

Micropropagación clonal, una alternativa biotecnológica en el cultivo de macroalgas marinas chilenas de importancia económica

Clonal micropropagation, a biotechnological alternative in the culture of chilean marine macroalgae of economical importance

GLORIA E. COLLANTES, CARLOS A. MELO
y ARTURO I. CANDIA*

Laboratorio de Algas, Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso,
Casilla 13-D, Viña del Mar, Chile, y

*Area Biotecmar, Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Talcahuano,
Casilla 127, Talcahuano, Chile.

Vegetative propagation of higher plants have been practiced since antiquity. The modern approach relies upon the totipotency of somatic cells to give rise to a fully differentiated plant. In this context, this paper presents the potential of plant biotechnology on economically interesting marine algae from Chile and outlines the ongoing research on seaweeds micropropagation. Micropropagation techniques are seen as the means of speeding up the production of desirable strains (e.g., higher growth rate, enhanced phycocolloid production, epiphyte resistance, etc.) that would be available as seed stocks for the development of chilean mariculture.

We report our advances in tissue culture techniques on *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan & Oliveira; *Gelidium lingulatum* Kützinger; *Gelidium rex* Santelices & Abbott and *Lessonia nigrescens* Bory. Our efforts are focused on the development of procedures for calli or totipotent cells induction and their pathways to plantlets; stages of micropropagation, its limitations, advantages and future research involving protoplasts isolation.

Las macroalgas marinas han sido utilizadas en la producción de ficocoloides destinados a las industrias alimenticia, química y farmacéutica. El material utilizado para la extracción química, a nivel mundial, proviene en gran medida de la cosecha de poblaciones naturales, lo que hace que la industria esté sujeta a grandes fluctuaciones en la disponibilidad de materia prima. De aquí que la producción mundial de extractos químicos de algas se encuentre limitada por el suministro (Gellenbeck and Chapman, 1983).

Las poblaciones naturales de algas en Chile están siendo cosechadas por pescadores artesanales, sus familias y recolectores ocasionales y exportadas como materia prima para la obtención de ficocoloides desde los años sesenta. Durante los últimos 10 años, la explotación de algas en el país ha aumentado sostenidamente; esto se debe, principalmente, al incremento de la actividad extractiva. En el año 1970 trabajaban en la recolección de algas (*Gracilaria* spp.) alrededor de 2.000 personas, 4.500

en el año 1976 y 11.300 en el año 1983. Este explosivo aumento del esfuerzo extractivo sobre las praderas, las que son absolutamente vulnerables por su accesibilidad, ha significado que éstas estén ya sobreexplotadas o al borde de la extinción del alga como recurso económico. Esta situación hace urgente la necesidad de incrementar los estudios y esfuerzos que permitan el desarrollo de cultivos (Lopehandía, 1986).

En 1988 el desembarque total de algas, de acuerdo a las estadísticas de Sernap, fue de 166.139 toneladas (90% humedad), de las cuales 59.787 tons correspondieron a *Gracilaria* spp. (pelillo) constituyéndose, económicamente, en uno de los principales recursos algales. Esta última cifra incluye la producción de centros de cultivo, los cuales aportaron con un 39% de la producción de *Gracilaria*. Otra agarófita importante (por la calidad de su gel) es *Gelidium* spp. (chasca) cuyo desembarque fue de 1.537 tons (90% humedad). En relación al alga parda

Lessonia, la estadística señala que se extrajeron 60.669 tons de poblaciones naturales. Estas algas, junto a las restantes que se explotan, constituyen en nuestro país recursos naturales renovables de notable importancia económica, ecológica y social, cuya explotación comercial debe basarse sobre sólido conocimiento científico y tecnológico (Santelices, 1983).

El desarrollo de los centros de cultivo de *Gracilaria* spp. en Chile se inició alrededor de 1980, debido a que el suministro de cosechas naturales no satisfacía la demanda de las exportaciones. Estos centros en la actualidad, se ubican prácticamente a lo largo de todo el país y en ellos se han utilizado diversos sistemas de siembra. La metodología de propagación usada está basada en la multiplicación vegetativa de las plantas. Una segunda alternativa de producción de este recurso, actualmente a nivel piloto, es el cultivo a partir de esporas. Una tercera alternativa está encaminada a desarrollar un procedimiento tecnológicamente más avanzado, fundamentado en la técnica de cultivo de tejido, e independiente de la existencia de factores estacionales de inducción de fertilidad y del estado de madurez del individuo. Esta técnica permite obtener células reproductivas viables a partir de plantas que exhiban características deseables.

Los métodos para la propagación vegetativa de las plantas vasculares han sido practicados desde la antigüedad. Los enfoques modernos se basan en la totipotencialidad de las células somáticas de originar plantas completamente diferenciadas. En el caso de las algas marinas bentónicas esta metodología comenzó a aplicarse en el alga verde *Prasiola* en la década del 70 y hoy en día se ha orientado a la obtención de callos, células y protoplastos destinados al mejoramiento genético de ellas. Considerando la importancia socioeconómica que las algas representan para nuestro país, la situación crítica en que se encuentran las especies agarófitas (*Gracilaria* y *Gelidium*) y las fluctuaciones en la disponibilidad del alga parda *Lessonia* debido al efecto de catástrofes naturales (presencia fenómeno "El Niño") este trabajo presenta el potencial de la biotecnología en algas marinas de

importancia económica, en relación a la aislación, producción y mantención de variedades con características deseables con destino a los centros de cultivo y a recuperar biomasa algal agotada.

Biotecnología de plantas vasculares

El término micropropagación fue utilizado por primera vez en 1968 por Hartmann and Kester (1975 *vide* Krikorian 1982). Actualmente la micropropagación de plantas se define como un método biotecnológico, el cual mediante procedimientos asépticos permite obtener plantas mejoradas. En el pasado, la eficiencia del mejoramiento de plantas estuvo limitada por la compatibilidad y estabilidad de los genes y por la duración de los ciclos reproductivos; hoy en día en base de la totipotencialidad celular y de la micropropagación clonal es posible manipular órganos de plantas, tejidos o células y producir poblaciones de plántulas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta madre.

Las técnicas de cultivo de tejido en plantas vasculares han sido ampliamente practicadas desde los años setenta. Avances recientes en el campo de cultivo de tejido en estos vegetales han dado por resultado un incremento en la utilización de estos métodos tanto para la investigación básica como aplicada. La capacidad regenerativa de las células de los vegetales ha abierto una nueva ruta para realizar investigación básica en genética de plantas (Vasil *et al.* 1979). Estas técnicas han dado lugar a descendencia genéticamente mejorada de plantas vasculares (White, 1933; Gautheret, 1942; Steward y Caplin, 1951), al descubrimiento de nuevas hormonas de plantas (Went y Thimann, 1937; Skoog, 1947; Addicott y Lyon, 1969, Wareing y Ryback, 1970), al uso de protoplastos vegetales en numerosas aplicaciones (Cocking, 1960; Gamborg, 1975; Takebe, 1975; Melchers, 1977) y a estudios fundamentales del fenómeno "crown gall" (Braun, 1959) el cual, últimamente, permitió el descubrimiento del plásmido Ti.

En plantas superiores la embriogénesis somática puede ser inducida ayudando a las células a escapar de las restricciones im-

puestas a ellas por su posición dentro de la planta o en un agregado multicelular. El suministro de nutrientes especiales para el posterior proceso de embriogénesis es también de importancia crítica (Steward y Ram, 1961). En algunos casos el comienzo exitoso de la morfogénesis en cultivo ha involucrado la transferencia de los cultivos a través de una secuencia de diferentes medios, lo que sugiere que el desarrollo de la capacidad para organizar el crecimiento involucra más de un cambio metabólico (Steward *et al.*, 1967). Hay indicios a partir de estudios con plantas vasculares de que la activación del crecimiento y la competencia embriogénica involucran pasos diferentes. Cultivos derivados de segmentos de tallos adultos y juveniles de una planta individual (hiedra) se comportaron a través de numerosos subcultivos en forma diferente, teniendo los cultivos derivados de juveniles células más grandes y tasas superiores de proliferación celular. Estas diferencias juveniles-adultos fueron mantenidas a través del proceso de inducción de callo y su subsecuente crecimiento en cultivo (Stortemeyer y Britt, 1965).

Micropropagación de algas

Aunque durante la década del 60 y del 70 hubo un gran interés en lo referente a regeneración y formación de yemas en algas, pocos investigadores apreciaron este proceso y sus implicaciones morfológicas como un hallazgo significativo para el desarrollo de metodologías de micropropagación clonal. *Bryopsis hypnoides* y *Caulerpa ashmeadii* taponan sus heridas para evitar pérdidas de citoplasma (Burr y West, 1971; Goddard y Dawes, 1979). *Fucus vesiculosus* (Fulcher y McCully, 1969, 1971) y *Sargassum filipendula* (Fagerberg y Dawes, 1976) forman una lámina de células epidermales a partir de las células medulares adyacentes de la superficie dañada y por crecimiento de una papila externa se forma un nuevo eje vegetativo. *Petroglossum nicaense* y *Gigartina acicularis* presentan dos clases de yemas o brotes adventicios, aquellos originados desde células medulares de las superficies de corte, regeneración *de novo* y aquellas formadas

por crecimiento renovado de los filamentos laterales que forman la corteza del talo, estas yemas han sido llamadas proliferaciones (Perrone y Felicini, 1972, 1976). En *Caulerpa prolifera* primordios de rizoides o frondas son originadas en una tasa de aparición y en un orden predecible en forma de papilas de crecimiento externo sobre partes del rizoma (Chen y Jacobs, 1966). Papilas vegetativas se originan en el extremo apical de segmentos de *Enteromorpha intestinalis* (Moss y Marsland, 1976).

Mediante regeneración de fragmentos del talo se ha demostrado que es posible la maricultura de *Chondrus crispus*, *Gracilaria* spp. y *Euclima* spp. (Neish y Fox, 1971; Goldstein, 1973; Edelstein, 1977).

La totipotencialidad de las células de algas ha sido demostrada por Tatewaki y Nagata (1970) en *Bryopsis plumosa*; Boden y Stein (1969) en *Codium tomentosum* y Saga (1978) en *Pelvetia wrightii* (*vide* Buggeln, 1981).

De acuerdo con Petiard y Deshayes (1986/87), el principal objetivo de la biotecnología de plantas es eliminar o minimizar tres limitaciones de la reproducción sexual: compatibilidad, estabilidad y duración del ciclo de reproducción. Hoy día estas limitaciones han sido superadas por dos tipos de técnicas, aquellas que modifican el genotipo (ingeniería genética, hibridación somática, mutagénesis, variación somaclonal y cultivo de células) y aquellas que estabilizan o multiplican un genotipo ya existente (haploidización, embriogénesis somática, micropropagación y cultivo de células). En comparación a las plantas superiores, en algas pocos avances se han realizado usando este tipo de técnicas; sin embargo, recientemente se ha comenzado a dedicar una mayor atención en esta área de investigación (Tabla I).

Uno de los primeros trabajos que se conocen en cultivo de tejido se deben a Schiff *et al.* (1972) quienes aislaron y cultivaron células del alga verde *Prasiola*; Misawa (1977) señaló la existencia de una patente japonesa mediante la cual es posible obtener agar a partir de callos de *Gelidium* y *Gracilaria*. En 1978 Chen y Taylor aislaron células provenientes de tejido

medular de frondas gametófitas femeninas de una variedad de *Chondrus crispus* cultivándolas en un medio axénico. En ese mismo año Saga *et al.* obtuvieron la formación de callos en *Laminaria angustata*. Protoplastos algales han sido aislados y cultivados *in vitro*. Gabriel (1970) obtuvo protoplastos del alga verde *Uronema gigas*, las células fueron tratadas con enzimas obtenidas del tracto digestivo de gastrópodos. Tratamientos enzimáticos similares fueron usados exitosamente en *Chlorella* (Braun y Aach, 1975), *Micrasterias* y *Cosmarium* (Berliner y Wenc, 1976), *Spirogyra* y *Zygnema* (Ohiwa, 1977) y *Mougeotia*

(Marchant y Fowke, 1977 y Marchant, 1979). Otros estudios incluyen preparación de protoplastos de *Enteromorpha intestinalis* (Millner *et al.*, 1979); *Laminaria* y *Porphyra* (Saga y Sakai, 1984); regeneración de protoplastos en *Porphyra* (Polne-Fuller y Gibor, 1984); fusión de protoplastos (Polne-Fuller y Gibor, 1986); aislación de protoplastos a partir de cigotos de *Fucus distichus* (Kloareg y Quatrano, 1987); producción de protoplastos a partir de *Sargassum muticum* (Fisher y Gibor, 1987); aislación, fusión y diferenciación de protoplastos de *Gracilaria secundata* (Björk *et al.*, 1988).

TABLA I

Especies de algas en las cuales se han realizado cultivo de tejido y/o protoplastos

CHLOROPHYTA	CULTIVO DE TEJIDO	PROTOPLASTOS
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlamydomonas</i>		Gresshoff, 1976 (2). Schlosser <i>et al.</i> , 1976 (3); Matsuda <i>et al.</i> , 1978 (3); Robinson y Schlosser, 1978 (3).
<i>Chlorella</i>		Braun y Aach, 1975 (3)
<i>Klebsormidium flaccidum</i>		Fowke, 1982.
<i>Ulothrix fimbriata</i>		Fowke, 1982.
<i>Stigeoclonium</i> sp.		Fowke, 1982.
<i>Uronema gigas</i>		Gabriel, 1970 (3)
<i>Draparnalia mutabilis</i>		Larpen-Gourgand y Aumaitre, 1987.
<i>Monostroma angicava</i>		Zhang, D., 1983 (1)
<i>M. zostericola</i>		Saga, 1984.
<i>Enteromorpha linza</i>		Saga, 1984; Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986.
<i>E. intestinalis</i>	Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986; Polne-Fuller y Gibor, 1987.	Millner <i>et al.</i> , 1979 (1); Saga <i>et al.</i> , 1986; Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986.
<i>Ulva pertusa</i>		Saga, 1984.
<i>U. linza</i>		Zhang, D.; 1983 (1).
<i>U. angusta</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>U. taeniata</i>		Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986.
<i>Prasiola stipitata</i>	Schiff <i>et al.</i> , 1972 (3)	
<i>Spirogyra</i>		Ohiwa, 1977 (3); Marchant y Fowke, 1977 (2)
<i>Zygnema</i>		Ohiwa, 1977 (3).
<i>Mougeotia</i> sp.		Marchant y Fowke, 1977 (3); Marchant, 1979 (3); Fowke, 1982.
<i>Cosmarium</i>		Berliner y Wenc, 1976 (3).
<i>Micrasterias</i>		Berliner y Wenc, 1976 (3).
PHAEOPHYTA	CULTIVO DE TEJIDO	PROTOPLASTOS
<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i>	Saga <i>et al.</i> , 1982.	
<i>Laminaria hyperborea</i>	Fries, 1980.	
<i>L. digitata</i>	Fries, 1980.	
<i>L. japonica</i>	Saga y Sakai, 1977; Fang, 1984; Yan, 1984	Saga y Sakai, 1984; Saga, 1984.
<i>L. saccharina</i>	Lee, 1985.	
<i>L. angustata</i>	Saga <i>et al.</i> , 1978; Saga y Sakai, 1983.	
<i>L. sinclairii</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Undaria pinnatifida</i>	Zhang, J., 1982 (1); Fang, 1984; Yan, 1984	
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	Saga <i>et al.</i> , 1986.
<i>Lessonia nigrescens</i>	Collantes y Melo, 1988.	
<i>Egregia menziesii</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Fucus distichus</i>		Kloareg y Quatrano, 1987.
<i>Pelvetia fastigiata</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Sargassum muticum</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987; Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986.	Saga <i>et al.</i> , 1986; Fisher y Gibor, 1987.
<i>S. fluitans</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Cystoseira osmundacea</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	

Cont. Tabla 1

RHODOPHYTA	CULTIVO DE TEJIDO	PROTOPLASTOS
<i>Smithora naiadum</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Porphyra perforata</i>	Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1984; Polne-Fuller y Gibor, 1987.	Saga <i>et al.</i> , 1986; Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986.
<i>P. nereocystis</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986.
<i>P. lanceolata</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986.
<i>P. schizophylla</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	Polne-Fuller y Gibor, 1987.
<i>P. suborbiculata</i>	Tang, 1982 (1).	Tang, 1982 (1).
<i>P. yezoensis</i>	Zhao y Zhan, 1981 (1); Polne-Fuller y Gibor, 1986.	Saga, 1984; Saga y Sakai, 1984; Saga <i>et al.</i> , 1986; Polne-Fuller <i>et al.</i> , 1986; Fujita y Migita, 1987.
<i>P. columbina</i>	Liu y Gordon, 1987.	
<i>Gelidium amansii</i>	Nakamura, 1974 (4).	
<i>G. subscostatum</i>	Nakamura, 1974 (4).	
<i>G. nudifrons</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>G. robustum</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>G. vagum</i>	Gusev <i>et al.</i> , 1987.	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Liu y Gordon, 1987.	
<i>P. lucida</i>	Liu y Gordon, 1987.	
<i>Eucheuma uncinatum</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>E. alvarezii</i> var. <i>tambalang</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Gigartina exasperata</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Chondrus crispus</i>	Chen y Taylor, 1978.	
<i>Phyllophora nervosa</i>	Gusev <i>et al.</i> , 1987.	
<i>Gracilaria tikvahiae</i>		Cheney <i>et al.</i> , 1986.
<i>G. lemaneiformis</i>		Cheney <i>et al.</i> , 1986.
<i>G. confervoides</i>	Nakamura, 1974 (4)	
<i>G. verrucosa</i>	Gusev <i>et al.</i> , 1987.	
<i>G. papenfusii</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Prionitis lanceolata</i>	Polne-Fuller y Gibor, 1987.	
<i>Rhodymenia pertusa</i>	Gusev <i>et al.</i> , 1987.	
<i>Furcellaria fastigiata</i>	Gusev <i>et al.</i> , 1987.	
<i>Ceramium kondoi</i>	Gusev <i>et al.</i> , 1987.	
<i>Laurencia panaliculata</i>	Gusev <i>et al.</i> , 1987.	

(1) *vide* Cheney, 1986; (2) *vide* Fowke, 1982; (3) *vide* Gibor, 1980; (4) *vide* Misawa, 1977.

La aplicación de la técnica de cultivo de tejido en macroalgas marinas ha enfrentado varios problemas, los cuales hoy en día son un campo activo de investigación: 1) Mantenimiento de cultivos unialgales estériles: Fries (1963) aplicó un tratamiento antibiótico efectivo en algas rojas; Gibor e Izawa (1963) emplearon soluciones antisépticas y tratamiento con antibióticos en cultivos de *Acetabularia* con resultados poco satisfactorios, en cambio Chen y Taylor (1978) aislaron axénicamente células medulares de *Chondrus crispus* y Saga y Sakai (1983) obtuvieron cultivos axénicos de *Laminaria angustata* flameando trozos de estipe con etanol. 2) Disociación del tejido algal para obtener suspensiones celulares: esto puede efectuarse mecánicamente (Schiff *et al.*, 1972; Chen y Taylor, 1978) o enzimáticamente para la obtención de protoplastos (Gabriel, 1970; Braun y Aach, 1975; Berliner y Wenc, 1976; Schlosser *et al.*,

1976; Ohiwa, 1977; Marchant y Fowke, 1977; Robinson y Schlosser, 1978; Matsuda *et al.*, 1978; Marchant, 1979; Millner *et al.*, 1979; Fowke, 1982; Polne-Fuller *et al.*, 1984; Saga y Sakai, 1984; Polne-Fuller y Gibor, 1984; 1986; Cheney *et al.*, 1986). 3) Inducción de crecimiento y diferenciación mediante hormonas (Fries, 1973, 1980; Chen y Taylor, 1978; Yan, 1984).

Las respuestas obtenidas son promisorias y ellas deben ser optimizadas antes que la aplicación de la técnica de cultivo de tejido sea utilizada en la producción masiva de algas de interés comercial.

Micropropagación en algas marinas chilenas

La micropropagación de algas involucra las siguientes etapas de laboratorio y terreno:

1. Selección genética de las plantas madres portadoras de los caracteres deseados.

2. Establecimiento de procedimientos eficientes de cultivo a partir de explantes primarios hasta la obtención de plántulas completas.
3. Acimatación de las plántulas desde condiciones asépticas a no asépticas (invernadero u otros).
4. Transferencia y evaluación del comportamiento de las plántulas en condiciones de terreno.

La idea de efectuar propagación vegetativa *in vitro* de *Lessonia nigrescens* Bory, *Gracilaria* spp., *Gelidium lingulatum* Kützling y *Gelidium rex* Santelices y Abbott, fue propuesta como una alternativa complementaria de los métodos tradicionales de cultivo de algas en terreno y en laboratorio (macropropagación vegetativa y reproducción mediante esporas) y como una herramienta nueva para mejorar y ampliar sus campos de aplicación.

Los objetivos de nuestra línea de investigación están orientados hacia el desarrollo de metodologías de cultivo que permitan aislar, producir y mantener variedades de algas marinas con caracteres deseables. Pensamos que el desarrollo de la propagación vegetativa *in vitro* permitirá la multiplicación rápida y el cultivo de variedades seleccionadas de algas marinas.

Dado el actual nivel de conocimiento de *Lessonia* y *Gelidium* no estamos aún en una posición que nos permita definir las propiedades requeridas para seleccionar de ellas plantas determinadas. En cambio, en *Gracilaria* parte del material utilizado en nuestros experimentos se obtuvo a partir de dos morfotipos silvestres, reproducidos en el laboratorio vía esporas (Candia *et al.*, en prensa). Estos morfotipos, con diferencias morfológicas y reproductivas evidentes, fueron sometidos a un análisis enzimático para su caracterización genética (Reyes *et al.*, en prensa). Esta información básica reforzará los criterios para la selección de variedades deseables y la micropropagación de esta especie.

Nosotros hemos cultivado diferentes partes del talo de estas algas, puesto que no todos los explantes de tejido responden efectivamente al aplicarse métodos artificiales de propagación. Actualmente cultivamos explantes de estipe, zona de transición

de la lámina y rizooides de *Lessonia* (Collantes y Melo, 1988); explantes apicales, mediales y basales de *Gelidium* (Melo y Collantes, 1988) y explantes apicales y mediales de *Gracilaria* (Collantes *et al.*, 1988). La esterilización del tejido se realiza mediante ultrasonido y procedimientos antisépticos; los explantes fueron obtenidos mediante el uso de hojas de afeitar y sacabocados y cultivados en medios nutritivos semisólidos y líquidos en agua de mar enriquecida (Provasoli o Droop). Estos medios nutritivos han demostrado ser una buena base a la cual pueden adicionarse reguladores de crecimiento, hormonas y extractos naturales de algas. Las condiciones de luz y temperatura para la incubación de los explantes fueron definidas en base a la literatura disponible acerca de cultivo de algas en laboratorio. En las plantas madres, explantes en cultivo, callo y plántulas diferenciadas se están realizando análisis cromosómicos con el objetivo de determinar el cariotipo respectivo.

Los callos obtenidos en cultivo de *Lessonia* se han expresado bajo diferentes formas, indiferenciación de células de origen cortical laxamente agrupadas sobre explantes estipe y zona de transición; células medulares compactas de color amarillo pálido sobre explantes estipe o agrupaciones de células medulares de color café claro en el interior de explantes estipe sin corteza (Collantes y Melo, 1988). Los callos de *Gelidium* se desarrollaron de células corticales en explantes rizoidales y mediales. Los callos de *Gracilaria* se han desarrollado en las superficies de corte del polo basal de explantes apicales y en el polo basal y apical de explantes mediales.

Estos resultados previos nos han permitido demostrar que bajo las condiciones de cultivo usadas en la micropropagación de algas pueden manifestarse dos tipos de expresión morfogénica, yemas adventicias y embriones somáticos, ambos desarrollándose a partir de callos o de células totipotentes.

La gemación adventicia fue observada a partir de células corticales en el polo apical de la superficie de corte de explantes de *Gracilaria* y a partir de células corticales y medulares en el polo apical y basal de la

superficie de corte de los explantes de *Gelidium*. También en ambas algas se originaron yemas laterales, debido al crecimiento renovado de los filamentos laterales que forman la corteza del talo. La formación de yemas adventicias es reconocida por nosotros como una vía muy importante para el clonaje de macroalgas marinas. En *Lessonia*, en las condiciones de cultivo usadas, el proceso de gemación no fue observado.

La embriogénesis somática fue la vía mediante la cual se obtuvieron plantas gametófitas y esporófitas en el cultivo de tejido de *Lessonia*, estas últimas se diferenciaron por modalidades distintas a partir de callos y/o gametófitos, aspecto que necesita ser investigado (Collantes y Melo, 1988). Los conteos cromosómicos efectuados en los gametófitos y esporófitos obtenidos nos indican que nuevos esquemas de autofertilización, manipulación sexual y poliploída podrían ser posibles de inducir. Esta vía de formación de embriones hasta ahora ha sido poco frecuente para los explantes de *Gelidium* (Melo y Collantes, 1988) y recién empieza a manifestarse en *Gracilaria* (Collantes *et al.*, 1988). Los callos de *Gelidium* han originado glóbulos proembrionicos y finalmente embriones bipolares diferenciados en plántulas laminares (Melo y Collantes, 1988).

Ventajas de la micropropagación en algas marinas

Los métodos de micropropagación presentan ventajas que nos proporcionan evidencias de que ellos pueden llegar a ser eficientes complementos de los métodos de cultivo tradicionales.

Una de estas ventajas se atribuye a las dimensiones diminutas del material necesario para iniciar los cultivos, lo que evita que grandes volúmenes de algas tengan que ser transportadas desde el terreno hasta el laboratorio. Las condiciones asépticas de la micropropagación aseguran condiciones saludables óptimas del material de algas (ausencia de virus, bacterias patógenas, epífitas y micosis). Estos cultivos son además fáciles de almacenar y su producción (bancos de tejidos) puede ser mantenida indefinidamente en pequeños recipientes

e inducida a producir según la demanda un gran número de ejemplares.

El cultivo de tejido, las suspensiones celulares y de protoplastos ofrecen además múltiples usos potenciales para la multiplicación clonal. Progresos sustanciales podrán lograrse produciendo plántulas genética y fenotípicamente uniformes vía desprendimiento y cultivo de yemas adventicias y laterales.

De acuerdo a la importancia y necesidad de los estudios de genética en el desarrollo de la acuicultura, la tecnología de la micropropagación permitirá la aplicación de protocolos de selección para inducir diferenciación confiable de células totipotentes en plantas viables. La maricultura de algas se beneficiará notablemente al poder disponer mediante estos nuevos métodos de variedades con propiedades deseables (alta tasa de crecimiento, producción de ficocoloides mejorados, resistencia al epifitismo, etc.). Estos stock de semillas certificadas acelerarán el desarrollo de la maricultura de algas.

Una vez que las técnicas de hibridación somática de células estén refinadas para las especies locales, éstas podrán ser usadas para evitar los largos períodos de desarrollo requeridos en los cruzamientos tradicionales. La variabilidad espontánea o inducida en los cultivos *in vitro* podrá ser usada para la selección de variedades con mayor eficiencia. Experiencias acerca de la aislación, producción y manipulación de protoplastos pueden ofrecer un gran potencial como vehículo para la selección de genes útiles que puedan ser introducidos en algas.

Limitaciones de la micropropagación de algas marinas

Existe aún la necesidad de resolver muchos problemas para asegurar el éxito de la micropropagación de algas marinas. Uno de los aspectos más críticos lo constituye la mantención de los cultivos unialgales estériles, se asume que la cubierta mucilagínosa exudada por la pared celular protege al protoplasma de los drásticos tratamientos químicos y físicos que se usan para lograr cultivos axénicos (hipoclorito, povidona yodada, etanol, agua destilada-cepillado,

ultrasonido, lavados, remoción de paredes celulares). La presencia de algas endófitas se considera como un problema especial aún no solucionado. Estos taxa considerados contaminantes introducen fuentes adicionales de variación que complican la información histológica y las interacciones simbióticas que se producen pueden involucrar, ya sea positiva o negativamente, la iniciación de la formación de células callo.

Otro aspecto crítico de los procedimientos de micropropagación es el control y la optimización de los medios de cultivo, condiciones de luz, temperatura, pH y salinidad. En cuanto a la composición del medio, algunas variedades tienden a formar embriones morfológicamente anormales cuando se agregan reguladores del crecimiento (Ammirato, 1977; *vide* Krikorian, 1982). La inducción de callo y la diferenciación a planta completa debe ser resuelta para cada alga estudiada. Algunas evidencias disponibles sugieren que algunas hormonas tienen efectos fisiológicos en las algas marinas. La respuesta de las especies de algas a las hormonas y otras sustancias orgánicas no podrá ser determinada hasta que estén disponibles para su uso las técnicas para cultivo axénico de algas marinas (Gibor, 1980).

La factibilidad de usar la superficie del océano para el cultivo de plantas ha sido demostrada por la industria de Nori en Japón (Miura, 1977; *vide* Gibor, 1980) y en un menor grado por el desarrollo de los centros de cultivos de *Gracilaria* en Chile. Se considera entonces prioritaria la necesidad de aumentar el conocimiento básico de *Gracilaria* y otras algas de importancia económica, antes de que avances significativos puedan mejorar el actual nivel de cosecha de estos recursos.

Se concluye que a pesar de los problemas que deberán ser enfrentados para la producción de plántulas mejoradas de algas marinas mediante técnicas de micropropagación, los beneficios potenciales que la maricultura podría obtener compensan ampliamente cualquiera de las dificultades ya mencionadas.

Proyecto UV 11/87 Dirección de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad de Valparaíso.

Proyecto FONDECYT 294/89

REFERENCIAS

- ADDICOTT, F.T.; LYON, J.L. (1969) Physiology of abscisic acid and related substances. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 20: 139-164.
- BERLINER, M.D.; WENC, K.A. (1976) Protoplast induction in *Micrasterias* and *Cosmarium*. *Protoplasma*, 89: 389-396.
- BJORK, M.; EKMAN, F.; WALLIN, A.; PEDERSEN, M. (1988) Regeneration of protoplast to whole thalli from the red seaweed *Gracilaria secundata* (Harv.). Abstracts Third International Phycological Congress, Melbourne, Australia, p. 4.
- BRAUN, A.C. (1959) A demonstration of the recovery of crown-gall tumor cell with the use of complex tumors and single-cell origin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45: 932-938.
- BRAUN, E.; AACH, H.G. (1975) Enzymatic degradation of the cell wall of *Chlorella*. *Planta*, 126: 181-185.
- BUGGELN, R.G. (1981) Morphogenesis and growth regulators. In: Lobban, C.S. & M.J. Wynne: The Biology of Seaweeds. Blackwell Scientific Publications, 626-660.
- BURR, F.A.; WEST, J.A. (1971) Protein bodies in *Bryopsis hypnoides*: their relationship to wound healing and branch septum development. *J. Ultrastruc. Res.*, 35: 476-498.
- CANDIA, A.; INFANTE, R.; THIBAUT, M. (1990) Las esporas: una alternativa para el cultivo de *Gracilaria* en Chile. Simposio sobre Recursos vivos y Pesquerías en el Pacífico Sudeste. En prensa.
- COCKING, E.C. (1960) A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles. *Nature*, 187: 962-963.
- COLLANTES, G.; MELO, C.; CANDIA, A. (1988) Micropropagación clonal en *Gracilaria* spp. (Rhodophyta, Gigartinales). VIII Jornadas de Ciencias del Mar-Chile. Comité de las Ciencias del Mar-Chile. R-61-62.
- COLLANTES, G.; MELO, C. (1988) Cultivo de tejido y células en *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta, Lessoniaceae). *Gayana, Bot.*, 45: 291-295.
- COLLANTES, G.; MELO, C.; NORAMBUENA, R. (1988) Micropropagación clonal en *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta, Laminariales). VIII Jornadas de Ciencias del Mar-Chile. Comité de las Ciencias del Mar-Chile. R-61.
- CHEN, J.C.W.; JACOBS, W.P. (1966) Quantitative study of development of the giant coenocyte. *Caulerpa prolifera*. *Am. J. Bot.*, 53: 413-423.
- CHEN, L.C.M.; TAYLOR, A.R.A. (1978) Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. *Can. J. Bot.*, 56: 883-886.
- CHENEY, D.P. (1986) Genetic engineering in seaweeds: applications and current status. *Nova Hedwigia*, 83: 37-43.
- CHENEY, D.P.; MAR, E.; SAGA, N.; VAN DER MEER, J. (1986) Protoplast isolation and cell division in the agar-producing seaweed *Gracilaria* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 22: 238-243.
- EDELSTEIN, T. (1977) Studies on *Gracilaria* sp.: experiments on inocula incubated under greenhouse conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30: 249-259.
- FAGERBERG, W.R.; DAWES, C.J. (1976) Studies on *Sargassum*. I. A light microscopic examination of the wound regeneration process in mature stipes of *S. filipendula*. *Am. J. Bot.*, 63: 110-119.
- FANG, T. (1984) Some genetic features revealed from culturing the haploid cells of kelps. *Hydrobiologia*, 116/117: 317-318.

- FISHER, D.; GIBOR, A. (1987) Production of protoplasts from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phaeophyta). *Phycologia*, 26: 488-495.
- FOWKE, L.C. (1982) Isolation and culture of protoplast from green algae. In L.R. Wetter and F. Constabel (eds), Culture Methods. *National Research Council of Canada*: 57-61.
- FRIES, L. (1963) On the cultivation of axenic red algae. *Physiol. Plant.* 16: 695-708.
- FRIES, L. (1973) Requirements for organic substances in seaweeds. *Botanica Marina XVI*: 19-31.
- FRIES, L. (1980) Axenic tissue cultures from sporophytes of *Laminaria digitata* and *Laminaria hyperborea* (Phaeophyta). *J. Phycol.*, 16: 475-477.
- FUJITA, Y.; MIGITA, S. (1987) Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda and development of fusion products. *Jap: J. Phycol.* (Soroui) 35: 201-208.
- FULCHER, G.R.; McCULLY, M.E. (1969) Histological studies on the genus *Fucus*. IV. Regeneration and adventive embryony. *Can. J. Bot.*, 47: 1643-1649.
- FULCHER, G.R.; McCULLY, M.E. (1971) Histological studies on the genus *Fucus*. V. An autoradiographic an electron microscopic study of the early stage of generation. *Can. J. Bot.*, 49: 161-165.
- GABRIEL, M. (1970) Formation, growth and regeneration of protoplasts of the green alga *Uronema gigas*. *Protoplasma* 70: 135-138.
- GAMBORG, O.L. (1975) Advances in somatic hybridization in higher plants. *Stadler Symp.*, 7: 37-46.
- GAUTHERET, R.J. (1942) Hetero-auxines et cultures de tissus végétaux. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 24: 13-46.
- GELLENBECK, K.W.; CHAPMAN, D.J. (1983) Seaweed uses: the outlook for mariculture. *Endeavour*, 7: 31-37.
- GIBOR, A. (1980) Studies on vegetative propagation of benthic marine algae, p. 152-156. In I.A. Abbott, M.S. Foster y L.F. Eklund (eds.), Pacific Seaweed Aquaculture. California Sea Grant College Program. La Jolla, USA. March, 1980.
- GIBOR, A.; IZAWA, M. (1963) The DNA content of the chloroplasts of *Acetabularia*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 50: 1164-1169.
- GODDARD, R.H.; DAWES, C.J. (1979) An ultrastructural and histochemical study of the wound response of *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpales). *J. Phycol.*, 15: (supp.), 17.
- GOLDSTEIN, M.C. (1973) Regeneration and vegetative propagation of the agarophyte *Gracilaria debilis* (Forsskal) Boerg. (Rhodophyceae). *Botanica Marina XVI*: 226-228.
- GRESSHOFF, P.M. (1976) Culture of *Chlamydomonas reinhardtii* protoplasts in defined media. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3: 457-464.
- GUSEV, M.V.; TAMBIEV, A.H.; KIRIKOVA, N.N.; SHELYASTINA, N.N.; ASLANYAN, R.R. (1987) Callus formation in seven species of agarophyte marine algae. *Marine Biology*, 95: 593-597.
- KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. (1987) Isolation of protoplasts from zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell (Phaeophyta). *Plant Science*, 50: 189-194.
- KRIKORIAN, A.D. (1982) Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biol. Rev.*, 57: 151-218.
- LARPENT-GOURGAUD, M.; AUMAITRE, M.P. (1987) Production et régénération de protoplastes chez *Draparnaldia mutabilis* (Chaetophorales, Chlorophyta). *Cryptogamie, Algologie*, 8: 101-106.
- LEE, T.F. (1985) Aposporous gametophyte formation in stipe explants from *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *Botanica Marina XXVIII*: 179-185.
- LIU, X.; GORDON, M.E. (1987) Tissue and cell culture of New Zealand *Pterocladia* and *Porphyra* species. *Hydrobiologia*, 151/152: 147-154.
- LOPEHANDIA, J. (1986) Problemas y perspectivas en la utilización de las algas chilenas. *Monografías Biológicas*, 4: 29-43.
- MARCHANT, H.J. (1979) Microtubules cell wall deposition and determination of plant cell shape. *Nature*, 278: 167-168.
- MARCHANT, H.J.; FOWKE, L.E. (1977) Preparation, culture and regeneration of protoplasts from filamentous green algae. *Can. J. Bot.*, 55: 3080-3086.
- MATSUDA, Y.; TAMAKI, S.; TSUBA, Y. (1978) Mating type specific induction of cell wall lytic factor by agglutination of gametes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 19: 1253-1261.
- MELCHERS, J. (1977) Microbial techniques in somatic hybridization by fusion of protoplast. In B.R. Brinkley & K.R. Porter (eds.). *International Cell Biology*, Rockefeller University Press, New York. 207-215.
- MELO, C.; COLLANTES, G. (1988) Micropropagación clonal en *Gelidium* spp. (Rhodophyta, Gelidiales). VIII Jornadas de Ciencias del Mar-Chile. Comité de las Ciencias del Mar-Chile. R-61.
- MILLNER, P.A.; CALLOW, M.E.; EVANS, L.V. (1979) Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinales* (L.) Link. *Planta*, 147: 174-177.
- MISAWA, M. (1977) Production of natural substances by plant cell cultures described in Japanese patents. In W. Barz, E. Reinhard & M.H. Zenk (eds.). *Plant Tissue Culture and its Biotechnology*, Springer, New York. 17-26.
- MOSS, B.; MARSLAND, A. (1976) Regeneration of *Enteromorpha*. *Br. Phycol. J.*, 11: 309-313.
- NEISH, A.C.; FOX, C.H. (1971) Greenhouse experiments on the vegetative propagation of *Chondrus crispus* (Irish Moss). Atlantic Regional Laboratory, Nat. Res. Council Canada. *Halifax Tech Rept.*, 12.
- OHIWA, T. (1977) Behavior of culture fusion products from *Zygnema* and *Spirogyra* protoplasts. *Protoplasma*, 97: 185-200.
- PERRONE, C.; FELICINI, G.P. (1972) Sur les bourgeons adventifs de *Petroglossum nicaense* (Duby) Schotter (Rhodophycées, Gigartinales) en culture. *Phycologia*, 13: 187-194.
- PERRONE, C.; FELICINI, G.P. (1976) Les bourgeons adventifs de *Gigartina acicularis* (Wulf). Lamour. (Rhodophyta, Gigartinales) en culture. *Phycologia*, 15: 45-50.
- PETIARD, V.; DESHAYES, A. (1986/87) Plant biotechnology as a tool for research and production. *Nestlé Research News*, 1986/87: 7-17.
- POLNE-FULLER, M.; GIBOR, A. (1984) Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion and protoplast regeneration. *J. Phycol.*, 20: 609-616.
- POLNE-FULLER, M.; GIBOR, A. (1986) Calluses, cells and protoplasts in studies towards genetic improvement of seaweeds. *Aquaculture*, 57: 117-123.
- POLNE-FULLER, M.; GIBOR, A. (1987) Calluses and callus-like growth in seaweeds: Induction and culture. *Hydrobiologia*, 151/152: 131-138.
- POLNE-FULLER, M.; BINIAMINOV, M.; GIBOR, A. (1984) Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. *Hydrobiologia*, 116/117: 308-313.

- POLNE-FULLER, M.; SAGA, N.; GIBOR, A. (1986) Algal cell, callus and tissue cultures and selection of algae strains. *Nova Hedwigia*, 83: 30-36.
- REYES, E.; CANDIA, A.; GALLEGUILLOS, R. (1990) Caracterización genética de variantes morfológicas de una población natural de *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales) de Bahía San Vicente, Chile. En prensa.
- ROBINSON, D.G.; SCHLOSSER, U.G. (1978) Cell wall regeneration by protoplasts of *Chlamydomonas*. *Planta*, 141: 83-92.
- SAGA, N. (1984) Isolation of protoplasts from edible seaweeds. *Bot. Mag. Tokyo*, 97: 423-427.
- SAGA, N.; SAKAI, Y. (1977) Studies on the morphogenesis of Laminariales plants. *Bull. Jap. Soc. Phycol.* 25 (suppl.): 297-301.
- SAGA, N.; SAKAI, Y. (1983) Axenic tissue culture and callus formation of the marine brown algae *Laminaria angustata*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 49: 1561-1563.
- SAGA, N.; SAKAI, Y. (1984) Isolation of protoplasts from *Laminaria* and *Porphyra*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50: 1085.
- SAGA, N.; UCHIDA, T.; SAKAI, Y. (1978) Clone *Laminaria* from single isolated cell. *Bull. Jap. Soc. Sc. Fish.*, 44: 87.
- SAGA, N.; MOTOMURA, T.; SAKAI, Y. (1982) Induction of callus from the marine brown alga *Dictyosiphon foeniculaceus*. *Plant & Cell Physiol.*, 23: 727-730.
- SAGA, N.; POLNE-FULLER, M.; GIBOR, A. (1986) Protoplasts from seaweeds: Production and Fusion. *Nova Hedwigia*, 83: 37-43.
- SANTELICES, B. (1983) Algas marinas bentónicas como recursos naturales renovables en Chile. En Arana, P. (ed). Trabajos presentados a la Conferencia Internacional sobre Recursos Marinos del Pacífico: 269-278.
- SCHIFF, J.A.; QUATRANO, R.S.; HARRIS, G.C.; LEGGS, L.; STALEY, J. (1972) Development of single cells from mechanically disrupted thalli of *Prasiola stipitata* Suhr. *Biol. Bull.*, 143: 476.
- SCHLOSSER, U.G.; SACHS, H.; ROBINSON, D.G. (1976) Isolation of *Chlamydomonas*. *Protoplasma*, 88: 51-64.
- SERNAP (1988) Anuario Estadístico de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Servicio Nacional de Pesca. Santiago, Chile.
- SKOOG, F. (1947) Growth substances in higher plants. *Biochemistry*, 16: 529-564.
- STEWART, F.C.; CAPLIN, S.M. (1951) A tissue culture from potatoe tuber: the synergistic action of 2,4-D and coconut milk. *Science*, 113: 518-520.
- STEWART, F.C.; MOHAN RAM, H.Y. (1961) Determining factors on cells growth: some implications for morphogenesis in plants. *Adv. Morphogen.*, 1: 189-266.
- STEWART, F.C.; KENT, A.E.; MAPES, M.O. (1967) Growth and organization in cultured cells: sequential and synergistic effects of growth regulating substances. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 144: 326-334.
- STORTMEYER, V.T.; BRITT, O.K. (1965) The behaviour of tissue cultures from English and Algerian Ivy in different growth phases. *Am. J. Bot.*, 52: 805-810.
- TAKEBE, I. (1975) The use of protoplasts in plant virology. *Ann. Rev. Phytopath.*, 13: 105-125.
- TANG, Y. (1982) Isolation and cultivation of the vegetative cells and protoplasts of *Porphyra suborbiculata* Kjellm. *J. Shandong Coll. of Oceanology* 12: 37-50.
- VASIL, I.K.; AHUGA, M.R.; VASIL, V. (1979) Plant tissue cultures in genetics and plant breeding. *Adv. Genet.*, 20: 127-215.
- WAREING, P.F.; RYBACK, G. (1970) Abscisic Acid. A newly discovered growth regulating substance in plants. *Endeavour* 29: 84-88.
- WENT, F.W.; THIMANN, K.V. (1937) *Phytohormones*. McMillan, New York, 294 pp.
- WHITE, P.R. (1933) Plant tissue culture: results of preliminary experiments on the culturing of isolated stems and tips of *Stellaria media*. *Protoplasma*, 19: 97-117.
- YAN, Z.M. (1984) Studies on tissue culture of *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Hydrobiologia*, 116/117: 314-316.
- ZHANG, J. (1982) Some experiments and observations on the tissue and cell culture of *Undaria pinnatifida*. *J. Shandong Coll. of Oceanology*, 12: 29-38.
- ZHANG, D. (1983) Study on the protoplast preparation culture and fusion of somatic cells from two species of green algae *Ulva linza* and *Monostroma angicava* Kjellm. *J. Shandong Coll. of Oceanology*, 13: 57-65.
- ZHAO, H.; ZHAN, H. (1981) Isolation and cultivation of the vegetative cells of *Porphyra yezoensis*. *J. Shandong Coll. of Oceanology*, 11: 61-66.