

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO EN MACROALGAS : SUSTANCIAS REGULADORAS,
FOTOFISIOLOGÍA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR
(TETRASPOROGÉNESIS) DURANTE LOS ESTADIOS DE
CRECIMIENTO "IN VITRO" DEL ALGA ROJA GRATELOUPIA
DORYPHORA**

MARTA RODRIGO SANZ

Las Palmas de Gran Canaria, 1998



51/1997-98
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/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD Las Palmas de Gran Canaria a 23 de mayo de 1998.

El/a Presidente/a: Dr. D. Angel Luque Escalona,

El/a Secretario/a: Dr. D. Pedro Sosa Henríquez,

El/a Vocal: Dr. Dr. Ricardo Sánchez Tamés,

El/a Vocal: Dr. D. Ioannas Tsekos.

El/a Vocal: Dr. D. Candelaria Gil Rodríguez

El/a Doctorando/a: D^a. Marta Rodrigo Sanz,

DESARROLLO EN MACROALGAS

Sustancias reguladoras, fotofisiología y diferenciación celular (tetrasporogénesis)

durante los Estadios de crecimiento *in vitro* del alga roja *Grateloupia doryphora*.


Memoria que presenta la Lcda. en Ciencias del Mar Marta Rodrigo Sanz
para aspirar al grado de Doctora.

Las Palmas G.C. mayo de 1998

El Profesor Doctor D. Rafael Robaina Romero y la Doctora Dña. Pilar García Jiménez, del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de G.C.

Hacen constar:

Que la Lcda. en Ciencias del Mar, Marta Rodrigo Sanz ha realizado el presente trabajo como Memoria de Tesis Doctoral bajo nuestra dirección, en el Dpto. de Biología de la U.L.P.G.C., y se presenta con nuestro Vº Bº.


Fdo. Rafael Robaina Romero



Fdo. Pilar García Jiménez

Las Palmas G.C., mayo de 1998.

Agradecimientos.

☞ A Rafa y a Pili, por enseñarme a disfrutar aprendiendo todo lo que sé, mostrándome día tras día su confianza y apoyo, sin dejar de insistir y de creer en mí. A “ustedes”, a su saber, capacidad de trabajo y calidad humana, les debo gran parte de este trabajo y las ganas de seguir aprendiendo más.

☞ A todos los miembros del Departamento de Biología, Director, profesores, personal laboral y administrativo por su colaboración en este trabajo, y de forma especial a los becarios de antes y ahora, por su compañía, ayuda y ánimo.

☞ A la Universidad de Las Palmas de G.C., cuyas becas y ayudas resultan fundamentales, como en mi caso, para la formación y sustento de muchas personas que desarrollan su labor investigadora.

☞ Al Servicio Central de Microscopía de la U.L.P.G.C., especialmente a Pili y a Chicha Sánchez, por su buen hacer y todas las horas que han dedicado a este trabajo.

☞ A mis Aitas, a Alicia, Daniel y Aser, porque aunque estuvierais lejos, desde el inicio de esta ya larga aventura, os he sentido conmigo, apoyándome sin condiciones.

☞ A Javier, por tu constante disposición a compartir conmigo muchas cosas buenas y contagiarme tu optimismo para superar las menos buenas.

A todos los miembros de mi Familia Canaria que tan bien me han acogido y cuidado.

☞ Nere Gasteizko Kuadrillari, larrialdietan beraien berotasuna eta laguntza behar izan dudanean, beti prest han egon direlako, Mila Esker guztioi.

☞ Y por último, quiero dar las gracias a todas las personas que sin darse cuenta me han alentado, y día a día han compartido muchas de mis alegrías y penas: a mis compañeras de piso, especialmente Bárbara y Nagore, y a todos mis amigos del Club de Rugby Las Palmas.

A mis Aitas y a Javier.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Propagación <i>in vitro</i> de carposporas de <i>G. doryphora</i> y caracterización de los Estadios de crecimiento.....	4
2. Contenidos del trabajo.....	13
2.1. Capítulo I: Control del crecimiento por auxinas, citoquininas, giberelinas y poliaminas en el Estadio 0.....	13
2.2. Capítulo II: Diferencias fotosintéticas y tolerancia al estrés salino y de temperatura entre los Estadios I y III.....	14
2.3. Capítulo III: Alteraciones morfológicas y fotofisiológicas en el Estadio III por el efecto del fotoperiodo.....	15
2.4. Capítulo IV: Inducción y seguimiento de la diferenciación celular durante la tetrasporogénesis en el Estadio I.....	16
3. Bibliografía.....	17
I. CAPÍTULO I: CONTROL DEL CRECIMIENTO POR AUXINAS, CITOQUININAS, GIBERELINAS Y POLIAMINAS EN EL ESTADIO 0	21
I.1. Introducción.....	23
I.2. Material y métodos.....	34
Material vegetal.....	34
Medios de cultivo.....	34
Histología e histoquímica.....	35
Índices y estadísticos.....	40
I.3. Resultados.....	41

I.4. Discusión.....	52
Conclusiones.....	58
I.5. Bibliografía.....	59

II. CAPÍTULO II: DIFERENCIAS FOTOSINTÉTICAS Y TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO Y DE TEMPERATURA ENTRE LOS ESTADIOS I Y III	69
II.1. Introducción.....	71
La fotosíntesis como medida fisiológica del estrés.....	75
II.2 Material y métodos.....	80
Material vegetal.....	80
Contenido pigmentario.....	80
Medidas fotosintéticas.....	82
Estadística.....	88
II.3. Resultados.....	89
II.4. Discusión.....	94
Conclusiones.....	100
II.5. Bibliografía.....	101

III. CAPÍTULO III: ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y FOTOFISIOLÓGICAS EN EL ESTADIO III POR EL EFECTO DEL FOTOPERIODO.....	111
III.1. Introducción.....	113
Estructura y aclimatación del ficobilisoma.....	117
III.2. Material y métodos.....	122

Análisis del contenido pigmentario.....	123
Medidas de las tasas fotosintéticas.....	123
Aislamiento de ficobilisomas.....	124
Determinación de proteína total y del contenido de ficoeritrina.....	129
Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	131
III.3. Resultados.....	135
Análisis del contenido pigmentario.....	139
Tasas fotosintéticas.....	139
Proteína total y estructura del ficobilisoma.....	141
III.4. Discusión.....	145
Conclusiones.....	152
III.5. Bibliografía.....	153
IV. CAPÍTULO IV: INDUCCIÓN Y SEGUIMIENTO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DURANTE LA TETRASPOROGÉNESIS EN EL ESTADIO I.....	163
IV.1. Introducción.....	165
IV.2. Material y métodos.....	173
Material vegetal.....	173
Estudio estructural y ultraestructural.....	173
Inducción de la tetrasporogénesis.....	174
Dependencia del estadio de crecimiento y desarrollo del estudio y seguimiento de la tetrasporogénesis.....	174

IV.3. Resultados.....	176
Induccion y dependencia del estadio de crecimiento en el estudio de la tetrasporogénesis.....	176
Eventos celulares durante la tetrasporogénesis.....	178
IV.4. Discusión.....	203
Conclusiones.....	211
IV.5. Bibliografía.....	213

Introducción General.

Desarrollo es el término polivalente empleado para describir los cambios en la estructura y función de un organismo a lo largo de su génesis, crecimiento, maduración y senectud de forma individual (ontogenia) y en la sucesión de generaciones (filogenia). El desarrollo de un organismo implica la multiplicación de sus células (crecimiento por división), aumento en el tamaño (crecimiento por elongación) y la diferenciación de ciertas células para funciones específicas. Las diferentes fases que comprende el desarrollo tienen lugar de acuerdo a un programa genético, inducido y modificado por los factores ambientales. Cada una de las fases se lleva a cabo en una porción del tiempo de vida, y tienen su forma externa y características funcionales particulares, regulados no sólo por la actividad génica sino por los efectos del medio. En cada una de las etapas o estadios, el organismo puede tener unas características fisiológicas y requerimientos especiales y responderá de forma diferente a las influencias externas.

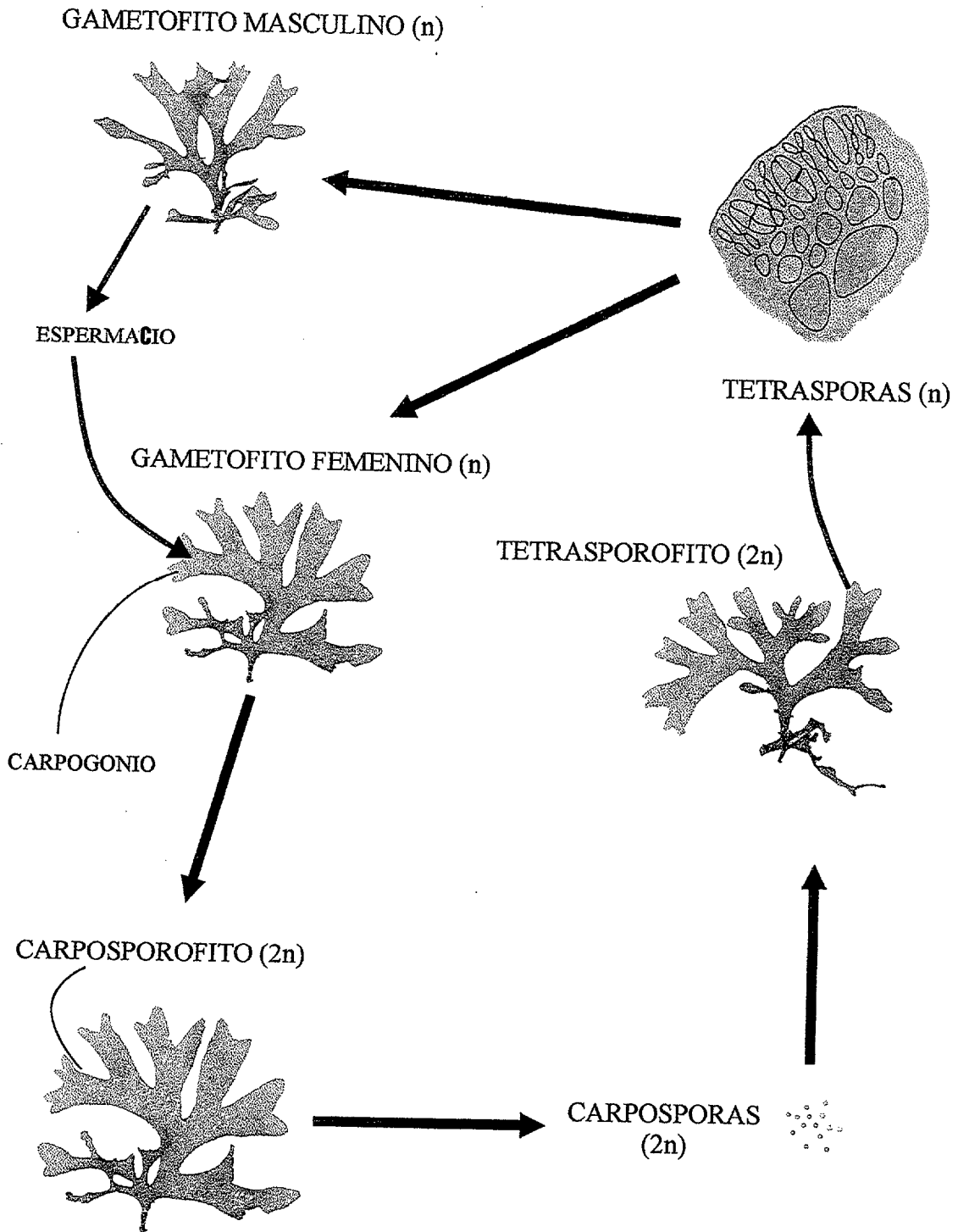
El talo de un alga roja rara vez se forma directamente a partir de la espora, existiendo estadios intermedios en el desarrollo. La secuencia de transición usual para las algas bentónicas incluye los estadios básicos de cigotos o esporas, *germlings*, *sporelings*, juveniles y adultos (Vadas y col., 1992), siendo los caracteres morfológicos fundamentalmente como la longitud del talo (cm) el criterio de clasificación entre estadios. Los aspectos fisiológicos o genéticos han sido menos abordados, por lo que es lógico la controversia al detectarse rangos de tamaño muy amplio para definir el mismo estadio en diferentes especies. De esta forma por ejemplo, una laminaria juvenil puede pasar de 1 cm en verano a 2-3 m en primavera (Dayton y col., 1984), mientras que la mayoría de las clorofitas y rodofitas raramente superan los 5 cm de longitud. Se hace necesaria por tanto la caracterización de estadios siguiendo o acompañando la morfología con aspectos fisiológicos y/o genéticos, estructurales, de diferenciación celular o incluso de

expresión génica diferencial.

1. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE CARPOSPORAS DE *G. doryphora* Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADIOS DE CRECIMIENTO.

El alga *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe, pertenece a la división Rhodophyta, clase Florideophyceae y dentro del orden Cryptonemial a la familia Cryptonemiaceae (Abbot y Hollenberg, 1976). Se encuentra en las zonas rocosas del intermareal medio en el NE de Gran Canaria, a menudo cubiertas de arena en su fondo, como plantas solitarias o formando matas de aproximadamente 4-5 cm de longitud (en raras ocasiones alcanzando 8 cm). Presenta una coloración entre violeta-púrpura y rojiza, que en los meses de mayor intensidad lumínica torna a blanquecino o verde en las partes superiores. Las ramificaciones que miden de 5 a 20 mm de ancho, son simples o con pocas divisiones hacia la base, presentando a veces proliferaciones hacia los márgenes (Alfonso-Carrillo y col., 1984). Posee un ciclo de vida trifásico del tipo *Polysiphonia* que incluye tetrasporofitos, carposporofitos, y gametofitos. Las fases del gametofito y tetrasporofito son independientes y viven libres, mientras que el carposporofito está adosado al gametofito femenino. Los gametofitos haploides masculinos y femeninos son vegetativamente parecidos, con una morfología idéntica a la del tetrasporofito diploide isomórfico (Figura 1).

Figura 1. Ciclo de vida tipo *Polysiphonia* de *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe (Cryptonemiales, Rhodophyta).

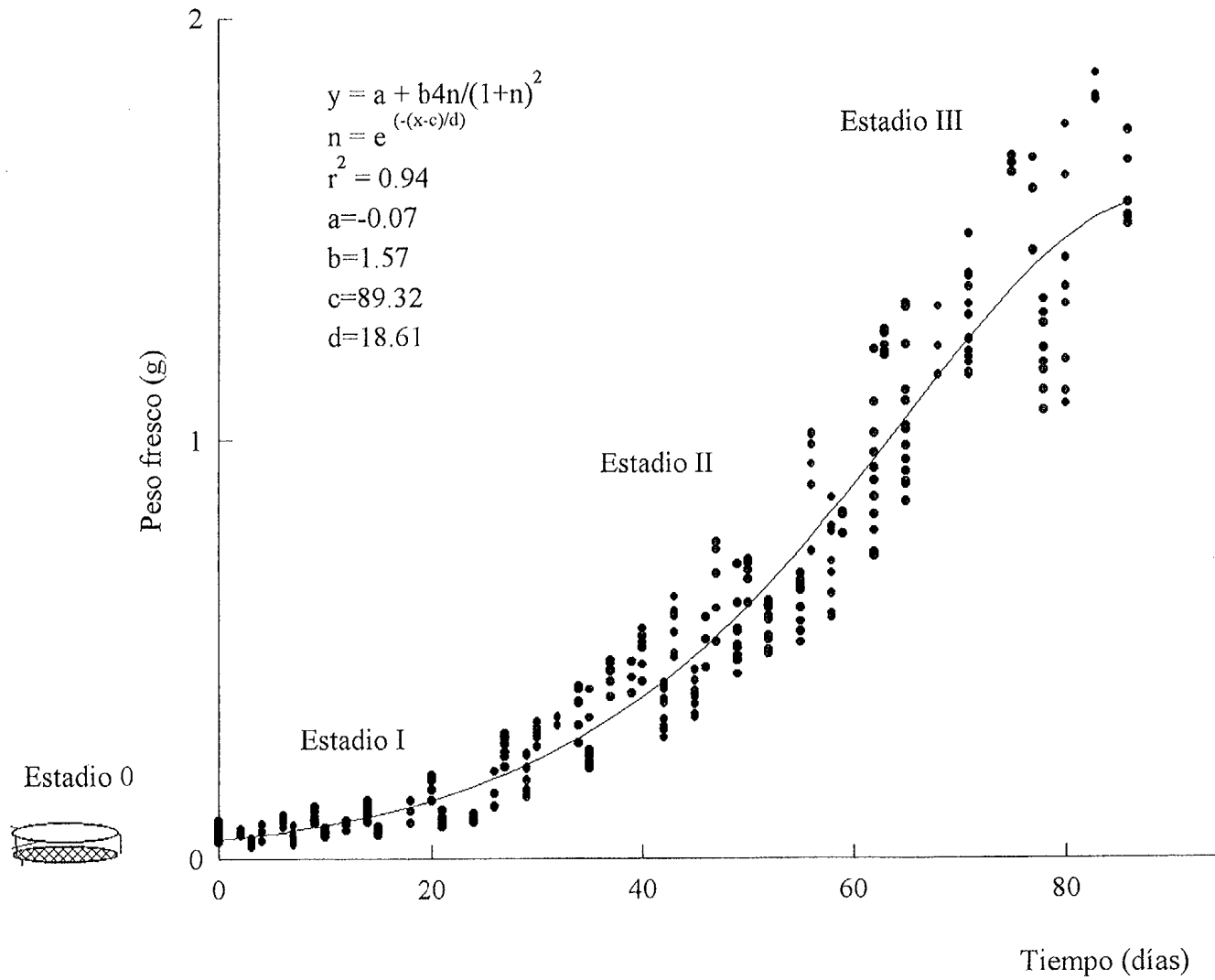


Para la propagación *in vitro* de carposporas, seguimos los métodos habituales en nuestro laboratorio y que ya describieron en detalle Robaina (1988) y García-Jiménez (1994). Se recogen talos carposporofíticos de *G. doryphora* en los charcos del intermareal alto de la zona de San Cristóbal y Melenara (NE de Gran Canaria) y de ellos se obtienen explantos circulares fértiles (con cistocarpos). Tras incubar durante una semana estos explantos en una solución de antibióticos, se siembran en placas medio PES (Provasoli Enriched Seawater, Provasoli, 1968) sólido (0,8 % agar) entre 25 y 30 días hasta que las carposporas se liberan espontáneamente y germinan: **Estadio 0**.

Estas carposporas germinadas son recogidas y cultivadas en placas con 20 mL de medio PES líquido durante 30-40 días en los que desarrollaron 3-4 ejes de crecimiento. Posteriormente se recultivan en botellas de Pyrex de 300 mL con PES líquido y aireación no aséptica. Al no fijarse el material a sustrato alguno y debido a la agitación (moderada, pero suficiente para voltear las algas), el crecimiento tiene lugar en todas las direcciones dando lugar a formas esféricas, técnicamente llamadas *aegagropilous* y morfológicamente distintas a sus homólogas fijadas en la naturaleza (Norton y Mathieson, 1983).

El seguimiento de su peso fresco y la representación a lo largo del tiempo dio lugar a una curva (Figura 2) que se ajusta bien al modelo de la curva logística. Sobre esta curva establecimos empíricamente tres fases o estadios de cultivo coincidiendo con las distintas tendencias de la curva: El **Estadio I**, **Estadio II** y **Estadio III**.

Figura 2. Curva de crecimiento de los carposporas germinadas de *Grateloupia doryphora* en cultivo.



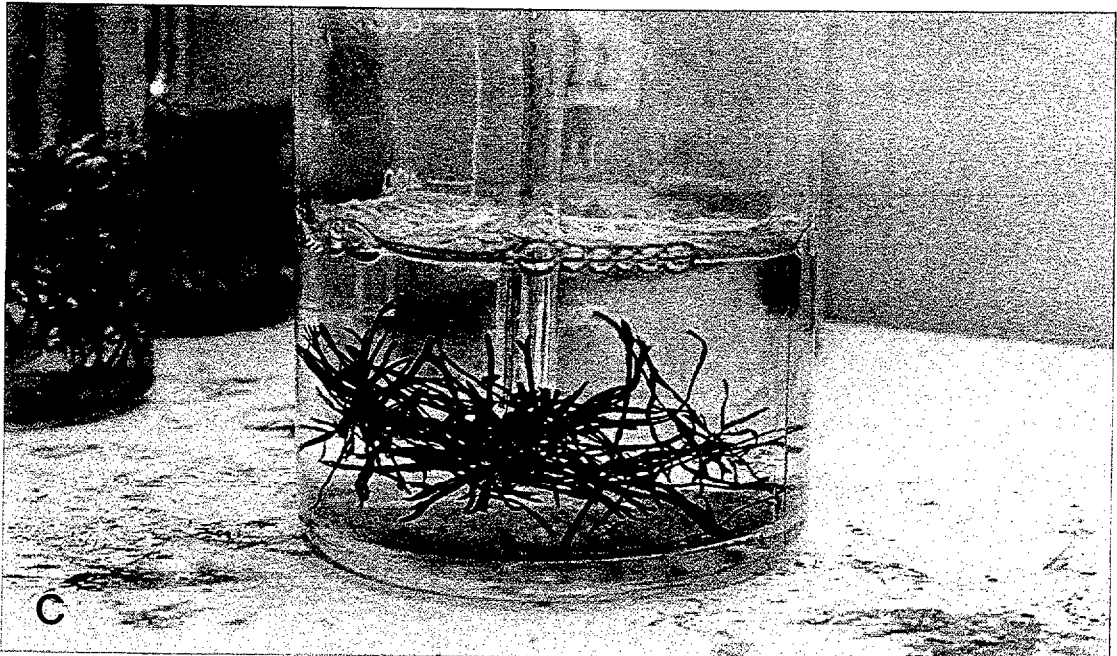
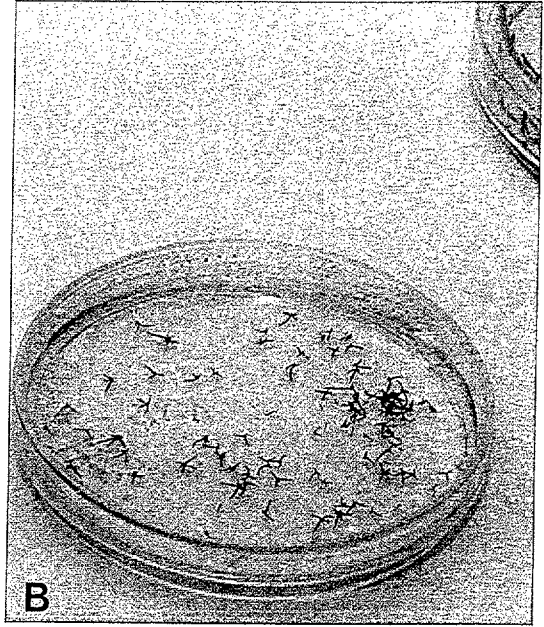
El Estadio I (Figura 3A, 3B) lo constituyen los individuos de 30-40 días de cultivo con 3-4 ejes de crecimiento y que presentan un crecimiento (incremento de biomasa frente al tiempo) moderado. El Estadio III coincide con la tendencia estacionaria de la curva de crecimiento y está constituido por talos bien pigmentados con ejes de crecimiento de más de 5 cm que presentan ramificación apical, y cultivados durante más de 80 días en PES líquido (Figura 3C).

El Estadio II lo consideramos como una fase de transición entre el crecimiento moderado del Estadio I, y la disminución del crecimiento (previa a la fase estacionaria) del Estadio III. Se trata de una fase que ocurriría entre 40 y 60 días de propagación, aunque difícil de concretar, y también difícil de diferenciar morfológicamente, ya que los individuos de este Estadio II presentan una morfología intermedia entre el I y el III.

Los análisis y ajustes matemáticos no revelan los mecanismos del crecimiento y desarrollo, aunque reflejan algo la naturaleza del proceso de crecimiento permitiendo realizar comparaciones entre las diferentes condiciones. La cinética del crecimiento es una manera de resumir los datos de crecimiento muy común en la fisiología vegetal para describir e interpretar las respuestas fisiológicas.

A lo largo de este trabajo para designar a los talos tetrasporofíticos jóvenes incluido el Estadio 0, y ante la dificultad de encontrar un término adecuado en castellano, nos remitimos a la única clasificación de las fases de post-fijación encontrada en la bibliografía (Vadas y col., 1992), y emplearemos el término anglosajón *sporeling*, seguido del Estadio de crecimiento al que nos referamos (0, I, II ó III). Esta forma de caracterizar el material de cultivo permite conocer en todo momento la fase y el grado de desarrollo del material empleado en los distintos ensayos que constituyen el grueso de este trabajo.

Figura 3. (A),(B) Estadio I de *Grateloupia doryphora* en cultivo, constituido por carposporas germinadas cultivadas en medio líquido durante aproximadamente 30 días y que presentan 3-4 ejes de crecimiento. (C) Estadio III del cultivo de *G. doryphora*, correspondiente a talos adultos que llevan más de 60 días en cultivo.



2. CONTENIDOS DEL TRABAJO.

2.1 Capítulo I: Control del crecimiento por auxinas, citoquininas, giberelinas y poliaminas en el Estadio 0. (Journal of Applied Phycology, (1998). En prensa)

La bibliografía muestra que las respuestas de las algas frente a los reguladores de crecimiento son muy variables. Para un mismo material, estas sustancias pueden aumentar, reducir e incluso inhibir la respuesta del crecimiento y la morfogénesis. El efecto causado también varía en función de las condiciones de cultivo, el tamaño y la edad del material vegetal (Bradley, 1991; Evans y Trewavas, 1991).

Los reguladores de crecimiento tienen escaso efecto en el tejido bien desarrollado de las rodofitas. En estudios preliminares realizados con explantos de talos desarrollados (Estadio III) de *G. doryphora* (Robaina, 1988), los reguladores no resultaron efectivos. A partir de estos resultados, consideramos la hipótesis de que el Estadio 0 podría representar el "estadio de competencia" capaz de reconocer la señal morfogénica de los reguladores, que condiciona una determinada variación en el desarrollo (Christianson y Warnick, 1983). Son muy escasas las referencias del uso de los reguladores de crecimiento en las fases más tempranas de desarrollo, de ahí gran parte del interés de este trabajo.

Por otra parte, conocíamos también los efectos del glicerol como fuente de carbono externa estimuladora del crecimiento vegetativo y morfogénesis en explantos y *sporelings* (Robaina y col., 1990 a,b,1995; García-Jiménez y col., 1996).

Llevamos a cabo un estudio de los efectos de los reguladores de crecimiento y de las poliaminas combinados con el glicerol en el Estadio 0 de *G. doryphora*. El trabajo comprendía un seguimiento completo del material sometido a los diferentes tratamientos con técnicas histológicas e histoquímicas y de valoración de dos índices de desarrollo y morfogénesis respectivamente.

2.2 Capítulo II: Diferencias fotosintéticas y tolerancia al estrés salino y de temperatura entre los Estadios I y III. (Marine Biology (1997) 128: 689-694).

El desarrollo de cualquier individuo, y concretamente de las algas, comprende una sucesión coordinada de cambios morfológicos y fisiológicos. El desarrollo hacia una fase adulta implica un aumento en el número de células que adquieren características fisiológicas y bioquímicas diferentes. Cada una de las fases del ciclo de vida tiene diferentes requerimientos. En este sentido Correa y col. (1985) recogieron que los talos adultos requerían un fotoperiodo con más horas de luz que los *sporelings*. La susceptibilidad de los propágulos de las algas puede variar también con la edad o el crecimiento (Hruby y Norton, 1979; Thelin, 1981; Johnson, 1989). Los talos adultos deberán adaptar su fisiología al que se supone estado final de desarrollo, en el que además de mantener tejido no fotosintético, tendrán que asumir el coste energético que supone la formación de estructuras reproductoras.

La respuesta marcadamente diferente del Estadio 0, obtenida en el primer trabajo frente a los reguladores de crecimiento, apuntaba la posibilidad de que hubiese comportamientos biológicos y fisiológicos diferentes entre los estadios de *G. doryphora*. Para corroborar esta hipótesis se planteó un ensayo en el que se eligieron dos estadios del cultivo claramente diferenciados entre sí (el I y el III) y se llevó a cabo un estudio comparativo de su fotofisiología (contenido pigmentario y tasas fotosintéticas), así como de la tolerancia fotosintética al estrés salino y de temperatura.

Para su realización fue necesario la puesta a punto de la técnica del Hansatech^{MR}, que nos permitió obtener las curvas P-I (Fotosíntesis-Irradiancia) a partir de las que medir y comparar la actividad fotosintética en ambos estadios de crecimiento antes y después de someterlos a los tratamientos estresantes.

2.3 Capítulo III: Alteraciones morfológicas y fotofisiológicas en el Estadio III por el efecto del fotoperiodo.

Apenas existen en la bibliografía referencias acerca del fotoperiodo que no hagan mención a la inducción y diferenciación de estructuras reproductoras, y que se centren en los efectos del fotoperiodo en el crecimiento y desarrollo como una componente más de la luz. De la misma manera que las algas se aclimatan a las distintas irradiancias (fotoaclimatación) y calidades espectrales (adaptación cromática) mediante cambios en su fotofisiología (contenido pigmentario y actividad fotosintética), forma y capacidad de crecimiento, queríamos estudiar si el desarrollo en los distintos fotoperiodos provocaba cambios similares en *G. doryphora*, tanto en su fotofisiología como en la tasa de crecimiento y el patrón de desarrollo en general, mediante un seguimiento de las algas en cultivo desde el Estadio I hasta el III en tres fotoperiodos distintos (16:8 control, 12:12 y 8:16).

Sabemos además de la existencia de modificaciones ligadas al desarrollo entre los Estadios I y III, por lo que el fotoperiodo y su efecto podría interpretarse incluso como "modulador" del desarrollo y de la expresión génica resultante. Un componente que podría revelarnos los cambios a este nivel es la composición y estructura, genéticamente controlada, del ficobilisoma (Bernard y col., 1996). Para ello fue necesario poner a punto las técnicas de aislamiento del ficobilisoma y de electroforesis que permitieran observar las diferencias en sus polipéptidos estructurales tras el crecimiento y desarrollo en los distintos fotoperiodos.

2.4. Capítulo IV: Inducción y seguimiento de la diferenciación celular durante la tetrasporogénesis en el Estadio I.

Este trabajo se basó en el uso del fotoperiodo, un parámetro de cultivo muy extendido en la literatura, para favorecer la inducción y formación de estructuras reproductoras (tetrasporas) en las algas (Dring, 1988; Lewis y col., 1991; Guiry y Dawes, 1992; Cunningham y col., 1993).

En un primer experimento con controles bajo el microscopio óptico, el tratamiento de fotoperiodo corto parecía inducir la tetrasporogénesis en el Estadio I de *G. doryphora*. Posteriormente mediante el diseño de experimentos basados en transferencias de los *sporelings* cultivados desde un fotoperiodo control (16:8) al fotoperiodo inductor (8:16), queríamos conocer el tiempo necesario en uno y otro fotoperiodo y el grado de desarrollo de la planta, necesario para la inducción en un mayor número de estructuras y mejor diferenciadas, así como, su seguimiento desde las primeras etapas de este proceso de tetrasporogénesis.

Combinando estas técnicas de cultivo en el laboratorio y las técnicas de microscopía óptica y electrónica, se realizó un seguimiento que permitió la descripción en profundidad, a nivel tisular y subcelular, de los eventos aparentes de diferenciación celular hasta la tetrasporogénesis, así como su comparación con material procedente de la naturaleza.

3. BIBLIOGRAFÍA.

Abbot IA, Hollenberg GJ (1976) Marine Algae of California. Standford University Press

Alfonso-Carrillo J, Gil-Rodríguez MC, Haroun R, Villena M, Wildpret de la Torre W (1984) Adiciones y correcciones al catálogo de algas marinas bentónicas para el Archipiélago Canario. *Vieraea* 13: 27-49

Bernard C, Etienne AL, Thomas JC (1996) Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (Rhodophyta): Compared effects of high light and translation inhibitors. *J Phycol* 32: 265-271

Bradley PM (1991) Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. *J Phycol* 30: 599-605

Christianson ML, Warnick DA (1983) Competence and determination in process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev Biol* 95: 288-293

Correa J, Avila M, Santelices (1985) Effects of some environmental factors on growth of sporelings in two species of *Gelidium* (Rhodophyta). *Aquaculture* 44: 221-227

Cunningham EM, Guiry MD, Breeman AM (1993) Environmental regulation of development, life history and biogeography of *Helminthora stackhousei* (Rhodophyta) by daylength and temperature. *J Exp Mar Biol Ecol* 171(1): 1-21

Dayton PK, Currie V, Gerrodette T, Keller BD, Rosenthal R, Ven tresca D (1984) Patch dynamics and stability of some California communities. *Ecol Monogr* 54: 253-289

Dring MJ (1988) Photocontrol of development in algae. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 39: 157-174

Evans LV, Trewavas AJ (1991) Is algal development controlled by plant growth substances? *J Phycol* 27: 322-326

García-Jiménez P (1994) Aclimatación reproductiva, fisiológica y estructural al cultivo in vitro del alga *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe (Rhodophyta). Tesis doctoral. U.L.P.G.C.

García-Jiménez P, Robaina RR, Luque A, Tsekos I (1996) Glycerol activated cellular division and byosintetic activity during growth and morphogenesis of carpospore seedlings of *Grateloupia doryphora* (Cryptonemiales, Rhodophyta). *Phycologia* 35(3): 261-269

Guiry MD, Dawes CJ (1992) Daylength, temperature and nutrient control of tetrasporogenesis in *Asparagopsis armata* (Rhodophyta). *J Exp Mar Biol Ecol* 158(2): 197-217

Hruby T, Norton TA (1979) Algal colonization on rocky shores in the Firth Cycle. *J Ecol* 67: 65-77

Johnson LE (1989) Spatial and temporal influences on the recruitment of intertidal red algae. Ph. D. Thesis. University of Washington, Seattle, U.S.A.

Lewis NI, Avila M, Mc Lachlan JL (1991) Life history of *Gimnogongrus furcellatus* (C.Ag.) J. Ag. (Rhodophyta, Phyllophoaceae) from Chile. Bot Mar 34: 145-152

Norton TA, Mathieson AC (1983) The biology of unattached seaweeds. Prog Phycol Res 2: 333-386

Provasoli L (1968) Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: Cultures and collections of algae. Watanabe A, Hattori A (eds.). Jap Soc Plant Physiol

Robaina R (1988) Biotecnología del cultivo in vitro de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis doctoral. U.P.C.

Robaina RR, García-Reina G, Luque A (1990a) The effect of the physical characteristics of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue cultures. Hydrobiologia 204/205: 137-142

Robaina RR, García P, García-Reina G, Luque A (1990b) Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. J Appl Phycol 2: 137-143

Theilin I (1981) Effects in culture of two petrol dispersants in the zygotes and plantules. Bot Mar 24: 515-519

Vadas RL, Johnson S, Norton TA (1992) Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae. Br Phycol J 27: 331-351

Capítulo I: Control del crecimiento por auxinas, citoquininas, giberelinas y poliaminas en el Estado 0.

1.1. INTRODUCCIÓN.

Existen numerosas sustancias químicas, naturales y sintéticas, capaces de controlar el crecimiento y diferenciación de las plantas. Los términos que se emplean para denominar a los reguladores del crecimiento (o sustancias de crecimiento) han generado mucho debate semántico entre los autores (Bradley, 1991; Evans y Trewavas, 1991). El término hormona, originalmente empleado para sustancias morfogénicas de los animales, engloba a las sustancias orgánicas producidas de forma natural y que a baja concentración ejercen un gran efecto en los procesos fisiológicos. A diferencia de las hormonas animales, en las plantas superiores, los reguladores de crecimiento se producen en tejidos no especializados e influyen conjuntamente en varios aspectos de la morfogénesis (Davies, 1987). Por ello, el término de reguladores de crecimiento es el preferido, junto al hecho de que algunas de las sustancias son sintéticas.

Se reconocen cinco grupos de sustancias de crecimiento de plantas: las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, el ácido abscísico y el etileno. Además de estos grupos principales, existen otros dos grupos que son también activos en la regulación del crecimiento de las plantas: las poliaminas y los brasinoesteroides (Azcón-Bieto y Talón, 1993; Hopkins, 1995). (Tabla I.1)

Las auxinas fueron las primeras hormonas descubiertas en plantas. La principal auxina es el ácido indol-3-acético (IAA), del que se derivan otros compuestos que también actúan como auxinas. El descubrimiento de su papel como estimuladoras del crecimiento y desarrollo hizo que se investigaran otros compuestos con una actividad similar, obteniéndose las auxinas sintéticas, como el 2,4-D.

La aplicación de citoquininas produce una gran diversidad de respuestas en las plantas, entre las que destaca la inducción de la morfogénesis. La mayor parte de las citoquininas endógenas descritas son derivados de la purina, que presentan una cadena lateral de 5 carbonos

en posición N⁶. La kinetina fue la primera citoquinina descubierta, aunque sintética. La citoquinina natural más extendida en las plantas superiores es la zeatina.

Las giberelinas se producen, tanto en hongos como en plantas superiores, como compuestos orgánicos naturales. Su aplicación exógena produce una amplia variedad de respuestas en el desarrollo. Son el único grupo de hormonas que se pueden definir sobre la base de su estructura, más que por su actividad biológica. Se conocen más de 80 y cada año aumenta su número. Todas las giberelinas poseen un esqueleto de ent-giberelano, y las demostradas naturales se caracterizan con una "A" y un número asignado por orden de descubrimiento (MacMillan y Takahasi, 1968). La más importante es el GA₃ conocido como ácido giberélico. Las giberelinas son muy abundantes pero muchas de ellas no parecen tener actividad biológica, y se consideran intermediarios en la síntesis de otras formas activas o productos metabólicos que todavía mantienen la estructura básica sin ser activos.

Tabla I.I. Principales sustancias reguladoras del crecimiento en plantas superiores. (N: síntesis natural; S: síntesis sintética). (Continúa)

Grupo	Compuestos principales	Funciones
Auxinas	IAA (indol-3-ácido acético) (N) IBA (indol-ácido butírico) (N) PAA (ácido fenilacético) (N) NA (ácido naftalenacético) (S) 2,4-D (Ac. diclorofenoxiacético) (S) 2,4,5-T (Ac. 2,4,5-triclorofenoxiacético) (S)	Principalmente estimulan la elongación celular. También estimulan la iniciación de la raíz, diferenciación vascular, respuestas trópicas y el desarrollo de yemas auxiliares, flores y frutos.
Citoquininas	Kinetina (N ⁶ -furfurilaminopurina) (S) 2 iP (N ⁶ -2-isopentiladenina) (S) Zeatina (N) BA (N ⁶ -benciladenina) (S)	Estimulan la división celular y también la diferenciación de raíces y yemas, el desarrollo de los cloroplastos y la senescencia de las hojas.
Giberelinas	GA ₃ (ácido Giberélico) (N)	Su aplicación exógena causa hiperelongación de los tallos. También relacionadas con la germinación de las semillas.
Acido Abscísico	ABA (ácido Abscísico) (N)	Regula la germinación de la semilla, induciendo la síntesis de proteínas almacenables.
Etileno	Etileno (N)	Aparentemente no requerido para el crecimiento vegetativo normal aunque puede tener efecto en el desarrollo de las raíces y yemas.

Tabla I.I. (continuación). Principales sustancias reguladoras del crecimiento en plantas superiores. (N: síntesis natural; S: síntesis sintética).

Grupo	Compuestos principales	Funciones
Poliaminas	Put (Putrescina) (N) Spm (Espermina) (N) Spd (Espermidina) (N)	Actúan a nivel de la membrana celular y tienen la capacidad de inducir cambios en la síntesis macromolecular.
Brasinoesteroides	Brasinolida (N)	Su actividad se cuestiona en tanto sus efectos se deberían a efectos "solapados" de las hormonas clásicas: Estimulación del desenrollamiento de las hojas, diferenciación del xilema, inhibición de la elongación de la raíz.

Las poliaminas son sustancias bioactivas que se encuentran en todos los organismos, incluyendo microorganismos, animales, plantas y también en las algas (Cohen y col., 1983; Dondini y col., 1993). El término poliamina se refiere a un grupo polivalente de compuestos que contienen dos o más grupos amina ($-NH_2$). Biosintéticamente derivan de los aminoácidos arginina y ornitina. A un pH intracelular normal, las poliaminas son policationicas, por lo que se unen fácilmente con los ácidos nucleicos (ADN, ARN) que son polianiónicos, y con los fosfolípidos de la membrana plasmática. Estas asociaciones características afectan no sólo a la síntesis y/o a la actividad de estas macromoléculas (Feuerstein y col., 1988), sino también, a la permeabilidad de las membranas (Scocciati y col., 1989). Diversos estudios con plantas superiores (Smith, 1985; Evans y Malmberg, 1989; Tiburcio y col., 1993) y algas (Cohen y col., 1984; Scocciati y Bagni, 1992; Badini y col., 1994) han demostrado que las poliaminas tienen un efecto probado sobre la división celular, mientras que existe gran controversia sobre su efecto en procesos como la embriogénesis, el desarrollo de la flor, etc.

Otras sustancias químicas suministradas de forma exógena necesarias para el crecimiento, tales como las vitaminas, no se consideran reguladores de crecimiento, aunque al igual que los nutrientes y la luz, pueden afectar al crecimiento. Además, las concentraciones de reguladores no deben exceder los 10^{-5} M, ya que podrían actuar como fuente de carbono en cultivo (Bradley y Cheney, 1990).

En los estudios realizados con algas, mediante la combinación de las técnicas de cromatografía de gases y espectroscopía de masas, se han extraído y caracterizado numerosos reguladores de crecimiento sintetizados por las propias algas, ya reconocidas en plantas vasculares y otras criptógamas (revisión realizada por Bradley, 1991). De forma paralela, existen numerosos trabajos que demuestran que la aplicación exógena de algunos de estos reguladores

provoca efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las algas (Tabla I.2); no obstante, estos resultados deben ser tratados cuidadosamente, ya que también se han probado sin éxito el efecto de estas sustancias en diferentes algas (Buggeln, 1976; Robaina, 1988), o sin obtener reproducibilidad en los resultados.

Tabla 1.2. Cuadro resumen de los principales trabajos sobre el efecto de los reguladores de crecimiento en las algas. (C= Chlorohyta; P= Phaeophyta; R= Rhodophyta. Kin= Kinetina; IAA= indol-3-ácido acético; 2iP= isopentiladenina; GA₃= ácido giberélico; OH-PAA= ácido (hidroxi) fenilacético; IPA= ácido indol-3-propiónico). (Continúa)

Tipo de Regulador	Especie	Efecto	Referencia
Auxina	<i>Fucus y Ascophyllum</i> (P)	Incrementó el crecimiento de los ápices	Davison (1950)
Kin e IAA	<i>Ulva lactuca</i> (C)	Aumentó la longitud del filamento	Provasoli (1958)
Kin	<i>Ecklonia e Hyphea</i> (R)	Estimuló el crecimiento	Jennings (1969)
IAA	<i>Caulerpa prolifera</i> (C)	Estimuló el crecimiento	Dawes (1971)
Kin	<i>Dilophus fasciola</i> (C)	Estimuló el crecimiento	Augier (1974 a,b)
	<i>Stypocaulon scoparium</i> (P)	Estimuló el crecimiento	
	<i>Ceramium ciliatum</i> (R)	Retrasó la senescencia	
	<i>Porphyra leucosticta</i> (R)	Retrasó la senescencia	
Kin	<i>Ectocarpus fasciculatus</i> (P)	Los rizoides indujeron filamentos erectos	Pedersén (1973)
Kin, 2iP, IAA, GA ₃	fase conchocelis de <i>Porphyra tenera</i> (R)	Estimuló el crecimiento	Fries (1977)
OH-PAA y PAA	<i>Fucus spiralis</i> (P)	Indujo la ramificación y estimuló el crecimiento	Fries (1977)
Kin GA ₃ + Kin	<i>Sphacelaria furcigera</i> (P)	Estimuló el crecimiento y la división celular	Dworetzky y col. (1980)
Kin	<i>Sargassum heterophyllum</i> (P)	Estimuló el crecimiento y la división celular	Mooney (1983)

Tabla 1.2. (continuación) Cuadro resumen de los principales trabajos sobre el efecto de los reguladores de crecimiento en las algas. (C= Cholorphyta; P= Phaeophyta; R= Rhodophyta. Kin= Kinetina; IAA= indol-3-ácido acético; 2iP= isopentiladenina; GA₃= ácido giberélico; (OH)-PAA= ácido (hidroxi) fenilacético; IPA= ácido indol-3-propiónico).

Tipo de Regulador	Especie	Efecto	Referencia
			Evans (1984)
Giberelinas (GA ₃)	<i>Ulothrix</i> y <i>Ulva</i> (C)	Inducción de la división celular	
Citoquininas	<i>Fucus vesiculosus</i> (P)	Indujo la ramificación	Evans (1984)
IAA, PAA, OH-PAA	<i>Fucus spiralis</i> (P)	Estimuló el crecimiento y la formación de plántulas	Fries (1984)
Kin	<i>Gracilaria verrucosa</i> y <i>Furcellaria fastigiata</i> (R)	Estimuló la formación de callo	Gusev y col. (1987)
IAA, 2iP, Zeatina	<i>Ascophyllum nodosum</i> (P)	Estimuló el crecimiento	Fries (1988)
IAA, OH-PAA	<i>Enteromorpha compressa</i> (C)	Indujo la formación de tubos en el talo	Fries (1988)
Auxina + citoquinina	<i>Agardhiella subulata</i> (R)	Estimuló la división celular	Bradley y Cheney (1990)
Zeatina, 2iP	<i>Macrocystis pyrifera</i> (P)	Estimuló el crecimiento como sustancias endógenas	de Nys y col. (1991)
IAA+IPA+2iP+ glicerol	<i>Gracilaria verrucosa</i> (R)	Estimuló la división celular	Kaczyna y Megnet (1993)

La mayoría de los estudios en los que los reguladores son descritos como efectivos, carecen de una descripción microscópica detallada de la estructura inducida que resulta imprescindible para diferenciar los efectos propios de los reguladores de otros efectos externos. En este sentido por ejemplo, Dawes y Koch (1990) publicaron la formación de callos en dos especies de *Gracilaria* sin considerar el efecto de la condición física del medio (% agar); Gusev y col. (1987) atribuyeron a la temperatura el efecto morfogénico que mostraron 7 especies de agarófitas marinas, sin considerar el cambio de osmolalidad del medio de cultivo que provocaban con la adición de NaCl. El resultado final es que en todos se producen callos o estructuras del tipo de los callos (*callus-like structures*) pero no necesariamente provocados por el efecto de los reguladores en sí, sino por otros efectos externos como son por ejemplo los compuestos fenólicos (Fries, 1976,1977), o las condiciones físicas del medio de cultivo (agarizado o líquido) (Polne-Fuller y Gibor, 1987; Robaina y col. 1990 a, b; Robaina y col., 1992).

Es necesario además tener en cuenta en los estudios con algas, tanto en los de caracterización como en los de aplicación exógena, que las bacterias epífitas marinas y los hongos producen también sustancias estimuladoras del crecimiento (Fries, 1984; Maruyama y col., 1986) por lo que los ensayos realizados, partiendo de material natural o que no hayan utilizado cultivos axénicos, pueden plantear ciertas dudas.

Son cada vez más los autores que insisten en la necesidad de que todos los experimentos se lleven a cabo bajo condiciones controladas en el laboratorio con un cultivo axénico, incluyendo el uso de vidrio y medios de cultivo esterilizados, así como una descripción detallada de las condiciones experimentales (Cheney, 1986; Bradley, 1991; Evans y Trewavas, 1991).

Existen muy pocas referencias en la bibliografía acerca de las fuentes de carbono en

relación a la actividad heterotrófica de las macroalgas (Neilson y Lewin, 1974; Markager y Sand-Jensen, 1990). La adición de una fuente de carbono al medio de cultivo ha permitido el desarrollo de una metodología para la propagación por cultivo de tejidos del alga roja multicelular *Grateloupia doryphora* en la que el glicerol actúa como una fuente de carbono eficaz para el crecimiento y la morfogénesis del alga, aumentando la tasa de crecimiento hasta un 400 % superior a la normal en medios no enriquecidos con fuente de carbono (Robaina y col., 1990 a, b). Estos efectos están mediatizados por la osmolalidad del medio (concentración de glicerol, concentración de agar) y por la presencia-ausencia de luz (Robaina, 1988, Robaina y col., 1990 a, b). Robaina y col. (1990 b) describieron para explantos de talos de *G. doryphora* que el glicerol estimulaba la morfogénesis (producción de yemas). Posteriormente, García-Jiménez (1994) describió que el glicerol, además de la morfogénesis, estimulaba el crecimiento (alta tasa de división celular) en *sporelings* de 30 días de *G. doryphora*, originando las masas celulares morfogénicas.

A pesar de que las fuentes de carbono y los reguladores de crecimiento de las plantas son dos herramientas básicas para la propagación *in vitro* de las macroalgas, hasta la fecha no existen referencias de estudios que empleen la combinación de ambos. Se espera que la fuente de carbono orgánica satisfaga los requerimientos de carbono para el crecimiento y el desarrollo, y el regulador de crecimiento dirija el patrón de crecimiento y de desarrollo de las células y los tejidos.

Atendiendo a la bibliografía, el material de partida elegido para establecer cultivos celulares o probar los efectos de los reguladores de crecimiento en macroalgas es en general el explanto de individuos completamente desarrollados y casi nunca se emplean las fases más tempranas como los *sporelings*. En un estudio previo realizado con explantos axénicos de talos desarrollados (Estadio III) de *Grateloupia doryphora* (Robaina, 1988), no se obtuvieron

resultados efectivos con los reguladores de crecimiento, pero nunca se había probado con fases de desarrollo más jóvenes. Basándonos en las experiencias anteriores con estos compuestos y conociendo los efectos del glicerol como fuente de carbono externa estimuladora del crecimiento y morfogénesis en *G.doryphora*, se llevó a cabo un estudio, combinando los efectos de los reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas, giberelinas) y poliaminas, y del glicerol, utilizando para ello los *sporelings* (Estadio 0) del cultivo de *G. doryphora* como material vegetal de partida. El estudio comprendía un seguimiento completo del material sometido a los diferentes tratamientos con técnicas histológicas e histoquímicas para poder realizar una descripción precisa y una valoración mediante índices, del crecimiento celular y de la morfogénesis inducida.

I.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Material vegetal.

Se emplearon *sporelings* de *Grateloupia doryphora* obtenidos por propagación *in vitro* de explantos provenientes de una población natural siguiendo las mismas directrices ya explicadas en el capítulo introductorio. Estos *sporelings* tras 30 días de cultivo en condiciones control (medio PES sólido, 16 horas de luz:8 h de oscuridad, 19 ± 2 °C y $30 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), constituían el llamado Estadio 0 de la curva de crecimiento establecida en el cultivo para *G. doryphora*. Los experimentos se llevaron a cabo con *sporelings* del Estadio 0 de 1 mes de cultivo.

Medios de cultivo.

Además de los medios con reguladores de crecimiento (2,4-D (ácido diclorofenoxiacético, Kin (kinetina), BA (N^6 -benciladenina), GA_3 (ácido giberélico), poliaminas (Put (putrescina), Spm (espermina) y Spd (espermidina)) en concentraciones 10^{-3} M y 10^{-6} M, y glicerol (0,1 M), se prepararon medios control con/sin glicerol en ausencia de reguladores. El medio base fue el PES solidificado con 0,8 % agar. Los medios que contenían glicerol se prepararon en base al medio PES al que se añadía 0,1 M de glicerol+ 0,8 % de agar, en agua de mar diluida al 90 % con agua destilada para alcanzar 1 Osmol Kg^{-1} (PES90-glicerol, Robaina y col., 1990a, b, 1995).

Para preparar los medios que contenían los reguladores de crecimiento partimos de las siguientes soluciones stock (Tabla I.3):

Tabla I.3. Cantidades (g) y procedimiento para preparar 5 mL de las soluciones stock de los distintos reguladores de crecimiento: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); Kin (kinetina); BA (N⁶-benciladenina); GA₃ (ácido giberélico); Put (putrescina); Spm (espermina); Spd (espermidina). Todos los productos proceden de la compañía química Sigma.

Regulador	Cantidad (g)	Concentración
2,4-D	0,221	Disolver previamente en 1 mL de etanol con agitación y llevar a 5 mL con agua destilada.
Kin	0,215	"
BA	0,225	"
GA ₃	0,346	"
Put	0,161	Disolver previamente en 1mL de HCl (0,1N) con agitación y llevar a 5 mL de con agua destilada.
Spm	0,202	"
Spd	0,145	"

Los distintos reguladores de crecimiento se añadieron por separado a los medios PES y PES-90, después del paso por el autoclave, como "soluciones stock" esterilizadas mediante filtrado. Para conseguir una concentración final de regulador de 10^{-3} M, se añadían 0,5 mL de "solución stock" a 100mL de medio. Para la concentración de 10^{-6} se diluía previamente el stock (50 μ L en 5 mL de agua destilada) y de la nueva dilución se añadían 50 μ L en 100 mL de medio de cultivo.

Histología e histoquímica.

Se eligieron tres *sporelings* por cada placa y tratamiento que se fijaron sumergiéndolos, durante 4 h a temperatura ambiente, en una disolución al 2,5% de glutaraldehído (v/v) en tampón cacodilato sódico 0,1 M en 0,3 M NaCl a pH 7,4, seguido de dos lavados de 30 min cada uno, y agitación periódica de las muestras en la misma solución sin glutaraldehído. Las

muestras se almacenaron a 4 °C en tampón cacodilato 0,1 M, 0,3M NaCl.

La solución de infiltración se preparó disolviendo 0,5 g de activador en 50 mL de Basic Resin (Historesin^{MR} Embedding Kit). El material vegetal, sumergido en esta disolución, se trató durante 10 min con vacío y se mantuvo en el desecador durante toda la noche a temperatura ambiente.

El material fue incluido posteriormente en Glicol-Metacrilato (GMA, Historesin^{MR}, Gerrids y Smid, 1983). La solución de inclusión polimerizó a los 60-70 min a 60 °C.

Para su observación al microscopio óptico, se obtuvieron secciones seriadas de 5 µm cortadas con cuchilla de tungsteno, en un microtomo marca Reichter-Jung, modelo 2050. Los cortes se depositaban en un baño de agua destilada, a temperatura ambiente para su estiramiento y se recogieron en portas desengrasados manteniéndose a 60 °C durante 20 min. Una vez adheridos, los cortes se teñían directamente con hematoxilina-eosina o azul de toluidina para revelar el estado general de la célula (García-Jiménez, 1994). Para la tinción de hematoxilina-eosina los cortes se tiñeron con la solución descrita en la Tabla I.4 durante 15 min, para posteriormente lavarlos durante 10 min con agua corriente y finalmente con agua destilada.

Tabla I.4. Composición de la solución de tinción de hematoxilina-eosina para un control general del tejido (García-Jiménez, 1994).

Tinción de hematoxilina	
Hematoxilina	6,0 g
Iodato sódico	0,6 g
Sulfato de aluminio	52,8 g
Etilen glicol	250 mL
Acido Glacial Acético	60 mL
Agua destilada	690 mL

La tinción con azul de toluidina se preparó con una solución de azul de toluidina al 1%

en borax al 1%. Las secciones se tiñeron durante 1 min con esta solución y se lavaron con abundante agua destilada.

El revelado de los polisacáridos neutros y sulfatados se realizó con el reactivo de Schiff y el alcian blue (AB) pH 1,0. La composición de ambas soluciones se describe en las Tablas I.5 y I.6.

Tabla I.5. Composición del reactivo de Schiff para la tinción de polisacáridos neutros (Tomasí, 1936).

Reactivo de Schiff	
Fucsina básica	1,0 g
Metabisulfito sódico	1,0 g
Carbón activo	2,0 g
Acido clorhídrico	20 mL
Agua destilada	200 mL

Tabla I.6. Composición de la solución de tinción alcian blue (AB) para revelar la presencia de polisacáridos sulfatados (Parker y Diboll, 1966).

Tinción Alcian Blue	
Alcian Blue	1,0 g
Acido clorhídrico	100 mL

Para ello, las secciones semifinas se tiñeron con AB (pH 1,0) durante 30 min y se lavaron con agua destilada. A continuación se sumergieron en una solución acuosa de 0,5% de ácido periódico durante 20 min y transcurrida la oxidación, se volvió a lavar con agua destilada. Tras

ello se tiñeron con el reactivo de Schiff durante 20 min y se enjuagaron en una solución al 2% de bisulfito sódico, seguido de un lavado en agua destilada. Se secaron a temperatura ambiente.

Para verificar que la reacción química entre el tinte y el grupo funcional tenía lugar de forma adecuada, se tomaron secciones alternativas de la serie obtenida y se sometieron a las siguientes reacciones control: (Tabla I.7)

Grupos funcionales PAS.

1. Tinción con reactivo de Schiff sin oxidar con HIO_4 . Este control sirvió para eliminar el posible efecto de fijación con gluteraldehído (Kiernan, 1990). En ningún caso se presentó alguna reacción como consecuencia de ello.

2. Reducción con borohidruro de sodio, de los grupos aldehídos (Cole y col., 1985; Kiernan, 1990). La reacción fue reversible.

Esta solución control se preparó disolviendo 0,5 g de hidrógeno fosfato de disodio (Na_2HPO_4) en agua destilada y añadiéndose 25 mg de borohidruro de sodio (NaBH_4). Los portas se sumergieron en esta disolución durante 10 min, con agitación ocasional para liberar las burbujas de hidrógeno.

Grupos funcionales: AB pH 1,0.

Metilación, produciendo un bloqueo de los grupos carboxilos y extracción de ésteres-sulfatados (Kiernan, 1990).

La metilación se llevó a cabo en cubetas de tinción modelo Hellendhall, conteniendo metanol absoluto y 1% de HCl concentrado, se mantuvieron los portas durante 48 horas a 58-60 °C. Transcurrido este período, los portas se enjuagaron en metanol absoluto y seguidamente en una solución acuosa de alcohol al 70 %.

Tabla I.7. Tinciones histoquímicas empleadas, detallándose la especificidad, grupo funcional sobre el que actúa el tinte, y los controles utilizados.

Tinción	Especificidad	Grupo funcional	Reacción bloqueadora	Referencia
Schiff-Ac.Periódico (PAS)	polisacáridos neutros	-OH (Hidroxi) después oxidación COH aldehido	Reducción R-COH + Na ₂ BH ₄ → R-CH ₂ OH + (...)	Mc Cully (1966)
Alcian Blue (AB)	polisacáridos sulfatados	-OSO ₃ H (Ester sulfatado)	Metilación R-OSO ₃ H + CH ₃ OH → R-OH + (...)	Parker y Diboll (1966)

Índices y estadísticos.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando 45 *sporelings* por cada uno de los tratamientos, repartidos en 3 placas de petri. Los experimentos se repitieron 2 veces.

Se utilizaron dos índices cuantitativos para averiguar si el efecto de un regulador de crecimiento en particular contribuía en mayor medida con el efecto del glicerol (formación de masas celulares y emisión de yemas). Estos índices fueron **(1)** el índice de crecimiento de la masa celular (CM) entendido como el diámetro de la masa celular en mm, que se determinó empleando un pie de rey electrónico (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Co.) y **(2)** el índice morfogénico (IM), expresado como el número de protuberancias o yemas regeneradas por cada *sporeling* (Robaina y col., 1990a, b; Robaina y col., 1992). El valor medio de los índices en los distintos tratamientos se compararon con el control (PES90-glicerol) utilizando para ello el test de Student del programa informático Sigma Plot (Jandel Corporation, Chicago, U.S.A.).

I. 3. RESULTADOS.

En medios PES, las esporas liberadas y germinadas dieron lugar a *sporelings* con 1-2 protuberancias (Figura I.1A). Se observó a nivel del microscopio óptico (Figura I.1B), la presencia de un córtex y una médula compactas. Las yemas se originaban a partir de una pequeña protuberancia en una zona restringida del *sporeling* (Figura I.1C), que se elongaba para dar lugar a un eje de crecimiento con líneas de células medulares y corticales bien definidas (Figura I.1D). Los tratamientos con BA y 2,4-D a la menor concentración (10^{-6} M) y GA₃ a ambas concentraciones (10^{-3} y 10^{-6} M), tuvieron un patrón similar al de los medios control.

Se observó la formación de callos en los tratamientos de 2,4-D a 10^{-3} M, y Spm a 10^{-6} M y 10^{-3} M respectivamente. Los callos se extendían desde la superficie del *sporeling*, cubriéndolo casi en su totalidad (Figura I.2A). A nivel microscópico, se observó que el callo estaba formado por una densa y desorganizada masa celular (Figuras I.2B, I.2C). El índice CM alcanzó el máximo valor observado (0,5 mm) en la masa celular del callo formado en el tratamiento de 2,4-D a 10^{-3} M.

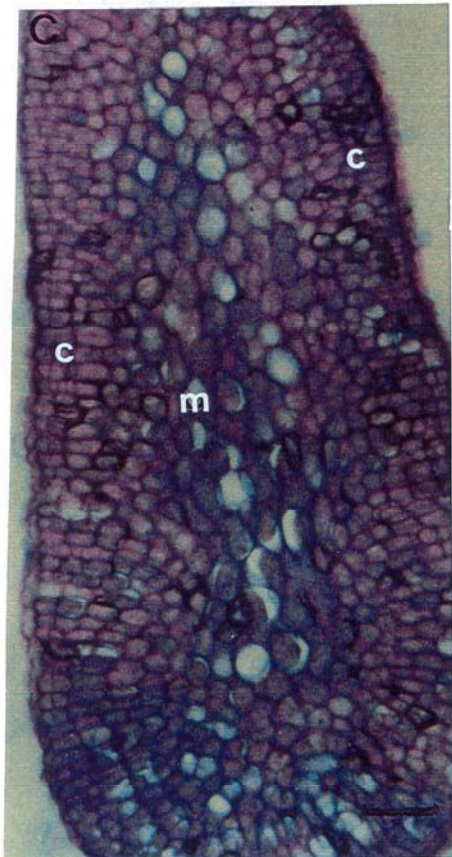
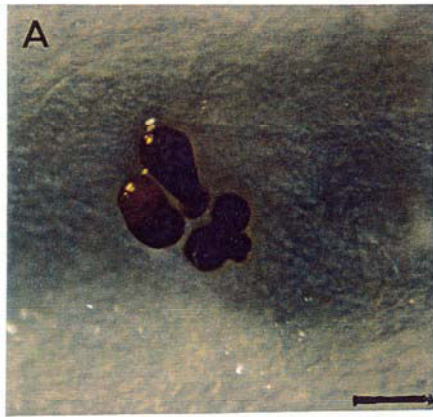
El tratamiento de BA en su mayor concentración (10^{-3} M), y la Kin en ambas concentraciones (10^{-3} M y 10^{-6} M) resultaron inhibitorios, no permitiendo el desarrollo de los *sporelings* incluso meses después de acabar el experimento.

Los *sporelings* del Estadio 0 crecieron y se transformaron en pequeñas masas morfológicas en los tratamientos con Put y Spd a las dos concentraciones probadas (Figura I.3A). El índice morfológico (IM) observado en las poliaminas varió entre 1,70 y 6,83 yemas por *sporeling* morfológico. A nivel microscópico, las masas celulares observadas en los tratamientos con Put y Spd están conformadas a partir de células que rápidamente se dispusieron de forma concéntrica y compacta en torno a las células del interior. A los 3 días se emitieron protuberancias constituidas por líneas de pequeñas células redondas alineadas y concéntricas a la masa celular (Figuras I.3B, C).

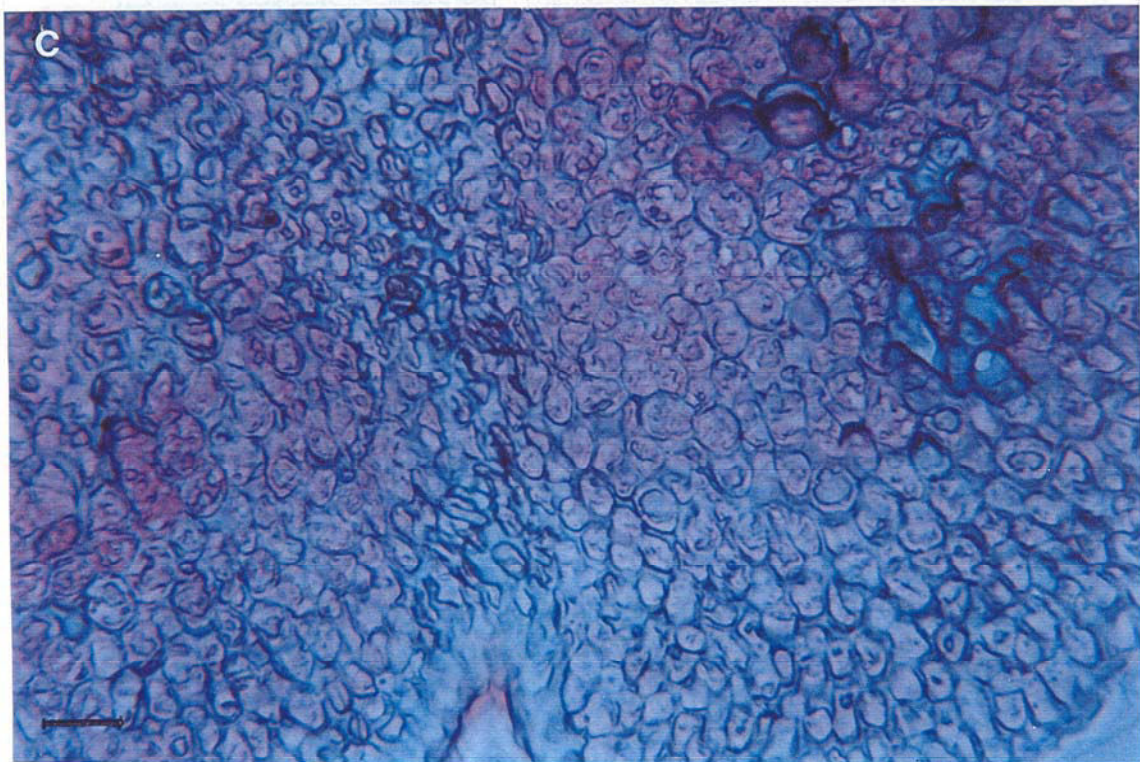
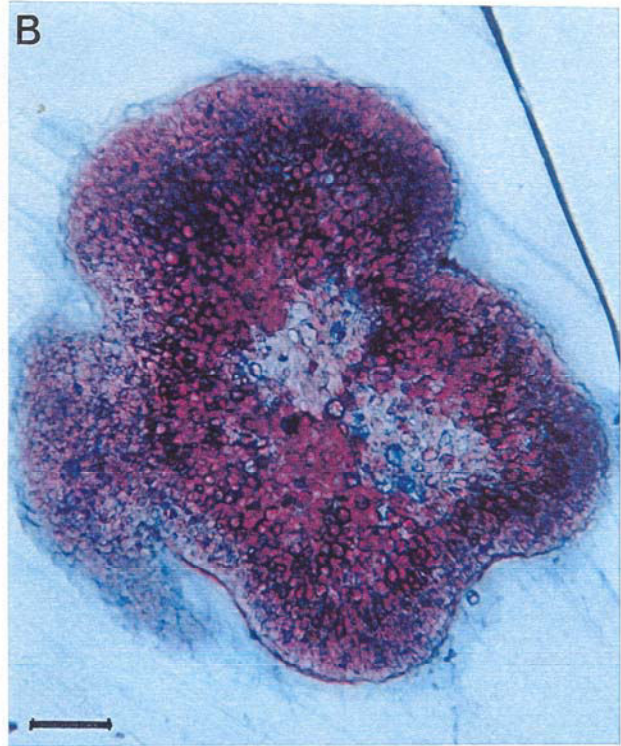
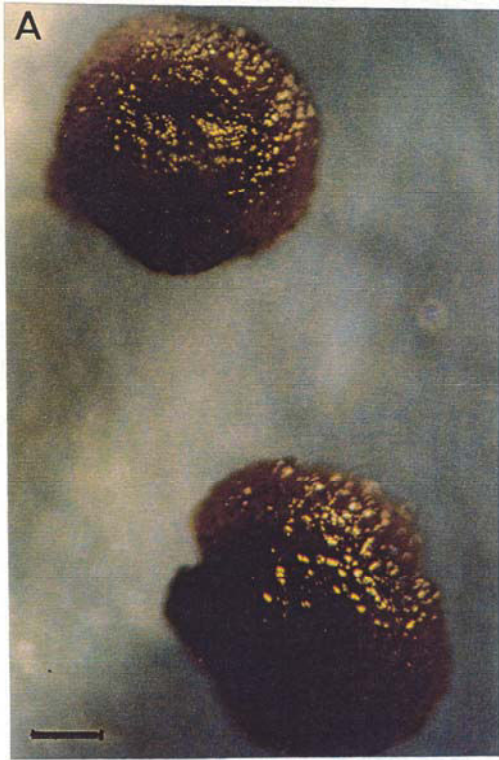
Figura I.1: *Sporelings* del Estadio 0 de *G.doryphora*. (A) *sporelings* en medio PES, mostrando entre 1-2 protuberancias (Escala= 0,6mm). (B) sección transversal (5 μm) de un *sporeling*, mostrando córtex (c) y médula (m)(Escala= 0,1 mm). (C) corte semifino longitudinal de un *sporeling* germinado en el que se observa células corticales (c) y medulares (m) diferenciadas (Escala= 0,2 mm). (D) sección longitudinal (5 μm) de una yema bien formada, mostrando córtex (c) y células medulares estrelladas y filamentosas (flechas) (Escala= 0,2 mm).

Figura I.2: (A) Callos generados por *sporelings* de *G. doryphora* cultivados en PES + 10^{-3} M 2,4-D (Escala= 0,6 mm). (B) corte transversal de un callo creciendo en las mismas condiciones de (A)(Escala= 0,2 mm). (C) Detalle de la disposición desorganizada de las células del callo. Secciones (5 μm) en PAS + AB (Escala= 0,06 mm).

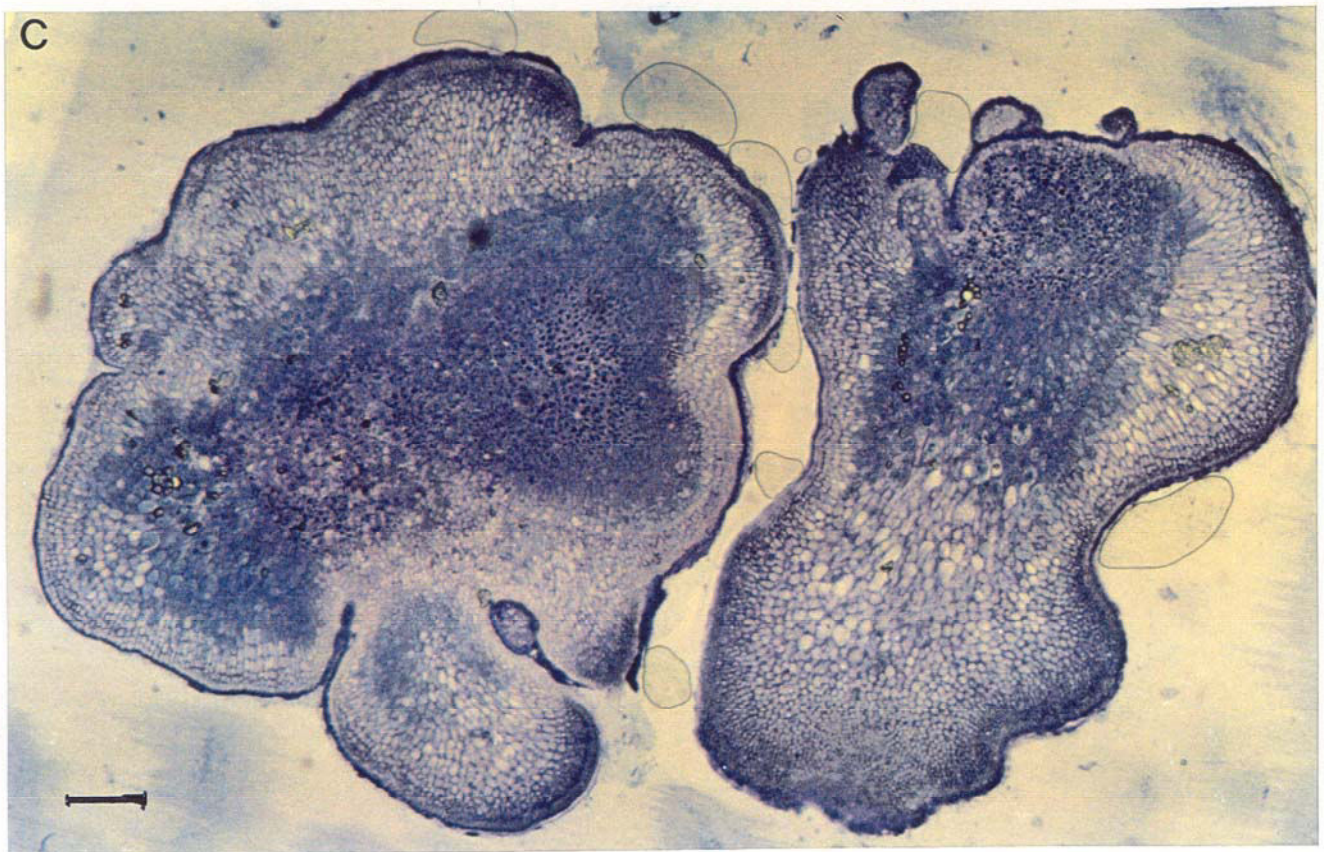
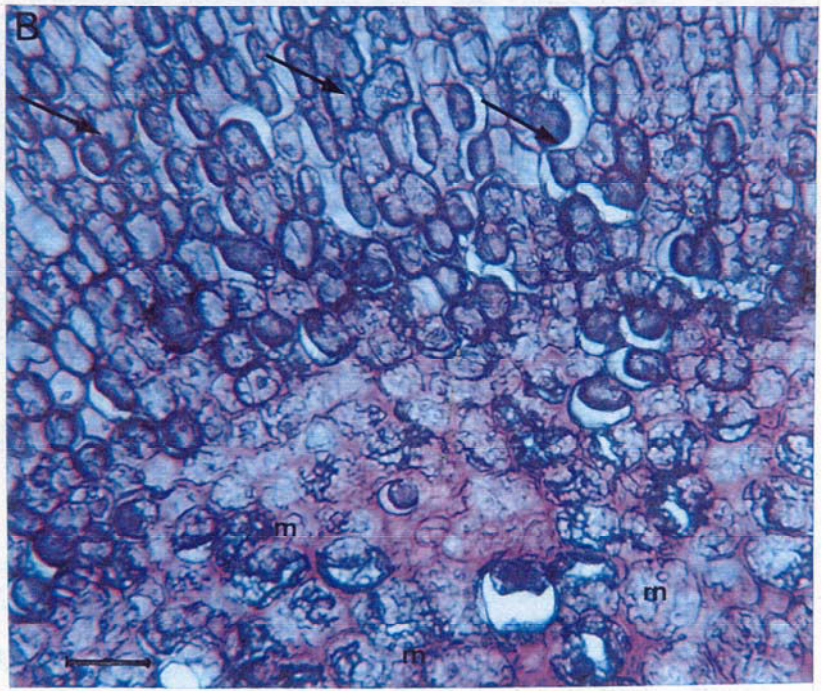
Figura I.3: (A) Masas morfogénicas generadas en PES + 10^{-3} M de putrescina (Escala= 0,5 mm). (B)Detalle de la disposición celular en un corte transversal. Nótese la disposición concéntrica y organizada de las células corticales (flechas) con respecto a la médula (m) (Escala= 0,08 mm). (C) Sección longitudinal de *sporelings* creciendo en 10^{-3} M putrescina. Secciones (5 μm) en azul de toluidina y hematoxilina respectivamente(Escala= 0,4 mm).



l.l.



1.2.



I.3.

En la Tabla I.8 se muestra la cuantificación del crecimiento celular y la morfogénesis derivada de la combinación de la fuente de carbono (glicerol) y los reguladores de crecimiento. En general, el cultivo con glicerol+reguladores de crecimiento estimularon, o aumentaron el crecimiento celular y/o la morfogénesis, tal y como se refleja en los valores de los índices de CM e IM, comparados con los valores medios del control.

El mayor valor de CM e IM entre todos los tratamientos (incluyendo las poliaminas), se observó en el tratamiento de glicerol 0,1 M+2,4-D a 10^{-3} M. En este tratamiento las masas celulares aparecían completamente cubiertas de yemas incipientes.

La adición de Kin 10^{-6} M y GA₃ en ambas concentraciones a los medios con glicerol, provocó una inhibición de la morfogénesis. La Kin y la BA a 10^{-3} M inhibieron el crecimiento y la morfogénesis.

Los tratamientos con Put, Spd y Spm en combinación con el glicerol provocaron un aumento tanto en el crecimiento celular (CM) debido al incremento de la división celular, como en la morfogénesis de las masas celulares (IM) (Tabla I.9). A excepción de la Put 10^{-6} M y el ligero aumento observado en CM para la Spd 10^{-3} M, todos los tratamientos con poliaminas aumentaron significativamente el crecimiento celular y la morfogénesis en comparación con el control en glicerol. En combinación con el glicerol, la Spm no provocó un crecimiento desorganizado como el observado cuando se probó sola.

Tabla 1.8. Efecto de los reguladores de crecimiento combinados con glicerol en los *sporelings* (Estadio 0) de *Grateloupia doryphora*. Valores de los índices de crecimiento. Datos de la media (\pm desviación estándar) de dos experimentos con tres replicados cada uno. (*) = $P < 0,001$ comparado con el control. Inhibitorio = los *sporelings* permanecieron igual que al principio del experimento. 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético, BA = N⁶-benciladenina, Kin = kinetina, GA₃ = ácido giberélico).

Tratamiento	Diámetro de las masas celulares (CM, mm)	Yemas por <i>sporeling</i> morfogénico (IM)
Glicerol 0,1 M (control)	0,72 \pm 0,08	9,83 \pm 1,25
Glicerol 0,1 M + 2,4 D 10 ⁻⁶ M	0,90 \pm 0,15 (*)	9,50 \pm 4,34
Glicerol 0,1 M + 2,4 D 10 ⁻³ M	1,36 \pm 0,31 (*)	23,50 \pm 4,68 (*)
Glicerol 0,1 M + BA 10 ⁻⁶ M	0,75 \pm 0,13	10 \pm 4,9
Glicerol 0,1 M + BA 10 ⁻³ M	Inhibitorio	Inhibitorio -
Glicerol 0,1 M + Kin 10 ⁻⁶ M	0,72 \pm 0,09	No morfogénico
Glicerol 0,1 M + Kin 10 ⁻³ M	Inhibitorio	Inhibitorio
Glicerol 0,1 M + GA ₃ 10 ⁻⁶ M	0,74 \pm 0,07	No morfogénico
Glicerol 0,1 M + GA ₃ 10 ⁻³ M	0,64 \pm 0,05	No morfogénico

Tabla 1.9. Efecto de las poliaminas combinadas con glicerol en los *sporelings* (Estadio 0) de *Grateloupia doryphora*. Datos de la media (\pm desviación estándar) de dos experimentos con tres replicados cada uno. (*) = $P < 0,001$ comparado con el control. (Put = putrescina, Spd = espermidina, Spm = espermina). (— = masa celular en la que resultó difícil la cuantificación de las yemas).

Tratamientos	Diámetro de las masas celulares (CM, mm)	Yemas por <i>sporeling</i> morfológico (IM)
Glicerol 0,1 M (control)	0,72 \pm 0,08	9,83 \pm 1,25
Glicerol 0,1 M + Put 10^{-6} M	0,63 \pm 0,10	—
Glicerol 0,1 M + Put 10^{-3} M	0,91 \pm 0,15 (*)	14,7 \pm 4,65 (*)
Glicerol 0,1 M + Spd 10^{-6} M	1,05 \pm 0,32 (*)	16 \pm 3,51 (*)
Glicerol 0,1 M + Spd 10^{-3} M	0,83 \pm 0,13	12 \pm 1,86 (*)
Glicerol 0,1 M + Spm 10^{-6} M	1,21 \pm 0,17 (*)	18 \pm 4,14 (*)
Glicerol 0,1 M + Spm 10^{-3} M	1,18 \pm 0,21 (*)	18,5 \pm 2,20 (*)

I. 4. DISCUSIÓN.

Existen evidencias sobre la existencia y participación de los reguladores de crecimiento en los procesos algales, que son análogos a los que ocurren en las plantas superiores (Featonby-Smith y Van Staden, 1984; Bradley, 1991; Bradley y Cheney, 1990; Evans y Trewavas, 1991; de Nys y col., 1991). No obstante, aplicados de forma exógena, no parecen estar muy claros los efectos que causan estos reguladores naturales y sintéticos. La bibliografía reciente muestra la efectividad de los reguladores de crecimiento en macroalgas cultivadas *in vitro*, induciendo y manteniendo los callos, el cultivo de células libres o regenerando nuevos talos (Bradley y Cheney, 1990; Kaczyna y Megnet, 1993; Aguirre-Lipperheide y col., 1995; Yokoya y Handro, 1996). Estos mismos resultados (inducción de callos, o formas parecidas a callos (*callus-like*) y/o regeneración) se obtuvieron, sin embargo, sin la adición de reguladores de crecimiento (Dawes y Koch, 1990; Robaina y col., 1992; Aguirre-Lipperheide y col., 1995).

Las diferencias en la procedencia del explanto pueden originar resultados distintos para una misma especie y un mismo tratamiento (Bradley y Cheney, 1990). Además, la alteración del estado físico del medio, como por ejemplo una exposición de los explantos al aire (Kaczyna y Megnet, 1993), o no controlar la osmolalidad del medio (Gusev y col., 1987), puede originar los mismos patrones de crecimiento y hacernos considerar que los efectos han sido provocados sólo por la adición de los reguladores. Por tanto, ante la confusión presente en la bibliografía y la escasa reproducibilidad de muchos de los resultados, no se puede asegurar *a priori* si una especie en particular responde a los reguladores de crecimiento, o si estos reguladores son indispensables para provocar tal respuesta; en este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo pueden aportar un poco más de luz.

En los ensayos planteados en este trabajo, se cumplieron los requisitos necesarios sobre el control de las condiciones axénicas de cultivo, para probar el papel funcional de los

reguladores de crecimiento y poliaminas en el desarrollo de las algas (Buggeln, 1976; Evans y Trewavas, 1991): El efecto de la sustancia probada no ocurre en ausencia de dicha sustancia, como demuestran los controles. Descartamos la idea que los reguladores de crecimiento en las concentraciones de 10^{-3} M y 10^{-6} M estén actuando como fuente de carbono externa, a pesar de que la mayor concentración rebasa los 10^{-5} M, si se tiene en cuenta que las fuentes de carbono como el glicerol, no actúan por debajo de una concentración de 10^{-1} M (Robaina, 1988; Robaina y col., a, b). La mayoría de los estudios que se realizan sobre la efectividad de los reguladores de crecimiento en algas, utilizan como material de ensayo explantos provenientes de talos adultos (Gusev y col., 1987; Bradley y Cheney, 1990; Dawes y Koch, 1990; Kaczyna y Megnet, 1993). En un estudio previo realizado con *sporelings* del Estadio I y explantos de talos desarrollados (Estadio III) de *Grateloupia doryphora* (Robaina, 1988), los reguladores no resultaron efectivos. Considerando estos preliminares, destaca el hecho de que todos los tratamientos con reguladores, poliaminas y glicerol provocaran distintos efectos, pero reproducibles, sobre el crecimiento y desarrollo de los *sporelings* del Estadio 0.

En las plantas, células y tejidos en los que tiene lugar la organogénesis, se ha descrito la existencia de tres estados experimentalmente distinguibles: el estado de competencia morfogénica, el de determinación del desarrollo y el estado de diferenciación morfogénica (Christianson y Warnick, 1983). Por definición, el estado de competencia presenta la habilidad para reconocer la señal morfogénica que conduce a una vía particular de desarrollo (Hicks, 1994). Lakshmanan y col. (1997) estudiaron los diferentes estados de desarrollo asociándolos con la regeneración de las yemas en tejidos de hoja de mangosto (*Garcinia mangonstanta* L.), y con el papel de los reguladores de crecimiento en varios estados de desarrollo. Observaron que la edad de la hoja tenía una gran influencia en la expresión de la competencia morfogénica. Las hojas adquirirían dicha competencia en una edad temprana y alcanzaban su máximo a los 10-12 días. En otro trabajo con alfalfa (Finstad y col., 1993) observaron que los explantos tan sólo

adquirían la competencia morfogénica en presencia de varias auxinas. En la misma idea pero antes del uso del término estado de competencia, Trewavas (1982) con plantas superiores y posteriormente Mooney y Van Staden (1986) con algas, ya señalaron en sus respectivos estudios que el efecto de los distintos reguladores además de depender del lugar de acción y de su concentración, dependía también de la “sensibilidad” que presentara el tejido algal, muy probablemente sinónimo de estado de competencia. Haciendo extensibles estos estados de desarrollo y su nomenclatura a las algas y teniendo en cuenta el hecho de que ni el talo, ni incluso en el Estadio I respondieron a los distintos reguladores de crecimiento, cabe pensar que en el caso de *G. doryphora* en cultivo, el Estadio 0 represente el estado competente o sensible.

El tratamiento de 2,4-D a 10^{-3} M provocó en el Estadio 0 de *G. doryphora* la formación de callo (Figura I.2). Esta potente auxina sintética es capaz de inducir la división y crecimiento celular incluso en los tejidos y especies más recalcitrantes (Evans y col., 1983); el 2,4-D fue capaz de inducir el crecimiento de los filamentos en *Ascophyllum* (Fries, 1991) y el crecimiento de estructuras similares al callo en *Grateloupia dichotoma* (Yokoya y Handro, 1996).

Kackzyna y Megnet (1993) publicaron que para inducir el crecimiento y la formación de callo en *Gracilaria verrucosa* era necesaria la combinación de los reguladores de crecimiento con glicerol. Entre los reguladores que emplearon incluían las auxinas naturales IAA (ácido indol-3-acético) e IPA (ácido indol-3-propiónico), aunque el 2,4-D también probado, no provocara efecto alguno. Sin embargo, cuando los *sporelings* de *G. doryphora* se cultivan en glicerol+2,4-D 10^{-3} M (Tabla I.8), se estimulaba considerablemente el crecimiento organizado y la morfogénesis, siendo precisamente la auxina 2,4-D el regulador de crecimiento más efectivo entre todos los probados.

Los resultados de la Tabla I.8 indican que los reguladores de crecimiento también influyeron sobre los efectos del glicerol en el crecimiento y la morfogénesis de los *sporelings*.

Sabemos que cuando se cultivan los *sporelings* del Estadio 0 de *G. doryphora* en un medio que contiene glicerol, este primeramente estimula la división celular, generando masa celular, y después se generan las yemas (García-Jiménez, 1994; García-Jiménez y col., 1996). Además del efecto sinérgico del 2,4-D y el glicerol ya discutido, los tratamientos de Kin a 10^{-6} M y el GA en sus dos concentraciones probadas inhibieron el efecto morfogénico del glicerol. La BA y la Kin en su mayor concentración de 10^{-3} M inhibieron la división celular y la morfogénesis. Al combinar ambos (reguladores + glicerol), el glicerol también afectó a las respuestas de los reguladores en comparación con su actividad aislada. De esta forma, no se observaron callos cuando se combinó el 2,4-D con el glicerol, sino que los *sporelings* del Estadio 0 se transformaron en masas celulares organizadas.

Las causas de la interacción de los reguladores de crecimiento (incluidas las poliaminas, discutidas posteriormente) y el glicerol necesitan más investigación. No obstante, desde el descubrimiento de sustancias como la oligosacarina, cada vez está más claro que la función de la fuente de carbono no es solamente la de proporcionar energía y esqueletos carbonados. Precisamente éste constituye uno de los campos punteros de la fisiología vegetal actual. La glucosilación representa uno de los mecanismos de control de la actividad de los reguladores de crecimiento (p.e. glucosilado permanece activo, no glucosilado se torna inactivo) por los que es fácilmente deducible el efecto que pudieran tener en los niveles endógenos de carbono sobre la cantidad endógena de reguladores y su actividad. Además en un reciente artículo, Coenen y Lomax (1997) sugieren la glucosilación de citoquininas y su control por auxinas, como mecanismo interactivo entre ambos grupos de reguladores.

Los cambios observados en las algas ante el suministro de sustratos orgánicos (cambios en las tasas fotosintéticas y respiratorias, acumulación de clorofila y almidón, etc.; Dubinsky y col., 1986; Falkowski y col., 1985; Antia, 1980; Robaina y col., 1995) revelan que el carbono

orgánico altera las características metabólicas básicas y las reconduce hacia diferentes productos finales. Concretamente, los *sporelings* de *G. doryphora* cultivados en glicerol acumulan almidón, y otros compuestos fenólicos no identificados en grandes vesículas electrodensas (García-Jiménez y col., 1996). Puede sospecharse que estas diferencias metabólicas observadas cuando crecen con o sin glicerol afectan a los niveles endógenos de reguladores; por ello una misma concentración de reguladores suministrada de forma exógena produciría distintos efectos si se tienen distintos niveles endógenos, lo que explicaría la diferencia de resultados entre reguladores solos y combinados con glicerol. Mooney y Van Staden (1986) argumentaron que la kinetina suministrada de forma exógena inhibía el crecimiento en las algas debido a las concentraciones supraóptimas que se alcanzaban, dado los niveles endógenos.

Existen muy pocas referencias en la bibliografía del efecto de las poliaminas en las algas. Se ha descrito la asimilación y transporte de poliaminas en talos de *Ulva rigida* (Badini y col., 1994). El alga unicelular *Porphyridium* también parece adsorber poliaminas mediante los polisacáridos de la pared celular (Scoccianti y col., 1989; Scoccianti y Bagni, 1992). Cohen y col. (1984) encontraron evidencias de que las poliaminas promovían la división celular en *Chlorella*. La presencia en el medio de cultivo de Put y Spd respectivamente provocaron en los *sporelings* de *G. doryphora* la formación de masas celulares (Figura I.3A-C) similares a las ya observadas para el glicerol (García-Jiménez y col., 1996). El mayor efecto se obtuvo con la Spm, que indujo la formación de callo similar al inducido por la auxina 2,4-D.

De la misma forma que los reguladores de crecimiento, la adición de poliaminas al medio con glicerol también influyó en los efectos del glicerol. La combinación de ambos aumenta significativamente el crecimiento y la morfogénesis de los *sporelings* (Tabla I.9). La poliamina más potente fue la Spm, con la que se obtuvo el mayor aumento de los índices de CM e IM. De hecho, los resultados obtenidos con la potente auxina 2,4-D y la poliamina Spm son similares, si

se considera que ambas sustancias por sí solas inducen callo y estimulan el crecimiento y la morfogénesis cuando se combinan con el glicerol.

Varios autores (Seraffini-Fracassini, 1991; Kotzabasis, 1996) han descrito los efectos de las poliaminas relacionándolos con su contribución al carbono y al nitrógeno celular. Aunque no se puede descartar esta posibilidad en los resultados obtenidos, debemos considerar que por ejemplo el glicerol por sí solo no resulta efectivo estimulando el crecimiento de *G. doryphora* en una concentración menor a 10^{-1} M (Robaina, 1988; Robaina y col., 1990 a, b), por lo que es dudosa la contribución en carbono y nitrógeno cuando se usa 10^{-3} M regulador o poliamina y 10^{-1} M glicerol para producir los resultados de las Tablas I.8 y I.9; parece en este caso, que las poliaminas estén actuando como sustancias estimuladoras del crecimiento en los *sporelings* de *G. doryphora*, de forma similar a los reguladores de crecimiento.

Las poliaminas son productos metabólicos producidos por la descarboxilación de los aminoácidos ornitina (vía ornitina descarboxilasa, odc) y/o arginina (vía arginina descarboxilasa, adc) que dan lugar a la putrescina. Las células utilizan esta putrescina para sintetizar Spd, que a su vez es una precursora de la Spm (Smith, 1985; Flores, 1990). Cohen y col. (1984) describieron la presencia de poliaminas en el alga *Chorella* sintetizadas vía odc, en las que al aumentar su actividad, daba lugar a la acumulación de putrescina y Spd, induciendo la división celular durante el ciclo de la célula. Parece que es la concentración y el balance respectivo de las poliaminas (normalmente en tejidos de planta la mayor concentración corresponde a la Put y la menor a la Spm) lo que provoca una gama de respuestas en las células que afectan al crecimiento de una manera similar a las fitohormonas, cuyos efectos son bien conocidos (Galston y Kaur-Sawhney, 1982; Smith, 1982, 1985; Tiburcio y col., 1993). Los resultados obtenidos con *sporelings* de *G. doryphora* sugieren que los mayores efectos se obtienen cuando se favorece la acumulación de Spm (Tabla I.9), bien por la adición directa de esta poliamina, o bien por la adición de Put y Spd en una respuesta dependiente de la concentración (cuanto más Put y Spd,

más Spm se sintetiza), asumiendo que en los *sporelings* operan las mismas vías metabólicas que en *Chlorella*.

Los efectos provocados en *G. doryphora* por los distintos reguladores combinados o no con el glicerol, pueden resultar muy interesantes en su aplicación a la micropropagación. En la propagación posterior en medio PES de los callos inducidos por el 2,4-D y de las masas celulares obtenidas en su combinación con el glicerol (2,4-D+glicerol) por ejemplo, se obtuvieron yemas y talos aparentemente normales; en 4 meses de cultivo, 26 callos de 20 mg de peso fresco aproximadamente produjeron 200 mg de talos. Estos resultados sugieren además, que en el futuro puede explotarse la habilidad del 2,4-D para inducir el crecimiento desorganizado en *sporelings*, combinándolo con los efectos del glicerol sobre el crecimiento, y dependiendo del objetivo, inhibir la morfogénesis con la adición de cierta cantidad de kinetina.

Estas posibilidades resultan muy interesantes si se considera la escasez de herramientas apropiadas existentes para el control del crecimiento y desarrollo de las algas *in vitro* (Aguirre-Lipperhide y col., 1995).

En conclusión:

- 1) Queda demostrado el efecto tanto de los reguladores de crecimiento como de las poliaminas en el Estadio 0 de *Grateloupia doryphora* cultivado en condiciones axénicas.
- 2) Se establece el Estadio 0 como estado competente o sensible a los efectos de los distintos reguladores y poliaminas probadas.
- 3) El glicerol interactúa con los reguladores de crecimiento, alterando el efecto de estos: reorganiza el crecimiento al combinarse con el 2,4-D (10^{-3} M) y anula los efectos inhibitorios de la Kin (10^{-6} M).
- 4) La combinación del glicerol y las poliaminas aumenta significativamente el crecimiento y la morfogénesis de los *sporelings*.

I. 5. BIBLIOGRAFÍA.

Aguirre-Lipperheide M, Estrada-Rodriguez FJ, Evans LV (1995) Facts, problems and needs in seaweed tissue culture: an appraisal. *J Phycol* 31: 677-688

Antia NJ (1980) Nutritional physiology of marine cryptomonads and chrysoomonads. En Levandowsky M, Hunter SH (eds.), *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Academic Press, New-York: 67-115

Augier H (1974 a) Les phytohormones des algues. I Etude biochimique. *Ann Sci nat, Bot* 15: 1-64

Augier H (1974 b) Les phytohormones des algues. II Etude physiologique. *Ann Sci nat, Bot* 15: 119-180

Azcón-Bieto J, Talón M (1993) *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Mac Graw-Hill. Interamericana de España

Badini L, Pistocchi R, Bagni N (1994) Polyamine transport in the seaweed *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J Phycol* 30: 599-605

Bradley PM (1991) Plant hormones do have a role in controlling growth and development of algae. *J Phycol* 27: 317-321

Bradley PM, Cheney DP (1990) Some effects of plant growth regulators on tissue cultures of the marine red alga *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 353-360

Buggeln RG (1976) Auxin, an endogenous regulator of growth in algae? *J Phycol* 12: 355-358

Cheney DP (1986) Genetic engineering in seaweeds: Applications and current status. *Nova Hedwigia* 83: 22-29

Christianson ML, Warnick DA (1983) Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev Biol* 95: 288-293

Coenen C, Lomax TL (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in plant science*, vol 2 (9):351-356

Cole KM, Park CM, Reid PE, Sheath RG (1985) Comparative studies on the cell wall of sexual and asexual *Bangia atropurpurea*. I. Histochemistry of polysaccharides. *J Phycol* 21: 585-592

Cohen E, (Malis) Arad S, Heimer YM, Mizrahi Y (1983) Polyamine biosynthetic enzymes in *Chlorella*: characterization of ornithine and arginine decarboxylase. *Plant Cell Physiol* 24: 1003-1010

Cohen E, (Malis) Arad S, Heimer YM, Mizrahi Y (1984) Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of *Chlorella*. *Plant Physiol* 74: 385-388

- Davison FF (1950) The effect of auxins on the growth of marine algae. *Am J Bot* 37: 501-510
- Davies PJ (1987) *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Martinus Nijhoff Publs., Dordrecht
- Dawes CJ (1971) Indole-3-acetic acid in the green alga coenocyte *Caulerpa prolifera* (Chlorophyceae, Siphonales). *Phycologia* 10: 375-379
- Dawes CJ, Koch EM (1990) Physiological responses of the red algae *Gracilaria verrucosa* and *G. tikvahiae* before and after nutrient enrichment. *Bull Marine Science* 46(2): 335-344
- Dondini L, Serafini Facassini D, Del Duca S, Bregoli AM (1993) Polyamines in salt-stressed halotolerant *Dunaliella salina*: free, TCA-soluble, -insoluble and transglutaminase-conjugated forms. En Calderera CM, Clo' C, Moruzzi Ms (eds.) *Polyamines: Biology and Clinical Aspects*. CLUEB, Bologna
- Dubinsky Z, Falkowsky PG, Wyman K (1986) Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol* 27: 1335-1349
- Dworetzky B, Klein RM, Cook PN (1980) Effect of growth substances on "apical dominance" in *Sphacelaria furcigera* (Phaeophyta). *J Phycol* 16: 239-242
- Evans ML (1984) Functions of hormones at the cellular level of organisation, En Scott TK (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series, vol 10. Springer-Verlag, Berlin

Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (1983) Handbook of Plant Cell Cultures. McMillan Publications, New-York

Evans PT, Malmberg R (1989) Do polyamines have roles in plant development? Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 40: 235-269

Evans LV, Trewavas AJ (1991) Is algal development controlled by plant growth substances? J Phycol. 27:322-326

Falkowsky PG, Dubinsky Z, Wymman K (1985) Growth irradiance relationship in marine phytoplankton. Limnol Oceanogr 30: 310-313

Featonby-Smith BC, Van Staden J (1984) Identification and seasonal variation of endogenous cytokinins in *Ecklonia maxima*. Bot Mar. 27: 527-531

Feuerstein BG, Basu HS, Marton LJ (1988) Theoretical and experimental characterization of polyamine/DNA interactions. En Zappia V, Pegg A (eds.) Progress in Polyamine Research. Plenum Press, New-York: 517-523

Finstad R, Brown DCW, Joy K (1993) Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. Plant Cell Tiss Org Cult 34: 125-132

Flores HE (1990) Polyamines and plant stress. En Alscher RG, Cumming JR (eds.) Stress Response in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism. Wiley-Lis, New-York: 217-239

Fries L (1976) p-Hydroxyphenylacetic acid and other phenolic compounds as growth stimulators of the red alga *Porphyra tenera*. Plant science letters 6: 299-307

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 (1984) Induction of plantlets in axenically cultivated rhizoids of *Fucus spiralis*. Can J Bot 62: 1616-1620

Fries L (1988) *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta) in axenic culture and its genome to endophytic fungus *Mycosphaerella ascophylli* and epiphytic bacteria. J Phycol 24: 333-337

Fries L (1991) Formation of filaments and single cells by the activity of meristoderm of axenic *Ascophyllum nodosum* (Fucaceae, Phaeophyta) Phycologia 30: 310-313

Galston AW, Kaur-Sawhney R (1982) Polyamines: are they a new class of plant growth regulators? En Wareing PF (ed.), Plant Growth Regulators. Academic Press, New-York: 451-461.

García-Jiménez P (1994) Aclimatación reproductiva, fisiológica y estructural al cultivo in vitro del alga *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe (Rhodophyta). Tesis doctoral. U.L.P.G.C.

García-Jiménez P, Robaina RR, Luque A, Tsekos I (1996) Glycerol activated cellular division and biosynthetic activity during growth and morphogenesis of carpospore seedlings of *Grateloupia doryphora* (Cryptonemiales, Rhodophyta). Phycologia 35(3): 261-269

Gerrids PO, Smid L (1983) A new less toxic polymerization system for embedding of soft tissue in glycol metacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J Microscopy* 132: 81-85

Gusev MV, Tambiev AH, Kirikova NN, Shelyastina NN, Aslanyan RR (1987) Callus formation in seven species of agarophyte marine algae. *Mar Biol* 95: 593-597

Hicks GS (1994) Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. *In Vitro Cell Dev Biol* 30P: 10-15

Hopkins WG (1995) *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.

Jennings RC (1969) Cytokinins as endogenous growth regulators in the alga *Ecklonia* and *Hypnea*. *Austr J Biol Sci* 22: 621-627

Kaczyna F, Megnet R (1993) The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 268: 57-64

Kiernan JA (1990) *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 2nd edition. Pergamon Press, U.K.

Kotzabasis K (1996) A role for chloroplast-associated polyamines? *Bot Acta*: 109-157

Lakshmanan P, Ng SK, Loh CS, Goh CJ (1997) Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured in vitro. *Plant Cell Physiol* 38(1): 59-64

- Mc Cully ME (1966) Histological studies on the genus *Fucus*. I. Light microscopy of mature vegetative plant. *Protoplasma* 62: 287-305
- MacMillan J, Takahasi N (1968) Proposed procedure for the allocation of trivial names to the gibberellins. *Nature* 217: 170-171
- Markager S, Sand-Jensen K (1990) Heterotrophic growth of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). *J Phycol* 26: 670-673
- Maruyama A, Maeda M, Simidu U (1986) Occurrence of plant hormone (cytokinin)-producing bacteria in the sea. *J Appl Bacteriol* 61: 369-574
- Mooney PA (1983) Cytokinins in *Sargassum heterophyllum* under natural and *in vitro* conditions. M Sc Thesis. University of Natal, South Africa
- Mooney PA, Van Staden J (1986) Algae and cytokinins. *J Plant Physiol* 123:1-21
- Neilson AH, Lewin RA (1974) The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia* 13(3): 227-264
- de Nys R, Jameson PE, Brown MT (1991) The influence of cytokinins on the growth of *Macrocystis pyrifera*. *Bot Mar* 34: 465-467
- Parker BC, Diboll AG (1966) Alcian stains for histochemical localization of acid and sulphated polysaccharides in algae. *Phycologia* 6: 37-46

Pedersén M (1973) Identification of a cytokinin, 6-(methyl-2-butenylamino) purine, in seawater and the effect of cytokinins on brown algae. *Physiol Plant* 28: 101-105

Polne-Fuller M, Gibor A (1987) Calluses and callus like growth in seaweeds: induction and culture. *Hydrobiologia* 151/152: 131-138

Provasoli L (1958) Effect of plant hormones on *Ulva*. *Biol Bull* 114: 375-384

Robaina RR (1988) Biotecnología del cultivo in vitro de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis doctoral. U.P.C.

Robaina RR, García-Reina G, Luque A (1990a) The effect of the physical characteristics of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue cultures. *Hydrobiologia* 204/205: 137-142

Robaina RR, García P, García-Reina G, Luque A (1990b) Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. *J Appl Phycol* 2: 137-143

Robaina RR, García-Jiménez P, Luque A (1992) The growth pattern and structure of callus from the red alga *Laurencia* sp. (Rhodophyta, Ceremiales) compared to shoot regeneration. *Bot Mar* 35: 267-272

Robaina RR, García-Jiménez P, Brito I, Luque A (1995) Light control of the respiration of exogenous glycerol by the red macroalga *Grateloupia doryphora*. *Eur J Phycol* 30: 81-86

Scoccianti V, Bagni N, Dubinsky O, Arad S (1989) Interaction between polyamines and cells of the marine unicellular red alga *Porphyridium* sp. *Plant Physiol Biochem* 27(6): 899-904

Scoccianti V, Bagni N (1992) *In vitro* interactions between polyamines and isolated *Porphyridium* sp. polysaccharide. *Plant Physiol Biochem* 30(2): 135-138

Serafini Fracassini D (1991) Polyamines biosynthesis and conjugation to macromolecules during the cell cycle of *Helianthum tuberosum* Tuber. En Galston AW, Tiburcio A (eds.) *Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development*. Fundación Juan March, Madrid, vol 11(57): 40-45

Smith TA (1982) The function and metabolism of polyamines in higher plants. En Wareing PF (ed.) *Plant Growth Regulators*. Academic Press, New-York: 463-472

Smith TA (1985) Polyamines. *Ann Rev Plant Physiol* 36: 117-143

Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X, Besford RT (1993) Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant growth regulation* 12: 331-340

Tomasi JA (1936) *Stain Technology* 11: 137

Trewavas AJ (1982) Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiol Plant* 55: 60-72

Yokoya NS, Handro W (1996) Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327: 393-40

Capítulo II: Diferencias fotosintéticas y tolerancia al estrés salino y de temperatura entre los Estadios I y III.

II.1. INTRODUCCIÓN.

El medio físico-químico de un organismo está compuesto por todos los factores abióticos que influyen en dicho organismo, es extremadamente complejo, y se encuentra en permanente variación. Las diversas condiciones desfavorables, no necesariamente letales, que tienen lugar de forma permanente o esporádica en el medio, someten al organismo a situaciones estresantes.

Lobban y Harrison (1994) definieron un factor estresante fisiológicamente, como un nivel subóptimo o supraóptimo de cualquier variable ambiental. Tanto en esta como en la mayoría de las definiciones, el estrés se considera una desviación significativa de las condiciones óptimas de vida que provocan respuestas y cambios a todos los niveles funcionales del organismo. Para amortiguar o evitar que estos factores externos puedan alterar todo el equilibrio químico y termodinámico del interior de la célula, los organismos poseen varios mecanismos protectivos, por lo que no todos los factores (o su intensidad) logran provocar un estado de estrés. Esta habilidad que muestra la célula para resistir el estrés representa lo que se denomina tolerancia (Larcher, 1995).

Las algas que viven dentro de la zona del intermareal se encuentran expuestas a condiciones particularmente variables durante el ciclo de marea. La habilidad de competir y crecer en esta zona dependerá de las respuestas fisiológicas específicas de cada alga a estos factores abióticos (Parker, 1982), desarrollando mecanismos que les confieran cierta tolerancia al estrés, o les permitan recuperarse de los efectos de este.

En los trabajos de ecofisiología consultados sobre algas, es muy común la comparación de diferentes especies de algas del intermareal, o diferentes estadios reproductivos de una misma especie, en función de su respuesta a los factores estresantes clave. Estos factores son: la

irradiancia, la temperatura, la salinidad y la desecación (que combina todos los factores).

El aparato fotosintético de las algas es capaz de absorber y utilizar eficientemente la luz visible, sin embargo, una irradiancia extremadamente alta supone más energía fotoquímica de la que puede utilizar el alga para la fotosíntesis, dañando los pigmentos fotosintéticos y la estructura de los tilacoides. Para contrarrestar estos efectos, las algas desarrollan mecanismos para tolerar o protegerse de estos altos niveles de irradiancia como la fotoprotección (Hanelt y col., 1992), mediante la síntesis de pigmentos fotoprotectores que disipen parte de la energía (Gantt, 1990).

La temperatura, es otro parámetro abiótico importante que afecta a las tasas de las distintas reacciones químicas englobadas en las rutas metabólicas, limitando el crecimiento y la distribución de las algas (Lüning, 1990). En general, las algas toleran un rango de temperatura que va desde $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta aproximadamente los $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lobban y Harrison, 1994). Este rango de temperatura viene determinado por su adaptación genética y por su capacidad de aclimatación a los cambios en la temperatura.

En general, la adaptación se entiende como un proceso evolutivo, con cambios en el genoma, que permite expandir el rango geográfico de las especies (Pakker y col., 1995). La aclimatación, sin embargo, implica cambios fenotípicos que afectan a los procesos fisiológicos, permitiendo que las algas optimicen la fotosíntesis y el crecimiento en respuesta a los cambios estacionales (Falkowski y LaRoche, 1991). Tanto la adaptación como la aclimatación de procesos como la fotosíntesis parecen jugar un papel fundamental en las respuestas a la temperatura en macroalgas marinas (Kübler y col., 1991).

La bibliografía revisada sobre el tema se centra básicamente en la respuesta metabólica del alga frente a los cambios estacionales en la temperatura del agua (Davison, 1987; Davison y

col., 1991; Kübler y Davison, 1993), conociéndose mucho menos sobre las respuestas a cambios térmicos repentinos que tienen lugar, por ejemplo, en los charcos del intermareal durante la bajamar en la estación cálida.

La salinidad es un parámetro más local que global, muy variable en las regiones costeras, especialmente en la franja intermareal, estuarios y zonas rocosas. De la misma manera que con la temperatura, existe también una salinidad óptima para los procesos de fotosíntesis, respiración y crecimiento. Las algas intermareales generalmente toleran mejor que el resto, salinidades del agua de mar entre el 10 y el 100 % (Kain y Norton, 1990).

La salinidad es un factor complejo, cuyos principales componentes son el potencial osmótico del agua y la composición iónica. Los cambios en la salinidad pueden afectar al alga de tres formas: (1) provocando un estrés osmótico con efecto directo en el potencial hídrico celular, (2) causando estrés iónico (salino) por la pérdida o toma de iones, y (3) afectando al cambio en las relaciones de iones celulares debidos a la permeabilidad selectiva de la membrana. Todos estos procesos mencionados forman a su vez parte de los mecanismos de aclimatación que tienen lugar simultáneamente en respuesta a las condiciones estresantes de salinidad, y, tanto la reacción como la respuesta son difícilmente separables (Kirst, 1989).

Durante muchos años se han llevado a cabo experimentos para averiguar la tolerancia que mostraban las algas a la salinidad y a la temperatura, y poder comparar los resultados con los límites de distribución. Son además muchos los autores que han considerado el efecto de la temperatura y la salinidad en el estudio de la fisiología de las algas.

La habilidad o capacidad de fotosintetizar bajo condiciones extremas de salinidad y temperatura es una de las adaptaciones frente al estrés, y su importancia radica en que permite

que la producción primaria continúe en un medio variable (Gatusso y Jaubert, 1985; Smith y Berry, 1986; Russell, 1987; Zupan y West, 1990; Davison, 1991; Davison y col., 1991; Henley, 1992, 1993; Kübler y Davison, 1993; Einav y col. 1995). Dentro de las mismas especies se han observado variaciones genotípicas considerables en respuesta a la temperatura y la salinidad (McLachlan y Bird, 1984; Bird y McLachlan, 1986).

Llama la atención sin embargo, que apenas se conozca nada sobre las variaciones de comportamiento frente el estrés térmico o salino que puedan existir dentro de una misma especie durante su crecimiento y desarrollo. Generalmente para este tipo de estudios se han empleado individuos recogidos de la naturaleza y completamente desarrollados (adultos), sin que haya un conocimiento previo de las fases más tempranas del ciclo de vida de las algas, y de los efectos de la temperatura y la salinidad en la supervivencia y desarrollo de las esporas y *sporelings*, tal y como se pone de manifiesto en la extensa revisión de Santelices (1990). Posteriormente, trabajos como los de Yokoya y Oliveira (1993) con *Gracilaria sp.* han mostrado que la salinidad y la temperatura actúan como factores críticos en la germinación de esporas y desarrollo de los *sporelings*. Resulta lógico pensar que la viabilidad de las fases de post-fijación dependa de la capacidad fisiológica que presenten para adaptarse a condiciones variables de luz, temperatura y salinidad que ocurren frecuentemente en los charcos del intermareal.

Las esporas fotosintetizan, respiran y fijan carbono de forma tal que les permita mantener una tasa de crecimiento acorde a su estadio de desarrollo (Correa y col., 1985; Amsler y Neushul, 1991; Clayton, 1992; Fletcher y Callow, 1992). En este sentido, Amsler y Neushul (1991) observaron la existencia de diferencias interespecíficas en la capacidad fotosintética y respiratoria de esporas recién liberadas de *Laminaria*, obteniendo los valores de estos y otros parámetros fisiológicos bajo condiciones ambientales bien definidas pero no los compararon con los estadios adultos. Por el contrario, Beach y col. (1995) trabajando con *Ulva fasciata* y

Enteromorpha flexuosa (Chlorophyta), publicaron tasas fotosintéticas y una relación fotosíntesis/respiración más altas en talos gametofíticos, que en los gametos de estas especies.

La fotosíntesis como medida fisiológica del estrés.

Existen varios criterios fisiológicos para estudiar el alcance del estrés en el metabolismo. Los más utilizados han sido la fotosíntesis y la respiración y en menor medida el metabolismo del carbono y el nitrógeno, la asimilación de nutrientes y las actividades enzimáticas (Ramus, 1990).

La fotosíntesis es un proceso metabólico relevante, fácilmente medible y empleado de forma rutinaria como un indicador o medida del efecto del medio en las algas. Los métodos más usados para medir la actividad fotosintética son la medida del CO₂ incorporado en el proceso, bien mediante el método IRGA (Infra Red Gas Analysis), o bien utilizando el marcaje radiactivo del carbono (¹⁴C). El método IRGA se emplea cada vez más para la medida del intercambio de CO₂ en el aire pero resulta complicado de usar e interpretar en fases acuosas, por lo que su uso no está muy extendido en el campo de las algas (Surif y Raven, 1990). El método radiactivo del ¹⁴C requiere de unas instalaciones y de un equipamiento específico para su medida, además de presentar el inconveniente propio de la radiactividad.

La actividad fotosintética también se puede medir cuantificando el oxígeno liberado. Los métodos más usuales para medir las concentraciones de oxígeno disuelto son los de Winkler y los electrodos de oxígeno basados en la polarografía.

Para medidas puntuales e instantáneas a distintas intensidades de luz, el método Winkler resulta poco práctico porque necesita de prolongadas incubaciones para su resolución. Este hecho conlleva además problemas de saturación de oxígeno y de contaminación de endófitos y bacteriana (Arnold y Littler, 1985). Los electrodos de oxígeno tienen la ventaja de suministrar

lecturas instantáneas y continuas, y lo que es más importante, proporcionan medidas lineales de liberación de oxígeno frente a distintas intensidades de luz, lo que permite el cálculo posterior de la tasa de actividad fotosintética con precisión.

Las algas muestran diferencias en la fotosíntesis en función de la edad (Wheeler, 1980; Ramus y Rosenberg, 1980; Prince, 1980) o de la morfología (Littler y Littler, 1983; Hanisak y col., 1988), que se han medido mediante las curvas fotosíntesis-irradiancia, también llamadas curvas P-I.

La curva P-I se construye representando la tasa de fotosíntesis de una biomasa o área específica de un alga, frente a la densidad del flujo de fotones (PFD, Photon Flux Density o número de fotones de radiación fotosintéticamente activa recibidos por unidad de superficie). Estas curvas son modelos matemáticos de las tasas fotosintéticas (Madsen y Maberly, 1990) y de la interpretación de sus parámetros se obtiene información de varios componentes del aparato fotosintético y su respuesta a la irradiancia (Ramus, 1981). Estos parámetros son:

- (1) La pendiente inicial a irradiancias limitantes, denominada alfa, que es función tanto de la eficiencia captadora de la luz como de la eficiencia fotosintética de conservación energética.
- (2) La tasa de respiración en la oscuridad, R_d , es el parámetro de la curva P-I cuyo valor es el de la ordenada en el origen y no coincide necesariamente con la actividad fisiológica de la respiración mitocondrial.
- (3) La tasa fotosintética máxima a luz saturante, abreviada como P_{max} (fotosíntesis máxima), que está principalmente limitada por la tasa de disponibilidad de carbono y por las reacciones enzimáticas del ciclo de Calvin.

Las modificaciones de estos parámetros marcan alteraciones fisiológicas útiles para la cuantificación del grado de perturbación causado por una variable ambiental (Geider y Osborne, 1992).

Son muchos y muy distintos los diseños experimentales presentes en la bibliografía sobre aspectos relacionados con la tolerancia y aclimatación fotosintética a la salinidad y temperatura. En general, en los distintos trabajos, las algas se obtienen o bien de cultivo en condiciones estables y conocidas (Lapointe y col., 1984; Davison y col., 1991), o bien se recogen directamente de la naturaleza (Zupan y West, 1990; Bell, 1993), partiendo de condiciones ambientales no definidas. Previamente a las medidas de la actividad fotosintética, estas algas permanecen durante un tiempo variable (desde horas a días) aclimatándose a temperaturas o salinidades más o menos extremas respecto a las condiciones iniciales. Dependiendo de los trabajos, las medidas de fotosíntesis se realizan en las mismas condiciones control del cultivo (Smith y Berry, 1986; Henley, 1992; Kübler y Davison, 1995), o a distintas temperaturas y salinidades que no coinciden ni con las de cultivo ni con las de aclimatación (Davison y col., 1991; Kübler y Davison, 1993).

Tomando como referencia los trabajos anteriores, y teniendo en cuenta la importancia del diseño experimental en este tipo de estudios, es conveniente plantear un diseño detallado del ensayo, cuidando aspectos como el origen del material de partida, el tiempo y las condiciones de incubación de las muestras, y la estandarización del proceso de medida de actividad fotosintética. De esta manera, se evitan las alteraciones continuas que pueden afectar a los resultados y a su interpretación.

Respecto al material de partida, cada vez son más los autores que consideran que el material recogido de la naturaleza no es el más adecuado para los estudios fisiológicos (Lüning y Freshwater, 1988; Macler y Zupan, 1991). La adaptación a condiciones de laboratorio o definidas puede requerir días o semanas (Macler, 1988). A no ser de que los experimentos sean de larga duración y se produzca la aclimatación en su transcurso, resulta más adecuado el uso de

plantas cultivadas *in vitro* en condiciones de crecimiento controladas. Si además, lo que se pretende es analizar las variaciones durante el crecimiento y desarrollo, es importante partir de un material del que se conozcan sus requerimientos nutritivos y de luz, los estadios en la historia de vida del alga y la fase de desarrollo en la que se encuentra. En definitiva, es conveniente que el material de partida sea homogéneo, con una historia de vida fisiológica previa conocida y muy similar entre todos los individuos del estudio. Es difícil que el material recogido en la naturaleza cumpla estas características y de ahí la necesidad de contar con cultivos de laboratorio, que ofrecen en este tipo de estudios una ventaja considerable. Los cultivos permiten además trabajar con una misma población y controlar así la variabilidad genética, que en ocasiones puede interferir o ser un inconveniente a la hora de interpretar los resultados.

Otro aspecto a tener en cuenta es el tiempo de incubación del alga a las distintas condiciones; la respuesta fotosintética frente a un factor estresante como pueda ser la salinidad y temperatura, puede estudiarse como un efecto a corto o a largo plazo. Se considera efecto a corto plazo, cuando previamente a la medición de fotosíntesis se realiza una incubación breve (de horas) en condiciones diferentes, alterando alguna variable de las habituales del cultivo del alga. Cuando el tiempo de permanencia en la nueva condición es mayor (días), se habla de aclimatación, (Prézelin, 1981; Ramus, 1981; Richardson y col., 1983; Neale, 1987) entendiéndose como un efecto a largo plazo. Por tanto, dependiendo del objetivo del trabajo, se tendrá que considerar tanto la duración, como las condiciones de las incubaciones (distintas salinidades y temperaturas), que podrán variar en un rango similar a las de la naturaleza, o probar condiciones arbitrarias extremas.

Es además imprescindible en este tipo de estudios, estandarizar el procedimiento de medida para obtener las curvas P-I; indicando para ello las condiciones de medida, el número de PFD usados y la duración de cada uno, y tras los cálculos, presentar los datos de los parámetros estimados (Henley, 1993).

Este estudio se realizó a partir del cultivo de *Grateloupia doryphora* en el que ya se habían establecido distintas etapas durante su crecimiento (Introducción general). Se eligieron para su comparación, los denominados Estadios I y III, bien caracterizados y diferenciados en su desarrollo. La hipótesis de partida se basó en la creencia de que los individuos adultos del Estadio III presentarían una respuesta homogénea ante condiciones estresantes de salinidad y temperatura, ya que debido a su grado de desarrollo, contarían con mecanismos fisiológicos capaces de contrarrestar las perturbaciones. En el Estadio I por el contrario, constituido por individuos con menor grado de desarrollo, cabría esperar un mayor efecto de las condiciones estresantes reflejado en una mayor perturbación de la actividad fotosintética.

Para refutar o desmentir esta hipótesis se plantearon ensayos en los que se pudiera analizar la capacidad fisiológica de los dos Estadios en condiciones normales de cultivo tras someterlos a períodos de incubación cortos en diferentes temperaturas y salinidades.

II.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Material vegetal.

Todas las algas que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron por propagación *in vitro* de esporas provenientes de una población natural siguiendo las mismas directrices ya explicadas anteriormente y se mantuvieron en cultivo en condiciones normales, (medio PES, 19 ± 2 °C, y $30 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) hasta que completaron las distintas fases del desarrollo establecidas en la curva de crecimiento (Introducción General, Figura 2).

Para llevar a cabo los experimentos se eligieron dos fases bien caracterizadas y diferenciadas: Los Estadios I y III. El Estadio I lo constituían *sporelings* con varios ejes de crecimiento en regeneración, y que permanecían en medio líquido PES un tiempo aproximado de entre 1 y 35 días. Los talos del Estadio III permanecían durante más de 70 días en medio líquido (PES), estaban bien pigmentados y presentaban numerosos ejes de crecimiento de 2,5-3 cm de longitud con dicotomía apical.

Para las medidas de actividad fotosintética, debido a la diferente morfología y tamaño del material entre los dos Estadios, se llevaron a cabo diversas pruebas para determinar el número de *sporelings* (Estadio I) o el peso del alga (Estadio III) que debían ser colocados en el volumen de la cámara de incubación (4 mL) para que el oxígeno liberado fuera detectable y diera una señal clara. Se encontraron buenas respuestas utilizando una media de peso fresco de 6 mg, correspondiente a 20 *sporelings* del Estadio I, y a las partes terminales de 2 cm de longitud de individuos del Estadio III.

Contenido pigmentario.

El análisis del contenido de pigmentos en nuestro estudio consistió en la determinación de clorofila *a* y ficobiliproteínas en las dos fases del desarrollo. Para la clorofila *a* se realizaron dos repeticiones partiendo de 4 muestras para cada Estadio, con un peso fresco de 6 mg,

correspondiente a 20 *sporelings* del Estadio I y un fragmento de talo de aproximadamente 2 cm del Estadio III. Para cada muestra se realizaron 3 extracciones consecutivas con 0,5 mL dimetilsulfóxido (DMSO) en frío y baja intensidad lumínica. De acuerdo a Seely y col. (1972) la absorbancia del extracto total (1,5 mL) se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 665 nm, y se procedió al cálculo de la concentración de clorofila con la siguiente relación:

$$\text{Clorofila } a = A_{665} / 72.8 \quad (\text{g L}^{-1}).$$

Para la determinación de la concentración de las ficobiliproteínas (R-FE y R-FC, R-ficoeritrina y R-ficocianina respectivamente) se partió de 3 muestras para cada Estadio, con un peso fresco de 20 mg, correspondiente a 60 *sporelings* del Estadio I y a 2-3 fragmentos de talos de aproximadamente 2 cm del Estadio III. Para cada muestra se realizó una extracción con arena de mar lavada y en morteros de porcelana, en 1 mL de tampón fosfato 0,1 M y pH= 6,8 para los *sporelings*, y 2,5 mL del mismo tampón para los talos adultos. Todo el procedimiento se llevó a cabo en frío y a baja intensidad lumínica. Previamente a las medidas en el espectrofotómetro, las muestras se centrifugaron durante 15 min y 5.000 rpm en una centrífuga Beckman J-25. Las medidas espectrofotométricas y los cálculos posteriores para determinar la concentración (mg L⁻¹) se realizaron de acuerdo a las siguientes fórmulas de Beer y Eshel (1985):

$$\text{R-FE (mg L}^{-1}\text{)} = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \cdot 0,20] \cdot 0,12$$

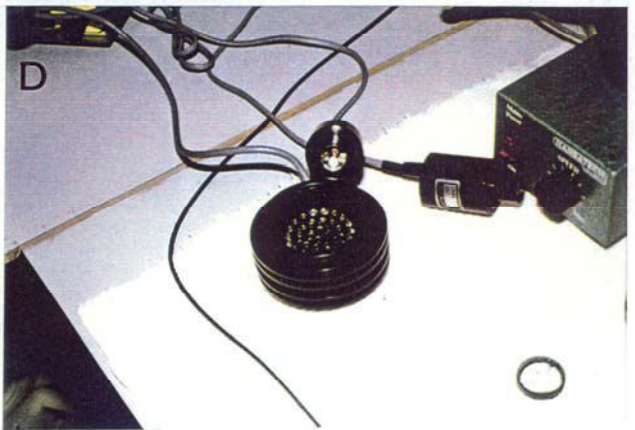
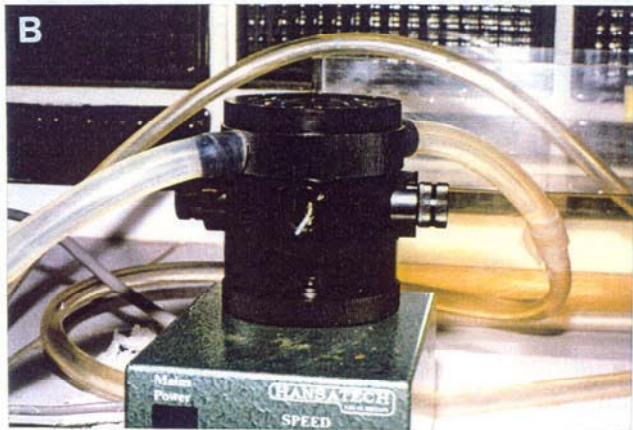
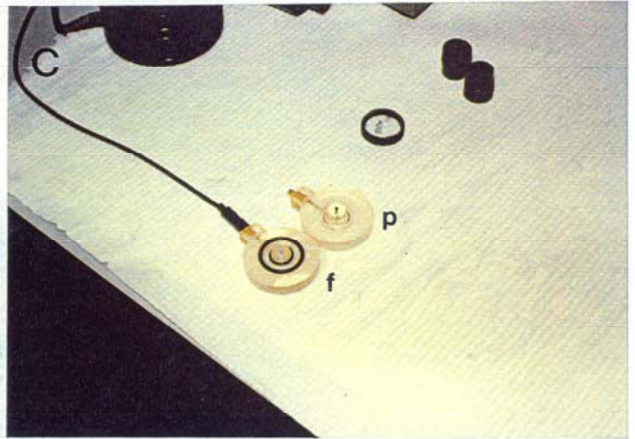
$$\text{R-FC (mg L}^{-1}\text{)} = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) \cdot 0,51] \cdot 0,15$$

El cociente peso fresco/peso seco para el Estadio I es 9,16 y para el Estadio III de 8,26.

Medidas fotosintéticas.

En este ensayo, las medidas de fotosíntesis (oxígeno liberado) se realizaron mediante un electrodo de oxígeno tipo Clark computarizado (Hansatech, Norfolk, U.K.) que funciona según el principio de polarografía y su sensibilidad permite detectar concentraciones de oxígeno del orden de 0,001 mM (Figura II.1).

Figura II.1: (A) Aspecto general del Hansatech^{MR}, con los monitores de control del electrodo y de las luces (B) Detalle de la cámara de incubación con su soporte magnético. (C) Vista del electrodo previo al montaje (p) y listo para su funcionamiento (f). (D) Diodos emisores de luz suministrados por el Hansatech^{MR}.



El electrodo tipo-Clark del Hansatech se fundamenta en un diseño de Deliu y Walker (1972) y consta básicamente de un cátodo de platino y un ánodo de plata unidos o conectados mediante un electrólito. Ambos electrodos están engarzados en un disco de plástico: el cátodo en el centro del domo y el ánodo de plata en una ranura circular que sirve a su vez como recipiente del electrólito. El electrodo para su funcionamiento, está protegido por una membrana de teflón o polietileno, permeable al oxígeno, que mantiene una fina capa del electrólito sobre la superficie de los electrodos. Se utiliza un papel fino debajo de la membrana para mantener una capa uniforme y continua de electrólito entre el ánodo y el cátodo.

Cuando se aplica un voltaje eficaz entre los electrodos, el platino se vuelve negativo (se convierte en el cátodo) y la plata (el ánodo) se torna positiva. El oxígeno se difunde a través de la membrana y se reduce en la superficie del cátodo, inicialmente en forma de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de tal forma que la polaridad tiende a descargarse a medida que se donan electrones al oxígeno, que actúa como aceptor de electrones. La plata se oxida y se deposita como cloruro de plata en el ánodo. La corriente generada es directamente proporcional al oxígeno reducido y se registra como voltaje en un registrador o se convierte en un registro de salida digital si se emplea el control de lectura que dispone el Hansatech.

El equipo de Hansatech está provisto de un juego de tres lámparas denominados LED (Light Emitting Diodes: Diodos Emisores de Luz) que representan una fuente de luz muy útil para aplicaciones fotosintéticas. Son pequeñas, manejables y capaces de emitir altas intensidades sin producir mucho calor. Son además relativamente baratas, estables y tienen una duración bastante larga. Los tres diodos (modelo: LH 36 U) usados en nuestro estudio emitían en una longitud de onda de 660 nm (luz roja), muy cercana al pico de absorción de la clorofila *a* y con un máximo (100 %) de 900 PFD (Photon Flux Density o densidad de flujo de fotones). Las unidades normalmente empleadas para expresar el PFD son los moles de fotones por unidad de

superficie y tiempo ($\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Los PFD a los que se realizaron las medidas de liberación de oxígeno fueron 0, 18, 36, 54, 72, 90, 108, 126, 144, 162, 180, 198, 216, 234 y 252 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Para llevar a cabo las medidas se utilizó la cámara de incubación de fase acuosa DW1 (Hansatech). Esta cámara consta de un cilindro central a modo de columna de cristal de 4 mL de capacidad donde se coloca el alga. La columna está rodeada por un espacio en el que fluye un circuito cerrado de agua termostatizado, que permite que durante todas las medidas y ensayos la temperatura en el interior de la cámara no varíe. Esto es importante ya que, el valor del contenido de oxígeno en el agua es función de la temperatura. La temperatura del baño termostatizado y por tanto la de las medidas, se ajustó para que coincidiera con la temperatura de cultivo (19-20 °C) de las algas.

La difusión del oxígeno en la columna de agua es tres órdenes de magnitud menor que en el aire. Es necesario por tanto el uso de una agitación continua de la solución mediante un agitador magnético que a su vez sirve de soporte de la cámara, y un imán de reducidas dimensiones que se introduce en la cámara de incubación al comienzo de la medida.

Todas las mediciones de la actividad fotosintética se realizaron de 8 a.m. a las 14.00 p.m. para evitar la variación diurna de la fotosíntesis (Coutinho y Zingmark, 1987). Las medidas se iniciaban con agua de mar desgasificada con N_2 para evitar niveles de saturación de oxígeno. En el caso de los individuos del Estadio III, dado que los fragmentos del alga intercedían con el imán, fue necesario incluir dentro de la cámara una malla de plástico también desgasificada. Los *sporelings* del Estadio I por sus reducidas dimensiones no interferían con el imán y permanecían libres en la columna de incubación mientras se procedía a las medidas. Una vez establecidos los niveles de oxígeno se colocaba el material vegetal dentro de la cámara, esta se sellaba y se mantenía en oscuridad.

Utilizando el propio soporte informático del Hansatech, tras 8 min de registro en

oscuridad, se obtenía la primera tasa de liberación de oxígeno y un minuto después una segunda también en oscuridad. Estas primeras tasas negativas representan los valores del parámetro R_d de respiración en la oscuridad. A continuación se procedía a medir en presencia de luz, comenzando con un equivalente a $18 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2% del total). Cada vez el PFD se incrementaba un 2% más. Cada uno de los PFD se mantenía durante 4 min en los que se registran 3 tasas consecutivas, para posteriormente calcular la media. Así sucesivamente, hasta que llegado a un determinado PFD, las tasas obtenidas no superaban las anteriores, o incluso disminuían. En este momento finalizaba la medida.

Las tasas obtenidas ($\mu\text{mol O}_2$ liberado h^{-1}) se normalizaron a cantidad de clorofila a (Cl a) ($\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} Cl a h^{-1}) y se representaron frente a los PFD correspondientes, obteniéndose de esta forma las curvas P-I. Para cada una de las curvas se calcularon los parámetros fotosintéticos de respiración en la oscuridad (R_d , $\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} Cl a h^{-1}), eficiencia fotosintética (alfa, $\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} Cl a $\text{h}^{-1} / \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y fotosíntesis máxima (P_{max} , $\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} Cl a h^{-1}). El valor de R_d coincidía con el valor de la ordenada en el origen. Para calcular alfa, se trazó una recta de regresión de los cuatro primeros puntos de la curva, tomando alfa el valor de la pendiente. P_{max} coincide con los valores máximos de las tasas obtenidas a determinados PFD.

Las incubaciones para ver el efecto a corto plazo de las distintas condiciones de temperatura y salinidad se realizaron previamente a las medidas en el Hansatech con muestras pertenecientes al mismo estadio elegidas al azar. El tiempo de incubación fue siempre de 30 min para cada una de las muestras y tratamiento. Las condiciones control fueron $19 \text{ }^\circ\text{C}$ y agua de mar $35 \text{ }^\circ\text{‰}$ ($1,1 \text{ osmolKg}^{-1}$).

Para los tratamientos de temperatura se realizaron las incubaciones a 25 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente, en erlenmeyers, en un baño termostático y en agua de mar (salinidad

control). Para el shock salino, el tratamiento hiposalino se obtuvo diluyendo al 50 % agua de mar con agua bidestilada, consiguiendo así una salinidad final de 18 ‰ (0,5 osmol; Kg^{-1} ; Robaina, 1988, Robaina y col., 1990). Las condiciones hipersalinas (65 ‰; $1,75 \text{ osmolKg}^{-1}$) se obtuvieron añadiendo 24 g L^{-1} de NaCl. Las incubaciones en los dos tratamientos salinos se llevaron a cabo en erlenmeyers a la temperatura control ($19 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) mantenida mediante un baño termostático. Todos los experimentos y medidas, incluidas las control, se realizaron seis veces con 3-4 medidas para cada uno de los tratamientos.

Estadística.

Los experimentos se realizaron con 3 medidas por tratamiento y con muestras de cada Estadio, obteniéndose los valores medios y la varianza en cada tratamiento.

Para ver si la respuesta provocada por las distintas condiciones de salinidad y temperatura en cada Estadio y reflejadas en los valores medios de los parámetros fotosintéticos (P_{max} , α y R_d), eran significativamente diferentes respecto a los valores medios del control, se realizó un test de comparación de medias empleando el programa SPSS 5.1 (SPSS Inc. San Rafael, CA, USA). Independientemente de si el tratamiento había provocado como respuesta una alteración significativa en el valor medio de los parámetros, se quería analizar también la forma de respuesta en sí. Una varianza pequeña en torno a la media, reflejaría una respuesta homogénea, entendiéndose que existe un comportamiento uniforme y común de los organismos, a modo de estrategia de respuesta frente las condiciones estresantes. Por el contrario, a una varianza grande, se asimilaría a un tipo de respuesta heterogénea, propia de organismos sin un mecanismo definido de respuesta, en la que cada organismo responde de una manera diferente a la perturbación. Para poder comparar la mayor o menor heterogeneidad de las varianzas sobre las medias de P_{max} , α y R_d dentro y en cada uno de los Estadios, se realizó una comparación de las varianzas, aplicando para ello el test de Cochran (Sachs, 1982).

II.3. RESULTADOS.

La cuantificación de los pigmentos demostró la existencia de una diferencia significativa en el contenido pigmentario entre los dos Estadios (Tabla II.1). Los individuos del Estadio I contienen mayor cantidad de clorofila *a* que los del Estadio III. Estos últimos por el contrario, mostraron mayor contenido en pigmentos accesorios, como son la ficoeritrina y la ficocianina.

La Figura II.2 muestra las curvas P-I obtenidas para los Estadios I y III en condiciones control. En ella se observa que la actividad fotosintética del Estadio I es mayor, presentando valores más altos de α y P_{max} . Estas diferencias se mantuvieron en los experimentos con las diferentes salinidades y temperaturas.

Las tablas II.2 y II.3 muestran la comparación estadística de los valores medios y las diferencias en la varianza de P_{max} , α y R_d del Estadio I y III respectivamente, tras las incubaciones en las distintas temperaturas y salinidades. En la Tabla II.2 no se observan diferencias significativas entre las condiciones control y los tratamientos de temperatura, ni el hiposalino (18 ‰). Tan sólo el tratamiento hipersalino alteró los parámetros fotosintéticos, reduciendo significativamente P_{max} y α frente al control. En este Estadio I, P_{max} y R_d variaron de forma similar con todos los tratamientos, mientras que α varió significativamente entre tratamientos.

Para el Estadio III, la Tabla II.3 muestra que todos los tratamientos redujeron significativamente el parámetro P_{max} , excepto el tratamiento hipersalino, que lo incrementó. Este mismo tratamiento hipersalino provocó también un aumento significativo en α . R_d tan sólo mostró una disminución significativa con el tratamiento de 30 °C. En el Estadio III se observaron diferencias significativas en la varianza en los parámetros P_{max} y R_d .

Tabla II.1. *Grateloupia doryphora*. Concentración en μg pigmento mg^{-1} peso seco de alga (media \pm error estándar de 6 replicados) de clorofila *a*, R-ficoeritrina (R-FE) y R-ficocianina (R-FC). Comparación estadística de la media entre el Estadio I y el III: (***) = $P \leq 0,001$.

Estadio	Clorofila <i>a</i>	R-FE	R-FC
I	$70 \cdot 10^{-1} \pm 4,25 \cdot 10^{-1}$	$4,69 \cdot 10^{-1} \pm 0,327 \cdot 10^{-1}$	$7,31 \cdot 10^{-2} \pm 3,27 \cdot 10^{-2}$
III	$40 \cdot 10^{-1} \pm 6,05 \cdot 10^{-1}$ (***)	$90 \cdot 10^{-1} \pm 9,93 \cdot 10^{-1}$ (***)	$100 \cdot 10^{-2} \pm 7,26 \cdot 10^{-2}$ (***)

Figura II.2. Curvas P-I correspondientes a los Estadios I y III (valores medios de 6 replicados. La barra vertical representa el error estándar de la media).

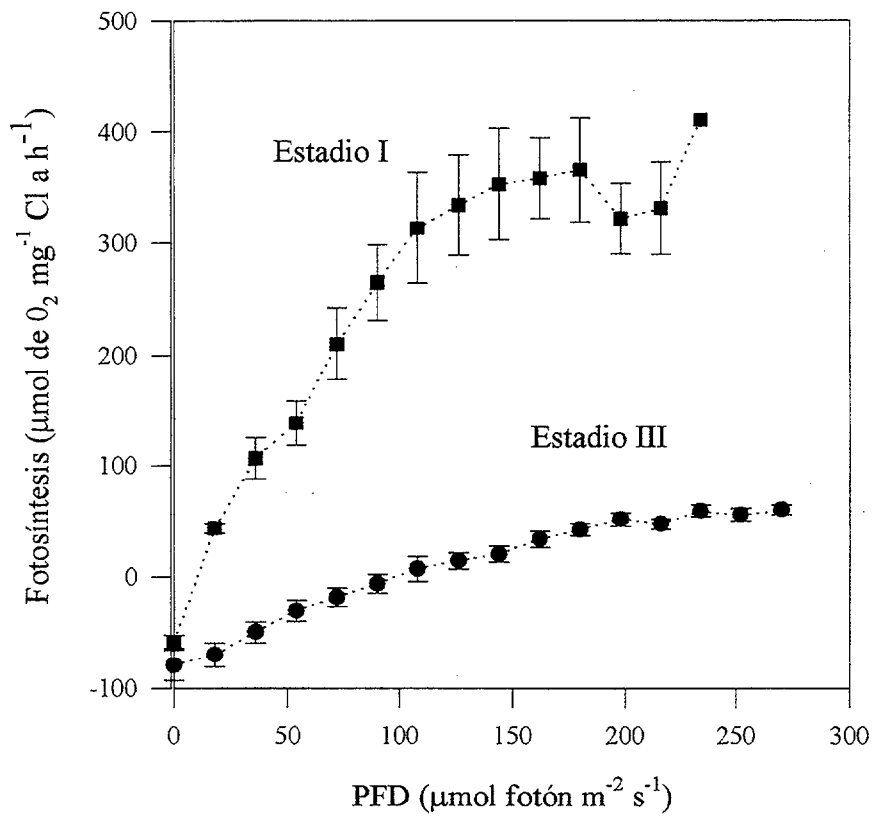


Tabla II.2. Estadio I (*sporelings*) de *Grateloupia doryphora*. Parámetros fotosintéticos (medias \pm error estándar de 6 replicados de los experimentos con 3-4 medidas cada una) P_{max} ($\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} clorofila a h^{-1}), alfa ($\mu\text{mol O}_2$ mg^{-1} clorofila a $\text{h}^{-1} / \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y R_d ($\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} clorofila a h^{-1}). Las condiciones control fueron 20 °C, 35 ‰ S (1,1 osmol kg^{-1}). (Comparación estadística de la media : (*) $P \leq 0,05$; ns = no significativo).

Tratamiento	P_{max}	alfa	R_d
Control	404,0 \pm 47,1 ^{ns}	3,68 \pm 0,55 ^{ns}	-41,7 \pm 9,51 ^{ns}
25 °C	360,3 \pm 70,9 ^{ns}	4,54 \pm 0,66 ^{ns}	-23,8 \pm 13,33 ^{ns}
30 °C	424,8 \pm 102,0 ^{ns}	4,85 \pm 1,26 ^{ns}	-42,2 \pm 14,41 ^{ns}
18 ‰ S	398,0 \pm 78,2 ^{ns}	3,68 \pm 0,55 ^{ns}	-20,7 \pm 10,89 ^{ns}
65 ‰ S	264,3 \pm 10,0 [*]	3,25 \pm 0,46 [*]	-18,7 \pm 5,45 ^{ns}
Diferencia en la varianza	No significativa	Significativa	No significativa

Tabla II.3. Estadio III (talo adulto) de *Grateloupia doryphora*. Parámetros fotosintéticos (medias \pm error estándar de 6 replicados de los experimentos con 3-4 medidas cada uno) P_{\max} ($\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} clorofila $a\text{ h}^{-1}$), alfa (α , $\mu\text{mol O}_2$ mg^{-1} clorofila $a\text{ h}^{-1}/\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y R_d ($\mu\text{mol O}_2$ liberado mg^{-1} clorofila $a\text{ h}^{-1}$). Las condiciones control fueron de 20 °C, 35 ‰ S (1,1 osmol kg^{-1}). (Comparación estadística de la media : (***) = $0,01 \leq P \leq 0,05$; ns = no significativo).

Tratamiento	P_{\max}	alfa	R_d
Control	64,8 \pm 1,9 ^{ns}	0,99 \pm 0,08 ^{ns}	-84,7 \pm 11,5 ^{ns}
25 °C	37,2 \pm 7,0 ^{**}	1,10 \pm 0,40 ^{ns}	-89,5 \pm 26,7 ^{ns}
30 °C	18,8 \pm 6,0 ^{**}	0,60 \pm 0,33 ^{ns}	-36,7 \pm 6,3 ^{**}
18 ‰ S	36,0 \pm 7,2 ^{**}	1,08 \pm 0,32 ^{ns}	-90,0 \pm 11,0 ^{ns}
65 ‰ S	171,7 \pm 41,7 ^{**}	1,76 \pm 0,17 ^{**}	-117,6 \pm 12,4 ^{ns}
Diferencia en la varianza	Significativa	No significativa	Significativa

II.4. DISCUSIÓN.

Las diferencias observadas en el contenido pigmentario entre los dos Estadios podrían tener varias explicaciones, algunas de las cuales son descartables. De esta forma, no es posible considerar una fotoaclimatación (alteraciones fenotípicas y fisiológicas frente al cambio de un parámetro ambiental) de los *sporelings*, ya que las condiciones de cultivo para todas las algas durante el crecimiento y desarrollo fueron las mismas (medio de cultivo, fotoperiodo, temperatura, cantidad y calidad de luz).

Las diferencias pigmentarias tampoco pueden explicarse por la heterogeneidad genética; todos los individuos provienen desde el inicio del cultivo, de las carposporas liberadas por los mismos explantos y seleccionadas al azar. Por tanto, solamente cabe interpretar estas diferencias pigmentarias (Tabla II.1) como resultado del propio grado de desarrollo desde el *sporeling* (Estadio I) hasta el adulto (Estadio III), es decir, un cambio ontogénico.

La consecuencia fotoquímica derivada de la diferente composición pigmentaria entre los dos Estadios se refleja en la Figura II.2. Las diferencias obtenidas en las tasas máximas de fotosíntesis entre los dos Estadios se deben, al tipo de luz suministrada con el Hansatech que emite un espectro de luz centrado en el rojo (660 nm), y al contenido pigmentario del Estadio III. Esta longitud de onda coincide con un pico de absorción de la clorofila α , que permite alcanzar tasas máximas de fotosíntesis en plantas C3 (Walker y Osmond, 1986), pero que no permite la participación de los pigmentos fotosintéticos accesorios, la ficoeritrina en particular. A pesar de que el sistema Hansatech esté pensado para dar máximas tasas en plantas C3, se debe utilizar con cautela con algas rojas, siendo preferible la utilización de luz de amplio espectro.

No obstante, se realizaron medidas de fotosíntesis máxima en el Estadio III utilizando una fuente de luz de amplio espectro (lámpara de un proyector de diapositivas) con el objetivo de que intervinieran en el proceso fotosintético otros pigmentos como las ficobiliproteínas. Las ficobiliproteínas son pigmentos accesorios situados en los ficobilisomas, cuyo rango de absorción

máximo se encuentra entre 500 y 650 nm. Su función consiste en transferir la luz hacia los centros de reacción de los fotosistemas I y II, ensanchando el rango de absorción de luz hacia el verde y contribuyendo de esta manera a aumentar el potencial de absorción en la radiación electromagnética disponible por el alga (Gantt, 1981; Glazer, 1984). Los valores de actividad fotosintética obtenidos con la luz de amplio espectro fueron superiores a los previamente obtenidos, aunque nunca superaron los valores del Estadio I.

Se puede concluir por tanto que una mayor cantidad de ficobiliproteínas, en detrimento de la cantidad de clorofila α , no contribuye en el Estadio III a una mejor actividad fotosintética; la presencia de los pigmentos accesorios resulta necesaria para igualar la actividad fotosintética del Estadio I, pero no para superarla.

En macroalgas se ha demostrado que la ficoeritrina puede acumularse en exceso a su requerimiento como pigmento fotosintético. Ramus y Van der Meer (1983) demostraron, utilizando mutantes de *Gracilaria tikvahiae* deficientes en R-ficoeritrina y comparándolos con las algas de tipo salvaje, que el contenido en ficoeritrina no está estrictamente relacionado con la fotoasimilación. Los mutantes deficientes en R-ficoeritrina presentaban una actividad fotosintética tan efectiva como la de las de tipo salvaje. Parece que estas últimas, en las que la ficoeritrina se encuentra en exceso, no completan, ni utilizan al 100% su potencial fotosintético, en concordancia con Dring (1981), que incluso lo hace extensivo a la mayoría de las algas rojas.

La síntesis y acumulación de pigmentos ocurre en función de la disponibilidad de nutrientes, en particular de nitrógeno, y toda la ficoeritrina disponible no contribuye a la optimización de la actividad fotosintética (López-Figueroa, 1991; Vergara y Niell, 1993). De acuerdo a esto, el máximo contenido pigmentario no necesariamente se traducirá siempre en una actividad fotosintética máxima como podría pensarse *a priori*.

Las diferencias fotofisiológicas observadas entre los dos Estadios obedecen además de al

tipo de luz empleada, a posibles diferencias fisiológicas y estructurales entre los Estadios. En este sentido, se han descrito la existencia de cambios en la actividad fotosintética en función de la edad (Ramus y Rosenberg, 1980; Wheeler, 1980), así como, del estadio de crecimiento (Prince, 1980). La organización celular estrechamente empacada de las macroalgas incrementa la posibilidad de la dispersión "múltiple" de la luz e intensifica su absorción. Las algas en su estado adulto (Estadio III) están compuestas por células más pequeñas en su parte externa que gradualmente se agrandan hacia el interior. Las células fotosintéticamente más activas se localizan fundamentalmente en las capas celulares más externas (el córtex), mientras que los *sporelings* del Estadio I no tienen todavía una clara definición de estos tipos celulares (García-Jiménez, 1994).

El Estadio III presenta una alta relación $R_d:P_{max}$ motivada por un aumento de R_d y una disminución de P_{max} . La ganancia de tejido no fotosintético con el desarrollo (Correa y col., 1985) explicaría la alta tasa de R_d observada para el Estadio III en comparación con la del Estadio I. Paralelamente el mismo hecho de que se acumule ficobiliproteínas sin una contribución clara a aumentar la fotosíntesis, incrementa más aún dicha relación, ya que esta reserva proteica se traduce normalmente en un elevado coste metabólico para el alga.

Los tratamientos de salinidad y temperatura capaces de alterar la actividad fotosintética, son diferentes para uno y otro Estadio según se deduce de los resultados de las Tablas II.2 y II.3. Tan sólo el tratamiento hipersalino afectó a ambos, aunque de diferente manera: con una disminución de la P_{max} , α y R_d en el Estadio I y un incremento en el Estadio III.

Pocos estudios sobre algas han demostrado de manera inequívoca, las relaciones existentes entre la salinidad y las distintas respuestas fisiológicas. Los resultados de las incubaciones en medios hipo o hipersalinos (Nellen, 1966; Reed, 1979; Lapointe y col., 1984; Smith y Berry, 1986; Kirst, 1989) son controvertidos y dispares dependiendo de las especies,

del incremento o disminución de la salinidad, del tiempo de incubación, etc. En la revisión de Kirst (1989) la mayoría de las 34 especies de rodofitas estudiadas respondieron a los tratamientos tanto hipo como hipersalinos, inhibiendo la fotosíntesis dado que la transferencia a aguas concentradas o diluidas puede tener efectos adversos en el metabolismo debido a los cambios en el turgor y volumen, o por la interrupción de los procesos de transporte y gradientes de iones transmembrana. Estos efectos son imposibles de diferenciar en la mayoría de los casos.

A salinidades extremas generalmente también se reduce la tasa respiratoria, debido a la inhibición de la actividad metabólica. La primera fase de la respuesta osmótica implica un cambio en el turgor de la célula y en su volumen y no tiene control intracelular; los cambios siguientes en la presión osmótica interna pueden tener lugar como respuesta directa de la actividad metabólica (osmoaclimatación) (Kirst, 1989).

Las condiciones hiposalinas son normalmente obtenidas por dilución del agua de mar con agua destilada y desionizada. Reed (1990) apunta que mediante este procedimiento se reduce la concentración de carbono inorgánico, pudiendo afectar a la interpretación de los resultados. En nuestro trabajo, todas las medidas se realizaron en condiciones control (35 ‰, no hiposalinas) después de la incubación o shock hiposalino, por lo que descartamos esta posibilidad.

Resulta difícil explicar las diferencias en la tendencia de la respuesta entre los dos Estadios de la misma especie, ya que apenas hay datos en la literatura de variaciones intraespecíficas en las tasas fisiológicas frente a estos factores estresantes. En la bibliografía revisada, sólo Lehnberg (1978) trabajando con *Delesseria sanguinea* (Rodofita) observó diferentes respuestas de los talos juveniles y adultos a los cambios de salinidad. La fotosíntesis en talos adultos a bajas salinidades se restringía a un rango de temperatura muy estrecho, limitando de esta manera la actividad fotosintética. Los resultados de este estudio muestran que los

mismos cambios de salinidad provocan diferentes respuestas en el estadio joven donde aumenta, mientras que en el adulto disminuye.

Con respecto a los tratamientos de temperatura y a las diferencias significativas observadas en el Estadio III, varios autores (Gatusso y Jaubert, 1985; Smith y Berry, 1986; Kübler y Davison, 1993) coinciden en que la fotosíntesis se incrementa progresivamente con el aumento de la temperatura hasta un límite o umbral de temperatura a partir del cual se produce una disminución de la P_{max} . Para el Estadio III de *Grateloupia doryphora* este límite puede rondar los 25 °C, aunque para otras especies se han determinado valores mayores en torno a los 30-35 °C (Lüning y Freshwater, 1988; Pakker y col., 1995). A pesar de que las medidas instantáneas de fotosíntesis-temperatura son útiles para comparar las tolerancias térmicas relativas, tienen un valor limitado para predecir los límites superiores e inferiores reales para el crecimiento y supervivencia a largo plazo. De esta forma, nuestros resultados no se pueden relacionar fácilmente con los efectos a largo plazo de las plantas de la naturaleza (Davison, 1991; Kübler y col., 1991).

De acuerdo con Davison (1991), la disminución de la P_{max} que se observa en el tratamiento de temperatura en el Estadio III puede deberse, por una parte, al daño del calor que afecta al Fotosistema II y que está controlado por el grado de saturación de los lípidos de los tilacoides, y por otra, al fallo de alguna enzima termolábil. Se cree que existe un constante reciclado (*turn-over*) de moléculas de proteínas que permite una aclimatación gradual de la maquinaria enzimática a las temperaturas cambiantes. Kübler y col. (1991) también sugieren que la inactivación térmica de la fotosíntesis se debe a una ruptura de transferencia de energía entre la ficoeritrina y la clorofila.

A pesar de que generalmente se relaciona un aumento de la temperatura con una tasa mayor de respiración en la oscuridad (parámetro R_d) (Davison, 1991; Henley, 1993), en el caso

del Estadio III se obtuvo un valor menor de R_d en el tratamiento de 30 °C. En trabajos similares consultados, el valor de R_d suele aumentar con la temperatura hasta un límite que ronda los 30-35 °C, a partir del cual la tasa de respiración en la oscuridad disminuye debido a la sensibilidad térmica de las enzimas (Gattuso y Jaubert, 1985; Kübler y col., 1991; Kübler y Davison, 1993). Según los resultados, también para el Estadio III parece que esta temperatura crítica sea en torno a los 30 °C.

La comparación de la varianza en los Estadios muestra que las diferencias son mayores en el Estadio III, lo que indica que este Estadio III no sólo cambia más (diferencia de la media) sino de una forma aparentemente incontrolada (diferencia de la varianza). Por lo que concluimos, que el Estadio I poseen mayor tolerancia a la temperatura y salinidad que la de los del Estadio III. En este sentido, los resultados coinciden con Correa y col. (1985) que señalan que el efecto de los factores físicos se hacen más evidentes a medida que progresa el crecimiento.

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la importancia del comportamiento de los estadios más jóvenes, y aunque obtenidos en el laboratorio, no dejan de tener cierta relevancia ecológica al demostrar que las esporas recientemente establecidas presentan una actividad fotosintética igual o incluso más eficiente que el Estadio adulto. Resulta lógico pensar que los *sporelings* con una óptima relación entre actividad fotosintética y demanda respiratoria, tendrán la ventaja de permanecer viables durante más tiempo siendo capaces de germinar y establecerse más rápidamente (Clayton, 1990; Amsler y Neushul, 1991), e incluso que la selección en las fases puede ocurrir a nivel *sporeling* tal y como sugieren Lindgren y Aberg (1996).

Littler y Littler (1980) basándose en un estudio simultáneo en la naturaleza y en el laboratorio con varias algas, habían sugerido que durante el crecimiento y desarrollo de un alga,

desde los *sporelings* hasta el talo maduro (grande y diferenciado), las estrategias de vida cambiaban. En la misma idea, comparando la fotofisiología de los *sporelings* y de los estadios adultos de distintas macroalgas, Beach y col. (1995) concluyeron que las diferencias observadas respondían a estrategias ecológicas diferentes: una estrategia oportunista en los *sporelings*, con actividad fotosintética alta que les permitiera alcanzar la fotofisiología de individuo adulto en poco tiempo.

En conclusión:

- 1) Existe una diferencia significativa en el contenido pigmentario ligada al desarrollo y cultivo: Los *sporelings* del Estadio I contienen mayor cantidad de clorofila *a* que los del Estadio III. Éstos últimos por el contrario, muestran mayor contenido en pigmentos “accesorios” como son la ficoeritrina y la ficocianina.
- 2) Las diferencias pigmentarias y estructurales ocasionan diferencias fotofisiológicas entre los dos Estadios, que se traducen a su vez en diferencias en los parámetros fotosintéticos. La presencia de los pigmentos “accesorios” en el Estadio III resulta necesaria para al menos igualar la actividad fotosintética del Estadio I.
- 3) Los *sporeling* del Estadio I presentan una respuesta fotosintética más estable y homogénea frente a las variaciones de temperatura y salinidad. Por el contrario, los del Estadio III se muestran más sensibles a estos cambios, que causan fuertes oscilaciones en la respuesta fotosintética, sin un comportamiento de respuesta homogéneo.

II.5. BIBLIOGRAFÍA

Amsler CD, Neushul M (1991) Photosynthetic physiology and chemical composition of spores of the kelp *Macrocystis pyrifera*, *Nereocystis luetkeana*, *Laminaria farlowii* and *Pterygophora californica* (Phaeophyceae). *J Phycol* 27: 26-34

Arnold KE, Littler MM (1985) The carbon-14 method for measuring primary productivity. En: Littler MM, Littler DS (eds). *Handbook of Phycological Methods*. vol 4. *Ecological Field Methods: macroalgae*. Cambridge Univ Press: 377-396

Beach KS, Smith CM, Michael T, Shin H-W (1995) Photosynthesis in reproductive unicells of *Ulva fasciata* and *Enteromorpha flexuosa*: implications for ecological success. *Mar Ecol Prog Ser* 125: 229-237

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

Bell EC (1993) Photosynthetic response to temperature and dessication of the intertidal alga *Mastocarpus papillatus*. *Mar Biol* 117: 337-346

Bird CJ, McLachlan J (1986) The effect of salinity on distribution of species of *Gracilaria* Grev. (Rhodophyta, Gigartinales): an experimental assesment. *Bot Mar* 29: 231-238

Clayton MN (1990) The adaptive significance of life history characters in selected orders of marine brown macroalgae. *Aust J Ecol* 15: 439-452

Clayton MN (1992) Propagules of marine macroalgae: structure and development. *Br phycol J* 27: 219-232

Correa J, Avila M, Santelices B (1985) Effects of some enviromental factors on growth of sporelings in two species of *Gelidium* (Rhodophyta). *Aquaculture* 44: 221-227

Coutinho R, Zingmark R (1987) Diurnal photosynthetic responses to light by macroalgae. *J Phycol* 23: 336-343

Davison IR (1987) Adaptation of photosynthesis in *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) to changes in grown temperature. *J Phycol* 23: 273-283

Davison IR (1991) Enviromental effects on algal photosynthesis: temperature. *J Phycol* 27: 28

Davison IR, Greene RM, Podolek EJ (1991) Temperature acclimatation of respiration and photosynthesis in the brown alga *Laminaria saccharina*. *Mar Biol* 110: 449-454

Deliu T, Walker DA (1972) An improved cathode for the measurament of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol* 71: 201-225

Dring MJ (1981) Chromatic adaptation of photosynthesis in benthic marine algae: an examination of its ecological significance using a theoretical model. *Limnol Oceanogr* 26: 271-284

Einav R, Breckle S, Beer S (1995) Ecophysiological adaptation strategies of some intertidal marine macroalgae of the Israeli Mediterranean coast. *Mar Ecol Prog Ser* 125: 219-228

Falkowski PG, LaRoche J (1991) Acclimation to spectral irradiance in algae. *J Phycol* 27: 8-14

Fletcher RL, Callow ME (1992) The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *Br phycol J* 27: 303-329

Gantt E (1981) Phycobilisome. *Ann Rev Pl Physiol* 28: 335-377

Gantt E (1990). Pigmentation and Photoacclimation. En Cole KM y Sheath RG (eds.). *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press

García-Jiménez P (1994) Aclimatación reproductiva, fisiológica y estructural al cultivo *in vitro* del alga roja *Grateloupia doryphora*. Tesis doctoral. U.L.P.G.C.

Gatusso JP, Jaubert J (1985) Photosynthesis and respiration of *Caulerpa racemosa* (Chlorophyceae, Caulerpales) grown in aquaria: effects of light and temperature. *Bot Mar* 28: 327-332

Geider RJ, Osborne BA (1992) *Algal Photosynthesis: The measurements of algal gas exchange*. Chapman & Hall. London

Glazer A (1984) Phycobilisome. A supramolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochem biophys Acta* 768: 29-51

Hanelt D, Huppertz K, Nultsch W (1992) Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in red algae. *Bot Acta* 105: 278-284

Hanisak MD, Littler MM, Littler DS (1988) Significance of macroalgal polymorphism: intraspecific tests of the functional-form model. *Mar Biol* 99:157-165

Henley WJ (1992) Growth and photosynthesis of *Ulva rotundata* (Chlorophyta) as a function of temperature and square wave irradiance in indoor culture. *J Phycol* 28: 625-634

Henley WJ (1993) Measurement and interpretation of photosynthetic light- response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J Phycol* 29: 279-739

Kain JM, Norton TA (1990) Marine Ecology. En *Biology of the Red Algae*. Cole KM, Sheath RG (eds.). Cambridge University Press

Kirst GO (1989) Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Ann Rev Pl Physiol (Pl molec Biol)* 40: 21-53

Kübler JE, Davison IR, Yarish C (1991) Photosynthetic temperature adaptation in the red algae *Lomentaria baileyana* and *Lomentaria orchadensis*. *Br Phycol J* 26: 9-19

Kübler JE, Davison IR (1993) High-temperature tolerance of photosynthesis in the red algae *Chondrus crispus*. Mar Biol 117: 327-335

Kübler JE, Davison IR (1995) Thermal acclimation of light-use characteristics of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). Eur J Phycol 30: 189-195

Lapointe BE, Rice DL, Lawrence JM (1984) Response of photosynthesis, respiration growth and cellular constituents to hypoosmotic shock in the red alga *Gracilaria tikvahiae*. Comp Biochem Physiol 77A: 127-132

Larcher W (1995) Plants under stress. En Physiological Plant Ecology. Springer-Verlag, New-York.

Lehnberg W (1978) Die Wirkung eines Licht-Temperatur-Salzgehalt Komplexes auf den Gaswechsel von *Delesseria sanguinea* (Rhodophyta) aus der westlinchen Ostee. Bot Mar 21: 485-498

Lindgren A, Aberg P (1996) Proportion of life cycle stages of *Chondrus crispus* and its population structure: A comparison between a marine and estuarine environment. Bot mar 39: 263-268

Littler MM, Littler DS (1980) The evolution of thallus form and survival strategies in the benthic marine macroalgae: field and laboratory tests of functional form model. Am Nat 116: 25-44



Littler MM, Littler DS (1983) Heteromorphic life history strategies in the brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Lyngb.) Link. *J Phycol* 19: 425-431

Lobban CS, Harrison PJ (1994) *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge

López-Figueroa F (1991) Red, green and blue light photoreceptors controlling chlorophyll a, biliprotein and total protein synthesis in the red alga *Chondrus crispus*. *Br Phycol J* 26: 383-393

Lüning K (1990) *Seaweeds. Their Environment, Biogeography and Ecophysiology*. Yarish C, Kiriman H (trans & eds). New York: Wiley-Interscience

Lüning K, Freshwater W (1988) Temperature tolerance of northeast Pacific marine algae. *J Phycol* 24: 310-315

McLachlan IJ, Bird CJ (1984) Geographical and experimental assesment of the distribution of *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gigartinales) in relation to temperature. *Helgol Meeresunters* 38: 319-334

Macler BA (1988) Salinity effects on photosynthesis, carbon allocation and nitrogen assimilation in the red alga *Gelidium coulteri*. *Plant Physiol* 88: 690-694

Macler BA, Zupan JK (1991) Physiological basis for the cultivation of the Gelidiaceae. *Hydrobiologia* 221: 83-90

Madsen TV, Maberly SC (1990) A comparison of air and water as environments for photosynthesis by the intertidal alga *Fucus spiralis* (Phaeophyta). *J Phycol* 26: 24-30

Neale PJ (1987) Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. En Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ (eds). *Topics in Photosynthesis*, Vol 9. Elsevier, Amsterdam

Nellen UR (1966) Über die einfluss des Salzgehaltes auf die photosynthetische Leistung verschiederner Standortformen von *Delesseria sanguinea* and *Fucus serratus*. *Helgol Meeresunters* 13: 288-313

Pakker H, Breeman AM, Prud'homme van Reine WF, van den Hoek C (1995) A comparative study of temperature responses of Caribbean seaweeds from different biogeographic groups. *J Phycol* 31: 499-507

Parker HS (1982) Effects of the simulated current on the growth rate and nitrogen metabolism of *Gracilaria tickvahiae* (Rhodophyta). *Mar Biol* 69: 137-145

Prézelin BB (1981) Light reactions in photosynthesis. *Can Bull Fish Aquat Sci* 210: 1-43

Prince JS (1980) The ecology of *Sargassum pteropleuron* Grunow (Phaeophyceae, Fucales) in the water of south Florida. II. Seasonal photosynthesis and respiration of *S. pteropleuron* and comparison of its phenology with that of *S. polyceratium* Montagne. *Phycologia* 19: 190-193

Ramus J (1981) The capture and transduction of light energy. En Lobban CS, Wynne MJ (eds.). The Biology of the Seaweeds. Univ California Press. Berkeley : 458-492.

Ramus JS (1990) A form-function analysis of photon capture for seaweeds. Proc Intl Seaweeds Symp 13: 65-71

Ramus JS, Rosenberg G (1980) Diurnal photosynthetic performance of seaweed measured under natural conditions. Mar Biol 56: 21-28

Ramus JS, Van der Meer JP (1983) A physiological test of the theory of the complementary chromatic adaptation. I. Color mutant of a seaweed. J Phycol 19: 86-91

Reed RH (1979) The osmotic responses of *Porphyra purpurea* (Roth) C. Ag. Tesis doctoral. University of Liverpool.U.K.

Reed RH (1990) Solute accumulation and osmotic adjustment. En Cole KM, Sheat RG (eds), Biology of Red Algae. Cambridge University Press:147-170

Richardson K, Beardall J, Raven JA (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. New Phytol 93: 157-191

Robaina RR (1988) Biotecnología del cultivo *in vitro* de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis doctoral. U.P.C.

Robaina RR, García P, García-Reina G, Luque A (1990) Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. J appl Phycol 2: 137-143

Russell G (1987) Salinity and seaweed vegetation. En Crawford RM (ed). Plant life in aquatic and amphibious habitats. Blackwell Scientific, Oxford : 35-52

Sachs L (1982) Applied statistics: A Handbook of Techniques. Springer-Verlag. New-York

Santelices B (1990) Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. Oceanogr mar Biol A Rev 28: 177-276

Seely RG, Duncan MJ, Vidaver WE (1972) Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dymethyl sulfoxide. Mar Biol 12: 184-188

Smith CM, Berry J (1986) Recovery of photosynthesis after exposure of intertidal algae to osmotic and temperature stresses: comparative studies of species with different distributional limits. Oecologia 70: 6-12

Surif MB, Raven JA (1990) Photosynthetic gas exchange under emersed conditions in eulitoral and normally submersed members of the Fucales and Laminariales: interpretation in relation to C isotope ratio and N and water use efficiency. Oecologia 82: 68-80

Vergara JJ, Niell FX (1993) Effects of nitrate availability and irradiance on internal nitrogen constituents in *Corallina elongata* (Rhodophyta). J Phycol 29: 285-293

Walker DA, Osmond CB (1986) Measurement of photosynthesis in vivo with a leaf disc electrode: correlations between light dependence of steady-state photosynthetic O₂ evolution and chlorophyll *a* fluorescence transients. Proc R Soc Lond B 227: 267-280

Wheeler WN (1980) Pigment content and photosynthetic rate of the fronds of *Macrocystis pyrifera*. Mar Biol 56: 97-102

Yokoya N, Oliveira E (1993) Effects of temperature and salinity on spore germination and sporeling development in South American agarophytes (Rhodophyta). Jpn J Phycol 41: 283-293

Zupan JR, West J (1990) Photosynthetic responses to light and temperature of the heteromorphic marine alga *Mastocarpus papillatus* (Rhodophyta). J Phycol 26: 232-239

Capítulo III: Alteraciones morfológicas y fotofisiológicas en el Estado III por el efecto del fotoperiodo.

III.1. INTRODUCCIÓN.

Se ha demostrado que el fotoperiodo induce cambios genéticos que se traducen en cambios fenotípicos (morfológicos, fenológicos y fisiológicos) (Kosovel y Talarico, 1979; Rietema, 1984; Ekman y Pedersén, 1990; Lüning, 1992). El fotoperiodo es el régimen de horas de luz:oscuridad que recibe un vegetal y constituye, junto a la irradiación y la calidad espectral, una característica fundamental de la luz.

La aclimatación fisiológica es la expresión de los ajustes que un organismo puede realizar en función de los cambios del medio, pero siempre dentro de los límites de su genoma (Levy y Gantt, 1988) y que ocurre en una escala de tiempo comparable a la generación de una célula (Falkowski y LaRoche, 1991). Se diferencia de la adaptación, en que esta última implica cambios en el genoma (Ramus, 1981).

Muchas especies de fitoplancton muestran una plasticidad fisiológica importante y son capaces de responder a grandes variaciones en el régimen de luz: la irradiancia, composición espectral (adaptación cromática) y el fotoperiodo (Wyman y col., 1985; Johnsen y Sakshaug, 1996). En macroalgas, la fotoaclimatación se ha estudiado a nivel estructural y ultraestructural (Post y col., 1984, Berner y col., 1989), y fisiológico (contenido de pigmentos y lípidos, Sukenik y col., 1990; fotosíntesis y tasa de crecimiento, Falkowski y col., 1985), pero siempre referidos a los cambios en la calidad espectral e intensidad de la luz. Apenas existen trabajos que consideren el ciclo de luz:oscuridad como factor causante de fotoaclimatación.

La aclimatación a la luz o fotoaclimatación generalmente se caracteriza por: (1) Cambios en la cantidad y ratios de los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, y (2) Cambios en los parámetros fotosintéticos que a su vez incluyen alteraciones en la actividad enzimática implicada en la fotosíntesis y la respiración y cambios en el volumen de la célula, tasa de respiración y composición química.

Las algas cuentan con tres grupos de pigmentos capaces de captar el rango completo de

longitudes de onda en el espectro visible: las clorofilas, los carotenoides y las ficobiliproteínas (Tabla III.1). Este último grupo de pigmentos es característico de las algas rojas y cianobacterias.

Tabla III.1. Principales pigmentos encontrados en algas rojas.

Pigmentos	Referencias
Clorofilas: clorofila <i>a</i>	(Jeffrey, 1980)
Carotenos: α -caroteno	(Sagert y Schubert, 1995)
β -caroteno	(Bjornald y col., 1984)
Xantofilas:	
luteína	(Bjornald y col., 1984)
zeaxantina	(Bjornald y col., 1984)
Ficobiliproteínas:	
R-ficoeritrina	(Larkum y Barret, 1983)
B-ficoeritrina	
R-ficocianina	
C-ficocianina	
aloficocianina (I,II y III)	

La clorofila *a* es esencial para captar luz para la fotosíntesis y se encuentra en todas las algas. La mayoría de los otros pigmentos forman parte de las antenas captadoras de luz, y conducen la energía a los centros de reacción fotosintéticos. Los tipos de ficobiliproteínas más importantes son la ficocianina, la ficoeritrina y la aloficocianina. Su rango de absorción máxima se encuentra entre 500-650 nm. Este hecho permite a las algas rojas llenar o completar la

"ventana verde" entre los picos de absorción de la clorofila α .

Las ficobiliproteínas (o biliproteínas) son proteínas coloreadas formadas por grupos tetrapirrólicos de cadena abierta, constituidos por el cromóforo (bilinas), unidos covalentemente a apoproteínas (polipéptidos). Las ficobiliproteínas son una familia de proteínas homólogas formadas, en general, por dos cadenas polipeptídicas diferentes, las subunidades α y β (de 17 a 22 Kdaltons), y en el caso de la B-ficoeritrina y R-ficoeritrina, además aparece una tercera subunidad, γ . A diferencia de los otros pigmentos, las ficobiliproteínas no se disponen dentro de las membranas de los tilacoides, sino que forman complejos supramoleculares, fuertemente agregados, que pueden observarse en la superficie de los tilacoides al microscopio electrónico y reciben el nombre de ficobilisomas. Son estos ficobilisomas los que principalmente realizan la captación de luz y la dirigen mayoritariamente al fotosistema II (Gantt, 1980).

En algas rojas, no está clara la contribución de carotenoides específicos a la fotosíntesis, exceptuando el β -caroteno, que es activo en el fotosistema I y probablemente también en el II. Parece que el papel principal de los carotenoides sea el de agentes fotoprotectores de factores como la luz y el oxígeno, evitando así la fotooxidación (Larkum y Barret, 1983).

Las algas son capaces de regular su composición pigmentaria en respuesta a la calidad y la intensidad de la luz natural (Kirk, 1983; López-Figueroa y Niell, 1991). La respuesta a una disminución en la irradiancia generalmente se corresponde con un incremento en la proporción de los pigmentos fotosintéticos. Todos los pigmentos no se incrementan del mismo modo y normalmente son los pigmentos accesorios captadores de luz, las ficobiliproteínas en el caso de las rodofitas, las que aumentan su contenido con respecto a la clorofila α , que permanece relativamente constante. En condiciones de alta

irradiancia, por el contrario, el contenido de pigmentos fotosintéticos es más bajo, eliminándose el riesgo de los procesos de fotodestrucción (inhibición irreversible del aparato fotosintético) y fotoinhibición. De forma general, en intensidades lumínicas bajas, la “planta” invierte mayor energía en la síntesis de pigmentos captadores de luz; en condiciones de irradiancias altas sin embargo, esta energía se reconduce a la síntesis de enzimas fotosintéticas y componentes de la cadena de electrones (Lüning, 1990).

Entre los autores que han estudiado el efecto de la intensidad lumínica sobre el número y composición de los ficobilisomas (Sukenik y col., 1990; revisión de Falkowski y LaRoche, 1991), son muy pocos los que lo han trabajado con rodofitas. Los ficobilisomas son variables en tamaño, número y composición y en general, se han descrito dos tipos de respuestas a la intensidad lumínica en las algas rojas. En la primera respuesta, a bajas irradiancias, el tamaño del ficobilisoma aumenta, seguido por un incremento en el número de ficobilisomas, pero sin modificación alguna en su estructura; En la segunda, tanto el número como la estructura de los ficobilisomas se modifica, con una pérdida específica de la ficoeritrina en altas irradiancias (Levy y Gantt, 1988; Cunningham y col., 1989; Algarra y Niell, 1990; Algarra y Rüdiger, 1993).

Las algas también responden a cambios en la composición espectral de la luz mediante la alteración tanto del contenido total, como del balance entre los diferentes pigmentos fotosintéticos.

Está demostrado que la aclimatación a diferentes calidades espectrales ocurre en numerosas especies de algas y cianobacterias que contienen ficobilisomas. Generalmente, el crecimiento con luz roja y naranja estimula la producción de ficobiliproteínas que absorben longitudes de onda largas (principalmente ficocianina), mientras que bajo luz verde, aumenta el contenido de ficoeritrina (FE), que absorbe longitudes menores, en detrimento

de la ficocianina (FC). Como resultado, se pueden observar cambios en la relación FE/FC (Tandeau de Marsac y col., 1988; Ohki y Fujita, 1994).

Respecto al fotoperiodo o longitud del día, son muy escasas las referencias que citan el fotoperiodo como una componente de la luz capaz de provocar una aclimatación. Falkowski y LaRoche en su revisión sobre la aclimatación en las algas (1991) no consideran que el ciclo luz-oscuridad provoque aclimatación fisiológica alguna, basándose únicamente en las conclusiones del artículo de Post y col. (1984). En este trabajo realizado con la diatomea *Thalassiosira weissflogii*, las células sometidas a un ciclo de 12 h luz:12 h oscuridad, adquirieron una periodicidad en el contenido clorofílico celular, que se interpretó no como una aclimatación a un ciclo de luz-oscuridad, sino como un comportamiento oscilatorio en torno a la irradiancia media durante el fotoperiodo.

Sin embargo, otros trabajos demuestran que el fotoperiodo puede provocar cambios a niveles fisiológicos, tales como, diferencias en la composición de los ácidos grasos (Floreto y col., 1993) y en la composición de agar (Ekman y Pedersén, 1990).

Diferentes estudios bioquímicos y fisiológicos han demostrado que, en la modulación del contenido de pigmentos fotosintéticos están implicados fotorreceptores específicos. Un fotorreceptor en un pigmento que además de absorber la luz, puede también transducir la señal de la luz (Rüdiger y López-Figueroa, 1992). Los fotorreceptores además, regulan la respuesta al fotoperiodo (Breeman y ten Hoopen, 1987) y afectan al crecimiento y desarrollo (Dring, 1988; Lüning, 1992; Figueroa y col., 1995).

Estructura y aclimatación del ficobilisoma.

Los casos mencionados anteriormente, hacen referencia al contenido en ficobiliproteínas de la célula. No obstante, la organización o estructuración del ficobilisoma responde también a cambios en la luz.

Los ficobilisomas (FBS) se componen exclusivamente de proteínas: ficobiliproteínas y polipéptidos de enlace, *linkers*, que sirven de unión entre las distintas biliproteínas, manteniendo una estructura ordenada y anclada a las lamelas fotosintéticas (Gantt, 1981, Bryant, 1991, Grossman y col., 1994)

De las distintas observaciones realizadas sobre la morfología de los FBS destaca la existencia de dos tipos: uno de tipo hemidiscooidal, más frecuente en cianobacterias (Bryant y col., 1979) y en algunas algas rojas (*Rhodella violacea*, Bernard y col., 1996), y el tipo elipsoidal, que parece ser más común en la mayoría de las rodofitas (Algarra y col., 1990; Talarico, 1996). No ha sido posible hasta la fecha, establecer mediante la microscopía electrónica un modelo detallado, debido a la compleja estructura de numerosas biliproteínas superpuestas.

Los cilindros del ficobilisoma están compuestos por diferentes proporciones de ficocianina (FC), ficoeritrina (FE) que están apilados en discos hexaméricos y que constituyen las unidades funcionales. La aloficocianina (AFC), que forma el núcleo, es el único componente estable de los ficobilisomas (Algarra y Rüdiger, 1993) mientras que la FC y sobre todo la FE varía considerablemente tanto a corto como a largo plazo, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Estas condiciones incluyen la calidad y cantidad de luz (Algarra y col., 1990; Talarico y Cortese, 1993), la disponibilidad de nutrientes (Bird y col., 1982; Vergara y Niell, 1993), la presencia de contaminantes y la estacionalidad en el ciclo anual (Talarico y Kosovel, 1983).

En los ficobilisomas de diversa composición biliproteica, como los de las rodofitas, sus componentes siempre se organizan en orden de absorción máxima. Es decir, FE en la periferia, FC en el centro y los complejos de AFC muy cerca de los centros de reacción, en la membrana del tilacoide. La energía siempre se transfiere vía $FE \rightarrow FC \rightarrow AFC$ a través de

los cromóforos. La energía de cualquier fotón absorbido es transferida a unos pocos aceptores terminales con muy pocas pérdidas en el proceso (Glazer, 1985, 1989).

La R-ficoeritrina (R-FE) está compuesta por monómeros $(\alpha\beta)$, trímeros $(\alpha\beta)_3$, tetrameros $(\alpha\beta)_4$, hexámeros $(\alpha\beta)_6$ y dobles hexámeros $(\alpha\beta)_6 \gamma^+$ $(\alpha\beta)_6 \gamma'$. La R-FE, debido a su localización (formando los discos hexaméricos periféricos del ficobilisoma), parece jugar un importante papel en las respuestas de las algas a la luz. Algarra y col (1991) sugieren un papel fisioecológico para este pigmento como resultado de su rápida capacidad de asociación y disociación, que permite una sencilla aclimatación del ficobilisoma. Las distintas ficoeritrinas de las diferentes especies de rodofitas, analizadas tanto por métodos bioquímicos (cromatografía y electroforesis) como estructuralmente (microscopía electrónica de transmisión), no mostraron diferencias sustanciales entre ellas (Honsell y col., 1984).

Se ha demostrado que la FE se puede acumular en exceso a su requerimiento como pigmento captador de luz (Ramus y Van der Meer, 1983). La síntesis y acumulación de pigmentos ocurre en función de la disponibilidad de nutrientes (López-Figueroa, 1991; Vergara y Niell, 1993) y no toda la FE disponible tiene como función la optimización de la fotosíntesis. Un contenido máximo de pigmentos no se traduce siempre en una actividad fotosintética máxima como podría pensarse *a priori*. Además de las concentraciones de pigmentos y sus ratios medidas a corto y largo plazo, tampoco existe una relación directa entre el contenido pigmentario y la tasa fotosintética, ya que se debe tener en cuenta que los ficobilisomas estén bien ensamblados (Talarico, 1996). Tras más de tres años de muestreo con *Gracilaria*, Kosovel y Talarico (1979) demostraron que el contenido mayor en biliproteínas no correspondía con un ficobilisoma bien estructurado. Las relaciones entre el contenido pigmentario, la tasa fotosintética y la cantidad y calidad de luz son todavía hoy en día motivo de discusión.

Mediante la clonación y secuenciación de genes se ha demostrado, que la mayoría de los genes del FBS, en las algas rojas, se localizan en el genoma del cloroplasto y por ello se transcriben y traducen en él (Reith y Munholland, 1993; Apt y Grossman, 1993a, b; Roell y Morse, 1993). En cambio, los genes que codifican los *linkers* de la FE se localizan en el genoma nuclear y se traducen en los ribosomas 80 S en el citoplasma (Apt y Grossman, 1993a, b).

En general, se conoce muy poco acerca de los aspectos dinámicos de las estructuras elipsoidales de los ficobilisomas, en relación al contenido pigmentario y a los factores que favorecen el ensamblaje de los ficobilisomas. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo con los ficobilisomas hemidiscoidales de las cianofitas (Tandeu de Marsac, 1983; Glazer, 1985; Sidler, 1994; Grossman y col., 1994) y abarcan aspectos como el detalle de su estructura, forma, tamaño, contenido pigmentario y acumulación de nitrógeno y azufre bajo la adaptación cromática y a nivel de expresión génica. Se conoce mucho menos sobre su formación y ensamblaje como respuesta a la luz y en relación a la tasa fotosintética, y nada sobre el efecto del fotoperiodo como factor causante de variaciones en estas estructuras.

Son muy pocos los estudios llevados a cabo con algas rojas, siendo muy común el uso de algas rojas unicelulares como *Porphyridium cruentum* o *Rhodella violacea*, mantenidas o crecidas en cultivo y adaptadas a condiciones específicas de calidad e intensidad de luz, sin haber experimentado nunca con el fotoperiodo (Algarra y Rüdiger, 1993; Sagert y Schubert, 1995). De la misma forma, los trabajos realizados con *Porphyridium cruentum* tienen una validez relativa para la comparación con macroalgas rojas, porque es un organismo unicelular con una relación filogenética desconocida y difícilmente comparable a un alga macrófita (Garbary y Gabrielson, 1990; Sagert y Schubert, 1995).

Sabíamos por experiencias anteriores (Capítulo II) que los *sporelings* de *Grateloupia doryphora* cultivados en las condiciones control de la cámara, presentaban además de cambios fisiológicos, alteraciones en el contenido pigmentario ligados a su desarrollo. Basándonos en el conocimiento de estos cambios, nos planteamos partiendo de *sporelings* del Estadio I, probar si el desarrollo en los diferentes fotoperiodos provocaría una reconducción en el patrón de la expresión génica “normal” en la síntesis de pigmentos y a nivel de estructuración del ficobilisoma. Al mismo tiempo, deseábamos estudiar si el efecto de la temporización de la luz (fotoperiodo) puede considerarse como una componente de la luz causante de aclimatación. Para ello, se realizó un seguimiento del contenido pigmentario, de la actividad fotosintética y de las modificaciones en la estructura y ensamblaje de los ficobilisomas, acompañan a los cambios morfológicos en talos adultos mantenidos durante su desarrollo en diferentes fotoperiodos.

III.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para este ensayo se emplearon algas bien pigmentadas que se encontraban en el Estadio III de la curva de crecimiento, ya mencionada en los capítulos anteriores (Figura 2), y que se habían obtenido partiendo del Estadio I cultivados en los fotoperiodos: 8:16 (8 horas luz: 16 oscuridad), 12 h:12 h y 16 h:8 h (control) , en medio PES líquido. Las condiciones iniciales de cultivo del Estadio I se correspondían con las del control: medio PES, fotoperiodo 16:8, 19 ± 2 °C, $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para acometer este experimento fue necesario acondicionar la cámara de cultivo, instalándose para ello temporizadores programables en cada una de las bandejas que permitían controlar el encendido y apagado de las luces de forma automática. Con el fin de evitar interferencias de luz entre los distintos fotoperiodos, se aisló cada una de las bandejas de la cámara con una doble malla de invernadero y se controló la temperatura interna en cada bandeja. De esta manera, se aseguró que la refrigeración central de la cámara era adecuada y que en el interior de las bandejas cubiertas no se acumulaba calor, permaneciendo la temperatura constante ($19 \pm 2^\circ\text{C}$).

Durante el desarrollo de los *sporelings* desde el Estadio I hasta el III en los distintos fotoperiodos, se llevó a cabo un seguimiento de su tasa de crecimiento, y de características morfológicas como son el índice longitud de los ejes de crecimiento y la presencia o no de ramificación dicotómica y ramificaciones laterales.

La tasa de crecimiento específica se calculó en base a una serie temporal de cambios en el peso fresco semanal y se expresó como el porcentaje del incremento del parámetro biomasa fresca por día. El índice longitud de los ejes de crecimiento (cm) representa el promedio de las longitudes de 5-6 ramas de diferentes matas esféricas cultivadas en los distintos fotoperiodos. La longitud se tomaba desde el inicio del eje (en el centro de la mata esférica) hasta el ápice del mismo.

Análisis del contenido pigmentario.

Para conocer en detalle las diferencias entre el contenido pigmentario entre el Estadio I y el III tras permanecer este último en los distintos fotoperiodos, se llevó a cabo, por una parte, la extracción de clorofilas y carotenos que se identificaron y cuantificaron por medio de la cromatografía líquida (HPLC) y por otra, la extracción y cuantificación de las ficobiliproteínas por métodos espectrofotométricos.

Para la extracción de clorofilas y carotenos se tomaron, de los individuos del Estadio III, 3 muestras de 500 mg de peso fresco por cada uno de los fotoperiodos probados (8 h luz: 16 h oscuridad, 12:12 y 16:8) y dos muestras de 26 mg (peso fresco) de individuos pertenecientes al Estadio I. La extracción se llevó con ayuda de un mortero y arena de mar esterilizada, en metanol al 90 %. Como precaución para evitar la degradación de los pigmentos, todas las operaciones se realizaron en frío y bajo luz tenue. Tras clarificar los extractos mediante centrifugación (Beckman, rotor JA 20.1 a 3.000 rpm y 0 °C durante 5 min), se inyectaron directamente 500 µL de cada muestra en el cromatógrafo y se procedió según lo descrito por Van Lenning (1995).

La extracción y cuantificación espectrofotométrica de las ficobiliproteínas (R-ficoeritrina, R-ficocianina) en el Estadio I y en los diferentes tratamientos de fotoperiodo del Estadio III se llevó tal y como se explicó detalladamente en el Capítulo anterior.

Medidas de las tasas fotosintéticas.

Para ver si la actividad fotosintética entre los individuos del Estadio III crecidos bajo los diferentes fotoperiodos variaba, se realizaron 7 curvas P-I por cada tratamiento. Para ello, se utilizó el electrodo de oxígeno computarizado Hansatech, de la misma manera y condiciones estándar ya explicadas en el Capítulo II. Todas las medidas se realizaron

utilizando 10 mg (peso fresco) de talos escogidos al azar de cada uno de los tratamientos.

Para cada una de las curvas obtenidas, se calculó el parámetro fotosintético de Fotosíntesis máxima (P_{max}).

Aislamiento de ficobilisomas.

Los ficobilisomas pueden separarse de las lamelas fotosintéticas mediante un tratamiento con un detergente suave, y aislarse sin perturbar su estructura y función. El aislamiento de los ficobilisomas se llevó a cabo a partir de los procedimientos descritos por Gray y Gantt (1975) y Wyman (1992), y adaptados a la infraestructura técnica disponible en nuestro laboratorio.

El aislamiento de los ficobilisomas comenzó con la homogeneización, en frío, de cada una de las muestras (300 mg de peso fresco) en un mortero de porcelana con arena de mar lavada y 10 mL de tampón fosfato 0,65 M y pH=7, a los que se añadía 1 mL de la solución de NaN_3 10 mM, 100 μL de la solución de PMSF (fenilmetilsulfonilfluoruro) y 100 μL del detergente Triton X-100. La pasta resultante se transfería a erlenmeyers que permanecían en constante agitación, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 45 min. Las preparaciones se clarificaban primeramente con una centrifugación moderada a 3.000 rpm a 4 °C durante 5 min, para retirar el precipitado formado por las partículas más grandes, y otra posterior, de 13.000 g a 4 °C durante 10 min.

Por cada muestra, se recogían 8 mL de sobrenadante, volumen que se disponía en el gradiente de densidad de sacarosa en tampón fosfato 0,65 M (pH=7) formado por las siguientes fracciones: 6mL de 0,25 M, 6 mL de 0,5 M, 6 mL de 0,75 M, 6 mL de 1 M, 6 mL de 1,5 M y 4 mL de 2M. El gradiente, una vez cargado, se dejaba en la centrifugadora (Beckman J-25, rotor JA 20.50) durante toda la noche (21-22h) a 40.000 g y 4 °C.

Las soluciones stock necesarias para el aislamiento de estas estructuras fueron:

NaN₃ 10 mM: 0,033 g de NaN₃ en 50 mL de agua destilada

10 mM PMSF: 0,0087 g de PMSF en 50 mL de agua destilada

Gradiente de sacarosa para 50 mL de tampón fosfato 0,65 M

Molaridad (M)	Sacarosa (g)
0,25	4,28
0,50	8,55
0,75	12,84
1,00	17,12
1,50	25,67
2,00	34,23

En el gradiente ya formado (Figura III.1), la ficoeritrina libre conformaba una banda de color rosa intenso y se recobró en la fracción de 0,5 M de sacarosa. Los ficobilisomas agregados se recuperaron en forma de sedimento pegado a la pared del tubo en la fracción de 1,5 M de sacarosa. Tras recoger cuidadosamente los precipitados de ficobilisomas de todas las muestras del gradiente, se resuspendieron en *eppendorfs* con ayuda de un vórtex, en 1 mL del mismo tampón fosfato, para realizar posteriormente la electroforesis.

Para cada una de las repeticiones, partimos de 300 mg de peso fresco por cada uno de los fotoperiodos estudiados con 3 réplicas y tres repeticiones cada uno.

Figura III.1. Resultado de la centrifugación (22 horas) del extracto del alga en gradiente de sacarosa (0,25-2 M). Nótese la banda de ficoeritrina libre en la fracción de 0,5 M de sacarosa (FE_L) y el sedimento pegado a la pared del tubo constituido por agregados de ficobilisomas en la fracción 1,5 M (FBS)



Determinación de proteína total y del contenido de ficoeritrina.

Se llevaron a cabo determinaciones tanto de proteína total como de ficoeritrina con el fin de comprobar la cantidad de proteína y ficoeritrina contenida en cada una de las fracciones del gradiente.

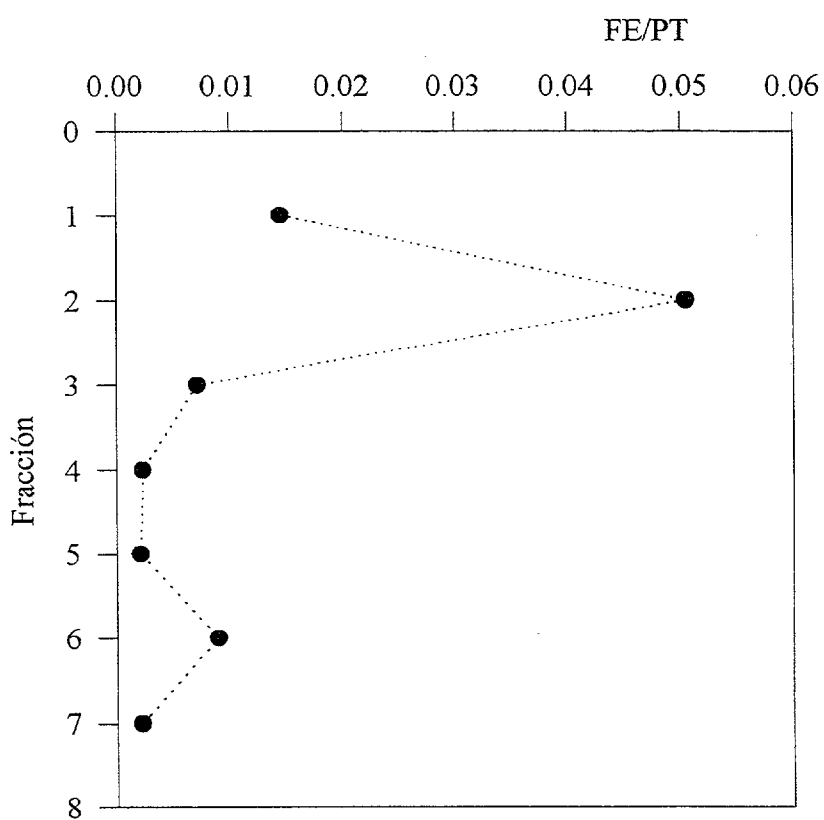
La proteína total se cuantificó mediante el kit y el método propuesto por Sigma Co. (Sigma Procedure nº TPRO-562, producto nº B-9643), que consiste en añadir a 50 μ L de muestra 2 mL de un reactivo compuesto por 1 parte de sulfato de cobre (II) pentahidratado (C-2284) por 50 partes de una solución de ácido bicinconínico (B-9643).

Tras incubar la mezcla durante 30 min a 37 °C, las muestras adquirirían un color púrpura y se medían en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Con el valor de la absorbancia, se calculaba la concentración de proteína total (μ g) en una curva de calibrado que se había realizado previamente con el estándar de proteína que adjunta el kit.

Las determinaciones de ficoeritrina se realizaron según el procedimiento expuesto anteriormente en el Capítulo II.

Al representar la relación ficoeritrina libre media y proteína total media (FE/PT) de las distintas fracciones obtenidas a partir de gradientes de densidad de sacarosa, se obtuvo la gráfica del perfil (Figura III.2) donde se muestra que la mayor parte de la ficoeritrina y proteína total se acumulan en las fracciones 2 y 6 correspondientes a las fracciones de 0,5 M y 1,5 M de sacarosa respectivamente; en la de 0,5 M se acumula ficoeritrina libre (no asociada al ficobilisoma) que aparece a modo de una banda rosa intenso en el gradiente, mientras que en la de 1,5 M se obtiene un precipitado de ficobilisomas.

Figura III.2. Relación de ficoeritrina y proteína total (FE/PT) cada 6 ml a lo largo del gradiente de sacarosa, desde la superficie (fracción 1) hasta el fondo del tubo (fracción 7).



Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La precipitación del sedimento del ficobilisomas, resuspendido en tampón fosfato, se realizó añadiendo TCA (ácido tricloroacético) al 15% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una relación de 1 volumen de muestra: 3 volúmenes TCA, durante 1 h. Tras descongelar las muestras, se centrifugaron (Beckman microfuge Lite) durante 15 min a 20.000 rpm. Se desechó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 60 μL de una solución de Tris 0,2M (pH= 8,8) al 15% sacarosa, 3% SDS (dodecil sulfato sódico, p/v) y 1mM de β -mercaptoetanol. Las muestras si no eran inmediatamente sometidas a la electroforesis, se etiquetaban y guardaban en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La separación de los polipéptidos de los ficobilisomas se llevó a cabo mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, con el detergente iónico SDS como agente disociador, y discontinua, (gel de separación = 12%; gel de concentración = 5 %) en gel de acrilamida de 0,3-0,4 mm de espesor.

Para la realización de los geles fue necesario preparar las siguientes soluciones stock:

Tampón de concentración: (Tris HCl 0,5 M, pH= 6,8)

6 g de TRIS (Trishidroximetilaminoetano) en 40 mL de agua destilada, 40 mL de HCl 1 M. Llevarlo a 100 mL con agua destilada y ajustar el pH a 6,8

Tampón de resolución o separación: (Tris HCl 3 M, pH= 8,8)

36,3 g de TRIS en 40 mL de HCl 1 M. Llevarlo a 100 mL con agua destilada y ajustar el pH a 8,8

Acrilamida-bisacrilamida: (30:0,8)

Mezclar 30 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida en 100 mL de agua destilada.

Esta solución, por su neurotoxicidad requiere mucha cautela en su preparación y manipulación y, se conserva en la nevera a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1-2 meses.

Persulfato amónico al 15 %: 1,5 g en 10 mL de agua destilada. Es conveniente preparar esta solución cada vez que se realice un gel nuevo.

Previamente a la realización del gel, se limpió todo el material de la electroforesis con etanol, insistiendo en los cristales, para luego montar con las varillas y la vaselina la cubeta donde se vertían los geles. Para delimitar la altura del gel de separación, se dibujó una raya sobre el cristal a 1,5 cm del borde inferior del peine.

Los geles de concentración (5%) y de resolución (12%) se realizaron mezclando en vasos de precipitados los siguientes volúmenes de soluciones:

Gel de concentración al 5 %	
Sol. Acrilamida-bisacrilamida 30:0,8	2,5 mL
Sol. Tampón de concentración	5 mL
Agua destilada	11,5 mL
Persulfato amónico (15%)	1 mL
Catalizador TEMED (Tetrametiletilendiamina)	15 μ L

Gel de resolución al 12 %	
Sol. Acrilamida-bisacrilamida 30:0,8	17 mL
Sol. Tampón de resolución	5 mL
Agua destilada	18 mL
Persulfato amónico (15%)	2 mL
Catalizador TEMED	20 μ L

Una vez preparadas las dos soluciones del gel, se vertía entre los cristales; en primer lugar se preparó y vertió el gel de resolución hasta la marca del cristal, evitando la

formación de burbujas, y se enrasó con agua destilada. Tras 10-15 min, una vez que se observaba el frente formado, se retiraba el agua y se procedía de la misma manera con el gel de concentración. El peine se colocaba antes de que este último endureciera y se sacaba cuidadosamente tras 15 min. Los pocillos formados se llenaban con agua destilada para evitar su deformación.

Para preparar las soluciones tampón de las bandeja superior e inferior de la electroforesis, se partió de las siguientes soluciones stock:

SDS al 20 %: 10 g de SDS en 50 mL de agua destilada.

Esta solución conviene renovarla mensualmente.

Solución de TRIS-Glicina: 144 g de glicina y 30,3 g de TRIS llevados a 1L de disolución con agua destilada.

Se diluye 1/10 (v/v) la solución de TRIS-Glicina (100 mL) en agua destilada (1L) y se ajusta el pH a 8,3. La mitad del volumen de esta nueva solución (500 mL) se vierten en la bandeja inferior de la cubeta de electroforesis, mientras que a los 500 mL restantes se les añade 8 mL de la disolución de SDS al 20 % y se coloca en la cubeta superior.

Las muestras (60 μ l), previas a ser colocadas en los pocillos del gel, se tiñeron con 10 μ l de azul de bromofenol al 1%. Con la ayuda de una microjeringa, se inyectaron 30 μ L por pocillo. Cada muestra estaba representada en dos pocillos. Para poder estimar las masas moleculares aparentes de los polipéptidos se emplearon los estándares de proteínas Seroalbúmina Bovina 66.000 Da; Fumarasa 48.500 Da y Anhidrasa carbónica 29.000 Da (Sigma Co.).

Una vez cargado el gel, se aplicaba una corriente continua de 25 mA y 100-150 V

durante 6-7 horas, tiempo suficiente para que las proteínas migraran verticalmente sin difundir. A continuación se recuperó el gel y se llevó a cabo su tinción y posterior destinción, siguiendo el protocolo común descrito por Hammes y Rickwood (1981).

La solución de tinción se realizó con 0,5 g de azul de Coomasie disueltos en 250 mL de agua destilada, 250 mL de metanol y 100 mL de ácido glacial acético. Esta solución se filtró y se puso en contacto con el gel, permaneciendo en agitación constante y cubierta con papel de aluminio durante toda la noche. Para su destinción, se utilizó la misma solución pero sin azul de Coomasie, la cual se renovaba a medida que desteñía el gel y hasta que las bandas aparecían claras, cuidando de no perder resolución por una excesiva destinción.

Las bandas resueltas se observaron y fotografiaron en un transiluminador. Posteriormente y para su conservación, se procedió al secado de los geles, utilizando papel de filtro como soporte, en un secador de geles Drygel Sr. SE-1160, conectado a una bomba de vacío durante 1 hora, a 60 °C.

Los experimentos de aislamiento de los ficobilisomas y electroforesis se repitieron 5 veces con los mismos resultados.

III.3. RESULTADOS

Tras 3 meses de cultivo en los distintos fotoperiodos, las algas presentaron entre ellas diferencias apreciables en aspectos como la longitud de los ejes de crecimiento, presencia de ejes secundarios y ramificación (Figura III.3; Tabla III.2). Las cultivadas en el fotoperiodo control (16:8) presentaban ejes de crecimiento mayores y ramificación dicotómica. Las algas bajo menos horas de luz (fotoperiodo corto, 8:16) mostraron los ejes de crecimiento más pequeños. A diferencia de los otros fotoperiodos (12:12, 16:8), únicamente las algas cultivadas en el corto no desarrollaron ramificaciones laterales.

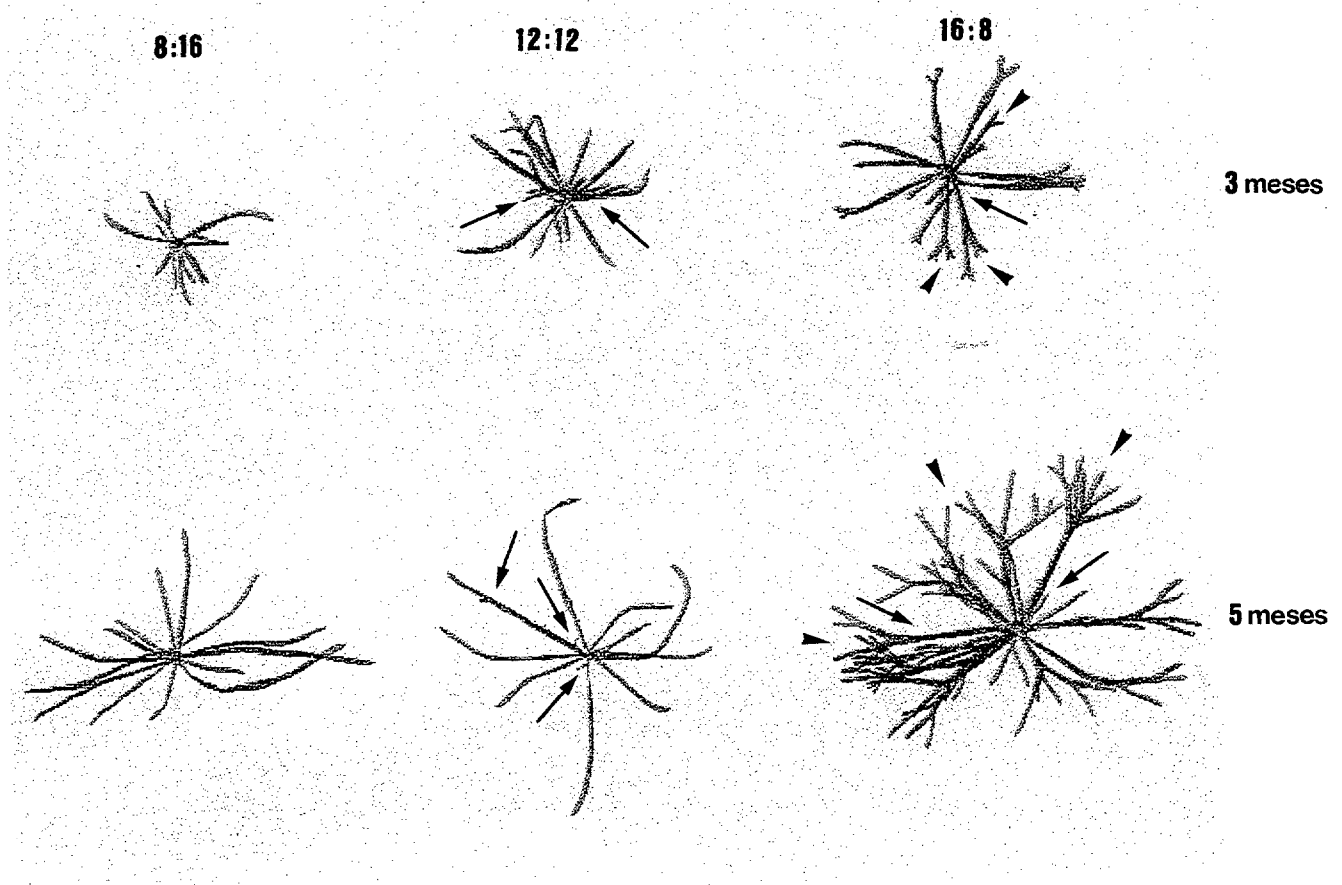
A los 5 meses, las diferencias en la longitud de los ejes de crecimiento, entre las algas de los distintos tratamientos, disminuyeron mostrándose tan sólo ejes de crecimiento ligeramente mayores en el fotoperiodo control. La ramificación dicotómica se mantuvo en el fotoperiodo largo, mientras que, las ramificaciones laterales continuaron ausentes en el corto (8:16) y fueron más numerosas en el fotoperiodo medio (12:12)

Las tasas de crecimiento de todas las algas del Estadio III no mostraron diferencias significativas durante el crecimiento en todos los fotoperiodos (Tabla III.2; Figura III.3).

Tabla III.2. Características morfológicas de *G. doryphora* a los 3 y 5 meses de cultivo en distintos fotoperiodos. Tasas de crecimiento expresadas como el porcentaje del incremento del peso fresco por día. Longitud de los ejes de crecimiento (cm). Valores semicuantitativos de la ramificación dicotómica y ramificaciones laterales: (-) = no observado nunca, (+++) = máximo observado.

cultivo	Características	8:16	12:12	16:8
	Tasa de crecimiento	0,031 ± 0,007	0,036 ± 0,013	0,038 ± 0,02
	ejes de crecimiento	0,75 cm	2 cm	2,5 cm
3 meses	ramificación dicotómica	(-)	(-)	(+++)
	ramificaciones laterales	(-)	(+)	(+)
	ejes de crecimiento	2,5 cm	2,5 cm	3 cm
5 meses	ramificación dicotómica	(-)	(-)	(+++)
	ramificaciones laterales	(-)	(+++)	(+)

Figura III.3. *Sporelings* del Estadio III cultivados durante 3 y 5 meses en los fotoperiodos 8:16, 12:12 y 16:8. Nótese la ramificación dicotómica (puntas de flecha) y la presencia de ramificaciones laterales (flechas).



Análisis del contenido pigmentario.

El análisis cuantitativo y cualitativo de los distintos pigmentos mostró también diferencias significativas tanto entre los Estadios I y III, como dentro del mismo Estadio III entre los individuos cultivados en los distintos fotoperiodos (Tabla III.3). En los tratamientos control (fotoperiodo 16:8) de los Estadios I y III se observaron diferencias significativas en todos los pigmentos analizados: el Estadio I contenía mayor cantidad de clorofila α , β -caroteno y zeaxantina y menor cantidad de ficobiliproteínas y luteína que cualquiera de los tratamientos del Estadio III.

Dentro del Estadio III, el contenido pigmentario varió dependiendo del régimen de luz durante el crecimiento (Tabla III.3). Tomando el fotoperiodo largo (16:8) como condiciones estándar, el desarrollo en el fotoperiodo 12:12 con menos horas de luz y más de oscuridad, provocó un aumento en la clorofila α y en los carotenoides, y una disminución en las ficobiliproteínas. El fotoperiodo corto 8:16 sin embargo no causó diferencias significativas en la clorofila α , aunque sí en los carotenoides, que aumentaron, y en las ficobiliproteínas, que disminuyeron.

Tasas fotosintéticas.

La actividad fotosintética, representada por el parámetro de fotosíntesis máxima (P_{\max}) mostró un aumento significativo en el tratamiento de fotoperiodo corto (8:16) dentro del Estadio III.

Tabla III.3. Concentración (media \pm error estándar) de clorofila *a*, carotenoides (β -carotenos, luteína, zeaxantina) y ficobiliproteínas (R-FE, R-FC) ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de peso seco) y del parámetro fotosintético P_{max} ($\mu\text{mol de O}_2$ liberado mg^{-1} peso fresco h^{-1}) del Estadio I y del Estadio III desarrollados en tres fotoperiodos diferentes (8 h luz: 16 h oscuridad, 12:12 y 16:8 (control)). Comparación estadística de la media respecto al control con el Test de Student: (*) = $0,01 < p < 0,05$; (n.d. = no detectado).

Estadio	Fotoperiodo	Clorofila <i>a</i>	β -caroteno	Luteína	Zeaxantina	R-FE	R-FC	P_{max}
I	16:8	9,205 \pm 0,31 (*)	0,058 \pm 3.10 ⁻⁴ (*)	0,33 \pm 0,01 (*)	0,014 \pm 3.10 ⁻⁴ (*)	0,47 \pm 0,03 (*)	0,07 \pm 0,03 (*)	-----
III	8:16	5,94 \pm 0,75	0.003 \pm 4.10 ⁻⁴ (*)	0,09 \pm 0,01 (*)	n.d.	6,34 \pm 0,14 (*)	1,09 \pm 0,06 (*)	0,08 \pm 0,01 (*)
	12:12	16,11 \pm 3,98 (*)	0,03 \pm 0,011 (*)	2,62 \pm 0,44 (*)	n.d.	6,13 \pm 0,87 (*)	0,94 \pm 0,12 (*)	0,04 \pm 5.10 ⁻³
	16:8 (control)	7,06 \pm 1,27	n.d.	0,41 \pm 0,26	n.d.	7,39 \pm 0,11	1,26 \pm 0,08	0,03 \pm 5.10 ⁻³

Proteína total y estructura del ficobilisoma.

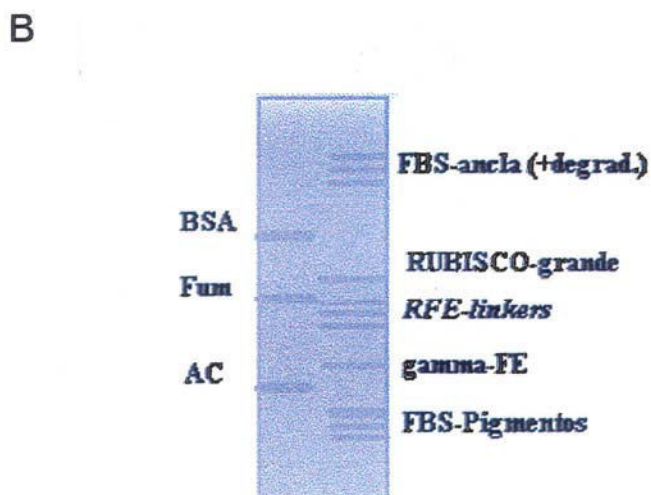
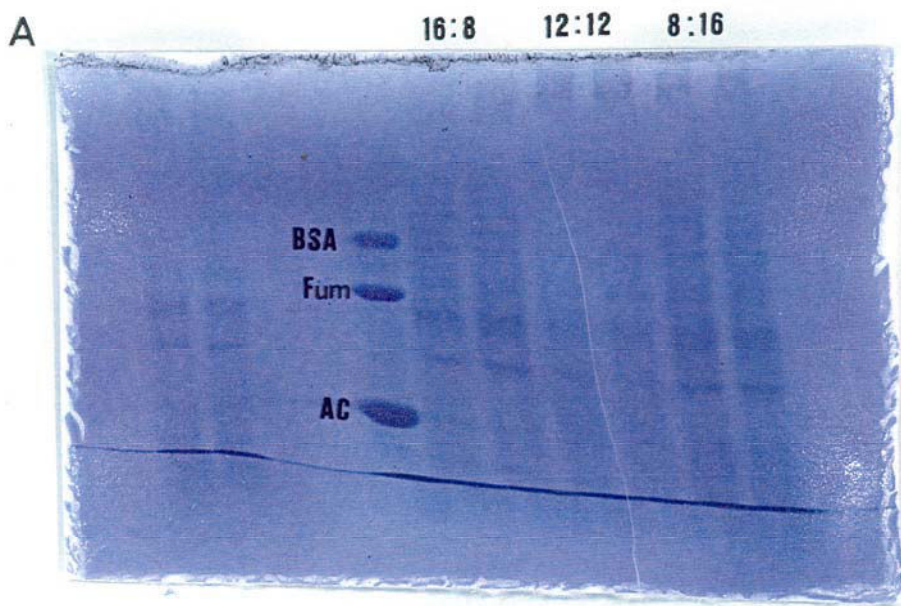
La concentración inicial de proteína total (PT) presente en todas las muestras de los diferentes fotoperiodos era la misma (Tabla III.4). Sin embargo, como resultado del gradiente de densidad de sacarosa, se pudieron observar diferencias significativas entre las muestras de los distintos fotoperiodos: en la banda de ficoeritrina libre (FE_L) de la fracción de 0,5 M del gradiente de sacarosa, la cantidad de proteína total asociada a esta fracción (PT_L) es significativamente menor en el tratamiento de 12:12, mientras que la cantidad de ficoeritrina libre (FE_L) en esta misma fracción, permanece constante. Esta diferencia en la proteína total del fotoperiodo 12:12 también se manifiesta en el sedimento de ficobilisomas (1,5 M del gradiente) con una cantidad significativamente menor de proteína total en los ficobilisomas (PT_{FBS}).

Tabla III.4. Concentración de proteína total (PT, $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco) del extracto de ficobilisomas, Proteína total y ficoeritrina libre (PT_L y FE_L, $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco) presentes en la banda de ficoeritrina libre que aparece en la fracción de 0,5 M del gradiente de sacarosa, y el valor de proteína total (PT_{FBS}, $\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco) obtenido a partir de la resuspensión del precipitado de ficobilisomas recogido en la fracción de 1,5 M (media \pm error estándar). (Comparación estadística del Test de Student respecto al control: (*): $0,01 < p < 0,05$).

Fotoperiodo	8:16	12:12	16:8
PT	175,62 \pm 27,63	170,37 \pm 32,52	170,29 \pm 23,10
PT _L	66,03 \pm 19,69	44,18 \pm 11,64 (*)	65,25 \pm 16,72
FE _L	3,63 \pm 0,69	3,69 \pm 0,73	4,55 \pm 0,7
PT _{FBS}	46,70 \pm 12,23	22,08 \pm 10,27 (*)	46,55 \pm 13,94

La electroforesis en el gel de acrilamida y su posterior tinción (Figura III.4A) reveló que las muestras del fotoperiodo 12:12 provocaron un bandeo más tenue que las muestras de los otros dos fotoperiodos. Los patrones utilizados y la bibliografía (Glazer, 1985; Algarra y col., 1990 Algarra y Rüdiger, 1993; D'Agnolo y col., 1994; Bernard y col., 1996) permitieron identificar las distintas bandas (Figura III.4B). Todas las muestras de los distintos fotoperiodos mostraron el polimorfismo “normal” en las bandas correspondientes a los *linkers* de la ficoeritrina.

Figura III.4: (A) Gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS) de muestras provenientes de ficobilisomas extraídas de algas ($n=2$) cultivadas en los distintos fotoperiodos. Nótese la disposición de las bandas en comparación con el esquema (B). BSA= seroalbúmina bovina; Fum= fumarasa; Ac= anhidrasa carbónica; FBS-ancla (+degrad)= polipéptidos de anclaje del ficobilisoma + productos de degradación; RUBISCO-grande= unidad grande de la rubisco; RFE-linkers = *linkers* de la R-ficoeritrina; gamma-FE= subunidad γ de la ficoeritrina; FBS-Pigmentos = subunidades de la ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina que constituyen los ficobilisomas. (Algarra y Rüdiger, 1993; D'Agnoles y col., 1994; Bernard y col., 1996).



III.4. DISCUSIÓN.

La respuesta de *G. doryphora* a los distintos fotoperiodos implica cambios en la morfología y en el patrón de crecimiento; las algas desarrolladas durante 3 meses en los tres fotoperiodos presentaban diferencias apreciables entre ellas (Figura III.3; Tabla III.2). La longitud de los ejes de crecimiento aumentó en función del número de horas de luz. De esta forma, las algas cultivadas en el fotoperiodo largo (16:8) presentaban mayor longitud de los ejes de crecimiento. La ramificación dicotómica sólo apareció en las algas desarrolladas en el fotoperiodo control, mientras que, las del corto, a diferencia de los otros fotoperiodos, no desarrollaron ni dicotomía ni ramificación lateral.

A medida que transcurrió el tiempo en cultivo (5 meses) en los distintos fotoperiodos, las diferencias en el tamaño disminuyeron, haciéndose la longitud de los ejes de crecimiento similar. La dicotomía apical y las ramificaciones laterales se mantuvieron para el caso del fotoperiodo largo. Sin embargo, en el caso del fotoperiodo medio (12:12) aumentó la presencia de ramificaciones laterales. La tasa de crecimiento permaneció constante durante el tiempo de cultivo en los tres fotoperiodos.

Todos los datos indican que las diferencias observadas no se deben a una menor capacidad de crecimiento provocada por el fotoperiodo, de hecho, la tasa de crecimiento, llegado al Estadio III, ya no varía y el tamaño se homogeneiza. Parece que cada uno de los fotoperiodos determina una morfología y un patrón de crecimiento distinto: el fotoperiodo largo (16:8) determina que el alga presente una ramificación dicotómica, el 12:12 que desarrolle proliferaciones laterales, y el corto (8:16) que no presente ramificaciones, independientemente del grado de desarrollo en el que se encuentre.

Son escasas las referencias sobre algas que relacionen el fotoperiodo con eventos concretos del crecimiento y desarrollo, que no sean la diferenciación de estructuras reproductoras. Se demostró por ejemplo, que en el alga roja *Dumontia contorta*

(Cryptonemiales), la formación de los “meristemos” (inicios de macrotalos) y su posterior desarrollo como talos erectos estaba controlada por el fotoperiodo, requiriéndose días cortos (Rietema 1982, 1984). En plantas superiores sin embargo, está constatado que eventos del desarrollo como la ramificación, la división celular, la elongación de las yemas, etc, están controlados a nivel genético, y se activan o desactivan en función del fotoperiodo (Weller y col., 1997). En *Grateloupia doryphora*, y por los resultados observados, el fotoperiodo parece controlar el patrón de ramificación, que varía desde la ausencia completa de ramificación hasta la dicotomía apical, atendiendo al régimen de luz en el que se haya desarrollado el alga. Esta modificación del patrón de ramificación según el fotoperiodo representa un modelo experimental para comprobar si existe también una base genética de acción del fotoperiodo en las algas.

Por otra parte, la interacción y el balance de concentración entre las auxinas y las citoquininas determinan en las plantas superiores la división y el crecimiento celular, provocando la dicotomía en las ramas o el crecimiento con dominancia apical. El fotoperiodo puede afectar a la síntesis y degradación de estas hormonas, alterando el balance de concentración y provocando un patrón de desarrollo distinto (Coenen y Lomax, 1997). Quizás en el caso de las algas también la concentración endógena de los reguladores de crecimiento pueda provocar diversas respuestas de tipo morfológico. Los patrones observados en el caso de *G. doryphora*, sugieren que los diferentes fotoperiodos controlarían el balance entre las sustancias, provocando una dicotomía apical en el caso del fotoperiodo largo, o ramificación lateral en el caso del medio. Es un campo muy interesante que necesita de más estudio, sobre todo teniendo en cuenta los resultados del Capítulo I.

El cultivo en los distintos fotoperiodos provocó la variación, (cualitativa y cuantitativa), en el contenido de los pigmentos de las algas del Estadio III (Tabla III.3). No

se puede sin embargo, establecer *a priori* una relación directa entre la síntesis de los diferentes pigmentos y las horas de luz o de oscuridad del régimen de luz. El fotoperiodo 12:12 (4 horas menos de luz y 4 más de oscuridad respecto al control, 16:8) causó incrementos significativos en la clorofila α , β -caroteno, y luteína, y una disminución en el contenido de las ficobiliproteínas. El fotoperiodo 8:16 que representa muchas menos de horas de luz respecto al control, tan sólo provocó un aumento en los carotenos y una disminución en las ficobiliproteínas. El aumento en el contenido pigmentario no confirió a las algas del fotoperiodo 12:12 ventajas en su actividad fotosintética. No parece por tanto que el comportamiento sea similar al que ocurre normalmente en el proceso de aclimatación, en el que el contenido de pigmentos guarda una relación con las dosis de luz recibidas, y las algas responden a las bajas intensidades de luz sintetizando una mayor concentración de pigmentos, particularmente clorofila α y ficobiliproteínas con el fin de optimizar la actividad fotosintética (Markager, 1993; Fillit, 1995; Bernard, 1996).

Tan sólo las algas desarrolladas en el fotoperiodo corto, con menos horas de luz y con un contenido pigmentario menor repartido entre la clorofila α y las ficobiliproteínas, mostraron un valor de P_{max} mayor. Este aumento en la actividad fotosintética puede deberse a que la tasa de fijación de carbono está controlada por el balance interno de carbohidratos determinado a su vez por los procesos de respiración y fotosíntesis, balance que tiende a permanecer constante (Azcón-Bieto y Osmond, 1983). Las algas del fotoperiodo corto cuentan con menor número de horas de luz que les limita la actividad fotosintética, por lo que tienen que fijar carbono a una tasa mayor, que les permita mantener ese balance interno de carbohidratos constantes, y que se refleja en una mayor P_{max} .

La disponibilidad de nitrógeno es otro factor que podría explicar la alteración de los niveles de pigmentos en algas (Lapointe, 1981; Levy y Gantt, 1990; Turpin, 1991; Vergara y Niell, 1993). Sin embargo en este caso, tampoco parece ser esta la razón que explique la

diferencia en el contenido pigmentario, ya que todas las algas de todos los fotoperiodos fueron cultivadas en medio PES (70 mg l^{-1} de NaNO_3) asegurando que el nitrógeno no fuera limitante para el crecimiento, y todas ellas se recultivaban semanalmente.

Teniendo en cuenta que *Grateloupia doryphora*, como ya se discutió extensamente en el Capítulo II, presenta durante su desarrollo desde el Estadio I al III, un cambio en sus contenidos pigmentarios, se podría pensar que los distintos fotoperiodos estén afectando al grado de desarrollo del alga (adquisición de las características fisiológicas del adulto) que a su vez determina la dotación pigmentaria. Esta hipótesis pierde consistencia, considerando que las algas, al igual que las plantas superiores completan su desarrollo acomodándose a las distintas condiciones ambientales, pudiendo variar su morfología y patrón de crecimiento, como ya se observó también para *G. doryphora* en la Figura III.3, pero adquiriendo toda las funciones de los organismos adultos (Weller y col. 1997). Además, tanto en el fotoperiodo medio (12:12) como en el corto (8:16), los pigmentos no se encuentran en valores intermedios entre uno y otro Estadio (I y III) como cabría esperar para un estado de desarrollo intermedio.

Considerando todo lo anteriormente expuesto, cabe pensar que como en la morfología (Tabla III.2, Figura III.3), los cambios pigmentarios “ontogénicos normales” (Tabla II.1) observados durante el crecimiento del *sporeling* entre el Estadio I y III, puedan variar como consecuencia de un factor externo como es el fotoperiodo (en este caso el 12:12 y 8:16).

El desarrollo de un alga, como de cualquier organismo, es un proceso crítico y una variedad de estímulos ambientales externos puede hacer variar ese desarrollo. El alga tiene que tener algún modo de percibir la señal y convertirla, o traducir la información en un cambio metabólico o bioquímico. La expresión génica engloba toda la síntesis de proteínas específicas codificadas por genes específicos. No todos los genes son activos al mismo

tiempo, muchos pueden activarse y desactivarse dependiendo de los requerimientos del programa de desarrollo o en respuesta a las condiciones ambientales. La expresión génica diferencial es el mecanismo principal para alterar el complemento de las enzimas en la célula y consecuentemente el curso del metabolismo y diferenciación de la célula, que engloba también la síntesis pigmentaria. El entender la naturaleza de la señal, en este caso la medida del tiempo de luz y oscuridad es uno de los primeros pasos para entender la cadena de sucesos que dan lugar a la última respuesta. Quizás en el caso de las algas, al igual que en el caso de las plantas superiores, también estén implicados fotorreceptores y balances de los reguladores de crecimiento específicos, (Breeman y ten Hoopen, 1987; Lüning, 1992; Figueroa y col., 1995; Coenen y Lomax, 1997; Weller y col., 1997) capaces de medir el tiempo de luz y de oscuridad.

Las algas desarrolladas en el fotoperiodo 12:12 a pesar de presentar mayor contenido pigmentario, mostraron una P_{max} similar al control. Una buena actividad fotosintética además de las concentraciones de pigmentos y sus relaciones, depende también de la presencia de un ficobilisoma bien estructurado (Talarico, 1996). Como ya se discutió en el Capítulo II, no toda la ficobiliproteína disponible tiene que ser fotosintéticamente activa (no toda está estructurada dentro del ficobilisoma), por lo que no siempre existe una relación directa entre el contenido pigmentario y la tasa fotosintética.

En las algas rojas, la presencia del ficobilisoma en función de la luz y la actividad fotosintética no está suficientemente bien documentada, ni en condiciones naturales ni en cultivo. Los aspectos dinámicos de las estructuras de los ficobilisomas elipsoidales con relación al contenido de pigmentos y los factores que favorecen el ensamblaje del ficobilisoma son muy poco conocidos (Gantt, 1981; Zilinkas y Greenwald, 1986; Algarra y Rüdiger, 1993). De hecho, la mayoría de los estudios se ha llevado a cabo con ficobilisomas

de cianofitas y algas rojas unicelulares (Tandeu de Marsac, 1983; Glazer, 1985; Algarra y col. 1990; Sidler, 1994; Bernard y col. 1996).

La síntesis de biliproteínas y la estructuración de los ficobilisomas parecen ser dos procesos regulados por diferentes factores: La síntesis de pigmentos está modulada por la disponibilidad de nitrógeno e irradiancia y la calidad de luz (López-Figueroa y Niell, 1991; Algarra y Rüdiger, 1993; Talarico, 1996), parámetros que en nuestro estudio se mantuvieron constantes en todos los tratamientos, mientras que la estructuración o ensamblaje parece depender de la mayor o menor concentración de unidades funcionales de R-FE dentro del espacio intratilacoidal (Cunningham y col., 1989; Bernard y col., 1996; Talarico, 1996).

La proporción de ficobiliproteínas, el tamaño y su forma parecen ser características específicas del ficobilisoma en cada especie de alga (Gantt y Lipschultz, 1980). El Estadio III de *G. doryphora* cultivada en los diferentes fotoperiodos presenta una cantidad similar de proteína total de partida (Tabla III.4), y sin embargo en el fotoperiodo 12:12, a nivel de la banda de ficoeritrina libre, la proteína total disminuye respecto a los otros tratamientos, mientras que la ficoeritrina libre es similar. Este hecho podría explicarse por la diferente metodología empleada en la determinación de ambos compuestos; al cuantificar la proteína total, se está tiñendo toda la proteína presente en la muestra, mientras que en la determinación de la ficoeritrina se está midiendo la absorción de los cromóforos. Podría pensarse que en el fotoperiodo 12:12 existen más cromóforos libres no unidos a apoproteínas que no son funcionales como pigmento, pero que contribuyen a la cantidad de FE_L medida por espectrofotometría. Sin embargo, estas diferencias también se manifiestan a nivel del ficobilisoma, y las muestras cultivadas en el 12:12 presentan menor cantidad de proteína total asociada al ficobilisoma (PT_{FBS}). Partiendo de cantidades de PT similares, la diferencia (lo que falta de PT_{FBS}) tendría que aparecer en forma de proteína libre (PT_L), que

sin embargo, también es menor para el 12:12. Por tanto, parte de la proteína de las muestras del fotoperiodo 12:12 tiene que estar en otra fracción del gradiente que no se haya considerado ni recogido. Algarra y Rüdiger (1993) durante el aislamiento del ficobilisoma de *Porphyridium purpureum* detectaron dos tipos de ficobilisomas: una fracción soluble que recogieron en la banda de 1 M del gradiente de sacarosa y una fracción insoluble recogida como un precipitado en el fondo de la capa de 2 M del gradiente, consistente en agregados de FBS, y que coincide con nuestro precipitado. Quizás, la diferencia de proteína asociada a los ficobilisomas detectada, se encuentre presente en el caso del 12:12, en forma de fracción soluble en una de las capas del gradiente de sacarosa sin que se haya considerado. De ser así, el fotoperiodo estaría ocasionando un cambio estructural en los ficobilisomas (Algarra y Rüdiger, 1993).

En las electroforesis llevada a cabo en condiciones desnaturalizantes (Figura III.4 A), las bandas correspondientes a la fracción de ficobilisomas de las muestras del fotoperiodo 12:12 aparecieron más tenues que el resto debido a la menor concentración o número de ficobilisomas. El cultivo en los diferentes fotoperiodos no provocó cambios estructurales aparentes en los ficobilisomas, no observándose cambios funcionales su ficoeritrina integrada. La organización funcional de los ficobilisomas depende estrictamente de la composición y presencia de los *linkers*, que juegan un papel esencial en la transferencia de energía (Glazer, 1984; Zilinkas y Greenwald 1986; Algarra y Rüdiger, 1993). En los tres fotoperiodos, el linker asociado del hexámero intermedio de la FE estaba siempre presente (Figura III.4). A este hexámero y sobre todo su *linker* asociado desaparecen cuando el alga se aclimata a altas intensidades de luz, explicando su ausencia mediante un mecanismo de retroalimentación entre el nivel de FE y la síntesis del *linker*: cuando el nivel de FE baja por debajo de un determinado valor por el efecto de la luz en el cloroplasto, una señal proveniente del cloroplasto alcanza el núcleo y la síntesis del *linker* se

reprime (Algarra y Rüdiger 1993; Bernard y col. 1996).

En definitiva, el crecimiento y desarrollo de las algas en los distintos fotoperiodos (16:8, 12:12 y 8:16) provoca alteraciones tanto en la morfología como en el contenido pigmentario, semejantes a una aclimatación. Estos cambios no confieren al alga ventaja fotofisiológica alguna. Las respuestas de las algas a la temporización del régimen luz:oscuridad no son comparables a las causadas por las distintas intensidades de luz (fotoaclimatación) ni por las distintas calidades espectrales (adaptación cromática) por lo que parece que el alga interpreta de forma distinta las señales de los distintos componentes de la luz.

En conclusión:

- 1) El fotoperiodo condiciona la morfología y tipo de ramificación del alga.
- 2) Los contenidos pigmentarios además de depender del desarrollo, varían por el efecto del fotoperiodo, sin que se aprecien ventajas fotofisiológicas similares a las que ocurren con la cantidad y calidad de luz.
- 3) El fotoperiodo 12:12 causa alteraciones en la estructura del ficobilisoma, en términos de número e incluso de forma.

III.5. Bibliografía.

Algarra P, Niell FX (1990) Short-term pigment response of *Corallina elongata* Ellis et Soland to light intensity. *Aquatic Botany* 36: 127-138

Algarra P, Thomas JC, Mousseau A (1990) Phycobilisome heterogeneity in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *Plant Physiol* 92: 570-576

Algarra P, de la Viña G, Niell FX (1991) Effects of light quality and irradiance level interaction on short term pigment response of the red alga *Corallina elongata*. *Mar Ecol Prog Ser* 74: 27-32

Algarra P, Rüdiger W (1993) Acclimatation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant Cell and Environ* 16: 149-159

Apt KE, Grossman AR (1993a) Characterization and transcript analysis of the major phycobiliprotein subunit genes from *Aglaothamnion neglectum* (Rhodophyta). *Plant Mol Biol* 21: 27-38

Apt KE, Grossman AR (1993b) Genes encoding phycobilisome linker polypeptides on the plastid genome in *Aglaothamnion neglectum* (Rhodophyta). *Photosyn Res* 35: 235-245

Azcón-Bieto J, Osmond B (1983) Relationship between photosynthesis and respiration. The effects of carbohydrate status in the rate of CO₂ production by respiration in darkened and illuminated wheat leaves. *Plant Physiol* 71: 574-581

Bernard C, Etienne AL, Thomas JC (1996) Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (Rhodophyta): Compared effects of high light and translation inhibitors. *J Phycol* 32: 265-271

Berner T, Dubinsky Z, Wyman K, Falkowski PG (1989) Photoadaptation and the "Package effect" in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J Phycol* 25: 70-8

Bird KT, Habig C, DeBusk T (1982) Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *J Phycol* 18: 344-348

Bjornland T, Borch G, Liaaen-Jensen S (1984) Configurational studies on red algae carotenoids. *Phytochemistry* 23: 1711-15

Breeman AM, ten Hoopen A (1987) The mechanism of daylight perception in the red alga *Acrosymphyton purpuriferum*. *J Phycol* 23: 36-42

Bryant DA (1991) Cyanobacterial phycobilisomes: progress towards a complete structural and functional analysis via molecular genetics. En Bogarad L, Vasil IK (eds.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol 7. Academic Press, New York

Bryant DA, Guglielmi G, Tandeu de Marsac N, Castets Am, Cohen-Bazire G (1979) Structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. Arch Microbiol 123: 113-127

Coenen C, Lomax TL (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. Trends in plant science, vol 2 (9):351-356

Cunningham FX, Dennenberg RJ, Mustardy L, Jursinic PA, Gantt E (1989) Stoichiometry of PSI, PSII and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance. Plant Physiol 91: 1179-1187

D'Agnolo E, Rizzo R, Paoletti S, Murano E (1994) R-Phycocerythrin from the red alga *Gracilaria longa*. Phytochemistry 35(3): 693-696

Dring MJ (1988) Photocontrol of development in algae. Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 39: 157-74

Ekman P, Pedersén M (1990) Temperature and growth rate on the agar composition of *Gracilaria sordida* W.Nelson and *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfus (Gigartinales, Rhodophyta). Bot Mar 33(6): 482-495

Falkowski PG, Dubinsky Z, Wyman K (1985) Growth irradiance relationships in marine phytoplankton. Limnol Oceanogr 30: 311-21

Falkowski PG, LaRoche J (1991) Acclimation to spectral irradiance in algae. J Phycol 27: 8-14

Figueroa FL, Aguilera J, Niell FX (1995) Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). *Eur J Phycol* 30: 11-18

Fillit M (1995) Seasonal changes in the photosynthetic capacities and pigment content of *Ulva rigida* in a mediterranean coastal lagoon. *Bor Mar* 38: 271-280

Floreto EAT, Hirata H, Ando S, Yamasaki S (1993) Fatty acid composition of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta) and *Gracilaria incurvata* Okamura (Rhodophyta). *Bot Mar* 36(3): 217-222

Gantt E (1981) Phycobilisomes. *Annu Rev Plant Physiol* 32: 327-347

Gantt E, Lipschultz CA (1980) Structure and phycobiliprotein composition of phycobilisomes from *Griffithsia pacifica* (Rhodophyceae). *J Phycol* 16: 394-398

Garbary DJ, Gabrielson PW (1990) Taxonomy and evolution. En Cole M y Sheat G (eds.) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 203-219

Glazer AN (1984) Phycobilisomes: a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta* 768: 29-51

Glazer AN (1985) Light harvesting by phycobilisomes. *Annu Rev Biophys Chem* 14: 47-77

Glazer AN (1989) Light guides. *J Mol Biol* 264: 1-4

Gray BH, Gantt E (1975) Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga *Nostoc* sp. *Photochemistry and Photobiology* 21: 121-128

Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL (1994) The response of Cyanobacteria to Environmental Conditions: Light and nutrients. En Bryant DA (ed.) *Advances in Photosynthesis. The molecular biology of cyanobacteria* pp. 641-675, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Hammes BD, Rickwood D (eds.) (1981) *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. IRL Press, Oxford.U.K.

Honsell E, Kosovel V, Talarico L (1984) Phycobiliprotein distribution in Rhodophyta: Studies and interpretations on the basis of their absorption spectra. *Bot Mar* 27: 1-16

Jeffrey SW (1980) Algal pigment systems. En *Primary Productivity in the Sea*, PG Falkowski (ed.), Plenum, New York: 33-58

Johnsen G, Sakshaug E (1996) Light harvesting in bloom-forming marine phytoplankton: species-specificity and photoacclimation. *Sci Mar* 60(1): 47-56

Kirk JTO (1983) *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press

Kosovel V, Talarico L (1979) Seasonal variations on photosynthetic pigments in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss (Florideophyceae, Gigartinales). *Boll Soc Adr Sci* 63: 5-15

Lapointe BE (1981) The effects of light and nitrogen growth, pigment content and biochemical composition of *Gracilaria foelifera*, v. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta) J Phycol 17: 90-95

Larkum AWD, Barret J (1983) Light harvesting processes in algae. Adv Bot Res 10: 1-219

Levy I, Gantt B (1988) Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis, and phycobilisomes. J Phycol 24: 452-458

Levy I, Gantt B (1990) Development of photosynthetic activity in *Porhyridium purpureum* (Rhodophyta) following nitrogen starvation. J Phycol 26: 62-68

López-Figueroa F (1991) Red, green and blue light photoreceptors controlling chlorophyll a, biliprotein and total protein synthesis in the red alga *Chondrus crispus*. Br Phycol J 26: 383-393

López-Figueroa F, Niell FX (1991) Photocontrol of chlorophyll and biliprotein synthesis in seaweeds: possible photoreceptors and ecological considerations. Sci Mar 55(3): 519-527

Lüning K (1990) Seaweeds. Their Environment, Biogeography and Ecophysiology. Yarish C, Kirkman H. (trans. & ed.). New York: Wiley-Interscience

Lüning K (1992) Day-and night-kinetics of growth rate in green, brown and red seaweeds. J Phycol 28: 794-803

- Markager S (1993) Light absorption and quantum yield for growth in five species of marine macroalgae. *J Phycol* 29: 54-63
- Ohki K, Fujita Y (1994) Photoregulation of phycobilisomes structure during complementary chromatic adaptation in the marine canopy phyte *Porphyridim sp.* C68. *J Phycol* 28: 803-808
- Post AF, Dubinsky Z, Wyman K, Falkowski, PG (1984) Kinetics of light-intensity adaptation in a marine planktonic diatom. *Mar Biol* 83: 231-238
- Ramus J (1981) The capture and transduction of light energy. En Lobban CS, Wynne MJ (eds.) *The Biology of the Seaweeds*. Oxford: Blackwell Scientific: 458-492
- Ramus J, Van der Meer JP (1983) A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. I. Color mutant of a seaweed. *J Phycol* 19: 86-91
- Reith M, Munholland J (1993) A high-resolution gene map of the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. *Plant Cell* 5: 465-475
- Rietema H (1982) Effects of photoperiod and temperature on macrothallus initiation in *Dumontia contorta* (Rhodophyta). *Mar Ecol Prog Ser* 8: 187-196
- Rietema H (1984) Development of erect thalli from basal crusts in *Dumontia contorta* (Gmel.) Rupr. (Rhodophyta, Cryptonemiales). *Bot Mar* 27: 29-36

Roell M, Morse DE (1993) Organization, expression and nucleotide sequence of the operon encoding R-phycoerithrin alfa and beta subunits from the red alga *Polysiphonia boldii*. *Plant Mol Biol* 21: 47-58

Rüdiger W, López-Figueroa F (1992) Photoreceptors in algae. *Photochemistry and photobiology* 55: 949-954

Sagert S, Schubert H (1995) Acclimation of the photosynthetic apparatus of *Palmaria palmata* (Rhodophyta) to light qualities that preferentially excite photosystem I or photosystem II. *J Phycol* 31: 547-554

Sidler WA (1994) Phycobilisome and phycobiliproteins structures. En Bryant DA (ed.) *Advances in Photosynthesis. The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers: 139-216

Sukenik A, Bennett J, Mortain-Bertrand A, Falkowski PG (1990) Adaptation of the photosynthetic apparatus to irradiance in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol* 92: 891-898

Talarico L (1996) Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. *Sci Mar* 60(1): 205-222

Talarico L, Kosovel V (1983) Ficobilisomi e variazioni delle ficobiliproteine in *Halphytis incurvus* (Huds.) Batt. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) durante il ciclo annuale. *Boll Soc Adr Sci* 67: 69-81

- Talarico L, Cortese A (1993) Response of *Audouinella saviana* (Meneghini) Woelkerling (Nemaliales, Rhodophyta) cultures to monochromatic lights. *Hydrobiologia* 261:477-484
- Tandeu de Marsac N (1983) Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation in Cyanobacteria. *Bull Inst Pasteur* 81: 201-254
- Tandeu de Marsac N, Mazel D, Damerval T, Gugliemi G, Copiano V, Houmard J (1988) Photoregulation of gene expression in the filamentous cyanobacterium *Calothrix sp.* PCC 7601: light harvesting complexes and cell differentiation. *Photosynthesis Res* 18: 99-132
- Turpin DH (1991) Minireview. Effects of inorganic nitrogen availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J Phycol* 27: 14-20
- Van Lenning K, Garrido JL, Arístegui J, Zapata M (1995) Temperature-Programmed High Performance Liquid Chromatography Separation of Mono- and Divinyl Chlorophyll Forms From Marine Phytoplankton. *Chromatographia* 41: 539-543
- Vergara JJ, Niell FX (1993) Effects of nitrate availability and irradiance on internal nitrogen constituents in *Corallina elongata* (Rhodophyta). *J Phycol* 29: 285-293
- Weller JL, Reid JB, Taylor SA, Murfet IC (1997) The genetic control of flowering in pea. *Trends in Plant Science* 2(11): 412-418
- Wyman M (1992) An in vivo method for the stimulation of phycoerythrin concentrations in marine cyanobacteria (*Synechococcus sp.*) *Limnol Oceanogr* 37(6): 1300-1306

Wyman M, Gregori RPF, Can NG (1985) Novel role of phycoerythrin in a marine cyanobacterium *Synechococcus* strain CD2. *Science* 230: 818-820

Zilinkas BA, Greenwald LS (1986) Phycobilisome structure and function. *Photosynthesis Res* 10: 7-35

Capítulo IV: Inducción y seguimiento de la diferenciación celular durante la tetrasporogénesis en el Estado I.

IV.1. INTRODUCCIÓN.

Las algas se caracterizan por su simpleza en cuanto a la existencia de tejidos diferenciados en la construcción de los talos. La esporogénesis es uno de los procesos de diferenciación celular en los talos que determina la formación de tetrasporas en el tetrasporofito y carposporas en el carposporofito.

El conocimiento del proceso de la tetrasporogénesis en rodofitas está limitado por los escasos trabajos a nivel ultraestructural que se han llevado a cabo, careciendo la mayoría de los órdenes de un estudio de este proceso. El mayor número de especies estudiadas pertenece al orden Ceramiales, mientras que en los otros, apenas se ha estudiado la formación de las tetrasporas (Tabla IV.1).

Otros trabajos a nivel ultraestructural no estudian el proceso general de la tetrasporogénesis, sino que, se centran en orgánulos citoplasmáticos concretos o en procesos determinados tales como el desarrollo de los dictiosomas y de sus vesículas (Chamberlain y Evans, 1973; Konrad-Hawkins, 1974; Alley y Scott, 1977), el sistema endomembrana (Peel y col., 1973; Scott y Thomas, 1975; Duckett y Peel, 1978) o en el citoesqueleto (Avazini y Honsell, 1984).

Tabla IV.I. Estudios ultraestructurales sobre la tetrasporogénesis en la división Rhodophyta.

Orden	Especie y género	Referencia
Ceramiales	<i>Griffithsia flosculosa</i>	(Peyriére 1970)
	<i>Levringiella gardneri</i>	(Krugens y West, 1972)
	<i>Ptilota hyponoides</i>	(Scott y Dixon 1973)
	<i>Erytrocystic montagnei</i>	(Santisi y De Masi, 1981)
	<i>Chondria tenuissima</i>	(Tsekos y col. 1985)
Rodimenciales	<i>Gastroclonum clavatum</i>	(Gori, 1982)
	<i>Lamentaria baileyana</i>	(Davis y Scott, 1986)
Palmariales	<i>Palmaria palmata</i>	(Pueschel, 1978,1979)
Hildebrandiales	<i>Hildebrandia rubra</i>	(Pueschel, 1982)
	<i>Hildebrandia occidentalis</i>	
Cryptonemiales	<i>Haliptilon curveri</i>	(Vesk y Borowitzka, 1984)

La tetrasporogénesis es un proceso asincrónico, siendo frecuente encontrar en un mismo talo diferentes grados de desarrollo del mismo. Por tanto, es posible llevar a cabo un estudio a nivel microscópico de los diferentes eventos de la tetrasporogénesis a partir de material fértil recogido en la naturaleza (Pueschel 1982; Tsekos y col., 1985; Gargiulo y col., 1992). Los trabajos basados en este tipo de material sin embargo, no permiten por sí solos conocer en detalle todos los eventos de la tetrasporogénesis. Generalmente estos estudios parten de estructuras más desarrolladas y omiten o suponen lo que acontece en los primeros estadios del

proceso.

Otros trabajos, aunque parten de material de cultivo en laboratorio, se limitan a reproducir mediante ilustraciones los esporangios en diferentes fases de maduración sin describir el proceso completo de la tetrasporogénesis (Guiry y Maggs, 1982; Brodie y Guiry, 1988 a,b; Mairh y col., 1990).

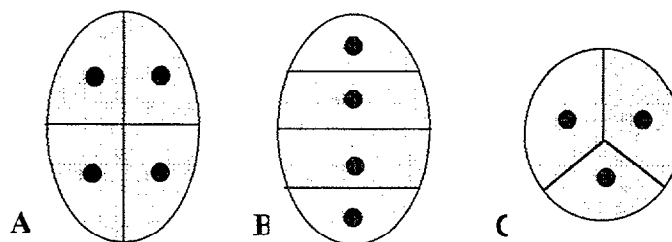
La estructura y la función de los esporangios, así como su terminología, fue revisada en detalle por Dixon (1973), Guiry (1978) y Maggs (1988). A pesar de ello, no existe en la bibliografía un único criterio, y la terminología o nomenclatura varía de autor a autor. Como consecuencia, las discusiones en este campo, a menudo, se complican por problemas semánticos. La célula que se diferencia y que da lugar al tetrasporangio, por ejemplo, se denomina *primordium* (Dixon, 1973), *tetrasporangial initial* (Chamberlain y Evans, 1973; Maggs, 1988), *mother cell* (Pueschel, 1982; Tsekos y col., 1985) o la traducción al castellano de célula tetrasporógena (Pérez-Cirera y col., 1989).

Los esporangios de las algas rojas se pueden dividir en dos grupos basándose en la presencia (meiosporangia) o ausencia (mitosporangia) de la meiosis. La mitosis ocurre en los tetrasporangios de algunas especies, dando lugar a esporas diploides que al germinar forman individuos diploides (West y Hommersand, 1981) o sufren una meiosis en el estadio inicial del desarrollo para formar individuos haploides. La mayoría de los tetrasporangios sufren meiosis en la formación de tetrasporas siendo demostrada por Yamanouchi (1906) y posteriormente confirmada por otros estudios (Guiry, 1978), porque forman parte de un ciclo haplodiploide.

La clasificación de los esporangios entre meiosporangios y mitosporangios resulta poco práctica y el sistema de nomenclatura más aceptado está basado en el origen, modo de formación y número de esporas de los esporangios.

Dentro de la división Rhodophyta, la clase Florideophyceae tienen más tipos de

esporangios y mejor estudiados, frente a las Bangiophyceae. El meiosporangio más común entre las Florideophyceae es el tetrasporangio. Los tetrasporangios generalmente se forman en talos de vida libre diploides y dan lugar a cuatro esporas uninucleadas. Los esporangios con cuatro esporas se forman por dos o tres divisiones, cuya orientación da lugar a los tres tipos básicos de tetrasporangios: cruciados, zonados y tetraédricos (Figura IV.1):



En la forma de división cruciada (Figura IV.1A) la primera división generalmente siempre tiene lugar a lo largo del eje menor. Las siguientes divisiones a lo largo del eje mayor suelen ser más irregulares, pero frecuentemente perpendiculares a la primera. Cuando una de las divisiones longitudinales no está en el plano de visión, el esporangio parece estar constituido por una célula grande y única y dos esporas menores. En este caso el tipo de división se denomina decusada-cruciada. La división cruciada en general es muy común en los órdenes Nemaliales, Cryptonemiales y en algunas Gigartinales.

La división zonal (Figura IV.1B) se puede producir de forma sucesiva o de forma simultánea. La primera es la más común y las divisiones tienen lugar sucesivamente: inicialmente se produce la división mediana seguida por las otras dos divisiones. En el segundo tipo, todas las divisiones comienzan simultáneamente. La división zonal en general es muy común en el orden Gigartinales.

En los tetrasporangios divididos tetraédricamente (Figura IV.1C), y a diferencia de los cruciados, las divisiones ocurren simultáneamente. La división tetraédrica es muy común en las

Rhodimenciales y Ceramiales. Ambos tipos (cruciados y tetraédricos) pueden ocurrir en especies de un mismo género (Guiry, 1978), aunque es posible que debido al poco rigor y detalle de ciertos trabajos, se hayan confundido ambos tetrasporangios.

Es numerosa la bibliografía en la que se utiliza el fotoperiodo como herramienta de inducción de estructuras reproductoras (tetrasporangios) en algas rojas pero con objetivos y un enfoque de los resultados distintos. La respuesta al fotoperiodo, tanto en plantas superiores como en los vegetales marinos, se ha considerado como un mecanismo fisiológico que coordina la reproducción de un organismo con una estación del año apropiada. Las algas presentan esta respuesta al fotoperiodo, aunque no fue demostrado hasta 1967 con la fase conchocelis de *Porphyra* (Dring, 1967; Rentschler, 1967). Las primeras respuestas investigadas en detalle resultaron similares a las de las plantas vasculares respecto al control de su floración, pero desde entonces, ha quedado claro que las algas no comparten todas las características propias del control de la reproducción por el fotoperiodo. En la última revisión de Dring (1988), se contabilizan 55 respuestas al fotoperiodo en especies macroscópicas de las tres divisiones algales y en la actualidad se siguen sumando trabajos con otras especies.

En los años 70 y 80, el interés por elucidar las historias de vida de muchas algas rojas, de las que no se conocía su fase tetrasporofítica, dio lugar a la idea errónea de que las respuestas al fotoperiodo eran exclusivas de las especies con historias de vida heteromórficas o de especies con ciclos anuales de aparición y desaparición. En la actualidad, son cada día más los trabajos que muestran control fotoperiódico de la reproducción en algas con fases de vida isomórficas. (Murray y Dixon, 1992; Brodie y col., 1994). La mayoría de las respuestas en las algas comprenden un cambio en la historia de vida, generalmente a través de la formación y liberación de esporas por la generación esporofítica, como se refleja en los trabajos con *Monostroma sp.* (Chlorophyta) (Lüning, 1981), *Botryocladia sp.* (Brodie y Guiry, 1988 b) y *Chondrus sp.*

(Rhodophyta) (Brodie y col., 1993) entre otros muchos. En menor medida, se obtiene como respuesta la formación y liberación de los gametos por la generación gametofítica tales como en *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyta) (ten Hoopen y col., 1983), y en *Audouiniella alariae* (Rhodophyta) (Lee y Kurogi, 1983).

Muchos estudios sobre la inducción de la tetrasporogénesis mediante el fotoperiodo se realizan, tan sólo, con fines taxonómicos buscando similitudes o diferencias filogenéticas. El tetrasporangio constituye una característica básica y universal de las Florideophyceae y la forma de disposición de las esporas parece tener un valor taxonómico significativo. En este tipo de trabajos, se describen detalladamente los cambios anatómicos de la estructura reproductora, tanto a nivel estructural (De Cew y col., 1992; Gargiulo y col., 1992) como ultraestructural (Krugens y Koslowsky, 1981; Pueschel, 1979; Vesik y Borowitzka, 1984).

Otros trabajos sin embargo, se centran en la determinación de los tratamientos más favorables para la inducción de estas estructuras estudiando la respuesta en sí (cuantitativa o cualitativa) y la causa que la produce, pero sin realizar seguimiento anatómico alguno (Mairh y col., 1990; Guiry y Dawes, 1992; Brodie y col., 1993; Cunningham y col., 1993; Molenaar y Breeman, 1994). La mayoría de estos trabajos carecen de un control histológico del material previo a la inducción, por lo que no es posible asegurar que la aparición de las estructuras reproductoras sea consecuencia directa de los diferentes fotoperiodos. Aunque menos frecuentes, se han llevado a cabo estudios completos que abarcan tanto el tratamiento inductor como el tipo de respuesta y el seguimiento de las estructuras reproductoras (West and Guiry, 1982; Brodie y Guiry, 1988 b). Estos trabajos incluyen la descripción detallada de las condiciones de cultivo y de los tratamientos inductores, así como, seguimientos al microscopio óptico en los que se puede ver la formación de las tetrasporas.

Muchas algas requieren para el desarrollo de sus estructuras reproductoras de una

exposición continua a un determinado fotoperiodo corto o largo, incluso la combinación del fotoperiodo con otro factor ambiental como es la temperatura (Lewis y col., 1991; Guiry y Dawes, 1992; Cunningham y col., 1993; Molenaar y Breeman, 1994). Otras en cambio desarrollan las estructuras incluso si, una vez expuestas a un fotoperiodo adecuado, se transfieren a otros fotoperiodos. En este caso, se habla de formación de las estructuras reproductoras mediante el fotoperiodo como tratamiento inductor. El fenómeno de la inducción implica el planteamiento de ciertas cuestiones sobre las condiciones fisiológicas del momento inductor, que requieren de más trabajos para su aclaración. El tratamiento inductor más efectivo descrito para las algas es el fotoperiodo corto (es decir, cuando los días son cortos y las noches largas). En estos casos, los cultivos se mantienen en condiciones de día largo, para asegurar un buen crecimiento, y cuando no es posible completar el ciclo de vida en estas condiciones, se transfieren a un fotoperiodo de día corto. Ejemplo de ello son los trabajos con las algas rojas *Gymnogongrus* (Lewis y col., 1991), *Helminthora* (Cunningham y col., 1993) y *Chondrus* (Brodie y col., 1994).

Las experiencias anteriores con talos tetrasporofíticos indicaban que *G. doryphora* cultivada en las condiciones control de la cámara (fotoperiodo 16 h luz:8 h oscuridad y 19 ± 2 °C), no generaban tetrasporangios durante meses (García-Jiménez, 1994). El estudio fenológico realizado entre los años 93 y 94 en la población natural de *G. doryphora* en Jinámar (NE de Gran Canaria) reveló la presencia durante todo el año de talos tetrasporofíticos con tetrasporangios divididos de forma cruciada y/o decusada-cruciada en diferentes grados de desarrollo (Rodrigo y col., 1995).

Basándonos en el conocimiento del desarrollo en cultivo *in vitro* de *G. doryphora* y en la literatura nos planteamos, partiendo de *sporelings* del Estadio I cultivados en el laboratorio, llevar a cabo un trabajo que tenía como objetivo el estudio estructural y ultraestructural de la

diferenciación celular en la inducción de tetrasporangios durante el crecimiento y desarrollo de los talos por efecto del fotoperiodo. Pretendíamos inducir la tetrasporogénesis, caracterizando el Estadio del desarrollo en el que se produce la diferenciación, mediante el cultivo en los diferentes fotoperiodos. Asimismo se realizó una descripción ultraestructural de los eventos durante la tetrasporogénesis y se comparó con el material de la naturaleza.

IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Material vegetal.

La inducción y el seguimiento de la diferenciación celular (formación de tetrasporas) por efecto del fotoperiodo durante el crecimiento y desarrollo del alga roja *G. doryphora* en cultivo *in vitro*, se llevó a cabo con *sporelings* del Estadio I.

El estudio de la tetrasporogénesis a partir de material de la naturaleza, se realizó con algas recogidas en la localidad de Jinámar que se trasladaron inmediatamente al laboratorio.

Estudio estructural y ultraestructural.

El estudio de la diferenciación celular y el seguimiento de la tetrasporogénesis se realizó mediante la aplicación de las técnicas histológicas e histoquímicas. La descripción morfológica se realizó con secciones semifinas (5 μ m) teñidas con azul de toluidina o hematoxilina según se describió en el Capítulo I. La caracterización de los componentes celulares (polisacáridos neutros y sulfatados) se realizó también atendiendo a los protocolos descritos en el Material y Métodos del mismo Capítulo.

Para el estudio bajo el microscopio electrónico, al procedimiento general de fijación (Material y Métodos del Capítulo I) se añadió un paso de postfijación en una solución al 1% de tetróxido de osmio en tampón cacodilato sódico 0,1 M a pH 7,4. La fijación finalizó con tres lavados, de 10 min cada uno, en el mismo tampón. La infiltración de las muestras comenzó con la deshidratación del tejido en una serie alcohólica en grado creciente, con baños de 10 min en etanol al 20%, 50%, 70%, 90%, 96% y dos baños de 20 min en etanol al 100% (20 min x 2). A continuación el material se sumergió en óxido de propileno durante 40 min (20 min x 2) y posteriormente en óxido de propileno-Epon (1:1) durante 3 horas. La inclusión se realizó con un baño de 12 a 24 horas en Epon y el endurecimiento de la resina durante 24 horas a 40 °C y otras

tantas a 60 °C.

Los cortes ultrafinos (400 Å) se obtuvieron con un ultramicrotomo marca Reichert Ultracut's o Reicher Jung Ultracut E. Las secciones fueron recogidas en rejillas de cobre y tras un baño al 2% de acetato de uranilo en solución alcohólica y al 2% de citrato de plomo en solución acuosa, se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss modelo EM 9 S-2. La película empleada fue Scientia film (Agfa).

Inducción de la tetrasporogénesis.

Se cultivaron aproximadamente 60 *sporelings* (Estadio I) repartidos en 5 placas con medio PES líquido en cada uno de los siguientes fotoperiodos: 8 h luz, 16 h oscuridad (fotoperiodo corto), 12:12 (medio) y 16:8 (fotoperiodo largo o control).

El estudio histológico de las diferentes muestras se realizó semanalmente con *sporelings* cultivados en los distintos fotoperiodos elegidos al azar, asegurándose la utilización del total de placas por cada tratamiento. El experimento fue repetido dos veces.

Previo a los tratamientos de fotoperiodo, se realizó un control histológico para verificar que los *sporelings* no presentaban ni tetrasporangios ni estructuras asociadas a la tetrasporogénesis descritas en la bibliografía como tales.

Dependencia del estadio de crecimiento y desarrollo en el estudio y seguimiento de la tetrasporogénesis.

Considerando los resultados del primer experimento, se diseñó un segundo ensayo basado en transferencias semanales desde el fotoperiodo control (16:8) al fotoperiodo inductor (tres semanas en el corto, 8:16), de tal forma que, permitiera conocer si existía una dependencia entre el grado de desarrollo en cultivo del *sporeling* (previo al tratamiento de inducción) y la presencia de una mayor cantidad y una mejor diferenciación de las estructuras reproductoras.

Así, a lo largo del periodo de estudio, semanalmente se transferían al fotoperiodo inductor, 4 placas con cinco *sporelings* cada una. Antes de la transferencia, se realizaban controles para ratificar la ausencia de estructuras asociadas con la tetrasporogénesis.

Tras el tratamiento inductor, se realizó un estudio estructural y ultraestructural simultáneo, atendiendo a los protocolos expuestos anteriormente, para realizar el seguimiento de la tetrasporogénesis y estructuras ligadas a ella. Para ello se eligieron al azar 8 ejes de crecimiento entre los diferentes *sporelings* de cada transferencia, de los cuales 5 eran postfijados en osmio para la microscopía electrónica, y las restantes para la microscopía óptica.

Paralelamente, se realizaron cortes a mano alzada bajo lupa de talos de *G. doryphora* de la naturaleza para verificar la presencia de tetrasporangios. Los cortes fueron montados en portas para su observación al microscopio óptico y posteriormente procesados para microscopía electrónica, sirviendo como referencia para los eventos y estructuras relacionadas con la tetrasporogénesis inducida en los talos de cultivo.

IV. 3. RESULTADOS

Inducción y dependencia del estadio de crecimiento y desarrollo en el estudio de la tetrasporogénesis.

Los *sporelings* cultivados en las condiciones control (16:8) no presentaron tetrasporangios. Las secciones seriadas de *sporelings* procesadas para el microscopio óptico mostraron un córtex y médula bien definidos (Figura IV.2). La capa cortical o córtex estaba constituida por células elongadas y fuertemente empaquetadas, formando tres o cuatro líneas, con un tamaño aproximado de $4 \times 6 \mu\text{m}$. La médula está constituida por células estrelladas y filamentosas (Figura IV.3). Histoquímicamente el reactivo de Schiff (PAS) puso de manifiesto la presencia de polisacáridos neutros en la pared celular y contenido intracelular, mientras que el alcian blue (AB, pH=1,0) reveló un espacio intercelular compuesto por polisacáridos sulfatados.

El estudio histológico de los *sporelings* del Estadio I (10 días en medio líquido) crecidos bajo los diferentes tratamientos de inducción de la tetrasporogénesis mostró que el día corto (8:16) favoreció en un menor periodo de tiempo (2-3 semanas) la formación de estructuras irregulares similares a los tetrasporangios, en la zona cortical (Figura IV.4). Las yemas de los *sporelings* creciendo en el fotoperiodo 12:12, mostraron evidencia de estas estructuras entre las 5 y 8 semanas de cultivo pero no aparecieron como una estructura bien definida hasta las doce semanas. (Figura IV.5)

El seguimiento de los talos en 8:16 puso de manifiesto la existencia de tres zonas celulares bien diferenciadas: córtex, zona de transición y zona medular. Se observó un córtex laxo y compuesto por una o dos filas de células, intercalándose algunas de mayor tamaño. Histoquímicamente, estas células reaccionaron con el reactivo de Schiff y el alcian blue poniendo de manifiesto la presencia de polisacáridos neutros en las paredes y espacio

intracelulares, y sulfatados en los espacios inter-celulares respectivamente.

La zona intermedia o de transición se caracterizó por la presencia de filamentos perpendiculares al córtex, ramificados de 1 a 3 veces, dispersos a lo largo de todo el talo, constituidos por células isodiamétricas encadenadas a modo de cuentas. Estas células se evidenciaron positivamente con la hematoxilina, como control del estado general de la célula, y se tiñeron intensamente con el reactivo de Schiff, revelando la existencia de compuestos polisacáridicos. En la zona terminal de muchos de los filamentos se observaron estructuras de formas irregulares. Su presencia fue posterior o simultánea a la de estos filamentos. Histoquímicamente también reaccionaron positivamente con la tinción de PAS.

La capa medular o médula estaba constituida por células filamentosas y/o estrelladas más delgadas pero con una histoquímica similar a las descritas previamente para el fotoperiodo control. (Figura IV.4)

El estudio de la dependencia entre el grado de desarrollo y la formación de una mayor cantidad de tetrasporangios mostró que los *sporelings* de 4 ó 5 semanas en el fotoperiodo control, y cultivados posteriormente durante 3 semanas en el tratamiento inductor, presentaban un mayor número y una mejor diferenciación de los tetrasporangios. Por el contrario, aquellos cultivados durante un menor número de semanas en el fotoperiodo control, presentaron estructuras irregulares similares a los tetrasporangios y cadenas de células encadenadas no bien definidas, dejando entrever sólo indicios de los tetrasporangios (Figura IV.6). Los talos que permanecieron durante más tiempo en las condiciones control (6-7 semanas) presentaron a nivel histológico un córtex y médula altamente compactados, con ausencia de estas estructuras y filamentos asociados, a pesar de que macroscópicamente no existían diferencias.

Consecuentemente, el seguimiento de la tetrasporogénesis se realizó con *sporelings* cultivados durante 4 semanas en el fotoperiodo control y 3 semanas en el corto. Este estudio

puso de manifiesto los mismos eventos estructurales descritos durante la inducción, (córtez laxo y formación de filamentos), a excepción de la formación de una estructura claramente definida como el tetrasporangio (Figuras IV.7, IV.8).

Los tetrasporangios, ahora mejor definidos que en el experimento preliminar, se localizaron en la parte terminal de los filamentos anticlinales, intercalados entre las células del córtex y dispersos a lo largo de él, configurándose como células alargadas de mayor tamaño. Al microscopio óptico estas células presentaron una aparente división transversal completa y una división longitudinal dando lugar a tres células: una basal y otras dos exteriores (Figura IV.7, IV.8).

No se obtuvieron evidencias macroscópicas de la liberación de tetrasporas, ni microscópicas en el sentido de que, los tetrasporangios no sufrieron ningún tipo de alteración posterior a lo largo del tiempo de cultivo.

Los cortes realizados con material fértil procedente de la naturaleza presentaron abundantes tetrasporangios idénticos a los inducidos en cultivo. Por contra, las tetrasporas sí eran liberadas y presentaron diferentes patrones de división, indicando diferentes estadios de desarrollo (Figura, IV.9).

Eventos celulares durante la tetrasporogénesis.

Ultraestructuralmente la tetrasporogénesis se inició con la elongación de una de las células localizadas en el córtex más externo, diferenciándose de las restantes en contenido celular y por la degeneración de las células vecinas colaterales. Hasta ese momento, la zona cortical la constituyen líneas de células no diferenciables entre ellas. En estas células elongadas se observan evidencias de invaginación o formación de canales transversales en la pared, e indicios de deposición de compuestos de pared a la altura de las invaginaciones, en forma de irregularidades sinuosas en el citoplasma, que tiene como fin la separación de las dos células (Figura IV.10 A,

B). El citoplasma contiene vesículas mucilaginosas y cloroplastos situados en la periferia con un sistema tilacoidal bien organizado. No se observa acumulación de almidón.

Una vez que el esporangio se ha elongado y sufrido la primera división transversal, tiene lugar la división longitudinal, que comienza desde el interior con la deposición de material mucilaginoso que acaba tabicando la célula (Figura IV.11). La naturaleza osmofílica y amorfa de las vesículas localizadas cerca de estos canales dan idea de su colaboración en la formación de nueva pared. En todas las secciones procesadas, se observan 3 de las 4 células que constituyen el tetrasporangio: dos distales conectadas mediante *pit-connections* (puntuaciones) a otra célula basal (Figura IV.11 y IV.12). Las dos células distales son alargadas presentando una apariencia similar entre ellas, con un cloroplasto periférico en el que se distinguen los tilacoides ordenados. En el citoplasma, en ocasiones reticulado, se encuentran numerosas vesículas y cuerpos de material denso rodeados de membranas, que se asocian entre sí formando agregados concéntricos de mayor tamaño que aparentemente originan vesículas fibrilares (Figura IV.14). Asimismo se han reconocido cerca de la pared celular dictiosomas con cisternas aplanadas (Figura IV.13). La célula basal es más isodiamétrica y muestra características subcelulares distintas a las dos distales, con un citoplasma más electro-denso y menos vacuolizado, un cloroplasto ocupando mayor superficie y con el sistema tilacoidal ordenado y presencia de algunos granos de almidón (Figuras IV.11 y IV.12).

Las células de la zona de transición aparecen formando asociaciones de 3-4 células unidas entre sí mediante *pit-connections* (Figura IV.15), y que presentan en su interior numerosos granos de almidón de forma redondeada o lenticular, frecuentemente asociados al cloroplasto. En las cercanías de los *pit connections* se observa el retículo endoplasmático empaquetado (Figura IV.16). Los cloroplastos, que rodean prácticamente todo el perímetro celular presentan, plastoglóbulos, zonas de replicación de ADN y tilacoides bien ordenados en número de 8 a 10 con ficobilisomas asociados (Figura IV.17). A diferencia de las células del

esporangio, el citoplasma de las células de la zona de transición es menos denso, observándose gran cantidad de mucílago vacuolizado. Gran parte de este mucílago se deposita en la pared celular, de apariencia sinuosa, formando grandes pliegues (Figura IV.18).

Las células medulares, presentan características similares a las de las células de transición pero donde abundan los granos de almidón. Los plastidios aparecen también bien organizados y formando asociaciones con el almidón y las mitocondrias (Figura IV.19).

Figura IV.2. Corte longitudinal de un *sporeling* desarrollado en el fotoperiodo 16:8 (control) durante 10 días en medio líquido. (Tinción azul de toluidina, escala = 0,4 mm)

Figura IV.3. Detalle del eje de crecimiento de un *sporeling* en el que se observan las células medulares estrelladas y un córtex compacto. (Tinción PAS + AB, escala = 0,2 mm)

Figura IV.4. Corte longitudinal de un *sporeling* cultivado durante 16 días en 8:16. Nótese las estructuras similares a los tetrasporangios (punta de flecha), las células encadenadas (flecha) y la médula constituida por células filamentosas (m). (Tinción PAS + AB, escala = 0,06mm)

Figura IV.5. Sección longitudinal de un *sporeling* cultivado durante 40 días en 12:12. Destaca la presencia de las células encadenadas (flecha) y algunas estructuras que recuerdan a los tetrasporangios (punta de flecha). (Tinción AB + PAS, escala = 0,06mm)

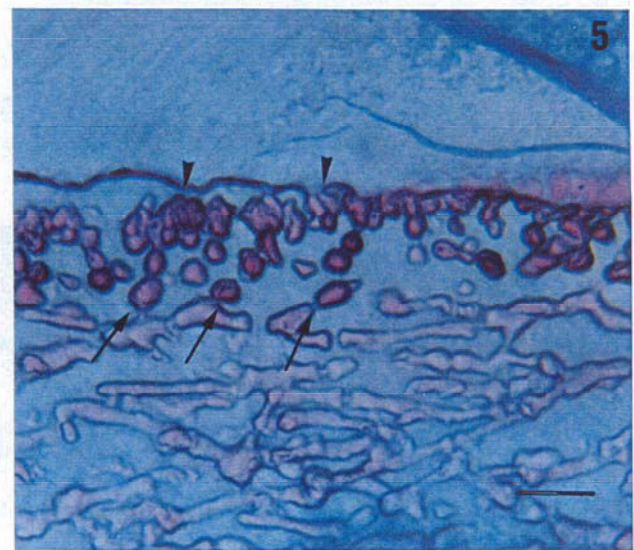
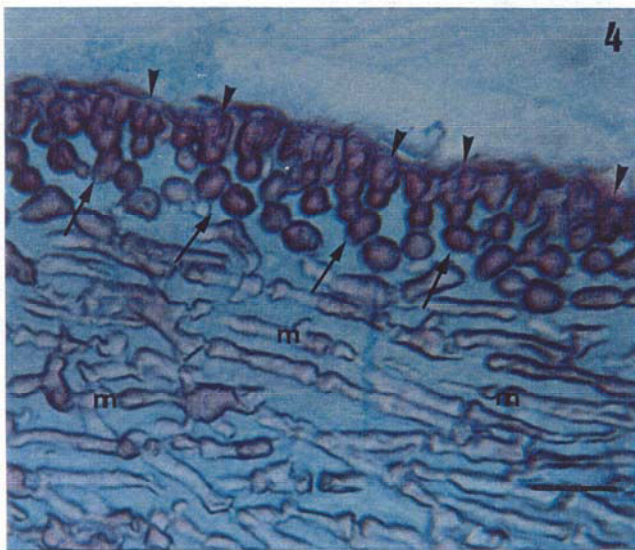
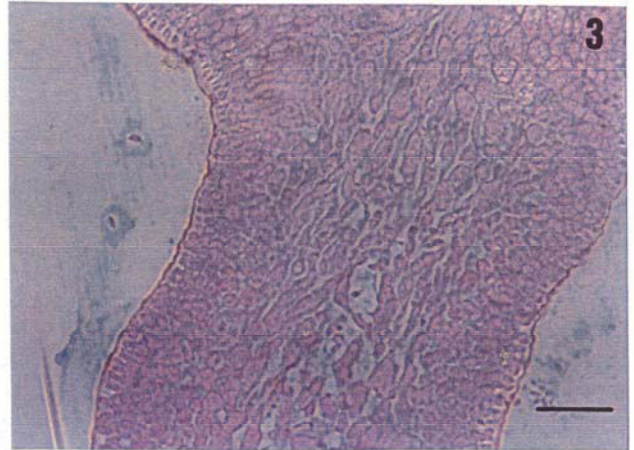
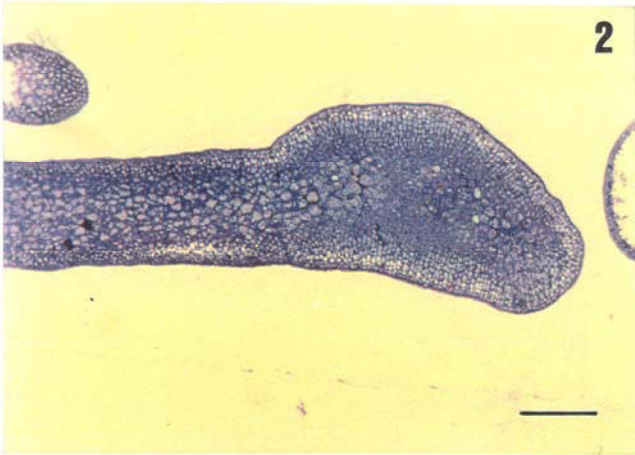


Figura IV.6. Corte longitudinal de un *sporeling* cultivado durante 21 días en 16: 8 y 3 semanas en el tratamiento inductor. Nótese la presencia de las células encadenadas (flechas) y posibles tetrasporangios (puntas de flecha). (Tinción hematoxilina, escala = 0,06 mm).

Figura IV.7 y IV.8. (IV.7) Sección longitudinal de un *sporeling* cultivado durante 4 semanas en el 16:8 y tres semanas en el 8:16. (Tinción PAS + AB). (IV.8) (Tinción hematoxilina). Destaca la presencia de tetrasporangios (puntas de flecha) y las células encadenadas (flechas). Escala = 0,06 mm

Figura IV.9. Tetrasporas liberadas del talo de *G. doryphora* procedente de la naturaleza. (Escala = 40 μ m)

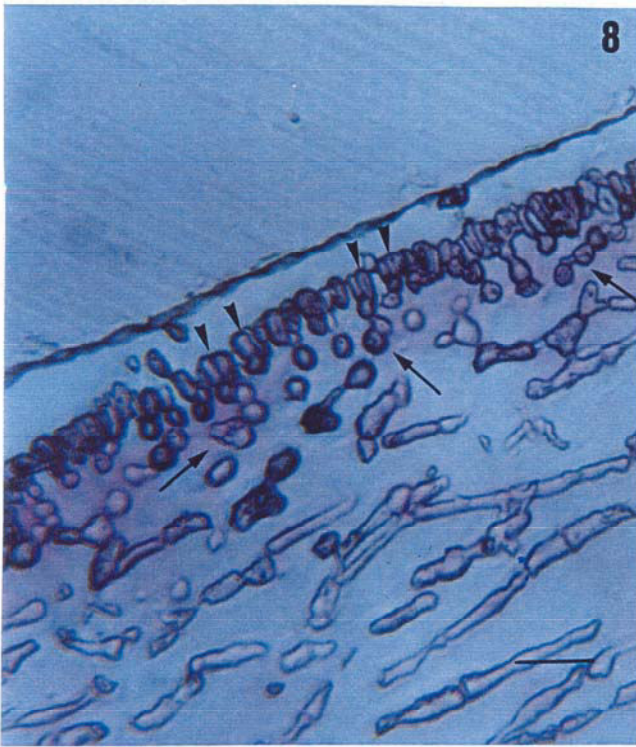
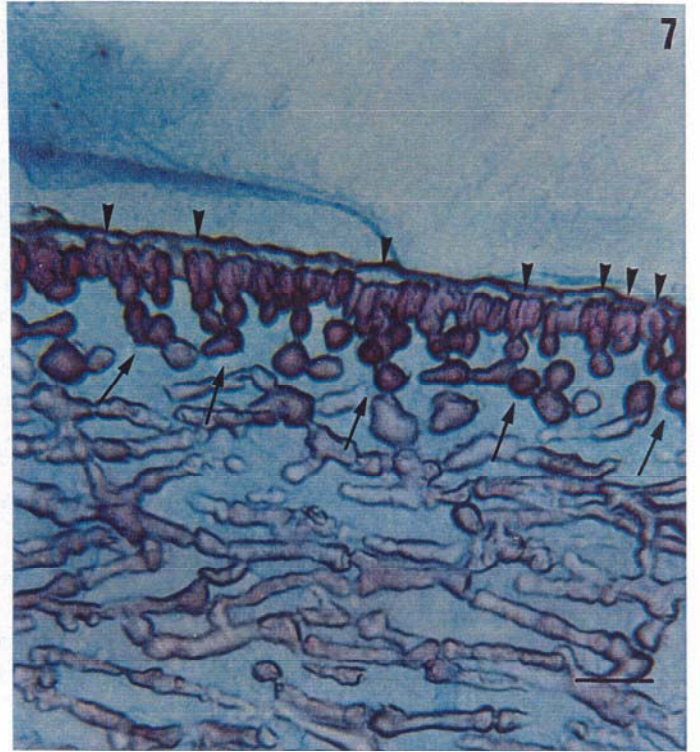
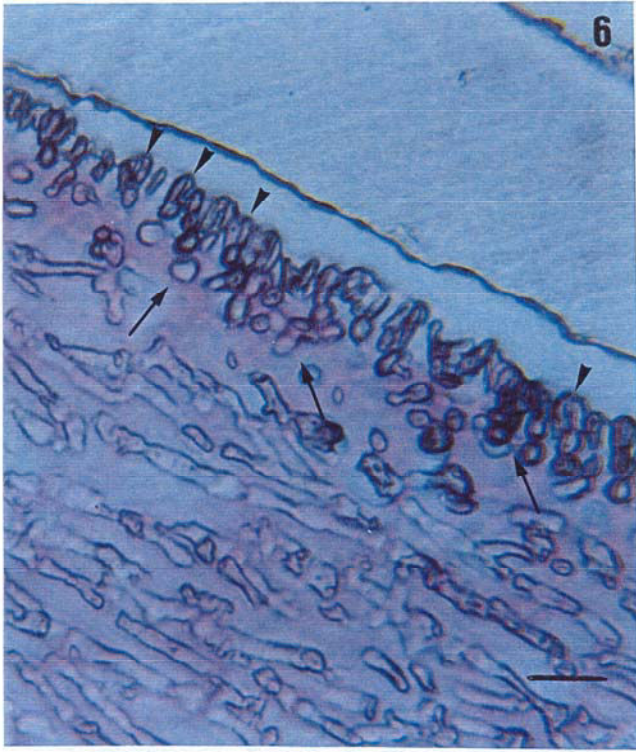


Figura IV.10. (A) Célula tetrasporógena elongada en la que se aprecian los canales de invaginación (puntas de flecha) e indicios de deposición de compuestos de pared a modo de irregularidades sinuosas en el citoplasma (flechas). (Escala=0,7 μm)
(B) Detalle de uno de los canales transversales en la pared. (n núcleo; CE córtex externo) (Escala= 0,2 μm)

Figura IV.11. Detalle de 3 de las 4 células del tetrasporangio, procedente de la naturaleza, tras completar las divisiones transversal y longitudinal. Nótese la presencia de vesículas osmofílicas (vo) localizadas en las células distales cerca de los canales, y el citoplasma reticulado. En la célula basal destaca el citoplasma denso y la presencia de granos de almidón (a). (c cloroplasto; t tilacoides; vf vesículas fibrilares; PC pared celular; CE córtex externo). (Escala= 0,8 μm)

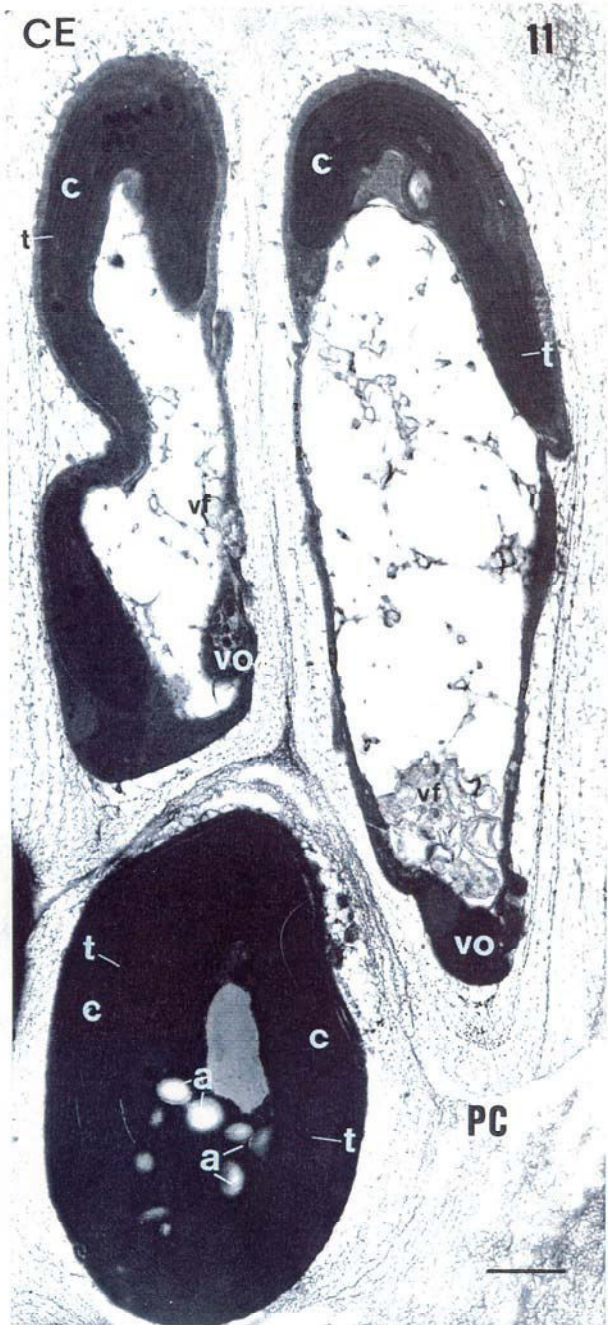
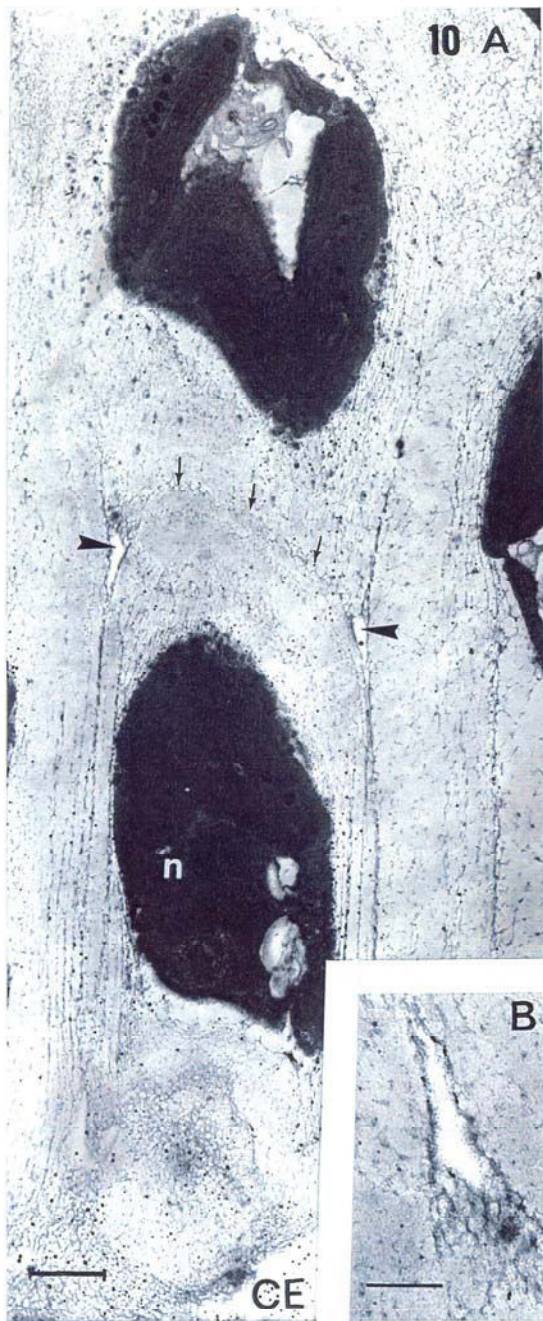


Figura IV.12. Sección que muestra 3 de las 4 células que constituyen el tetrasporangio. Nótese las puntuaciones o *pit-connections* (pc) que unen la célula basal con las dos distales, en las que se puede observar numerosas vacuolas y cuerpos de material denso rodeados de membranas que se asocian entre sí para dar agregados concéntricos de mayor tamaño. Cerca de la pared celular se distinguen dictiosomas con las cisternas aplanadas (d). La célula basal presenta un citoplasma más denso, con la presencia de granos de almidón (a) y un cloroplasto (c) que ocupa mayor superficie en el que se distinguen los tilacoides ordenados (t). (vf vesículas fibrilares; vo vesículas osmofílicas; PC pared celular). (Escala = 0,4 μm)

Figura IV.13. Detalle de los dictiosomas que presentan las cisternas aplanadas y que se localizan en las células distales del tetrasporangio, cerca de la pared celular. (Escala = 0,1 μm)

Figura IV.14. Detalle de los agregados concéntricos generados por la asociación de vesículas (vf) y que se encuentran en el citoplasma de las células distales del tetrasporangio. (Escala = 1,4 μm)

12

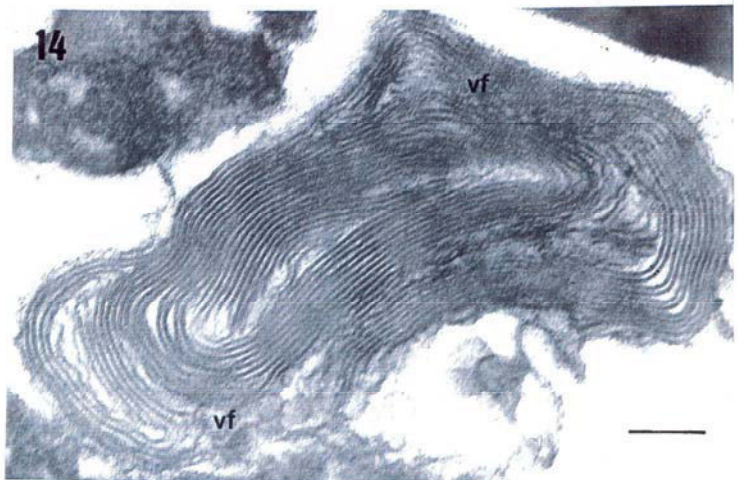
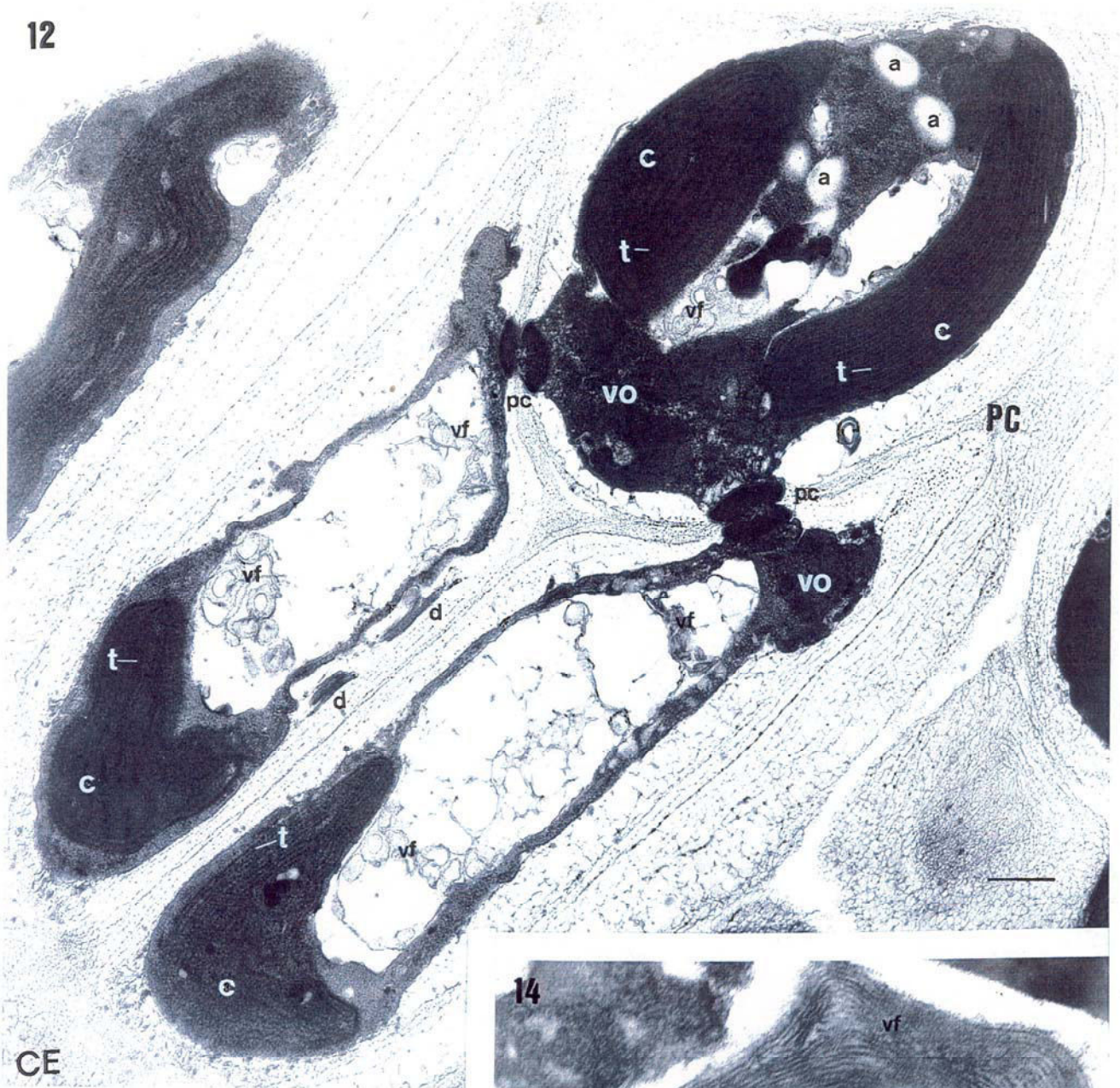


Figura IV.15. Campo celular de la zona de transición en el que se observa la asociación de tres células unidas entre sí mediante *pit-connections*. En su interior se observan numerosos granos de almidón (a) de forma lenticular y redondeada frecuentemente asociados al cloroplasto (c). Cercano a los *pit-connections* (pc) se distingue el retículo endoplasmático (re) empaquetado. (Escala= 1,2 μm)

Figura IV.16. Detalle del retículo endoplasmático (re) empaquetado en las cercanías de un *pit-connection* (pc) en una de las células de la zona de transición. (Escala= 0,5 μm)

Figura IV.17. Detalle de una célula de la zona de transición donde se observa alta actividad en la pared celular (puntas de flecha). En el cloroplasto se observan los plastoglobulos (flecha), las zonas de replicación de ADN (*) y los ficobilisomas (pequeñas flechas) asociados a los tilacoides. (PC pared celular). (Escala= 0,8 μm)

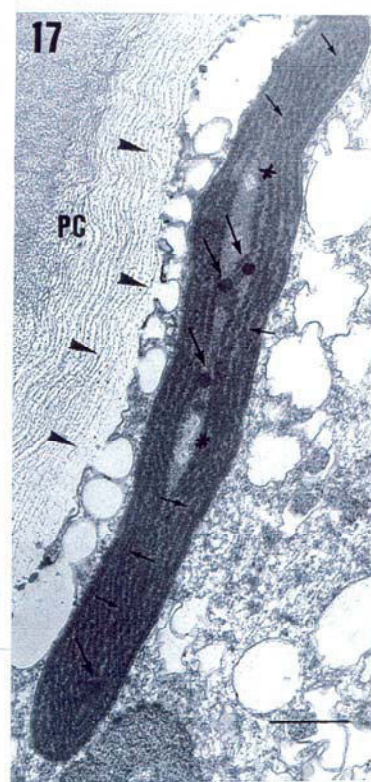
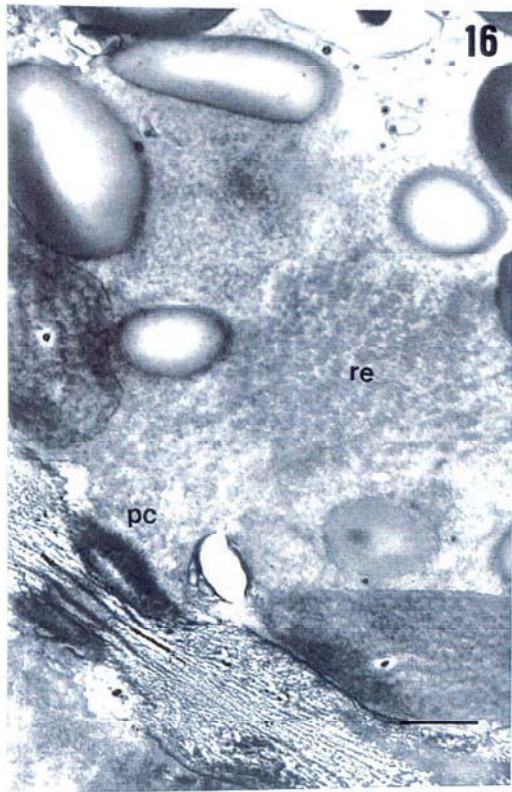
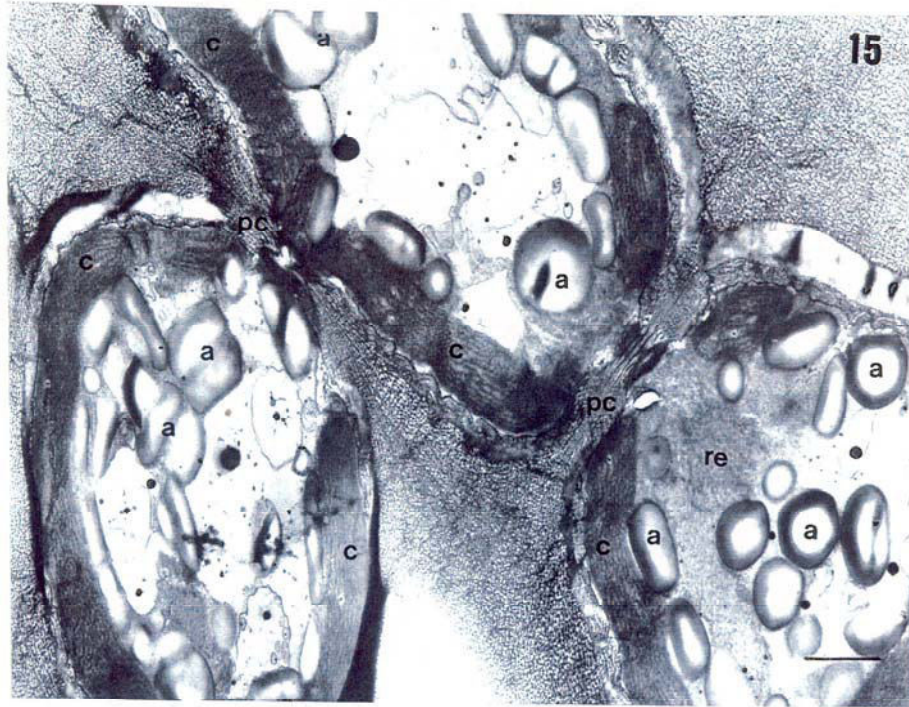


Figura IV.18. Detalle de la deposición de vesículas (v), en las células de la zona de transición, previas a la excreción. Nótese la abundante deposición de mucílago en la pared celular (PC) originando grandes pliegues. (Escala = 0,3 μm)

Figura IV.19. Células medulares unidas mediante *pit-connections* (pc) en las que se observa la abundancia de los granos de almidón (a) asociados a los cloroplastos (c) y mitocondrias (m). (Escala = 0,9 μm)



IV.4. DISCUSION.

La bibliografía señala al fotoperiodo como una de las herramientas más efectivas utilizadas para la inducción de estructuras reproductoras en cultivo (Dring, 1984). Numerosos trabajos emplean el fotoperiodo corto (8:16) como el tratamiento más adecuado para favorecer o estimular la tetrasporogénesis en las algas rojas (Maggs y Guiry, 1982; Brodie y Guiry, 1988 a,b; Mairh y col., 1990; De Cew y col., 1992; Brodie y col., 1993).

Si bien anteriores estudios con *G. doryphora* (García-Jiménez, 1994) habían demostrado que en condiciones control (medio PES líquido, 18 °C, fotoperiodo 16:8, 30 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), los *sporelings* no diferenciaban tetrasporangios, el cultivo bajo los fotoperiodos 12:12 y 8:16 permitieron el desarrollo de las estructuras reproductoras, siendo el último fotoperiodo el que, en un menor periodo de tiempo (3 semanas), reveló la presencia de tetrasporangios irregulares y estructuras asociadas a la tetrasporogénesis.

Este tratamiento inductor, es decir cultivo bajo fotoperiodo corto durante tres semanas consecutivas, resultó ser eficaz y reproducible para la diferenciación celular de *sporelings* en el Estadio I.

El tiempo de respuesta obtenido para *Grateloupia doryphora* fue similar al observado para otras rodofitas, como la Cryptonemiaceae *Acrosymphyton purpuriferum* (20 días, Cortel-Breeman, 1975), y la Rhodymeniaceae *Botryocladia ardreana* (15 días, Brodie y Guiry, 1988 b).

El establecimiento de los Estadios de crecimiento de *Grateloupia doryphora* permitió seleccionar *sporelings* con diferentes, pero conocidos, grados de desarrollo y probar el efecto del fotoperiodo inductor. Comprobamos que partiendo de *sporelings* del Estadio 0 y transferidos posteriormente a medio líquido, tras 4-5 semanas en estas condiciones, en el que alcanzaban un determinado tamaño (Estadio I-II), el tratamiento inductor en el fotoperiodo corto resultaba más

efectivo, con la presencia de un mayor número de tetrasporangios bien definidos.

A pesar de su importancia, la idea de alcanzar una talla (supuestamente asociada a un grado de desarrollo mínimo) para ser reproductivamente maduro, aparece únicamente reflejada en algunos trabajos, pero sin concretar ni tiempos de cultivo, ni tallas, ni edad y limitándose a emplear el término "maduro" sin mayores especificaciones. Para llevar a cabo este tipo de estudios con algas de la naturaleza, es necesario realizar el seguimiento de una cohorte a través del tiempo para conocer la edad de los talos, y, obviamente se plantean numerosos problemas técnicos que explicarían la ausencia de trabajos con este material. Por otra parte, el paso del estado vegetativo a la reproducción en la mayoría de las algas conlleva muy poco crecimiento, siendo generalmente dependiente de los factores ambientales, como son la temperatura y la luz. Los gametofitos de las laminarias, por ejemplo, pueden reproducirse cuando tienen un tamaño de pocos centímetros o pueden seguir creciendo indefinidamente dependiendo de la calidad o cantidad de luz (Lüning y tom Dieck, 1989; Lüning, 1990).

Diversos autores, trabajando con material vegetal cultivado en el laboratorio, sin embargo relacionan la edad o el tamaño del talo con la formación de estructuras reproductoras. Cunningham y col., (1993) afirman que la formación de tetrasporangios no ocurre en *Helminthora stackhousei* con talos menores de 3-4 semanas de cultivo. West y Calumpong (1988), a pesar de no mencionar el tiempo de cultivo, hacen referencia a que la diferenciación reproductiva no ocurre generalmente hasta que los *sporelings* de *Spyridia filamentosa* alcanzan 1,0 cm de longitud. West y Guiry (1982) fijan este tamaño de diferenciación para *Gigartina johnstonii* en 1,5-2 cm. Brodie y Guiry (1988b) citan sin concretar, que la reproducción en cultivo de *Botryocladia ardreana* parece ser función de la edad y no del tamaño del talo y no creen que el fotoperiodo tenga efecto sobre ello.

En el caso de los *sporelings* de *Grateloupia doryphora* cultivados *in vitro*, el tratamiento inductor es más efectivo sobre aquellos individuos entre el Estadio I y II, con 4-5

semanas en las condiciones control de cultivo. En este tiempo de cultivo los *sporelings* de este Estadio desarrollan ejes de crecimiento de unos 0,5 cm. Sin embargo, si el *sporeling* permanece creciendo mucho tiempo en el fotoperiodo control, alcanzando el Estadio III, el tejido se va configurando y compactando en una médula y un córtex bien definidos (Figura IV.3) y a pesar del tratamiento posterior de las tres semanas en el fotoperiodo corto, no es posible observar una diferenciación de estructuras. Este hecho parece indicar que la capacidad de respuesta al tratamiento inductor implica la necesidad de unas características tisulares concretas, tejido laxo con pocas células. Un experimento paralelo mostró que si cortábamos parte de los ejes de crecimiento de los *sporelings* del Estadio III, los cuales no habían desarrollado filamentos fértiles y, esos *sporelings* se transferían al fotoperiodo corto, el nuevo tejido desarrollado en estas condiciones inductoras, presentaba las mismas estructuras características de los inicios de la tetrasporogénesis.

En definitiva, parece por tanto que, más que la edad, entendida como tiempo en cultivo, son las características o el grado de diferenciación del tejido, laxitud o compactación del córtex, las que favorecen o no la respuesta a los tratamientos de inducción de las estructuras reproductoras.

Paralelamente este trabajo pretendía ya no sólo aportar datos sobre el tamaño o grado de desarrollo mínimo del alga necesario para la formación de estas estructuras reproductoras, sino también avanzar en el conocimiento de los eventos previos y posteriores a la diferenciación celular. Los estudios sobre el proceso de la tetrasporogénesis suelen partir de muestreos escasos, basados en material fértil proveniente de la naturaleza (Pueschel, 1982; Tsekos y col., 1985; Gargiulo y col., 1992), con el inconveniente adicional de que las diferencias ecológicas pueden ser responsables de la variación citológica (Pueschel, 1979). Por ello la herramienta del cultivo resulta imprescindible para llevar a cabo un estudio detallado de la tetrasporogénesis de un alga

desde los primeros estadios del proceso.

El origen y patrón de formación de la célula tetrasporógena es muy variable entre las rodofitas. Brodie y col. (1993) tras inducir su formación en cultivo mediante el fotoperiodo corto, describieron para dos morfotipos de la especie *Chondrus ocellatus* (Gigartinales, Rhodophyta) dos patrones distintos de formación del tetrasporangio; uno a partir de las células medulares y otro a partir de las células del córtex. Otras rodofitas como *Gloisiphonia* (Cryptonemiales), *Gymnogongrus furcellatus* y *Opuntia californica* (Gigartinales) sin embargo, originan su tetrasporangios en filamentos peritálicos (DeCew y col., 1981; Lewis y col., 1991; De Cew y col., 1992). En ocasiones las células tetrasporógenas aún existiendo, son tan pequeñas, que incluso se obvian (Brodie y Guiry, 1988a, b), lo que implica que los estudios en este campo deben ser rigurosos, empleando para ello las técnicas microscópicas.

En el caso de los *sporelings* de *G. doryphora* y tras el tratamiento inductor observamos al microscopio óptico la presencia de un córtex muy laxo compuesto por 2-3 líneas de células (Figuras IV.7 y IV.8). En la zona subcortical aparecieron de forma bien definida filamentos ramificados perpendiculares al córtex, constituido por células encadenadas, con estructuras en su zona terminal a modo de tetrasporangios en división. Los tests histoquímicos que revelan la presencia de polisacáridos neutros y sulfatados ponen de manifiesto que estas células reaccionan positivamente con el reactivo de Schiff y alcian blue, así como, con la hematoxilina dando lugar a células marcadamente teñidas (Figuras IV.7 y IV.8). Este patrón es similar al de otras especies de rodofitas; Pueschel (1979) describe para *Palmaria palmata* a las células tetrasporógenas como aquellas células apicales de los filamentos corticales o fértiles que se elongan y se diferencian del resto de las células del córtex exterior, a su vez constituido por pocas células. West y Guiry (1982) observaron que los tetrasporangios de *Gigartina johstonii* se formaban siguiendo un patrón parecido, a partir de filamentos subcorticales que posteriormente daban

lugar a tetrasporas divididas de forma cruciada o decusada. También de forma similar, Guiry y Maggs (1982) describieron para el alga *Dermocorynus montagnei* (Halymeniaceae) que la célula tetrasporógena o célula madre se originaba a partir de las ramas laterales de unos filamentos anticlinales.

Las dos únicas referencias acerca del patrón de desarrollo de la tetrasporogénesis del género *Grateloupia*, encontradas en la bibliografía, también se basan en observaciones realizadas a partir de material recolectado en la naturaleza y cultivado en el laboratorio e igualmente carecen de un seguimiento microscópico riguroso presentando los resultados con ilustraciones. Kraft (1977) se limita a describir para *Grateloupia intestinalis* el tamaño y patrón de división de las tetrasporas, que puede ser cruciada o decusada y no aporta información sobre el modo de formación del tetrasporangio. Pérez-Cirera y col. (1989) observaron para *Grateloupia lanceola* estructuras similares a las descritas en nuestro estudio: las células tetrasporógenas se originan lateralmente de forma secundaria a partir de las células basales de los filamentos anticlinales externos. Posteriormente estas células tetrasporógenas se dividen transversalmente, se separan del filamento cortical y cada una de las células originadas en esta primera división sufre una nueva división longitudinal, dando lugar a tetrasporangios elipsoidales cruciados o decusados.

Paralelamente, estudios realizados con otras rodofitas cultivadas tales como *Chondrus ocellatus* y *Halymenia latifolia*, han mostrado que para las mismas especies, los tetrasporangios de cultivo suelen tener un tamaño menor (Brodie y col., 1993; Maggs y Guiry, 1982). Esto explicaría que los tetrasporangios descritos para *G. lanceola* procedentes de la naturaleza midan aproximadamente 20x35 μm , mientras que los inducidos en *G. doryphora* en cultivo son de aproximadamente (5-7) x (12-20) μm .

Atendiendo a nuestros estudios, los tetrasporangios de *G. doryphora* son decusados-cruciados con dos esporas grandes y dos más pequeñas, una de las cuales estaría en distinto

plano. Por esta razón explicaríamos que a nivel del microscopio óptico y con cortes realizados a mano alzada, sea posible visualizar 4 esporas (Figura IV.9), mientras que, con cortes semifinos y ultrafinos en los que se trabaja en dos dimensiones estrictamente, sólo sea visible estructuras de 3 células (Figuras IV.11, IV.12). Este hecho además, aparece refutado en la bibliografía (revisión de Guiry, 1978) que señala que todos los órdenes de las Florideophyceae presentan tetrasporangios con división cruzada, siendo además las familias Cryptonemiaceae, Kallymeniaceae y Chlorellaceae las que con cierta consistencia pueden enmarcarse dentro de estas divisiones, ya que las restantes incluyen mezclas de diferentes tipos de división. Descartamos el tipo tetraédrico, a pesar de que su procedencia deriva de las cruzadas puesto que, las esporas resultantes son del mismo tamaño entre sí. Además, los tetrasporangios divididos tetraédricamente sufren divisiones simultáneas y sólo se presentan en Ceramiales, Nemaliales (Gelidiaceae) y Rhodymeniales, mientras que, las cruzadas tienen dos divisiones sucesivas o separadas.

El estudio ultraestructural nos confirmó que los patrones *in vitro* y de la naturaleza eran iguales. Comparando el modelo desarrollado por *G. doryphora* frente a las estructuras celulares descritas en algunas rodofitas por otros autores, como en *Halimnion curveri* (Vesk y Borowitzka, 1984), *Harveyella* sp. (Krugens y Kolowski, 1981), *Palmaria palmata* (Pueschel, 1979), *Hildenbrandia* (Pueschel, 1982) y *Chondria tenuissima* (Tsekos y col., 1985), respecto a la división nuclear, no se observaron complejos sinaptonemales, los cuales son indicadores fundamentales de la existencia de meiosis (Pueschel, 1979; Tsekos y col., 1985), ya que, no se realizó un seguimiento de la división nuclear. Sí se observaron 2 núcleos con forma irregular claramente diferenciados en cada una de las células ya divididas longitudinalmente y uno en la célula basal, difícil de entrever (Figura IV.10A). La presencia de núcleos de forma irregular ha sido recogida en células reproductivas de muchas algas rojas (Scott & Dixon, 1973),

probablemente tanto por la presión citoplasmática ejercida por los restantes componentes celulares (Krugens y West, 1972) como por la deformación intrínseca que sufren a lo largo del proceso de división, y como consecuencia de la síntesis de elementos nucleares (Pueschel, 1979).

Como se ha comentado, la mayoría de los trabajos emplean el proceso de la meiosis como referencia temporal de la tetrasporogénesis pero en general, se ha llevado a cabo sobre tetrasporangios que conllevan una célula base o de soporte (*stalk cell*) de las tetrasporas (Krugens y Kolowsky, 1981; Pueschel, 1982; Vesik y Borowitzka, 1984; Tsekos y col., 1985). Son incompletos o inexistentes los estudios en los que se describe la tetrasporogénesis sobre células con división cruzada o zonada. En ninguna de las observaciones ultraestructurales de *G. doryphora* se recogieron imágenes de los 4 núcleos presentes previa a la división.

Observamos también un aumento de la actividad del sistema de endomembrana. Al microscopio electrónico existen evidencias de la deposición de una nueva pared celular externa que no parece tener continuidad a lo largo del perímetro del tetrasporangio (Figuras IV.11 IV.12). La aparente no continuidad de esta nueva pared en las células tetrasporangiales de *G. doryphora* puede ser explicada por la enorme deposición de contenido de pared que tiene lugar y que llega a convulsionar el contorno de la célula, destacando vesículas mucilaginosas y fibrilares diferenciadas, e inclusiones electrodensas en las que no se distingue una membrana que las englobe (Figuras IV.11 y IV.12).

Durante la tetrasporogénesis de *G. doryphora* es destacable el desarrollo y actividad del sistema de endomembrana. Así, se obtuvieron imágenes de agregados de retículo endoplasmático (Figura IV.16) localizado en la periferia celular, y que parecen ser característicos de células que segregan lípidos, sustancias hidrofílicas y proteínas (Schneff, 1969; Galatis y Apostolakis, 1977) y que podrían estar colaborando en la formación de nueva pared (Tsekos y col., 1985). También se observó la presencia de dictiosomas (Figura IV.13), los

cuales modificaban su estructura a medida que avanzaba el proceso. Durante los estadios tempranos de la tetrasporogénesis, el aparato de Golgi produce vesículas que contribuyen a la secreción mucilaginosa (Chamberlain y Evans, 1973; Krugens y West, 1974; Pueschel, 1979, 1982; Tsekos y col., 1985). El contenido de estas vesículas se descarga por exocitosis o puede ser añadido a sacos mayores de mucílago para una secreción posterior. La abundancia de estas vesículas disminuye en el citoplasma a medida que avanza la tetrasporogénesis. Existe otro tipo de vesículas fibrilares formadas por “aparentemente” membranas dispuestas concéntricamente que se sitúan también en el citoplasma (Figura IV.14). Al final del proceso son también evidentes vesículas con un centro opaco a los electrones, o *cored vesicles*, también observadas durante la carposporogénesis de *G. doryphora* (García-Jiménez, 1994). Todas estas vesículas contribuyen a la adhesión y protección de las esporas tras su liberación (Tsekos y col., 1985; García-Jiménez, 1994).

La formación de canales de división (Figura IV.10A,B) desde el interior del tetrasporangio ha sido recogida también en los estadios postmeióticos de *Haliptilon cuvieri*. En este caso, el lugar donde comienza la división está predeterminado por la deposición de un material de naturaleza desconocida, pero que recuerda al contenido de las vesículas procedentes del Golgi (Vesk y Borowitzka, 1984).

Al final de la tetrasporogénesis, el conjunto de esporas, independientemente del tipo de división sufrida por el tetrasporangio, se mantiene unido, aunque las esporas que lo conforman mantienen entre ellas una zona diferenciada más clara según la tinción con azul de toluidina y/o menos electrodensa atendiendo a las observaciones al microscopio electrónico (Figuras IV.11 y IV.12) (Tsekos y col., 1985; este trabajo).

La existencia de esta separación entre las células del tetrasporangio puede ser un mecanismo que evite interferencias durante la fijación y posterior desarrollo de las esporas, por ejemplo debidas a cambios en la composición iónica del medio que, resultaría en la inviabilidad

de algunas de las cuatro esporas, en vez de todas. La formación de esporas es también un proceso asincrónico incluso dentro del mismo esporangio (Pueschel, 1979).

El hecho de que no existan evidencias de liberación de las tetrasporas de los *sporelings* en cultivo *in vitro* nos hace pensar que el final de la tetrasporogénesis se aborta en alguna de sus etapas. Atendiendo a la bibliografía parece que a partir del proceso meiótico, el tetrasporangio puede dejar de ser viable y se "reorganiza" incorporándose al córtex. En rodofitas, se han observado casos de reabsorción de tetrasporangios. Así, en el alga roja *Opuntella californica*, por ejemplo, no se produjo liberación de esporas y los esporangios no liberados penetraron y se reabsorbieron en los filamentos peritálicos adyacentes (De Cew y col., 1992). Eventos similares están descritos en procarpos viejos de *Mastocarpus* (West, 1972) y en tetrasporangios de *Gigartina johnstonii* (West y Guiry, 1982).

En conclusión:

- 1) El cultivo bajo fotoperiodo corto durante tres semanas consecutivas, resultó ser un tratamiento eficaz y reproducible para la diferenciación celular de los tetrasporangios en los *sporelings* del Estadio I-II.
- 2) Partiendo de *sporelings* del Estadio 0 y transferidos posteriormente a medio líquido, tras 4-5 semanas en estas condiciones, en el que alcanzaban un determinado tamaño (Estadio I-II), el tratamiento inductor en el fotoperiodo corto resultaba más efectivo, con la presencia de un mayor número de tetrasporangios bien definidos.
- 3) Parece que más que la edad, entendida como tiempo en cultivo, son las características o el grado de diferenciación del tejido, laxitud o compactación del córtex, las que favorecen o no la

respuesta a los tratamientos de inducción de las estructuras reproductoras.

4) Los eventos estructurales relacionados con la tetrasporogénesis son la presencia del córtex laxo y de los filamentos fértiles que originan los tetrasporangios. Ultraestructuralmente, este proceso se caracteriza por la elongación y división de la célula cortical más distal del filamento, y la adquisición de características celulares propias de la tetrasporogénesis (secreción de componentes de pared celular, actividad dictiosomal, acumulación de vesículas).

5) La tetrasporogénesis inducida en cultivo no finaliza con la maduración y la liberación de tetrasporas. Estos procesos parecen depender de factores adicionales al inductor.

IV.5 BIBLIOGRAFÍA.

- Alley CD, Scott JL (1977) Unusual dycytosome morphology and vesicle formation in tetrasporangia of the marine red alga *Polysiphonia demodata*. J Ultrastruct Res 58: 289-98
- Avazini A, Honsell P (1984) Membrane tubules in the tetraspores of a red alga. Protoplasma 119: 156-8
- Brodie J, Guiry MD (1988 a) Life History and Reproduction of *Cordylecladia erecta* (Rhodymeniaceae, Rhodophyta). Br Phycol J 23: 347-364
- Brodie J, Guiry MD (1988 b) Life history and reproduction of *Botryocladia ardreana* sp.nov. (Rhodymeniales, Rhodophyta) from Portugal. Phycologia 27(1): 109-130
- Brodie J, Guiry MD, Masuda M (1993) Life history, morphology and crossability of *Chondrus ocellatus* forma ocellatus and *C. ocellatus* forma crispoides (Gigartinales, Rhodophyta) from the north-western Pacific. Eur J Phycol 28: 183-196
- Brodie J, Masuda M, Guiry MD (1994) Life history and photoperiodic responses in *Chondrus giganteus* forma flabellatus (Gigartinaceae, Rhodophyta) from Japan. Eur J Phycol 29: 159-164
- Cortel-Breeman AM (1975) The life history of *Acrosymphyton purpuriferum* (J.Ag.) Sjöst (Rhodophyceae, Cryptonemiales). Isolation of the tetrasporophytes. Acta Bot Neerl 24(2): 11-127

Cunningham EM, Guiry MD, Breeman AM (1993) Environmental regulation of development, life history and biogeography of *Helminthora stackhousei* (Rhodophyta) by daylength and temperature. *J Exp Mar Biol Ecol* 171: 1-21

Chamberlain AH, Evans LV (1973) Aspects of spore production in the red alga *Ceramium*. *Protoplasma* 76: 139-159

Davis E, Scott J (1986) Ultrastructure of cell division in the marine red alga *Lomentaria baileyana*. *Protoplasma* 131: 1-10

De Cew T, West JA, Ganesann EK (1981) The life histories and development morphology of two species of *Gloiosiphonia* (Rhodophyta, Cryptonemiales, Gloiosiphoniceae) from the Pacific coast of North America. *Phycologia* 20(4): 415-423

De Cew T, West JA, Silva PC (1992) The life history and anatomy of *Opuntiella californica* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Phycologia* 31(5): 462-469

Dixon PS (1973) *Biology of the Rhodophyta*. Oliver & Boyd, Edinburgh

Dring MJ (1967) Phytochrome in red alga, *Porphyra tenera*. *Nature* 215: 1411-12

Dring MJ (1984) Photoperiodism and phycology. *Prog Phycol Res* 3: 159-92

Dring MJ (1988) Photocontrol of development in algae. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 39: 157-74

Duckett JG, Peel MC (1978) The role of transmission electron microscopy in elucidating the taxonomy and phylogeny of the Rhodophyta. En Irvine DE, Price JH (eds.) *Modern Approaches to the taxonomy of Red and Brown Algae*. Academic Press: 157-204

Galatis B, Apostolakos P (1977) On the fine structure of differentiating mucilage papillae of *Marchantia*. *Can J Bot* 55: 772-795

García-Jiménez P (1994) Aclimatación reproductiva, fisiológica y estructural al cultivo in vitro del alga *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe (Rhodophyta). Tesis Doctoral. U.L.P.G.C.

Gargiulo GM, De Masi F, Tripodi G (1992) Morphology, reproduction and taxonomy of the mediterranean species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycologia* 31 (1):53-80

Gori P (1982) An investigation of tetrasporogenesis in the marine red alga *Gastroclonium clavatum* (Roth) Ardissonne (Rhodymeniales). *Ann Bot* 50: 451-457

Guiry MD (1978) The importance of Sporangia in the Classification of the Florideophyceae. En *Modern Approaches to the taxonomy of red and brown algae*. Irvine D, Price N, (eds.). Academic Press.

Guiry MD, Maggs CA (1982) The morphology and life history of *Dermoconyomus montagnei* cronan frat. (Halymeniaceae, Rhodophyta) from Ireland. *Br Phycol J* 17: 215-228

Guiry MD, Dawes C (1992) Daylength, temperature and nutrient control of tetrasporogenesis in *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta). *J Exp Mar Biol Ecol* 158: 197-217

- Konrad-Hawkins EK (1974) Growth and differentiation of the Golgi apparatus in the red alga, *Callithamnion roseum*. J Cell Sci 14: 633-655
- Kraft GT (1977) The morphology of *Grateloupia intestinalis* from New Zealand, with some thoughts on generic criteria within the family Cryptonemiaceae (Rhodophyta). Phycologia 16(1): 43-51
- Krugens P, West JA (1972) Ultrastructure of tetrasporogenesis in the parasitic red alga *Levringiella gardneri* (Setchell) Kylin. J Phycol 8: 370-383
- Krugens P, West JA (1974) The ultrastructure of carposporogenesis in the marine hemiparasitic red alga *Erythrocytis saccata*. J Phycol 10:139-47
- Krugens P, Kolowsky J (1981) Electron microscopic studies on an unique cytokinetic structure in tetrasporocytes of the red alga *Harveyella* sp. (Cryptonemiales, Choreocolaceae). Protoplasma 108:197-209
- Lee YP, Kurogi M (1983) The life history of *Audouinella alariae* (Johnson) Woelkerling (Rhodophyta, Acrochaetiaceae) in nature and culture. J Fac Sci Hokkaido Univ Ser V (Botany) 13: 57-76
- Lewis NI, Avila M, Mc Lachlan JL (1991) Life history of *Gymnogongrus furcellatus* (C.Ag.) J.Ag. (Rhodophyta, Phyllophoaceae) from Chile. Bot Mar 34: 145-152

- Lüning K (1981) Photomorphogenesis of reproduction in marine macroalgae. *Ber Deutsch. Bot Ges* 94: 401-17
- Lüning K (1990) *Seaweeds. Their Environment, Biogeography and Ecophysiology*. Yarish C, Kirkman H. (trans. & ed.). New York: Wiley-Interscience
- Lüning K, tom Dieck I (1989) Environmental triggers in algal seasonality. *Bot Mar* 32: 389-97
- Maggs CA (1988) Intraspecific life history variability in the Florideophyceae (Rhodophyta). *Bot Mar* 31:465-490
- Maggs CA, Guiry MD (1982) Morphology, phenology and photoperiodism in *Halymenia latifolia* Kütz. (Rhodophyta) from Ireland. *Bot Mar* 25:589-599
- Mairh OP, Ramavat BK, Rao PS (1990). Nutrition, growth and tetraspore induction of *Gelidiella acerosa* Feld. et Hamel (Gelidiellaceae, Rhodophyta) in culture. *Bot Mar* 33:133-141
- Molenaar F, Breeman AM (1994) Ecotypic variation in *Phyllophora pseudoceranoides* (Rhodophyta) ensures winter production throughout its geographic range. *J Phycol* 30: 392-402
- Murray SN, Dixon PS (1992) The Rhodophyta: some aspects of their biology. III *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 30: 1-148

Peel M, Lucas IAN, Duckett JG, Greenwood AD (1973) Studies of sporogenesis in the Rhodophyta. I. An association of the nuclei with endoplasmic reticulum in postmeiotic tetraspore mother cells of *Corallina officinalis*. L Z Zellforsch 147: 59-74

Pérez-Cirera JL, Cremades J, Bárbara I. (1989) *Grateloupia lanceola* (Cryptonemiales, Rhodophyta) en las costas de la Península Ibérica: Estudio morfológico y anatómico. Lazaroa 11:123-134

Peyrière M (1970) Evolution the l'aparaleil de Golgi au controle de la tetrasporogenése de *Griffithsia flosculosa* (Rhodophyceae). C R Acad Sci Paris Ser D 270: 2071-2074

Pueschel CM (1978) Tetrasporogenesis and other cytological features of the red alga *Palmaria palmata* (Rhodymenia Palmata). Tesis doctoral, Universidad de Cornell, Nueva York, EE.UU.

Pueschel CM (1979) Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). J Phycol 15:409-24

Pueschel CM (1982) Ultrastructural observations of tetrasporangia and conceptacles in *Hildenbrandia* (Rhodophyta, Hildenbrandiales). Br Phycol 17: 333-341

Rentschler, H-G. (1967) Photoperiodische Induktion der Monosporenbildung bei *Porphyra tenera* Kjellm. (Rhodophyta, Bangiophyceae). Planta 76: 65-74

Rodrigo M, Rovira C, García-Jiménez P, Robaina RR (1995) Biología reproductiva de *Grateloupia doryphora*. XI Simposium Nacional de Botánica Criptogámica. Santiago de Compostela

Santisi S, De Masi F (1981) An electron microscopy study on the tetrasporogenic on the parasitic red alga *Erythrocytis montagnei* (Derb. and Sol.) Silva. *Cytobios* 31:163-178

Schenpf E (1969) Sekretion und exkretion bei Pflanzen. *Protoplasmatologia* 8: 1-181

Scott JL, Dixon PS (1973) Ultrastructure of tetrasporogenesis in the marine red algae *Ptilota hypnoides*. *J Phycol* 9: 29-46

Scott JL, Thomas JP (1975) Electron microscope observations of telophase II in the Florideophyceae. *J Phycol* 11: 474-476

ten Hoopen A, Bos S, Breeman AM (1983) Photoperiodic response in the formation of gametangia of the long-day plant *Sphacelaria rigidula* (Phaeophyceae). *Mar Ecol Prog Ser* 13: 285-9

Tsekos I, Schnepf E, Makrantonakis A (1985) The ultrastructure of tetrasporogenesis in the marine red alga *Chondria tenuissima* (Good. et Woodw.) (Ceramiales, Rhodomelaceae). *Annals of Botany* 55: 607-619

Vesk M., Borowitzka MA (1984) Ultrastructure of tetrasporogenesis in the coralline alga *Haliptilon cuvieri* (Rhodophyta). *J Phycol* 20:501-515

West JA (1972) Environmental regulation of reproduction in *Rhodochorton purpureum*. En Abbot A, Kurogi M (eds.) Contributions to the Systematics of the Benthic Marine Algae of the North Pacific. Kobe: Japan Soc Phycol

West JA, Hommersand MH (1981) Rhodophyta: life histories. En Lobban CS, Wynne M (eds.) The Biology of the Seaweeds. Blackwell Scientific Publications

West JA, Guiry MA (1982) A Life history study of *Gigartina johnstonii* (Rhodophyta) from the Gulf of California. Bot.Mar 25:205-211

West JA, Calumpong HP (1989) On the reproductive biology of *Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey (Rhodophyta) in Culture. Bot Mar 32:379-387

Yamanouchi, S. (1906). The life-history of *Polysiphonia violacea*. Bot Gaz 41:425-433

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
N.º Documento 442.827
N.º Copia 536.412

