

# El glicerol como activador de la división celular y la actividad biosintética del alga *Grateloupia doryphora*

**PILAR GARCÍA JIMÉNEZ**

## **RESUMEN**

El alga roja *Grateloupia doryphora* creció en medios axénicos de agua de mar enriquecida (PES) con glicerol como una fuente de carbono orgánico. Las técnicas histológicas, histoquímicas y de microscopía electrónica revelaron que el glicerol fue utilizado para biosintetizar polímeros, necesarios para la elongación y la posterior división celular, tal y como lo evidenció la acumulación de almidón y la actividad del sistema de endomembranas.

## **ABSTRACT**

***Glycerol as an activator of cellular division and the biosynthetic of the seaweed *Grateloupia doryphora****

*The red alga *Grateloupia doryphora* was grown in axenic culture in Provasoli's enriched seawater medium (PES) supplemented with glycerol as an organic carbon source. Histologic and histochemical techniques and studies at the electron microscope level revealed that glycerol was used to biosynthesize polymers needed for cell elongation and division as evidenced by starch accumulation and endomembrane system activity.*

## INTRODUCCIÓN

**E**l trabajo <sup>(1)</sup> que a continuación se presenta tiene como objetivo principal contribuir a la mejora de los cultivos *in vitro* de las macroalgas.

El hecho de que nos centramos en las algas marinas viene dado por el gran interés industrial que éstas despiertan. No debemos olvidar que los vegetales marinos, y principalmente las algas rojas y pardas, acumulan en las paredes de sus células y espacios intercelulares determinados compuestos (agar-agar, carrageno) cuyas propiedades físicas los hacen insustituibles en su aplicación industrial.

Por otro lado, su metabolismo secundario genera compuestos de características químicas y propiedades bioactivas, únicas en el Reino Vegetal, con actividad farmacológica, antifúngica, antivírica y antineoplásica (Fenical, 1982; McLachlan, 1985).

Sobre lo expuesto, el primer paso será la obtención y mantenimiento del cultivo de algas que produzcan mayores y mejores cantidades de compuestos orgánicos de interés industrial y sobre los que se realice la extracción de productos macroalgales independientemente de la existencia de las poblaciones naturales.

La dificultad de cultivar y manipular los cultivos de estas macroalgas y de mantenerlas en condiciones libres de contaminantes (axénicas) ha hecho que, durante muchos años, no se le prestase la suficiente atención.

El desarrollo, relativamente reciente, de cultivos axénicos de estos vegetales ha dado una oportunidad al estudio de los requerimientos no sólo nutritivos sino al de su crecimiento en condiciones controladas. El cultivo en condiciones libres de contaminantes también ha permitido la introducción de diversas fuentes de carbono. Las mismas facilitarían el mantenimiento de cultivos con una alta tasa de propagación hasta generar nuevos individuos.

En los últimos años hemos desarrollado un sistema de propagación *in vitro* en condiciones libres de contaminantes para el alga roja multicelular *Grateloupia doryphora*. Dicho sistema permite no sólo la propagación de carposporas y tetrasporas hasta la obtención de talos gametofíticos y tetrasporofíticos sin que se presenten los clásicos problemas de contaminación que ocurre cuando se parte de un material no axénico, sino que también, la adición de una fuente de carbono eficaz para el crecimiento y la morfogénesis (emisión de yemas) ha posibilitado un aumento en la tasa de crecimiento de 4 veces superior a la tasa normal e inducido la formación de yemas. Esta fuente de carbono fue el glicerol y ninguna otra probada: galactosa, glucosa, sacarosa y manosa, provocó cambio alguno (Robaina et al., 1990).

Para centrar el tema, lo que tratamos de comunicar es, a), tenemos un sistema que nos permite la obtención de nuevos individuos, estando en vías de completar el ciclo de vida de esta alga en el laboratorio, permitiéndonos abandonar la población natural, y, b), la presencia de glicerol ya no sólo es

importante por su efecto sobre el crecimiento, sino que también forma parte de los productos de reserva en las algas rojas como es el floridosido e isofloridosido (compuestos de galactosa-glicerol); y que su metabolismo favorece la acumulación de almidón y otros ficocoloides como el agar-agar y carrageno (Macler, 1986), los cuales, a su vez, han estado relacionados con la formación de las yemas (Brown et al., 1979). En definitiva, conociendo el metabolismo del glicerol y la ventaja que nos reporta el sistema, utilizarlo como una "herramienta" que nos permita actuar sobre el crecimiento y la acumulación de estos productos, al mismo tiempo que podemos caracterizar histológica e histoquímicamente los cambios morfológicos que tienen lugar, y correlacionar las variaciones en determinados componentes estructurales derivables del metabolismo del glicerol (aproximación histoquímica) con los cambios morfológicos.

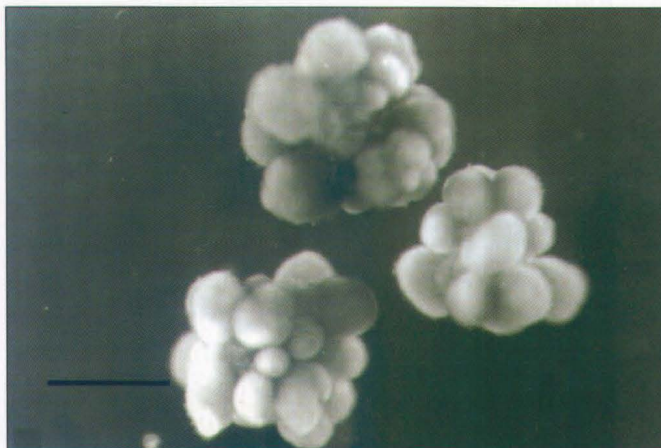
## IMPLICACIONES MORFOGENÉTICAS DEL GLICEROL

**L**el material vegetal empleado en el seguimiento del desarrollo y la morfogénesis de *G. doryphora* fueron carposporas las cuales habían sido liberadas en placas de Petri, conteniendo medios de cultivos agarizados. Para ello, las bases aplicadas por Robaina (1988) para la esterilización del material vegetal, así como para la obtención de carposporas nos permitieron mejorar los méto-



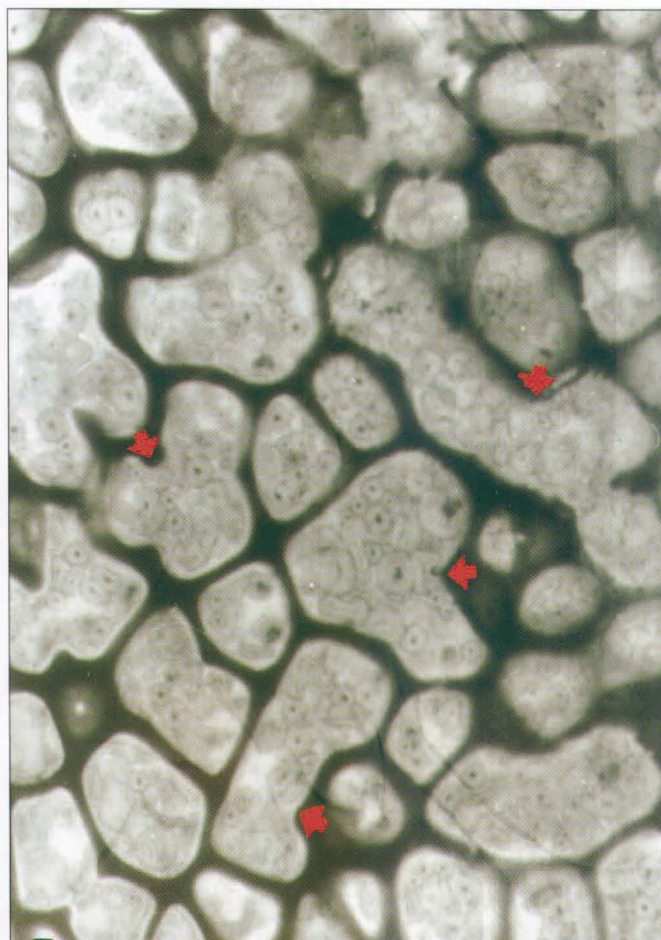
**FOTO 1.**

*Talos de Grateloupia doryphora de 45 días de edad cultivados en medios sólidos control (PES). x60.*



**FOTO 2.**

*Masas morfológicas de 45 días de edad cultivadas en medios sólidos PES 70 + 0.3 M glicerol. x60.*



**FOTO 3.**

*Fotografía al microscopio óptico de células pertenecientes a las capas interna-intermedia de material cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 2 horas. Las flechas indican los lugares donde probablemente comience la división del citoplasma. Sección semifina de 1.5  $\mu$ m teñida con azul de toluidina. x140.*

dos de propagación del alga roja *G. doryphora* (García-Jiménez, 1994).

El estudio del crecimiento y el desarrollo fue seguido desde las 2 primeras horas hasta los 12 días en cultivo. Para ello se dispuso de aproximadamente 950 carposporas repartidas en 8 placas de Petri conteniendo medios agarizados normales (4 placas) y conteniendo glicerol (4 placas). Durante cada uno de los tiempos descritos, 25 esporas de cada medio fueron recolectadas y preparadas para su visualización al microscopio óptico y al electrónico.

## RESULTADOS

**S**i bien las carposporas cultivadas en presencia del glicerol era el material idóneo sobre el que caracterizar los cambios morfológicos y la acumulación de derivados del glicerol, lo cierto es que este hecho pasaba por el conocimiento previo de “su patrón normal”, es decir, aquel que tenía lugar en ausencia de la fuente de carbono.

Las técnicas de histología e histoquímica, junto con, las de microscopía electrónica han constatado no sólo los cambios estructurales que tienen lugar sobre este tipo de material hasta la formación de una nuevo talo, sino también las posibles alteraciones en el patrón de crecimiento.

El examen del material, en medios conteniendo glicerol, reveló un modelo de disposición celular muy diferente al encontrado en medios control. Esto

se debe al hecho de que el crecimiento en medios con glicerol induce un patrón de crecimiento diferente al encontrado en medios control (Fotos 1,2).

El material a estudio mostraba, en el momento inicial, una forma esférica con 3 capas diferenciadas (externa, intermedia e interna), mientras que, en estadios más avanzados ya se distinguía la presencia de yemas. En este sentido, diremos que este aumento de tamaño de las carposporas está sustentado por una inducción temprana de la división de las células internas a las 2 horas de cultivo en presencia del glicerol (Foto 3), hecho que no fue visto en los medios control.

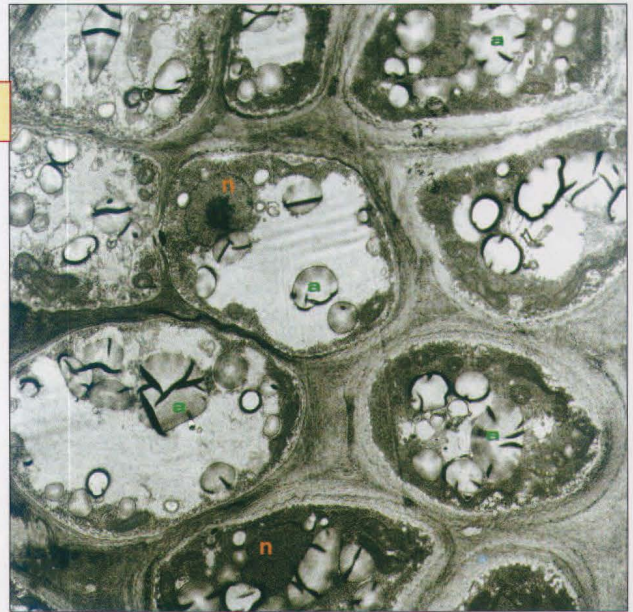
El mayor número de yemas se formó pasados los 3 días de cultivo en glicerol, prolongándose hasta los 12 días. Simultáneamente, con la formación de yemas se obtiene la disminución de los granos de almidón y la acumulación de lípidos.

La disminución de los granos de almidón (Foto 4), muy probablemente, está relacionada con la emisión de las yemas, siendo extremadamente notable en los últimos estadios del desarrollo.

Los lípidos si bien se encuentran en todas las células (internas/externas) desde el inicio del seguimiento (Foto 5, 6), a medida que tiene lugar el crecimiento se sitúan únicamente en las células internas, ocupando toda la superficie celular (Foto 7). Este hecho además coincide, a nivel macroscópico, con la depigmentación total del material de cultivo entre los 9-12 días y, a nivel microscópico, con la oclusión de las células

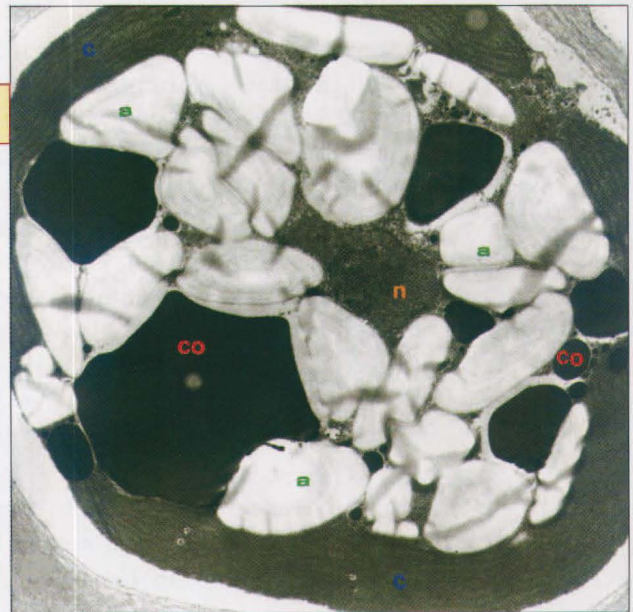
**FOTO 4.**

*Sección de las capas interna-intermedia del material cultivado durante 6 días en medios conteniendo glicerol. Nótese la escasa presencia de los granos de almidón (a). x13000.*



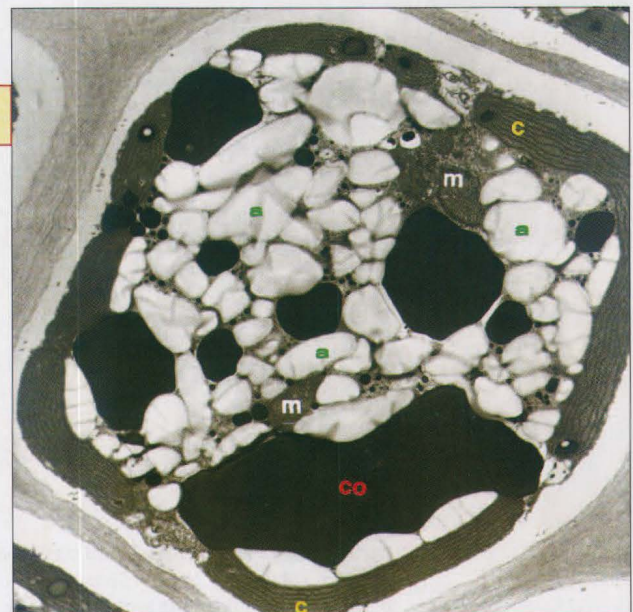
**FOTO 5.**

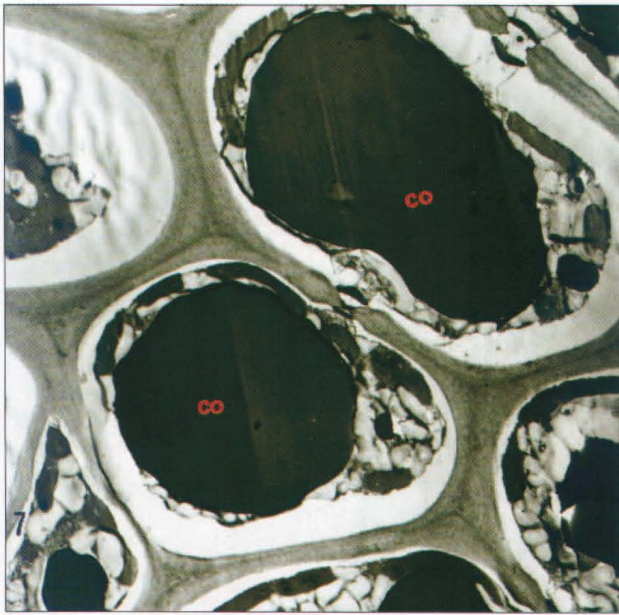
*Célula interna de material cultivado 1 día en presencia del glicerol. Nótese la escasa presencia de los granos de almidón (a), lípidos (cuerpos osmofílicos, co), núcleo y cloroplastos (c). x120000.*



**FOTO 6.**

*Célula externa de material cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 1 día. Nótese la presencia de almidón (a), lípidos (cuerpos osmofílicos, co), mitocondrias (m) y cloroplastos(c). x17000.*





**FOTO 7.**

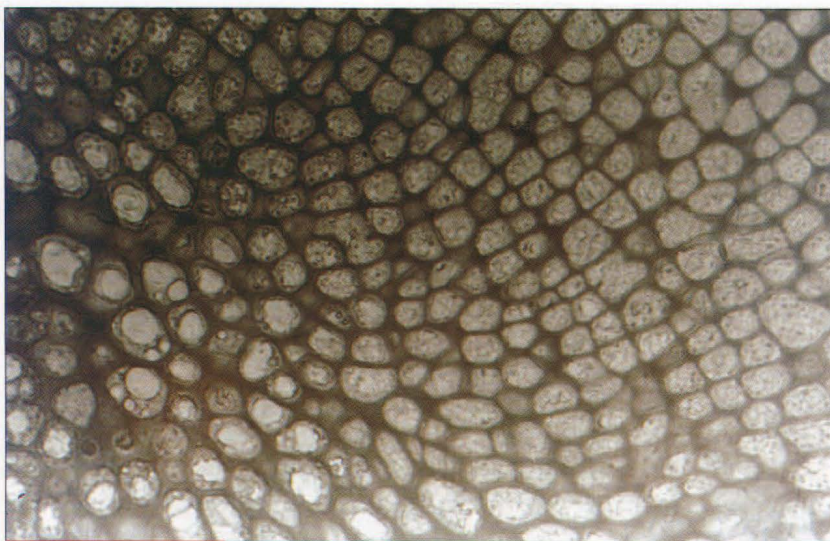
*Células internas del material cultivado durante 9 días en presencia del glicerol. De importancia es la enorme superficie celular que ocupa los cuerpos osmofílicos (co). x8000.*

internas por las nuevas capas celulares que se están generando, al mismo tiempo que se acentúan las diferencias entre los distintos tipos celulares.

En medios control, la formación de yemas ocurre entre los 2-3 meses por lo que estos cambios se producen paulatinamente y son más difíciles de determinar.

La disposición celular en la yema en medios con glicerol se caracterizó por células dis-

puestas concéntricamente y muy compactadas (Foto 8), con un alto grado de división en un sólo plano. En los medios sin fuente de carbono fue normal observar una capa cortical o externa y una medular o interna constituida por células elongadas, las cuales se originaron a partir de sucesivas elongaciones y bifurcaciones de las células internas de la carpospora (García-Jiménez, 1994). Estas yemas tienen una estructuración celular similar a la que presentan los talos en la naturaleza.



**FOTO 8.**

*Corte longitudinal de material cultivado en PES 70 + 0.3 M glicerol durante 6 días. Nótese la tendencia de las células a estar altamente compactadas. x150.*

Estas observaciones nos permiten afirmar que en medios con glicerol no existen yemas en sentido estricto.

Paralelamente al crecimiento y la emisión de yemas se observa que, a nivel ultraestructural, se sucede el engrosamiento de la pared celular (Foto 9). En este sentido, el número de dictiosomas o de aparatos de Golgi incrementan a medida que transcurre el tiempo de cultivo en glicerol (Foto 10).

## COMENTARIOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

\* El establecimiento de una línea de cultivo in vitro controlada nos permite propagar las carposporas y tetrasporas axénicas a medios líquidos con sistema de aireación donde se mantendrán los talos tetrasporofíticos y gametofíticos. Estos talos tienen la particularidad de ser un material mantenido durante largos periodos de tiempo en condiciones controladas en nuestro laboratorio y, por tanto, del que se conoce la fase del ciclo, edad, etc. Las algas, así mantenidas, servirán para estudiar cuáles son los requerimientos necesarios para inducir el desarrollo de las tetrasporas, el número de talos gametofitos femeninos, la fecundación y la obtención de los talos carposporofíticos.

Esta línea de investigación ha tenido su continuación con la publicación de diversos trabajos en revistas internacionales (Rodrigo y Robaina, 1996), así como en la realización de una Tesis Doctoral (Rodrigo M.,

fecha sin determinar) en la que se abordan los cambios fisiológicos y morfológicos que tienen lugar durante la formación de tetrasporas.

\* El estudio de las caposporas, a nivel ultraestructural, indica la disminución del tamaño de los granos de almidón la cual ha sido descrita previamente en callos de tabaco (Brown et al., 1979). En este caso, los autores estimaban que el papel del almidón podría ser tanto de "suministrador" de esqueletos de carbono y energía, como de regulador osmótico durante la formación de yemas.

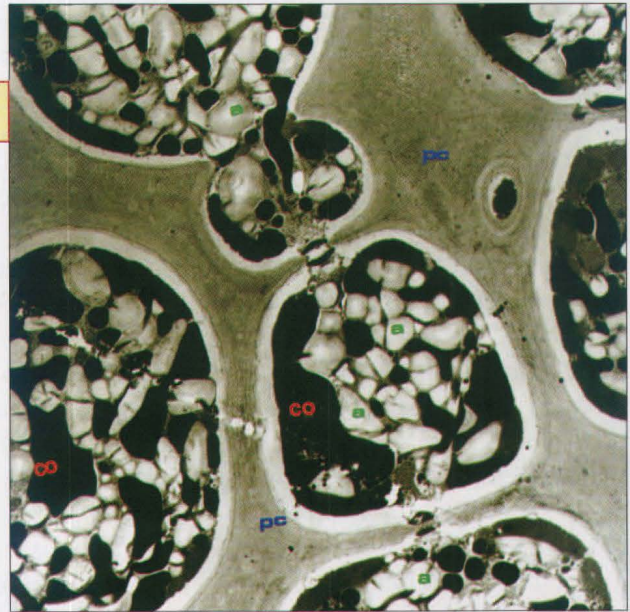
En *G. doryphora*, este almidón funcionaría como regulador osmótico debido a que la presencia del glicerol como fuente de carbono ya suministraría todo el carbono y energía necesaria para el crecimiento (García-Jiménez, 1994; García-Jiménez et al., 1996).

También, como hemos dicho anteriormente, el material a los 9-12 días se depigmenta completamente. La depigmentación del material afecta primeramente a las células más externas contrariamente a lo que cabría esperar si se establece un gradiente de nutrientes <sup>(2)</sup>. Simultáneamente, el recultivo del material completamente decolorado a nuevos medios implica la repigmentación de las células de la zona interna.

Experimentos paralelos nos han indicado que estas mismas células, en condiciones experimentales adversas, son capaces de regenerar nuevas capas celulares. Este hecho, junto con la presencia de enormes gotas lipídicas en toda la superficie de las células internas en estos

**FOTO 9.**

*Células de la capa interna de un material de 6 horas en PES 70 + 0.3 M glicerol. Compárese el grado de asociación entre los cuerpos osmofílicos (co), así como el grosor de la pared celular (pc). x5000.*



últimos estadios, podría indicarnos la existencia de un determinado tipo celular capaz de iniciar (son las que se dividen en las dos primeras horas) y mantener el crecimiento.

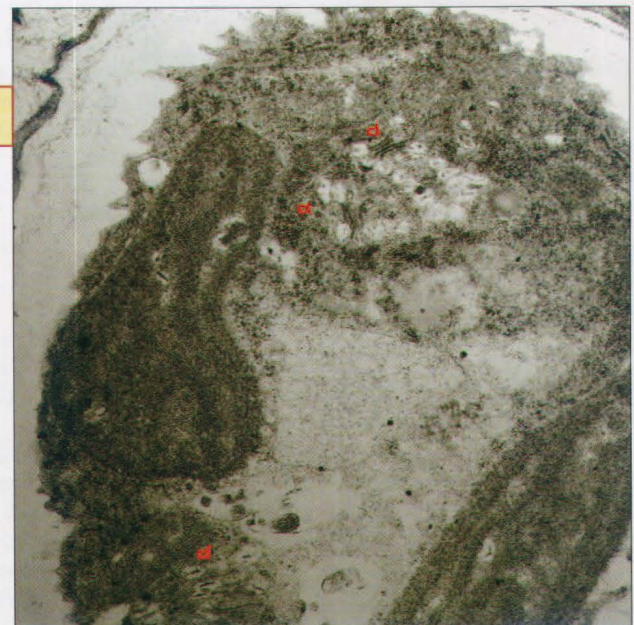
Estos hechos además son reflejo, por un lado, de la acumulación del carbono celular y de la disminución del contenido de nitrógeno (equivale a la depigmentación total del material), y, por otro, de la existencia de un tipo celular biosintético (en este estado, las células del

interior están completamente ocluidas por otras capas celulares y muy probablemente su capacidad fotosintética está reducida).

Cuando el recultivo se hace a medios que no contienen la fuente de carbono, hemos observado, que tiene lugar el patrón normal de desarrollo. Esto significa que estas células están siempre disponibles, por lo que, su aislamiento puede significar el mantenimiento de un cultivo de células libres sobre

**FOTO 10.**

*Parte de una célula interna procedente de material cultivado durante 3 días en medios conteniendo glicerol. Nótese la presencia de numerosos dictiosomas (d). x25000.*



el cual se pueda ejercer cierto control, enfocando el metabolismo hacia la acumulación de carbohidratos o hacia el desarrollo normal de los talos.

En cuanto al engrosamiento de la pared celular, existen referencias que indican que a lo largo de diferentes fases del ciclo de determinadas algas se produce la predominancia de un componente de la pared celular (Mukai et al., 1981; Gretz et al., 1980). En *G. doryphora*, éste puede ser debido a la acumulación de productos deriva-

dos del metabolismo del glicerol. Sin embargo, este detalle debe ser objeto de un estudio detenido para determinar qué componentes polisacáridos son susceptibles de acumularse.

La relación del aparato de Golgi con la síntesis de estos polisacáridos y con la formación de la pared celular también está ampliamente documentada (Ramus, 1972; Konrad-Hawkins, 1974; Tsekos 1985, Liu et al., 1992). Esto es perfectamente correlacionable con la enorme cantidad de dictiosomas que hemos encontrado en

medios conteniendo glicerol en comparación con los pocos presentes en medios normales.

Por tanto, el sistema de cultivo in vitro desarrollado para *G. doryphora* es un buen punto de partida para trabajos sobre la producción de polisacáridos, su biosíntesis y los modos de deposición, al mismo tiempo que el cultivo 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.

## NOTAS

1. El mismo forma parte de la Tesis Doctoral desarrollada en el Departamento de Biología de la U.L.P.G.C., bajo la dirección de los Dres. D. Angel Luque Escalona y D. Ra-

fael Robaina Romero.

2. Se entiende que la depigmentación del material está estrechamente relacionada con la disminución de los niveles de

nutrientes, principalmente nitrógeno, y que ésta deberá ser más acentuada en las células del interior, puesto que no existiría una correcta difusión de los mismos.

## GLOSARIO

**Cultivos axénicos:** según la terminología aceptada por la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (Boletín 8, 1988) y la Tissue Culture Association (volumen 17, 1983) la definición de cultivo axénico es aquel carente de hongos, bacterias, virus, micoplasmas y otros microorganismos.

**Medios de cultivos agarizados:** son medios que, teniendo como base el agua de mar y la adición de algunos nutrientes y vitaminas, se les ha solidificado con agar.

**Carpospora:** es una única célula

capaz de germinar y dar lugar a nuevos individuos, denominados talos tetrasporofíticos.

**Tetrasporofito:** Talo productor de tetrasporas, normalmente diploide.

**Tetraspora:** 4 células producidas por meiosis en el tetrasporofito de las algas rojas.

**Gametofito:** Talo originado a partir de la germinación y desarrollo de la tetraspora. Son haploides y la fusión del gametofito femenino y masculino dará lugar al talo que

sustenta las carposporas.

**Almidón:** Polisacárido de reserva compuesto de uniones glucosídicas á 1-4, 1-6, y 1-3 que se encuentra en las algas rojas.

**Células biosintéticas:** son células que tienen reducida o anulada su capacidad fotosintética y subsisten a partir de los productos de reserva acumulados.

**Aparato de Golgi:** Orgánulo de recepción y/o síntesis de sustancias que son preparadas para su expulsión.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Brown D.C.W., Leung D.W.M., Thorpe T.A.** (1979): "Osmotic requeriments for shoot formation in tobacco callus". *Physiologia Plantarum*, 46: 36-41.
- **Fenical W.** (1982): "Natural products chemistry in the marine environment". *Science*, 215: 923-927.
- **García Jiménez P.** (1994): Aclimatación reproductiva, fisiológica y estructural al cultivo in vitro del alga *Grateloupia doryphora*. Tesis Doctoral, U.L.P.G.C.
- **García Jiménez P., Robaina R.R., Luque A., Tsekos A.** (1996): "Glycerol-activated cellular division and biosynthetic activity during growth and morphogenesis of carpospore-seedlings of *Grateloupia doryphora* (Cryptonemiales, Rhodophyta)". *Phycologia*, 35 (3): 261-269.
- **Gretz M.R., Aronson J.M., Sommerfeld M.R.** (1980): "Cellulose in the cell walls of the Bangiophyceae (Rhodophyta)". *Science*, 207: 779-781.
- **Konrad Hawkins E.** (1974): "Golgi vesicles of uncommon morphology and wall formation in the red alga *Polysiphonia*". *Protoplasma*, 80: 1-14.
- **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.
- **Macler B.A.** (1986): "Regulation of carbon flow by nitrogen and light in the red alga *Gelidium coulteri*". *Plant Physiol*, 82: 136-140.
- **McLachlan J.** (1985): "Growth media marine", en Stein J.R. (ed), *Phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 25-52.
- **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.
- **Ramus J.** (1972): "The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aeruginosum*". *J. Phycol*, 8: 97-111.
- **Robaina R.R., García P., García Reina G., Luque A.** (1990): "Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*". *J. Applied Phycol*, 2: 137-42.
- **Robaina R.R.** (1988): Biotecnología del cultivo "in vitro" de algas rojas (*Rhodophyta*) de interés industrial. Tesis. U.P.C.
- **Rodrigo M., Robaina R.R.** (1996): "Stress tolerance of sporelings of *Grateloupia doryphora* as compared to further grown developmental stages". *Mar. Biol.* (en prensa).
- **Tsekos I.** (1985): "The endomembrane system of differentiating carposporangia in the red alga *Chondria tenuissima*: occurrence and participation in secretion of polisaccharidic and proteinaceous substances". *Protoplasma*, 129: 127-136.

## BIOGRAFÍA

### Pilar García Jiménez

Licenciada en 1988 por la Facultad de Ciencias del Mar de la ULPCG. Se doctoró en Ciencias del Mar en 1994, y actualmente trabaja como técnico especialista en microscopía en la ULPGC. Es autora y coautora de numerosas publicaciones en revistas especializadas, ha asistido a congresos nacionales e internacionales y ha

disfrutado de una estancia en el extranjero, en 1993, en el Instituto de Botánica de la Universidad de Tesalónica, en Grecia.

Dirección:

Facultad de Ciencias del Mar  
Despacho 113-B  
Tlf. 45.44.68

Este trabajo ha sido patrocinado por:

**RAMCHAND BULCHAND**