOS DE FICOFAGOS Y SU APLICACION FICOTECNOLOGICA EN EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE MACROALGAS MARINAS.

Memoria que presenta, el Lcdo. en Ciencias del Mar, Juan Luis Gómez Pinchetti para aspirar al grado de Doctor.

Las Palmas de Gran Canaria, Mayo de 1993.

GUILLERMO GARCIA REINA, DOCTOR EN BIOLOGIA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Hace constar:

Que el Lcdo. en Ciencias del Mar D. Juan Luis Gómez Pinchetti ha realizado el presente trabajo como Memoria de Tesis Doctoral, en el Instituto de Algología Aplicada del Dpto. de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo su dirección, y se presenta con su V°B°.

Las Palmas de Gran Canaria, Mayo de 1993.

Agradecimientos

Desde estas líneas quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento,

* Al Dr. Guillermo García Reina por la dirección, el apoyo y el entusiasmo que he recibido de él para la realización de este trabajo.

* A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por la beca de Tercer Ciclo que ha permitido financiar este período de formación y por ofrecerme los medios con los que llevar a cabo este trabajo.

* A la Fundación Universitaria de Las Palmas por la concesión de la primera beca que me ayudó a comenzar los estudios de doctorado.

* Al Dr. Pedro Sosa Henríquez, Daniel Robledo Ramírez, Miguel Jiménez del Rio, Antera Martel Quintana y Yolanda Freile Pelegrín por todos los buenos ratos que hemos pasado juntos, tanto en el Laboratorio como fuera de él.

* A D. Rafael Armisén Abós, Director de Investigación de Hispanagar S.A. por compartir conmigo gran parte de sus conocimientos (que no son pocos), ideas, interés, ágares, agarosas y carragenatos que se ajustaban a mis necesidades y por supuesto, su increíble entusiasmo.

* To Dr. Marianne Pedersén, Dr. Mats Björk, Dr. Shukun Yu, Dr. Kurt Haglund, Dr. Peter Lindblad, Jonas Collen, Katrin Österlund, Erica Young and the other members of the algal group, Dpt. of Physiological Botany, Uppsala University (Sweden) to share with me their knowledge on seaweed cultivation and physiology and make me feel at home during my very cold and white stages in Uppsala.

* Al Dr. Zakir Ramazanov por las largas, provechosas y entretenidas horas trabajando a su lado.

* A los Dres. Angel Luque Escalona, Rafael Robaina Romero, Pascual Caballero Ortega, M^a Ascensión Viera Rodríguez, a María del Mar Bernal Suárez y a todos los miembros del Dpto. de Biología (por cuestión de espacio no los puedo nombrar a todos) por su apoyo en todo momento. * A Hipólito Fernández-Palacios, Lidia Robaina, María Salhi, Juan Socorro y todos los miembros del grupo de cultivo de peces del ICCM por estar siempre disponibles en el momento de pedirles un favor.

* A la Svensk-Spanska Stiftelsen, Fundación Margit y Folke Pehrzon, Gobierno de Canarias, Plan de Formación del Profesorado y Plan de Formación del PAS de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por financiar mis estancias en el extranjero y mis asitencias a congresos y cursos, tanto dentro como fuera de España.

* A la compañía Air Europa S.A. por las facilidades ofrecidas en los viajes al extranjero.

* Y por último pero no por ello menos importantes, a Cristina e Isabel por su apoyo durante todo este tiempo.

A mis Padres.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

· .

PREFACIO

Esta tesis compila los resultados de los artículos que se citan a continuación así como otros resultados no publicados. En el texto, los artículos se indican por sus números romanos:

- I. Gómez Pinchetti JL, García Reina G (1993) Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds. *Marine Biology* (en prensa).
- **II.** Gómez Pinchetti JL, García Reina G (1993) Acid deoxyribonuclease activity in crude extracts from marine phycophages used for seaweed protoplast isolation. *Scientia Marina* (enviado).
- III. Björk M, Gómez Pinchetti JL, García Reina G, Pedersén M (1992)
 Protoplast isolation from Ulva rigida (Chlorophyta). British Phycological Journal 27: 401-407.
- IV. Gómez Pinchetti JL, Björk M, Pedersén M, García Reina G (1993) Factors affecting protoplast yield of the carrageenophyte Solieria filiformis (Gigartinales, Rhodophyta). Plant Cell Reports (en prensa).
- V. Gómez Pinchetti JL, Ramazanov Z, García Reina (1992) Effect of inhibitors of carbonic anhydrase activity on photosynthesis in the red alga Solieria filiformis (Gigartinales, Rhodophyta). Marine Biology 114: 335-339.
- VI. 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.

Este trabajo a sido llevado a cabo por Juan Luis Gómez Pinchetti en el Instituto de Algología Aplicada del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Parte del trabajo de los artículos III y IV fue realizado en cooperación con el Dr. Mats Björk del Dpt. Physiological Botany de la Universidad de Uppsala, en base al convenio de cooperación científica entre la Universidad de Las Palmas de G.C. y la Universidad de Uppsala.

INDICE GENERAL

Prefacio
Indice general iii
Indice de Tablas vii
Indice de Figuras viii
Abreviaciones ix
Introducción general 1
1 Introducción
1.1Estructura y composición de la pared celular de las
macroalgas marinas
1.1.1Componentes del esqueleto
1.1.2Componentes de la matriz
Agar y agarasas
Carragenato y carragenasas
Alginato y alginato liasas
1.2Efecto de la dieta sobre la actividad enzimática
1.3Actividad deoxiribonucleasa (DNasa) en extractos de
origen marino
1.4Aislamiento de protoplastos de macroalgas marinas 19
1.4.1Clorofitas
1.4.2Feofitas
1.4.3Rodofitas
1.5Factores que afectan el rendimiento de protoplastos
1.5.1Enzimas digestoras de pared celular
1.5.2Material vegetal de partida
1.5.3Condiciones de incubación
Temperatura y pH

•

÷

Cationes 2	8
Osmolalidad	9
1.6Objetivos	0
2 Material y métodos 3	3
2.1Descripción de las especies herbívoras	3
2.1.1Aplysia dactylomela Rang	3
2.1.2Littorina striata King et Broderip	3
2.1.3Haliotis coccinea canariensis Nordsieck	4
2.1.4Diadema antillarum Phillipi	4
2.2Extracción y caracterización de los extractos enzimáticos 3	4
2.3Cultivos bacterianos	5
2.4Cultivo de Aplysia dactylomela y Haliotis coccinea	
canariensis. Ensayo de dietas monoespecíficas	5
2.5Purificación parcial de la agarasa de los extractos	
crudos de Aplysia dactylomela 30	6
2.6Descripción de las especies vegetales	6
2.6.1Solieria filiformis (Kützing) Gabrielson	6
2.6.2Hypnea musciformis (Wulfen) Lamouroux 3'	7
2.6.3Grateloupia doryphora (Montagne) Howe	7
2.6.4Gracilaria tenuistipitata var. liui Zhang et Xia 3'	7
2.6.5Ulva rigida C. Agardh	8
2.7Cultivo de las especies vegetales	8
2.8Aislamiento de protoplastos	8
2.9Fotosíntesis, alcalinización del medio y actividad anhidrasa	
carbónica en Solieria filiformis	9
3 Resultados	1
3.1Método de extracción	1
3.1.1Precipitación con sulfato amónico 4	1

	3.1.2Diálisis y filtración en gel
	3.2Actividades enzimáticas [I] 42
	3.2.1Actividad celulasa
	3.2.2Actividad agarasa
	3.2.3Actividad alginato liasa
	3.3El pH de los sistemas digestivos [II]
	3.4Cultivos bacterianos
	3.5Actividad DNasa [II] 45
	3.6Ensayo de dietas monoespecíficas
	3.7Purificación parcial
	3.8Producción de protoplastos
	3.8.1Gracilaria tenuistipitata
	3.8.2Grateloupia doryphora
	3.8.3Hypnea musciformis
	3.8.4Ulva rigida [III] 54
	3.8.5Solieria filiformis [IV]
	3.9Captación de carbono inorgánico en Solieria filiformis [V] 63
4	Discusión
	4.1Metodología de la extracción
	4.2Actividades enzimáticas [I]
	4.3pH del sistema digestivo [II]
	4.4Actividad bacteriana
	4.5Actividad DNasa [II]
	4.6Influencia de la dieta monoespecífica
	4.7Purificación parcial
	4.8Aislamiento de protoplastos
	4.8.1Soluciones enzimáticas
	4.8.2Material vegetal
	4.8.3Efectos de los pretratamientos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

v

6	Bibliografía	•••	••	••	•••	•	••	•	••	•	••	•	• •	•	••	•	•	• •	•	•	•	•	••	•	•	• •	•	•	79
7	Artículos			•••		•		٠	•••	•		•		• •	••	•	•	• •	•	•	•	•		•	•	• •			95

.

Indice de tablas

Tabla 1.	Principales polisacáridos estructurales en las paredes
	celulares de algunas macroalgas marinas de las
	Divisiones Clorofita, Feofita y Rodofita
Tabla 2.	Condiciones físicas del aislamiento, rendimiento y
	viabilidad de protoplastos de macroalgas
Tabla 3.	Porcentaje de actividad enzimática (medida
	como actividad agarasa) en los extractos
	de Aplysia dactylomela 41
Tabla 4.	Actividades enzimáticas de los diferentes extractos
	expresadas como μ g AR h ⁻¹ en diferentes condiciones
	de temperatura y pH 43
Tabla 5.	Actividades enzimáticas medidas como μ g AR h ⁻¹ de
	los extractos crudos de Aplysia dactylomela cultivada
	con dietas monoespecíficas durante 1 mes 47
Tabla 6.	Acción de diferentes combinaciones de enzimas
	comerciales y extractos crudos de herbívoros
	marinos en la producción de protoplastos de
	las especies de algas rojas, Gracilaria tenuistipitata,
	Grateloupia doryphora e Hypnea musciformis
Tabla 7.	Actividad enzimática, en U m L^{-1} , de los extractos
	crudos utilizados en las soluciones
	enzimáticas para el aislamiento de protoplastos

Indice de figuras

Figura 1.	Estructura química de los principales polisacáridos
	del esqueleto y la matriz de las macroalgas marinas9
Figura 2.	Secuencia de la hidrólisis enzimática completa de la
	molécula de agar según van der Meulen (1975) 11
Figura 3.	Evolución de la actividad DNasa en función del
	tiempo de L. striata, A. dactylomela, AAP
	y DNasa estandar
Figura 4.	Incremento en peso de Aplysia dactylomela alimentada
	con Ulva rigida, Gracilaria spp. y Solieria filiformis 48
Figura 5.	Evolución del peso fresco de las diferentes especies
	de macroalgas con las que fue alimentado
	Haliotis coccinea canariensis por un periodo de 4 dias 49
Figura 6.	Perfil cromatográfico de la agarasa obtenida del
	extracto crudo de Aplysia dactylomela 50
Figura 7.	(A) Corte transversal de un talo de Ulva rigida.
	(B) Protoplastos fotografiados en contraste de fases 57
Figura 8.	Producción de protoplastos de Solieria filiformis

Abreviaciones

AAP	Abalone Acetone Powder, extracto en acetona de Haliotis sp.
AC	Anhidrasa Carbónica
AC _{ext}	AC extracelular
AC _{int}	AC intracelular
AR	Azúcares reductores
Bis-Tris	Bis[2-Hidroxietil]imino-tris[hidroximetil]metano
СМС	Carboximetil celulosa
DBS	Sulfonamida unida al dextrano (Dextran-bound sulfonamide)
DBAZ	Acetazolamida unida al dextrano (Dextran-bound acetazolamide)
DCMU	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DNasa	Deoxiribonucleasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilenodiaminotetraacético
EF	Extracto frío de Gracilaria spp.
EGTA	Acido etilenoglicol-bis(B-aminoetil eter) NNN'N'-tetra-acético
EZ	6-etoxizolamida
FDA	Diacetato de fluoresceína
HEPES	N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-acido etanosulfónico]
H _f	Haliotis alimentado con dieta monoespecífica
Hw	Haliotis sin alimentación específica (salvaje)
Mops	Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
NPA	Agarasa de Pseudomonas atlantica no purificada
PA	Agarasa de Pseudomonas atlantica purificada
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidades de actividad enzimática

•

.

Introducción general

La palabra *Biotecnología* se ha convertido últimamente en un término muy familiar que define, en su sentido más amplio, "cualquier técnica que utiliza organismos vivos (o parte de estos organismos) para preparar o modificar productos, mejorar las características de plantas y animales o desarrollar microorganismos para usos específicos" (Office of Technology Assessment, Anónimo 1984). Para completar esta definición habría que incluir "el marcado interés económico" asociado al desarrollo de estas técnicas (Nonomura 1988). La reciente interacción de la *Ficología* con la biología molecular y celular, la ingeniería química, la maricultura, el cultivo de células y protoplastos y otras disciplinas relacionadas para usos específicamente comerciales, han dado contenido a lo que Lewin en 1983 denominó *Ficotecnología*.

De las biotecnologías aplicadas a vegetales, el cultivo de protoplastos se viene consolidando como una de las preferidas debido a la cantidad y exclusividad de aplicaciones potenciales que permite en campos como la fisiología, la bioquímica y, más recientemente, en biología molecular e ingeniería genética. Parafraseando a Coury et al. (1991): "cuando observamos 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".

La palabra *protoplasto* define a la célula vegetal de la cual la pared celular ha sido separada por métodos físicos o enzimáticos (Cocking 1972). Las técnicas para el aislamiento rutinario de gran número de protoplastos viables en plantas terrestres, utilizando enzimas degradadoras de la pared celular, fueron desarrolladas en los años 60, desde que Cocking (1960) utilizó el extracto crudo de un hongo, que contenía celulasa, para preparar protoplastos de *Lycopersicon* spp. A partir de ese momento, el aislamiento y cultivo de protoplastos se ha convertido en una poderosa herramienta con la que se han obtenido resultados como la regeneración de pared celular, la división celular y, más recientemente, la demostración de totipotencia (regeneración de planta completa) (Evans y Bravo 1984).

Las algas son un grupo heterogéneo que exhibe una gran variedad y complejidad en la organización de las paredes celulares, lo que contrasta con la relativa homogeneidad de las plantas terrestres (Butler et al. 1990). En principio, no hay razón para que las técnicas tantas veces aplicadas en plantas terrestres no puedan ser aplicadas con éxito en macroalgas. Sin embargo, la gran complejidad y diversidad de los componentes estructurales de sus paredes celulares (sobre todo en las especies de mayor interés industrial), y la escasa efectividad de las polisacaridasas comerciales potencialmente utilizables para su digestión, han dado como resultado el que sólo recientemente se hayan obtenido ciertos éxitos en el aislamiento y cultivo de protoplastos de macroalgas marinas. La digestión ineficaz de las paredes celulares más diferenciadas de macroalgas (principalmente de las Divisiones Feofita y Rodofita) es debida no sólo a cambios en la constitución celular (y consecuentemente en la producción de protoplastos) con relación a su edad, ciclo de vida, estado fisiológico y condiciones de cultivo (Kloareg y Quatrano 1988, Björk et al. 1990), al igual que en plantas terrestres (Evans y Bravo 1984, Eriksson 1985), sino también a la ausencia de eficaces enzimas degradadoras de sus complejas paredes celulares. La implantación del cultivo de protoplastos de macroalgas marinas como técnica rutinaria al nivel de plantas terrestres, precisa aún del conocimiento de técnicas para la modificación de los enlaces entre los polímeros que conforman la pared celular, así como de métodos de extracción, purificación y caracterización de enzimas efectivas que actúen sobre los polímeros específicos (Butler et al. 1990).

Paralelamente, las características fisiológicas de las macroalgas están directamente relacionadas con el desarrollo estructural de su pared celular. El estudio de la relación entre las características del metabolismo del carbono y del nitrógeno de las algas con las que se trabaja y de los protoplastos que se obtienen de ellas, hacen que los estudios fisiológicos sean un complemento (cuando no una finalidad) fundamental para llevar a cabo el desarrollo de estas técnicas con éxito.

Gran cantidad de bacterias y otros microorganismos capaces de degradar los polisacáridos estructurales de macroalgas marinas (incluyendo el agar, carragenato y alginato), son comunes en el medio marino tanto de forma libre (Yaphe 1957, Sarwar et al. 1983) como asociados a las algas que contienen estos polisacáridos (Chesters et al. 1956, Quatrano y Caldwell 1978, Torzilli y Andrykovitch 1980, Wainwright 1980, Bellion et al. 1982, Greer y Yaphe 1984, Hodgkiss y Leung 1986, Aoki et al. 1990, Schaumann y Weide 1990, Kitamikado et al. 1992, Lavilla-Pitogo 1992), e incluso, en los sistemas digestivos de algunos herbívoros marinos (Lasker y Giese 1954, Galli y Giese 1959, Prim y Lawrence 1975, Minamitake et al. 1986, Seiderer et al. 1987, Vitalis et al. 1988). La utilización de las enzimas producidas por microorganismos ha sido, en general, la principal herramienta para el análisis estructural de estas macromoléculas (Yaphe 1957, Duckworth y Yaphe 1971, Young et al. 1978, Greer y Yaphe 1984, Morrice et al. 1984, Brown y Preston 1991). Sin embargo, el desarrollo de estudios estructurales más exhaustivos y, sobre todo, el desarrollo de nuevas aplicaciones (como las técnicas de cultivo de células y protoplastos) han generado la demanda y el estudio de nuevas y más potentes fuentes de enzimas.

La existencia de gran cantidad de invertebrados marinos con dietas herbívoras (Lawrence 1975, Hawkins y Hartnoll 1983, Carefoot 1987, Tutschulte y Connell 1988), capaces de digerir macroalgas, y la descripción del gran equipamiento enzimático (particularmente en enzimas digestivas) tanto de moluscos como equinodermos (van Weel 1961, Lawrence 1975), han propiciado el estudio de sus sistemas digestivos como fuente alternativa para la obtención de enzimas específicas. No obstante, la descripción de enzimas capaces de degradar los polisacáridos matriciales complejos de la pared celular de macroalgas marinas ha sido escasa, debido principalmente a la complejidad del proceso de degradación (Lewis 1964, Horiuchi y Lane 1965, Usov y Miroshnikova 1975, Benítez y Macaranas 1979). Aunque poco estudiados, resulta evidente que estos herbívoros han de poseer mecanismos

3

(tanto mecánicos como enzimáticos) capaces de digerir eficazmente la pared celular de las macroalgas marinas.

Entre las diferentes metodologías descritas para la preparación y caracterización de este tipo de extractos enzimáticos (Crabtree et al. 1979, Scopes 1982, Deutscher 1990), el empleo de la precipitación con sulfato amónico y la desalación son las técnicas más frecuentemente utilizadas, junto con la extracción en acetona. Este proceso de purificación parcial evita los problemas inherentes al uso de extractos crudos que, con gran probabilidad, contienen otras sustancias que dificultan la actividad de los enzimas y su aplicación cuando son utilizados en el aislamiento de protoplastos (Cocking 1972, Berliner 1981, Butler et al. 1990).

En este estudio se han desarrollado técnicas para la preparación y caracterización de extractos digestivos de herbívoros marinos con la finalidad de obtener fuentes enzimáticas eficaces para la digestión de la pared celular y la obtención de protoplastos de macroalgas.

1.- INTRODUCCION

1.1.- Estructura y composición de la pared celular de las macroalgas marinas

La pared celular de las macroalgas marinas, como la de las plantas terrestres, está compuesta por una fase cristalina (el esqueleto) encajada en una fase más amorfa (la matriz). Sin embargo, la pared celular de las algas se diferencia de la de las plantas terrestres tanto por la abundancia y variedad de los componentes de la matriz con respecto a los del esqueleto como por un mayor contenido en polisacáridos polianiónicos con respecto a los neutros. Estas diferencias han sido asociadas a funciones específicas relacionadas con la regulación mecánica, osmótica o iónica de las algas en el medio marino (Kloareg y Quatrano 1988).

1.1.1.- Componentes del esqueleto

En la mayoría de las macroalgas marinas los polímeros del esqueleto son polisacáridos lineales neutrales donde, como en las plantas terrestres, el polisacárido más común es la celulosa (Kreger 1962), un ß(1-4) glucano de conformación helicoidal plana (Tabla 1). Este polímero es muy abundante en Ulvaceas (Clorofitas) constituyendo aproximadamente el 70% de la pared celular (Preston 1974), pero relativamente escaso (menos del 10% del peso seco) en Feofitas y Rodofitas, e incluso inexistente en algunas especies (Butler et al. 1990). Xilanos y mananos también forman parte del esqueleto de macroalgas marinas, en proporciones que varían dependiendo de la especie y de la fase del ciclo de vida.

La celulasa (EC 3.2.1.4), enzima que hidroliza los enlaces $\beta(1-4)$ de la celulosa, está ampliamente distribuída en la naturaleza y ha sido detectada en

numerosas ocasiones en el medio marino (Yokoe y Yasumasu 1964, Elyakova et al. 1968, Horiuchi y Lane 1965, Koningsor et al. 1972, Brock et al. 1986, Boyen et al. 1990).

1.1.2.- Componentes de la matriz

Los polisacáridos de la matriz han sido el objeto de intensas investigaciones en los últimos años. El interés en estos polímeros radica principalmente en su capacidad para formar soluciones acuosas altamente viscosas o geles compactos estables. Estos ficocoloides se emplean en las industrias alimentaria, cosmética, textil, farmacéutica y biotecnológica (Armisén y Galatas 1987, McHugh 1987, Stanley 1987) generando un mercado que mueve más de $3x10^6$ Tm en peso fresco por año (McHugh 1991).

Sus propiedades físico-químicas están basadas en la estereoquímica de sus cadenas que, a su vez, dependen de la composición química y sus estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria. Contrariamente a los componentes del esqueleto, los componentes de la matriz pueden ser extraídos en agua en presencia de aditivos como sales, ácidos, bases o quelantes. Típicamente están formados por polisacáridos ácidos, sulfatados y/o carboxilados. De todos los componentes encontrados en la matriz de las distintas Divisiones, son los de las Rodofitas (algas rojas) y Feofitas (algas pardas) los de mayor interés por sus características físico-químicas particulares.

Los componentes mayoritarios de la matriz en las Clorofitas (algas verdes) son polisacáridos ramificados, sulfatados y solubles en agua. En diferentes especies de *Ulva* y *Enteromorpha* los polímeros están formados principalmente por ramanosa, xilosa y ácido glucurónico.

En las Rodofitas se encuentran principalmente galactanos lineales sulfatados, con pesos moleculares frecuentemente superiores a 10^6 . Básicamente consisten en la repetición regular de un disacárido (AB) compuesto por dos unidades de galactosa enlazadas alternativamente por enlaces $\beta(1-4)$ y

 $\alpha(1-3)$ (Tabla 1). Esta estructura regular suele completarse con sustituciones de grupos sulfatos, metilos o piruvatos, pero siempre conteniendo D-galactosa enlazada (1,3) como unidad B. Los elementos que ocupan la unidad A, enlazados (1,4), pueden ser tanto configuraciones D-, en los carragenatos, como L-, en el agar o el porfirán. Las otras diferencias básicas radican en el número y localización de los sustituyentes en la molécula.

En las Feofitas el componente más abundante de la matriz es el ácido algínico, complementado con polisacáridos sulfatados, principalmente heteromoléculas conteniendo fucosa, y diferentes proporciones de xilosa, ácido glucurónico, galactosa y manosa (Percival 1978).

En general, las proporciones de los diferentes polisacáridos matriciales dependen tanto de la especie como del hábitat y la estación del año. La composición de la matriz también puede ser característica de las distintas generaciones del ciclo de vida, como ocurre en el caso de los polisacáridos del esqueleto. Incluso en algas con generaciones isomórficas, como en algunas de las especies pertenecientes al orden Gigartinales, los gametofitos sintetizan únicamente *kappa*-carragenato mientras los esporofitos sintetizan sólo *lambda*-carragenato (McCandless et al. 1973, McCandless et al. 1982).

Agar y agarasas

El agar es el principal polisacárido matricial de los géneros Gelidium, Gracilaria y Pterocladia. Su molécula está constituída por dos fracciones: agarosa y agaropectina (Araki 1956).

La agarosa es una molécula larga, neutra, formada por D-galactosa, conectada por enlaces $\alpha(1-3)$ con moléculas de 3,6-anhidro-L-galactosa que a su vez están unidas por enlaces $\beta(1-4)$ a la siguiente molécula de Dgalactosa. Los enlaces entre los diferentes monómeros tienen diferente resistencia a las hidrólisis química y enzimática. Los enlaces $\alpha(1-3)$ son fácilmente hidrolizados por ácidos suaves, dando como resultado una serie de oligosacáridos con la 3,6-anhidro-L-galactosa como extremo reductor. La

Componente	Composición química y tipo de enlace	Distribución					
Celulosa	D-Glu-ß(1→4)-D-Glu	Esqueleto					
Acido Algínico	β-D-Man-(1→4)-α-L-Gul	Matriz					
Carragenato	β(1→4)-D-Gal-α(1→3)-D-Gal	Matriz					
Agar	β(1→4)-L-AGal-α(1→3)-D-Gal	Matriz					

 Tabla 1. Principales polisacáridos estructurales en las paredes celulares de algunas macroalgas marinas de las Divisiones Clorofita, Feofita y Rodofita.

Glu: Glucosa; Man: Acido Manurónico; Gul: Acido Gulurónico; AGal: 3,6-Anhidro-Galactosa; Gal: Galactosa

unidad más pequeña de esta serie es la agarobiosa, un disacárido con un enlace β -galactosídico. Los enlaces $\beta(1-4)$ son fácilmente hidrolizados por enzimas, produciendo unidades de neoagarobiosa con un enlace α -galactosídico (van der Meulen 1975).

Algunas unidades de D- y L- galactosa pueden estar metiladas, lo que determina el punto de gelificación de la agarosa y por lo tanto el del agar del que ésta proviene (Armisén y Galatas 1987). Otros residuos polares como el piruvato y el sulfato se encuentran en cantidades traza. La molécula de agarosa es la responsable del alto poder gelificante del agar.

Las agaropectinas tienen un bajo poder gelificante en agua. Están formadas por unidades alternativas de D- y L- galactosa, y contienen todos los grupos polares de la molécula de agar: sulfato (20%) y piruvato (3%). La presencia de grupos metilo, sulfato y piruvato condiciona la hidrólisis de la molécula.

Aunque se conocen bacterias agarolíticas desde comienzos de siglo, el aislamiento, purificación, caracterización y aplicación de las agarasas no se inició hasta finales de la década de los 50. La agarasa obtenida de *Pseudomonas kyotoensis* permitió la obtención de oligosacáridos de la agarosa, dando lugar al establecimiento del primer modelo de la estructura de dicho polímero (Araki 1956). Las agarasas de *Pseudomonas atlantica* y *Cytophaga* NCMB 1327

Figura 1. Estructura química de los principales polisacáridos del esqueleto y la matriz de las macroalgas marinas.



celulosa



agarosa





ácido algínico

.

fueron utilizadas para identificar los polisacáridos matriciales de agarofitas y obtener información de la estructura de los diferentes galactanos del tipo agar (Yaphe 1957, Duckworth y Turvey 1969, Duckworth y Yaphe 1971). No obstante, los estudios sobre purificación y especificidad de las agarasas se han llevado a cabo recientemente (van der Meulen 1975, Morrice et al. 1983a, 1983b, 1984, Aoki et al. 1990, Yamaura et al. 1991).

La hidrólisis enzimática de la molécula de agar hasta obtener sus monómeros es un proceso complejo que implica la acción de diferentes enzimas (Fig. 2) (van der Meulen 1975). En general, las agarasas muestran actividad sobre oligosacáridos de mayor tamaño que el hexámero de la molécula de agarosa. Otra enzima, una tetrasacaridasa, se requiere para hidrolizar el tetrámero y una disacaridasa para hidrolizar el dímero resultante.

Figura 2. Secuencia de la hidrólisis enzimática completa de la molécula de agar según van der Meulen (1975).



Las tetrasacaridasa y disacaridasa obtenidas de *Pseudomonas atlantica* son las únicas oligosacaridasas que han sido estudiadas (Young et al. 1971). Estos mismos autores clasificaron las agarasas en dos grupos: α -agarasas que hidrolizan los enlaces α -, y las β -agarasas (agarosa 3-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.81)que hidrolizan los enlaces β - en la molécula de agarosa.

Enzimas agarolíticas extracelulares con actividad sobre los enlaces ßdel agar (productores de oligosacáridos del tipo neoagarobiosa) han sido obtenidos de diferentes especies bacterianas: *Pseudomonas kyotoensis* (Araki y Arai 1957), *Cytophaga* sp. (Turvey y Christison 1967), y *Pseudomonas atlantica* (Morrice et al. 1983a).

Morrice et al. (1983a, 1983b, 1984) aislaron y caracterizaron dos ßagarasas de *Pseudomonas atlantica*: 1) ß-agarasa I, enzima predominante, con actividad endo-, actuando sobre el agar tanto en solución como gelificado y 2) ß-agarasa II, con una actividad similar, aunque también con actividad sobre el tetrasacárido de la agarosa. Una tercera enzima, neoagarobiosa hidrolasa, que degrada la molécula de neoagarobiosa en sus monómeros había sido purificada previamente por Day y Yaphe (1974) a partir de la misma especie.

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Aunque las β -agarasas han sido descritas con frecuencia, las agarasas que hidrolizan los enlaces α - de la molécula del agar únicamente lo han sido en raras ocasiones (Young et al. 1971, 1978).

La metodología empleada normalmente para cuantificar la actividad agarolítica se ha basado tanto en el aumento del poder reductor como en la disminución de la viscosidad de soluciones de agar o agarosa.

La temperatura óptima descrita para la mayoría de las agarasas bacterianas es de 40°C. Sin embargo, este óptimo puede estar influido por la metodología, que obliga a realizar las mediciones a elevadas temperaturas para prevenir la gelificación de las soluciones. Sólo el uso de sustratos formados por neoagaro-oligosacáridos solubles podría confirmar la influencia del proceso de gelificación en la actividad de la enzima y clarificar por tanto los valores reales de temperatura óptimos (van der Meulen 1975).

Los valores óptimos de pH para la mayoría de las agarasas bacterianas

se han descrito entre 5.0 y 7.2 y sus pesos moleculares entre 18 y 34 kDa (Morrice et al. 1983a, Aoki et al. 1990, Yamaura et al. 1991). El efecto inhibitorio de los iones metálicos Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Al³⁺ ha sido des-crito recientemente (Yamaura et al. 1991).

Los antecedentes sobre la actividad agarolítica en herbívoros marinos son escasos y en ningún caso ha sido cuantificada. La degradación de una solución de agar, entre otros polisacáridos complejos, por extractos crudos de *Diadema antillarum* fue descrita por Lewis en 1964. Kristensen (1972) estudiando diferentes carbohidrasas de algunos invertebrados marinos detectó un aumento mínimo en la concentración de azúcares reductores al incubar diferentes extractos en una solución de agar.

La purificación parcial por cromatografía de afinidad de una agarasa del hepatopancreas de *Littorina mandshurica* ha sido descrita por Usov y Miroshnikova (1975) indicando valores de pH óptimos del extracto crudo y de la agarasa purificada de 5.6 y 6.0 respectivamente.

Al igual que sucede con las agarasas bacterianas, las condiciones de temperatura, dependiendo del tipo de sustrato, influencian en gran medida los ensayos de cuantificación de la actividad enzimática de estos extractos, con lo que la información obtenida hasta el momento no ha sido todo lo completa que cabría esperar.

Carragenatos y carragenasas

El carragenato constituye el principal polisacárido matricial de la pared celular de los géneros *Eucheuma*, *Chondrus*, *Hypnea* y *Gigartina*. Químicamente son galactanos altamente sulfatados (20-38%) y fuertemente aniónicos, característica que los diferencia del agar y el alginato.

En cuanto a su composición química los diferentes carragenatos tienen una estructura básica común, siendo polisacáridos lineales formados por Dgalactosa unida alternativamente por enlaces $\alpha(1-3)$ y $\beta(1-4)$. La diferencia entre los distintos tipos de carragenatos (*kappa-*, *lambda-*, *iota-*, entre otros) radica en el número y la posición de los grupos sulfato (Stanley 1987).

Las carragenasas se extraen principalmente de *Pseudomonas carragee*novora, Klebsiella pneumoniae (Knutsen 1991) y de diferentes cepas de *Cytophaga* (Sarwar et al. 1983, Potin et al. 1991). Diferentes carragenasas capaces de degradar kappa-, iota- y lambda-carragenato han sido aisladas, purificadas y caracterizadas, y enzimas específicas capaces de hidrolizar los enlaces β - de los carragenatos kappa- y iota- han sido descritas (Bellion et al. 1982). Tanto la kappa- como la iota-carragenasa son endoenzimas que producen oligosacáridos del tipo neocarrabiosa. Enzimas digestoras de estos oligosacáridos han sido aislados de *Pseudomonas carrageenovora* (McLean y Williamson 1979, 1981). Sin embargo, no se ha descrito aún la existencia de enzimas que degraden el disacárido en monómeros.

La cuantificación de actividad carragenasa se basa en la misma metodología utilizada para la actividad agarolítica. Las condiciones óptimas de temperatura y pH vienen determinadas en función del tipo de carragenato y de la fuente de enzimas. La *kappa*-carragenasa de *Pseudomonas carragenovora* (Pm = 35 kDa) muestra actividad óptima a 40°C y pH 8.0 (McLean y Williamson 1979). La actividad óptima de la carragenasa obtenida de un cultivo de *Cytophaga* sp. fue detectada en un rango de temperatura que varió entre 25 y 50°C y a pH 7.0 (Sarwar et al. 1983) siendo inhibida en presencia de HgCl₂, AgNO₃ y NaCl (en concentraciones >1.5%). Una *iota*-carragenasa (de una especie no identificada) con Pm aparente de 57 kDa degradó la molécula de *iota*-carragenato hasta producir neocarratetraosa y neocarrahexaosa en unas condiciones óptimas de 40°C, pH 8.0 y en presencia de Na⁺ (0.1 M) (Greer y Yaphe 1984). Una *kappa*-carragenasa de una cepa de *Cytophaga*, con un Pm estimado de 40 kDa y pH óptimo de 7.0 y 7.2 (dependiendo del tampón) ha sido purificada recientemente por Potin et al. (1991).

Las únicas referencias de carragenasas en herbívoros marinos las constituyen los trabajos de Horiuchi y Lane (1965) y Benítez y Macaranas (1979). Los primeros cuantificaron la degradación de diferentes polisacáridos, entre ellos el carragenato, por extractos crudos obtenidos de *Strombus gigas*.

Los segundos purificaron parcialmente una kappa-carragenasa del erizo de mar Diadema setosum.

Alginatos y alginato liasas

El ácido algínico es un polímero lineal basado en dos unidades monoméricas, el ácido β -1,4-D-manurónico y su epímero, el ácido α -1,4-L-gulurónico. Es soluble en soluciones alcalinas y constituye de un 10 a un 45% del peso seco del talo de algas pardas. Se forma por la unión de los monómeros en las posiciones C1 y C4 por medio de un puente eter-oxígeno. La cadena del polímero está constituída por tres clases de regiones o bloques. Los bloques G que contienen sólo unidades derivadas del ácido L-gulurónico, los bloques M que sólo contienen unidades de ácido D-manurónico y los bloques MG que están constituídos por unidades alternativas de ácidos D-manurónico y L-gulurónico. La proporción de estos bloques varía con el alga, y las propiedades físicas de los alginatos dependen de la proporción relativa de estos tres tipos de bloques. La formación de geles por adición de Ca²⁺ está relacionada con la proporción de bloques G de la molécula por lo que, a mayor cantidad de bloques G, mayor fuerza de gel. A su vez, la solubilidad de los alginatos en ácido depende de la proporción de bloques MG (McHugh 1987).

Aunque la gran mayoría de algas pardas contienen alginato, los géneros Laminaria, Macrocystis y Ascophyllum constituyen las principales fuentes para la industria. Las propiedades del alginato no sólo varían de una especie a otra, sino también con el tipo y la edad del tejido, la estación del año y las condiciones de crecimiento (McHugh 1987).

La presencia de enzimas capaces de degradar alginato ha sido demostrada en diferentes especies de bacterias (Doubet y Quatrano 1984, Preston et al. 1985, Boyen et al. 1990, Brown y Preston 1991, Kitamikado et al. 1992, Aasen et al. 1992) y en gran variedad de invertebrados marinos. Está generalmente aceptado que el proceso de la degradación del alginato transcurre como una reacción por ß- eliminación en la cual el poliurónido es degradado a oligómeros, con un ácido urónico 4,5 insaturado en el extremo no reductor del residuo. Las alginato liasas obtenidas de bacterias varían en su especificidad sobre el sustrato (dependiendo del tipo de bloque, ya sean bloques polimanuronatos, poliguluronatos o combinaciones de estos) y su modo de acción. La mayoría parecen poseer actividad endo-. La descripción de enzimas con actividad exo- ha sido menos frecuente, aunque se ha argumentado que este tipo de actividad debería ser común entre bacterias que utilizan el alginato como su única fuente de carbono (Gacesa 1988).

La metodología para la cuantificación de la actividad alginato liasa se basa en la reducción en viscosidad de las soluciones de alginato, la producción de azúcares reductores y otros métodos espectrofotométricos. Las alginato liasas bacterianas han sido utilizadas para analizar la estructura del alginato y la organización macromolecular de la pared celular de las algas pardas (Kloareg y Quatrano 1988, Østgaard 1992).

Las alginato liasas, contrariamente a lo que ocurre con las agarasas y carragenasas, han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas en herbívoros marinos (Eppley y Lasker 1959, Franssen y Jeuniaux 1965, Nakada y Sweeny 1967, Nisizawa et al. 1968, Kristensen 1972, Elyakova y Favorov 1974, Muramatsu et al. 1977, Favorov et al. 1979, Muramatsu y Egawa 1980, Seiderer et al. 1982, Zhu et al. 1987a, 1987b) y, recientemente, en el aislamiento de protoplastos de algas pardas (Boyen et al. 1990). Las alginato liasas parecen ser enzimas constitutivas del equipamiento enzimático de los moluscos, ya que no sólo están presentes en especies ficófagas marinas sino también en especies carnívoras y herbívoras terrestres o de agua dulce. No obstante parece existir una alta correlación entre los hábitos alimenticios y la actividad alginato liasa de los órganos digestivos de estos organismos (Franssen y Jeuniaux 1965).

Se han descrito diferentes tipos de alginato liasas en función de su afinidad por los diferentes bloques que componen la molécula de alginato. Una alginato liasa específica de los bloques constituídos por el ácido Dmanurónico (alginasa I, con actividad endo-) y otra específica de los bloques constituídos por el ácido L-gulurónico (alginasa II, con actividad exo-) fueron Introducción

purificadas a partir del hepatopancreas de Haliotis rufescens y H. corrugata (Nakada y Sweeny 1967). Un extracto de Littorina littorea degradó tanto una solución de ácido algínico como su sal sódica a pH 7.6 (Kristensen 1972). Estudios más detallados sobre la purificación de alginato liasas de los extractos del hepatopancreas de Littorina sp. dieron como resultado la caracterización de una enzima con peso molecular 40 kDa, pH óptimo 5.6, y actividad endo-, específico de los enlaces glicosídicos entre dos residuos de ácido manurónico (Elyakova y Favorov 1974, Favorov et al. 1979). Zhu et al. (1987a, 1987b) purificaron y caracterizaron tres alginato liasas diferentes del tracto digestivo de Lunella coronata coreensis con pH óptimos de 7.6,6.6 y 5.6. Las tres enzimas fueron activadas por KCl y NaCl, inhibidas por MnCl₂, y actuaron con mayor actividad sobre las cadenas que contenían residuos de ácido manurónico. Resultados similares (en cuanto a la activación y especificidad de las alginato liasas) han sido recientemente descritos por Boyen et al. (1990) en extractos de Aplysia depilans y Haliotis tuberculata. En general, el pH óptimo para la mayoría de las alginato liasas parece estar entre 7.2 y 7.8. Sin embargo, en algunos casos las actividades parecen aumentar al hacerlo los valores de pH como en el caso de A. depilans (8.0) y H. tuberculata (9.6) (Boyen et al. 1990). Actividades alginato liasas óptimas se han descrito en un amplio rango de temperaturas que va desde 20 a 40°C.

1.2.- Efecto de la dieta sobre la actividad enzimática

Aunque los estudios sobre las preferencias alimenticias de ficófagos marinos son relativamente numerosos (Carefoot 1980, 1982, Harada y Kawasaki 1982, Sakata et al. 1984, 1986, Shunula y Ndibalema 1986, Granado y Caballero 1991), su capacidad de adaptación enzimática en base a la relación directa entre digestión y dieta ha sido muy poco considerada. En los contados trabajos que han estudiado las características de la digestión (incluyendo la actividad enzimática) al alimentar ciertos herbívoros con dietas específicas, tanto naturales como artificiales, los resultados han sido variables (van Weel 1961,
Neushul 1984, Boyen et al. 1990).

Prosser y van Weel (1958) y van Weel (1959) detectaron un aumento de las carbohidrasas en el molusco *Achatina fulica* alimentado con dietas ricas en almidón. Estos resultados indicaban una evidente adaptación enzimática con la dieta, aunque la inexistencia de alteraciones en la actividad proteasa cuando el molusco fue alimentado con una dieta rica en proteínas no pudo ser interpretada por los autores.

Los ensayos con tres especies de *Haliotis (H. cracherodii, H. corrugata* y *H. rufescens)* realizados por Neushul (1984), indicaron que la dieta algal con la que fueron alimentados (durante un mes) no afectaba significativamente la actividad enzimática, tomando como método de cuantificación la capacidad para disgregar *Sargassum* sp., especie con la que habían sido alimentados. Resultados similares se obtuvieron con el erizo de mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, alimentado monoespecíficamente con *Sargassum muticum* y *Gelidium robustum*. No obstante, la alimentación con una dieta monoespecífica durante períodos cortos (inferiores a un mes) se considera insuficiente para alterar de manera significativa la producción de enzimas en moluscos (van Weel 1961). Asimismo, la evidente subjetividad del método de cuantificación de la actividad enzimática empleado por Neushul no permite obtener conclusiones definitivas del efecto que produce la dieta sobre la composición enzimática de estos herbívoros.

1.3.- Actividad deoxiribonucleasa (DNasa) en extractos de origen marino

Diversos autores han sugerido un posible efecto tóxico sobre las células y protoplastos (tanto de plantas terrestres como de micro y macroalgas) aislados enzimáticamente, debido a la presencia de proteasas, lipasas, peroxidasas y ribonucleasas tanto en las enzimas comerciales (celulasas, pectinasas, etc.) como en los extractos crudos de herbívoros (Tribe 1955, Schenk y Hildebrandt

1969, Berliner 1981, Cocking 1972, Fitzsimons y Weyers 1985, Butler et al. 1990). Sin embargo, no se le ha prestado atención a la cuantificación y caracterización de tales enzimas potencialmente tóxicas.

La purificación de las enzimas específicas, como una solución a este problema, puede resultar en una digestión de la pared celular menos efectiva, debido al hecho de que enzimas adicionales que se encuentran en los extractos crudos pueden ser necesarias para completar la digestión (Schenk y Hildebrandt 1969).

Los extractos crudos de *Aplysia depilans* y *Haliotis tuberculata* contienen bajos niveles de proteasas (Boyen et al. 1990). Otras proteasas y lipasas han sido medidas en diferentes especies de moluscos marinos y peces (Clifford et al. 1982, Feral 1989, Teo y Sabapathy 1990). Sin embargo, las ribonucleasas (DNasas y RNasas) han sido estudiadas únicamente en algunos peces e invertebrados (Ashe et al. 1965, Rasskazov et al. 1975, Domingo et al. 1986, Chou y Liao 1990, Strætkvern et al. 1990) incluyendo unos pocos moluscos (Georgatsos y Antonoglou 1963), ninguno de los cuales ha sido empleado para la digestión de la pared celular y el aislamiento de protoplastos de algas marinas. Estos extractos de origen marino han revelado la existencia de, al menos, dos grupos de enzimas depolimerizadoras de DNA con diferentes propiedades, denominadas DNasas ácida y alcalina (Georgatsos y Antonoglou 1963, Rasskazov et al. 1975).

1.4.- Aislamiento de protoplastos de macroalgas marinas

La primera referencia sobre la obtención de protoplastos de macroalgas marinas (*Enteromorpha intestinalis*) data de 1979 (Millner et al.). Desde entonces, nuevos géneros de algas verdes y varios géneros de algas pardas y rojas han sido añadidos a la lista (Tabla 2), y la descripción de procesos de regeneración completa y de fusión de protoplastos son cada vez más frecuentes. Con el avance en el desarrollo de estas técnicas en macroalgas, recientemente han sido publicados trabajos más específicos en los que se

describen la caracterización de proteínas o la determinación de la concentración de oxígeno intracelular en protoplastos de diferentes especies (Amano y Noda 1992, Matsue et al. 1992).

1.4.1.- Clorofitas

El empleo de enzimas comerciales [Tabla 3, **VI**] ha sido el recurso comunmente empleado para el aislamiento de protoplastos de algas verdes (Tabla 2), aunque el empleo de extractos crudos de herbívoros marinos comienza a ser utilizado con mayor frecuencia (Reddy et al. 1989, Reddy et al. 1990, Reddy y Fujita 1991). La relativa sencillez estructural de estas algas (cuya pared celular se asemeja a la de las plantas terrestres) hace el aislamiento de protoplastos un proceso mucho más reproducible, comparándolo con el de algas más complejas. De ahí que el empleo únicamente de Celulasa R10 haya producido rendimientos de hasta 4.5×10^6 protoplastos g⁻¹ PF de *Monostroma angicava* (Saga 1984, Saga y Kudo 1989). La adición de otras enzimas (p.e., Macerozima) no mejora significativamente los rendimientos en *Enteromorpha*, *Monostroma* y *Ulva* (Saga 1984). Sin embargo, el empleo exclusivo de celulasa en la digestión de diferentes especies de *Ulva* no fue suficiente para alcanzar buenos rendimientos, que sí se obtuvieron (6.0 x 10⁶ protoplastos g⁻¹ PF) al combinar un extracto crudo de *Haliotis* sp. y celulasa (Reddy et al. 1989).

El éxito y la estandarización de los procesos de aislamiento y regeneración de los protoplastos de las especies citadas anteriormente (Fujita y Migita 1985, Fujimura et al. 1989a, Reddy et al. 1989, Saga y Kudo 1989) han posibilitado el desarrollo de técnicas como la immobilización (Fujimura et al. 1989b) y la preparación de híbridos somáticos por electrofusión (Reddy et al. 1992) o por utilización del polietilen glicol (Reddy y Fujita 1989). Tabla 2. Condiciones físicas del aislamiento, rendimiento y viabilidad de los protoplastos de macroalgas marinas. EC = Extracto Crudo.Pre-= Pre-tratamiento (esterilización, pre-plasmolisis, etc.); T = Temperatura de incubación; t = Tiempo de incubación; Viab = Viabilidad(+ = Regeneración o División celular). LAP = Extracto en acetona de Patella sp. AL = Alginato liasas.

Especie	Pre-	Enzimas	Osmótico	pН	T (°C)	t(h)	Rendimiento (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
Chlorophyta									
Enteromorpha intestinalis	-	4% Driselasa + 0.4% Pectinasa	Sorbitol	6.0	10-12	12-17	?	85-90	Millner et al. 1979
Ulva linza Monostroma angicava	+++++	4% Celulasa R10 + 2% Pectoliasa	Glucosa	?	?	?	?	73+	Zhang 1983
Enteromorpha linza Monostroma zostericola Ulva pertusa	-	2% Celulasa R10	Manitol	6.0	20-25	1	>10 ⁶ 5.0 x 10 ⁶ >10 ⁴	>80	Saga 1984
Enteromorpha linza Monostroma nitidum Ulva pertusa	-	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	Fujita y Migita 1985
Enteromorpha intestinalis	-	2% Celulasa R10	Sorbitol	6.0	20	4	4.0 x 10 ⁵	?	Saga et al. 1986
Enteromorpha intestinalis Ulva angustata	-	3% Celulasa RS + 1% Macerozima	?	?	?	1-2	?	?	Polne-Fuller y Gibor 1987
Ulva pertusa Ulva fasciata Ulva conglobata		Haliotis (EC) + 5% Celulasa R10	Manitol	6.0	20	2.5-4	1.5-6.0 x 10 ⁶	64-99	Reddy et al. 1989
Ulva pertusa	+	2% Celulasa R10 + 2% Macerozima + 2% Driselasa	Manitol	5.8	20-23	2-3	4.8 x 10 ⁶	90	Fujimura et al. 1989a

Especie	Pre-	Enzimas	Osmótico	pН	T (°C)	t(h)	Rendimiento (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
Monostroma angicava	+	5% Celulasa R10	Manitol	6.0	5-25	1-10	4.0-5.0 x 10 ⁶	>80+	Saga y Kudo 1989
Enteromorpha linza Enteromorpha compressa Enteromorpha prolifera	- -	2% <i>Turbo</i> (EC) + 3% Celulasa RS	Manitol	6.0	20	3	$\begin{array}{c} 1.03.7 \times 10^7 \\ 1.03.2 \times 10^7 \\ 0.22.0 \times 10^7 \end{array}$	85-90+	Reddy y Fujita 1991
Phaeophyta									
Laminaria japonica	-	Strongylocentrotus (EC)	Manitol	7.0	?	Var	10 ³	<10	Saga y Sakai 1984
Macrocystis pyrifera Sargassum muticum	-	Haliotis (EC) + 1% Macerozima + 1% Pectinasa	Sorbitol	6.0	20-25	10	2.0×10^4	?	Saga et al. 1986
Dyctiota dichotoma Dyctiopteris prolifera Dyctiopteris undulata	+ + +	Haliotis (EC), Batillus (EC), Crassostrea (EC) + 2% Celu- lasa R10 + 2% Macerozima + 2% Driselasa + 2% Hemi- celulasa + 1% Pectoliasa	Manitol	6.0	20-23	3-4	6.1 x 10 ⁶ 6.1 x 10 ⁶ 8.2 x 10 ⁶	70-80	Kajiwara et al. 1988
Fucus distichus (zigotos)	-	1.2-2% Celulasa + 6-10U AL Haliotis y Aplysia (EC)	Sucrosa	5.8 7.8	25	8-14 6	>95 % cel >95 % cel	? ?	Kloareg y Quatrano 1987
Sargassum muticum	-	2% Celulasa RS + 10% LAP (EC)	Sorbitol	6.0	?	24	?	?	Fisher y Gibor 1987
Sphacelaria spp.	-	2% Celulisin + 0.5% Pecto- liasa + 0.2% AL (EC)	Manitol	5.8	20	12	260-4600	?	Ducreaux y Kloareg 1988
Undaria pinnatifida	-	Aplysia (EC) o Haliotis sp (EC)	Manitol	6.2	25	1-1.5	1.5-4.0 x 10 ⁵	?	Tokuda y Kawashima 1988
Macrocystis pyrifera	+	2% Celulasa + 30U AL (EC)	Sorbitol	6.5	22	2-3	10 ⁷ - 10 ⁸	21-76	Kloareg et al. 1989
Laminaria saccharina Laminaria digitata	+ +	2% Celulasa + AL (Haliotis 0.5-5U y Psudomonas 1-2U) (EC)	NaCl	6.5	16	3-8	10 ⁷ - 10 ⁸	>80	Butler et al. 1989
Pilayella littoralis	+	2% Celulasa R10 + 1% Macerozima + 2% AL 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	Osmótico	pН	T (°C)	t(h)	Rendimiento (prot·g ⁻¹ PF)	Viab (%)	Referencia
Rhodophyta						×			
Porphyra suborbiculata	-	Turbo (EC) + 2% Celulasa	Glucosa	6.5	32	?	?	?	Tang 1982
Porphyra yezoensis	-	Strongylocentrotus (EC)	Manitol	7.0	?	Var	0.3-1.0 x 10 ⁶	<10	Saga y Sakai 1984
Porphyra perforata	-	Haliotis spp (EC)	Sorbitol	6.0	20-25	5-10	?	80	Polne Fuller y Gibor 1984
Gracilaria tikvahiae Gracilaria lemaneiformis	-	2% Celulasa R10 + 3% Macerozima + 1% Agarasa + 0.5% Pectoliasa	Manitol	5.0	26	2-2.5	0.8-4.2 x 10 ⁵	31	Cheney et al. 1986
Porphyra leucosticta	-	<i>Littorina</i> (EC) + 1.5% Celu- lasa R10 + 0.5% Pectinasa	Sorbitol	7.0	15	1	10 ⁴ .	?	Chen 1987
Chondrus crispus	+	Pseudomonas (EC) + 1% Ce- lulasa	NaCl	7.0	16	12-18	1.0-8.5 x 10 ⁸	>90	LeGail et al. 1990
Gigartina corymbifera Gigartina exasperata Gigartina harveyana	- -	5U carragenasa <i>Pseudomonas</i> + 2% Celulasa + 2% Mace- rozima + 0.2% Pectoliasa	Manitol	7.0	20	2-4	$\begin{array}{c} 1.5\text{-}2.0 \times 10^{7} \\ 5.0 \times 10^{6} \\ 1.0 \times 10^{6} \end{array}$	>95	Gross 1990
Gracilaria lemaneiformis Gracilaria sordida Gracilaria verrucosa Gracilaria tenuistipitata		2% Celulisin + 0.01% Aga- rasa	Manitol	5.8	25	1-4	10 ⁵ - 10 ⁷	?	Björk et al. 1990
Porphyra nereocystis	-	10% Papaína y 2% Haliotis sp (EC)	Manitol	6.0	10	2	0.2-0.3 x 10 ⁶	?+	Waaland et al. 1990
Chondrus ocellatus		8% Haliotis sp + 3% Celula- sa	Sorbitol	6.0	15	?	10 ⁶	?+	Zhang 1991
Palmaria palmata	+	0.1-0.2% Haliotis + 3% Celulasa R10	Manitol	6.0	21	1-1.5	4.0 - 6.0 x 10 ⁷	70 15-20 +	Liu et al. 1992

.

El aislamiento de protoplastos de algas pardas se ha desarrollado siguiendo la metodología descrita en los primeros trabajos (Saga y Sakai 1984, Saga et al. 1986) empleando una combinación de celulasa y extractos crudos de moluscos, equinodermos o bacterias. La mayoría de los grupos de investigación obtiene, purifica y caracteriza las alginato liasas, que emplean para el aislamiento de protoplastos de macroalgas marinas, de herbívoros marinos y bacterias (Liu et al. 1984, Kloareg y Quatrano 1987, Kajiwara et al. 1988, Butler et al. 1989, Boyen et al. 1990).

Kloareg y Quatrano (1987) han descrito diversos métodos para el aislamiento de protoplastos viables a partir de zigotos de *Fucus distichus*. Ducreaux y Kloareg (1988) describieron por primera vez la regeneración de protoplastos de un alga parda, *Sphacelaria* sp. Desde ese momento, la descripción de la obtención frecuente de gran cantidad de protoplastos viables de especies de *Laminaria y Macrocystis* con la utilización de alginato liasas definidas y específicas para los bloques manurónico o gulurónico (obtenidas de *Haliotis tuberculata y Pseudomonas alginovora* respectivamente) parece confirmar la reproducibilidad de los protocolos de aislamiento con estas especies (Butler et al. 1989, Kloareg et al. 1989, Benet y Kloareg 1991).

La aplicación de los protoplastos obtenidos de *Macrocystis pyrifera* en estudios de fotosíntesis y la detección de bromoperoxidasas tanto en protoplastos de *M. pyrifera* como de *Laminaria digitata* y *L. saccharina* han sido descritos recientemente (Davison y Polne Fuller 1990, Butler et al. 1990, Jordan et al. 1991).

1.4.3.- Rodofitas

El aislamiento de protoplastos de algas rojas ha estado, hasta hace poco tiempo, restringido al genero *Porphyra* (Tabla 2) [Tabla 1, VI] y, en un único

estudio, a dos especies de *Gracilaria* (Cheney et al. 1986). Sólo a partir de 1990 se han empleado estas técnicas con éxito en varias especies de *Gracilaria* (Björk et al. 1990), *Gigartina* (Gross 1990), *Chondrus crispus* (LeGall et al. 1990) y *Palmaria palmata* (Liu et al. 1992).

Al igual que sucede con algas pardas, los mayores rendimientos han sido logrados con combinaciones de extractos crudos de ficófagos o microorganismos y celulasas comerciales. La única excepción la constituye los mejores resultados obtenidos con una combinación de agarasa purificada de *Pseudomonas atlantica* y celulasa en especies de *Gracilaria* (Cheney et al. 1986, Björk et al. 1990). Sin embargo, el precio de las agarasas comerciales (5000 Unidades de agarasa Sigma cuestan 38530 Ptas, 500 U de agarasa Boehringer Mannheim 38500 Ptas y 500 U de agarasa Calbiochem 92400 Ptas) hace muy costosa su utilización en ensayos rutinarios.

Aunque gran parte de los protoplastos obtenidos de algas rojas se han descrito como viables, fotosintéticamente activos o capaces de desarrollar nueva pared celular, la regeneración de planta completa se ha obtenido únicamente con algunas especies de *Porphyra* (Polne Fuller y Gibor 1984, 1990, Fujita y Migita 1985, Araki et al. 1987, Wang et al. 1987, Chen 1987, Dai et al. 1988, Waaland et al. 1990). La relativa facilidad con la que se obtienen rendimientos elevados en estas especies [*Porphyra* es un alga foliosa formada por una o dos capas celulares (Polne-Fuller y Gibor 1984)], la capacidad de regeneración de sus protoplastos y el interés comercial de este género, han propiciado la realización de estudios de hibridación somática (Saga et al. 1986, Fujita y Migita 1987, Reddy y Fujita 1989, Araki y Morishita 1990, Fujita y Saito 1990, Reddy et al. 1990, Saito y Fujita 1991, Mizukami et al. 1992, 1993).

La regeneración de la pared celular en protoplastos de *Palmaria* palmata ha sido estudiada con detalle por Liu et al. (1992). El 15-20% de los protoplastos de esta especie completaron la regeneración de pared celular en su totalidad y sobrevivieron más de un mes, pero sólo el 1-2% de éstas fueron capaces de dividirse por segunda vez. Por otra parte, estudios sobre los mecanismos de asimilación de carbono inorgánico, fotosíntesis y actividad anhidrasa carbónica han sido realizados con protoplastos de *Chondrus crispus* (Smith y Bidwell 1989) y *Gracilaria tenuistipitata* (Haglund et al. 1992).

1.5.- Factores que afectan el rendimiento de protoplastos

1.5.1.- Enzimas digestoras de pared celular

Para digerir 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 de macroalgas marinas con gran efectividad, sin embargo, difieren en actividad y en el contenido de otras enzimas digestoras como xilanasas, mananasas y glucanasas (Butler et al. 1990). Estas enzimas asociadas pueden ser decisivas para la digestión completa de la pared y pueden explicar la utilización y efectividad de la celulasa en el aislamiento de protoplastos de algunas especies de *Porphyra* que no contienen celulosa en su pared celular (Tabla 2).

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Aunque moluscos, equinodermos y bacterias constituyen la fuente de enzimas más comúnmente empleada, la composición y actividad específica de las enzimas presentes en los extractos crudos de estos organismos no ha sido cuantificada ni caracterizada, a excepción de las alginato liasas de *Aplysia depilans* y *Haliotis tuberculata* (Boyen et al. 1990). Este hecho explica la práctica inexistencia de datos sobre los efectos de enzimas específicas en el proceso de aislamiento (Bellanger et al. 1990) y su reproducibilidad.

1.5.2.- Material vegetal de partida

Características tales como tasas de crecimiento, composición celular, edad, fase del ciclo biológico y el estado fisiológico del alga afectan tanto el ren-

dimiento como la totipotencia de los protoplastos (Kloareg y Quatrano 1988, Björk et al. 1990, Butler et al. 1990). Características de la pared celular, como su composición, dependen de factores tales como la zona del alga escogida como explanto, la estación de recolección, la localización geográfica o las condiciones de cultivo, los cuales condicionan la eficacia enzimática.

Polne-Fuller y Gibor (1984), han identificado cuatro áreas diferentes en el talo de *Porphyra perforata* en función del rendimiento y totipotencia de los protoplastos que producen. Diferencias significativas en el rendimiento de protoplastos de *Macrocystis pyrifera* en base a la profundidad a la que crece el alga han sido descritas por Kloareg et al. (1989). Estas diferencias fueron atribuídas a las diferentes proporciones relativas de bloques gulurónico y manurónico entre los frondes. LeGall et al. (1990) obtuvieron los máximos rendimientos empleando los ápices en lugar del talo completo, tanto de plantas cultivadas intensivamente como de plantas salvajes de *Chondrus crispus*. Björk et al. (1990) demostraron la influencia de la tasa de crecimiento en el rendimiento de protoplastos de diferentes especies de *Gracilaria*. Tasas de crecimiento del 10 al 20% diarias produjeron rendimientos entre 10^5 y 10^7 protoplastos g⁻¹ PF en *G. sordida, G. tenuistipitata y G. lemaneiformis*. La relación directa entre tasa de crecimiento y rendimiento se asoció con la menor complejidad de la pared celular en las zonas de mayor crecimiento.

La relación directa entre algunas características fisiológicas relacionadas con el metabolismo del carbono y las condiciones en las que el alga se desarrolla, bien sea en la naturaleza o en condiciones de cultivo (p.e., el pH del medio), y que afectan tanto a la composición de la pared celular como a los factores como la tasa de crecimiento, hacen que los estudios fisiológicos básicos sean de gran importancia para el conocimiento de las especies con las que se trabaja y su manera de reaccionar ante condiciones particulares.

1.5.3.- Condiciones de incubación

Temperatura y pH

La actividad de las enzimas digestoras de la pared celular depende tanto de la temperatura como del pH. Aunque las actividades máximas de las polisacaridasas se obtienen a temperaturas superiores a 30°C, estas temperaturas afectan negativamente la viabilidad celular. Los rangos utilizados para la digestión enzimática de macroalgas varían de 10 a 25°C (Tabla 2) 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, superiores a los empleados en plantas terrestres (que varían de 5.4 a 6.2) (Evans y Bravo 1984). Las actividades enzimáticas óptimas de diversas enzimas utilizadas en la digestión suelen ser bastante diferentes (p.e., celulasas, pH 6.0, y alginato liasas, pH 8.0) (Butler et al. 1990). En este caso, Kloareg y Quatrano (1987) han utilizado con éxito la incubación del tejido en dos fases.

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 polisacáridos matriciales y aumentando la accesibilidad de la celulosa, el alginato o el carragenato a las enzimas digestivas (Butler et al. 1989, 1990, LeGall et al. 1990).

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 el rendimiento entre 4 y 5 veces superior al obtenido con plantas sin tratamiento (Butler et al. 1989, Kloareg et al. 1989). Un aumento del 50% fue obtenido por LeGall et al. (1990) en *Chondrus crispus* cuando emplearon el Kryptofix 222, un quelante específico de potasio. Sin embargo, en este último estudio cuando los experimentos se llevaron a cabo utilizando EDTA, EGTA o variando las concentraciones de ClK del medio de incubación, no se produjeron cambios significativos en los rendimientos.

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 tenga lugar provocando la explosión de los protoplastos. 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-plasmolisis en los procesos de aislamiento de protoplastos en macroalgas marinas (Butler et al. 1989, Björk 1992).

Por otro lado, durante el proceso de plasmolisis los protoplastos absorben sustancias del medio (Cocking 1972) por lo que la plasmolisis directa en la solución enzimática puede provocar la acumulación de enzimas y agentes contaminantes en la célula. El efectuar la pre-plasmolisis puede prevenir el posible efecto tóxico de la asimilación de productos.

Los factores que influyen en el proceso de plasmolisis y en el aislamiento de protoplastos incluyen el potencial osmótico del medio y el agente osmótico utilizado. El ajuste entre 1000 y 1700 mOsm kg⁻¹ de las soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de macroalgas (Butler et al. 1989, Björk 1992) es superior al utilizado con plantas terrestres (de 300 a 1000 mOsm kg⁻¹). Los agentes osmóticos más frecuentemente utilizados se muestran en la Tabla 2.

1.6.- Objetivos

Los objetivos de la Tesis se han centrado en los sigientes puntos:

- Desarrollar un método de extracción, purificación parcial y caracterización enzimática para cuantificar las actividades agarasa, celulasa, carragenasa y alginato liasa de herbívoros marinos, compararlas con las fuentes comerciales de enzimas tradicionalmente empleadas, y determinar la influencia de la temperaturas y pH sobre su actividad *in vitro*.
- Desarrollar un método que permitiera la cuantificación de actividad agarasa a temperaturas adecuadas para el aislamiento de protoplastos viables.
- Estimar la capacidad de adaptación enzimática de herbívoros marinos para la digestión de polisacáridos matriciales, con la finalidad de obtener extractos enzimáticos específicos.
- Cuantificar la actividad deoxiribonucleasa de los extractos enzimáticos de herbívoros y su posible toxicidad en el aislamiento de protoplastos.
- 5) Estimar la relación entre la actividad *in vitro* de las polisacaridasas de los extractos digestivos de herbívoros marinos y los comerciales, y su efectividad real en la digestión de la pared celular de macroalgas.
- 6) Determinar la influencia del material vegetal (tasa de crecimiento, edad, pH del medio de cultivo, características fisiológicas) y de pretratamientos del explanto (efecto de ultrasonidos, pre-plamolisis, quelantes, pH) sobre el rendimiento de protoplastos.

En los artículos I y II se describen la preparación y caracterización de los extractos crudos de herbívoros marinos, en los artículo III y IV el aislamiento de protoplastos y en el III y V se desarrollan los estudios de fotosíntesis y asimilación de carbono inorgánico tanto en protoplastos como en macroalgas. El artículo VI constituye una revisión del "estado del arte" de la aplicación de estas técnicas a macroalgas marinas.

⊘ Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

•

2.- MATERIAL Y METODOS

Las metodologías utilizadas para llevar a cabo los ensayos se describen detenidamente en los capítulos de material y métodos de los anexos respectivos. En este capítulo se describe la metodología de resultados no publicados.

2.1.- Descripción de las especies herbívoras

2.1.1.- Aplysia dactylomela Rang

Molusco gasterópodo perteneciente a la Familia Aplysiidae, Orden Aplysiacea. Conocido como "liebre de mar", es un animal con una pequeña concha interna. Puede alcanzar hasta 40 cm de longitud y 1400 g de peso. Su ciclo de vida varía entre los 10 y los 11 meses.

Se localiza en la zona intermareal y fondos próximos sobre sustratos rocosos donde se alimenta de gran variedad de macroalgas, tanto diferentes especies de Rhodophytas (p.e., *Corallina, Laurencia, Gracilaria*) como de Chlorophytas (p.e., *Ulva, Cladophora*) (Carefoot 1987). Su apetito es voraz y sus tasas de crecimiento elevadas.

Los animales analizados en este trabajo fueron recolectados en la plataforma rocosa de la zona intermareal de la playa de Arinaga, donde existe gran variedad y cantidad de especies de macroalgas.

2.1.2.- Littorina striata King et Broderip

Molusco gasterópodo perteneciente a la Familia Littorinidae, Orden Mesogastropoda. El régimen alimenticio de las diferentes especies de *Littorina* es omnívoro aunque prefieren los organismos vegetales, tanto microflora (diatomeas y algas verde-azules) como macroalgas (Hawkins y Hartnoll 1983).

Los individuos utilizados en el presente estudio fueron recolectados en la Punta de Taliarte (Telde).

2.1.3.- Haliotis coccinea canariensis Nordsieck

Molusco gasterópodo perteneciente a la Familia Haliotidae, Orden Archaeogastropoda. Se localiza en la zona infralitoral, bajo piedras o rocas a poca profundidad. Es un molusco de hábitos nocturnos y su alimentación se basa preferentemente en diferentes especies de Rodofitas, Feofitas y Clorofitas.

Los individuos analizados en este trabajo fueron recolectados en el muelle de Taliarte.

2.1.4.- Diadema antillarum Phillipi

De los ficófagos estudiados, es el único que pertenece al Phylum Equinodermata (Familia Diadematoidae, Orden Diadematoida). Al igual que otras especies de erizos son organismos ramoneadores generalistas nocturnos, dependiendo de la disponibilidad se alimentan de una gran variedad de algas (su dieta predominante), organismos incrustantes y sésiles, detrito o el mismo sustrato (Lawrence 1975, Hawkins y Hartnoll 1983).

Los individuos analizados en este estudio fueron recolectados en Arinaga y Taliarte.

2.2.- Extracción y caracterización de los extractos enzimáticos

La metodología de extracción y cuantificación de actividad enzimática de las diferentes polisacaridasas, descripción de sustratos, otras fuentes de enzimas y la determinación de proteínas y azúcares reductores se describen en el ar-

tículo I. La cuantificación de la actividad DNasa y la medida del pH del sistema digestivo de los diferentes herbívoros marinos se describen en el artículo II, y la cuantificación de actividad carragenasa se describe en el artículo IV.

2.3.- Cultivos bacterianos

Para determinar la existencia de bacterias agarolíticas en los diferentes sistemas digestivos de los herbívoros estudiados, se realizaron siembras en placa de muestras tomadas de los restos del tracto digestivo obtenidos tras el proceso de homogeneizado. El medio de cultivo enriquecido empleado fue el descrito por Morrice et al. (1983a). Una vez el pH del medio era ajustado a 7.5, era esterilizado en el autoclave durante 20 min y dispensado en placas Petri de 9 cm de \emptyset .

2.4.- Cultivo de Aplysia dactylomela y Haliotis coccinea canariensis. Ensayo de dietas monoespecíficas

Los ejemplares de *Aplysia dactylomela* (de peso medio 449.37 ± 57.66 g (n=10)) fueron cultivados en tanques de fibra (50 x 70 cm), a una densidad de 3-5 individuos por tanque, con flujo continuo de agua de mar durante 35-40 días. La altura del agua en los tanques se mantuvo a 20 cm y la aireación constante. Los individuos fueron alimentados con tres dietas monoespecíficas de *Ulva rigida, Solieria filiformis y Gracilaria* spp., consumiendo aproximadamente unos 100 g PF de alga día⁻¹ antes de proceder a la extracción de los sitemas digestivos.

Los extractos de los diferentes individuos fueron preparados del esófago ($V_1 = 19.37 \pm 3.50$ mL) y la glándula digestiva ($V_2 = 21.00 \pm 5.93$ mL).

Los ejemplares de Haliotis coccinea canariensis fueron alimentados, en las mismas condiciones, durante una semana con mezclas de Solieria filiformis, Hypnea musciformis, Grateloupia doryphora y Gracilaria tenuistipitata, mostrando una clara preferencia por Solieria filiformis por lo que fueron cultivados durante dos meses con esta especie antes de proceder a la extracción de los sistemas digestivos.

2.5.- Purificación parcial de la agarasa de los extractos crudos de Aplysia dactylomela

La separación de las fracciones de los extractos del esófago y de la glándula digestiva de *Aplysia dactylomela* se efectuó por cromatografía estándar con filtración en gel. La columna (2.6 x 40 cm) se empaquetó con dos geles, Sephacryl S-300 y Sephadex G-100, previamente equilibrados con agua destilada siguiendo el procedimiento descrito por la compañía Pharmacia (1991). Una vez empaquetada, y antes de cargar la muestra, la columna fue equilibrada con tampón fosfato (0.1 M, pH 6.0). Un volumen de 5.0 mL de extracto fue pasado a través de la columna, eluído con tampón fosfato (0.1 M, pH 6.0) a un flujo de 1.0 mL min⁻¹ y las fracciones recogidas en un colector en volúmenes de 5.0 mL. La concentración de proteínas fue determinada midiendo la A_{280nm} de las fracciones recolectadas. La actividad agarasa se determinó siguiendo la metodología descrita en el artículo **I**.

2.6.- Descripción de las especies vegetales

2.6.1.- Solieria filiformis (Kützing) Gabrielson

Especie perteneciente a la Familia Solieriaceae del Orden Gigartinales (Rhodophyta). Previamente denominada Agardhiella tenera (J. Agardh)

Schmitz o Solieria tenera (J. Agardh) Wynne et Taylor, presenta crecimiento multiaxial, crece erecta desde un sistema basal fibroso y puede alcanzar una altura de 15-20 cm. Productora de *iota*-carragenato, las algas utilizadas en este estudio fueron recolectadas en el interior del muelle de Taliarte donde crecen libremente (no fijadas al sustrato) conformando una morfología esférica laxa.

2.6.2.- Hypnea musciformis (Wulfen) Lamouroux

Especie perteneciente a la Familia Hypnaceae del Orden Gigartinales (Rhodophyta). El género *Hypnea* es uno de los géneros de algas rojas de mayor polimorfismo. Se encuentra ampliamente distribuído en las costas tropicales, donde es muy abundante, y sub-tropicales. Las especies pertenecientes a este género han sido descritas principalmente como productoras de *kappa*carragenato. Especie intermareal, en las islas se puede encontrar en charcos, asociada a un sustrato o a diferentes especies de algas pardas como *Sargassum* y *Cystoseira*. La recolección de esta especie se llevó a cabo en la plataforma intermareal de la playa de Arinaga.

2.6.3.- Grateloupia doryphora (Montagne) Howe

Perteneciente a la Familia Halymeniaceae del Orden Cryptonemiales (Rhodophyta). Es abundante en ambientes protegidos y semiexpuestos al oleaje, viviendo sobre rocas en niveles bajos de marea mostrando gran plasticidad morfológica. Productora de *lambda*-carragenato, las plantas utilizadas en este estudio fueron recolectadas en la punta de Taliarte.

2.6.4.- Gracilaria tenuistipitata var. liui Zhang et Xia

Perteneciente a la Familia Gracilareaceae del Orden Gigartinales (Rhodophyta). Normalmente crece en forma libre (no fijada al sutrato). Esta especie agarofita, posee interesantes propiedades fisiológicas como su gran tolerancia a las variaciones de salinidad y temperatura y su resistencia a los pH elevados y a las infecciones por epífitos.

2.6.5.- Ulva rigida C. Agardh

Perteneciente a la Familia Ulvaceae del Orden Ulvales (Chlorophyta). Si bien muestra un ligero carácter estacional, esta especie fue recolectada en el interior del muelle de Taliarte donde se la puede encontrar principalmente creciendo en cuerdas muy cerca de la superficie, en immersión constante.

2.7.- Cultivo de las especies vegetales

El cultivo de las diferentes especies se realizó en un invernadero, donde la irradiación no supera los 1300 μ moles m⁻² s⁻¹, en tanques de 300 L con bombeo continuo de aire. El agua de mar (20 ± 2°C) era enriquecida con nutrientes (Provasoli 1968) y el medio renovado semanalmente.

Otras condiciones de cultivo utilizadas con Ulva rigida y Solieria filiformis se describen en los artículos III, IV y V.

2.8.- Aislamiento de protoplastos

La metodología del aislamiento de protoplastos se describe en los artículos III y IV. Aunque en estos artículos no se describe el aislamiento de protoplastos de *Hypnea musciformis*, *Grateloupia doryphora* y *Gracilaria tenuistipitata* el proceso empleado en los experimentos fue exactamente igual para todas las especies.

2.9.- Fotosíntesis, alcalinización del medio y actividad anhidrasa carbónica en *Solieria filiformis*

La descripción de la metodología utilizada para llevar a cabo estos experimentos es descrita detenidamente en el artículo V. En este estudio no se realizó otro tipo de experimentación más que la que es descrita en él.

•

.

3.- RESULTADOS

3.1.- Método de extracción

3.1.1.- Precipitación con sulfato amónico

En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de actividad obtenidos con las distintas concentraciones de sulfato amónico añadidos a las diferentes soluciones enzimáticas. Concentraciones de sulfato amónico superiores al 80% no aumentaron las actividades enzimáticas en ningún extracto.

Tabla 3. Porcentaje de actividad enzimática (medida como actividad agarasa)de extractos de Aplysia dactylomela.

% (NH ₄) ₂ SO ₄	% actividad
20	11
30	36
40	72
60	88
80	100

3.1.2.- Diálisis y filtración en gel

Aunque la eliminación de solutos de bajo peso molecular $((NH_4)_2SO_4, NaCl,$ etc.) por medio del dializado fue efectiva, se detectaron ciertas desventajas al comparar este método con la filtración del extracto a través de columnas preempaquetadas con Sephadex G-25 (Pharmacia). El problema principal del dializado fue la degradación de las bolsas de diálisis (compuestas de celulosa) debido probablemente a la acción de las celulasas contenidas en los extractos, dando como resultado la pérdida de los mismos.

3.2.- Actividades enzimáticas [I]

Todos los sistemas enzimáticos degradaron los sustratos experimentados aunque se observaron diferencias significativas de actividad entre i) especies, ii) tipo de sustrato y iii) condiciones de temperatura y pH.

Debido a la escasez de individuos de *Haliotis coccinea canariensis* (aunque endémica, no es una especie abundante), los extractos preparados de esta especie se utilizaron en experimentos muy concretos de cuantificación de actividad carragenasa y aislamiento de protoplastos cuyos resultados se describen en los apartados 3.6 y 3.8, y en el artículo **IV**.

En general, la concentración total de proteínas fue de 3 a 5 veces superior en los extractos de Aplysia dactylomela y Haliotis coccinea canariensis que en los de AAP, Littorina striata y Diadema antillarum [Tabla 1, I]. Estas diferencias en la concentración de proteínas afectaron los resultados al expresarlos como actividad enzimática específica. Los extractos de A. dactylomela fueron los que mayor actividad celulasa y agarasa mostraron, mientras que el AAP mostró la mayor actividad alginato liasa (Tabla 4). En la Fig. 2 [I] se muestra la evolución de la producción de azúcares reductores de los extractos en diferentes condiciones de temperatura, pH y sobre los diferentes tipos de sustratos. Los extractos de A. dactylomela mostraron la mayor tasa de producción de azúcares reductores en todos los sustratos, exceptuando el alginato de sodio, sobre el que el AAP mostró poseer la mayor actividad. En la Fig. 2A [I] se muestran las diferencias de actividad agarasa entre los sutratos agar y extracto frío (EF). Después de 4 horas de incubación, no se detectaron aumentos en la producción de azúcares reductores.

Tabla 4. Actividades enzimáticas de los diferentes extractos expresadas como μ g AR h⁻¹ en diferentes condiciones de temperatura y pH. EF: Extracto frío de *Gracilaria* spp. CMC: Carboximetil celulosa. Alg: Alginato de sodio. AAP: Extracto en acetona de *Haliotis* sp. (Sigma).

Extracto	pH Actividad enzimática (μ g AR h ⁻¹)								
		EF		Agar	Agar CMC			Alg	
		25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
A. dactylomela	6.0	393.08	472.44	122.76	291.40	458.18	459.42	88.04	279.62
	7.2	239.32	360.22	1 20.28	286.44	388.12	482.98	111.60	323.64
AAP	6.0	141.93	182.02	77.90	29.07	176.51	221.92	168.15	63.46
	7.2	90.06	122.74	24.32	46.36	145.92	152.00	266.00	343.90
H. coccinea canariensis	6.0	59.63	-	-	• •	328.97	-		-
	7.2	46.23	-	-	-	265.32	-	-	-
L. striata	6.0	66.24	16.20	89.64	23.16	147.12	130.44	72.12	78.36
	7.2	52.68	25.44	61.20	17.16	107.40	147.48	60.72	134.52
D. antillarum	6.0	79.80	161.69	169.29	108.30	123.12	139.65	54.72	28.12
	7.2	147.82	202.92	150.48	140.79	134.14	130.72	53.58	12.73

3.2.1.- Actividad celulasa

Todos los extractos mostraron óptimos de actividad celulasa a 40°C. Sin embargo, los óptimos de pH variaron en función de la especie. En los extractos de las diferentes especies de *Haliotis (Haliotis coccinea canariensis* y el AAP) y *Diadema antillarum* las mayores actividades específicas se obtuvieron a pH 6.0, mientras que en *Aplysia dactylomela* y *Littorina striata* fueron observadas a pH 7.2 [Tabla 1, I]. La mayor producción de azúcares reductores, en μ g AR h⁻¹ (medidos como glucosa), se obtuvo con los extractos de *A. dactylomela*.

3.2.2.- Actividad agarasa

La actividad agarasa de los extractos estuvo fuertemente condicionada por el tipo de sustrato utilizado. El EF de *Gracilaria* spp. fue digerido con mayor facilidad que las soluciones de agar natural y agarosa [Tablas 1, 2 y Fig. 2A, I]. Las condiciones óptimas de temperatura y pH fueron 40°C y 6.0 en la mayor parte de los extractos ensayados. En *Littorina striata* la mayor actividad específica tanto para el extracto frío como para el agar se obtuvo a 25°C.

La actividad agarasa de los extractos de *Aplysia dactylomela*, expresada como μ g AR h⁻¹, fue superior a las determinadas de los demás extractos, y a las agarasas bacterianas, tanto purificada (PA) como no purificada (NPA) [Tablas 1 y 2, Fig. 2A y 2B, I].

3.2.3.- Actividad alginato liasa

Las mayores actividades específicas en la degradación de las soluciones de alginato de sodio se obtuvieron a 40°C y pH 7.2, exceptuando las obtenidas con los extractos de *Diadema antillarum* que fueron a 25°C y pH 6.0 y a su vez, las de menor actividad [Tabla 1, I]. Las mayores actividades se obtuvieron con Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

el AAP.

3.3.- El pH de los sistemas digestivos [II]

En la Tabla 1 [II] se muestra el pH de los diferentes órganos digestivos en el momento de la disección de cada uno de los herbívoros estudiados. El pH de los diferentes órganos varió entre 5.0 y 6.0 en el esófago y la glándula digestiva de *Aplysia dactylomela*, entre 5.5 y 6.0 en el homogeneizado de *Littorina striata* y entre 6.5 y 7.0 en el hepatopancreas de *Haliotis coccinea canariensis* y el tracto digestivo de *Diadema antillarum*.

3.4.- Cultivos bacterianos

Las bacterias, existentes en los diferentes sistemas digestivos, que crecieron en el medio agarizado no mostraron actividad agarasa (ni por licuefacción, ni por formación de depresiones en el gel) en ninguna de las siembras, ni en los recultivos posteriores.

3.5.- Actividad DNasa [II]

La actividad DNasa de los distintos extractos se muestra en la Tabla 1 [II]. Los extractos crudos degradaron DNA en presencia de Mg^{2+} a pH 5.0, excepto los extractos de la glándula digestiva de *A. dactytomela*. A pH 6.0, independientemente del tipo de tampón (20 mM Bis-tris en agua de mar ó 0.1 M fosfato), no se detectó actividad DNasa en ninguno de los extractos.

En la Fig. 3 se muestran los incrementos en A_{260nm} a lo largo del tiempo de algunos de los extractos estudiados.



Figura 3. Evolución de la actividad DNasa en función del tiempo de Littorina striata, Aplysia dactylomela, AAP y DNasa estandar.

3.6.- Ensayo de dietas monoespecíficas

En la Tabla 5 se muestran las actividades enzimáticas del esófago y la glándula digestiva de *Aplysia dactylomela* tras someter a los individuos a dietas monoespecíficas de *Ulva rigida*, *Solieria filiformis* y *Gracilaria* spp. durante 35-40 días. Tanto los extractos obtenidos del esófago como de la glándula digestiva degradaron los sutratos en las condiciones empleadas.

La actividad celulasa de los animales alimentados con Ulva rigida (Tabla 5) fue similar a la detectada en los extractos obtenidos de animales salvajes (control) (Tabla 4), y fue superior en los alimentados con Gracilaria spp. y Solieria filiformis.

La actividad agarasa fue superior en los animales alimentados con

Tabla 5. Actividades enzimáticas medidas como μ g AR h⁻¹ de los extractos digestivos (del esófago y de la glándula digestiva) de *Aplysia* dactylomela cultivada con dietas monoespecíficas (*Ulva rigida*, *Gracilaria* spp. y *Solieria filiformis*) durante más de 30 días. EF: extracto frío de *Gracilaria* spp.; Alg: alginato de sodio; CMC: carboximetil celulosa. T = 25°C; pH = 6.0.

Sustrato	Ulva rigida		Gracilaria	spp.	Solieria fili	formis	
	Esof	Hepat	Esof	Hepat	Esof	Hepat	
EF	238.4	129.4	385.6	332.9	237.0	244.0	
Alg	94.5	125.2	287.3	125.7	38.0	99.0	
СМС	415.6	457.5	612.2	561.3	603.3	578.7	

Gracilaria spp. en comparación a los alimentados con *Ulva rigida* y *Solieria filiformis* (especies no agarófitas) (Tabla 5). Sin embargo, la actividad agarasa no fue superior a la detectada en el control (Tabla 4).

La actividad alginato liasa fue similar a la de los extractos de los individuos sin alimentación específica, aunque se detectó un ligero aumento en la actividad de los extractos obtenidos de individuos alimentados con *Gracilaria* spp. (Tabla 5).

En la Fig. 4 se muestran los incrementos de peso de los animales alimentados con dietas monoespecíficas. La tasa de crecimiento diario de los individuos alimentados con *Solieria filiformis* casi duplicó a la de los individuos alimentados con *Gracilaria* spp. y *Ulva rigida*, que mostraron tasas de crecimiento diario similares.



Figura 4. Incremento en peso (media \pm sd) de *Aplysia dactylomela* alimentada con *Ulva rigida*, *Gracilaria* spp. y *Solieria filiformis*. Los pesos fueron tomados semanalmente durante el periodo de un mes. N= 3 por dieta.

Haliotis coccinea canariensis mostró una clara predilección por Solieria filiformis, aunque en ausencia de ésta consumió sin problemas Hypnea musciformis y Gracilaria tenuistipitata (Fig. 5). Sin embargo, mostró un claro rechazo a la ingesta de Grateloupia doryphora (Fig. 5). Los extractos obtenidos de los individuos alimentados durante dos meses con S. filiformis mostraron un incremento en su actividad carragenasa (la actividad fue de 30 U mL⁻¹) comparada con la obtenida de los extractos de animales salvajes (10 U mL⁻¹) [**IV**].



Figura 5. Evolución del peso fresco de las especies de macroalgas suministradas como alimento a Haliotis coccinea canariensis durante un periodo de 4 días. Hypnea musciformis (+); Solieria filiformis (\Box); Grateloupia doryphora (\bigcirc) y Gracilaria tenuistipitata (\triangledown).

3.7.- Purificación parcial

El perfil de elución de la agarasa del esófago de *Aplysia dactylomela* en una columna de Sephacryl S-300 HR se muestra en la Fig. 6. Aunque no se obtuvo una buena separación se distinguen claramente dos picos de actividad (fracciones 16-31 y 37-46). El perfil de elución del extracto en la columna de Sephadex G-100 fue muy similar. Sin embargo, la elución del extracto de la glándula digestiva en ambas columnas no mostró un perfil con suficiente resolución de picos.



Figura 6. Cromatografía en una columna de Sephacryl S-300 ($2.6 \times 40 \text{ cm}$) de la agarasa del extracto crudo obtenido del esófago de *Aplysia dactylomela*. La columna fue equilibrada y luego eluída con tampón fosfato 0.1 M (pH 6.0).

3.8.- Producción de protoplastos

Rendimientos de protoplastos que variaron entre 10^3 y 10^7 protoplastos g⁻¹ PF fueron obtenidos en todas las especies utilizadas. Sin embargo, los rendimientos y la viabilidad de los mismos variaron dependiendo de la especie y de las enzimas empleadas (Tabla 6). Experimentos reproducibles normalmente en condiciones estandares fueron obtenidos únicamente con *Ulva rigida* y *Solieria filiformis*. La producción de protoplastos de *Gracilaria tenuistipitata*, *Grateloupia doryphora* e *Hypnea musciformis* varió considerablemente durante el tiempo que duraron los experimentos, de tal manera que, en iguales condiciones y con las mismas combinaciones enzimáticas los resultados fueron completamente diferentes de un día para otro en muchos de los casos.

En la Tabla 7 se muestran las actividades enzimáticas de algunos de los extractos crudos utilizados en las soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de las especies descritas.

3.8.1.- Gracilaria tenuistipitata

Se obtuvieron rendimientos entre $0.8 \text{ y} 5.2 \text{ x} 10^5$ protoplastos g⁻¹ PF con las combinaciones de agarasa purificada (Sigma) y celulasa (Cellulysin, Calbiochem). La utilización de extractos crudos de *Aplysia dactylomela* o *Haliotis coccinea canariensis* en combinación con celulasa no produjo efecto alguno, o en el mejor de los casos una ligera degradación del tejido. Los mejores resultados se obtuvieron con algas cultivadas a tasas de crecimiento superiores al 10%. La pre-plasmolisis del material aumentó ligeramente los rendimientos aunque no de manera significativa. La adición de quelantes como EDTA o EGTA no afectó el rendimiento. El tiempo de incubación medio para la obtención de rendimientos máximos varió entre tres y cuatro horas. El tamaño de los protoplastos varió de 15 a 20 μ m, mostraron forma esférica y explotaron al ser transferidos a agua destilada. **Tabla 6.** Acción de diferentes combinaciones de enzimas comerciales [Agarasa (Sigma); Celulasa (Cellulysin, Calbiochem)] y extractos crudos de herbívoros marinos [AAP (Sigma); *Aplysia dactylomela y Haliotis coccinea canariensis* (H: alimentado con *Hypnea musciformis* por una semana)] en la producción de protoplastos de las especies de algas rojas, *Gracilaria tenuistipitata*, *Grateloupia doryphora* e *Hypnea musciformis*. -: sin efecto; -+: degradación de tejidos y producción de células; +: < 10^3 prot. gr⁻¹ PF; ++: 10^3 - 10^5 ; +++: 10^5 - 10^7 .

Enzimas	G. tenuistipitata	G. doryphora	H. musciformis
0.01% Agarasa + 2.0% Celulasa	+++	++	-+
3.0% AAP	-	-	-+
3.0% AAP + 2.0% Celulasa	-	+	+
A. dactylomela (EC)	-	-+	+
A. dactylomela (EC) + 2.0% Celulasa	-	-+	++
H. coccinea (EC)	-	+	++
H. coccinea (EC) + 2.0% Celulasa	-	++	+++
H. coccinea (EC H) + 2.0% Celulasa	-	++	+++

3.8.2.- Grateloupia doryphora

Esta especie mostró grandes variaciones en el rendimiento dependiendo en gran medida de la combinación de enzimas utilizados. Se obtuvieron rendimientos entre $1.0 \text{ y} 3.0 \text{ x} 10^5$ tanto con los extractos crudos de *Haliotis coccinea canariensis* como con combinaciones de agarasa y celulasa (Tabla 6) a pesar de ser *Grateloupia doryphora* una especie carragenofita. Los rendimientos no variaron entre plantas salvajes y las cultivadas en tanque (cuya tasa de crecimiento no superó valores del 1% d⁻¹). Se obtuvieron mayores rendimientos de explantos tomados de zonas juveniles (10^3-10^5 protoplastos g⁻¹ PF) que de zonas adultas ($<10^2$ protoplastos g⁻¹ PF). A diferencia de *Gracilaria tenuistipitata*, los mayores rendimientos se obtuvieron con tiempos de incubación entre 7 y 10 h. El diámetro de los protoplastos osciló entre 20 y 25 μ m.

3.8.3.- Hypnea musciformis

Todas las enzimas y combinaciones enzimáticas (Tabla 6) degradaron en mayor o menor medida los tejidos de *Hypnea musciformis*. Los mejores rendimientos se obtuvieron con la combinación de celulasa y extractos crudos de *Haliotis coccinea canariensis* (tanto de los individuos salvajes como de los alimentados una semana con *H. musciformis*). Los extractos de *Aplysia dactylomela* también produjeron protoplastos aunque en menor cantidad. En esta especie, al igual que en *Gracilaria tenuistipitata*, la pre-plasmolisis y la utilización de explantos de material cultivado a tasas de crecimiento entre el 5 y el 10% diario, aumentaron el rendimiento entre un 2.0 y un 5.0%. Sin embargo, el pre-tratamiento con agentes quelantes como EDTA o EGTA no afectó de manera significativa los rendimientos. El diámetro de los protoplastos osciló entre 12 y 15 μ m, manteniéndose viables durante más de 24 h. Al igual que en *Grateloupia doryphora*, no se lograron rendimientos repetibles,
oscilando entre $< 10^3$ y 4.0 x 10⁶ protoplastos g⁻¹ PF.

Tabla 7. Actividad enzimática, en U mL⁻¹, de los extractos crudos utilizados en las soluciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de *Gracilaria tenuistipitata*, *Grateloupia doryphora*, *Hypnea musciformis*, *Ulva rigiday Solieria filiformis*. *Haliotis coccinea canariensis* fue alimentado con *Hypnea musciformis* durante 1 semana y con *Solieria filiformis* durante 2 meses (especies entre paréntesis). 1 U de actividad es definida como la cantidad de enzima que produce un aumento de la A_{510nm} min⁻¹ de 0.1 en el ensayo de los azúcares reductores. * Medido como actividad celulasa; ** Medido como actividad *iota*-carragenasa.

AAP	23 U mL $^{-1*}$
Aplysia dactylomela	15 U mL^{-1**}
Haliotis coccinea canariensis	10 U mL^{-1***}
H. coccinea canariensis (H. musciformis)	12 U mL ⁻¹
H. coccinea canariensis (S. filiformis)	30 U mL^{-1}
Pseudomonas carrageenovora	3 U mL^{-1}

3.8.4.- Ulva rigida [III]

En la Tabla I [III] se muestra la variación en rendimiento de los explantos de algas salvajes en función de los tratamientos enzimáticos. La combinación de 1.5% del extracto comercial de *Haliotis* sp. (Sigma) y 1.5% Celulasa (Celulysin, Calbiochem) produjo los mayores rendimientos, cercanos a 10^7 protoplastos g⁻¹ PF. Concentraciones superiores no aumentaron los rendimientos. Ninguna de las dos fuentes de enzimas produjo por sí sóla rendimien-

tos significativos.

La emisión de protoplastos comenzó a partir de la segunda hora de incubación y continuó hasta la digestión completa de los tejidos, alrededor de 24 h. Sin embargo, muchos protoplastos comenzaron a explotar a partir de las 8 h en la solución enzimática. El diámetro de los protoplastos osciló entre 10 y 30 μ m [Fig. 1, III]. En la Figura 7A se muestra un corte transversal del talo de *Ulva rigida* y en la 7B los protoplastos de esta especie.

El tratamiento de pre-plasmolisis como mínimo duplicó el rendimiento [Fig. 2, III], aunque no se detectaron diferencias en cuanto a su viabilidad.

Los mejores rendimientos se obtuvieron con explantos juveniles y, al igual que con *Gracilaria tenuistipitata*, *Hypnea musciformis* y *Solieria filiformis*, estuvieron condicionados por la tasa de crecimiento. Tasas de crecimiento del $20\% d^{-1}$ produjeron rendimientos máximos [Fig. 2, **III**] que disminuyeron considerablemente con plantas cultivadas sin adición de nutrientes.

La tinción con FDA mostró una viabilidad entre el 70 y el 90%. Tras 24 h en cultivo, los protoplastos regeneraron pared celular, y después de 5 días aún se mantenían viables.

En la Figura 3 [III] se muestra la evolución de oxígeno fotosintético tanto de los protoplastos como de explantos de *Ulva rigida*. La evolución de oxígeno fotosintético de los protoplastos fue dependiente del pH [Fig. 3 b, III], siendo cuatro veces mayor a pH 6.5 que a 7.5 ú 8.5. A pH 6.5, tanto los protoplastos como los explantos mostraron saturación fotosintética a una concentración de HCO_3^- entre 400 y 500 μ M [Fig. 3 a, III]. La concentración de oxígeno en el medio disminuyó notablemente en la oscuridad.

•



Figura 7. (A) Corte transversal de un talo de Ulva rigida. Escala = $20 \ \mu m$. (B) Protoplastos fotografiados en contraste de fases. Escala = $20 \ \mu m$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.8.5.- Solieria filiformis [IV]

En la Fig. 1 [IV] se observan las diferencias morfológicas entre algas salvajes (Fig. 1A) y las cultivadas durante más de dos meses en tanques de 300 L (Fig. 1B).

La combinación de celulasa y extractos crudos de *Haliotis coccinea* canariensis, tanto de individuos salvajes como mantenidos en el laboratorio durante dos meses alimentados con Solieria filiformis, produjo rendimientos entre 10^4 y 10^7 protoplastos g⁻¹ PF, aunque fue con los extractos de H_f con los que se obtuvo los mejores resultados [Tabla 1, IV]. No se observó aumento en el rendimiento por adición de carragenasas bacterianas (obtenidas de *Pseudomonas carrageenovora*), o pectoliasa. Sin embargo, se observó un ligero aumento del rendimiento cuando estos enzimas se añadieron a la solución que contenía el H_w [Tabla 1, IV]. La celulasa tuvo influencia directa en la digestión de la pared celular. El aumento de su concentración del 1.0 al 3.0% aumentó el rendimiento de protoplastos (de ninguno al 1.0%, a 10^4 al 3.0% tras 2 h de incubación) sin afectar la viabilidad de las células. El AAP sólo o en combinación con celulasas únicamente produjo la degradación del tejido [Tabla 1, IV].

La producción de protoplastos comenzó a partir de la segunda hora de incubación, aunque los mayores rendimientos (de $1.0 \text{ a } 8.5 \times 10^6$ protoplastos g⁻¹ PF) fueron observados después de las 12 h. Se distinguieron dos tipos de protoplastos: protoplastos de 20-25 μ m de Ø provenientes de la región subcortical y medular [Fig. 1C, IV], y de 10-15 μ m de Ø, en mayor cantidad, producidos de la zona cortical [Fig. 1D, IV].

El 70-80% de los protoplastos mostraron ser viables al teñirlos con FDA. Al cabo de 48 h, el 10-15% de los protoplastos regeneraron pared celular y se observó la formación de agrupaciones de 5 a 10 células. No se observó división celular.

Los ápices de algas "salvajes" (recolectadas del medio natural) y "cilindro" (extraídos de algas creciendo en fotobioreactores cilíndricos [V]) mostraron los mayores rendimientos $(6.0-8.5 \times 10^6 \text{ protoplastos g}^{-1} \text{ PF})$. En los pocos casos en los que se obtuvieron protoplastos de talos maduros, los rendimientos no superaron los 10^4 protoplastos g $^{-1}$ PF. Los rendimientos de los "ápices esféricos" (extraídos de algas cultivadas en tanques que generaron morfologías esféricas apicales) fueron aún menores [Tabla 2, IV]. Las diferencias en los rendimientos tienen una relación directa con las tasas de crecimiento. Las algas cultivadas durante períodos cortos en los cilindros mostraron tasas de crecimiento entre el 10 y el 14% diario mientras que el de las cultivadas durante períodos largos (mayores de 2 meses) en tanques no fue superior al 1%. Las algas utilizadas en el experimento de los diferentes pH del medio de cultivo mostraron tasas de crecimiento intermedias (entre el 0.5 y el 3% diario) y la producción de protoplastos fue igualmente intermedia.

El pH del medio de cultivo afectó el rendimiento de protoplastos de Solieria filiformis siendo máximo a pH 6.0 [Fig. 2, IV]. La correlación entre la producción de protoplastos y la tasa de crecimiento (coeficiente de correlación de Pearson, $\alpha = 0.86$) indicó una clara influencia del pH del medio de cultivo y ambos parámetros.

La pre-plasmolisis del tejido aumentó entre un 1.0 y un 2.0% los rendimientos y la viabilidad. La viabilidad de los protoplastos obtenidos de explantos no pre-plasmolizados fue menor del 70% y no mostraban el aspecto uniforme que mostraron los obtenidos de explantos pre-plasmolizados, cuya viabilidad fue del 90%.

La incubación del explanto en un baño de ultrasonidos (previa a la preplasmolisis) durante períodos de tiempo no superiores a 2 min aumentó el rendimiento en un 20%. Períodos más largos produjeron ablandamiento del explanto.

La adición de los agentes quelantes EDTA y EGTA a la solución de pre-plasmolisis no tuvo efectos significativos sobre los rendimientos de protoplastos en Solieria filiformis.



Figura 8. (A) Producción de protoplastos de *Solieria filiformis* después de dos horas de incubación; las flechas muestran protoplastos corticales y subcorticales. Escala = 40 μ m. (B) Después de doce horas; las flechas muestran la envoltura del tejido después de la digestión. Escala = 100 μ m.

Oniversidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.9.- Captación de carbono inorgánico en Solieria filiformis [V]

Resultados

En la Fig. 2 [V] se muestra la evolución de oxígeno fotosintético en los fenotipos "salvaje" y "esférico" de *Solieria filiformis*. La evolución de oxígeno fue dependiente, en ambos casos, de la irradiación y del pH del medio. El "fenotipo salvaje" mostró saturación fotosintética a 100 y 200 μ mol m⁻² s⁻¹ tanto a pH 8.2 como a pH 6.5. En el "fenotipo esférico", ésta fue observada a 150 y 200 μ mol m⁻² s⁻¹ en ambos pH. Sin embargo, la evolución de oxígeno del "fenotipo esférico" fue un 25% superior a ambos pH. Esta diferencia fue más significativa a mayores irradiaciones (400 μ mol m⁻² s⁻¹).

En la Tabla 1 [V] se muestran las concentraciones de clorofila y ficoeritrina, y sus proporciones en ambos fenotipos. La concentración de clorofila y la proporción Clorofila:Ficoeritrina fue mayor en el "fenotipo salvaje" que en el "fenotipo esférico".

Se observó actividad anhidrasa carbónica (AC) tanto en los sobrenadantes como en los precipitados de los extractos crudos de *Solieria filiformis*. La actividad AC del so-brenadante fue de 7.0 U mg⁻¹ de proteínas (135 μ g mL⁻¹) y en el precipitado de 117 U mg⁻¹ de proteínas (34 μ g mL⁻¹).

En la Fig. 3 [V] se muestra el efecto de EZ (50 μ M) y DBS (40 μ M), en la evolución de oxígeno fotosintético del "fenotipo salvaje" de *Solieria filiformis*. La evolución de oxígeno (sin adición de los inhibidores de AC) fue aproximadamente un 25% superior a pH 6.5 que a pH 8.2. A pH 8.2 tanto EZ como DBS inhibieron la fotosíntesis un 90 y un 50%, respectivamente. El aumento de la concentración de DBS, en las mismas condiciones, no aumentó la inhibición. A pH 6.5 no se observó inhibición. Los mismos resultados fueron observados con el "fenotipo esférico".

En la Fig. 4 [V] se muestra la tasa de alcalinización del medio de incubación por los dos fenotipos estudiados. Las tasas de alcalinización fueron dependientes de la irradiación. El "fenotipo esférico" mostró mayor tasa de al-

calinización del medio. Cuando la irradiación aumentó de 100 a 230 μ mol m⁻² s⁻¹, la tasa de alcalinización del "fenotipo esférico" aumentó aproximadamente dos veces. En el "fenotipo salvaje", la alcalinización fue saturada a una intensidad de luz menor (100 μ mol m⁻² s⁻¹).

Aunque no de manera significativa, las tasas de alcalinización fueron superiores con la utilización del filtro azul.

En la Fig. 5 [V] se muestran los efectos de la adición de EZ, DBS, DCMU y de la oscuridad sobre la tasa de alcalinización del medio del "fenotipo salvaje" de *Solieria filiformis*. La tasa de alcalinización fue inhibida al añadir los inhibidores y en la oscuridad. Sin embargo, como se observó en los experimentos de fotosíntesis, el EZ inhibió la tasa de alcalinización en mayor medida. Los mismos resultados fueron observados con el "fenotipo esférico".

4.- DISCUSION

4.1.- Metodología de la extracción

En base a las actividades enzimáticas detectadas, la metodología para la extracción y preparación de los extractos crudos, basada en la precipitación con sulfato amónico y la posterior desalación (tanto por diálisis como por cromatografía por filtración en gel), mostró ser efectiva. No obstante, la filtración en Sephadex G-25 aceleró el proceso de preparación de los extractos crudos y evitó las posibles pérdidas de actividad, e incluso de extractos, que ocasiona la diálisis, debido a la degradación enzimática de las bolsas.

La actividad enzimática del AAP, preparado comercialmente por extracción en acetona, mostró valores similares a los descritos por otros autores (Nisizawa et al. 1968, Wojtowicz 1972, Polne-Fuller 1987).

4.2.- Actividades enzimáticas [I]

Las elevadas actividades enzimáticas de los extractos de Aplysia dactylomela sobre todos los sustratos estudiados indican la alta capacidad digestiva de un amplio rango de componentes estructurales de la pared celular, lo que es de suponer, le confiere una gran capacidad para alimentarse eficientemente de macroalgas verdes, pardas y rojas. En este sentido, las diferencias de actividad de los extractos de *Haliotis coccinea canariensis*, *Littorina striata* y *Diadema antillarum*, pueden ser debidas a las preferencias alimenticias y a los tipos de especies disponibles en su entorno.

Los resultados de actividad celulasa de todos los herbívoros estudiados, fueron similares a los descritos en otras especies de invertebrados marinos (Yokoe y Yasumasu 1964, Kristensen 1972, Brock et al. 1986, Suzuki et al. 1986, Boyen et al. 1990), cuyos óptimos de temperatura (entre 24 y 35° C) y pH (6.0-7.0) también concuerdan con nuestros valores óptimos de actividad (Horiuchi y Lane 1965, Brock et al. 1986).

Boyen et al. (1990) encontraron actividades similares entre una celulasa comercial y extractos crudos y purificados de *Aplysia depilans* y *Haliotis tuberculata* usando celulosa microcristalina como sustrato. Sin embargo, cuando estos extractos se utilizaron para el aislamiento de protoplastos, la eficacia fue practicamente nula, en comparación con la celulasa comercial. Asimismo, Lewis (1964) no detectó actividad celulasa en extractos de *Diadema antillarum* empleando papel de filtro como sustrato. En nuestro caso, los extractos crudos de todos los herbívoros degradaron eficazmente carboximetil celulosa. Estas diferencias son obviamente debidas al tipo de sustrato empleado y ponen de manifiesto la importancia de su correcta elección para determinar la existencia de actividad.

No obstante, aunque existe actividad celulasa en los extractos de todos los herbívoros estudiados, su utilización exclusiva no permitió la obtención de gran número de protoplastos (Tabla 6), que sin embargo se obtuvieron al suplementar los extractos con celulasas comerciales. La incapacidad de los extractos de digerir la celulosa de la pared celular indica que la existencia de actividad sobre la CMC no prueba su efectividad sobre la pared celular. Estos resultados demuestran experimentalmente la hipótesis de Friesen (1980) cuestionando la capacidad real de digestión de celulosa en base a la actividad celulasa detectada con la CMC en extractos de invertebrados marinos.

La temperatura (40 °C) y pH (6.0) óptimos de actividad agarasa de los extractos, fueron similares a los de las agarasas bacterianas (40 °C y pH entre 5.0 y 7.2; Yaphe 1966, Duckworth y Turvey 1969, van der Meulen 1975, Morrice et al. 1984).

El extracto frío de *Gracilaria* spp. fue el mejor sustrato para la determinación de la actividad agarasa, tanto porque no forma geles en solución (y por tanto permite la cuantificación de actividad a temperaturas por debajo del punto de gelificación del agar), como por la mayor sensibilidad del sustrato [Tabla 1 y 2, Fig. 2A, I]. La dificultad para la determinación de actividad agarasa utilizando sustratos convencionales (agar y agarosa), debido

a la imposibilidad de obtener soluciones homogéneas, descrita por van der Meulen (1975) puede evitarse con la utilización del EF.

Las agarasas bacterianas (tanto NPA como PA) no mostraron las actividades enzimáticas indicadas por las empresas suministradoras. Esta pérdida de actividad pudo haberla ocasionado el transporte defectuoso de los enzimas.

Los resultados de actividad alginato liasa son similares a los descritos en diferentes especies de Aplysia, Haliotis y Littorina (Franssen y Jeuniaux 1965, Nakada y Sweeny 1967, Elyakova y Favorov 1974, Boyen et al. 1990), aunque esta actividad se describe por primera vez en el género Diadema.

4.3.- pH del sistema digestivo [II]

La correlación entre el pH del sistema digestivo [Tabla 1, II] y los valores de pH en los que se obtuvieron las mayores actividades (Tabla 4), indica que la digestión se realiza por hidrólisis enzimática, confirmando los resultados obtenidos en otros invertebrados (*Sphaeroma walkeri*, Vallabhan 1989; *Perna viridis*, Teo y Sabapathy 1990). Asimismo pone de manifiesto la conveniencia de determinar el pH del tracto digestivo del herbívoro previamente a su elección para la obtención de enzimas para la digestión de la pared celular de macroalgas. Aunque no existen datos suficientes los valores de pH del sistema digestivo en peces herbívoros $(3.5 \pm 0.5 \text{ en } Lagodon rhomboides$, Montgomery y Targett 1992) parece indicar que en éstos la digestión se efectúa por hidrólisis ácida.

Los valores de pH del tracto digestivo de *Diadema antillarum* [Tabla 1, **II**] coincidieron con los valores de pH descritos en esta especie por Lewis (1964). Asimismo, los valores de pH de los órganos digestivos de los herbívoros estudiados entran en el rango de pH óptimos de las actividades polisacaridasas de los extractos de invertebrados marinos (Onishi et al. 1985, Bärlocher et al. 1989).

4.4.- Actividad bacteriana

La ausencia de bacterias agarolíticas en el sistema digestivo de los herbívoros estudiados contrasta con su detección en el equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus* (Lasker y Giese 1954), el gasterópodo *Tegula funebralis* (Galli y Giese 1959) y *Haliotis* sp. (Minamitake et al. 1986). Además de agarasas, dichas bacterias también disponían de carragenasas y alginato liasas.

Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con la ausencia de bacterias agarolíticas en *Aplysia juliana* descrita por Vitalis et al. (1988), aunque estos autores mencionan su capacidad para degradar glucosa, maltosa, almidón y carragenato. Es posible que estos resultados contradictorios sean debidos al mayor o menor contenido en bacterias agarolíticas asociadas a las algas consumidas por los herbívoros.

4.5.- Actividad DNasa [II]

La detección de una deoxiribonucleasa ácida (pH 5.0) en los extractos [Tabla 1, II] concuerda con los resultados obtenidos en otros invertebrados marinos (Georgatsos y Antonoglou 1963, Rasskazov et al. 1975) en los que también se detectan DNasas alcalinas (a valores de pH superiores a 7.0).

La mayor actividad DNasa específica de los extractos de *Littorina* striata y Diadema antillarum [Tabla 1, II] se debe posiblemente a la contaminación por otros órganos (los extractos de *L. striata* se prepararon utilizando todo el animal y durante el aislamiento del sistema digestivo de *D. antillarum* fue muy difícil evitar el contacto con otros fluídos y órganos).

Sin embargo, la ausencia de actividad DNasa a pH 6.0 [Tabla 1, II] indica la ausencia de efecto tóxico en el rango de pH óptimo para el aislamiento de protoplastos de macroalgas marinas. En este sentido, la inexistencia de actividad a pH 6.0 indica que la adición de inhibidores de actividad DNasa a la solución enzimática que algunos autores utilizan para el aislamiento de protoplastos (Fujimura et al. 1989a, Waaland et al. 1990, Reddy y Fujita 1991) es una complejidad innecesaria.

4.6.- Influencia de la dieta monoespecífica

El aumento de actividad carragenasa de los extractos de *Haliotis coccinea canariensis* alimentados durante dos meses con *Solieria filiformis* (de 10 U mL⁻¹ en los individuos salvajes a 30 U mL⁻¹ en los cultivados) indica la existencia de adaptación enzimática a la dieta. La inexistencia de actividad carragenasa en el AAP y, por el contrario su gran actividad alginato liasa (40 U mL⁻¹) (en contraste con la escasa actividad en H_w y H_f) corroboran la posibilidad de estimular la producción de determinadas polisacaridasas en función de la dieta (el AAP se extrae de *Haliotis* sp. alimentado con *Macrocystis pyrifera*, una especie alginofita). Los extractos de H_f permitieron obtener rendimientos superiores en la digestión de *S. filiformis* que los H_w (aptdo. 4.8).

Aunque en *Aplysia dactylomela* los cambios de actividades enzimáticas no fueron tan espectaculares, se observaron diferencias entre los individuos alimentados con las diferentes especies (Tabla 5, aptdo 3.6) y, en la mayoría de los casos, con respecto a los controles.

Estos resultados concuerdan con el aumento de actividad de carbohidrasas en Achatina fulica alimentados con dietas ricas en almidón durante más de ocho semanas (van Weel 1961). Sin embargo, Boyen et al. (1990) no describen cambios sustanciales en la actividad alginato liasa de Aplysia vaccaria, A. depilans y Haliotis rufescens alimentados durante una semana con Macrocystis pyrifera. No obstante, los individuos de H. rufescens empleados fueron obtenidos de una granja en la que habían sido alimentados con M. pyrifera durante más de 6 años. Sus extractos contenían 50 veces más cantidad de alginato liasa que las dos especies de Aplysia, con una actividad 28 a 38 veces superior en su actividad específica. A la vista de nuestros resultados, es probable que de haber alimentado estos herbívoros durante un período más prolongado, hubiesen detectado alteraciones enzimáticas más significativas.

4.7.- Purificación parcial

Aunque la resolución obtenida no fue la suficiente (Fig. 6), es muy probable la existencia de, al menos, dos agarasas en los extractos de *Aplysia dactylomela*. La gran complejidad del proceso de purificación de agarasa en *Littorina mandshurica* ha sido exhaustivamente descrita por Usov y Miroshnikova (1975), lo cual contrasta con la facilidad de la purificación de las agarasas de origen bacteriano (Duckworth y Turvey 1969, van der Meulen 1975, Groleau y Yaphe 1977, Morrice et al. 1983a, Aoki et al. 1990, Yamaura et al. 1991).

La disminución de la actividad enzimática de las fracciones en comparación con la de los extractos crudos se debe probablemente a la dilución del enzima al pasar por la columna.

La gran complejidad enzimática de los extractos de *Aplysia dactylomela* indica la necesidad de utilizar columnas de mayor longitud y cromatografía de afinidad para poder purificar las enzimas. No obstante las ventajas de la purificación enzimática para su aplicación al aislamiento de protoplastos no están claras. Aunque tanto para el aislamiento de protoplastos de plantas terrestres (Schenk y Hildebrandt 1969) como para el de macroalgas marinas (Butler et al. 1990) se ha sugerido la necesidad de purificar los complejos enzimáticos, la inexistencia de actividad DNasa en los extractos (a pH 6.0), la diversidad de polisacáridos de la pared celular de macroalgas y la pérdida de enzimas durante el proceso de purificación, nos hacen pensar que la estrategia debe ser precisamente la opuesta.

4.8.- Aislamiento de protoplastos

Aunque se obtuvieron elevados rendimientos de protoplastos viables de Ulva rigida y Solieria filiformis de manera reproducible, los rendimientos con Gracilaria tenuistipitata, Grateloupia doryphora e Hypnea musciformis, aunque elevados en algunos ensayos (Tabla 6), no fueron tan reproducibles, indicando la existencia de factores no controlados.

4.8.1.- Soluciones enzimáticas

Los rendimientos obtenidos de *Gracilaria tenuistipitata* con la combinación de agarasa purificada de *Pseudomonas atlantica* y celulasa, concuerdan con los obtenidos por Björk et al. (1990) con *Gracilaria* spp., incluída *G. tenuistipitata* $(10^{5}-10^{7} \text{ protoplastos g}^{-1} \text{ PF})$. La utilización de extractos crudos (Tabla 6), incluído el AAP, no produjo protoplastos, lo que contrasta con los resultados obtenidos por Chou y Lu (1989) que describieron rendimientos similares a los nuestros utilizando extractos de *Haliotis diversicolor* (alimentados con *Gracilaria*) combinado con otras enzimas comerciales, aunque a concentraciones muy superiores y sin aportar datos de viabilidad.

Los rendimientos obtenidos con *Grateloupia doryphora* utilizando tanto la combinación de enzimas comerciales o combinaciones de extractos crudos de *Haliotis coccinea canariensis* y celulasa (Tabla 6) son mayores que los obtenidos por Chou y Lu (1989) con *Grateloupia* sp. y *G. filicina* ($< 2.0 \times 10^3$ protoplastos g⁻¹ PF) utilizando mayores concentraciones de una combinación de extractos de *Haliotis diversicolor*, pectoliasa, macerasa y celulasa. Los elevados rendimientos obtenidos con la combinación de agarasa y celulasa comerciales no dejan de ser sorprendentes ya que *G. doryphora* es una especie carragenofita.

La obtención de protoplastos del género Hypnea no había sido descrita previamente. En el caso de Hypnea musciformis, la combinación de las diferentes enzimas, tanto extractos crudos como enzimas comerciales, mostraron diferentes efectos sobre el tejido y, en mayor o menor medida produjeron células y protoplastos, obteniéndose los mayores rendimientos con combinaciones de extractos de Aplysia dactylomela y Haliotis coccinea canariensis (tanto salvaje como alimentado con H. musciformis) (Tabla 6). Estos resultados sugieren que dichos herbívoros tienen una gran preferencia por especies carragenofitas. Los rendimientos obtenidos con *Ulva rigida* (> 10^6 protoplastos g⁻¹ PF) fueron similares a los descritos en otras especies de *Ulva* (Zhang 1983, Fujita y Migita 1985, Reddy et al. 1989), aunque en estos casos las concentraciones enzimáticas fueron superiores, lo que indica la posibilidad de aumentar la viabilidad de los protoplastos (reduciendo el efecto tóxico de los enzimas) a igualdad de rendimientos.

En Solieria filiformis, la combinación de los extractos crudos de Haliotis coccinea canariensis con celulasa fue la más efectiva, con rendimientos significativamente superiores a los obtenidos con el AAP [Tabla 1, IV]. Los mayores rendimientos con H_f (respecto a H_w) corroboran las mayores actividades enzimáticas detectadas *in vitro* y la posibilidad de inducir mayores actividades mediante dietas monoespecíficas, y demuestran la correlación entre actividades enzimáticas *in vitro* y las actividades reales sobre la pared celular. No obstante, la imposibilidad de obtener protoplastos, tanto de S. filiformis como de Ulva rigida, únicamente con extractos digestivos (aunque poseen celulasas, aptdo. 4.2) indica que dicha correlación es válida para polisacáridos matriciales, pero no para los del esqueleto (principalmente celulosa).

4.8.2.- Material vegetal

Los bajos rendimientos de explantos viejos en comparación con los juveniles en todas las especies, similares a los resultados descritos en *Gracilaria* spp. (Björk et al. 1990), *Gigartina* spp. (Gross 1990), *Chondrus crispus* (LeGall et al. 1990) y *Macrocystis pyrifera* (Kloareg et al. 1989), demuestran la menor complejidad de las paredes celulares de los tejidos juveniles.

Esta característica está directamente relacionada con la tasa de crecimiento del alga (y por lo tanto con las condiciones de cultivo previas a la extracción del explanto), ya que los mejores rendimientos en todas las especies se obtuvieron con algas cultivadas a altas tasas de crecimiento (> 10% d⁻¹ en la mayoría de los casos), exceptuando *Grateloupia doryphora* (cuya tasa de crecimiento no superó el 1% d^{-1}). La influencia de la tasa de crecimiento en la composición del agar de *Gracilaria sordida*, *G. verrucosa* y *G. tenuistipitata* ha sido demostrada por Lignell y Pedersén (1989) y Ekman y Pedersén (1990).

En este sentido, los mayores rendimientos de los ápices "cilindro" en comparación con los ápices "esféricos" de *Solieria filiformis* (cuyo proceso de formación y sus causas han sido descritos por Robledo y García-Reina 1993), se explican por las mayores tasas de crecimiento de los primeros [Tabla 2, IV]. Las algas que crecieron a tasas de crecimiento intermedias mostraron rendimientos intermedios. Los rendimientos similares entre los explantos de ápices "salvajes" y "cilindro" podrían explicarse por el rápido crecimiento de las algas en el medio natural en el momento de la recolección (*S. filiformis* muestra un marcado crecimiento estacional y durante los experimentos se encontraba en una fase de rápido crecimiento).

La relación entre el rendimiento de protoplastos y el pH del medio de cultivo [Fig. 2, IV] indica un claro aumento del rendimiento a pH ácidos. No obstante, el efecto del pH más que un efecto directo (excluyendo su hipotético efecto en la compactación de la pared celular) se debe a su influencia sobre la tasa de crecimiento, mediatizada por el mecanismo de captación de captación

A pH 6.5, Solieria filiformis muestra una tasa de fotosíntesis 25% superior a la tasa observada a pH 8.2 [Fig. 2, V]. Estas diferencias se deben a las distintas proporciones de carbono inorgánico fotosintéticamente asimilables a ambos pH, lo que, a pesar de la existencia de AC_{ext} en S. filiformis permite mayores tasas de crecimiento en medios con elevada concentración de CO₂ (pH 6.5).

Además de las diferencias en cuanto a la tasa de crecimiento, se observaron diferencias fisiológicas entre ápices "salvajes" y "esféricos" en cuanto al contenido en clorofila (superior en los ápices "salvajes") y ficoeritrina [Tabla 1, V]. A pesar de estas diferencias, y de las diferencias en complejidad de la pared celular (evidenciada por las diferencias en rendimiento), ambos tipos de explanto poseen AC_{ext} [V]. La existencia de AC_{ext} en ambos explantos indica que, independientemente de su tasa de crecimiento, morfología y rendimiento, la viabilidad de los protoplastos estará condicionada por la concentración de CO_2 del medio de incubación y de cultivo posterior. Por lo tanto, el pH del medio de incubación no sólo afecta la actividad de las polisacaridasas (y por tanto el rendimiento) y la viabilidad únicamente por la desactivación de las DNasas, sino también por la capacidad fisiológica de recuperación del protoplasto (después del estrés causado por la digestión) y activar adecuadamente el metabolismo del carbono (p.e., comenzar la síntesis de nueva pared celular). Debido a la inhibición de las DNasas y a las relativamente elevadas concentraciones de CO_2 a pH 6.0, el ajuste a un valor próximo a pH 6.0 es el más adecuado para llevar a cabo los procesos de aislamiento y cultivo de protoplastos.

4.8.3.- Efecto de los pretratamientos

El aumento de los rendimientos en *Solieria filiformis* tras la incubación de los explantos en un baño de ultrasonidos, durante períodos inferiores a dos minutos, concuerda con los resultados descritos por Neushul (1984) con *Sargassum* spp. Este tratamiento produce la relajación de la estructura compacta de las paredes celulares, facilitando por tanto la acción de las enzimas.

El aumento del rendimiento y de la viabilidad (en base a la capacidad fotosintética de los protoplastos de *Ulva* [Fig. 3, III], y por tinción con FDA en los de *Solieria*) demuestra los efectos beneficiosos del tratamiento de preplasmolisis de los explantos. Este efecto beneficioso, según Butler et al. (1989) y Björk (1992) se debe al efecto estabilizante y preventivo de captación de sustancias tóxicas durante la digestión de la pared celular.

La ausencia de efectos apreciables en el rendimiento por adición de los agentes quelantes (EDTA y EGTA) en *Solieria filiformis, Hypnea musciformis* y *Gracilaria tenuistipitata*, concuerda con los resultados observados por LeGall et al. (1990) en *Chondrus crispus*. La efectividad del EGTA en el aislamiento

de protoplastos de *Laminaria* (Butler et al. 1989) se debe probablemente a la especificidad de dicho quelante sobre el Ca^{2+} , el principal ion responsable de la compactación de los polisacáridos matriciales en alginofitas.

4.9.- Capacidad fotosintética de los protoplastos

La capacidad de fotosintetizar de los protoplastos se ha empleado recientemente como un indicador de la viabilidad de éstos. Unicamente en protoplastos de *Enteromorpha* se han descrito tasas de fotosíntesis iguales, o ligeramente superiores, a las de los explantos (Millner et al. 1979), ya que tanto en *Chondrus crispus* como en *Macrocystis pyrifera* (Smith y Bidwell 1989, Davison y Polne-Fuller 1990) la capacidad fotosintética de sus protoplastos fue inferior (30 y 40% respectivamente), en proporciones similares a los valores de los protoplastos obtenidos de *Ulva rigida* [Fig. 3, **III**].

No obstante, las variaciones en la tasa de fotosíntesis, como indicador de viabilidad de los protoplastos, sin considerar el pH, lleva a conclusiones erróneas. Las diferencias de fotosíntesis entre protoplastos y explantos fueron considerablemente menores a pH 6.5 que a pH 8.2 [Fig. 3, III].

Esta dependencia de la fotosíntesis de los protoplastos de *Ulva rigida* del pH, confirma resultados similares descritos en *Chondrus crispus* (Smith y Bidwell 1989) y *Gracilaria tenuistipitata* (Haglund et al. 1992) y demuestra tanto la incapacidad del HCO_3^- para atravesar la membrana plasmática como la necesidad de una pared celular intacta para el funcionamiento de la AC_{ext} , y la dependencia de los protoplastos de la concentración de CO_2 en el medio (y por tanto del pH). Björk et al. (1992) han demostrado la fuerte inhibición producida por EZ (inhibidor de AC total) y nula por DBAZ (inhibidor de la AC_{ext}) sobre la fotosíntesis de los protoplastos de *U. rigida*, lo que puede significar que el mecanismo de asimilación de HCO_3^- (catalizado por la AC_{ext}) puede ser destruído en el momento de la digestión de la pared celular.

5.- CONCLUSIONES

- 1.- Las elevadas actividades celulasa, agarasa, carragenasa y alginato liasa cuantificadas en los extractos digestivos de los herbívoros estudiados demuestran la capacidad de éstos para digerir los polisacáridos estructurales de las paredes celulares de las macroalgas marinas. Estas actividades mostraron poseer pH óptimos similares a los existentes en los sistemas digestivos de los ficófagos, y ser más activos a temperatura ambiente que las fuentes comerciales de enzimas, lo que justifica su alto interés para el aislamiento de protoplastos.
- 2.- La metodología de la cuantificación de actividad agarasa empleando el "extracto frío" de *Gracilaria* spp. ha permitido, por primera vez, cuantificar la actividad agarasa a temperaturas inferiores a 40°C. Este método ha puesto de manifiesto la menor actividad de algunas agarasas bacterianas comerciales a las temperaturas de incubación óptimas para el aislamiento de protoplastos de macroalgas marinas, en relación a la actividad de los extractos de ficófagos.

La actividad agarasa del sistema digestivo de los herbívoros marinos estudiados no es de origen bacteriano.

3.- Las variaciones de las actividades polisacaridasas de los extractos de Aplysia dactylomela y Haliotis coccinea canariensis tras su alimentación con dietas monoespecíficas durante más de 30 días, demuestran la posibilidad de alterar la composición enzimática de su sistema digestivo en función del tipo de polisacárido matricial existente en la dieta. La demostración de esta capacidad posibilitaría la producción de extractos enzimáticos hiperactivos sobre la pared celular de las especies que se utilicen como alimento.

- 4.- La inactividad de la deoxiribonucleasa ácida detectada en los extractos a los valores de pH óptimos para el aislamiento de protoplastos, demuestra la inexistencia de toxicidad de los extractos por actividad de estos enzimas y la innecesariedad de añadir inhibidores de DNasas a la solución enzimática.
- 5.- Los elevados rendimientos en Solieria filiformis y Ulva rigida con los extractos digestivos demuestran la existencia de una relación entre las actividades enzimáticas in vitro (tanto de herbívoros salvajes como de los alimentados con dietas monoespecíficas) y su efectividad real sobre la digestión de la pared celular. Sin embargo, la imposibilidad de obtener rendimientos elevados únicamente con extractos digestivos (sin la adición de celulasas complementarias) demuestra que ésta relación afecta únicamente a los polisacáridos matriciales y no a los del esqueleto.
- 6.- La tasa de crecimiento influye directamente sobre el rendimiento de protoplastos. El pH del medio de cultivo también afecta directamente el rendimiento de protoplastos, pero este efecto se debe a la estimulación de la tasa de crecimiento al aumentar la captación de carbono inorgánico del medio.

El valor de pH mas adecuado para la digestión enzimática es 6.0, tanto por la mayor actividad de las polisacaridasas y la inactividad de las DNasas, como por favorecer la captación de CO_2 por los protoplastos, al carecer estos de AC_{ext} .

Los pretratamientos con ultrasonidos (durante períodos inferiores a dos minutos) y plasmolisis, aumentan el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

•

6.- BIBLIOGRAFIA

- Aasen IM, Folkvord K, Levine DW (1992) Development of a process for large-scale chromatographic purification of an alginate lyase from *Klebsiella pneumoniae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 55-60.
- Amano H, Noda H (1992) Proteins of protoplasts from several seaweeds. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 58: 291-299.
- Anónimo (1984) Commercial Biotechnology: an international analysis. U.S. Congress, Office of Tchnology Assessment, OTA-BA-218. Government Printing Office, Washington, DC. 612 pp.
- Aoki T, Araki T, Kitamikado M (1990) Purification and characterization of β -agarases from Vibrio sp. AP-2. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 56: 825-830.
- Araki C (1956) Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. Proc. 5th Int. Seaweed Symp. 5: 3-17.
- Araki C, Arai K (1957) Studies on the chemical constitution of agar-agar. 20. Isolation of a tetrasaccharide by enzymatic hydrolysis of agar-agar. Bull. Soc. Chem. Jpn. 30: 287-293.
- Araki T, Morishita T (1990) Fusion of protoplasts from wild type *Porphyra* yezoensis and green type *P. tenera* thalli (Rhodophyta). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 56: 1161.
- 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.
- Armisén R, Galatas F (1987) Production, properties and uses of agar. En: McHugh DJ (ed.) Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. 288: 1-57.
- Ashe H, Seaman E, Van Vunakis H, Levine L (1965) Characterization of deoxyribonuclease of *Mustelus canis* liver. Biochim. Biophys. Acta 99: 298-306.
- Bärlocher F, Arsuffi TL, Newell SY (1989) Digestive enzymes of the saltmarsh periwinkle *Littorina irrorata* (Mollusca, Gastropoda). Oecologia 80: 39-43.
- Bellanger F, Verdus MC, Henocq V, Christiaen D (1990) Determination of the composition of the fibrillar part of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta) cell wall in order to prepare protoplasts. Hydrobiologia

204/205: 527-531.

- Bellion C, Hamer GK, Yaphe W (1982) The degradation of *Eucheuma* spinosum and *E. cotonii* carrageenans by i-carrageenases and k-carrageenases from marine bacteria. Can. J. Microbiol. 28: 874-880.
- Benet H, Kloareg B (1991) Isolation of protoplasts from brown seaweeds. En: García-Reina G, Pedersén M (eds.) Seaweed cellular biotechnology, physiology and intensive cultivation. Cost 48 - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, 287-290.
- Benítez LV, Macaranas JM (1979) Partial purification of a carrageenase from the tropical sea urchin *Diadema setosum*. Proc. 9th Inter. Seaweed Symp., Sci. Press, 9: 353-359.
- Berliner M (1981) Protoplasts of eukaryotic algae. Intern. Rev. of Cytology 73: 1-19.
- Björk M (1992) Protoplast isolation from marine macroalgae and application to studies of inorganic carbon utilization. Ph.D. thesis, Dpt. Physiological Botany, University of Uppsala, 47 pp.
- 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.
- Björk M, Haglund K, Ramazanov Z, García-Reina G, Pedersén M (1992) Inorganic-carbon assimilation in the green seaweed Ulva rigida C. Ag. (Chlorophyta). Planta 187: 152-156.
- 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.
- Brock V, Kennedy VS, Brock A (1986) Temperature dependency of carbohydrase activity in the hepatopancreas of thirteen estuarine and coastal bivalve species from the North American east coast. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 103: 87-101.
- Brown BJ, Preston JFIII (1991) L-Guluronan-specific alginate lyase from a marine bacterium associated with *Sargassum*. Carbohyd. Res. 211: 91-102.
- Butler DM (1989) Isolation and culture of protoplasts and tissues of *Laminaria* spp. (Phaeophyta). Ph.D. thesis, Dpt. of Pure and Applied Biology. The University of Leeds, 203 pp.

- Butler DM, Evans LV, Kloareg B (1990) Isolation of protoplasts from marine macroalgae. En: Akatsuka I (ed.), Introduction to applied phycology, SPB Academic Publishing, The Hague, 647-668.
- Butler DM, Østgaard 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.
- Carefoot TH (1980) Studies on the nutrition and feeding preferences of *Aplysia*: Development of an artificial diet. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 42: 241-252.
- Carefoot TH (1982) Phagostimulatory properties of various chemical compounds to sea hares (*Aplysia kurodai* and *A. dactylomela*). Mar. Biol. 68: 207-215.
- Carefoot TH (1987) Aplysia: its biology and ecology. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 25: 167-284.
- 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.
- Chesters CGC, Turner M, Apinis A (1956) Decomposition of Laminarin by microorganisms. Proc. 2nd Inter. Seaweed Symp. 2: 141-144.
- Chou H-N, Lu H-K (1989) Protoplasts from seaweeds: isolation, culture and fusion. Current topics in Marine Biotechnology, 227-230.
- Chou M-Y, Liao T-H (1990) Shrimp hepatopancreatic deoxyribonuclease purification and characterization as well as comparison with bovine pancreatic deoxyribonuclease. Biochim. Biophys. Acta 1036: 95-100.
- Clifford C, Walsh J, Reidy N, Johnson DB (1982) Digestive enzymes and subcellular localization of disaccharidases in some echinoderms. Comp. Biochem. Physiol. 71B: 105-110.
- Cocking EC (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187: 962-963.
- Cocking EC (1972) Plant cell protoplasts isolation and development. Ann. Rev. Plant Physiol. 23: 29-50.

- Coury DA, Hong Y, Polne-Fuller M (1991) Preparation of protoplasts from *Porphyra*, *Macrocystis* and *Ulva*. Phycol. Newslett. December-91: 9-11.
- Crabtree B, Leech AR, Newsholme EA (1979) Measurement of enzyme activities in crude extracts of tissues. En: Techniques in metabolic research. Elsevier, North-Holland Scientific Publishers, Ltd. B211: 1-37.
- Dai J, Bao Z, Tang Y, Liu W (1988) Studies on isolation of the thallodic cells of *Porphyra* with enzymes and cultivation of these cells. Chinese J. Biotech. 4: 133-137.
- Davison IR, Polne-Fuller M (1990) Photosynthesis in protoplasts of Macrocystis pyrifera (Phaeophyta). J. Phycol. 26: 384-387.
- Day DF, Yaphe W (1974) Enzymic hydrolysis of agarose to D-galactose and 3,6 anhydro-L-galactose. Purification of an α -Neoagarobiose hydrolase. Proc. 8th Inter. Seaweed Symp. 8: 543-547.
- Deutscher M (1990) Guide to protein purification. Methods in Enzymology, Vol. 182. 894 pp.
- Domingo A, Cervera M, Martin E, Marco R (1986) Biochemical characterization and developmental behavior of *Artemia* embryonic and nauplial deoxyribonucleases. Biochemistry 25: 4125-4131.
- Doubet R, Quatrano RS (1984) Properties of alginate lyases from marine bacteria. Appl. envir. Microbiol. 47: 699-703.
- Duckworth M, Turvey JR (1969) An extracellular agarase from a Cytophaga species. Biochem. J. 113: 139-142.
- Duckworth M, Yaphe W (1971) The structure of agar. Part II. The use of a bacterial agarase to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar. Carbohyd. Res. 16: 435-445.
- Ducreaux G, Kloareg B (1988) Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria* (Pheophyceae). Planta 174: 25-29.
- Ekman P, Pedersén M (1990) The influence of photon irradiance, day lenght, dark treatment, temperature, and growth rate on the agar composition of *Gracilaria sordida* W. Nelson and G. verrucosa (Hudson) Papenfuss (Gigartinales, Rhodophyta). Bot. Mar. 33: 483-495.
- Elyakova LA, Favorov VV (1974) Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina* sp. Biochim. Biophys. Acta 358: 341-354.

- Elyakova LA, Sova VV, Vaskovsky VE (1968) Cellulase of marine mollusc Littorina sp. Biochim. Biophys. Acta 167: 462-464.
- Eppley RW, Lasker R (1959) Alginase in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Science 129: 214-215.
- Eriksson, TR (1985) Protoplast isolation and culture. En: Fowke LC, Constabel F (eds.) Plant protoplasts. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1-20.
- Evans DA, Bravo JE (1984) Protoplast isolation and culture. En: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds) Handbook of plant cell culture, Vol 4, Macmillan Publ. Co., New York, 97-132.
- Favorov VV, Vozhova EI, Denisenko VA, Elyakova LA (1979) A study of the reaction catalysed by alginate lyase VI from the sea mollusc *Littorina* sp. Biochim. Biophys. Acta 569: 259-266.
- Feral J-P (1989) Activity of the principal digestive enzymes in the detritivorous apodous holothuroid *Leptosynapta galliennei* and two other shallow water holothuroids. Mar. Biol. 101: 367-379.
- 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.
- Franssen J, Jeuniaux C (1965) Digestion de l'acide alginique chez les invertebres. Cah. Biol. mar. 6: 1-21.
- Friesen JA (1980) The structure of the gut of *Mysis stenolepsis* and the mechanism of cellulose digestion. M.Sc. thesis, Dalhousie University, Nova Scotia, 73 pp.
- Fujimura T, Kawai T, Shiga M, Kajiwara T, Hatanaka A (1989a) Preparation of immobilized living cells from a marine green alga *Ulva pertusa*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 55: 2211.
- Fujimura T, Kawai T, Shiga M, Kajiwara T, Hatanaka A (1989b) 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, Migita S (1987) Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda and development of fusion products. Jap. J. Phycol. 35: 201-208.
- Fujita Y, Saito M (1990) Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). Hydrobiologia 204/205: 161-166.
- Gacesa P (1988) Alginates. Carbohydr. Polym. 8: 161-182.
- Galli DR, Giese AC (1959) Carbohydrate digestion in a herbivorous snail, *Tegula funebralis*. J. Exp. Zool. 140: 415-439.
- Georgatsos JG, Antonoglou O (1963) Deoxyribonucleases in tissues of marine origin. Enzymologia 27: 141-150.
- Granado I, Caballero P (1991) Feeding preferences by Littorina striata King and Broderip on different algal species. Sci. Mar. 55: 577-581.
- Greer CW, Yaphe W (1984) Purification and properties of i-carrageenase from a marine bacterium. Can. J. Microbiol. 30: 1500-1506.
- Groleau D, Yaphe W (1977) Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of ß-neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas* atlantica. Can. J. Microbiol. 23: 672-679.
- Gross W (1990) Preparation of protoplasts from the carrageenophyte Gigartina corymbifera (Kütz.) J. Ag. (Rhodophyta). J. Microbiol. Methods 12:217-223.
- Haglund K, Björk M, Ramazanov Z, García-Reina G, Pedersén M (1992) Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. Planta 187: 275-281.
- Harada K, Kawasaki O (1982) The attractive effect of seaweeds based on the behavioral responses of young herbivorous abalone *Haliotis discus*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48: 617-621.
- Hawkins SJ, Hartnoll RG (1983) Grazing of intertidal algae by marine invertebrates. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 21: 195-282.
- Hodgkiss IJ, Leung HC (1986) Cellulase associated with mangrove leaf decomposition. Bot. Mar. 29: 467-469.
- Horiuchi S, Lane CE (1965) Digestive enzymes of the crystalline style of *Strombus gigas* Linne. I. Cellulase and some other carbohydrases. Biol. Bull.

129: 273-281.

- Jordan P, Kloareg B, Vilter H (1991) Detection of vanadate-dependent bromoperoxidases in protoplasts from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina*. J. Plant Physiol. 137: 520-524.
- Kajiwara 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.
- Kitamikado M, Tseng C-H, Yamaguchi K, Nakamura T (1992) Two types of bacterial alginate lyase. Appl. envir. Microbiol. 58: 2474-2478.
- 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.
- Knutsen S (1991) Large scale production of bacterial enzymes for depolimerization of matrix polysaccharides in seaweeds. En: García-Reina G, Pedersén M (eds.) Seaweed cellular biotechnology, physiology and intensive cultivation. Cost 48 - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, 91-104.
- Koningsor RL, McLean N, Hunsaker D (1972) Radiographic evidence for a digestive allulase in the sea hare, *Aplysia vaccaria* (Gastropoda: Opisthobranchia). Comp. Biochem. Physiol. 43B: 237-240.
- Kreger DR (1962) Cell walls. En: Lewin RD (ed.), Physiology and biochemistry of algae. Academic Press, New York, 315-335.
- Kristensen JH (1972) Carbohydrases of some marine invertebrates with notes on their food and on the natural occurrence of the carbohydrates studied. Mar. Biol. 14: 130-142.
- Lasker R, Giese AC (1954) Nutrition of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus. Biol. Bull. 106: 328-340.
- Lavilla-Pitogo CR (1992) Agar-digesting bacteria associated with 'rotten thallus syndrome' of *Gracilaria* sp. Aquaculture 102: 1-7.

- Lawrence JM (1975) On the relationships between marine plants and sea urchins. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 13: 213-286.
- LeGall Y, Braud JP, Kloareg B (1990) Protoplast production in *Chondrus* crispus gametophytes (Gigartinales, Rhodophyta). Pl. Cell Rep. 8: 582-585.
- Lewin R (1983) Phycotechnology how microbial geneticists might help. BioScience, 33: 177-179.
- Lewis JB (1964) Feeding and digestion in the tropical sea urchin Diadema antillarum Philippi. Can. J. Zool. 42: 549-557.
- Lignell A, Pedersén M (1989) Agar composition as a function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *G. verrucosa* (Rhodophyta). Bot. Mar. 32: 219-227.
- Liu WS, Tang YL, Liu XW, Fang TC (1984) Studies on the preparation and on the properties of sea snail enzymes. Hydrobiologia 116/117: 319-320.
- 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.
- McCandless JS, Craigie JS, Walter JA (1973) Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. Planta 112: 201-212.
- McCandless EL, West JA, Guiry MD (1982) Carrageenan patterns in the Phyllophoraceae. Biochem. Syst. Ecol. 10: 275-284.
- McHugh DJ (1987) Production, properties and uses of alginates. En: McHugh DJ (ed) Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. 288: 58-115.
- McHugh DJ (1991) Worlwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. Hydrobiologia 221: 19-29.
- McLean MW, Williamson FB (1979) K carrageenase from *Pseudomonas* carrageenovora. Eur. J. Biochem. 93: 553-558.
- McLean MW, Williamson FB (1981) Neocarratetraosa 4-O-monosulphate ßhydrolase from *Pseudomonas carragenovora*.Eur. J. Biochem. 113: 447-456.

- 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.
- Minamitake S, Natori M, Nakajima M, Murooka H (1986) Production of agar-decomposing enzyme by a marine bacterium and some properties of the enzyme. Bull. Coll. Agric. Vet. Med. 43: 84-91.
- Mizukami Y, Kito H, Okauchi M (1993) Factors affecting the electrofusion efficiency of *Porphyra* protoplasts. J. Appl. Phycol. 5: 29-36.
- 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.
- Montgomery JLM, Targett TE (1992) The nutritional role of seagrass in the diet of the omnivorous pinfish Lagodon rhomboides (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 158: 37-57.
- Morrice LM, McLean M, Williamson FB, Long WF (1983a) β -agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Purifications and some properties. Eur. J. Biochem. 135: 553-558.
- Morrice LM, McLean M, Williamson TB, Long WF (1983b) β -Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Substrate specifities. Eur. J. Biochem. 137: 149-154.
- Morrice LM, McLean M, Williamson FB, Long WF (1984) β -agarases from *Pseudomonas atlantica*. Hydrobiologia 116/117: 576-579.
- Muramatsu T, Egawa K (1980) Isozymes of alginate lyase in the mid-gut gland of *Turbo cornutus*. Agric. Biol. Chem. 44: 2587-2594.
- Muramatsu T, Hirose S, Katayose M (1977) Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. Agric. Biol. Chem. 41: 1939-1946.
- Nakada HI, Sweeny PC (1967) Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. J. Biol. Chem. 242: 845-851.
- Neushul M (1984) Marine algal tissue culture. Topical technical report for Gas Research Institute 1981-1983, Gas Research Institute 84/0076, Goleta, CA, 46 pp.

88

- Nisizawa K, Fujibayashi S, Kashiwabara Y (1968) Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. J. Biochem. 64: 25-37.
- Nonomura AM (1988) A future of phytotechnology. En: Lembi CA, Waaland JR (eds.) Algae and human affairs. Cambridge University Press, Cambridge, 529-552.
- Onishi T, Suzuki M, Kikuchi R (1985) The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 51: 301-308.
- Østgaard K (1992) Enzymatic microassay for the determination and characterization of alginates. Carbohyd. Polym. 19: 51-59.
- Percival E (1978) Do the polysaccharides of brown and red seaweeds ignore taxonomy? En: Irvine DEG, Price JH (eds.), Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae. Academic Press, London, New York, 47-62.

Pharmacia LKB (1991) Gel filtration: principles and methods. 5th ed., 102 pp.

- Polne-Fuller M (1987) Preparation of enzymes. En: Indergaard M, Østgaard K, Guiry M (eds.) Seaweed protoplast and tissue culture. Cost 48, Trondheim, 29-30.
- 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. En: 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.
- Potin P, Sanseau A, Le Gall Y, Rochas C, Kloareg B (1991) Purification and characterization of a new k-carrageenase from a marine *Cytophaga*-like bacterium. Eur. J. Biochem. 201: 241-247.
- Preston RD (1974) The physical biology of plant cell walls. Chapman & Hall, London. 491 pp.

Preston JF, Romeo T, Bromley JC, Robinson RW, Aldrich HC (1985)

Alginate lyase-secreting bacteria associated with the algal genus Sargassum. En: Underkofler LA (ed.), Developments in industrial microbiology. Society for industrial microbiology, Arlington, VA, 727-740.

- Prim P, Lawrence JM (1975) Utilization of marine plants and their constituents by bacteria isolated from the gut of Echinoids (Echinodermata). Mar. Biol. 33: 167-173.
- Prosser, CL, van Weel PB (1958) Effect of diet on digestive enzymes in midgut gland of African giant snail, Achatina fulica Fér. Physiol. Zool. 31: 171-178.
- 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. 63-75.
- Quatrano RS, Caldwell BA (1978) Isolation of a unique marine bacterium capable of growth on a wide variety of polysaccharides from macroalgae. Appl. envir. Microbiol. 36: 979-981.
- Rasskazov VA, Pirozhnikova VV, Galkin VV (1975) Some properties and specificity of deoxyribonucleases from marine invertebrates and fishes. Comp. Biochem. Physiol. 51B: 343-347.
- Reddy CRK, Fujita Y (1989) Protoplast isolation and fusion of Ulva pertusa and U. conglobata. En: Miyachi S, Karube I, Ishida Y (eds.), Current topics in marine biotechnology. The Japanese Society for Marine Biotechnology, Tokyo, 235-238.
- Reddy CRK, Fujita Y (1991) Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. J. Appl. Phycol. 3: 265-275.
- Reddy CRK, Iima M, Fujita Y (1992) Induction of fast-growing and morphologically different strains through intergeneric protoplast fusions of Ulva and Enteromorpha (Ulvales, Chlorophyta). J. Appl. Phycol. 4: 57-65.
- Reddy CRK, Migita S, Fujita Y (1989) Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture. Bot. Mar. 32: 483-490.
- Reddy CRK, Saito M, Migita S, Fujita Y (1990) Intrageneric fusions of isolated protoplasts from *Ulva* and *Porphyra* by electrofusion method. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ. 68: 21-27.
- Robledo, DR, García-Reina G (1993) Apical callus formation in Solieria filiformis (Gigartinales, Rhodophyta) cultured in tanks. Hydrobiologia (en
prensa)

- 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.
- Sakata K, Itoh T, Ina K (1984) A new bioassay method for phagostimulants for a young abalone, *Haliotis discus* Reeve. Agric. Biol. Chem. 48: 425-429.
- Sakata K, Tsuge M, Ina K (1986) A simple bioassay for feeding-stimulants for the young seahare *Aplysia juliana*. Mar. Biol. 91: 509-511.
- Sarwar G, Sakata T, Kakimoto D (1983) The production and characteristics of carrageenase from marine *Cytophaga*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49: 1689-1694.
- Schaumann K, Weide G (1990) Enzymatic degradation of alginate by marine fungi. Hydrobiologia 204/205: 589-596.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1969) Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases. Crop Sci. 9: 629-631.
- Scopes R (1982) Protein purification. Principles and practice. Springer-Verlag, New York, 282 pp.
- Seiderer LJ, Newell RC, Cook PA (1982) Quantitative significance of style enzymes from two marine mussels (*Choromytilus meridionalis* Krauss and *Perna perna* Linnaeus) in relation to diet. Mar. Biol. Lett. 3: 257-271.
- Seiderer LJ, Newell RC, Schultes K, Robb FT, Turley CM (1987) Novel bacteriolytic activity associated with the style microflora of the mussel *Mytilus edulis* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 110: 213-224.

Shunula JP, Ndibalema V (1986) Grazing preferences of *Diadema setosum* and *Heliocidaris erythrogramma* (Echinoderms) on an assortment of marine algae. Aquat. Bot. 25: 91-95.

Bibliografía

- Smith RG, Bidwell RGS (1989) Inorganic carbon uptake by photosynthetically active protoplasts of the red macroalga *Chondrus crispus*. Mar. Biol. 102: 1-4.
- Stanley N (1987) Production, properties and uses of carrageenan. En: McHugh DJ (ed) Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. 288: 116-146.
- Strætkvern KO, Raae AJ, Walther BT (1990) Purification and physicochemical properties of deoxyribonuclease from pyloric caeca of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Fish Physiol. Biochem. 8: 529-539.
- Suzuki M, Watanabe Y, Tanaka A, Ohnishi T (1986) The polysaccharide degradation activity in the apple snail. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Laboratory 120: 53-60.
- Tang Y (1982) Isolation and cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *Porphyra suborbiculata* Kjellm. J. Shandong Coll. Oceanol. 12: 38-50.
- Teo LH, Sabapathy V (1990) Preliminary report on the digestive enzymes present in the digestive gland of *Perna viridis*. Mar. Biol. 106: 403-407.
- Tokuda H, Kawashima Y (1988) Protoplast isolation and culture of a brown alga, Undaria pinnatifida. En: 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.
- Torzilli AP, Andrykovitch G (1980) Cell wall degrading enzymes produced by the salt marsh fungus *Buergenerula spartinae*. Bot. Mar. 23: 645-650.
- Tribe HT (1955) Studies on the physiology of parasitism. XIX. On the killing of plant cells by enzymes from *Botrytis cinerea* and *Bacterium aroideae*. Ann. Bot. 19: 351-371.
- Turvey JR, Christison J (1967) The hydrolysis of algal galactans by enzymes from a Cytophaga species. Biochem. J. 105: 311-316.
- Tutschulte TC, Connel JH (1988) Feeding behavior and algal food of three species of abalones (*Haliotis*) in Southern California. Mar. Ecol. Prog. Ser. 49: 57-64.
- Usov AJ, Miroshnikova LI (1975) Isolation of agarase from Littorina

mandshurica by affinity chromatography on Biogel A. Carbohyd. Res. 43: 204-207.

- Vallabhan DL (1989) Studies on the physiology of digestion in the isopod *Sphaeroma walkeri*. 1. Digestive enzymes. Comp. Physiol. Ecol. 14: 139-144.
- van der Meulen HJ (1975) The enzimatic hydrolysis of agar by Cytophaga flevensis sp. nov. Ph.D., Gröningen University, 80 pp.
- van Weel PB (1959) The effect of special diets on the digestion processes (enzyme production and resorption) in the african giant snail Achatina fulica Bowdich. Z. vergl. Physiol. 42: 433-448.
- van Weel PB (1961) The comparative physiology of digestion in molluscs. Am. Zool. 1: 245-252.
- Vitalis TZ, Spence MJ, Carefoot TH (1988) The possible role of gut bacteria in nutrition and growth of the sea hare *Aplysia*. The Veliger 30: 333-341.
- Waaland JR, Dickson LG, Watson BA (1990) Protoplast isolation and regeneration in the marine red alga *Porphyra nereocystis*. Planta 181: 522-528.
- Wainwright M (1980) Alginate degradation by the marine fungus Dendryphiella salina. Mar. Biol. Lett. 1: 351-354.
- Wang S, Sun Y, Lu A, Wang G (1987) Early stage differentiation of thallus cells of *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta). Chin. J. Oceanol. Limnol. 5: 217-224.
- Wojtowicz MB (1972) Carbohydrases of the digestive gland and the crystalline style of the atlantic deep-sea scallop (*Placopecten magellanicus* Gmelin). Comp. Biochem. Physiol. 43A: 131-141.
- Yamaura I, Matsumoto T, Funatsu M, Shigeiri H, Shibata T (1991) Purification and some properties of agarase from *Pseudomonas* sp. PT-5. Agric. Biol. Chem. 55: 2531-2536.
- Yaphe W (1957) The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae). Can. J. Microbiol. 3: 987-993.
- Yaphe W (1966) The purification and properties of an agarase from a marine bacterium, *Pseudomonas atlantica*. Proc. 5th Int. Seaweed Symp. 5: 333-335.

Yokoe Y, Yasumasu I (1964) The distribution of cellulase in invertebrates.

Comp. Biochem. Physiol. 13: 323-338.

- Young KS, Bhattacharjee SS, Yaphe W (1978) Enzymic cleavage of the α -linkages in agarose to yield agaro-oligosaccharides. Carbohyd. Res. 66: 207-212.
- Young K, Hong KC, Duckworth M, Yaphe W (1971) Enzymic hydrolysis of agar and properties of bacterial agarases. Proc. 7th Inter. Seaweed Symp. 7: 469-472.
- 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.
- Zhu R, Shaoling C, Li H (1987a) A study of alginate lyases. I. Isolation, purification and kinetics of lyases. Acta Oceanol. Sin. 6: 281-291.
- Zhu R, Shi H, Liu R (1987b) A study of alginate lyases. II. Their effects on substrate. Acta Oceanol. Sin. 6: 434-443.

.

· .

.

7. Artículos

.

.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

.

. .

.

I

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

. •

Marine Biology (1993) 112, 0-00



Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds

J. L. Gómez-Pinchetti, G. García-Reina

Instituto de Algología Aplicada, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Box 550, E-Las Palmas, Canary Islands, Spain

Received: 4 March 1993 / Accepted: 1 April 1993

Abstract. Agarase, cellulase and alginate lyase activities from crude extracts of Aplysia dactylomela Rang, Haliotis coccinea canariensis Nordsieck, Littorina striata King et Broderip and Diadema antillarum Phillipi were measured in vitro to compare digestive efficiencies against several components of complex seaweed cell walls. Commercial Abalone acetone powder (AAP, an extract from Haliotis sp.; Sigma, Ref. A-7514) and purified (Sigma, Ref. A-6306) and non-purified agarases from Pseudomonas atlantica were used with the same objective. Optimum conditions for agarase and cellulase activities were 40 °C and pH 6.0. For alginate lyase, optimum temperature and pH were species-dependent. Highest reducing sugar release was shown by crude extracts from A. dactylomela. These crude extracts displayed high agarase activity compared with bacterial agarases at 40 °C, and were significantly higher at 25 °C. AAP and crude extracts from L. striata and D. antillarum exhibited high specific activities on all the substrates. Cold extract from Gracilaria spp. was the best substrate with which to measure agarase activity.

Introduction

Protoplast and somatic hybridization have been suggested as promising biotechnological tools for applied and basic studies in seaweed physiology, biochemistry and genetics (Cheney et al. 1986, Saga et al. 1986, Smith and Bidwell 1989, Butler et al. 1990, Davison and Polne-Fuller 1990, Jordan et al. 1991). but this potential is still constrained in agarophytes (and in other anatomically complex seaweeds) by the absence of highly efficient enzymes which degrade their cell walls.

Cellulose is the most common skeletal polymer in most macroalgae (Kreger 1962). Agar [a linear sulphated galactan composed of two regularly repeated galactose units alternatively linked by $\beta(1-4)$ and $\alpha(1-3)$ linkages]

and carrageenan [highly sulphated galactans composed of D-galactose alternatively linked by $\beta(1-4)$ and $\alpha(1-3)$ linkages] in Rhodophyta, and algin [a polysaccharide made up of two uronic acids, β -1,4-D-mannuronic and α -1,4-L-guluronic acids] in Phaeophyta, are the most common matrix components of seaweeds (Kloareg and Quatrano 1988).

Inefficient digestion of the cell walls of anatomically complex brown and red seaweeds is not only due to their inherent complexity, but also to changes in cell-wall constitution due to age, life history, physiological status and culture conditions (Kloareg and Quatrano 1988, Björk et al. 1990). The complex and wide range of structural, matrix and storage carbohydrates found in seaweeds can be degraded by several marine herbivores and microorganisms (Galli and Giese 1959, Lewis 1964, Nisizawa et al. 1968, Benitez and Macaranas 1979, Torzilli and Andrykovitch 1980, Liu et al. 1984, Morrice et al. 1984, Onishi et al. 1985, Preston et al. 1985, Suzuki et al. 1986, Boyen et al. 1990). Broad-spectrum enzymatic systems freshly isolated from microorganisms (Polne-Fuller and Gibor 1987a, Smith and Bidwell 1989, Le Gall et al. 1990) or from the digestive tract of phycophages (Zhu 1983, Polne-Fuller et al. 1984, Saga and Sakai 1984, Chen 1987, Tokuda and Kawashima 1988, Butler et al. 1989) have been described as effective for the isolation of seaweed protoplasts, but the results have shown variable success.

There are very few data on enzymes from marine herbivores that degrade cell walls of seaweeds, and no quantitative studies of the agarolytic activity of extracts from marine molluscs have been reported. Knowledge of the specific polysaccharidase activity is a previous basic step to obtaining sustained high protoplast yields and plating efficiency (Boyen et al. 1990). The aim of the present study was the quantitative screening of enzymes from phycophages and bacteria that degrade seaweed cell walls, and the comparison of specific enzymatic activities at temperatures and pHs appropriate for the recovery of viable seaweed protoplasts.

Materialverbrauch: 0.6 m p150

Ms. No. A(7.89... Author 2.L..60m.e.2...Springer-Verlag, Heidelberg/Triltsch, Würzburg Provisional page numbers SGML Please correct in red ink



Fig. 1. Schematic of extraction procedure for preparing crude extracts from phycophages

Materials and methods

Crude extracts from the molluses *Aplysia daetylomela* Rang, *Haliotis coccinea canariensis*. Nordsieck, *Littorina striata* King et Broderip and the echinoderm *Diadema antillarum* Phillipi were prepared within 24 h of collection.

Preparation of crude extracts

Salivary glands, oesophagus and the digestive gland of *Aplysia* dactylomela, the digestive tract and hepatopancreas of *Haliotis coccinea canariensis*, the gut of *Diadema antillarum* and the whole body of *Littorina striata* (after shell removal), were used as enzymatic sources. Temperatures between 0 and 4° C and 0.1 *M* phosphate buffer at pH 6.0 or 7.2 were used for all operations (except where indicated otherwise).

The pH of the oesophagus and digestive gland (separately) from *Aplysia dactylomela* and the gut from *Diadema antillarum* were measured immediately after dissection.

The extraction procedure is shown in Fig. 1. Glands and organs were homogenized and extracted with buffer supplemented with EDTA Na₂ (2.0 mM) in a mortar under liquid nitrogen. Homogenates were squeezed through a 170 μ m nylon mesh and centrifuged at 3000 $\times g$ for 30 min.

A saturated ammonium sulphate solution was added to the supernatants to 40% saturation. Suspensions were equilibrated for several hours and then centrifuged at 13 000 $\times g$ for 20 min. Pellets were resuspended in buffer (Fraction I), and saturated ammonium sulphate was added to the new supernatants to 80% saturation. After equilibration and centrifugation at 13 000 $\times g$ for 20 min, pellets were collected and dissolved in buffer (Fraction II). Fractions I and II were dialyzed against buffer overnight. Crude extracts consisted of the combined dialyzed Fractions I and II.

Purified agarase (PA) (EC 3.2.1.81, 1000 U ml⁻¹ buffer; unit definition: 1 unit will produce 1.0 μ g of reducing sugar, measured as D-galactose, from agar per min at 40 °C and pH 6.0) from *Pseudomonas atlantica* (Sigma, Ref. A-6306) and abalone acetone powder (AAP, a commercial available crude extract prepared from *Haliotis* sp. entrails; Sigma, Ref. A-7514) dissolved in buffer were used for a comparative experiment. After several hours equilibration, abalone acetone powder solution (1% w/v) was centrifuged at 3000 × g for 30 min and dialyzed overnight against buffer.

A non-purified agarase (NPA), from a *Pseudomonas atlantica* culture (kindly provided by Boehringer Mannheim), containing 110 U ml⁻¹ of agarase [unit definition: 1 unit of agarase will produce 1.0 μ g/min of reducing sugars from low melting-point agarose, measured as D-galactose by the ferric-cyanide assay (Kidby and Davidson 1973) at 45 °C and pH 6.8] was also used for comparison of agarolytic activities.

All the enzymatic solutions were stored at -20 °C until use. Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as the standard.

Substrates

Cold extract from *Gracilaria* spp. (kindley supplied by Professor M. Pedersén, University of Uppsala, Sweden), "natural" agar (dry powder without any additive, as extracted from *Gelidium* sp., kindly supplied by R. Armisén, Hispanagar S.A., Spain) and low meltingpoint agarose (Sigma, Ref. A-4018) were used as substrates to measure agarase activity. The extraction procedure of cold extract (Lahaye et al. 1986) is based on the differential solubility of agar polymers in ethanol and water at different temperatures. The agar content in the cold extract (extracted in distilled water at 22°C) is equivalent to the agar content of the young tissue (Lahaye et al. 1986).

Carboxymethyl cellulose (CMC) and sodium alginate (Sigma, Ref. C-8758 and A-2158, respectively) were used for cellulase (EC 3.2.1.4) and alginate lyase (EC 4.2.2.3) activities, respectively.

Quantification of enzymatic activities

The assay system consisted of 900 μ l of 0.3% (w/v) substrate solution dissolved in buffer and 100 μ l crude extract. Mixtures were incubated for 4 h at 25 and 40°C. Samples were removed at different intervals of time and reactions were stopped by boiling mixtures for 3 min in a water bath. After centrifugation (3000 × g, 5 min) supernatants were used for the analysis of reducing sugars (RS). RS were determined spectrophotometrically by the method of Nelson (1944) as modified by Somogyi (1952), using galactose, glucose and galacturonic acid as standards for agarase, cellulase and alginate lyase activities, respectively. Results were corrected by subtraction of the corresponding blank.

Specific enzymatic activities were expressed as μg of reducing sugars produced per mg of protein per hour. Results are the means of 3 to 5 different determinations (5 observations each). The variability of each experiment never exceeded 10% of the mean.

Results

The pH in the oesophagus and digestive gland of Aplysia dactylomela was (mean \pm SD) 5.58 \pm 0.42 and 5.85 \pm 0.19, respectively (n = 8), and in the gut of Diadema antillarum 6.92 \pm 0.18 (n = 4). pH in the tract and hepatopancreas of Haliotis coccinea canariensis and in the whole body of Littorina striata was difficult to measure because of their small size, but the pH of the homogenates varied between 5.5 and 6.0.

J.L. Gómez-Pinchetti and G. García-Reina: Enzymes degrading seaweed cell walls

 Table 1. Aplysia dactylomela, Haliotis coccinea canariensis, Littorina striata and Diadema antillarum. Specific enzymatic activities of digestive enzymes at different conditions of temperature (25 and
 40 °C) and pH (6.0 and 7.2). RS: reducing sugars, CX: cold extract, CMC: carboxymethyl cellulose, Alg: sodium alginate, -: not tested

Extract	рН	Specific activity (µg RS mg protein ⁻¹ h ⁻¹)								Protein conc,
		CX		Agar		СМС		Alg		$(mg ml^{-1})$
		25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40 °C	
A. dactylomela	6.0	63.4	76.2	19.4	47.0	73.9	74.1	14.2	45.1	6.2 ± 1.6
	7.2	38.6	58.1	19.8	46.2	62.6	77.9	18.0	52.2	(<i>n</i> =10)
Abalone acetone powder	6.0	74.7	95.8	41.0	15.3	92.9	116.8	88.5	33.4	1.9 ± 0.4
	7.2	47.4	64.6	12.8	24.4	76.8	80.0	140.0	181.0	(n=9)
H. coccinea canariensis	6.0 7.2	8.9 6.9		-	-	49.1 39.6	-		-	6.7 ± 1.2 (n=4)
L. striata	6.0	55.2	13.5	74.7	19.3	122.6	108.7	60.1	65.3	1.2 ± 0.3
	7.2	43.9	21.2	51.0	14.3	89.5	122.9	50.6	112.1	(n=7)
D. antillarum	6.0	42.0	85.1	89.1	57.0	64.8	73.5	28.8	14.8	1.9 ± 0.5
	7.2	77.8	106.8	79.2	74.1	70.6	68.8	28.2	6.7	(n=4)

Table 2. Aplysia dactylomela and Pseudomonas atlantica. Agarase activity of crude extract from A. dactylomela, and purified (PA) and non-purified (NPA) agarases from P. atlantica. CX: cold extract; -: not tested

Extract	рН	Agarase activity (μ g RS h ⁻¹)							
		CX		Agar		Agarose			
		25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C		
A. dactylomela (crude)	6.0 7.2	393.1 239.3	472.4 360.2	120.3 122.7	291.4 286.4	118.0	261.8		
Agarase (PA)	6.0 7.2	275.4 234.9	384.5 370.5	73.0 82.0	213.8 180.0	87.8 39.7	118.0 84.0		
Agarase (NPA)	6.0 7.2	119.5 111.9	138.5 54.9	37.0 76.0	90.0 109.0	33.3 67.5	77.0 51.1		

Specific enzymatic activities and protein concentration of crude extracts of Aplysia dactylomela, abalone acetone powder, Haliotis coccinea canariensis, Littorina striata and Diadema antillarum are given in Table 1. Total protein concentration was 3- to 5-fold higher in A. dactylomela and H. coccinea canariensis than in the abalone acetone powder L. striata and D. antillarum extracts. These differences strongly affected the results for specific enzymatic activity on a protein concentration basis.

All the enzymatic systems degraded the experimental substrates, although clear differences were observed in substrate-specificity and as a function of temperature and pH. Optimal temperature and pH for agarase and cellulase activity were 40 °C and pH 6.0 for all the extracts, except for cellulase activity in *Littorina striata* (Table 1).

Highest alginate lyase activities were generally obtained at 40 °C and pH 7.2, with some exceptions; AAP showed very high activities at 25 °C, although the highest was observed at 40 °C (pH 7.2). *Diadema antillarum* crude extracts displayed highest activity at 25 °C, and *Littorina striata* at 40 °C and pH 7.2 (Table 1).

Agarolytic activities from Aplysia dactylomela and both purified and non-purified bacterial sources, expressed as μ g RS h⁻¹, are shown in Table 2. Optimum temperature and pH for bacterial agarases appeared to be the same as for crude extracts from phycophages (40 °C and 6.0). The agarolytic activity of *A. dactylomela* crude extracts was significantly higher against cold extract, agar and agarose, and varied as a function of temperature and pH (Table 2).

Fig. 2 shows the hydrolytic evolution of some extracts on different substrates. The extract from *Aplysia dactylomela* had the highest RS-release rate on all the substrates except sodium alginate, and displayed significant differences between activities on cold extract and agar (Fig. 2A). No significant increases in RS were observed after 4 h of incubation.

Discussion

This is the first report which describes agarase activity from phycophages. Our results revealed similar optimum values for temperature and pH as those described for bacterial agarases, i.e., temperatures around 40 to 41 $^{\circ}$ C and pH between 5.0 and 7.2 (Yaphe 1966, Duckworth





Fig. 2. Hydrolytic evolution of various mollusc extracts on different substrates. (A) On cold extract (\Box : *Aplysia dactylomela*; \triangle : abalone acetone powder, AAP) and on natural agar (+:*A. dactylomela*; o: AAP); (B) on natural agar (\Box : *A. dactylomela*; +: purified agarase; \diamond : *Diadema antillarum*); (C) on carboxymethyl cellulose (\Box :

and Turvey 1969, Van der Meulen 1975, Morrice et al. 1983). The agarolytic activities of crude extracts from *Aplysia dactylomela* (combined with high cellulase activity) appeared to be optimum at optimum conditions for protoplast isolation, 25 °C and pH 6.0, and were notably higher than activities of bacterial agarases. As expected, optimum pH conditions were similar to these measured in the digestive system, a fact common to all the enzymatic activities and phycophages.

The reducing power is hindered at temperatures <35 °C when agar and agarose are used as substrates, since these substrates do not form homogeneous solutions (Van der Meulen 1975). However activities on cold extract (which does not form gels at any concentration and is easily dissolved in aqueous solution), natural agar and low melting-point agarose at concentrations up to 0.3%, can be measured at lower temperatures. Compared with natural agar and agarose (Tables 1 and 2), cold extract enabled the highest resolution of agarase activity measurements at a broad range of temperatures.

The results for cellulase activity are in accordance with those obtained for other species of molluscs (Yokoe and

A. dactylomela; \times : Haliotis coccinea canariensis; o: AAP; \diamond : D. antillarum); (D) On sodium alginate (o: AAP; \Box : A. dactylomela; ∇ : Littorina striata). Incubation conditions are given inside each graph. RS: reducing sugars

Yasumasu 1964, Hylleberg Kristensen 1972, Brock et al. 1986, Suzuki et al. 1986, Boyen et al. 1990), as are the optimum ranges of temperatures (24 to 35°C) and pH (6.0 to 7.0) (Horiuchi and Lane 1965, Brock et al. 1986).

Boyen et al. (1990) found similar in vitro levels of activity between a commerical cellulase and crude and purified fractions of Aplysia depilans and Haliotis tuberculata using microcrystalline cellulose as substrate. The negligible cellulase activity of the crude extracts used for the isolation of protoplasts compared to commercial cellulase could be due to the use of an inappropriate substrate. To measure digestive cellulases, the most convenient substrate is carboxymethyl cellulose (CMC) which is easier to degrade than other cellulose derivatives (Hylleberg Kristensen 1972). However, the ability to digest CMC does not prove that an organism can digest the types of cellulose present in its natural diet (Friesen 1980). In our case, CMC was extensively digested by all the crude extracts, including these prepared from Diadema antillarum, although previous results (Lewis 1964) did not show cellulase activity in extracts from this sea urchin using filter paper as substrate.

Similar data on alginate lyase activities from *Aplysia*, *Haliotis* and *Littorina* species had been reported previously (Franssen and Jeuniaux 1965, Nakada and Sweeny 1967, Elyakova and Favorov 1974. Boyen et al. 1990), but not for *Diadema antillarum*, although Eppley and Lasker (1959) described degradation of sodium alginate solutions by other species of sea urchins.

Differences in agarase, cellulase and alginate lyase activities of crude extracts from *Aplysia dactylomela*, *Haliotis coccinea canariensis*, *Littorina striata*, and *Diadema antillarum*, are probably related to factors such as dietary preferences and availability of seaweeds. The highest alginate lyase activity was shown by the acetone powder from abalone (*Haliotis* sp.), and could be related to the preparation of extracts from individuals fed specific diets (i.e., brown seaweeds such as *Macrocystis pyrifera*) for long periods.

The acetone powder method for the extraction of abalone entrails was very effective, as reported previously by Polne-Fuller (1987). Substances which could be potentially harmful to plant tissues during the process of protoplast isolation (Cocking 1972, Berliner 1981) are removed from crude extracts by partial purification with ammonium sulphate and desalting. Nevertheless, new steps in the process of purification could be aimed at elucidating the behaviour and the biochemical properties of the different enzymes found in these phycophages.

Extracts from Aplysia dactylomela, commercial abalone acetone powder, Haliotis coccinea canariensis, Littorina striata and Diadema antillarum are highly efficient in digesting the complex carbohydrates in seaweeds cell walls, at a temperature (25°C) and pH (6.0) optimal for the recovery of high protoplast yields and plating efficiencies of complex seaweeds (Polne-Fuller and Gibor 1987 b, Butler et al. 1990).

Acknowledgements. The authors are indebted to R. Armisén (Hispanagar S.A.) for his valuable comments on this study. This work was supported by CICYT (Project MAR-1237/91) and the University of Las Palmas de Gran Canaria through a grant to J. L. Gómez-Pinchetti. Support by Fundación Universitaria de Las Palmas and Air Europa are gratefully acknowledged.

Literature cited

- Benitez, L. V., Macaranas, J. M. (1979). Partial purification of a carrageenase from the tropical sea urchin *Diadema setosum*. Proc. int. Seaweed Symp. 9: 353-359 [Jensen, A., Stein, J. R. (eds.) Science Press, Princeton]
- Berliner, M. D. (1981). Protoplasts of eukaryotic algae. Int. Rev. Cytol. 73: 1-19
- 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). Botanica mar. 33: 433-439
- Boven, 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
- Brock, V., Kennedy, V. S., Brock, A. (1986). Temperature dependency of carbohydrase activity in the hepatopancreas of thirteen estuarine and coastal bivalve species from the North American east coast. J. exp. mar. Biol. Ecol. 103: 87-101
- Butler, D. M., Evans, L. V., Kloareg, B. (1990). Isolation of protoplasts from marine macroalgae. In: Akatsuka, I. (ed.) Introduc-

tion to applied phycology. SPB Academic Publishing, The Hague, p. 647-668

- Butler, D. M., Østgaard, K., Boyen, C., Evans, L. V., 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
- Chen, L. C.-M. (1987). Protoplast morphogenesis of Porphyra leucosticta in culture. Botanica mar. 30: 399-403
- Cheney, D. P., 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, E. (1972). Plant cell protoplasts. Isolation and development. A. Rev. Pl. Physiol. 23: 29-50
- Davison, I. R., Polne-Fuller, M. (1990). Photosynthesis in protoplasts of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). J. Phycol. 26: 384– 387
- Duckworth, M., Turvey, J. R. (1969). An extracellular agarase from a Cytophaga species. Biochem. J. 113: 139-142
- Elyakova, L. A., Favorov, V. V. (1974). Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina* sp. Biochim. biophys. Acta 358: 341-354
- Eppley, R. W., Lasker, R. (1959). Alginase in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Science, N.Y. 129: 214-215
- Franssen, J., Jeuniaux, C. (1965). Digestion de l'acide alginique chez les invertebres. Cah. Biol. mar. 6: 1-21
- Friesen, J. A. (1980). The structure of the gut of *Mysis stenolepis* and the mechanism of cellulose digestion. M. Sc. thesis. Dalhousie University, Nova Scotia
- Galli, D. R., Giese, A. C. (1959). Carbohydrate digestion in a herbivorous snail, *Tegula funebralis*. J. exp. Zool. 140: 415-439
- Horiuchi, S., Lane, C. E. (1965). Digestive enzymes of the crystalline style of *Strombus gigas* Linne. I. Cellulase and some other carbohydrases. Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 129: 273-281
- Hylleberg Kristensen, J. (1972). Carbohydrases of some marine invertebrates with notes on their food and on the natural occurrence of the carbohydrates studied. Mar. Biol. 14: 130-142
- Jordan, P., Kloareg, B., Vilter, H. (1991). Detection of vanadatedependent bromoperoxidases in protoplasts from the brown algae Laminaria digitata and L. saccharina. J. Pl. Physiol. 137: 520-524
- Kidby, D. K., Davidson, D. J. (1973). A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. Analyt. Biochem. 55: 321-325
- Kloareg, B., Quatrano, R. S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. Oceanogr. mar. Biol. A. Rev. 26: 259-315
- Kreger, D. R. (1962). Cell walls. In: Lewin, R. D. (ed.) Physiology and biochemistry of algae. Academic Press, New York, p. 315– 335
- Lahaya, M., Rochas, C., Yaphe, W. (1986). A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell wall of *Gracilaria* spp. (Gracilariaceae, Rhodophyta). Can. J. Bot. 64: 579-585
- Le Gall, Y., Braud, J. P., Kloareg, B. (1990). Protoplast production in *Chondrus crispus* gametophytes (Gigartinales, Rhodophyta). Pl. Cell Rep. 8: 582-585
- Lewis, J. B. (1964). Feeding and digestion in the tropical sea urchin Diadema antillarum Philippi. Can. J. Zool. 42: 549-557
- 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 116/117: 319-320
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193: 265-275
- Morrice, L. M., McLean, M., Williamson, F. B., Long, W. F. (1983). β-agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*: purifications and some properties. Eur. J. Biochem. 135: 553-558
- Morrice, L. M., McLean, M., Williamson, F. B., Long, W. F. (1984). β-agarases from *Pseudomonas atlantica*. Hydrobiologia 116/ 117: 576-579

- Nakada, H. I., Sweeny, P. C. (1967). Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. J. biol. Chem. 242: 845-851
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. biol. Chem. 153: 375-380
- Nisizawa, K., Fujibayashi, S., Kashiwabara, Y. (1968). Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella* auricula Solander. J. Biochem. 64: 25-37
- Onishi, T., Suzuki, M., Kikuchi, R. (1985). The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. Bull. Jap. Soc. scient. Fish. 51: 301-308
- Polne-Fuller, M. (1987). Preparation of enzymes. In: Indergaard, M., Østgaard, K., Guiry, D. (eds.) Seaweed protoplast and tissue culture. COST 48. European Economic Community, Brussels. Proceedings of Workshop on Biotechnical Methods in seaweed cultivation. E.E.C., Trondheim, p. 29-30
- Polne-Fuller, M., Biniaminov, M., Gibor, A. (1984). Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. Hydrobiologia 116/117: 308-313
- Polne-Fuller, M., Gibor, A. (1987a). Microorganisms as digestors of seaweed cell walls. Hydrobiologia 151/152: 405-409
- Polne-Fuller, M., Gibor, A. (1987 b). Tissue culture of seaweeds. In: Bird, K. T., Benson, P. H. (eds.) Seaweed cultivation for renewable resources. Vol. 16. Elsevier, Amsterdam, p. 219-239
- Preston, J. F., Romeo, T., Bromley, J. C., Robinson, R. W., Aldrich, H. C. (1985). Alginate lyase-secreting bacteria Underkofler, L. A. (ed.) Developments in industrial microbiology. Society for Industrial Microbiology, Arlington, Virginia, p. 727-740
- Saga, N., Polne-Fuller, M., Gibor, A. (1986). Protoplasts from seaweeds: production and fusion. In: Barclay, W. R., McIntosh, R. P. (eds.) Algal biomass technologies: an interdisciplinary perspective. Vol. 83. J. Cramer, Berlin, p. 37-43
- Saga, N., Sakai, Y. (1984). Isolation of protoplasts from Laminaria and Porphyra. Bull. Jap. Soc. scient. Fish. 50: 1085

- Smith, R. G., Bidwell, R. G. S. (1989). Inorganic carbon uptake by photosynthetically active protoplasts of the red macroalga *Chondrus crispus*. Mar. Biol. 102: 1-4
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. J. biol. Chem. 195: 19-23
- Suzuki, M., Watanabe, Y., Tanaka, A., Ohnishi, T. (1986). The polysaccharide degradation activity in the apple snail. Bull. Tokai reg. Fish. Res. Lab. 120: 53-60
- 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., Morran, H., Christiaen, D. (eds.) Algal biotechnology. Elsevier Applied Science, London, p. 152-157
- Torzilli, A. P., Andrykovitch, G. (1980). Cell wall degrading enzymes produced by the salt marsh fungus *Buergenerula sparti*nae. Botanica mar. 23: 645-650
- Van der Meulen, H. J. (1975). The enzymatic hydrolysis of agar by *Cytophaga flevensis* sp. nov. Ph. D. thesis. University of Groningen, The Netherlands
- Yaphe, W. (1966). The purification and properties of an agarase from a marine bacterium, *Pseudomonas atlantica*. Proc. 5th int. Seaweed Symp. 5: 333-335 [Young, E. G., McLachlan, J. L. (eds.) Pergamon Press, Oxford]
- Yokoe, Y., Yasumasu, I. (1964). The distribution of cellulase in invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 13: 323-338
- Zhu, R. (1983). A comparative study of marine algae cell-wall decomposition by the digestive enzimes isolated from three species of marine gastropods. Coll. ocean. Wks. Qingdao (China) 6: 122-126

Communicated by J. M. Pérès, Marseille

.

·



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

.

,

•

Acid deoxyribonuclease activity in crude extracts from marine phycophages used for seaweed protoplast isolation

JUAN LUIS GOMEZ-PINCHETTI and GUILLERMO GARCIA-REINA

Instituto de Algología Aplicada, Dpto. Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Box 550, Las Palmas, Islas Canarias, Spain

Running title: DNase in crude extracts from marine phycophages

Key words: phycophages, seaweed, protoplasts, DNase.

SUMMARY

Deoxyribonuclease activity (DNase) was studied in crude extracts prepared from the digestive tracts of the marine molluscs *Aplysia dactylomela* Rang, *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck, *Littorina striata* King et Broderip, the echinoderm *Diadema antillarum* Phillipi, and a commercially available abalone acetone powder (AAP; Sigma, Ref. A-7514) to evaluate their toxic effects when used for seaweed protoplast isolation. DNase was detected at pH 5.0, in presence of Mg^{2+} , in all the crude extracts except in those obtained from the digestive gland of *A. dactylomela*. At pH 6.0, activity was not detected. Maximal specific activities were measured in *L. striata* and *D. antillarum* crude extracts. AAP showed the lowest specific activity of all the assayed extracts.

The pH in the different digestive organs of these phycophages ranged from 5.0 to 7.0, measured *in vivo*, providing new information about the optimum values at which digestion occurs and, together with results on DNase activities, those which should be used to degrade seaweed cell walls.

RESUMEN

Actividad deoxiribonucleasa en extractos crudos de ficófagos marinos empleados para el aislamiento de protoplastos de macroalgas. Actividad deoxiribonucleasa (DNasa) fue estudiada en extractos crudos, preparados de los sistemas digestivos, de los moluscos *Aplysia dactylomela* Rang, *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck, *Littorina striata* King et Broderip, el equinodermo *Diadema antillarum* Phillipi, y un extracto de *Haliotis* sp. en forma de polvos acetónicos, comercialmente disponible (abalone acetone powder, AAP; Sigma, Ref. A-7514), para evaluar sus efectos tóxicos al ser empleados en el aislamiento de protoplastos de macroalgas. DNasa fue detectada a pH 5.0, en presencia de Mg²⁺, en todos los extractos crudos exceptuando aquellos obtenidos de la glándula digestiva de *A. dactylomela*. A pH 6.0, actividad DNasa no fue detectada en ninguno de los extractos. Las actividades específicas máximas fueron medidas en los extractos crudos de *L. striata* y *D. antillarum*. El AAP mostró la actividad específica más baja de todos los extractos ensayados.

El pH en los diferentes órganos digestivos de estos ficófagos, medido *en vivo*, varió de 5.0 a 7.0, aportando nueva información sobre los valores óptimos de pH en los que la digestión tiene lugar y, junto a los resultados sobre la actividad DNasa, aquellos que deben ser usados para la digestión de la pared celular en macroalgas.

Palabras clave: ficófagos, macroalgas, protoplastos, DNasa.

INTRODUCTION

The potential toxicity of proteases, lipases, peroxidases and deoxyribonucleases of crude extracts from the digestive tracts of a number of phycophages on the viability of plant protoplasts has been commented by several authors (see TRIBE, 1955; SCHENK and HILDEBRANDT, 1969; BERLINER, 1981; COCKING, 1972; FITZSIMONS and WEYERS, 1985; BUTLER *et al.*, 1990). However, few attempts have been made on quantification and characterization of such potentially toxic enzymes.

Most of the crude extracts used for seaweed protoplast isolation are extracted from herbivorous marine molluscs and echinoderms such as Aplysia, Haliotis, Littorina or Diadema species (SAGA and SAKAI, 1984; CHEN, 1987; BUTLER et al., 1989; BOYEN et al. 1990; GOMEZ-PINCHETTI and GARCIA-REINA, in press). Low protease activity has been detected in crude extracts of Aplysia depilans and Haliotis tuberculata (BOYEN et al., 1990). Lipases and proteases have been measured in other marine molluscs and fishes (CLIFFORD et al., 1982; FERAL, 1989; TEO and SABAPATHY, 1990). Deoxyribonucleases in the marine environment have been studied only in some fishes and invertebrates (ASHE et al., 1965; RASSKAZOV et al., 1975; DOMINGO et al., 1986; CHOU and LIAO, 1990; STRÆTKVERN et al., 1990) including a few molluscs (GEORGATSOS and ANTONOGLOU, 1963), none of which are used for seaweed cell wall degradation and protoplast isolation. These tissues of marine origin have revealed at least two groups of DNA-depolymerizing enzymes with quite different properties, namely acid and alkaline DNases (GEORGATSOS and ANTONOGLOU, 1963; RASSKAZOV et al., 1975).

In this study, we report on the acid DNase activity of crude extracts from the most common phycophages used for the isolation of seaweed protoplasts.

3

MATERIAL AND METHODS

Source of enzymes

Crude extracts from Aplysia dactylomela, Haliotis coccinea canariensis, Littorina striata and Diadema antillarum were prepared within 24 h of collection. Abalone acetone powder (AAP; Sigma, St. Louis, USA, Ref. A-7514), a crude extract prepared from Haliotis sp. entrails was also used as a source of enzymes.

Preparation of crude extracts

The oesophagus and the digestive gland (separately) from *Aplysia dactylomela* the digestive tract and hepatopancreas from *Haliotis coccinea canariensis*, the gut from *Diadema antillarum* and the whole body of *Littorina striata* (after shell removal), were used to prepare the crude extracts. Temperatures between 0 and 4° C and 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) were used to perform all operations (except where indicated).

The pH of the different glands and organs were measured with a microelectrode (PHR-146, Lazar Res. Lab., CA, USA) immediately after dissection.

Crude extracts were prepared, as previously described by GOMEZ-PINCHETTI and GARCIA-REINA (in press), with some modifications. Glands and organs were homogenized and extracted with buffer, supplemented with EDTA Na₂ (2.0 mM), in a mortar under liquid nitrogen. The extraction was carried out in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) supplemented with EDTA Na₂ (2.0 mM; 5.0 mL g tissue⁻¹). Homogenates were squeezed through a 170 μ m nylon mesh and centrifuged at 27,000 x g for 30 min. Ammonium sulphate was then added to the supernatant to 80% saturation. After several hours equilibration, the suspension was centrifuged at 37,000 x g for 20 min. Pellets were resuspended in buffer and passed through a prepacked Sephadex G-25 column (PD-10, Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) equilibrated with 20 mM Bis-tris buffer (pH 6.0) dissolved in seawater, 1.0 M sodium acetate buffer (pH 5.0), or 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) for desalting and buffer exchange.

AAP was dissolved in buffer (2.0% w/v), equilibrated for several hours between 0 and 4°C, centrifuged at 27,000 x g for 15 min and passed through a Sephadex G-25 column.

Protein concentration was determined by the method of LOWRY et al. (1951) using bovine serum albumin as the standard.

Quantification of DNase activity

A DNA (Ref. D-3664, Sigma) solution (0.004%, final concentration) dissolved in distilled water and supplemented with the addition of 1.0 M sodium acetate buffer (0.01%, pH 5.0) and 0.1 M MgSO₄ (0.005%) was used as substrate. Activity was obtained by measuring the maximun linear rate at A_{260nm} in a spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan) of a mixture containing 2.5 mL of substrate equilibrated at 25°C and 0.5 mL of the crude extract.

One unit (Kunitz unit) will produce a ΔA_{260} of 0.001 per min per mL at pH 5.0 at 25°C using DNA as the substrate (Mg²⁺ concentration = 4.2 mM). Values were corrected to the standard activity of DNase I (EC 3.1.21.1; 2,000 Units per vial, Ref. D-4263, Sigma).

RESULTS AND DISCUSSION

The pH of the different digestive systems ranged between 5.0 and 7.0 (Table 1), coincident with the optimum values for *in vitro* activities of agarase, cellulase, alginate lyase and other polysaccharidases from the digestive systems of those and other marine herbivores (ONISHI *et al.*, 1985; GOMEZ-PINCHETTI and GARCIA-REINA, in press).

DNase activities of the different crude extracts are shown in Table 1. All the crude extracts degraded DNA in the presence of Mg^{2+} at pH 5.0, except those prepared from the digestive gland of *Aplysia dactylomela*. At pH

Crude extract	pH (mean \pm sd)	Prot. Conc. mg ml ⁻¹	DNase Units	activity ml ⁻¹	Specific Activity Units mg ⁻¹ prot	
	(n=5)		рН 5.0	рН 6.0		
Aplysia dactylomela						
Oesophagus	5.58 ± 0.42	6.2 ± 1.6	423.8	-	68.35	
Digestive gland	5.85 ± 0.19	7.6 ± 0.6	-	-	-	
Haliotis coccinea						
Hepatopancreas	6.56 ± 0.15	6.7 ± 1.2	257.9	-	38.49	
Littorina striata						
Homogenate	5.75 ± 0.25	1.2 ± 0.3	134.1	-	111.75	
Diadema antillarum					· •	
Gut	6.92 ± 0.18	1.9 ± 0.5	219.5	-	115.53	
AAP	nm	1.9 ± 0.4	35.6	-	18.70	

TABLE 1. - pH, after dissection, of the different digestive systems used as enzymatic sources, and DNase activity of crude extracts at two different pH [5.0(1.0 M sodium acetate) and 6.0(20 mM Bis-Tris in seawater or 0.1 M phosphate)]. T = $25 \degree$ C. AAP: Abalone acetone powder; -: no activity detected; nm: not measured.

6.0 no DNase activity was detected in any of the different crude extracts regardless buffer (20 mM Bis-tris in seawater or 0.1 M phosphate). Protein concentration of the different extracts strongly affected the specific activities (Table 1). The significantly higher DNase specific activities from *Littorina striata* and *Diadema antillarum* might be explained by enzymatic contamination from other organs. In *L. striata* DNase activity was measured from the whole body of the animal. In *D. antillarum*, although the gut is easily distinguishable, it was very difficult to excise the digestive system without contact from other fluids and organs. Abalone acetone powder showed the lowest specific activity of all the assayed crude extracts.

Adjustment of the pH of the enzymatic solution to values between 6.0 and 7.0, depending on the phycophage and the seaweed to be digested, would avoid the action of DNases and be closely related to the optimum conditions in which natural digestion occurs in these phycophages and thus maximum activity of the polysaccharidases. pH values higher than 8.0, optimal for the action of alkaline DNases (GEORGATSOS and ANTONOGLOU, 1963; RASSKAZOV et al., 1975), would be too high for the optimal action of cell wall degrading enzymes. The addition of inhibitors (i.e., potassium dextran sulphate) to the enzymatic solutions to prevent the effects of ribonucleases, employed by some authors (FUJIMURA et al., 1989; WAALAND et al., 1990; REDDY and FUJITA, 1991), would be unnecessary if the pH of the solution is adjusted close related to 6.0. New steps in specific enzyme partial purification would be desirable made to avoid toxic effects (see SCHENK and HILDEBRANDT, 1969; BUTLER et al., 1990), however, the risk of loosing the degrading effects of other additional enzymes present in the crude extracts would be considerable. These data give us new information to improve seaweed protoplast production, cell viability and thallus regeneration.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to R. Armisén (Hispanagar S.A.), Dr. P. Sosa and Dr. A.

Critchley for their valuable advice in the present study. This work was supported by CICYT Spain (project MAR-1237/91) and the ULPGC through a grant to J.L. Gómez-Pinchetti.

REFERENCES

- ASHE, H., E. SEAMAN, H. VAN VUNAKIS and L. LEVINE. 1965. Characterization of deoxyribonuclease of *Mustelus canis* liver. Biochim. Biophys. Acta, 99: 298-306.
- BERLINER, M. 1981. Protoplasts of eukaryotic algae. Intern. Rev. of Cytology, 73: 1-19.
- BOYEN, C., B. KLOAREG, M. POLNE-FULLER and A. GIBOR 1990. Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. Phycologia, 29: 173-181.
- BUTLER D.M., L.V. EVANS and B. KLOAREG. 1990. Isolation of protoplasts from marine macroalgae. In: I. AKATSUKA (ed.): Introduction to Applied Phycology, pp. 647-668. SPB Academic Publishing, The Hague.
- BUTLER D.M., K. ØSTGAARD, C. BOYEN, L.V. EVANS, A. JENSEN and B. KLOAREG. - 1989. Isolation conditions for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). J. Exp. Bot., 40: 1237-1246.
- CHEN L.C.-M. 1987. Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. Bot. Mar., 30: 399-403.
- CHOU M.-Y. and T.-H. LIAO. 1990. Shrimp hepatopancreatic deoxyribonuclease - purification and characterization as well as comparison with bovine pancreatic deoxyribonuclease. Biochim. Biophys. Acta, 1036: 95-100.
- CLIFFORD C., J. WALSH, N. REIDY and D.B. JOHNSON. 1982. Digestive enzymes and subcellular localization of disaccharidases in some echinoderms. Comp. Biochem. Physiol., 71B: 105-110.
- COCKING E.C. 1972. Plant cell protoplasts-isolation and development. Ann. Rev. Plant Physiol., 23: 29-50.
- DOMINGO A., M. CERVERA, E. MARTIN and R. MARCO. 1986. Biochemical characterization and developmental behavior of *Artemia* embryonic and nauplial deoxyribonucleases. Biochemistry, 25: 4125-4131.

FERAL J.-P. - 1989. Activity of the principal digestive enzymes in the detritivorous apodous holothuroid *Leptosynapta galliennei* and two other shallow water holothuroids. Mar. Biol., 101: 367-379.

- FITZSIMONS P.J. and J.D.B. WEYERS. 1985. Properties of some enzymes used for protoplast isolation. In: P.E. PILET (ed.): The physiological properties of plant protoplasts, pp. 12-23. Springer-Verlag, Berlin -Heidelberg.
- FUJIMURA T., T. KAWAI, M. SHIGA, T. KAJIWARA and A. HATANA KA. 1989. Regeneration of protoplasts into complete thalli in the marine green alga *Ulva pertusa*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 55: 1353-1359.
- GEORGATSOS J.G. and O. ANTONOGLOU. 1963. Deoxyribonucleases in tissues of marine origin. Enzymologia, 27: 141-150.
- GOMEZ-PINCHETTI J.L. and G. GARCIA-REINA. 1993. Marine phycophages enzymes that degrade cell walls of seaweeds. Mar. Biol., (in press)
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL. -1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- ONISHI T., M. SUZUKI and R. KIKUCHI. 1985. The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 51: 301-308.
- RASSKAZOV V.A., V.V. PIROZHNIKOVA and V.V. GALKIN. 1975. Some properties and specificity of deoxyribonucleases from marine invertebrates and fishes. Comp. Biochem. Physiol., 51B: 343-347.
- REDDY C.R.K. and Y. FUJITA. 1991. Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. J. Appl. Phycol., 3: 265-275.
- SAGA N. and Y. SAKAI. 1984. Isolation of protoplasts from Laminaria and Porphyra. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50: 1085.
- SCHENK R.U. and A.C. HILDEBRANDT. 1969. Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases. Crop. Sci., 9: 629-631.
- STRÆTKVERN K.O., A.J. RAAE and B.T. WALTHER. 1990. Purification and physicochemical properties of deoxyribonuclease from pyloric caeca of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Fish. Physiol. Biochem., 8: 529-539.

- TEO L.H. and V. SABAPATHY. 1990. Preliminary report on the digestive enzymes present in the digestive gland of *Perna viridis*. Mar. Biol., 106: 403-407.
- TRIBE H.T. 1955. Studies on the physiology of parasitism. XIX. On the killing of plant cells by enzymes from *Botrytis cinerea* and *Bacterium aroideae*. Ann. Bot., 19: 351-371.
- WAALAND J.R., L.G. DICKSON and B.A. WATSON. 1990. Protoplast iso lation and regeneration in the marine red alga *Porphyra nereocystis*. Planta, 181: 522-528.

. .

. .

. .

. .

.

II

.

.

•

.

.

. .

.

Protoplast Isolation from Ulva rigida (Chlorophyta)

By Mats Björk*, Juan Luis Gómez-Pinchetti†, Guillermo García-Reina† and Marianne Pedersén*

*Department of Physiological Botany, Box 540 S-751 21 Uppsala, Sweden †Marine Plant Biotechnology Laboratory, University of Las Palmas, Box 550, E-35017, Las Palmas, Spain

High numbers of protoplasts were isolated from wild and cultivated thalli of *Ulva rigida*. Optimal conditions for protoplast release were obtained with 1.5% Abalone Acetone Powder and 1.5% Cellulysin in 0.4 M mannitol. Treatment for 30 min with hypotonic (0.8 M) solution more than doubled the yield. Growth conditions prior to enzyme treatment also influenced the yield greatly. Protoplasts were photosynthetically active, and 70–90% of the protoplasts were estimated to be viable.

Protoplasts of higher plants are valuable for physiological, genetic, and biochemical studies (Eriksson, 1985). The photosynthesis of protoplasts has been studied for a number of species, like spinach (Nishimura & Akazawa, 1975) and wheat (Edwards et al., 1978). The photosynthetic activity of protoplasts from the mesophyll compared to that of bundle sheath cells has been used to study the localization of photosynthetic enzymes in several C₄ plants (Kanai & Edwards, 1973; Gutierrez et al., 1974). However, there are few reports of physiological studies using seaweed protoplasts. Protoplasts from the red macroalga Chondrus crispus have been used to study inorganic carbon uptake (Smith & Bidwell, 1989). It has also been suggested that protoplasts from Macrocystis pyrifera can be used as a model for physiological research (Davison & Polne-Fuller, 1990), and protoplasts from this species have recently been used for studies on bromoperoxidases (Butler et al., 1990).

Ulva rigida is a common, widely distributed, green seaweed that has been used in many physiological studies (Zavodnik, 1987; MacFarlane & Smith, 1984; Fujita, Wheeler & Edwards, 1988), but to our knowledge no reports on protoplast isolation from this species have been published. However,

0007-1617/92/040401+07 \$08.00/0

protoplasts have been isolated from Ulva linza (Zhang, 1983), Ulva pertusa (Saga, 1984), and Ulva lactuca (Chou & Lu, 1989). Complete thalli have been obtained from protoplasts of Ulva fasciata, U. conglobata and U. pertusa (Reddy, Migita & Fujita, 1989: Fujimura et al., 1989a). Experiments on immobilization (Fujimura et al., 1989b), fusion (Reddy & Fujita, 1989) and production of bioflavour compounds (Fujimura & Kajiwara, 1990) of Ulva protoplasts have been reported recently. However, no physiological experiments have been reported for these protoplasts. In the present study we describe a method to isolate large amounts of photosynthetically active protoplasts from Ulva rigida. Factors such as standardized precultivation conditions, and preplasmolysis that influence the yield of protoplasts are considered.

MATERIALS AND METHODS

Ulva rigida C.Ag. was collected in May 1991 from the harbour of Taliarte, Gran Canaria, (Canary Islands, Spain). Plants were taken from populations growing on ropes near the surface under constant immersion. After collection, the plants were thoroughly cleaned in sterile seawater and then maintained in 201 tanks with running sea-water or cultured in sea-water in 41 bottles with aeration. Fluorescent lamps (Thorn Polylux 4000) were used to illuminate the plants, which were cultured in a medium of filtered seawater (0·2 µm pore size) enriched according to Provasoli (1968) with NO₃⁻ as nitrogen source. Nutrients were added after determining the fresh weight (fw) of the algae, the additions being adjusted to algal growth rate. Unless otherwise indicated, temperature were maintained at $25\pm1^{\circ}$ C, at a continuous photon flux density of 150 µmol m⁻² s⁻¹, at a salinity of 38‰. The density of the cultures was maintained at 1-2 g fw l⁻¹ medium. Algae were weighed each day after gentle centrifugation to remove excess water, and growth rate was calculated as percent increase in fresh biomass per day.

Cellulysin (Calbiochem AG, Lucerne, Switzerland) and abalone acetone powder (Sigma, St. Louis, MO, USA) were dissolved in sea-water at a salinity of 38‰ with addition of 0.4 M mannitol and 20 mM Bis-Tris. The enzyme solution was left on ice with stirring for 30 min, centrifuged at 1000 g for 10 min, the pH was adjusted to 6.0 and the solution filtered through 0.8 μ m and 0.2 μ M filter (Sartorius). Prior to the experiments the enzyme solution was stored frozen in 10 ml portions at -20° C.

The tissue was fragmented into millimeter pieces using a razor blade. The fragmented thallus was then rinsed five times in wash buffer (0.2 Mmannitol and 20 mM Hepes in sea-water, pH 7). To test the effect of preplasmolysis on protoplast yield, samples of thallus were incubated for 30 min in sea-water with addition of 20 mM Hepes and 0.8 M mannitol, final pH 7.0, and compared with untreated material.

One gram fragmented thallus was immersed in 10 ml enzyme solution in a 90 mm diameter petri dish. Incubation in enzyme solution was at 20°C under constant shaking (60 rpm). After cell wall digestion, the protoplast suspension was filtered through 100 µm and 50 µm nylon meshes to remove cell wall debris and non-digested material, rinsed with wash buffer and centrifuged in a swing our rotor at 100 g for 5 min. The pellet was then resuspended in test buffer and re-centrifuged. The resulting protoplast pellet was resuspended in a buffer for photosynthesis tests or the culture medium of Provasoli enriched sea-water (Provasoli, 1968) supplied with 0.2 M mannitol.

After purification, protoplasts were allowed to settle on the bottom of a petri dish and counted directly with an inverted microscope. Newly isolated protoplasts were stained with 0.01% Calcofluor-White, and examined in UV-light for absence of cell wall by fluorescence microscopy (Olympus IMT2-RFL).

Fluorescein diacetate (FDA, Sigma) was added to the protoplast suspension to a final concentration of $35 \,\mu g \, ml^{-1}$. After 5 min incubation, the sample was washed by centrifugation (100 g, 5 min.) and the pellet resuspended in wash medium. Protoplasts were examined in UV-light by fluorescence microscopy.

Oxygen evolution was measured with an oxygen electrode (Hansatech Ltd, UK). Algal samples were transferred to the measuring chamber, irradiated at a photon flux density of 400 μ mol m⁻² s⁻¹ at 25±0.1°C, and allowed to consume the remaining inorganic carbon of the buffer and the intracellular pool of inorganic carbon until no net oxygen evolution was observed. Inorganic carbon was then added as bicarbonate. Two test buffers of low dissolved inorganic carbon content were used, one for thalli consisting of sea-water with addition of 100 mm Bis-Tris Propane (Sigma), and the same for protoplasts with addition of 0.2 M mannitol. Low inorganic carbon contents were obtained by acidifying buffers to pH 2, bubbling for a minimum of 12 h with CO₂-free air to remove dissolved inorganic carbon, and adjusting the pH to 6.5. 7.5, and 8.5 respectively with carbonate-free NaOH solution. Protoplasts used in these experiments were produced from cultured plants, growing at 18-23% per day, by isolation in 1.5% AAP and 1.5% Cellulysin, using preplasmolysis.

All solutions were filtered through a $0.22 \,\mu m$ sterile-filter before use (Sartorius Minisart N).

OBSERVATIONS

A mixture of 1.5% Cellulysin and 1.5%Abalone Acetone Powder gave a high yield of protoplasts, up to more than 10^7 per gram fresh weight, of plants from natural populations. Increasing the enzyme concentration further did not give a corresponding increase in protoplast yield. Neither Cellulysin nor abalone acetone powder were by themselves sufficient to release large numbers of protoplasts from *Ulva rigida* (Table I). Release of

TABLE I. Effect of enzyme composition on protoplast yield from thalli of *Ulva rigida* from a natural population. $+++=>10^6$, $++=10^5-10^6$, $+=10^4-10^5$, $-=<10^4$ protoplast per g fw. Values represent at least three repeated experiments

Enzymes	Relative yield			
3.0% Cellulysin 3.0% AAP (abalone acetone powder)	young parts +	old parts		
3.0% Cellulysin, 3.0% AAP 1.5% Cellulysin, 1.5% AAP 0.75% Cellulysin, 0.75% AAP	+++ +++ +++	 + + +		



FIG. 1. Freshly isolated protoplasts of Ulva rigida. Scale bar = $100 \ \mu m$.

Protoplast isolation from Ulva



FIG. 2. Yield of protoplasts from *Ulva rigida* from plants cultured at different growth rates. Each growth rate was tested once.

protoplasts started after about 1-2 h of incubation. The protoplasts were spherical and ranged between 10-30 µm in diameter (Fig. 1). The release of protoplasts continued for up to 24 h, but after 8-12 h large numbers of protoplasts started to lyse (visual observation). No cell wall material was found when protoplasts were observed with Calcofluor in UV light. Preplasmolysis prior to the enzyme incubation was effective in enhancing the yield by a factor of about 2.5 (Fig. 2), and there was no observed difference in viability by this treatment. The growth rate of cultured algae was also important for the yield of protoplasts, with an optimum growth rate of about 20% biomass increase per day (Fig. 2). Only the young parts from natural populations plants were used for protoplast isolation. The yield decreased rapidly when plants were stored in tanks, so that after 3 days of storage without growth, except on one occasion, no protoplasts were released from this plant material.

The rate of photosynthetic oxygen evolution in protoplasts from *Ulva rigida* was shown to be pH dependent (Fig. 3b). Photosynthetic oxygen evolution was higher at pH 6.5 than in 7.5 and 8.5. At pH 6.5, photosynthesis of protoplasts as well as thalli was close to saturation at a concentration of $400-500 \,\mu\text{M} \,\text{HCO}_3^-$ [Fig. 3(a)]. Oxygen concentration in the medium decreased in the dark. Incubation in FDA resulted in 70–90% fluorescing protoplasts. After 24 h, protoplasts in culture had regenerated cell walls and still appeared viable after five days. No attempts were made to further culture the protoplasts.

DISCUSSION

The toxicity to plant cells of crude enzyme extracts such as abalone acetone powder has been discussed extensively (e.g. Tribe, 1955; Cocking, 1972; Berliner, 1981). Extracts of digestive enzymes from herbivorous organisms contain substances potentially harmful to protoplasts. Therefore low concentrations and short incubation times should be used. Addition of inhibitors of proteases during isolation has also been suggested to increase



FIG. 3. Photosynthetic oxygen evolution of protoplasts and cultured thalli of *Ulva rigida*. (a). pH 6.5 with different concentrations of added HCO₃⁻. (b). pH 6.5, 7.5 and 8.5, after addition of 50 μ m HCO₃⁻. Irradiance was 400 μ mol m⁻² s⁻¹, and temperature 25°C.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

plast yield at the same growth rates indicate that factors other than the growth rate of the plant have to be considered during preculture. More work is needed to establish culture procedures for obtaining plants optimal for protoplast isolation. This may well prove as useful as the development of improved cell wall degrading enzymes.

The retention of photosynthetic and respiratory activity in protoplasts is additional proof of viability. If the photosynthetic rate of protoplasts in Fig. 3, is compared to that of intact thalli, it is shown that protoplasts retain about 65% of the photosynthetic capacity of source tissue. In the unicellular green alga Chorella, oxygen evolution rate of protoplasts was a third of that of intact cells (Webb, Berliner & Carlsson, 1980). Enteromorpha protoplasts had a slightly higher rate of oxygen evolution than the intact thallus (Millner, Callow & Evans, 1979), whilst the photosynthetic capacity of Macrocystis protoplasts was 40% of the intact tissue (Davison & Polne-Fuller, 1990). The higher rate of oxygen evolution of protoplasts at pH 6.5 than at 7.5 and 8.5 is to be considered in future experiments with protoplast culture. This decrease at higher pH, may be caused by the associated decrease in CO_2 , and/or a decreased capacity by the protoplasts to utilize HCO_3^- . Calculation of the spontaneous dehydration of HCO_3^- to CO_2 (Johnson, 1982) at the different pH conditions in this study, reveals that the photosynthetic rate of protoplasts did not exceed what can be expected by the formation of CO₂. Different species of Ulva have been reported to utilize HCO_3^- (Larsson et al., 1990; Drechsler & Beer, 1991; Johnston, 1991), indicating that the HCO_3^- utilization mechanism may be destroyed when the cell wall is removed, and that freshly isolated protoplasts are dependent solely on the CO_2 in the medium.

High yields and results from measurements of photosynthesis, as well as the result of viability tests, indicate that protoplasts isolated from actively growing *Ulva rigida* plants in good condition, preplasmolysed

protoplast viability. This may of course not always be compatible with an optimizing initial yield. In this study high yield was obtained using enzyme concentrations of 1.5% Cellulysin and 1.5% AAP. This is lower than the total enzyme concentrations previously used to obtain corresponding yields of protoplast from other species of Ulva (Reddy, Migita & Fujita, 1989; Fujita & Migita, 1985; Zhang, 1983). Improved protoplast yield was obtained in all material tested by the use of pretreatment with a plasmolytic solution. However, plasmolysis may be harmful to the cells. Premecz et al. (1978) showed a decrease in RNA and protein synthesis in tobacco protoplasts exposed to osmotic stress, and inhibition of photosynthesis under such conditions has been shown (Fleck et al., 1982). Nevertheless, pretreatment with a plasmolysing solution prior to enzyme treatment may increase both yield and viability of plant protoplasts. Tribe (1955) showed that plasmolysis greatly increased the viability of potato cells incubated in crude enzymes. Butler et al. (1989) reported a marked increase in yield and viability of protoplasts of Laminaria saccharina and L. digitata. Cocking (1972) suggested preplasmolysis of the tissue before enzyme treatment as a way to prevent uptake of crude enzymes solutions into the cytoplasm. In this study protoplasts obtained with the use of preplasmolysis were healthy and demonstrated photosynthetic activity (Fig. 3). The status of the plant material was important for isolation of protoplasts. Mature parts of collected thalli, and thalli in stagnant culture, were not suitable for protoplast isolation, whereas actively growing plants yielded high numbers. Cultured G. sordida Gracilaria tenuistipitata and showed the same characteristics (Björk et al., 1990), and Kloareg, Polne-Fuller & Gibor (1989) demonstrated that higher yields of protoplasts of Macrocystis could be obtained from younger tissue than from old. Standardized culture conditions in this study produced reliable source tissue for protoplast isolation, yielding constant high numbers of protoplasts. However, variations in proto-
prior to enzyme treatment with 1.5%Cellulysin and 1.5% Abalone Acetone Powder, may prove useful in studies of algal physiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms Erica Young for help with the manuscript and Dr Sylvia Waara for advising us about staining procedures. This work has been partly supported by the Swedish Institute (SI), Swedish Council for Forest and Agricultural Research (SJFR), the Swedish Agency for Research Cooperation with Developing Countries (SAREC), and by a scholarship from the University of Las Palmas, Gran Canaria to J.-L. Pinchetti. The planning of the cooperation was facilitated by COST-48.

REFERENCES

- BERLINER, M. D. (1981). Protoplasts of eukaryotic algae. Int. Rev. Cytol., 73: 1-19.
- BJÖRK, M., EKMAN, P., WALLIN, A. & PEDERSÉN, M. (1990). Effects of growth rate and other factors on protoplast yield from four species of the red seaweed Gracilaria (Rhodophyta). Botanica mar., 33: 433-439.
- BUTLER, A., SOEDJAK, H., POLNE-FULLER, M., GIBOR, A., BOYEN, C. & KLOAREG, B. (1990). Studies of vanadium-bromoxidase using surface and cortical protoplasts of Macrocystis pyrifera (Phaeophyta). J. Phycol., 26: 589-592.
- BUTLER, D., ÖSTGAARD, K., BOYEN, C., EVANS, L., 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.
- CHOU, H. N. & LU, H. K. (1989). Protoplasts from seaweeds: Isolation, culture and fusion. In *Current Topics in Marine Biotechnology*. (Miachi, S., Karube, I. & Ishida, Y., editors), 227–230. *Proc. First Int. Mar. Biotech. Conf.*, Tokyo.
- COCKING, E. (1972). Plant cell protoplasts—Isolation and development. A. Rev. Pl. Physiol., 23: 29-50.
- DAVISON, I. & POLNE-FULLER. M. (1990). Photosynthesis in protoplasts of Macrocystis pyrifera (Phaeophyta). J. Phycol., 26: 384–387.
- DRECHSLER, Z. & BEER, S. (1991). Utilization of inorganic carbon by Ulva lactuca. Pl. Physiol., 97: 1439-1444.
- EDWARDS, E. E., ROBINSON, S. P., TYLER, N. J. C. & WALKER, D. A. (1978). Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extracts, and chloroplasts of wheat. *Pl. Physiol.*, **62**: 213-319.
- ERIKSSON, T. (1985). Protoplast isolation and culture. In Plant Protoplasts (Fowke, L. C. & Constabel, F., editors), 1-20. CRC Press Inc., Florida USA.
- FLECK, J., DURR, A., FRITSCH, C., VERNET, T. & HIRT, L. (1982). Osmotic-shock "stress proteins" in protoplasts of Nicotiana sylvestris. Plant Sci. Lett., 26: 159-165.

- FUJIMURA, T. & KAJIWARA, T. (1990). Production of bioflavor by regeneration from protoplasts of Ulva pertusa (Ulvales, Chlorophyta). Hydrobiologia., 204/205: 143-149.
- FUJIMURA, T., KAWAI, T., SHIGA, M., KAJIWARA, T. & HATANAKA, A. (1989a). Regeneration of protoplasts into complete thalli in the marine green alga Ulva pertusa. Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 1353-1359.
- FUJIMURA, T., KAWAI, T., SHIGA, M., KAJIWARA, T. & HATANAKA, A. (1989b). Preparation of immobilized living cells from a marine green alga Ulva pertusa. Nippon Suisan Gakkaishi., 55: 2211.
- FUJITA, Y. & MIGITA, S. (1985). Isolation and culture from some seaweeds. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ., 57: 39-45.
- FUJITA, R. M., WHEELER, P. A. & EDWARDS, R. L. (1988): Metabolic regulation of ammonium uptake by Ulva rigida (Chlorophyta): A compartmental analysis of the rate-limiting step for uptake. J. Phycol. 24: 560-566.
- GUTIERREZ, M., KANAI, R., HUBER, S. C., KU, S. B. & EDWARDS, E. G. (1974). Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of various types of C_4 plants I: Carboxylases and CO_2 fixation studies. Z. Pfl. Physiol., 72: 305-319.
- JOHNSON, K. S. (1982). Carbon dioxide hydration and dehydration kinetics in seawater. *Limnol.* Oceanogr., 27: 849-855.
- JOHNSTON, A. M. (1991). The acquisition of inorganic carbon by marine macroalgae. Can. J. Bot., 69, 1123-1132.
- KANAI, R. & EDWARDS, E. (1973). Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Pl. Physiol.*, **51**: 1133–1137.
- 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.
- LARSSON, C., AXELSSON, L., CARLBERG, S., RYBERG, H. UUSITALO, J. (1989). Inducible CO₂ & concentrating mechanisms in green seaweeds II. Ecology and field observations. In Current Research Photosynthesis; in Vol. IV. (Baltscheffsky, M., editor), 529-532. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- MACFARLANE, J. J. & SMITH, F. A. (1984). Limitations of membrane transport in Ulva by unstirred layers. In Membrane Transport in Plants (Cram, W. J., Janacek, K., Rybova, R. & Sigler, K., editors), 333-334. Proceedings of: "Symposium Membrane Transport in Plants" Prague (Czechoslovakia) 15-21 Aug 1983.
- MILLNER, P. A., CALLOW, M. E. & EVANS, L. (1979). Preparation of protoplasts from the green alga Enteromorpha intestinalis (L.) Link. Planta, 147: 174-177.
- NISHIMURA, M. & AKAZAWA, T. (1975). Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. *Pl. Physiol.*, **55:** 712–716.
- PREMECZ, G., RUZICSKA, P., OLÁH, T. & FARKAS, G. (1978). Effect of "osmotic stress" on protein and nucleic acid synthesis in isolated tobacco protoplasts. *Planta*, 141: 33-36.

- PROVASOLI, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. In *Cultures and Collections of Algae.* (Watanabe, A. & Hattori, A., editors), 63-75. Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone, Jpn. Soc. Pl. Physiol.
- REDDY, C. R. K. & FUJITA, Y. (1989). Protoplast Isolation and Fusion of Ulva pertusa and U. conglobata. In Current Topics in Marine Biotechnology. (Miachi, S., Karube, I. & Ishida, Y., editors), 235-238. Proc. First Int. Mar. Biotech. Conf., Tokyo.
- REDDY, C. R. K., MIGITA, S. & FUJITA, Y. (1989). Protoplast Isolation and Regeneration of Three species of Ulva in Axenic Culture. Botanica. mar., 32: 483-490.
- SAGA, N. (1984). Isolation of Protoplasts from Edible Seaweeds. Bot. Mag. Tokyo, 97: 423-427.
- SMITH, R. G. & BIDWELL, R. G. S. (1989). Inorganic carbon uptake by photosynthetically active protoplasts of the red macroalga Chondrus crispus. *Mar. Biol.*, 102: 1-4.

- TRIBE, H. T. (1955). Studies on the physiology of parasitism. XIX. On the killing of plant cells by enzymes from Botrytis cinerea and bacterium aroideae. Ann. Bot., 19: 351-371.
- WEBB, T., BERLINER, M. & CARLSSON, I. (1980). Photosynthesis in Chlorella vulgaris Cells and Protoplasts. Z. Pfl. Physiol., 96: 325-329.
- ZAVODNIK, N. (1987). Seasonal variations in the rate of photosynthetic activity and chemical composition of the littoral seaweeds *Ulva rigida* and *Porphyra leucosticta* from the North Adriatic. *Botanica mar.*, **30:** 71–82.
- 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. of Oceanology., 13: 57-65.

(Accepted 27 March 1992)

Oniversidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

· ·

· .

.

·

IV

.

.

-

Factors affecting protoplast yield of the carrageenophyte Solieria filiformis (Gigartinales, Rhodophyta)

Juan Luis Gómez Pinchetti¹, Mats Björk², Marianne Pedersén² and Guillermo García Reina¹

 ¹ Instituto de Algología Aplicada, Dpto. Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Box 550, 35214 Las Palmas, Islas Canarias, Spain
 ² Department of Physiological Botany, Uppsala University, Villavägen 6, S-752 36 Uppsala, Sweden

Summary. The effect of age, pH of the culture medium, pre-treatment of tissues, enzymes sources and enzymatic adaptability of phycophages fed with a monospecific diet were analyzed on the protoplast yields of the red seaweed *Solieria filiformis* (Kützing) Gabrielson. New apices from fast growing plants showed the highest protoplast yields. The protoplast yield decreased when the pH of the culture medium increased from 6.0 to 9.0. Crude extracts from abalone *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck, fed with *Solieria filiformis* thalli for two months in combination with cellulysin, released the highest number of viable cells and protoplasts. Yields ranged from 1.0 to 8.5×10^6 protoplasts per gram of fresh weight.

Key words: Protoplast - Solieria filiformis - Enzymes -Haliotis coccinea canariensis - Culture

Introduction

The inefficient digestion of the cell walls of anatomically complex brown and red seaweeds is usually due not only to changes in cell wall constitution (and consequently protoplast yield) in relation to age, life story, physiological status and culture conditions (Kloareg and Quatrano 1988; Björk et al. 1990), as in higher plants (Evans and Bravo 1984; Eriksson 1985), but also to the absence of highly efficient, cell wall degrading enzymes.

Commercially available enzymes (mostly purified from fungi) have been found to be effective for the preparation and regeneration of higher plant protoplasts (Eriksson 1985), but when used for complex seaweeds, a high number of failures have been reported (see review by Butler et al. 1990). A great variety of marine herbivores and microorganisms have been found to degrade the complex and wide range of structural and matrix carbohydrates found in seaweeds (Benítez and Macaranas 1979; Zhu 1983; Liu et al. 1984; Onishi et al. 1985; Polne-Fuller 1987; Aoki et al. 1990; Boyen et al. 1990; Potin et al. 1991). However, results on protoplast yields and plating efficiencies from these enzymatic sources have shown variable success (Saga and Sakai 1984; Tokuda and Kawashima 1988; Smith and Bidwell 1989; Le Gall et al. 1990). Problems with brown algae, such as Laminaria and Macrocystis species, appear to have been resolved since combinations of defined specific alginate lyases from marine molluscs (Haliotis tuberculata) and bacteria (Pseudomonas alginovora) have provided reproducible protocols (Butler et al. 1989; Kloareg et al. 1989; Benet and Kloareg 1991).

Work done so far in the division Rhodophyta almost exclusively concerns the genera *Porphyra* (Polne-Fuller and Gibor 1984, 1990; Chen 1987; Waaland et al. 1990) and *Gracilaria* (Cheney et al. 1986; Björk et al. 1990). However, recent reports have demonstrated success with new species such as *Chondrus crispus* (Smith and Bidwell 1989; Le Gall et al. 1990), *Gigartina corymbifera* (Gross 1990) and most recently *Palmaria palmata* (Liu et al. 1992). Except for protoplasts obtained from *Gracilaria* spp., cell wall degradations were successfully carried out with combinations of commercial cellulase and crude extracts prepared from marine invertebrates or bacteria. Although most of these protoplasts appeared to be viable, photosynthetically active, or developed new cell walls, complete regeneration has been only described in *Porphyra* species (Araki et al. 1987; Polne-Fuller and Gibor 1990; Waaland et al. 1990).

Neushul (1984) pointed out the possibility that marine herbivores fed with specific diets could alter specific enzymatic activities and, as a consequence, use of their digestive enzymes should improve protoplast yields. It appeared that the algal diet which the animals were fed for a month did not significantly affect their enzymatic activity, and new experiments were not developed further.

In the present study we describe a reproducible method to isolate large amounts of viable cells and protoplasts from the carrageenophyte *Solieria filiformis* using a commercial cellulase and various crude extracts prepared from *Haliotis coccinea canariensis*, wild and fed on a diet of this alga. Factors affecting growth, age and several pre-treatments of tissues were analyzed in order to obtain the best conditions for protoplast production.

Materials and methods

Sources and cultivation of plant material. Apices of Solieria filiformis (no longer than 1 cm in length) for enzymatic digestion were taken from healthy plants from four different systems:

1) "Wild apices": from wild plants taken from an unattached population at 3-4 m depth (Fig. 1A) on the east coast of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Plants were cleaned thoroughly and kept in 20 L tanks with UVfiltered running seawater 1-3 h before the experiments. New material was collected daily from the sea during the experimental period. 2) "Cylinder apices": taken from plants cultivated for 1 week in plexiglas cylinders, as described by Lignell et al. (1987).

3) "Ball apices": taken from young branches of balls ("Ball phenotype", Fig.1B) developed after 2 months of culture in 300 L tanks.

4) Apices from plants cultured for 1 week in four different controlled pH values (6.0, 7.0, 8.0 and 9.0), in 20 L tanks. pH was adjusted throughout the day with diluted HCl and NaOH.

In the continuously aerated cultures (i.e., 2, 3 and 4), seawater (at a salinity of 37‰) was enriched with minerals according to Provasoli (1968), except vitamins, and changed once a week. Maximum irradiance inside the greenhouse was 1300 μ mol m⁻² s⁻¹. Growth rate was estimated daily as percent increase in fresh weight (FW) per day, after mild centrifugation (2,000 rpm, 10 s) to remove surface water.

Mature fragments from thalli and branches were assayed to compare the effectiveness of degradation between tissues of different ages.

Sources of enzymes. Crude extracts were prepared from the endemic species of abalone, *Haliotis coccinea canariensis* (Haliotidae) (average shell length 3.0 cm). Crude extracts from wild individuals (H_w) were prepared within 12 h of collection and stored at - 20°C until used.

Crude extracts from diet-controlled specimens (H_f) were prepared from abalone fed three times a week with whole plants of *Solieria filiformis* as their only source of food for 2 months. Animals were maintained in fibreglass tanks with running, UV-filtered seawater at 19 ± 2°C.

Carrageenases were extracted from cultures of the marine bacterium *Pseudomonas carrageenovora* grown on both kappa- (κ -) and iota- (ι -) carrageenans, following the methods described by Knutsen (1991). Carrageenases were prepared after bacteria were grown in 1 L flasks containing 250 mL medium (Knutsen 1991) and placed on a rotary shaker (100 rpm) at 22°C for 48 h.

4

Abalone acetone powder (AAP, Ref. A-7514, Sigma, St Louis, USA), cellulysin (cellulase from *Trichoderma viride*, Ref. 219466, Calbiochem, San Diego, USA) cellulase (from *Trichoderma viride*, A-2274, Sigma), pectolyase (from *Aspergillus japonicus*, P-3026, Sigma) and agarase (from *Pseudomonas atlantica*, A-6306, Sigma) were also used singly or in combination (see Table 1).

Preparation of crude extracts. Crude extracts were prepared and characterized as previously described (Gómez-Pinchetti and García-Reina, 1993), with some modifications. The digestive tract and hepatopancreas from *Haliotis coccinea* canariensis were ground under liquid nitrogen after removal from the animals. The extraction was carried out in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) supplemented with EDTA Na₂ (2.0 mM; 5.0 mL g tissue⁻¹). Homogenates were squeezed through a 170 μ m nylon mesh and centrifuged at 27,000 g for 30 min. Ammonium sulphate was then added to the supernatant to 80% saturation. After several hours equilibration, the suspension was centrifuged at 37,000 g for 20 min. Pellets were resuspended in buffer and passed through a pre-packed Sephadex G-25 column (PD-10, Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) equilibrated with 20 mM Bis-Tris buffer (pH 6.0) dissolved in seawater for desalting and buffer exchange.

AAP was dissolved in buffer, equilibrated for several hours at 0-4 °C, centrifuged at 27,000 g for 15 min and passed through a PD-10 column.

For bacterial carrageenases, cells were collected by centrifugation at 27,000 g for 30 min and the supernatant used for enzyme preparation. Ammonium sulphate was added to the solution to 90% saturation and the following procedure carried out as described above. All the extracts were stored at -20° C until use.

Quantification of enzymatic activities. κ - and ι - carrageenases (EC 3.2.1.83 and EC 3.2.1.-, respectively) and cellulase (EC 3.2.1.4) enzymatic activities of

crude extracts were measured at 25°C and pH 6.0 and 7.2 on κ - and ι carrageenans (kindly supplied by R. Armisén, Hispanagar S.A.) and carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma, Ref. C-8758). The reaction mixture consisted of 900 μ L of 0.3% (w/v) substrate dissolved in buffer and 100 μ L crude extract. Reducing sugars were measured spectrophotometrically by the method of Nelson (1944) and Somogyi (1952). One unit (U) of enzyme activity is defined as the amount of enzyme which produce an increase in A₅₁₀ min⁻¹ of 0.1 in the reducing-sugar assay.

Plant pre-treatments

Treatment with ultrasound. "Wild apices" in sterile seawater were treated in an ultrasonic bath (50 Hz, Ultrasonic cleaner, Penta, Izasa S.A., Spain) for 1 to 3 min prior to pre-plasmolysis, (n=5).

Pre-plasmolysis. All algal material was chopped into millimeter pieces using a razor blade and then rinsed five times in wash buffer (20 mM Hepes in seawater, 0.2 M mannitol, pH 7.0) before incubation for 30 min in seawater supplemented with 20 mM Hepes and 0.8 M mannitol, pH 7.0, (n=35).

Metal chelators. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and EGTA (ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) N N N' N'-tetra-acetic acid) were used separately at concentrations from 20 to 40 mM in the pre-plasmolysis medium to check the effect of metal chelators on the protoplast yield of "ball" and "cylinder" apices, (n=10).

The effect of the different pre-treatments was compared with chopped apices directly incubated in the enzymatic solution (control).

Protoplast isolation. The enzymes mixtures used for the degradation procedure are shown in Table 1. Enzymatic solutions, supplemented with 0.4 M mannitol, were stirred for 30 min at 0-4°C, centrifuged at 27,000 g for 10 min, pH adjusted to 6.0 and filtered through 0.8 and $0.2 \,\mu$ m Minisart filters (Sarto-

rius, Göttingen, Germany).

One gram of chopped apices was incubated in 10 mL enzyme solution in a 90 mm diameter Petri dish at 20°C under constant shaking (80 rpm) in the dark. After digestion, cell wall debris and non-digested material were removed by filtration through a 45 μ m nylon mesh and protoplast yields estimated with a hemocytometer on an inverted microscope (IMT-2 Olympus, Hamburg, Germany). The suspension was rinsed with wash buffer and centrifuged in a swing out rotor at 100 g for 10 min. The pellet was resuspended in buffer and protoplasts were washed twice by centrifugation at 100 g for 5 min. Protoplasts were maintained in 5 cm plastic Petri dishes with Provasoli enriched seawater (Provasoli 1968) supplied with 0.2 M mannitol. Osmotic sensitivity of protoplasts was checked by immersion in distilled water. Cell viability was checked by the ability to accumulate fluorescein diacetate (FDA, Sigma, final concentration of 35 μ g mL⁻¹) (Larkin 1976). The absence and regeneration of cell walls were followed by staining with Calcofluor White (0.01% w/v) (Galbraith 1981).

Results and discussion

Isolation of protoplasts

High numbers of cells and protoplasts were observed after 2 h, although maximum protoplasts yields (1.0 to 8.5×10^6 protoplasts per g FW) were obtained after 12 h of incubation in the enzymatic solution. Protoplasts from the sub-cortex and medulla (20-25 μ m) and mostly from cortical cells (10-15 μ m in diameter)(Fig. 1C) were released (Fig. 1D). Viable protoplasts, approximately 70-80%, appeared bright yellow-green when stained with FDA. After 2 days, 10-15% of the protoplasts showed cell wall regeneration and formation of cell clusters were observed.

The best protoplast yields were obtained with combinations of cellulysin

Table 1. Effect of enzyme composition on protoplast yield (protoplasts g^{-1} FW) from "wild apices" of *Solieria filiformis*. -= no effect or slight tissue degradation. Values represent at least three repeated experiments. Carr = carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora*; Pect = pectolyase from *Aspergillus japonicus*.

Enzymes	Yield	
3.0% Cellulysin (Calbiochem)	-	
3.0% Cellulase (Sigma)	-	
6.0% Cellulase (Sigma)	-	
3.0% AAP	-	
6.0% AAP	-	
2.0% AAP + 2.0% Cellulase	-	
0.01% Agarase (Sigma) + 2.0% Cellulysin	< 10 ⁴	
Carr (3 U/ml) + 1.0% Cellulysin	< 10 ⁴	
H_w (10 U/ml) + 1.0% Cellulysin	$4.3 \pm 1.7 \times 10^4$	
H_w (10 U/ml) + 0.25% Pect + 1.0% Cellulysin	$7.5 \pm 0.5 \ge 10^4$	
H_w (10 U/ml) + Carr (3 U/ml) + 1.0% Cellulysin	$8.7 \pm 1.0 \times 10^5$	
H_f (30 U/ml) + 1.0% Cellulysin	$6.2 \pm 1.5 \times 10^6$	
H_f (30 U/ml) + 3.0% Cellulysin	$7.3 \pm 1.2 \ge 10^6$	
H_{f} (30 U/ml) + Carr (3 U/ml) + 1.0% Cellulysin	$6.4 \pm 0.7 \text{ x } 10^6$	

and crude extracts from *Haliotis coccinea canariensis* fed with *Solieria filiformis* (H_f) (Table 1). No yield enhancement was observed when either bacterial carrageenases from *Pseudomonas carrageenovora*, or pectolyase, were added to the enzyme solution containing H_f crude extract, although an increase was observed when added to the H_w (Table 1). Cellulase played an important role in cell wall digestion. Increases in cellulysin concentration in the enzyme

solution from 1.0 to 3.0 % accelerated protoplast production (none at 1%, to 10^4 at 3% after 2 h of incubation) without affecting cell viability. AAP, alone or in combination with cellulases, only degraded apices but no cells or protoplasts were observed (Table 1).

The increased efficiencies of H_f (and H_w), in comparison to AAP (Table 1), could be directly related to the diet of these phycophages. AAP is obtained from cultivated *Haliotis* sp. fed with brown seaweeds (mostly *Macrocystis pyrifera*), which might explain its high alginate lyase activity (40 U ml⁻¹ at pH 7.2 and 25°C; Gómez-Pinchetti and García-Reina, 1993). Differences in carrageenase and alginate lyase activities between the different crude extracts (AAP, H_w and H_f) were observed. While alginate lyase was higher in AAP (40 U ml⁻¹) but not detected in H_w and H_f , carrageenase activity was not detected in AAP, but 10 in H_w and 30 U ml⁻¹ in H_f . These results are in accordance to those described by van Weel (1961) who previously obtained higher production of carbohydrases (amylase and saccharase) when the mollusc *Achatina fulica* was fed, during eight weeks, with a diet rich in starch. Our data clearly shows the importance of the diet of phycophages on the effectiveness of their crude extracts for protoplast isolation.

Sources of plant material

All the pieces used for the experiments showed the same anatomy and cell distribution as observed in Fig. 1C. Although alterations were produced in the morphology of plants cultured for more than 2 months in tanks ("ball phenotype", Fig. 1B) changes in the growth pattern of the "ball" apices were not observed.

Large differences in the release and viability of protoplasts were found depending on the donor tissue. "Wild" and "cylinder" apices showed the highest protoplast yields (6.0-8.5 x 10^6 protoplast g⁻¹ FW). In the few cases where protoplasts were obtained from mature thalli, yields were no higher than 10^4 .

. .



Fig. 1. Solieria filiformis plants freshly collected from the sea (A) and after 2 months in tank culture showing ball morphology (B). Scale bars = 2 cm. (C) Transverse section showing cell distribution; (c) cortical, (sc) sub-cortical and (m) medullary cells. Scale bar = $10 \ \mu m$. (D) Freshly collected protoplasts produced from cortical (c) and sub-cortical cells (sc). Scale bar = $25 \ \mu m$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003

Plant material	Growth rate	Yield	
Ball apices	<1 %	< 104	
Cylinder apices	10-14 %	8.0-8.5 x 10 ⁶	
Wild apices	-	6.0-8.0x 10 ⁶	

Table 2. Protoplast yield of *Solieria filiformis* in relation to growth rates (% per day) and source of plant material.

Similar results have been described by Gross (1990) and Le Gall et al. (1990) in other carrageenophytes. Yields of protoplasts from "ball apices" (Fig. 1B), were even lower. The differences in protoplast yield between "cylinder" and "ball" apices might be explained by differences in the growth rates of the donor plants (Table 2). Björk et al. (1990) described the production of higher protoplast numbers from Gracilaria spp. derived from fast growing plants. These results appear to be related to the fact that growth rate and culture conditions have a very strong influence on the composition of the cell walls (Lignell and Pedersén 1989; Ekman and Pedersén 1990) thereby requiring less complex enzymatic degradation during protoplast production. Intermediate growth rates obtained in the pH-experiment (Fig. 2) gave intermediate protoplast yields. An explanation of the similar yields observed with "wild" and "cylinder" grown apices might be related to a fast growth rate (not quantified) of wild plants during the period of the experiments. Solieria filiformis shows a marked seasonal growth and specimens were collected during the period of most growth activity.

Effect of the pH of the culture medium

The pH of the culture medium directly affected the protoplast yield (Fig. 2). Correlation between protoplast yield and growth rate (Pearson correlation coefficient, $\alpha = 0.86$) indicates a relationship between the pH of the culture medium and both parameters. Previous results have shown an increase of 25% in photosynthetic oxygen evolution of *Solieria filiformis* at pH 6.5 compared to measurements taken at pH 8.2 (Gómez-Pinchetti et al. 1992) which might explain the influence of pH on the growth rate and, as a consequence, the protoplast yield. However, the influence of the pH of the culture medium on the resistance to enzymatic digestion of the cell wall might be also other factor to be considered.

Effect of plant pre-treatments

Pre-plasmolysis. Pre-plasmolysis slightly improved protoplast yield (1-2%) and more so viability (90% of the cells appeared viable as detected by FDA staining). Viability of protoplasts obtained from tissues no pre-plasmolyzed was less than 70% and cells did not look as uniform in aspect as those obtained from pre-plasmolyzed tissues. Similar beneficial effects of pre-plasmolysis have been shown in other red (*Gracilaria*, Björk 1992), brown (*Laminaria*, Butler et al. 1989) and green (*Ulva*, Björk et al. 1992) seaweeds. This has been generally described as a useful step to ensure protoplast stability during cell wall digestion (Butler et al. 1989) present in enzymatic preparations (Tribe 1955; Berliner 1981; Fitzsimons and Weyers 1985). Pre-plasmolysis could have reduced the possible assimilation of substances such as proteases or ribonucleases, found in crude extracts, which might be detrimental to protoplast survival at certain pH and temperature conditions.

Factors affecting protoplast yield in S. filiformis



Fig. 2. Protoplast yield and growth rates as a function of the pH of the culture medium in *Solieria filiformis*. \bigcirc : Protoplast yield; \square : Growth rate. (mean \pm SD; n=5).

Treatment with ultrasound plus pre-plasmolysis. Protoplast yields were increased by approximately 20% (with respect to the control) when apices were incubated in an ultrasonic bath for no more than 2 min before pre-plasmolysis. Longer periods produced softening of tissues but also damaged cells, decreasing their viability. Neushul (1984) also reported the increase of effectiveness of the enzymatic treatment on *Sargassum* spp. when sonication was carried out prior to digestion. This kind of physical treatment of tissues can help to desintegrate the structure of cell walls facilitating the action of enzymes.

Pre-plasmolysis plus metal chelators. Addition of metal chelators such as EDTA or EGTA to the pre-plasmolysis solution had no significant effect on protoplast yield in *Solieria*. Although EGTA improved protoplast yield from *Laminaria*, by removing calcium from the matrix poly-saccharides (Butler et al. 1989), it seems unable to affect the matrix polysaccharides from carrage-nophytes. Similar results have been reported in *Chondrus crispus* with either EDTA or EGTA, although a 50% enhancement was obtained when Kryptofix 222 (a potassium chelator) was used as a chelating agent in the pre-incubation solution (Le Gall et al. 1990). Specificity of chelators in relation to the type of polysaccharide to be degraded seems to strongly affect the effectiveness of this pre-treatment.

This report indicates the possibility to expand protoplast techniques to difficult seaweeds species for digestion, inducing "tailor-made", species-specific, enzymes through specific dietary control of phycophages, and by an appropriate manipulation of pre-culture factors.

Acknowledgements.

We are grateful to Dr Alan Critchley for his valuable help with the manuscript. This work was supported by CICYT Spain (project MAR-1237/91), the ULPGC through a grant to J.L. Gómez-Pinchetti, the Swedish Institute (SI), and the Swedish Council for Forest and Agricultural Research (SJFR). The planning for the cooperation was facilitated by COST-48. Support by Fundación Universitaria de Las Palmas is gratefully acknowledged.

References

Aoki T, Araki T, Kitamikado M (1990) Eur J Biochem 189:461-465

Araki T, Aoki T, Kitamikado M (1987) Bull Jap Soc Sci Fish 53:1623-1627

Benet H, Kloareg B (1991) In: García-Reina G, Pedersén M (eds) Seaweed cellular biotechnology, physiology and intensive cultivation, COST-48-Universidad de Las Palmas de GC, Las Palmas, pp 287-290

Benítez LV, Macaranas JM (1979) Proc 9th Int Seaweed Symp 1979:353-359

Berliner M (1981) Int Rev of Cytology 73:1-19

Björk M (1992) Ph D Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis, 378

Björk M, Ekman P, Wallin A, Pedersen M (1990) Bot Mar 33:433-439

- Björk M, Gómez-Pinchetti JL, García-Reina G, Pedersén M (1992) Br Phycol J, 27:401-407
- Boyen C, Kloareg B, Polne-Fuller M, Gibor A (1990) Phycologia 29:173-181
- Butler DM, Østgaard K, Boyen C, Evans LV, Jensen A, Kloareg B (1989) J Exp Bot 40:1237-1246
- Butler DM, Evans LV, Kloareg B (1990) In: Akatsuka I (ed) Introduction to applied phycology, SPB Academic Publishing, The Hague, pp 647-668Chen LC-M (1987) Bot Mar 30:399-403
- Cheney DP, Mar E, Saga N, van der Meer J (1986) J Phycol 22:238-243
- Ekman P, Pedersén M (1990) Bot Mar 33:483-495
- Eriksson TR (1985) In: Fowke LC, Constabel F (eds) Plant Protoplasts, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 1-20
- Evans DA, Bravo JE (1984) In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds) Handbook of plant cell culture, Vol 4, Macmillan Publ Co, New York, pp 97-132
- Fitzsimons PJ, Weyers JDB (1985) In: Pilet PE (ed) The physiological properties of plant protoplasts, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp 12-23
- Galbraith DW (1981) Physiol Plant 53:111-116
- Gómez-Pinchetti JL, García-Reina G (1993) Mar Biol, in press
- Gómez-Pinchetti JL, Ramazanov Z, García-Reina G (1992) Mar Biol 114: 335-339
- Gross W (1990) J Microbiol Methods 12:217-223
- Kloareg B, Quatrano RS (1988) Oceanogr Mar Biol Annu Rev 26:259-315
- Kloareg B, Polne-Fuller M, Gibor A (1989) Plant Sci 62:105-112

- Knutsen SH (1991) In: García-Reina G, Pedersén M (eds) Seaweed cellular
 biotechnology, physiology and intensive cultivation, COST-48 Universidad de Las Palmas de GC, Las Palmas, pp 277-281
- Larkin PJ (1976) Planta 128:213-216
- Le Gall Y, Braud JP, Kloareg B (1990) Pl Cell Rep 8:582-585
- Lignell Å, Pedersén M (1989) Bot Mar 32:219-227
- Lignell Å, Ekman P, Pedersén M (1987) Bot Mar 30:417-424
- Liu QY, Chen LC-M, Taylor ARA (1992) Bot Mar 35:21-33
- Liu WS, Tang YL, Liu XW, Fang TC (1984) Hydrobiologia 116/117:319-320
- Nelson N (1944) J Biol Chem 153:375-380
- Neushul M (1984) Topical technical report for Gas Research
 - Institute 1981-1983, Gas Research Institute 84/0076, Goleta CA
- Onishi T, Suzuki M, Kikuchi R (1985) Bull Jap Soc Sci Fish 51:301-308
- Polne-Fuller M (1987) J Protozool 34:159-165
- Polne-Fuller M, Gibor A (1984) J Phycol 20:609-616
- Polne-Fuller M, Gibor A (1990) J Phycol 26:674-682
- Potin P, Sanseau A, Le Gall Y, Rochas C, Kloareg B (1991) Eur J Biochem 201:241-247
- Provasoli L (1968) In: Watanabe A, Hattori A (eds) Cultures and collections of algae (Proc. US-Japan Conf., Hakone) Jpn Soc Plant Physiol, pp 63-75
- Saga N, Sakai Y (1984) Bull Jap Soc Sci Fish 50:1085
- Smith RG, Bidwell RGS (1989) Mar Biol 102:1-4
- Somogyi M (1952) J Biol Chem 195:19-23
- Tokuda H, Kawashima Y (1988) In: Stadler T, Mollion J, Verdus M-C, Karamanos Y, Morvan H, Christiaen D (eds) Algal Biotechnology, Elsevier applied science, London New York, pp 151-157
- Tribe HJ (1955) Ann Bot 19:351-371
- van Weel PB (1961) Am Zoologist 1:245-252
- Waaland JR, Dickson LG, Watson BA (1990) Planta 181:522-528
- Zhu R (1983) Collected Oceanic Works 6:122-126

.

.

•

.

.

•

V

· · ·

.

.

•

.

•



Effect of inhibitors of carbonic anhydrase activity on photosynthesis in the red alga *Soliera filiformis* (Gigartinales: Rhodophyta)

J. L. Gómez-Pinchetti¹, Z. Ramazanov^{2*} and G. García-Reina¹

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal Marina, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Box 550,

Las Palmas, Islas Canarias, Spain

² Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya 35, Moscow-276, Russia

Date of final manuscript acceptance: May 27, 1992. Communicated by J. M. Pérès, Marseille

Abstract. The effect of light intensity, pH and carbonic anhydrase (CA) inhibitors on photosynthesis of the red marine macroalgae Solieria filiformis (Kützing) Gabrielson, collected from Taliarte (Gran Canaria, Canary Islands) in 1991, has been investigated. Plants taken from the sea ("wild phenotype") developed spherical morphology ("ball phenotype") after 2 mo culture in aerated tanks. The photosynthetic oxygen evolution in the wild phenotype was saturated at 100 μ mol photons m⁻²s⁻¹, while the "ball" phenotype displayed saturation at 200 μ mol photons m⁻²s⁻¹. The inhibitors of total CA activity (6-ethoxizolamide) and extracellular CA activity (dextran-bound sulfonamide) inhibited photosynthesis at pH 8.2, to 90 and 50% respectively, in both phenotypes. No inhibition of the photosynthetic oxygen evolution was detected at pH 6.5. CA activity was associated with both supernatant and pellet fractions of crude extracts of S. filiformis. The rate of alkalization of the medium by the algae was dependent on light intensity. We suggest that carbon dioxide is the general form of inorganic carbon transported across the plasmamembrane in S. filiformis. HCO_3^- transport into the cell takes place simultaneously by an "indirect" mechanism (dehydration to CO₂ catalyzed by CAext) and by direct uptake. Extracellular (CAext) and intracellular (CAint) CAs are involved in the mechanisms of inorganic carbon assimilation by S. filiformis.

Introduction

The concentration of HCO_3^- in natural seawater at pH 8.2 is ~2.2 mM, while dissolved CO_2 represents <12 μ M. Aquatic plants can use both CO_2 and HCO_3^- as an inorganic carbon (C_i) source for photosynthesis (Sand-Jensen and Gordon 1984, Bidwell and McLachlan 1985, Smith and Bidwell 1987, 1989). The mechanism of CO_2 and HCO_3^- uptake from the medium into the cell

and its transport over the chloroplast envelope are not fully understood, and several transport mechanisms have been suggested. CO_2 can be transported from the medium into the cell and through the cell compartments by diffusion. In the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, an "active CO_2 -transporting system" (after adaptation to low CO_2 conditions) is considered an image portant component of the total C_i -concentrating mechanism nism (Sültemeyer et al. 1989). However, a mechanism C_2^{eff} "active" CO_2 transport in seaweeds has not yet bee demonstrated.

In aquatic plants, HCO_3^- can enter the cells by specific plasmamembrane ATPase-dependent $HCO_3^$ transporter, by a H⁺/HCO₃⁻ symport, or by an OH⁻ HCO_3^- antiport mechanism (Lucas 1983, Raven and Lucas cas 1985). However, a specific protein for such transport of HCO_3^- has not been identified (Marcus et al. 1984) Goyal and Tolbert 1989).

Recently, Smith and Bidwell (1987, 1989) described, in the red seaweed *Chondrus crispus*, an "indirect" mechanism of HCO_3^- assimilation; i.e., after dehydration of HCO_3^- to CO_2 , catalyzed by an extracelullar carbonic anhydrase CAext). However, Cook et al. (1986, 1988) did not find CAext activity in several species of red seaweeds, and proposed an active mechanism for the direct transport of HCO_3^- in marine plants. These contradictory results may reflect species-specific capabilities related to growth conditions.

The present study presents evidence of the involvement of CAext and CAint (intracellular CA) in a dual mechanism of HCO_3^- uptake in *Solieria filiformis* by (a) an "indirect" mechanism after dehydration to CO_2 (catalyzed by CAext) and (b) by direct HCO_3^- uptake from seawater.

Materials and methods

Plant material

Solieria filiformis (Kützing) Gabrielson [formerly Agardhiella tenera (J. Agardh) Schmitz or S. tenera (J. Agardh) Wynne et Taylor

^{*} Present address: Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain



Fig. 1. Solieria filiformis. Morphology of plants freshly collected from in situ conditions ("wild" phenotype) (a) and after 2 mo in tank culture ("ball" phenotype) (b). Scale bars = 2 cm

(Gigartinales: Rhodophyta)] was collected from Taliarte, on the east coast of Gran Canaria, Canary Islands, Spain, in 1991. In nature, S. filiformis grows in a free-floating population at 3 to 4 m depth where maximum irradiance is <100 μ mol photons m⁻² s⁻¹. Plants grow erect from a fibrous basal system and may attain a height of 10 to 15 cm ("wild phenotype"; Fig. 1a).

Healthy material was cleaned thoroughly with UV-filtered seawater and cultivated for 2 mo in 300-litre tanks, under greenhouse conditions, with continuous aeration. The seawater was enriched with minerals according to Provasoli (1968), but no vitamins, and changed once a week. Maximum irradiance ranged between 1100 and 1300 μ mol photons m⁻² s⁻¹. After the 2 mo culture period, plants exhibited spherical morphology ("ball phenotype"; Fig. 1 b).

Fresh healthy material was collected from the sea every day during the experimental period. Both, wild and ball-type phenotypes were used in all experiments.

Irradiance

Photosynthesis and rate of alkalization were measured by white light from a slide projector (Reflecta, Germany). Light was measured with a radiometer LI-1000 Data Logger using a spherical quantum sensor, LI-193SA (LI-COR, Nebraska, USA).

Photosynthetic oxygen evolution in plant fragments

Photosynthetic oxygen evolution was measured by a Clark-type electrode fitted with a measuring chamber (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) thermostated to $25 \,^{\circ}$ C. The chamber was filled with buffered seawater at pH 8.2 [50 mM Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane)] or at pH 6.5 [50 mM Mops (3-[N-morpholino]propanesulphonic acid)] and plant fragments (25 mg fresh wt) were added. A flatbed recorder was used to follow oxygen evolution. Sequential experiments were performed with the same thallus fragments after changing the incubation buffer.

Alkalization measurements

Alkalization rates were measured on thallus pieces of 2.0 cm in length in fresh natural seawater at different light irradiances. The change in the pH of the medium was measured with a pH-meter (Orion 701, USA). The electrode tip was immersed in a sealed 50 ml flask containing medium and algae at a density of up 1.0 g fresh wt/l. The spectral composition of the light was varied with blue (500 to 700 nm with peak at 640 nm) and red (400 to 600 nm with peak at 540 nm) Plexiglas filters.

Carbonic anhydrase measurements

Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1.) activity was measured according to Ramazanov and Semenenko (1988). Algal thalli were ground in liquid nitrogen, extracted in a buffer containing 50 μ M Tris (pH 8.5), 5 μ M dithiothreitol (DTT). 25 mM isoascorbic acid and 5 mM EDTA (CA buffer), and centrifuged at 13 000 × g for 60 min. CA activities of the supernatant and pellet were measured potentiometrically by determining the time required for the pH of the enzyme solution to change from 8.5 to 7.4 at 2 °C, in a 2 ml sample. The reaction was started by rapidly introducing 2 ml of ice-cold CO₂saturated distilled water into the enzyme solution. The decrease in pH was measured with a digital pH-meter (Orion 701, USA), connected to a flatbed recorder.

One unit of activity (Wilbur Andersen, WA unit) was defined as 10 $(T_0/T) - 1$, where T_0 and T = the times for changes in the pH of the nonenzymatic and the enzymatic reactions, respectively. Nonenzymatic reaction was established by the same procedure in the absence of algal material.

Inhibitors

6-ethoxizolamide (EZ; Sigma, St. Louis, USA) and dextran-bound sulfonamide (DBS; kindly supplied by Professor G. Samuelsson, Department of Plant Physiology, University of Umeå, Sweden) dissolved in 50 mM NaOH were used as total and extracellular inhibitors of CA activity, respectively. 100 μ M DCMU [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; Sigma, St Louis, USA] were used to inhibit photosynthesis.

Pigments and protein analysis

Chlorophyll was measured according to Wintermans and De Mots (1965), and phycoerythrin according to Beer and Eshel (1985). Protein content was determined using a modification of the Brad-ford method as described by Peterson (1983). Results are the means of 4 to 5 independent experiments in each case.

Results

Effect of light intensity and pH on photosynthesis

The rate of photosynthetic oxygen evolution in both phenotypes of Solieria filiformis was dependent on light in-



Fig. 2. Solieria filiformis. Photosynthetic oxygen evolution by wild (\blacksquare, \square) and ball (\bullet, \circ) phenotypes (25 mg fresh wt/ml) in buffered seawater at pH 8.2 (50 mM Tris; \square, \circ) and 6.5 (50 mM Mops; \blacksquare, \bullet)



Fig. 3. Solieria filiformis. Effect of 6-ethoxizolamide (EZ; 50 μ M) and dextran-bound sulfonamide (DBS; 40 μ M) on photosynthetic oxygen evolution by wild phenotype (25 mg fresh wt/ml) in buffered seawater at pH 8.2 (50 mM Tris) and 6.5 (50 mM Mops). Data are maximum rates of linear portions of the O₂-evolution kinetics; means of 5 measurements. Light intensity=100 μ mol photons m⁻² s⁻¹

Table 1. Solieria filiformis. Chlorophyll (chl) and phycoerythrin (phy) concentrations and ratio of wild and ball phenotypes

Phenotype	Chlorophyll (µg/ml)	Phycoerythrin (µg/ml)	chl:phy
Wild	24.23±0.13	14.96±0.65	1.62
Ball	15.26 ± 0.66	16.84±0.39	0.91

tensity and the pH of the medium (Fig. 2). In the wild phenotype, photosynthetic saturation was observed at 100 and 200 µmol photons $m^{-2} s^{-1}$ at pH 8.2 and 6.5, respectively. In the ball phenotype, photosynthetic saturation was observed at 150 and 200 µmol photons $m^{-2} s^{-1}$ at pH 8.2 and 6.5, respectively. However, the rate of oxygen evolution was 25% higher than in the wild phenotype at both pHs. The difference in oxygen evolution was



Fig. 4. Solieria filiformis. Alkalization $(\Delta pH/min)$ of medium by wild and ball phenotypes (50 mg fresh wt/ml) at different light intensities (100 and 230 µmol photons m⁻² s⁻¹; filled and hatch d bars, respectively) and spectral composition

more significant at higher light intensities (400 μ mol ph^{$\frac{1}{6}$} tons m⁻² s⁻¹; Fig. 2).

Table 1 shows chlorophyll (chl) and phycoerythren (phy) concentrations and their ratios for wild and bigill phenotypes. Chlorophyll concentration and the chl:phy ratio were higher in the wild than in the ball phenotype.

Carbonic anhydrase activity

CA activity in *Solieria filiformis* plants was associated with both the supernatant and the pellet of the crude extracts. CA activity in the supernatant was 7 U/mg protein and in the pellet 117 U/mg protein. Low CA activity in the supernatant could have been caused by the relatively high protein concentration of this fraction $(135 \ \mu g \ ml^{-1})$ compared with that of the pellet (34 $\mu g \ ml^{-1})$.

Effect of inhibitors of carbonic anhydrase activity on photosynthesis

The wild phenotype of *Solieria filiformis* exhibited high photosynthetic rates in buffered seawater at pH 8.2 and 6.5 (Fig. 3). However, at pH 6.5 the rate of oxygen evolution was $\sim 25\%$ higher than at pH 8.2. At pH 8.2, EZ



Fig. 5. Solieria filiformis. Effects of 100 μ M of 6-ethoxizolamide (**•**), dextran-bound sulfonamide (**•**), 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) (0) and darkness (×) on alkalization rate of seawater by wild phenotype (50 mg fresh wt/ml); •: control. Light intensity 400 μ mol photons m⁻² s⁻¹

(50 μ M) and DBS (50 μ M) inhibited photosynthesis to 90 and 50%, respectively. Under the same conditions, increasing the DBS concentration to 100 and 200 μ M did not change the percentage of inhibition. At pH 6.5, inhibition was not observed. The same results were exhibited by the ball phenotype (data not shown).

Effect of light intensity on alkalization rate of medium

Fig. 4 shows the rate of alkalization of the medium by wild and ball phenotypes. Alkalization rates were dependent on light intensity and spectral composition. The ball phenotype displayed higher alkalization rates than the wild phenotype. When light intensity was increased from 100 to 230 µmol photons $m^{-2} s^{-1}$, the rate of alkalization by the ball phenotype increased by almost twice. In the wild phenotype, alkalization was saturated at low light intensity (100 µmol photons $m^{-2} s^{-1}$) regardless of spectral composition. Although there were no evident differences in alkalization rates as a function of spectral composition, there was a slight increase in all measurements when blue light was used.

Effect of inhibitors of carbonic anhydrase activity on alkalization rate of medium

Fig. 5 shows the rate of alkalization of the medium by the wild phenotype of *Solieria filiformis*. Alkalization took place only in the light and was inhibited by DCMU (100 μ M) and also by EZ and DBS. However, as in the case of photosynthesis, EZ inhibited the alkalization rate to a stronger degree. The same results were obtained with the ball phenotype (data not shown).

Discussion

The results reveal important changes in the morphological and photosynthetic characteristics of *Solieria filiformis* cultivated in aerated tanks. The morphological changes (ball phenotype) would seem to be related to high water turbulence. The lower light-saturation point of photosynthetic oxygen evolution and the lower alkalization rate of the wild phenotype are probably due to adaptation of the light-harvesting system to low light intensities characteristic of "shade-growing" plants (Falkowski and LaRoche 1991). The ball phenotype is protected from high light intensities by its morphology (self-shading) and the resulting decrease in chlorophyll concentration; this explains the absence of photoinhibition at low light intensities in this phenotype (Fig. 2).

When bound to dextran, sulfonamide cannot penetrate the plasma membrane, and selectively inhibits CAext (Moroney et al. 1985, Palmqvist et al. 1990). It has been suggested that the role of CAext is to speed up the conversion of HCO_3^- to CO_2 in the extracellular space (Smith and Bidwell 1989). CO₂ can then either diffuse through the plasma membrane (Simpson et al. 1978, Smith and Bidwell 1989), or be actively transported to the cell (Sültemeyer et al. 1989). The inhibition of photosynthesis by DBS at pH 8.2 (Fig. 3) indicates the existence in Solieria filiformis of an "indirect" mechanism of HCO₃ uptake catalyzed by CAext. However, the importance of the direct mechanism of uptake of inorganic carbon cannot be ignored, since the rate of photosynthetic oxygen evolution at pH 8.2, in natural seawater $(2.2 \text{ m}M \text{ HCO}_3^-)$ and in the presence of 50 μM DBS (Fig. 3), was higher than theoretical values based on a spontaneous supply of CO_2 from HCO_3^- (Axelsson 1988). Thus, active $HCO_3^$ transport in S. filiformis may constitute a significant contribution to the total uptake of inorganic carbon.

The stronger inhibition of photosynthetic oxygen evolution by EZ (Fig. 3) indicates the existence of intracellular CA in *Solieria filiformis*.

The non-inhibitory effect of EZ and DBS at pH 6.5 (Fig. 3) evidences a high CO_2 -assimilation efficiency by *Solieria filiformis*, CO_2 being the main form of inorganic carbon entering through the cell wall and plasmalemma.

Alkalization of the medium by algae has been taken as evidence of the presence of active HCO_3^- transport (Cook et al. 1988). Recently, it has been shown that alkalization by the green and red seaweeds Ulva rigida and Gracilaria tenuistipitata is performed by an extracellular mechanism requiring CAext (Björk et al. 1992, Haglund et al. 1992). The efficiency of this mechanism is dependent on the concentration of inorganic carbon in the medium (Beer and Israel 1990, Björk et al. 1992, Haglund et al. 1992). Several authors have postulated that the process of alkalization of the growth medium by aquatic plants is effected by the release of 1 mol OH⁻ for each molecule of CO₂ transported (Simpson et al. 1978, Morgan et al. 1980, Lucas 1983). If OH⁻ production and efflux to the medium is an exclusively intracellular mechanism, as maintained by Lucas, then DBS would not affect the rate of alkalization by Solieria filiformis, as the present results show that it does (Fig. 5).

In conclusion, the different effects of EZ and DBS on the alkalization rate (and photosynthetic oxygen evolution) of *Solieria filiformis* indicate the involvement of external carbonic anhydrase in the uptake of inorganic carbon. Acknowledgements. The authors wish to thank to D. Robledo Ramírez and M. Jiménez del Rio for providing the cultured material. This work was supported by a scholarship from the University of Las Palmas of Gran Canaria to J. L. Gómez-Pinchetti and CICYT (project MAR-1237/91 and a sabbatical to Z. Ramazanov, invited Professor of Ministerior de Educación y Ciencia, Spain). Support by Fundación Universitaria de Las Palmas and by Air Europa is gratefully acknowledged.

Literature cited

- Axelsson, L. (1988). Changes in pH as a measure of photosynthesis by marine macroalgae. Mar. Biol. 97: 287-294
- Beer, S., Eshel, A. (1985). Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. Aust. J. mar. Freshwat. Res. 36: 785-792
- Beer, S., Israel, A. (1990). Photsynthesis of Ulva fasciata. IV. pH, carbonic anhydrase and inorganic carbon conversions in the unstirred layer. Pl., Cell Envir. 13: 555-560
- Bidwell, R. G. S., McLachlan, J. (1985). Carbon nutrition of seaweeds: photosynthesis, photorespiration and respiration. J. exp. mar. Biol. Ecol. 86: 15-46
- Björk, M., Haglund, K., Ramazanov, Z., García-Reina, G., Pedersén, M. (1992). Inorganic carbon assimilation in the green seaweed Ulva rigida C. Ag. (Chlorophyta). Planta 187: 152-156
- Cook, C. M., Lanaras, T., Colman, B. (1986). Evidence for bicarbonate transport in species of red and brown macrophytic marine algae. J. exp. Bot. 37: 977-984
- Cook, C. M., Lanaras, T., Roubelakis-Angelakis, K. A. (1988). Bicarbonate transport and alkalization of the medium by four species of Rhodophyta. J. exp. Bot. 39: 1185-1198
- Falkowski, P. G., LaRoche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. J. Phycol. 27: 8-14
- Goyal, A., Tolbert, N. E. (1989). Uptake of inorganic carbon by isolated chloroplasts from air-adapted *Dunaliella*. Pl. Physiol. 89: 1264-1269
- Haglund, K., Björk, M., Ramazanov, Z., García-Reina, G., Pedersén, M. (1992). Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic carbon assimilation in the red alga Gracilaria tenuistipitata. Planta 187: 275-281
- Lucas, W. J. (1983). Photosynthetic assimilation of exogenous HCO_3^- by aquatic plants. A. Rev. Pl. Physiol. 34: 71-104
- Marcus, Y., Volokita, M., Kaplan, A. (1984). The location of the transporting system for inorganic carbon and the nature of the

form translocated in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. exp. Bot. 35: 1136-1144

- Morgan, K. C., Shacklock, P. F., Simpson, F. J. (1980). Some aspects of the culture of *Palamaria palmata* in greenhouse tanks. Botanica mar. 23: 765-770
- Moroney, J. V., Husic, D. H., Tolbert, N. E. (1985). Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by Chlamydomonas reinhardtii. Pl. Physiol. 77: 177-183
- Palmqvist, K., Ramazanov, Z., Samuelsson, G. (1990). The role of extracellular carbonic anhydrase for accumulation of inorganic carbon in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. A comparison between wild-type and cell-walless mutant cells. Physiologia Pl. 80: 267-276
- Peterson, G. L. (1983). Determination of total protein. Meth. Enzym. 91: 95-119
- Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe, A., Hattori, A. (eds.) Cultures and collections of algae. Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo, p. 63-75 (Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone)
- Ramazanov, Z. M., Semenenko, V. E. (1988). Content of the CO₂dependent form of carbonic anhydrase as a function of light intensity and photosynthesis. Soviet Pl. Physiol. 35: 340-344
- Raven, J. A., Lucas, W. J. (1985). The energetics of carbon acquisition. In: Lucas, W. J., Berry, J. A. (eds.) Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms. American Society of Plant Physiologists. Rockwell, Maryland, p. 305-324
- Sand-Jensen, K., Gordon, D. M. (1984). Differential ability of marine and freshwater macrophytes to utilize HCO₃ and CO₂. Mar. Biol. 80: 247-253
- Simpson, F. J., Neish, A. C., Shacklock, P. F., Robson, D. R. (1978). The cultivation of *Chondrus crispus*. Effect of pH on growth and production of carrageenin. Botanica mar. 21: 229-235
- Smith, R. G., Bidwell, R. G. S. (1987). Carbonic anhydrase-dependent inorganic carbon uptake by the red macroalga, Chondians crispus. Pl. Physiol. 83: 735-738
- Smith, R. G., Bidwell, R. G. S. (1989). Mechanism of photosynth ic carbon dioxide uptake by the red macroalga, *Chondrus crospus*. Pl. Physiol. 89: 93-99
- Sültemeyer, D. F., Miller, A. G., Espie, G. S., Fock, H., Canvin, ⁸).
 T. (1989). Active CO₂ transport by the green algae Chlangerdomonas reinhardtii. Pl. Physiol. 89: 1213-1219
- Wintermans, J. F. G., De Mots, A. (1965). Spectrophotometec characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. Biochim. biophys. Acta 109: 448-453

.

.

•

•

·

.

.

· · · ·

· · ·

VI

€ G

. . .

.

.

Actual, potential and speculative applications of seaweed cellular biotechnology: some specific comments on *Gelidium*

G. Garcia-Reina, J. L. Gómez-Pinchetti, D. R. Robledo & P. Sosa Marine Plant Biotechnology Laboratory, University of Las Palmas, Box 550, Las Palmas, Canary Islands, Spain

Key words: callus, cell culture, domestication, protoplast, tissue culture

Abstract

Cellular biotechnology is a promising application in the propagation and selection of superior strains of seaweeds. Although axenic cultures, organogenetic tissue cultures, vegetative micro-propogation, callus induction and high yields of agar from calli have been described for several species of *Gelidium*, a number of basic problems remain to be solved. These include standardized methods for obtaining axenic cultures, identification of requirements for organic nutrients, PGR's, cellular disorganization and reorganization, somaclonal variation and somatic incompatibilities. Future progress in seaweed biotechnology will depend on the resolution of many of these problems.

Introduction

Cellular biotechnology was introduced into the phycological field at the beginning of the 1980's (Gibor, 1980), and is considered important in future development of seaweed cultivation. The four major techniques in seaweed cellular biotechnology, tissue-, callus-, cell- and the protoplast-culture, offer means in understanding seaweed domestication (propagation and selection) germplasm storage and for production of biomass. We first discuss seaweed cellular biotechnology as highly effective techniques, and then consider some still unresolved questions, which limit their potential and actual applications.

Seaweed biotechnology

Vegetative micropropagation

The possibility of using small thallus fragments (tissue culture) to establish cultures, instead of spores, exploits the organogenetic potential of explants. Chen and Taylor (1978) described the regeneration of whole plants from decorticated explants of Chondrus crispus Stackh. Waaland (1982) and Sylvester and Waaland (1983) obtained plants following inoculation of finelychopped fragments of the thallus of Gigartina into braided rope. Their data indicated that the best strategy for commerical purposes is to maximize the amount of propagules per donor plant. During the early 1980's, similarly successful experiments were done with Gelidium nudifrons Gardner and G. robustum (Gardner) Hollenberg & Abbott (Polne-Fuller, 1988).

In China, Luqin et al. (1988), described a tech-

nique, using small explants of *Gelidium pacificum* Okamura, that permitted the firm attachment of small explants to ropes through the development of adventitious rhizoids and the regeneration of new plantlets. Garcia-Reina *et al.* (1988a) reported on organogenetic development from wounded explants of *Gelidium versicolor* (Gmel.) Lamouroux, and Robaina *et al.* (1990a) discussed the effects of solid culture medium and its osmolality on organogenetic potential.

If the best commercial strategy for vegetative micropropagation is to maximize propagules per donor-plant ratios, the logical strategy would be to reduce the plant to single, somatic cells, using these as inocula. 'Somatic spores' implies totipotentiality, as pointed out by Saga *et al.* (1978). Single somatic cells, obtained by enzymatic digestion of the thalli of *Porphyra* and *Ulvaria*, have been inoculated onto ropes and, from these, attached plants have developed (Polne-Fuller *et al.*, 1984; Kapraun, 1987; Kapraun & Sherman, 1989). This technique has been tested in commercial *Porphyra* farms (Mumford, 1987).

Somatic-cell isolation in seaweeds is not a difficult task as it has been achieved by partial enzymatic digestion of thalli (in Porphyra: Tang, 1982; Chen, 1986; Wang et al., 1986, 1987a, 1987b; Tait et al., 1990; Wang & Yan, 1990; Sphacelaria: Ducreux et al., 1988), by cell-wall regeneration from protoplasts (Porphyra: Chen, 1989) or spheroplasts (Undaria: Kapraun & Sherman, 1989), by mechanical disruption of thalli (Prasiola: Schiff et al., 1972; Bingham & Schiff, 1973; Griffithsia: Duffield et al., 1972; Porphyra, Tait et al., 1990), or of frozen thalli (Porphyra: Zhao & Zhang, 1984), by mechanical disruption of calli (Laminaria: Saga et al., 1978; McLean & Connolly, 1989; Alaria: Saga et al., 1978; Undaria: Zhang, 1982) or by combinations of mechanical and enzymatic treatments of both thallus and callus (Pterocladia: Liu & Gordon, 1987).

There are advantages to vegetative micropropagation over conventional propagation from spores. It is unnecessary to know or control the life-history of the species; 'seedlings' can be produced in quantity, both when they are needed and from a small number of donor plants, requiring cheap storage and handling.

These advantages are directly related to propagation, while the techniques are applicable to selection. Mono-phase crops (*i.e.* monoculture of *Gelidium* sporophytes or of male or female gametophytes) can be produced. Mutant plants (natural or induced) can be propagated rapidly, even if sterile, and even if the selected phenotype has a non-genetic basis (epigenetic) but is stable.

Selection

Tissue culture of seaweeds is based on natural genetic variability of the somatic cells; for example, *Gracilaria* species (van der Meer, 1986) have been shown to have a high degree of somatic recombination. Genetic diversity among cells of the thallus, normally masked by more common non-variant cells, is exploited, as described for higher plant tissue culture (D'Amato, 1978). This 'island effect' (retention of pigmentation, growth, *etc.*, by some cells or cell aggregates) is a common phenomenon in seaweed tissue culture (Fries, 1980; Polne-Fuller *et al.*, 1986; Garcia-Reina *et al.*, unpubl. data).

Polne-Fuller and Gibor (1986) have described the isolation and growth to callus on solid medium of a few living cells from *Porphyra* tissue cultures contaminated by *Pythium*. The callus was enzymatically digested to cells and small clumps of cells and co-cultured with *Pythium*, where healthy, normal callus developed. Although no plant regeneration was reported, this simple experiment shows how quickly and effectively tissue-culture techniques can yield results by selection.

Selected strains of Sargassum and Enteromorpha (showing differences in temperature tolerance, orphology and vitamin auxotrophy) have been established through tissue culture (Polne-Fuller *et al.*, 1986), apparently owing to intercellular variability among explants. Tissue culture (*i.e.* callus culture) is not, however, considered the best technique for cultivar improvement. The application of callus culture for selection is based on a process referred to as

somaclonal variation by Larkin and Scowcroft (1981). This term covers genomic, chromosomic, genetic and even epigenetic variations associated with or induced by the disorganized callus state, and is also expressed in the reorganized plants (Karp, 1989). Callus is associated with a high degree of genetic (or epigenetic) variability. Fang et al. (1983) have described genomic alteration in the callus cells of Laminaria, and Lee (1986), varying levels of polyploidy.

Callus culture has many advantages over conventional selection procedures. Within a small space (e.g. Petri dish incubated in growth chamber), large numbers of 'plants' (assuming cell = plant), having natural or induced genetic variabilities, can be screened. The stability of selected phenotypes can be determined in a short time, as the following generation is the next mitotic division, not the new adult sporophytic phase as in Laminaria. Any selected phenotype can be easily propagated to large amounts (using cell culture), even if it is an epigenetic but stable character.

In seaweeds, obtaining haploid cultures through cell culture is easy, whereas with higher plants the only way to obtain haploid cultures is by anther or pollen culture (Han & Hongyuan, 1986). For the latter group of plants, diploid cells can proliferate and few haploid cells remain viable, so that the efficiency is low. In seaweeds, haploid cultures depend only on the type of explant (gametophyte) chosen. Thus, exploitation of recessive information, haploid somatic recombination and gametoclonal variation (somaclonal variation in haploid cells, Evans et al., 1984), can be readily employed as can the production of fully-homozygous cells and plants by colchicine treatment or by spontaneous chromosome doubling. All such characteristics (haploid culgametoclonal variation, chromosome ture, doubling) have been demonstrated and utilized for Laminaria-improvement programs (Fang, 1984; Wu & Lin, 1988). Reports of regeneration of variant plants (altered morphology and lifehistory: monospore producing) from isolated cells or protoplasts of Porphyra (Tang, 1982; Fujita & Migita, 1985; Chen, 1987) and Monostroma

gametophytes, with different developmental patterns and apogamy (Saga & Kudo, 1989), may be explained by differential regenerative potential or different variant cell strains pre-existing in the haploid thallus.

Selection through callus culture has some drawbacks, as the techniques allow selection only of cellular-based characteristics. It is impossible to screen for stipe-length or frond-thickness at the cellular level or for sulphate content in the cell walls of Gelidium. Monoclonal antibodies (Vreeland et al., 1987) can be useful markers. There are also possibilities of selecting variant cells with characteristics expressed only at the cellular level and not in fully-differentiated plants.

The regeneration of plants from calli can yield surprises, some of which could be useful, even in the absence of directionally selective pressures. Several reports indicate inadvertent selection resulting from seaweed somaclonal variation. Yan (1984) described plants, reorganized from calli of Laminaria and Undaria, with more rapid growth and tolerance of high temperatures for a longer period than the normal sporophytes. Garcia-Reina et al. (1988b) selected two types of callus of Laurencia obtained from the same plant and similar in appearance (pigmentation, texture). These differed markedly in organogenetic potential (number of plantlets/callus) and growth-rate of the regenerated plants.

A major advantage of selection using cellular biotechnologies is in protoplast culture. This allows for somatic hybridization (through the breakdown of sexual barriers, through interspecific or intergeneric fusion of somatic cells, and exclusively maternal extrachromosomal inheritance). There is also improved efficiency of genetic transformation by the removal of physical barriers, and host-vector recognition specificities through elimination of the cell wall.

Protoplast isolation and regeneration of whole plants have been successful (Table 1). The same techniques as applied to higher plant protoplasts induce somatic hybridization in seaweeds. These include electrofusion (Enteromorpha: Saga et al., 1986; Porphyra: Fujita & Saito, 1989) and PEG (Ulva × Monostroma: Zhang, 1982; Enteromor-
pha, Saga et al., 1986; Porphyra: Fujita & Migita, 1987; Fujita & Saito, 1989; Gracilaria: Cheney, 1989). True somatic hybrids have been obtained in microalgae (Chlamydomonas: Matagne et al., 1979; Dunaliella × Porphyridium: Lee & Tan,

1988). Recently, Fujita & Migita (1987), with wild \times mutant *Porphyra* and Kapraun (1987) *Enteromorpha*, in anatomically-simple species, and Cheney (1989), with anatomically more complex species (*Gracilaria tikvahiae* McLachlan \times

Table 1. Seaweeds from which protoplasts have been isolated, types of isolation (Iso; M = mechanical, F = enzymes obtained from phycophages, C = commercial enzymes, B = enzymes obtained from bacteria, A = enzymes obtained from amoeba) and types of further development (Dev; R = cell wall regeneration, R = without cell wall regeneration, R + = plant regeneration, Ca = callus formation, Ca + = callus and plants).

	Iso.	Dev.	
Chlorophyta			
Bryopsis plumosa	М	R +	Tatewaki & Nagata 1970
Enteromorphalinza	С	R +	Fujita & Migita 1970
Enteromorphalinza	C	R	Saga 1984
E. intestinalis	С	R +	Millner et al. 1979
E. intestinalis	С	R +	Saga et al 1986
Monostroma angicava	C + F	R +	7 hang 1982
Monostroma angicava	C	R	Saga & Kuda 1080
Monostroma nitidum	Č	R +	Fujita & Migita 1085
Monostroma zoostericola	Č	R + Ca	Saga <i>et al</i> 1986
Ulva conglobuta	C + F	R + Ca	Reddy at al. 1980
Ulva fasciata	C + F	R +	Reddy et al. 1989
Ulva linza	C + F	R +	Zhang 1982
Ulva pertusa	C	R +	Eugita & Migita 1085
Ulva pertusa	Ċ	R +	Saga 1984
Ulva pertusa	Ċ	R + Ca	Fujimura & Kajiwara 1000
Ulva pertusa	C + F	R + , Ca	Poddy et al. 1080
Ulvaria oxysperma	Ċ	R +	Kapraup & Sharman 1080
Uronema gigas	F		Gabriel 1970
Phaeophyta			
Fucus distichus	C + F	R⊥	Klasses et al. 1098
Laminaria	F		$ \begin{array}{c} \text{Ridal cg} \ el \ ul. \ 1966 \\ \text{Saga} \ e \ \text{Salar} \ 1084 \\ \end{array} $
Laminaria digitata	F		Saga & Sakai 1984
Laminaria digitata	C + F	R	Butter & Evans 1988
Laminaria japonica	F	R _	Same & Salari 1984
Laminaria saccharina	F	K-	Saga & Sakai 1984
Laminaria saccharina	C + F	Q	Butler & Evans 1988
Macrocystis pyrifera	C + F	K	Same et al. 1989
Macrocystis pyrifera	C + F	R Ca	Saga et al. 1986
Macrocystis pyrifera	M + F	R, Ca P _	Noareg <i>et al.</i> 1989
Sargassum echinocarpum	C + F	K -	Davison & Poine-Fuller 1990
Sargassum muticum	F	q	Fisher & Gibor 1987
Sargassum muticum	С+ F	ĸ	Neusnui 1984
Sargassum muticum	C + F		Saga et al. 1986
Sargassum muticum	A		Pisher & Gibor 1987
Sargassum polyphyllum	$\dot{\mathbf{C}} + \mathbf{F}$		Folle-Fuller & Gibor 1987c
Sphacelaria	C + F	D _	risner & Gibor 198/
Undaria pinnatifida	B	R + P _	Ducreux & Kloareg 1988
Undaria pinnatifida	F	к – р	rujita & Migita 1985
Sumaria productiuu	T .	κ.	Tokuda & Kawashima 1988

184

Table 1. (Continued)

	Iso.	Dev.	
Rhodophyta		,	
Chondrus crispus	В	R –	LeGall et al. 1989
Chondrus crispus	В		Smith & Bidwell 1989
Gracilaria lemaneiformis	С	Ca	Cheney et al. 1986
Gracilaria lemaneiformis	С		Björk et al. 1990
Gracilaria secundata	С		Björk <i>et al.</i> 1990
Gracilaria tenuistipitata	С		Björk et al. 1990
Gracilaria tikvahiae	С	Ca	Cheney et al. 1986
Gracilaria verrucosa	С		Björk <i>et al.</i> 1990
Palmaria palmata	С	R	Liu 1989
Porphyra	F	R +	Liu et al. 1984
Porphyra	C + B		Fujita & Saito 1989
Porphyra haitanensis	C + F		Wang et al. 1986
Porphyra leucosticta	C + F	Ca, R +	Chen 1987
Porphyra linearis	C + F	R+, Ca	Chen et al. 1988
Porphyra maculosa	C + F		Waaland & Dickson 1987
Porphyra nereocystis	C + F	Ca	Waaland & Dickson 1987
Porphyra perforata		R +	Saga <i>et al.</i> 1986
Porphyra perforata	C + F	R+, Ca+	Polne & Gibor 1984
Porphyra perforata	C + F		Waaland & Dickson 1987
Porphyra pseudolanceolata	C + F		Waaland & Dickson 1987
Porphyra suborbiculata	F	R	Tang 1982
Porphyra vezoensis	F	R +	Araki et al. 1987
Porphyra yezoensis	F	R + , Ca +	Polne et al. 1984
Porphyra yezoensis	F	R+, Ca+	Polne & Gibor 1984
Porphyra yezoensis	В	R –	Saga & Sakai 1984
Porphyra vezoensis	C + F	R +	Fujita & Migita 1985
Porphyra yezoensis	F	R +	Saga et al. 1986
Porphyra yezoensis		R +	Dai 1987

G. chilensis Bird, McLachlan & Oliveira), have described the recovery of somatic hybrids. These results suggest that the production of 'agarophytic corn' (Gelidium \times Zea mays), of 'agarageenan' (Gelidium \times Eucheuma) or other imaginative hybrids, can be realized.

There are a few somewhat speculative and distantly related reports on genetic engineering in seaweeds. Thes include Agrobacterium tumefaciens, used genetically to engineer algae, at least in Chlamydomonas (Ausich, 1983); the possible existence of Agrobacterium-like bacteria that promote the induction and growth of seaweed tumours, galls and calli (Cantacuzene, 1930; Apt, 1988; Tsekos, 1982; Garcia-Reina et al., 1988a); DNA-transferring parasitic seaweeds, possibly usable as vectors (Goff & Coleman, 1984); chromosomal location and molecular biological regulatory studies of alginate-related genes in *Pseudomonas*, with characteristics similar to those in *Fucus* alginates (Deretic *et al.*, 1987); development of cloning vectors in photosynthetic microorganisms (Chauvat *et al.*, 1988).

Germplasm storage

Tissues and callus cultures can be highly efficient techniques for germplasm storage in selection programs or 'seed' storage for propagation as they avoid expensive whole-plant management. The longest, 5-year-old culture of seaweed calli (Fang, 1983; Polne-Fuller & Gibor, 1987b), and culture of somatic cells (Chen, 1989) parallels the immortality shown by higher plant-cell cultures (Gautheret, 1985). Cryopreservation will require even less handling, and van der Meer and Simpson (1984) have described techniques for *Gracilaria* tissue.

Production of biomass or metabolites

The cultivation of tissues, calli or cells in photobioreactors, bioreactors or immobilized bioreactors are alternative techniques for direct production of biomass or of economically-significant metabolites. The best example (Misawa, 1977) is described in Japanese patent No. 74-101561 obtained by Nakamura in 1984 (Kureha Chem. Co. Ltd). This patent protects the right to produce agar from calli of *Gelidium amansii* Lamouroux and *G. subcostatum* Okamura (among other agarophytes). Callus growth increased 11.3 times in 20 days and, from 100 g of dried callus, 75 g of agar was obtained.

In phycocolloid production in cell culture, Cheney et al. (1987) did not find a significant difference between iota-type carrageenan extracted from tissue culture of Agardhiella subulata (C. Ag.) Kraft & Wynne compared with extractive from field-collected material. Tait et al. (1990) obtained comparative spectra for polysaccharides produced by Porphyra cell-cultures and the native plants, but, as the authors concluded, 'it should be demonstrated whether specific growth conditions can affect the structure and properties of the polysaccharides produced by cell cultures'... or by disorganized cells.

Bryhni (1978) found highly-significant quantitative and structural differences between polysaccharides extracted from organized strains of Ulva mutabilis Føyn and those from a strain of disorganized aggegates of undifferentiated cells. Liu *et al.* (1989) obtained 50% agar yield from dried callus of *Pterocladia capillacea* (Gmel.) Born. & Thur., 25% less than Nakamura's patent, but the agarose molecule contained less sulfate and fewer methyl groups. The callus of *Laurencia* consists of small photoautotrophic, pseudomeristematic cells, filled with starch-like granules, and with cell walls at least twice the width of normal cells (Garcia-Reina *et al.*, unpub. data). These data indicate that phycocolloid production, with high quality and distinct characteristics, is possible through cell and callus culture.

In addition to phycocolloid production, Chen (1989) has suggested the possibility of producing *Porphyra* for human consumption through cell culture. Fujimura and Kajiwara (1989) produced a bioflavor (released into the culture media) from *Ulva pertusa* Kjellman cell-suspension cultures.

Some critical considerations on applicability

All the applications described above are possible. The question is whether application on a commercial scale will be practical. *Laminaria* selection by monoploid cell-culture has yielded industrial results, and propagation by somatic cell-inoculation of morphologically simple species could be achieved commercially in a few years. There remain, however, many unresolved basic questions, limiting types of applications and species to which these processes can be applied.

Axenic cultures

Owing to seasonal variation of contaminants, differential interspecific sensitivities to biocides and the widespread phenomenon of endophytism in seaweeds and other algae, few generalizations can be made on obtaining axenic cultures. Evaluation of axenic cultures do not include tests for viruses, mycoplasma, rickettsia and so forth. Even if judged axenic, contaminants can appear in the cultures after months or years (Fries, 1963; Lee, 1986; Cheney, 1986; Tait *et al.*, 1990), and even with morphologically simple species, there are contradictory results of the efficacy of sterilization treatments (Bonneau, 1976).

Callus, callus control and PGR's

Gall, tumour, cancer, tumour-like, callus and callus-like are all terms used to describe proliferative, disorganized growth in seaweeds (Apt, 1988). The term 'callus-like' has been widely-used to qualify filamentous, crustose, hyperplasic and other abnormal outgrowth of the explant. If 'callus-like' is not true callus, as some authors claim, the literature on seaweed callus culture can be dramatically reduced. A consensus of what a callus in seaweed is has not been achieved.

Callus control implies callus induction, growth (without the explant) and regeneration. Although auxins and cytokinins exist in seaweeds, their effects when applied *in vitro* are not clear. Based on the literature of cell and callus culture of agarophytes (*Gelidium* and *Pterocladia*), three types of responses have been described for the effects of these hormones: 'success', although not compared with hormone-free media (Nakamura, 1974; Gusev *et al.*, 1987); 'no effect' (Polne-Fuller & Gibor, 1987a; Garcia-Reina *et al.*, 1988a); 'not clear' (Liu & Gordon, 1987).

Ranking of calligenic potential (Table 2) can be done (Gusev *et al.*, 1987; Garcia-Reina *et al.*, 1988a; Polne Fuller & Gibor, 1987a), indicating genotypic differences in disorganization (Fang *et al.*, 1979). 'Wounding-response' seems to be the key factor in initiating callus growth in seaweeds.

True callus culture (excised from the explant) has been described for a few species (Gelidium and Gracilaria: Nakamura, 1974; Laurencia: Garcia-Reina et al., 1988b; Grateloupia: Robaina et al., 1990b; Phyllophora: Gusev et al., 1987; Sargassum, Cystoseira, Macrocystis, Ulva, Enteromorpha, Eucheuma and Porphyra: Polne-Fuller & Gibor, 1987a, 1987b; Ecklonia: Lawlor et al., 1989; Pterocladia: Liu & Gordon, 1987). Only the Nakamura (1974) patent describes (true) callus culture of Gelidium amansii and G. subcostatum. Calli from Gelidium vagum Okamura (Gusev et al., 1987), G. nudifrons, G. robustum (Polne-Fuller & Gibor, 1987a) and G. versicolor (Garcia-Reina et al., 1988a) have not been described, either excised from the explant or with organogenetic potential.

Table 2. Ranking of 'calligenic potential' expressed as percent of tissue explants which developed callus (data from Gusev *et al.* 1987; Kawashima & Tokuda, 1989; Garcia-Reina, unpubl.; Polne-Fuller & Gibor, 1987a).

Chlorophyta

88.0%	Enteromorpha	intestinalis
-------	--------------	--------------

86.0% Ulva augusta

Phaeophyta

0.3%

70.0%	Ecklonia cava
29.0%	Macrocystis pyrifera (gametophyte)
20.0%	Laminaria sinclairii (gametophyte)
17.0%	Sargassum muticum
17.0%	Pelvetia fastigiata
10.0%	Sargassum hystrix
10.0%	Cystoseira osmundacea
9.2%	Laminaria sinclairii (sporophyte)
9.0%	Sargassum fluitans
7.8%	Macrocystis pyrifera (sporophyte)
Rodoph	yta
87.0%	Porphyra lanceolata
84.0%	Porphyra perforata
81.0%	Porphyra nereocystis

84.0%	Porphyra perforata
81.0%	Porphyra nereocystis
75.0%	Smithora naiadum
33.0%	Laurencia sp
18.0%	Phyllophora nervosa
16.0%	Furcellaria fastigiata
15.0%	Gelidium vagum
10.0%	Gracilaria ferox
7.0%	Eucheuma alvarezii
4.0%	Gracilaria verrucosa
2.0%	Ceramium kondoi
1.0%	Gigartina exasperata
0.9%	Eucheuma uncinatum
0.6%	Gelidium robustum
0.5%	Gracilaria papenfusii

Gelidium versicolor

callus culture to seaweeds.

Neither the physiological status of the explant (differential nutritional levels yielding differences in calligenic potential (Fries, 1980) seasonal differences in endogenous hormones (Mooney & van Staden, 1984; Featonby-Smith & van Staden, 1984) nor seasonally-different calligenic potentials, (Polne-Fuller & Gibor, 1987b) could be key factors for success. With so many unknown variables, it is difficult to project a produc-

tive future in the short term for the application of

Culture media

As organic requirements for axenic or aseptic seaweed cultures are largely unknown, the more common culture media are undefined (enriched seawater). The addition of organic complexes (coconut milk, algal and veast extracts, etc.) to increase low growth rates (indicating suboptimal conditions) of seaweed tissue (Fries, 1973; 1984) and callus cultures (Nakamura, 1974; Saga & Sakai, 1983) has resulted in both stimulatory effects and no effects (Robaina, 1988; Lawlor et al., 1988). Nutrient depletion could be the reason for callus and 'callus-like' inductions or reversions (Pedersén, 1968; Fries, 1980; Bradley & Cheney, 1986; Polne-Fuller & Gibor, 1986; Lawlor et al., 1989). Sugars have been reported to be unnecessary or even inhibitory to tissue (Fucus spiralis: Fries, 1984), callus (Ecklonia radiata: Lawlor et al., 1989) and cell culture (Porphyra umbilicalis: Tait et al., 1990) growth or organogenesis. Our studies on the interrelationship between the osmolality of the culture medium and the effect of osmotically active sugar supplementation has shown that, as in higher plants (van Rensburg & Vcelar, 1989), the effects of carbohydrates in seaweed tissue and callus culture seem osmotic or metabolic or both (Robaina et al., 1990a; 1990b). Solidity of culture media promotes disorganization (Robaina et al., 1990a; 1990b).

Heterotrophic growth is required for biomass production in bioreactors, but heterotrophic frowth of seaweed tissue remains to be demonstrated (Fries, 1973; Robaina, 1988; Lawlor et al., 1989; Robaina et al., 1990b). Although a callus of Gelidium has been obtained with the addition of sucrose (Nakamura, 1974), 20 g l⁻¹ mannitol (Gusev et al., 1987), or in the absence of sugars in the culture media (Polne-Fuller & Gibor, 1987a; Garcia-Reina et al., 1988a), callus production has not occurred in darkness. However, as seaweed tissues, (Fries, 1977; 1980), cell (Saga et al., 1978; Polne-Fuller et al., 1987; Tait et al., 1990) and callus cultures (Polne-Fuller et al., 1986; Polne-Fuller & Gibor, 1987b; Garcia-Reina et al., 1988a; Lawlor et al., 1989) are phototrophic, including Gelidium species, photobioreactors remain a possibility for biomass production.

True cell culture

Porphyra is the only genus for which continuous cell cultures have been established (Chen, 1989; Tait et al., 1990). Other reports on 'cell culture' refer to dynamic steps between protoplasts, pseudoprotoplasts or enzymatically/mechanically-isolated cells and their development to callus or to plants. The application of cell culture of other species for selection and for the production of biomass or metabolites requires confirmation of true cell culture.

Viable protoplasts

Protoplast isolation is not a problem in some seaweeds (Table 1), whereas the isolation of large numbers of highly-viable protoplasts is. Trial and error assays with cocktails of commercial (Table 3), phycophage-extracted (Table 4) or microorganism-extracted (Table 5) enzymes are common approaches to obtain protoplasts. Basic knowledge of composition and structure of cell walls of seaweeds and enzymatic activity of cellwall digesting enzymes are scarce. Until more information becomes available, possible benefits from protoplast culture as applied to Gelidium, for example, are likely limited.

Somatic incompatibility

Somatic incompatibility needs to be overcome to realize the potential for somatic hybridization. In somatic incompatibility chromosomes, chloroplasts and mitochondria from one of the fused protoplasts degenerate, as noted in heterokaryons of Zygnema × Porphyridium, Zygnema × Mougeotia (Ohiwa, 1978; 1980; 1981) and Daucus × Chlamydomonas (Fowke et al., 1979). Other undesirable processes could result from the *Table 3.* Commercial enzymes commonly used for the digestion of seaweed cell walls.

Pronase E	Merck 7433
Driselase	Kyowa hakko
Laminarinase	BDH 39120 2G
Macerase	Calbiochem 441201
Cellulysin	Calbiochem 219466
Maceroyme R-200	Serva
Cellulase onozuka R-10	Serva
Macerozyme R-10	Yakult
Cellulase onozuka R-10	Yakult
Cellulase onozuka RS	Yakult
Lysozyme	Sigma L6876
Protease XXIV	Sigma P8163
Pectolyase	Sigma P3026
Pectinase	Sigma P2401
Papain	Sigma P3125
Hemycelulase	Sigma H2125
Limpet III	Sigma L8755
Limpet II	Sigma L0630
Limpet I	Sigma L1251
Laminarinase	Sigma L7758
Cellulisin	Sigma C2274
Cellulase	Sigma C2415
Agarase	Sigma A6162
Abalone acetone powder	Sigma A7514

formation of different types of chimaera in plants regenerated from the heterokaryon. This occurred in the first seaweed somatic hybrid; irregularlyvariegated chimeral thalli from the fusion of wild (red) and mutant (green) *Porphyra* protoplasts occurred (Fujita & Migita, 1987). Cheney (1989) claimed to verify true hybridization in green and red plants regenerated from the fused green mutant (*Gracilaria tikvahiae*) and red (*G. chilensis*) protoplasts by isoenzyme analysis. Although suggestive of true hybridization, this technique cannot distinguish chimaeric plants from true somatic-hybrid plants.

As with somatic hybridization in microalgae (Matagne *et al.*, 1979), the first recovery of a stable seaweed heterokaryon (Kapraun, 1987) has been achieved using haploid cells, although these were zoospores, not somatic protoplasts. If the reduction of somatic incompatibility from haploid state of the fusants can be confirmed, potential applications of seaweed somatic hybridization can be reexamined with some likelihood of success.

Table 4. Phycophages from which have been isolated seaweed cell wall digestive enzymes.

Aplysia dactylomela	Gómez-Pinchetti et al. 1989
Aplysia depilans	Boyen et al. 1990
Aplysia punctata	Kloareg & Quatrano 1987a, 1987b
Aplysia vaccaria	Kloareg et al. 1989
Aplysia kurodai	Tokuda & Kawashima 1988
Crassostrea gigas	Onishi et al. 1985
Diadema antillarum	Gómez-Pinchetti <i>et al.</i> 1989, Lewis 1964
Diadema setosum	Benitez & Macaranas 1979
Dolabella auricula	Nisizawa <i>et al.</i> 1968
Haliotis cracherodii	Dai 1987
Haliotis rufescens	Dai 1987
Haliotis tuberculata	Ducreux & Kloareg 1988
Haliotis corrugata	Nakada & Sweeny 1967
Katherina tunicata	Kloareg & Quatrano 1987a
Littorina sp	Elyakova & Favorov 1974
Littorina striata	Gomez-Pinchetti et al. 1989
Littorina littorea	Chen 1986
Littorina brevicula	Onishi et al. 1985
Lunella cornata	Zhu 1982
Melagraphia aethiops	Liu & Gordon 1987
Monodonta labio	Zhu 1982
Mytilus edulis	Onishi et al. 191985
Nordotis discus	Onishi et al. 1985
Patella vulgata	Ducreux et al. 1988
Purpura clavigera	Zhu 1982
Strongylocentrotus intermedius	Saga & Sakai 1984
Strongylocentrotus	Neushul 1984
purpuratus	
Tegula funebralis	Galli & Giese 1959
Turbo coronatus	Tang 1982
Turbo sp	Liu et al. 1984
Turbo cornutus	Muramatsu et al. 1977
	•

Genetic engineering

Few data are available on seaweed gene-identification, location and cloning, vectors, effectiveness of DNA injection techniques or possible expression of foreign genes. The genetic engineering of seaweeds is thus largely speculative at this time. When, for instance, the genes codifying agar synthesis are transferred, the beginning of phycocolloid-producing bacterial biotechnology will be a real possibility.

Achromobacter	Quatrano & Caldwell 1978
Aeromonas sp. F-25	Araki <i>et al.</i> 1987
Alcaligenes	Quatrano & Caldwell 1978
Alteromonas	Quatrano & Caldwell 1978
Amoeba (Am I-7)	Polne-Fuller & Gibor 1987c
Arthrobacter	Quatrano & Caldwell 1978
Cytophaga flevensis	van der Meulen 1975
Flavobacterium	Quatrano & Caldwell 1978
Pseudomonas atlantica	Yaphe 1957, Morrice et al. 1983
Pseudomonas sp. strain P-1	Fujita & Migita 1987
Pseudomonas carrageenovora	Smith & Bidwell 1989
Vibrio sp. AP-2	Araki <i>et al.</i> 1987
Vibrio sp. AX-4	Araki <i>et al.</i> 1987

Table 5. Microorganisms from which has been isolated seaweed cell wall digestive enzymes.

References

- Apt, K. E., 1988. Etiology and development of hyperplasia induced by *Streblonema* sp. (Phaeophyta) on members of the Laminariales (Phaeophyta). J. Phycol. 24: 28-34.
- Araki, T., T. Aoki & M. Kitamikado, 1987. Preparation and regeneration of protoplasts from wild-type of *Porphyra yezoensis* and green variant of *P. ternera*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 53: 1623-1627.
- Ausich, R. L., 1983. Method for introducing foreign genes into green algae utilizing T-DNA of agrobacterium. European patent application no. 83306603.8. Publication no. 0108580. Applied for by Standard Oil Company, 200 East Randolph Drive, Chicago, IL 60601.
- Benítez, L. V. & J. M. Macaranas, 1979. Partial purification of a carrageenase from the tropical sea urchin *Diadema* setosum. Proc. Int. Seaweed Symp. 9: 353-359.
- Bingham, S. E. & J. A. Shiff, 1973. Conditions for attachment of single cells released from mechanically disrupted thalli of *Prasiola stipitata*. Biol. Bull. 154: 425.
- Björk, M., P. Ekman, A. Wallin & M. Pedersén, 1990. Effects of growth rate and other factors on protoplast yield from four species of the red seaweed *Gracilaria* (Rhodophyta). Bot. mar. 33: 433–439.
- Bonneau, E. R., 1976. Variation in growth and morphology of Ulva in axenic culture. Thesis, Connecticut. University, Gorton CT, 155 p.
- Boyen, C., B. Kloareg, M. Polne-Fuller & A. Gibor, 1990. Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. Phycologia 29: 173-181.
- Bradley, P. M. & D. P. Cheney, 1986. Morphogenetic variation in tissue cultures of a red seaweed. Plant Physiol. Suppl. 80: 129.
- Bryhni, E., 1978. Quantitative differences between poly-

saccharide compositions in normal differentiated Ulva mutabilis and the undifferentiated mutant lumpy. Phy-cologia 17: 119-124.

- Butler, D. M. & L. V. Evans, 1988. Isolation of protoplasts from *Laminaria*. Br. Phycol. J. 23: 284.
- Butler, D. M., K. Ostgaard, C. Boyen, L. V. Evans, A. Jensen & B. Kloareg, 1989. Isolation conditions for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). J. exp. Bot. 40: 1237-1246.
- Cantacuzene, A., 1930. Contribution à l'étude des tumeurs bactériennes chez les Algues marines. Thése présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris, Paris, 97 p.
- Chauvat, F., J. Labarre, F. Ferino, P. Thuriaux & P. Fromageot, 1988. Gene transfer to the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. In Stadler T., J. Mollion, M.-C. Verdus, Y. Karamanos & M. H. Christiaen (eds), Algal Biotechnology. Elsevier. pp. 89-99.
- Chen, L. C.-M. & A. R. A. Taylor, 1978. Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. Can. J. Bot. 56: 883-886.
- Chen, L. C.-M., 1986. Cell development of *Porphyra leucosticta* in culture. Bot. mar. 30: 399-403.
- Chen, L. C.-M., 1987. Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. Bot. mar. 30: 399-403.
- Chen, L. C.-M., M. F. Hong & J. S. Craigie, 1988. Protoplasts development from *Porphyra linearis* – an edible marine red alga. In Puite K. J., J. J. M. Dons, H. J. Huizing, A. J. Kool, M. Koornneef & F. A. Krens (eds), Progress in Plant Protoplast Research. Kluwer Academic Publishers. 123-124.
- Chen, L. C.-M., 1989. Cell suspension culture from *Porphyra linearis* (Rhodophyta) a multicellular marine red alga. J. appl. Phycol. 1: 153-159.
- Cheney, D. P., 1986. Genetic engineering in seaweeds: applications and current status. Nova Hedwigia 81: 22-29.
- Cheney, D. P., E. Mar, N. Saga & J. van der Meer, 1986. Protoplast isolation and cell division in the agar-producing seaweed *Gracilaria* (Rhodophyta). J. Phycol. 22: 238–243.
- Cheney, D. P., A. H. Luistro & P. M. Bradley, 1987. Carrageenan analysis of tissue cultures and whole plants of *Agardhiella subulata*. Hydrobiologia 151/152: 161-166.
- Cheney, D. P., 1989. Interspecific protoplast fusion and somatic hybridization in the agarophyte *Gracilaria*. Abstracts XIII Int. Seaweed Symp. Vancouver, p. 17-69.
- Dai, J., 1987. The effects of digestive enzymes of five species of marine shellfish on the isolation of *Porphyra yezoensis* cells. Trans. Oceanol. Limnol. 1: 84-88.
- D'Amato, F., 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In Thorpe T. A. (ed.), Frontiers of Plant Tissue Culture Calgary, 288-296.
- Davison, I. R. & M. Polne-Fuller, 1990. Photosynthesis in protoplasts of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). J. Phycol. 26: 384-387.
- Deretic, V., J. F. Gill & A. M. Chakrabarty, 1987. Alginate biosynthesis: a model system for gene regulation and function in *Pseudomonas*. Biotechnology 5: 469-477.

- Ducreux, G., P. Maillard & D. Sihachard, 1988. Patterns of differentiation and regeneration in single cells and protoplasts of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). In Stadler T., J. Mollion, M.-C. Verdus, Y. Karamanos & M. H. Christiaen (eds), Algal Biotechnology. Elsevier, 129–137.
- Ducreux, G. & B. Kloareg, 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). Planta 174: 25-29.
- Duffield, E. C. S., S. D. Waaland & R. Cleland, 1972. Morphogenesis in the red alga *Griffithsia pacifica*: regeneration from single cells. Planta 105: 185-195.
- Elyakova, L. A. & V. V. Favorov, 1974. Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina* sp. Biochimica et Biophysica Acta 358: 341-354.
- Evans, D. A., W. R. Sharp & H. P. Medina-Felho, 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Am. J. Bot. 71: 759-774.
- Fang, T. C., T. Chi-Hsun, O. Yu-Lin, T. Chin-Chin & C. Ten-Chin, 1979. Some genetic observations on the monoploid breeding of *Laminaria japonica*. Oceanic Selections 2: 1–12.
- Fang, T. C., 1983. A summary of the genetic studies of Laminaria japonica in China. In Tseng C. K. (ed.) Proceedings of the joint China-USA. Phycology Symposium. Science Press. Beijing, 123-136.
- Fang, T. C., Z. Yan & Z. Wang, 1983. Some preliminary observations on tissue cultures in *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. Kezue Tougbao Sci. Bull. Jpn. 28: 247-249.
- Fang, T. C., 1984. Some genetic features revealed from culturing the haploid cells of kelps. Hydrobiologia 116/117: 317-318.
- Featonby-Smith, B. C. & J. van Staden, 1984. Identification and seasonal variation of endogenous cytokinins in *Ecklonia maxima*. Bot. mar. 27: 527-531.
- Fisher, D. D. & A. Gibor, 1987. Production of protoplasts from the brown alga, *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phaeophyta). Phycologia 26: 488-495.
- Fowke, L. C., P. M. Gresshoff & M. J. Marchant, 1979. Transfer of organelles of the alga *Chlamydomonas reinhardii* into carrot cells by protoplast fusion. Planta 144: 341-347.
- Fries, L., 1963. On the cultivation of axenic red algae. Physiol. Plant. 16: 695-708.
- Fries, L., 1973. Requirements for organic substances in seaweeds. Bot. mar. 26: 19-31.
- Fries, L., 1977. Growth regulating effects of phenylacetic acid and p-hydroxyphenylacetic acid on *Fucus spiralis* in axenic culture. Phycologia 16: 451-455.
- Fries, L., 1980. Axenic tissue cultures from the sporophytes of *Laminaria digitata* and *L. hyperborea*. J. Phycol. 16: 475-477.
- Fries, L., 1984. D-vitamins and their precursors as growth regulators in axenically cultivated marine macroalgae. J. Phycol. 20: 62-66.
- Fujimura, T. & T. Kajiwara, 1989. Production of bioflavor by

regeneration from protoplasts of *Ulva pertusa*. Abstracts XIII Int. Seaweed Symp. Vancouver, 17-68.

- Fujita, Y. & S. Migita, 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. Bull. Fac. Fish. 57: 39-45.
- Fujita, Y. & S. Migita, 1987. Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda and development of fusion products. Jpn. J. Phycol. 35: 201–208.
- Fujita, Y. & M. Saito, 1989. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra*. Abstracts XIII Int. Seaweed Symp. Vancouver, 17-68.
- Gabriel, M., 1970. Formation, growth, and regeneration of protoplasts of the green alga, *Uronema gigas*. Protoplasma 70: 135-138.
- Galli, D. R. & A. C. Giese, 1959. Carbohydrate digestion in a herbivorous snail, *Tegula funebralis*. J. exp. Zool. 140: 415-439.
- García-Reina, G., R. Robaina & A. Luque, 1988a. Attempts to establish axenic cultures and photoautotrophic growth of *Gelidium versicolor Gracilaria ferox* and *Laurencia* sp. In Stadler T., J. Mollion, M.-C. Verdus, Y. Karamanos & M. H. Christiaen (eds), Algal Biotechnology. Elsevier. 111-118.
- García-Reina, G., R. Romero & A. Luque, 1988b. Regeneration of thalliclones from *Laurencia*. In Pais M. S. S.,
 F. Mavituna & J. M. Novais (eds), Plant Cell Biotechnology. NATO ASI Series. Springer-Verlag. 81–86.
- Gautheret, R. J., 1985. History of plant tissue and cell culture: a personal account. In Vasil I. K. (ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press. 2–60.
- Goff, L. J. & A. W. Coleman, 1984. Transfer of nuclei from a parasite to its host. Proc. natl. Acad. Sci. USA 81: 5420-5424.
- Gómez-Pinchetti, J. L., R. Robaina & G. García-Reina, 1989. Quantification of the agarolytic activity from marine herbivores. Its potential use for protoplast isolation. Abstracts XIII Int. Seaweed Symp. Vancouver, 17–97.
- Gusev, M. W., A. H. Tambiev, N. N. Kirikova, N. N. Shelyastina & R. R. Aslanyan, 1987. Callus formation in seven species of agarophyte marine algae. Mar. Biol. 95: 593-597.
- Han, H. & Y. Hongyuan, 1986. Haploids of Higher Plants in vitro. Springer Verlag. 211 pp.
- Kapraun, D. F., 1987. Marine biologist clones seaweed cells. Gen. Engineering News 7: 42-43.
- Kapraun, D. F. & S. G. Sherman, 1989. Strain selection and cell isolation of *Ulvaria oxysperma* (Chlorophyta) for net cultivation. Hydrobiologia 179: 53-60.
- Karp, A., 1989. Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? Newsletter IAPTC, 58: 2-11.
- Kawashima, Y. & H. Tokuda, 1989. Callus formation of *Eklonia cava*. Abstracts XIIIth Int. Seaweed Symp. Vancouver, 17-27.
- Kloareg, B. & R. S. Quatrano, 1987a. Enzymatic removal of the cell walls from zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell (Phaeophyta). Hydrobiologia 151/152: 123-129.

- Kloareg, B. & R. S. Quatrano, 1987b. Isolation of protoplasts from zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell. Plant Science 50: 189–194.
- Kloareg, B., D. Kropf, R. S. Quatrano, C. Boyen & V. Vreeland, 1988. Protoplast production, cell wall regeneration and photopolarization in zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell (Phaeophyta). In Stadler T., J. Mollion, M.-C. Verdus, Y. Karamanos & M. H. Christiaen (eds), Algal Biotechnology. Elsevier. 119-128.
- Kloareg, B., M. Polne-Fuller & A. Gibor, 1989. Mass production of viable protoplasts from *Macrocystis pyrifera*. Plant Science 62: 105-112.
- Larkin, P. J. & W. R. Scowcroft, 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. appl. Genetics 60: 197–214.
- Lawlor, H. J., J. A. McComb & M. A. Borowitzka, 1988. The development of filamentous and callus-like growth in axenic cultures of *Ecklonia radiata*. Proc. Int. Seaweed Symp. 12: 139-149.
- Lawlor, H. J., J. A. McComb & M. A. Borowitzka, 1989. Tissue culture of *Ecklonia radiata* (Phaeophyceae, Laminariales): effects on growth of light, organic carbon source and vitamins. J. appl. Phycol. 1: 105-112.
- Lee, T. F., 1986. Callus development from *Laminaria saccharina* sporophytes derived from gametophytes of aposporous origin. Abstracts for the meeting of the American Society of Limnology and Oceanography. Phycologial Society of America. 75.
- Lee, Y.-K. & H. M. Tan, 1988. Interphylum protoplast fusion and genetic recombination of the algae *Porphyridium cruentum* and *Dunaliella* spp. J. gen. Microbiol. 134: 635-641.
- LeGall, Y., J. P. Braud & B. Kloareg, 1989. Mass production of protoplasts from *Chondrus crispus* Stackhouse. Abstracts XIIIth Int. Seaweed Symp. Vancouver, 17-32.
- Lewis, J. B., 1964. Feeding and digestion in the tropical sea urchin *Diadema antillarum* Philippi. Can. J. Zool. 42: 549-557.
- Liu, W.-X., Y.-L. Tang, X.-W. Liu & T. C. Fang, 1984. Studies on the preparation and properties of sea snail enzymes. Hydrobiologia 116/117: 319-320.
- Liu, Q. Y., 1989. The ultrastructure of cell wall regenerated by isolated *Palmaria palmata* protoplasts. Abstracts XIIIth Int. Seaweed Symp. Vancouver, 17-32.
- Liu, X.-W. & M. E. Gordon, 1987. Tissue and cell culture of New Zealand *Pterocladia* and *Porphyra* sp. Hydrobiologia 151/152: 147-154.
- Liu, X.-W., C. Rochas & M. E. Gordon, 1989. Callus culture of cell wall polysacharides. Abstract XIIIth. Int. Seaweed Symposium. Vancouver, 17–32.
- Luqin, P., Z. Fei, G. Ma, J. Zhou & Y. Zhu, 1988. A preliminary study on the raising of seedlings of *Gelidium pacificum* by regeneration of thallus fragments. J. Zhejiang Coll. Fisheries 7: 100-105.
- Matagne, R. F., R. Deltour & L. Ledoux, 1979. Somatic fusion between cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardi*. Nature 278: 344-346.

- McLean, R.O. & D.J. Connolly, 1989. Callus and suspension culture in the Laminariales. Abstracts XIIIth Int. Seaweed Symp. Vancouver, 17–98.
- Millner, P. A., M. E. Callow & L. V. Evans, 1979. Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha* intestinalis (L.) Link. Planta 147: 174–177.
- Misawa, M., 1977. Production of natural substances by plant cell cultures described in Japanese patents. In Barz W. (ed.), Plant Tissue Cultures and its Biotechnological Applications. Springer-Verlag. 49-101.
- Mooney, P. A. & J. van Staden, 1984. Lunar periodicity of the levels of endogenous cytoquinins in *Sargassum heterophyllum*. Bot. mar. 27: 467-472.
- Morrice, L. M., M. McLean, F. B. Williamson & W. F. Long, 1983. β-Agarases from *Pseudomonas atlantica*. Hydrobiologia 116/117: 576-579.
- Mumford, T., 1987. Commercialization strategy for nori cultivation in Puget Sound, Washington. In Bird K. & P. H. Benson (eds), Seaweed Cultivation for Renewable Resources. Elsevier. 351-372.
- Muramatsu, T., S. Hirose & M. Katayose, 1977. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. Agric. Biol. Chem. 41: 1939-1946.
- Nakada, H. I. & P. C. Sweeny, 1967. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. J. Biol. Chem. 242: 845-851.
- Nakamura, T., 1974. (See Misawa, 1977).
- Neushul, M., 1984. Marine algal tissue culture. Topical technical report for Gas Research Institute. Neushul, M. (ed.) Gas Research Institute 84/0076, Goleta CA. 46 p.
- Nisizawa, K., S. Fujibayashi & Y. Kashiwabara, 1968. Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. J. Biochem. 64: 25-37.
- Ohiwa, T., 1978. Behavior of cultured fusion products from Zygnema and Spirogyra protoplasts. Protoplasma 97: 185-200.
- Ohiwa, T., 1980. Fine structure of degenerating nuclei in intergeneric fusion products from Zygnema taceae protoplasts. Protoplasma 102: 77-95.
- Ohiwa, T., 1981. Intergeneric fusion of Zygnema taceae protoplasts. Bot. Mag. Tokyo 94: 261-271.
- Onishi, T., M. Suzuki & R. Kikuchi, 1985. The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 51: 301–308.
- Pedersén, M., 1968. *Ectocarpus fasciculatus*: marine brown algae requiring kinetin. Nature 218: 5143.
- Polne-Fuller, M., M. Biniaminov & A. Gibor, 1984. Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. Hydrobiologia 116/117: 308-313.
- Polne-Fuller, M., N. Saga & A. Gibor, 1986. Algal cell, callus, and tissue cultures and selection of algal strains. Nova Hedwigia 83: 30-36.
- Polne-Fuller, M. & A. Gibor, 1986. Calluses, cells, and protoplasts in studies towards genetic improvement of seaweeds. Aquaculture 57: 117-123.

Polne-Fuller, M. & A. Gibor, 1987a. Tissue culture of

seaweeds. In Bird K. & P. H. Benson (eds), Seaweed cultivation for renewable resources. Elsevier. 219-239.

- Poine-Fuller, M. & A. Gibor, 1987b. Calluses and callus-like growth in seaweeds: Induction and culture. Hydrobiologia 151/152: 131–137.
- Polne-Fuller, M. & A. Gibor, 1987c. Microrganisms as digestors of seaweed cell walls. Hydrobiologia 151/152: 405-409.
- Polne-Fuller, M., 1988. The past, present, and future, of tissue culture and biotechnology of seaweeds. In Stadler T., J. Mollion, M.-C. Verdus, Y. Karamanos & M. H. Christiaen (eds), Algal Biotechnology. Elsevier. 17-31.
- Quatrano, R. S. & B. A. Caldwell, 1978. Isolation of a unique marine bacterium capable of growth on a wide variety of polysaccharides from macroalgae. Appl. envir. Microbiol. 36: 979-981.
- Reddy, C. R. K., S. Migita & Y. Fujita, 1989. Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture. Bot. mar. 32: 783-490.
- Robaina, R., 1988. Biotecnología del cultivo *in vitro* de algas rojas de interés industrial. Thesis. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 236 pp.
- Robaina, R., G. García-Reina & A. Luque, 1990a. The effects of the physical characteristic of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue culture. Hydrobiologia (In press).
- Robaina, R., P. García, G. García-Reina & A. Luque, 1990b. Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. J. appl. Phycol. 2: 137-143.
- Saga, N., T. Uchida & Y. Sakai, 1978. Clone Laminaria from single isolated cell. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 44: 87.
- Saga, N. & Y. Sakai, 1983. Axenic tissue culture and callus formation of the marine brown alga *Laminaria angustata*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49: 1561-1563.
- Saga, N., 1984. Isolation of protoplasts from edible seaweeds. Bot. Mag. Tokyo 97: 423-427.
- Saga, N. & Y. Sakai, 1984. Isolation of protoplasts from Laminaria and Porphyra. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 50: 1085.
- Saga, N., M. Polne-Fuller & A. Gibor, 1986. Protoplasts from seaweeds: production and fusion. Nova Hedwigia 83: 37–43.
- Saga, N. & T. Kudo, 1989. Isolation and culture of protoplasts from the marine green alga *Monostroma angicava*. J. appl. Phycol. 1: 25-30.
- Schiff, J. A., R. S. Quatrano, G. C. Harris, M. Legg & R. Stanley, 1972. Development of single cells released from mechanically disrupted thalli of *Prasiola stipitata*. Biol. Bull. 143: 476.
- Smith, R. G. & R. G. S. Bidwell, 1989. Inorganic carbon uptake by photosynthetically active protoplasts of the red macroalga *Chondrus crispus*. Mar. Biol. 102: 1–4.
- Sylvester, A. W. & J. R. Waaland, 1983. Cloning the red alga *Gigartina exasperata* for culture on artificial substrates. Aquaculture 31: 305-318.

- Tait, M. I., A. M. Milne, D. Grant, J. A. Somers, J. Staples, W. F. Long, F. B. Williamson & S. B. Wilson, 1990. Porphyra cell cultures: isolation and polysaccharide production. J. appl. Phycol. 2: 63-70.
- Tang, Y., 1982. Isolation and cultivation of vegetative cells and protoplasts of *Porphyra suborbiculata* Kjellm. J. Shandong Coll. Oceanol. 12: 49-50 (English abstract).
- Tatewaki, M. & K. Nagata, 1970. Surviving protoplasts in vitro and their development in Bryopsis. J. Phycol. 6: 401-403.
- Tokuda, H. & Y. Kawashima, 1988. Protoplast isolation and culture of brown alga Undaria pinnatifida. In Stadler T.,
 J. Mollion, M.-C. Verdus, Y. Karamanos & M. H. Christiaen (eds), Algal Biotechnology. Elsevier. 151-157.
- Tsekos, I., 1982. Tumour-like growths induced by bacteria in the thallus of a red alga, *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. Ann. Bot. 49: 123-126.
- van der Meer, J. P. & F. J. Simpson, 1984. Cryopreservation of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) and other macrophytic marine algae. Phycologia. 23: 195-202.
- van der Meer, J. P., 1986. Genetic contributions to research on seaweeds. Prog. in Phycol. Res. 4: 1-38.
- van der Meulen, H. J., 1975. The enzymatic hydrolysis of agar by *Cytophaga flevensis* sp. nov. Thesis, University of Groningen, Netherlands, 80 pp.
- van Rensburg, J. G. J. & B. M. Vcelar, 1989. The effect of the sucrose concentration on the initiation and growth of adventitious buds from leaf tissue of *Lachenalia*. S. Afr. J. Bot. 55: 117-121.
- Vreeland, V., E. Zablackis, B. Doboszewski & W. M. Laetsch, 1987. Molecular markers for marine algal polysaccharides. Hydrobiologia 151/152: 155-159.
- Waaland, J. R., 1982. Cloning marine algae for mariculture. J. World. Maricul. Soc. 14: 404-414.
- Waaland, J. R. & L. G. Dickson, 1987. Preparation of *Porphyra* protoplasts. J. Phycol. 23: 13.
- Wang, S., Z. Xu, G. Wang & Z. Xia, 1986. Ultrastructural $\frac{5}{6}$ study on protoplasts of *Porphyra haitanensis* (Bangio-phyceae, Rhodophyta). Mar. Sci. 10: 21-24 (Chinese with English abstract).
- Wang, S., X. Zhang, Z. Zhidong & Y. Sun, 1986. A study on the cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *Porphyra haitanensis*. Oceanol. Limnol. Sinica 17: 217–221.
- Wang, S., Y. Sun, A. Lu & G. Wang, 1987a. Early stage differentiation of thallus cells of *Porphyra haitanensis*. Chin. J. Oceanol. Limnol. 5: 217-224.
- Wang, S., G. Wang, Y. Sun & A. Lu, 1987b. Isolation and cultivation of the vegetative cells of *Porphyra haitanensis*. Chin. J. Oceanol. Limnol. 5: 333-339.
- Wang, S. & X. Yan, 1990. Observations on the monosporelike cells in the somatic cell culture of *Porphyra haitanensis*. Oceanol. Limniol. Sinica 21: 166–169.
- Wu, C. Y. & G. Lin, 1988. Progress in the genetics and breeding of economic seaweed in China. Hydrobiologia 151/152: 57-61.

- Yan, Z. M., 1984. Studies on tissue culture of *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. Hydrobiologia 116: 314-316.
- Yaphe, W., 1957. The use of agarase from *Pseudomonas* atlantica in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae). Can. J. Microbiol. 3: 987-993.
- Zhang, D., 1982. Study on protoplasts preparation, culture and fusion of somatic cells from two species of green algae

Ulva linza and Monostroma angicava Kjellm. J. Shandong College of Oceanol. 13: 57-65.

- Zhao, H. & X. Zhang, 1984. On the cultivation of the isolated vegetative cells of *Porphyra yezoensis* Ueda. J. Fish. China 8: 197-202.
- Zhu, R., 1982. A comparative study of marine algae cell wall decomposition by the digestive enzymes isolated from three species of marine gastropods. Biochem. Biophys. 2: 43-45.