

## Proceso de obtención de conchocelis de *Pyropia* sp. en laboratorio

### Process for the obtention of conchocelis of *Pyropia* sp. in laboratory

Hernández-Carrizales Verónica<sup>1</sup>, Pérez-Bravo Elizabeth<sup>2</sup>, Marco A. Cadena-Roa<sup>2</sup>, Hernández-Jaime Rito Jesús<sup>3</sup>, Pacheco-Vega Juan Manuel<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Biología, Puebla, México.

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), Unidad Pichilingue, La Paz, Baja California Sur, México.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de Nayarit (UAN), Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera, Programa de Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias (CBAP) Nayarit, México.

**Recibido:** mayo 02 de 2020

**Aceptado:** junio 28 de 2020

### RESUMEN

Las algas rojas (Rhodophytas) presentan cada vez una mayor importancia ecológica y biotecnológica, por lo que es necesario generar las bases del conocimiento que permitan la aplicación técnica de mantenimiento y producción de la fase conchocelis en condiciones de laboratorio. El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de la fase conchocelis de *Pyropia* sp. en laboratorio, para ello se colectaron del medio silvestre talos de esta especie y fueron transportados al laboratorio, donde fueron separados los gametofitos masculinos de los femeninos y colocados en agua de mar enriquecida con medio Jack's Classic (J R Peters Inc.). Se mantuvieron bajo condiciones estables de incubación: 15±1°C y ciclo día: oscuridad (12:12). Una vez que los gametangios estuvieron maduros, fueron seleccionados y cortados los gametofitos para favorecer la liberación y fecundación de las esporas, dichos cortes fueron transferidos a un medio de cultivo estéril y estuvieron en observación hasta que fueron evidentes las características filamentosas distintivas de la fase de desarrollo de conchocelis. Con estos resultados, se muestra una metodología que permite generar conchocelis de *Pyropia* sp. en condiciones de laboratorio.

**PALABRAS CLAVE:** *Pyropia*, laboratorio, gametofitos, cultivo.

### ABSTRACT

The ecological and biotechnological importance of red algae (Rhodophyta) is increasing, hence, a knowledge base is needed to allow the technological application of maintenance and production of the conchocelis phase under laboratory conditions. The objective of this study was to obtain the conchocelis phase of *Pyropia* sp. in laboratory. Thalli of *Pyropia* sp. were collected in the wild and transported to the laboratory where male and female gametophytes were separated and placed in seawater enriched with Jack's Classic medium (JR Peters Inc.). Gametophytes were maintained under stable incubation conditions as follows: 15±1°C and photoperiods of 12:12 (night:day). Once gametangia were ripe, gametophytes were selected and cut to benefit the release and fecundation of spores. Gametophyte cuts were transferred into a sterile culture medium and maintained under visual observation until the filamentous characteristics intrinsic of the development phase of conchocelis were detected. These results show a methodology that allows to generate conchocelis of *Pyropia* sp. under laboratory conditions.

**KEY WORDS:** *Pyropia*, laboratory, gametophytes, culture.

### INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos el ser humano ha tenido particular interés en las macroalgas, las cuales han sido utilizadas como fuentes de alimento directo principalmente en el continente asiático, donde estos organismos eran asociados al bienestar físico, pero en la actualidad han cobrado importancia alrededor del mundo por sus múltiples aplicaciones y beneficios (Mouritsen, 2013). Las macroalgas rojas (Rhodophytas) se han señalado por poseer diversos metabolitos biológicos activos en comparación con las algas café (Heterokontophyta) y verdes (Chlorophyta). Entre las propiedades terapéuticas destacan las actividades antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias, antihelmínticas, insecticidas, además de eliminar radicales libres (El Gamal, 2010).

Uno de los géneros más importantes a nivel mundial es *Pyropia* (J. Agardh, 1899) el cual es altamente valorado en la industria alimenticia presentando gran importancia gastronómica y cultural en los países como Japón, Corea y China, pues históricamente en el siglo XVII se inició con el cultivo de esta macroalga que se recolectaba en fase conchocelis del medio silvestre, ya que aún era desconocida su historia de vida (McHugh, 2002). El género *Pyropia* presenta un ciclo de vida caracterizado por alternancias de generaciones donde una fase es macroscópica foliar que se desarrolla generalmente en zonas rocosas, aunque algunas veces también es epífita, distribuyéndose desde la zona intermareal alta hasta la zona submareal (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2018). Por otra parte, también presenta una fase filamentosa microscópica denominada conchocelis, que se caracteriza por filamentos que pueden penetrar sustratos de carbonato de calcio y habita en zonas submareales (Tribollet *et al.*, 2018).

Han sido diversos los estudios realizados sobre la biología *Pyropia* spp. con aplicaciones biotecnológicas, proponiendo a esta macroalga como un alimento vivo alternativo para el cultivo de diversas especies como la almeja de cuello corto (*Ruditapes philippinarum*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y pepino de mar (*Apostichopus japonicus*), ya que se ha demostrado una mejora en las tasas de supervivencia, crecimiento e inmunidad, además se le ha atribuido actividades antivirales (Shahabuddin *et al.*, 2015; Lozano *et al.*, 2016; Shahabuddin *et al.*, 2017).

En México la ficología aplicada comenzó en el año de 1950, con la extracción de especies productoras de ficocoloides (*Macrocystis pyrifera*, *Gelidium robustum* y *Porphyra perforata*) en el Pacífico noroccidental mexicano (Lobato-Benítez *et al.* 2018). Actualmente se han logrado cultivos exitosos de las macroalgas marinas *Chondrus crispus* (Zertuche-González *et al.*, 2001) y *Kappaphycus alvarezii* (Muñoz *et al.*, 2004), y se están realizando cultivos piloto de *Ulva lactuca* y *Ulva fasciata* con el objetivo de usarse como alimento humano con diversas propiedades nutraceuticas (Cuesta *et al.*, 2016). De igual manera se ha integrado *Ulva clathrata* en un

co-cultivo de camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) obteniendo resultados favorables en el crecimiento, supervivencia y en la relación de proteínas (Peña-Rodríguez *et al.*, 2017).

Son diversas las macroalgas existentes en el país con interés comercial y con posible utilización en la acuicultura con fines de cultivo comercial, pero se requiere investigación científica y un mayor conocimiento en la ficología nacional (Vázquez-Delfín *et al.*, 2019). El género *Pyropia* en México, aún no cuentan con la suficiente información que permita consolidar técnicas de cultivos, por lo que el presente estudio busca mostrar el proceso inicial para la obtención de cultivos monoespecíficos y axénicos de *Pyropia* sp. en la fase conchocelis, género proveniente de las costas del Golfo de California, México.

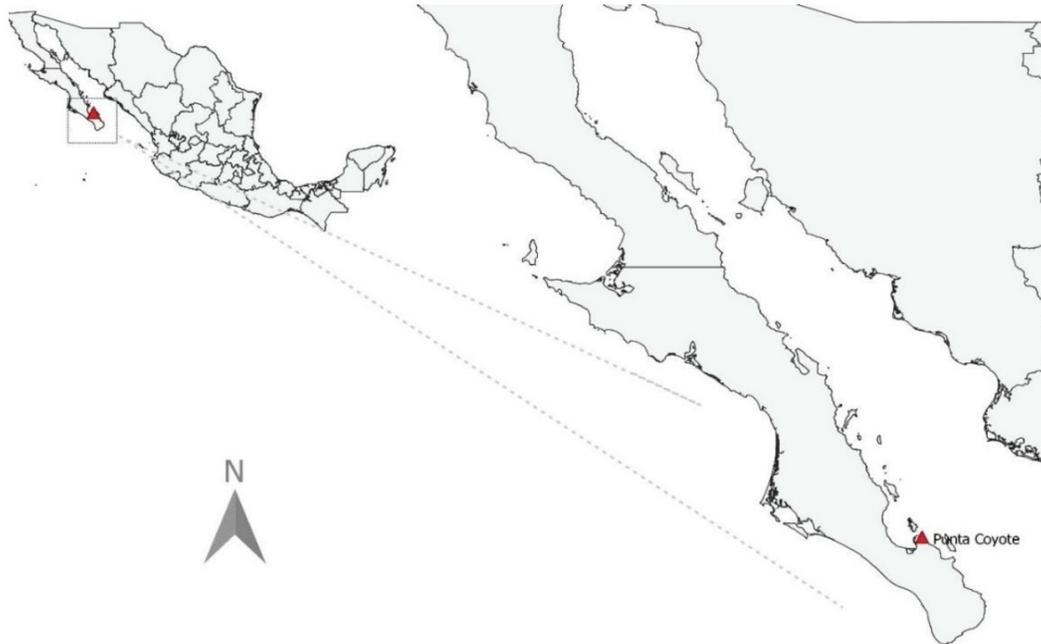
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen y procesado de muestras

Los talos de *Pyropia* sp. fueron colectados de medio silvestre, procedentes del Punta Coyote (24° 19' 48" Norte 110° 13' 48" Oeste), Baja California Sur, México (Figura 1). El material ficológico fue transportado en una hielera térmica por una hora en bolsas de polietileno conteniendo agua de mar. En el laboratorio de microalgas, ubicado en la Unidad Académica Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, se depositaron las muestras de macroalga en seis matraces conteniendo agua de mar filtrada a 10, 5 y 1µm e irradiada con luz ultravioleta enriquecida con fertilizante Jack's Classic (J R Peters Inc.) a una concentración de un 1mL por litro de agua previamente esterilizada en autoclave (Sterilmatic, Market Forge) a 121° C a una presión de 1.02 kg/cm<sup>2</sup> por 20 minutos. Los matraces conteniendo las muestras de *Pyropia* fueron conservados por 24 horas a una temperatura constante de 15±1°C, con un fotoperiodo 12:12 a una intensidad lumínica de 2500 lux.

### Limpieza y selección de gametofitos de *Pyropia* sp

La limpieza de los gametofitos se realizó sumergiéndolos en agua de mar previamente filtrada a 10, .5 y 1µm e irradiada con luz ultravioleta, y se removieron con un pincel las algas epífitas y epibiontes adheridos a los talos.



**Fig. 1**

Posteriormente, se lavaron las muestras con agua destilada, eliminando de esta forma los contaminantes provenientes en muestras. Este proceso se repitió dos veces. Después del proceso anterior, los talos fueron colocados en seco según su género (masculino o femenino) en dos bandejas de acero inoxidable. De esta manera, se consideraron machos maduros a aquellos gametofitos que tenían un color amarillo en los bordes, mientras que las hembras maduras poseían un borde color rojo (Holmes y Brodie, 2004). Posteriormente las bandejas fueron expuestas a radiación solar (25 000lux) por 35 minutos para eliminar organismos oportunistas. Pasado el tiempo de desecación, los talos de *Pyropia* se colocaron en los matraces conteniendo agua de mar enriquecida con medio Jack's Classic (J R Peters Inc.), adicionando cinco gametofitos femeninos y cinco gametofitos masculinos en cada matraz. Todo esto se llevó a cabo bajo una campana de flujo laminar con un mechero Bunsen. Finalizando el proceso, los matraces fue-

ron incubados a una temperatura constante de  $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperiodo 12:12 a una intensidad continua de 2500 lux, sin aireación y con agitación manual.

#### Obtención de gametangios

Una vez que maduraron los gametofitos *Pyropia*, se procedió a realizar cortes de los gametangios maduros para favorecer la liberación y fecundación de las esporas. No sin antes realizar un proceso de lavado con agua destilada estéril y un filtro de  $1\ \mu\text{m}$ , repitiendo este proceso dos veces y al final un lavado con agua de mar filtrada y estéril. Una vez terminado el proceso se colocaron los gametangios en matraces con agua de mar filtrada y estéril enriquecida con medio Jack's Classic (J R Peters Inc.), adicionando a cada uno de ellos 5 gametangios (masculinos y femeninos). Se incubaron por dos días bajo las condiciones anteriormente descritas y se mantuvieron en observación hasta la aparición de conchocelis. Todo lo anterior se realizó por triplicado.

### Limpieza y obtención de conchocelis

Una vez obtenidos los esporofitos (fase conchocelis), se realizó una revisión microscópica mediante el uso de un microscopio óptico (CxL, Labomed) para buscar la presencia de bacterias y protozoarios. La contaminación bacteriana fue eliminada mediante baño por 24 horas en una solución: 1 mL de solución con gentamicina ( $240 \text{ mg } 3 \text{ mL}^{-1}$ ) en 30 mL del cultivo. Una vez pasado el tiempo de acción del antibiótico, se realizó una siembra de la conchocelis en matraces preparados con agua de mar filtrada y estéril adicionada con Von Stosch (Von Stosch, 1963) como medio de cultivo, manteniéndose por una semana bajo las condiciones de incubación ya descritas. En cada cambio de estadio de desarrollo, fueron registrados los tiempos e

imágenes que evidencian el proceso para llegar a la fase conchocelis de *Pyropia* sp.

### RESULTADOS

De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, el proceso de aislamiento de *Pyropia* sp., puede realizarse en condiciones de laboratorio siguiendo los procesos de transferencias, limpieza de la cepa, medio de cultivo adecuado y condiciones de temperatura e iluminación aquí mostradas. Se obtuvieron cultivos monoespecíficos y axénicos de la fase conchocelis del género *Pyropia* sp. colectado en la costa sureste del Golfo de California, logrando resultados favorables en un periodo de tiempo de 21 días (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tiempo transcurrido y medio de cultivo usado en los

Etapa	Tiempo transcurrido	Medio de cultivo
Colecta de talos silvestres	Día 0	-
Selección y limpieza gametofitos	Día 1	Fertilizante Jack's Classic (J R Peters INC)
Maduración de gametangios	Día 10	Fertilizante Jack's Classic (J R Peters INC)
Liberación de esporas	Día 12	Fertilizante Jack's Classic (J R Peters INC)
Obtención y primera medicación de conchocelis	Día 13	Von Stosch (Von Stosch, 1963)
Obtención y segunda medicación de conchocelis	Día 21	Von Stosch (Von Stosch, 1963)

Para obtener conchocelis de *Pyropia* sp. se requiere de un proceso y el uso de medios de cultivo bajo condiciones de esterilidad. Adicionalmente, el uso de antibióticos en éste proceso es indispensable y evita la afectación a la especie durante su desarrollo. En la figura 2-A se observa el crecimiento de *Pyropia* sp. en sustrato rocoso, del cual se extrajeron los ejemplares para realizar la reproducción en laboratorio. A partir de los talos (figura 2-B) y siguiendo el protocolo descrito, se presentó la libe-

ración de esporas que bajo un proceso de medicación con antibióticos pueden obtenerse conchocelis libres de contaminantes microbiológicos (figura 2-D). En la figura 2-E, se muestra el tamaño alcanzado (hasta 10 cm) en fase de conchocelis madura.

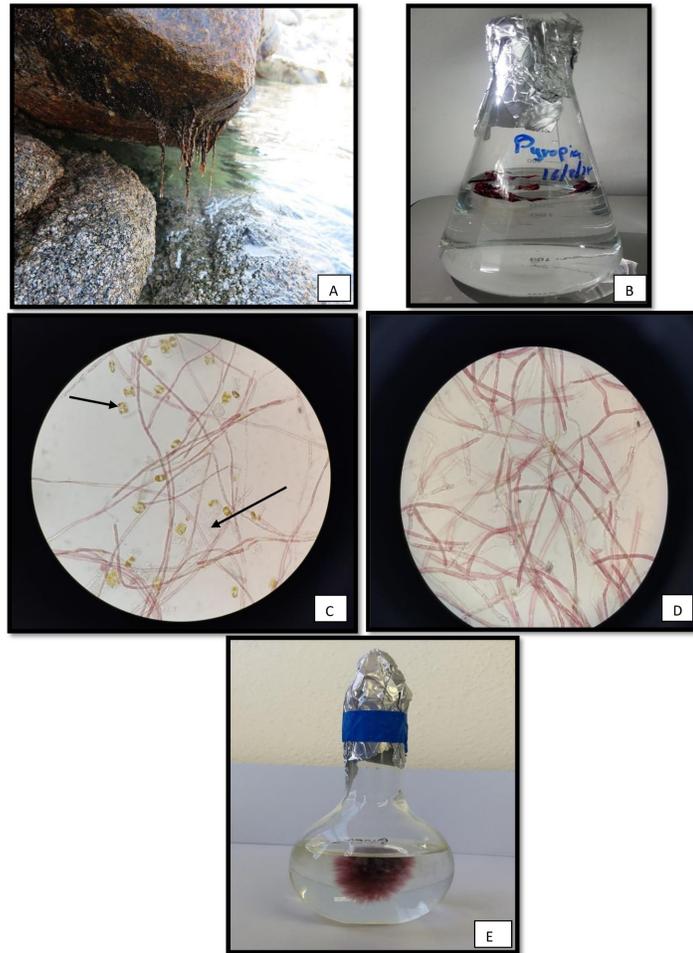


Figura 2.

Fig. 2

## DISCUSIÓN

El proceso reproductivo de macroalgas en laboratorio implica condiciones específicas para cada especie, siendo la colecta de conchocelis del medio silvestre una de las prácticas comunes para el cultivo de macroalgas marinas (Pereira y Yarish, 2008). Las especies del género *Pyropia* forman parte de un grupo de las que presentan mayor potencial biotecnológico por la alta demanda en Asia (Knoop *et al.*, 2019), por lo que se debe evaluar la producción de conchocelis en especies diferentes que

permita su cultivo masivo y el abasto de la demanda. El género *Pyropia* utilizado en el presente estudio se colectó en la costa Punta Coyote del Golfo de California, no se logró llegar a identificar la especie, sin embargo, por sus características y zona de colecta, podría tratarse de una nueva especie endémica del Golfo de California identificada como *Pyropia* GCI por López-Vivas *et al.*, (2015).

Por otra parte, han sido diversos los estudios para conocer las condiciones óptimas del cultivo de la fase conchocelis de *Pyropia* en donde según lo reportado por Ávila *et al.*, (1986) en el ciclo de vida

*Porphyra columbina* las condiciones óptimas obtenidas fue a una temperatura de 15°C con un fotoperiodo de 12:12 (luz:oscuridad) y con una irradiancia de 45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que Allen *et al.* (1995) mostraron mejores crecimientos de la fase conchocelis de *Pyropia columbina* en temperaturas bajas (15°C) con un flujo de fotones de 0 and 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y altos contenidos de nitrógeno. Dichos resultados concuerdan con el presente estudio, mostrando una similitud a lo reportado en este trabajo en el fotoperiodo y la temperatura óptima obtenida. Sin embargo, discrepa del estudio realizado en la Bahía Agua Verde, Baja California Sur por López-Vivas *et al.*, (2015b) en cuyos resultados hace mención que la temperatura óptima para el desarrollo de la fase conchocelis de *Pyropia hollenbergui* es de 25°C con un fotoperiodo de 15:9 h L:D y una irradiancia de 50 y 150  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Haciendo observación de que se necesita mayor investigación en los cultivos de esta macroalga, así como determinar las condiciones óptimas de cada especie del género. Estas diferencias pueden estar relacionadas al hábitat de las diferentes especies evaluadas, las cuales están adaptadas a esas condiciones y obedecen a su historial térmico, presencia de nutrientes y de intensidad de luz.

En este trabajo se logró el estadio de conchocelis en 21 días en medio líquido, diversos estudios se realizan en medio sólido (Guan *et al.*, 2013; López-Vivas *et al.*, 2015b) siendo este segundo medio (sólido) más lento para crecimiento de macroalgas. Un factor que incide de forma negativa en el proceso reproductivo y de desarrollo de *Pyropia* y en general en algas, es la alta presencia de contaminación microbiana (Guan *et al.*, 2013), microalgas, protozoarios y de hongos (Kerwin *et al.*, 1992), por lo que en este trabajo el proceso de medicación con antibiótico permitió un desarrollo favorable en medio líquido.

Debido al complicado ciclo de vida para *Porphyra*, el sistema de cultivo de puede dividirse en cinco fases distintas: cultivo de conchocelis; recolección de conchosporas; crecimiento en mar abierto; cosecha y procesamiento. Con estos resultados podemos se muestra una alternativa para la producción de conchocelis de *Porphyra* sp. en laboratorio.

## CONCLUSIÓN

Las macroalgas rojas del género *Pyropia* sp. representan un grupo de alta importancia biotecnológica y alimenticia, las cuales llevan a cabo diferentes etapas reproductivas que se requiere conocer para su reproducción controlada en laboratorio. Con estos resultados se muestra una metodología que comprende condiciones de temperatura, iluminación y eliminación de epibiontes presentes, que permitan generar conchocelis de *Pyropia* sp. en laboratorio y no depender del medio natural para su aprovechamiento.

## AGRADECIMIENTOS

Un recuerdo a la memoria del Dr. Marco A, Cadena-Roa que debe seguir haciendo Acuicultura en donde esté. Se agradece al laboratorio de microalgas de la UABCS y a la Escuela Nacional de Ingeniería Pesquera (ENIP-UAN) por las facilidades para el desarrollo de este trabajo.

## REFERENCIAS

- Ávila, M., Santelices, B., McLachlan, J. (1986). Photoperiod and temperature regulation of the life history of *Porphyra columbina* (Rhodophyta, Bangiales) from central Chile. *Canadian Journal of Botany*, 64(9), 1867-1872.
- Cuesta, R. G., García, K. L. G., Iglesias, O. D. R. V., Rivera, Y. H., Suárez, Y. A. (2016). Algas marinas como fuente de compuestos bioactivos en beneficio de la salud humana: un artículo de revisión/seaweeds as sources of bioactive compounds in the benefit of human health: a review. *Biotechnia*, 18(3), 20-27.
- El Gamal, A. A. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi pharmaceutical journal*, 18 (1), 1-25.
- Guan, X., Li, J., Zhang, Z., Li, F., Yang, R., Jiang, P., Qin, S. (2013). Characterizing the microbial culprit of white spot disease of the conchocelis stage of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1341-1348.
- Holmes, M. J., Brodie, J. (2004). Morphology, seasonal phenology and observations on some aspects of the life history in culture of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Devon, UK. *Phycologia*, 43(2), 176-188.

- Knoop, J., Griffin, J. N., Barrento, S. (2019). Cultivation of early life history stages of *Porphyra dioica* from the British Isles. *Journal of Applied Phycology*, 1-13.
- Lobato Benítez, C., Arenas, P. M., Mateo Cid, L. E. (2018). Etnoficología Mexicana: perspectivas y desafíos.
- López-Vivas, J. M., Muñoz-Salazar, R., Riosmena-Rodríguez, R., Pacheco-Ruíz, I., Yarish, C. (2015a). Endemic *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta) from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 1029-1041.
- López-Vivas, J. M., Riosmena-Rodríguez, R., Pacheco-Ruíz, I., Yarish, C. (2015b). Growth and reproductive responses of the conchocelis phase of *Pyropia hollenbergii* (Bangiales, Rhodophyta) to light and temperature. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1561-1570.
- Lozano, I., Wacyk, J. M., Carrasco, J., Cortez-San Martín, M. A. (2016). Red macroalgae *Pyropia columbina* and *Gracilaria chilensis*: sustainable feed additive in the *Salmo salar* diet and the evaluation of potential antiviral activity against infectious salmon anemia virus. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1343-1351.
- McHugh, D. J. (2002). Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/3/y3550s/Y3550S00.htm>
- Mouritsen, O. G. (2013). The science of seaweeds: marine macroalgae benefit people culturally, industrially, nutritionally, and ecologically. *American Scientist*, 101(6), 458-466.
- Muñoz, J., Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D. (2004). Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. *Aquaculture*, 239(1-4), 161-177.
- Peña-Rodríguez, A., Elizondo-González, R., Nieto-López, M. G., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L. E. (2017). Practical diets for the sustainable production of brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis*, juveniles in presence of the green macroalga *Ulva clathrata* as natural food. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 413-421.
- Pereira, R., Yarish, C. (2008). Mass production of marine macroalgae. En: *Encyclopedia of Ecology*. 2236-2247.
- Kerwin, J. L., Johnson, L. M., Whisler, H. C., Tuininga, A. R. (1992). Infection and morphogenesis of *Pythium marinum* in species of *Porphyra* and other red algae. *Canadian Journal of Botany*, 70(5), 1017-1024.
- Rodríguez-Rodríguez, E. F., Fernández-Honores, M. A., Alviérez-Izquierdo, E., Pollack Velásquez, L. E., Luján-Bulnes, L. A., Geldres-Cruz, C. W., Paredes-Pizarro, Y. (2018). Algas marinas del litoral de la región La Libertad, Perú. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 71-81.
- Shahabuddin, A. M., Khan, M.N.D., Arisman, N., Saha D., Yoshimatsu, T., Araki T. (2015). Use of *Pyropia spheroplast* as a live food substitute for culturing Japanese short-neck clam *Ruditapes philippinarum*.
- Shahabuddin, A. M., Khan, M. N. D., Mikami, K., Araki, T., Yoshimatsu, T. (2017). Dietary supplementation of red alga *Pyropia spheroplasts* on growth, feed utilization and body composition of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture Research*, 48(10), 5363-5372.
- Tribollet, A., Pica, D., Puce, S., Radtke, G., Campbell, S. E., Golubic, S. (2018). Euendolithic Conchocelis stage (Bangiales, Rhodophyta) in the skeletons of live stylasterid reef corals. *Marine Biodiversity*, 48(4), 1855-1862.
- Zertuche-González, J. A., García-Lepe, G., Pacheco-Ruiz, I., Chee, A., Gendrop, V., Guzmán, J. M. (2001). Open water *Chondrus crispus* Stackhouse cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 13(3), 247-251.
- Vázquez-Delfín, E., Freile-Pelegrín, Y., Pliego-Cortés, H., Robledo, D. (2019). Seaweed resources of Mexico: current knowledge and future perspectives. *Botanica Marina*, 62(3), 275-289.
- Von Stosch, H.A. 1963. Wirkung von Jod und Arsenit auf Meeresalgen in Kultur. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 4: 142-150.

