

VARIABILIDAD GENÉTICA EN TASAS DE REPRODUCCIÓN DE UNA POBLACION EXPERIMENTAL DE LA MICROALGA *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch: MEJORA GENÉTICA POR SELECCIÓN ARTIFICIAL.

ELISABET GONZALEZ-CHABARRI ¹, MACARENA NAVARRO ¹ Y EDUARDO COSTAS ¹

Elisabet González-Chábarri ¹, Macarena Navarro ¹ y Eduardo Costas ¹: Genetic variability and artificial selection in growth rates in an experimental population of the microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch.

The acclimated growth rates of ten clones of *Tetraselmis suecica* (an unicellular algae frequently used in aquaculture to feed bivalves) were measured to estimate the amount of genetic variability in growth rates in a natural population of *Tetraselmis*. The amount of genetic variability among clones was 12,5% (coefficient of variation). Artificial selection was employed to increase the cell yield of *Tetraselmis* culture. The selection planing was based in the isolation of several clonal cultures selecting the two most productives, which were cultivated in lack of nutrients to induce their sexual reproduction. From their offspring the two most productives clones were selected and crossed again. The process was repeated until the selection response finished. Before selection, the experimental *Tetraselmis* population grew to $0,74 \pm 0,03$ doubling/day, and after selection growth rate significantly increased to $1,14 \pm 0,02$ doubling/day.

Key words: artificial selection, genetic variability, sexual reproduction, microalgae, *Tetraselmis suecica*.

¹ Producción Animal (Genética) Facultad de Veterinaria Universidad Complutense 28040 Madrid, España.

INTRODUCCION

Un aspecto fundamental de la biotecnología de microalgas es la obtención de cepas adecuadas para su cultivo. En este sentido, la mejora genética por selección artificial, a diferencia del gran impacto que ha tenido sobre las especies agrícolas

y ganaderas, apenas ha sido aplicada en poblaciones de microalgas.

Los trabajos de genética de poblaciones en microalgas parecen demostrar la existencia de variabilidad genética para tasas de reproducción, estimadas como componentes de fitness malthu-

siano de genotipos enteros (Brand 1981, 1982, Brand *et al.* 1981) y también se ha encontrado variabilidad alozímica (Murphy & Guillard 1976; Gallaheer 1980, Hayhome *et al.* 1985, Beam & Himes 1985). Más recientemente han comenzado a proponerse modelos de estructura genética de algunas poblaciones de microalgas (Costas 1986 a, 1990, Costas & Varela 1987 a, b). Aparentemente la estructura de las poblaciones naturales de estas microalgas permitirían una buena respuesta a programas de selección artificial (Costas 1986 b, Navarro 1990, González de Chábarri 1991).

En este trabajo hemos detectado la existencia de variabilidad genética para el carácter tasa de reproducción en una población de laboratorio procedente de una población natural de la microalga unicelular *Tetraselmis suecica* (cloroficea). Al tratarse de organismos con una fase vegetativa haploide y en la que se reproducen asexualmente, podemos obtener cultivos clónicos con miles de individuos genéticamente idénticos entre sí a partir del aislamiento de una sola célula vegetativa (Brand 1981). Consecuentemente, podemos determinar la existencia de diferencias significativas entre genotipos midiendo las tasas de reproducción de muchos individuos genéticamente idénticos.

El problema de disociar el efecto genético del ambiental sobre la variabilidad fenotípica puede evitarse estimando las tasas de reproducción de los distintos clones bajo las mismas condiciones ambientales, tal y como se ha realizado con frecuencia en microalgas (Murphy & Guillard 1976, Brand 1981, 1982, Costas 1990), siendo necesaria previamente una

completa aclimatación de cada clon a las condiciones experimentales (Brand 1981).

La existencia de variabilidad genética en microalgas induce a pensar en el éxito de un programa de mejora genética por selección. Sería del máximo interés obtener un programa en este sentido, pues en la actualidad la mayoría de las algas utilizadas en las plantas de cultivo provienen de inóculos no seleccionados. En la mayoría de los casos tan sólo la casualidad es la responsable de que una determinada especie llegue a ser cultivada. Para ello, es necesario además que se produzcan fenómenos de reproducción sexual que permitiesen este tipo de mejora. Así, aunque hasta el momento no se han descrito procesos de reproducción sexual en estas praxinophyceas (Regan 1988), estudios recientes con isoenzimas en *Tetraselmis* spp. reflejaron que este género puede incluir individuos haploides y diploides, sugiriendo la existencia de procesos de reproducción sexual (Lewin & Cheng 1988) y recientemente han sido detectados fenómenos de reproducción sexual en *Tetraselmis suecica* (González de Chábarri 1991).

Para la elaboración de un programa de mejora genética por selección hay que tener en cuenta las peculiares características de estas microalgas, que por una parte dificultan el control individualizado de apareamientos y por otra nos permiten con facilidad la obtención de cultivos clónicos debido a su reproducción asexual. Todo ello nos conduce a emplear un esquema de selección diferente, ante la imposibilidad de aplicar esquemas clásicos de mejora por selección, que con tanto éxito se han utilizado en plantas y mamíferos.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION Y CULTIVO DE CLONES

Se fundaron 10 clones de *Tetraselmis suecica* a partir de muestras procedentes de la Bahía de La Coruña (NW Spain). Cada uno de ellos fue obtenido mediante el aislamiento de una única célula vegetativa mediante un micromanipulador Leitz. Se mantuvieron en placas de petri con 25 ml de medio f/2 sin silicatos (Guillard 1975), bajo iluminación continua de $50 \mu\text{Ein.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a una temperatura de 20 ± 1 °C. Con el fin de obtener cultivos axénicos, se trataron previamente con 150 mg l⁻¹ de penicilina y con 100 mg l⁻¹ de estreptomycin. La ausencia de bacterias se comprobó periódicamente mediante la técnica común de la fluorescencia con naranja de acridina. Los clones se mantuvieron en el tiempo mediante transferencias de un inóculo de 500 ± 20 células a medio fresco una vez cada 10 días. Más detalles en Costas (1990), González de Chábarri (1991).

DETECCION DE VARIABILIDAD GENETICA PARA EL CARACTER TASA DE REPRODUCCION.

Esta metodología ha sido descrita previamente in extenso (Costas 1986 a, Costas 1990). En resumen: las tasas de reproducción aclimatadas máximas se calcularon en cultivos en fase de crecimiento exponencial, mediante la fórmula de Crow y Kimura (1970):

$$\text{Div. Día}^{-1} = 1/\text{Ln } 2 \times \text{Ln } (N_t/N_0) / t$$

siendo en este caso N_t el número de células en el día 6 y N_0 el número de células en el día 3, después de transferir el

inóculo a medio fresco y comprobar que correspondía al momento de máximo crecimiento exponencial.

Las tasas de reproducción se midieron en tres replicados de cada clon. El número de células se estimó mediante el conteo directo en hemocitómetro, estimándose el número de muestras a contar para obtener un error inferior al 5%, mediante la técnica de medias progresivas (Williams 1977).

Para conseguir una completa aclimatación antes de medir la tasa de reproducción, cada clon creció durante más de 10 generaciones en estas condiciones ambientales, según propone Brand (1981).

PROGRAMA DE MEJORA GENETICA POR SELECCION ARTIFICIAL.

Tras determinar las tasas de reproducción de los 10 clones iniciales de *T. suecica*, se seleccionaron aquellos 2 clones que presentaban una tasa de reproducción más elevada, y se cultivaron conjuntamente durante un mes, en condiciones de escasez de nutrientes (agua de mar estéril sin ningún enriquecimiento en nutrientes) para favorecer una posible reproducción sexual.

A partir de la población resultante, se midieron las tasas de reproducción de otros 10 clones, seleccionando los dos de mayor crecimiento. Este proceso se realizó un total de tres veces, hasta que se observó que la tasa de reproducción obtenida en el último proceso no superaba la tasa de reproducción máxima del proceso anterior.

Todo este proceso se efectuó simultáneamente en tres replicados de cada experimento para asegurar la repetibilidad. Siempre se trabajó con los valores medios de los tres replicados.

RESULTADOS

EXISTENCIA DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA POBLACION BASE DE *T. suecica*

En la tabla 1 se reflejan los valores de las tasas de reproducción en divisiones por día de los 10 clones aislados de la población natural *Tetraselmis suecica*, que constituye la población base.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de reproducción de los diferentes clones de la población base, ($p < 0,001$, comprobado tanto por análisis de varianza como con una prueba no paramétrica de la H de Kruskal-Wallis), siendo las tasas más elevadas de 0,94 y 0,98 div./día, y las menores de 0,60 y 0,72 div./día.

MODELO DE MEJORA

En la tabla 1 se reflejan los valores de las tasas de reproducción en divisiones por día de los clones obtenidos del cruzamiento de los 2 clones más productivos de la población base (Te9 x Te10). Estos clones presentaron tasas de reproducción diferentes entre sí y diferentes de sus progenitores ($p < 0,001$, según un test a posteriori de Student-Newman-Keuls y según un test U de Mann-Whitney). Un resultado semejante se encontró en los 2 siguientes ciclos de selección (tabla 1). Cada vez que se cultivaban

conjuntamente los dos clones con tasas de reproducción mayores, los clones aislados de la descendencia resultante generalmente presentaban tasas de reproducción significativamente diferentes entre sí, y diferentes de la de sus progenitores.

Por último, tras el tercer ciclo de selección ensayado en los tres replicados del experimento, los clones resultantes presentaron en todos los casos tasas de reproducción inferiores a 1,14 div./día.

Los principales parámetros numéricos del proceso de selección se resumen en la tabla 2. En ella se indica la variabilidad genética en tasas de reproducción, (estimada mediante el coeficiente de variación de las tasas de reproducción de los distintos clones, tal y como es tradición en los trabajos de microalgas), así como las dos tasas de reproducción máximas y la tasa de reproducción más baja en los sucesivos ciclos de selección.

Como resumen del proceso destacaremos que con este programa de mejora genética por selección artificial se ha obtenido un incremento de la tasa de reproducción de 0,74 divisiones por día en la población base a 1,14 en los clones más reproductivos al final del experimento.

DISCUSION

Dado que las tasas de reproducción de todos los clones se midieron en las mismas condiciones ambientales, las variaciones fenotípicas en las tasas de reproducción reflejan la existencia de variabilidad genética, tal como indica Brand (1981). Este procedimiento es el más comúnmente seguido para detectar la

Tabla 1. Tasas de reproducción de las sucesivas poblaciones de *T. suecica* en el programa de mejora por selección artificial (divisiones/día)

CLONES POBLACION BASE	TASAS DE REPRODUCCION		CLONES POBLACION Tet9 X Tet10		TASAS DE REPRODUCCION		CLONES POBLACION Tet9 X Tet30		TASAS DE REPRODUCCION	
	0,60±0,02	0,72±0,02	11	12	0,62±0,01	0,69±0,02	21	22	0,72±0,02	0,76±0,03
2	0,75±0,01	0,76±0,00	13	14	0,78±0,02	0,92±0,01	23	24	0,78±0,02	0,83±0,02
3	0,79±0,01	0,82±0,02	15	16	0,92±0,01	0,94±0,01	25	26	0,83±0,02	0,85±0,01
4	0,89±0,01	0,90±0,00	17	18	0,94±0,01	0,94±0,01	27	28	0,94±0,01	0,98±0,02
5	0,92±0,01	0,94±0,01	19	20	0,94±0,01	0,98±0,01	29	30	0,98±0,02	1,02±0,02
6									1,02±0,02	1,11±0,03
7									1,14±0,01	1,14±0,02
8										
9										
10										
Tasa Global	0,74***	0,93***	Tasa Global	0,96***	Tasa Global	1,14***	Tasa Global	1,14***		

*** Existen diferencias significativas entre clones ($P < 0,001$) contrastadas con un test H de Kruskal-Wallis.

Tabla 2.- Principales parámetros numéricos del proceso de selección.

	Estimación variabilidad genética (CV)	2 clones de mayor tasa de reproducción	Clon de menor tasa de reproducción
POBLACION BASE	12,48%	0,92±0,01 0,94±0,01	0,60±0,02
1° CICLO DE SELECCION	13,63%	0,94±0,00 0,98±0,01	0,62±0,02
2° CICLO DE SELECCION	14,06%	1,02±0,02 1,14±0,02	0,72±0,02
3° CICLO DE SELECCION	22,45%	1,14±0,02 1,14±0,02	0,57±0,02

variabilidad genética en poblaciones experimentales de microalgas estimándose la variabilidad mediante coeficientes de variación (Brand 1981, 1982, Brand *et al.* 1981, Costas 1986a, b, 1990). La variabilidad obtenida para la tasa de reproducción en la población de *Tetraselmis suecica* fue de 12,5% (coeficiente de variación). Esto puede infraestimar la variabilidad real de la población natural, ya que sólo se estudiaron unos cuantos clones procedentes de la población natural, debido a la laboriosidad del proceso de obtención de los clones. No obstante, podemos asegurar que existe variabilidad genética para el que probablemente sea uno de los caracteres de mayor relevancia ecológica y evolutiva. Estos resultados sugieren que la variabilidad genética puede ser un hecho común en las poblaciones naturales de *Tetraselmis*, contrariamente a la idea generalizada de muchos fitoplanctólogos que asumen implícitamente una uniformidad genética en las poblaciones naturales de microalgas (Murphy & Guillard 1976, Brand *et al.* 1981).

Tradicionalmente se asume que las

praxinophyceas carecen de fenómenos de reproducción sexual. Sin embargo, cada vez que se cultivaban conjuntamente dos clones en condiciones de escasez de nutrientes y se aislaban nuevos clones de la población resultante, estos clones presentaban tasas de reproducción significativamente diferentes entre sí y diferentes de los 2 clones originales. Según Brand (1981) este hecho sólo es explicable debido a que los clones de diferente tasa de reproducción son de genotipos diferentes. Estos individuos genotípicamente diferentes entre sí no pueden proceder de la reproducción asexual de los dos clones iniciales, puesto que en las sucesivas generaciones y en ausencia de mutaciones, obtendríamos individuos con solo dos tasas de reproducción, que se corresponderían con las de los parentales. Por lo tanto, estos hechos necesariamente implican la existencia de procesos de intercambio de material genético que den lugar a la creación de nuevos genotipos, sugiriendo que *Tetraselmis* presenta un proceso de reproducción sexual semejante al descrito para otras microalgas próximas a ella, como el género *Chlamydomonas*, que cuenta con una fase

vegetativa haploide y un cigoto diploide originado por la unión de dos células vegetativas haploides, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Lewin y Cheng (1988) en *Tetraselmis* spp.. En este sentido, numerosos grupos de microalgas en los cuales se asumía la inexistencia de fenómenos de reproducción sexual, presentan de hecho estos fenómenos; especialmente las algas isógamas suelen pasar más desapercibidas en sus fenómenos sexuales.

Recientemente se ha sugerido (Costas 1986a, 1987, 1990) que determinadas poblaciones de dinoflagelados que tradicionalmente se suponía carentes de reproducción sexual, no sólo presentan procesos de reproducción sexual, sino que pueden funcionar como verdaderas poblaciones mendelianas, con casi todos los individuos genéticamente diferentes para el carácter tasa de reproducción. Probablemente en *T. suecica* ocurra algo semejante, lo que se ve reforzado por registros en videomicroscopía donde comprobamos que 2 células se unen aparentemente para aparearse.

Aunque sería recomendable haber realizado más replicados, analizar un mayor número de clones y desarrollar repeticiones del experimento, las peculiares dificultades de las microalgas, especialmente en cuanto a los aislamientos de los clones, no lo permiten en un tiempo

razonable. Pese a ello, los resultados obtenidos tras los procesos de selección y posterior cruzamiento de los clones seleccionados muestran una excelente respuesta de *T. suecica* a la selección artificial para el carácter tasa de reproducción, lo que nos da una idea del potencial de mejora genética por selección existente en esta microalga, que por otra parte es la que tiene mayor importancia aplicada en la acuicultura de nuestro país como alimento básico de moluscos bivalvos. En el último ciclo de selección-cruzamiento no se incrementó la tasa de reproducción máxima obtenida en el proceso anterior, debido a que probablemente se agotara la varianza genética aditiva para este carácter dentro de la población base.

Los resultados obtenidos son muy prometedores, pues con un esquema muy sencillo de selección, y en tan sólo dos generaciones se ha conseguido una excelente respuesta, con el consiguiente incremento en la producción de biomasa. Las perspectivas futuras de estos métodos parecen halagüeñas, puesto que es posible que las microalgas mantengan bastante variabilidad genética en sus poblaciones naturales, al no haber estado nunca sometidas a selección artificial, si bien algunos estudios sugieren que la selección natural en ecosistemas acuáticos tiende a llevar al fitoplacton hacia bajas productividades (Margalef 1980).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Concepción Salgado por su asesoramiento y ayuda con el plan de selección artificial. Proyecto financiado con la ayuda IN-89-0163 de la DGICYT.

LITERATURA CITADA

- Beam, C.A. & M. Himes 1985. Electrophoretic characterization of strains within the *Cryptocodinium colnii* (Dinophyceae) species complex. 3rd International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates, 231 p. Surrey.
- Brand, L.E. 1981. Genetic variability in reproduction rates in marine phytoplankton populations. *Evolution* 35: 1117-1127.
- Brand, L.E. 1982. Genetic variability and spatial patterns of genetic differentiation in the reproductive rates of the marine coccolitophores, *Emiliana huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Limnology and Oceanography* 27: 236-245.
- Brand, L.E.; Murphy, H.; Guillard, R.R.L. & T. Lee 1981. Genetic variability in temperature niche component of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Marine Biology* 62: 103-140.
- Costas, E. 1986a. Variabilidad genética en tasas de reproducción de los dinoflagelados *Prorocentrum micans* y *Gonyaulax excavata*. Una primera aproximación hacia la estructura genética de sus poblaciones. *Genética Ibérica* 38: 173-181.
- Costas, E. 1986b. Heredabilidad de caracteres cuantitativos en poblaciones experimentales de dinoflagelados: 1. longitud y anchura celular. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 3(2): 67-72.
- Costas, E. 1990. Genetic variability in growth rates in marine dinoflagellates. *Genetica* 83: 99-102.
- Costas, E. & M. Varela 1987 a. Variabilidad genética en tasas de reproducción en una marea roja del dinoflagelado *Prorocentrum triestinum* Schiller. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 4(2): 29-36.
- Costas, E. & M. Varela 1987b. Competencia interespecífica en microalgas: el papel de los componentes genéticos. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 4(2): 101-106.
- Crow, J.S. & M. Kimura 1970. An introduction to population genetics theory, 591 p. Harper & Row (eds), New York.
- Gallagher, J.C. 1980. Population genetics of *Skeletonema costatum* in Narragansett Bay. *Journal of Phycology* 16: 464-474.
- González-Chábarri, E. 1991. Producción de biomasa a base de microalgas y sus aplicaciones en producción animal, 142 p. Tesis Doctoral. Univ. Complutense de Madrid.
- Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith & M.H. Chanley (eds), *Culture of marine invertebrate animals*, 29-60 p. New York.
- Hayhome, B.A.; Whitten, D.J. & L.A. Pfister 1985. Dinoflagellate population structure: inter and intra population variation among clonal isolates of *P. volzii*. 231 p. 3rd International Conference on Modern and Fossil Dinoflagellates, Surrey.
- Lewin, R.A. & L. Cheng 1988. Attempts to determine quantitatively the DNA contents of *Tetraselmis* cells. *Journal of Phycology* 24, N. supp. pp.15.

- Margalef, R. 1980. La biosfera. Entre la termodinámica y el juego. Ed. Omega, Barcelona.
- Murphy, L.S. & R. Guillard 1976. Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by enzyme electrophoresis. I. the centric diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *T. fluviatilis*. *Journal of Phycology* 12: 9-13.
- Navarro, M. 1990. Características de los cultivos a pequeña escala de dinoflagelados marinos: su evolución como organismos para la producción primaria en acuicultura, 197 p. Tesis Doctoral. U.C. Madrid.
- Regan, D.L. 1988. Other microalgae. In: M. Borowitzka & L.J. Borowitzka (eds), *Microalgae Biotechnology*, 465 p. Cambridge Univ. Press, London.
- Williams, M. 1977. Stereological techniques. *Practical methods in electron microscopy* 6: 1-216. Ed. Glanert, Elsevier, Amsterdam.