

Efecto de las condiciones de cultivo en la germinación de esporas de *Chondrus crispus* Stackh, (Gigartinales, Rhodophyta).

M.A. Tasende y M^a.I. Fraga

Dpto. Biología Vegetal, Univ. Santiago de Compostela
Campus Universitario. 15706. Santiago de Compostela. España

Résumé : Ce travail expose les résultats de l'influence des facteurs température, photopériode, intensité lumineuse, milieu de culture, salinité, pH et quelques facteurs de croissance sur la germination des carpospores et tétraspores de *Chondrus crispus* en culture.

Les meilleurs pourcentages de germination ont été observés en culture dans les conditions suivantes 14-19 °C, photopériode de 16:8, intensité lumineuse 20-30 $\mu\text{E. m}^{-2} \text{s}^{-1}$, milieux de culture MP1 et SWM-3, pH 7.5-8.0, salinité 27-30 ‰ en présence d'hormones BAP et ANA (1 mg./l.).

Abstract : This paper reports the results of investigations out in order to determine the effect of some factors light intensity, growth regulators, culture medium, pH, salinity, photoperiod and temperature on the germination of carpospores and tetraspores of *Chondrus crispus* in culture.

The higher germination percentages were obtained at light intensities of 20-30 $\mu\text{E. m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a 16:8 photoperiod, in both culture media SW-3 and MP1, at pH 7.5-8.0, salinity 27-30 ‰ and temperature 14-19 °C the presence of the growth regulators BAP and ANA (1 mg./l.).

INTRODUCCIÓN

Chondrus crispus Stackh. (Gigartinales, Rhodophyta), es una especie de elevado interés económico puesto que de ella se extrae carragen, polisacárido sulfatado de gran aplicación industrial.

Aunque importantes aspectos relacionados con la germinación de carposporas y tetrasporas de *Chondrus crispus* se conocen desde hace tiempo (Darbishire 1902, Kylin, 1917, Rosenvinge, 1931, Chemin, 1937, Weber, 1960), fue en la década de los 70 cuando por primera vez se realizaron estudios, mediante cultivos en laboratorio, que permitieron conocer la influencia de determinados factores ambientales tales como temperatura, fotoperíodo, iluminación, salinidad... en la germinación de dichas esporas.

En general las esporas utilizadas en esos estudios eran producidas por plantas desarrolladas en poblaciones naturales y recolectadas cuando se encontraban en fase de esporulación. La mayoría de las algas utilizadas fueron recogidas en la costa atlántica canadiense y norteamericana, y en menor medida en algunas localidades de la costa europea. Por los datos que disponemos, no parece que se hallan realizado investigaciones a este respecto con esporas procedentes del litoral ibérico.

Está plenamente admitido que las características de germinación, así como las primeras fases de desarrollo, de carposporas y tetrasporas son básicamente iguales. Asimismo con

frecuencia, se indica que ambos tipos de esporas germinan bien en cultivo cuando las condiciones de los mismos son similares a las de las poblaciones naturales (Prince & Kingsbury, 1973). Sin embargo, dado el amplio rango de condiciones ambientales existentes dentro del área de distribución de esta especie, así como el elevado grado de variabilidad de la misma observado en las poblaciones naturales, los resultados obtenidos por diferentes investigadores en relación a las condiciones de cultivo más favorables para la germinación de esporas, presentan ciertas diferencias (Tabla I).

Es evidente que todavía hay numerosos aspectos sin resolver en relación a la influencia de factores ambientales en la germinación de las esporas. Con este trabajo pretendemos contribuir a ampliar los conocimientos en este tema.

TABLA I

Condiciones de cultivo más favorables para germinación de espóra de *Chondrus crispus*.

Autor	T (°C.)	Fot.	Iluminación	Medio	Salinidad (‰)	pH
Prince (1971)	11.7-21.1	16:8	0.35 mw. m. s.	F/2	28.6-30.8	8.1-8.3
Chen & McLachlan (1972)	15	16:8	60 $\mu\text{E m.}^{-2} \text{s.}^{-1}$	SWM-3		
Burns & Mathieson (1972)	11	12:12	130-700 ft.c.	F/2	35	
Prince & Kingsbury (1973)	11.7	16:8	130 ft.c.	F/2	29-31	8.1-8.3
Chen & Taylor	15	16:8	500 ft.c.	SWM-3		
Tveter & Mathieson (1976)	15	12:12	5 382 lux	Agua de mar con fosfatos		
Chen (1977)	15	16:8	20-80 $\mu\text{E m.}^{-2} \text{s.}^{-1}$	SWM-3		
Guiry (1979)	15-17	16:8	1 400-1 500 lux	Provasoli		

T. Temperatura

Fot. Fotoperíodo

Medios de cultivo : F/2. Guillard & Ryther (1962)

SWM-3 Chen *et al.* (1969)

Provasoli. Provasoli (1966)

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se ha desarrollado en 2 fases, una primera de carácter exploratorio que tuvo como finalidad el determinar cuales eran los valores de intensidad luminosa, temperatura,

fotoperíodo, así como medio de cultivo, pH y salinidad del mismo, más favorables para la germinación. Los resultados obtenidos han servido de referencia para desarrollar la segunda parte, en la que se ha prestado especial atención a los medios de cultivo e intensidades luminosas que habían ofrecido mejores resultados. Asimismo en esta segunda fase se analizó la influencia que sobre la germinación tuvieron las fitohormonas que se detallan más adelante.

Las esporas utilizadas se han obtenido a partir de carposporófitos, desarrollados sobre gametófitos femeninos, y de tetrasporófitos recolectados en una población natural, desarrollada en el nivel inferior de la franja intermareal, de un área rocosa y batida de la Ensenada de San Francisco (Muros, La Coruña). Para el traslado al laboratorio, se introdujeron estas plantas en botes de plástico con agua de mar, que se transportaron en nevera.

En el laboratorio se procedió a una esterilización superficial de los talos, según Druehl & Hsiao (1969), con la utilización de la mezcla de antibióticos propuesta por Guillard (1968). Este tratamiento ofreció resultados satisfactorios, puesto que la mayor parte de nuestros cultivos no presentaron apenas problemas de contaminación.

El material utilizado en la primera fase fue recolectado en Diciembre de 1988 y una vez esterilizado se mantuvo en agua de mar esterilizada, con una salinidad del 35 ‰ y pH de 7,9, a 14-16 °C, 10-20 $\mu\text{E. m.}^{-2} \text{ s.}^{-1}$ (aproximadamente 500-1 000 lux) y fotoperíodo de 10 horas de luz. La iluminación fue suministrada con tubos fluorescentes de luz blanca fría Powertube 40 V, y medida con luxímetro (Digital Lux Meter Mod. 101).

Las algas utilizadas en la segunda parte de este estudio fueron recogidas en agosto de 1989 y una vez esterilizadas se introdujeron en medio MP1 a 20 °C, con 16 horas de luz y 10-18 $\mu\text{E. m.}^{-2} \text{ s.}^{-1}$ de intensidad luminosa. El pH del medio fue 8.0 y la salinidad 27 ‰.

En ambas condiciones la liberación de las esporas, tanto carposporas como tetrasporas, se inició a las 24 horas de la instalación de los talos en las cámaras de cultivo (Sherer, mod Cel 37-14) y se prolongó por un período de hasta 30 días. Mientras duró la fase de liberación de la esporas, el fondo de los recipientes que contenían los talos se cubrió con portaobjetos, a la superficie de los cuales se fijaron las esporas. Los portaobjetos con las esporas fueron transferidos a placas Petri (100 x 15 mm), iniciándose posteriormente los estudios de germinación.

En el primer estudio exploratorio se han utilizado básicamente carposporas. En la Tabla II se detallan las condiciones de cultivo analizadas. El número de esporas sembradas para cada serie de repeticiones de este estudio fue aproximadamente de 1 000 esporas. Se han realizado todas las posibles combinaciones de cada uno de los estados de las variables. Asimismo, los medios ensayados eran renovados cada 15 días y antes de ser desechados se anotaban los valores de pH y salinidad por si se habían producido modificaciones.

En la Tabla III se expone el diseño experimental de las condiciones utilizadas en la segunda parte del trabajo, indicando el número aproximado de esporas fijadas a los portaobjetos utilizadas en cada caso. Las condiciones de cultivo fueron 14 °C, 16 horas de luz y salinidad y pH del medio de 27 ‰ y 7.5-8.0 respectivamente. Las fitohormonas utilizadas fueron AIA (ácido indol acético), AIB (ácido indol butírico), ANA (ácido naftalen acético), BAP (bencil amino purina) y GA3 ácido giberélico, siendo la concentración de las mismas de 1 mg de fitohormona por litro de medio de cultivo.

TABLA II

Condiciones de cultivo utilizadas en la primera fase.

MEDIOS DE CULTIVO :	AGUA DE MAR, MP1, MP2, EM, ES y VS.
TEMPERATURA :	14, 16 y 26 °C.
INTENSIDAD LUMINOSA :	12, 20, 40 y 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
pH :	7.5-8 y 8-8.5
SALINIDAD :	23, 27 y 33 ‰
FOTOPERIODO :	12:12
EPORA :	CARPOSPORA

Medios de cultivo : EM.- Erdschreiber-Föyn (1934) modificado.
 ES.- Provasoli (1966)
 MP1.- Abèlard (1978)
 MP2.- Abèlard (1978)
 VS.- Von Stosch (1967)

En esta segunda parte se realizó un análisis multifactorial para determinar los efectos principales y los términos de interacción de los factores medio, espora, iluminación y fitohormona, en el que fue necesario proceder a una transformación logarítmica de las variables, puesto que se encontró, en todos los casos, una interacción transformable al analizar los residuos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la primera fase de este estudio se muestran en la Tabla IV y gráficas de la Figura 1.

TABLA III

Número de esporas y condiciones de cultivo utilizadas en la segunda fase del trabajo.

HORMONA	AIA			AIB			ANA			BAP			CA3			
	20	24	30	20	24	30	20	24	30	20	24	30	20	24	30	
ILUMINACION ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)																
MP1	C	2000	6700	8000	5300	4500	8400	7800	3200	7200	2400	3500	7100	150	3300	2200
	T	130	100	200	300	100	1100	100	900	850	200	650	4100	800	300	400
SWM	C	3500	6000	6500	2100	850	400	1800	900	3000	220	550	4700	200	300	3000
	T	200	650	600	150	250	200	9400	9500	500	800	200	400	150	9000	100

HORMONA : AIA (ac. indol acético), AIB (ac. indol butirico), ANA (ac. naftalen acético), BAP (bencil amino purina) y GA3 (ac. giberélico). (1 mg./l.)

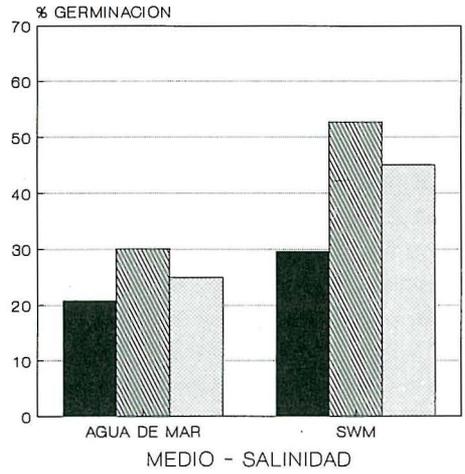
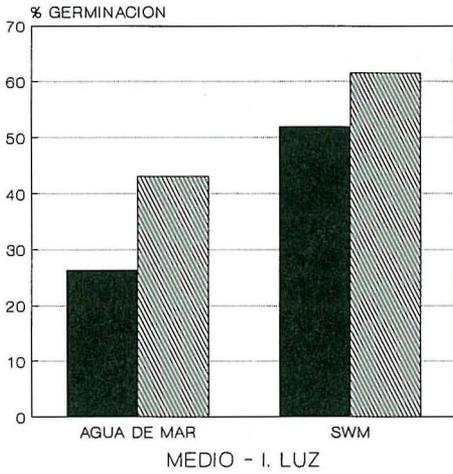
TEMPERATURA : 20 °C.

FOTOPERIODO : 16:8

pH : 7.5-8.0

SALINIDAD : 27 ‰

ESPORAS : C (carposporas) y T (tetrasporas)



I. Luz. Intensidad luminosa $\mu E m^{-2} s^{-1}$

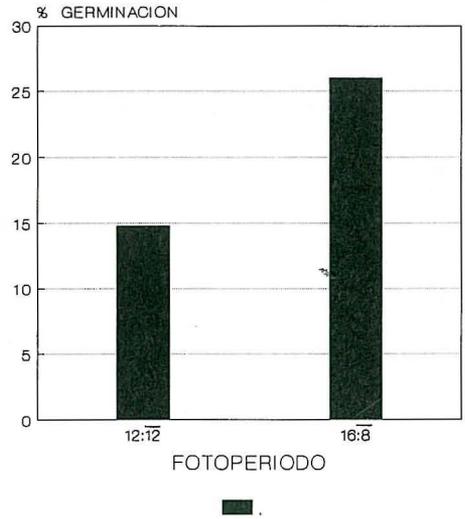
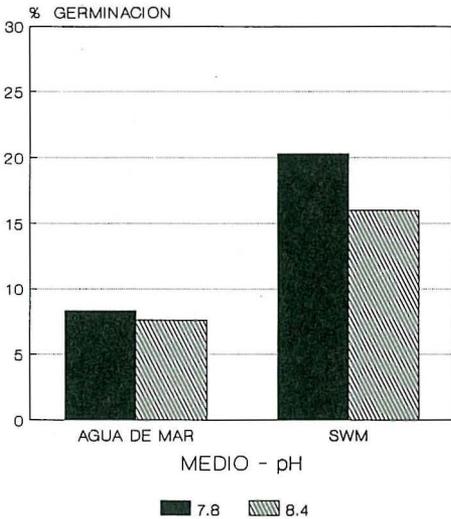


Fig. 1 : Porcentajes de germinación obtenidos en la primera fase, en la cual solo se sembraron carposporas.

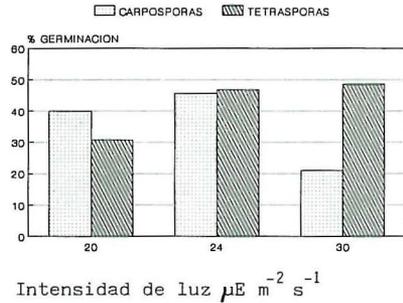
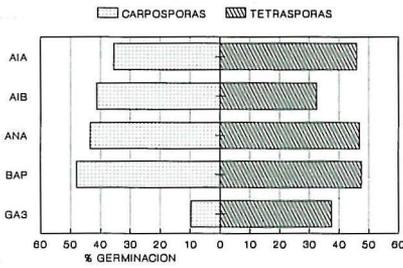
De los medios analizados en la primera fase, agua de mar sin adición de nutrientes fue el que ofreció peores resultados, mientras que en el medio MP1 fue donde se obtuvieron los porcentajes de germinación más elevados. En cuanto a la salinidad y pH del medio de cultivo podemos señalar que los mejores porcentaje de germinación se produjeron a valores de 27-30 ‰ y 7.5-8.0 respectivamente. Aunque son escasos los trabajos en los que se ha estudiado el efecto de estos dos factores sobre la germinación se pueden destacar los de Prince (1971) y Prince & Kingsbury (1973), que anteriormente a nosotros había obtenido resultados similares.

Con respecto a temperatura y fotoperíodo nuestros resultado coinciden en general con los expuestos anteriormente en otros trabajos (Prince, 1971 ; Chen & McLachlan, 1972 ; Chen & Taylor, 1980 ; Guiry, 1979), siendo los valores más favorables 14-19 °C y 16 horas de luz respectivamente.

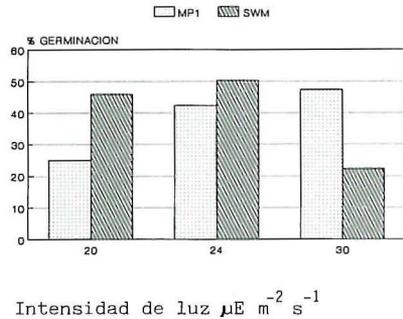
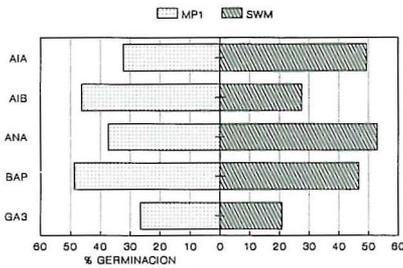
Hemos observado que intensidades de luz por debajo de los 12 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ causaban una disminución en el porcentaje de germinación y que intensidades por encima de los 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ producían decoloración de esporas y a valores por encima de los 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la decoloración era tan intensa que en la mayor parte de los casos producía la muerte de las esporas. Es por eso por lo que en la segunda parte de este estudio hemos considerado importante analizar con más detalle intensidades de luz dentro de los límites 20-40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, evitando las más próximas al límite superior. Estos valores ya han sido señalados como más eficaces por Prince & Kingsbury (1973) y Guiry (1979). En la bibliografía consultada este es quizás uno de los factores en el que se aprecian más discrepancias entre los diferentes investigadores, cubriendo todo un abanico desde 20 hasta 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Algunos autores como Prince (1971) y Chen & McLachlan (1972) destacaban como las intensidades óptimas próximas a 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, otros como Guiry (1979) ofrecen valores más bajos (26-30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y otros como Chen & Taylor (1980) y Tveter & Mathieson (1976) entre 100-110 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En la segunda parte del trabajo, después de analizar las interacciones espóra-hormona, media-hormona, espóra-iluminación, medio-espóra-hormona y medio-iluminación-hormona (Fig. 2), se ha podido constatar que un mes después de la iniciación del cultivo, los factores que más influyen en la germinación de las esporas son hormona e iluminación. El porcentaje de germinación, aunque no es demasiado elevado es claramente superior a los observados por Chen & McLachlan (1972) y Hanic (1973).

Por los resultados obtenidos, el medio de cultivo es el factor que menos influye en la germinación de esporas de *Chondrus crispus*, de los que nosotros hemos estudiado en esta segunda fase. En cuanto a la germinación de esporas no aparecieron diferencias significativas en ambos medios, tanto para carposporas ni tetrasporas. Podemos así mismo afirmar que las dos hormonas que proporcionaron mejores resultados para ambos medios fueron BAP y ANA, aunque en MP1, AIB dio lugar a porcentajes de germinación elevados. Por otro lado, señalamos que SWM-3 da mayores porcentajes de germinación a valores bajos de intensidad de luz, mientras MP1 presenta mejores resultados a valores altos, no coincidiendo nuestros resultados con los obtenidos por Chen (1977) y Chen & Taylor (1980) que señalan que para SWM-3 los mayores porcentajes fueron obtenidos a intensidades de luz entre 80-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

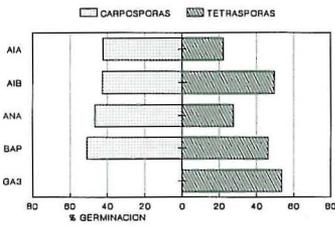


Porcentaje de germinación para el total de los medios.

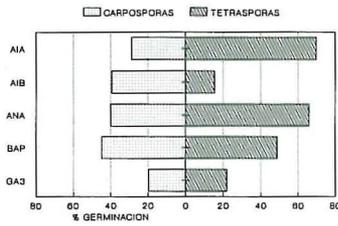


Porcentaje de germinación para carposporas y tetrasporas.

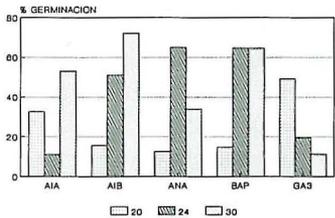
MP1



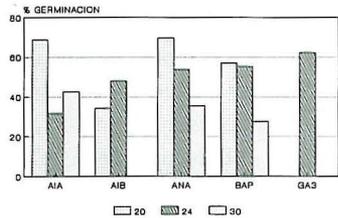
SWM



MP1



SWM



Intensidad de luz $\mu E m^{-2} s^{-1}$

Intensidad de luz $\mu E m^{-2} s^{-1}$

Fig. 2 : Porcentajes de germinación de la segunda fase.

Al igual que los resultados obtenidos por Prince (1971), los porcentajes más elevados de germinación de carposporas se produjeron a intensidades de iluminación baja (20-24 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que las tetrasporas los alcanzaron a mayores iluminaciones. Como ya se ha indicado anteriormente, en ocasiones se ha considerado que los valores óptimos de intensidad luminosa, para la germinación de las esporas, eran superiores a los experimentados por nosotros en este trabajo, 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Chen & McLachlan, 1972) 30-60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bird *et al.*, 1979).

Las 5 hormonas ensayadas se pueden ordenar en serie decreciente de intensidad de influencia positiva sobre la germinación de las esporas de la siguiente manera : BAP, ANA, AIA, AIB y GA3, si consideramos el conjunto de esporas. Sin embargo, si se analizan por separado los comportamientos de carposporas y tetrasporas, se puede apreciar que hay notables diferencias en los efectos de GA3 sobre tetrasporas, en relación a carposporas. Queremos destacar que las únicas referencias bibliográficas de la utilización de fitohormonas en cultivo de *Chondrus crispus* se refieren al efecto de las mismas sobre crecimiento y desarrollo (Chen, 1977, Chen & Taylor, 1978), sin hacer alusión alguna a la germinación.

TABLA IV

Porcentaje de germinación obtenido en la primera fase del cultivo.

		pH		ILUMINACION ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		SALINIDAD (‰)		
		7.5	8.4	12	20	23	27	33
MEDIO		<hr/>						
	\bar{X}	8.3	7.6	26.4	43.1	20.8	30	25
AGUA DE MAR	s.d.	0.8	0.7	1	1.5	1.2	1	0.6
	\bar{X}	20.3	16	52	61.5	29.6	52.7	45
SWM	s.d.	0.6	0.9	0.8	1.2	0.7	1.1	1.2

 \bar{X} - Valor medio.

s.d.- desviación típica

Como ya se ha observado en repetidas ocasiones, (Chen & Taylor, 1980 ; Guiry, 1979) el comportamiento de *Chondrus crispus* en el laboratorio, no solo depende de las condiciones de cultivo, sino también de característica propias de las poblaciones naturales de origen, por lo que a la hora de establecer comparaciones entre los resultados aquí obtenidos con los de otros autores, resulta extraordinariamente difícil determinar cual es la causa de las diferencias observadas, ya que a la compleja interacción de variables que tiene lugar en todos los cultivos, hay que sumarle las propias de cada población natural que ha servido como material de partida.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento al Dr. Martínez Cortizas por su ayuda en el estudio estadístico.

BIBLIOGRAFIA

- ABELARD, C., 1979. Influence de divers milieux sur la croissance du thalle d'*Apoglossum ruscifolium* (Turner) J. Agard (Rhodophycees, Ceramiales). *Rev. Algol. N.S.*, XIV, 4 : 343-357.
- BIRD, N.L. et al, 1979. Effects of temperature, light and salinity on growth in culture of *Chondrus crispus*, *Furcellaria lumbicalis*, *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales, Rhodophyta) and *Fucus serratus* (Fuciales, Phaeophyta). *Bot. Mar.*, 22 : 521-527.
- BURNS, R.L. & A.C. MATHIESON, 1972. Ecological studies of economic red alga : II. Culture studies of *Chondrus crispus* Stackh and *Gigartina stellata* (Stackh) Batters. *J. Exp. Biol. Ecol.*, 8 : 1-6.
- DARBISHIRE, O.V., 1902. *Chondrus*. Liverpool Maine Biology "Committee". *Memoir*, 9 : 1-42.
- DRUEHL, L.D. & S.I.C. HSIAO, 1969. Axenic culture of Laminariales in defined media. *Phycologia*, 8 : 47-49.
- CHEMIN, M.E., 1937. Le développement des espores chez les Rhodophycees. *Rev. Gen. Bot.*, 49 : 205-535.
- CHEN, L.C.-M., 1977. Morphological and culture studies of two strains of *Chondrus crispus* Stackhouse. Ph. D. Thesis, University of New Brunswick, Frederiton, N.B. Canada. 190 p.
- CHEN, L.C.-M. et al., 1969. *Bonnemaisonia haemifera* Hariot in nature and culture. *J. Phycol.* 5 : 211-220.
- CHEN, L.C.-M. & J. McLACHLAN, 1972. The life history of *Chondrus crispus* in culture. *Can. J. Bot.*, 50 : 1055-1060.
- CHEN, L.C.-M & A.R.A. TAYLOR, 1978. Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. *Can. J. Bot.*, 56 : 883-886.
- CHEN, L.C.-M & A.R.A. TAYLOR, 1980. Investigations of distinct strains of *Chondrus crispus* Stackh. II. Culture studies. *Bot. Mar.*, XXIII : 441-448.
- FÖYN, B., 1934. Lebenszyklus, Cytologie und sexualität der Chlorophyceen *Cladophora suhriana* Kützing. *Arch. Protistenk.* 83 : 1-56.
- GUILLARD, R.R.L., 1968. A simplified antibiotic treatment for obtaining axenic culture of marine phytoplankton. Mimeographed document. Woods Hole Oceanographic Inst., Marine Biological Laboratory, 9 p.
- GUILLARD, R.R.L. & J.H. RYTHYR, 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8 : 229-239.
- GUIRY, M.D., 1979. The life history in laboratory culture of an isolate of *Chondrus crispus* Stackh. (Rhodophyta) from Scotland. *Br. Phycol. J.*, 14 : 1-124.
- HANIC, L.A., 1973. Cytologie and genetics of *Chondrus crispus* Stackh. In Harvey, M.J. & McLachlan, J. (eds.) *Chondrus crispus* : 34-52.
- KYLIN, H., 1917. Über die Kälteresistenz der Meeresalgen. *Ber. Dent. Bot. Ges.*, 35 : 370-384.
- PRINCE, J.S., 1971. An ecological study of marine red alga *Chondrus crispus* at Plymouth, Massachusetts. Ph. Thesis. Cornell University, 193 p.
- PRINCE, J.S. & J.M. KINGSBURY, 1973. The ecology of *Chondrus crispus* in the waters of Plymouth, Massachusetts. I. Ontogeny vegetative, Anatomy, reproduction and Life Cycle. *Amer. J. Bot.*, 60 : 956-963.
- PROVASOLI, I., 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In Culture and Collections of Algae. Proceedings of the U.S.-Japan Conference (Hakone) : 63-75.
- ROSENVINGE, L.K., 1931. The marine algae of Denmark contributions to their natural history. IV. Rhodophyceae (Gigartinaeae). *kgl. Dan. Vidensk. Selsk. Ser.*, 7, 7 : 449-509.
- TVETER, E. & A.C. MATHIESON, 1976. Sporeling coalescence in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). *J. Phycol.*, 12 : 110-118.
- VON STOSCH, H.A., 1964. Wirkungen von Iod und Arsenit auf Meeresalgen in Kultur. Proc. IV Intern. Seaweed Symposium Biarritz 1961, de Virville et Feldman et., *Pergamon Press* : 142-150.
- WEBER, W., 1960. Keimungsphysiologische Untersuchungen an *Chondrus crispus*. *Zeitschr. Bot.*, 48 : 251-257.