

# PAPEL REGULADOR DE LAS POLIAMINAS EN LA REPRODUCCIÓN DE LAS ALGAS ROJAS MARINAS

GARCÍA-JIMÉNEZ PILAR, SACRAMENTO T. ALICIA, GARCÍA-MAROTO FEDERICO\*, ROBAINA R. RAFAEL

DEPARTAMENTO DE BIOLÓGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR. CAMPUS UNIVERSITARIO DE TAFIRA S/N. 35017

\* DEPARTAMENTO DE BIOLÓGÍA APLICADA. UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

rrobaina@dbio.ulpgc.es

## INTRODUCCIÓN

En macroalgas marinas, ha sido demostrado que las poliaminas (PAs) putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm) están involucradas en procesos de división celular (García-Jiménez et al. 1998; Marián et al. 2000), de respuesta al estrés hiposalino (García-Jiménez et al. 2007) y en la reproducción (Guzmán-Urióstegui et al. 2002; Sacramento et al. 2004).

En el caso particular de la reproducción, los niveles de PAs disminuyen durante la transición del estado infértil al fértil, siendo la Spm promotora de la liberación y crecimiento de las esporas. Las enzimas ornitina descarboxilasa (ODC) y arginina descarboxilasa, llaves en la síntesis de las PAs, se correlacionan con estos niveles.

Nos preguntamos si estos cambios coinciden específicamente con el desarrollo del cistocarpio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Modelo de estudio.** *Grateloupia imbricata* se caracteriza por tener en el mismo pie de planta, ejes fértiles (presencia de cistocarpos) y ejes infértiles (ausencia de ellos) (Fig 1). Para monitorizar el desarrollo de los cistocarpos, los ejes infértiles fueron cultivados durante 8 días, bajo condiciones controladas, a lo largo de los cuales se valoró el incremento en peso de estos ejes convertidos a fértiles respecto al peso total y el número de cistocarpos (ver Tabla).

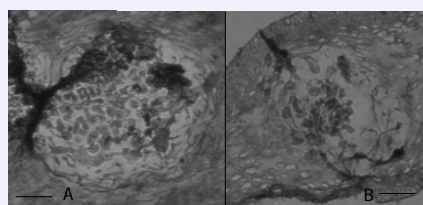
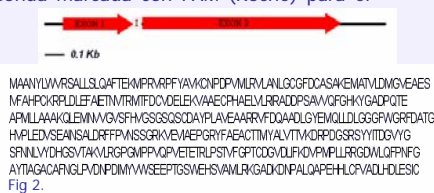
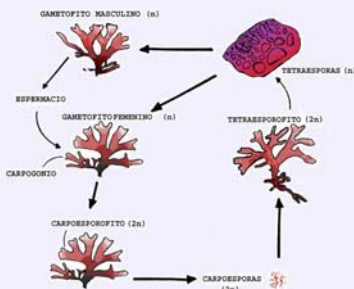
**Seguimiento de las actividades enzimáticas y de los cambios estructurales.** Basado en este modelo de estudio, se establecieron nuevos cultivos en donde los ejes fueron extraídos (por triplicado) aleatoriamente los días 0, 2, 5 y 8 para determinar el contenido de PAs, y las actividades enzimáticas de síntesis de las PAs (ODC) y degradativas (diaminooxidasas, DAO; poliaminooxidasas, PAO), los días 0 y 8.

La valoración de PAs se realizó como en Sacramento et al. 2004 y las DAO Y PAO, usando Put y Spd como sustratos radioactivos respectivamente, y cuantificando la pirrolina formada. Los cambios estructurales durante el desarrollo del cistocarpio por efecto de la adición de la Spm ( $10^{-6}$ M) se determinaron sobre explantos de ejes infértiles cultivados, durante una semana en multi-well, y fijados cada día para su inclusión en Histo-resin (García-Jiménez et al. 1998).

**Seguimiento de expresión génica.** Utilizando oligonucleótidos degenerados frente a motivos altamente conservados y posterior paseo cromosómico mediante iPCR (Ochman et al. 1988), obtuvimos la secuencia del gen de la enzima ODC de *Grateloupia* (Fig 2). A partir de este gen se ha diseñado una sonda marcada con FAM (Roche) para el seguimiento de la expresión génica, mediante *real-time* PCR durante la transición de ejes infértiles a fértiles.

**BIBLIOGRAFÍA** García-Jiménez et al. 1998 *J Appl Phycol* 10: 95-100; García-Jiménez et al. 2007 *J Plant Physiol* 164: 367-370; Guzmán-Urióstegui et al. 2002 *J Phycol* 38: 1169-1175; Marián et al. 2000 *Physiol Plant* 110: 530-534; Ochman et al. 1988. 120: 621-623; Sacramento et al. 2004 *J Phycol* 50: 887-894.

**AGRADECIMIENTOS** Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional I+D+i); BFI 2003-01244; BFU 2006-06198



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso de los ejes fértiles desarrollados en cultivo alcanzó el 50%, de la biomasa total cultivada, sobre el día 8. El número de cistocarpos contabilizados ascendió a  $1.91 \pm 0.1$  mm<sup>2</sup> en ese periodo de tiempo. (1, diferencia significativa con respecto al día 0).

Día	Porcentaje de ejes fértiles	Número de cistocarpos mm <sup>-2</sup> n= 55	pmol h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína n= 2-4		
			ODC	DAO	PAO
Día 0	0	0	2.5±1	31±10	7±3
Día 8	>50%	1.91 ± 0.1	0.74±0.04 <sup>1</sup>	384±76 <sup>1</sup>	120±18 <sup>1</sup>

Los niveles de PAs determinan un incremento muy marcado para la Spm previo a la máxima diferenciación, para después decaer abruptamente, correspondiéndose con la mayor presencia de cistocarpos. La Spd presenta la misma tendencia (Fig 3).

Coincidiendo con esa máxima diferenciación de los cistocarpos, la enzima ODC decrece su actividad, respecto a la presentada el día 0, cerca del 30%, mientras que las de la DAO y PAO incrementan alrededor de 10-15 veces respectivamente, favoreciendo la degradación de las PAs (ver Tabla).

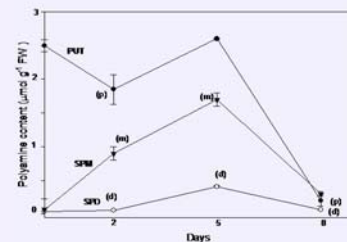


Fig 3. Concentraciones de poliaminas endógenas durante la maduración del cistocarpio. (p) indica diferencia significativas de la Put con respecto al día 0. (d) *idem* con la Spd. (m) *idem* con la Spm.

Los niveles de transcritos del gen de la ODC disminuyeron durante la transición del estado infértil al fértil hasta no detectarse (Fig 4). Asimismo, los resultados obtenidos también indican que existen diferencias en la expresión entre las zonas basal y apical, donde se desarrollan los cistocarpos (Fig 4)

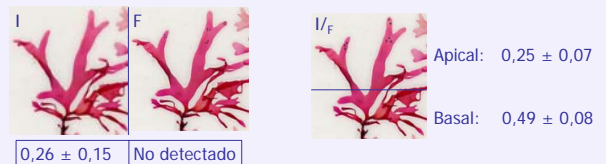


Fig 4. Niveles de transcritos (en µg RNA total) cuantificados, por método absoluto, a partir de los Ct obtenidos mediante *real time* -PCR.

*In vitro*, la Spm favoreció el desarrollo de cistocarpos, pudiéndose observar en distintos estadios a los 7 días de cultivo (Fig 5.), y consecuentemente constatándose como un agente inductor del desarrollo. El efecto de la Spm fue inhibido por la adición de cyclohexilamine ( $10^{-6}$ M), reduciendo el número de cistocarpos un 50%. Dicho efecto se revirtió con la adición de Spm.

Fig 5. Cortes longitudinales correspondientes a cistocarpos de *G. imbricata* procedentes de talos cultivados durante 7 d. (A) Spm ( $10^{-6}$ M). Nótese las profusa división de las ramas carpogoniales. (B) ausencia de Spm.