

## EFFECTO BIOLÓGICO DE LAS FITOHORMONAS SOBRE LOS MECANISMOS DE CONTROL DE LA PROLIFERACION DE *Tetraselmis* sp. (Praxinophyceae)

ANGELES AGUILERA<sup>1</sup>, SONSOLES GONZALEZ-GIL<sup>1</sup>, VICTORIA LOPEZ-RODAS<sup>1</sup>, HECTOR MENDOZA<sup>1</sup> & EDUARDO COSTAS<sup>1</sup>

ABSTRACT: Aguilera, A.; González-Gil, S.; López-Rodas, V.; Mendoza, H. & E. Costas 1994. Fitohormone effects on the proliferation of *Tetraselmis* sp. (Praxinophyceae). Revista de Biología Marina, Valparaíso 29(1):47-55.

The effect of five phytohormones (Indol-3-Acetic Acid, Zeatin, Kinetin, Gibberellic Acid and Abscisic Acid) were analyzed on the marine Praxinophyceae *Tetraselmis* sp. proliferation. A statistically significant increase in the growth rate of *Tetraselmis* sp. was observed when the media is supplemented with Zeatin, Abscisic Acid, Gibberellic Acid and Kinetin, but, when the media is supplemented with Indol-3-Acetic Acid the growth rate decreased. This mitogenic effect exhibited by some phytohormones on *Tetraselmis* sp. growth, seems to confirm that many microalgae species, as well as most of mammalian cells, need this kind of growth factors to proliferate. This fact is in agreement with the hypothesis concerning to a universal mechanism which controls the cell division cycle in all the eukaryotic cells.

Key words: Cell division cycle, growth rate, fitohormones, *Tetraselmis* sp.

RESUMEN: Aguilera, A.; González-Gil, S.; López-Rodas, V.; Mendoza, H. & E. Costas 1994. Efecto biológico de las fitohormonas sobre los mecanismos de control biológico de la proliferación de *Tetraselmis* sp. (Praxinophyceae). Revista de Biología Marina, Valparaíso 29(1):47-55.

Se analizan los efectos de cinco fitohormonas (Acido Indol-3-Acético), Zeatina, Kinetina, Acido Giberélico y Acido Abscísico) sobre la proliferación de la Praxinoficea marina *Tetraselmis* sp. Se observa un incremento estadísticamente significativo de la tasa de división de esta especie cuando el medio de cultivo es suplementado con Zeatina, Acido Abscísico, Acido Giberélico y Kinetina, observándose una disminución en su crecimiento cuando el cultivo crece en presencia de Acido Indol-3-Acético. Este efecto mitógeno que exhiben algunas fitohormonas frente a *Tetraselmis* sp. parece confirmar la necesidad de este tipo de factores de crecimiento para la proliferación celular, al igual que ocurre en líneas celulares de mamífero y en ciertas especies de microalgas. Este hecho concuerda con la hipótesis que supone la existencia de un mecanismo universal que controla el ciclo de división celular en todas las líneas eucariotas.

Palabras claves: Ciclo de división celular, tasa de reproducción, fitohormonas, *Tetraselmis* sp.

1) Genética. Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. E-28040 Madrid. SPAIN.

### INTRODUCCION

Durante la última década se ha dedicado un gran esfuerzo a estudiar los mecanismos que controlan la proliferación celular de numerosas especies de microalgas.

Quizás esto sea debido a la enorme importancia que dichos organismos presentan en los ecosistemas marinos, a la toxicidad que tienen algunas de sus especies, principalmente los dinoflagelados (Yasumoto 1990) ó a su elevado interés

## EFFECTO BIOLÓGICO DE LAS FITOHORMONAS SOBRE LOS MECANISMOS DE CONTROL DE LA PROLIFERACION DE *Tetraselmis* sp. (Praxinophyceae)

ANGELES AGUILERA<sup>1</sup>, SONSOLES GONZALEZ-GIL<sup>1</sup>, VICTORIA LOPEZ-RODAS<sup>1</sup>, HECTOR MENDOZA<sup>1</sup> & EDUARDO COSTAS<sup>1</sup>

ABSTRACT: Aguilera, A.; González-Gil, S.; López-Rodas, V.; Mendoza, H. & E. Costas 1994. Fitohormone effects on the proliferation of *Tetraselmis* sp. (Praxinophyceae). Revista de Biología Marina, Valparaíso 29(1):47-55.

The effect of five phytohormones (Indol-3-Acetic Acid, Zeatin, Kinetin, Gibberellic Acid and Abscisic Acid) were analyzed on the marine Praxinophyceae *Tetraselmis* sp. proliferation. A statistically significant increase in the growth rate of *Tetraselmis* sp. was observed when the media is supplemented with Zeatin, Abscisic Acid, Gibberellic Acid and Kinetin, but, when the media is supplemented with Indol-3-Acetic Acid the growth rate decreased. This mitogenic effect exhibited by some phytohormones on *Tetraselmis* sp. growth, seems to confirm that many microalgae species, as well as most of mammalian cells, need this kind of growth factors to proliferate. This fact is in agreement with the hypothesis concerning to a universal mechanism which controls the cell division cycle in all the eukaryotic cells.

Key words: Cell division cycle, growth rate, fitohormones, *Tetraselmis* sp.

RESUMEN: Aguilera, A.; González-Gil, S.; López-Rodas, V.; Mendoza, H. & E. Costas 1994. Efecto biológico de las fitohormonas sobre los mecanismos de control biológico de la proliferación de *Tetraselmis* sp. (Praxinophyceae). Revista de Biología Marina, Valparaíso 29(1):47-55.

Se analizan los efectos de cinco fitohormonas (Acido Indol-3-Acético), Zeatina, Kinetina, Acido Giberélico y Acido Abscísico) sobre la proliferación de la Praxinofícea marina *Tetraselmis* sp. Se observa un incremento estadísticamente significativo de la tasa de división de esta especie cuando el medio de cultivo es suplementado con Zeatina, Acido Abscísico, Acido Giberélico y Kinetina, observándose una disminución en su crecimiento cuando el cultivo crece en presencia de Acido Indol-3-Acético. Este efecto mitógeno que exhiben algunas fitohormonas frente a *Tetraselmis* sp. parece confirmar la necesidad de este tipo de factores de crecimiento para la proliferación celular, al igual que ocurre en líneas celulares de mamífero y en ciertas especies de microalgas. Este hecho concuerda con la hipótesis que supone la existencia de un mecanismo universal que controla el ciclo de división celular en todas las líneas eucariotas.

Palabras claves: Ciclo de división celular, tasa de reproducción, fitohormonas, *Tetraselmis* sp.

1) Genética. Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. E-28040 Madrid. SPAIN.

### INTRODUCCION

Durante la última década se ha dedicado un gran esfuerzo a estudiar los mecanismos que controlan la proliferación celular de numerosas especies de microalgas.

Quizás esto sea debido a la enorme importancia que dichos organismos presentan en los ecosistemas marinos, a la toxicidad que tienen algunas de sus especies, principalmente los dinoflagelados (Yasumoto 1990) ó a su elevado interés

mental, son básicamente similares a los desarrollados en nuestro reciente trabajo sobre los efectos de factores de crecimiento y mitógenos en la proliferación de dinoflagelados (López-Rodas et al. 1992), Costas et al. 1993), por lo que se comentan de forma resumida.

#### MATERIAL BIOLÓGICO:

Un clon de *Tetraselmis* sp. (Te 40, de la colección de la Universidad Complutense de Madrid), previamente bien caracterizado en su biología (González de Chavarri 1991) y procedente de la bahía de La Coruña, fue aislado a partir de una sola célula vegetativa haploide y cultivado en placas de Petri con 20 ml de agua de mar enriquecida con medio f/2 sin silicatos (Guillard 1975). El clon se mantuvo en cámaras de cultivo a temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y una intensidad lumínica de  $50 \mu\text{Eins m}^{-2} \text{sg}^{-1}$ . El clon se conservó en el tiempo mediante transferencias seriadas de un inóculo a medio fresco cada 15 días. Fué cultivado en condiciones de asepsia rigurosa comprobándose la ausencia de bacterias mediante chequeos periódicos del cultivo con técnicas de epifluorescencia, previa tinción con naranja de acridina.

#### DESARROLLO EXPERIMENTAL:

Para comprobar el posible efecto mitógeno de la fitohormona sobre el cultivo de *Tetraselmis* sp., replicados del clon Te 40 fueron cultivados en placas multien-sayo con agua de mar artificial ASPM f/2 (Guillard 1975) suplementándose el medio con las siguientes fitohormonas.

-Acido Indol 3 Acético (AIA, SERVA)  $3 \text{ mg l}^{-1}$   
 -Zeatina (SERVA)  $5 \text{ mg l}^{-1}$

-Kinetina (SERVA)  $5 \text{ mg l}^{-1}$   
 -Acido Giberélico (SERVA)  $5 \text{ mg l}^{-1}$   
 -Acido Abscísico (SERVA)  $10 \text{ mg l}^{-1}$ .

Las concentraciones óptimas de cada una de las fitohormonas son las concentraciones mínimas a las que son activas y en las que no pueden, por tanto actuar como una fuente de carbono adicional en el medio, lo que sin duda falsearía los resultados (Bradley & Cheney 1990). Además dispusimos de un control no suplementado con fitohormonas.

Los replicados se mantuvieron a lo largo de toda la experiencia en cámaras de cultivo bajo las mismas condiciones ambientales mencionadas anteriormente. El número total de replicados del experimento fué de 6.

Para estimar el efecto de las diferentes fitohormonas se realizaron recuentos celulares diarios durante seis días consecutivos durante la fase de máximo crecimiento exponencial en un microscopio invertido. El número de recuentos fue estimado mediante la técnica de las medias progresivas de Williams (1977) para obtener un error inferior al 5% en todos los casos.

Como método para estimar la tasa de reproducción, utilizamos el modelo de Crow & Kimura (1970) para determinar la proliferación de una población celular como divisiones y muertes distribuidas aleatoriamente de forma continua, calculando el parámetro de crecimiento maltusiano  $m$  en divisiones por día usando la expresión:  $N_t = N_0 e^{mt}$  donde,  $N_t$  es el número de células en el tiempo  $t$ ,  $N_0$  es el número de células en el tiempo 0 y  $t$ , el tiempo en días.

Determinamos las máximas tasas de reproducción aclimatadas en la fase de mayor crecimiento exponencial. Experimentos previos en los que filmamos en video y visualizamos a cámara rápida la cinética de crecimiento de este clon, nos llevaron a elegir este modelo que ajustaba perfectamente a las características del crecimiento de este cultivo.

Previamente a la realización del experimento, el clon creció en medio artificial ASPM f/2 (Guillard 1975) para eliminar cualquier posible traza de mitógenos procedentes del agua de mar. Antes de empezar las valoraciones experimentales, se esperó a que los cultivos estuviesen aclimatados a las nuevas condiciones experimentales.

Las comparaciones estadísticas se realizaron comparando las tasas de reproducción obtenidas en cada una de las fitohormonas con las obtenidas en los controles no sometidos a fitohormonas, utilizando para ello las pruebas no pa-

raméticas de la U de Man-Whitney y la H de Kruskal-Wallis (Siegel 1956).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 1 quedan reflejadas las tasas de reproducción máximas aclimatadas de *Tetraselmis* sp. tanto en medios suplementados con fitohormonas como en los controles.

Podemos observar que se produce un incremento estadísticamente significativo en la tasa de división de esta especie cuando el medio de cultivo es suplementado con Zeatina ( $p < 0.05$ ), Acido Abscísico ( $p < 0.01$ ), Acido Giberélico ( $p < 0.01$ ) y con Kinetina ( $p < 0.01$ ). De igual manera se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto a la tasa de división del control cuando el clon creció en presencia de Acido Indol 3 acético ( $p < 0.01$ ), observándose en este caso, una disminución del 11% en el medio suplementado con esta hormona respecto del control.

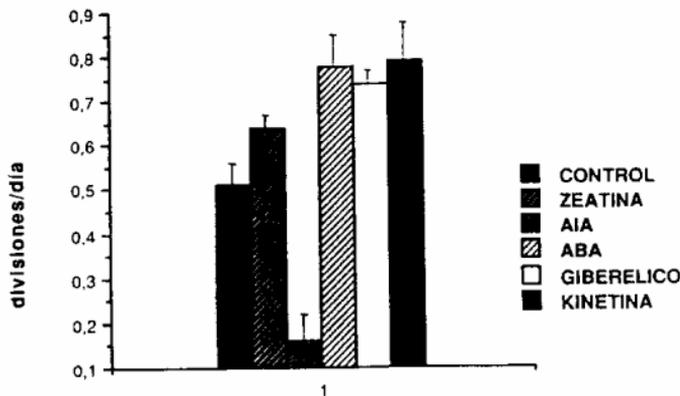


Fig. 1. Tasas de crecimiento máximas aclimatadas de *Tetraselmis* sp. en cultivos suplementados con distintas fitohormonas y en el control no suplementado (barras=error standard de los replicados).

Además, las cuatro fitohormonas que incrementan las tasas de división de *Tetraselmis* sp. lo hacen de manera semejante. Las que presentan un efecto mitógeno más acusado son la Kinetina y el Acido Abcísico, que incrementan 1.5 veces la tasa de división del control, les sigue el Acido Giberélico el cual presenta una tasa de división 1.4 veces mayor que la del control. En último lugar se encuentra la Zeatina, capaz de incrementar 1.2 veces la tasa de división que presenta el replicado control.

El efecto más importante que ejercen las fitohormonas sobre las células es una acción mitógena, al inducir proliferación celular. Hasta ahora este efecto solo había sido descrito en líneas celulares de vegetales superiores, sin embargo, también parecen ser capaces de modificar el ciclo de división celular en microalgas, organismos filogenéticamente anteriores, siendo capaces de producir diversas respuestas en su proliferación. De esta forma, mientras que la mayor parte de las fitohormonas ensayadas presentan un efecto mitógeno acusado, existe una (el Acido Indol Acético) que parece ser extremadamente citotóxica.

En la actualidad, el mecanismo molecular por el que actúan las fitohormonas no se conoce en su totalidad. Estudios sobre sistemas biológicos simplificados, sugieren que este tipo de moléculas tienen un efecto importante sobre el ciclo de división celular, afectando, especialmente, a la fase S de síntesis de DNA e incrementando la transcripción de determinados genes, al igual que harían los factores de crecimiento en células de mamífero. Así, recientemente se ha descrito la dependencia de factores de

crecimiento típicos de mamíferos superiores en varios grupos de microalgas (González de Chavarri 1991, Costas et al. 1993, López-Rodas et al. 1992). Esta activación en la síntesis y transcripción del DNA podría ser la base molecular de los numerosos cambios fisiológicos que inducen las fitohormonas, incluyendo el disparo de la mitosis (Peaud-Leonel 1977).

De todas las fitohormonas ensayadas, llama la atención el efecto estimulante de la proliferación celular que produce el ácido abcísico sobre *Tetraselmis* sp. Hasta ahora esta fitohormona ha sido reconocida como un inhibidor del crecimiento, aunque sus efectos podrían ser contrarrestados por otras fitohormonas como la giberelina (Raven & Curtis 1975). Sin embargo, trabajos recientes indican que el ácido abcísico podría inducir la síntesis de nuevas proteínas implicadas en la ruta de los inositol fosfato (Parmar & Brearley 1993, Lee et al. 1993), lo cual explicaría su efecto mitogénico en este organismo y, aunque muchos estudios apuntan hacia una regulación negativa de la transcripción de muchos genes en presencia del ácido abcísico (Bray 1988, Deng 1987) otros estudios más recientes indican que el ácido abcísico tiene un efecto positivo en la transcripción, especialmente durante el desarrollo embrionario de algunas plantas (Bartholomew et al. 1991).

Por otro lado, el Acido Indol Acético actúa inhibiendo drásticamente la división celular de *Tetraselmis* sp. disminuyendo, por tanto, su tasa de división de forma estadísticamente significativa al compararla con la del control. Las auxinas, entre las que se encuentra el

Acido Indol Acético, actúan indirecta o directamente en la fase S del ciclo celular de formas muy diversas. Así, por ejemplo, la misma cantidad de auxina que promueve el crecimiento de determinadas líneas celulares en plantas tiene efectos inhibitorios en otros tipos celulares (Raven & Curtis 1975, Peaud-Leonel 1977).

Este tipo de efectos citotóxicos han sido ampliamente descritos, existiendo numerosas sustancias que, bien por tener un efecto antagónico al de las fitohormonas o bien, al aparecer en concentraciones elevadas en el medio, reducen el crecimiento celular (Matsunami *et al.* 1990, Reuse *et al.* 1990, Traxler *et al.* 1991).

El hecho de que al suplementar los medios de cultivo con fitohormonas *Tetraselmis* sp. incrementa su tasa de división de forma estadísticamente significativa, parece confirmar que, al menos en esta especie, son necesarios este tipo de factores de crecimiento específicos para su proliferación, tal como ocurre en otras líneas celulares eucariotas y en ciertas especies de microalgas.

Este comportamiento concuerda con la hipótesis de un mecanismo universal común a todos los eucariotas, altamente conservado durante la evolución y ya desarrollado por el antecesor común de los primeros eucariotas (Cantley *et al.* 1991, Costas & López-Rodas 1991, Nurse 1990).

Esta aparente dependencia en el crecimiento celular por determinados mitógenos específicos como factores de

crecimiento o fitohormonas podría tener importantes consecuencias a nivel ecológico, pudiendo ser la ausencia de este tipo de factores la principal causa limitante en cuanto al crecimiento de los medios de cultivo artificiales, sugiriendo este hecho que, en el agua de mar natural, podrían existir de forma libre estas sustancias mitógenas. Su origen no se conoce en la actualidad. Nuestra hipótesis es que las microalgas podrían producir de forma endógena sus propias fitohormonas o factores de crecimiento al igual que lo hacen otras líneas celulares eucariotas. Esta producción autocrina explicaría el porqué este tipo de organismos son capaces de crecer en medios artificiales, como el ASPM, en total ausencia de mitógenos específicos. En este sentido se han descrito especies de dinoflagelados capaces de llevar a cabo una elevada producción de factores de crecimiento (Soong 1980, López-Rodas *et al.* 1992) o de diatomeas que excretan al medio inhibidores del crecimiento que afectan a determinadas especies de microalgas que compiten con ellas (Gentien & Arzul 1990), así como de determinadas bacterias que son capaces de sintetizar y excretar al medio diacilglicerol, un importante mensajero en la ruta de los inositol fosfolípidos (Morotomi *et al.* 1990).

En la actualidad quedan todavía muchas cuestiones por resolver respecto al papel que desempeñan los mecanismos internos que controlan la división celular en este tipo de organismos, sin embargo, un mejor conocimiento de ellos constituiría un interesante complemento de los tradicionales estudios sobre los efectos de las condiciones ambientales.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto DGICYT PB91-0369 y el Proyecto PR189/92-4110.

## LITERATURA CITADA

- Alvarez, M. & T. Gallardo 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las algas. *Botánica Complutense* 32:12-60.
- Auger, K. R.; Carpenter, C.L.; Cantley, L.C. & L. Varticovski. 1989. Phosphatidylinositol 3 - Kinase and its novel products, phosphatidylinositol- 3- phosphate, are present in *Sacharomyces cerevisiae*. *Journal Biological Chemistry* 264:20181-20184.
- Bartholomew, D.M; Bartley, G.E. & P.A. Scolnik. 1991. Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiology* 96:291-296.
- Baserga, R.; Kaczmarek, L.; Calabretta, B.; Battini, R. & S. Ferrari. 1986. Cell cycle genes as potential oncogenes. In: Tanner, W. y D. Gallwitz (eds), *Cell cycle and oncogenes*. pp 3-12. Springer-Verlag, New York.
- Bradley, P.M. & D.P. Cheney. 1990. Some effects of plant growth regulators on tissue cultures of the marine red algae *Agardhiella subuleta*. *Hydrobiologia* 204/205:353-360.
- Bray, E.A. 1988. Drought and abscisic acid induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiology* 88:1210-1214.
- Cantley, L.C.; Auger, K.R.; Carpenter, C.; Duckworth, B.; Graziani, A.; Kapeller, R. & S. Soltoff. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64:281-302.
- Costas, E. & V. Lopez-Rodas. 1991. On growth factors, cell division cycle and the eukaryotic origin. *Endocytobiosis & Cell Research* 8:89-92
- Costas, E.; Aguilera, A.; González-Gil, S. & V. López-Rodas. 1993. Effects of mitotic growth factors on growth rates in marine dinoflagellates *Phycologia* 32(5). en prensa.
- Crow, F.J. & M. Kimura. 1970. In: Harper y Row (eds), *An introduction to population genetics theory*. 591 p. New York.
- Deng, X.W. & W. GUISSEM. 1987. Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49:379-387.
- Gentien, P. & R. Arzul. 1990. A theoretical case of competition based on the ectocrine production by *Gyrodinium cf. aureolum*. In: Graneli, E.; Sundström, B.; Edler, L. & D. M Anderson (eds), *Toxic Marine Phytoplankton*. pp. 161-164. Elsevier Sci. Publ. Co., New York.
- Goldman, J.C.; Dennett, M.R. & C.B. Riley. 1982. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO<sub>2</sub> supply in intensive microalgal cultures. *Biotechnology Bioengineering* 24:619-632.
- González de Chavarri, E. 1991. Producción de biomasa a base de microalgas y sus aplicaciones en la producción animal. Ph. Thesis. Universidad Complutense. Madrid. 142 p.

- González-Gil, S. 1991. Factores de crecimiento y control de la división celular en *P. lima* y *G. excavata*. Ms Thesis. Universidad Complutense Madrid. 40 pp.
- Gould, R.L. & P. Nurse. 1989. Tyrosin phosphorylation of the fission yeast cdc 2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**: 39-45.
- Goustin, A.S.; Leof, E.B.; Shipley, G.D. & H.L. Moses. 1986. Growth factors and cancer. *Cancer Research* **46**:1015-1029.
- Guillard, R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates In: Smith, W. y M. Chanley (eds), *Culture of marine invertebrate animals*. pp: 26-60. Planum Publ. Co., New York.
- Johnston, H.W. 1970. The biological and economic importance of algae. 3. Edible algal of fresh and brakish waters. *Tuatara* **18**: 19-35.
- Laing, I. & S.D. Utting. 1980. The influence of salinity in the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture* **21**:79-86.
- Lee, T.M.; Lur, H.S. & C. Chu. 1993. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa*) seedings. 1.1 Endogenous abscisic acid levels. *Plant Cell and Environment* **16**:481-490.
- Lopez-Rodas, V.; Navarro, M.; De la Campa, L.; González de Chavarri, E.; González-Gil, S.; Aguilera, A.; Segura, R. & E. Costas. 1991. In: F. Chavarria (ed), *Tras las pistas de los primeros mecanismos de control de la división celular: Una aproximación evolutiva*. Fundación Científica A.E.C.C. pp: 94-108. Madrid.
- Lopez-Rodas, V.; González Gil, S.; Aguilera, A. & E. Costas. 1992. Mecanismos de control biológico de la proliferación de dinoflagelados: 1- Factores de crecimiento y mitógenos. *Scientia Marina* **56**(4):293-299.
- Matsunami, K.R.; Campion, S.R.; Niyogi, S.K. & A. Stevens. 1990. Analogs of human Epidermal Growth Factor which partially inhibit the growth factor-dependent protein-tyrosine kinase activity of the Epidermal Growth Factor receptor. *Federation of European Biochemical Societies* **264**(1):105-108.
- Mora, B. & S. Fabregas. 1980. The effect of inorganic and organic mercury on growth kinetics of *Nitzschia acicularis* W.S.M. and *Tetraselmis suecica* Butch. *Canadian Journal Microbiology* **26**:930-937.
- Morotomi, M.; Guillen, G.; Logerfo, P. & I.B. Weinstein. 1990. Production of diacylglycerol, an activator of protein kinase C, by human intestinal microflora. *Cancer Research* **50**:3595-3599.
- North, P. 1991. Starting and stopping. *Nature* **351**:604-605.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulatin onset on M-phase. *Nature* **344**:503-509.
- Parmar P.N. & C.A. Brearley. 1993. Identification of 3-Phosphorylated and 4-Phosphorylated phosphoinositoides and inositol phosphates in stomatal guard cells. *Plant Journal* **4**:255-263.
- Peaud-Lenoel, C. 1977. The hormonal regulation of the cell division cycle. In: P.E. Pilet (ed), *Proceedings in life sciences. Plant Growth Regulation*. pp. 241-248. Springer Verlag, Berlin.

- Raven, P.H. & H. Curtis. 1975. *Biology of the Plants*. Worth Publishers (ed), New York. pp. 162-198.
- Reuse, S.; Maenhaut, C. & J.E. Dumont. 1990. Regulation of protooncogenes c-fos and c-myc expressions by protein tyrosine, protein kinase C, and cyclic AMP mitogenic pathway in Dog primary thyrocytes: A positive and negative control by cyclic AMP on c-myc expression. *Experimental Cell Research* 189:33-40.
- Siegel, S. 1956. A method for obtaining an ordered metric scale. *Psychometrika* 21:207-216.
- Soeder, C.J. 1980. Massive cultivation of microalgae: results and prospects *Hydrobiology* 72:197-209.
- Soong, P. 1980. Production and development of *Chorella* and *Spirulina* in Taiwan. In: G. Shelef y J. Soeder (eds), *Algae Biomass*. pp: 97-103 Elsevier, Amsterdam.
- Traxler, P.M.; Wacker, O.; Bach, Ha. L.; Geissler, J.F.; Kump, W.; Meyer, T.; Renegass, U.; Roeser, J.L. & N. Lyndon. 1991. Sulfonylbenzoyl-Nitrostyrenes: Potential bisubstrate type inhibitors of the EGF receptor tyrosine protein kinase. *Journal Medical Chemistry* 34:2328-2337.
- Watanabe, R.; Kitajima, C. & S. Fugita. 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34:115-143.
- Williams, M. 1977. Stereological techniques for electron microscopic morfometry. In: Hayat, M. (ed), *Principles and techniques of electron microscopy*. Elsevier Sci. Publ. Co., New York.
- Yasumoto, I. 1990. Marine microorganisms toxin- an overview. In: Graneli, E.; Sundstron, B.; Edler, L. y D.M. Anderson (eds), *Toxic Marine Phytoplankton*. pp 3-10. Elsevier Sci. Publ. Co., New York.