



Manual de cultivo de *Ahnfeltia plicata*

(Hudson) Fries en base a fitohormonas (reguladores de crecimiento)



Proyecto
FONDEF D081163
Fondo de Fomento al
Desarrollo Científico y Tecnológico



Serie Programa educativo para el desarrollo de la acuicultura de especies nativas:

Ahnfeltia plicata

INDICE

1. Introducción	7
2. Biología, distribución, e importancia comercial	6
2.1 Identificación de la especie/ especies similares	6
2.2 Ecología de la especie en la Región de Magallanes y Antártica chilena	8
2.3 Importancia comercial de la especie	11
2.4 Cadena productiva de <i>Ahnfeltia</i>	13
3. Laboratorio: Requerimientos y condiciones para el cultivo	13
3.1 Equipamiento e instrumental	13
3.2 Tratamiento de agua de mar	15
3.3 Esterilización de material de cultivo	15
3.4 Medios de cultivo y nutrientes a utilizar	15
3.5 Control de factores abióticos	17

4. Preparación de material biológico para aplicación de hormonas	18
4.1 Colecta de material biológico	18
4.2 Procedimiento de preparación de explantes para micropropagación	19
4.2.1 Experimento con sustancias reguladoras de crecimiento en medio líquido	19
4.2.2 Experimento con sustancias reguladoras de crecimiento en medio sólido	20
4.3 Medición de parámetros en cultivo	21
5. Diferenciación celular producida por hormonas en <i>Ahnfeltia plicata</i>	22
5.1 Crecimiento apical e intercalar	22
5.2 Ramificaciones laterales y basales	24
5.3 Formación de estructuras tipo callo	24
6. Bioseguridad en cultivos con aplicación de hormonas	25
7. Glosario	26
8. Referencias	29



Manual de cultivo de



Ahnfeltia plicata



1

INTRODUCCIÓN

Ahnfeltia plicata (Hudson) Fries, 1836, es una agarófita de importancia comercial en el mundo, principalmente ocurre en las costas de Rusia, Canadá, Alaska y China y ha sido explotada como una fuente de agar de alta calidad y bajo contenido de sulfato (Maggs & Pueschel, 1989; Maggs *et al.*, 1989). Esta especie se encuentra en las costas de Chile, particularmente en la Región de Magallanes. Forma praderas submareales sobre sustrato rocoso en sectores expuestos, de las cuales no existen antecedentes biológicos ni ecológicos. En forma similar a las poblaciones de Rusia, parece presentar un ciclo de vida heteromórfico. En los años 80 fue explotada y actualmente existe interés comercial sobre este recurso. El proyecto FONDEF “Cultivo y biotecnología de *Ahnfeltia plicata* nueva alternativa en la producción de ficocoloides para la Región de Magallanes” estudia por primera vez en Chile, las praderas existentes en la Región de Magallanes y entrega las bases para el cultivo de la especie. Este manual es parte de los resultados del proyecto antes mencionado y su objetivo es entregar las bases para la aplicación de reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de explantes de *A. plicata* para su micropropagación.

El desarrollo de técnicas de micropropagación para el cultivo de órganos aislados vegetales, tejidos y células genera múltiples oportunidades en el área de la biotecnología y se ha masificado la utilización de cultivo celular para manipulación genética *in vitro*, propagación de plantas y producción de productos útiles comercialmente (Reddy *et al.*, 2008). Desde hace algún tiempo, la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado para propagar distintos genotipos de algas de interés económico (Yokoya & Handro, 1997).

El crecimiento vegetal es un proceso orientado, donde la polaridad de las células y el talo está establecida desde el comienzo y se mantiene durante el desarrollo del organismo. La dominancia apical y la influencia del meristema apical en el control del desarrollo de raíces es un proceso conocido en plantas vasculares, donde reguladores de crecimiento vegetal, especialmente auxinas producidas en el ápice son las responsables. Presumiblemente, la polaridad apical-basal y la dominancia apical en algas son también controlados por reguladores de crecimiento vegetal (Lobban & Harrison, 1994). Los términos usados para tales reguladores de crecimiento han generado mucho debate. La palabra hormona fue originalmente propuesta para sustancias morfogenéticas animales, decir, que estas sustancias son producidas en sitios específicos (glándulas) y tienen funciones específicas. Sin embargo, las sustancias de crecimiento en vegetales se producen en tejidos no específicos y trabajan de manera integrada en muchos aspectos de la morfogénesis.

El metabolismo y papel de los reguladores de crecimiento (plant growth regulators, PGR) en el desarrollo de plantas vasculares fueron ampliamente estudiados, sin embargo no hay conocimiento de estos compuestos en algas. Los PGR encontrados en plantas vasculares (como auxinas, citoquininas y Acido abscísico) han sido también detectados en algas (Stirk *et al.*, 2003; Yokoya *et al.*, 2010) sugiriendo que estos compuestos pueden actuar de forma similar en el crecimiento y desarrollo de macroalgas marinas.

El avance en el conocimiento tanto sobre la regulación hormonal como de la importancia de los diferentes factores sobre los procesos fisiológicos en algas rojas, han jugado un papel fundamental para obtener éxito en la propagación *in vitro* de muchas especies (Yokoya & Handro, 1997). La importancia de reguladores de crecimiento en plantas (PGR) sobre procesos fisiológicos y la necesidad de probar diferentes concentraciones de PGR han sido muy importantes para determinar el control de éstos sobre el crecimiento y regeneración en algas (Yokoya & Handro, 1996). El presente manual entrega todos los elementos técnicos y científicos para la aplicación de reguladores de crecimiento a cultivos de la especie *Ahnfeltia plicata*, la cual representa una nueva alternativa para la producción de agarosa en la Región de Magallanes.

2

BIOLOGÍA, DISTRIBUCIÓN, E IMPORTANCIA COMERCIAL

2.1 Identificación de la especie/ especies similares

Ahnfeltia es el único género del orden Ahnfeltiales y está representado por 32 especies. Se caracteriza por la presencia de carpogonios con filamentos terminales en la zona cortical con nematecios de aspecto engrosado, los cuales durante la fertilización se fusionan con células corticales (Fig. 1). No hay células auxiliares diferenciadas. Los filamentos del gonimoblasto se forman directamente sobre el carpogonio y radian para terminar en carposporangios. Las paredes celulares contienen agarocoloides. Los gametofitos crecen como talos erectos directamente de un disco basal. Frondas multiaxiales con células vegetativas que presentan pit connections secundarios. Los espermatangios son solitarios y nacen de células madres superficiales, en algunos casos las células corticales modificadas pueden formar monosporangios, donde las monosporas pueden reciclar la generación de gametofito masculino. En la reproducción sexual se forman varios embriones adyacentes no rodeados por un pericarpo, tetrasporofito crustoso, sin pit connections secundarias, tetrasporangios zonados ocurren en soros apicales (Rosenvinge, 1931; Maggs & Poeschel, 1989)).



Fig. 1. A) Nematocios de aspecto engrosado presentes en talos de *A. plicata*; B) Detalle de nematocios.

Los talos pueden alcanzar hasta 35 cm de longitud. La especie tipo del genero es *Ahnfeltia plicata* Fries, 1836 y tiene distribución circumpolar en ambos hemisferios. En el hemisferio norte se ha reportado en Groenlandia, Islandia, norte de Noruega y Estrecho de Bering, Alaska y Siberia, Oeste de Manchuria y China. En el hemisferio sur se ha reportado en islas subantárticas, sur de América del Sur (Guiry & Guiry, 2012).

Especie: *Ahnfeltia plicata* (Hudson) Fries, 1836

Gametofitos cilíndricos delgados hasta 1 mm de diámetro, de color oscuro a amarillento (Fig. 2A y B), ramificación sub dicotómica irregular, de hasta 35 cm de longitud con un disco basal delgado, pequeño y elíptico. Ápices se pueden presentar decolorados de apariencia amarillenta. Tetrasporofito crustoso tipo *Porphyrodiscus* de color violáceo oscuro, ocurre en sectores cercanos y asociados a gametofitos.

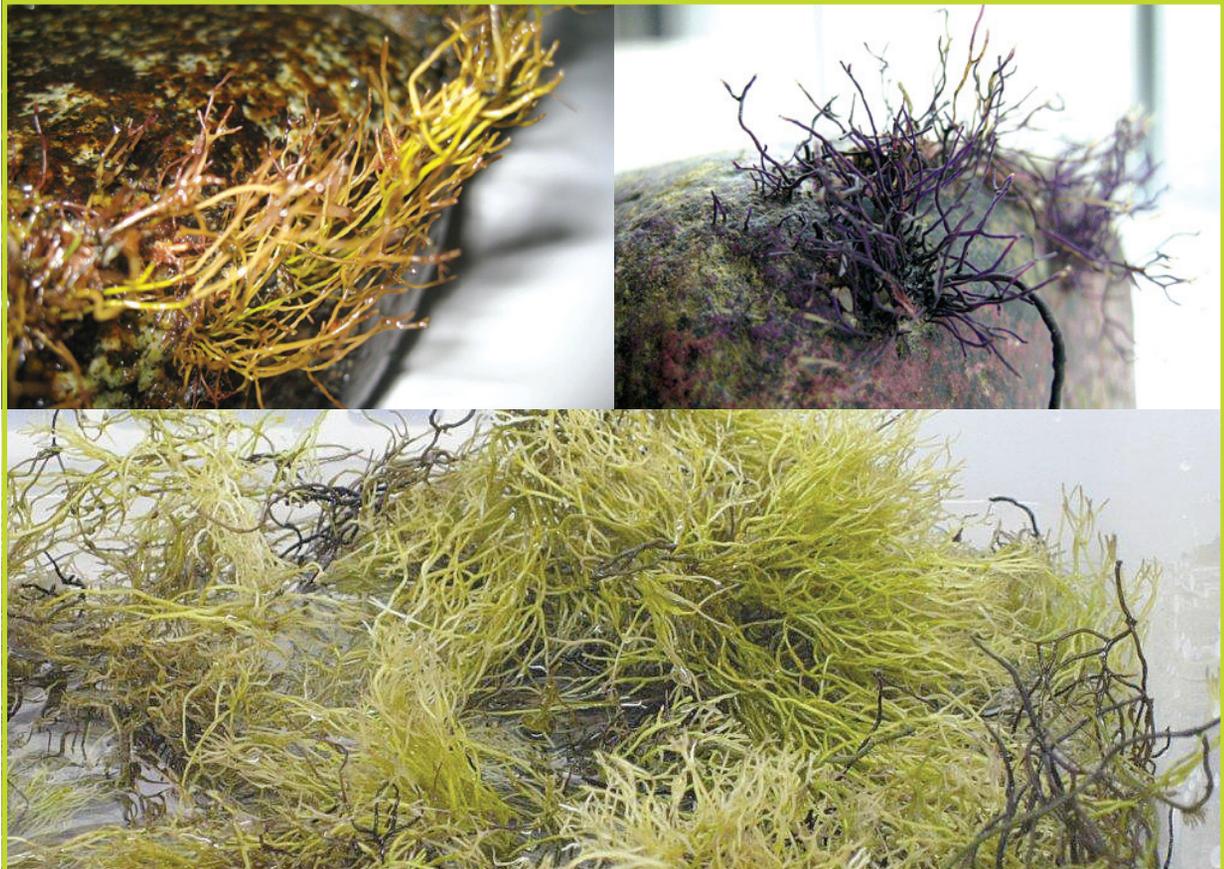


Fig. 2 Gametofitos foliosos creciendo sobre bolones, obsérvese los diferentes colores de los talos.

2.2 Ecología de la especie en la Región de Magallanes y Antártica chilena

A plicata es una especie de alga roja marina, que vive en el intermareal y submareal hasta los 10 m de profundidad. En la Región de Magallanes, Seno Skyring, forma densas praderas submareales y crece sobre sustrato rocoso (bolones) (Fig. 3). Por su morfología en la base de los talos atrapa sedimento, el cual tiene aspecto anóxico. Según Kilian *et al.* (2007), en general, en Seno Skyring se presentan temperaturas del agua entre los 3°C (invierno) y 10.5°C (verano) y salinidades alrededor de 18 eps (escala practica de salinidad, Salamanca & Schneider, 2004).



Fig. 3. A) Sector Isla Riesco; B) Roqueríos donde se encuentran las praderas de *A plicata*; C) *Ahnfeltia* en el submareal; D) *A. plicata* en el intermareal

La mayor biomasa de esta especie observada durante la estación de otoño del 2011, principalmente corresponde a biomasa infértil ($4.126,2 \pm 361 \text{ g/m}^2$). Por otra parte, la mayor biomasa gametofítica y carpoesporofítica fértil se observó durante la estación de primavera y de verano de 2010.

La fauna asociada a las praderas observadas corresponde principalmente a poliquetos, nemertinos, crustáceos, bivalvos y abundante cantidad de anfípodos. En la zona basal de los talos y próximo a los discos de fijación se atrapa gran cantidad de sedimentos lo que hace que los talos crezcan en un ambiente relativamente anóxico y con olor a sulfuros (Fig. 4).

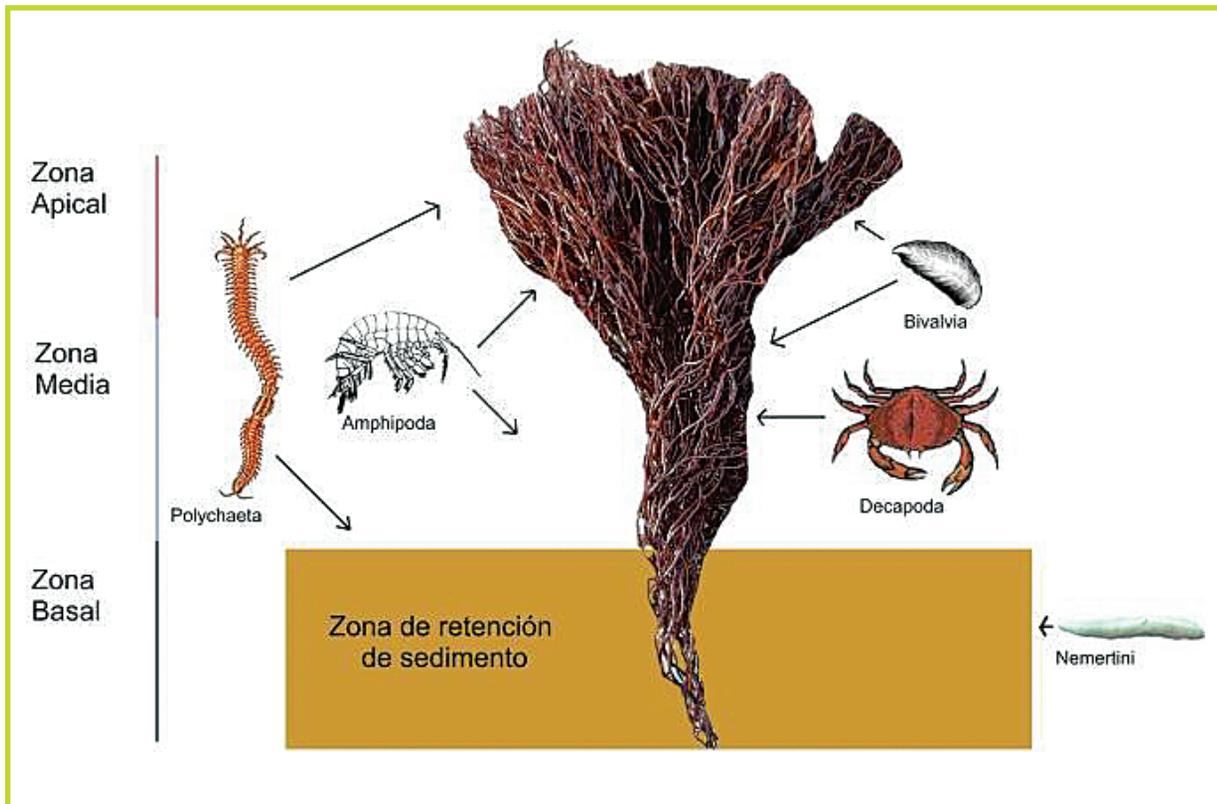


Fig. 4. Fauna asociada a *A. plicata*.

La flora asociada a praderas de *A. plicata* son especies de algas rojas y pardas, entre ellas se destacan: *Heterosiphonia*, *Caepidium antarcticum*, *Polysiphonia sp.*, *Ceramium sp.*, *Adenocystis utricularis*, *Ballia calitricha* y *Desmarestia willie*.

En las praderas estudiadas, los talos de mayor longitud se presentan durante la estación de verano del 2011, con un tamaño promedio sobre 16 cm, mientras que en otoño se observaron longitudes menores con un tamaño bajo los 13 cm. En verano las plantas fértiles son de mayor tamaño que las plantas infértiles, con longitudes promedio $17 \pm 0,6$ cm. Excepcionalmente pueden ser colectados ejemplares de hasta 35 cm de largo.

De acuerdo a lo señalado en la literatura de ejemplares del Hemisferio norte, esta especie presenta un ciclo de vida trifásico heteromórfico (Farnham & Fletcher, 1973; Farnham & Fletcher, 1976; Chen, 1977) con alternancia de fase gametofítica y carposporofítica foliosa y tetrasporofítica crustosa (Fig. 5).

confiere a la agarosa la capacidad de formar geles muy fuertes incluso a bajas concentraciones. Estos geles de agarosa tienen una estructura macroreticular con una malla muy abierta que se puede modificar simplemente variando la concentración de agarosa.

La estructura macroreticular de los geles de agarosa se forma por uniones de puentes de hidrógeno que hacen que el gel sea termo-reversible, y por lo tanto que se funda cuando es sometido a calentamiento. La histéresis (diferencia entre la temperatura gelificación y de fusión) es mayor que en otros hidrocoloides, lo cual es una gran ventaja en muchas aplicaciones. Adicionalmente, la ausencia de grupos iónicos hace que el gel sea una estructura neutra e inerte, por lo que se evita la interacción de las moléculas con la estructura del gel.

Todas las aplicaciones que utilizan agarosa se benefician de esta característica de gel macroreticular. Se emplea como un tamiz o soporte por el que pasan moléculas biológicas como proteínas o Ácidos nucleicos. Partículas más grandes como virus o fragmentos sub celulares también pueden moverse a través de la red del gel.

Algunas de las áreas en que la agarosa es una herramienta imprescindible son:

- Inmunodifusión: en esta técnica las moléculas migran a través del gel por difusión y se precipitan.
- Electroforesis: las moléculas son conducidas por campos eléctricos a través de la estructura del gel. La agarosa es una herramienta adecuada para todas las variantes de técnicas electroforéticas, así como inmunolectroforesis y electroenfoque.
- Cromatografía de gel, de afinidad y de cambio iónico: en estas aplicaciones el movimiento de las moléculas es debido al desplazamiento de un diluyente a través del gel formado por microesferas.
- Medios de cultivo sólidos: los medios de cultivo sólidos o semi-sólidos se usan para el crecimiento de tejidos y células. Los medios preparados con agarosa (en vez de agar) pueden ser empleados para crecimiento bacterias autótrofas estrictas.
- Crecimiento de cristales de proteína: el gel de agarosa regula la difusión de las moléculas de proteína permitiendo así la formación de cristales idóneos para el estudio cristalográfico.

2.4 Cadena productiva de Ahnfeltia



Fig. 6. Cadena productiva teórica de *A. plicata*

Las algas que son cosechadas desde praderas naturales o centros de cultivo, son trasladadas y secadas en condiciones naturales o en secadores con bandejas y luego procesadas en una empresa procesadora de algas para la obtención de agarosa (Fig. 6).

3

LABORATORIO: REQUERIMIENTOS Y CONDICIONES PARA EL CULTIVO

3.1 Equipamiento e instrumental

Para realizar experiencias de efecto de reguladores de crecimiento en algas, se requiere contar con un laboratorio equipado con los siguientes instrumentos:

- **Cámara de flujo laminar:** todo el trabajo de montaje de los cultivos debe ser realizado bajo la cámara de flujo laminar con el fin de evitar o disminuir la contaminación de los medios de cultivo utilizados y de los cultivos.
- **Cámaras de incubación:** con condiciones controladas de fotoperíodo, temperatura e intensidad de luz para mantener los cultivos en laboratorio.

- **Lupa estereoscópica:** durante los controles es necesario observar los talos o explantes con el mayor detalle posible utilizando la lupa estereoscópica para realizar la limpieza y registrar posibles necrosamientos de estos tejidos. Además, en esta actividad se permite realizar el registro fotográfico para posteriormente realizar mediciones de los explantes. Para las mediciones se utiliza el programa Imagen, software que permite obtener los valores de talla. Es importante tomar las fotografías con papel milimetrado o alguna referencia para poder medir los talos.
- **Refrigerador:** para mantener los medios de cultivo y soluciones de reactivos. El Ácido Indol acético (AIA) marca Sigma debe ser almacenado a una temperatura de -20°C (de acuerdo a lo indicado por el proveedor). La fitohormona 6- Bencilaminopurina (BAP) marca Sigma debe ser almacenada a temperatura ambiente.
- **Micropipetas:** las cantidades de reactivos y medios de cultivo deben ser medidas con la mayor precisión, por lo que el uso de micropipetas adecuadas para los diferentes volúmenes a adicionar es fundamental.
- **Autoclave:** el material de cultivo que se utiliza para realizar este tipo de ensayos en laboratorio requiere necesariamente estar esterilizado, por otra parte las soluciones de reactivos y de los regulares de crecimiento también deben ser autoclavadas. Se recomienda autoclavar el material a 121°C por 15 minutos.
- **Balanza analítica:** se utiliza para pesar todos los reactivos utilizados en la preparación de medios de cultivo y soluciones de reguladores de crecimiento, además de la biomasa de los explantes, deben ser cuidadosamente registrada si se evalúan los cambios en biomasa.
- **Sonicador:** se utiliza en el tratamiento de pre-limpieza de los talos. Para ello los talos se sumergen en vasos de precipitado con agua de mar esterilizada y son sonicados por 3 veces durante 30 segundos para eliminar epifitos o restos de sedimento adosados a los talos que serán usados en el cultivo.
- **Mechero:** se utiliza dentro de la cámara de flujo laminar para flamear las pinzas que se utilizan para tomar los explantes.
- **pH-metro:** se utiliza para medir el pH de medios de cultivo y de soluciones stock.
- **Salinómetro:** se utiliza para medir la salinidad del agua de mar y de los medios de cultivo.
- **Radiómetro o luxómetro:** se usa para medir la irradiancia (densidad de flujo fotónico) incidente sobre los cultivos.
- **Bomba de vacío:** se utiliza para realizar filtraciones de agua de mar y medios de cultivo.

3.2 Tratamiento de agua de mar

El agua de mar que se utiliza para preparar los medios enriquecidos con fitohormonas, debe ser filtrada (filtro de 0,22 μm) y esterilizada con UV al momento de ser recolectada. Posteriormente, se preparan los medios de cultivo con fitohormonas en botellas de vidrio tipo “shott”, las cuales deben someterse a un nuevo proceso de esterilización, autoclavándolas a 121°C por 15 minutos.

3.3 Esterilización de material de cultivo

Con el fin de evitar contaminación de los explantes, todo el material utilizado (botellas, placas petri de vidrio, probetas graduadas, puntas de micropipeta, frascos, entre otros) deben ser cuidadosamente esterilizados, autoclavándolos a 121°C por 15 minutos. Para evitar contaminación del material ya autoclavado, el trabajo debe ser realizado, como se indicó anteriormente, bajo campana de flujo laminar. Es conveniente, esterilizar en forma previa la cámara, dejándola 10 – 15 minutos con UV antes de comenzar el trabajo con los explantes.

3.4 Medios de cultivo y nutrientes a utilizar

Como medio de cultivo se puede usar Provasoli (McLachlan, 1973) y von Stosch (Edwards, 1970) ambos consisten en agua de mar filtrada y esterilizada enriquecida con nutrientes de la solución stock a una concentración que depende del tipo de tejido que se esté cultivando y de la especie. En base a este medio de cultivo se prepararon los medios enriquecidos con sustancias reguladoras de crecimiento, a concentraciones que serán definidas de acuerdo a la especie que se está estudiando. En el caso de *A. plicata*, se utilizó un rango de concentraciones de 0,1-1-5-10 mg/L, o 5 e 50 μM (que corresponde a aproximadamente 1 y 10 mg/L).

Se entiende por hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo ó metabolismo del vegetal. El término “sustancias reguladoras del crecimiento” es más general y abarca tanto las sustancias de origen natural como aquellas sintetizadas en el laboratorio que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta. Las auxinas son las primeras sustancias reguladoras de crecimiento descritas. Su estructura es un derivado del fenol o el indol y tienen anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados.

Las auxinas actúan sobre los procesos de división, expansión y diferenciación celular, controlando el metabolismo de los ácidos nucleídos y las alteraciones rápidas y específicas de la expresión génica, incluyendo ARN mensajero y ARN ribosómico (Hagen, 1995).

Sus efectos están relacionados principalmente con:

- I) Crecimiento: estimulan la elongación celular en tallos, incrementan la extensibilidad de la pared celular.
- II) Dominancia apical: la yema apical del tallo (produce la mayoría de auxinas) inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.
- III) Rizogénesis: estimulan la formación de raíces laterales o adventicias. Inhiben la elongación de la raíz principal.

Existen varias auxinas presentes en el tejido vegetal, siendo el Ácido Indolacético (AIA) la más relevante. Por otra parte, se fabrican auxinas de origen sintético como el Ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) que cumplen la misma función que aquellas de origen natural.

Las citoquininas constituyen un grupo de fitohormonas que en conjunto con las auxinas promueven la división y la diferenciación celular, proceso que se encarga de dar origen a la formación de cada uno de los órganos de cualquier vegetal. Pueden inducir la apertura de yemas laterales de ramificaciones. Las citoquininas actúan en los procesos de crecimiento y morfogénesis vegetal, controlando la división celular, síntesis de ARN y de proteínas (Evans, 1984)

Los efectos de las citoquininas están relacionados principalmente con:

- I) Crecimiento: en conjunto con las auxinas estimulan la proliferación de células meristemáticas.
- II) Dominancia apical: estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo que deben estar en equilibrio).
- III) Diferenciación y morfogénesis: provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento. Junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- IV) Senescencia: son anti-senescentes.

En este estudio se utilizaron las citoquininas 6- bencilaminopurina (BAP) y isopenteniladenina (iP) y las auxinas Ácido Indolacético (AIA) y Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

3.5 Control de factores abióticos

Entre los factores abióticos más relevante para el desarrollo de estudios con reguladores está la temperatura la cual se debe mantener bajo control permanente (termómetro) durante una experiencia, ya que cualquier modificación puede provocar variaciones en los resultados de la experiencia. Otro factor relevante es la iluminación ($\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la cual debe ser controlada mediante un radiómetro o luxómetro, utilizando preferentemente fuentes de luz fría y realizando renovación de los tubos cuando estos presenten variaciones de intensidad lumínica.

Junto a la iluminación la definición de un fotoperiodo adecuado es importante, este se debe ajustar mediante un timer que asegure un régimen de horas luz y horas oscuridad. La salinidad es otro factor determinante en este estudio, ya que se debe medir con un salinómetro para evitar que los recambios de medio de cultivo se efectúen con aguas de diferente salinidad, ya que podría alterar los resultados de una experiencia de laboratorio. Durante los experimentos de reguladores de crecimiento se utilizó agua de mar con salinidad constante de 33 eps.

Para el montaje de un experimento se debe considerar utilizar el número de réplicas necesarias que permitan posteriormente la aplicación de test estadísticos para comparar los resultados de los diferentes tratamientos (Zar, 1999).

Se llevaron a cabo experimentos de temperatura y salinidad con gametofitos fértiles de *A. plicata* de color rojo, que fueron colectados en Seno Skyring (52°38'59,7"S 71°29'44"W), Región de Magallanes en octubre del 2010. Segmentos apicales (200 mm de largo) fueron cultivados en medio de cultivo von Stosch (VSES) y Provasoli (PES) con distintas concentraciones, el primero preparado de acuerdo a Edwards (1970) y modificado según Yokoya (2000).

A. plicata en laboratorio crece en un amplio rango de temperaturas desde 5 a 23 °C, pero la más baja tasa de crecimiento se observa en las temperaturas extremas 5 y 23°C, la temperatura óptima de crecimiento es 15°C. En laboratorio también se evaluó el efecto de la salinidad (25 y 35 eps) sobre el crecimiento y la mayor tasa de crecimiento se observó con salinidad de 35 eps en medio de cultivo von Stosch y concentración VSES/2 (50% de la concentración de VSES).

4

PREPARACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA APLICACIÓN DE HORMONAS

4.1 Colecta de material biológico

Se colectan ejemplares de *A. plicata* de poblaciones naturales, Seno Skyring, Isla Riesco (52°38'59.7"S; 71°29'44"W) Región de Magallanes en Octubre de 2010 y en Febrero de 2011. Los talos colectados se deben trasladar en contenedores cerrados y en lo posible con ice pack para conservar una baja temperatura, ya que las poblaciones naturales crecen en aguas con temperaturas entre 3 y 10°C aproximadamente.

Los ejemplares una vez en el laboratorio se deben seleccionar y separar en talos no reproductivos y reproductivos. Los ejemplares recolectados en Febrero/2011 presentaron fenotipos de coloración amarilla y roja (Fig. 7). Se deben

limpiar y eliminar organismos contaminantes y restos de arena, fango o sedimento. Los ejemplares seleccionados y limpios serán utilizados para los cultivos de explantes. En el laboratorio de algas de la Universidad Arturo Prat y de la Universidad de Magallanes se mantuvo un stock de talos en estanques con el propósito de aclimatar los talos para los ensayos con hormonas.



Fig. 7. Gametofitos de *Ahnfeltia plicata* recolectados en Febrero de 2011 con coloración amarilla y roja.

Los talos de *Ahnfeltia* se pueden mantener por largo tiempo en esas condiciones y no requieren de cambios frecuentes de agua de mar (1 vez a la semana es suficiente) ni adición de nutrientes para su mantención. De cada ejemplar se cortan trozos de talos gametofíticos no reproductivos de 3 cm de dos sectores del talo: región apical y porción media, los cuales son sonicados y enjuagados con solución betadina 0,5%, con el fin de eliminar epífitos y microorganismos.

4.2 Procedimiento de preparación de explantes para micropropagación

Los fragmentos de talo, posteriormente, son tratados por 48 horas con penicilina/nistatina (Villanueva *et al.* 2010), con el fin de eliminar bacterias y hongos, a una temperatura de 10°C y con un fotoperiodo de 16:8 L: O (Luz: Oscuridad). Transcurrido ese tiempo, cada segmento es cortado en explantes de aproximadamente 5 mm para los experimentos con reguladores de crecimiento.

4.2.1. Experimento con sustancias reguladoras de crecimiento en medio líquido.

Para el tratamiento control, se toman segmentos de talos gametofíticos no reproductivos, los cuales son lavados en agua de mar esterilizada y cultivados en medio de cultivo Provasoli (PES). Se utilizan dos hormonas de crecimiento, AIA (auxina) y BAP (citoquinina), a 3 concentraciones: 0,1 mg/L, 1,0 mg/L y 5,0 mg/L, preparadas en medio de cultivo Provasoli (PES) (McLachlan, 1973). El experimento es realizado en triplicado para cada concentración de hormonas y para cada sección del talo, utilizando un n= 4 explantes por placa de cultivo en dos fotoperiodos. Durante el estudio, los cambios de medio de cultivo enriquecido con hormonas se realizan semanalmente.

4.2.2. Experimento con sustancias reguladoras de crecimiento en medio sólido.

Segmentos apicales (20 mm longitud) de gametófitos con talos de color rojo y amarillo fueron cultivados por una semana en medio de cultivo VSES/2 y bajo las siguientes condiciones de cultivo: temperatura de $8 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclos luz: oscuridad de 12:12 h, densidad de flujo fotónico de $6 \pm 1 \text{ mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y salinidad de 34 eps.

Concentraciones de 5,0 y 50,0 de dos auxinas (AIA y 2,4-D), y dos citoquininas (BAP y isopentenyladenine =iP) fueron adicionadas al medio de cultivo VSES, y gelificado con 0,5% de agar. Segmentos apicales (10 mm) fueron cortados de especímenes rojos y amarillos de *Ahnfeltia*, protocolos esterilizados siguiendo el siguiente protocolo: lavado por 10 segundos en una solución de agua de mar estéril con 0,5% de hipoclorito de sodio y 200 l L⁻¹ de detergente, y lavado varias veces en agua de mar estéril para remover esta solución. Estos explantes fueron inoculados en 30 ml de medio VSES sólido esterilizado y enriquecido con PGR. Los experimentos fueron desarrollados a temperatura de $8 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 12:12 h luz: oscuridad, irradianza de $6 \pm 1 \text{ mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 34 eps de salinidad. Cada tratamiento fue realizado con tres repeticiones (Fig. 8). Después de cuatro semanas en medio sólido, los explantes fueron cultivados en medio líquido con las mismas condiciones experimentales. La biomasa húmeda fue evaluada semanalmente en los mismos períodos de recambio de medio de cultivo.



Fig. 8. Experimento con sustancias reguladoras de crecimiento en medio sólido. Se aprecian los frascos con agar en los cuales fueron colocados los explantes de *A. plicata*.

4.3 Medición de parámetros en cultivo

Durante el desarrollo de estudios sobre el efecto de hormonas en crecimiento y diferenciación de macroalgas se pueden medir parámetros como: sobrevivencia de explantes, mortalidad de explantes, crecimiento en longitud, y crecimiento en biomasa entre otros. La evaluación del crecimiento se puede realizar mediante fotografías tomadas directamente a través de fotografía digital acoplada a Microscopio óptico o lupa estereoscópica. Una vez finalizada la etapa experimental, se compara el crecimiento de los diferentes tratamientos experimentales a través de análisis de varianza de factores (ANDEVA).

Las concentraciones de hormonas utilizadas en explantes de *Ahnfeltia plicata*, durante el desarrollo del proyecto Fondef D08I1163 mostró un porcentaje de sobrevivencia total promedio de 79,2%, de los explantes, tanto de regiones apicales como de porciones medias. En cuanto a las condiciones de cultivo, se observó una mayor sobrevivencia en aquellos explantes cultivados en fotoperíodo de día largo: 16:8 (luz: oscuridad). La menor sobrevivencia (<10%) se observó en aquellos explantes apicales e intercalares cultivados con BAP de 5 mg/L y mantenidos en fotoperíodo 12:12 (luz: oscuridad) y a 10°C, hubo necrosis temprana de tejido.

5

DIFERENCIACIÓN CELULAR PRODUCIDA POR HORMONAS EN *AHNFELTIA PLICATA*

La aplicación de fitohormonas en cultivos de *A. plicata* es recomendable para la micropropagación de talos ya que puede inducir la diferenciación celular, formación de ramificaciones apicales y laterales y crecimiento apical e intercalar. También se puede observar formación de estructuras tipo callos tanto en cultivos con hormonas de crecimiento como en los controles (agua de mar), lo que indica que el desarrollo de estas estructuras es inducido por procesos de cicatrización, más que por efecto de adición de hormonas (Yokoya & Handro, 1997; 1999).

En este estudio, se observa que cultivos enriquecidos con auxina (AIA) estimulan escasamente el crecimiento en las regiones polares de explantes de *A. plicata* en ambas regiones de corte y que ante la presencia de esta hormona no se presentaron ramificaciones laterales de los mismos, en cambio al utilizar citoquinina (BAP) se observó tanto crecimiento de las regiones polares como diferenciación y formación de ramificaciones laterales. La presencia de ramificaciones laterales en explantes mantenidos con AIA, puede ser producto de que al momento de comenzar el estudio, estas estructuras hayan estado en proceso de crecimiento y se estimuló el crecimiento con el uso de medio de cultivo enriquecido con hormonas. Según Yokoya & Handro (1997), el efecto inhibitorio de las auxinas sobre la morfogénesis, en contraste con efectos estimulantes de las citoquininas sobre la formación de estas ramificaciones laterales, es muy similar a lo observado en plantas vasculares. Estos autores, mencionan que el efecto de altas concentraciones de citoquinina podría estar relacionado con la división celular ya que incrementa la síntesis de proteínas y actividad metabólica, afectando los procesos de diferenciación celular, lo que podría explicar el crecimiento de ramas laterales en los explantes.

5.1 Crecimiento apical e intercalar

Es posible evidenciar el crecimiento apical por observaciones bajo lupa estereoscópica. Los ápices en crecimiento tienden a aparecer con una coloración más tenue que el resto del talo y un diámetro claramente menor al talo inicial (Fig. 9)



Fig. 9.
Explantes con
crecimiento
apical.

En cuanto al tipo de crecimiento presentado por los explantes de *A. plicata* cultivados en medio líquido enriquecido con reguladores de crecimiento vegetal, se observó que los explantes cultivados con hormona BAP presentaron crecimiento tanto en los polos o extremos y formación de ramificaciones laterales, en las dos regiones de corte: apicales y porciones medias. En los tratamientos con AIA, sólo se pudo observar crecimiento en los polos (Fig. 5).

El crecimiento (biomasa) de gametofitos rojos de *A. plicata* fueron estimulados por 2,4-D a concentraciones de 5,0 M durante las dos primeras semanas, sin embargo, el crecimiento disminuyó después de este período. Alta concentración de 2,4-D también estimuló el crecimiento inicialmente, disminuyendo después de cuatro semanas. Gametofitos rojos, no toleraron los tratamientos con auxinas AIA (en concentraciones de 5,0 y 50,0 M) y con altas concentraciones de iP. Entretanto, bajas concentraciones de iP inhibió el crecimiento de ejemplares rojos de *A. plicata*. Por otro lado, el crecimiento de gametofitos amarillos de *A. plicata* fue inhibido en todos los tratamientos con auxinas y citoquininas, sin embargo los reguladores de crecimiento vegetal no fueron letales para gametofitos amarillos de *A. plicata*, sugiriendo que fenotipos de este color podrían ser más tolerantes de los fenotipos de color rojo.

5.2 Ramificaciones laterales y basales

La aplicación de citoquininas en explantes en condiciones de laboratorio induce a la formación de ramificaciones apicales y laterales, las cuales no presentan un patrón claro de dicotomía (Fig. 6 a y b). También se observó, en algunos casos, formación de una cubierta blanquecina que se denominó “estructura hialina”, la que cubrió todo el talo en ambas regiones de corte y en los 2 tratamientos. (Fig. 10).

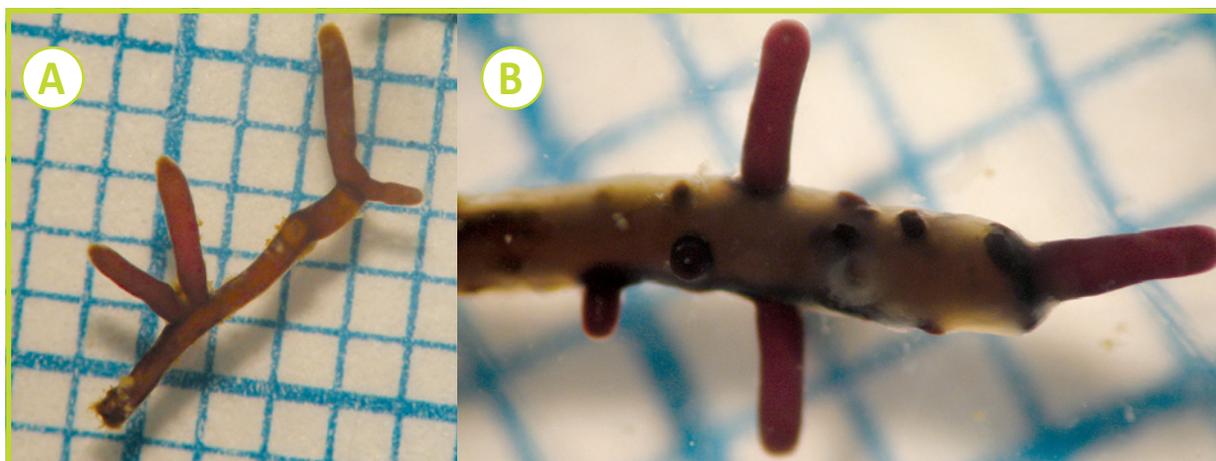


Fig. 10. Explantes de *A. plicata* con ramificaciones. A) Cubierta hialina y ramificaciones; B) Ramificaciones laterales y picales

Se observó mayor aumento sobre la longitud de fragmentos intercalares atribuibles al control, el que a partir de la semana 10 muestra incrementos significativos en comparación al resto de los tratamientos hormonales. Los explantes mantenidos con BAP a concentraciones de 1 y 5 mg/L, muestran tendencias de crecimiento similares al control, no diferenciándose significativamente de él. Se aprecia, que las tallas promedio de fragmentos intercalares de *A. plicata* aumentan a partir de la semana 10 para la condición 12:12 de fotoperíodo.

5.3 Formación de estructuras tipo callo

La aplicación de reguladores de crecimiento en explantes de *A. plicata* promueve la formación de estructuras tipo callos (Fig. 11). La formación de los callos ocurrió principalmente en el tratamiento BAP 5 mg/L, donde se observó que el 25% de los explantes formaron callos. Estos callos fueron seccionados y cultivados en medio de cultivo líquido, sin embargo después de 2 semanas se observó necrosis y pérdida total del tejido. Posteriormente los callos observados se han dejado en el talo y han sido mantenidos con medio de cultivo Provasoli sin hormonas y sin TRIS buffer, para evitar contaminación por bacterias. La formación de estructuras tipo callo en otras especies de algas rojas ha sido descrita por Polne-Fuller & Gibor (1987)



Fig. 11. Explantes con formación de callos a) apicales, b) basales y c) laterales.

6

BIOSEGURIDAD EN CULTIVOS CON APLICACIÓN DE HORMONAS

La “Bioseguridad” comprende un conjunto de medidas y disposiciones, que tienen como principal objetivo la protección humana, animal, vegetal y ambiental. Es, por tanto, legítimo pensar que dentro de este campo tiene también cabida la protección, contra otros elementos que no son estrictamente de origen biológico, pero que si son capaces de constituir riesgo y agresión.

Se debe tener en cuenta siempre si los reactivos utilizados en la preparación de los medios de cultivo son tóxicos. En general, el riesgo a que se está expuesto por la manipulación de agentes químicos se produce por:

- I) Ingestión, inhalación y/o contacto con la piel, tejido, mucosas u ojos, de sustancias tóxicas, irritantes, corrosivas y/o nocivas.
- II) grado de inflamabilidad de la sustancia.
- III) Capacidad de las sustancias de liberar energía
- IV) Heridas en la piel

Los accidentes con líquidos inflamables, materiales inestables, tóxicos, cáusticos, vapores tóxicos, etc., son relativamente frecuentes y configuran lo que podría denominarse en términos generales como “Accidentes”, “exposición aguda” o “toxicidad aguda”. La inmensa mayoría de los problemas generales en laboratorios con agentes químicos de riesgo caen dentro de este grupo.

Una segunda categoría son aquellos que ejercen su efecto tóxico o potencial de riesgo a través de una “exposición prolongada” o “crónica”, lo que es más frecuente en la industria, o en el uso de ellos en el ambiente (e.g. insecticidas).

Una tercera categoría son las sustancias químicas que podrían producir contaminación ambiental.

La idea de encontrar mecanismos de protección frente al manejo de productos tóxicos, microorganismos patógenos, organismos vivos genéticamente modificados o material contaminado con patógenos, no es nueva y en muchos países se han dado normas, particularmente relacionadas con estos elementos de riesgo.

Es imprescindible que las actividades de los laboratorios de investigación, la industria y los ensayos de campo, se efectúen en condiciones controladas. Con las normas de seguridad, se pretende lograr que las actividades se efectúen en forma controlada de manera tal que se garantice, por un lado, la seguridad personal (integridad física) de quienes están directamente en el proceso de investigación y producción, y, por otro lado y de manera indisoluble, la seguridad del ecosistema adonde van a ir directa o indirectamente estos productos, provocando agresión a sus componentes bióticos o abióticos.

Otro aspecto importante tiene relación con la definición de límites máximos permisibles en el uso de agentes químicos en laboratorio. Para ello de acuerdo a lo establecido en nuestra legislación en el Decreto Supremo N°594 (1999) se define estos límites como: a) Limite permisible ponderado (LPP); b) Limite permisible temporal (LPT); c) Limite permisible absoluto (LPA).

Es muy importante considerar llevar a cabo toda la manipulación de cultivos de tejido asegurando la esterilidad de los procesos, usar guantes y trabajar en campana extractora de flujo laminar mientras se estén manipulando los explantes y eliminar todos los residuos como material bio- contaminante.

Cada laboratorio debe contar con las normas específicas para el manejo de agentes químicos de riesgo. Estas normas deben considerar el almacenamiento y transporte de sustancias químicas, uso de gabinetes de seguridad química y manejo de residuos químicos,

2-isopenteniladenina (iP): es una citoquinina derivada del isoprenoide y actúa principalmente en los procesos de diferenciación celular y organogénesis en plantas.

6-Benzilaminopurina (BAP): es una citoquinina aromática y actúa en diferentes procesos del desarrollo vegetal.

Acido indol-3-acético (AIA): es una auxina natural que actúa en diferentes procesos del desarrollo, principalmente en el crecimiento celular, dominancia apical y rizogénesis.

Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D): es una auxina sintética que actúa en diferentes procesos del desarrollo vegetal.

Agar: polisacárido sulfatado producido por algunas especies de algas rojas pertenecientes a los Ordenes Gracilariales, Gelidiales y Ahnfeltiales. Es utilizado principalmente en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, por sus propiedades gelificante, emulsionante y estabilizante.

Agarófito: alga roja que produce agar.

Agarosa: polisacárido producido por algunas especies de algas rojas cuya característica química confiere una gran fuerza de gel.

Auxinas: es un grupo de reguladores de crecimiento vegetal que actúa en los procesos de división, expansión y diferenciación celular, controlando el crecimiento y el desarrollo vegetal.

Callo: estructura formada a partir de divisiones de células del talo (corticales y/o medulares) en respuesta a una herida, un corte o sección (proceso de cicatrización) o estrés (e.g. exposición al aire), pudiendo presentar diferentes formas y consistencias.

Carpogonio: célula femenina de las algas rojas floríferas.

Carposporofito: generación diploide, parasito en el gametófito femenino de las algas rojas floríferas.

¹ Algunas definiciones han sido basadas siguiendo Boraso, A.L., Rico, A.E., Perales, S., Pérez L. & Zalazar, H. (2009). Algas Marinas de la Patagonia: una guía ilustrada. 2ª ed. Fundación de Historia Natural Félix de Azara, Buenos Aires. 54 p.

Citoquininas: grupo de reguladores de crecimiento vegetal que actúa en los procesos de crecimiento y morfogénesis vegetal, controlando la división celular, la síntesis de ARN y de proteínas.

Cultivo in vitro: se refiere a todos los procesos biológicos que ocurren en condiciones controladas de laboratorio y que son hechos normalmente en recipientes de vidrio.

Dominancia apical: es el fenómeno a través del cual el eje central de la planta es dominante (crece más vigorosamente) que los ramos laterales.

Explant: puede ser una célula, trozo de tejido u órgano de una planta que es utilizado para iniciar cultivos *in vitro*.

Ficocoloides: polisacáridos producidos por algas.

Fitohormonas: sustancias de origen vegetal que actúan en los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal.

Gametófito: fase haploide de ciclo de vida de una alga.

Gonimoblasto: filamento del carposporofito que originará las carpósporas.

Heteromórfico: ciclo de vida en el que los talos del gametófito (n) y esporófito (2n) muestran diferentes morfologías, generalmente, una fase es erecta y macroscópica y la otra microscópica (crustosa, postrada o filamentosas).

Meristemas: tejido en el que ocurren abundantes divisiones celulares, donde se localiza principalmente el crecimiento de la planta.

Micropropagación: multiplicación de una gran cantidad de individuos (clon) a partir de un único individuo (genotipo) en condiciones *in vitro*. Sinónimo de propagación clonal *in vitro*. Monosporangio: estructura que origina monósporas (una única espora uninucleada).

Monóspora: espora producida en monosporangio.

Morfogénesis: es el proceso de desarrollo del alga, desde la germinación de la espora, desarrollo de la plantula y de la formación de estructuras de reproducción en el organismo adulto.

Pericarpo: estructura pseudoparenquimatosa (n) originada en el gametófito femenino que contribuye a proteger el carposporofito (2n). El conjunto de pericarpo y carposporofito se denomina cistocarpo.

Pit connection: estructura intercelular compleja, típica de las algas rojas floríferas.

Propagación in vitro: multiplicación asexual de partes de plantas (células, tejidos, órganos o propágulos), originando individuos genéticamente idénticos a la planta madre.

Reguladores de crecimiento vegetal: sustancias de origen vegetal o sintética que controla la división, el crecimiento y la diferenciación celular, el desarrollo vegetal. Se conocen seis tipos: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno y poliaminas.

Tetrasporangio: estructura que origina tetrásporas.

Tetrasporofito: fase diploide del ciclo de vida de una alga.

Zonados: se dice de los tetrasporangios con las tetrásporas ordenadas en fila.

8

REFERENCIAS

- Chapman, V.J. & Chapman, D.J., 1980. *Seaweeds and their uses*. Chapman & Hall, London. 334p.
- Chen, L.C.-M. (1977). The sporophyte of *Ahnfeltia plicata* (Huds.) Fries (Rhodophyceae, Gigartinales) in culture. *Phycologia* 16: 163-168.
- Edwards, P. (1970) Illustrated guide to the seaweeds and seagrasses in the vicinity of Porto Aransas, Texas. *Contrib Mar Sci* 15: 1-228.
- Evans, M.L. (1984). Functions of hormones at the cellular level of organisation. In: Scott, T. K. (ed.) *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 10. Springer-Verlag, Berlin, pp. 23-80.
- Farnham, W.F. & Fletcher, R.L. (1973). Sur la présence a Roscoff du *Porphyrodiscus simulans* Batters, et sa relation avec l'*Ahnfeltia plicata* (Huds.) Fries.. *Travaux Station Biologique de Roscoff, Nouvelle Série* 20: 9.
- Farnham, W.F. & Fletcher, R.L. (1976). The occurrence of a *Porphyrodiscus simulans* Batt. phase in the life history of *Ahnfeltia plicata* (Huds.) Fries. *British Phycological Journal* 11: 183-190.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2012). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 14 August 2012.
- Hagen, G. (1995). The control of gene expression by auxin. In: Davies, P.J. (ed) *Plant hormones- Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 228-245.

- Kilian, R., O. Baeza, T. Steinke, M. Arevalo, C. Rios & C. Schneider (2007). Late Pleistocene to Holocene marine transgression and thermohaline control on sediment transport in the western Magellanes fjord system of Chile (531S). *Quaternary International* 161: 90-107.
- Lobban C. & P. Harrison (1994). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. Pp. 63-65.
- Maggs, C.A. & Pueschel, C.M. (1989). Morphology and development of *Ahnfeltia plicata* (Rhodophyta): proposal of Ahnfeltiales ord. nov. *Journal of Phycology* 25(2): 333-351.
- Maggs, C.A., McLachlan, J.L. & Saunders, G.W. (1989). Infrageneric taxonomy of *Ahnfeltia* (Ahnfeltiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 25(2): 351-368.
- McLachlan, J. (1973). Culture media – marine. En Stein, J. (Ed.) *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, Cambridge, 25- 51 pp.
- Polne-Fuller, M. & A. Gibor (1987). Calluses and callus-like growth in seaweeds: Induction and culture. *Hydrobiologia* 151/152: 131 – 138.
- Rayment, W.J., 2004. *Ahnfeltia plicata*. A red seaweed. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. Available from: <http://www.marlin.ac.uk/species/Ahnfeltiaplicata.htm>
- Reddy, C., Jha, B. & Y. Fujita. (2008). Seaweed micropropagation techniques and their potentials: an overview. *J. Appl. Phycol.* 20: 609 – 617.
- Rosenvinge, L.K. (1931). The reproduction of *Ahnfeltia plicata*. *Det kgl. dan. Vidensk. Skr., Naturv. og Mathem. Afd.* 10: 1-29.
- Salamanca, M. & W. Schneider (2004). La salinidad en los océanos. En Werlinger, C. (ed) *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*. Tomo I. Universidad de Concepción. Concepción. P. 149-160.
- Stirk, W.A., O. Novák, M. Strnad & J. van Staden. (2003). Cytokinis in macroalgae. *Plant Growth Regulation* 41: 13-24.
- Villanueva, F., Ávila, M., Mansilla, A. & J. Cáceres (2010). Desarrollo de técnicas de micropropagación in vitro de *Ahnfeltia plicata* (Hudson) Fries, 1836 (Ahnfeltiales, Rhodophyta) de la Región de Magallanes. *Resúmenes XXX Congreso de Ciencias del Mar*. Universidad Católica de la Santísima Concepción, Concepción, 2010). P: 179.
- Yokoya, N.S. (2000). Apical callus formation and plant regeneration controlled by plant growth regulators on axenic culture of the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycological Research* 48: 133-142.

- Yokoya, N.S. & W, Handro (1997). Thallus regeneration and growth induced by plant growth regulators and light intensity *Grateloupia dichotoma* (Rhodophyta) In Kitamura, T. (Ed.) *Proceedings of I.T.I.T. International Symposium on New Technologies from Marine-Sphere*. Agency of Industrial Science and Technology (AIST/MITI) and New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) Takamatsu, Japan: 83 – 86.
- Yokoya, N.S. & W. Handro (1996). Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327: 393 – 400.
- Yokoya, N.S., Kakita, H., Obika, H. & T. Kitamura (1999). Effects of environmental factors and plant growth regulators on growth of the red alga *Gracilaria vermiculophylla* from Shikoku Island, Japan. *Hydrobiologia* 398/399: 339 – 347.
- Yokoya, N.S.; Stirk, W.A ; Van Staden, J.; Novak, O ; Tureckova, V.; Pencik, A. & Strnad, M. (2010). Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in red algae from Brazil. *Journal of Phycology* 46: 1198-1205.
- Zar J.H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, New Jersey, p. 663.

Manual de cultivo de *Ahnfeltia plicata*
(Hudson) Fries en base a fitohormonas (reguladores de crecimiento)



ISBN: 978-956-351-760-6



9 789563 517606

Proyecto FONDEF “Cultivo y biotecnología de *Ahnfeltia plicata* nueva alternativa en la producción de ficocoloides para la Región de Magallanes”