

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**ACLIMATACIÓN REPRODUCTIVA FISIOLÓGICA Y ESTRUCTURAL
AL CULTIVO INVITRO**

MARÍA DEL PILAR GARCÍA JIMÉNEZ

Las Palmas de Gran Canaria, Marzo de 1994

27-1993/94

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, la aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por la Doctoranda las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO COM LAUDE
Las Palmas de G. C., a 11 de Marzo de 1.994.
El Presidente: Dr. D. José Regidor García,

El Secretario: Dr. D. Pascual Caballero Ortega,

La Vocal: Dr^a D^a M^a Rosario de Felipe Antón,

El Vocal: Dr. D. Roberto Rodríguez Fernández,

El Vocal: Dr. D. Ioannes Tsekos,

La Doctoranda: D^a M^a del Pilar García Jiménez,



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
LAS PALMAS DE G. CANARIA	
N.º Documento	339.618
N.º Copia	339.624



**ACLIMATACION REPRODUCTIVA, FISIOLÓGICA Y ESTRUCTURAL
AL CULTIVO "IN VITRO" DEL ALGA *Grateloupia doryphora* (Montagne)
Howe (RHODOPHYTA).**

Memoria que presenta la Lcda. en Ciencias del Mar
M^a Pilar García Jiménez para aspirar al grado de
Doctor.

Las Palmas G.C., Marzo de 1994.

Los Dres. D. Angel Luque Escalona, Catedrático de Universidad
y D. Rafael Robaina Romero, Profesor Titular, del Departamento
de Biología de la Universidad de Las Palmas G.C.

Hacen constar:

Que la Lcda. en Ciencias del Mar, M^a Pilar García Jiménez ha
realizado el presente trabajo como Memoria de Tesis Doctoral
bajo su dirección, en el Dpto. de Biología de la U.L.P.G.C., y se
presenta con nuestro V^oB^o.

Fdo. Angel Luque.



Fdo. Rafael Robaina.

Las Palmas G.C., Marzo de 1994.

AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas deseo agradecer :

* A los Dres. Angel Luque Escalona y Rafael Robaina Romero por lo que me han enseñado y cómo lo han hecho. Gracias por su constante orientación en el desarrollo de este trabajo y su enorme paciencia.

* A Rafa que soportó innumerables horas de discusión, en las que siempre estuvo presente su enorme entusiasmo e ingenio. Gracias por enseñarme a ver dónde yo no veía, apoyándome, sin condiciones, en los momentos equivocados.

* A Angel cuyas sugerencias han permitido ampliar mi "horizonte" e ir tomando, casi sin notarlo, la dirección buena. Gracias por tus conocimientos científicos y humanos.

* To Dr. Ioannes Tsekos from University of Thessaloniki (Institute of Botany) to share with me his knowledge about electron microscope and algae. To his wife, Aspa and Basilis because they made me feel as at home.

* To all of people from Institute of Botany for their wonderful reception. To Thasos and Soula for their skilful technical assistance. To all of them the warmest gratefulness.

* A Macu Granado que supo estar en los buenos momentos y acudir en los malos. Gracias por tu valiosísima colaboración en la búsqueda bibliográfica "allende los mares".

* A Pascual Caballero por las innumerables ocasiones en las que me cedió la silla frente a su ordenador.

* A Chicha Sánchez y Paco Freire por su labor al frente del servicio de microscopía electrónica de la U.L.P.G.C.

* A la Fundación Universitaria de Las Palmas y a la U.L.P.G.C. por su importante labor en la concesión de ayudas y becas.

* A mi padre y hermanos, a Fabiola, a Fran. Todos vivieron mis esperanzas y desilusiones como tuyas. Sencillamente, MIL GRACIAS.

* Por último, aunque no menos importante, a todas aquellas personas que, en algún momento, han colaborado con este trabajo. Gracias Emilio Soler, Dioni Comesaña, profesores del Dpto. Biología, becarios, personal laboral y administrativo.

A mi madre.

I. INTRODUCCION GENERAL	1
I.1 Introducción	3
I.2 Características estructurales de las diferentes etapas del ciclo biológico de las algas rojas	3
I.3 Cultivo "in vitro" de algas rojas	9
I.4 Papel de la luz y los nutrientes inorgánicos en la utilización de las fuentes de carbono orgánico por las algas	13
I.5 El glicerol como fuente de carbono y en la osmorregulación ..	15
I.6 Objetivos del trabajo	20
I.6.1 Capítulo III	21
I.6.2 Capítulo IV	22
I.6.3 Capítulo V	23
II. MATERIAL Y METODOS GENERAL	25
II.1 Material y métodos	27
II.2 Recolección	27
II.3 Medios de incubación y cultivo	28
III. PROPAGACION "IN VITRO" DE CARPOSPORAS DEL ALGA ROJA <u>Grateloupia doryphora</u>. SEGUIMIENTO MICROSCOPICO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO	33
III.1 Introducción	35
III.2 Material y métodos	39
III.2.1 Esterilización	39
III.2.2 Obtención de carposporas.	42
III.2.3 Cultivo y propagación hasta la obtención de talos. ..	43
III.2.4 Estudio histológico de los pretalos en medios PES. ..	47

III.3 Resultados	57
III.3.1 Obtención de carposporas.	57
III.3.2 Cultivo y propagación hasta la obtención de talos. . .	61
III.3.3 Estudio histológico de los pretalos en medios PES. . .	61
III.4 Discusión	89
III.4.1 Esterilización y obtención de carposporas.	89
III.4.2 Cultivo y propagación hasta la obtención de talos. . .	92
III.4.3 Estudio histológico de los pretalos en medios PES. .	101
IV. INFLUENCIA DE LA LUZ EN LA UTILIZACION DEL GLICEROL POR <u>Grateloupia doryphora</u> EN CONDICIONES DE CULTIVO.	107
IV.1 Introducción	109
IV.2 Material y métodos	114
IV.2.1 Material vegetal	122
IV.2.2 Medidas de intercambio de oxígeno.	123
IV.2.3 Medidas de intercambio de CO ₂ . Tasas de fijación y respiración del glicerol.	126
IV.2.4 Intercambio gaseoso en luz.	129
IV.2.5 Intercambio gaseoso en oscuridad	130
IV.2.6 Seguimiento del ¹⁴ C-CO ₂ fijado.	132
IV.2.7 Efecto de la calidad de luz sobre la respiración en oscuridad.	133
IV.2.8 Expresión de tasas y estadística.	135
IV.3 Resultados	138
IV.3.1 Experimentos de intercambio gaseoso en luz.	138
IV.3.2 Experimentos de intercambio gaseoso en oscuridad. . . .	141
IV.3.3 Seguimiento del ¹⁴ C-CO ₂ fijado.	146

IV.3.4 Efecto de la calidad de luz sobre la respiración en oscuridad. Influencia del nitrógeno.	148
IV.4 Discusión	150
IV.4.1 Intercambio gaseoso en luz.	150
IV.4.2 Intercambio gaseoso en oscuridad.	153
IV.4.3 Efecto de la calidad de luz sobre la respiración en oscuridad.	159
V. IMPLICACIONES MORFOGENETICAS DEL GLICEROL.	165
V.1 Introducción	167
V.2 Material y métodos	171
V.2.1 Material vegetal.	171
V.2.2 Efectos del glicerol y la luz sobre el cultivo de pretalos.	171
V.2.3 Estudio histológico de los pretalos en medios PES 70 + 0.3 M glicerol.	173
V.3 Resultados	175
V.3.1 Efectos de glicerol y la luz sobre el cultivo de pretalos.	175
V.3.2 Estudio histológico de los pretalos en medios PES 70 + 0.3 M glicerol.	187
V.4 Discusión	260
V.4.1 Efectos del glicerol y la luz en el desarrollo de los pretalos.	260
V.4.2 Estudio histológico de los pretalos en medios PES 70 + 0.3 M glicerol.	266

VI. CONCLUSIONES	283
VII. BIBLIOGRAFIA	287

I. INTRODUCCION GENERAL.

I.1 INTRODUCCION

Este trabajo se divide en tres capítulos, el primero de los cuales, está dedicado a la propagación "in vitro" de las carposporas del alga roja **Grateloupia doryphora**, así como, al seguimiento microscópico del crecimiento y desarrollo hasta la obtención de talos; el segundo se centra en el papel de la luz cuando **G. doryphora** toma el glicerol como fuente de carbono en condiciones de cultivo y el tercero en las implicaciones morfogénicas del glicerol.

Cada capítulo consta de los apartados de introducción, material y métodos, resultados y discusión. A efectos de evitar duplicaciones hemos integrado en la introducción general y el material y métodos general todos los elementos comunes a los tres trabajos. También hemos unificado la bibliografía en un único listado y damos unas conclusiones generales a los tres trabajos presentados.

I.2 CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO BIOLOGICO DE LAS ALGAS ROJAS.

La mayor parte de las algas rojas poseen un ciclo biológico complicado, presentando alternancia de generaciones y sobre las que se sabe, que no sólo, requieren condiciones experimentales distintas (Pirson & Kowallik 1964, Druehl & Hsiao 1971, Waaland & Cleland 1972, Lunning & Dring 1975, Lunning 1981b), sino que también, acumulan distintos productos de interés comercial dependiendo de la fase en la que se encuentren (Mukai *et al.*, 1981, Cole *et al.*, 1985, Diannelidis & Kristen 1988, Kloareg & Quatrano 1988), lo que añade un interés económico al conocimiento del ciclo biológico y a la propagación de las distintas fases.

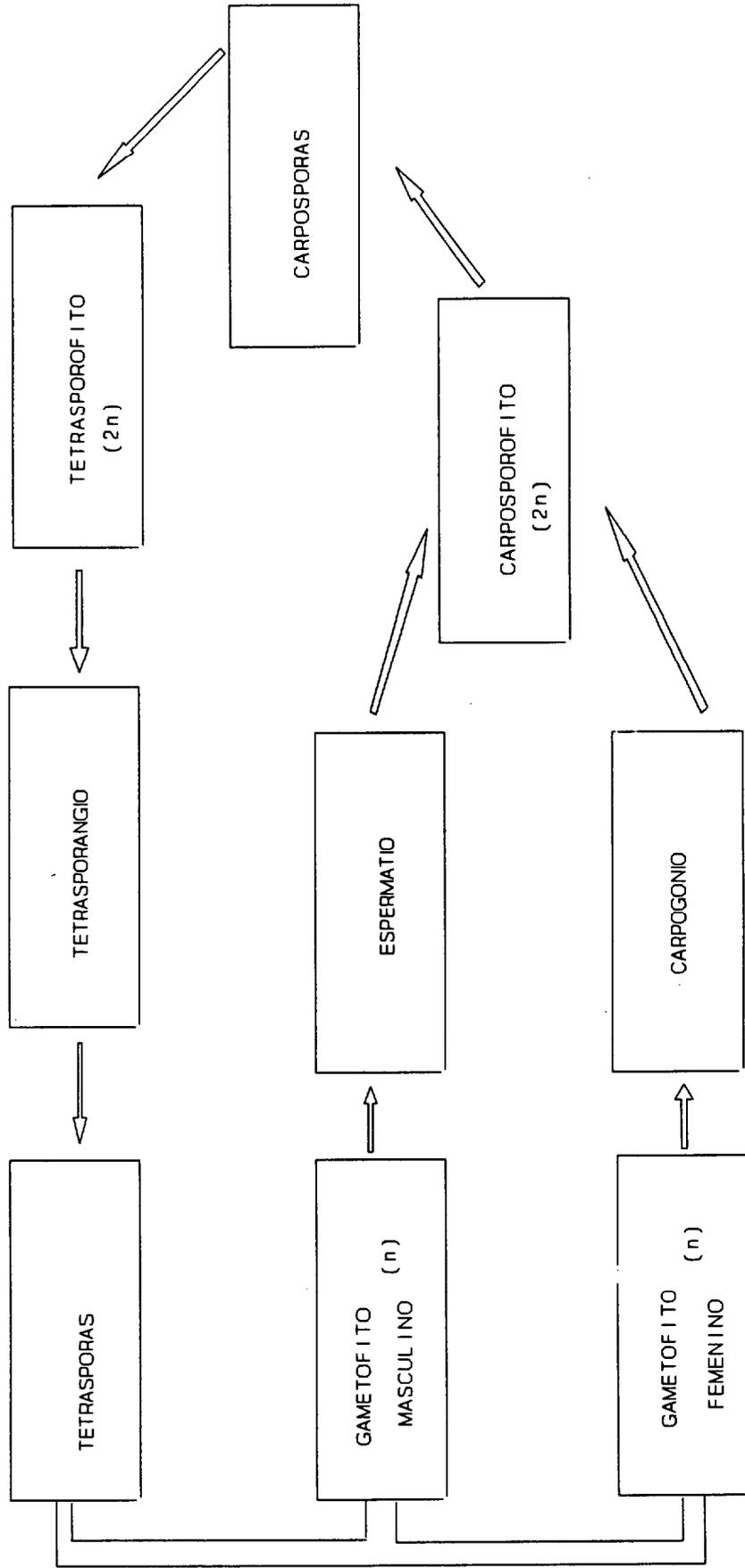
El conocimiento de este ciclo de vida posibilitaría el cultivo independiente de cada una de las fases, la inducción de esporas y el control del patrón de crecimiento desde las esporas hasta la formación de talos con la posibilidad de interpretar la estructura y morfogénesis de los mismos.

La división *Rhodophyta* es un grupo extremadamente amplio y diverso compuesto de 2 subclases: la *Bangiophycidae* y la *Florideophycidae*. Cada una de estas subclases posee varios ordenes, siendo dentro de la última subclase y orden *Cryptonemiales* a la que pertenece *Grateloupia doryphora*.

G. doryphora posee un ciclo de vida trifásico del tipo de Polysiphonia (Figura I.1) que incluye tetrasporofitos, carposporofitos y gametofitos. Dos de estas fases, el gametofito y el 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.

Después de la fusión del carpogonio (n) y el espermatio (n) en el gametofito femenino se origina la fase denominada carposporofito (2n). El carposporofito será el encargado de la liberación de los propágulos unicelulares denominados carposporas (2n) que desarrollarán los talos tetrasporofíticos (Figura I.1) (Bold & Wynne 1985).

Figura I.1 Ciclo de vida trifásico, del tipo de Polysiphonia, que se supone para Grateloupia doryphora, perteneciente al orden *Cryptonemiales* (según Bold & Wynne 1985).



En las revisiones realizadas no hemos encontrado referencias bibliográficas relacionadas con el desarrollo ulterior de las carposporas y tetrasporas hasta la consecución de nuevos talos, sin embargo, no ocurre lo mismo con el estudio de la carposporogénesis y la tetrasporogénesis, ya que, existen numerosos datos histológicos y citológicos sobre todo en aquellos ordenes más estudiados, *Ceramiales* (Wetherbee 1978, 1980) y *Gigartinales* (Tsekos 1981, 1983, Tsekos & Schnepf 1983), relacionados con las células implicadas en su desarrollo (Tsekos 1985), cloroplastos (Hara & Chiara 1974) y sus características funcionales (Scott 1983). También ha sido documentada la relación entre el aparato de Golgi y la síntesis de polisacáridos, los cuales son necesarios durante la liberación y fijación de las esporas (Tsekos 1985, Tsekos & Schnepf 1983).

Estructuralmente, los talos de las *Cryptonemiales* poseen células corticales y medulares (Bold & Wynne 1985). Estas células han sido descritas para aquellas especies de estructura celular compleja y en donde aparece una zona medular laxa con células estrelladas y filamentosas y un córtex compacto, constituido por células pequeñas, las cuales llegan a conformar un talo pseudoparenquimático (Scagel *et al.*, 1973).

Al microscopio electrónico, la pared de las algas rojas se presenta con una apariencia fibrilar, generalmente interpretada como de constitución celulósica, en una matriz de polisacáridos. La valoración microscópica de estas zonas ha permitido reafirmar su composición química (Evans *et al.*, 1974, Tsekos & Reiss 1988, Kloareg & Quatrano 1988, Tsekos *et al.*, 1993), encontrándose, en la pared y en los espacios intercelulares de las células, determinados compuestos como el agar-agar o carrageno. Estas sustancias complejas son, en realidad, mezclas de polisacáridos sulfatados y neutros (Diannelidis & Kristen 1988).

Como material de reserva ha sido reconocido el almidón en *Florideophyceae* (almidón de florideas). Este polisacárido es, fundamentalmente, la fracción de amilopectina encontrada en el almidón de las algas verdes y plantas superiores (Dodge 1973, Scagel *et al.*, 1973).

Generalmente, las células son plurinucleadas, con núcleos que poseen una membrana nuclear bien definida y un nucleólo. Se encuentran también cloroplastos axiales (centrales) o parietales (laterales) con una doble membrana, granos densos (plastoglóbulos) y ficobilisomas los cuales contienen los pigmentos fotosintéticos (Dodge 1973).

Pero probablemente uno de los orgánulos más estudiados, en algas rojas, ha sido el aparato de Golgi. El aparato de Golgi altera su estructura durante el desarrollo de las esporas de diversos grupos (Ueda & Noguchi 1976, Noguchi 1978, Wetherbee 1978). Estas alteraciones están relacionadas tanto con la formación de la pared celular como con la producción de varios productos de reserva (Kugrens & West 1972, Ramus 1972b, Chamberlain & Evans 1973).

Finalmente, la estructura y función de las puntuaciones (*pit-connections*) ha estado sujeta a una enorme especulación y controversia. Soslayando los problemas iniciales, que concernían a una defectuosa preservación de las diferentes membranas de esta estructura, se ha establecido que la presencia de las puntuaciones en algas rojas está correlacionada con un crecimiento apical en dónde se establece una comunicación intercelular dirigida, por el contrario, su ausencia está ligada a un crecimiento difuso (Pueschel & Cole 1982).

I.3 CULTIVO "IN VITRO" DE ALGAS ROJAS

La obtención y mantenimiento de los cultivos "in vitro" de algas rojas ha avanzado muy poco debido a la dificultad de cultivar, manipular y mantener estos cultivos en condiciones libres de contaminantes (Robaina 1988).

El desarrollo, relativamente reciente, de los cultivos axénicos ha dado una oportunidad para el estudio, no sólo de los requerimientos nutritivos, sino también, del crecimiento en condiciones de cultivo controladas (Fries 1984). Con ello, el cultivo "in vitro" de macroalgas ha supuesto una nueva concepción de lo que es la utilización de estos vegetales, sobre la base del control que podemos ejercer sobre su crecimiento y su desarrollo (Robaina 1988).

La investigación de aspectos como la nutrición, después del establecimiento de los cultivos axénicos, permitió el desarrollo de los medios que tuvieran en cuenta aspectos de la auxotrofia vitamínica de las algas (Fries 1959, 1961, 1963, 1964, 1973) o de la necesidad de los requerimientos minerales como el nitrógeno, fósforo, bromo, iodo, etc. (Woollery & Lewin 1973, McLachlan 1977).

El cultivo en condiciones axénicas ha incluido, al igual que en el caso de las plantas superiores, la adición de fuentes de carbono al medio de cultivo.

Fisiológicamente no se conoce con certeza cómo las fuentes de carbono externas pueden "amoldarse" al metabolismo algal. No obstante, se sabe que éstas necesitan, en ciertos casos, un sistema de transporte para ser absorbidas, mientras que, el alga requiere de un tiempo de contacto para alcanzar la máxima absorción.

Se han examinado una gran variedad de sustratos orgánicos que van desde compuestos con 2 carbonos (etanol, acetato) hasta las hexosas (glucosa,

galactosa), siendo, una de las mayoritariamente mencionadas, en la bibliografía, el glicerol. El papel del glicerol en las algas será tratado en el apartado I.5.

La capacidad de utilización de compuestos orgánicos para el crecimiento está ampliamente documentada en numerosos trabajos de microalgas, fundamentalmente diatomeas (Lewin & Lewin 1960, Lewin 1963, Lewin & Hellebust 1970, Nielson & Lewin 1974, Droop 1974, Berman *et al.*, 1977, Lewitus & Caron 1990), pero muy pocos estudios se han realizado sobre macroalgas (Markager & Sand-Jensen 1990).

La mayor parte de la bibliografía relacionada con la utilización de las diversas fuentes de carbono en macroalgas está orientada hacia la vertiente ecológica (Nielson & Lewin 1974, Lewitus & Caron 1990).

En esta línea, el problema que presenta la heterotrofia algal se centra en la falta de un nexo que relacione las condiciones de campo y las de laboratorio. En condiciones naturales, las muestras a estudio contienen especies de zooplancton, fitoplancton, protozoos y bacterias, así como, los detritus asociados (Munro & Brock 1968, Hellebust 1970, Lewin & Hellebust 1976, Darley *et al.*, 1979, Rivkin & Putt 1987) que contribuyen a aumentar la concentración de los sustratos orgánicos. En el laboratorio, por el contrario, las algas en cultivos axénicos son capaces de usar una mayor variedad de sustratos (Danforth 1962, Neilson & Lewin 1974, Raven 1980), pero al mismo tiempo, los estudios de cinética han puesto en entredicho la capacidad de las algas para competir con las bacterias (Hobbie & Wright 1965, Allen 1969, Sepers 1977, Bollman & Robinson 1985).

La presencia de una fuente de carbono externa no implica necesariamente un aumento de crecimiento. En este sentido, la utilización de las técnicas radiactivas, en experimentos de pulso y caza, dejó claro que podría tener lugar la absorción de la fuente de carbono sin que por ello hubiera aumento en el peso fresco del alga (Seheult 1970)

Así, Seheult (1970) encontró que el 99% de la glucosa tomada por Navicula pelliculosa era respirada pero no utilizada para fomentar el crecimiento.

En Chlorella vulgaris, la glucosa absorbida en oscuridad fue acumulada en forma de almidón pero bajo estas condiciones no hubo crecimiento (Killam & Myers 1956, Neilson & Lewin 1974). No obstante, estas células pudieron crecer, respirando esta fuente de carbono, a intensidades de luz muy bajas.

La inducción del crecimiento por una fuente de carbono, en un alga determinada, no implica que todas las algas deban responder de la misma manera. Se sabe que las fuentes de carbono pueden ser asimiladas directamente o necesitan de una serie de reacciones que las "introduzcan" en el metabolismo de la célula (Van Baalan & Pulich 1973, Neilson & Lewin 1974).

La asimilación de sustratos orgánicos requiere de un sistema enzimático para la absorción (transporte), para la activación o asimilación (introducción en el metabolismo de la célula), para el metabolismo intermediario y para la obtención de energía (respiración) (Neilson & Lewin 1974).

La mayoría de las fuentes de carbono orgánico sufren esta serie de reacciones que las activan. Así, el metabolismo del lactato se inicia por la conversión de éste a piruvato, el del acetato por la conversión a acetyl-CoA y el del glicerol a glicerol 3 fosfato.

Algunas de las enzimas requeridas para estos procesos están identificadas como es el caso de la acetato quinasa, o bien como en el caso de la L-lactato oxidoreductasa en las levaduras, pero no están identificadas en algas.

Otro grupo de sustratos orgánicos son asimilados directamente. De esta forma, la incorporación al metabolismo intermediario de la glucosa y azúcares relacionados se realiza a través del ciclo de las pentosas fosfatos (Cheung & Gibbs 1966, Pelroy & Bassham 1972, Van Baalan & Pulich 1973);

el piruvato es rápidamente incorporado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCAC) y hacia los aminoácidos, alanina y glutamato (Oaks 1962a,b); los compuestos de 2 carbonos, como etanol y acetato, siguen la vía del glioxilato en microalgas (Neilson & Lewin 1974).

También, algunos compuestos orgánicos pueden estimular su propia asimilación, induciendo la síntesis de enzimas, orgánulos, etc. requeridos para su metabolismo (Horrum & Schwartzbach 1981, Komor *et al.*, 1988) y con importantes repercusiones para su desarrollo. Este es el caso del etanol en células de Euglena y Chlorella (Neilson & Lewin 1974) que promueve el desarrollo de glioxisomas, los cuales están implicados en el metabolismo.

Los requerimientos de vitaminas se excluyen del concepto de heterotrofia, puesto que, no son utilizados ni como fuente de energía, ni como esqueletos de carbono para el crecimiento (Hellebust & Guillard 1967, Saunders 1972, Wheeler *et al.*, 1974). Respecto a los aminoácidos, hay que hacer mención al trabajo de Rivkin & Putt (1987) sobre microalgas antárticas (diatomeas) donde de un total de 7 algas examinadas, 4 fueron capaces de usar aminoácidos para sintetizar macromoléculas para el crecimiento. Los aminoácidos fueron usados para sintetizar proteínas. La deaminación sirvió para ser metabolizados como intermediarios (piruvato y acetyl CoA) en el TCAC; estos intermediarios fueron empleados para posteriormente sintetizar glucosa, carbohidratos y lípidos (Meister 1965a,b, Bonner & Varner 1976, Kirchman *et al.*, 1985, Rivkin & Putt 1987).

I.4 PAPEL DE LA LUZ Y LOS NUTRIENTES INORGANICOS EN LA UTILIZACION DE LAS FUENTES DE CARBONO ORGANICO POR LAS ALGAS

El crecimiento de las algas puede estar limitado por la luz y los nutrientes, principalmente el nitrógeno.

Desde el punto de vista fisiológico, existe una escasa documentación sobre el comportamiento de las algas en presencia de las fuentes de carbono, aunque hay evidencias de que las condiciones de luz influyen en el crecimiento (Dring 1984, Brodie & Guiry 1987, Lewitus & Caron 1991b). La falta de información sobre los mecanismos fisiológicos por los cuales las algas integran el modo de nutrición autotrófico y el heterotrófico hace que todavía este fenómeno no pueda ser evaluado completamente (Berman *et al.*, 1977, Lewitus & Caron 1991a,b). La bibliografía recoge numerosos casos donde la contribución de una fuente de carbono al crecimiento algal es dependiente de la intensidad de luz (Van Baalan & Pulich 1973, Ukeles & Rose 1976, Lewitus & Caron 1991b).

El crecimiento heterotrófico aumenta generalmente con intensidades bajas de luz, limitantes para el crecimiento fotoautotrófico (Pintner & Provasoli 1968, Van Baalan & Pulich 1973, Lewitus & Caron 1991b). La presencia de fuentes de carbono, bajo condiciones saturantes de luz, no aumenta la tasa de crecimiento, salvo pocas excepciones como la presentada en Poterioochromonas malhamensis donde la adición de glucosa, glicerol o etanol a los cultivos incrementó la tasa de crecimiento de esta alga para todas las intensidades de luz probadas y disminuyó la cantidad de clorofila presente (Lewitus 1990, Lewitus & Caron 1991b).

En el cultivo "in vitro", la heterotrofia en estas algas parece ser el modo de nutrición dominante tanto en luz como en oscuridad, ya que, P.

malhamensis no puede crecer sin sustrato orgánico (Pringsheim 1952, Hutner *et al.*, 1953, Lewitus & Caron 1991a).

En un intento por conocer la naturaleza de la fotoheterotrofia, la mayoría de los autores han sugerido que la luz podría funcionar simplemente como una fuente adicional de energía para la síntesis de ATP. Este ATP se usaría, ya bien, para mantener el aparato fotosintético íntegro durante periodos desfavorables (Sand-Jensen 1988a,b, Markager & Sand-Jensen 1990) o bien para la activación de las fuentes de carbono previo a su metabolización (Hunter 1953).

No obstante, otras posibilidades no se han desechado. En este sentido y en función de las especies examinadas, el efecto de la luz sobre el grado de asimilación del sustrato orgánico y del aparato fotosintético ha variado mucho, pudiendo oscilar la respuesta del sistema fotosintético a la absorción de los sustratos orgánicos desde la represión del desarrollo del cloroplasto en Chlorella y Euglena (Neilson & Lewin 1974) hasta el aumento de la producción de clorofila en Golenkinia (Lewitus & Caron 1991a).

De los trabajos expuestos se puede concluir que la luz juega un papel importante como reguladora de la utilización de diferentes sustratos orgánicos en las algas, aunque este papel no es el mismo para todas las algas, ni en diferentes condiciones fisiológicas, ni con distintos sustratos orgánicos.

En algunas ocasiones no es la fuente de carbono la que actúa directamente sobre el aparato fotosintético sino sus derivados. Muchos sustratos orgánicos son capaces de inducir la síntesis de compuestos celulares que faciliten la incorporación de los primeros al metabolismo. Pues bien, son estas sustancias las que también podrían inhibir la síntesis de los cloroplastos y encabezar una disminución de la actividad fotosintética. Por ejemplo, en células de Euglena la presencia del etanol induce el desarrollo de los glioxisomas, orgánulos implicados en el metabolismo de esta fuente de carbono, los cuales reprimen la formación de cloroplastos (Monroy & Schwartzbach 1984, Lewitus & Caron 1991a,b).

La bibliografía recoge casos donde una misma fuente de carbono induce distintos comportamientos; el caso más relevante es el de Chlorella y Poteroochromonas malhamensis donde la presencia de glucosa, a la misma concentración y condiciones experimentales, estimula el crecimiento en P. malhamensis pero no lo hace en Chlorella (Lewitus & Caron 1991b).

El nitrógeno, por su parte, es un elemento de gran importancia como constituyente de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos celulares. Es por ello que la disminución en su concentración tiene sus implicaciones sobre el metabolismo algal (Dawes & Koch 1990).

Desde hace varios años, se viene postulando la idea de una relación entre la acumulación de carbohidratos y la ausencia de nitrógeno. Este postulado conocido como el efecto Neish podría tener sus implicaciones morfogénicas. La disminución de los niveles de proteínas conlleva un incremento de la concentración de carbohidratos y lípidos. Esta manifestación ha sido perfectamente demostrada con los ficocoloides donde la concentración de carragenos (Neish & Shacklock 1971, Neish *et al.*, 1977, Hanisak 1983) y agar (Macler 1988) se ve incrementada considerablemente con la disminución de los niveles proteicos de las macroalgas.

I.5 EL GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO Y EN LA OSMORREGULACION

El glicerol es la fuente de carbono, descrita el mayor número de veces y, que más comúnmente afecta al crecimiento.

Fries (1973) en un trabajo recopilatorio sobre los requerimientos de sustancias orgánicas por las algas, expuso que la presencia de glicerol, bajo condiciones de luz, permitía un incremento del crecimiento entre el 70-130%.

Asimismo, la respuesta de determinadas algas al glicerol, y no a otras fuentes de carbono, indicarían que los cambios fisiológicos que tienen lugar son el resultado directo de la utilización del glicerol por el alga.

En Pyrenomonas salina las consecuencias de la utilización del glicerol son específicas de esta fuente de carbono (Antia *et al.*, 1969, Cheng & Antia 1970, Antia 1980, Lewitus & Caron 1991b). La adición de varios sustratos (manitol, ribitol), en las mismas concentraciones que el glicerol, no permitió o inhibió el crecimiento (Antia *et al.*, 1969).

En el cultivo "in vitro" de fragmentos de talo (explantos) de Grateloupia doryphora se ha encontrado un efecto positivo del glicerol sobre el crecimiento, sin que, otras fuentes de carbono probadas manifestaran respuesta alguna (Robaina 1988, Robaina *et al.*, 1990b).

El metabolismo del glicerol, utilizado como una fuente de carbono, no ha sido estudiado en algas. Las referencias acerca de su funcionamiento han sido recogidas principalmente en bacterias y en plantas superiores.

En 2 especies de Mycobacterium capaces de crecer a expensas de este sustrato, se demostró que el glicerol es primeramente fosforilado usando ATP, y el glicerofosfato obtenido oxidado a triosas fosfato. Le sigue la conversión a piruvato para continuar con su entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Hunter 1953).

Un estudio sobre la incorporación de glicerol marcado radiactivamente en extractos celulares de cacahuete (Arachis hypogaea) mostró que el glicerol es introducido sobre el citrato, malato, 2 cetoglutarato y fumarato, para finalmente ser oxidado a CO₂ (Stumpf 1955).

Pero además, el glicerol tiene importancia, ya no sólo por su efecto sobre el crecimiento, sino porque también, forma parte de los productos de reserva y de regulación osmótica tanto en algas rojas como en algas verdes.

En algas rojas, el metabolismo del glicerol favorece la acumulación de almidón y otros ficocoloides como el agar-agar y carrageno (Antia *et al.*, 1969, Macler 1986, 1988). El almidón, a su vez, han estado relacionado con la formación de yemas (Brown *et al.*, 1979).

Esta clase de eventos morfogenéticos ha sido descrita en gran cantidad de ocasiones tanto en algas como en plantas superiores (Fries 1973, Brown *et al.*, 1979). Hay que mencionar, también, otras implicaciones morfogenéticas por efecto de la luz (calidad y cantidad) (Lunning 1980) y las interrelaciones entre éstas y las fuentes de carbono en la fotomorfogénesis.

A nivel de regulación osmótica, las evidencias de la existencia de agentes osmóticos orgánicos, en algas rojas, se obtuvieron a partir de los compuestos marcados radiactivamente y obtenidos después de un periodo fotosintético en $^{14}\text{CO}_2$ (Fogg 1956, Kanazawa *et al.*, 1970, Kauss 1978a,b, Konopka & Schnur 1980).

Algunos de estos compuestos son el floridosido (galactosa-glicerol) (Kauss 1968,1969, Hellebust 1976, Gutknecht *et al.*, 1978, Kauss 1978a, Zimmermann 1978, Bisson & Kirst 1979, Kirst & Bisson 1979, Reed *et al.*, 1980a, Wiencke & Lauchli 1981, Reed 1985) presente en las *Rhodophytas* a excepción del orden de las *Ceramiales* donde está presente el digeneasido (manopiranosil-glicerato) (Colin & Augier 1939, Kremer 1981, Reed 1985) y de las *Bangiales* con el isofloridosido (isómero del floridosido) (Kauss 1968, Ekman *et al.*, 1991). En algas pardas, aunque no las trataremos, son el manitol y laminarian los agentes osmóticos por excelencia (Davison & Reed 1985a,b).

El papel fisiológico del floridosido no está establecido completamente. La concentración de floridosido está intrínsecamente relacionada

con el incremento de la concentración salina en el medio (Ben Amotz & Avron 1983).

La respuesta del floridosido fue idéntica bajo condiciones de luz y oscuridad (Reed *et al.*, 1980). Esto sugiere la posibilidad de que la función primaria de estos compuestos es la de proteger a la célula durante los periodos donde la concentración salina fuese elevada.

Sin embargo, en algunas especies de ***Porphyra***, el incremento en la concentración de floridosido es insuficiente para restaurar el volumen celular original. En algas rojas intermareales del tipo de ***Corallina***, ***Grateloupia***, ***Hypnea***, ***Lomentaria*** y ***Rhodymenia*** este aumento sólo supone una pequeña parte (5-10% Reed *et al.*, 1980) en el reestablecimiento del potencial osmótico. Wiencke & Lauchli (1980, 1981), los cuales habían estudiado la distribución de floridosido e iones en ***Porphyra umbilicalis***, apuntan que frente a un shock hiperosmótico se produciría un desarrollo exagerado del espacio vacuolar.

Esto estaría de acuerdo con la hipótesis de la osmorregulación citoplasmática y vacuolar establecida tanto para plantas superiores como para algas (Bisson & Kirst 1979, Kirst & Bisson 1979). En este sentido, un número considerable de algas rojas responden a las variaciones de potencial osmótico por ajustes entre los niveles iónicos intracelulares y la concentración de compuestos orgánicos, haciéndolo el floridosido en aquellos donde existe (Ben Amotz & Avron 1983).

Los estudios con ^{14}C sobre los modelos fotosintéticos de acumulación de estos heterosidos en diferentes algas rojas (Kremer 1979) han demostrado la presencia de glicerol 3 fosfato y de la UDP galactosa como primeros productos fotosintéticos marcados, y posibles precursores de la síntesis del floridosido.

Reed y colaboradores (1980) en ***Porphyra purpurea*** observan que la concentración de floridosido incrementa en oscuridad después de un shock

hiperosmótico, lo que indica su papel en la osmorregulación de forma independiente a la síntesis fotosintética de hidratos de carbono y su acumulación.

La presencia en Gracilaria tenuistipitata y en G. sordida de la α galactosidasa (Yu & Pedersen 1990a,b), la enzima que degrada el floridosido, y de su alta actividad cuando el alga está expuesta a concentraciones hiposalinas pone de manifiesto la degradación del floridosido bajo estas condiciones.

La importancia de todos estos compuestos osmorreguladores está basada en que son elementos centrales del metabolismo en algas (Reed 1985). Además concurre que la fisiología de las algas rojas posee marcadas diferencias con la presentadas en algas verdes y plantas superiores.

Tanto la fotosíntesis como la respiración se ven afectadas por cambios en la salinidad (Yarish *et al.*, 1979, Reed *et al.*, 1980, Kirst 1981, Coudret *et al.*, 1983) y por consiguiente el flujo fotosintético también se ve alterado. La tasa de fijación y el flujo de carbono dependen también del nivel de nitrógeno que tenga el alga (Macler 1986, 1988), lo cual determinará hacia dónde se desviarán los compuestos formados. Así, las pruebas realizadas por Macler (1986) en Gelidium coulteri con ^{14}C marcan compuestos como agar y almidón a concentraciones de nitrógeno bajas, mientras que, con niveles de nitrógeno elevados, la cantidad de floridosido marcado es superior a las encontradas en almidón y agar.

En algunas *Chlorophytas*, la regulación osmótica tiene lugar por la predisposición de la célula a liberar o fijar el glicerol (Ben Amotz & Avron 1973, Belmans & Van-Laere 1988a,b, Chitlaru & Pick 1991) y la respuesta tiene lugar tanto en luz como en oscuridad (Borowitzka *et al.*, 1977, Ben Amotz & Avron 1973, Hellebust & Lin 1989). Así por ejemplo, cuando la fotosíntesis está inhibida por un aumento de la salinidad, la síntesis de glicerol en Chlamydomonas pulsatilla es llevada a cabo por la degradación del almidón. Sin

embargo, para valores de salinidad donde la fotosíntesis no está inhibida, hay síntesis tanto de glicerol como de almidón.

En Dunaliella tertiolecta opera un ciclo de glicerol cuyo metabolito central es probablemente la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Wegmann 1979, Belmans & Van Laere 1988a, Chitlaru & Pick 1991). La dihidroxiacetona fosfato procede tanto de la fotosíntesis como de la degradación del almidón aunque no se conoce cuáles son sus requerimientos en ATP.

DHAP es reducida a glicerol 3 fosfato (G3P); esta reacción está catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Haus & Wegmann 1984, Marengo et al., 1985). El G3P se convertirá en glicerol por acción de la glicerol 3 fosfatasa (Sussman & Avron 1981).

La degradación del glicerol, durante la adaptación de las células a bajas concentraciones de solutos en el medio, está regida por las enzimas gliceroldeshidrogenasa (Ben-Amotz & Avron 1974) y dihidroacetonaquinasa (Lerner et al., 1980).

I.6 OBJETIVOS DEL TRABAJO.

La mejora de las condiciones de cultivo de las macroalgas debe abordar tanto el conocimiento de su ciclo biológico como la propagación vegetativa "in vitro" de las distintas especies.

Si bien la propagación vegetativa es importante para algunos individuos de potencial morfogenético elevado, el conocimiento del ciclo biológico permite controlar y actuar sobre la reproducción. No hay que olvidar que una de las grandes ventajas que ello supone es la de obtener cientos de individuos a partir de carposporas.

I.6.1 Capítulo III: " PROPAGACION IN VITRO DE CARPOSPORAS DEL ALGA ROJA Grateloupia doryphora. SEGUIMIENTO MICROSCOPICO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO ".

Establecido que nuestro objetivo final es la mejora de las condiciones de cultivo para la propagación "in vitro" de las macroalgas, en este capítulo, intentaremos mejorar los métodos de propagación mediante el establecimiento de cultivos "in vitro" de carposporas y tetrasporas. Las bases del cultivo "in vitro" aplicadas por Robaina (1988) nos permitirán profundizar en estos aspectos.

Utilizaremos las carposporas como el material más idóneo para el seguimiento del patrón normal del crecimiento y el desarrollo en el alga roja G. doryphora. El sistema de propagación "in vitro" en condiciones asépticas nos permitirá constatar no sólo los cambios estructurales, sino también, las posibles alteraciones que tienen lugar en el patrón de crecimiento.

La puesta a punto de técnicas de microscopía electrónica, así como, las de histología e histoquímica con sus tinciones específicas para proteínas, carbohidratos y almidón contribuirán a estudiar el problema.

En esta línea, emplearemos la tinción de azul de toluidina para poner en evidencia la topografía general de la célula.

El ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) teñirá los polisacáridos neutros, mientras que, el alcian blue (AB) pH 1.0 reaccionará con los polisacáridos sulfatados. Para ello, los grupos -OH de los carbohidratos deben ser previamente oxidados, con el periódico, a aldehídos, a los que se les unirá el reactivo de Schiff. El AB pH 1.0, por su parte, se unirá a los grupos ésteres-sulfatados, con los que reaccionará y dará color.

En este punto, es necesario hacer un inciso sobre cuál es la combinación exacta de estos dos tintes: AB-PAS ó PAS-AB.

Nuestras observaciones, así como, aquellas recogidas por Johannes & Klessen (1984) indican que la reacción correcta es la de AB-PAS. El hecho de que tiñamos previamente con PAS implica la adición de compuestos de azufre, ya que, por un lado el protocolo requiere el lavado con bisulfito y por otra, para la preparación del reactivo de Schiff es necesario la presencia de sulfato de aluminio. No hay que olvidar, por consiguiente, que el AB pH 1.0 detecta grupos ésteres sulfatados (-OSO₃⁻).

El mercurio azul de bromofenol teñirá proteínas mediante su unión a los grupos aminos terminales de las mismas.

Finalmente, el lugol se unirá específicamente a las cadenas de almidón.

I.6.2 Capítulo IV. " INFLUENCIA DE LA LUZ EN LA UTILIZACION DEL GLICEROL POR Grateloupia doryphora EN CONDICIONES DE CULTIVO "

Con lo observado en el cultivo "in vitro" de los explantos, presuponíamos que Grateloupia doryphora absorbe y respira el glicerol, alcanzando cierto grado de heterotrofia, lo que permite el crecimiento y desarrollo morfogénico del alga en cultivo. Al mismo tiempo, nos interesaba conocer hasta qué punto la utilización del glicerol podría ser modulada por la luz.

Con estas premisas, establecimos como principal objetivo para este capítulo, conocer la fisiología del alga roja G. doryphora en medios conteniendo glicerol y qué papel desempeña la luz en los cultivos. Particularmente sus efectos sobre el crecimiento y el desarrollo y si su papel específico es fotosintético o fotomorfogénico.

Simulamos con incubaciones en glicerol, las condiciones fisiológicas del alga en cultivo y cuantificamos las tasas respiratorias y fotosintéticas (medida en $\mu\text{molO}_2 \text{ mgCl}_a^{-1} \text{ h}^{-1}$, con electrodo de oxígeno). Paralelamente empleamos técnicas de marcaje radiactivo con $^{14}\text{C-HCO}_3$ y de pulso y caza con $^{14}\text{C(u)-glicerol}$.

I.6.3 Capítulo V: " IMPLICACIONES MORFOGENETICAS DEL GLICEROL "

Una vez conocido el patrón "normal" que siguen las carposporas durante su desarrollo y la formación de yemas (Capítulo III), pasaremos a estudiar si este material es capaz de adaptarse a las mismas condiciones experimentales de luz y glicerol que los explantos, y cómo es su crecimiento en presencia del glicerol.

Nuestra finalidad es utilizar a las carposporas como el sistema idóneo para poder comprender, explicar y regular el desarrollo ulterior de la mismas hasta la obtención de yemas y nuevo talos.

Abordaremos también, las implicaciones morfogénicas del glicerol y si éstas están relacionadas con la producción específica de derivados del glicerol, ya que, los compuestos que combinan el glicerol con otros azúcares (isofloridosido, floridosido, digeneasido) han sido relacionados con la regulación osmótica en algas, que a su vez ha estado implicada en la regulación de la morfogénesis vegetal. Creemos que es posible la participación de estos compuestos derivados del glicerol en la formación de yemas y su regulación por efecto de la luz (fotomorfogénesis).

Las técnicas histoquímicas y de microscopía electrónica, descritas en el capítulo III, permitirán el control de los efectos del glicerol en las células.

II. MATERIAL Y METODOS GENERAL.

II.1 MATERIAL Y METODOS

Grateloupia doryphora Montagne (Howe) pertenece a la Familia *Cryptonemiceae* del orden *Cryptonemiales* (Bold & Winne 1985). Se caracterizan por ser plantas erectas con varios ejes de crecimiento de color rojo oscuro que se expanden en láminas asimétricas.

G. doryphora fue recolectada al noreste de la isla de Gran Canaria, en San Cristóbal (Las Palmas G.C.). La zona de recolección es una plataforma rocosa sobre la que se dispone el alga, formando grupos de plantas expuestas en la bajamar o sumergidas en charcos poco profundos.

II.2 RECOLECCION.

El material vegetal se caracterizó por ser plantas con un alto grado de pigmentación y bajo epifitismo. Se procuró recoger toda el alga a excepción de las estructuras de fijación.

El material recolectado se agrupó en bandejas de plástico o aluminio con papel, previamente humedecido en agua de mar, en el fondo de las mismas. Una vez en el laboratorio, las algas se limpiaron con pincel para arrastrar restos de sustratos y/o epífitos y se pasaron por un baño de ultrasonidos (3 veces x 1.5 minutos), marca Selecta modelo S512, tras lo cual se mantuvieron en agua de mar estéril con un fotoperiodo de 18:6 (luz: oscuridad), flujo constante de aire y renovación diaria del agua.

II.3 MEDIOS DE INCUBACION Y CULTIVO.

Tanto para el cultivo y obtención "in vitro" de esporas como para la incubación de material, en las medidas de las tasas de consumo y desprendimiento de oxígeno, los medios empleados fueron el PES (Provasoli Enriched Seawater, Provasoli 1968) y variaciones del mismo, consecuencia de la presencia del glicerol como un agente osmótico.

La adición de glicerol supuso la alteración de la concentración del agua de mar en la preparación del medio PES diluyendo con agua destilada.

Los medios resultantes se denominaron PES 70 y PES 90 de acuerdo con la cantidad de agua de mar (70-90%) utilizada en la preparación de los mismos. A los medios anteriormente señalados se les midió la osmolaridad con un osmómetro marca Autostad TM modelo OM 6010 Daiichi Kogaku Co Ltd (Robaina *et al.*, 1990a).

En la elaboración del medio PES se utilizaron 4 tipos de soluciones stock.

- agua de mar pretratada
- solución de micronutrientes (soluc. pII) (Tabla II.1)
- solución EDTA- ferroso (soluc. EDTA-Fe) (Tabla II.2)
- solución de vitaminas (Tabla II.3)

El agua de mar pretratada para la elaboración del medio de cultivo era recogida por un sistema de bombeo a 7m de profundidad y filtrada a través de 3 filtros de 100, 10 y 1 μm , antes de pasar por luz U.V. El agua era almacenada en recipientes de plástico oscuro de 50 l.

Las soluciones de micronutrientes y EDTA ferroso eran realizadas con sales de grado puro procedentes de Sigma y/o Aldrich. Para evitar

precipitaciones en la preparación, los compuestos eran pesados y añadidos uno a uno hasta su completa disolución.

Todas las disoluciones se almacenaron en frascos de 50 ml a -18 °C.

Por cada litro de medio, se añadieron 70 mg de nitrato de sodio y 10 mg de glicerol fosfato. Si el medio de cultivo se requería sólido, se añadía 8 g/l de agar (Bacto-agar). En la Tabla II.4 se recogen las cantidades añadidas de las diferentes soluciones stock, así como, la composición final del medio PES.

La preparación del medio finalizaba ajustando el pH a 7.8 y esterilizando con un paso por autoclave de 20 minutos a 120 °C y 1Kg/cm² de presión. Tal procedimiento de esterilización causó un incremento constante de 0.5 unidades de pH.

La esterilización tenía lugar en el interior de los recipientes de cultivo, si el medio era líquido. Si los medios de cultivo eran sólidos, se dispensaba después de la esterilización, en placas Petri y en el interior de la cámara de flujo laminar horizontal Glatt Labortecnic.

Tabla II.1 Composición de la solución de micronutrientes (pII) usada en la elaboración de los medios PES y sus variaciones (PES 70, PES 90).

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	50.34 mg
H_3BO_3	1.14 g
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	122.90 mg
ZnCl_2	10.48 mg
CoCl_2	4.03 mg
$\text{NaEDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	1000 mg
agua destilada	200 ml

Soluciones stock de ZnCl_2 y CoCl_2 .

		Adición a
		pII
ZnCl_2	104.8 mg	1ml
CoCl_2	40.3 mg	1ml
agua destilada	10 ml	

Tabla II.2 Composición de EDTA ferroso (EDTA-Fe) usada en la elaboración de los medios PES y sus variaciones (PES 70, PES 90).

FeSO ₄ x H ₂ O	245 mg
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	330 mg
agua destilada	50 ml

Tabla II.3 Composición de la solución de vitaminas empleadas en la elaboración de los medios PES y sus variaciones (PES 70, PES 90).

Tiamina HCl	100 mg
Biotina	1 mg
Piridoxina	1 mg
B ₁₂	0.2 mg
agua destilada	100 ml

Soluciones stock de Biotina, Piridoxina y B₁₂.

	Adición a la soluc. vitaminas	
Biotina	10 mg	10 ml
Piridoxina	10 mg	10 ml
B ₁₂	1 mg	20 ml

Tabla II.4 Composición final del medio de cultivo PES (Provasoli, 1968).

NaNO ₃	70 mg
Na ₂ glicerol P	10 mg
soluc. pII	1 ml
soluc. EDTA-Fe	0.5 ml
soluc. vitaminas	1 ml
agua de mar	1000 ml
pH 7.5-7.8	

III. PROPAGACION "IN VITRO" DE CARPOSPORAS DEL ALGA ROJA Grateloupia doryphora. SEGUIMIENTO MICROSCOPICO DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO.

III.1 INTRODUCCION

El crecimiento y desarrollo de un organismo no puede ser estudiado únicamente a nivel de células individuales sino de las interacciones entre las diferentes células que lo conforman.

El desarrollo algal abarca una serie de eventos que afectan tanto a los posibles cambios morfológicos como a los procesos fisiológicos y bioquímicos. Estos cambios conllevan un aumento en el número de células, en el tamaño y forma celular y en la producción de diferentes tipos celulares y áreas con características considerablemente distintas entre ellas.

En algas rojas, los estudios de desarrollo han sido llevados a cabo, principalmente, con fragmentos de talo y en algunos casos con esporas (Duffield *et al.*, 1972, Sylvester & Waaland 1984).

No obstante, los estudios que pretendíamos realizar sobre *G. doryphora* no pudieron ser realizados con fragmentos de talo (explantos). Este material presentaba diversos inconvenientes, tales como, una elevada complejidad estructural y una enorme variabilidad en la respuesta de los talos. El estudio histológico con microscopio óptico reveló que las yemas y zonas de crecimiento de los explantos en medios PES poseen una estructuración celular similar a la del talo, distinguiéndose claramente las células corticales de las medulares filamentosas y estrelladas y la transición entre tales tipos celulares (Robaina 1988). Esto implica que los cortes no son homogéneos, y por tanto, la morfogénesis sería bastante difícil de interpretar.

Además, la existencia de zonas con diferente potencialidad regenerativa (emisión de yemas), restringidas en el explanto hacia la zona más externa, así como, la deformación del explanto crecido en medios conteniendo

glicerol dificultan los estudios de desarrollo del alga roja ***G. doryphora*** (Robaina 1988).

Es importante también destacar que en las algas, salvo en los casos de organización compleja, no hay una distinción clara de la procedencia del explanto y ha sido precisamente la utilización de explantos de diferentes zonas del talo lo que ha permitido detectar diferencias que dificultan la viabilidad después de la desinfección (Fries 1980, Fisher & Gibor 1987, Kawashima & Tokuda 1990), la capacidad de regeneración, la presencia de endófitos (Schatz 1980, Martin & Benson 1982, Ducker & Knox 1984, Robaina 1988) e incluso diferencias en la digestibilidad enzimática para la obtención de células libres y protoplastos, basadas en el tamaño del explanto o en el estado fisiológico de cada talo (madurez) (Chen & Taylor 1978, Fries 1980, Chen 1982, Polne-Fuller *et al.*, 1984, Zuo-Mei 1984, Chen 1986, Cheney *et al.*, 1986, Fisher & Gibor 1987, Mooney & Van Staden 1987).

Los resultados obtenidos por Saga y Sakai (1982), que mejoran los métodos de cultivo de macroalgas usando propágulos unicelulares de algas, nos sugirieron la utilización de esporas para la propagación de ***G. doryphora*** "in vitro" usando, incluso, medios conteniendo glicerol (Robaina 1988). Las carposporas en medios PES 70 + 0.3 M glicerol formaban masas celulares lobulares. El recultivo de estas masas provocó la elongación de los lóbulos, los cuales adoptaron una morfología similar a la de las yemas formadas por los explantos.

El estudio histológico preliminar de estas masas celulares puso de manifiesto la existencia de capas celulares corticales y medulares que interconectaban los lóbulos, disposición celular mucho más sencilla de interpretar que la del explanto.

Lo descrito anteriormente acerca de las carposporas, nos llevó a utilizarlas como material vegetal con las que caracterizar los cambios estructurales que ocurrían a lo largo del periodo de formación de los talos y conocer el patrón de desarrollo "normal" de las carposporas (medios sin fuente de carbono).

Existen numerosos datos histológicos y citológicos relacionados con las células implicadas en el desarrollo (Delivopoulos & Kugrens 1984, Delivopoulos & Tsekos 1985, Tsekos 1985), sus características ultraestructurales, tales como la arquitectura de cloroplastos (Hara & Chiara 1974, Tsekos & Reiss 1990), mitocondrias (Tsekos & Diannelidis 1990), conexiones celulares (Pueschel & Cole 1982) y sus características funcionales (Scott 1983).

Sin embargo, en la bibliografía consultada no hemos encontrado referencias al modelo de desarrollo de las carposporas de las algas rojas, ya que, la mayoría de los trabajos se centran en el seguimiento de la carposporogénesis y tetrasporogénesis más como una vía de establecer relaciones taxonómicas y filogenéticas entre los diferentes grupos algales (Kugrens 1974, Chamberlain 1984) que como una forma de entender los procesos que conducen a la obtención de nuevos individuos.

La dificultad de propagar y cultivar el material algal aséptico bajo condiciones experimentales controladas probablemente explique la escasez de trabajos referidos a este tema.

El objetivo principal de este apartado es el conocimiento del desarrollo "in vitro" del alga roja Grateloupia doryphora empleando carposporas. Se estudió la puesta a punto diversas técnicas para la propagación

"in vitro" de G. doryphora partiendo de carposporas, incluyendo esterilización, germinación y crecimiento hasta la formación del talo.

Hay que resaltar que el punto de partida de los trabajos no fueron las carposporas en el sentido estricto, es decir, definida como aquella única célula que germina y puede dar lugar a nuevos individuos, sino que, se partió de carposporas que ya habían sufrido las primeras divisiones y, por tanto, multicelulares. A estas nuevas estructuras las hemos denominado como pretalos ante la dificultad de encontrar un término en castellano adecuado al anglosajón de *carpospores-seedling*.

Asimismo, usaremos el término de talo joven para designar a los "talos" (*carosporelings*) procedentes del pretalo.

Identificaremos microscópicamente el patrón "normal" de crecimiento y desarrollo de los pretalos en medios sin fuentes de carbono, como exponíamos anteriormente.

Para el estudio de estos cambios, sobre los cultivos, optamos por la utilización de técnicas de microscopía electrónica y óptica.

III.2 MATERIAL Y METODOS

III.2.1 ESTERILIZACION

Diversos experimentos preliminares de cultivos de carposporas indicaron que éstas debían ser asépticas, dado que, el crecimiento de contaminantes (bacterias, hongos) impedían el de las carposporas.

Para la obtención de carposporas asépticas no fue factible la esterilización directa de las mismas, por lo que, seguimos la estrategia de esterilizar los explantos que contenían los cistocarpos.

La estrategia general fue la de utilizar varios agentes que fueran eliminando paulatinamente todos los organismos asociados al talo de las algas.

Genéricamente, los organismos carentes de pared celular fueron eliminados con un shock osmótico y epífitos bacterianos y algales con limpieza manual y/o sonicación (ultrasonidos) (Polne-Fuller *et al.*, 1980, García-Reina *et al.*, 1988, Robaina *et al.*, 1990a).

Se obtuvieron explantos fértiles de aproximadamente 3mm de diámetro, procedentes de la zona media de talos, que previamente se limpiaron, bajo lupa, con pincel eliminando los restos de sustratos y/o epífitos y se lavaron en agua destilada durante 5 minutos. Estos fragmentos discos (explantos) fueron tratados con un baño de ultrasonidos y, como alternativa, sumergidos en una solución de betadine 5% con una gota de Tween 80, utilizado como tensoactivo, durante 7 minutos.

La esterilización prosiguió con la incubación individual de cada explanto en una solución de antibióticos con distintos espectros de acción (Tabla III.1).

Transcurrida esta etapa, la esterilidad de los explantos se comprobó, cultivando durante 10 días en medio sólido MCE (Medio Comprobación de la Esterilidad) (Tabla III.2), cuya preparación fue la misma que para la elaboración del medio PES (Provasoli 1968). Este medio permitió comprobar la ausencia o la presencia de contaminantes bacterianos, fúngicos y algales.

Las referencias posteriores a la asepsia de los explantos y esporas deben entenderse como la ausencia en la superficie del talo de estos tipos de contaminantes (Robaina 1988, Robaina *et al.*, 1991).

Finalmente, los fragmentos discos, libres de contaminantes, fueron transferidos a PES sólido hasta que las carposporas fueran liberadas.

Tabla III.1 Solución de antibióticos y espectro de acción de cada uno de ellos utilizado en la desinfección de los explantos de G. doryphora.

Penicilina	bactericida gram +	100 mg
Ampicilina	bactericida gram +/-	25 mg
Nistatina	fungicida	25 mg
GeO ₂	antidiatomeas	10 mg
agua de mar esterilizada		100 ml
tomar 1 ml y enrasar con agua de mar esterilizada a 10ml		

Tabla III.2 Composición del medio MCE (Medio Control Esterilidad).

Glucosa	0.05 g
Sacarosa	0.1 g
Hidrolisado de caseína	0.05 g
Lactosa bacteriológica	0.1 g
PES	100 ml

Todas las operaciones de incubación y cultivo se realizaron en una cámara de flujo laminar horizontal Glatt Labortechnik. El material de laboratorio, usado en la incubación y siembra, fue esterilizado con un paso por autoclave y con flameado en alcohol en el interior de la cámara de flujo. El material vegetal fue incubado y cultivado en una cámara de cultivo marca Koxka, a una temperatura de 19 ± 2 °C, fotoperiodo de 18 horas luz: 6 horas de oscuridad e intensidad de luz blanca de $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sylvania grolux) a nivel de las placas de Petri.

III.2.2 OBTENCIÓN DE CARPOSPORAS.

Siguiendo la metodología ya establecida para macroalgas por Robaina (1988), se obtuvieron explantos fértiles axénicos, con los que, comparamos los siguientes métodos para la obtención de carposporas:

a) Procedimiento de liberación espontánea.

Se sembraron los explantos conteniendo carposporas, en medios PES sólidos (agarizados) y líquidos entre 25 y 30 días, hasta que, éstas hubieron sido liberadas espontáneamente y germinaron.

Los pretalos fueron recogidos con una lanceta metálica flameada en alcohol y cultivados en medios sólidos y líquidos PES.

b) Destrucción mecánica del explanto.

Con el fin de minimizar el tiempo de liberación de las esporas se procedió a la destrucción mecánica de los explantos asépticos, desgarrándolos directamente en medios líquidos (imposible en medios sólidos) con ayuda de unas

pinzas y bisturí previamente esterilizados. Los explantos, así tratados, quedaron en medios líquidos PES (Provasoli 1968) y ASP6F2 (Fries 1977).

III.2.3 CULTIVO Y PROPAGACION HASTA LA OBTENCION DE TALOS.

Los talos jóvenes (*carposporelings*) procedentes de los pretalos fueron cultivados en medios líquidos PES y ASP6F2 con sistema de aireación.

Para ello, el interior de la cámara de cultivo fue habilitado con un compresor soplante, modelo ELMO G (Siemens), el cual proporciona aire a los cultivos, a través de un sistema de tuberías de PVC (cloruro de polivinilo) que a su vez, finaliza en botellas lavadores de gases, marca Pyrex, de 1000 y 250 ml de capacidad (Foto III.1). El aire fue temporizado (15 minutos h^{-1}) a la máxima potencia para evitar sobrecalentamiento en la cámara de cultivo.

Las condiciones experimentales de luz, temperatura y fotoperiodo fueron las mismas ya descritas.

Los talos se cultivaban cosidos a mallas de plástico donde se individualizaban unos de otros.

Foto III.1 Vista parcial de la cámara de cultivo compuesta de un sistema de tuberías de PVC y de botellas lavadoras tipo PYREX.



1

III.2.4 ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS PRETALOS EN MEDIOS PES.

El estudio histológico de este material, creciendo en medios sólidos sin fuente de carbono (PES), se realizó con un número aproximado de 500 pretalos los cuales tenían entre 1 y 3 meses de edad desde la liberación de las carposporas.

a) Microscopía Óptica.

Los pretalos fueron fijados sumergiéndolos durante 4 horas, a temperatura de 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 2 lavados, de 30 minutos 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, 0.3 M NaCl.

Después de la fijación, el material vegetal fue sometido al proceso de pre-infiltración e infiltración. La solución de pre-infiltración se preparó manteniendo una relación 1:1 (v/v) de una disolución al 95% de etanol y la solución de infiltración. El material se mantuvo durante 2 horas a temperatura de ambiente.

La solución de infiltración se preparó disolviendo 0.5 g de activador en 50 ml de *Basic Resin* (Historesin Embedding Kit, marca registrada). El material vegetal, sumergido en esta disolución, se trató durante 10 minutos con vacío y se mantuvo en el desecador durante toda la noche a temperatura de ambiente.

El material fue incluido en Glicol-Metacrilato (GMA, Historesin marca registrada, Reichert-Jung, Gerrids & Smid, 1983). La solución de inclusión polimerizó a los 60-70 minutos a 60 °C.

Se obtuvieron secciones seriadas de 5 μm , cortadas con cuchilla de tungsteno, en un microtomo marca Reichert-Jung, modelo 2050. Los cortes se depositaron, en un baño de agua destilada, a temperatura de ambiente para su estiramiento y se recogieron en portas desengrasados manteniéndose a 60 °C durante 20 minutos. Una vez adheridos, los cortes fueron teñidos directamente.

Las tinciones y controles empleados se describen a continuación y en la Figura III.1 se resume los tipos de tinción, sus controles y las reacciones que tiene lugar.

Tabla III.1 Resumen de las tinciones histológica e histoquímicas empleadas; especificidad, grupo funcional sobre el que actúa el tinte y controles utilizados.

TINCION	ESPECIFICIDAD	GRUPO FUNCIONAL	REACCION BLOQUEADORA	REFERENCIA
AZUL DE TOLUIDINA				TSEKOS 1985
LUGOL (I/IK)	ALMIDON		AMILASAS	LEA 1990
SCHIFF-AC. PERIODICO (PAS)	POLISACARIDOS NEUTROS	-OH (HIDROXY) DESPUES OXIDACION -COH (ALDEHIDO)	REDUCCION R-COH + Na ₂ BH ₄ = R-CH ₂ OH + (...)	MCCULLY 1955
MERCURIO- AZUL DE BROMOFENOL	PROTEINAS	-NH ₂ (AMINO)	DEAMINACION R-NH ₂ + NO ₂ Na = R-OH + (...)	TSEKOS 1983
ALCIAN BLUE (AB)	POLISACARIDOS SULFATADOS	-OSO ₃ H (ESTER SULFATO)	METILACION R-OSO ₃ H + CH ₃ OH = R-OH + (...)	PARKER & DIBOLL 1966

a.1 Tinción con Azul de Toluidina (Tsekos 1985).

Para la visualización de la topografía general se preparó una solución de azul de toluidina al 1% a partir de otra de borax también al 1%.

Las secciones se tiñeron durante 1 minuto con azul de toluidina y se lavaron con abundante agua destilada.

a.2 Tinción con Acido Periódico-Schiff (PAS) y Alcian Blue (AB) pH 1.0. (McCully, 1966 y Parker & Diboll, 1966).

Para obtener una información más completa se combinaron los 2 métodos de tinción (Kiernan, 1990)

Se tiñeron las secciones con AB pH 1.0 durante 30 minutos y se lavaron con agua destilada. Seguidamente, se sumergieron en una solución acuosa de 0.5% de ácido periódico durante 20 minutos y transcurrida la oxidación, se volvió a lavar con agua destilada.

Se tiñeron con el reactivo de Schiff durante 20 minutos y se enjuagó en una solución al 2% de bisulfito sódico, seguido de un lavado en agua destilada, dejándose secar a temperatura de ambiente.

* Preparación de las soluciones del reactivo de Schiff y Alcian Blue.

Reactivo de Schiff (Tomasí 1936): Se disolvió 1.0 g de fucsina básica (pararosaniline, Sigma) en 200 ml de agua destilada y se llevó a ebullición, agitando durante 5 minutos y dejándose enfriar hasta los 50 °C; se filtró y al filtrado se añadieron 20 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se dejó enfriar hasta 25 °C y se añadió 1 g de metabisulfito sódico. Esta solución se almacenó

en oscuridad durante toda la noche. Finalmente, se añadieron 2 g de carbón activo y se agitó durante 1 minuto. Se filtró y se almacenó en botella oscura a 4 °C.

Alcian Blue (Kiernan 1990): Se disolvió 1.0 g alcian blue (Sigma) en 100 ml ácido clorhídrico 0.1M, pH 1.0. Se agitó hasta su completa disolución y se filtró antes de usar.

*** Soluciones "Control".**

PAS:

1.- Tinción con el reactivo de Schiff sin oxidar con HIO_4 .

Este control sirvió para eliminar el posible efecto de la fijación con glutaraldehído (Kiernan 1990). En ningún caso se presentó alguna reacción como consecuencia de ello.

2.- Reducción, con borohidruro de sodio, de los grupos aldehídos (Cole *et al.*, 1985, Kiernan 1990). La reacción fue irreversible.

AB pH 1.0:

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

*** Preparación y modo de empleo de las soluciones "Control"**

Borohidruro de sodio: Se disolvieron 0.5 g de hidrógeno fosfato de disodio (Na_2HPO_4) en agua destilada y se añadieron 25 mg de borohidruro de sodio (NaBH_4). Los portas se sumergieron en esta disolución durante 10 minutos, con agitación ocasional para liberar las burbujas de hidrógeno.

Metilación: En cubetas de tinción modelo Hellendhall, conteniendo metanol absoluto y 1% de HCl concentrado, se matuvieron los portas durante 48 horas a 58-60 °C. Transcurrido este periodo, los portas se enjuagaron en metanol absoluto y seguidamente en una solución acuosa de alcohol al 70%.

a.3 Tinción con Mercurio Azul de Bromofenol (Tsekos 1983).

Las secciones fueron tratadas con el mercurio azul de bromofenol durante 15 minutos. Se lavaron con ácido acético al 1% en agua destilada, hasta que se obtuvo un fondo claro y finalmente, con metanol durante 3 minutos para convertir el colorante a su forma alcalina.

*** Preparación de la solución de Mercurio-Azul de Bromofenol.**

Se disolvieron 10 g de cloruro de mercurio ($\text{Cl}_2 \text{Hg}$) y 100 mg mercurio-azul de bromofenol (Sigma) en 100 ml de agua destilada y se filtró.

*** Solución "Control".**

La deaminación bloquea los grupos aminos llevándolos a grupos hidroxilos. La reacción es irreversible.

*** Preparación y modo de empleo de la solución "Control".**

Se disolvieron 7 g de nitrito sódico ($\text{NO}_2 \text{Na}$) en 94 ml de agua destilada y se añadieron 6 ml de ácido acético. Los cortes fueron sumergidos en esta disolución durante 4 horas a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada.

a.4 Tinción con Lugol (I/IK) (Lea, 1990).

Durante 5 ó 10 minutos, se sumergieron los cortes en la solución de lugol. Los restos de colorante se lavaron con agua destilada.

* Preparación del Lugol.

Se disolvieron 0.127 g iodo metálico y 0.230 g ioduro potásico en 100 ml agua destilada añadiendo 10 ml de ácido acético.

* Solución "Control".

Se probaron como controles las α y β amilasas (Kiernan 1990).

Las α amilasas son endoglucosidasas que hidrolizan las cadenas de almidón mediante ataques al azar en puntos alejados de los extremos de la cadena y forman cortas cadenas polisacáridicas. Aunque también probamos la α amilasa comercial (Boehringer), los mejores resultados se obtuvieron con la amilasa salivar (Kiernan 1990).

Las β amilasas muestran acción exoglucosidasa, separando de los extremos 2 unidades de azúcar, a la vez, en forma de maltosa. El enlace α original se invierte y el producto es la β maltosa. La β amilasa usada fue de *Ipomoea batatas* (Boehringer)

* Preparación y modo de empleo de las soluciones "Control".

El modo de empleo de ambas amilasas fue el mismo. La β amilasa (1mg/ml) fue sometida, previo a su uso, a un proceso de diálisis en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 durante toda la noche. Los cortes fueron sumergidas en la α ó β amilasa a 37 °C durante 30 minutos.

a.5 Determinación del tamaño de las células.

Una vez que los cortes habían sido teñidos con cualesquiera de los procedimientos anteriores, el tamaño celular se midió utilizando un objetivo micrométrico (10X) de Olympus, corregido en escala con un porta milimetrado.

Sobre cada una de las 5 ó 6 secciones transversales obtenidas en cada tiempo descrito anteriormente (1-3 meses), se eligieron tres transectos al azar que cubrían desde el interior hasta el exterior del corte. Los datos fueron agrupados en función de los tamaños celulares y el tamaño final de cada una de ellas fue la media de cada clase.

b) Microscopía electrónica.

Al procedimiento general de fijación se añadió, después del glutaraldehído, un paso de postfijación en una solución al 2% de tetróxido de osmio en tampón cacodilato sódico 0.1 M a pH 7.4. La fijación finalizó con tres lavados, de 10 minutos cada uno, en tampón cacodilato 0.1 M a pH 7.4. Las muestras quedaron almacenadas en la misma disolución a 4 °C hasta su inclusión.

Para la inclusión en Epon, se comenzó con la deshidratación del tejido en una serie alcohólica, con baños de 10 minutos en etanol al 20%, 50%, 70%, 90%, 96% y dos baños de 20 minutos en etanol al 100%. El material deshidratado se sumergió en óxido de propileno durante 40 minutos (20 minutos x 2 veces) y posteriormente en óxido de propileno-Epon (1:1) durante 3 horas. El proceso terminó 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 ó Reichert Jung Ultracut E.

Las secciones fueron recogidas en rejillas de cobre y tras un baño en acetato de uranilo al 2% ó al 4% de acetato de uranilo en una solución acuosa de citrato de sodio y nitrato de plomo se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca Phillips, modelo EM 301 o Zeiss EM 9 S-2. La película empleada fue Negrapan 21 ó Scientia film (Agfa).

III.3 RESULTADOS

III.3.1 OBTENCION DE CARPOSPORAS.

a) Liberación espontánea.

Después de 30 días, la mayoría (80-90 %) de los explantos cultivados habían liberado carposporas. Estas eran fácilmente distinguibles sobre la superficie de los explantos y la producción fue tan considerable que permitió que los pretalos fueran recolectados de la superficie de los mismos (Foto III.2). Los explantos, una vez emitidas las esporas, se tornaron pálidos y depigmentaron completamente.

Los pretalos (1 mm de diámetro) cultivados en medios PES sólidos y líquidos desarrollaron en 2 ó 3 meses pequeños talos jóvenes con 3 ó 4 ejes de crecimiento (Foto III.3).

b) Destrucción mecánica del explanto.

Las carposporas liberadas en medios líquidos (PES, ASP6F2), tras forzar la ruptura de los cistocarpos se fijaron al fondo de la placa de cultivo mediante el desarrollo de una estructura filamentosa de crecimiento concéntrico a partir de la carpospora.

Comparadas con las esporas liberadas espontáneamente, el patrón de desarrollo es distinto, ya que, aparecen como pequeños puntos fijados en el fondo de la placa (Foto III.4).

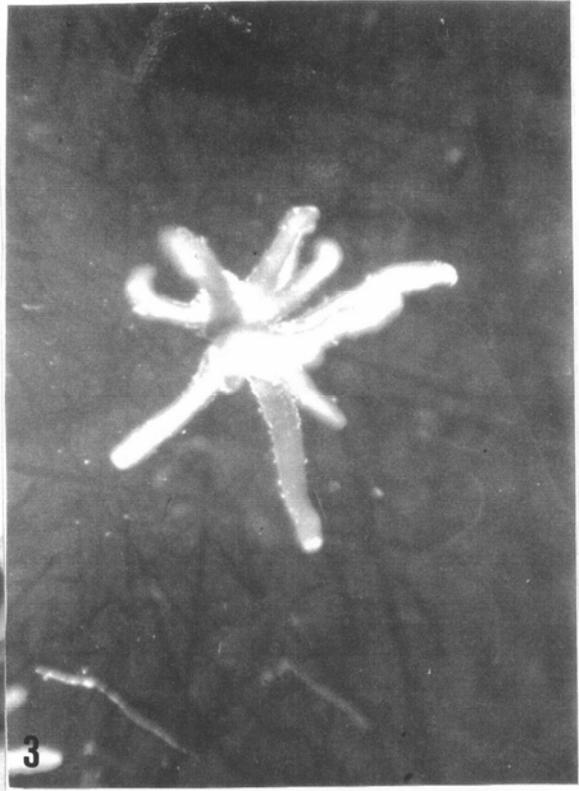
El recultivo de estas esporas fijadas a medios sólidos PES permitió el desarrollo de pequeños talos jóvenes en 2-3 meses (Foto III.5).

Foto III.2 Liberación espontánea de esporas en un explanto sembrado en medio agarizado PES liberando sus esporas. x60.

Foto III.3 Talo joven de G. doryphora de 2 meses de edad cultivado en PES líquido. x60.

Foto III.4 Liberación mecánica de esporas de G. doryphora en medio PES líquido. x100.

Foto III.5 Talos jóvenes de G. doryphora recultivados a medios agarizados PES, tras la liberación mecánica en medios líquidos. x60.



III.3.2 CULTIVO Y PROPAGACION HASTA LA OBTENCION DE TALOS.

Los pretalos fueron propagados en medios líquidos aireados (no asépticos) en la cámara de cultivo hasta la obtención de talos.

En medios PES, 2 ó 3 meses después de haber sido transferidos, los diferentes talos jóvenes permanecían altamente pigmentados y ramificados. Las yemas emitidas tendían a conformarse como pequeñas láminas, adquiriendo una morfología similar a la presentada en la naturaleza (Foto III.6).

En medios ASP6F2, el crecimiento fue bastante anormal ya que las ramificaciones emitidas por los talos jóvenes eran muy pequeñas, no llegando a sobrepasar los 0.5 cm. Estas ramificaciones se caracterizaban además por tener a lo largo de su eje pequeños nódulos. El recultivo a medios PES permitió el desarrollo "normal" de los talos y la desaparición de estas protuberancias o verrugas.

III.3.3 ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS PRETALOS EN MEDIOS PES.

El material mostraba una morfología esférica diferenciándose las más antiguas (3 meses) por la presencia de yemas o ejes de crecimiento.

Histoquímicamente, los pretalos mostraron una aparente homogeneidad en su contenido celular. La tinción del reactivo de Schiff (PAS, polisacáridos neutros) reaccionó con la cutícula, la cual bordea a la capa celular

externa, y con la pared celular. También fueron perceptibles, con esta tinción, los gránulos de almidón distribuidos por todas las células (Foto III.7).

Conjuntamente con el Alcian Blue pH 1.0 (polisacáridos sulfatados), se reveló la existencia de mucílago externo e intercelular (Foto III.7). La tinción para proteínas (Hg-azul de bromofenol) tampoco mostró variaciones entre las células de las que consta el pretalo.

Las secciones semifinas, teñidas con azul de toluidina y vistas con objetivo de inmersión mostraban que los pretalos constan de tres tipos celulares:

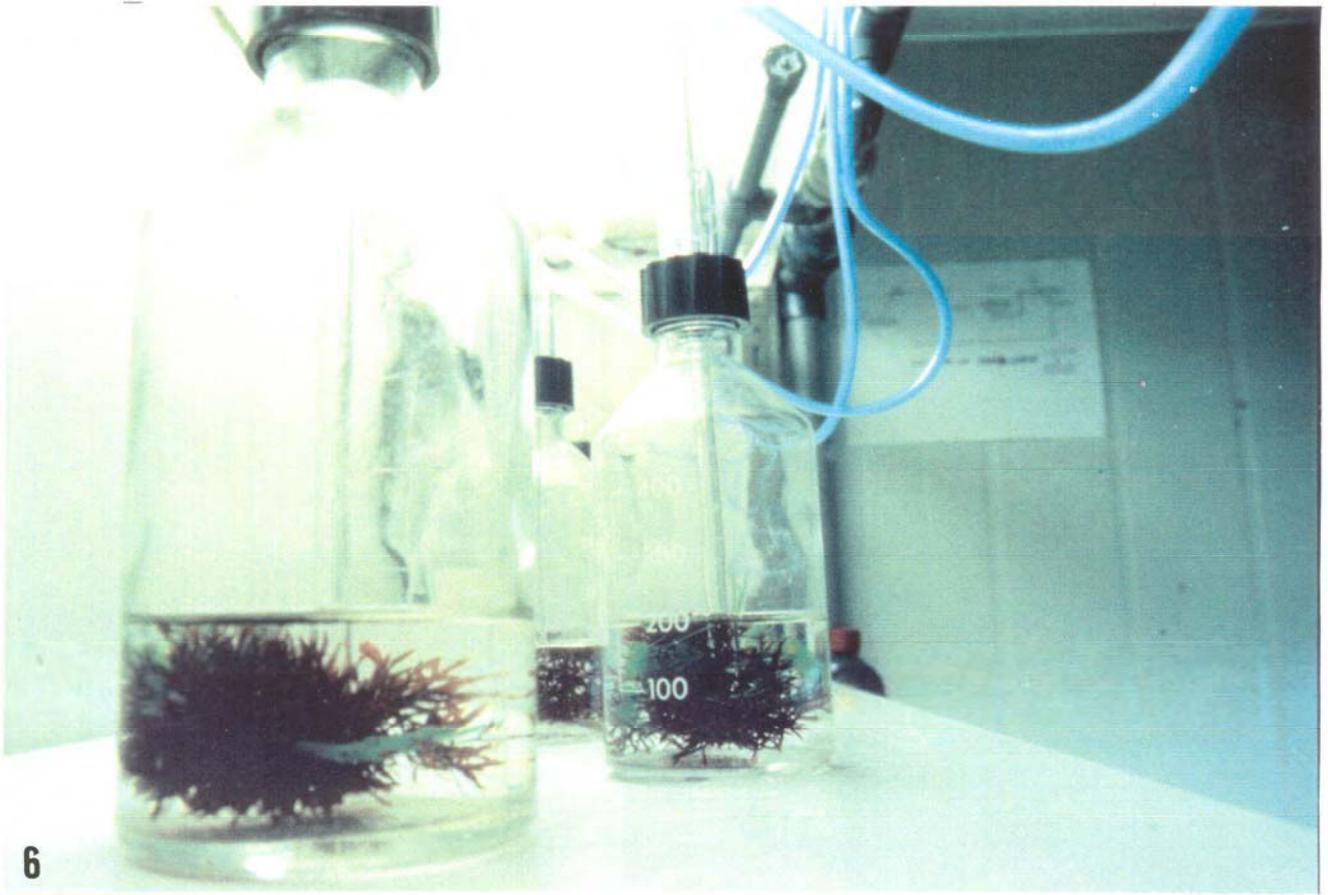
a) Células ovoides cuyo diámetro no excede las $4.8 \mu\text{m}$ que ocupan la capa más externa y que han surgido por división de las células intermedias (Foto III.8).

b) Células isodiamétricas cuyas áreas aproximadas son de $4.8 \times 4.8 \mu\text{m}$ y que están situadas en la zona interna (Foto III.9).

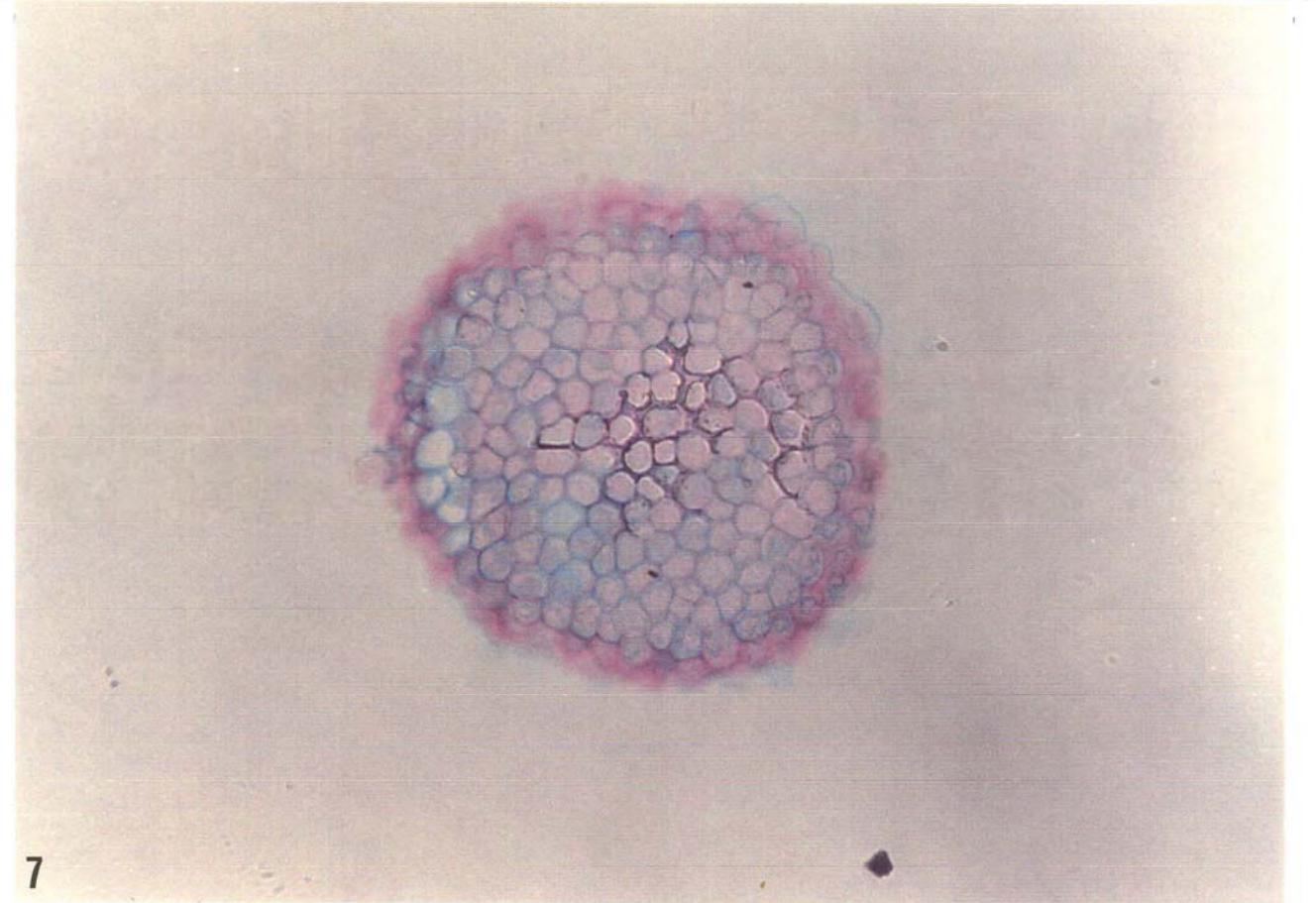
c) células elongadas o rectangulares con un área de $7.2 \times (7.2-4.8) \mu\text{m}$ que conforman la capa intermedia (Foto III.9) y que posteriormente se dividen dando lugar a dos células hijas (Foto III.10).

Foto III.6 Talos de G. doryphora cultivados en condiciones no asépticas y procedentes de esporas liberadas espontáneamente en medios sólidos PES. x200.

Foto III.7 Corte transversal de $5\mu\text{m}$ de un pretalo de 1 mes de edad, cultivado en PES sólido, teñido con la tinción específica para polisacáridos neutros (PAS) y sulfatados (AB pH 1.0). Nótese la reacción de PAS con la cutícula y la pared celular y conjuntamente con el AB la del mucílago. x250.



6



7

Foto III.8 Campo de células de la zona externa del pretalo cultivado en medio sólido PES. Nótese las células las cuales han sufrido división (flechas) y la gran cantidad de gránulos de almidón (a).

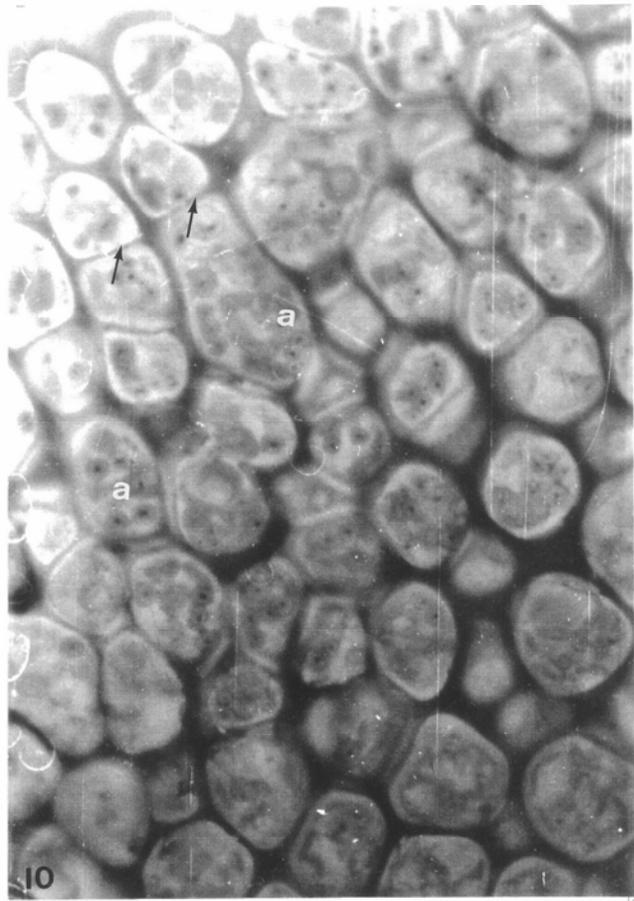
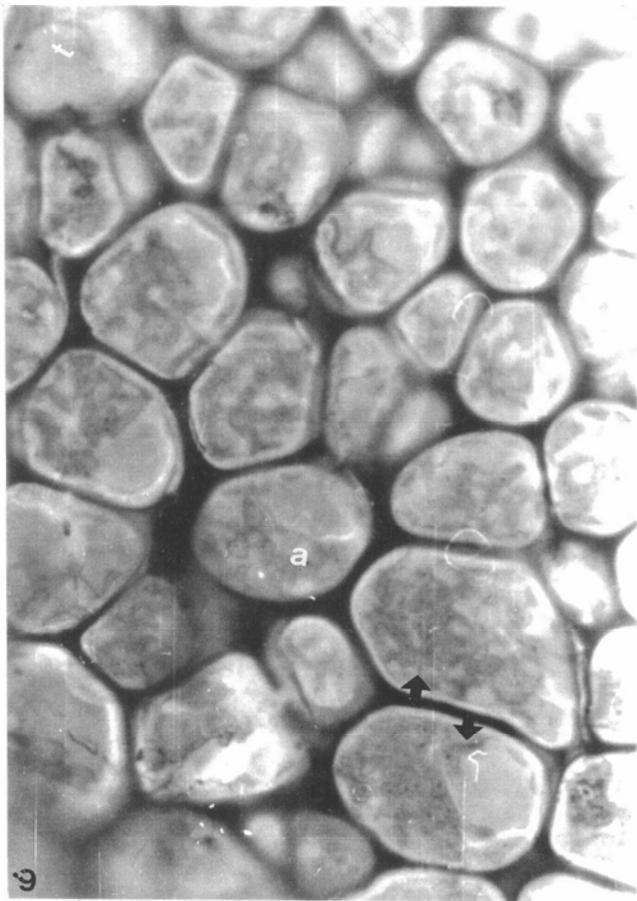
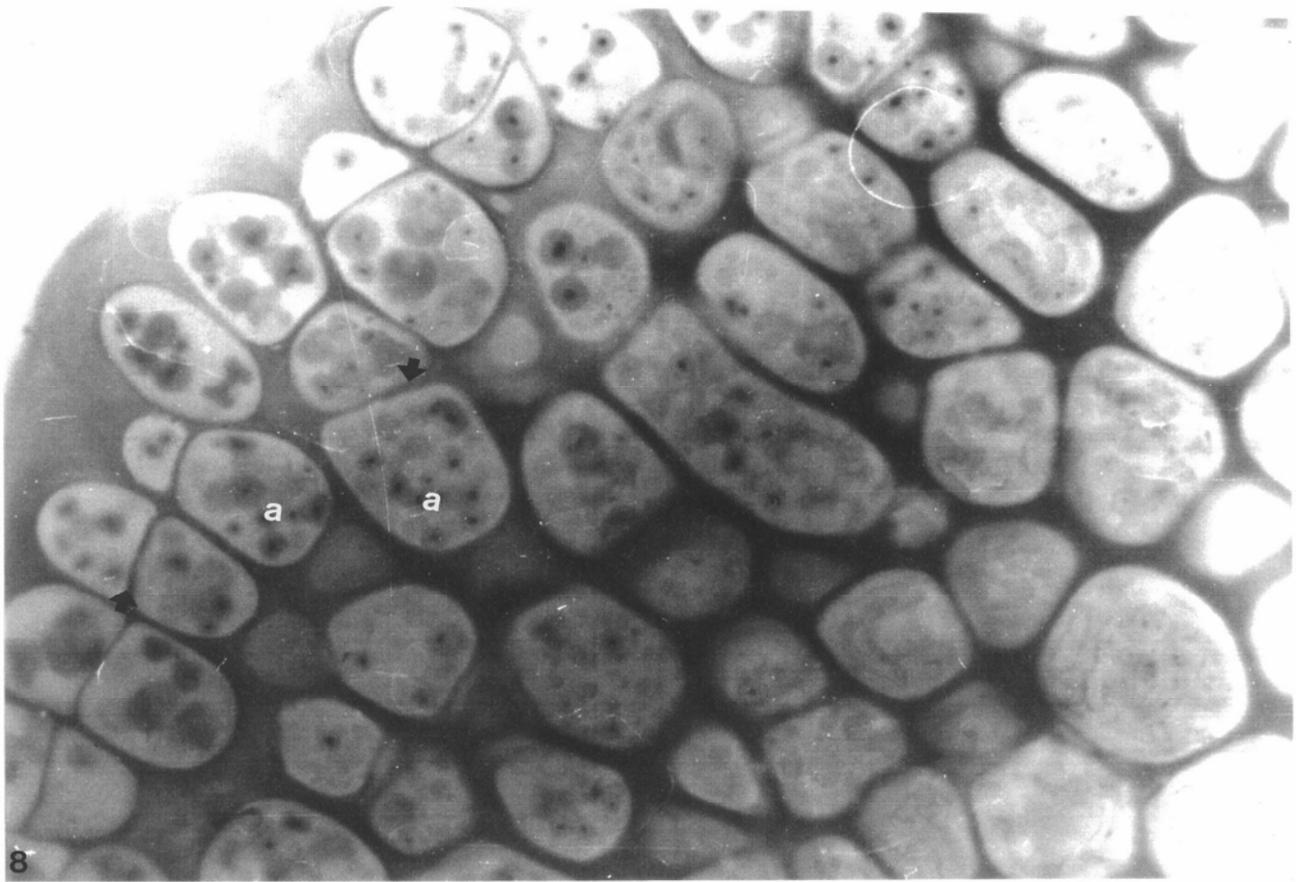
Sección semifina de 1.5 μm teñida con azul de toluidina. x200.

Foto III.9 Células del interior de un pretalo cultivado en medios sólido PES. Nota las células redondeadas, casi isodiamétricas, y el alto contenido en almidón (a).

Sección semifina (1.5 μm) teñida con azul de toluidina. x140.

Foto III.10 Pretalo de cultivado en medio PES. Este campo de células cubre desde la mitad del pretalo hasta las células más externas. Nótese que las células exteriores están elongadas (margen superior izquierdo) y sufren divisiones (flechas) en contraste con las del interior (margen inferior derecho).

Sección semifina de 1.5 μm teñida con azul de toluidina. x140.



Con la microscopía electrónica pudimos observar diferencias ultraestructurales entre los diferentes tipos celulares. Generalmente, las células del interior (isodiamétricas) acumulan cuerpos osmofílicos (Foto III.12, III.14) y poseen un citoplasma menos denso (Foto III.14) a diferencia de aquellas pertenecientes a la capa intermedia-externa las cuales presentan un citoplasma más denso, un núcleo central grande y un nucleólo prominente (Foto III.15).

En todos los tipos celulares, desde el interior hasta el exterior del pretalo, se pueden distinguir vesículas (Foto III.12, III.13, III.15) las cuales se caracterizan por poseer zonas electro-densas incluidas en una matriz transparente a los electrones. Existen dos tipos de vesículas:

a) Las vesículas pequeñas que tienen un diámetro aproximado de $0.3 \mu\text{m}$. Estas poseen formas esféricas, siendo similares a las *cored vesicles* encontradas en otras algas rojas durante la carposporogénesis y que se suponen contribuyen a la secreción de mucílago que permite la adhesión de las esporas (Foto III.12) (McBride & Cole 1971, Chamberlain & Evans 1973, Pueschel & Cole 1985, Tsekos 1981, 1983, 1991, Tsekos *et al.*, 1985, Tsekos & Schnepf 1985, Delivopoulos & Tsekos 1983).

b) Las vesículas mayores de $0.3 \mu\text{m}$ con tamaños y formas variables, probablemente como resultado de la fusión entre ellas. Están constituidas por mucílago y también han sido citadas en una gran variedad de algas rojas (McBride & Cole 1971, Chamberlain & Evans 1973, Pueschel & Cole 1985, Tsekos 1981, 1983, 1991). Estas vesículas o sacos de mucílago descargan su contenido en el exterior contribuyendo a la formación de la pared celular (Foto III.12, III.13, III.15).

Los granos de almidón son abundantes y están dispersos por todas las células (Foto III.11, III.12, III.14, III.15). Son de gran tamaño y con formas lenticulares y/o redondeadas (Foto III.13, III.15). Es de destacar las asociaciones entre los granos de almidón y los cloroplastos (Foto III.13).

Los cloroplastos tienen desarrollado su sistema tilacoidal, en todos los tipos celulares (Foto III.13, III.16), y parecen dividirse por constricción (Foto III.15, III.16).

Aunque no hemos buscado estructuras nucleares (cromosomas) o haloplasmáticas (huso) propias de la división celular, ya que, los núcleos aparecen normales (interfásicos) (Foto III.14, III.15), son claras las imágenes de citocinesis de las células elongadas las cuales generan las células corticales (Foto III.10).

Foto III.11 Campo celular externo de un pretalo cultivado en medio PES con gran cantidad de granos de almidón (a) y núcleos normales (n). En las células situadas más hacia el interior destaca la presencia de cuerpos osmofílicos (co), muy probablemente lípidos. x4300.

Foto III.12 Campo celular de la zona interna de un pretalo cultivado en PES mostrando 3 células unidas por 2 *pit-connections*. Nota los enormes sacos de mucílago (sm) momentos antes de ser excretados. x5400.

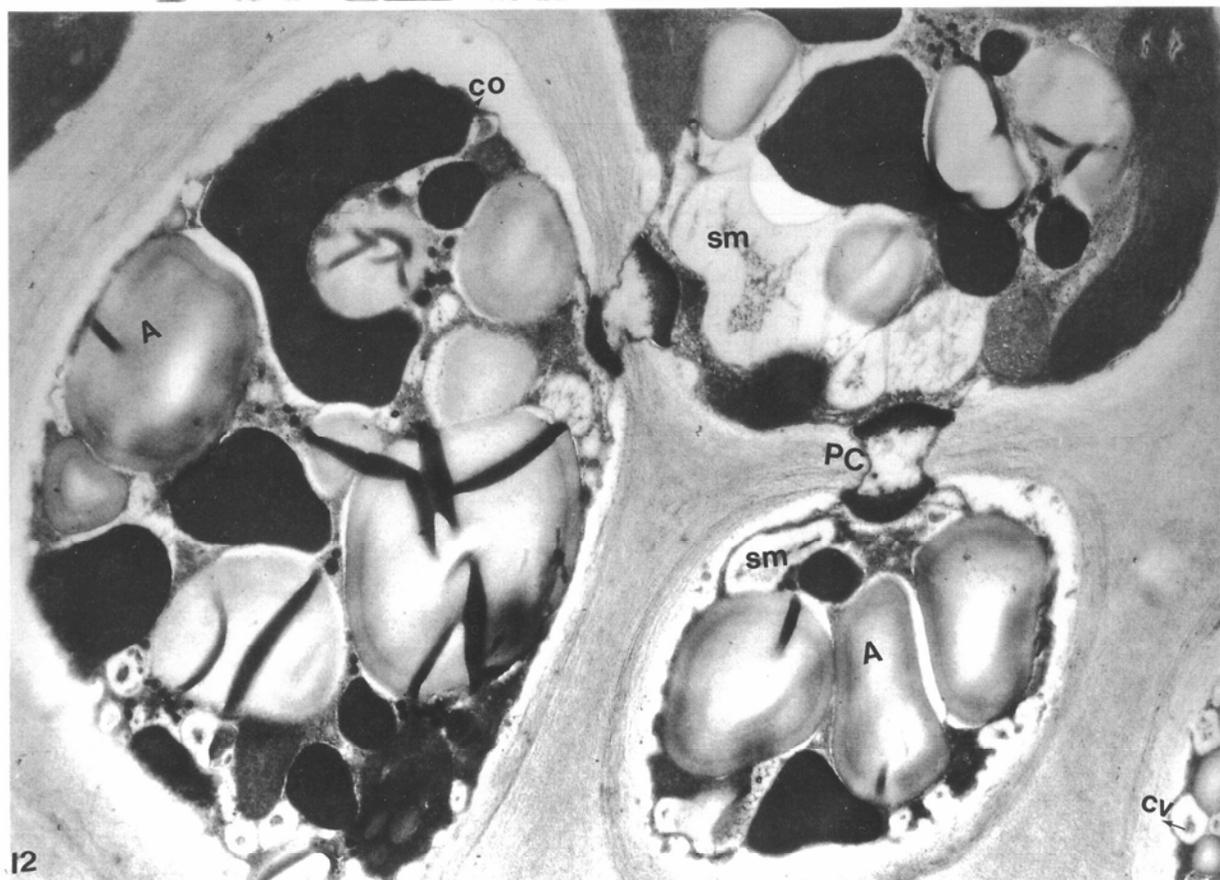
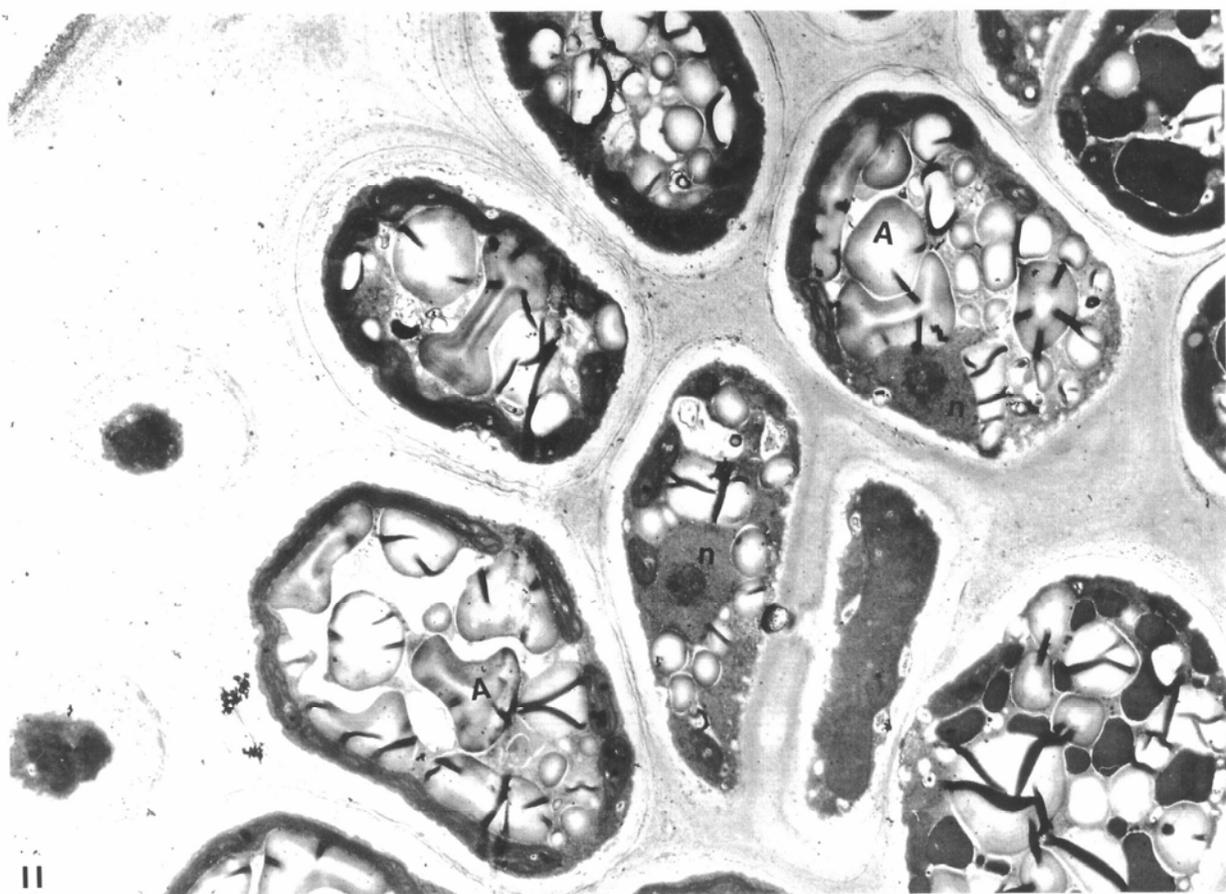
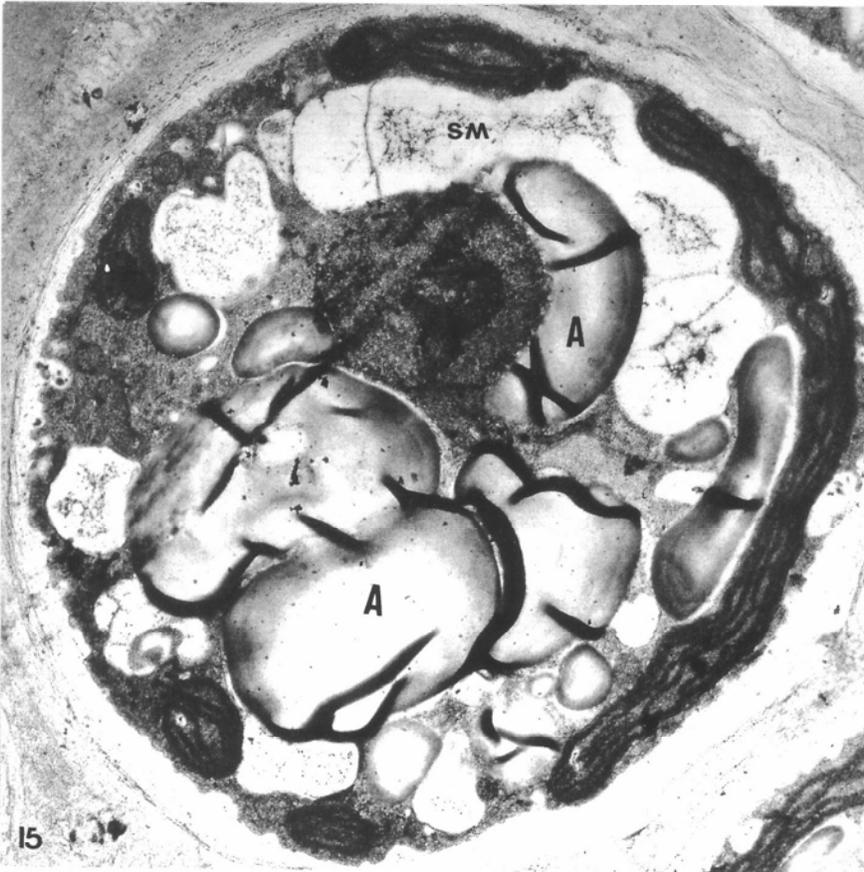
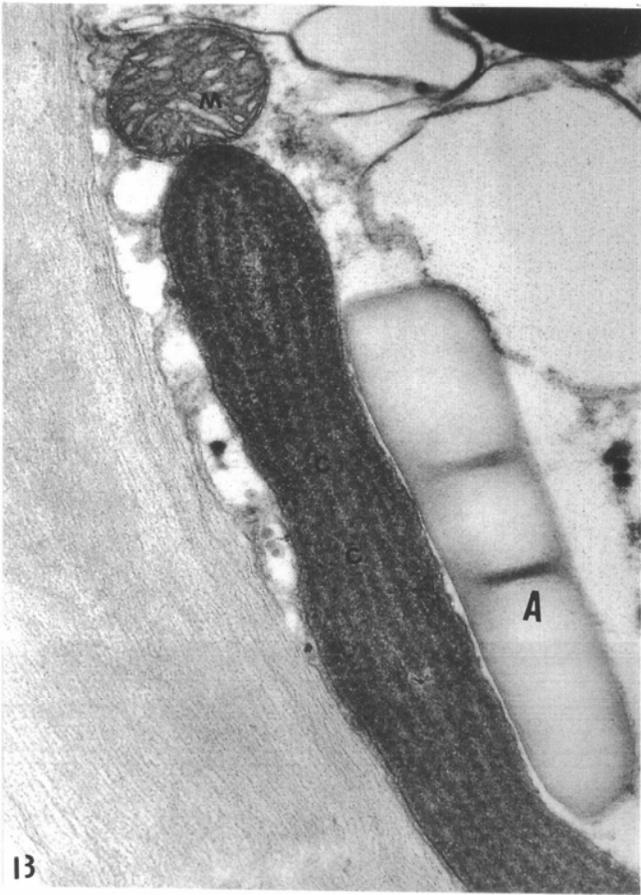


Foto III.13 Campo intracelular de una célula interna de un pretalo cultivado en PES, mostrando cloroplastos normales (c) con ficobilisomas, zonas de ADN (*), mitocondrias (m) y granos de almidón (a). x28500.

Foto III.14 Célula del interior de un pretalo cultivado en PES. Son visibles los granos de almidón (a), mitocondrias (m), cloroplastos (c), núcleo (n) y cuerpos osmoflicos (co). x5400.

Foto III.15 Célula de la capa cortical de un pretalo cultivado en PES. Nota los granos de almidón (a), núcleo (n), mitocondrias (m) y sacos de mucílago (sm). Son también visibles los cloroplastos, conteniendo plastoglóbulos (p). x13400.

Foto III.16 Cloroplasto perteneciente a una célula del interior de un pretalo en PES. Nota los plastoglóbulos (p) y las zonas de ADN (*). (x30000)



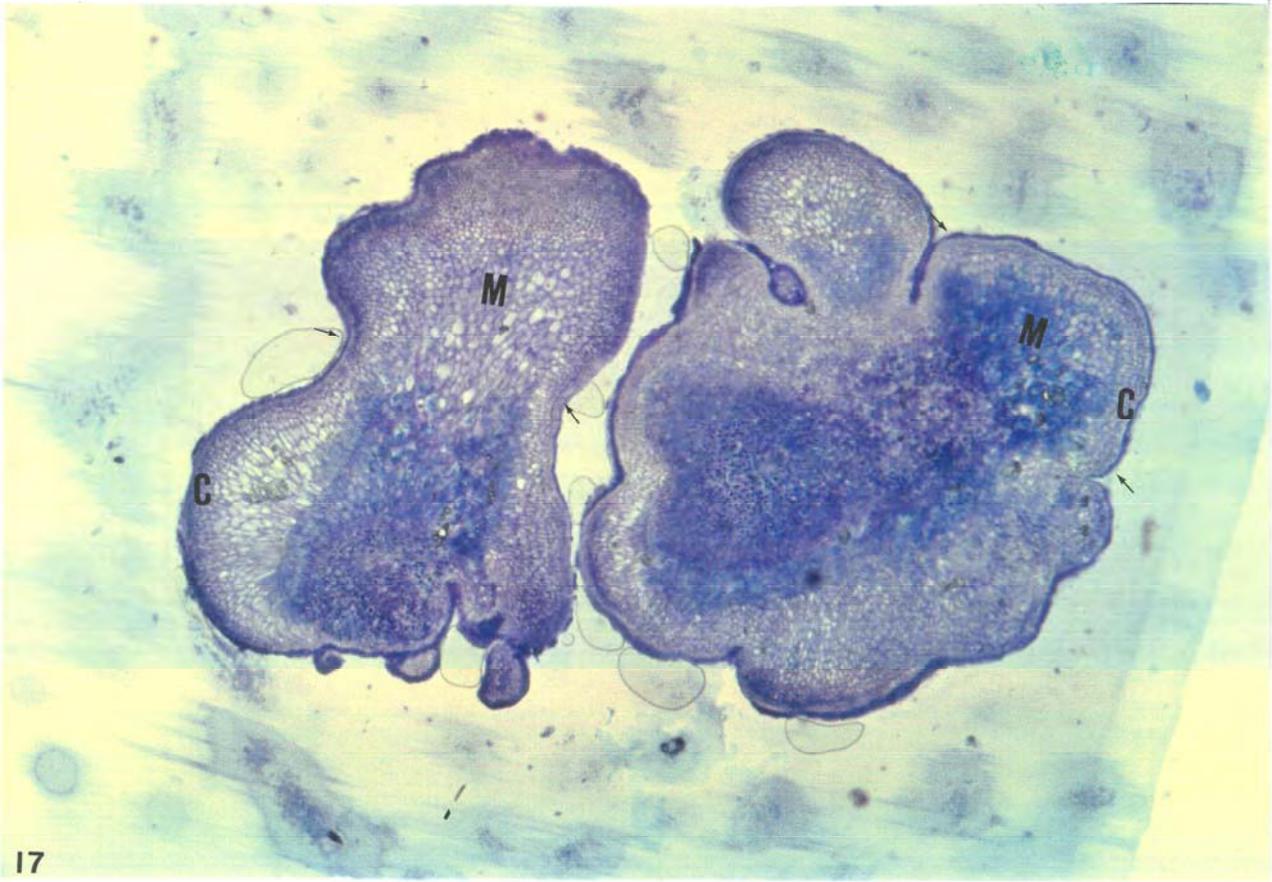
Características de las yemas (ejes de crecimiento).

El estudio de secciones seriadas de pretalos, conteniendo yemas, indicó que la primera señal para la formación de las mismas era la existencia de una pequeña protuberancia en el pretalo, sobre la que convergen las diferentes capas celulares. Con el tiempo, esta protuberancia pasa por distintos estadios de desarrollo y la auténtica yema (eje de crecimiento) culmina su formación cuando quedan definidas las capas cortical y medular (Foto III.17).

En la zona cortical aparecen las células elongadas y fuertemente empaquetadas formando al menos tres capas. El tamaño de las células disminuye hasta la zona medular de la yema en donde ya se aprecian las células estrelladas y filamentosas normales en los talos de G. doryphora (Foto III.18).

Es de destacar la acumulación de almidón, revelada con lugol, concentrado en la zona de emisión de la yema (Foto III.19).

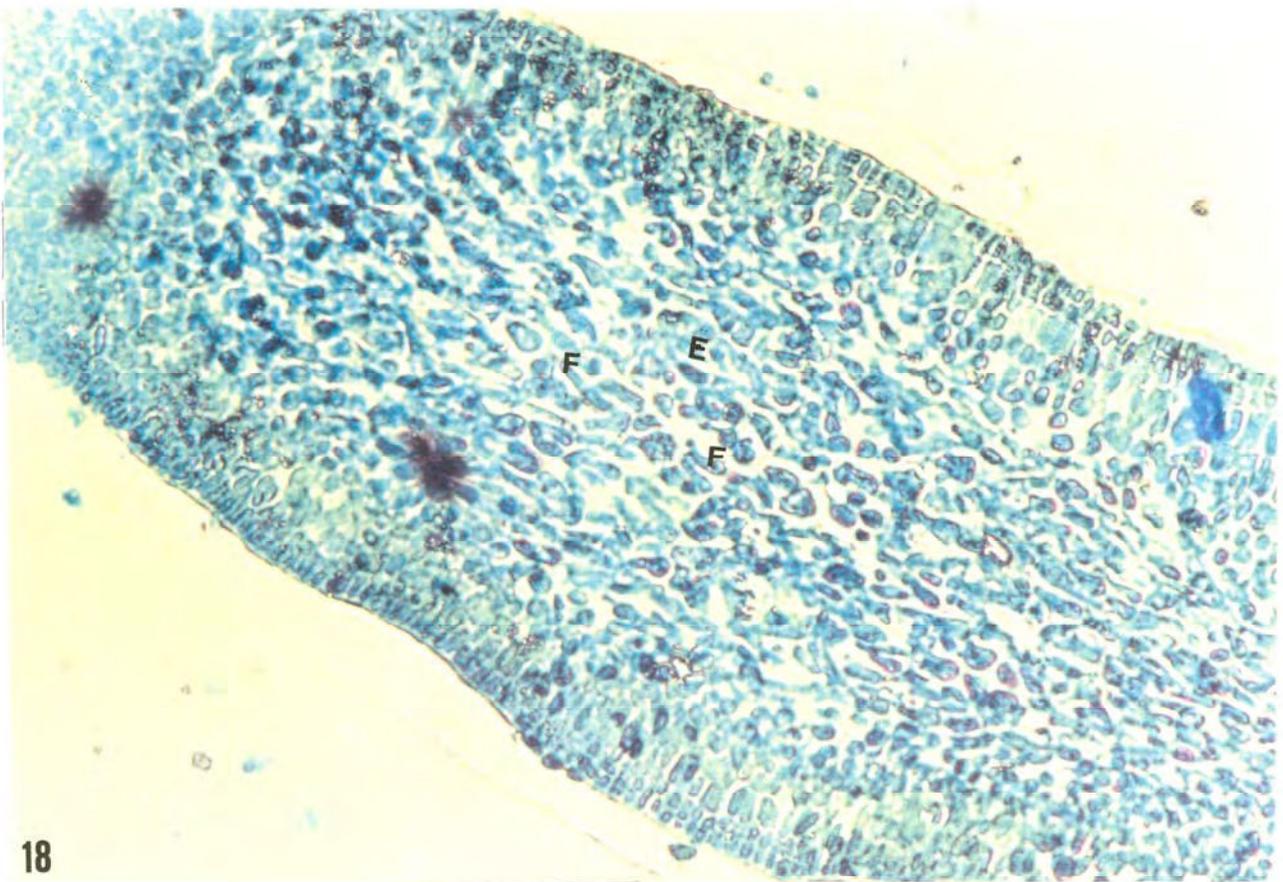
Foto III.17 Sección longitudinal de un pretalo de 1 mes de edad y cultivado en medio PES. Nótese cómo convergen las diferentes capas celulares en las zonas de formación de futuras yemas (flecha) y cómo cuando están desarrolladas se define una capa cortical (C) y otra medular (M). x100.



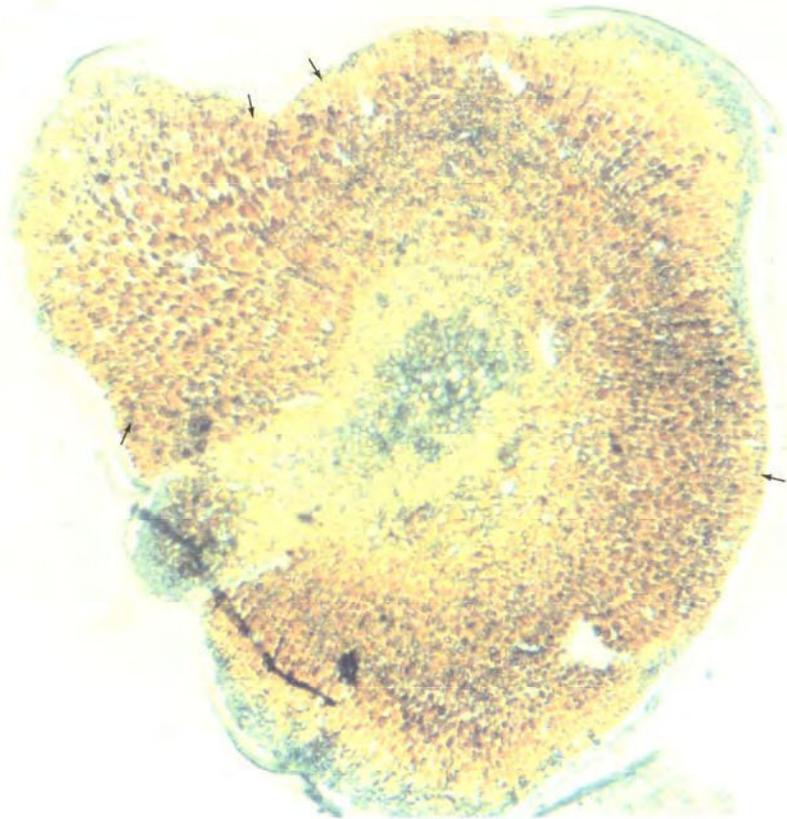
17

Foto III.18 Corte longitudinal de una yema, perteneciente a un pretalo de 2 meses de edad cultivado en PES. En este estadio son evidentes las células estrelladas (E) y filamentosas (F) que conforman la zona medular de la misma. x200.

Foto III.19 Sección longitudinal de un pretalo de 1 mes de edad teñido con I/IK (almidón). Nótese la acumulación de éste en la zona de emisión de la yema (flecha). x200.



18



19

III.4 DISCUSION

III.4.1 ESTERILIZACION Y OBTENCION DE CARPOSPORAS.

La obtención de carposporas asépticas fue absolutamente necesario para su establecimiento en cultivo.

Las experiencias con Grateloupia doryphora y otras algas, tales como, Gelidium versicolor, Gracilaria ferox y G. verrucosa habían puesto en evidencia la poca viabilidad de las esporas liberadas en condiciones no asépticas. Normalmente, y aunque no haya una fuente de carbono presente, ocurre un crecimiento desmesurado de contaminantes (bacterias, hongos, diatomeas) los cuales impiden el del alga.

Tal y como señalabamos en el Material y Métodos de este capítulo, no es posible la esterilización directa de las esporas. Los procedimientos usados habitualmente en el cultivo de tejidos de macroalgas consisten en protocolos largos, en los que se combinan distintos agentes desinfectantes, y con periodos de 3-5 días de incubación, lo que, probablemente explicaría la falta de resultados positivos en carposporas liberadas.

La única aproximación que quedaba era la esterilización de explantos fértiles los cuales contenían carposporas, con la metodología habitual establecida en las macroalgas para explantos (Robaina 1988). Los resultados obtenidos mostraron que este método fue útil para nuestros objetivos, resultando en una producción aproximada de 500 carposporas por explanto.

La inexistencia de datos acerca de la cantidad de carposporas por cistocarpio en G. doryphora nos impiden hablar en términos de eficiencia de producción y germinación. De cualquier forma, esta metodología produce la

suficiente cantidad de carposporas como para establecer un cultivo, con una cantidad de material de partida, mucho mayor del que se pueda conseguir utilizando el cultivo de explantos (Robaina 1988, Robaina *et al.*, 1990a,b).

En plantas superiores, una de las vías para la obtención de material aséptico es la utilización de tejido meristemático apical en la planta, ya que, su capacidad multiplicativa permite la obtención de material libre de partículas víricas (Evans *et al.*, 1983). Sin que este hecho sea estrictamente comparable, los resultados obtenidos con las carposporas indicarían que también ellas pueden ser un material internamente libre de contaminantes. En otro caso no se explicaría que la desinfección exterior del explanto que las contiene implique la esterilización de cada una de ellas, aunque cabe la mínima posibilidad de que los antibióticos penetren en el interior del cistocarpo y desinfecte a cada una de las carposporas.

Consideramos que la desinfección del explanto conteniendo cistocarpos puede constituir la vía más adecuada para propagar macroalgas especialmente para aquellas reticentes a la puesta en cultivo aséptico (*Gelidium versicolor*, *Gracilaria ferox* y *G. verrucosa*).

Otro aspecto interesante de los resultados obtenidos fue el efecto de los distintos tipos de medios utilizados (líquidos/sólidos) sobre el desarrollo ulterior de las carposporas recién emitidas.

Mientras que, la liberación de esporas en medios líquidos sólo permite la observación de pequeños puntos en el fondo de la placa de Petri, sin que, se manifieste crecimiento alguno, la liberación en medios sólidos favorece la inmediata emisión de ejes de crecimiento, ya que, las carposporas recién liberadas no se fijan.

Estos hechos demuestran un cambio en el patrón de desarrollo de las carposporas cuando están en medios líquidos o cuando está el agar ejerciendo de sustrato.

Algunos autores (Evans & Christie 1974, Callow & Evans 1974, Pueschel 1979) han recogido que la fijación de las esporas a la placa de Petri conlleva la emisión de sustancias mucilaginosas, las cuales permiten la deposición y la fijación, propiamente dicha, de las esporas sobre la placa. La fijación *per se* queda consolidada por la emisión de un segundo mucílago (de fijación) y el desarrollo posterior de los rizoides (Pueschel 1979, Lobban *et al.*, 1985).

Prince (1973) encontró que las condiciones artificiales de los medios agarizados podían impedir la formación de este mucílago y, por lo tanto, eliminan la posibilidad de fijarse al sustrato. Trabajos posteriores relacionados con la emisión y fijación de tetrasporas (Pueschel 1979) recogieron que la emisión de este mucílago "de fijación" tiene lugar a medida que las esporas se liberan de la sustancia mucilaginosa que las envuelve durante la emisión de las mismas. En medios sólidos, la desaparición o disipación de las sustancias mucilaginosas parece estar limitada, debido a los propios condicionantes del medio.

En esta línea, también es posible considerar que las carposporas al ser obtenidas de forma diferente (destrucción del explanto frente a liberación espontánea) tuvieran distintos grados de maduración. En un experimento paralelo, seguimos el método de liberación espontánea en medios líquidos y se demostró que también las esporas, así liberadas espontáneamente, se fijaban al fondo de la placa.

En definitiva, esto es una nueva prueba de que la solidificación del medio (característica física del medio de cultivo) afecta al desarrollo de las

carposporas, de igual manera que, ya se había demostrado para los fragmentos de talo de macroalgas de Laurencia sp., Gelidium versicolor, Gracilaria ferox y G. verrucosa (Robaina 1988, Robaina et al., 1990a, Robaina et al., 1992).

Gracias a la enorme ventaja que nos aporta el sistema de propagación de carposporas asépticas de G. doryphora y a la importancia del tema se realizará, en el futuro, el estudio detallado de este fenómeno.

III.4.2 CULTIVO Y PROPAGACION HASTA LA OBTENCION DE TALOS.

En la Figura III.2 se muestra los tiempos y el material de partida necesario para el establecimiento de cultivos stock de talos de G. doryphora. En definitiva de lo que se trata es que partiendo de carposporas asépticas, con los beneficios ya comentados, se propague a medios líquidos donde se obtendrán talos de la fase tetrasporofítica. Estos talos crecen con aspecto aparentemente normal, si los comparamos con los que se encuentra en la Naturaleza, pero con la particularidad de que se trata de un material de procedencia controlada (fase del ciclo, edad) y mantenida durante largos periodos de tiempo en condiciones conocidas en nuestro laboratorio, lo que constituye un material adecuado para estudios fisiológicos, morfológicos, etc..

Figura III.2 Cultivo y desarrollo "in vitro" del alga roja Grateloupia doryphora desde la emisión de carposporas y tetrasporas hasta la obtención de talos gametofíticos y tetrasporofíticos.

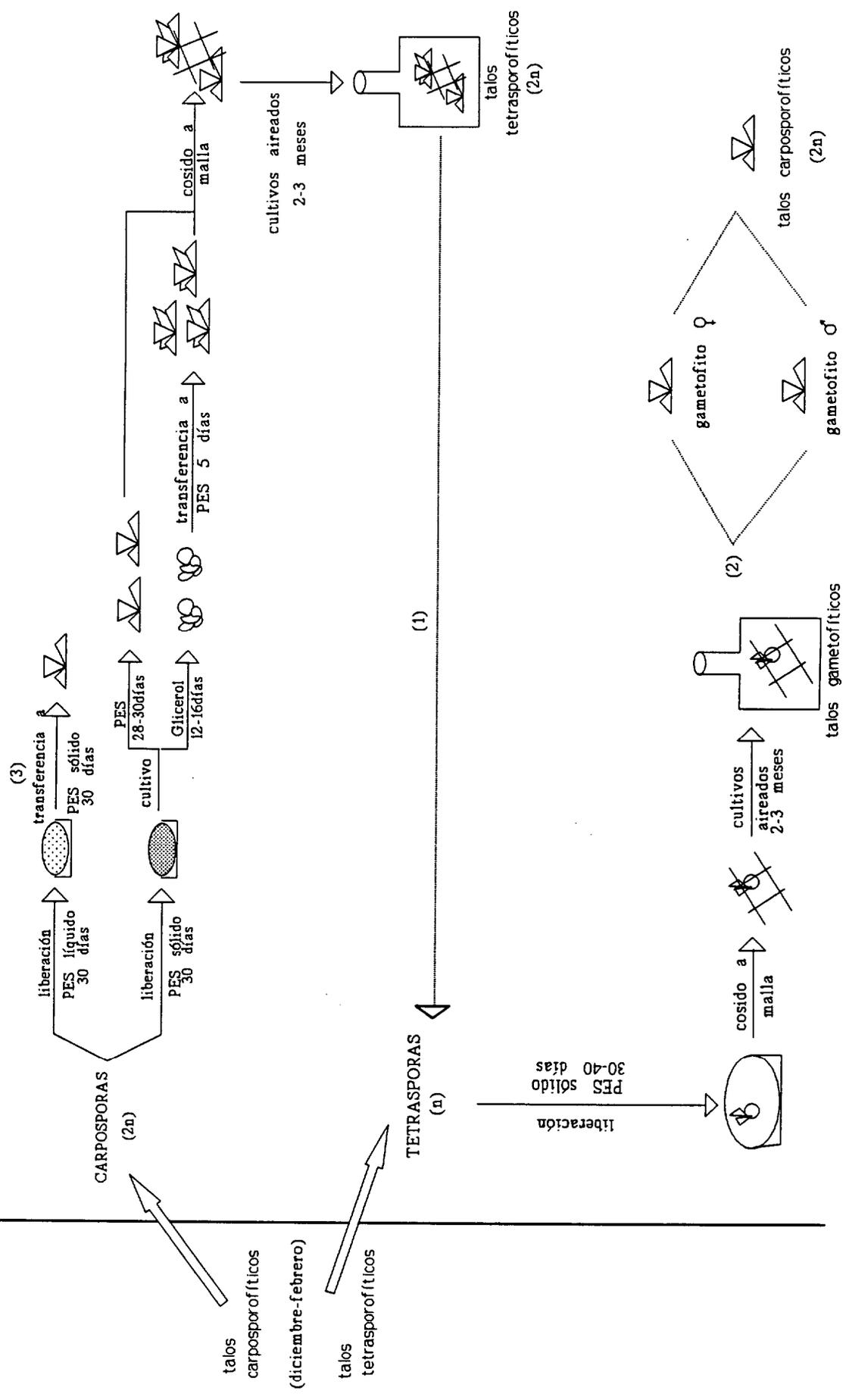
Los números, a su vez, indican futuras líneas de actuación:

- (1) completar el ciclo en el laboratorio, induciendo la emisión de tetrasporas a partir de talos tetrasporofíticos cultivados "in vitro".
- (2) identificar tanto los talos gametofíticos masculinos como los femeninos y permitir la regeneración de talos carposporofíticos independientemente de la población natural.
- (3) conocer qué factores actúan favoreciendo la emisión de rizoides (fijación en la placa Petri en medios líquidos) o inhibiéndolos (transferencia a medios sólidos).

Interacciones entre la posible ausencia de la pared celular y las características de los medios de cultivo.

NATURALEZA

CULTIVO EN LABORATORIO



Es de destacar que las carposporas asépticas pudieron ser propagadas hasta la obtención de talos, los cuales crecen en condiciones no asépticas. Este cambio no provoca el crecimiento desmesurado de los contaminantes en el medio de cultivo, como es habitual en la propagación en el laboratorio de macroalgas recolectadas en la naturaleza. Por lo que se aumenta la viabilidad del cultivo stock al utilizar carposporas.

La posible contaminación podría venir dada por el sistema de aireación, hecho que nunca hemos observado, o por el medio de cultivo, en cuyo caso hay que asegurarse de la esterilidad del mismo para mantener creciendo los cultivos durante años.

La asepsia de las carposporas no sólo ha supuesto un avance en cuanto a los aspectos comentados en el apartado anterior, sino también, una mejora en el desarrollo de las técnicas para el mantenimiento de algas "in vitro".

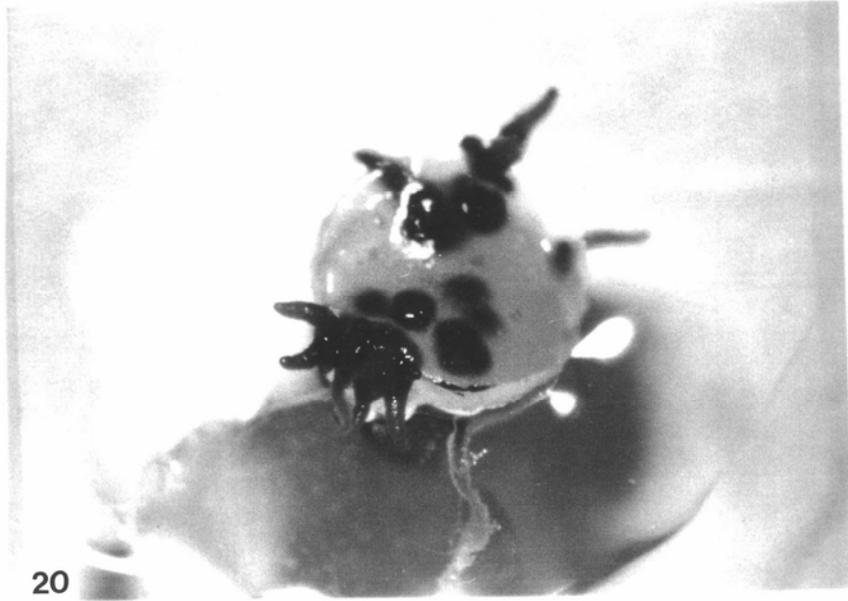
Estas servirán, a su vez, para la realización de trabajos de investigación básica en condiciones controladas, donde se puedan estudiar cuáles son los requerimientos necesarios para inducir el desarrollo de las tetrasporas y por supuesto completar el ciclo de vida de esta alga roja en el laboratorio (Figura III.2).

La obtención de talos "in vitro" no sólo es aplicable a las carposporas y por consiguiente a los talos tetrasporofíticos. En este sentido, hemos de decir que con estudios paralelos también hemos obtenido plantas gametofíticas, partiendo de explantos fértiles los cuales contenían tetrasporas, y sobre los que se desarrollaron pequeñas yemas (Foto III.20). Estos explantos terminaron decolorando y muriendo aunque sin perjuicio para los talos que sobre ellos se desarrollaban.

La cantidad de tetrasporas germinadas por explanto fue de 4 a 5, un número considerablemente inferior al obtenido con carposporas, aunque no conocemos si este hecho tiene algo que ver con el medio de cultivo o por el tratamiento de esterilización empleado.

Estos ensayos amplían el campo de estudios sobre este material, ya que, nos permite mantener por separado plantas tetrasporofíticas y gametofíticas y sobre ellas, estudiar aspectos tales como el número de gametofitos femeninos, la fecundación, obtención de talos carposporofíticos.

Foto III.20 Explanto conteniendo tetrasporas cultivado en medio PES sólido.
x60.



20

III.4.3 ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS PRETALOS EN MEDIOS PES.

La inexistencia de referencias previas en las que se describa la estructura de los pretalos en algas rojas y en particular en G. doryphora nos impiden realizar un estudio comparativo con datos de otros autores.

De los aspectos más resaltables de los pretalos, tanto a nivel óptico como al electrónico, cabe destacar la existencia de diferentes tipos celulares y algunas características celulares que se habían recogido previamente en referencias acerca de la carposporogénesis.

La existencia de los distintos tipos de células (Foto III.10) indicarían la posibilidad de que las mismas puedan desempeñar distintos papeles fisiológicos con incidencia en el futuro desarrollo del talo. El hecho de que las células más internas de estos pretalos lleguen a conformar la capa medular de las yemas que emiten los mismos, mientras que, simultáneamente las del exterior conforman una capa cortical, así parece indicarlo del pretalo. En el capítulo sobre los efectos del glicerol abordaremos las diferencias entre los distintos tipos celulares de los pretalos.

Aunque no son plantas vasculares y por lo tanto no existen tejidos diferenciados si hay una organización en el talo que recuerda a la de la hoja de la planta vascular, con un tejido en empalizada con células fuertemente empaquetadas, que sería la zona cortical y un tejido lagunar que sería la zona medular de células multiformes y con amplios espacios intercelulares (Barceló-Coll *et al.*, 1983).

En cuanto a las características celulares, la ultraestructura de los pretalos cultivados en medios PES muestran cierta similitud con la recogida en estudios realizados con carposporas procedentes de otras algas rojas.

El aparato de Golgi consta de las caras Cis y Trans. En la cara Cis o de formación se encuentran las vesículas de transición, mientras que, en la cara Trans o madura se encuentran las vesículas de Golgi y las *cored vesicles* de la carposporogénesis y la tetrasporogénesis, y en algunos casos aún en los primeros estadios de desarrollo tras la liberación de las esporas donde juegan un papel en la adhesión de las mismas (Tsekos 1983, 1985).

Nuestros resultados demuestran que las *cored vesicles*, que han sido sólo descritas en la formación de las esporas (Tsekos 1981), se mantienen en los pretalos de 1 mes de edad (Foto III.12). El hecho de que se presenten en carposporas que no se fijan indican que no sólo deben participar en la adhesión al sustrato. En cualquier caso, las diferencias que promueve el cultivo de carposporas en medios sólidos y líquidos permitirá la investigación del papel de las *cored vesicles* en los eventos post-liberación de las carposporas de *G.doryphora*.

La asociación entre los granos de almidón y los cloroplastos (Fotos III.13) parece ser un hecho habitual que ha sido ya descrito en diferentes especies de algas. (Gantt & Counti 1965, Brown & Weier 1970, Kugrens & West 1972, Peyriere-Eyboulet 1972, Simon-Bichard-Breud 1972, Scott & Dixon 1973, Konrad-Hawkins 1974, Alley & Scott 1977, Triemer & Vasconcelos 1977, Wetherbee & West 1977).

Estas asociaciones podrían representar zonas de síntesis y degradación del almidón si consideramos que éste se sintetiza fuera del cloroplasto en algas rojas y por consiguiente su degradación también ocurriría en el citoplasma.

Características de las yemas (ejes de crecimiento).

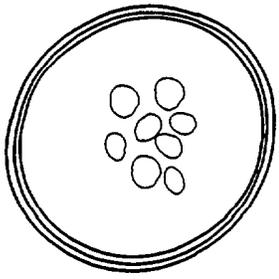
La formación de las yemas es el último suceso en el desarrollo de los pretalos.

En plantas superiores, la formación de yemas es bien conocida, mientras que, en plantas inferiores el proceso ha sido descrito en musgos (Schnepf 1982) y en el alga parda filamentosa Sphacelaria furcigera (Burns et al., 1982a,b), caracterizándose en ambos casos por la aparición de una protuberancia en la pared celular de la célula apical, la cual origina, a su vez, 2 células hijas; una de ellas constituirá la primera célula de la yema, mientras que, la otra seguirá formando parte del eje principal.

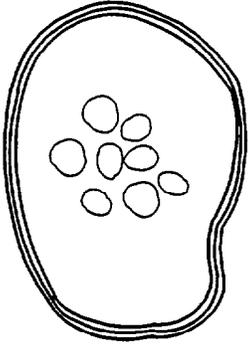
Sin embargo, no tenemos constancia de bibliografía relacionada con la formación de estos ejes de crecimiento en macroalgas del tipo de G. doryphora.

Observamos que el inicio de una yema o eje de crecimiento sobre un pretalo tiene lugar entre los 15 ó 20 días de cultivo del mismo. Durante este periodo las diferentes capas celulares convergen hacia el lugar donde se ha producido la protuberancia y a lo largo de 2 ó 3 meses más se culmina la elongación de la yema con la formación de las capas cortical y medular. Esta última estará conformada por las células internas del pretalo las cuales han sufrido sucesivas elongaciones y bifurcaciones. Las células más internas del pretalo parecen ser las responsables del crecimiento y el desarrollo del futuro talo. Cualquier alteración en la capacidad de crecimiento del pretalo (p.e. la adición de una fuente de carbono) debería incidir sobre este tipo de células. En la Figura III.3 se muestra cómo podría ocurrir la formación y desarrollo de las yemas en pretalos cultivados en medios PES.

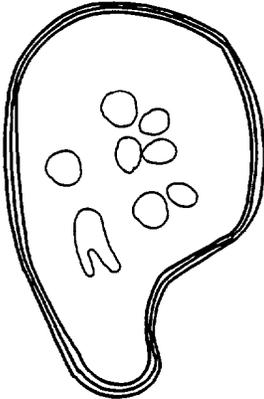
Figura III.3 Hipótesis sobre la formación de las yemas en Grateloupia doryphora. Se ha simplificado el contenido celular y número de células dejando sólo aquellas que intervienen en el proceso.



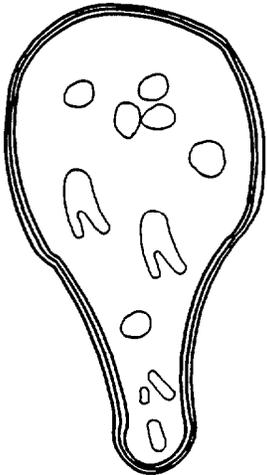
INICIO
FORMACION
YEMA
15-20 dias



ELONGACION
YEMA
+20-30 dias



FINALIZACION
FORMACION
YEMA
+30-35 dias



El inicio de la formación de la yema parece estar favorecido por la acumulación de almidón vista histoquímicamente (Foto III.19). Estos acúmulos desaparecen cuando la yema ha quedado constituida.

La bibliografía recoge ejemplos donde la acumulación de almidón lleva aparejada la elongación celular y la emisión de yemas (Thorpe & Murashige 1970, Ross & Thorpe 1973, Brown *et al.*, 1979). Este hecho, recogido en callos de tabaco, puede ser correlacionado con nuestras observaciones sobre los pretalos de G. doryphora.

El problema radica en distinguir cuál sería el papel del almidón, si la reserva de carbono y energía necesaria para el crecimiento o también, cómo se ha sugerido, regulador osmótico del proceso de la elongación celular que ocurre durante la formación de las yemas, es decir, el inductor de las yemas.

El efecto del almidón será mejor entendido con material cultivado en medios conteniendo una fuente de carbono como el glicerol, ya que, ésta proporciona carbono y energía lo que haría innecesaria la acumulación del primero en la formación de las yemas.

**IV. INFLUENCIA DE LA LUZ EN LA UTILIZACION DEL
GLICEROL POR Grateloupia doryphora EN CONDICIONES DE
CULTIVO.**

IV.1 INTRODUCCION

La presencia del glicerol y la repercusión que éste tiene sobre el crecimiento ha sido recogida en numerosas ocasiones, destacándose siempre que la respuesta del alga a esta fuente de carbono es específica, sin que, se haya presentado ningún caso similar, con otro sustrato orgánico, ni en las mismas condiciones experimentales (intensidad de luz, fotoperiodo) ni de concentración (Fries 1973, Robaina *et al.*, 1990b, Lewitus *et al.*, 1991).

No obstante, y de igual forma que ocurre con otras fuentes de carbono, ha sido descrita la limitación del crecimiento por efecto de las interacciones del glicerol y la luz. Este es el caso de *Pyrenomonas salina*, que cultivada a concentraciones de glicerol muy superiores a las normales, vio limitada su crecimiento como resultado de la inhibición de la síntesis de carotenoides (Harris & Kirk 1969) y de la fijación del CO₂ (Hase 1971).

El conocimiento del metabolismo del glicerol ha quedado relegado a los estudios realizados sobre bacterias y plantas superiores. En estos casos, parece existir una fosforilación previa del glicerol, usando ATP, para dar lugar al glicerofosfato el cual se introduce en el metabolismo de estos organismos.

El crecimiento heterotrófico a expensas del glicerol ha sido demostrado en varias algas, desde la *Cryptophyta Chromonas salina* (Antia *et al.*, 1969) hasta la *Chlorophyta Prototheca zopfii* (Barker 1936) pasando por las algas rojas unicelulares donde se han recogido casos de aumento del crecimiento por la adición de glicerol en presencia de luz en *Goniotrichium elegans* (Fries 1973) y en *Porphyridium cruentum* (Cheng & Antia 1970).

La aplicación de la metodología del cultivo de tejidos a las macroalgas tal y como se ha desarrollado para plantas superiores no es del todo

factible (Polne-Fuller & Gibor 1984, Polne-Fuller *et al.*, 1984, Bradley & Cheney 1986, Polne-Fuller *et al.*, 1986, Saga *et al.*, 1986, Chen 1987, Liu & Gordon 1987). La experiencia acumulada en los intentos de inducir y controlar el desarrollo celular de las macroalgas ha permitido constatar la ineficacia de los reguladores del crecimiento de naturaleza química frente a un fuerte efecto de las características físicas y ambientales del medio de cultivo sobre el crecimiento y el patrón de desarrollo de las macroalgas (Ramus 1972a, Fries 1980, Saga & Sakai 1983, Lee 1985, Bradley & Cheney 1986, Polne-Fuller & Gibor 1987, García-Reina *et al.*, 1988).

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 *et al.*, 1990a,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 *et al.*, 1990a,b).

El glicerol además combina el efecto de fuente de carbono con el efecto osmótico que induce la morfogénesis. Los valores del índice n° de yemas: n° de explantos en medios conteniendo glicerol son considerablemente superiores a los presentados en medios sin esta fuente de carbono (Robaina *et al.*, 1990b).

Los resultados obtenidos con el cultivo de explantos en medios conteniendo glicerol demostraron que esta fuente de carbono no tenía ningún efecto sin la presencia de luz (Robaina *et al.*, 1990b). Estos datos coinciden con los encontrados posteriormente en Pyrenomonas salina (Lewitus & Caron 1991a).

Los explantos sembrados en régimen de oscuridad y de luz exhibieron claras diferencias en la respuesta a la fuente de carbono. En oscuridad, éstos permanecieron en el mismo estado en el que fueron sembrados, mientras que, la respuesta en luz fue el incremento del crecimiento normal en estos medios. Los explantos crecidos en glicerol mostraron, a los 25 días en cultivo, un aumento en el peso fresco (400%) y un alto valor del índice morfogenético (Robaina 1988, Robaina *et al.*, 1990b) frente a los explantos procedentes de PES.

Otras fuentes de carbono como galactosa, glucosa y manosa no promovieron ni el crecimiento ni la morfogénesis (Robaina *et al.*, 1990b).

No se han encontrado referencias en las que se destaque un efecto similar de otra fuente de carbono sobre el crecimiento de las macroalgas. Tampoco se han descrito efectos sobre la tasa de propagación de un alga en cultivo de tejidos como el demostrado para el glicerol ni se han utilizado medidas de crecimiento que permitan la cuantificación del fenómeno.

Otra característica importante del cultivo, tanto en medios sólidos como líquidos, es el aspecto de los explantos al cabo de un tiempo. A los 16 días de sembrados, el material comienza a depigmentarse sin que se observe la emisión de sustancias o la alteración de las propiedades del medio.

Las características del crecimiento de los explantos en medio conteniendo glicerol sólo se explican si el glicerol es utilizado como fuente de carbono. El glicerol actuaría como una fuente de carbono que permite una alta tasa de propagación vegetativa, y además, canaliza el crecimiento hacia un patrón morfogenético (Robaina 1988).

La necesidad de la luz para la observación del efecto morfogenético del glicerol, y otras fuentes de carbono en macroalgas en cultivo, sugieren un papel fotomorfogenético de la luz. Este efecto ha sido relacionado con el control

del metabolismo celular (Lunning 1980) y cuyos efectos se traducen en la aparición de estructuras vegetativas mediadas por acción de la cantidad y calidad de luz (Dring & Lunning 1985).

A nivel de flujo de carbono existe la hipótesis de que la luz regula la síntesis del floridosido (Macler 1986), tanto durante la fotosíntesis como a partir de los polisacáridos de reserva, y que contribuye como elemento central al metabolismo de los hidratos de carbono en algas (Reed 1985).

Para caracterizar el papel de la luz en los cultivos de *G. doryphora* nos cuestionamos a qué nivel fisiológico podríamos medir el efecto de la misma cuando el alga se encuentra en medios con glicerol. Podría suceder que la presencia de glicerol aumentara la fotosíntesis, de ahí su relación con la luz y los efectos sobre el alga.

La bibliografía consultada muestra que no siempre hay una relación entre fotosíntesis y crecimiento, ya que, pueden existir plantas con valores idénticos de fotosíntesis pero que crecen a diferentes tasas (Walker 1987). Esto se explica porque los productos fotosintéticos formados se pueden desviar hacia el mantenimiento de las plantas (p.e. pigmentos), lo que se contabilizaría como una pérdida de peso del material vegetal.

En el alga parda *Laminaria solindungula*, procedente de ambientes árticos (Chapman & Lindley 1980, Dunton 1985, Geider & Osborne 1992), las reservas de carbohidratos (laminarian) aumentan en verano cuando la luz está aún disponible. Sin embargo, el crecimiento se registra en invierno a expensas de los carbohidratos almacenados pero cuando los niveles de luz son bajos.

Para que una fuente de carbono aumente la capacidad de crecimiento debe aportar carbono y energía extra, lo que implica necesariamente a la respiración. La tasa de respiración, considerada como toma de oxígeno o liberación de CO₂, se relaciona directamente con el crecimiento (respiración de

crecimiento y respiración de mantenimiento). Esto permitió considerar a la respiración como la mejor medida para manifestar el crecimiento.

Al tiempo, el posible efecto de la luz sobre la respiración del glicerol nos introduce en el campo de las interacciones entre luz, fotosíntesis y respiración (en luz y oscuridad).

El objetivo de este trabajo fue conocer hasta qué punto la respiración del glicerol por el alga roja *Grateloupia doryphora* estaba modulada por la luz.

Para ello, realizamos medidas de intercambio gaseoso (CO_2 y O_2) utilizando medidas de polarimetría y radiactivas.

Caracterizamos si la luz tenía un efecto fotosintético y tratamos de elucidar qué efecto tenían las diferentes calidades de luz sobre la respiración.

IV.2 MATERIAL Y METODOS

Las medidas de intercambio de oxígeno que pretendíamos realizar para cuantificar la respiración del alga requerían una cantidad aproximada en peso fresco de 16 g por día de experimentación. Considerando los experimentos a realizar, las distintas variables, sus repeticiones y que cada explanto aséptico pesa unos 3 mg, necesitaríamos de aproximadamente 5500 explantos por experimento.

La alternativa consistió en simular las condiciones de cultivo, a la misma temperatura e intensidad de luz, pero con material recolectado en la costa y tratado adecuadamente, lo que permitió un considerable ahorro de tiempo.

Para el uso de este material consideramos:

- 1.- la necesidad de un cierto periodo de incubación para que el glicerol penetre en la célula y sea metabolizado.

El material cultivado está en permanente contacto con el glicerol y la luz. Por el contrario, en la naturaleza, no existen las concentraciones de glicerol externas de 0.1-0.3 M que usamos en el cultivo.

Con la puesta a punto del método espectrofotométrico del MBTH (cloruro de metil 2 benzotiazolinona hidrazona) (Johnson *et al.*, 1981) se determinó la absorción de glicerol, midiendo la retirada del medio. Para ello el material (0.18 g de peso fresco de alga) era incubado en un volumen de 1 ml de medio conteniendo glicerol, en condiciones de luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y oscuridad, a distintos tiempos y finalmente calculado el porcentaje de desaparición de la fuente de carbono. El ensayo fue repetido 3 veces con 3 réplicas cada una de ellas.

De esta forma comprobamos que la absorción de esta fuente de carbono era del 85 al 90% al final de las 2 horas independientemente de que las condiciones fueran de luz u oscuridad.

De la bibliografía revisada creemos importante reseñar dos puntos:

a.- la absorción de los diferentes sustratos orgánicos examinados, tales como, glucosa y glicerol, se puede realizar tanto en presencia de luz como de oscuridad sin que por ello haya alteraciones.

b.- se pone de manifiesto que es necesaria una fase de adaptación previa para alcanzar la máxima absorción.

En microalgas existen casos bien estudiados donde se ponen de manifiesto uno o varios tipos de transportadores. Es el caso de Chlamydomonas sp. (Bennet & Hobbie 1972), Chlorella vulgaris y C. fusca (Tanner et al., 1970), Navicula pavillardii (Lewin & Hellebust 1976), Ankistrodesmus braunii (Bollman & Robinson 1985) y Oscillatoria rubescens (Feuillade & Feuillade 1989) las cuales poseen un sistema de transporte, en contraste por ejemplo con, A.braunii y Scenedesmus que toman la glucosa espontáneamente (Tanner et al., 1970). Para otras como Bractaeococcus minor, Sheath & Hellebust (1974) demostraron la existencia de 2 sistemas de utilización de la glucosa, uno constitutivo, con baja afinidad por el sustrato y otro regulado por la luz, con un transporte de alta afinidad. Podemos considerar también a Pediastrum duplex, un alga verde de la familia *Hydrodictyaceae* capaz de absorber distintos tipos de compuestos orgánicos, como acetato, glucosa y glicerol entre otros.

En macroalgas marinas, el estudio realizado por Markager & Sand-Jensen (1990) sobre Ulva lactuca demuestra la importancia del acetato y la glucosa como sustratos orgánicos para el crecimiento y mantenimiento de U. lactuca en oscuridad o a bajas intensidades, sin embargo, no caracterizan el tipo de transporte para ambos sustratos. Markager & Sand-Jensen asumen la existencia de dos transportadores (Droop 1974), uno por simple difusión y donde

U. lactuca es fisiológicamente heterotrófica y otro por un proceso activo desconocido.

Asimismo, el tiempo que mantengan en contacto con la fuente de carbono permitirá que la absorción sea más eficaz. Así para **Chlamydomonas** sp., Bennet & Hobbie (1972) recogieron que la máxima actividad de absorción de la glucosa fue inducida después de 48 horas. También en células de **Euglena** (Nicolas *et al.*, 1980) es necesaria una fase de adaptación cuando son transferidas a medios conteniendo glucosa.

Las variaciones en las tasas de absorción obtenidas en microalgas no están afectadas por las condiciones de luz y oscuridad. No obstante, la enorme diversidad encontrada en las tasas se deben fundamentalmente al tipo de ensayo experimental desarrollado. Los cultivos de microalgas son tomados en distintas fases del crecimiento (Berman *et al.*, 1977). Además las capacidades de absorción pueden ser muy diferentes para un mismo organismo dependiendo de su estado nutricional (Law *et al.*, 1976) o de su medio ambiente.

2.- la depigmentación del material en cultivo tiene lugar a los 12-16 días.

Es posible que en las condiciones de cultivo, el alga varíe su modo de nutrición de autotrófico a heterotrófico, lo que permitiría el uso del glicerol tras cierto tiempo (días) en contacto con el mismo.

Para valorar el status nutritivo de **Grateloupia doryphora** y su influencia sobre la capacidad heterotrófica del alga sometimos al material a tratamientos con incubaciones en oscuridad, luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y nitrógeno (nitrato sódico, 70 mg l^{-1}) y evaluamos la concentración de proteínas, ficobiliproteínas y clorofila a, así como, las distintas tasas respiratorias en los diferentes tratamientos (Tabla IV.1).

El material recolectado en el día fue llevado al laboratorio y tras los protocolos de limpieza, parte era empleado en la determinación de proteínas, ficobiliproteínas y clorofila a. Otra parte, destinada a los tratamientos que conducían a la determinación de las tasas respiratorias ($T_{\text{día recogida}}$) y el material restante fue incubado durante 10 días en oscuridad y agua de mar esterilizada, con aireación continua y renovado diario del medio. Transcurrida esta etapa, se tomó el material para determinar la concentración de proteínas, ficobiliproteínas y clorofila a, además de las tasas ($T_{10 \text{ días oscuridad}}$).

La siguiente fase consistió en fraccionar el material e incubarlo durante 4 días en 2 tratamientos diferentes:

- luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y nitrógeno (70 mgr l^{-1})
- luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Completadas estas incubaciones, se determinaron las nuevas concentraciones en proteínas, ficobiliproteínas y clorofila a y las tasas respiratorias en los tratamientos de luz y nitrógeno (T_{L+N}) y luz (T_L).

Tabla IV.1 Tasas de consumo de oxígeno en valor absoluto ($\mu\text{molO}_2 \text{ mgChla}^{-1} \text{ h}^{-1}$) en medios SW y SW 90-Gli, así como, concentración de ficobiliproteínas, clorofilas y proteínas de un material sometido a tratamientos de oscuridad, luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y nitrógeno (nitrato sódico 70 mg l^{-1}).

Tratamientos	Consumo de O ₂		Ficobiliproteínas (mg g ⁻¹ p.f.)	Clorofilas (mg g ⁻¹ p.f.)	Proteínas (mg g ⁻¹ p.f.)
	SW	SW90-gli			
Sin tratamiento	55.42±11	97.72±19	0.210	0.019±7x10 ⁻⁴	2.00
10 días osc.	55.84±9.0	71.54±3.0	0.065	0.014±10 ⁻⁴	1.40
10d.osc.+4d.luz	62.29±6.0	59.23±3.0	---	0.001±4x10 ⁻⁵	1.46
10d.osc.+					
4 d.(luz+NaNO ₃)	52.50±14.0	99.10±16.0	0.094	0.006±10 ⁻⁴	1.94

La luz y el nitrógeno pueden simultáneamente limitar el crecimiento tanto de macroalgas (Lapointe & Duke 1984) como en microalgas (Rhee & Gotham 1981) aunque algunas de ellas tienden a consumir y almacenar nitrógeno durante los periodos de alta disponibilidad (Chapman & Craigie 1977, Rosenberg *et al.*, 1984, Fujita 1985).

Ambos controlan directamente las tasas de crecimiento (Goldman & Gilbert 1983, Lapointe & Tenore 1981) y por consiguiente el nivel de pigmentos (Ramus *et al.*, 1976) que a su vez podría afectar a la capacidad fotosintética del alga (Ramus *et al.*, 1976, Lapointe & Tenore 1981).

La luz estimula la absorción de nitrógeno ejerciendo una acción directa sobre la actividad de la nitrato reductasa (NR) (Azuara & Aparicio 1983, 1985, Maldonado & Aparicio 1987).

Las deficiencias de otros nutrientes tales como fósforo y azufre contribuyen a acrecentar los efectos manifestados por la falta de nitrógeno cuando interaccionan entre ellos (Konopka & Schnur 1981, Lewitus 1990).

El efecto más inmediato de la deficiencia de nitrógeno en algas es la disminución de los pigmentos fotosintéticos (ficobiliproteínas y clorofilas) (Allen & Smith 1969, de Loura *et al.*, 1987, Falkowski *et al.*, 1989, Herzig & Falkowski 1989, Plumley & Schmidt 1979, Plumley *et al.*, 1989, Turpin 1991), así como, de proteínas (Horrum & Schwartzbach 1980, Konopka & Schnur 1981, Lapointe & Tenore 1981, Macler 1986, 1988, Levy & Gantt 1990, Turpin 1991).

Se han constatado, también, disminuciones en las concentraciones de ficocianinas en respuesta a la reducción de P en las *Cyanophyceae* *Merispodemia tenuissima* (Konopka & Schnur 1981) o *Anacystis nidulans* (Stevens *et al.*, 1981, Konopka & Schnur 1981) y en las *Cryptophyceae* *Pyrenomonas salina* (Lewitus 1990) o *Agmenellum quadruplicatum* (Stevens *et al.*, 1981, Lewitus & Caron 1990).

La deficiencia de nitrógeno no sólo causa disminuciones de las ficobiliproteínas, clorofilas y proteínas, sino que, también afecta a otras reacciones (Smith *et al.*, 1989, Vanlerberghe *et al.*, 1992).

Levy & Gantt (1990) con *Porphyridium purpureum* (*Rhodophyta*) demostraron la disminución de las tasas respiratorias afectadas por la deficiencia de nitrógeno. Estas tasas pudieron ser recuperadas con la adición de nitrato potásico (0.01M) y fueron las mismas a 1, 2 y 4 días después de la adición.

El metabolismo del carbono y la fotosíntesis están íntimamente relacionados (Turpin *et al.*, 1988). También son conocidas las interacciones entre la asimilación del nitrógeno inorgánico con la fotosíntesis y el metabolismo del carbono. Además muchas de estas interacciones están mediatizadas por los procesos respiratorios.

La incorporación de nitrógeno en aminoácidos requiere la vía de la glutamina sintetasa/ glutamato sintasa (GS/GOGAT). La consecución de esta vía resulta en la producción de glutamato (Turpin & Harrison 1979, Cullimore & Sims 1981, Syrett 1981, Zehr & Falkowski 1989, Turpin 1991). La síntesis de glutamato requiere el suministro de 2-oxoglutarato. La síntesis de otros aminoácidos necesita de distintos intermediarios del ciclo respiratorio.

El ATP y poder reductor necesarios para la asimilación del nitrato son suministrados básicamente por la fotosíntesis. La capacidad para regular la producción de ATP y NADPH viene dada por el control ejercido sobre el flujo de electrones fotosintético (Williams & Allen 1987, Turpin & Bruce 1990). No obstante también se ha comprobado en *Selenastrum minutum* que el poder reductor obtenido en respiración es utilizado para soportar la reducción de NO_3^- a NO_2^- (Larsson *et al.*, 1985, Turpin & Weger 1989).

Determinación de proteínas.

Se siguió el método de Lowry (Micro Protein Determination, Sigma). La clorofila a fue estimada previamente sobre el mismo extracto, ya que, interfería en la medida con las proteínas (Harrison & Thomas 1988).

Determinación de ficobiliproteínas.

La extracción de las ficobiliproteínas se realizó en frío y en luz débil manteniendo una relación de 1 g de peso fresco de alga : 10 ml de tampón fosfato 0.3 M (pH 6.8-7.1). Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 3000 g durante 5 minutos y el sobrenadante utilizado en la determinación de las ficoeritrinas y las ficocianinas. Las concentraciones en mgr ml⁻¹ fueron determinadas atendiendo a las ecuaciones de Beer & Eshel (1985).

La valoración del status nutritivo de G. doryphora sirvió para comprobar que la capacidad de respirar el glicerol se mantiene únicamente cuando las condiciones nutricionales son las adecuadas y a falta de un status nutritivo apropiado el glicerol no se respira (Tabla IV.1).

Esto indica que G. doryphora no es heterótrofa ocasional, es decir, durante el periodo de cultivo no cambia de modo de nutrición, permitiéndonos utilizar, en estos experimentos, material no cultivado.

IV.2.1 MATERIAL VEGETAL

Las plantas de Grateloupia doryphora, utilizadas para las medidas de intercambio gaseoso, se caracterizaban por poseer una alta pigmentación y un bajo grado de epifitismo. En el momento de la recogida no mostraban ningún tipo de estructuras reproductoras.

Una vez trasladadas al laboratorio, se sometían al proceso de limpieza ya descrito y se mantenían en agua de mar continuamente aireada, a temperatura ambiente y baja intensidad de luz (aproximadamente $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante todo el periodo de experimentación.

Debido a que el estado fisiológico de las algas podía variar (Ramus & Rosenberg 1980, Zupan & West 1990, Matta & Chapman 1991), las recolecciones y experimentos se programaron de tal forma que la utilización del material comenzaba, ya bien, en el mismo día ó a las 24 horas y no duraba más de 5 días. Cuando era imposible realizarlos en una misma jornada se realizaba un ensayo control que permitía normalizar todos los valores obtenidos en los distintos días.

En estas condiciones, las tasas fotosintéticas de G. doryphora podían variar del 80 al 100% entre las recogidas en el primer día y las del sexto día. Paralelamente, se comprobó que las tasas de liberación de oxígeno variaban incluso en el mismo día.

Así en las primeras horas de la mañana, los valores de las tasas de fotosíntesis recogidas eran de $198.4 \pm 3.5 \mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cl}_a^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que, con una diferencia de 7 horas, la disminución era cerca del 40% ($79.36 \pm 1.9 \mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cl}_a^{-1} \text{ h}^{-1}$). Estos valores se obtuvieron como la media de 20 experimentos.

IV.2.2 MEDIDAS DE INTERCAMBIO DE OXIGENO.

Los métodos más usuales para medir las concentraciones de oxígeno disuelto son los de Winkler y los polarográficos (electrodos de oxígeno).

El método de Winkler necesita de prolongadas incubaciones para su resolución, lo que conlleva tanto problemas de saturación de oxígeno como de contaminación bacteriana (Arnold & Littler 1985). Esta última cuestión se ve agravada por el hecho de que nuestros ensayos debieron ser llevados a cabo en medios conteniendo glicerol.

Los electrodos de oxígeno, por el contrario, tienen la ventaja de suministrar lecturas continuas e instantáneas (Langdon 1984). Además el desarrollo reciente de los microelectrodos (Revsbech 1983, Revsbech & Ward 1983) ha permitido un incremento en su precisión. Estos se utilizan en cultivos, tanto de microalgas como de talos de macroalgas, los cuales tienen una elevada biomasa en relación al volumen del medio.

Actualmente, los electrodos se caracterizan por tener una membrana protectora que los separa del medio de incubación (Hitchman 1978, Grasshoff 1981). Este tipo de electrodos, conocidos como "tipo Clark", fueron diseñados con el propósito de soslayar los problemas asociados con la calibración del aparato y con la contaminación de las muestras por efecto de la propia corrosión que puedan padecer.

El electrodo de oxígeno Orion modelo 97-08 se incluye dentro de este tipo Clark de electrodos cubiertos. Está constituido por un par de electrodos y un electrolito, conteniendo iones cloruro, separados de la muestra por la membrana permeable. El oxígeno difunde a través de la membrana y es reducido en el cátodo a iones hidroxilo. Los electrones requeridos para este proceso son suministrados por la reacción que ocurre en el ánodo. La corriente producida por

la reducción del oxígeno es transformada a un voltaje y recogida sobre un pH metro marca Crison modelo 506 cuya señal muestra la lectura en mg l^{-1} de oxígeno existente.

La calibración de los electrodos precisa de 2 puntos de referencia: una solución libre de oxígeno (0.00) y otra de agua saturada de oxígeno (100%) (Hitchman 1978).

Así para una presión de 1 atmósfera, salinidad de 35‰ y temperatura de 19 °C se ajustó a un valor absoluto de 8.0 mg l^{-1} según el Handbook of Chemistry and Physics (Weast 1981).

Para las medidas de desprendimiento de oxígeno, los medios de incubación fueron burbujeados con N_2 con el fin de reducir los niveles de oxígeno de 8.0 a 1.0 mg l^{-1} , evitando así, la formación de burbujas que se produce con niveles de oxígeno cerca de la saturación (Lapointe *et al.*, 1984, Brechignac & André 1984, Walker 1987).

Previo al registro de las medidas de intercambio de oxígeno, se realizaron experimentos para determinar el volumen del medio de incubación y el peso del alga que debían ser colocados en los recipientes donde se tomaban las medidas de la cantidad de oxígeno disuelto (Dawes 1981).

El electrodo Orion y sus accesorios están diseñados para un volumen máximo de 300 ml. Sin embargo, debido a la enorme cantidad de biomasa que esto suponía, se hizo necesario reducir este volumen final.

A lo largo de 90 experiencias, intentamos ajustar la relación de peso del alga a un volumen de incubación menor, encontrándose buenas medidas con 1.6-2.0 g de peso fresco de alga en un volumen de 70 ml.

Para la ejecución de las medidas, el alga debió ser troceada y los medios agitados correctamente (Littler & Arnold 1979). Esto permitió evitar los posibles problemas de autosombreado y de gradientes de difusión.

Todos los ensayos fueron realizados a una temperatura de 19 °C controlada gracias al flujo de agua establecido entre el baño y el criostato. La intensidad de luz fue de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ suministrada por una lámpara halógena (Unomat LX 650 GS MP) y ajustada en el interior del baño con un LiCor Quantum meter 1800 u.w.

Todos los experimentos fueron realizados incubando previamente el material vegetal en medios conteniendo glicerol (SW 90-gli) y en agua de mar (SW) respectivamente durante 2 horas.

Consideramos que la absorción de la fuente de carbono requiere de un cierto tiempo, ya que, el alga no es capaz de tomar el glicerol de forma inmediata. También nos cuestionamos, si durante este periodo, los niveles de oxígeno existentes podían verse alterados por el desarrollo de algún tipo de contaminación en los medios.

Con esta finalidad, se realizaron controles consistentes en tomar una cantidad aproximada de 5 g de peso fresco de alga en un volumen de 70 ml de medio, con y sin glicerol respectivamente, y sometidos a un baño de ultrasonidos durante 1.5 minutos (3 veces) sin realizar cambios. El ultrasonido permitía el desprendimiento de bacterias y hongos, así como, fragmentos de otras algas que se encontraban adosadas al talo. Transcurrido el baño, las algas se extraían con ayuda de unas pinzas quedando este "medio" dispuesto para la medida.

Los valores de fotosíntesis y respiración recogidos en estos "medios" no superaron, en ninguna de las ocasiones, el 1% de las tasas normales.

La presencia del glicerol, como un agente osmótico, supuso ajustar la osmolalidad del SW 90-gli a la que posee el agua de mar (1 Os kg^{-1}). La

disminución de la osmolalidad del agua de mar por la adición de agua destilada, implica a su vez, una dilución de la salinidad presente (Robaina *et al.*, 1990a). En este rango de fluctuación (35-30 ‰), las tasas fotosintéticas no se vieron afectadas.

Las medidas de intercambio de oxígeno se vieron afectadas por la adición de fuentes de carbono, ya que, una concentración de 0.3 M de glicerol daba lugar a una serie de registros anómalos.

Esta cuestión fue subsanada al usar una concentración de glicerol inferior para la incubación y la medida (0.15 M) ó midiendo en ausencia de la fuente de carbono después de la incubación del alga en glicerol. En este caso, las tasas fotosintéticas fueron de 200.0 ± 2.0 y 198.4 ± 3.5 $\mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que, las respiratorias alcanzaron valores de 147.66 ± 1.3 y 151.0 ± 2.0 $\mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente.

Con estos resultados, interpretamos que ambas condiciones son igualmente válidas para distinguir el efecto específico del glicerol y la luz sobre la fotosíntesis y la respiración de G. doryphora.

IV.2.3 MEDIDAS DE INTERCAMBIO DE CO₂ .TASAS DE FIJACION Y RESPIRACION DEL GLICEROL.

Los isótopos radiactivos utilizados fueron los del H¹⁴CO₃ para la fijación del CO₂ y el glicerol marcado para la liberación del CO₂.

Las tasas fotosintéticas, medidas por liberación de oxígeno, en medios SW 90-gli fueron siempre muy inferiores a las presentadas en SW.

La medida del CO₂ fijado, mediante experimentos con bicarbonato radiactivo, trató de elucidar si la tasa de fijación en medios SW90-gli estaba

limitada o era debida simplemente a que la respiración en estos medios era elevada.

Las tasas de fijación fueron evaluadas en condiciones de luz, oscuridad y en la transición de luz a oscuridad.

Para su determinación, 1 g de alga fue incubada, bien a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ o bien en oscuridad, en 20 ml durante 2 horas a 19°C en medios conteniendo glicerol para permitir la absorción de la fuente de carbono.

Transcurrida esta etapa, el material fue trasladado a viales de cristal conteniendo 20 ml de medio sin glicerol (SW) para las medidas de las tasas de fijación. La razón fundamental de este cambio fue la dificultad para conocer cómo difunde el $^{14}\text{CO}_2$ en los medios SW 90-gli. Esta decisión fue tomada apoyándonos en los resultados obtenidos con las técnicas de polarimetría las cuales nos indicaron que no existía ningún tipo de variación en las medidas si incubamos en SW90-gli y medimos en SW.

La muestra incubada en 20 ml de agua de mar, a la misma temperatura y condiciones de luz u oscuridad ya descritas, fue puesta en contacto con el marcador radiactivo, $1.15 \mu\text{Ci}$ ($^{14}\text{C-NaHCO}_3$ $42.6 \text{ mCi mmol}^{-1}$, NEN England) durante 20 minutos.

Al final de esta incubación se determinó el ^{14}C inorgánico fijado en la fracción orgánica. La liberación del H^{14}CO_3 restante se realizó acidificando la muestra con HCl 5N (Schindler *et al.*, 1972).

El material vegetal debió ser previamente extraído antes de la realización del contaje (Beer *et al.*, 1982, Lewis *et al.*, 1982, Filbin & Hough, 1984). Para ello, se procedió a la extracción del $^{14}\text{CO}_2$ fijado introduciendo el alga en 10 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) durante 15 minutos.

Finalmente, se tomaron 3 réplicas de 0.5 ml de cada extracto radiactivo en DMSO y se mezcló con 4 ml de líquido de centelleo (fórmula 989,

NEN, Inglaterra). Las dpm's fueron registradas por un contador de centelleo marca Pharmacia Wallac 1410.

Los ensayos control fueron realizados con material incubado en agua de mar (SW) bajo las mismas condiciones experimentales.

El empleo de glicerol marcado permitió comprobar si existía liberación de $^{14}\text{CO}_2$ y con ello verificar que el consumo de oxígeno registrado por el método polarográfico era debido a la respiración del glicerol.

El material vegetal (100 mg de peso fresco) utilizado para esta comprobación fue previamente incubado en medios SW 90-gli durante 2 horas en un volumen de 2 ml en condiciones de luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u oscuridad y a una temperatura de 19 °C. El objetivo fue el mismo que en el caso anterior, es decir, permitir que la fuente de carbono penetrara en el alga.

Finalizada esta fase previa, la muestra se trasladó a viales de cristal, en las condiciones experimentales ya descritas, y se mantuvo durante 60 minutos en un medio de SW conteniendo $1 \mu\text{Ci}$ ($61 \mu\text{M}$) de glicerol marcado (^{14}C (u)-glycerol, $8.2 \text{ mCi mmol}^{-1}$, NEN, Inglaterra).

El *trapping* ó recogida del $^{14}\text{CO}_2$ liberado por la respiración del glicerol se realizó impulsando el aire desde el vial de incubación hacia otro adyacente el cual contenía el Solvable (solución de *trapping*, marca registrada, NEN, Inglaterra). Se añadió 4 ml de líquido de centelleo (fórmula 989, NEN, England) y se registraron las desintegraciones en un contador marca Pharmacia Wallac 1410.

Los ensayos control fueron realizados siguiendo el mismo procedimiento descrito, pero en ausencia de material algal. En su lugar se utilizó los fragmentos de otras algas adosadas al talo del alga en estudio, así como, las bacterias y los hongos desprendidos tras un baño de ultrasonidos a la que fue sometido G. doryphora.

IV.2.4 INTERCAMBIO GASEOSO EN LUZ.

Las tasas fotosintéticas, medidas como desprendimiento de oxígeno, de Grateloupia doryphora fueron estimadas tanto en agua de mar (SW, ensayo control) como en medios conteniendo glicerol (SW 90-gli) a las intensidades de luz de 100, 250, 350, 600 y 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El material, que estuvo previamente en contacto durante 2 horas, en sus medios respectivos, y a una intensidad de luz de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fue incubado durante 5 minutos en cada intensidad de luz.

Las tasas de desprendimiento de O_2 se obtuvieron durante 20 minutos en condiciones lineales. La pendiente resultante da una medida de la máxima eficiencia fotosintética (Walker 1987).

Todos los experimentos realizados en presencia del glicerol, mostraron que las tasas fotosintéticas siempre fueron inferiores a las presentadas en SW. Las medidas del CO_2 fijado, mediante experimentos con bicarbonato radiactivo, nos permitió valorar estos resultados de liberación de oxígeno obtenidos con la polarimetría.

Para determinar las tasas de fijación, muestras triplicadas de 1 g de material fresco, cada una de ellas, fueron incubadas según se describe en el apartado IV.2.3

El tratamiento empleado fue de:

- incubación en luz a 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y medida de la tasa de fijación a la misma intensidad (luz-luz).

La liberación del CO₂ marcado sirvió para verificar que el consumo de oxígeno obtenido a través del método polarográfico era la respiración del glicerol.

Las muestras (100 mg x 3 réplicas) fueron tratadas atendiendo a lo descrito en IV.2.3 pero considerando que las muestras fueron preincubadas en luz durante 2 horas y la liberación de CO₂ medida también en luz, durante 60 minutos (luz-luz), bajo las condiciones de intensidad de luz y temperatura descritas.

IV.2.5 INTERCAMBIO GASEOSO EN OSCURIDAD

Con el objeto de comprobar qué efecto tenían las incubaciones previas en luz sobre el consumo de oxígeno (respiración), las tasas respiratorias de G. doryphora fueron medidas en diferentes condiciones experimentales.

Aproximadamente 7 g de peso fresco (1.6 g x 4 réplicas) fueron troceados e incubados a distintos tiempos (0, 40, 120 minutos) en glicerol (0.15 M) y en tratamientos de luz (0, 100, 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Los correspondientes valores de respiración se tomaron a lo largo de 20 minutos en condiciones de linealidad.

Otro experimento fue realizado para evaluar durante cuánto tiempo la luz ejercía su influencia sobre el consumo de oxígeno (respiración) en el periodo de oscuridad subsiguiente.

En consecuencia, se obtuvieron las tasas de consumo de oxígeno en oscuridad a los 0, 8, 12 y 16 minutos de haber cesado el tratamiento con la iluminación (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El material había sido incubado previamente 120 minutos en luz y glicerol.

Los registros finales en cada tiempo se realizaron durante 10 minutos con el objetivo de mantener las condiciones de linealidad durante todo el ensayo.

Todos estos experimentos se realizaron utilizando como control el material vegetal mantenido en agua de mar.

Para conocer si el efecto de la incubación previa en luz sobre el consumo de oxígeno (respiración) era de tipo fotosintético, el material fue preincubado durante 120 minutos en una concentración de 10^{-5} M de 3-(3,4-diclorofenil) 1,1 dimetil urea (DCMU) (Sigma) este fue preparado diariamente a partir de una solución concentrada de 0.01 M. El DCMU está descrito como un inhibidor que bloquea el transporte de electrones desde el fotosistema II (PSII) al fotosistema I (PSI) (Brechignac & Furbank 1987, Francko 1989).

Asimismo, para saber si el consumo de oxígeno se debía a la respiración mitocondrial o a cualquier otro proceso metabólico que supusiera también reducción de los niveles de oxígeno (fotorrespiración, reacción de Mehler) (Brechignac & Furbank 1987, Weger *et al.*, 1989), el material fue preincubado en cianuro potásico (KCN 1mM) (Sigma) y ácido salicilhidroxámico (SHAM 25mM) (Sigma).

Las soluciones de KCN y SHAM fueron preparadas a partir de soluciones concentradas de 1.4 y 1.2 M respectivamente y añadidos antes de comenzar a medir las tasas de consumo de oxígeno. Estos compuestos han sido descritos como inhibidores de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Brechignac & Furbank 1987).

Las tasas de respiración en oscuridad fueron obtenidas a partir de material preincubado con glicerol y sin él y en presencia/ ausencia de los inhibidores.

Las medidas de las tasas de fijación siguieron idéntica metodología a la descrita en el apartado IV.2.3. No obstante, los tratamientos empleados fueron:

- preincubación durante 2 horas a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y medida de la capacidad de fijación del material incubado en oscuridad durante 20 minutos (luz-oscuridad).

- preincubación en oscuridad durante 2 horas y medida de la tasa de fijación que ha tenido lugar en oscuridad durante 20 minutos (oscuridad-oscuridad).

La metodología empleada para verificar la respiración del glicerol ha sido descrita anteriormente en el apartado IV.2.3. El tratamiento específico utilizado en este caso fue la preincubación del material algal en oscuridad durante 2 horas y la medida de la liberación del CO_2 durante 60 minutos, también en oscuridad (oscuridad-oscuridad).

IV.2.6 SEGUIMIENTO DEL $^{14}\text{C-CO}_2$ FIJADO.

La respiración del glicerol podría definir rutas metabólicas (p.e. anapleróticas) donde sería posible fijar CO_2 .

Para ahondar en este aspecto, el destino final del CO_2 radiactivo fijado fue seguido, atendiendo a los siguientes tratamientos de a) luz-luz, b) luz-oscuridad y c) oscuridad-oscuridad

La fracción soluble fue extraída con DMSO y separada en:

* fracción catiónica ó la eluída con 3N de NH_4OH en una columna de intercambio catiónico (Dowex 50 W X8, 200-400 mesh, H-form).

* fracción aniónica ó la eluída con 3N de ácido fórmico en una columna de intercambio aniónico (Dowex 1-X8, 200-400 mesh, Cl-form).

* fracción neutra o de no intercambio.

Las columnas de intercambio se prepararon atendiendo a las recomendaciones del fabricante.

IV.2.7 EFECTO DE LA CALIDAD DE LUZ SOBRE LA RESPIRACION EN OSCURIDAD.

Los ensayos realizados con la adición de DCMU no mostraron ninguna reducción de la respiración. Todas las experiencias dejaron patente que no existía una dependencia clara entre la respiración del glicerol y la fotosíntesis en el periodo de luz precedente.

Nos planteamos si el efecto de la luz podría estar relacionado con la calidad de luz. Con tal fin, se midieron las tasas respiratorias del material preincubado en glicerol y a distintas calidades de luz.

Las algas fueron mantenidas durante todo un día en oscuridad para asegurar que todos los fotorreceptores estuvieran disponibles.

Los ensayos se realizaron con luz azul y roja ($17.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y luz blanca ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como control.

La luz azul (máximo 450 nm) se obtuvo con fluorescentes Mazdafluor TF 36/18 y dos filtros tipo Plexi62 de 3 mm, mientras que, la luz

roja (máximo 640 nm) fue obtenida con fluorescentes Mazdafluor TF 36/15 y un filtro rojo tipo Plexi52 también de 3 mm. Los fluorescentes blancos tipo luz día fueron de Sylvania grolux de amplio espectro (10% de azul y 10% de roja, según nota del fabricante).

Asumiendo pues, que la luz blanca contenía el 10% de luz azul y roja respectivamente, las dosis ($\mu\text{E m}^{-2}$) y el tiempo de incubación se recogieron en la siguiente tabla:

Luz Blanca		Luz Roja/Azul	
Dosis	Tiempo	Dosis	Tiempo
($\mu\text{E m}^{-2}$)	(min.)	($\mu\text{E m}^{-2}$)	(min.)
180.000	30	18.000	17
360.000	60	6.000	34
540.000	90	4.000	51
720.000	120	72.000	68

También se hicieron controles para evaluar la respiración del glicerol a tiempo inicial (t_0), cuando el material no había sufrido ningún tipo de tratamiento, y a tiempo final (2 h)(t_2) que correspondía al final del periodo en oscuridad.

Efecto del nitrógeno.

Existen numerosas referencias que señalan la relación existente entre el efecto de la calidad de luz y las reservas de carbohidratos y proteínas. Así por ejemplo, bajo la presencia de la luz azul, las reservas de carbohidratos disminuyen, resultando en un aumento concomitante de la respiración en oscuridad (Kowallik & Schatzle 1980).

Las causas sobre el modo de acción de la luz azul no se conocen completamente. Se ha constatado que una disminución de los niveles de ATP acelera la degradación de carbohidratos, mientras que, aparece un incremento en sustancias nitrogenadas (Kowallik 1982). Además, la asimilación de nitratos y su posterior conversión a nitritos se ve activada por la presencia de la luz azul (Kowallik 1982 y referencias contenidas, Aparicio & Quiñones 1991).

Para conocer qué efecto tenía la adición de nitrógeno cuando se preincubaba bajo el espectro puro de luz roja o azul, el material fue tratado con las dosis de 18.000 y 54.000 $\mu\text{E m}^{-2}$ pero añadiendo nitrato sódico (70 mgr l^{-1}) en los medios de incubación (SW 90-gli y SW).

IV.2.8 EXPRESION DE TASAS Y ESTADISTICA.

Las tasas fotosintéticas y respiratorias fueron normalizadas a valores de clorofila a, como un índice de la cantidad de biomasa presente, tal y como sugiere Ramus (1981), Walker (1987) y Zupan & West (1990). Las tasas quedaron expresadas en $\mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cla}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

La extracción de clorofila a se realizó con acetona al 90% y un peso aproximado de alga fresca entre 1.6-2.0 g. La maceración se realizó en frío con un homogenizador marca Politrón modelo PT 3000 y en una habitación con luz tenue. Los extractos fueron centrifugados a 1.500 g durante 5 minutos y el sobrenadante utilizado en la determinación de la clorofila.

La concentración de clorofila fue determinada usando las ecuaciones de Jeffrey & Humphrey (1975).

El valor de concentración de clorofila a por gramo de peso fresco, obtenido para un material pigmentado y calculado como la media de 90 repeticiones, fue de 0.078 ± 0.002 mg. Estos valores están de acuerdo con los estimados por Walker (1987) y Levy & Gantt (1988).

La tasa de fijación del CO_2 expresada en $\text{mg C mg Cla}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se calculó mediante la expresión:

$$\text{Carbón fijado} = \frac{\text{Dpm en la fracción soluble} \times \text{DIC} \times 1.05}{\text{Dpm totales} \times \text{mg Cla} \times t}$$

donde:

* Dpm en la fracción soluble son las Dpm tomadas por el material en luz u oscuridad respectivamente.

* DIC son los mg C existente en el agua de mar. Calculado sobre un volumen de 20 ml de agua de mar, el DIC fue de 1.86 mM. El carbono inorgánico fue determinado atendiendo a la técnica de valoración por volumetría.

* 1.05 es el factor de corrección entre la capacidad de difusión del ^{14}C frente al ^{12}C .

* Dpm totales son las Dpm's añadidas al vial de incubación ($1\mu\text{Ci} = 2.22 \times 10^6$ dpm).

* t es el tiempo de incubación, expresado en horas de incubación.

Todos los ensayos fueron repetidos de 3 a 4 veces, con 3 ó 4 réplicas cada uno de ellos, salvo en algunos casos excepcionales donde se realizaron 4 ó 5 repeticiones con una réplica cada vez.

Tanto las tasas respiratorias como las fotosintéticas se expresaron como la media de sus repeticiones o en algunos casos como la más significativa del experimento.

El análisis de la linealidad, así como, el cálculo de las diferentes pendientes fueron realizados con los programas estadísticos Epistat y Curfitt. El diseño de gráficos fue desarrollado con SigmaPlot (Sigma Co.). La comparación de las diversas tasas de fijación se realizó con el Test de Student (t-Student), evaluadas con el SigmaPlot.

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1 EXPERIMENTOS DE INTERCAMBIO GASEOSO EN LUZ.

La Tabla IV.2 muestra las tasas de liberación de oxígeno de material incubado a distintas intensidades de luz en medios conteniendo glicerol (SW 90-gli) y agua de mar (SW, ensayo control). En ambos casos, la saturación fotosintética se encuentra entre los 250 y 350 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la fotoinhibición sobre los 600 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No obstante, los valores de las tasas fotosintéticas, medidas en medios conteniendo glicerol, siempre muestran valores entre el 40-50% por debajo de las recogidas en SW.

Las tasas de fijación de CO_2 , marcadas con bicarbonato radiactivo (Tabla IV.3), son significativamente superiores ($p < 0.05$), en los tratamientos de luz-luz, entre los valores recogidos en SW 90-gli ($12.20 \pm 1.15 \text{ mg C mg Cl}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y SW ($8.21 \pm 0.90 \text{ mgC mgCl}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Tabla IV.2 Tasas de desprendimiento de oxígeno ($\mu\text{molO}_2 \text{ mgCl}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de material incubado en medios SW 90-gli y SW a distintas intensidades de luz (100, 250, 350, 600 y 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Para todos los tratamientos, el material fue previamente sometido a una incubación en sus medios respectivos durante 2 horas a 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Los datos se calculan como la media de tres repeticiones, $x \pm \text{SD}$.

PFD Photon Flux Density, Densidad del flujo de fotones.

PFD	SW	SW 90-gli
100	363.0 \pm 10.0	200.0 \pm 2.0
250	451.3 \pm 8.0	330.0 \pm 13.0
350	598.0 \pm 13.0	348.0 \pm 8.0
600	500.0 \pm 7.4	259.0 \pm 27.0
700	353.0 \pm 6.0	205.0 \pm 7.0

Tabla IV.3 Tasas de fijación de CO₂ radiactivo (¹⁴CNaHCO₃ 42.6mCimmol⁻¹; mgC mgCla⁻¹ h⁻¹) recogidas en los distintos tratamientos de luz y oscuridad a los que fue sometido material incubado en SW y SW 90-gli. La intensidad de luz fue de 100 μE m⁻² s⁻¹.

Los datos se calculan como la media de 3 repeticiones, $x \pm SD$.

TRATAMIENTOS	SW	SW 90-gli
Luz-Luz	8.21 ± 0.90	12.20±1.15
Luz-Oscuridad	0.44 ± 0.05	0.45±0.08
Oscuridad-Oscuridad	1.21 ± 0.08	0.87±0.07

Los ensayos realizados demostraron que el glicerol se absorbe y se respira en cualquiera de los tratamientos previos de luz y oscuridad. Las dpm's obtenidas, en presencia de G. doryphora, fueron mayores que las encontradas en las muestras sin alga (Respiración bacteriana). Así se recogió 12.000 ± 3.600 dpm frente a las 3.000 ± 900 dpm de las muestras sin el alga.

Estos valores fueron del mismo orden tanto si la liberación de CO_2 tiene lugar en luz o en oscuridad.

IV.3.3 EXPERIMENTOS DE INTERCAMBIO GASEOSO EN OSCURIDAD.

La Tabla IV.4 muestra las tasas de consumo de oxígeno de Grateloupia doryphora según los tratamientos previos de incubación en oscuridad, luz (100 y $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y presencia o ausencia de glicerol.

Las tasas respiratorias aumentan por la incubación previa en glicerol durante 2 horas en ausencia de luz ($119.4 \pm 10.0 \mu\text{moles O}_2 \text{mgCl}^{-1} \text{h}^{-1}$). Estas tasas también incrementan por el tratamiento previo en luz sin glicerol ($100.07 \pm 20.0 \mu\text{moles O}_2 \text{mgCl}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Los valores más altos de tasas de consumo de oxígeno se presentaron cuando las muestras fueron preincubadas en luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y glicerol simultáneamente ($147.66 \pm 9.0 \mu\text{moles O}_2 \text{mgCl}^{-1} \text{h}^{-1}$), siendo aún mayor cuánto más alta sea la intensidad ($700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($176.96 \pm 9.0 \mu\text{moles O}_2 \text{mgCl}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Tabla IV.4 Tasas de consumo de oxígeno ($\mu\text{molO}_2 \text{ mgCl}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de material preincubado durante 120 minutos en glicerol (0.15 M) o sin él y en luz (0 (control), 100, 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Los datos se calculan como la media de 3 repeticiones, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

	Luz 700	Luz 100	Control (oscuridad)
Medios			
SW 90-gli	176.96 \pm 9	147.66 \pm 9	119.4 \pm 10
SW	98.2 \pm 2	100.07 \pm 2	58.9 \pm 9

Las tasas de consumo de oxígeno obtenidas a los tiempos de 0, 8, 12 y 16 minutos después del pretratamiento en luz (2 horas a 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) mostraron una activación en medios SW por la incubación previa en luz, mientras que, en SW 90-gli no hubo tal activación (Figura IV.1), sino que, el consumo de oxígeno precedente ya era elevado.

En medios conteniendo glicerol, las tasas respiratorias se mantuvieron durante aproximadamente 8 minutos, tendiendo a disminuir a medida que el efecto de la luz decrecía hasta valores cercanos a las tasas obtenidas en SW.

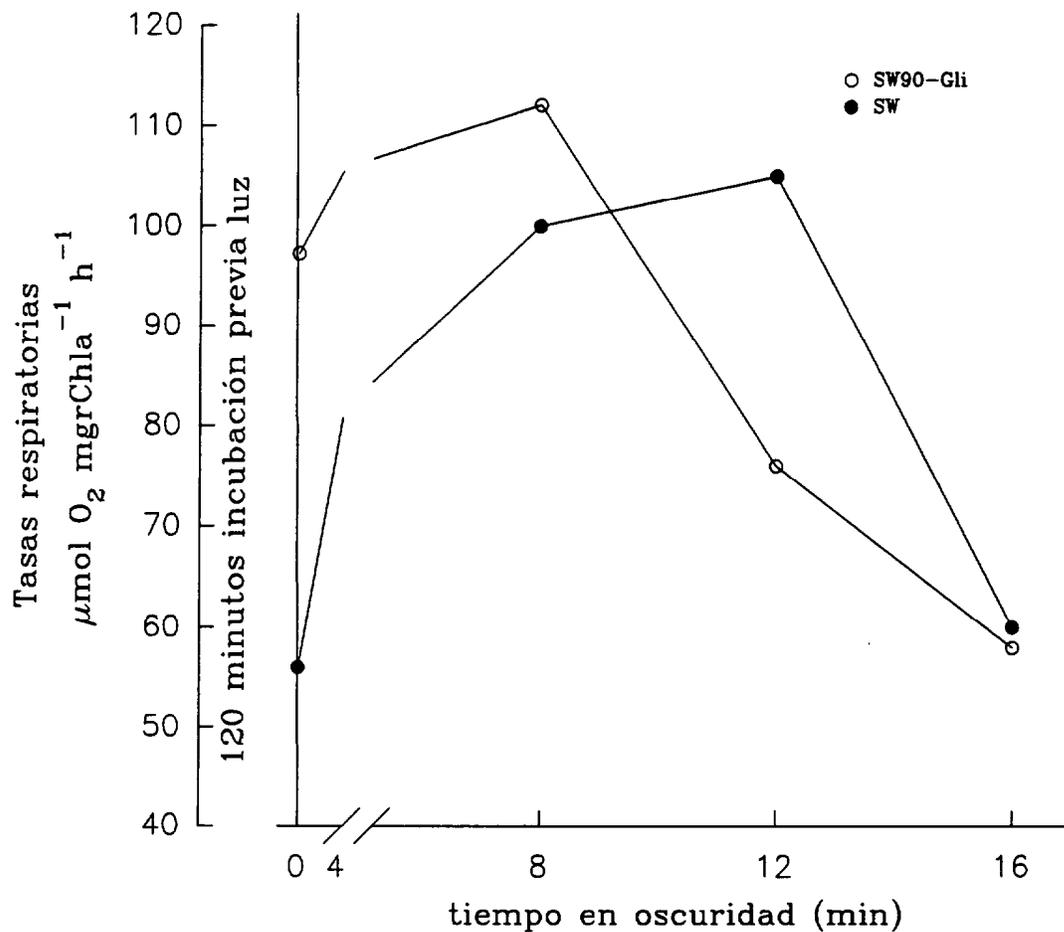


Figura IV.1 Tasas de consumo de O_2 en valores absolutos ($\mu\text{molO}_2\text{mgChla}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de material preincubado durante 120 minutos a $100 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en SW 90 -gli y SW a distintos tiempos (0, 8, 12 y 16 min.) después del cese de la iluminación.

La adición de DCMU, durante el periodo de preincubación, no afectó a las tasas respiratorias, mostrando los mismos valores de consumo de oxígeno, tanto en medios SW como en SW 90-gli, en ausencia de los inhibidores (Tabla IV.5).

Sin embargo, la adición de inhibidores de la respiración mitocondrial, KCN y SHAM, redujo drásticamente el consumo de oxígeno dejando una tasa remanente de $18.46 \pm 5.5 \mu\text{moles O}_2 \text{ mgCl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en medios conteniendo glicerol. Esta tasa la consideramos mínima frente a la de $97.86 \pm 1.0 \mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ que se presentaba en condiciones normales (Tabla IV.5).

Tabla IV.5 Tasas de consumo de oxígeno en valor absoluto ($\mu\text{molO}_2 \text{ mgCl}_a^{-1} \text{ h}^{-1}$) de muestras preincubadas en SW 90-gli y SW a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 2 horas en presencia/ausencia de inhibidores de la cadena transportadora fotosintética (DCMU) y mitocondrial (KCN+SHAM). Las tasas se calculan como la media de 3 repeticiones, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

KCN 1mM; SHAM 25 mM; DCMU 10^{-5}M .

	Tratamientos previos		
	+KCN +SHAM	+DCMU	Sin Inhibidores
SW 90-gli	18.46±5.5	96.05±1.0	97.86±1.0
SW	18.60±5.0	61.25±0.9	57.40±1.3

IV.3.3 SEGUIMIENTO DEL $^{14}\text{C-CO}_2$ FIJADO.

La Figura IV.2 muestra los porcentajes de acumulación de $^{14}\text{C-CO}_2$ en las fracciones catiónica (aminoácidos), aniónica (ácidos orgánicos, ésteres-fosfato) y neutra en material incubado en SW y SW 90-gli respectivamente.

* En los tratamientos de luz-luz, la fracción catiónica y la fracción neutra presentan ligeras variaciones de CO_2 fijado tanto si se trata de SW como de SW 90-gli.

Sin embargo, se muestra un mayor porcentaje de acumulación, en medios conteniendo glicerol, sobre la fracción aniónica.

* En los tratamientos de luz-oscuridad, se manifiestan los mayores contrastes entre ambos medios. Las fracciones catiónica y aniónica son significativamente diferentes entre ellas, mientras que, la fracción neutra es igual para ambos.

* Finalmente, en las transiciones de oscuridad-oscuridad, los porcentajes de fijación, en todas las fracciones y medios, son muy parecidos.

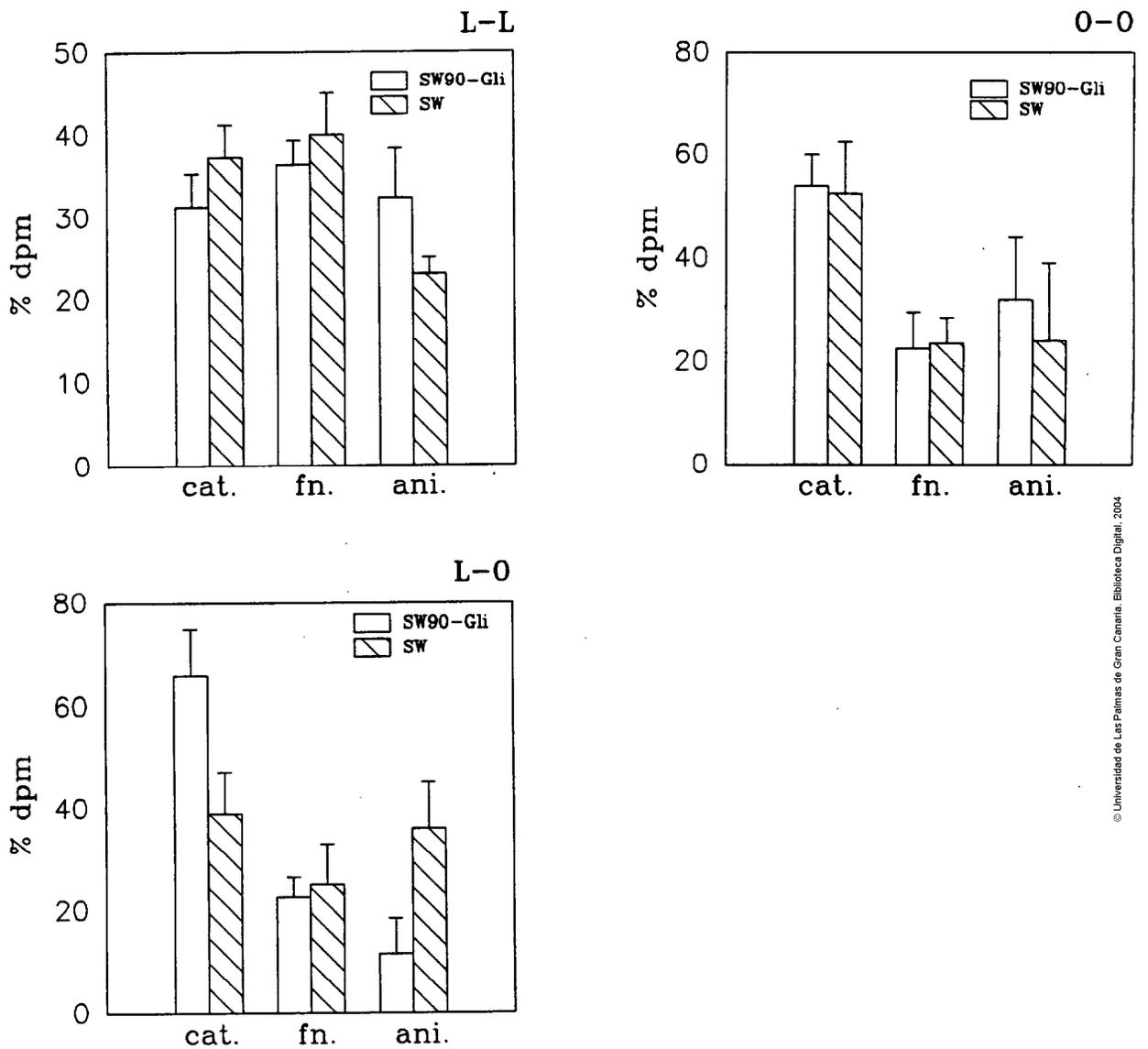


Figura IV.2 Tasas de fijación de CO₂ radiactivo (% dpm) en las fracciones catiónica (cat.), neutra (fn.) y aniónica (ani.) de material incubado en SW y SW 90-gli, después de 20 minutos en presencia del marcador (1.15 $\mu\text{M}^{14}\text{C HCO}_3$) en los distintos tratamientos de luz (L-L), oscuridad (O-O) y transición de luz a oscuridad (L-O).

Los datos se calculan como la media de 3 repeticiones, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

IV.3.4 EFECTO DE LA CALIDAD DE LUZ SOBRE LA RESPIRACION EN OSCURIDAD. INFLUENCIA DEL NITROGENO.

La Figura IV.3 muestra las tasas respiratorias de talos que han sido previamente incubados en SW 90-gli e irradiados con luz azul y roja a diferentes dosis y con o sin nitrógeno (NaNO_3 , 70mg l^{-1}).

A una dosis de $18.000 \mu\text{E m}^{-2}$ (17 minutos), en glicerol y luz azul, se produjo un incremento notable de la respiración en oscuridad. Este incremento es superior (11%) al registrado con luz blanca tras un pretratamiento en luz ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y glicerol durante 120 minutos.

Es destacable que la luz roja, a dosis de $18.000 \mu\text{E m}^{-2}$, no favorece el consumo de oxígeno de la misma manera que la luz azul, siendo las tasas un 44% inferiores a las vistas con azul.

A tiempos mayores de incubación, las tasas respiratorias obtenidas, tras las preincubaciones en luz azul y roja se hacen cada vez menos diferentes, aunque se evidencia un mayor efecto de la luz roja sobre el consumo de oxígeno.

La adición de nitrato sódico a los talos incubados con glicerol en luz azul durante 17 minutos redujo considerablemente el consumo de oxígeno, siendo la tasa, sin nitrógeno, de $138.0 \pm 20 \mu\text{moles O}_2 \text{mgCl}^{-1} \text{h}^{-1}$ y en presencia de nitrógeno de $67.0 \pm 15.0 \mu\text{moles O}_2 \text{mgCl}^{-1} \text{h}^{-1}$. Este efecto se mantiene en dosis de irradiación más elevadas.

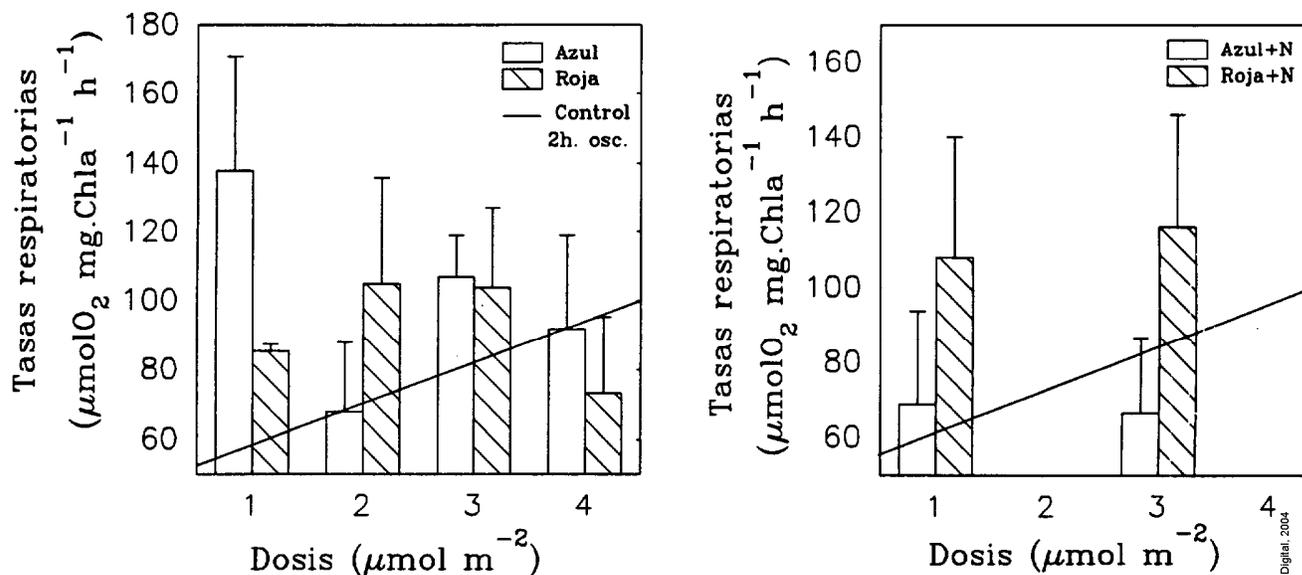


Figura IV.3 Tasas de consumo de oxígeno ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Cla}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de talos incubados en SW90-gli y SW 90-gli + 70 $\text{mg l}^{-1} \text{ NO}_3\text{Na}$ e irradiados previamente con luz roja y luz azul a distintas dosis.

1,2,3,4 equivalen a 18000, 36000, 54000, 72000 $\mu\text{mol m}^{-2}$ respectivamente.

Los datos se calculan como la medida de 3 repeticiones, $x \pm \text{SD}$.

IV.4 DISCUSION

IV.4.1 INTERCAMBIO GASEOSO EN LUZ.

Los primeros cambios de propiedades fotosintéticas siguiendo la acumulación de carbohidratos fueron recogidos en plantas superiores: trigo (Farquhar & von Caemmerer 1982), espinaca (Stitt 1986) y alfalfa (Chatterton 1973). La inhibición de la fotosíntesis también ha sido correlacionada con la acumulación de azúcares (Farquhar & von Caemmerer 1982, Azcón-Bieto 1983).

Todos estos estudios apuntan a que la acumulación de azúcares solubles fijan el fósforo inorgánico en forma de azúcar-fosfatos y como consecuencia se reduce las tasas de regeneración de ribulosa bifosfato (RuBP) y otros componentes del ciclo de Calvin (Herold 1980, Azcon-Bieto 1983) por lo que la tasa de asimilación del CO₂ estaría controlada por las tasas de liberación de fosfato (Herold 1980, Farquhar & von Caemmerer 1982, Harris *et al.*, 1983).

En *Dunaliella tertiolecta*, donde el glicerol es un producto de la fotosíntesis, se fija fósforo inorgánico en forma de glicerol 3 fosfato (G3P), con importantes consecuencias sobre el control de la síntesis del glicerol (Belmans & Van Laere 1988a). Esto es consistente con la hipótesis de la limitación de fosfato sugerida anteriormente (Herold 1980, Robinson & Walker 1981, Miginiac-Maslow & Hoarau 1982, Azcon-Bieto 1983, Azcón Bieto & Osmond 1983).

En microalgas, la fotosíntesis no sólo disminuye por la limitación de nutrientes (Horrum & Schwartzbach 1980, Rhiel *et al.*, 1986), sino que, en presencia de una fuente de carbono es capaz de producirse un cambio en la forma de nutrición, constatándose el paso de autótrofos a heterótrofos (Faust & Gantt 1973, Lewitus *et al.*, 1991).

Sería pues explicable que la disminución de la necesidad de luz, al producirse este cambio, repercutiera en la reducción de los componentes fotosintéticos. Posiblemente, bajo estas condiciones, podría ser más ventajoso gastar energía biosintética, sobre los componentes celulares involucrados en el metabolismo de las fuentes de carbono, que sobre los componentes fotosintéticos superfluos para el crecimiento.

En *Pyrenomonas salina* (*Cryptophyceae*), la adición de glicerol al medio puede incrementar la tasa de crecimiento bajo irradiaciones limitantes para el crecimiento fotoautotrófico (Antia *et al.*, 1969, Lewitus & Caron 1991a,b). En esta situación, la asimilación del glicerol da como resultado una reducción de los componentes fotosintéticos (Lewitus & Caron 1991a,b).

Las tasas de liberación de oxígeno de *Grateloupia doryphora*, observadas en medios conteniendo glicerol, (Tabla IV.2) fueron siempre muy inferiores a las presentadas en agua de mar. Esto podría ser debido a que el oxígeno no difunda bien en estos medios por impedimentos físicos (p.e. la viscosidad del medio) o que bajo estas condiciones el alga produjera una menor cantidad de oxígeno.

En un intento de explicar esta circunstancia, simulamos las curvas de liberación de oxígeno, en medios SW 90-gli y SW, insuflando O₂ (g) en ausencia del material vegetal. Estas curvas no mostraron ninguna diferencia entre los medios, por lo que, indicaron que la respuesta de *G. doryphora* era una consecuencia directa de la utilización de esta fuente de carbono por el alga y no como el resultado indirecto de un cambio en las condiciones físico-químicas del medio que impidiera la correcta difusión del oxígeno.

También es posible que el oxígeno liberado sea consumido en la respiración, en vista de que ésta es tan elevada (Tabla IV.4).

Otro aspecto poco conocido es el efecto de la presencia de fuentes de carbono sobre la organización molecular del sistema fotosintético. Los resultados obtenidos han sido muy variables y los mecanismos fisiológicos por los que las algas responden a la adición de una fuente de carbono parecen muy diversos. Por ejemplo, la adición de compuestos orgánicos asimilables pueden reprimir, no tener efecto o aumentar la producción de clorofilas (Shihira-Ishikawa & Hase 1964, Doermel & Brock 1971, Faust & Gantt 1973, Schwelitz *et al.*, 1978, Ellis *et al.*, 1981, Lewitus *et al.*, 1991).

La adición de glicerol en cultivos de diversas *Cryptophyceae* causó una reducción de los componentes fotosintéticos. El contenido y composición pigmentarias, la organización tilacoidal y la distribución de partículas asociadas a la membrana del tilacoide en *Pyrenomonas salina* resultaron afectadas por la adición de glicerol a bajas irradiaciones (Lewitus *et al.*, 1991).

Faust & Gantt (1973) y Antia *et al.*, (1969) también recogieron reducción de la cantidad de cloroplastos y una disminución en la cantidad de pigmentos fotosintéticos.

A pesar de que la fotosíntesis, medida como desprendimiento de oxígeno, es baja en *G. doryphora*, los ensayos realizados con bicarbonato marcado indican que no hay ningún impedimento en la fijación del carbono, (luz-luz), siendo incluso ésta más grande en medios con glicerol que en agua de mar. Estas tasas nos estarían indicando la posibilidad de que existieran modelos de fijación no fotosintética, algo posible si consideramos las altas tasas respiratorias en SW 90-gli frente a las encontradas en SW (Tabla IV.3).

La acumulación del ^{14}C en la fracción aniónica (Figura IV.2) apoya estas evidencias, esperándose que en los futuros trabajos de identificación de estos compuestos se encuentre intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCAC), resultantes de la actividad fijadora en rutas anapleróticas

o de otros componentes propios del metabolismo del glicerol en luz que impliquen pasos de carboxilación.

La incubación con glicerol marcado pone en evidencia la existencia de la respiración de esta fuente de carbono, ya que, de ella se obtiene $^{14}\text{CO}_2$ tanto con incubaciones previas en luz como en oscuridad. Estos resultados apuntarían hacia una activa descarboxilación en presencia de la luz y la posible fijación de $^*\text{CO}_2$ liberado.

IV.4.2 INTERCAMBIO GASEOSO EN OSCURIDAD.

Numerosos trabajos muestran la existencia de una activación de la respiración tras un periodo de luz (Graham 1980, Walker 1987) y posiblemente sea esto lo que registramos con el material incubado en agua de mar (Figura IV.1).

Con el material en glicerol encontramos también otros fenómenos. La respiración de Grateloupia doryphora en medios conteniendo glicerol se vió estimulada por la incubación previa en luz. Este consumo de oxígeno fue siempre superior al presentado con incubaciones en oscuridad, durante el mismo tiempo, y aumentó a medida que la irradiación era más alta (Tabla IV.4). También como muestra la Figura IV.1, esta respiración es, además, dependiente del periodo de luz y a medida que nos alejamos de la influencia de ésta, las tasas respiratorias disminuyen drásticamente hasta alcanzar el mismo nivel que las muestras incubadas en agua de mar.

La tasa respiratoria, en medios SW, después de una incubación previa en luz durante 120 minutos es de $56.03 \mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A los 8

minutos del cese de la incubación, la tasa que se presenta es de $99.90 \mu\text{moles O}_2 \text{ mg Cl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ lo que indica que la "activación" ha sido cerca del 80%. A los 16 minutos, la tasa obtenida vuelve a ser la registrada en estos medios (Figura IV.1).

En medios conteniendo glicerol, la respiración alcanzada inmediatamente después de apagar la luz es de $97.22 \mu\text{moles O}_2 \text{ mgCl}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y transcurridos los 8 minutos la tasa se ve escasamente alterada (Figura IV.1).

La diferencia de tasas, a tiempo 0, entre SW 90-gli y SW puede ser explicada por la utilización del glicerol como sustrato respiratorio (respiración del glicerol) dependiente de la luz y que muy probablemente tenga lugar al mismo tiempo que la fotosíntesis.

No hay que olvidar que el glicerol también se respira en oscuridad a altos valores (Tabla IV.4), lo que descarta que la diferencia de tasas entre el material incubado en SW y en SW 90-gli pueda deberse a una activación por efecto de la luz y que, tras incubaciones con glicerol radiactivo se obtiene $^{14}\text{CO}_2$ en condiciones de luz y oscuridad, indicando que la fuente de carbono es susceptible de descarboxilarse.

De la bibliografía consultada se puede extraer que aparte de la reacción de Mehler, la cual tiene lugar por la fotorreducción directa del O_2 a nivel del fotosistema I (PSI) y que se presenta cuando la fotorrespiración y la respiración mitocondrial están inhibidas (Peltier & Thibault 1985, Weger & Turpin 1989), el consumo de oxígeno se debe fundamentalmente a 2 procesos (Canvin *et al.*, 1980, Badger 1985, Peltier & Thibault 1985, Weger & Turpin 1989):

- Fotorrespiración, relacionado con el metabolismo del glicolato.
- Consumo de oxígeno asociado a la respiración mitocondrial que puede ocurrir en luz.

La fotorrespiración se produce en luz y se caracteriza por ser un proceso cíclico, donde no hay ni acumulación ni pérdida de ningún metabolito y donde el único producto obtenido, el CO₂, es inmediatamente reciclado (Zelitch, 1979, 1992).

Los estudios de fotorrespiración, tanto en macroalgas, como en microalgas, han sido llevados a cabo con diferentes métodos tales como punto de compensación del CO₂, presencia de glicolato, ¹⁴C, ¹⁸O (Brechignac & Andre 1984).

A pesar de la diversidad de técnicas usadas, la presencia de fotorrespiración no ha sido determinada inequívocamente. Las discrepancias surgidas entre los diferentes trabajos por la variedad de métodos empleados, así como, las condiciones de trabajo hacen difícil llegar a un acuerdo. En este sentido, los estudios realizados con microalgas en condiciones no estacionarias (p.e. distintas fases de crecimiento) y en medios anómalos (libres de CO₂, presencia de inhibidores) contribuyen a esta dificultad en la interpretación.

El uso de las técnicas de espectrometría de masas con ¹⁸O mostró evidencias de la existencia de un consumo de oxígeno al mismo tiempo que ocurría la fotosíntesis, tanto en algas como en plantas superiores (Peltier & Thibault 1985, Weger & Turpin 1989). Este consumo fue diferente al registrado cuando ocurría la respiración en oscuridad. Se demostró que la actividad oxigenasa de la ribulosa bifosfato (RuBP) y el metabolismo del glicolato estaban presentes durante el consumo de O₂ en la luz.

Existen organismos que producen glicolato en la fotosíntesis como Coccochloris pericystis y otros que poseen una vía de glicolato funcional como el alga verde Chlamydomonas reinhardtii. Así Coleman & Colman (1980) demostraron la existencia de fotorrespiración en el alga C. reinhardtii y no la detectan en C. pericystis.

Desde nuestra perspectiva, la existencia de este tipo de consumo de oxígeno en G. doryphora fue evaluada en función de los resultados obtenidos en los cultivos "in vitro" de esta macroalga y con las apreciaciones recogidas a través de la polarimetría.

G. doryphora aumenta su peso fresco en un 400% en medios conteniendo glicerol (Robaina *et al.*, 1990b). Este crecimiento requiere energía y probablemente la forma más factible de obtenerla sea respirando esta fuente de carbono.

La fotorrespiración se caracteriza por consumir ATP para condensar 2 moléculas de glicina en una de serina (Brechtig *&* Furbank 1987, Zelitch 1992).

Además, la inhibición de la fotosíntesis, con DCMU, implica que los intermediarios fotosintéticos para la realización de la fotorrespiración no están disponibles. Estos resultados también fueron expuestos en la diatomea Thalassiosira weissflogii. La adición de DCMU inhibió el flujo de electrones fotosintético y con ello el poder reductor necesario para la regeneración de la ribulosa 1,5 bifosfato (Weger *et al.*, 1989).

Existen pruebas de la presencia de respiración mitocondrial en luz. Graham (1980) concluyó en su trabajo que existían evidencias bioquímicas que implicaban el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en hojas iluminadas, de la misma manera que, en la oscuridad. También Peltier *&* Thibault (1985), trabajando a concentraciones de CO₂ elevadas, obtuvieron que las tasas de consumo de oxígeno de Chlamydomonas en luz fueron iguales en presencia de luz, oscuridad y tratadas con DCMU. Esto sugiere que en condiciones donde la fotorrespiración no tiene lugar, el proceso de consumo de oxígeno en luz es debido únicamente a la respiración mitocondrial.

La respiración mitocondrial juega dos papeles importantes en el metabolismo: uno catabólico encargado de la oxidación de los carbohidratos para la obtención de energía y poder reductor y otro anabólico donde los intermediarios del ciclo de los tricarbónicos son usados para la biosíntesis de nuevos compuestos celulares, principalmente los aminoácidos (Bassham *et al.*, 1981, Elrifi & Turpin 1987, Weger *et al.*, 1989, Weger & Turpin 1989).

Nuestros resultados también demuestran, en presencia del glicerol, un aumento considerable del consumo de oxígeno cuánto mayor es la irradiación (Tabla IV.4), pero que sin embargo, se contraponen a unas tasas fotosintéticas, para la misma intensidad, muy inferiores a las obtenidas en medios sin esta fuente de carbono. A $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se alcanza la mayor tasa de respiración, después del periodo de iluminación y, ocurre el mayor grado de fotoinhibición (Tabla IV.2). Esto hace aún más dudoso el pensar que la fotorrespiración es activa bajo nuestras condiciones experimentales.

Estimamos que en *G. doryphora*, la respiración mitocondrial es la que contribuye, con la aportación de carbono y energía a la elevada tasa de crecimiento que presenta el alga en medios conteniendo glicerol (400% superior a la tasa normal).

Esta observación también está de acuerdo con la recogida por diferentes autores sobre el fitoplancton: las tasas de crecimiento incrementan con las tasas de respiración estando a su vez correlacionadas con la biosíntesis de compuestos celulares (Geider & Osborne 1992).

Además, la inhibición de la respiración mitocondrial con KCN y SHAM durante la incubación previa en luz provoca que no haya ningún consumo de oxígeno inmediatamente después del cese de la iluminación (Tabla IV.5). Esto indica no sólo que la respiración es mitocondrial, sino que también, la

dependencia de la luz no es fotosintética como lo demuestra los valores de respiración de plantas previamente incubadas en DCMU (Tabla IV.5).

En Chlamydomonas, Peltier & Thibault (1985) también pusieron en evidencia el efecto inhibitorio que sobre el consumo de oxígeno tenía la adición de KCN y SHAM, tanto en luz como en oscuridad. Estas observaciones soportan la idea de que la respiración mitocondrial estaría presente en luz.

La respiración mitocondrial es también inhibida por KCN y SHAM en el alga roja Chondrus crispus (Brechignac & Furbank 1987).

La fijación del CO₂ en algas ocurre mediante procesos mediados por la luz, pero pueden también ocurrir vía no fotosintética en la oscuridad (Raven 1974, Kremer 1978a,b,c, 1979, Bird *et al.*, 1980). Esto podría explicar las diferencias en las tasas de fijación de CO₂ encontradas en medios con glicerol en los cuales existen menos fotosíntesis (Tabla IV.3)

Bogges & Naylor (1975) encontraron en Gracilaria sp., y en general en todas las algas rojas mantenidas en oscuridad, que el mayor porcentaje de ¹⁴C fue recogido en la fracción catiónica. Bird y colaboradores (1980) no encontraron actividad de la PEP carboxilasa en G. verrucosa y un alto porcentaje del carbono marcado estaba en la citrulina, lo que indicó que la ruta de fijación del CO₂ en condiciones no fotosintéticas no procedía a través de la β carboxilación. Bogges & Naylor (1975) han sugerido que el ciclo de la urea-ornitina juega un papel importante en la incorporación del bicarbonato en aminoácidos tales como la citrulina. Esta vía o algunas modificaciones de ella pueden ser la/s responsable/s de la fijación no fotosintética de G. verrucosa.

En el seguimiento del *CO₂, que realizamos en G. doryphora, encontramos las mayores diferencias en la transición luz-oscuridad, por el contrario, fue donde se encontraron las mayores diferencias entre los medios

(Figura IV.2) lo que podría indicar que existen distintos flujos de carbono: la fracción catiónica aumentó considerablemente en glicerol, mientras que, disminuyó la aniónica. Esto podría indicar que la parte activa de la respiración mitocondrial es el proceso anabólico sustentado por la acumulación de aminoácidos (fracción catiónica).

Esta posibilidad podría ser aceptada si consideramos que durante la fotosíntesis tiene lugar el periodo de mayor actividad biosintética (incubación en luz) y que la respiración mitocondrial puede ocurrir en luz y ser observados durante un periodo muy corto en la oscuridad (medida de la tasa de fijación en oscuridad) (Weger *et al.*, 1989).

IV.4.3 EFECTO DE LA CALIDAD DE LUZ SOBRE LA RESPIRACION EN OSCURIDAD.

En *Grateloupia doryphora* se recoge un aumento de la respiración en oscuridad tras un periodo de incubación en todos los tratamientos de luz y, fundamentalmente en luz azul a dosis pequeñas ($18.000 \mu\text{E m}^{-2}$) (Figura IV.3).

Por los experimentos realizados, en luz blanca no se registra ningún aumento de la respiración, salvo a una dosis de $720.000 \mu\text{E m}^{-2}$.

Emerson & Lewis (1943) también registraron un incremento del consumo de oxígeno después de una etapa fotosintética con luz azul pero no fue hasta 1969 cuando Kowallik & Kowallik lo confirmaron tras un periodo de iluminación de 20 minutos. Los autores interpretaron este consumo extra como un indicador del aumento de la respiración independiente de la fotosíntesis.

En G. doryphora ocurre un aumento de la tasa de respiración al incubar en luz y glicerol (ver figura IV.3, línea continua). El glicerol, por su parte, incrementa su concentración intracelular a medida que transcurre el tiempo en luz (azul o roja). A dosis de 36000 y 54000 $\mu\text{E m}^{-2}$, la concentración interna inhibiría el efecto de la luz azul principalmente.

Descartamos una activación de la tasa de respiración tras un periodo de incubación en luz azul, ya que, no se detecta el mismo efecto en muestras incubadas en agua de mar.

El estudio de las longitudes de onda de la luz sobre el crecimiento y desarrollo de las algas se ha llevado a cabo con la luz azul y la luz roja y ambas parecen estar íntimamente relacionadas (Ruyters & Kowallik 1980, Ruyters 1984, 1988, Kowallik & Grotjohann 1988, Schuller *et al.*, 1990, Grotjohann *et al.*, 1991).

El efecto de las diferentes calidades de luz no se deriva de una influencia de la fotosíntesis propiamente. En células de Euglena quedó patente que estos efectos son los mismos tanto en células tratadas con DCMU (Kowallik 1969, Kowallik & Neuert 1984) como aquellas que no lo fueron (Kowallik & Neuert 1984). Sin embargo, subyace la idea de una conexión entre el incremento de la respiración y el aparato fotosintético. La bibliografía revisada recoge casos en los cuales el desarrollo primario del aparato fotosintético y su mantenimiento requiere de la irradiación azul (Brinkmann & Senger 1980). En luz roja prolongada, las membranas altamente organizadas pierden su orientación (Voskresenskaya *et al.*, 1968, Voskresenskaya 1972) y la capacidad fotosintética disminuye tanto en algas como en plantas superiores (Harnischfeger *et al.*, 1974).

La luz azul estimula el consumo de oxígeno, acelerando la respiración mitocondrial y resultando en una pérdida de los carbohidratos de reserva y acumulación de proteínas (Pirson & Kowallik 1960, Kowallik 1962,

Kowallik 1982, Kowallik & Neuert 1984, Kowallik *et al.*, 1990). Esta degradación de los carbohidratos es más activa bajo estas condiciones de iluminación que en oscuridad (Dwyer & Smillie 1970, Senger & Bishop 1972, Dresbach 1973, Georgi 1974, Schwartzbach *et al.*, 1975, Brinkmann & Senger 1980, Kowallik & Schatzle 1980).

Los efectos de la luz azul sobre el metabolismo del carbono, especialmente, sobre la degradación de los carbohidratos y la respiración han sido estudiados en *Chlorella* y *Scenedesmus* (Brinkmann & Senger 1980, Kowallik & Schatzle 1980, Kowallik 1982, Ruyters 1984, 1987, 1988).

Estos cambios en el metabolismo por el efecto de la luz azul no se conocen bien como están regulados. Las hipótesis recogidas en la mayoría de los trabajos se basan en la influencia de esta calidad de luz sobre los enzimas respiratorios o sobre los niveles de ATP.

Tanto la piruvato quinasa (PK) (Kowallik & Ruyters 1976) como la fosfofructoquinasa (PFK) (Kowallik & Grotjohann 1988, Grotjohann & Kowallik 1989) podrían estar influenciadas por longitudes de onda específicas.

En general, todos los resultados indican que la luz azul induce la biosíntesis de la PK en presencia de alguna fuente de carbono con la consiguiente activación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Kowallik & Ruyters 1976, Kowallik & Schatzle 1980, Kowallik 1982, Turpin 1991).

En esta línea, la disminución de la concentración de ATP también puede acelerar la degradación de los carbohidratos vía glicolisis.

La luz roja, por el contrario, causa una disminución del consumo de oxígeno y favorece la acumulación de carbohidratos (Kowallik 1962, 1987).

Con estas perspectivas, sería lógico pensar que la distribución del carbono fijado sea diferente bajo condiciones de luz azul o roja. Así

Voskresenskaya (1952) en plantas superiores y posteriormente Hauschild y colaboradores (1962a,b) en algas verdes recogieron una mayor actividad de azúcares-fosfato marcados en luz roja, mientras que, en luz azul predominó la presencia de aminoácidos.

Sin embargo, el seguimiento de la partición, realizada únicamente a dosis de $18.000 \mu\text{E m}^{-2}$ en G. doryphora, no indicó la existencia de flujos distintos, resultando en una acumulación en la fracción catiónica en ambas calidades.

Paralelamente, la luz azul estimula la utilización de nitratos y la consiguiente aparición de compuestos nitrogenados (Raghavan & Demaggio 1971, Voskresenskaya 1972, Turpin 1991). Tanto la actividad de la nitrato reductasa (NR), como la de la nitrito reductasa (NiR) están bajo la acción de la luz azul (Stoy 1955, 1956, Strotmann 1967, Strotmann & Ried 1969, Aparicio *et al.*, 1976, Calero *et al.*, 1980, Kowallik 1982, Turpin 1991).

Según Quiñones & Aparicio (1990) las células de Chlamydomonas reinhardtii procedentes de la oscuridad necesitan de la luz azul para adquirir la actividad de la nitrato reductasa (NR). El nitrato no entra con sólo la presencia de la luz roja incluso si las células son previamente iluminadas con luz azul y contienen una actividad alta de NR; esto indica claramente que la luz azul está actuando sobre la absorción de nitrato. Estos mismos resultados se obtuvieron en células de Euglena (Calero *et al.*, 1980).

Los resultados también demuestran que la actividad de la nitrito reductasa (NiR) está bajo el control de la luz azul. Luego esta luz actúa sobre el metabolismo del nitrógeno inorgánico en 3 pasos:

- absorción de nitratos y nitritos
- activación de la NR
- activación de la NiR

La disminución, en presencia del glicerol, de las tasas respiratorias en G. doryphora por la adición de nitrato sódico (Figura IV.3) podría deberse a que el poder reductor obtenido a través del TCAC por la degradación de carbohidratos es utilizado en la asimilación de nitrato y su reducción a nitritos y a amonio.

Resultados similares fueron recogidos en células de Chlorella (Kanazawa et al., 1970) donde el suministro de nitrato como única fuente de nitrógeno tampoco tuvo el efecto esperado, es decir, la activación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Este efecto fue debido a la reducción de nitrato a amonio.

Con dosis más elevadas, la luz azul y la roja alcanzan tasas de consumo de oxígeno similares entre ellas, pero sin lograr las tasas observadas con luz blanca.

Esto podría sugerir otro efecto de la calidad de luz sobre las tasas respiratorias donde las luces monocromáticas (azul y roja) se complementaran y se alcanzara un equilibrio entre la síntesis y degradación de carbohidratos.

V. IMPLICACIONES MORFOGENETICAS DEL GLICEROL.

V.1 INTRODUCCION

La puesta a punto de un sistema de propagación "in vitro" en condiciones asépticas para el alga roja Grateloupia doryphora ha permitido la propagación de fragmentos de talo (explantos) hasta originar nuevos individuos (Robaina *et al.*, 1990a,b), así como, la propagación de carposporas y tetrasporas hasta la obtención y mantenimiento de talos gametofíticos y tetrasporofíticos, sin que, se presenten los clásicos problemas de contaminación que ocurren cuando se parte de un material no aséptico (Capítulo III).

Sobre lo expuesto, el siguiente paso era determinar si las carposporas responden al glicerol, de igual manera que, los explantos extraídos de material recolectado en la naturaleza.

La presencia de esta fuente de carbono influye tanto en el crecimiento como en el aumento de la tasa de propagación vegetativa e incluso puede relacionarse con su metabolismo si se favorece la acumulación de almidón y otros ficocoloides derivados del glicerol como son el floridosido e isofloridosido. El almidón, a su vez, ha sido relacionado con la morfogénesis (formación de yemas) (Brown *et al.*, 1979).

El floridosido e isofloridosido han sido descritos como agentes osmóticos, cuya concentración varía en función de la salinidad del medio. En periodos de luz son sintetizados teniendo como precursores al glicerol 3 fosfato y a la UDP galactosa. No obstante, en periodos de oscuridad, éstos se forman a partir de las reservas polisacarídicas (Yu & Pedersen 1990a,b).

Paralelamente, también se conoce que los niveles de nutrientes, principalmente nitrógeno, influyen en la acumulación de estos ficocoloides. Pruebas realizadas con carbono radiactivo han mostrado que con niveles de nitrógeno bajos se favorece el acúmulo de agar y carrageno (Macler 1986, 1988).

En callos de tabaco, dónde la secuencia del desarrollo de las yemas

ha sido descrita (Thorpe & Murashige 1970, Brown *et al.*, 1979) y correlacionada con eventos fisiológicos, incluyendo el contenido de almidón y respiración (Thorpe & Murashige 1968, 1970, Thorpe & Meier 1972, Ross & Thorpe 1973, Thorpe & Laishley 1973, Thorpe 1974), se ha sugerido el enorme requerimiento energético necesario para este proceso a través de la degradación del almidón (Thorpe & Murashige 1970, Barg & Umiel 1977, Thorpe 1977, Brown *et al.*, 1979).

Así, conociendo el metabolismo del glicerol, y la ventaja que nos reporta el sistema de cultivo "in vitro", podríamos llegar a utilizarlo como una herramienta que nos permita actuar sobre el crecimiento, enfocándolo hacia cualesquiera de las formas de desarrollo que pudiera tener lugar.

Para realizar este seguimiento es necesario describir los eventos que ocurren no sólo a nivel celular, sino también, en el cultivo.

Así pues, tendremos un material vegetal disponible para el estudio del crecimiento y desarrollo de *G. doryphora* sobre el que 1) caracterizar histológica e histoquímicamente los cambios morfológicos que tengan lugar y 2) correlacionar las variaciones en determinados componentes estructurales derivables del metabolismo del glicerol (aproximación histoquímica) con esos cambios.

La estructura y organización celular sufren una serie de modificaciones las cuales reflejan los cambios morfológicos que se suceden: 1) incremento en el número de células, 2) cambios en el tamaño y la forma y 3) producción de diferentes células y áreas ("tejidos") con características fisiológicas distintas.

En *Rhodophyta*, la formación de grandes cantidades de carbohidratos necesarias para la diferenciación y desarrollo, así como, para la liberación y fijación de las esporas ha sido descrita en multitud de ocasiones

(Chamberlain & Evans 1973, Kugrens & West 1972, Pueschel 1979, Scott & Dixon 1973, Tsekos 1981, 1983, 1985, Tsekos & Schnepf 1983). La relación del aparato de Golgi con la síntesis de estos polisacáridos y con la formación de la pared celular también está ampliamente documentada (Mollenhauer & Morré 1966, Muhlethaler 1967, Beams & Kessel 1968, Konrad-Hawkins 1974, Ramus 1972a,b, Tsekos 1985, Liu *et al.*, 1992).

El aparato de Golgi está implicado en la secreción de 2 tipos de productos los cuales contribuyen a la formación de la matriz amorfa de la pared celular. El primer producto procedente de las vesículas de Golgi participa directamente en la formación de la pared celular (Kugrens & West 1973, Scott & Dixon 1973, Tsekos 1983, Tsekos *et al.*, 1985). El segundo producto son las *cored vesicles* (Chamberlain & Evans 1973, Scott & Dixon 1973, Tsekos 1981, 1983, 1985, Tsekos *et al.*, 1985). La secreción ocurre de dos formas diferentes: o bien se funden con la membrana o bien con otras vesículas para formar vacuolas grandes de diferentes tamaños las cuales también expulsan su contenido al exterior (Scott & Dixon 1973, Tsekos 1981, 1985).

A diferencia del almidón de las plantas superiores y algas verdes, el almidón de las algas rojas, almidón de florideas, contiene únicamente la fracción de amilopectina y se sitúa en el citoplasma.

Los granos de almidón se han visto unidos a dictiosomas y cloroplastos aunque no se conoce cuál es el significado concreto de estas asociaciones.

La importancia de los granos del almidón radica en que forman parte de la fracción insoluble de las reservas de carbohidratos de las cuales también forma parte el floridosido como porción soluble (Pueschel 1990).

Los lípidos también se encuentran en numerosas algas rojas y si bien no conoce su papel exacto en macroalgas se estima que pueden desempeñar una función similar a la presentada en algas unicelulares. En células de

Porphyridium sometidas a bajas concentraciones de nitratos se ha recogido como productos de reserva granos de almidón y lípidos (Kost *et al.*, 1984). Estos últimos se utilizan para regenerar los componentes de membrana cuando las condiciones nutricionales son favorables (Wanner & Kost 1984).

La división celular juega un importante papel en el desarrollo ya no sólo, incrementando el número de células y por consiguiente el tamaño del organismo, sino también, porque la citocinesis permite la separación de las células con funciones diferentes, facilitando la diferenciación en tipos y áreas celulares.

Los estudios sobre división celular se han realizado principalmente con el objetivo de contrastar las relaciones taxonómicas entre los distintos grupos, y establecer criterios de sistemática (Scott 1983, Davis & Scott 1986). En este sentido, por ejemplo, se han sugerido 5 tipos de mitosis entre las algas rojas que deben ser tomados con mucha precaución, puesto que, todos tienen como finalidad establecer relaciones filogenéticas (Scott & Broadwater 1990).

El objetivo de esta parte del trabajo es estudiar si las carposporas responden a la luz y al glicerol de la misma manera que previamente lo han hecho los fragmentos de talo.

Por ello, abordaremos las implicaciones morfogenéticas de la luz y el glicerol sobre este nuevo material y, paralelamente si éstas están relacionadas con la acumulación específica de productos del metabolismo. Esto es importante, ya que, de encontrar implicaciones morfogenéticas por efecto de la luz sobre la fuente de carbono constituiría un efecto fotomorfogenético.

Las técnicas de microscopía óptica y electrónica permitirán el control de los efectos del glicerol.

V.2 MATERIAL Y METODOS

V.2.1 MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal, empleado en el seguimiento del desarrollo y la morfogénesis de Grateloupia doryphora en medios conteniendo glicerol, fueron esporas las cuales habían sido previamente liberadas espontáneamente en PES sólido según se describió en el capítulo III.

Los pretalos con una edad máxima de un mes se sembraron en medios sólidos PES 70 + 0.3 M glicerol y PES (control).

Las operaciones de recolección fueron realizadas en una cámara de flujo laminar Glatt Labortecnic y el material de laboratorio usado fue esterilizado previamente con un paso por autoclave y con flameado en alcohol en el interior de la cámara de flujo.

V.2.2 EFECTOS DEL GLICEROL Y LA LUZ SOBRE EL CULTIVO DE PRETALOS.

a) Efecto de las distintas concentraciones del glicerol con iluminación constante.

Se realizó un experimento dónde se estudiaba el efecto de distintas concentraciones de glicerol sobre el desarrollo de los pretalos a una intensidad de luz de $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Sylvania grolux) a nivel de las placas de Petri.

Las concentraciones de glicerol probadas fueron de 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 M. Con el fin de mantener la osmolaridad final de los medios de cultivo

en un valor aproximado entre 0.9-1 Osmol l⁻¹, los medios realizados fueron de PES 70 (0.2-0.3 M) y PES 90 (0.05-0.1 M). Los ensayos controles se establecieron cultivando en medios PES 70, PES 90 y PES.

Todos los medios de cultivo se establecieron por quintuplicados y con un número de pretalos asépticos entre 20 y 25 por placa.

Los pretalos fueron colocados en una cámara de cultivo marca Koxka, a una temperatura de 19 ± 2 °C y fotoperiodo 18 horas de luz: 6 horas de oscuridad.

b) Efecto de la luz en medios con glicerol a concentración constante.

Luz blanca.

Este ensayo fue realizado para evaluar el desarrollo de los pretalos crecidos en medios conteniendo glicerol (PES 70 + 0.3 M glicerol) bajo distintas intensidades de luz. Las intensidades de luz probadas fueron de 20, 40, 60 y 100 μE m⁻² s⁻¹.

Los pretalos, desarrollados de aquellas carposporas liberadas espontáneamente, fueron cultivados en cada una de las intensidades en medios PES y PES 70 (ensayos controles) y PES 70 + 0.3 M glicerol.

Los medios de cultivo también se establecían por quintuplicados y conteniendo 20-25 pretalos por placa.

Las condiciones de temperatura y fotoperiodo fueron las mismas que las anteriormente señaladas.

Luz azul y roja.

Este ensayo fue realizado para conocer el efecto que las distintas calidades de luz tenían sobre el crecimiento y desarrollo de los pretalos.

Para ello, los pretalos fueron sembrados en medios sólidos PES, PES 70 (controles) y PES 70 + 0.3 M glicerol en luz roja, azul y blanca como control, durante 12 días.

Cuando los cultivos se establecieron bajo las distintas calidades de luz se hicieron a una intensidad de $17.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tanto para la luz azul y roja, como para, la blanca pero sin fotoperiodo para obtener un efecto de calidad de luz pura.

La luz azul se obtuvo con fluorescentes Mazda fluor TF 36/18 y dos filtros tipo Plexi62 de 3 mm, mientras que, la luz roja fue obtenida con fluorescentes Mazda fluor TF 36/15 y un filtro tipo Plexi52 también de 3 mm.

El resto de las condiciones experimentales fueron las mismas de la luz blanca.

V.2.3 ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS PRETALOS EN MEDIOS PES 70 + 0.3 M GLICEROL.

El estudio del crecimiento y desarrollo fue seguido a las 2 y 6 horas de comenzar el cultivo, así como, al primer día, segundo, tercero, y sucesivamente hasta finalizar los 12 días de cultivo, en los cuales, se había determinado que se alcanzaba la morfogénesis máxima de los explantos en medios conteniendo glicerol (Robaina 1988). El control de ensayo fue establecido con pretalos de un mes de edad cultivados en medio PES.

Para ello se cultivaron 500 pretalos repartidos en 4 placas de Petri con medios sólidos PES 70 + 0.3 M glicerol. En cada uno de los tiempos descritos se recolectaron 25 pretalos y se colocaron en tubos Eppendorf donde eran fijados con una solución al 2.5% de glutaraldehído en tampón cacodilato al 0.1 M; infiltrados, para la microscopía óptica, en *Basic Resin* (Historesin Embedding Kit, marca registrada) e incluidos en Glicol Metacrilato (Gerrids & Smid 1983). A nivel electrónico fue necesario un paso de post fijación al 1% en OsO₄, seguido de la deshidratación en una serie alcohólica y la infiltración en óxido de propileno, para finalizar en la inclusión en Epon (para más detalle capítulo III).

V.3 RESULTADOS

V.3.1 EFECTOS DE GLICEROL Y LA LUZ SOBRE EL CULTIVO DE PRETALOS.

a) Efecto de las distintas concentraciones de glicerol con iluminación constante.

No se presentó ninguna diferencia de crecimiento y morfogénesis entre el material sembrado en los controles, PES, PES 90, PES 70.

Los pretalos transferidos a medios PES 70 +(0.2-0.3) M glicerol desarrollaron masas celulares o masas morfogénicas (*budding-masses*) con un diámetro superior a los 2 mm y con una elevada cantidad de nuevas proliferaciones (Foto V.1).

Estas masas se disgregaban con facilidad, en medios líquidos, dando lugar a fragmentos que regeneraban nuevas masas celulares. A los 50 días, de 4 *budding-masses* iniciales se habían formado 38 nuevas masas (Foto V.2).

En 12-15 días, los *budding-masses*, creciendo en PES 70 + 0.3 M glicerol, tanto en sólido como líquido, se volvían pálidos y terminaron decolorando completamente. La depigmentación de las masas se podía retrasar algunas semanas recultivando cada 6-7 días en nuevos medios o disgregando las masas celulares formadas. La depigmentación llegó a ser irreversible en la mayoría de los casos a partir de los 40 ó 50 días del comienzo del cultivo.

El recultivo de los *budding-masses* a medios sin glicerol permitió recobrar la pigmentación y la estructura de los pretalos en medios PES, pero, con un mayor número de yemas.

En medios PES 90 + (0.05-0.1) M glicerol, si bien se evidenció la misma manifestación morfogénica, ésta ocurre más tardíamente (aproximadamente 10 días después) que a concentraciones de 0.3 M.

b) Efecto de las diferentes intensidades de luz en medios con glicerol a concentración constante.

Luz blanca

En ninguna de las intensidades de luz experimentadas se presentaron diferencias entre el material sembrado en PES y el de PES 70.

Los pretalos, cultivados en medios PES 70 + 0.3 M glicerol a intensidades de 20 y 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, constituyeron masas celulares (Foto V.1), mientras que, en medios PES y PES 70 formaron talos jóvenes con 3-4 ejes de crecimiento, de apariencia similar que la descrita en el capítulo III (Foto III.2).

El material permaneció pigmentado y únicamente fue necesario los recultivos en medios conteniendo glicerol cada 8 ó 10 días para evitar la depigmentación la cual ocurrió a los 15-20 días de inicio del cultivo.

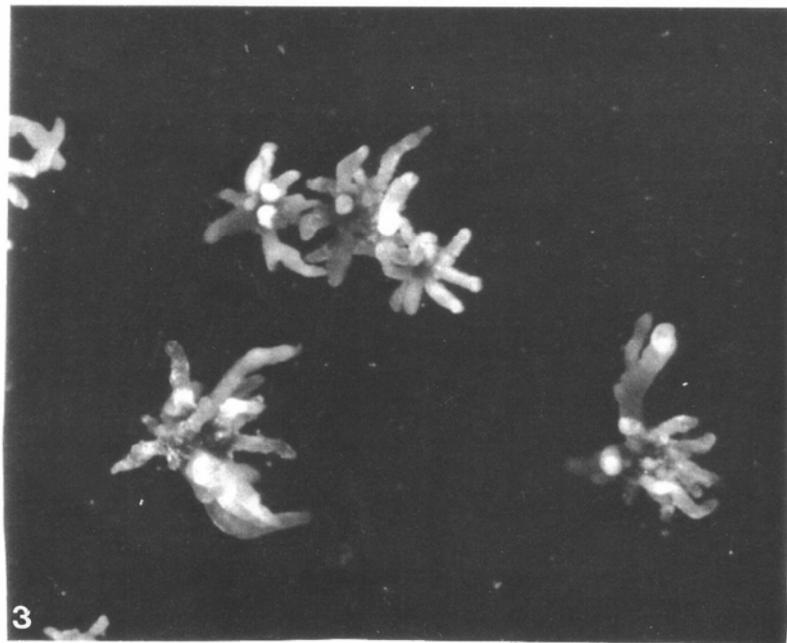
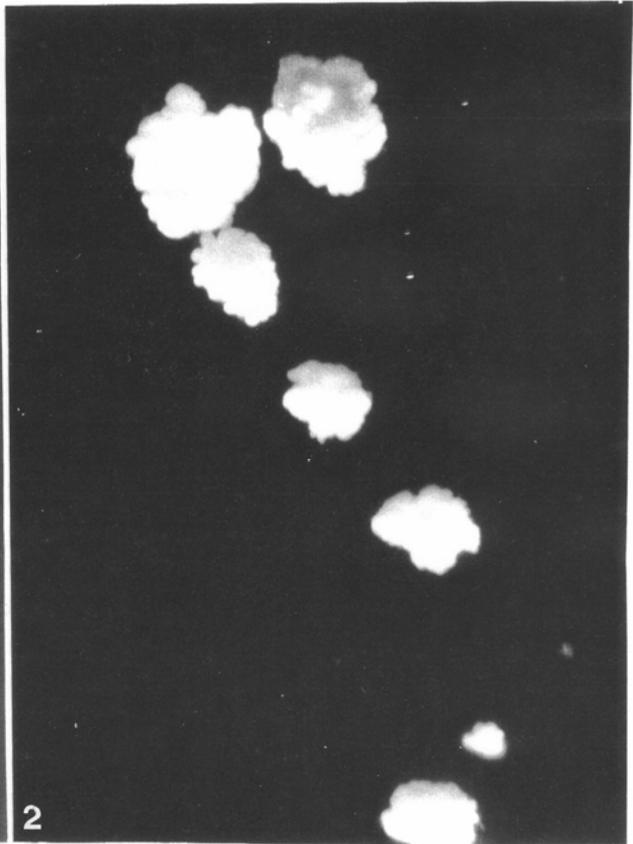
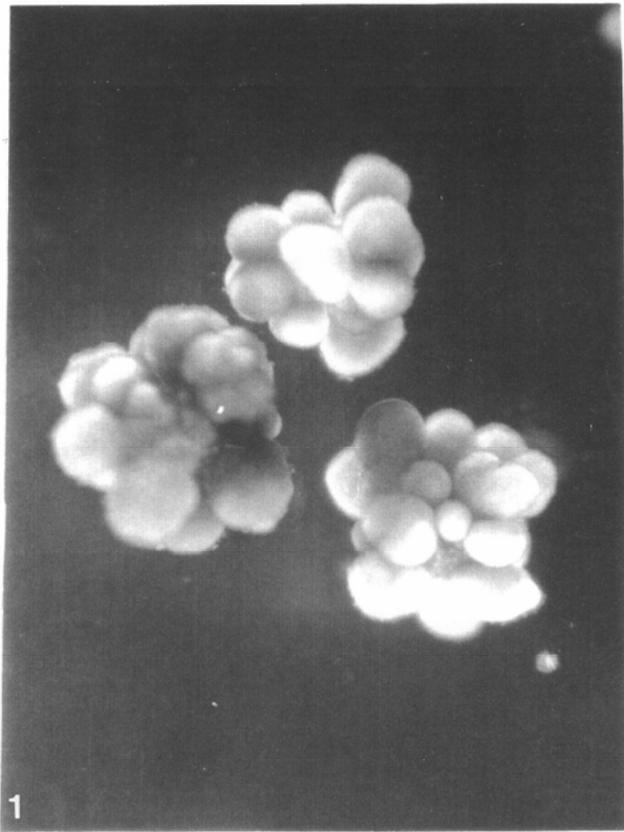
Al incrementar la intensidad de luz (60 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), el material cultivado en medios PES 70 + 0.3 M glicerol se depigmentó rápidamente y se hizo imprescindible reducir los periodos de tiempo del recultivo (5 días). Las masas celulares tuvieron un elevada friabilidad. Los nuevos fragmentos originados dieron lugar a otras masas con un elevado poder morfogénico.

A estas intensidades, en medios PES y PES70, los pretalos crecieron más lentamente y los yemas originadas fueron más cortas (Foto V.3). La transferencia a intensidades bajas de luz (20-30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) permite a los pretalos recuperarse y crecer y desarrollarse como lo hacen a tales irradiaciones.

Foto V.1 Masa morfo genética (*budding-masses*) de 14 días, cultivada en medio PES 70 + 0.3 M glicerol, fotoperiodo 18:6 e irradiación $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. x60.

Foto V.2 Nuevas masas morfo genéticas originadas por la disgregación de otra cultivada en las mismas condiciones experimentales que V. 1 . x60.

Foto V.3 Talos de **G. doryphora** cultivados a una elevada intensidad de luz (60 y $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y fotoperiodo 18:6 en medios PES. x60.



Luz roja y azul.

La mayoría de los pretalos (398 de un total de 500) cultivados en glicerol tendieron a la depigmentación durante los primeros 4 días en ambas calidades de luz probadas, a diferencia del control bajo luz blanca. No obstante, el material algal se recuperó completamente y comenzó a re-pigmentar primeramente en la zona más interna de la masa celular morfológica.

El material sembrado en PES, con luz continua y $17.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, presentó las mismas características que aquel cultivado en PES a $20\text{-}30 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en fotoperiodo 18 h luz: 6 h oscuridad. (Foto V.4).

En medios PES 70 + 0.3 M glicerol, el 75% de los pretalos cultivados (188 de un total de 250 por ensayo) en luz azul desarrollaron en 5 días masas morfológicas con un diámetro aproximado de 2 mm y con una elevada cantidad de yemas. Estas yemas se distinguieron de aquellas presentes en luz blanca por su engrosamiento.

Entre los 7 u 8 días de cultivo, a lo largo de estas yemas, se originaron pequeñas protuberancias en número de 4-5 por yema (Foto V.5). Estas protuberancias se disgregaron con enorme facilidad, siendo capaces de regenerar nuevas masas morfológicas por separado (Foto V.6). La depigmentación comenzó a ser visible en la zona externa del pretalo, así como, en los ápices de las yemas.

En 11 días, todas las masas decoloraban completamente y terminaron muriendo. La depigmentación no se pudo evitar ni tan siquiera recultivando a nuevos medios, aunque estos fueran sin fuente de carbono.

En experimentos donde se recultivó antes de la aparición de la depigmentación se encontró que la zona central del pretalo sufría un considerable alargamiento.

Bajo la acción de la luz roja, a los 5 días de cultivo se observó la elongación de las yemas emitidas por estas masas morfogénicas (2mm) junto con la emisión de otras nuevas. En ambos casos, todas tendieron a engrosarse y a emitir pequeñas protuberancias o verrugas (Foto V.7).

A los 11 días, en medios sólidos PES 70 + 0.3 M glicerol, estas protuberancias se separaron de la yema debido a su alta capacidad de friabilidad y constituyeron nuevas masas morfogénicas.

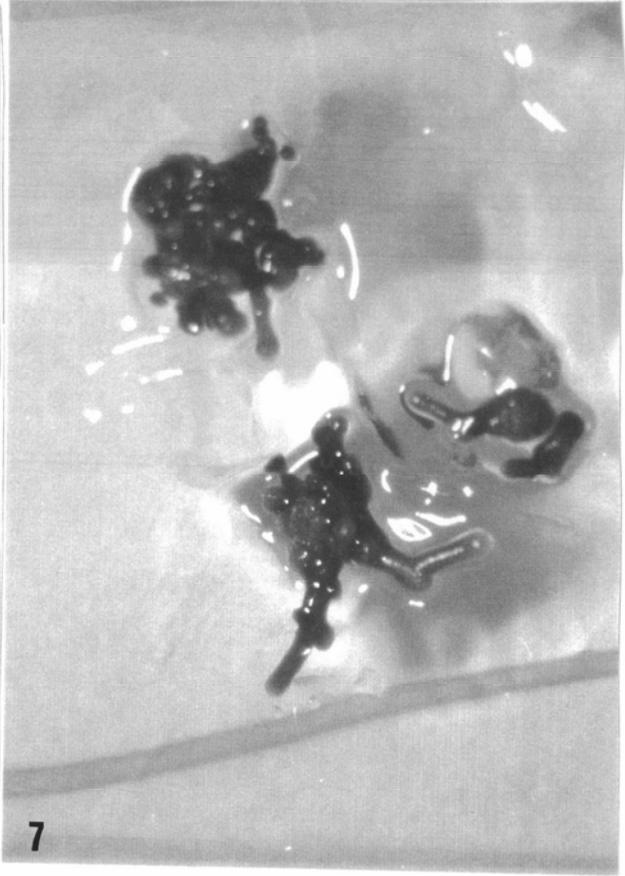
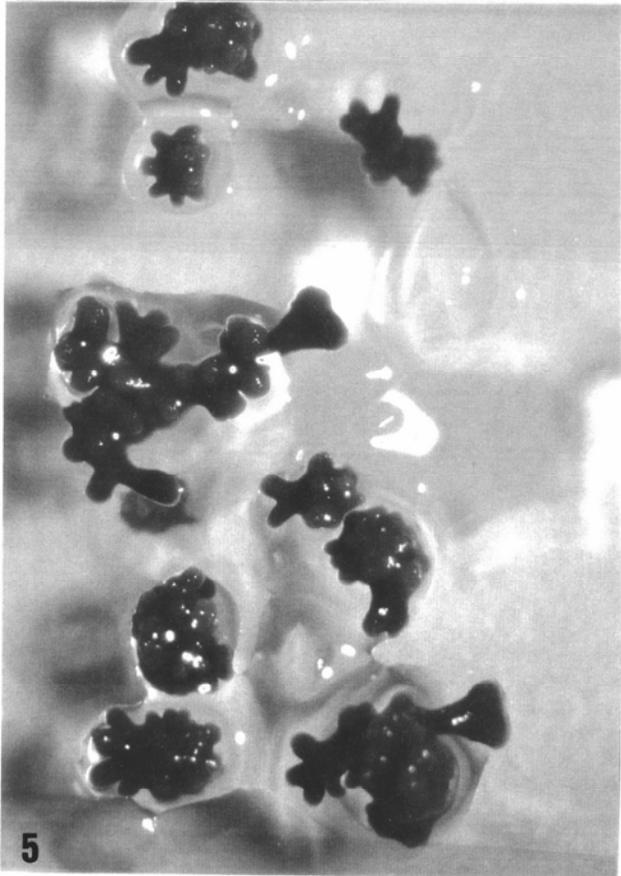
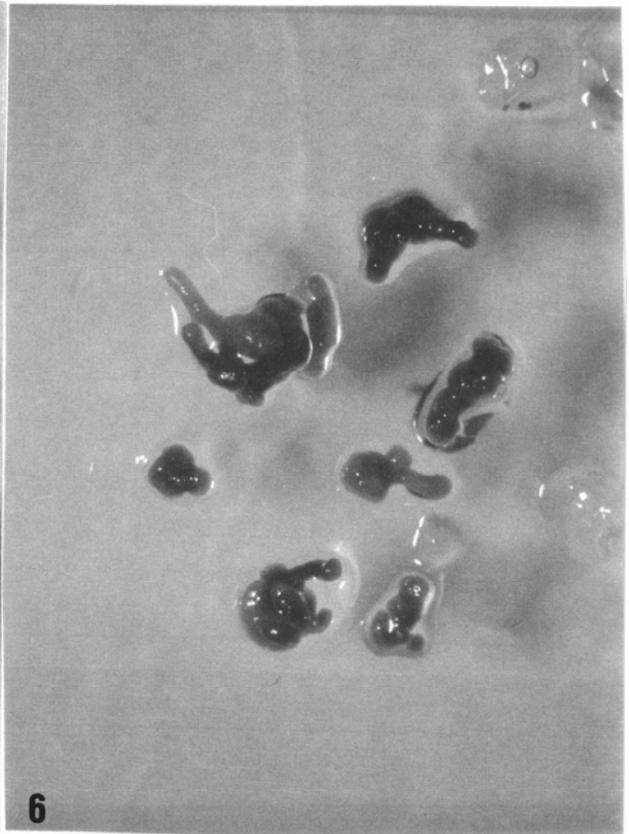
Este efecto se presentó con un retraso de aproximadamente 4 días en relación a lo acaecido en cultivos bajo la luz azul.

Foto V.4 Talo de G. doryphora de 1 mes de edad cultivado en medio PES sólido, bajo luz blanca continua, a una intensidad de $17.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. x60.

Foto V.5 Masas morfogenéticas (5-8 días de edad) cultivadas en medios sólidos PES 70 + 0.3 M glicerol a una intensidad de luz azul continua de $17.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nótese la gran cantidad de protuberancias o nódulos que se originaron por yema. x60.

Foto V.6 Disgregación de los nódulos adosados a las yemas. Cada uno de ellos será capaz de originar nuevas masas. x60.

Foto V.7 Masas morfogenéticas (5-8 días de edad) cultivadas en medios sólidos PES 70 + 0.3 M glicerol a una intensidad de luz roja continua de $17.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. x60.



V.3.2 ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS PRETALOS EN MEDIOS PES 70 + 0.3 M GLICEROL.

Las fotografías (V.8 a V.49) recogen el seguimiento al microscopio electrónico, y controles de microscopía óptica con tinción de azul de toluidina, de los pretalos en medios conteniendo glicerol, mostrándose correlativamente a fin de facilitar su comparación.

a) Ultraestructura celular

Plastidios.

Los plastidios se encuentran bien desarrollados, con los tilacoides dispuestos paralelamente unos a otros (Fotos V.13, V.26). También es posible visualizar la presencia de plastoglóbulos (Fotos V.26, V.40), ficobilisomas (Foto V.13, V.49) y áreas transparentes a los electrones las cuales representan zonas de ADN (Fotos V.46).

Esta disposición se mantiene durante todo el tiempo que dura el seguimiento en las células isodiamétricas internas, mientras que, en las ovoidales externas se produce la degeneración celular completa.

Cuerpos osmofílicos.

La presencia de cuerpos osmofílicos, muy probablemente de naturaleza lipídica a juzgar por la coloración oscura que toman al ser teñidos con azul de toluidina y por la naturaleza de la fuente de carbono, se mantiene a lo largo de todo el seguimiento realizado, tanto en células internas como en aquellas

situadas exteriormente (Foto V.14, V.24). No obstante, cabe destacar la gran superficie que estos cuerpos osmofílicos llegan a ocupar en las células internas a medida que transcurre el cultivo en medios conteniendo glicerol (Fotos V.14, V.19, V.39, V.44).

La posible fusión de pequeñas gotas lipídicas para formar estas "enormes" vacuolas provoca el arrinconamiento de los granos de almidón y plastidios hacia la periferia celular, al mismo tiempo que, acentúa, aún más, las diferencias entre los tipos celulares descritos en medios PES. En estos estadios finales podríamos hablar de células internas que sintetizan, o al menos, acumulan lípidos en presencia del glicerol.

Dictiosomas.

La estructura de los dictiosomas es similar a la encontrada en la mayoría de las algas rojas (Tsekos 1981). A nivel ultraestructural están compuestos de una zona central densa con 3-5 cisternas delgadas que se ensanchan en los extremos (Fotos V.14, V.30).

El número de dictiosomas incrementa a medida que transcurre el tiempo de cultivo en PES 70 + 0.3 M glicerol.

Los dictiosomas producen 2 tipos de vesículas cuyos contenidos mucilaginosos favorecen el engrosamiento de la pared celular. Las vesículas de Golgi se forman lateralmente y en la posición trans, mientras que, las vesículas de transición tienen lugar en la cara cis del dictiosoma (Foto V.30). Estas vesículas pueden encontrarse asociadas a ribosomas.

Ambas vesículas emigran a la periferia citoplasmática y su contenido es secretado por exocitosis, favoreciendo la deposición de la nueva pared celular o el engrosamiento de la misma. Estas vesículas también pueden llegar a fusionarse formando otras de mayor tamaño.

Usando las tinciones específicas para microscopía óptica se observa que el componente mucilaginoso de la pared celular da una reacción positiva para polisacáridos (PAS) (Foto V.54), mientras que, es débilmente teñido con la tinción de proteínas.

b) División celular.

El primer aspecto notable que pudimos observar con el seguimiento histológico en medios PES 70 + 0.3 M glicerol fue la alta capacidad de división celular con tan sólo 2 horas en presencia del glicerol (Fotos V.8, V.9).

Las células internas, así como, las pertenecientes a la zona intermedia y comienzo de la externa se dividen repetidamente en un mismo plano dando lugar, éstas últimas, a una capa subcortical mucho más engrosada que la observada en los pretalos procedentes de medios PES y de mayor espesor a medida que transcurre el cultivo en glicerol (Fotos V.50, V.51, V.52).

Ultraestructuralmente, esta enorme actividad mitótica quedó reflejada por la presencia de núcleos los cuales se encuentran en la última profase y comienzo de la prometafase (Davis & Scott 1986). Los núcleos celulares alteran su forma esférica normal en PES (ver foto III.13, cap. III) a otra más ovalada (Foto V.12). El nucleólo aparece menos compacto (Foto V.12) y ya en momentos más avanzados del cultivo en glicerol es posible observar incluso el núcleo completamente dividido (Foto V.21).

La división celular va disminuyendo en las células más internas a medida que se produce la deposición de nuevas capas celulares, en favor de aquellas situadas hacia el exterior y que conformaban la capa subcortical la cual llega a soportar la división celular (Foto V.28). Este hecho genera diferencias en

el patrón de tinción específica que no se producían en PES, como el que se observa para proteínas (Foto V.53).

En estadios más avanzados, los pretalos tienen del exterior al interior: la cutícula, la zona cortical, la subcortical de células elongadas y bastante engrosadas y la zona de células internas (Foto V.52), muy similares a los cultivados en PES (Foto III.7) pero las capas celulares de los cultivos con glicerol aparecen más estratificadas y contrastadas.

La citocinesis se inicia por la formación de pequeños canales o invaginaciones laterales y concluyen cuando cruzan la célula completamente hasta dividirla en dos (Fotos V.15, V.19). Las dos células hijas quedan conectadas por puntuaciones (*pit-connections*) (Foto V.20).

La nueva pared celular se completa por acción de los dictiosomas, cuyas vesículas expulsan el contenido al exterior (Fotos V.15, V.24, V.36).

Las puntuaciones probablemente degeneran y desaparecen a medida que las células hijas adquieren capacidad de división en posteriores ocasiones. Sin embargo, hemos recogido situaciones donde se están produciendo nuevas divisiones citoplasmáticas sin que estas uniones hayan desaparecido (Fotos V.19, V.36). Esto bien podría ser explicado por la activación mitótica que causa el glicerol o bien que la secuencia de división nuclear-citocinesis-*pit connections* descrita por numerosos autores (ver la revisión de Davis & Scott 1986) no es el modelo aplicable en algas rojas ya multinucleadas.

c) Formación de yemas.

En medios PES 70 + 0.3 M glicerol la disposición celular en la yema se caracterizó por la ausencia de la capa medular constituida por células estrelladas y filamentosas. En su caso, fue normal observar células dispuestas concéntricamente y muy compactadas (Foto V.23, V.33), con un alto grado de

división en un sólo plano. Las capas celulares convergieron hacia la zona dónde se originó la protuberancia sin perjuicio para el mantenimiento de la concentricidad. Estas observaciones nos permite suponer que en medios PES 70 + 0.3 M glicerol no existen yemas en sentido estricto (Foto V.55) tal y como fueron definidas para un medio PES donde si aparecen las células filamentosas (Foto III.17, capítulo III).

Histoquímicamente, los polisacáridos neutros se distribuyeron en gradiente, aumentado su presencia hacia las células que conforman el interior del pretalo. Las células de la capa subcortical, que mantienen la división celular y por consiguiente la formación de las protuberancias, tienen mayor cantidad de granos de almidón aunque éstos también están dispersos por todas las células del pretalo.

Paralelamente con la formación de nuevas protuberancias o brotes en los pretalos, el tamaño de los granos de almidón disminuye (Foto V.31, V.38, V.45) a medida que transcurre el cultivo en glicerol. Este hecho ha sido corroborado al observar, a través de microscopio de luz polarizada y usando el sistema de cruces (Tsekos 1985), los granos de almidón los cuales aparecen deformados a medida que pasa el tiempo. A nivel de microscopía óptica, se refleja en la zona de acumulación de éstos una tinción más débil utilizando tanto la reacción de PAS como la de I/IK.

Foto V.8 Sección semifina de 1.5 μm teñida con azul de toluidina, mostrando un campo de células de la zona intermedia-externa de un protalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol sólido durante 2 horas.

Las flechas indican los lugares donde probablemente comience la citocinesis. x140.

Foto V.9 Células del interior de un protalo cultivado en medios conteniendo glicerol durante 2 horas. Sección semifina de 1.5 μm teñida con azul de toluidina. x140.

Foto V.10 Sección de la región externa de un protalo cultivado en medios conteniendo glicerol durante 2 horas. Nótese la formación de una nueva pared celular y las vesículas de Golgi descargando su contenido en la pared (flechas). x17250.

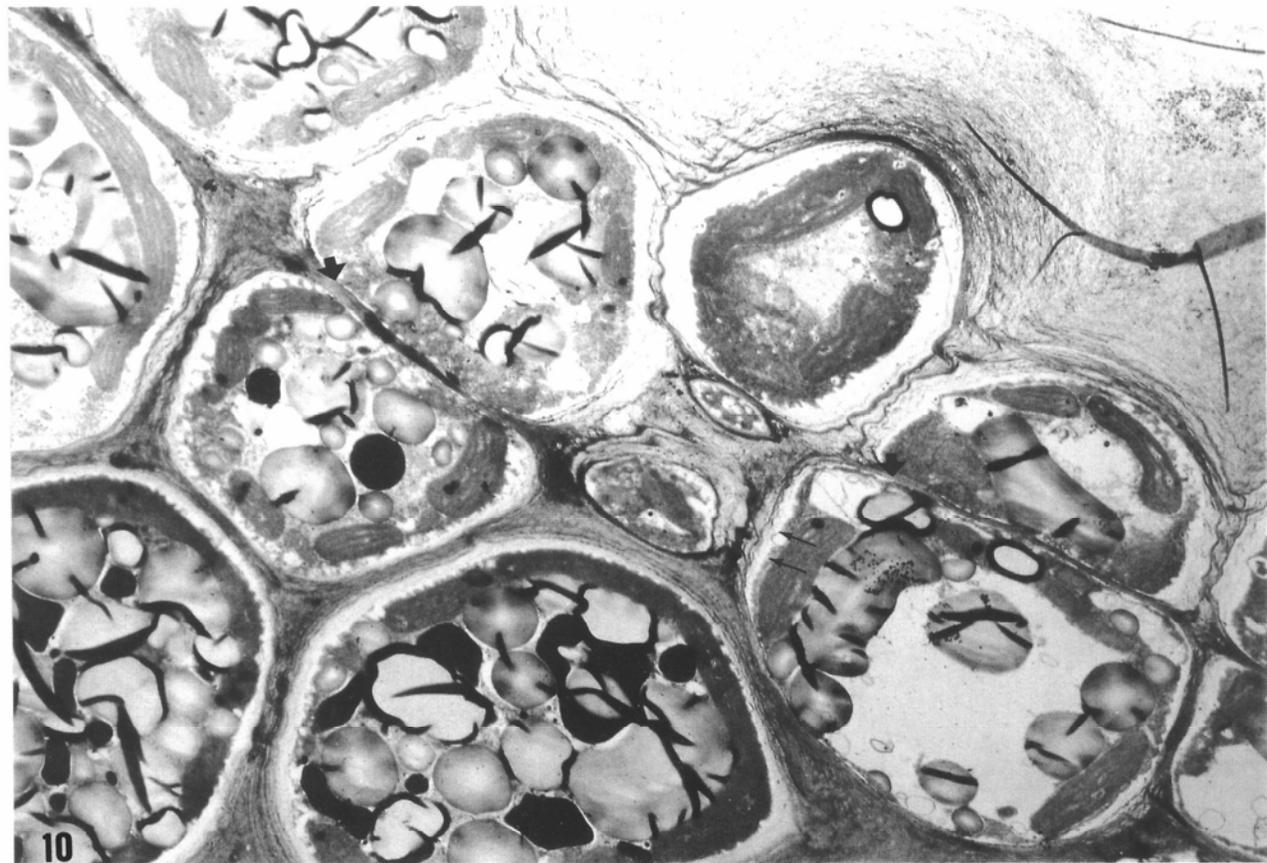
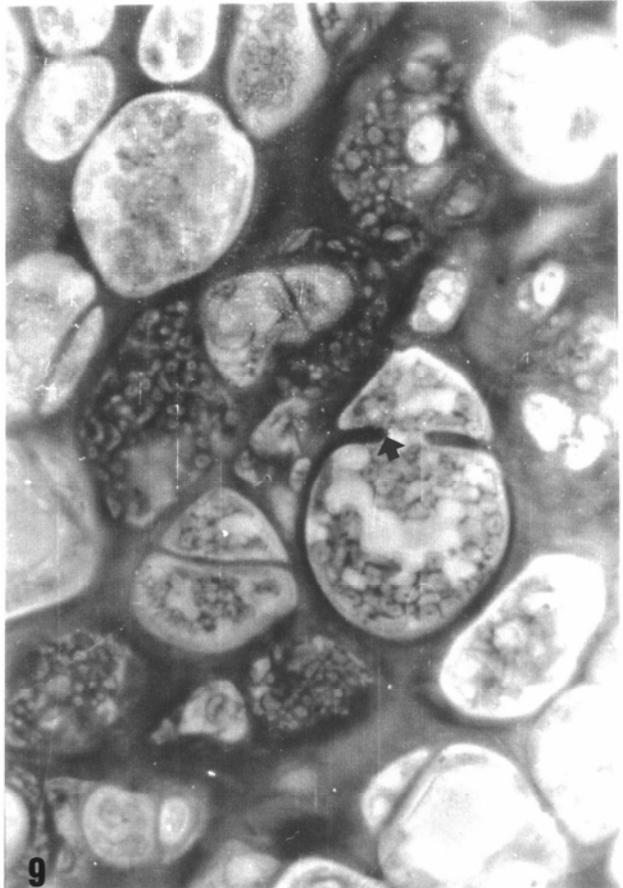
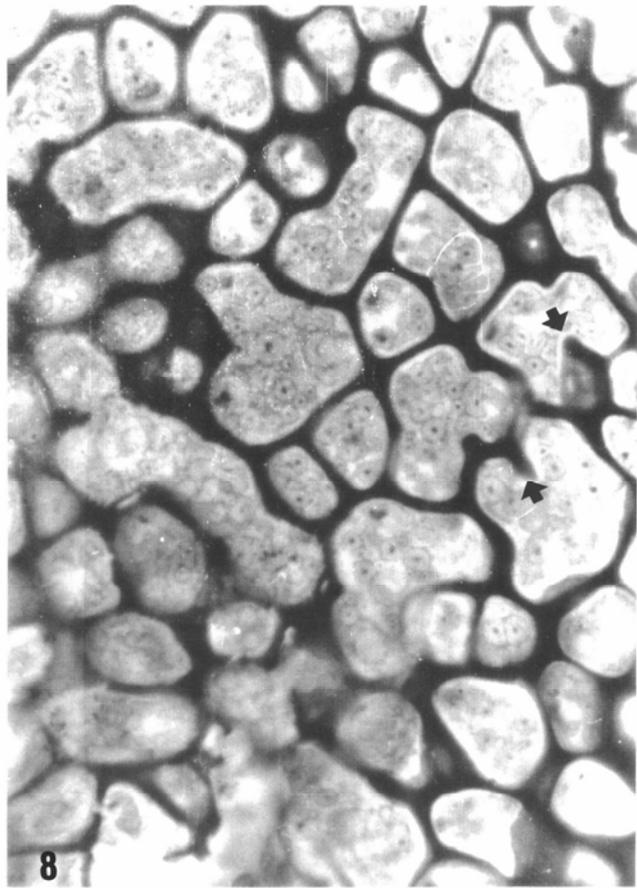


Foto V.11 Detalle intracelular de la foto V.10. Nótese cómo los dictiosomas (asteriscos) están produciendo vesículas las cuales descargarán su contenido en la pared. x20000.

Foto V.12 Parte de una célula del interior de un protalo creciendo en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 2 horas.

Nótese la presencia de almidón (a), mitocondrias (m), cuerpos osmofílicos (co) y un núcleo probablemente en la última etapa de la profase o comienzo de la prometafase. x15350.

Foto V13 Parte de un cloroplasto de la célula interna anterior. Nótese como los tilacoides están dispuestos paralelamente. x22000.

Foto V.14 Sección interna de un pretalo crecido en glicerol durante 2 horas. De destacar los numerosos granos de almidón (a) y los cuerpos osmofílicos (co) los cuales parecen fusionarse (comparar con la foto III.14).

x4000

Foto V.15 Células externas de un pretalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 2 horas. La célula superior de la fotografía muestra la formación de una nueva pared, mientras que, la célula inferior muestra el comienzo de la invaginación que dará lugar a 2 células hijas. Nota la gran cantidad de vesículas de Golgi en la periferia de las células. x6850.

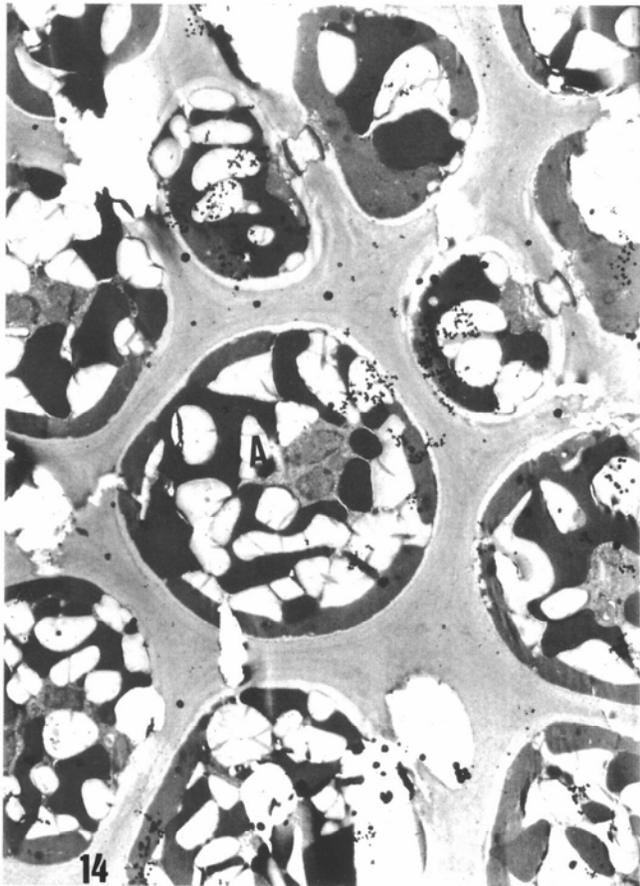
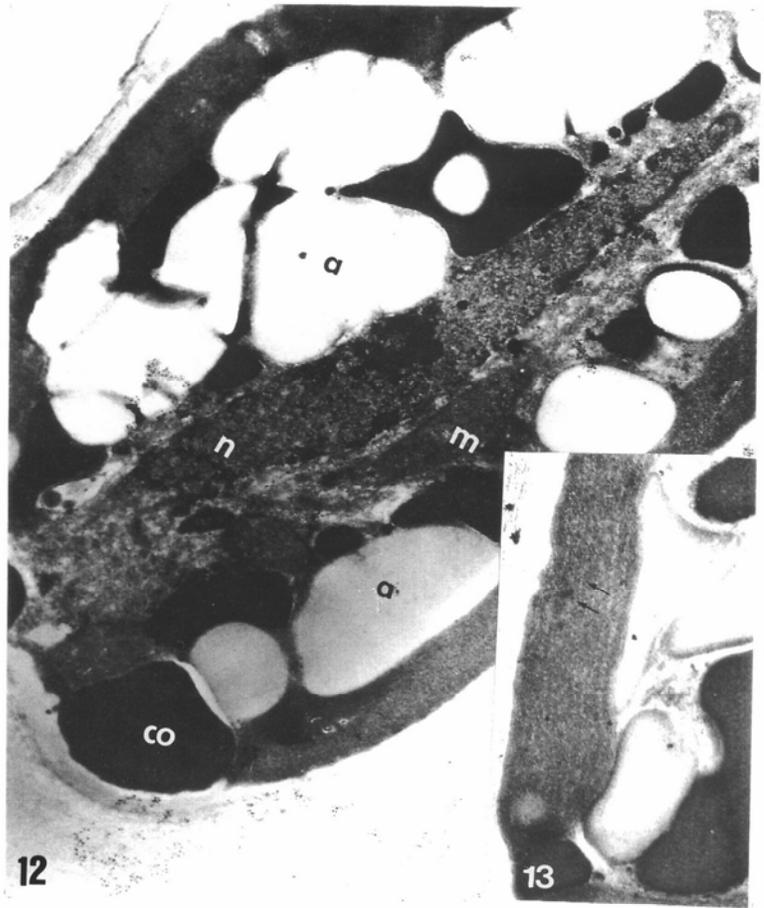


Foto V.16 Sección semifina de 1.5 μm teñida con azul de toluidina mostrando un campo celular externo de un pretalo cultivado durante 6 horas en presencia del glicerol.

Las puntas de las flechas indican los canales laterales o invaginaciones que se están produciendo y las flechas la formación de la pared celular. x130.

Foto V.17 Sección semifina, de 1.5 μm teñida con azul de toluidina de un pretalo crecido en medios conteniendo glicerol durante 6 horas.

Nótese el mayor tamaño de las células del interior (capa medular) en contraste con las externas (capa cortical). x60.

Foto V.18 Sección externa de un pretalo cultivado en las mismas condiciones que la foto anterior. Son visibles la gran cantidad de vesículas de Golgi en la periferia de la célula. x17000

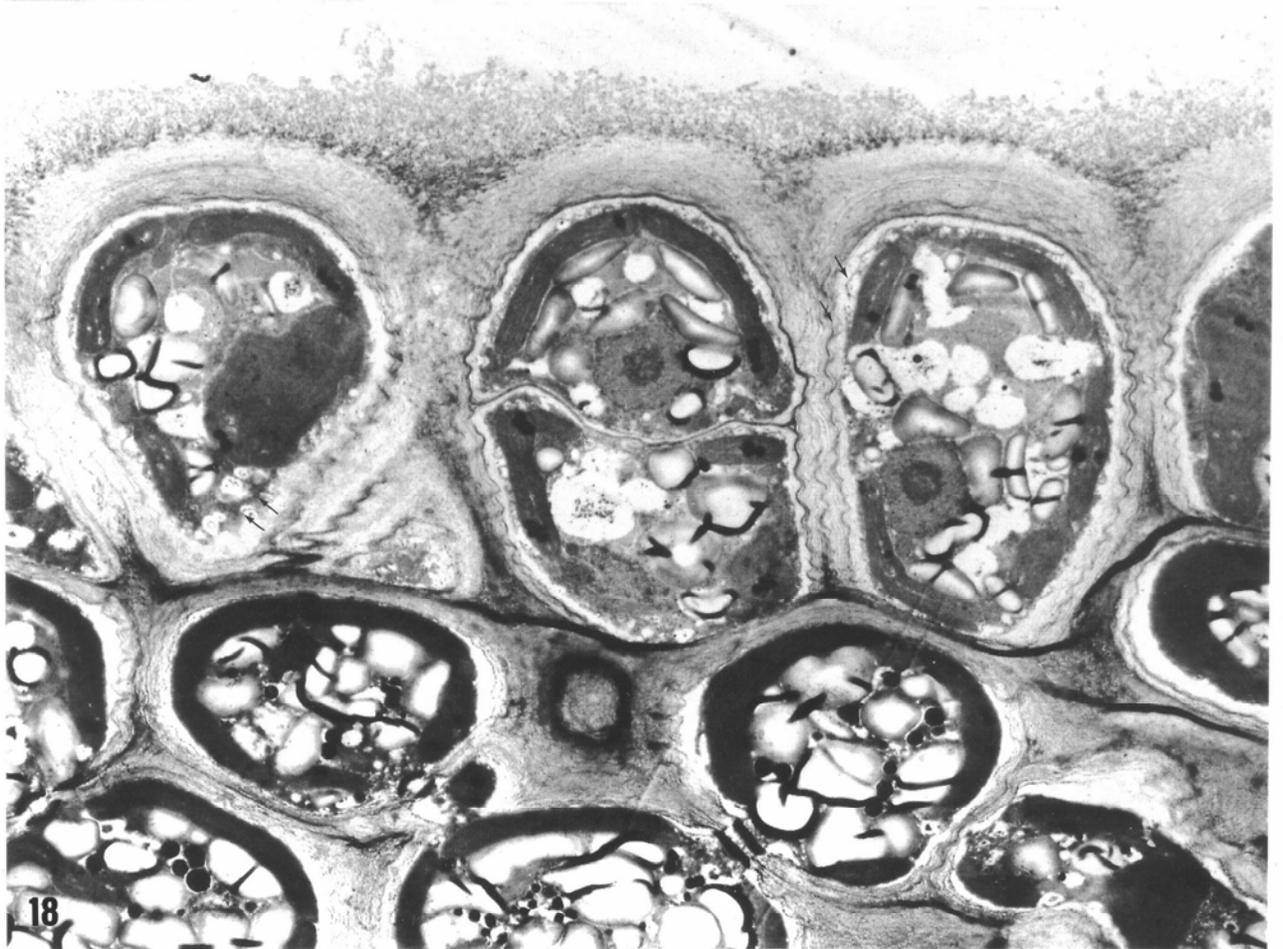
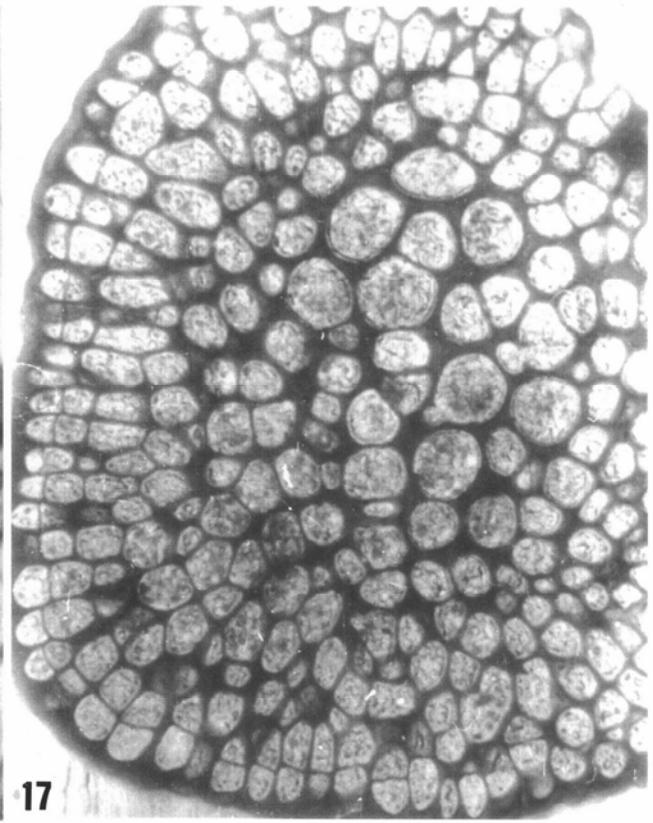
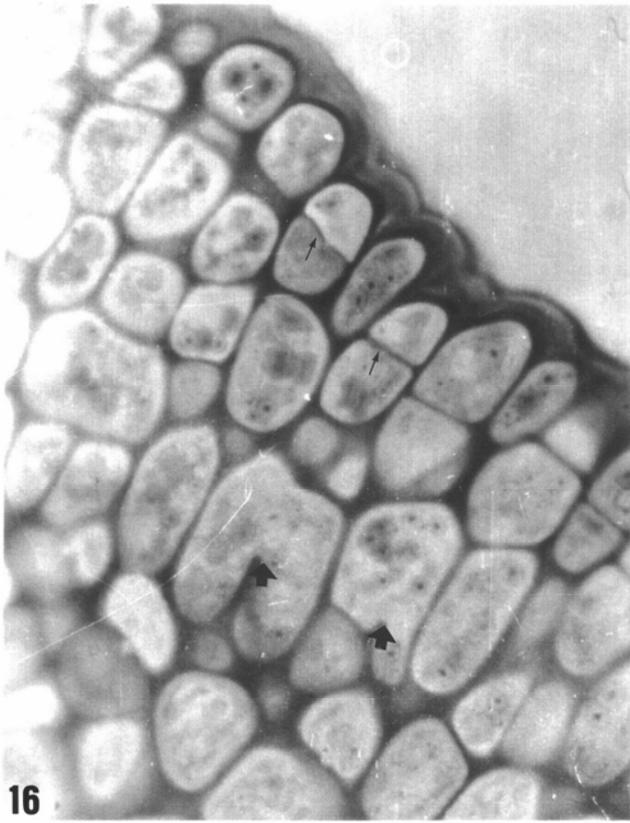


Foto V.19 Pretalo cultivado durante 6 horas en PES 70 + 0.3 M glicerol. 3 células internas unidas por puntuaciones (*pit-connections*), al mismo tiempo, que una de ellas sufre citocinesis. x5400.

Foto V.20 La misma situación que la anterior, pero compara el diferente grado de asociación entre los cuerpos osmofílicos de ambas fotografías. x5400.

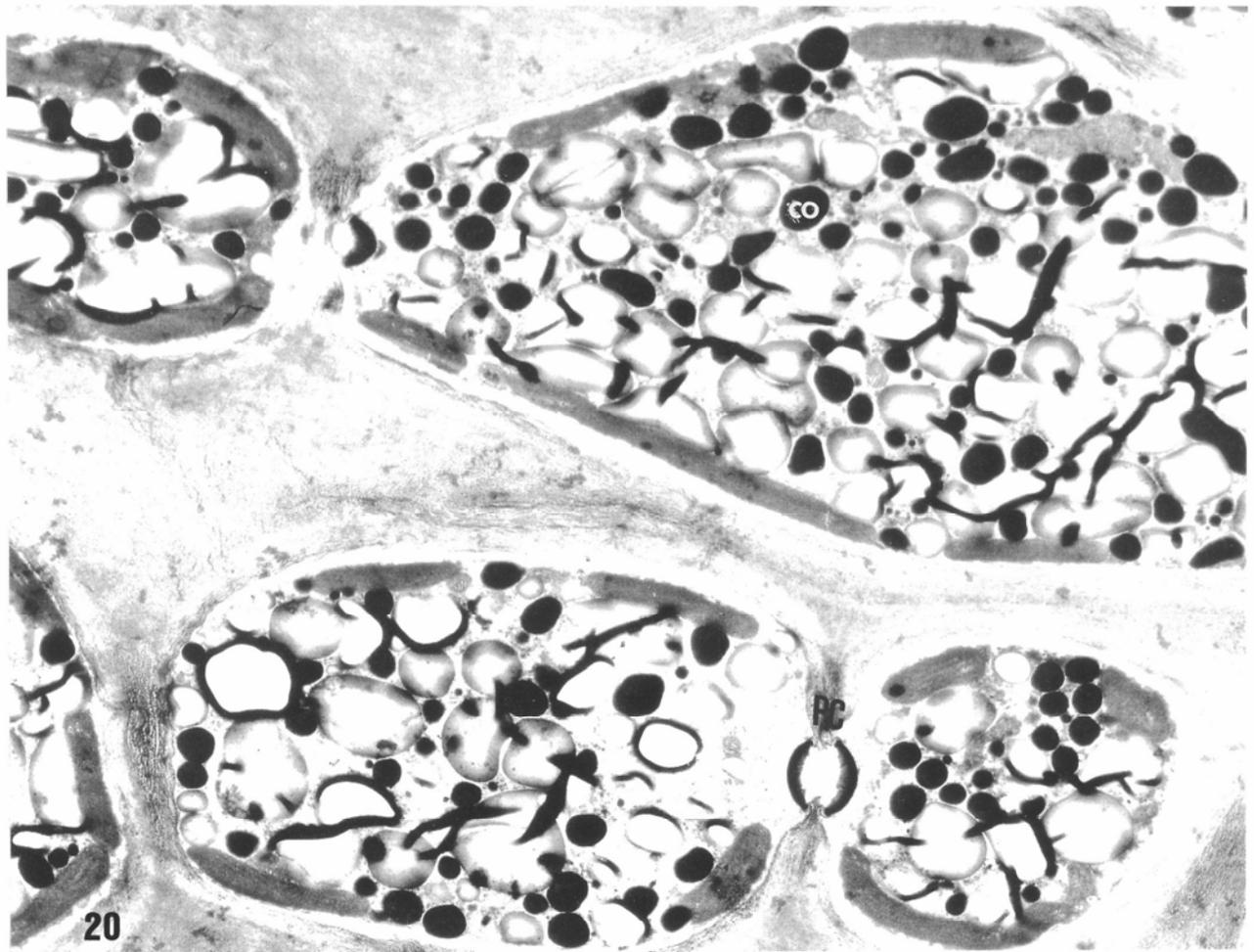
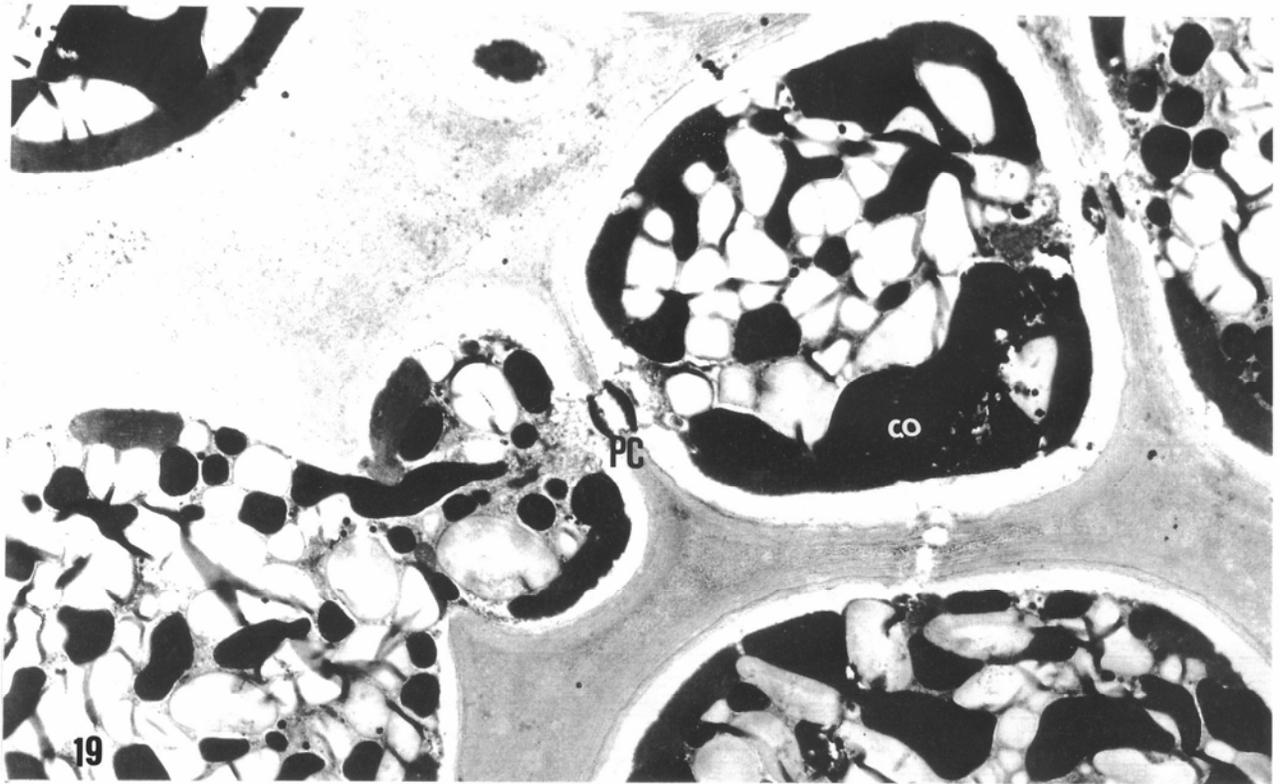
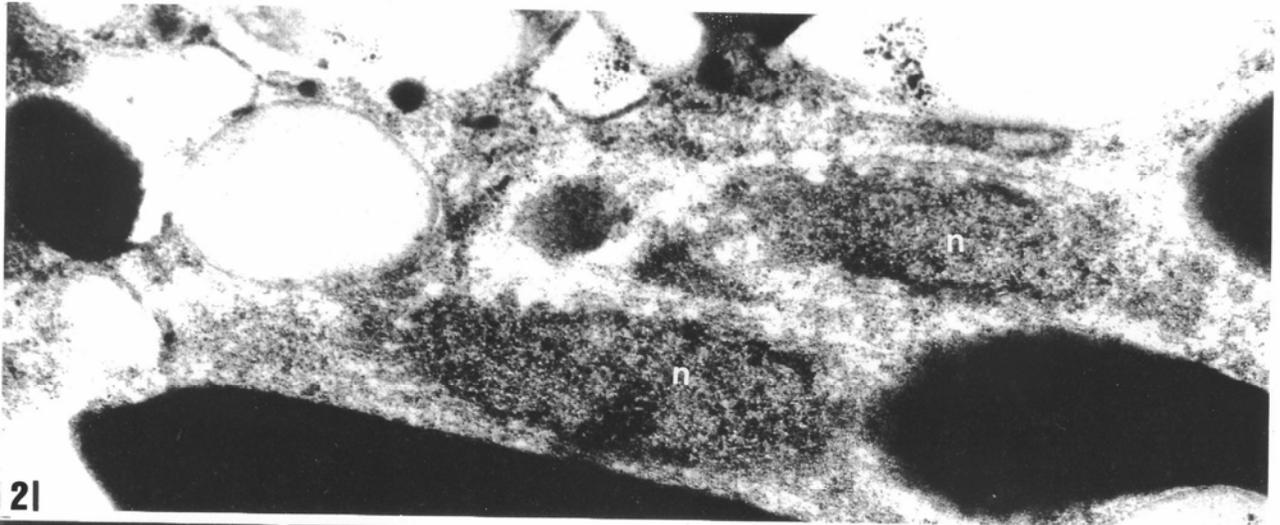


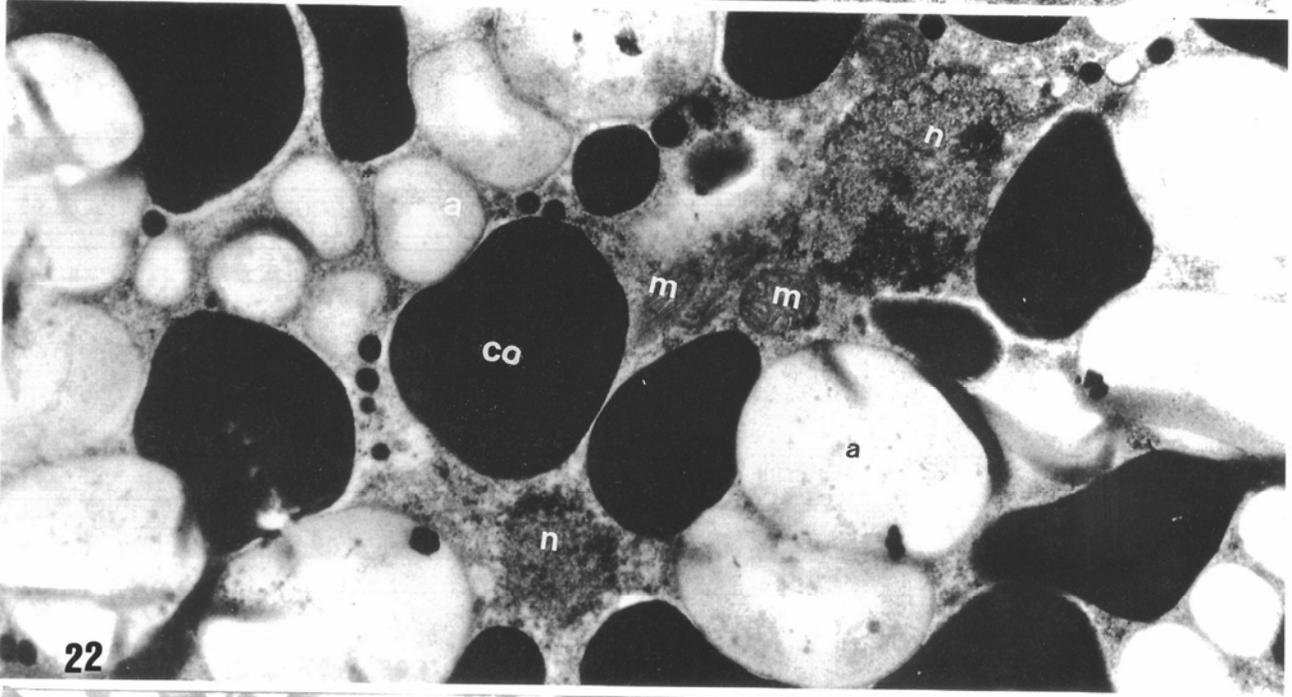
Foto V.21 Pretalo cultivado en glicerol durante 6 horas y mostrando cierta actividad celular. La división nuclear "podría" encontrarse en la telofase. x22000.

Foto V.22 Campo intracelular de una célula interna de un pretalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 6 horas. Nótese la presencia de mitocondrias (m), 2 núcleos (n), granos de almidón (a) y cuerpos osmofílicos (co). x22000.

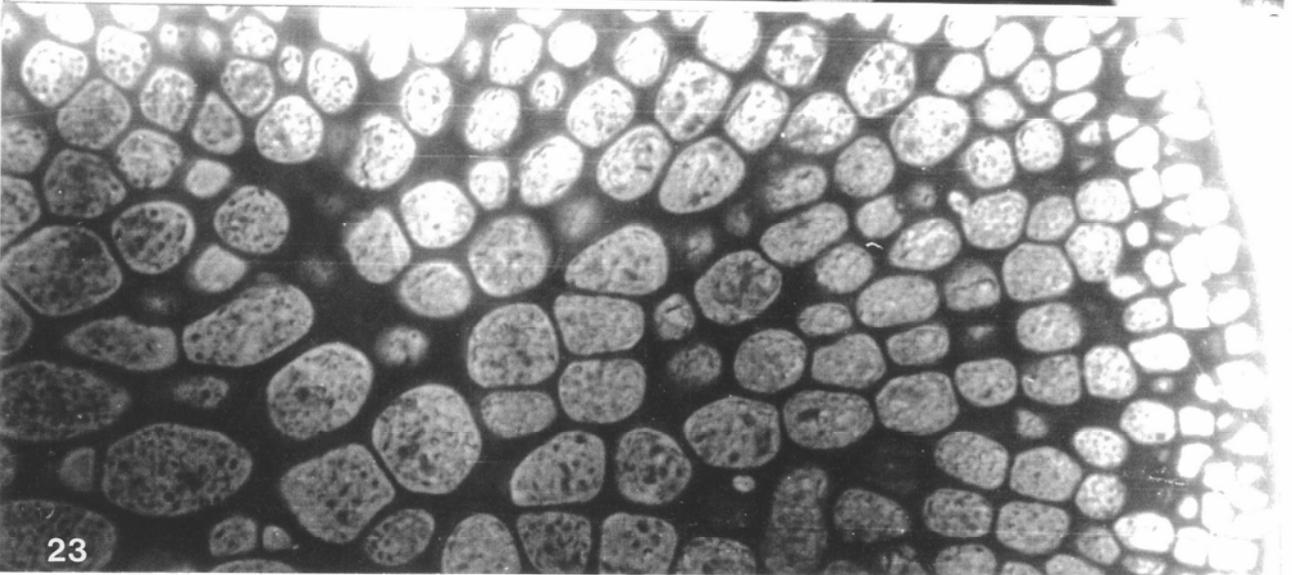
Foto V.23 Sección (1.5 μm) de un pretalo cultivado en medios conteniendo glicerol durante 1 día. x200.



21



22



23

Foto V.24 Sección de la zona exterior de un pretalo cultivado en glicerol durante 1 día. Visibles son los granos de almidón (a), los cuerpos osmofílicos (co) y las vesículas de Golgi, cerca de la periferia celular (flechas). x7700.

Foto V.25 Célula de un pretalo de 1 día en medios conteniendo glicerol. Nota 4 vesículas de Golgi (puntas de flechas) en la superficie celular. x10000.

Foto V.26 Sección de una célula del interior perteneciente a un pretalo de 1 día en medios PES 70 + 0.3 M glicerol. Visibles son las mitocondrias (m), granos de almidón (a), núcleos (n) y cloroplastos (c) con ficobilisomas (puntas de flechas) y plastoglóbulos (p). Además nótese que los tilacoides siguen manteniéndose paralelos entre sí. x20000.

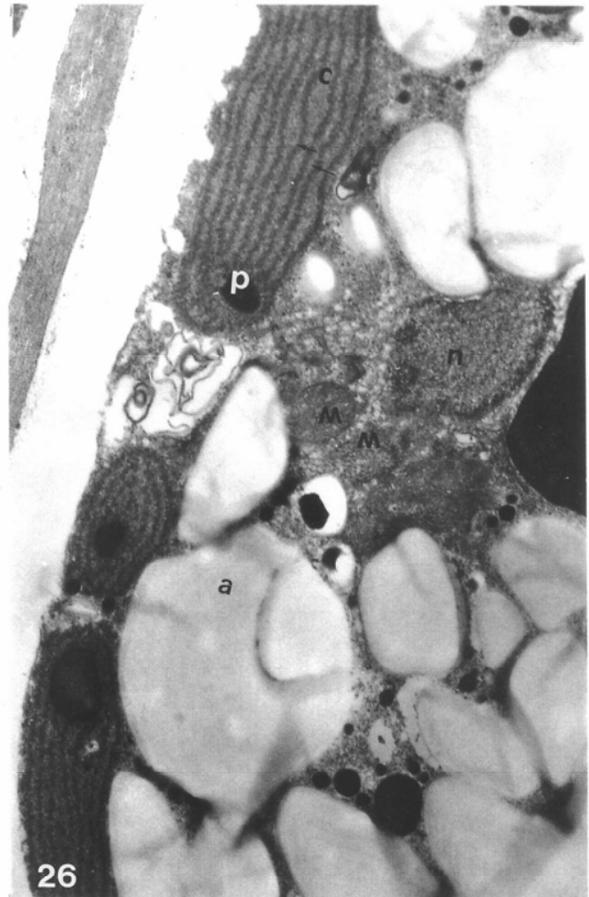
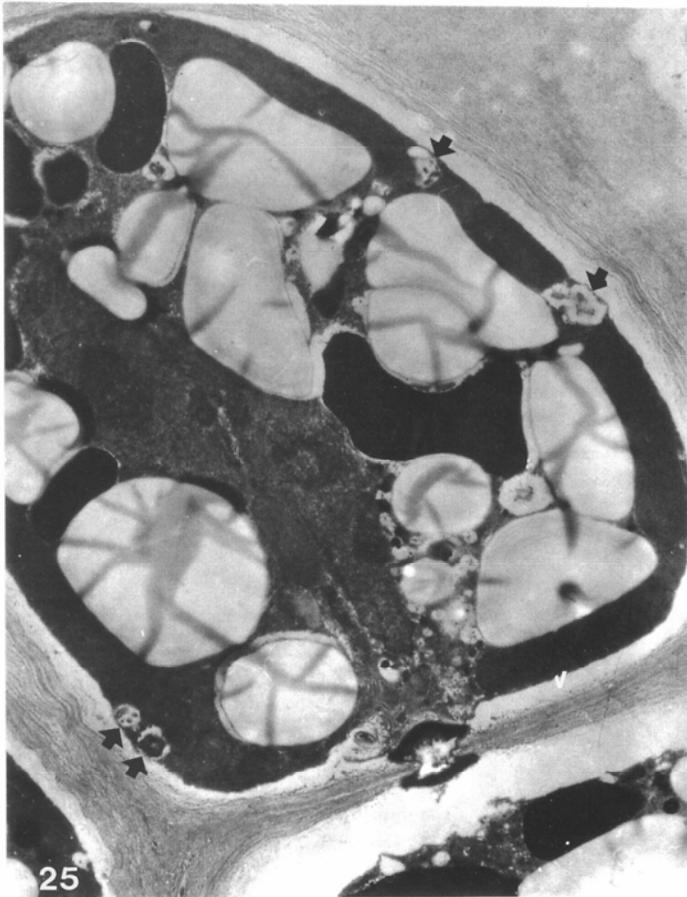
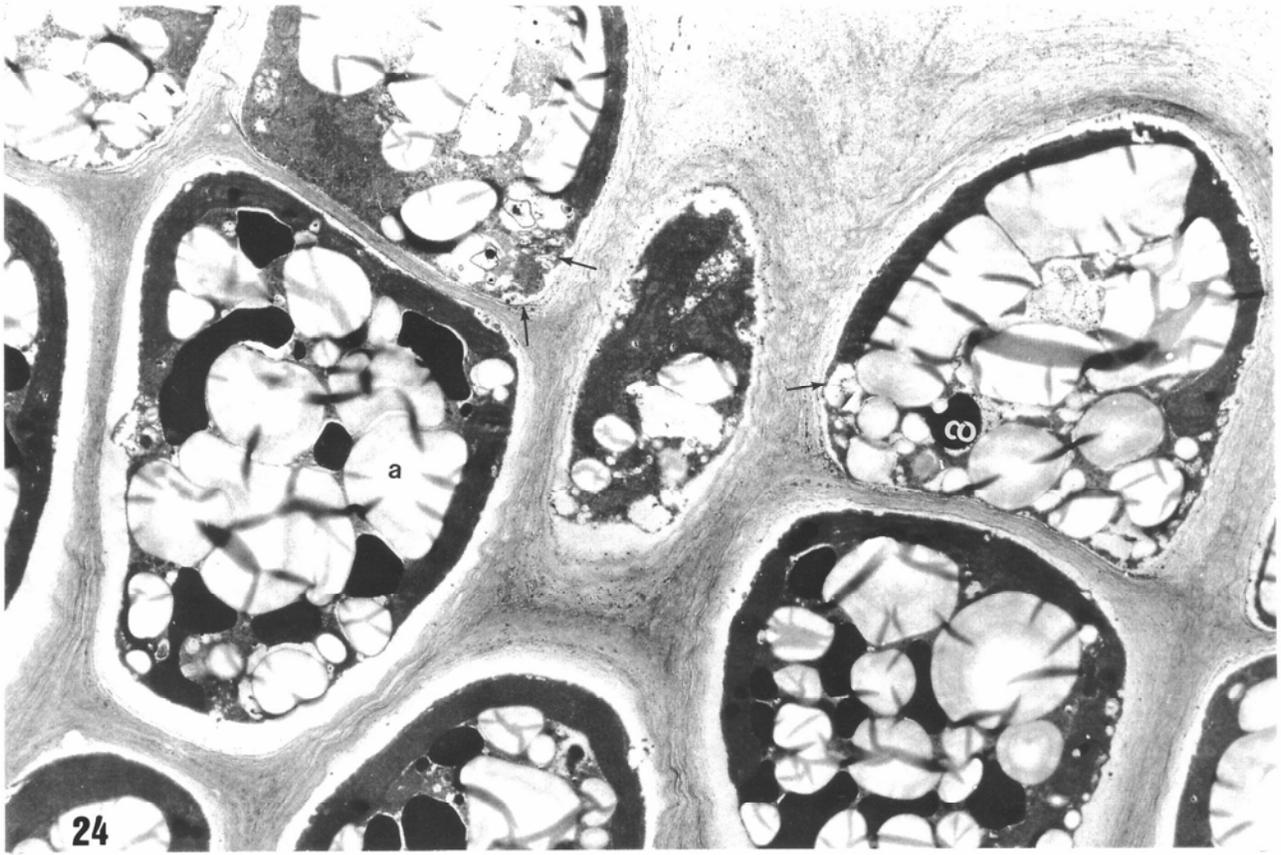
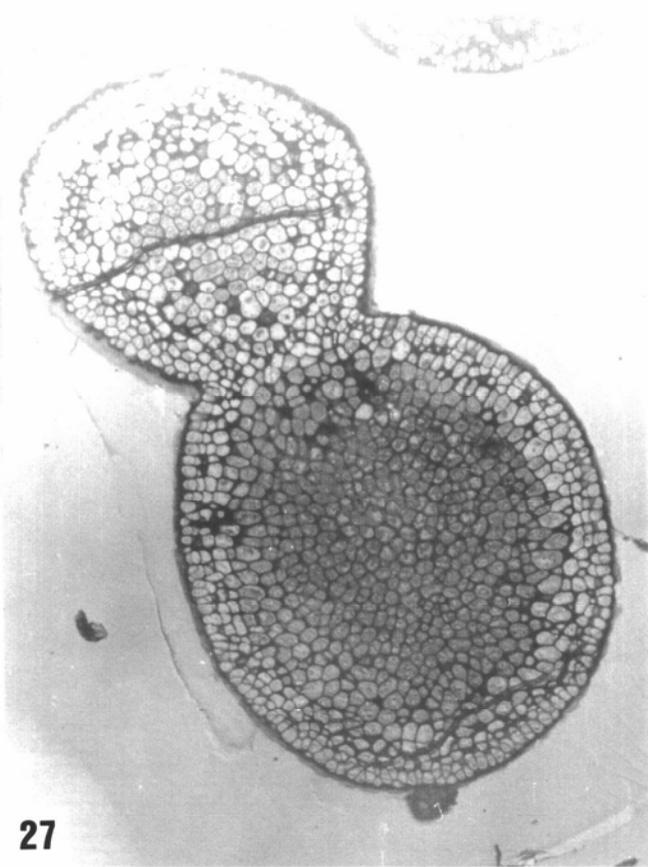


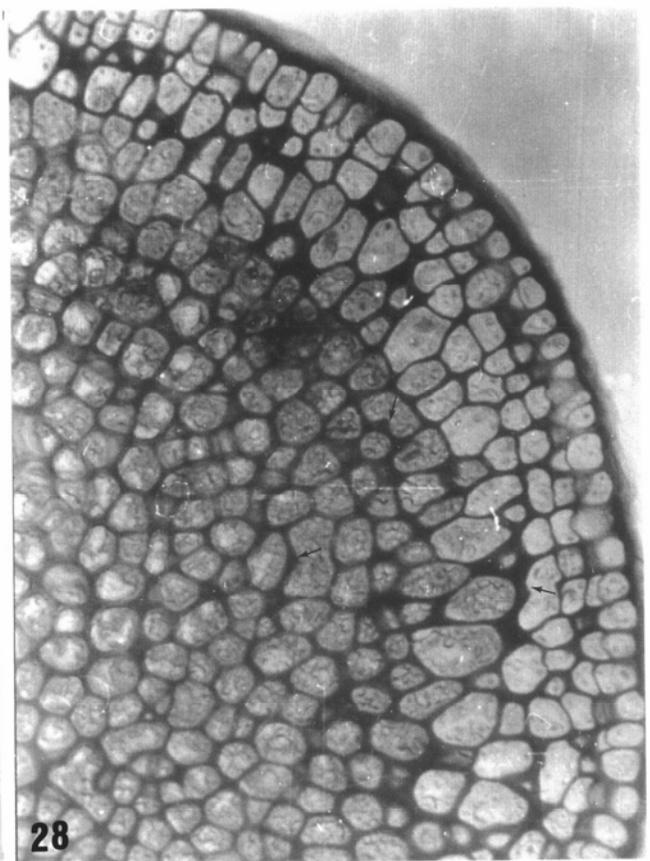
Foto V.27 Formación de protuberancia en un pretalo creciendo en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 3 días. Sección semifina de 1.5 μm y teñida con azul de toluidina. x60.

Foto V.28 Campo celular del pretalo anterior. Las flechas marcan las zonas probables para el comienzo de la citocinesis. x100.

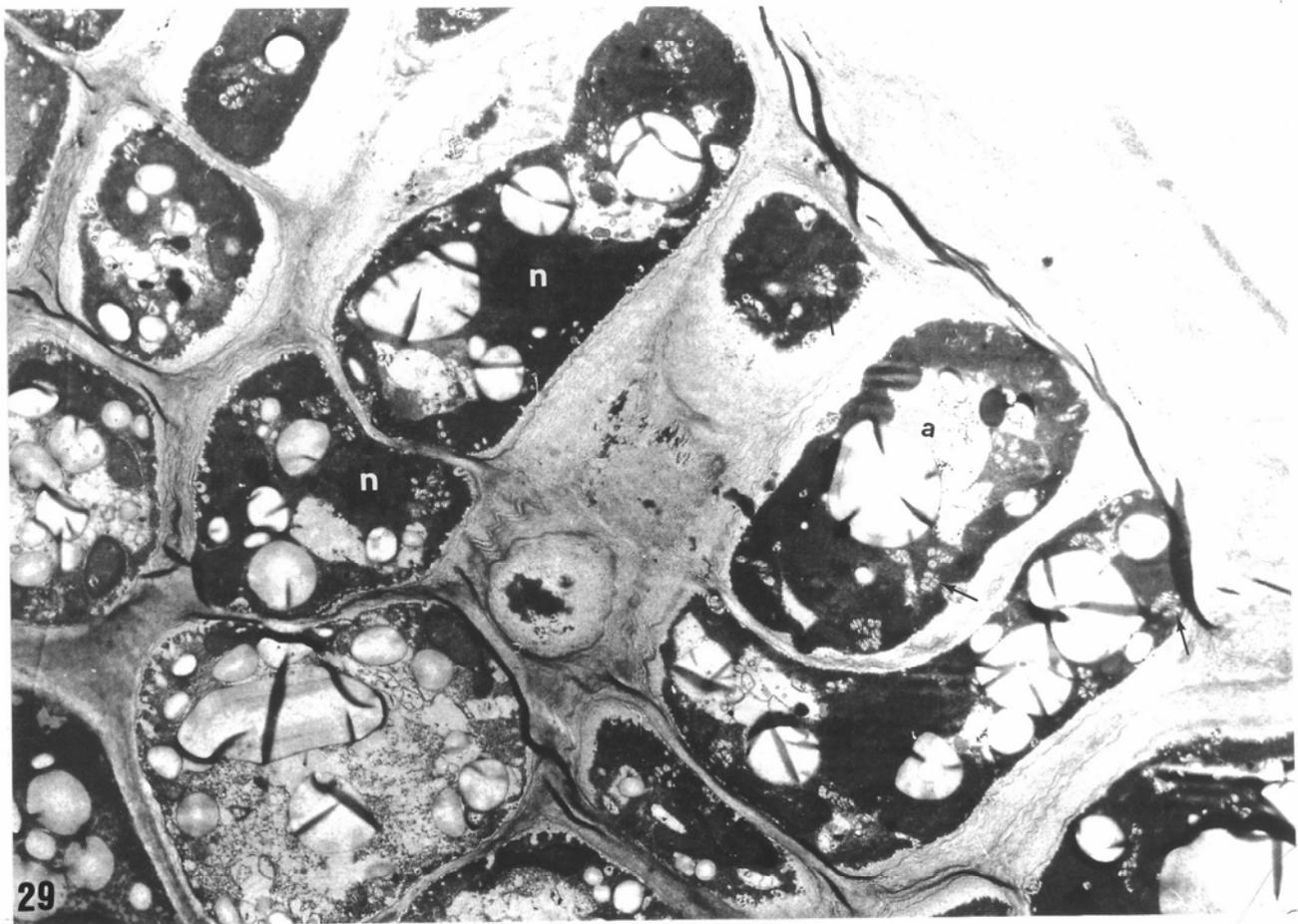
Foto V.29 Región externa del pretalo crecido en presencia del glicerol durante 3 días. Nótese los núcleos (n), granos de almidón (a) y numerosos dictiosomas (flechas). x5800.



27

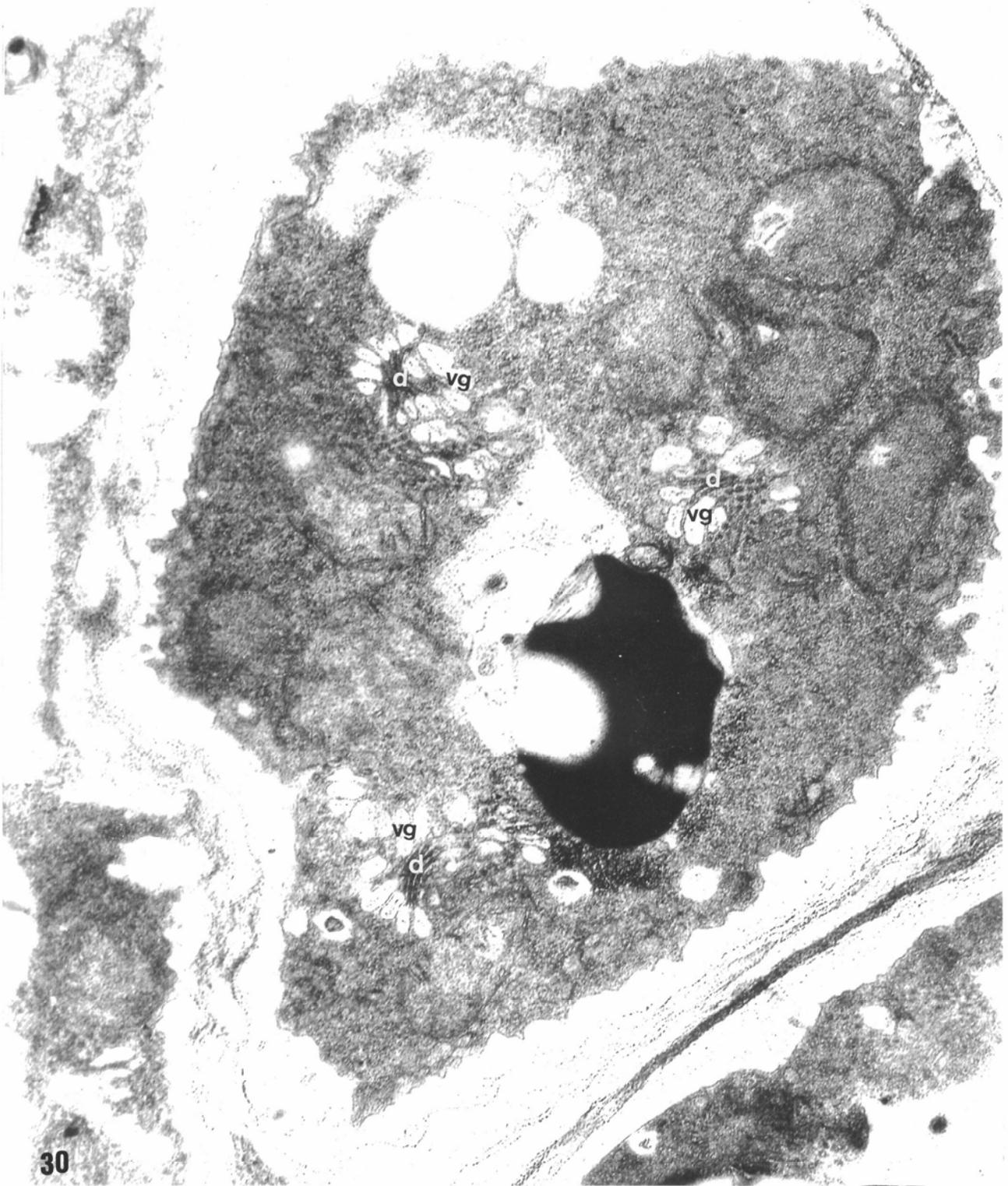


28



29

Foto V.30 Parte de una célula exterior de un pretalo cultivado durante 3 días en presencia del glicerol. Nótese la presencia de numerosas dictiosomas (d) y de las vesículas de Golgi (vg), además de, las vesículas de formación (cara Cis) asociadas a los ribosomas. x35150.



30

Foto V.31 Célula subcortical de un pretalo crecido en glicerol (3 días). Nótese la mitocondria (m), cloroplastos (c), vesículas de Golgi (vg) y granos de almidón (a). x13400.

Foto V.32 Célula binucleada creciendo en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 3 días. x20250.

Foto V.33 Pretalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 6 días. Nótese la tendencia de la célula a estar altamente compactadas y concéntricas. x150.

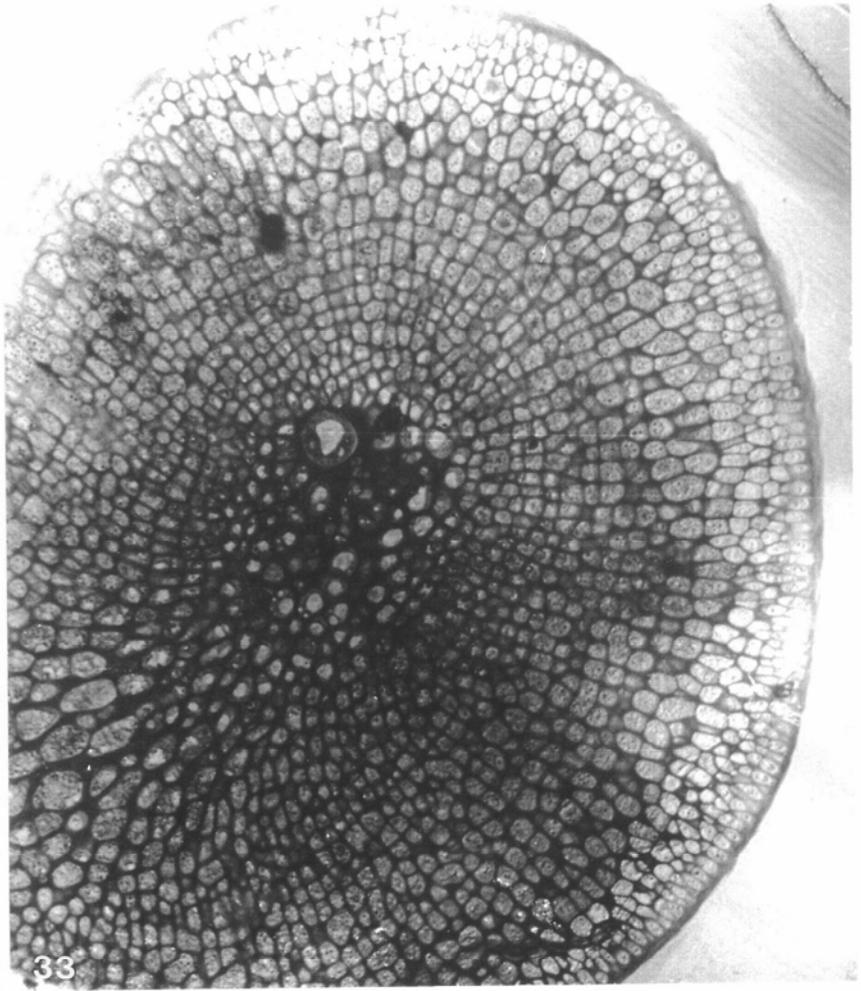
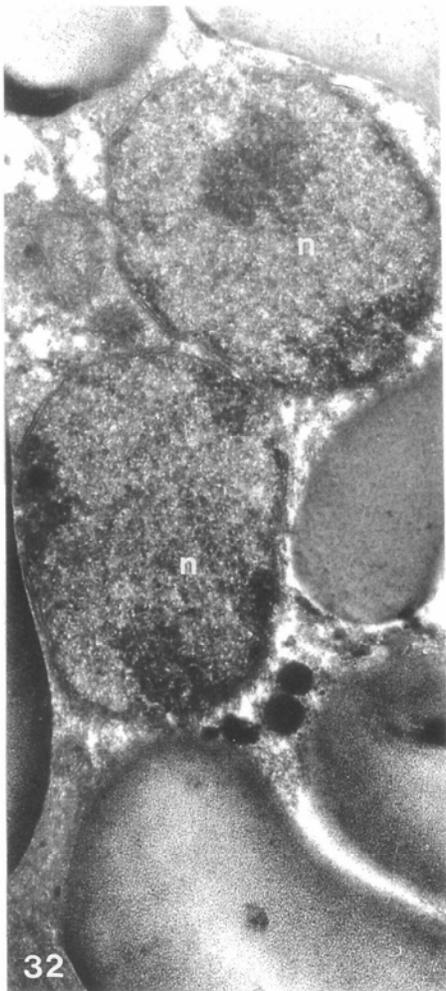
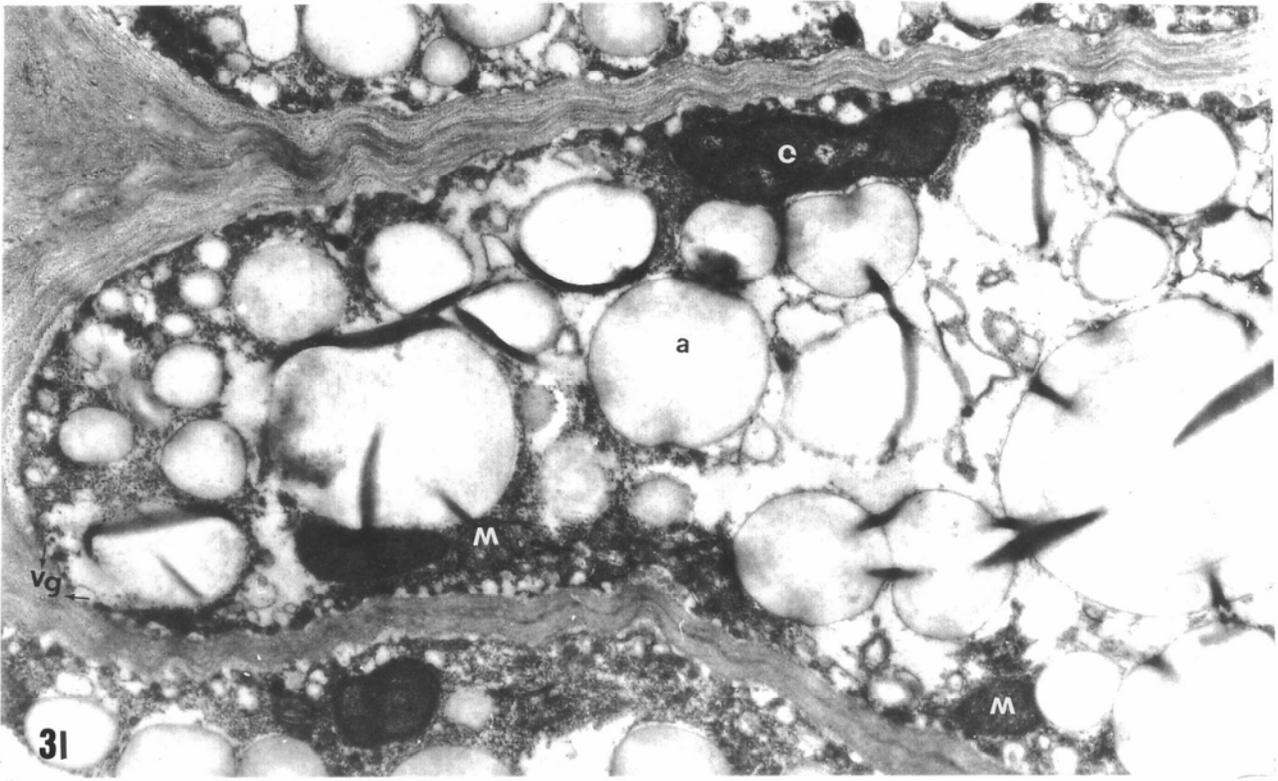


Foto V.34 Parte interna de la anterior sección semifina. Nota las células grandes centrales en contraste con aquellas que las rodean. x160.

Foto V.35 Sección externa de la foto V.33. Nota cómo las células están alineadas perfectamente y se alcanza un alto grado de compactación en las capas externas. x160.

Foto V.36 Sección externa de un pretalo visto al microscopio electrónico, cultivado durante 6 días en presencia de glicerol.

Es de destacar la formación de la nueva pared celular después de la citocinesis (flecha) y los primeros estadios en la formación de los canales que separarán a las células hijas. Nota también las vesículas de Golgi (vg), sacos de mucílago (sm) y granos de almidón (a). x7000.

Foto V.37 Muestra la zona encuadrada en la foto V.36. Nota los dictiosomas (d), granos de almidón (a), y ribosomas (r) asociados a la formación de la nueva pared. x20000.

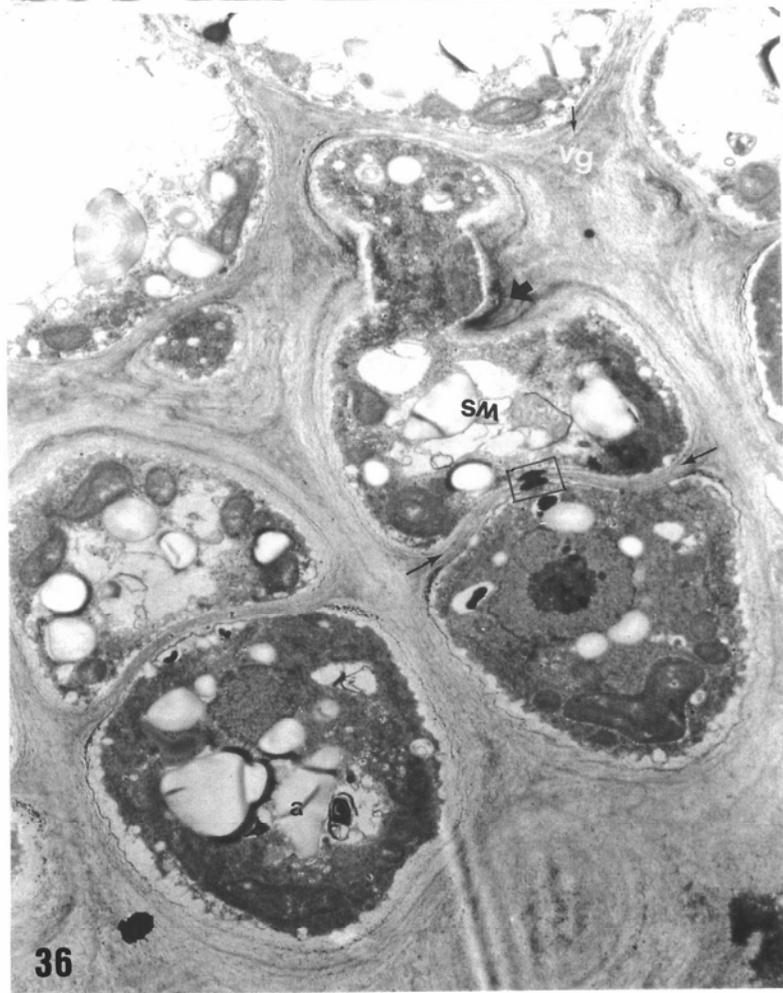
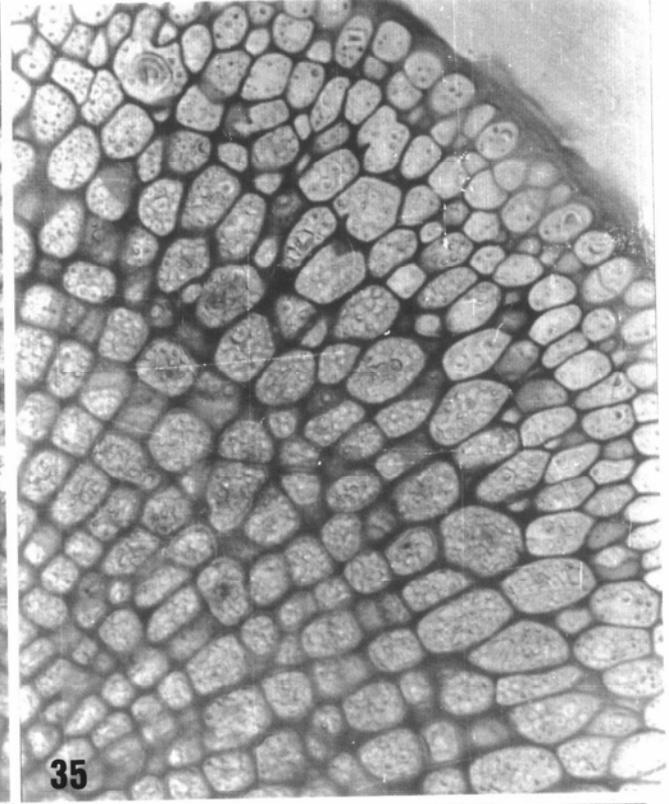
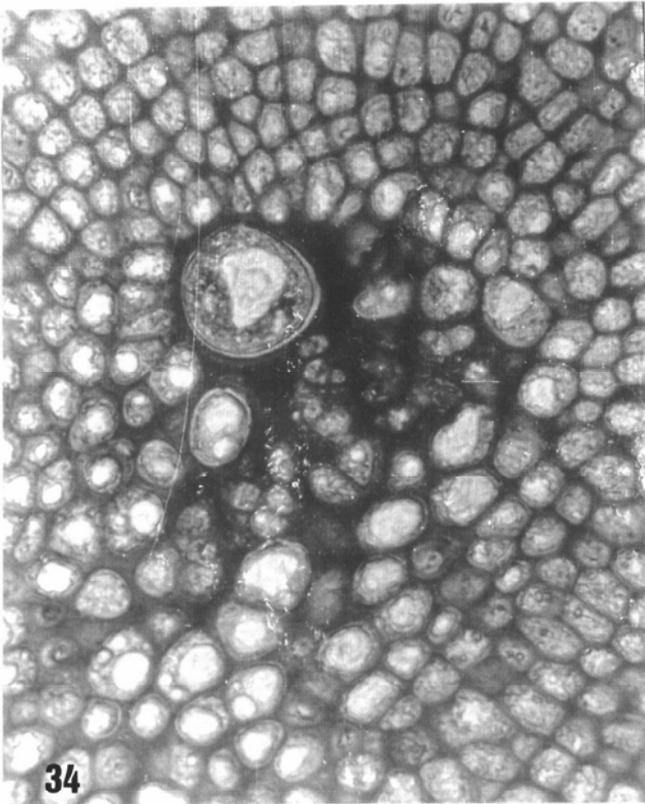


Foto V.38 Célula exterior de un pretalo creciendo 6 días en presencia del glicerol. Visibles son las mitocondrias (m), núcleos (n) y granos de almidón (a). x4050.

Foto V.39 Célula del interior de un pretalo de 6 días en PES 70 + 0.3 M glicerol. Compara el grado de asociación entre los cuerpos osmofílicos, así como, el grosor de la pared celular. x5200

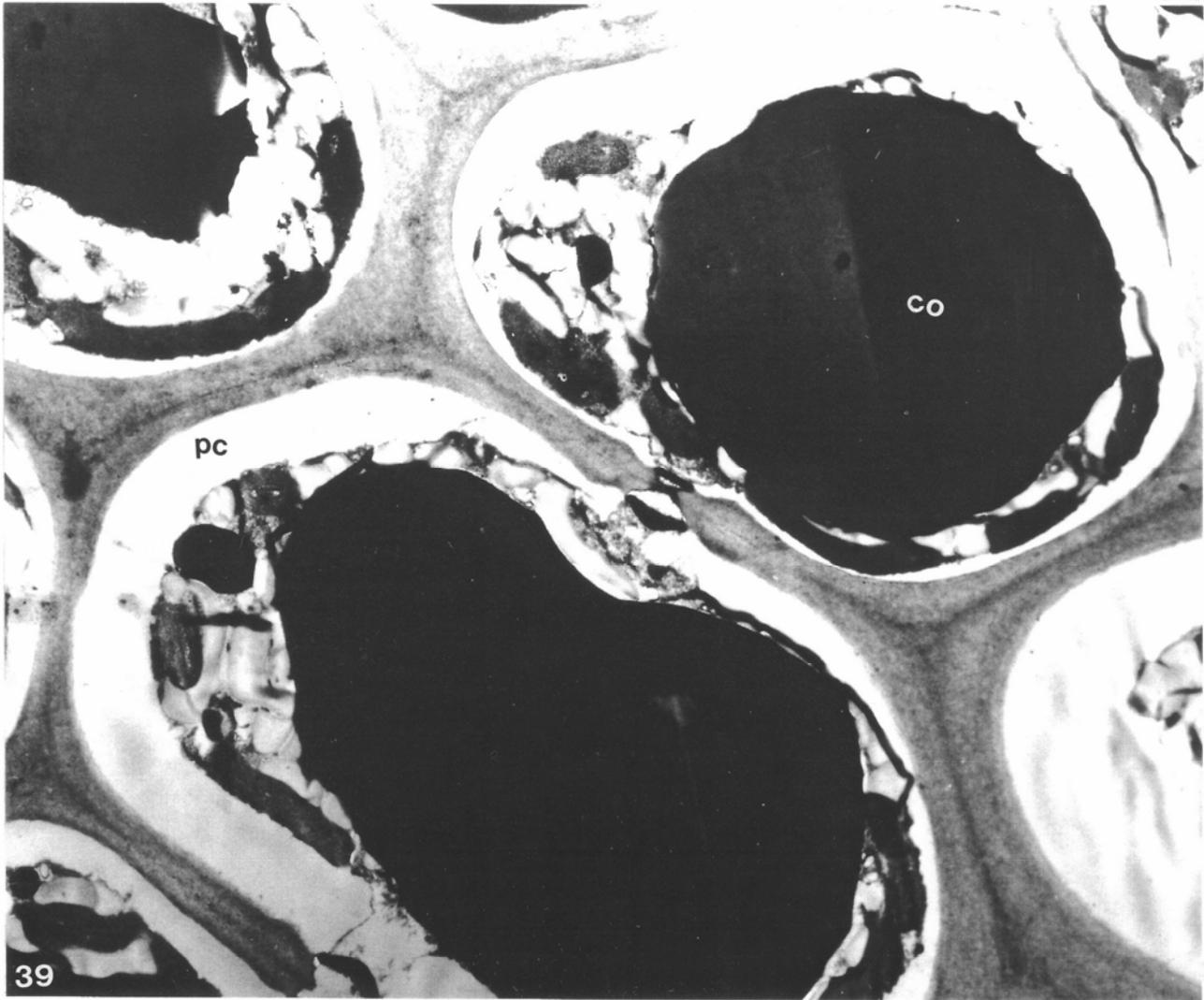
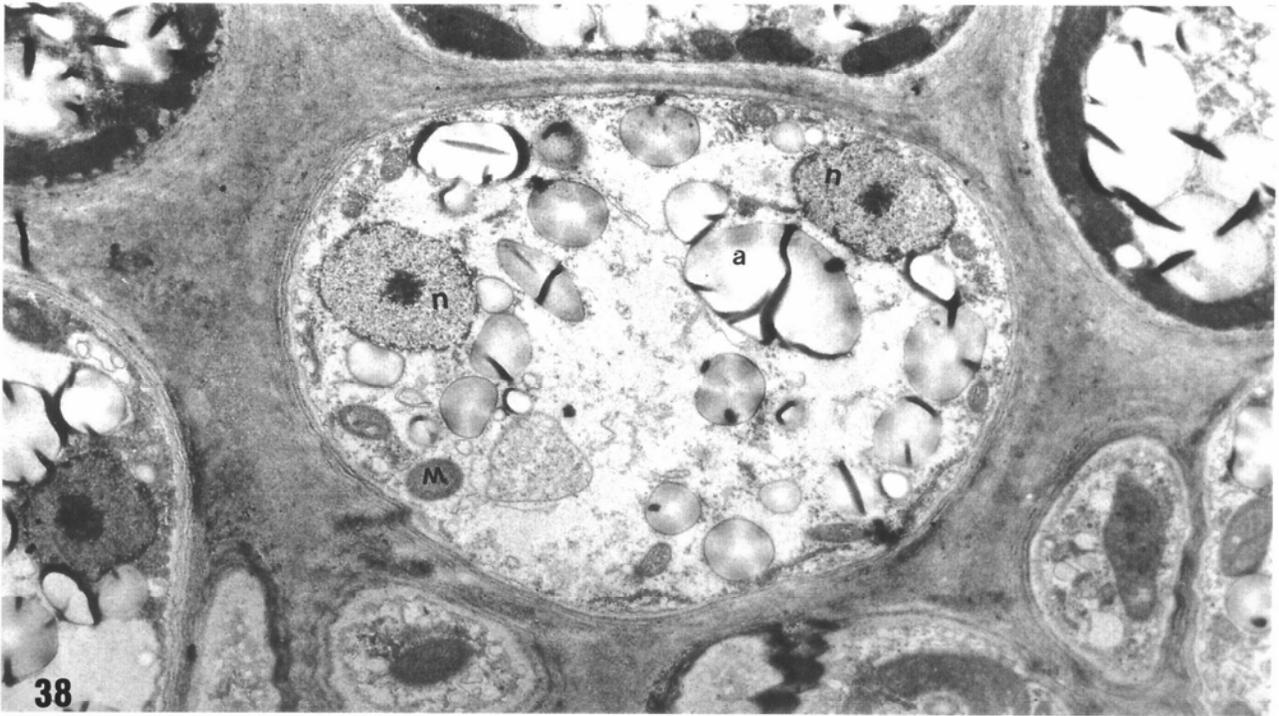


Foto V.40 Pretalo creciendo en glicerol durante 6 días.

Las células de las capas internas se encuentran unidas por puntuaciones (*pit-connections*). x5400.

Foto V.41 Célula binucleada del exterior creciendo en las mismas condiciones que en la foto anterior. Visibles son las mitocondrias alrededor del núcleo. x8600.

Foto V.42 Sección de un pretalo fotografiada al microscopio óptico después de 12 días en presencia de glicerol. Nota que incluso en este estadio, donde se han formado yemas, la división celular ocurre en un mismo plano. x50.

Foto V.43 Parte de la foto V.42 mostrando la región central y la de transición hacia una yema (margen izquierdo). x60.

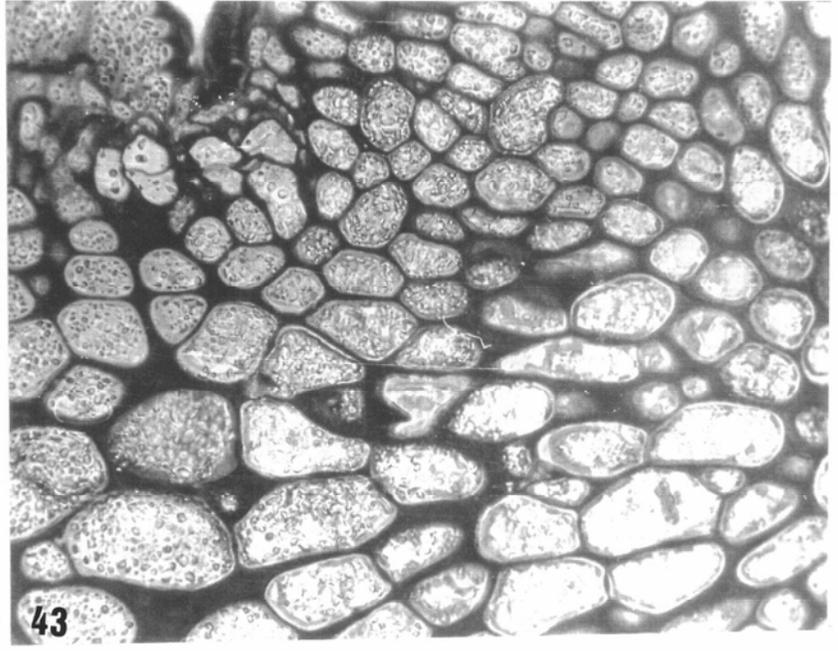
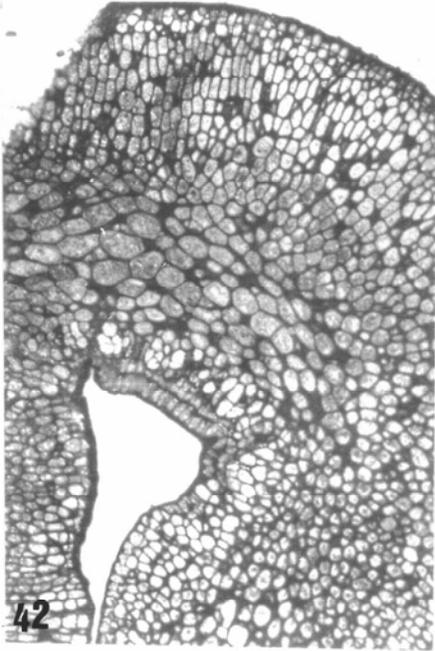
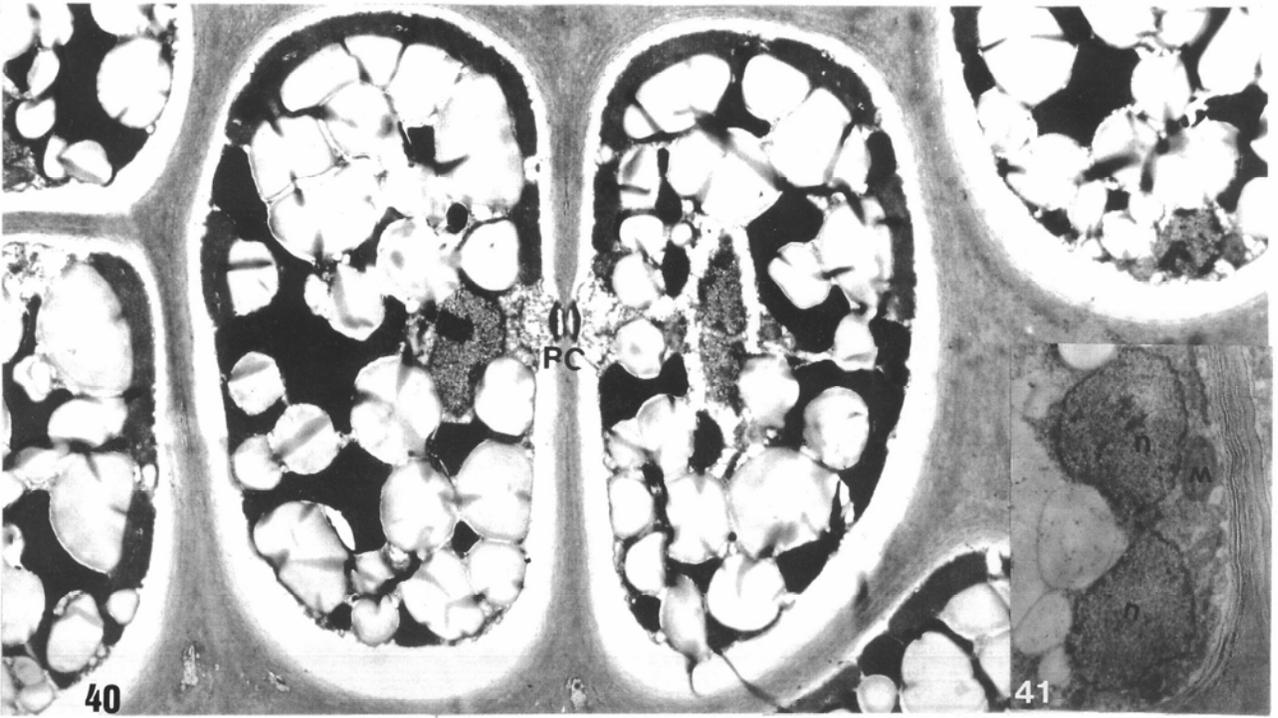
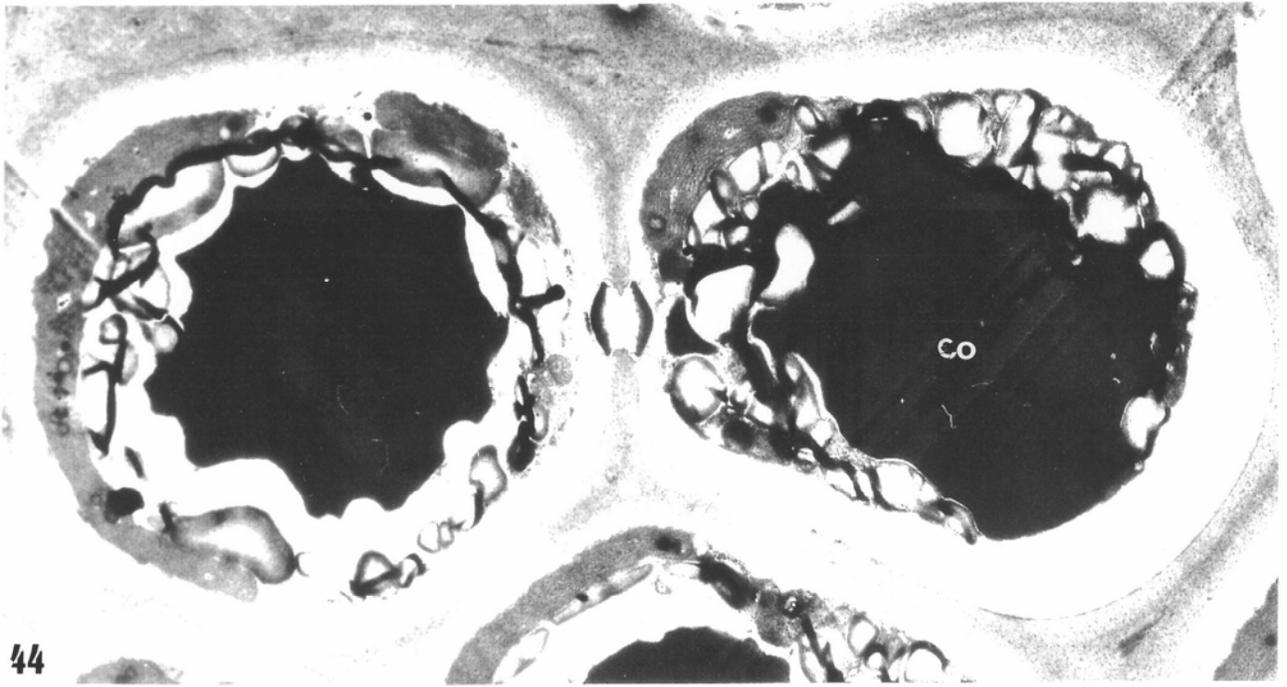
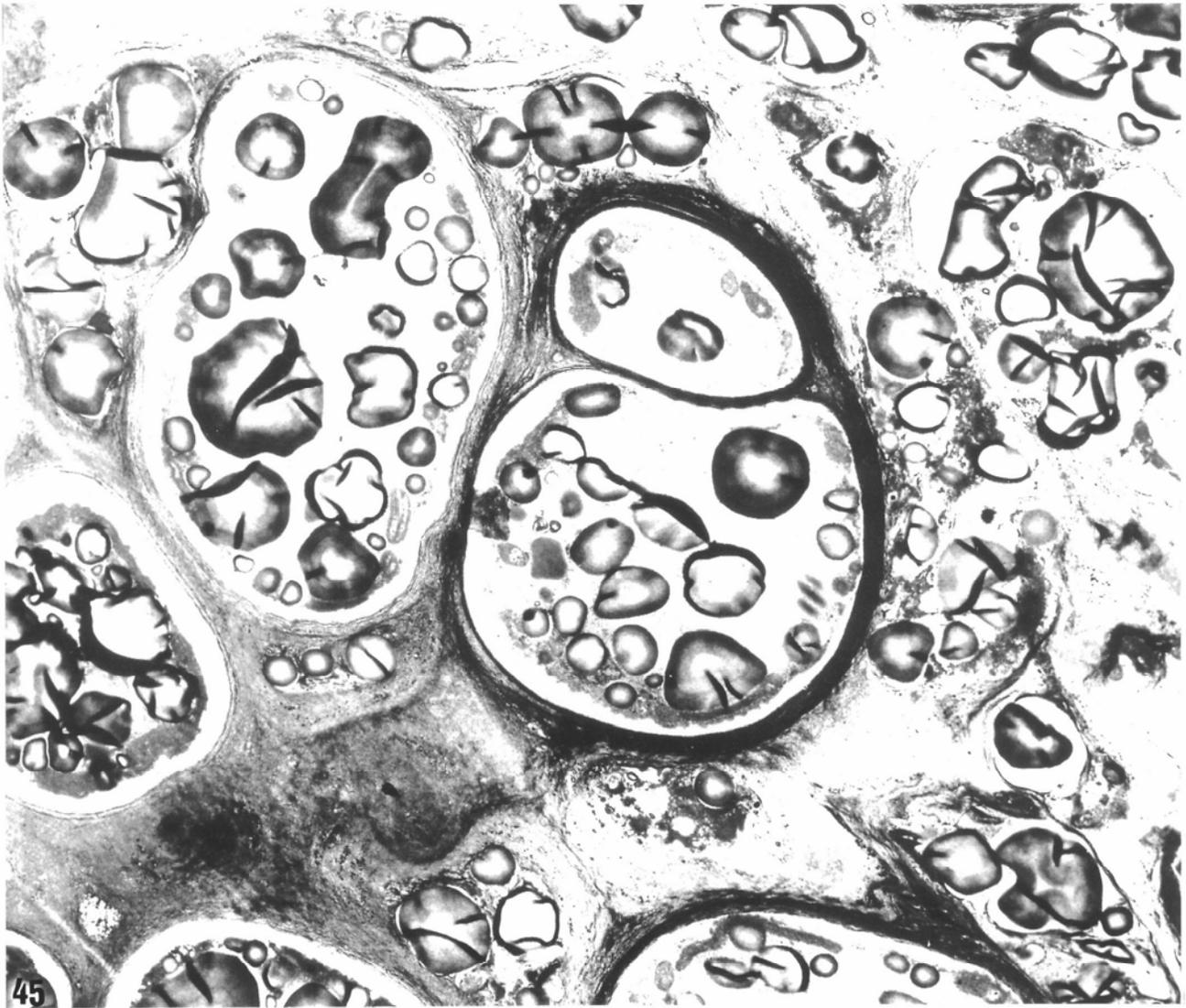


Foto V.44 Células del interior, de un pretalo cultivado en presencia de glicerol durante 12 días, enlazadas por un *pit-connection*. De importancia es la enorme superficie celular que ha alcanzado los cuerpos osmofílicos. x5400.

Foto V.45 Sección externa del mismo material anterior. Nota el contenido citoplasmático tan escaso. x6300.



44



45

Foto V.46 Cloroplasto de una célula interna perteneciente a un pretalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 12 días. Son visibles los ficobilisomas y las zonas de ADN. x17000.

Foto V.47 Sección longitudinal de un *pit-connection* entre 2 células corticales de un pretalo cultivado durante 12 días. x31350.

Fotos V.48-V.49 Parte de una célula interna de un pretalo cultivado en presencia del glicerol durante 12 días. Nota en ambas fotos, los núcleos (n), y los cloroplastos (c) con sus ficobilisomas (puntas de flechas) y los tilacoides dispuestos paralelamente (flechas). x23700.

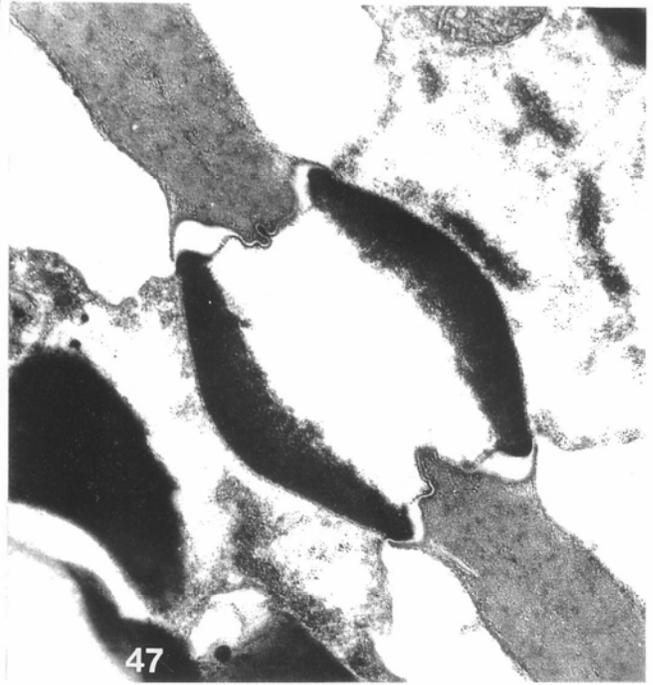
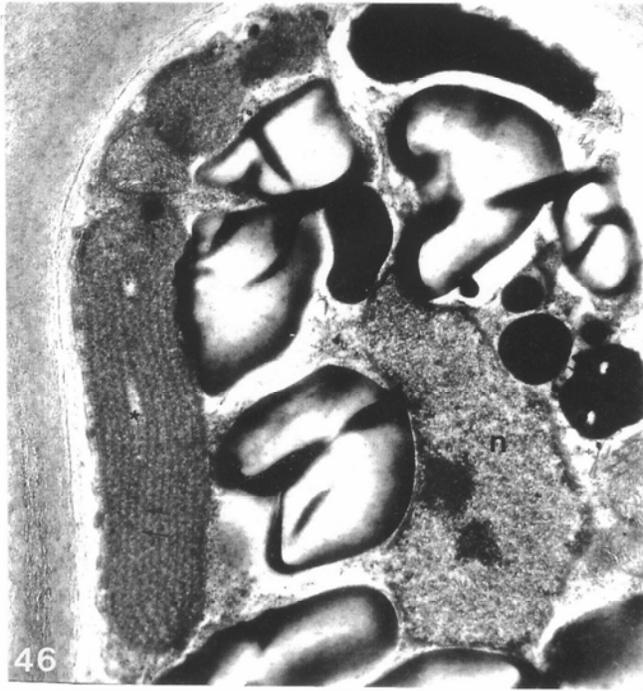


Foto V.50 Sección transversal de 5 μm , teñida con azul de toluidina, de un pretalo cultivado durante 2 horas en presencia de PES 70 + 0.3 M glicerol. Nota la existencia de las células internas (zona medular) y de las externas (capa cortical). x250.

Foto V.51 Sección transversal de 5 μm de un pretalo cultivado durante 6 días en presencia de glicerol. Nota la proliferación de nuevas capas celulares y la configuración de una capa subcortical. Tinción con azul de toluidina. x250.

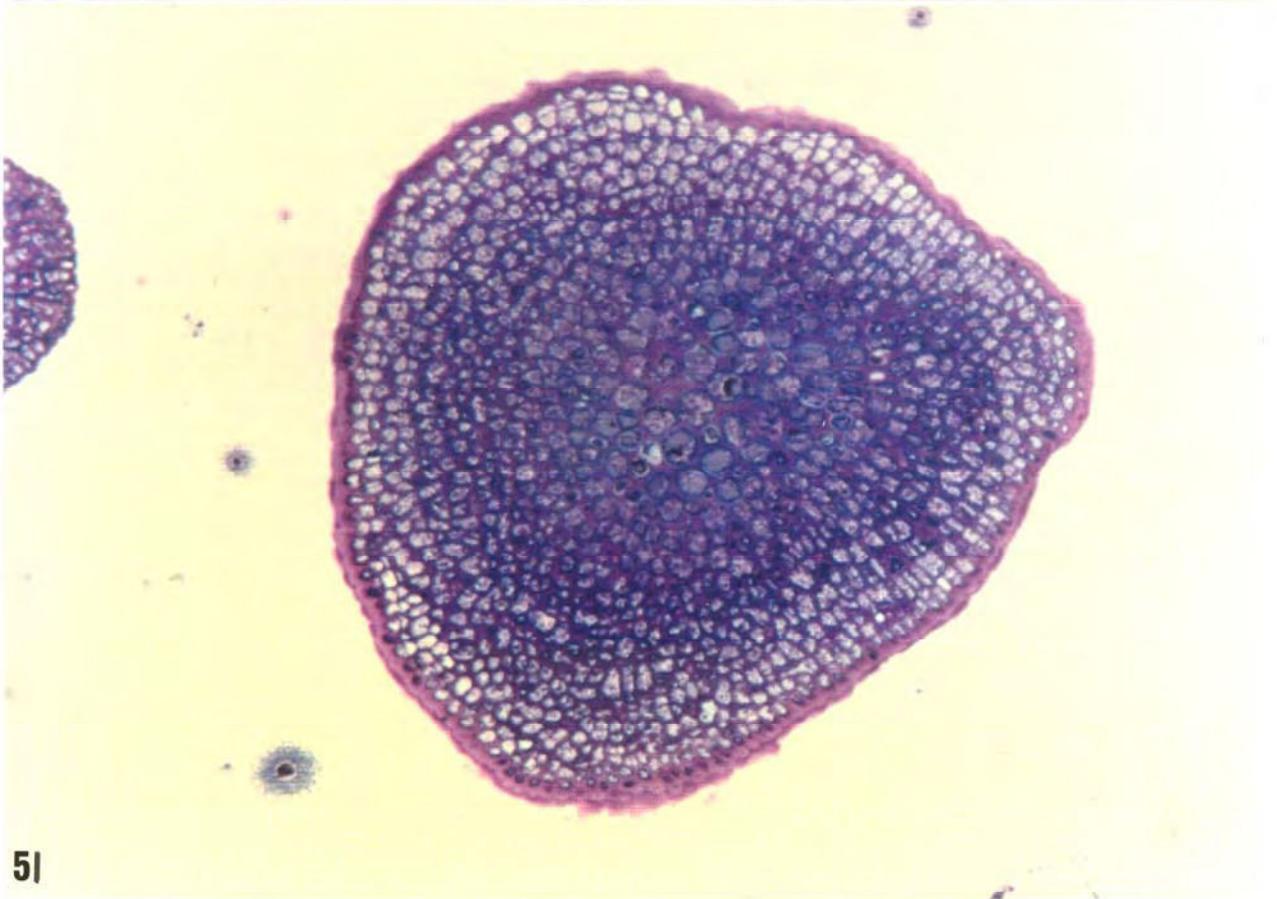
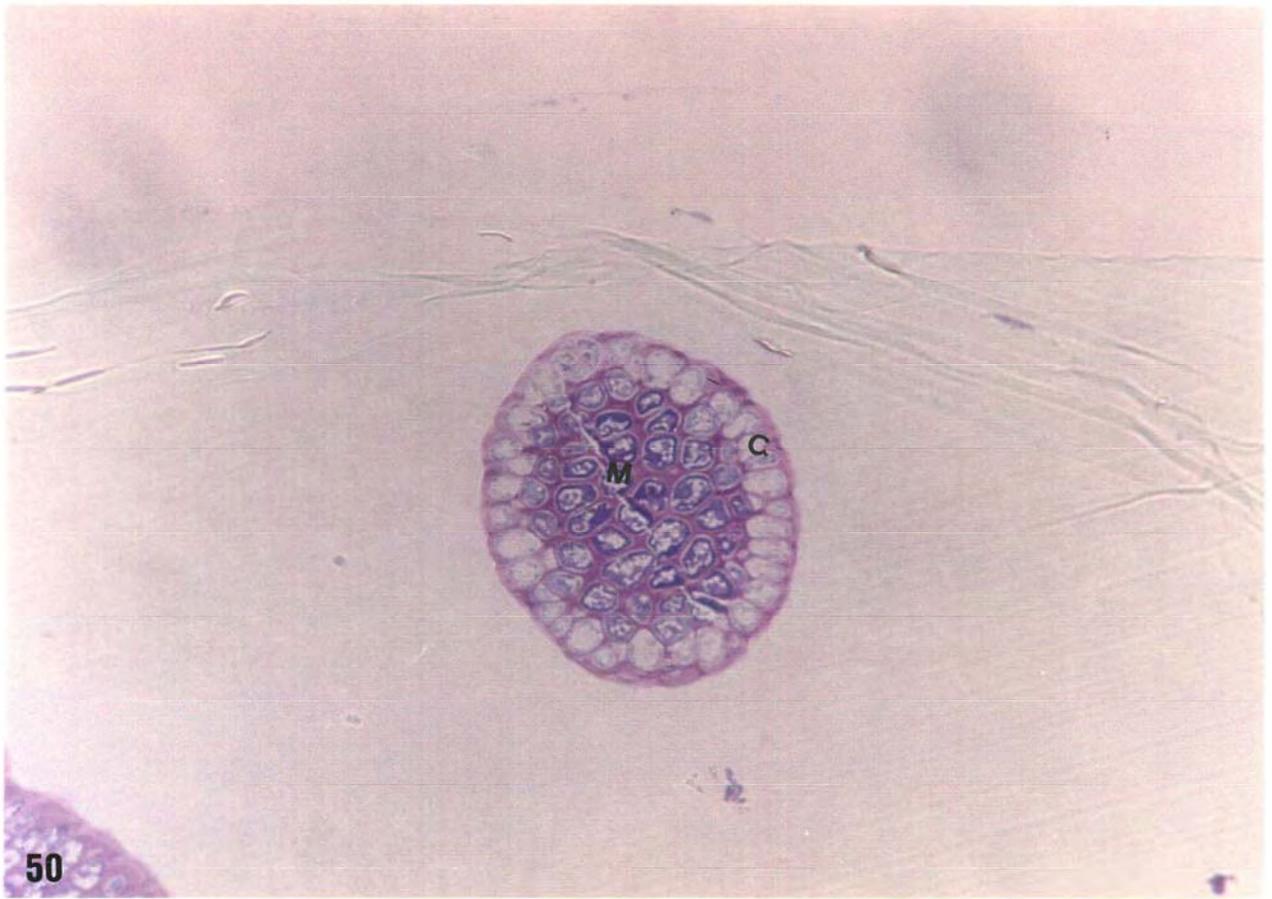
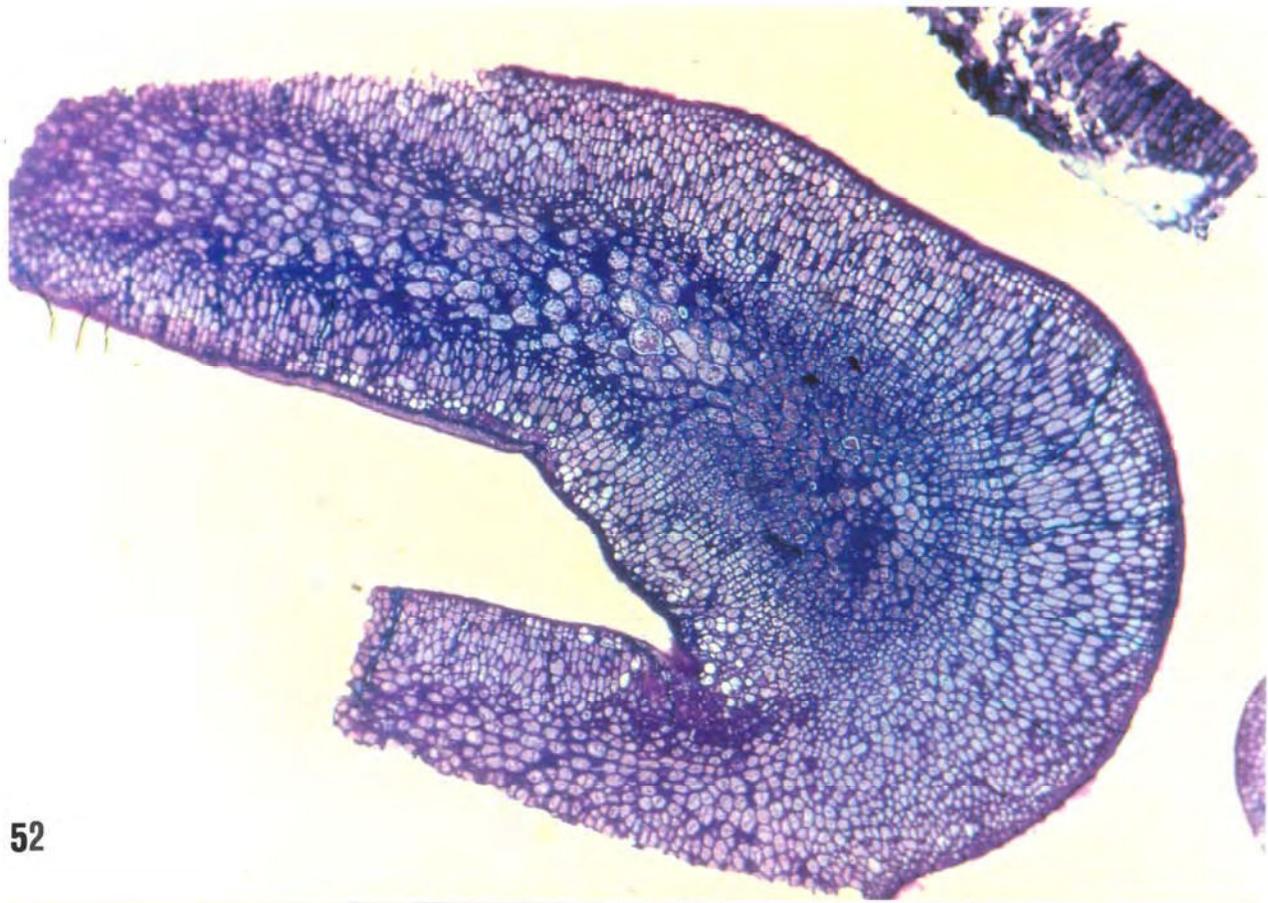
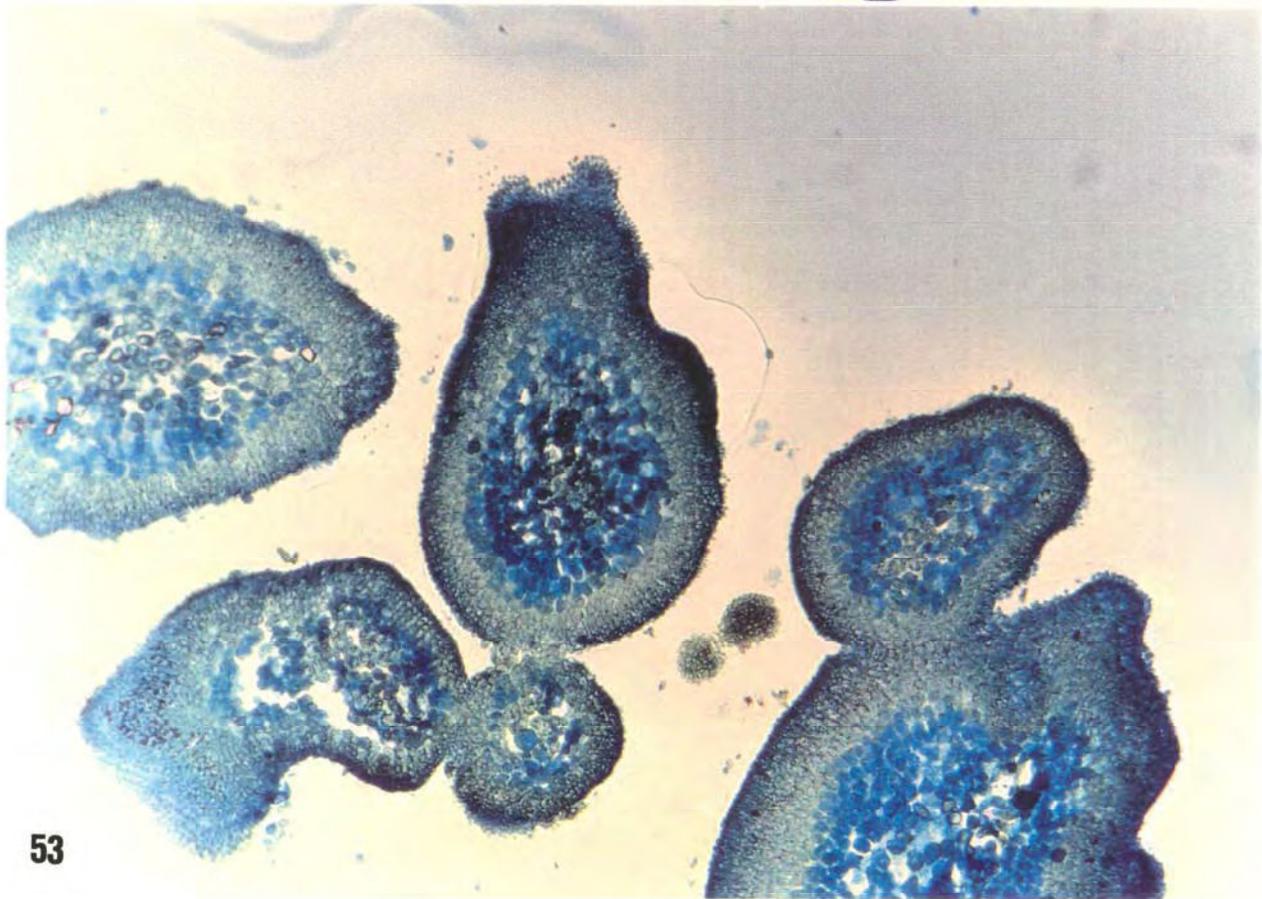


Foto V.52 Sección longitudinal de un pretalo con 12 días en cultivo con glicerol. En este caso, la capa subcortical es más prominente que en los casos anteriores. Tinción con azul de toluidina. x70.

Foto V.53 Secciones longitudinales de un pretalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 9 días. Nótese las diferencias que genera la tinción específica para proteínas (Hg-Azul de Bromofenol) entre los diferentes tipos celulares. x100.



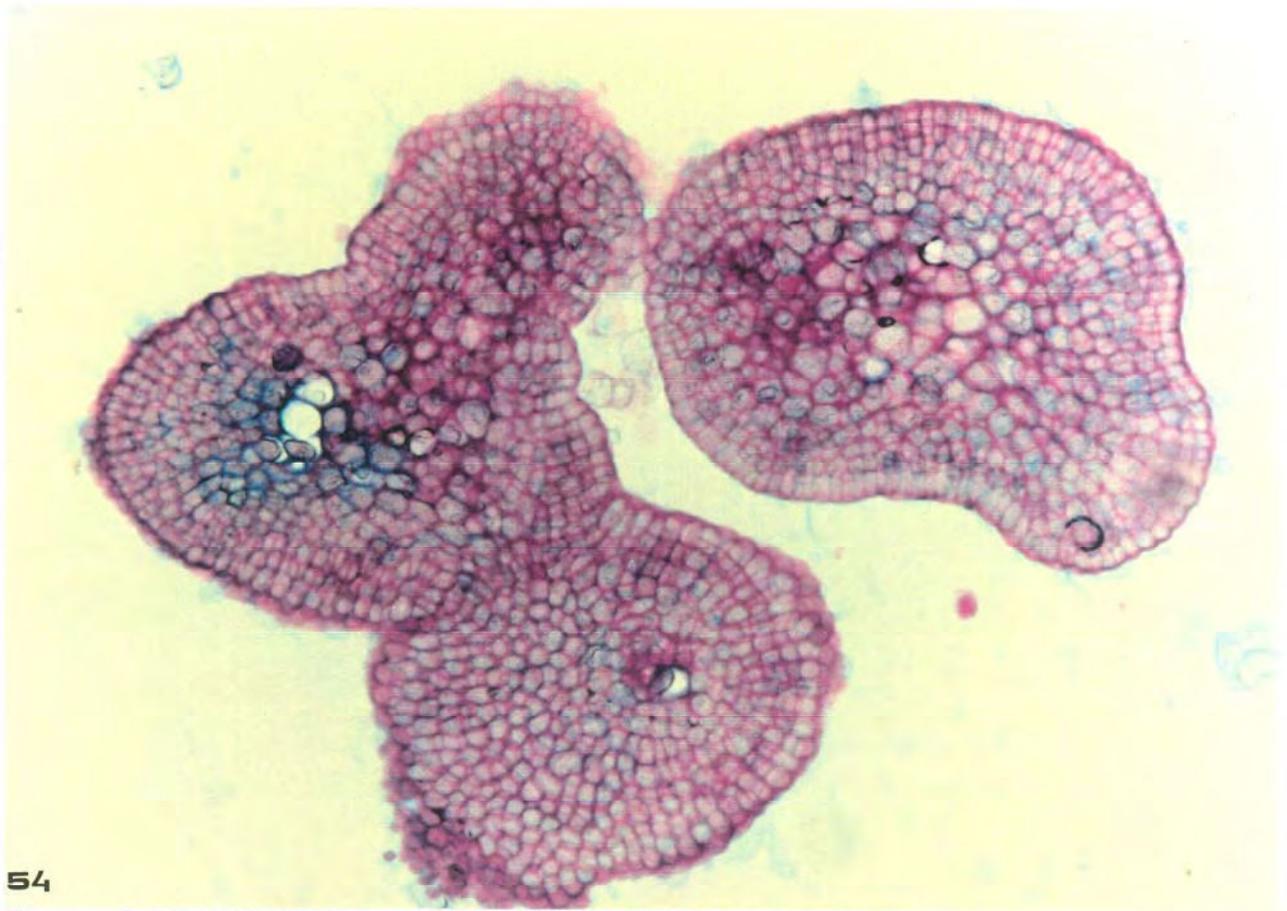
52



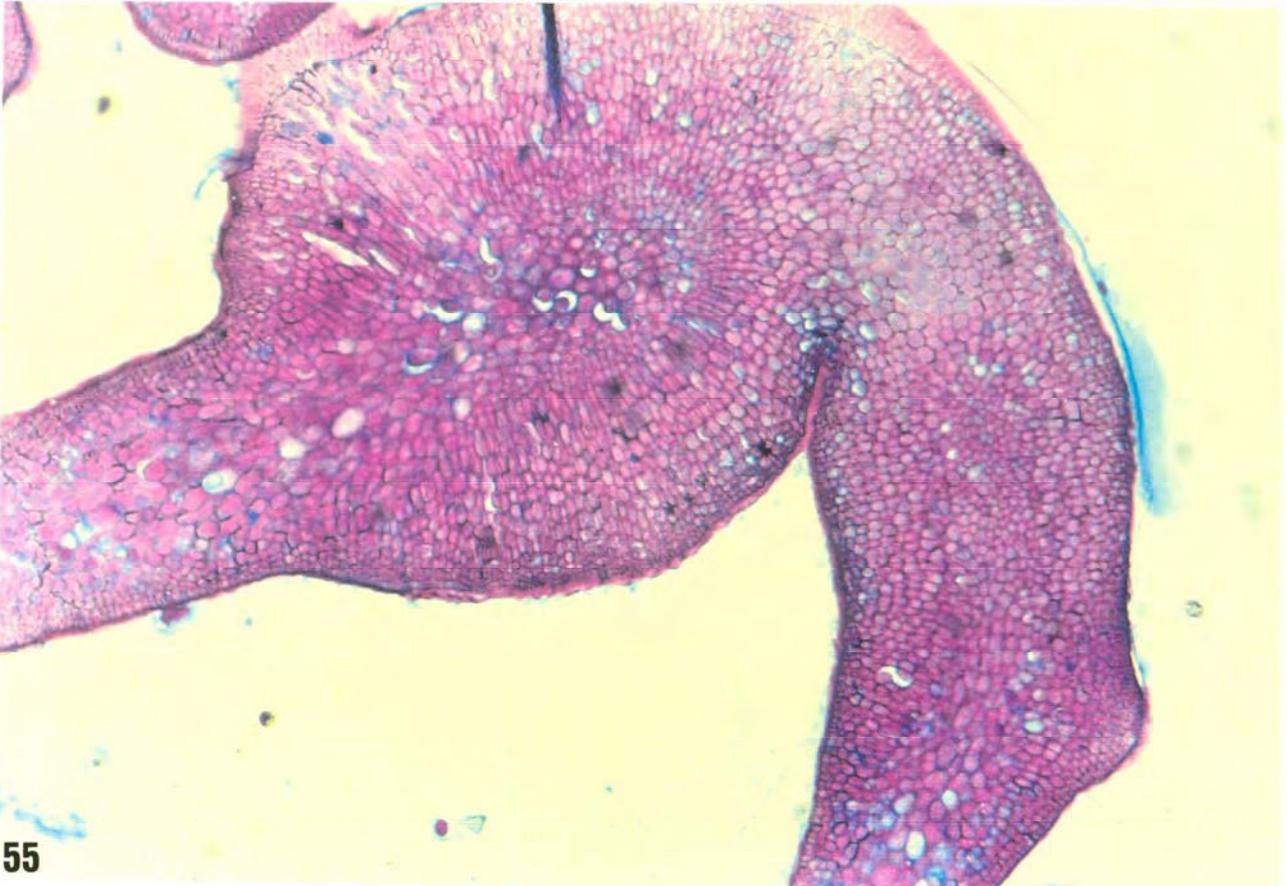
53

Foto V.54 Sección longitudinal de un pretalo de 3 días de edad en presencia del glicerol. Nótese como la tinción de Schiff (PAS) reacciona con el componente mucilaginoso de la pared. x150.

Foto V.55 Sección longitudinal, teñida con PAS, de un pretalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 12 días. Nótese que la configuración celular de la yema es completamente distinta a la vista en la foto III.17. x200.



54



55

Resumiendo los sucesos ocurridos durante el cultivo "in vitro" de pretalos de G. doryphora tanto a nivel macroscópico como microscópico, podremos decir:

1) El aumento del tamaño del pretalo, a lo largo de los 12 días de duración de la morfogénesis, está sustentado por la inducción temprana de la división celular a las 2 horas de cultivo en presencia del glicerol (Foto V.8, V.9). Este crecimiento fue más patente entre el día 1 y el 6.

2) El mayor número de yemas se formó pasados los 3 días de cultivo en PES 70 +0.3 M glicerol, prolongándose en algunos casos hasta los 12 días, periodo en el cual se había estimado la completa morfogénesis, y por lo tanto, nos encontrábamos con masas morfogénicas ya depigmentadas.

3) La formación de yemas lleva aparejada la disminución de los granos de almidón (Foto V.44, V.45) y la acumulación de lípidos (V.39, V.44).

La disminución de los granos de almidón, muy probablemente, está relacionada con la emisión de yemas siendo extremadamente notable en los últimos estadios del desarrollo de las masas morfogénicas.

Los lípidos si bien se encuentran en todas las células (internas/externas) desde el inicio del seguimiento (Foto V.14, V.18), a medida que tiene lugar el crecimiento se sitúan en las células más internas, ocupando toda la superficie celular. Este hecho coincide con la oclusión de las células internas por las nuevas capas celulares que se están generando.

V.4 DISCUSION

V.4.1 EFECTOS DEL GLICEROL Y LA LUZ EN EL DESARROLLO DE LOS PRETALOS.

El glicerol promovió en las carposporas, con todas las concentraciones probadas, los mismos efectos descritos en explantos por Robaina (1988): 1) crecimiento 2) desarrollo morfogénético y 3) depigmentación del material.

Paralelamente, otro hecho significativo fue la obtención de masas susceptibles de separación (friables) las cuales permitían un incremento de la biomasa algal.

Efecto sobre el crecimiento: la depigmentación

El cultivo en medios conteniendo glicerol permitió el desarrollo de masas morfogénéticas, las cuales no lograban cierto grado de cohesión a intensidades entre $60-100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y terminaban separándose. Pero además, en PES 70 + 0.3 M glicerol, los *budding-masses* sufrieron depigmentación.

La depigmentación observada en las masas morfogénéticas (*budding-masses*) puede ser un efecto concomitante con la alta tasa de crecimiento y morfogénesis. La depigmentación tarda más en aparecer tanto si las masas son transferidas a medios líquidos como a nuevos medios sólidos, aunque ambos contengan glicerol.

El hecho de que el recultivo de estas masas morfogénéticas en medios PES permita recuperar la pigmentación y desarrollarse como talos en estos medios, aunque con un mayor número de ejes de crecimiento, sugiere también que el glicerol promueve algún tipo de cambio metabólico que a largo

plazo afectaría a la supervivencia del cultivo: retirada de fósforo, degradación de las membranas fotosintéticas, etc.

En la bibliografía revisada se señala que para la metabolización de glicerol, en bacterias y plantas superiores, es necesaria la fosforilación del mismo usando ATP (Hunter 1953, Stumpf 1955). Al mismo tiempo, los bajos niveles de fosfato limitarían la vía de la fotofosforilación y de la transferencia de electrones vía ATP/ADP y con ella la disminución de las tasas de fotosíntesis (Harris & Kirk 1969, Farquhar & von Caemmerer 1982).

Las interacciones entre la luz ($265 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la presencia de glicerol (0.5 M) recogidas por Lewitus & Caron (1991b) en los cultivos de Pyrenomonas salina no son comparables a las de G. doryphora. La inhibición del crecimiento en P. salina es explicable porque la presencia de sustratos orgánicos puede inhibir la síntesis de determinados compuestos involucrados en la fotoprotección (carotenoides, Harris & Kirk 1969) o en la enzima encargada de la fijación del CO_2 (Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa, Hase 1971). Esos mismos cultivos a concentraciones de glicerol inferiores (0.2 M) no se ven afectados.

No creemos, sin embargo, que la depigmentación sea debida exclusivamente a la disminución en la concentración de nutrientes, ya que, en tal caso, la zona principalmente afectada sería el centro del pretalo. La depigmentación en G. doryphora se caracteriza por comenzar desde las zonas más externas hacia el interior.

Para comprobar si la depigmentación se debía a un aumento en las necesidades de nutrientes debido a la alta tasa de crecimiento, hemos mantenido un cultivo de pretalos de G. doryphora los cuales han sido recultivados semanalmente. De estas observaciones, nosotros sospechamos que la presencia

de nutrientes (nitratos, fosfatos, vitaminas,...) podría balancear los posibles desajustes provocados por el glicerol. Con estos estudios adicionales, recogimos que un suplemento periódico de nutrientes, el cual se acortaría cuánto mayor fuese el tiempo en contacto con el glicerol, permitiría la prolongación del crecimiento tal y como refleja la re-pigmentación del material en cultivo.

La disminución de la concentración de nutrientes deteriora al buen estado del material en cultivo. En este sentido, existen numerosas referencias que destacan como la disminución de los niveles de nitrógeno afecta tanto a los pigmentos fotosintéticos (Calabrese & Felicini 1970, Chapman *et al.*, 1978, DeBoer & Ryther 1977, Hanisak 1983, Koppers & Weidner 1980, Lapointe & Ryther 1979, Lapointe & Tenore 1981, Morgan *et al.*, 1980, Neish *et al.*, 1977, Ramus 1981, Rosenberg & Ramus 1982) como a los niveles de proteínas (Fogg 1959, Macler 1986, 1988, Syrett 1962).

El hecho de que en cultivo "in vitro" de G. doryphora la depigmentación del material afecte primeramente a las zonas más externas, contrariamente a lo que se espera si realmente se establece un gradiente de nutrientes hace pensar en que estas células son capaces de originar y mantener el crecimiento. Debido a esta función de "iniciadora" y "mantenedora" del crecimiento se identificaron a estas células como pertenecientes a un núcleo de regeneración. Este efecto se retomará en el seguimiento histológico.

La presencia de un determinado tipo de células capaces de iniciar el crecimiento y desarrollo, así como, de desarrollar una función de mantenimiento de las mismas es la primera observación de este tipo que se ha realizado en algas rojas.

Consecuentemente pensamos que este núcleo bien podría funcionar como un "meristemo" y que su aislamiento nos permitiría tener un cultivo de células sobre las cuales poder realizar estudios de crecimiento, desarrollo y

diferenciación, entendiéndose que todos los procesos estarían controlados por las condiciones experimentales (luz, nutrientes, hormonas, etc.). De hecho, hemos intentado el aislamiento de este "meristemo", y si bien ha sido un pequeño experimento-prueba, nos ha permitido constatar que es posible el crecimiento.

Lawlor y colaboradores (1988, 1989) han recogido el desarrollo del centro del explanto del alga parda Ecklonia radiata cuando el resto ha depigmentado y muerto. También en numerosos casos se ha visto la regeneración de plantas gametofíticas a partir de explantos depigmentados en cultivo (Fries 1980, Lee 1985, Polne-Fuller *et al.*, 1986).

Consistente con la presencia de un núcleo de regeneración en Grateloupia doryphora, existen aspectos similares en la estructura de Chroomonas salina cultivada en estos medios (Cheng & Antia 1970, Antia *et al.*, 1973). Cabe destacar que el crecimiento de este flagelado en presencia de glicerol se caracteriza por la acumulación de grandes cantidades de almidón, lo que lleva a una buena parte de las células a aumentar de tamaño y conducir las a la lisis; no obstante dos aspectos contradictorios aparecen en el seguimiento de estos cultivos: primero la tendencia, en cierta forma "suicida", de algunas células y segundo la capacidad de otras de continuar reproduciéndose. Esta dualidad en el comportamiento de C. salina no puede ser justificada por una posible adaptación a los medios con glicerol. Sucesivos controles realizados a lo largo de diferentes periodos de tiempo mostraron que todas las células mantienen su crecimiento autotrófico.

La depigmentación que sufre el material durante los primeros 4 días de cultivo bajo la luz roja y/o azul y su posterior recuperación, cuando en luz blanca y en las mismas condiciones experimentales no ocurre, es una nueva

prueba de la existencia de un tipo de célula capaz de adaptarse a estas condiciones, permitiendo así, que los pretalos sigan dividiéndose.

Además el hecho de que el centro de los pretalos se agrande cuando el material está siendo recultivado en periodos de tiempo más cortos supondría, a falta de más datos, que estas células internas funcionan como una reserva de nutrientes las cuales suministrarían la energía necesaria para subsistir en condiciones desfavorables.

Pero el efecto del glicerol no se manifiesta sólo con estos hechos. La depigmentación ocurre rápidamente a elevadas intensidades haciéndose necesario recultivos muy frecuentes. La intensidad de luz empleada para el cultivo de pretalos es de vital importancia para el desarrollo del cultivo "in vitro" en las mejores condiciones.

La rápida depigmentación sufrida puede ser debida a un uso efectivo del glicerol cuánto mayor es la intensidad de luz, que además como se ha comentado, podría originar un efecto fisiológico inhibitorio.

Las diferencias encontradas entre los cultivos en medios PES 70 + 0.3 M glicerol en luz blanca y azul o roja, cuando en PES no las había, permite pensar que cuando no está presente el glicerol, el alga puede acelerar o retrasar su crecimiento y desarrollo según sus necesidades, sin que por ello se vea alterada su estructura.

En medios conteniendo glicerol, la existencia de diferentes condiciones experimentales afectarían al metabolismo. El uso efectivo de esta fuente de carbono, intensificado por la calidad de luz, podría provocar la acumulación de algún metabolito, el cual actuaría reprimiendo el desarrollo normal de los pretalos.

Efecto sobre el patrón: friabilidad

La alta producción de carposporas vista en el capítulo III, junto con, el incremento en el crecimiento, la morfogénesis y la friabilidad de los *budding-masses*, en medios conteniendo glicerol, permite aumentar en un periodo de tiempo muy corto (2 meses), la cantidad de material algal disponible para el establecimiento de cultivos.

En medios PES 70 + 0.3 M glicerol, a intensidades de luz blanca de 20-30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se desarrollaban *budding-masses* con un diámetro de aproximadamente 2 mm, a intensidades superiores (60-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el desarrollo de estas masas no alcanzaban cierto grado de cohesión y podían ser fácilmente friables por una ligera agitación del medio. Estos nuevos *budding-masses* originados, con un diámetro entre 0.5-1 mm, mantienen la misma capacidad morfogénica y son capaces de seguir desmembrándose paulatinamente.

Las diferencias, entre los distintos niveles de intensidad, de carposporas cultivadas en los medios PES y PES 70 no fueron tan acentuadas como las observadas en aquellas cultivadas en medios conteniendo glicerol.

En ambos medios, los cultivos se caracterizaban por el desarrollo de pequeños talos, con varias yemas cada uno de ellos, pero la diferencia más notable era el tamaño de estos ejes de crecimiento: cuanto mayor era la intensidad, estas ramificaciones eran más cortas, indicando que una elevada intensidad de luz puede ser perjudicial para el desarrollo normal del talo.

El recultivo a intensidades bajas de luz permite el desarrollo normal de los pretalos.

En lo referente al patrón altamente friable presentado por los pretalos cultivados bajo luz azul y/o roja, creemos que en medios PES 70 + 0.3 M glicerol el aumento de esta friabilidad en las masas morfogenéticas es causado posiblemente por una activa metabolización del glicerol. Recordemos que el patrón morfogenético y friabilidad de los pretalos en presencia de las calidades de luz tiene lugar entre 7 u 8 días de cultivo.

Es de destacar también que bajo las mismas condiciones experimentales, los pretalos cultivados en medios sin fuente de carbono no mostraron ninguna diferencia con aquellos cultivados en luz blanca ($20-30 \mu E m^{-2} s^{-1}$) y fotoperiodo.

La pérdida de algún tipo de polisacárido estructural como consecuencia de esta canalización del glicerol podría ser la causa de la presencia de este patrón friable.

Se sabe que los efectos del glicerol están asociados a variaciones o cambios tanto en la composición de las paredes celulares (Kloareg & Quatrano 1988) como en la morfología de la célula (Lewitus & Caron 1991a,b).

La friabilidad y los efectos de la luz (cantidad y calidad) son los fenómenos a desarrollar en una línea futura de investigación.

V.4.2 ESTUDIO HISTOLOGICO DE LOS PRETALOS EN MEDIOS PES 70 + 0.3 M GLICEROL.

a) Ultraestructura celular.

Plastidios.

La bibliografía consultada recoge casos donde los cloroplastos pueden verse afectados durante el cultivo en presencia de una fuente de carbono.

El glicerol puede causar una reducción de los componentes fotosintéticos, afectando al contenido y composición pigmentarios y a la organización tilacoidal (Shihira-Ishikawa & Hase 1964, Antia *et al.*, 1969, Doermel & Brock 1971, Faust & Gantt 1973, Ellis *et al.*, 1981, Lewitus *et al.*, 1991a,b).

Las células de *Euglena gracilis*, al ser cultivadas en presencia de acetato (Bates & Hurlbert 1970, Droop 1974), padecen la disminución del contenido de clorofilas y la actividad fotosintética (App & Jagendorf 1963, Buetow 1967).

La represión total de la fotosíntesis y de la síntesis de clorofilas, por efecto de las condiciones nutricionales, en cloroplastos ya existentes no ha sido registrada (Mego 1968, Nigon & Heizmann 1978, Schiff 1980), a excepción del caso presentado por Vannini (1983) en *E. gracilis* la cual fue cultivada en un exceso de acetato (1% en lugar del 0.1% que es la concentración óptima).

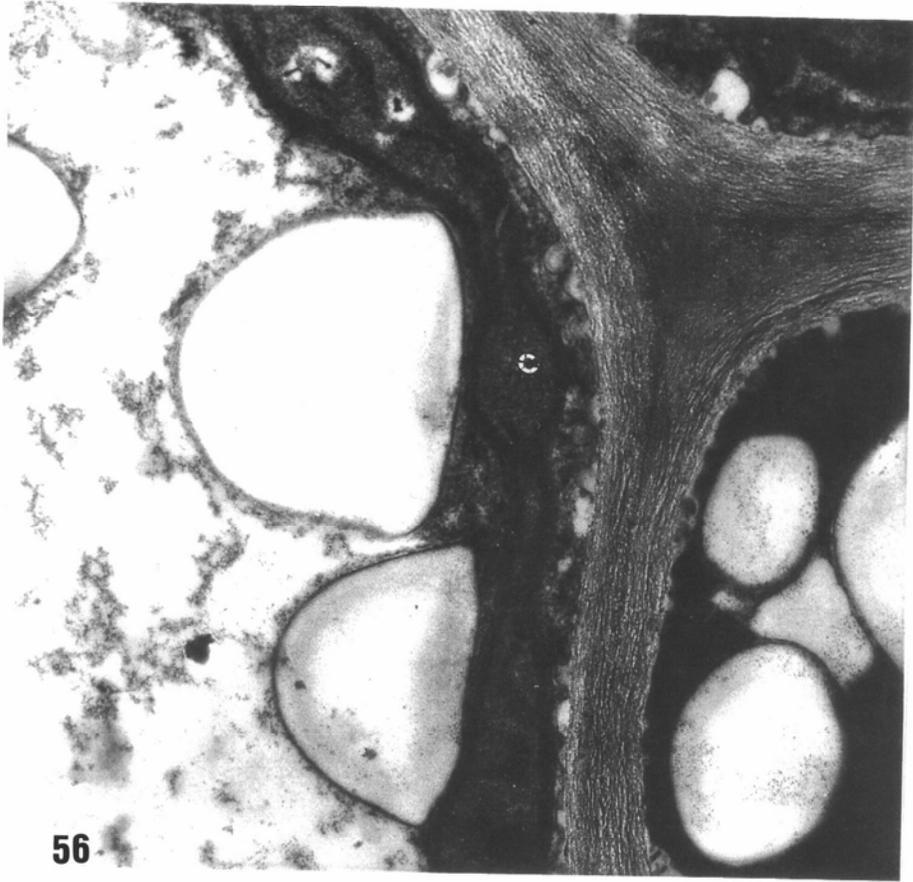
Nuestros resultados no recogen ningún cambio en los cloroplastos de las células internas del pretalo (Foto V.46, V.48, V.49), mientras que, en las externas se encuentran completamente degeneradas (Foto V.45). Esto sería otra prueba que explicaría por qué la pigmentación se mantiene en la zona interna del pretalo.

Sin embargo, en experimentos ultraestructurales paralelos con pretalos de esta misma alga mantenidos bajo las mismas condiciones experimentales, pero suministrando luz continua, mostraron plastidios de diferente forma y comprimidos en la membrana plasmática con un sistema tilacoidal completamente degenerado (Foto V.56).

Entre los 3-6 días de cultivo, este material puede ser recultivado a condiciones no estresantes (fotoperiodo 18:6) siendo capaz de retomar un desarrollo normal de los plastidios.

Este hecho, aún a falta de estudios más prolongados, podría ser explicado por la disminución de la concentración de nutrientes o por un uso efectivo del glicerol (los pretalos crecen más rápidos en presencia de luz continua pero al mismo tiempo depigmentan antes).

Foto V.56 Parte de una célula interna de un pretalo cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol a $17.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nótese la presencia de cloroplastos degenerados. x7000.



56

La deficiencia de nitrógeno supone para el aparato fotosintético la reducción del estroma y el deterioro de la organización tilacoidal (Boussiba & Richmond 1980, Yamanaka & Glazer 1980, Stevens *et al.*, 1981, Wehrmeyer & Schneider 1975, Kost *et al.*, 1984, Rhiel *et al.*, 1985).

La utilización del glicerol también podría inducir la acumulación en el medio de algún metabolito que alteraría el desarrollo del cloroplasto. Cuando la concentración de este metabolito fuese baja (máxima la alcanzada a los 6 días en estos medios), el recultivo permitiría la "dilución" del mismo. Por el contrario, a concentraciones elevadas (9-12 días) se excedería un "cierto nivel crítico" y ya no sería posible recuperar el desarrollo normal del cloroplasto.

Los ensayos control realizados en medios sin glicerol mostraron que siempre es posible regenerar los cloroplastos de células cultivadas en PES durante periodos prolongados.

Acumulación de lípidos y almidón.

La presencia de glicerol está asociada con cambios en la morfología y composición celular. Los pretalos de *G. doryphora* acumulan almidón y lípidos, aunque cuánto mayor es el tiempo en cultivo, predominan los lípidos en las células más internas (Foto V.32). Este efecto se puede relacionar con un incremento en la cantidad de carbono celular y una disminución en el contenido de nitrógeno.

Esta observación es consistente con las descritas para *Poterioochromonas salina* (Lewitus & Caron 1991b) y en *Chlorella pyrenoidosa* (Rodríguez-López 1965) donde se producía una elevada acumulación de almidón y lípidos.

La presencia de enormes gotas lipídicas que ocupan prácticamente todo el volumen celular en los talos cultivados durante 9-12 días en glicerol son

un reflejo del desacoplamiento entre los niveles de proteínas y los de carbohidratos (coincide con la depigmentación total del material; reacción Hg-azul de bromofenol negativa), así como, a la existencia de un tipo celular biosintético (en este estado, las células situadas más al interior están completamente ocluidas por otras capas celulares).

Creemos que esta acumulación se debe a un crecimiento desequilibrado como consecuencia de la dificultad para la difusión de los nutrientes.

La disminución del tamaño de los granos de almidón a medida que transcurre el tiempo en glicerol podría indicar que el almidón está siendo digerido. Esta actividad autofágica es notable en células, las cuales sufren procesos de diferenciación, como son las esporas de las algas rojas (Matile 1975, Tsekos 1981, 1985).

La reacción positiva con mercurio azul de bromofenol (determinación de proteínas) en la misma zona donde se recoge una reacción de I/IK y PAS ha sido relacionada con la posible existencia de una actividad fosfatasa ácida (Tsekos 1985, Tsekos *et al.*, 1985).

El hecho de que los granos de almidón en algas rojas se digieran en los compartimentos líticos desarrollados a partir de membranas del retículo endoplasmático, a diferencia del almidón situado en los plastidios, que es digerido en ellos, permitiría usar este material cultivado "in vitro" para el estudio y desarrollo de estos compartimentos (citolisosomas).

La asociación entre los granos de almidón y los cloroplastos visto en *G. doryphora* ha sido recogida en otros muchos casos (Alley & Scott 1977, Brown & Weier 1970, Gantt & Counti 1965, Konrad-Hawkins 1974, Kugrens & West 1972, Peyriere 1975, Scott & Dixon 1973, Simon-Bichard-Breud 1972, Triemer & Vasconcelos 1977, Wetherbee & West 1977). Estas asociaciones,

como ya se comentó en el capítulo III, pueden representar zonas de síntesis y degradación del almidón, al ser éste sintetizado y degradado en el citoplasma.

Dictiosomas.

El aparato de Golgi visto en los pretalos de Grateloupia doryphora tiene una estructura similar a los presentados en otras algas rojas. Según las observaciones de Peyriere-Eyboulet (1972), el aparato de Golgi consta de 2 caras: una de formación (Cis) y otra madura (Trans).

En la cara Cis se encuentran las vesículas de transición. Las asociaciones que se presentan entre éstas y las membranas del retículo e incluso ribosomas, sugieren que éstas vesículas son equivalentes funcionales a los citolisosomas, involucrados en la rotura del almidón (Konrad-Hawkins 1974).

En la cara Trans se forman las vesículas de Golgi y las *cored vesicles*. La ausencia de las *cored vesicles* en los talos crecidos en glicerol podría ser simplemente un efecto de madurez de los mismos. La bibliografía revisada siempre señala la presencia de estas vesículas durante los procesos de carposporogénesis y tetrasporogénesis y en los primeros estadios de desarrollo tras la liberación de las esporas (Tsekos 1983, 1985).

Estas vesículas son ricas en compuestos glucoproteicos y su composición estaría en concordancia con la obtenida en G. doryphora en vista de la coloración azul-violeta con la tinción de azul de toluidina (Tsekos 1970) y la tinción roja-celeste obtenida con AB-PAS.

El componente fibrilar (fase cristalina) aparece en la superficie de la membrana plasmática (Delmer 1987, Tsekos *et al.*, 1993).

La formación de remolinos que algunas veces se presentan sobre la pared celular (Foto V.31) es debida a la alta actividad del aparato de Golgi de

igual manera que lo describieron Chamberlain & Evans (1973) en Laurencia pinnatifida.

Si asumimos que la cantidad de dictiosomas es indicativa de la actividad del aparato de Golgi y de la biosíntesis de polisacáridos entonces podemos decir que éstos se presentan en una mayor proporción en medios PES 70 + 0.3 M glicerol que en medios control.

Al mismo tiempo, las observaciones realizadas sobre el alga roja unicelular Porphiridium cruentum sobre la presencia de "complejos tetraédricos" en el aparato de Golgi y en la membrana plasmática e involucrados también en la síntesis de la matriz celular podría tener su continuación con los talos de G. doryphora crecidos en glicerol. La presencia de estos "complejos" en P. cruentum fue posible gracias a la elevada actividad de los dictiosomas y la producción de polisacáridos (Jones 1962, Fogg 1966, Ramus & Robins 1975, Tsekos 1985, 1988). De llegar a confirmarse esta situación en G. doryphora sería de un enorme interés, considerando que la pared celular está compuesta principalmente de material sulfatado tal como agar y carrageno. (Percival & McDowell 1967, Tsekos 1988, Craigie 1990).

Por tanto, el sistema de los pretalos cultivados "in vitro" en presencia de glicerol permitiría un buen punto de partida para futuros trabajos sobre la producción de polisacáridos, su biosíntesis y los modos de deposición.

Otro hecho destacado en la ultraestructura de los pretalos de Grateloupia doryphora es el engrosamiento de la pared celular a medida que transcurren los días de cultivo en PES 70 + 0.3 M glicerol hasta la aparición de una zona poco densa que, si bien podría tratarse de un artefacto en el procedimiento de fijación, el cual originaría la retracción del citoplasma, también podría ocurrir que se tratara de la síntesis de un componente nuevo de pared (Foto V.15, V.19, V.39).

b) División celular y células del núcleo de regeneración.

Desgraciadamente, los estudios ultraestructurales sobre la división celular han sido realizados en muy pocos géneros y con macroalgas de tipo tubular o filamentoso (Davis & Scott 1986, Cole & Sheath 1980, Markey & Wilce 1975). Además para nuestro conocimiento en ninguno de las familia *Cryptonemiaceae* a la cual pertenece *Grateloupia doryphora*.

La dificultad para encontrar un gran número de células en división explicaría la escasez de trabajos en esta área.

Lo que si parece establecido para todos los géneros es la existencia de la citocinesis (división del citoplasma) tras la división nuclear (Scott & Broadwater, 1990).

En *G. doryphora*, esta sucesión (mitosis-citocinesis) también fue observada, y con ella, la formación de una nueva pared celular en la que estaría implicada la actividad de los dictiosomas.

La citocinesis concluye con la formación de puntuaciones (*pit-connections*) las cuales terminarán por separarse en las células hijas. No obstante, en nuestras muestras hemos observado procesos de citocinesis cuando aún no se ha producido la separación del *pit-connection*.

La rotura de los *pit-connections* pueden estar relacionadas con las condiciones requeridas para el crecimiento y el desarrollo. Probablemente, las células requieren estar física y fisiológicamente aisladas unas de otras para comenzar la diferenciación celular (Aghajanian & Hommersand 1978).

La degradación de estas puntuaciones ocurre en una sólo dirección y tiene lugar hacia el centro de la masa celular (Chamberlain & Evans 1973). Muy probablemente esta es la razón por la cual vemos una mayor cantidad de *pit-connections* hacia el centro de los pretalos de *G. doryphora*.

Núcleo de regeneración

Las primeras observaciones histológicas de los pretalos en medios sin fuente de carbono mostraron la existencia de diferentes capas de células, de las cuales, la más interna era encargada de la génesis de las yemas (capítulo III).

Los resultados obtenidos con los pretalos cultivados en PES 70 + 0.3 M glicerol destacan el papel de estas mismas células en el crecimiento y la morfogénesis al constituirse un núcleo central que genera el resto de las capas celulares.

A pesar de que este núcleo de regeneración es activo mitóticamente en las primeras horas de cultivo en medios PES 70 + 0.3 M glicerol, a medida que transcurre el tiempo (9-12 días), las divisiones son menos frecuentes, ocurriendo la división a cierta distancia de este centro. Este hecho estaría en concordancia con la reacción negativa de la tinción con mercurio azul de bromofenol en estos estadios (Foto V.53).

No obstante, este centro no es completamente inactivo siendo capaz de regenerar nuevas capas celulares cuando las condiciones experimentales son adversas e incluso, como veremos, se ha producido la completa depigmentación del material.

Este mismo fenómeno ha sido recogido en raíces de ciertas angiospermas (Raven *et al.*, 1992).

Las técnicas histológicas empleadas por Whittier (1962) en el helecho *Equisetum aruense* demostraron también que la primera señal para inducir el crecimiento fue la formación de un "centro de multiplicación celular" compuesto de pequeñas células cuya función era la de dividirse (Kuriyama *et al.*, 1990).

Esta mayor actividad celular en las primeras horas de cultivo en medios conteniendo glicerol abre importantes oportunidades para el estudio de la mitosis en macroalgas y principalmente en algas rojas.

c) Formación de yemas.

La morfogénesis vegetal depende de una expansión celular acoplada a la división. Las células en glicerol se elongan y sufren divisiones más rápidamente que en medios donde se encuentra ausente la fuente de carbono.

La aparición de las yemas coincide con la acumulación y posterior degradación de los granos de almidón en la zona intermedia del pretalo, simultáneamente con la ocupación total de la superficie celular interna de las gotas lipídicas.

La existencia de una reacción positiva de iodo-ioduro potásico y de PAS, junto con, una reacción positiva para proteínas con el Hg-azul de bromofenol en la capa subcortical corrobora este hecho.

La bibliografía recoge ejemplos donde la presencia de glicerol implica la acumulación de almidón (Antia *et al.*, 1969, Antia *et al.*, 1979, Cheng & Antia 1979, Faust & Gantt 1973).

La frecuencia de incorporación de las vesículas de Golgi sobre la pared celular podría anticipar dónde se produciría la expansión celular con una mayor probabilidad (Konrad-Hawkins 1974).

Este hecho aún siendo muy difícil de determinar explicaría la enorme cantidad de protuberancias que se forman en medios conteniendo glicerol comparadas con aquellas surgidas en medios PES y en dónde sólo es posible visualizar zonas puntuales. Paralelamente, la degradación de los granos de almidón, la enorme vacuolación del citoplasma y la fusión de las vesículas para

producir otras de mayor tamaño, en las células de los pretalos cultivados en PES 70 + 0.3 M glicerol, suministrarían la suficiente presión para producir la extensión de la pared celular.

Estos resultados son consistentes con la hipótesis de un crecimiento y expansión celular dirigido por el potencial de presión (Cleland 1967, 1971, 1977, Zimmerman 1977, 1978, Brown *et al.*, 1979) en dónde la pared celular desempeñaría dos importantes papeles, el primero como "conductora" del potencial de presión y el segundo como "mantenedora" de la estructura e integridad celular tal y como también fue descrito para el alga parda filamentosa *Spacelaria furcigera* (Burns *et al.*, 1982a,b, 1984).

Los trabajos recopilados sobre la emisión y desarrollo de las yemas no son abundantes aunque algunos factores han indicado que la discontinuidad de la pared celular (Bartinicki-García 1973, Wertz 1974, Toth 1974, Bal *et al.*, 1975, Fevre 1977, 1979) y la alteración de la organización vacuolar podrían ser indicativos de la emisión de una yema. Se sabe que la síntesis y/o degradación de la pared celular involucra la participación de ciertas enzimas (Roland & Vian 1979). La bibliografía revisada recoge diversos casos sobre la determinación citoquímica de la actividad peroxidasa (Henry 1979, Burns *et al.*, 1984) o la presencia de adenosín trifosfatasa (ATPasa, Coupe & D'Auzac 1980) y fosfatasa ácida (ACPasa, Giordani 1980, Tsekos 1991) las cuales permiten esta suposición.

La alteración de la organización vacuolar está caracterizada por un aumento del número de vacuolas antes de la emisión de las yemas y posteriormente la disminución de las mismas (Burns *et al.*, 1982b). Esta alteración está relacionada con la existencia de un elevado potencial de presión el cual sería imprescindible para la génesis de la yema. La elevada actividad a las que están sometidas estas células es debida a la metabolización de los acúmulos de almidón.

En definitiva, creemos que el papel del almidón celular en medios conteniendo glicerol y durante la formación de las yemas es principalmente como regulador osmótico, compensando la presión que ejerce la fusión de las diferentes vesículas y la propia actividad de los dictiosomas que aportan los materiales necesarios para la expansión celular.

El glicerol, por sí sólo, favorecería el crecimiento de las "yemas" primero con la proliferación de capas celulares a partir de las células internas (inducción de la división celular a las 2 h) y en estadios más avanzados actuando sobre las células de la capa intermedia las cuales también se dividirán y soportarán la acumulación y/o degradación del almidón.

Es importante tener en cuenta que el metabolismo del glicerol conduce a la acumulación de almidón, pero también, aporta la energía y la fuente de carbono necesaria para el crecimiento.

VI. CONCLUSIONES

(1.) La obtención de esporas, procedentes de la esterilización de los explantos fértiles, es una vía adecuada para la propagación de macroalgas y el establecimiento de un cultivo de talos, en condiciones experimentales controladas, los cuales nos permitirá el estudio de fenómenos, tales como, la fecundación e inducción de carposporas y tetrasporas, así como, conocer el ciclo de vida de esta macroalga.

(2.) Las características físicas del medio de cultivo inducen un cambio en el patrón de desarrollo de las carposporas (fijación a la placa en medios líquidos-no fijación en medios sólidos). El estudio citológico mostró que las *cored vesicles* no participan únicamente en la adhesión al sustrato, tal y como lo demuestra su presencia en carposporas no fijadas.

(3.) En este trabajo se recoge la primera aproximación a la génesis de las yemas en macroalgas del tipo de *Grateloupia doryphora*.

(4.) A pesar de la aparente homogeneidad celular en los talos de las algas, se muestra la existencia de diferentes tipos celulares, los cuales conformarán la capa cortical y medular de la yema, con características fisiológicas distintas.

(5.) Los talos de *G. doryphora* recolectados en la naturaleza son capaces de respirar el glicerol si se les incuba previamente en la fuente de carbono y en presencia de luz o en oscuridad. Esta respiración se incrementa a altas intensidades o en periodos cortos con luz azul; además es mitocondrial y no dependiente del efecto fotosintético de la luz.

(6.) El glicerol reduce la tasa de desprendimiento de oxígeno, aunque la fijación de CO₂ es elevada, lo que se interpreta como un resultado de la metabolización del glicerol la cual implica pasos de carboxilación.

(7.) El glicerol provoca en las carposporas el mismo patrón de crecimiento y morfogénesis visto en explantos de *G. doryphora*, en todas las condiciones experimentales de cantidad y calidad de luz.

(8.) La alta intensidad de luz y las condiciones de calidad de luz favorecen la morfogénesis y la friabilidad de los pretalos, entendiéndose que, al mismo tiempo, se produce una activa metabolización del glicerol (máxima morfogénesis) y se canaliza esta fuente de carbono hacia la pérdida de algún polisacárido estructural (friabilidad).

(9.) La activa metabolización del glicerol provoca la depigmentación del material la cual se debe, a un efecto a corto plazo, relacionado con la alta tasa de crecimiento y morfogénesis que favorece la reducción de los nutrientes, y otro a largo plazo, en dónde algún tipo de cambio metabólico afectaría al cultivo.

(10.) La presencia de un núcleo de regeneración, capaz de originar y mantener el crecimiento, nos permitirá mantener un cultivo de células sobre las cuales realizar estudios de crecimiento, desarrollo y diferenciación.

(11.) El glicerol provoca cambios ultraestructurales relacionados con:

1.- las células del núcleo de regeneración, tales como, aumento de la división celular; la acumulación de gotas lipídicas las cuales constituyen un tipo celular biosintético; y la presencia de cloroplastos organizados, lo que explicaría, no sólo el tipo de depigmentación que se produce, sino también, la diferencia entre los tipos celulares.

2.- la morfogénesis generando alteraciones como una intensa actividad de los dictiosomas, implicados en la formación y engrosamiento de la pared celular y en la formación de yemas; un aumento del tamaño vacuolar y la acumulación y degradación del almidón.

VII. BIBLIOGRAFIA

-
- Aghajanian J.G., Hommersand M.H. (1978). The fine structure of the pit connections of *Batrachospermum sirodotii* Skuja. *Protoplasma* **96**: 247-265.
- Allen H.L. (1969). Chemoorganotrophic utilization of dissolved organic compounds by planktic algae and bacteria in a pond. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.* **54**: 1-33.
- Allen M.M., Smith A.J. (1969). Nitrogen chlorosis in blue green algae. *Arch. Microbiol.* **69**: 114-120.
- Alley C.D., Scott J.L. (1977). Unusual dictyosome morphology and vesicle formation in tetrasporangia of the marine red alga *Polysiphonia denudata*. *J. Ultrastruct. Res.* **58**: 289-298.
- Antia N.J. (1980). Nutritional physiology and biochemistry of marine cryptomonads and chryomonads. En: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. vol. 3. Pp. 67-115. Levandowsky M. & Hutner S.H. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Antia N.A., Cheng J.Y., Taylor F.J.R. (1969). The heterotrophic growth of a marine photosynthetic cryptomonad (*Chroomonas salina*). *Proc. Intl. Seaweed Symp.* **6**: 17-29.
- Antia N.J., Kalley J.P., McDonald J., Bisalputra T. (1973). Ultrastructure of the marine cryptomonad *Chroomonas salina* cultured under conditions of photoautotrophy and glycerol heterotrophy. *J. Protozool.* **20**(3): 377-385.
- Antia N.J., Cheng J.Y., Foyle R.A.J., Percival E. (1979). Marine cryptomonad starch from autolysis of glycerol grown *Chroomonas salina*. *J. Phycol.* **15**: 57-62.

- Aparicio P.J., Quiñones M.A. (1991). Blue light, a positive switch signal for nitrate and nitrite uptake by the green alga *Monoporadium braunii*. *Plant Physiol.* **95**: 374-378.
- Aparicio P.J., Roldan J.M., Calero F. (1976). Blue light photoreactivation of nitrate reductase from green algae and higher plants. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **70**: 1071-1075.
- App A.A., Jagendorf A.T. (1963). Repression of chloroplast development in *Euglena gracilis* by substrates. *J. Protozool.* **10**: 340-343.
- Arnold K.E., Littler M.M. (1985). The carbon-14 method for measuring primary productivity. En: *Handbook of Phycological methods*. vol. 4. Ecological field methods: macroalgae. Pp. 377-396. Littler M.M. & Littler D.S. (eds). Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Azcón Bieto J. (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiol.* **73**: 681-686.
- Azcón Bieto J., Osmond B. (1983). Relationship between photosynthesis and respiration. *Plant Physiol.* **71**: 574-581.
- Azuara M.P., Aparicio P.J. (1983). In vivo blue light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase. *Plant Physiol.* **71**: 286-290.
- Azuara M.P., Aparicio P.J. (1985). Spectral dependence of photoregulation of nitrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **77**: 95-103.
- Badger M.R. (1985). Photosynthetic oxygen exchange. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 27-53.

-
- Bal A.K., Verma D.P.S., Byrne H., McLachlan G.A. (1976). Subcellular localization of cellulases in auxin treated pea. *J. Cell Biol.* **69**: 97-105.
- Barceló Coll J., Nicolás G., Sabater B., Sánchez R. (1983). La pared celular. En: *Fisiología Vegetal*. Pp. 35-72. Pirámide (ed). Madrid.
- Barg R., Umiel N. (1977). Effects of sugar concentrations on growth, greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco. *Z. Pflanzenphysiol.* **81**: 161-166.
- Barker H.A. (1936). The oxidative metabolism of the colourless alga *Prototheca zopfii*. *J. cell. comp. Physiol.* **8**: 231-250.
- Bartinicki Garcia S. (1973). Fundamental aspects of hiphal morphogenesis. En: *Microbial Differentiation (23rd. Symposium of the Society for general microbiology)*. Ashworth J.M. & Smith J.E. (Ed). Cambridge Univ. Press.
- Bassham J.A., Larsen P.O., Lawyer A.L., Cornwell K.C. (1981). Relationships between nitrogen metabolism and photosynthesis. En: *Nitrogen and Carbon metabolism*. Pp. 153-163. Bewley J.D. (Ed). Junk Publ. London.
- Bates R.C., Hurlbert R.E. (1970). The effect of acetate on *Euglena gracilis* var. *bacillaris* as a function of environmental conditions. *J. Protozool.* **17**: 134-138.
- Beams H.W., Kessel R.G. (1968). The Golgi apparatus: structure and function. *Int. Rev. Cytol.* **23**: 209-276.
- Beer S., Eshel A. (1985). Determining phycoerithrin and phycocianin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. freshw. Res.* **36**: 785-792.

-
- Beer S., Steward A.J., Wetzel R.G. (1982). Measuring chlorophyll a and ^{14}C labelled photosynthate in aquatic angiosperms by use of a tissue solubilizer. *Plant. Physiol.* **69**: 54-57.
- Belmans D., Van Laere A. (1987). Glycerol cycle enzymes and intermediates during adaptation of *Dunaliella tertiolecta* cells to hyperosmotic stress. *Plant Cell Environment* **10**: 185-190.
- Belmans D., Van Laere A. (1988a). Glycerol 3 phosphatase and the control of glycerol metabolism in *Dunaliella tertiolecta* cells. *Arch. Microbiol.* **150**: 109-112.
- Belmans D., Van Laere A. (1988b). Effect of ionophores on the ATP pool and glycerol content in cell of the halotolerant green alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. General Microbiology* **134**: 2261-2268.
- Ben Amotz A., Avron M. (1973). The role of glycerol in osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.* **51**: 875-878.
- Ben Amotz A., Avron M. (1974). Isolation, characterization and partial purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent dihydroxyacetone reductase from the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.* **53**: 628-631.
- Ben-Amotz A., Avron M. (1983). Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 95-119.
- Bennett M.E., Hobbie J.E. (1972). The uptake of glucose by *Chlamydomonas* sp. *J. Phycol.* **8**: 392-398.
- Berman T., Hadas O., Kaplan B. (1977). Uptake and respiration of organic compounds and heterotrophic growth in *Pediastrum duplex* (Meyen). *Freshwater Biology* **7**: 495-502.

-
- Bernard F. (1963). Density of flagellates and Myxophyceae in the heterotrophic layers related to environment. En: Symposium on Marine Microbiology. Pp. 215-228. Oppenheimer C.H. (Ed). Springfield.
- Berner T., Dubinsky Z., Wyman K., Falkowski P.G. (1989). Photoadaptation and the package effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). J. Phycol. 25: 70-78.
- Bird K.T., Daves C.J., Romeo J.T. (1980). Patterns of non photosynthetic carbon fixation in dark held, respiring thalli of *Gracilaria verrucosa*. Z. Pflanzenphysiol. 98: 359-364.
- Bisson M.A., Kirst G.O. (1979). Osmotic adaptation in the marine alga *Griffithsia monilis* (Rhodophyceae): the role of ions and organic compounds. Aust. J. Plant Physiol. 6: 523-538.
- Boalch G.T. (1961). Studies on *Ectocarpus* in culture. II. Growth and nutrition of a bacteria free culture. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 41: 287-304.
- Bogges S.F., Naylor A.W. (1975). J. Elisha Mitchell Scientific Society. 91: 25-29.
- Bold H.C., Wynne M.J. (1985). Introduction to the algae. Structure and reproduction. Pp. 513-633. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Bollman R.C., Robinson G.G.C. (1985). Heterotrophic potential of the green alga *Ankistrodesmus braunii*. Can. J. Microbiol. 31: 549-554.
- Bonner J., Varner J.E. (1976). Plant biochemistry. Academic Press. N.Y.

-
- Borowitzka L.J., Kessly D.S., Brown A.D. (1977). The salt relations of *Dunaliella*. Further observations on glycerol production and its regulation. *Archives of Microbiology* 113: 131-138.
- Boussiba R., Richmond A.E. (1980). C-phycoerythrin as a storage protein in the blue green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125: 143-147.
- Bradley P.M., Cheney D.P. (1986). Morphogenetic variation in tissue cultures of a red seaweed. *Plant Physiol (suppl)* 80: 129-134.
- Brechignac F., Andre M. (1984). Oxygen uptake and photosynthesis of the red macroalga *Chondrus crispus* in seawater: effects of light and CO₂ concentration. *Plant Physiol.* 75: 919-923.
- Brechignac F., Furbank R.T. (1987). On the nature of the oxygen uptake in the light by *Chondrus crispus*. Effects of inhibitors, temperature and light intensity. *Photosynthesis research* 11: 45-59.
- Brinkmann G., Senger H. (1980). Blue light regulation of chloroplast development in *Scenedesmus* mutant C2A. Pp. 526-540. En: *The blue light syndrome*. Senger H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Brodie J., Guiry M.D. (1987). Life history and photoperiodic responses in *Cordylecladia erecta* (Rhodophyta). *Br. Phycol.* 22: 300-306.
- Brown D.L., Weier T.E. (1970). Ultrastructure of the freshwater alga *Batrachospermum*. I. Thin section and freeze etch analysis of juvenile and photosynthetic filament vegetative cells. *Phycologia* 9: 217-235.
- Brown D.C., Thorpe T.A. (1980). Changes in water potential and its component during shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plantarum* 49: 83-87.

-
- Brown D.C.W., Leung D.W.M., Thorpe T.A. (1979). Osmotic requirements for shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum* **46**: 36-41.
- Buetow D.E. (1967). Acetate repression of chlorophyll synthesis in *Euglena gracilis*. *Nature* **18**: 1127-1128.
- Burns A.R., Oliveira L., Bisalputra T. (1982a). A histochemical study of bud initiation in the brown alga *Sphacelaria furcigera*. *New Phytol.* **92**: 297-307.
- Burns A.R., Oliveira L., Bisalputra T. (1982b). A morphological study of bud initiation in the brown alga *Sphacelaria furcigera*. *New Phytol.* **92**: 309-325.
- Burns A.R., Oliveira L., Bisalputra T. (1984). A cytochemical study of cell wall differentiation during bud initiation in the brown alga *Sphacelaria furcigera*. *Botanica Marina* **27**: 45-54.
- Calabrese G., Felicini G.P. (1970). Research on the red algae pigments. I. Pigments of *Pterocladia capillacea* cultured with some nitrogenous materials. *G. Bot. Ital.* **104**: 81-89.
- Calero F., Ullrich W.R., Aparicio P.J. (1980). Regulation by monochromatic light of nitrate uptake in *Chlorella fusca*. En: The blue light syndrome. Pp. 411-421. Senger H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Callow M.C., Evans L.V. (1974). Studies on the ship fouling alga *Enteromorpha*. III. Cytochemistry and autoradiography of adhesive production. *Protoplasma* **80**: 15-22.
- Canvin D.T., Berry J.A., Badger M.R., Fock H., Osmond B. (1980). Oxygen exchange in leaves in the light. *Plant Physiol.* **66**: 302-307.

-
- Cleland R. (1967). A dual role of turgor pressure in auxin induced cell elongation in *Avena coleoptiles*. *Planta* 77: 182-191.
- Cleland R. (1971). Cell wall extension. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22: 197-222.
- Cleland R. (1977). The control of cell enlargement. En: *Integration of activity in the higher plant*. Jennings D.H. (Ed). University Press. Cambridge.
- Cole K., Sheath R.G. (1980). Ultrastructural changes in major organelles during spermatial differentiation in *Bangia*. *Protoplasma* 102: 253-279.
- Cole K.M., Park C.M., Reid P.E., Sheath R.G. (1985). Comparative studies on the cell wall of sexual and asexual *Bangia atropurpurea*. I. Histochemistry of polysaccharides. *J. Phycol.* 21: 585-592.
- Coleman J.R., Colman B. (1980). Effect of oxygen and temperature on the efficiency of photosynthetic carbon assimilation in two microscopic algae. *Plant Physiol.* 65: 980-983.
- Colin H., Augier J. (1939). Un glucide original chez les floridées du genre *Polysiphonia* le dmannoside de l-glycerate de sodium. *C.r.hebd. Séanc. acad. Sci. Paris.* 208: 1450-1453.
- Coudret A., Ferron F., L'Hardy Halos M.T. (1983). Effects of salinity on growth and photosynthetic metabolism of *Aglaothamnion chadefaudil* (Ceramiales). *Photosynthetica* 17: 43-48.
- Coupé M., D'Auzac J. (1980). ATPase des parois squeletiques de racine et d'epicotyle chez *Vicia faba*. *Physiologie Vegetale* 18: 223-240.

-
- Craigie J.S. (1990). Cell walls. En: *Biology of the red algae*. Cole K.M. & Sheath R.G. (Ed). Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Craigie J.S., McLachlan J. (1964). Glycerol as a photosynthetic product in *Dunaliella tertiolecta*. Butcher. *Can. J. Bot.* **42**: 777-778.
- Cullimore J.V., Sims A.P. (1981). Occurrences of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* **20**: 597-600.
- Chamberlain Y.M. (1984). Spore size and germination in *Fosliella*, *Pneophyllum* and *Melobesia* (Rhodophyta). *Phycologia* **23**: 433-440.
- Chamberlain A.H.L., Evans L.V. (1973). Aspects of spore production in the red alga *Ceramium*. *Protoplasma* **76**: 139-159.
- Chapman A.R., Craigie J.S. (1977). Seasonal growth in *Laminaria longicuris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. *Mar. Biol.* **40**: 107-205.
- Chapman A.R.O., Lindley J.E. (1980). Seasonal growth of *Laminaria solidungula* in the Canadian high arctic in relation to irradiance and dissolved nutrient concentrations. *Mar. Biol.* **57**: 1-5.
- Chapman A.R.O., Markham J.W., Lunning K. (1978). Effects of nitrate concentration on the growth and physiology of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) in culture. *J. Phycol.* **14**: 195-198.
- Chatterton N.J. (1973). Product inhibition of photosynthesis in alfalfa as related to specific leaf weight. *Crop. Sci.* **13**: 284-285.
- Chen L.C.M. (1982). Callus like formation from Irish moss. En: *Biological Bulletin National Taiwan Normal University*. Miu T.S. (Ed). Taipei.

- Chen L.C.M. (1986). Cell development of *Porphyra miniata* (Rhodophyceae) under axenic culture. *Botanica Marina* **29**: 435-440.
- Chen L.C.M. (1987). Protoplast morphogenesis of *Porphyra leucosticta* in culture. *Botanica Marina* **30**: 399-301.
- Chen L.C.M., Taylor A.R.A. (1978). Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. *Can. J. Bot.* **56**: 883-887.
- Cheney D.P., Mar E., Saga N., Van der Meer J. (1986). Protoplasts isolation and cell division in the agar producing seaweed *Gracilaria* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **22**: 238-243.
- Cheng J.Y., Antia N.A. (1970). Enhancement by glycerol of phototrophic growth of marine planktonic algae and its significance to the ecology of glycerol pollution. *J. Fisheries Res. Bd. Can.* **27**: 335-346.
- Cheung W.Y., Gibbs M. (1966). Dark and photometabolism of sugars by a blue green alga *Tolypothrix tenuis*. *Plant Physiol.* **41**: 731-735.
- Chitlaru E., Pick U. (1991). Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiol.* **96**: 50-60.
- Danforth W.F. (1962). Substrate assimilation and heterotrophy. En: *Physiology and Biochemistry of algae*. Pp. 99-123. Lewin R.A. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Darley W.M., Ohlman C.T., Wimpee B.B. (1979). Utilization of dissolved organic carbon by natural populations of epibenthic salt marsh diatoms. *J. Phycol.* **15**: 1-5.

-
- Davis E., Scott J. (1986). Ultrastructure of cell division in the marine red alga *Lomentaria baileyana*. *Protoplasma* 131: 1-10.
- Davison I.R., Reed R.H. (1985a). The physiological significance of mannitol accumulation in brown algae: the role of mannitol as a compatible cytoplasmic solute. *Phycologia* 24(4): 449-457.
- Davison I.R., Reed R.H. (1985b). Osmotic adjust in *Laminaria digitata* (Phaeophyta) with particular reference to seasonal changes in internal solute concentrations. *J. Phycol.* 21: 41-50.
- Dawes C.J. (1981). *Marine Botany*. Wiley and Sons (Publ.). N.Y.
- Dawes C.J., Koch E.M. (1990). Physiological responses of the red algae *Gracilaria verrucosa* and *G. tikvahiae* before and after nutrient enrichment. *Bull. Marine Science* 46(2): 335-344.
- DeBoer J.A., Ryther J.H. (1977). Potential yields from a waste recycling algal mariculture system. En: *The marine plant biomass of the Pacific Northwest coast*- Krauss R. (Ed). Oregon State Univ. Press. Corvallis.
- Delivopoulos S.G., Tsekos I. (1983). A light microscope study of carposporophyte development in *Gracilaria verrucosa*. *Annals of Botany* 52: 317-323.
- Delivopoulos S.G., Kugrens P. (1984). Ultrastructure of carposporogenesis in the parasitic alga *Faucheocolax attenuata* Setch. *Amer. J. Bot.* 71: 1245-1259.
- Delivopoulos S.G., Tsekos I. (1985). Nuclear envelope activity in gonimoblast generative cells of the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Flora* 177: 309-313.
- Delmer D.P. (1987). Cellulose biosynthesis. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 38: 259-290.

-
- deLoura I.C., Dubacq J.P., Thomas J.C. (1987). The effects of nitrogen deficiency on pigments and lipids of cyanobacteria. *Plant Physiol.* **83**: 838-843.
- Diannelidis B.E., Kristen U. (1988). Comparative histochemical studies of reproductive and gametophytic tissue of marine red algae by means of fluorescent and light microscopy. *Botanica Marina* **31**: 163-170.
- Dixon P.S. (1973). *Biology of the Rhodophyta*. New York. Hafner.
- Dodge J.D. 1973. *The fine structure of algal cells*. Academic Press. London.
- Doermel W.N., Brock T.D. (1971). The physiological ecology of *Cyanidium caldarium*. *J. Gen. Microbiol.* **67**: 17-24.
- Dresbach C. (1973). *Lichtwirkungen auf die bildung von photosynthesepigmenten bei mutanten von ankistrodesmus und Chlorella*. PhD Thesis. Univ. Kohl. Alemania.
- Dring M.J. (1984). Photoperiodism and phycology. *Prog. Phycol. Res.* **3**: 159-167
- Dring M.J., Lunning K. (1985). Emerson enhancement effect and quantum yield of photosynthesis for marine macroalgae in simulated underwater light fields. *Mar. Biol.* **87**: 109-117.
- Droop M.R. (1974). Heterotrophy of carbon. En: *Algal Physiology and Biochemistry*. Pp. 530-559. Stewart W.D.P. (Ed). Blackwell Sci. Oxford.
- Druehl L.D., Hsiao S.I. (1971). Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. I. The effect of light and culture media. *Can. J. Bot.* **49**: 1503-1509.

-
- Ducker S.C., Knox R.B. (1984). Epiphytism at the cellular level with special reference to algal epiphytes. En: Encyclopedia of plant physiology: cellular interaction. Linsken H.F. & Heslop Harrison J. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Duffield E.C.S., Waaland S.D., Cleland R.E. (1972). Morphogenesis in the red alga *Griffithsia pacifica*: regeneration from single cells. *Planta* **105**: 185-195.
- Dunton K.H. (1985). Growth of dark exposed *Laminaria saccharina* Lamour and *Laminaria solidungula* (Laminariales, Phaeophyta) in the Alaskan Beauford Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **94**: 181-189.
- Dwyer M., Smillie R.M. (1970). A light induced β 1,3 glucan breakdown asociated with the differentiation of chloroplasts in *Euglena gracilis*. *Biochim. biophys Acta* **216**: 392-401.
- Ekman P., Yu S., Pedersen M. (1991). Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content, α galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. *Br. Phycol. J.* **26**: 123-131.
- Elrifi I.R., Turpin D.H. (1986). Nitrate and ammonium induced photosynthetic suppression in N limited *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* **81**: 273-279.
- Ellis R., Moore D., Shure R. (1981). Characteristics of chlorophyll formation in the green alga *Golenkina*. *Plant Cell Physiol.* **22**: 999-1009.
- Emerson R., Lewis C.M. (1943). The dependence of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis on wave length of light. *Am. J. Bot.* **30**: 165-178.

-
- Evans L.V., Christie A.O. (1974). Studies on the ship fouling alga *Enteromorpha*. I. Aspects of fine structure and biochemistry of swimming and newly settled zoospores. *Ann.Bot. N.S.* **34**: 451-461.
- Evans L.V., Callow M.E., Percival E., Freed V. (1974). Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. *J. Cell Sci.* **16**: 1-21.
- Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (1983). Handbook of plant cell culture. vol. 1. Techniques for propagation and breeding. McMillan (Publ). N.Y.
- Falkowski P.G., Sukenik A., Herzig R. (1989). Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana*. II. Relative abundance of chloroplast proteins. *J. Phycol.* **25**: 471-478.
- Farquhar G.D., Von Caemmerer S. (1982). Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. En: Water relations and photosynthetic productivity. Vol. B. Pp. 549-587. Lange O.L., Osmond B., & Ziegler H. (Ed). Springer Verlag. Heidelberg.
- Faust M.A., Gantt E. (1973). Effect of light intensity and glycerol on the growth, pigment composition, and ultrastructure of *Chroomonas* sp. *J. Phycol.* **9**: 489-495.
- Feuillade M., Feuillade J. (1989). Heterotrophic capabilities of the blue green alga *Oscillatoria rubescens*. *Arch. Hydrobiol.* **117**: 61-76.
- Fevre M. (1977). Subcellular localization of glucanase and cellulase in *Saprolegnia monoica* Pringsheim. *J. General Microbiology* **103**: 287-295.
- Fevre M. (1979). Glucanases, glucan synthases and wall growth in *Saprolegnia monoica*. En: Fungal Walls and Hyphal growth (Symposium of the

British Mycological Society). Burnett J.H. & Trinci A.P.J. (Ed).
Cambridge Univ. Press.

Filbin G.J., Hough R.A. (1984) Extraction of ^{14}C -labelled photosynthate from aquatic plants with dimethyl sulfoxid (DMSO). *Limnol. Oceanogr.* **29**: 426-428.

Fisher D.D., Gibor A. (1987). Production of protoplasts from the brown seaweed *Sargassum muticum* (Phaeophyta). *Phycologia* **26**: 488-492.

Fogg G.E. (1956). Photosynthesis and formation of fats in a diatom. *Ann. Bot.* **20**: 265-285.

Fogg G.E. (1959). Nitrogen nutrition and metabolic patterns in algae. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **13**: 106-125.

Francko D.A. (1989). Modulation of photosynthetic carbon assimilation in *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyceae) by cAMP: An electrogenic mechanism?. *J. Phycol.* **25**: 305-313.

Fries L. (1959). *Goniotrichum elegans*: a marine red alga requiring vitamin B₁₂. *Nature* **183**: 558-559.

Fries L. (1961). Vitamin requirements of *Nemalion multifidum*. *Experientia* **17**: 75-79.

Fries L. (1963). On the cultivation of axenic red algae. *Physiol. Plantarum* **16**: 695-708.

Fries L. (1964). *Polysiphonia urceolata* in axenic culture. *Nature* **202**: 110-115.

-
- Fries L. (1973). Requirements for organic substances in seaweeds. *Botanica Marina*. **16**: 19-31.
- Fries L. (1977). Growth regulating effects of phenylacetic acid and p-hydroxyphenilacetic acid on *Fucus spiralis* in axenic culture. *Phycologia* **16**: 451-455.
- Fries L. (1980). Axenic tissue cultures from the sporophytes of *Laminaria digitata* and *Laminaria hyperborea* (Phaeophyta). *J. Phycol.* **16**: 475-477.
- Fries L. (1984). Induction of plantlets in axenically cultivated rhizoids of *Fucus spiralis*. *Can. J. Bot.* **62**: 1616-1620.
- Fujita R.M. (1985). The role of nitrogen status in regulating transient ammonium uptake and nitrogen storage by macroalgae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **92**: 283-301.
- Gantt E., Conti S.F. (1965). The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.* **26**: 365-381.
- Garcia Reina G., Robaina R.R., Luque A. (1988). Regeneration of thalliclones from *Laurencia* sp. (Rhodophyta). En: *Plant Cell Biotechnology*. Pais M.S.S., Mavituna F., & Novais J.M. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Geider R.J., Osborne B.A. (1992). Algal photosynthesis. The measurement of algal gas exchange. Pp. 2-66. Chapman & Hall (Publ). N.Y.
- Georgi M. (1974). Über blaulichtbedingte Veränderungen im Kohlenhydrat und Proteingehalt einer chlorophyllfreien Mutante *Chlorella vulgaris*. PhD thesis. Univ. Koln. Alemania.

-
- Gerrids P.O., Smid L. (1983). A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J. Microscopy* **132**: 81-85.
- Giordani R. (1980). Dislocation du plasmalemmes et liberation de vesicules parietales lors de la degradation des parois terminales durant la differentiation des lactiferes articules. *Biol. Cellulaire* **38**: 231-236.
- Goldman J.C., Glibert P.M. (1983). Kinetics of inorganic nitrogen uptake by phytoplankton. En: Nitrogen in the marine environment. Pp. 233-274. Carpenter E.J. & Capone D.G. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Gooday G.W. (1970). Aspects of the carbohydrate metabolism of *Prynesium parvum*. *Arch. Microbiol.* **72**: 9-15.
- Graham D. (1980). Effects of light on dark respiration. En: The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. vol. 2. Pp. 525-579. Davies D.D. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Grasshoff K. (1981). The electrochemical determination of oxygen. En: Marine electrochemistry. A practical introduction. Pp. 327-420. Whitfield M. & Jager D. (Eds). N.Y.
- Grotjohann N., Kowallik W. (1989). Influence of blue light on the activity of phosphofructokinase in *Chlorella kessleri*. *Physiol. Plant.* **75**: 43-46.
- Grotjohann N., Kowallik W., Ruyters G. (1991). Properties of oligomeric forms of phosphofructokinase from *Chlorella kessleri* grown under different light conditions. *Bot. Acta* **104**: 77-81.
- Gutknecht J., Hastings D.F., Bisson M.A. (1978). Ion transport and turgor pressure regulation in giant algal cells. En: Membrane transport in biology. III. Transport across multimembrane systems. Pp. 125-174.

- Giebisch G.D., Tosteson C., & Ussing H.H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Hanisak M.D. (1983). The nitrogen relationships of marine macroalgae. En: Nitrogen in the marine environment. Pp 699-730. Carpenter E.J. & Capone D.G. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Hara Y., Chiara M. (1974). Comparative studies on the chloroplast ultrastructure in the Rhodophyta with special references to their taxonomic significance. The Science Reports of the Tokyo Kyoiki Daigaku 15(232): 209-235.
- Harnischfeger G., Treharne K., Feierabend J. (1974). Studies on the primary photosynthetic processes of plastids from wheat grown under light of different spectral quality. Plant Sci. Lett. 3: 61-66.
- Harris R.C., Kirk J.T.O. (1969). Control of chloroplast formation in *Euglena gracilis*: antagonism between carbon and nitrogen sources. Biochem. J. 113: 195-202.
- Harris G.C., Cheesbrough J.K., Walker D.A. (1983). Effect of mannose on photosynthetic gas exchange in spinach leaf discs. Plant Physiol. 71: 108-111.
- Harrison P.J., Thomas T.E. (1988). Biomass measurements: protein determination. En: Experimental phycology. A laboratory manual. Pp. 27-34. Lobban C.S., Chapman D.J., Kremer B. (ed). Cambridge University Press. Cambridge.
- Hase E. (1971). Studies on the metabolism of nucleic acid and protein associated with processes of de- and re- generation of chloroplasts in *Chlorella protothecoides*. En: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. Boardman N.K., Linnane A.W., & Smillie R.M. (Ed). North Holland. N.Y.

-
- Haus M., Wegmann K. (1984). Glycerol 3 phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.8.) from *Dunaliella tertiolecta*. II. Influence of phosphate esters and different salts on the enzymatic activity with respect to osmoregulation. *Physiol. Plant* **60**: 289-293.
- Hauschild A., Nelson C.D., Krotkov G. (1962a). The effect of light quality on the products of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*. *Can. J. Bot.* **40**: 179-183.
- Hauschild A., Nelson C.D., Krotkov G. (1962b). The effect of light quality on the products of photosynthesis in green and blue-green algae and in photosynthetic bacteria. *Can. J. Bot.* **40**: 1619-1623.
- Heber U. (1980). Metabolic regulation by a transmembrane proton gradient. En: Cell compartmentation and metabolic channeling. Pp. 311-344. Nover L., Lynen F., Mothes K. (Ed). Elsevier/ North Holland. Amsterdam.
- Hellebust J.A. (1970). The uptake and utilization of organic substances by marine phytoplankton. En: Symposium on organic matter in natural waters. Pg. 223-256. Hood D.W. (Ed). Univ. of Alaska. Fairbanks. Inst. Mar. Sci. Occ. Publ. n° 1.
- Hellebust J.A. (1976). Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**: 485-505.
- Hellebust J.A., Guillard R.R.L. (1967). Uptake specificity for organic substrates by the marine diatom *Melosira nulloides*. *J. Phycol.* **3**: 132-136.
- Hellebust J.A. Lin Y.H. (1989). Regulation of glycerol and starch metabolism in *Chlamydomonas pulsatilla* in response to changes in salinity. *Plant Cell Environment* **12**: 621-627.

- Henry E.W. (1979). Peroxidases in tobacco abscission zone tissue. VI. Ultrastructural localization in plasmodesmata during ethylene induced abscission. *Cytologia* **44**: 135-152.
- Herold A. (1980). Regulation of photosynthesis by sink activity, the missing link. *New Phytol.* **86**: 131-144.
- Herzig R., Falkowski P.G. (1989). Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana*. I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. *J. Phycol.* **25**: 462-471.
- Hitchman M.L. (1978). Measurement of dissolved oxygen. John Wiley (Ed & Publ). N.Y.
- Hobbie J.E., Wright R.T. (1965). Competition between planktonic bacteria and algae for organic solutes. *Mens. Ist. Ital. Idrobiol. Dott. Marco de Marchi* **18**: 175-187.
- Holm-Hansen O. (1962). Physiology and biochemistry of algae. Pp. 25-33. Lewin R.A. (Ed). Academic Press. Londres.
- Horrum M.A., Schwartzbach S.D. (1980). Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena*. *Plant Physiol.* **65**: 382-386.
- Horrum M.A., Schwartzbach S.D. (1981). Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena*: induction of microbodies. *Plant Physiol.* **68**: 430-434.
- Hunter G.J.E. (1953). The oxidation of glycerol by *Mycobacteria*. *Biochem. J.* **55**: 320-328.

-
- Hutner S.H., Provasoli L., Filfus J. (1953). Nutrition of some phagotrophic fresh water chrysoomonads. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **56**: 852-862
- Jeffrey S.W., Humphrey G.W. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c, and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **46**: 191-194.
- Johannes M.L., Klessen C. (1984). Alcian Blue/PAS or PAS/Alcian Blue?. *Histochemistry* **80**: 129-132.
- Johnson K.M., Burney C.M., Sieburth J.M. (1981). Doubling the production and precision of the MBTH spectrophotometric assay for dissolved carbohydrates in seawater. *Marine Chemistry* **10**: 467-473.
- Kanazawa T., Kirk T.M.R., Bassham J.A. (1970). Regulatory effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. biophys. Acta* **205**: 401-408.
- Kauss H. (1968). α Galaktosylglyzeride und osmoregulation in Rotalgen. *Z. Pflanzenphysiol.* **58**: 428-433.
- Kauss H. (1969). Osmoregulation mit α galaktosylglyzeride bei *Ochromonas* und *Rotalgen*. *Ber. dt. bot. Ges.* **82**: 115-125.
- Kauss H. (1978a). Osmotic regulation in algae. *Progress in Phytochemistry* **5**: 1-27.
- Kauss H. (1978b). Osmoregulation. En: Membrane transport in plants. Zimmermann U.U. & Dainty J. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Kawashima Y., Tokuda H. (1990). Callus formation in *Ecklonia cava* Kjellman (Phaeophyta). *Hydrobiologia* **204/205**: 375-380.

-
- Kiernan J.A. (1990). *Histological and histochemical methods: theory and practice*. 2nd. edition. Pergamon press. U.K.
- Killan A., Myers J. (1956). A special effect of light on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Am. J. Bot.* **43**: 569-572.
- Kirchman D., Knees F., Hodson R. (1985). Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 599-607.
- Kirst G.O. (1981). Photosynthesis and respiration of *Griffithsia monilis* (Rhodophyceae): effect of light, salinity and oxygen. *Planta* **151**: 281-288.
- Kirst G.O., Bisson M.A. (1979). Regulation of turgor pressure in marine algae: ions and low molecular weight organic compounds. *Aust. J. Plant Physiol.* **6**: 539-556.
- Kloareg B., Quatrano R.S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **26**: 259-315.
- Komor E., Cho B.H., Kraus M. (1988). The occurrence of the glucose inducible transport system for glucose, proline, and arginine in different species of *Chlorella*. *Bot. Acta* **101**: 321-324.
- Konopka A., Schnur M. (1980). Effect of light intensity on macromolecular synthesis in Cyanobacteria. *Microb. Ecol.* **6**: 291-301.
- Konopka A., Schnur M. (1981). Biochemical composition and photosynthetic carbon metabolism of nutrient limited cultures of *Merispodemia tenuissima* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* **17**: 118-122.

-
- Konrad Hawkins E. (1974). Golgi vesicles of uncommon morphology and wall formation in the red alga *Polysiphonia*. *Protoplasma* 80: 1-14.
- Kost H.P., Senger M., Wanner G. (1984). Effect of nitrate and sulphate starvation on *Porphyridium cruentum* cells. *Z. Pflanzenphysiol.* 113: 231-249.
- Kowallik W. (1962). Über die Wirkung des blauen und roten Spektralbereichs auf die Zusammensetzung und Zellteilung synchronisierter Chlrellen. *Planta* 58: 337-365.
- Kowallik W. (1969). Der einfluss von Licht auf die Atmung von *Chlorella* bei gehemmter Photosynthese. *Planta* 86: 50-62.
- Kowallik W. (1982). Blue light effects on respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 51-72.
- Kowallik W. (1987). Blue light effects on carbohydrate and protein metabolism. En: *Blue light responses: phenomena and occurrence in plants and microorganisms*. Pp. 7-16. Senger H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Kowallik U., Kowallik W. (1969). Eine wellenlangenabhängige Atmungssteigerung während der Photosynthese von *Chlorella*. *Planta* 84: 141-144.
- Kowallik W., Ruyters G. (1976). Über aktivitätssteigerungen der pyruvat kinase durch blaulicht oder glucose bei einer chlorophyllfreien *Chlorella* mutante. *Planta* 128: 11-14.
- Kowallik W., Schatzle S. (1980). Enhancement of carbohydrate degradation by blue light. En: *The blue light syndrome*. Pp. 344-360. Senger H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.

- Kowallik W., Neuert G. (1984). Enhancement by blue light of GOGAT activity in *Chlorella*. En: Blue light effects in biological systems. Senger H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Kowallik W., Grotjohann N. (1988). Influence of red light on the activity of phosphofructokinase in *Chlorella kessleri*. *Physiologia Plantarum* **74**: 101-106.
- Kowallik W., Grotjohann N., Ruyters G. (1990). Oligomeric forms of glycolytic enzymes in *Chlorella* grown in different light qualities. *Bot. Acta* **103**: 197-202.
- Kremer B.P (1978a). Patterns of photoassimilatory products in Pacific Rhodophyceae. *Can. J. Bot.* **56**: 1655-1659.
- Kremer B.P. (1978b). Studies on $^{14}\text{CO}_2$ assimilation in marine Rhodophyceae. *Marine Biology* **48**: 47-55.
- Kremer B.P. (1978c). Aspects of CO_2 fixation in some freshwater Rhodophyceae. *Phycologia* **17**: 430-434.
- Kremer B.P. (1979). Photoassimilatory products and osmoregulation in marine Rhodophyceae. *Z. Pflanzenphysiol.* **93**: 139-147.
- Kremer B.P. (1981). Aspects of carbon metabolism in marine macroalgae. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **19**: 41-94.
- Kugrens P. (1974). The ultrastructure of carposporogenesis in the marine hemiparasitic red alga *Erthrocytis saccata*. *J. Phycol.* **8**: 390-395.

-
- Kugrens P., West J.A. (1972). Ultrastructure of tetrasporogenesis in the parasitic red alga *Levringiella gardneri* (Setchell) Kylin. *Journal of Phycology* **8**: 370-383.
- Kugrens P., West J.A. (1973). The ultrastructure of carpospores differentiation in the parasitic red alga *Levringiella gardneri*. *Phycologia* **12**: 163-173.
- Kupperts U., Weidner M. (1980). Seasonal variation of enzyme activities in *Laminaria hyperborea*. *Planta* **148**: 222-230.
- Kuriyama A., Hojoh T., Matsushima H., Takeuchi M. (1990). Histological and morphological observation of sporophytic shoot of *Equisetum arvense* produced from gametophytic cells by exogenously supplied cytokinin. *J. Plant Physiol.* **137**: 20-24.
- Langdom C. (1984). Dissolved oxygen monitoring system using a pulsed electrode: design, performance, and evaluation. *Deep sea Res.* **31**: 1357-1367.
- Lapointe B.E., Ryther J.H. (1979). The effects of nitrogen and seawater flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* v. *angustissima* in mass outdoor cultures. *Bot. Mar.* **22**: 529-537.
- Lapointe B.E., Tenore K.R. (1981). Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata*. I. Interaction of light and nitrogen on nutrient uptake, growth and biochemical composition. *J. Exp. Mar. Biol. ecol.* **53**: 135-152.
- Lapointe B.E., Duke C.S. (1984). Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* **20**: 488-495.

- Lapointe B.E., Rice D.L., Lawrence J.M. (1984). Responses of photosynthesis, respiration, growth and cellular constituents to hypoosmotic shock in the red alga *Gracilaria tikvahiae*. *Comp. Biochem. Physiol.* **77a**: 127-132.
- Larsson M., Olsson T., Larsson C.M. (1985). Distribution of reducing power between photosynthetic carbon and nitrogen assimilation in *Scenedesmus*. *Planta* **164**: 246-253.
- Law A.T., Robertson B.R., Dunker S.S., Button D.K. (1976). On describing microbial growth kinetics from continuous culture data: some general considerations, observations and concepts. *Microb. Ecol.* **2**: 261-283.
- Lawlor H.J., McComb J.A., Borowitzka M.A. (1988). The development of filamentous and callus like growth in axenic tissue cultures of *Ecklonia radiata*. En: *Algal Biotechnology*. Stadler T., Mollion J., Verdis M.C., Karamanos Y., Horvan H., & Christiansen D. (Ed). Elsevier Applied Science. London.
- Lawlor H.J., McComb J.A., Borowitzka M.A. (1989). Tissue culture of *Ecklonia radiata* (Phaeophyceae, Laminariales): effects on growth of light, organic carbon source and vitamins. *J. Appl. Phycol.* **1**: 105-112.
- Lea P.J. (1990). *Methods in plant biochemistry*. Academic Press. London.
- Lee T.F. (1985). Asporogous gametophyte formation in stipe explants from *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *Botanica Marina* **28**: 179-185.
- Lerner H.R., Sussman I., Avron M. (1980). Characterization and partial purification of dihydroxyacetone kinase in *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta* **615**: 1-9.

-
- Levy I., Gantt E. (1988). Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis and phycobilisomes. *J. Phycol.* **24**: 452-458.
- Levy I., Gantt E. (1990). Development of photosynthetic activity in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) following nitrogen starvation. *J. Phycol.* **26**: 62-68.
- Lewin J. (1963). Heterotrophy in marine diatoms. Pp. 229-235. En: *Marine microbiology*. Oppenheimer C.H. (Ed). Springfield.
- Lewin J., Lewin R.A. (1960). Auxotrophy and heterotrophy in marine littoral diatoms. *Can. J. Microbiol.* **6**: 127-134.
- Lewin J., Hellebust J.A. (1970). Heterotrophic nutrition of the marine pennate diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Can. J. Microbiol.* **16**: 1123-1129.
- Lewin J., Hellebust J.A. (1976). Heterotrophic nutrition of the pennate diatom *Nitzschia angularis affinis*. *Mar. Biol.* **36**: 313-320.
- Lewin M.R., Kemp W.M., Cunningham J.J., Stevenson J.C. (1982). A rapid technique for preparation of aquatic macrophyte samples for measuring ^{14}C incorporation. *Aquat. Bot.* **13**: 203-207.
- Lewitus A.J. (1990). Physiological studies of phototrophy and heterotrophy in two algae with contrasting nutritional characteristics, *Pyrenomonas salina* (Chryptophyceae) and *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae). PhD Thesis, Massachusetts Institute of Technology. Woods Hole Oceanographic Institution. Woods Hole, Massachusetts, WHOI 90-48.
- Lewitus A.J., Caron D.A. (1990). Relative effects of nitrogen or phosphorous depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition, and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **61**: 171-181.

-
- Lewitus A.J., Caron D.A. (1991a). Physiological responses of phytoflagellates to dissolved organic substrate additions. 1. Dominant role of heterotrophic nutrition in *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae). *Plant Cell Physiol.* 32(5): 671-680.
- Lewitus A.J., Caron D.A. (1991b). Physiological responses of phytoflagellates to dissolved organic substrate additions. 2. Dominant role of autotrophic nutrition in *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Plant Cell Physiol.* 32(6): 791-801.
- Lewitus A.J., Caron D.A., Miller K.R. (1991). Effects of light and glycerol on the organization of the photosynthetic apparatus in the facultative heterotroph *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *J. Phycol.* 27: 578-587.
- Littler M.M., Arnold K.E. (1979). Electrodes and chemicals. En: Handbook of phycological methods. Ecological field methods: Macroalgae. Pp. 350-372. Littler M.M. & Littler D.S. (Ed).
- Liu W.S., Gordon M.E. (1987). Tissue and cell culture of New Zealand *Pterocladia* and *Porphyra* species. *Hydrobiologia* 116/7: 319-323.
- Liu Q.Y., Chen L.C.M., Taylor A.R.A. (1992). Ultrastructure of cell wall regeneration by isolated protoplasts of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Botanica Marina* 35: 21-33.
- Lobban C.S., Harrison P.J., Duncan M.J. (1985). The physiological ecology of seaweeds. Cambridge Univ Press. N.Y.
- Lunning K. (1980). Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three *Laminaria* species (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 16: 1-15.

-
- Lunning K. (1981a). Light. En: The biology of seaweeds. Lobban C.S. & Wynne M.J. (Ed). Blackwell. Oxford.
- Lunning K. (1981b). Egg release in gametophytes of *Laminaria saccharina*: Induction by darkness and inhibition by light and U.V. Br. Phycology J. 16: 379-387.
- Lunning K., Dring M.J. (1975). Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* grown in blue and red light. Marine biology 29: 195-204.
- Lunning K., Dring M.J. (1985). Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli. Marine Biology 87: 119-129.
- Macler B.A. (1986). Regulation of carbon flow by nitrogen and light in the red alga *Gelidium coulteri*. Plant Physiol. 82: 136-140.
- Macler B.A. (1988). Salinity effects on photosynthesis, carbon allocation and nitrogen assimilation in the red alga *Gelidium coulteri*. Plant Physiol. 88: 690-694.
- Maldonado J.M., Aparicio P.J. (1987). Photoregulation of nitrate assimilation in eukaryotic organisms. En: Inorganic nitrogen metabolism. Pp. 76-81. Ullrich, Aparicio, Syrett & Castillo (Eds). Springer Verlag. Heidelberg.
- Marengo T., Lilley R.M., Brown A.D. (1985). Osmoregulation in *Dunaliella*. Catalysis of the glycerol 3 phosphate dehydrogenase reaction in a chloroplast enriched fraction of *Dunaliella tertiolecta*. Arch. Microbiol. 142: 262-268.
- Markager S., Sand-Jensen K. (1990). Heterotrophic growth of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). J. Phycol. 26: 670-673.

-
- Markey D.R., Wilce R.T. (1975). The ultrastructure of reproduction in the brown alga *Pylaiella littoralis*. 1. Mitosis and cytokinesis in the plurilocular gametangia. *Protoplasma* 85: 219-241.
- Martin E.L., Benson R.L. (1982). Algal viruses, pathogenic bacteria and fungi: introduction and bibliography. En: Selected topics in phycology. Rosowsky I.R. & Tauber B.C. (Ed).
- Matile P. (1975). The lytic compartment of plant cells. *Cell Biology Monographs*. vol. 1. Wien-N.Y.. Springer.
- Matta J.L., Chapman D.J. (1991). Photosynthetic responses and daily carbon balance of *Colpomenia peregrina*: seasonal variations and differences between intertidal and subtidal populations. *Mar. Biol.* 108: 303-313.
- McBride D.L., Cole K.M. (1971). Electron microscopic observations on the differentiation and release of monospores in the marine red alga *Smithora naiadum*. *Phycologia* 10: 49-61.
- McCully M.E. (1966). Histological studies on the genus *Fucus*. I. Light microscopy of mature vegetative plant. *Protoplasma* 62: 287-305.
- McLachlan J. (1977). Effects of nutrient on growth and development of embryos of *Fucus edentatus* Pyl. (Phaeophyceae, Fucales). *Phycologia* 16: 329-334.
- Mego J.L. (1968). Inhibitors of the chloroplast system in *Euglena*. En: The biology of *Euglena*. vol. 2. Buetow D.E. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Meister A. (1965a). *Biochemistry of Amino Acids*. vol. I. Academic Press. N.Y.
- Meister A. (1965b). *Biochemistry of Amino Acids*. vol.II. Academic Press. N.Y.

-
- Miginiac Maslow M., Hoarau A. (1982). Variations in the adenylate levels during phosphate depletion in isolated soybean cells and wheat leaf fragments. *Z. Pflanzenphysiol.* **107**: 427-436.
- Mollenhauer H.H., Morré D.J., Kelley A.G. (1966). The widespread occurrence of plant cytosomes resembling animal microbodies. *Protoplasma* **62**: 44-52.
- Monroy A.F., Schwartzbach S.D. (1984). Catabolite repression of chloroplast development in *Euglena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2786-2790.
- Mooney P.A., Van Staden J. (1987). Tentative identification of cytokinins in *Sargassum heterophyllum*. *Botanica Marina* **30**: 323-326.
- Morgan K.C., Shacklock P.F., Simpson F.J. (1980). Some aspects of the cultivation of *Palmaria palmata* in greenhouse tanks. *Bot. Mar.* **23**: 765-770.
- Muhlethaler K. (1967). Ultrastructure and formation of plant cell walls. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **18**: 1-24.
- Mukai L.S., Craigie J.S., Brown R.G. (1981). Chemical composition and structure of the cell walls of the conchocelis and thallus phases of *Porphyra tenera* (Rhodophyceae). *J. Phycol.* **17**: 192-198.
- Munro A.L.S., Brock T.D. (1968). Distribution between bacterial and algal utilization of soluble substances in the sea. *J. Gen. Microbiol.* **51**: 35-42.
- Neilson A.H., Lewin R.A. (1974). The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia.* **13**: 227-264.

-
- Neish A.C., Shacklock P.F. (1971). Greenhouse experiments on the propagation of strain T4 of Irish moss. Atl. Reg. Tech. Rep. Ser. N°14. Nat. Res. Counc. Halifax. Canada.
- Neish A.C., Shacklock P.F., Fox C.H., Simpson F.J. (1977). The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. Can. J. Bot. 55: 2263-2271.
- Nicolas P., Freyssinet G., Nigon V. (1980). Effect of light on glucose utilization by *Euglena gracilis*. Plant Physiol. 65: 631-634.
- Nigon V., Heizmann P. (1978). Morphology, biochemistry and genetics of plastid development in *Euglena gracilis*. Int. Rev. Cytol. 53: 212-290.
- Noguchi T. (1978). Transformation of the Golgi apparatus in the cell cycle, especially at the resting and earliest developmental stages of a green alga *Micrasterias americana*. Protoplasma 95: 73-88.
- Oaks A. (1962a). Metabolism of pyruvate by starved cells of *Chlorella elipsoida*. Plant Physiol. 37: 310-315.
- Oaks A. (1962b). Influence of glucose and light on pyruvate metabolism by starved cells of *Chlorella elipsoida*. Plant Physiol. 37: 316-320.
- Osatune T., Hase E. (1975). Some structural characteristics of the chloroplasts in the glucose bleaching and regreening cells of *Chlorella protothecoides*. Biochem. Physiol. Pfl. 168: 533-542.
- Palade G.E. (1959). Functional changes in the structure of cell components. En: Subcellular particles. Hagashi T. (Ed). Ronald Press. N.Y.

-
- Parker B.C., Diboll A.G. (1966). Alcian stains for histochemical localization of acid and sulphated polysaccharides in algae. *Phycologia* **6**: 37-46.
- Pelroy R.A., Bassham J.A. (1972). Photosynthetic and dark carbon metabolism in unicellular blue green algae. *Arch. Microbiol.* **86**: 25-30.
- Peltier G., Thibault P. (1985). O₂ uptake in the light in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **79**: 225-230.
- Penning de Vries F.W.T. (1972). Respiration and growth. En: *Crop Processes in Controlled environments*. Pp. 327-334. Rees, Cockshull, Hand, & Hurd (Ed). Academic Press. N.Y.
- Percival E., McDowell R.H. (1967). Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press. London.
- Peyriere Eyboulet M. (1972). Etude cytologique de la Ceramiacee *Griffithsia flosculosa* et de quelque autres Floridees. These, L'University de Paris XI, Centre D'Orsay.
- Pickett Heaps J.D. (1972). Variation in mitosis and citokinesis in plant cells: its significance in the phylogeny and evolution of ultrastructural systems. *Cytobios.* **5**: 59-77.
- Pirson A., Kowallik W. (1960). Wirkung des blauen und roten spektralbereiches auf die usammensetzung von *Chlorella* bei Anzucht im Leicht Dunkel Wechsel. *Naturwiss.* **47**: 476-477.
- Pirson A., Kowallik W. (1964). Spectral responses to light by unicellular plants. *Photochem. Photobiol.* **3**: 489-494.

- Pintner I.J., Provasoli L. (1968). Heterotrophy in subdued light of 3 *Chrysochromulina* species. Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto Univ. **12**: 25-28.
- Plumley F.G., Schmidt G.W. (1979). Nitrogen dependent regulation of photosynthetic gene expression. Proc. Nat. Acad. Sci USA. **86**: 2678-2682.
- Plumley F.G., Douglas S.E., Switzer A.B., Schmidt G.W. (1989). Nitrogen dependent biogenesis of chlorophyll protein complexes. En: Photosynthesis. Pp. 311-329. Alan R. Liss, Inc.
- Polne Fuller M., Gibor A. (1984). Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion and protoplast regeneration. J. Phycol. **20**: 609-613.
- Polne Fuller M., Gibor A. (1987). Calluses and callus like growth in seaweeds: induction and culture. Hydrobiologia **151/152**: 131-138.
- Polne Fuller M., Gibor A., Neushul M. (1980). The use of ultrasound for the removal of macroalgal epiphytes. Botanica Marina **23**: 731-740.
- Polne Fuller M., Biniaminov M., Gibor A. (1984). Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. Hydrobiologia **116/7**: 308-313.
- Polne Fuller M., Saga N., Gibor A. (1986). Algal cells, callus, and tissue cultures and selection of algal strains. Beihefte zur Nova Hedwigia **83**: 30-34.
- Powell J. (1986). A short day photoperiodic response in *Constantinea subulifera*. Am. Zool. **26**: 479-486.

-
- Prince G.B. (1973). Field and culture studies of a marine red alga *Phodysmenia palmata*. M.S. Thesis. Cornell University, Ithaca, N.Y.
- Pringsheim E.G. (1952). On the nutrition of *Ochroomonas*. Q.J. Microscop. Sci. **93**: 71-96.
- Provasoli L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: Cultures and collections of algae. Watanabe A. & Hattori A. (Ed). Jap. Soc. Plant Physiol.
- Pueschel C.M. (1979). Ultrastructure of tetrasporogenesis in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). J. of Phycology **15**: 409-424.
- Pueschel C.M. (1990). Cell structure. En: Biology of the red algae. Pp. 7-41. Cole K.M., Sheath R.G. (Ed). Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Pueschel C.M., Cole K. (1982). Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications. Amer. J. Bot. **69**: 703-720.
- Pueschel C.M., Cole K.M. (1985). Ultrastructure of germinating carpospores of *Porphyra variegata* (Bangiales, Rhodophyta). J. Phycol. **21**: 146-154.
- Quiñones M.A., Aparicio P.J. (1990). Flavin type action spectrum of nitrate utilization by *Monoraphidium braunii*. Photochem. Photobiol. **51**: 689-692.
- Raghavan V., Demaggio A.E. (1971). Enhancement of protein synthesis in isolated chloroplasts by irradiation of fern gametophytes with blue light. Plant Physiol. **48**: 82-86.
- Ramus J. (1972a). Differentiation of the green alga *Codium fragile*. Amer. J. Bot. **59**(5): 478-482.

-
- Ramus J. (1972b). The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aerugineum*. *J. Phycol.* **8**: 97-111.
- Ramus J. (1981). The capture and transduction of light energy. En: *The biology of the seaweeds*. Pp. 458-492. Lobban C.S. & Wynne M.J. (Ed). Univ. California Press. Berkeley.
- Ramus J., Robins D.M. (1975). The correlation of Golgi activity and polysaccharide secretion in *Porphyridium*. *J. Phycol.* **11**: 70-74.
- Ramus J., Rosenberg G. (1980). Diurnal photosynthetic performance of seaweed measured under natural conditions. *Mar. Biol.* **56**: 21-28.
- Ramus J., Beale S.I., Mauzerall D. (1976). Correlation of changes in pigment content with photosynthetic capacity of seaweeds as a function of water depth. *Mar. Biol.* **37**: 231-238.
- Raven J.A. (1974). *Algal physiology and biochemistry*. Pp. 434-440. Steward W.D.P. (Ed). Univ. California Press. Berkeley.
- Raven J.A. (1980). Nutrient transport in microalgae. En: *Advances in microbial physiology*. vol. 21. Pp. 47-226. Rose A.H. & Morris J.G. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. (1992). The angiosperm plant body: structure and development. En: *Biology of plants*. pp. 472-475. Worth Publishers. N.Y.
- Reed R.H. (1985). Osmoacclimation in *Bangia atropurpurea* (Bangiales): the osmotic role of floridoside. *Br. Phycol. J.* **20**: 211-218.

-
- Reed R.H., Collins J.C., Russell G. (1980). The effects of salinity upon galactosyl glycerol content and concentration of the marine red alga *Porphyra purpurea*. *J. Experimental Botany* 31: 1539-1554.
- Revsbech N.P. (1983). In situ measurements of oxygen profiles of sediments by use of oxygen microelectrodes. En: *Polarographic oxygen sensors: aquatic and physiological applications*. Pp. 265-273. Gneiger E. & Forstner H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Revsbech N.P., Ward D.M. (1983). Oxygen microelectrode that is insensitive to medium chemical composition: use in an acid microbial mat dominated by *Cyanidium caldarium*. *Appl. envirl. Microbiol.* 45: 755-759.
- Rhee G.Y., Gotham I.J. (1981). The effect of environmental factors on phytoplakton growth: light and interactions of light with nitrate limitation. *Limnol. Oceanogr.* 26: 649-659.
- Rhiel E., Morschel E., Wehrmeyer W. (1985). Correlation of pigment deprivation and ultrastructural organization of thylakoid membranes in *Cryptomonas maculata* following nutrient deficiency. *Protoplasma* 129: 62-73.
- Rhiel E., Krupinska K., Wehrmeyer W. (1986). Efects of nitrogen starvation on the function and organization of the photosynthetic membranes in *Cryptomonas maculata* (Cryptophyceae). *Planta* 169: 361-369.
- Rivkin R.B., Putt M. (1987). Heterotrophy and photoheterotrophy by Antarctic microalgae light dependent incorporation of amino acid and glucose. *J. Phycol.* 23: 442-452.
- Robaina R.R. (1988). Biotecnología del cultivo "in vitro" de algas rojas (Rhodophyta) de interés industrial. Tesis Doctoral. U.P.C.

- Robaina R.R., Garcia Reina G., Luque A. (1990a). The effects of the physical characteristics of the culture medium on the development of red seaweeds in tissue culture. *Hydrobiologia* 204/205: 137-142.
- Robaina R.R., Garcia P., Garcia-Reina G., Luque A. (1990b). Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. *J. Appl. Phycology* 2: 137-143.
- Robaina R.R., García-Jiménez P., Luque A. (1991). Tissue culture of explants and carospores of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. *J. Phycol.* 27: 63.
- Robaina R.R., García-Jiménez P., Luque A. (1992). The growth pattern and structure of callus from the red alga *Laurencia* sp. (Rhodophyta, Ceramiales) compared to shoot regeneration. *Botanica Marina* 35: 267-272.
- Robinson S.P., Walker D.A. (1981). Photosynthetic carbon reduction cycle. En: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise.* vol. 8. Photosynthesis. Pp. 193-236. Hatch M.D. & Boardman N.K. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Rodriguez Lopez M. (1965). Morphological and structural changes produced in *Chlorella pyrenoidosa* by assimilable sugars. *Arch. Mikrob.* 52: 319-324.
- Roland J.C., Vian B. (1979). The wall of the growing plant cell: its three dimensional organization. *Int. Rev. Cytology* 61: 129-165.
- Rosenberg G., Probyn T.A., Mann K.H. (1984). Nutrient uptake and growth kinetics in brown seaweeds: response to continuous and single additions of ammonium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 80: 125-146.

-
- Ross M.K., Thorpe T.A. (1973). Physiological gradients and shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Cell Physiol.* **14**: 473-480.
- RossenberG G., Ramus J. (1982). Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyta) and *Ulva sp* (Chlorophyta): photosynthesis and antenna composition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **8**: 233-241.
- Ruyters G. (1984). Effects of blue light on enzymes. En: Blue light effects in biological systems. Pp. 71-88. Senger H. (Ed). Springer Verlag. Berlin.
- Ruyters G. (1987). Control of enzyme capacity and enzyme activity. En: Blue light responses: phenomena and occurrence in plants and microorganisms. vol. 2. Pp. 283-301. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Ruyters G. (1988). Light stimulated respiration in the green alga *Dunaliella tertiolecta*: involvement of the ultraviolet/blue lightphotoreceptor(s) and phytochrome?. *Planta* **174**: 422-425.
- Ruyters G., Kowallik W. (1980). Further studies on the light mediated change in the activity of pyruvate kinase of chorophyll free *Chlorella* mutant. *Z. Pflanzenphysiol.* **96**: 29-34.
- Saga N., Sakai Y. (1982). A new method for pure culture of macroscopic algae, the one step selection method. *Jap. J. Phycol.* **30**: 40-43.
- Saga N., Sakai Y. (1983). Axenic tissue culture and callus formation of the marine brown alga *Laminaria angustata*. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* **49**: 1561-1564.
- Saga N., Polne Fuller M., Gibor A. (1986). Protoplast from seaweeds: production and fusion. *Beihefte zur Nova Hedwigia* **83**: 37-43.

-
- Sand-Jensen K. (1988a). Minimum light requirements for growth in *Ulva lactuca*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 50: 187-193.
- Sand-Jensen K. (1988b). Photosynthetic responses of *Ulva lactuca* a very low light. Mar. Ecol. Prog. Ser. 50: 195-201.
- Saunders G.W. (1972). Potential heterotrophy in a natural population of *Oscillatoria agardhii* var. *Isothrix skuja*. 17(5): 704-711.
- Scagel R.F., Bandoni R.J., Rouse G.E., Schofield W.B., Stein J.R., Taylor T.M. (1973). El reino vegetal. Pp. 230-257. Omega (ed). Barcelona.
- Scott J. (1983). Mitosis in the freshwater red alga *Batrachospermum ectocarpum*. Protoplasma 118: 56-70.
- Scott J.L., Dixon P.S. (1973). Ultrastructure of tetrasporogenesis in the marine red alga *Ptilota hypnoides*. J. of Phycology 9: 29-46.
- Scott J., Broadwater S. (1990). Cell division. En: Biology of the red algae. Pp. 123-146. Cole K.M. & Sheath R.G. (Ed). Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Schatz S. (1980). Degradation of *Laminaria saccharina* by higher fungi: a preliminary report. Botanica Marina 13: 617-621.
- Schiff J.A. (1980). Development, inheritance and evolution of plastids and mitochondria. En: The biochemistry of the Plants. vol. 1. Tolbert N.E. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Schindler D.W., Schmidt R.V., Reid D.A. (1972). Acidification and bubbling as an alternative to filtration in determining phytoplankton production by the ¹⁴C method. J. Fish. Res. Bd. Can. 29: 1627-1631.

-
- Schnepf E. (1982). Morphogenesis in moss *Protonemata*. En: The cytoskeleton. pp. 320-441. Academic Press. London.
- Schuller K.A., Plaxton W.C., Turpin D.H. (1990). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* **93**: 1303-1311.
- Schwartzbach S.D., Schiff J.A., Goldstein N.H. (1975). Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. V. Control of paramylum degradation. *Plant Physiol.* **56**: 313-317.
- Schwelitz F.D., Cisneros P.L., Jagielo J.A., Comer J.L., Butterfield K.A. (1978). The relationship of fixed carbon and nitrogen sources to the greening process in *Euglena gracilis*. *J. Protozool.* **25**: 257-261.
- Seheult C.L. (1970). The uptake of glucose by *Naviculla pelliculosa*. Unpublished M.S. thesis. Dept. Zoology. North Carolina. State Univ. Raleigh.
- Senger H., Bishop N.I. (1972). The development of structure and function in chloroplasts of greening mutants of *Scenedesmus*. I. Formation of chlorophyll. *Plant Cell Physiol.* **13**: 633-649.
- Sepers A.B.J. (1977). The utilization of dissolved organic compounds in aquatic environments. *Hydrobiologia* **52**: 39-54.
- Sheath R.G., Hellebust J.A. (1974). Glucose transport system and growth characteristics of *Bracteacoccus minor*. *J. Phycol.* **10**: 34-41.
- Shihira-Ishikawa I., Hase E. (1964). Nutritional control of cell pigmentation in *Chlorella protothecoides* with special reference to the degeneration of chloroplast induced by glucose. *Plant Cell Physiol.* **5**: 227-240.

- Simon Richard Breud J. (1972). Origine et devenir des vacuoles a polysaccharides des gametocystes males de *Bonnemaisonia hamifera* (Rhodophyta). C.R. Acad. Sci. Ser. D. 274: 1485-1488.
- Smith R.G., Vanlerberghe G.C., Stitt M., Turpin D.H. (1989). Short term metabolite changes during transient ammonium assimilation by the N limited green alga *Selenastrum minutum*. Plant Physiol. 91: 749-755.
- Stevens S.E., Paone D.A.M., Balkill D.L. (1981). Accumulation of cyanophycin granules as a result of phosphate limitation in *Agmenellum quadruplicatum*. Plant Physiol. 67: 716-719.
- Stitt M. (1986). Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. Plant Physiol. 81: 1115-1122.
- Stoy V. (1955). Action of different light qualities on simultaneous photosynthesis and nitrate assimilation in wheat leaves. Physiol. Plant. 8: 963-967.
- Stoy V. (1956). Riboflavin catalysed enzymatic photoreduction of nitrate. Biochim. Biophys. Acta 21: 395-341.
- Strotmann H. (1967). Blaulichteffekt auf die Nitritreduktion von *Chlorella*. Planta 73: 376-380.
- Strotmann H., Ried A. (1969). Polarographische messung der nitritreduktion von *Chlorella* im monochromatischen licht. Planta 85: 250-253
- Stumpf P.F. (1955). Fat metabolism in higher plants. III. Enzymatic oxidation of glycerol. Plant Physiol. 30: 55-58.

-
- Sussman I., Avron M. (1981). Characterization and partial purification of DLglycerol 1 phosphatase from *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. acta* **661**: 199-204.
- Sylvester A.W., Waaland J.R. (1984). Sporeling dimorphism in the red alga *Gigartina exasperata*. *Phycologia* **23**: 427-435.
- Syrett P.J. (1962). Nitrogen assimilation. En: *Physiology and biochemistry of algae*. Lewin R.A. (Ed). Academic Press. N.Y.
- Syrett P.J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. En: *Physiological bases of phytoplankton ecology*. Platt T. (Ed). *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* **210**: 182-210.
- Tanner W., Grunes R., Kandler O. (1970). Spezifität und turnover des induzierbaren Hexose Aufnamesystem von *Chlorella*. *Z. Pflanzenphysiol.* **62**: 376-386.
- Thorpe T.A. (1974). Carbohydrate availability and shoot formation in tobacco callus cultures. *Ibid.* **30**: 77-81.
- Thorpe T.A. (1977). Carbohydrate metabolism and shoot formation in tobacco callus. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.* **42**: 1681-1689.
- Thorpe T.A., Murashige T. (1968). Starch accumulation in shoot forming tobacco cultures. *Science* **160**: 421-422.
- Thorpe T.A. & Murashige T. (1970). Some histological changes underlying shoot initiation in tobacco callus. *Can. J. Bot.* **48**: 277-285.
- Thorpe T.A., Meier D.D. (1972). Starch metabolism, respiration and shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* **27**: 365-369.

-
- Thorpe T.A., Laishley E.J. (1973). Glucose oxidation during shoot initiation in tobacco callus cultures. *J. Exp. Bot.* **24**: 1082-1089.
- Tomasí J.A. (1936). *Stain Technology* **11**: 137.
- Toth R. (1976). A mechanism of propagule release from unilocular reproductive structure in brown algae. *Protoplasma* **89**: 263-278.
- Triemer R.E., Vasconcelos A.C. (1977). The ultrastructure of carposporogenesis in *Caloglossa leprieurii* (Ceramiales). *Am. J. Bot.* **64**: 825-834.
- Tsekos I. (1970). Mikrospektralphotometrische Untersuchungen an lebenden Zellen der Schuppenblattoberepidermen von *Allium cepa* nach Toluidinblau 0 und Nilblauschlorid Färbung. *Protoplasma* **71**: 173-190.
- Tsekos I. (1981). Growth and differentiation of the Golgi apparatus and wall formation during carposporogenesis in the red alga *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *J. Cell Sci.* **52**: 71-84.
- Tsekos I. (1983). The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour: gonimoblast cells and carpospores. *Flora* **174**: 191-211.
- Tsekos I. (1985). The endomembrane system of differentiating carposporangia in the red alga *Chondria tenuissima*: occurrence and participation in secretion of polysaccharidic and proteinaceous substances. *Protoplasma* **129**: 127-136.
- Tsekos I. (1991). The supramolecular organization of red algal cell membranes and their participation in the biosynthesis and secretion of extracellular polysaccharides. En: *Seaweed cellular biotechnology, physiology and intensive cultivation*. Pp. 113-128. Proceedings of a Cost 48 workshop. Las Palmas G.C.

-
- Tsekos I., Schnepf E. (1983). The ultrastructure of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Roth) Lamour: auxiliary cells and cystocarpic plants. *Flora* 173: 81-96.
- Tsekos I., Schenpf E. (1985). Ultrastructure of the early stages of carposporophyte development in the red alga *Chondria tenuissima* (Ceramiales). *Pl. Syst. Evol.* 151: 1-18.
- Tsekos I., Reiss H.D. (1988). Occurrence and transport of particle tetrads in the cell membranes of the unicellular red alga *Porphyridium* visualized by freeze fracture. *J. Ultrastuct. Molec. Struct. Res.* 99: 156-168.
- Tsekos I., Reiss H.D. (1990). The supramolecular organization of photosynthetic membranes of the thallus stage of *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta) visualized by freeze fracture. *Bot. Acta* 103(3): 244-249.
- Tsekos I., Diannelidis B.E. (1990). Mitochondrial structure at two different stages of carposporogenesis in *Gigartina teedii* (Rhodophyta). *Flora* 184: 78-80.
- Tsekos I., Schenpf E. (1991). Acid phosphatase activity during spore differentiation of the red algae *Gigartina teedii* and *Chondria tenuissima*. *Pl. Syst. Evol.* 176: 35-51.
- Tsekos I., Schenpf E., Makrantonakis A. (1985). The ultrastructure of tetrasporogenesis in the marine red alga *Chondria tenuissima* (Ceramiales, Rhodomelaceae). *Annals of Botany* 55: 607-619.
- Tsekos I., Reiss H.D., Schnepf E. (1993). Cell wall structure and supramolecular organization of the plasma membrane of marine red algae visualized by freeze fracture. *Acta. Bot. Neerl.* 42(2). en prensa.

-
- Turpin D.H. (1991). Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* **27**: 14-20.
- Turpin D.H., Harrison P.J. (1979). Fluctuations in free amino acid pools of *Gymnodinium simplex* in response to ammonia perturbation: evidence for glutamine synthetase pathway. *J. Phycol.* **14**: 461-464.
- Turpin D.H., Bruce D. (1990). Regulation of photosynthetic light harvesting by nitrogen assimilation in the green alga *Selenastrum minutum*. *FEBS lett.* **263**: 99-103.
- Turpin D.H., Elrifi I.R., Birch D.G., Weger H.G., Holmes J.J. (1988). Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation in microalgae. *Can. J. Bot.* **66**: 2083-2097.
- Turpin D.H., Botha F.C., Smith G.G., Feil R., Horsey A.K., Vanlerberghe G.C. (1990). Regulation of carbon partitioning to respiration during dark ammonium assimilation by the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* **93**: 166-175.
- Ueda K., Noguchi T. (1976). Transformation of the Golgi apparatus in the cell cycle of a green alga *Micrasterias americana*. *Protoplasma* **87**: 145-162.
- Ukeles R., Rose W.E. (1976). Observations on organic carbon utilization by photosynthetic marine microalgae. *Mar. Biol.* **37**: 11-28.
- Van Baalan C., Pulich W.M. (1973). Heterotrophic growth of the microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* **2**: 229-255.
- Vanlerberghe G.C., Huppe H.C., Vlossak D.M., Turpin D.H. (1992). Activation of respiration to support dark NO_3^- and NH_4^+ assimilation in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* **99**: 495-500.

-
- Vannini G.L. (1983). Degeneration and regeneration of chloroplasts in *Euglena gracilis* grown in the presence of acetate: ultrastructural evidence. *J. Cell Sci.* **61**: 413-422.
- Voskresenskaya N.P. (1952). Effect of spectral composition of light on the relations of substances formed in photosynthesis. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **86**: 429-434.
- Voskresenskaya N.P. (1972). Blue light and carbon metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**: 219-234.
- Voskresenskaya N.P., Nechaeva E., Vlasova M.P., Nichiporovich A. (1968). Significance of blue light and kinetin for restoration of the photosynthetic apparatus of aging barley leaves. *Translates from Fiziol. Rast.* **15**: 890-897.
- Waland S.D., Cleland R.E. (1972). Development in the red alga *Griffithsia pacifica*: control by internal and external factors. *Planta* **105**: 196-206.
- Wanner G., Kost H.P. (1984). Membrane storage of the red alga *Porphyridium cruentum* during nitrate and sulphate starvation. *Z. pflanzenphysiol.* **113**: 251-262.
- Walker D. (1987). The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Sheffield Univ. Print. Oxgraphics limited (Publ). Shiffield. U.K.
- Weast R.C., ed. (1981). Handbook of Chemistry of Physics. 61st edition. Pp. 228-276. CRC Press. Florida.
- Weger H.G., Turpin D.H. (1989). Mitochondrial respiration can support NO₃⁻ and NO₂⁻ reduction during photosynthesis. *Plant Physiol.* **89**: 409-415.

-
- Weger H.G., Herzig R., Falkowski P.G., Turpin D.H. (1989). Respiratory losses in the light in a marine diatom: measurements by short term mass spectrometry. *Limnology & Oceanography* **34**(7): 1153-1161.
- Wegmann K. (1979). Biochemical adaptation of *Dunaliella tertiolecta* to salinities and temperature changes. *Ber. Dt. Bot. Ges.* **92**: 43-54.
- Wehrmeyer W., Schneider H. (1975). Elektronenmikroskopische untersuchungen zur reversiblen veränderung der chloroplastenfeinstruktur von *Rhodella volacea* bei stickstoffmangel. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **168**: 519-532.
- Wertz G. (1974). Fine structural aspects of morphogenesis in *Acetabularia*. *Int. Rev. Cytology* **38**: 319-367.
- Wetherbee R. (1978). Differentiation and continuity of the Golgi apparatus during carposporogenesis in *Polysiphonia* (Rhodophyta). *Protoplasma* **95**: 347-360.
- Wetherbee R. (1980). Postfertilization development in the red alga *Polysiphonia*. I. Proliferation of the carposporophyte. *J. Ultrastr. Res.* **70**: 259-274.
- Wetherbee R., West J.A. (1977). Golgi apparatus of unique morphology during early carposporogenesis in a red alga. *J. Ultrastruct. Res.* **58**: 119-133.
- Wheeler P., North B.B., Stephens G.C. (1974). Amino acid uptake by marine phytoplankters. *Limnology & Oceanography* **19**(2): 249-259.
- White A.W. (1974a). Growth of two facultatively heterotrophic marine centric diatoms. *J. Phycol.* **10**(3): 292-300.
- White A.W. (1974b). Uptake of organic compounds by two facultatively heterotrophic marine centric diatoms. *J. Phycol.* **10**: 433-438.

-
- Whittier D.P. (1962). The origin and development of apogamous structures in the gametophyte *Pteridium* in sterile culture. *Phytomorphology* 12: 10-20.
- Wiencke C., Lauchli A. (1980). Growth, cell volume and fine structure of *Porphyra umbilicalis* in relation to osmotic tolerance. *Planta* 150: 303-311.
- Wiencke C., Lauchli A. (1981). Inorganic ions and floridoside as osmotic solutes in *Porphyra umbilicalis*. *Z. Pflanzenphysiol.* 103: 247-258.
- Williams W.P., Allen J.F. (1987). Stage 1/ Stage 2 changes in higher plants and algae. *Photosyn. Res.* 13: 19-45.
- Woolery M.L., Lewin R.A. (1973). Influence of iodine on growth and development on the brown alga *Ectocarpus siliculosus* in axenic culture. *Phycologia* 12: 131-134.
- Yamanaka G., Glazer A.N. (1980). Dynamic aspects of phycobilisome structure. Phycobilisome turnover during nitrogen starvation in *Synechococcus* sp. *Arch. Microbiol.* 124: 39-47.
- Yarish C., Edwards P., Casey S. (1979). Acclimation responses to salinity of three estuarine red algae from New Jersey. *Mar. Biol.* 51: 289-293.
- Yu S., Pedersen M. (1990a). The α galactosidase of *Gracilaria tenuistipitata* and *G. sordida* (Rhodophyta). *Phycologia* 29: 454-460.
- Yu S., Pedersen M. (1990b). The effect of salinity changes on the activity of α galactosidase of the red algae *Gracilaria sordida* and *G. tenuistipitata*. *Botanica Mar.* 33: 385-391.

- Zehr J.P., Falkowski P.G. (1989). Pathway of ammonium assimilation in a marine diatom determined with the radiotracer ^{13}N . *J. Phycol.* **24**: 588-591.
- Zelitch I. (1979). Photorrespiration: studies with whole tissues. En: *Photosynthesis II. Photosynthetic carbon metabolism and related processes.* vol. 6. Pp. 353-367. Gibbs M. & Latzko E. (Ed). Springer Verlag. N.Y.
- Zelitch I. (1992). Control of plant productivity by regulation of photorrespiration. *Bioscience* **42**(7): 510-516.
- Zimmermann U. (1977). Cell turgor pressure regulation and turgor pressure mediated transport processes. En: *Integration of activity in the higher plant.* Jennings D.H. (Ed). University Press. Cambridge.
- Zimmermann U. (1978). Physics turgor and osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 121-148.
- Zuo Mei Y. (1984). Studies on tissue culture of *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Hydrobiologia* **116/7**: 314-320.
- Zupan J.R., West J.A. (1990). Photosynthetic responses to light and temperature of the heteromorphic marine alga *Mastocarpus papillatus* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **26**: 232-239.