



Aplicación de procesos de biotecnología a la selección y propagación de macrofitos marinos

Guillermo García Reina

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Politécnica de Canarias, Apto. 550.
Las Palmas de Gran Canaria

El desarrollo y aplicación de biotecnologías a macrofitos marinos de interés industrial puede ser una de las herramientas de trabajo más eficaces para solventar los problemas básicos que restringen la expansión de la maricultura vegetal como actividad industrial en Occidente. Antes de analizar el estado actual y potencialidad de la aplicación de biotecnologías a macrofitos marinos vamos a exponer brevemente la problemática de los sistemas de producción de biomasa macroalgal que, como veremos, estará centrada en la selección de clones de alta producción. Una vez establecida la necesidad de seleccionar clones de alto rendimiento pasaremos a analizar brevemente los métodos convencionales de mejora genética aplicados a macrofitos, analizando los resultados y los problemas que plantean, para finalmente desarrollar el estado actual de la aplicación de procesos de biotecnología vegetal a la selección y propagación de macrofitos marinos.

Existen tres sistemas de producción de biomasa algal, que por orden de aparición y de importancia son:

I— Explotación de poblaciones naturales.

II— Cultivo en granjas marinas (sistemas outdoor).

III— Cultivo en tierra (sistemas indoor-tanques, canales fotobioreactores, etc.).

I.— *La explotación de poblaciones naturales* es una de las industrias más antiguas de la humanidad y sigue constituyendo la fuente más importante de obtención de biomasa en términos globales. La ventaja de la recolección es la nula inversión en el sistema productor, aunque actualmente existen sofisticados sistemas de recolección, como los barcos-segadoras utilizados en California para cosechar *Macrocystis* y *Laminaria*. Pero frente a esta ventaja existen numerosos inconvenientes que podríamos resumir en una absoluta falta de control, tanto de la calidad (no se puede garantizar la monoespecificidad de la biomasa ni su contenido en compuestos orgánicos de interés) como de la cantidad, ya que el número de poblaciones naturales explotables es muy limitado, están sometidas a variaciones estacionales y al ataque por ficófaos, y en general se encuentran sobreexplotadas.

II — Vista la insuficiencia e ineficacia de la explotación de poblaciones naturales,

y debido al gran aumento de la demanda de productos extraídos de macroalgas, se empezaron a desarrollar en Oriente *granjas marinas* basadas en las experiencias del cultivo de *Porphyra* de los japoneses. Estos sistemas de cultivo se fundamentan en el anclaje de las algas a un sistema de redes que, bien de forma suspendida o flotante, se cultivan en zonas costeras. La metodología de este tipo de cultivo la podemos clasificar en dos tipos:

- cultivos de propagación vegetativa y
- cultivos de propagación sexual

Los cultivos de propagación vegetativa consisten en la fijación a las redes oceánicas de fragmentos de talo. Esta metodología está obviamente restringida a especies con un alto potencial regenerativo.

Los cultivos de propagación sexual presentan la desventaja de que requieren el cultivo de las dos fases del ciclo biológico. La primera se realiza en tierra y consiste en la manipulación muy precisa de temperatura e intensidad lumínica de los tanques de cultivo donde se induce la fijación de las esporas a las redes. Una vez obtenida la emisión, fijación y germinación de las esporas, se trasladan las redes al mar. Por tanto, para este tipo de especies la propagación es un factor que encarece considerablemente su cultivo.

La ventaja del cultivo en granjas marinas es que permite un mayor control de la biomasa en un doble aspecto: garantiza la monoespecificidad de la biomasa y da una cierta garantía de suministro continuado. Los inconvenientes son básicamente tres:

- La susceptibilidad de estos sistemas de cultivo monoespecífico y de alta estabulación a las infecciones y contaminaciones por ficofagos y patógenos, problemas que han generado la pérdida de cosechas enteras.
- La baja productividad de estos sistemas, puesto que no se pueden abonar.

— El elevado coste de la mano de obra que requieren estos sistemas. Datos económicos referidos a una granja marina en Taiwan estimaban el coste de la mano de obra en más de un 60% de los gastos totales. La aplicación de estos sistemas es pues impensable en una economía occidental.

III.— La aproximación al cultivo de macrofitos en Occidente, fundamentalmente para la producción de ficocoloides de alta calidad, se ha realizado sobre *sistemas de cultivo indoor*. Estos sistemas de cultivo de alta sofisticación — tanques, canales y fotobioreactores — permiten un control total de la especie, nutrición, producción cuantitativa/cualitativa de ficocoloides, parasitismo, etc., pero a costa de una elevada inversión de energía y capital que hace impensable el cultivo de especies de reproducción sexual, ya que el cultivo de todas las fases del ciclo biológico requeriría una inversión que dispararía los costes de producción.

La resolución de lo que podríamos considerar como factores tecnológicos del cultivo (diseño del sistema, tipo y forma de fertilización, procesos de extracción de mayor eficacia, etc.) no ha permitido, en general, obtener cosechas suficientes como para rentabilizar a nivel comercial estos sistemas de cultivo.

El factor limitante en la producción de algas marinas no es tecnológico; es puramente biológico y radica en la selección de clones de alta producción, en la domesticación de las especies. Lo que ha quedado claro tras cerca de dos décadas de estudio de sistemas experimentales de cultivo es que, haciendo una comparación con la agricultura terrestre, por muchos tractores, abonos, pesticidas e invernaderos que se apliquen a un sistema de cultivo, si lo que se está cultivando es trigo salvaje... no hay pan.

La principal limitación de la expansión de la maricultura vegetal es la mejora genética.

Una vez establecido que el objetivo es la

mejora genética, la siguiente pregunta que se plantea es *Cómo* abordar un programa de selección y, en segundo lugar, *Qué* características interesan, o mejor dicho, qué características son susceptibles de mejora. Como veremos, la metodología que se emplee en el proceso selectivo va a condicionar las características que se pueden seleccionar.

En principio, y como declaración de ideales, las características prioritarias a seleccionar son:

- Variedades de alto crecimiento.
- De reproducción vegetativa.
- De alto contenido cuantitativo/ cualitativo del producto a extraer.
- De alta resistencia a infecciones y estrés ambiental.
- Que produzcan más de un compuesto de alto valor añadido.

Abordar un programa de selección en macroalgas es realmente difícil, debido a la complejidad del ciclo biológico de estos organismos, en los que la alternancia de gametofito-esporofito no es más que una simplificación de un ciclo vital, que cuanto más se estudia más ramificaciones y complejidades presenta. Otra gran dificultad de partida la constituyen las enormes lagunas en el conocimiento del metabolismo y genética de estos organismos.

La contestación al *Cómo* seleccionar la podemos clasificar en dos respuestas: por *métodos convencionales* o por aplicación de *procesos de biotecnología vegetal*.

1.— Vamos a describir brevemente las metodologías, resultados y problemas de los *procesos convencionales de mejora*:

Los trabajos pioneros en la selección de macrofitos fueron los iniciados a finales de la década de los 50 en el Shandong College of Oceanography en China, (TSENG; T. C. FANG) con *L. japonica*. Las características que se pretendía seleccionar eran altas tasas de crecimiento, así como tamaño y grosor del fronde. La metodología seguida fue la de autocruzamiento; es decir, se se-

leccionaron esporofitos con las características antes mencionadas, se cultivaban en tanques individuales, se inducía la emisión de esporas, el desarrollo y maduración de gametofitos, la producción de esporofitos, se seleccionaban los más adecuados y vuelta a empezar.

Los resultados fueron muy alentadores, ya que se obtuvieron no sólo variedades de mayor tasa de crecimiento y grosor de fronde, sino también con un mayor contenido en iodo, lo que permitió erradicar los problemas de bocio endémico en la China continental.

Como veremos a continuación, y tal como lo han expuesto los propios investigadores que llevaron a cabo este programa, hay que introducir muchas mutaciones a la eficacia de la hibridación sexual por autocruzamiento como sistema eficaz de mejora en macrofitos.

En primer lugar, la caracterización de un fenotipo óptimo con el que iniciar un programa de selección, está muy condicionada por la enorme plasticidad que presentan los macrofitos.

En segundo lugar, el grado de heredabilidad de las características deseadas es muy bajo, lo cual alarga enormemente los programas de selección y obliga a un control muy ajustado de las características ambientales, a fin de poder determinar la base genética o epigenética de los fenotipos.

En tercer lugar, las características deseables de selección (alto crecimiento, grosor, tamaño, etc.) son caracteres cuantitativos, ligados por tanto a las normas que regulan su transmisión, es decir, lentos de sumar y en todo caso con un límite que su propia interacción delimita.

En cuarto lugar, no se conocen bien los mecanismos que inducen la esporogénesis y sobre todo la gametogénesis, lo que implica que no se puede reducir en cultivo el tiempo en que se completa el ciclo biológico.

En quinto lugar y relacionado con el punto anterior, la necesidad de cultivar hasta su madurez ambas fases del ciclo para po-

der identificar los fenotipos óptimos con los que continuar el proceso selectivo.

En sexto lugar, y relacionado con la herencia cuantitativa, está el hecho de que los genes, o mejor dicho el sistema de poligenes que regula las características deseables por el hombre, no tiene por qué ser dominante, ya que normalmente no tiene por qué presentar una ventaja selectiva en la naturaleza, y obliga realizar infinidad de cruces para que se vayan sumando genes recesivos en homocigosis.

Y como conclusión final y consecuencia de los problemas expuestos, la larga duración de estos programas de selección, que en el caso de *L. japonica* duraron más de 30 años.

Los trabajos de hibridación interespecífica e intergenética realizados en las dos últimas décadas en Japón (Saito, Tokida y Yabu, Migita), Canadá (Chapman, Linnings) y EE.UU. (Sabonsunga y Neushul), a pesar de estar más bien centrados en dilucidar problemas de relaciones filogenéticas, han permitido un cierto avance en el conocimiento del potencial de la hibridación sexual aplicado a la mejora en Laminarias.

Estos avances han permitido:

- Establecer métodos de control de la gametogénesis y de la emisión de gametos.
- Establecer técnicas para obtener cultivos de gametofitos unisexuales.
- Desarrollar sistemas de cultivo e identificación de los esporofitos híbridos.

Pero estos avances en la manipulación de la hibridación sexual han puesto de manifiesto nuevos problemas, como:

- La gran mortalidad de los híbridos tanto en cultivo en laboratorio como en condiciones protegidas en el mar.
- El descubrimiento de la gran importancia que tiene la herencia materna en características de alto crecimiento.
- La esterilidad de los esporofitos híbi-

dos, que impide el estudio de la estabilidad de la transmisión de los fenotipos variantes de interés.

De los trabajos de selección por hibridación sexual se extraen dos conclusiones: la primera es que no se puede plantear un programa de selección a medio plazo si se trabaja con especies de reproducción sexual, e incluso plantearlo a largo plazo es sumamente arriesgado si previamente no se conoce la heredabilidad de las características que se pretende seleccionar, y la segunda es que como única alternativa viable queda la selección de especies capaces de propagarse vegetativamente.

Esta segunda alternativa de los métodos convencionales de selección tuvo un gran impulso en Occidente tras las experiencias de los sistemas de cultivo indoor, ya que en estos cultivos aparecían espontáneamente mutantes que presentaban, aparentemente, mayores tasas de crecimiento, un elevado potencial de reproducción vegetativa y un mayor contenido en ficocoloides.

La primera referencia fue la del clon T-4 de *Chondrus crispus* obtenido en Canadá por el equipo de VAN DER MEER en 1973 y patentado en 1978. A partir de los trabajos de la escuela canadiense no ha habido año en que no se publicaran nuevos mutantes.

Las grandes expectativas que despertaron estos clones se fueron diluyendo cuando, al pasar los clones a cultivo industrial, se comprobó que las características estaban relacionadas con las condiciones de cultivo en laboratorio (baja densidad, pequeño tamaño de las plantas, nutrientes de pureza analítica, irradiación y temperaturas óptimas, etc.) y no con su constitución genética.

La conclusión de todos estos trabajos es que la mejora genética continúa siendo el cuello de botella de la expansión de la maricultura vegetal, ya que no se dispone de una metodología eficaz con que abordarla. Otra conclusión es que, a menos que no se obtenga un sistema alternativo de propaga-

ción, los sistemas de cultivo occidentales están restringidos a especies de reproducción vegetativa.

2.— La alternativa a los métodos convencionales de mejora surge de la potencialidad de aplicar las técnicas de biotecnología vegetal que se vienen aplicando a plantas vasculares. Estas técnicas permitirían solventar tanto la selección de clones como su propagación, haciendo innecesario el cultivo de todas las fases del ciclo vital de las especies con reproducción sexual.

La aplicación de los procesos de biotecnología vegetal a la mejora y propagación de macrofitos se puede clasificar en dos tipos:

A.— Selección y propagación por cultivo celular.

B.— Selección por ingeniería genética.

A.— Las ventajas de la aplicación del cultivo celular a la selección son:

— Permite trabajar con millones de células en un espacio reducido y con un ambiente totalmente controlado.

— Cada célula se puede considerar una planta en potencia ya que en teoría, y como se ha demostrado en diversas especies, cada célula es totipotente (capaz de regenerar una planta completa).

— El callo es un sistema celular generador de una gran cantidad de variabilidad genética y sobre el que se puede aumentar la variabilidad por tratamientos con mutágenos físicos o químicos.

— Se puede efectuar una presión selectiva directa sobre una población de millones de «plantas» (células) e identificar rápidamente los fenotipos variantes.

— Como célula equivale a planta, la estabilidad del fenotipo variante se puede controlar por el número de divisiones mitóticas.

Estas ventajas del cultivo celular aplicado a macrofitos son las mismas si se aplican a plantas vasculares, pero hay dos caracterís-

ticas de los macrofitos que hacen que estas técnicas tengan aún mayor potencial que en plantas vasculares, y son las siguientes:

— En primer lugar, la alternancia de generaciones que caracteriza a estos organismos permite trabajar indistintamente con gametofitos o esporofitos isomórficos. Esta característica diferencial con plantas vasculares es muy importante, pues permite establecer el cultivo celular de la fase haploide. Esta posibilidad es de gran interés aplicada a la mejora genética ya que:

— La información codificada en alelos recesivos se manifestará y se podrán clonar líneas con características que de otra forma habría sido muy difícil o imposible conseguir, y

— permite obtener clones diploides enteramente homocigóticos mediante tratamientos suaves con colchicina a los clones haploides seleccionados.

Esta posibilidad, que en plantas vasculares está supeditada a la compleja manipulación de polen y anteras, constituye una gran ventaja del cultivo celular de macrofitos que, como hemos visto, constituye uno de los principales inconvenientes en una aproximación convencional a la mejora.

— La segunda ventaja específica de macrofitos referida a la selección por cultivo celular es su comparativamente elevada tasa de recombinación mitótica, lo que implica que se parte, ya desde el explante primario, con una considerable variabilidad genética en las células que inician el cultivo celular.

En resumidas cuentas, el cultivo celular aplicado a la mejora genética de macrofitos permitiría reducir los programas de selección de 30 años a unos cuantos meses. Esta enorme ventaja del cultivo celular presenta un único inconveniente:

Ya habíamos mencionado al principio que el cómo seleccionar iba a condicionar el qué seleccionar. Hemos visto que los pro-

gramas de selección convencionales permitirían seleccionar características morfológicas tales como grosor, tamaño, etc; es decir, rasgos anatómicos a nivel de planta entera. El cultivo celular presenta el inconveniente (inconveniente muy matizable, como veremos), de que únicamente se podrán seleccionar características codificadas a nivel celular, no características a nivel de planta entera.

No obstante, esta salvedad está referida a los programas de selección en sentido estricto, es decir, aplicando presiones selectivas dirigidas, y no implica que por la variabilidad generada en cultivo aparezcan espontáneamente mutantes, que siempre lo harán con una frecuencia muy superior a la variabilidad natural.

La aplicación del cultivo celular a la selección y propagación de macrofitos marinos fue sugerida por primera vez por un científico californiano, el Dr. A. GIBOR, en una conferencia sobre maricultura vegetal en el Pacífico celebrada en 1980. Su sugerencia fue recibida con bastante escepticismo, pero sólo siete años después de aquella elucubración ya existen varias compañías dedicadas a la aplicación de biotecnologías a macrofitos.

En su conferencia, el Dr. GIBOR expuso claramente que antes de especular acerca de las características a seleccionar por estas técnicas, lo primero que había que hacer era desarrollar la herramienta metodológica que permitiera acceder a la manipulación celular de los macrofitos. Para el desarrollo de esta herramienta metodológica se han de cumplir los siguientes requisitos:

- a) Obtener cultivos axénicos.
- b) Obtener medios de cultivo adecuados para el cultivo celular.
- c) Desarrollar métodos que permitan la desorganización celular y la formación de callo, es decir, el establecimiento del cultivo celular propiamente dicho.
- d) Mantener la totipotencia celular y

por tanto la capacidad de regenerar planta a partir del cultivo celular desorganizado.

a/b.— Los dos primeros pasos, la metodología de la obtención de cultivos axénicos y la formulación de medios de cultivo adecuados, ya estaban dados antes de la conferencia de GIBOR. L. PROVASOLI y col. en EE.UU., y posteriormente L. FRIJES en Suecia, venían desarrollando desde mediados de los años 50 estudios de nutrición de macroalgas en cultivos axénicos. Estos estudios básicos de nutrición ya habían sentado las bases de los protocolos de desinfección y obtención de cultivos axénicos, requerimientos nutritivos y orgánicos, formulaciones artificiales de agua de mar y metodología de cultivo.

No obstante, fueron solamente las bases, ya que cuando se intentó establecer el cultivo axénico en otras especies se encontraron numerosas dificultades que hasta el presente sólo se han solucionado en su totalidad para un número muy reducido de especies.

La necesidad de establecer el cultivo axénico es doble:

- Primero, porque para estudiar los requerimientos nutritivos y los reguladores que inducen la desorganización y la morfogénesis del cultivo celular hay que evitar toda interferencia con microorganismos que mediatizarían los resultados.
- En segundo lugar, porque estos microorganismos impedirían el desarrollo del cultivo celular o acabarían destruyéndolo.

El problema de la obtención de cultivos axénicos radica básicamente en 3 puntos:

- El primero de ellos es que los tratamientos desinfectantes no se pueden generalizar. Es decir, las características diferenciales en cuanto a pared celular, difusión y tolerancia del agente biocida en algas verdes, rojas

y pardas hacen que éstas respondan de forma muy diversa frente a un mismo agente biocida. Un tratamiento que funcione muy bien para un grupo o para una especie determinada puede ser completamente tóxico o ineficaz para otra, lo cual obliga a desarrollar un tratamiento específico para cada especie.

- El segundo problema lo constituyen las relaciones simbióticas establecidas entre las macroalgas y sus endoepífitos, que provocan malformaciones y detención del crecimiento cuando se establece el cultivo axénico de macroalgas.
- Y en tercer lugar, el problema que plantea la eliminación de endoepífitos que quedan protegidos de los tratamientos de desinfección.

El establecimiento del cultivo axénico en macroalgas requiere unos tratamientos muy sofisticados, en comparación con plantas vasculares, que podemos esquematizar en el siguiente protocolo:

- En primer lugar se precultivan fragmentos juveniles, liberados de epífitos, por raspado con cepillo en un medio con una concentración ligera de una mezcla de antibióticos durante un par de días.
- Sucesivos tratamientos de sonicación de los fragmentos más vitales en agua de mar estéril.
- Tratamiento con compuestos orgánicos iodados, alcohol, hipoclorito cálcico o sódico, desinfectantes clínicos, etc.
- Post-tratamiento de los fragmentos más vitales con una mezcla de antibióticos de amplio espectro, fungicidas y dióxido de germanio.

De los trabajos iniciales de PROVASOLI y FRIES surgieron diversas formulaciones artificiales de agua de mar que en mayor o menor grado de definición permitían el cre-

cimiento «in vitro» de macroalgas. No obstante, las formulaciones artificiales de agua de mar no daban los mismos resultados que las formulaciones de agua de mar enriquecida. Los trabajos de M. PEDERSEN demuestran la presencia de citoquininas en aguas someras cercanas a poblaciones densas de macroalgas. Estos resultados, conjuntamente con los aportados por PROVASOLI y FRIES de la auxotrofia macroalgal frente al complejo vitamínico B, han llevado a que en el desarrollo del cultivo celular se emplee el agua de mar como medio base. La estrategia ha sido la de posponer el conocimiento y definición exacta de los requerimientos nutritivos y orgánicos frente al objetivo de establecer el cultivo celular.

c. — Y entramos en el tercer requisito del desarrollo de esta herramienta de trabajo, el establecimiento del cultivo celular, que se entiende por el desarrollo de un sistema celular desorganizado, un tumor a fin de cuentas, que es lo que se denomina callo en estas técnicas.

El primer problema que se plantea es el de la definición de callo en organismos como los macrofitos, que se caracterizan por un bajo nivel de organización celular. Así como en el cultivo celular de plantas superiores una estructura de callo es fácilmente reconocible, la escasa organización celular y la gran plasticidad morfológica de los macrofitos ha llevado al abuso del término «callus-like» para referirse al desarrollo, al parecer desorganizado, de los explantes en cultivo, y a un ambiente de crítica y escepticismo entre los diversos grupos de trabajo en cuanto a la consideración de los resultados ajenos como un auténtico establecimiento del cultivo desorganizado. Esta situación se ha visto potenciada por los escasos datos histológicos aportados en los trabajos.

La primera referencia que se suele citar en el desarrollo de la biotecnología de macrofitos marinos es la de CHEN y TAYLOR (1978), aunque estos autores no obtienen la

desorganización de los fragmentos de médula de *Chondrus crispus* que emplean como explante primario. No obstante es la primera referencia en la que se describe el efecto de hormonas sobre la regeneración «in vitro» de fragmentos de macroalgas empleando la metodología del cultivo celular. El mismo año SAGA en Japón describe la regeneración de esporofitos a partir de células aisladas, lo que denomina callus-like, en Laminarias. Estos trabajos sentaron las bases de la posibilidad de que células o pequeñas agrupaciones celulares podían expresar su totipotencia en cultivo «in vitro» y por tanto confirmaban la posibilidad de aplicar las técnicas del cultivo celular a macrofitos marinos. En 1980 FRIES publica la inducción de callo y su regeneración en medio artificial semisólido.

A partir de 1980 aumentan los grupos de trabajo interesados en el establecimiento del cultivo celular de macrofitos. CHENEY y col. en Boston, BRINKHUIS en Nueva York, GIBOR y POLNE FULLER en California, VAN STADEN en Sudáfrica, GORDON en Nueva Zelanda, YAN en China y BOROWITZKA en Australia, constituyen los grupos más importantes que surgen a partir de 1983.

La aproximación que hacen todos estos grupos al desarrollo de la «herramienta» del cultivo celular es bastante coincidente en cuanto a los parámetros básicos que parecen controlar la desorganización celular:

- Identificar los genotipos de mejor respuesta.
- Seleccionar el tipo de explante más adecuado.
- Determinar la composición del medio de cultivo y su estado físico más adecuado para la inducción de la desorganización celular.
- Determinar el efecto que presentan diversos reguladores del crecimiento sobre la desorganización y regeneración del callo.

Tras seis años de trabajo, cada grupo había desarrollado la metodología necesaria para establecer el cultivo celular en las especies particulares en las que trabajaban, que en su mayoría eran algas pardas. Los medios de cultivo se fueron complicando cada vez más con la introducción de compuestos orgánicos, formulaciones modificadas de los medios de cultivo de plantas vasculares, diversos tipos de azúcares, reguladores del crecimiento convencionales y no convencionales, etc.; es decir, se siguió el mismo slogan de «adiciona que algo hará» que sufrió el cultivo celular de plantas vasculares veinticinco años antes.

Asimismo se descubrió el efecto-herida en macrofitos como inductor de desorganización y la influencia de las concentraciones hormonales endógenas y su variación estacional entre las fases haploide y diploide en la formación de callo, así como la importancia del potencial osmótico en la desorganización celular. En resumidas cuentas, se avanzó en cuatro años lo que en el desarrollo del cultivo celular de plantas superiores había costado veinte. Aunque eran pocos los parámetros controlados y muy diversos los modos de acción entre diferentes especies, la «herramienta» ya estaba construida, para algunas especies en 1984, en lo que se refiere a los tres primeros puntos que antes habíamos mencionado: obtención de cultivo axénico, medio de cultivo adecuado y tumorigénesis.

d.—El cuarto punto, la regeneración de planta, es decir el mantenimiento de la totipotencia de la célula desorganizada, es el que mayor problema plantea.

La regeneración de planta del cultivo celular se ha conseguido solventar en parte jugando con dos factores:

- La adición de hormonas al medio de cultivo y
- el estado físico del medio de cultivo,
- La utilización de hormonas para inducir la reversión organo-genética en el cultivo celular de macrofitos ha

dado lugar a resultados bastante contradictorios. La importancia de la regulación hormonal endógena en macrofitos está bien establecida, al menos en algunas especies, pero lo cierto es que dentro de un amplio rango de tipos de auxinas y citoquininas, concentraciones y balances relativos experimentados, no se ha conseguido dar con una formulación que de forma eficaz revierta el crecimiento desorganizado hacia la formación de una planta completa. Haciendo una comparación con el cultivo celular de plantas superiores, la utilización de hormonas para inducir organogénesis probablemente no será eficaz hasta que se obtenga con macrofitos un sistema celular análogo al de *Nicotiana* en plantas vasculares, cuya gran facilidad de cultivo «in vitro» permitió dar con formulaciones hormonales que permitían «dirigir» a voluntad la morfogénesis del cultivo celular.

Algunos autores han descrito el efecto de compuestos orgánicos inéditos en la fisiología vegetal, tales como el naftenato sódico (YAN, 1984), como reguladores esenciales para la inducción de organogénesis en callos de Laminariales. Nuestra experiencia al respecto es que esta sustancia no tiene efecto aparente en la organogénesis de callos de algas rojas.

- El estado físico del medio de cultivo parece ser un sistema más eficaz para controlar a voluntad un crecimiento desorganizado o inducir organogénesis. Según los resultados de la escuela californiana, la formación de callo tiene lugar en medio sólido y la regeneración se induce sin problemas, simplemente subcultivando callos o agregados celulares en medio líquido. Al igual que en el cultivo celular de plantas superiores, el potencial

osmótico parece jugar un importante papel como regulador del crecimiento en el cultivo celular de macrofitos.

Lo cierto es que actualmente la regeneración del cultivo celular constituye el principal problema en la expansión de estas técnicas; prueba de ello es que de las 30 especies en que se ha obtenido el establecimiento del cultivo celular, menos de la mitad se han conseguido regenerar. Pero lo que es igualmente cierto es que este contratiempo no ha desalentado la continua aparición de nuevos grupos de trabajo en el campo de la biotecnología aplicada a los macrofitos marinos.

Los programas de selección aplicando estas técnicas, iniciados en el Shangdong College of Oceanography en China y en la Universidad de California, comprenden la selección de cuatro características:

- Selección de estirpes de alto crecimiento.
- Selección de estirpes resistentes a antibióticos y fungicidas.
- Selección de estirpes resistentes a elevadas temperaturas.
- Selección de estirpes resistentes a toxinas bacterianas.

El común denominador de estas características es que están codificadas a nivel celular, y no precisan de marcadores morfológicos para seleccionar. El indicativo de su resistencia es que continúan creciendo o lo hacen a mayor velocidad que otros agregados celulares. Es decir, son características que no precisan de marcadores especiales para ser detectadas.

Los resultados prácticos más espectaculares hasta el momento los constituyen los trabajos realizados en China con *Laminaria japonica*. La selección de clones resistentes a elevadas temperaturas llevados a cabo por YAN ZUO-MEI (1984), le han permitido regenerar plantas de callos resistentes que no sólo retenían la resistencia manifestada en el callo, sino que además mostraban una tasa de crecimiento superior a la especie sal-

vaje. La obtención de clones resistentes a elevadas temperaturas ha permitido el desarrollo de la *maricultura* de esta especie en el Mar de China, zona muy rica en nutrientes, donde las especies salvajes no se podían cultivar por las elevadas temperaturas que alcanzaba el agua de mar.

Con este ejemplo práctico de la aplicación del cultivo celular a la selección vamos a introducir otro aspecto aplicado muy importante de estas técnicas: la posibilidad de emplear el cultivo celular como un sistema muy eficaz de propagación.

La base de esta aplicación es muy sencilla. Consiste simplemente en disgregar un talo y provocar que cada célula o agregado celular origine una planta completa, con lo que se podrían obtener de golpe millones de plantas idénticas a la planta disgregada sin necesidad de pasar por todo el ciclo biológico de la especie. Por lo tanto, se podrían ahorrar las costosas instalaciones en tierra y la compleja manipulación de las fases alternantes de las especies con reproducción sexual que hablamos expuesto anteriormente, y la producción de material para la siembra se podría efectuar a partir de una única planta o grupo de plantas que presentara las características más deseadas, que estarían exactamente reflejadas en su descendencia, ya que se trata de un sistema vegetativo de propagación.

El último avance en esta aplicación del cultivo celular se publicó el pasado año en la revista «Genetic Engineering News» (1987) con un trabajo realizado por el Dr. KAPRAUN con la especie *Ulvaria oxysperma*, en la que obtiene la producción de planta cosechable seis semanas después del aislamiento de células y su fijación en cuerdas.

Con el nivel actual de conocimiento en el campo de la biotecnología vegetal, las aplicaciones que hemos mencionado —en cuanto a las posibles características a seleccionar y su aplicación a la propagación somática— son las que presentan una expectativa de aplicación comercial más próxima. No obstante, el desarrollo del cultivo

celular y otras biotecnologías han permitido abordar otros estudios que, aunque en un plazo más largo, tendrán un gran impacto en la maricultura vegetal. De entre estos campos a medio-largo plazo citaremos dos:

- la producción directa de compuestos orgánicos de interés industrial en biorreactores y
- la aplicación de anticuerpos monoclonales a ficocoloides para la identificación y selección de estirpes celulares de agarofitas.

Paradójicamente, la producción de metabolitos secundarios de algas eucariotas a partir del cultivo celular desorganizado en biorreactores está citada desde 1974, cuando al parecer ni tan siquiera se había planteado en el mundo la posibilidad de aplicar el cultivo celular a las algas. Y si ello constituye una paradoja, lo que resulta sorprendente es la base misma de esta referencia, que no es ni más ni menos que una patente japonesa para la producción de agar a partir de callos de *Gelidium* cultivados en un biorreactor estático. Y si la paradoja es sorprendente, los datos aportados en esta patente han sido calificados de exageraciones comerciales por la comunidad científica, ya que la producción de agar en biorreactor era tres o cuatro veces superior al equivalente de biomasa en cultivo en tanque. No se conoce ninguna empresa que disponga de esta tecnología y, en general, esta patente se ha relacionado con la posibilidad de patentar ideas en el campo de la biotecnología y con el interés en destacar el potencial de la técnica, más que con el desarrollo real del sistema.

No obstante, un reciente estudio microscópico del callo de algas rojas nos ha permitido descubrir dos aspectos que hacen suponer que el cultivo en biorreactor puede dar un rendimiento de ficocoloides muy superior al de la planta organizada.

Estas dos observaciones son:

- De una parte, el considerable grosor

de las paredes celulares del callo, lo que unido al pequeño tamaño de las células podría aumentar un orden de magnitud el contenido en ficocoloides en relación a una planta completa.

— En segundo lugar, el descubrimiento de una desproporcionada concentración de amiloplastos en las células del callo. Este predominio del metabolismo de los hidratos de carbono bien podría ser el responsable de una sobreproducción de polisacáridos estructurales.

La posibilidad de aplicar las técnicas del cultivo celular a la selección de estirpes con un mayor contenido cuantitativo y cualitativo de ficocoloides depende de un requisito: la obtención de un marcador; un marcador morfológico, fisiológico o bioquímico, pero que nos permita identificar en una población de billones de células, aquellas que manifiestan las características deseadas. Este aspecto de la aplicación del cultivo celular a la selección genética tiene un gran interés económico, ya que los ficocoloides de alta calidad constituyen el producto de mayor interés actual extraído de los macrofitos.

Si no se dispone de marcadores, el procedimiento es generar variabilidad en el cultivo desorganizado, regenerar planta y analizar la «descendencia» una por una intentando obtener un variante somaclonal, es decir un proceso tedioso y sin ninguna garantía de éxito.

El segundo ejemplo que habíamos mencionado como biotecnologías que tendrán impacto en el campo de la biotecnología y maricultura vegetal es el de los anticuerpos monoclonales a ficocoloides. La importancia del desarrollo y perfeccionamiento en la producción de anticuerpos monoclonales a ficocoloides radica en que es la «miniherramienta» que precisa la «gran herramienta» del cultivo celular para abordar un programa de selección cuantitativa y cualitativa de ficocoloides.

Los primeros trabajos de obtención de anticuerpos monoclonales a ficocoloides se

realizaron en Canadá a mediados de los 70 por el grupo de la Dra. McCANDLESS. Poco a poco se fue aumentando la especificidad de estos marcadores moleculares, desarrollándose anticuerpos específicos a iota, lambda y kappa carrageno y, tras la incorporación del equipo californiano de la Dra. VREELAND a principios de los 80, se desarrollaron las técnicas de hibridación de polisacáridos con marcadores fluorescentes.

A mediados de los 80 ya se disponía de la «miniherramienta» que permitía identificar a nivel celular la longitud y composición de carragenatos y agar, ya que este último también mostraba una respuesta inmunogénica. Los resultados presentados en 1987 en el Congreso «Recent Progress in Algal Biotechnology» (Lille, Francia), han sido espectaculares en cuanto a la variabilidad en contenido y composición que presentan las células de especies carragenofitas sometidas a tratamientos mutágenos. Por el momento no se han regenerado plantas de los clones selectos, pero lo que es importante tener presente es el impresionante avance que suponen estas técnicas si las comparamos con los métodos de hibridación sexual iniciados en China. La aplicación conjunta del cultivo celular y los anticuerpos monoclonales permite, además de las ventajas que ya mencionamos del cultivo celular, seleccionar casi a nivel genético, porque lo que sí ha quedado claro tras los trabajos de McCANDLESS y VREELAND es que la cantidad de unidades estructurales y su grado de sulfatación, es decir la cantidad y calidad de los ficocoloides, está sujeta a una codificación genética. El desarrollo de estas técnicas nos ha llevado pues a las puertas de la manipulación genética, es decir al máximo grado posible de control... pero sólo a las puertas.

Porque para hablar estrictamente de manipulación genética hay que llegar a eso, a manipular, y no a identificar y seleccionar variabilidad que no sabemos de dónde ni cómo ha surgido... por muy útil que nos pueda resultar esta variabilidad.

B.— Esto nos lleva al punto final del desarrollo de la biotecnología aplicado a la selección de macrofitos, *los procesos de ingeniería genética*. Los requisitos para el desarrollo de la ingeniería genética en estos organismos pasan por:

- la obtención de protoplastos
- la obtención de métodos eficaces de hibridación somática y producción de heterocariotes
- la identificación de plásmidos
- la obtención de vectores
- y finalmente por la identificación, aislamiento y clonado de genes en plásmidos.

Las metodologías para manipular la información genética en macrofitos las podemos clasificar en dos:

- a.— por *hibridación somática* y
- b.— por *transformación genética*.

a.— La aplicación de la *hibridación somática* es la metodología más sencilla, pero la menos fiable de las dos. Esta técnica se basa en la obtención de protoplastos y su fusión con protoplastos de otras especies o géneros, dando lugar a una célula que presenta el genoma de ambos. En teoría esta metodología permite romper cualquier barrera genética y generar una «especie» nueva, que expresará las características codificadas en ambos genomas. Como es fácilmente imaginable, la potencia de esta técnica es muy superior a la simple hibridación sexual de los sistemas convencionales de mejora. La potencialidad de esta técnica ha hecho que científicos de gran prestigio dentro del campo de productos bioactivos de macrofitos como W. FENICAL (1983), hayan sugerido la posibilidad de «ingeniar» plantas terrestres que produzcan ficocoloides o antibióticos característicos de la flora marina.

La gran expectación que causó la posibilidad de hibridación somática en el mundo de los ficólogos, estuvo en parte condicionada por la similar expectación, pero con mu-

cha mayor base científica y metodológica, que se había levantado en el campo de la biotecnología de plantas vasculares. No obstante es muy probable que, al igual que ha sucedido en el campo de la hibridación somática en plantas vasculares, se descubra que esta posibilidad aplicada a macrofitos presenta muchos más problemas de los esperados.

El primer requisito para realizar la hibridación somática es obtener protoplastos, y aquí aparece el primer problema, porque la aplicación de la metodología y sobre todo, de los sistemas enzimáticos que se han desarrollado para plantas vasculares, no funcionan en algas rojas y pardas, que son las de mayor interés. Las paredes celulares de estas algas son diferentes y mucho más complejas que las plantas vasculares, y no digieren las mezclas de celulasas, pectoliasas y hemicelulasas que funcionan perfectamente con plantas vasculares. Para la digestión de las paredes celulares de macrofitos marinos se han empleado dos sistemas:

El primero es la utilización de auténticos cócteles enzimáticos en los que se añade una muestra de la mayoría de los enzimas existentes en el mercado que actúan sobre pared celular. De esta forma ha surgido un considerable número de formulaciones enzimáticas. Este recetario de formulaciones enzimáticas plantea dos problemas:

— El primero es que la idoneidad de una formulación está restringida a una especie determinada, no sirve para todas las especies, incluidas las de un mismo género. Es más, su efectividad puede estar restringida a una fase determinada del ciclo celular; es decir, el que digiera las células gametofíticas no significa que digiera las células del esporofito.

— El segundo problema es el que plantea la toxicidad de estos cócteles enzimáticos en lo que se refiere a la viabilidad del protoplasto para regenerar pared celular y posteriormente dividirse y dar lugar a una planta completa. Protoplastos sí se han ob-

tenido con estos cocteles, pero la obtención de plantas sólo se ha descrito en muy pocas especies. En las demás especies o no se ha conseguido la regeneración de pared, o como máximo un par de divisiones mitóticas.

El segundo sistema empleado para la obtención de protoplastos consiste en la extracción de los sistemas enzimáticos de ficófitos. La utilización de extractos crudos, o ligeramente purificados, del sistema digestivo de *Aplysia*, *Diadema* o *Littorina* han permitido la regeneración de callo y en algunos casos la regeneración de plantas a partir de éstos. Este sistema ha demostrado ser mucho más eficaz en cuanto a la repetibilidad, ausencia de toxicidad, número de especies a las que se puede digerir la pared y, sobre todo, cantidad de protoplastos obtenidos.

Realmente el «estado del arte de la ingeniería genética en macrofitos» no ha pasado de este punto. A lo largo de 1986 y 1987 se han publicado diversos trabajos y ha habido varios congresos en los que se han descrito técnicas rutinarias para el aislamiento de protoplastos. El primer paso se puede considerar dado. Los siguientes están en su mayoría por dar, pero es muy probable que se efectúen en la presente década.

Lo que vamos a exponer a continuación son los trabajos que se están realizando actualmente en diversos laboratorios del mundo en cuanto a las posibilidades que el desarrollo de sistemas eficaces de obtención de protoplastos han abierto en el campo de la ingeniería genética aplicada a macrofitos.

Los trabajos de hibridación somática se están llevando a cabo en la Universidad de California bajo la Dirección del Dr. GIBBOR, y en la Universidad de Nottingham y la de Boston, que llevan a cabo el proyecto conjuntamente. Los resultados publicados hasta el momento sólo hacen referencia a la facilidad con que los protoplastos se fusionan espontáneamente, por lo que en principio no parece que este aspecto vaya a presentar graves problemas. Donde es muy

probable que surjan es en la formación de auténticos heterocarios, es decir, que realmente se fusionen los núcleos, y sobre todo, en que los genomas de distintas especies puedan coexistir en el híbrido. Este último aspecto es el que ha producido el abandono, o al menos ralentización en los programas de hibridación somática en vegetales superiores.

Los más optimistas en cuanto al potencial de la hibridación somática en macrofitos suelen citar el trabajo de MATAGNE y col que, en 1979, describieron la obtención de un auténtico heterocarion estable al fusionar protoplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*. Lo que no suelen mencionar es que se empleó un mutante que carece de pared celular. También los trabajos de OHIWA en Japón con hibridaciones inter-específicas e intergenéricas con otras especies de algas unicelulares o filamentosas (*Zygnema*, *Mougeotia*, *Spirogyra*), que dieron lugar rápidamente a procesos de incompatibilidad somática y nuclear. Los mismos procesos de incompatibilidad que en un trabajo precoz y muy olvidado, publicó L. FOWKE en 1979 al fusionar protoplastos de *Chlamydomonas* y *Daucus carota*. Ciertamente la bibliografía es muy escasa, pero si se extrapolan los resultados obtenidos en la hibridación somática de plantas vasculares, algas unicelulares o filamentosas y algas y plantas vasculares, la profecía de FENICAL de fabricar plantas terrestres que produzcan compuestos bioactivos característicos de macrofitos, parece que tardará algún tiempo en hacerse realidad.

b. — La otra gran vía que ha abierto la obtención de protoplastos es la de la ingeniería genética propiamente dicha, es decir, la *transformación genética*.

Démonos cuenta de cuántos prerrequisitos para aplicar esta tecnología se han superado en apenas siete años:

— Se han obtenido cultivos axénicos; no hay pues interferencia con otros organismos.

- Se han obtenido medios de cultivo que pueden hacer crecer en forma organizada o desorganizada a las células de macrofitos.
- Se pueden cultivar en medio sólido, con lo que posibilitan la identificación y aislamiento de mutantes.
- Se ha descrito la existencia de plásmidos en macrofitos de interés comercial.
- Se pueden obtener protoplastos, con lo que la especificidad de los procesos de transformación (o conjugación) se ve reducida a un mínimo, y potenciadas las eficacias de transformación. Es decir, podrían servir los mismos vectores o plásmidos que se emplean en plantas vasculares.

El cuello de botella radica en la obtención de vectores naturales en macrofitos.

Aunque es un hecho poco conocido, la existencia de bacterias marinas generadoras de tumores en macrofitos está descrita desde el siglo pasado. Desde los trabajos de BROWN en 1983, diversos autores han descrito a las bacterias como las causantes de los tumores, agallas o callos (se han empleado indistintamente estos tres términos) que aparecen en poblaciones naturales de macrofitos. Un trabajo reciente de TSEKOS (1983) mostraba la morfología de estas bacterias en tumores de *Gracilaria*. El estudio de la microscopía electrónica de los callos inducidos en nuestro Departamento ha puesto de manifiesto la presencia de bacterias similares a las descritas por TSEKOS y otros autores en tumores de poblaciones naturales. De la identificación y aislamiento de estas bacterias puede que venga ese vector, esa «llave maestra» que nos permita introducirnos en el código genético de los macrofitos.

Otro cuello de botella, mucho más difícil de resolver, es la identificación, aislamiento y clonación de genes que confieran una mejora cuantitativa o cualitativa a la especie en particular. Ciñéndonos al caso es-

pecífico de ficocoloides, la pregunta sería, ¿qué genes codifican una mayor producción de agarosa, de k-carrageno?, ¿qué genes codifican un menor grado de sulfatación en estas moléculas? y la segunda pregunta sería, ¿dónde están localizados? En macrofitos se desconoce la respuesta a estas preguntas. No obstante, unos trabajos recientes de DE-RETIC y col (1987) en *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria productora de alginatos iguales a los producidos por *Fucus gardneri*, ha permitido identificar los genes involucrados en su síntesis y ha abierto la posibilidad de comenzar a identificar los genes relacionados con la síntesis de alginatos en macrofitos.

Aunque la alternativa de la transformación genética en macrofitos parece muy lejana, hay que tener presente que el penúltimo número de la revista «High Technology» dedica un artículo a la biotecnología en algas marinas en el que se citan diversas empresas de ingeniería genética que están investigando el desarrollo de estos procesos en especies de algas marinas de interés industrial.

Para finalizar haremos un resumen historiado-especulativo de lo expuesto. Hemos visto cómo a partir del estancamiento de la recolección como método de obtención de biomasa, el hombre ha ido desarrollando la maricultura vegetal en sucesivos escalones hacia un objetivo muy concreto: máximo control.

El primer escalón fue el cultivo en granjas, primer paso de cazador a agricultor. Vimos las razones que le impulsaron a subir un escalón más y desarrollar los sistemas de cultivo indoor. En el sistema indoor el cultivo es muy fácil, incluso se puede automatizar, pero descubre que la cantidad de energía que consumen estos sistemas de cultivo en tierra en relación a la cantidad de dinero que recibe por su producto no es suficiente, y que si cultiva especies de reproducción sexual la explotación es ruinosa. Sabe que la demanda y el precio de las algas van en aumento, que esas plantas son las únicas

que pueden producir el producto que necesita (no existen sistemas industriales o biotecnológicos alternativos), y que la solución es hacerlas más productivas. Pasa entonces a aplicar los métodos convencionales de selección; trata de hibridar especies, trata de cultivar los mutantes que han aparecido en el cultivo, pero descubre que esas herramientas selectivas no le van a garantizar el material vegetal que necesita. Aprende que el único éxito descrito por esa vía es puntual y muy limitado a unas características que no son exactamente las que anda buscando.

Decide subir un escalón más y llegar al control de la célula, la máquina que produce los compuestos que necesita. Entonces, mientras intenta controlar el comportamiento de la célula, descubre un gran abanico de posibilidades. No sólo es posible seleccionar células resistentes a diversos estrés ambientales, que crezcan muy rápido, resistentes a toxinas, etc., sino que puede identificar y seleccionar células que sintetizen una mayor cantidad del producto que le interesa, o una mayor calidad, o incluso nuevos productos. Puede también cruzar especies que divergieron en la evolución hace millones de años, y puede montar un sistema de producción de «semilla» que produzca millones de plantas idénticas a un fenotipo determinado, en un espacio de cultivo muy reducido. Ha superado la esclavitud de la reproducción sexual y las barreras genéticas.

Al mismo tiempo se da cuenta de que el cultivo celular abre la posibilidad de saltar al siguiente escalón y controlar el mecanismo que regula la maquinaria celular. En este momento está intentando encontrar el vector que le permita manipular el ADN.

Este camino probablemente le llevará bastante tiempo, pero mientras tanto dispone de la herramienta del cultivo celular, que ya le está permitiendo producir las plantas que necesita.

Además, el cultivo celular le ha enseñado otra cosa: que puede hacer cambiar drásticamente la maricultura vegetal, y es que realmente no necesita la planta. Cultivando las células ha descubierto que obtiene mayor cantidad del producto que le interesa y de una forma mucho más controlable y cómoda. Si pudiera desarrollar un biorreactor con agregados celulares que le produzcan mucho más que la mejor de las plantas y encima no necesite empleados, ni espacio, ni mar, su decisión no es difícil de imaginar. Probablemente la historia no acabará aquí. Para cuando haya conseguido identificar las rutas metabólicas que conducen al producto que le interesa y los enzimas que las regulen, se dará cuenta de que no necesita a las células, ni tan siquiera manipular a voluntad el ADN; lo único que necesita es sujetar los enzimas en un biorreactor de inmovilización, introducir el sustrato adecuado por un extremo y recoger el producto por el otro. Al final llegará al Control Total.

Como hemos visto, las rutas biosintéticas de ficocoloides y los enzimas que las controlan se están empezando a conocer y en el mercado ya existen varios modelos de biorreactores normales y de inmovilización desarrollados para la producción y biotransformación de metabolitos secundarios de plantas vasculares. El tiempo que se tarde en emplearlos y el tipo de biorreactores que se empleen dependerán de la velocidad a la que se vaya resolviendo el actual «estado del arte» del cultivo celular, y en vez de «arte» se convierta en ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Angel Luque por la revisión y valiosas sugerencias aportadas al manuscrito.