



PROTOCOLO DE CULTIVO *IN VITRO* DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS

CÓDIGO: DGIA/BG/P-02.01/CIVM

Rev. N°.	Fecha	Descripción de la Modificación	Edición	Aprobado por



R. GUEVARA

DISTRIBUIDO A:


DEC	DGIA	AFIA	
-----	------	------	--



L. CARRERA

Copia No:
ÉSTA ES UNA COPIA CONTROLADA, SALVO SE INDIQUE DE OTRA MANERA.

Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. Maria Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 2 de 12

1. OBJETIVO:

El presente protocolo establece las pautas para realizar el cultivo *in vitro* de macroalgas rojas.

2. ALCANCE:


Se aplica al proceso del cultivo *in vitro* de macroalgas rojas a partir de esporas.

3. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

- **Macroalga:** grupo muy diverso de organismos fotosintéticos, mayormente marinos y de tamaño considerable. Están divididos en tres grandes grupos basados en su coloración: Chlorophyta (verdes), Rhodophyta (rojas) y Phaeophyceae (pardas).
- **Cistocarpio:** masa de carposporas formadas en las algas rojas como producto de la fecundación. Se observan como protuberancias sobre el talo femenino (ver anexo).
- **Carpospora:** espora no móvil producida por un alga roja. Desarrolla un tetrasporofito de vida libre (ver anexo).
- **Soro tetrasporangial:** grupo de tetrasporangios en las algas rojas que aparecen como manchas rojizas pequeñas distribuidas en la corteza del talo tetrasporofítico (ver anexo).
- **Tetraspora:** una de las cuatro esporas haploides no móviles producidas en un tetrasporangio en las algas rojas. Desarrolla en un gametofito (ver anexo).
- **Solución stock:** es una solución concentrada que sirve como base para preparar soluciones más diluidas de corto término.
- **Epífitos:** organismos que crecen adheridos a otras plantas, pero sin parasitarlas.
- **Esporas:** células (o grupos de células) reproductivas asexuales.
- **Talo:** cuerpo de la planta relativamente indiferenciado que carece de hojas, tallo y raíces verdaderas.



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 3 de 12

4. RESPONSABILIDADES

El Responsable o Jefe de Laboratorio:

- 4.1. Es responsable de asegurar el cumplimiento del presente protocolo.
- 4.2. Supervisa los procesos que involucran la obtención del cultivo *in vitro* de macroalgas.
- 4.3. Gestiona y verifica el cumplimiento del plan de mantenimiento y calibración de equipos.
- 4.4. Supervisa el correcto ingreso de datos de los registros internos de trabajo.
- 4.5. Designa y autoriza al personal capacitado para realizar el cultivo *in vitro* de macroalgas.

El Analista:

- 4.6. Aplica el presente protocolo para realizar el cultivo *in vitro* de macroalgas.
- 4.7. Realiza el mantenimiento preventivo del equipo y sus componentes.
- 4.8. Realiza el mantenimiento y mediciones de los cultivos.
- 4.9. Realiza el registro fotográfico.
- 4.10. Registra la información en formato correspondiente.

5. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

5.1. EQUIPOS

- Microscopio invertido
- Estereoscopio
- Cámara de cultivo
- Refrigerador
- Campana de flujo laminar
- Ultrasonido

5.2. MATERIALES

- Pipeta pasteur



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 4 de 12

- Bulbos de goma para pipeta pasteur
- Placas petri de vidrio o acrílico
- Pinzas y estiletes
- Láminas portaobjetos
- Hojas de afeitar
- Parafilm
- Papel toalla
- Paper Wypall
- Papel aluminio
- Plumón marcador

5.3. REACTIVOS

- Agua de mar filtrada (0.22 micras)
- Medio de cultivo Provasoli modificado (West & McBride 1999)
- Medio de cultivo Von Stosch modificado (Guiry & Cunningham 1984)

6. CULTIVO *IN VITRO* DE MACROALGAS ROJAS

6.1. OBTENCIÓN DE UN CULTIVO UNIALGAL A PARTIR DE ESPORAS

6.1.1. LIMPIEZA Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL

- a. Seleccione un talo fértil, en buen estado, con todos sus segmentos limpios.
- b. Lave cada segmento con abundante agua de mar estéril filtrada, con la finalidad de remover partículas superficiales adheridas.
- c. Repita el punto anterior sucesivas veces.
- d. Realice además una limpieza mecánica bajo el estereoscopio a fin de remover organismos epifitos utilizando pinzas, estiletes y pinceles.
- e. Coloque los trozos limpios en el equipo ultrasonido, por unos minutos, para asegurar la eliminación de epifitos.



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 5 de 12

6.1.2. ESTIMULACION DE MATERIAL A ESPORULAR:


- a. Elija y recorte con una hoja de afeitar trozos de talo de 5 cm conteniendo estructuras reproductivas: cistocarpos o soros tetrasporangiales maduros (ver anexo).
- b. Las plantas tetraspóricas deben diferenciarse de ejemplares estériles o de plantas masculinas.
- c. Estimule la esporulación por leve desecación, para ello envuelva los trozos de alga, que aún se encuentran humedecidas con el agua de mar, en papel de aluminio y guarde en el refrigerador por algunas horas.

6.1.3. ESPORULACIÓN:

- a. Limpie con alcohol la superficie de trabajo y las manos.
- b. Tenga a la mano los siguientes materiales: agua de mar filtrada y esterilizada, placas petri de vidrios estériles, pinzas, láminas portaobjetos y cubreobjetos, marcador.
- c. En el caso de haber elegido el medio de cultivo Provasoli modificado, use 10 mL de la solución stock por litro de agua de mar filtrada y esterilizada, además de 2 mL de solución de dióxido de germanio.
- d. En el caso de haber elegido el medio de cultivo Von Stosch modificado, use 10 mL de cada solución stock por litro de agua de mar filtrada estéril y agregue 2 mL de dióxido de germanio.
- e. Rotule las placas petri indicando el tipo de estructura reproductiva (citoscarpo o tetrasporangios) o el tipo de espora seleccionada (carpospora o tetraspora), origen y fecha.
- f. Mantenga siempre las placas tapadas.
- g. Coloque en el fondo de las placas láminas portaobjetos para que ahí se produzca la fijación de las esporas o deje libre el fondo.
- h. Vierta agua de mar filtrada y esterilizada en las placas, llenándolas hasta la mitad de su profundidad.



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
--	---	--

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 6 de 12


- i. Tenga a la mano los trozos fértiles y recórtelos cada 2 cm. y colóquelos dentro de las placas y sobre las láminas portaobjetos.
- j. Prepare varias réplicas.
- k. Mantenga las placas Petri con poca luz dentro de la cámara bioclimática controlada a 15 o 17 °C y evite moverlas.
- l. Realice observaciones de las placas a las 24 horas en el microscopio invertido, tenga cuidado de no destapar.
- m. Controle la esporulación hasta que se observen manchas rojizas en el fondo de la placa o sobre los portaobjetos. Luego retire los trozos de material algal con una pinza. La liberación puede ser inmediata o tomar algunos días.
- n. Recupere las esporas recién liberadas con una pipeta pasteur antes de su asentamiento, y trasládelas a otra placa limpia con el medio de cultivo seleccionado, o transfiera las láminas portaobjetos con las esporas adheridas a una nueva placa con el medio de cultivo.
- o. Selle cada placa con parafilm.
- p. Coloque las placas en la cámara, programando las condiciones de iluminación, fotoperiodo y temperatura en los niveles requeridos por la especie.
- q. Para el desarrollo inicial se recomienda la incubación a 15 o 17 °C, 40-60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ y fotoperiodo 12:12 horas luz: oscuridad.

6.1.4. GERMINACIÓN DE ESPORAS Y CAMBIO DE MEDIO DE CULTIVO:

- a. Coloque las placas en el microscopio invertido y observe las esporas sin abrir las placas (generalmente el asentamiento de las esporas se completa a las 24 horas y la germinación se produce a las pocas horas).
- b. Realice el primer cambio del medio de cultivo cuando las esporas estén suficientemente adheridas a la superficie de la lámina o al fondo de la placa petri.



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 7 de 12

- c. Cambie el medio de cultivo una vez a la semana, en un ambiente limpio, evitando posibilidades de contaminación. El nuevo medio debe estar a la misma temperatura del que se cambia para evitar el estrés de las algas.
- d. Coloque parte del medio de cultivo en un matraz de 250 mL para facilitar el vaciado a las placas, cubra siempre el matraz con papel de aluminio.
- e. Observe las divisiones iniciales a los pocos días del asentamiento, el diámetro empezará a incrementarse y se formará un disco multicelular.
- f. Después de dos meses observe la presencia una protuberancia en el centro, hasta formar micro talos cilíndricos de unos pocos milímetros. Este es el comienzo de un nuevo talo.

6.2. MANTENIMIENTO DE LOS BROTES DE MACROALGAS

6.2.1. PREPARACIÓN DE MATERIALES


- a. Limpie con alcohol la superficie de trabajo y las manos.
- b. Tenga cerca al estereoscopio los siguientes materiales: agua de mar filtrada y esterilizada, medio de cultivo, placas petri de vidrio o acrílico esterilizadas, pinzas, estiletes, pipetas de vidrio y plástico, trozos de papel Wypall, papel toalla, parafilm y marcador.
- c. Coloque las placas petri que contiene los brotes de macroalgas cerca al estereoscopio.
- d. Mantenga las placas cerradas, solo abrirlas cuando se va a cambiar de medio o con fines de limpieza.

6.2.2. OBSERVACIÓN DE TALOS:

- a. Realice observaciones semanales de los brotes de macroalgas en sus primeros estadios bajo el estereoscopio, sin abrir las placas.
- b. Los brotes se pueden mantener de dos formas: adheridos al sustrato o sueltos.



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 8 de 12

- c. En el caso de que el brote crezca y sobrepase la altura de la placa remuévalo suavemente de la superficie adherida, usando una pinza fina o estilete, y trasládalo a un matraz con medio de cultivo para el siguiente proceso.
- d. Realice la captura fotográfica de los brotes en el estereoscopio.
- e. Con la ayuda de una pinza realice mediciones de los brotes, para ello coloque los brotes adheridos verticalmente y mídalos con la reglilla de acuerdo al aumento escogido.

6.2.3. LIMPIEZA DE BROTES Y SUSTRATOS (fondo de placa petri o lámina portaobjeto):

- a. Coloque la placa en el estereoscopio, proceda a abrir y observe la presencia de contaminantes.
- b. Limpie manualmente los brotes de macroalgas, la superficie de la placa y el sustrato de vidrio, extrayendo los organismos epifitos y/o los brotes decolorados, para ello emplee pinzas, estiletos, trozos de papel Wypall, etc.
- c. Separe los brotes sueltos para el proceso de conservación de talos con una pinza limpia y los más pequeños con una pipeta pasteur.
- d. Realice lavados continuos de las placas con los brotes fijados, para ello utilice agua de mar filtrada y con mucho cuidado renueve el agua tratando de mantener los brotes a un costado. Si los brotes están muy pequeños use una pipeta de plástico para absorber el agua.
- e. Mantenga limpia la tapa original de la placa petri y verifique los datos.
- f. Una vez limpia la placa y el brote de macroalga, añada un nuevo medio de cultivo y selle la placa con parafilm.
- g. Realice cambios de medio de cultivo semanalmente, el nuevo medio de cultivo debe estar a la misma temperatura que el antiguo para evitar estresar a las algas.



L. CARRERA

Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 9 de 12

- h. Los brotes sueltos o adheridos pueden ser conservados en cámaras de cultivo a baja temperatura, poca iluminación y menor concentración de nutrientes por corto plazo (1 año para plantas, Sánchez-Chiang & Jiménez 2010).

7. BIBLIOGRAFIA

- ALVEAL K, ROMO H & C WERLINGER (1995) Cultivo de Gracilaria a partir de esporas. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC & E Sar (Eds). Manual de métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, pp. 599-609.
- GONZÁLEZ MA, PARRA OO & AS CIFUENTES (1995) Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC & E Sar (Eds). Manual de métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, pp. 219-250.
- GUIRY M & E CUNNINGHAM (1984) Photoperiodic and temperature responses in the reproduction of the north-eastern Atlantic *Gigartina acicularis* (Rhodophyta: Gigartinales). Phycologia 23: 357-367.
- OLIVEIRA EC, PAULA EJ, PLASTINO EM & PETTI R (1995) Metodologías para cultivo no axénico de macroalgas. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC & E Sar (Eds). Manual de métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, pp. 429-447.
- PETERS A. 2015. Isolation and laboratory cultivation of macroalgae. Workshop, NIBR, Incheon, Korea. October 21.
- REDMOND S, GREEN L, YARISH C, KIM J & C NEEFUS (2014). New England Seaweed Culture Handbook-Nursery Systems. Connecticut Sea Grant CTSG-14-01. 92 pp.
- URL: <http://seagrant.uconn.edu/publications/aquaculture/handbook.pdf>.
- ROMO H & K ALVEAL (1995) Técnicas para el cultivo experimental, medición del crecimiento y manejo de las poblaciones de *Iridaea (Mazzaella)*. En: Alveal

Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---



	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 10 de 12

K, Ferrario ME, Oliveira EC & E Sar (Eds). Manual de métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, pp. 563-576.

SÁNCHEZ-CHIANG N & VM JIMÉNEZ (2010) Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de Bancos de Germoplasma en cultivos tropicales. Agronomía Mesoamericana 21 (1): 193-205.

WEST JA & DL MCBRIDE (1999) Long-term and diurnal carpospore discharge patterns in the Ceramiaceae, Rhodomelaceae and Delesseriaceae (Rhodophyta). Hydrobiologia 298/299: 101-113.


Documentos del Laboratorio:

DGIA/BG/I-01/BPLBG

Instructivo Buenas Prácticas de Laboratorio
 Aplicado en el Banco de Germoplasma.



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---

	PROTOCOLO -IMARPE-	DGIA/BG/P-02.01/CIVM
	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MACROALGAS ROJAS A PARTIR DE ESPORAS	Edición: 01 Revisión: 0 Fecha : 12 /09/2016 Página 11 de 12

ANEXO

Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi Fecha: Mayo 2016	Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco Fecha: Julio 2016	Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos Director DGIA Fecha: Setiembre 2016
---	--	---



PROTOCOLO
-IMARPE-

DGIA/BG/P-02.01/CIVM

CULTIVO *IN VITRO* DE MACROALGAS ROJAS A
PARTIR DE ESPORAS

Edición: 01
Revisión: 0
Fecha : 12 /09/2016
Página 12 de 12

Ciclo de vida de *Gracilaria* sp.

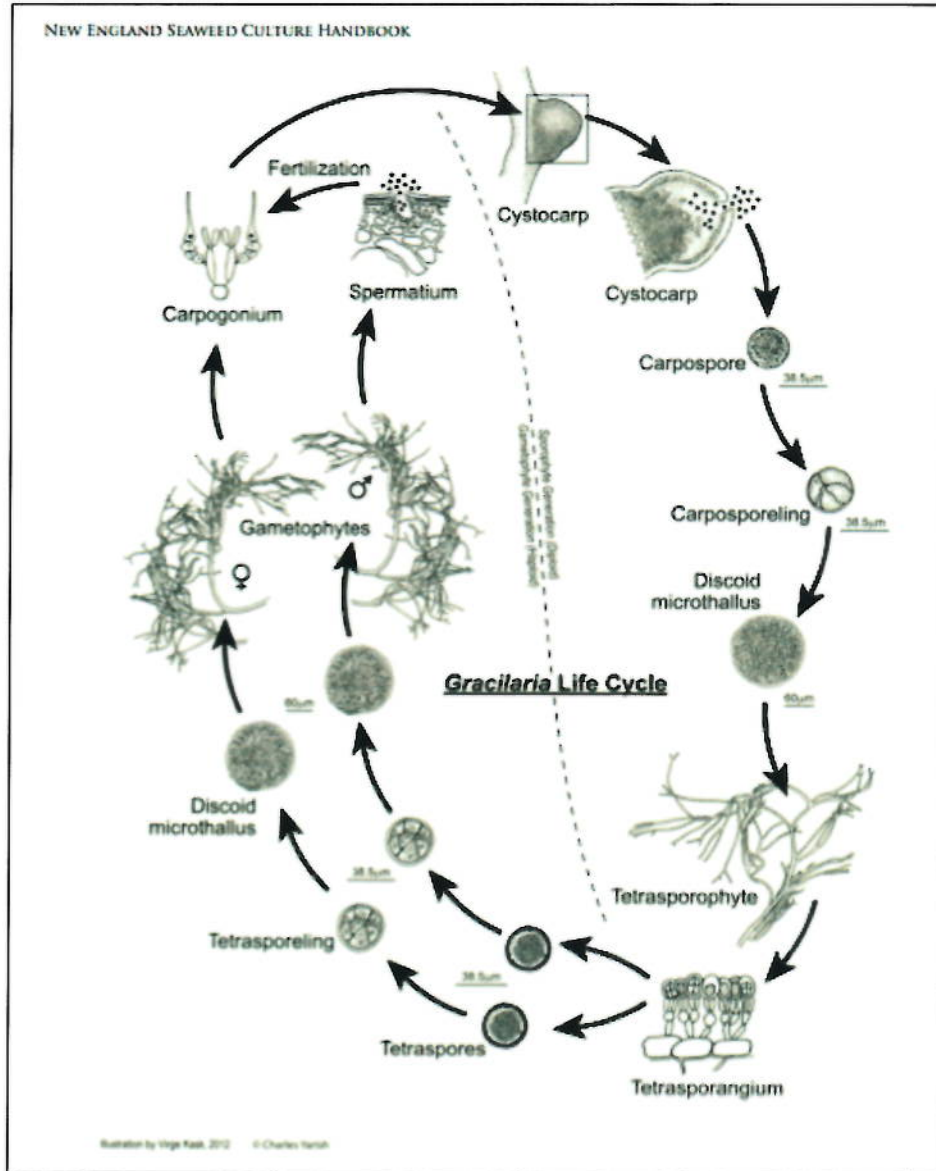


Fig. 1. Ciclo de vida de un alga Florideophyceae, *Gracilaria*. (Redmond et al. 2014)
Cystocarp = cistocarpo. Carpospore = carpospora. Tetraspores = tetrasporas.
Tetrasporophyte = tetrasporofito



Elaborado: Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi
Fecha: Mayo 2016

Revisado: M. Sc. María Elena Jacinto Tayco
Fecha: Julio 2016

Autorizado: Ing. Lili Carrera Santos
Director DGIA
Fecha: Setiembre 2016