

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA  
DE GELIDIUM ARBUSCULA, GELIDIUM CANARIENSIS Y  
GRACILIARIA FERROX POR ELECTROFORESIS ISOENZIMÁTICA**

**PEDRO SOSA HENRÍQUEZ**

Las Palmas de Gran Canaria, 1991

---

## Fé de erratas.

---

<b>Página.</b>	<b>Donde dice.</b>	<b>Debe decir.</b>
23	tetraesporofitos	tetrasporofitos.
97	ALD	ALDO
101	Gottlieb, 1977a	Gottlieb, 1977.
222	DIA-2	DIA-3
241	Akatsuka, 1986a	Akatsuka, 1986.
Tabla 2.3.B	Volumen final (ml) 50	Volumen final (ml) 40
Tabla 6.38	DIA-2	DIA-3
Tabla 6.40	DIA-2	DIA-3

---



---

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD Y DIFERENCIACION  
GENETICA DE GELIDIUM ARBUSCULA, GELIDIUM  
CANARIENSIS Y GRACILARIA FEROX POR  
ELECTROFORESIS ISOENZIMATICA.**

---

**Memoria que presenta, el Lcdo. en Biología,  
Pedro Sosa Henríquez para aspirar al grado  
de Doctor en Ciencias del Mar.**

**Las Palmas de Gran Canaria, Abril de 1991.**

GUILLERMO GARCIA REINA, DOCTOR EN BIOLOGIA Y  
PROFESOR TITULAR DEL DPTO. DE BIOLOGIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Hace constar:

Que el Lcdo. en Biología D. Pedro Sosa Henríquez ha  
realizado el presente trabajo como memoria de Tesis  
Doctoral, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal  
Marina del Dpto. de Biología de la Universidad de Las  
Palmas de Gran Canaria, bajo su dirección, y se presenta  
con su V° B°.

Las Palmas de Gran Canaria,      Abril de 1991.

A Magda, la mujer que más sabe de electroforesis  
isoenzimática en macroalgas marinas.

## Agradecimientos.

---

Quiero dar mis más sinceras " ¡GRACIAS!"

\* Al Dr. Guillermo García Reina, por la dirección y el apoyo que he recibido en la realización del presente trabajo

\* Al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca del Plan de Formación de Personal Investigador (P.F.P.I.) que ha permitido poder financiar la formación como Doctor.

\* A la Universidad Politécnica de Canarias por ofrecerme los medios técnicos necesarios para **comenzar** esta investigación.

\* A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por ofrecerme los medios necesarios para **finalizar** esta investigación.

\* Al Plan de formación del profesorado de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria por la financiación para poder asistir a los diversos cursos, seminarios y estancias en otros centros de investigación nacionales e internacionales que han contribuido enormemente a la realización de este trabajo.

\* Al Dr. Angel Luque por su orientación y consejos desde que inicié este trabajo.

\* A los doctores D. José Jiménez, D. Pedro González de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, D. César Benito de la Universidad Complutense de Madrid y D. Vicente Moreno de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Valencia por revelarme sus secretos y conocimientos de las técnicas electroforéticas.

\* A la Dra. Ana María Vázquez del Departamento de genética de la Universidad Complutense de Madrid por su desinteresada ayuda y apoyo personal que siempre he recibido de ella.

\* Al Dr. Mario Díaz del Departamento de Fisiología Animal de la Universidad de La Laguna por esas apreciadísimas noches informatizadas de las cuales se obtuvieron y reformaron los programas aplicados.

\* A Juan Luis Gómez Pinchetti y Daniel Robledo por permitirme "librarme" de otros quehaceres en el laboratorio mientras redactaba este trabajo.

\* A la Dra. Nieves González, del Jardín Canario "Viera y Clavijo" de Las Palmas por su estimado asesoramiento ecológico y biológico de nuestras "amigas comunes".

\* Al doctor Juan Manuel Afonso de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas y al Dr. José Larruga del Departamento de Genética de la Universidad de La Laguna por sus apreciados consejos en genética de poblaciones.

\* Al doctor Rafael Robaina por sus siempre bien acogidos consejos y comentarios.

\* A la doctora María Candelaria Gil del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de La Laguna por sus comentarios y correcciones.

\* A Fernando Castillo y M<sup>a</sup> Mar Bernal por esas correcciones ortográficas tan oportunas como importantes.

\* A todo el personal del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, con especial énfasis a los becarios de investigación.

\* A la compañía Air Europa S.A. por las facilidades ofrecidas en los viajes a centros de investigación extranjeros.

\* Finalmente quiero agradecer muy especialmente a mi madre y mi familia el apoyo tan incondicional que siempre he recibido de ellos.

---

---

## Indice general.

---

<b>INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS. . . . .</b>	<b>1</b>
<b>I. METODOLOGIA. INTRODUCCION. . . . .</b>	<b>3</b>
1.1.-Introducción a la técnica de la electroforesis. . . . .	4
1.2.-Técnicas electroforéticas en macroalgas marinas. . . . .	4
1.2.1.-Fase de almacenamiento. . . . .	11
1.2.2.-Fase de extracción. . . . .	12
1.2.3.-Fase de separación en el gel. . . . .	15
1.2.4.-Fase de tinción y enzimas analizadas. . . . .	16
1.2.5.-El efecto "sin deshidrogenasa" . . . . .	17
<b>II. METODOLOGIA. MATERIAL Y METODOS . . . . .</b>	<b>18</b>
2.1.-Descripción de las especies. . . . .	20
2.1.1.- <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	20
2.1.2.- <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	20
2.1.3.- <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	20
2.2.-Tratamiento de las muestras. . . . .	23
2.2.1.-Almacenamiento a -20°C. . . . .	23
2.2.2.-Cultivo. . . . .	23
2.2.3.-Almacenamiento en nitrógeno líquido. . . . .	23
2.3.-Homogeneización de las muestras. . . . .	24
2.3.1.-Tampones de extracción. . . . .	24
2.3.2.-Homogeneización sin centrifugación. . . . .	24
2.3.3.-Homogeneización con centrifugación. . . . .	26
2.4.-Fabricación de los geles. . . . .	26
2.4.1.-Geles de almidón. . . . .	26
2.4.2.-Soluciones tampón empleadas en la electroforesis de almidón . . . . .	27
2.4.3.-Geles de acrilamida. . . . .	28



---

2.4.4.-Soluciones tampón empleadas en la electroforesis de acrilamida. ....	32
2.5.-Condiciones de la electroforesis. ....	33
2.5.1.-Electroforesis en almidón. ....	33
2.5.2.-Electroforesis en acrilamida ....	34
2.6.-Preparación de los geles para la tinción. ....	35
2.6.1.-Geles de almidón. ....	35
2.6.2.-Geles de acrilamida. ....	35
2.7.-Métodos de tinción. ....	35
2.8.-Sistemas enzimáticos ensayados. ....	36
2.9.-Fijación de los geles. ....	62
<b>III. METODOLOGIA. RESULTADOS Y DISCUSION. ....</b>	<b>63</b>
3.1.-Actividad general de los sistemas enzimáticos. ....	64
3.2.-Efecto del almacenamiento sobre la actividad enzimática. ....	69
3.2.1.-Almacenamiento a -20°C ....	69
3.2.2.-Efecto del almacenamiento a -20°C. ....	69
3.2.3.-Almacenamiento en cámara de cultivo. ....	70
3.3.-Efecto del tratamiento de homogeneización ....	71
3.3.1.-Tampones de extracción. ....	73
3.4.-Electroforesis en acrilamida. ....	78
3.5.-Electroforesis en almidón. ....	84
3.6.-Diferencias entre los geles de acrilamida y almidón ...	89
3.7.-Tinción. ....	90
3.7.1.-Enzimas con actividad. ....	90
3.7.2.-Enzimas sin actividad. ....	97
3.7.3.-El efecto "sin deshidrogenasa". ....	98
<b>IV. GENETICA. INTRODUCCION ....</b>	<b>100</b>
4.1.-Aplicación de las técnicas electroforéticas en la genética de poblaciones ....	101

4.2.- Aplicación de las técnicas electroforéticas en	
macroalgas marinas. . . . .	104
4.2.1.-Aplicación con fines taxonómicos. . . . .	105
4.2.2.-Aplicación con fines genéticos. . . . .	107
4.3.-Medidas de la variabilidad genética. . . . .	110
4.3.1.-Proporción de loci polimórficos. . . . .	110
4.3.2.-Heterocigosidad observada. . . . .	111
4.3.3.-Heterocigosidad esperada. . . . .	112
4.3.4.-Número medio de alelos por locus. . . . .	113
4.3.5.-Número medio de alelos por locus polimórfico. . . . .	113
4.4.- Los genes en las poblaciones. La ley de	
Hardy-Weinberg. . . . .	114
4.5.-Distancia genética. . . . .	116
4.6.-Loci diagnóstico. . . . .	121
4.7.-Relación entre la distancia genética y el	
tiempo evolutivo. . . . .	121
4.8.-Filogenias electroforéticas. . . . .	124
4.9.-Análisis de la estructura genética de una población	
subdividida en subpoblaciones. . . . .	126
4.9.1.-Índices de fijación de Wright. . . . .	126
4.9.2.-Parámetros de diversidad génica. . . . .	128
<b>V. GENÉTICA. MATERIAL Y METODOS. . . . .</b>	<b>129</b>
5.1.-Muestreo de los individuos. . . . .	130
5.2.-Descripción de las poblaciones. . . . .	130
5.2.1.-Gáldar. . . . .	131
5.2.2.-Agaete. . . . .	131
5.2.3.-Puerto de la Cruz. . . . .	131
5.2.4.-Las Palmas de Gran Canaria.. . . . .	131
5.3.-Condiciones de electroforesis. . . . .	133
5.4.-Identificación y nomenclatura de loci alelos. . . . .	133
5.5.-Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas. . . . .	135
5.5.1.-Frecuencias genotípicas. . . . .	135

---

5.5.2.-Frecuencias alélicas. . . . .	135
5.6.-Análisis de las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. . . . .	136
5.7.-Medidas de la variación genética. . . . .	138
5.7.1.-Proporción de loci polimórficos. . . . .	138
5.7.2.-Heterocigosidad observada. . . . .	138
5.7.3.-Heterocigosidad esperada. . . . .	138
5.7.4.-Número medio de alelos por locus . . . . .	139
5.7.5.-Número medio de alelos por locus polimórfico. . . . .	140
5.8.-Determinación de las frecuencias genotípicas en el equilibrio de Hardy-Weinberg. . . . .	140
5.9.-Determinación de loci diagnóstico. . . . .	141
5.10.-Estimación de las distancias genéticas entre las poblaciones y subpoblaciones. . . . .	142
5.10.1.-Distancia de Rogers. . . . .	142
5.10.2.-Distancia genética de Nei. . . . .	142
5.11.-Relación entre la distancia genética y el tiempo de evolución . . . . .	144
5.12.-Análisis de la estructura genética de una población subdividida en subpoblaciones. . . . .	144
5.12.1.-Índice de Wright. . . . .	144
5.12.2.-Índices de Nei. . . . .	146
5.13.-Establecimiento de relaciones filogenéticas. . . . .	147
<b>VI. GENÉTICA. RESULTADOS. . . . .</b>	<b>149</b>
6.1.-Número de individuos analizados. . . . .	150
6.2.-Interpretación genética de los zimogramas. . . . .	150
6.2.1.-Ficoeritrina. . . . .	152
6.2.2.-Fosfatasa alcalina. . . . .	152
6.2.3.-Diaforasa. . . . .	155
6.2.4.-Esterasa. . . . .	157
6.2.5.-Glutamato deshidrogenasa. . . . .	157

6.2.6.-Malato deshidrogenasa. ....	160
6.2.7.-Fosfoglucoisomerasa. ....	161
6.2.8.-Fosfoglucomutasa. ....	164
6.2.9.-Superóxido dismutasa. ....	164
6.3.-Frecuencias génicas y genotípicas. ....	167
6.4.-Variabilidad genética. ....	173
6.4.1.-Número medio de alelos por locus. ....	173
6.4.2.-Número medio de alelos por locus polimórfico. ....	177
6.4.3.-Proporción de loci polimórficos. ....	177
6.4.4.-Heterocigosidad observada. ....	179
6.4.5.-Heterocigosidad esperada. ....	183
6.5.-Comparación de las frecuencias genotípicas en el equilibrio de Hardy-Weinberg. ....	183
6.6.-Comparación de las frecuencias alélicas entre poblaciones. ....	188
6.7.-Loci diagnóstico. ....	193
6.8.-Distancia e identidad genética entre las poblaciones. .	196
6.9.-Distancia e identidad genética entre especies. ....	204
6.10.-Tiempo de divergencia evolutivo. ....	208
6.11.-Relaciones filogenéticas entre subpoblaciones. ....	212
6.12.-Diferenciación genética entre las subpoblaciones. ..	219
6.12.1.-Índices de fijación de Wright. ....	219
6.12.2.-Índices de diversidad genética de Nei. ....	223
<b>VII. GENÉTICA. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>227</b>
7.1.-Discusión. ....	228
7.1.1.-Individuos analizados. ....	228
7.2.-Loci y enzimas analizadas. ....	229
7.3.-Desviaciones de las frecuencias del equilibrio de Hardy-Weinberg. ....	233
7.4.-Variabilidad genética de las especies. ....	235
7.4.1.-Número medio de alelos por locus. ....	235

---

7.4.2.-Proporción de loci polimórficos. . . . .	236
7.4.2.1.-Subpoblaciones esporofíticas. . . . .	236
7.4.2.2.-Subpoblaciones gametofíticas. . . . .	236
7.4.3.-Heterocigosidad observada. . . . .	237
7.4.4.-Heterocigosidad esperada. . . . .	237
7.4.4.1.-Subpoblaciones esporofíticas. . . . .	237
7.4.4.2.-Subpoblaciones gametofíticas. . . . .	238
7.5.-Causas de la escasa variabilidad genética. . . . .	238
7.6.-Preponderancia de las fases en las poblaciones. . . . .	241
7.7.-Diferenciación genética entre fases. . . . .	245
7.8.-Diferenciación genética entre poblaciones. . . . .	245
7.9.-Distancia e identidad genética entre poblaciones y subpoblaciones. . . . .	248
7.10.-Relaciones filogenéticas intrapoblacionales. . . . .	250
7.11.-Distancia e identidad genética entre especies. Loci diagnóstico. . . . .	251
7.12.-Tiempos evolutivos entre especies. . . . .	253
<b>VIII. CONCLUSIONES. . . . .</b>	<b>255</b>
8.1.-Conclusiones metodología. . . . .	256
8.2.-Conclusiones genética. . . . .	257
<b>BIBLIOGRAFIA. . . . .</b>	<b>259</b>

---



---

## Indice de tablas.

---



---

TABLA 1.1.	Metodología aplicada y enzimas analizadas por electroforesis en macroalgas marinas. ....	6
TABLA 2.1.	Composición de las soluciones stock en la elaboración del medio de cultivo .....	24
TABLA 2.2.	Tampones de extracción ensayados .....	25
TABLA 2.3.	Preparación de los geles de acrilamida .....	30
TABLA 2.4.	Concentración de los componentes ensayados en los tampones de electrodos y gel en poliacrilamida .....	32
TABLA 2.5.	Sistemas enzimáticos ensayados .....	37
TABLA 3.1.	Clasificación de las enzimas según la actividad obtenida. ....	65
TABLA 3.2.	Resultados obtenidos con los tampones de extracción en el grupo "enzimas con actividad" .....	74
TABLA 3.3.	Resolución obtenida en el grupo "enzimas con actividad" empleando electroforesis en acrilamida .....	78
TABLA 3.4.	Resolución obtenida en el grupo "enzimas con actividad" empleando electroforesis en almidón .....	85
TABLA 3.5.	Compuestos añadidos a las soluciones de tinción del grupo "enzimas sin actividad" .....	98
TABLA 4.1.	Especies y parámetros empleados en el análisis de la variabilidad genética mediante electroforesis isoenzimática en macroalgas marinas .....	108
TABLA 6.1.	Loci fijados y loci polimórficos detectados en las tres especies analizadas .....	151

---

TABLA 6.2.	Frecuencias genotípicas de los loci polimórficos detectados en las poblaciones de <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	168
TABLA 6.3.	Frecuencias genotípicas detectadas en los loci polimórficos en las poblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	169
TABLA 6.4.	Frecuencias genotípicas de los loci polimórficos detectados en las poblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	170
TABLA 6.5.	Frecuencias alélicas de los loci polimórficos detectados en las subpoblaciones de <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	171
TABLA 6.6.	Frecuencias alélicas de los loci polimórficos detectados en las subpoblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	172
TABLA 6.7.	Frecuencias alélicas de los loci polimórficos detectados en las subpoblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	173
TABLA 6.8.	Proporción de loci polimórficos y número medio de alelos por locus detectados en las subpoblaciones de <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	174
TABLA 6.9.	Proporción de loci polimórficos y número medio de alelos por locus detectados en las subpoblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	175
TABLA 6.10.	Proporción de loci polimórficos y número medio de alelos por locus detectados en las subpoblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	176
TABLA 6.11.	Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) detectadas en las poblaciones y loci polimórficos de <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	180
TABLA 6.12.	Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) detectadas en las poblaciones y loci polimórficos de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	181

---

TABLA 6.13. Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) detectadas en las poblaciones y loci polimórficos de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	182
TABLA 6.14. Número de esporofitos observados y esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada genotipo en los locus polimórficos de las tres poblaciones de <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	184
TABLA 6.15. Número de esporofitos observados y esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada genotipo en los locus polimórficos de las tres poblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	186
TABLA 6.16. Valores de $X^2$ en el equilibrio de Hardy-Weinberg en <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	187
TABLA 6.17. Número de esporofitos observados y esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada genotipo en los locus polimórficos de las poblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	187
TABLA 6.18. Valores de $X^2$ al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas en <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	189
TABLA 6.19. Valores de $X^2$ al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas en <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	191
TABLA 6.20. Valores de $X^2$ al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas en <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	193
TABLA 6.21. Identificación de loci diagnóstico entre <i>Gelidium arbuscula</i> y <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	194
TABLA 6.22. Comparación entre los loci detectados en <i>Gracilaria ferox</i> y ambas especies de <i>Gelidium</i> . . . . .	195



---

TABLA 6.23.	Distancia genética e identidades genéticas entre las subpoblaciones de <i>Gelidium arbuscula</i> según Nei. ....	197
TABLA 6.24.	Distancia genética y similitud genética entre las subpoblaciones de <i>Gelidium arbuscula</i> según Rogers. ....	198
TABLA 6.25.	Distancia genética e identidad genética entre las subpoblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> según Nei. ....	200
TABLA 6.26.	Distancia genética e identidad genética entre las subpoblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> , según Rogers. ....	201
TABLA 6.27.	Distancia genética e identidad genética entre las subpoblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> según Nei. ....	202
TABLA 6.28.	Distancia genética y similitud genética entre las subpoblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> según Rogers. ....	202
TABLA 6.29.	Distancia genética media e identidad genética media de todas las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas entre las tres especies analizadas, según Nei. ....	205
TABLA 6.30.	Distancia genética media y similitud genética de todas las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas entre las tres especies analizadas, según Rogers. ....	206
TABLA 6.31.	Distancia genética media e identidad genética media entre las tres especies analizadas, según Nei. ....	207
TABLA 6.32.	Distancia genética media y similitud genética media entre las tres especies analizadas, según Rogers. ....	207
TABLA 6.33.	Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las subpoblaciones de <i>Gelidium arbuscula</i> . ....	209

TABLA 6.34.	Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las subpoblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	210
TABLA 6.35.	Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las subpoblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	211
TABLA 6.36.	Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las tres especies analizadas. . . . .	211
TABLA 6.37.	Valores obtenidos del índice de fijación $F_{IS}$ de cada locus polimórfico analizado en las subpoblaciones esporofíticas de <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	220
TABLA 6.38.	Valores obtenidos del índice de fijación $F_{IS}$ de cada locus polimórfico analizado en las subpoblaciones esporofíticas de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	220
TABLA 6.39.	Valores de los índices de fijación de Wright detectados en <i>Gelidium arbuscula</i> entre todas las subpoblaciones. . . . .	221
TABLA 6.40.	Valores de los índices de fijación de Wright detectados en <i>Gelidium canariensis</i> entre todas las subpoblaciones. . . . .	221
TABLA 6.41.	Diversidad genética obtenida en los loci polimórficos detectados en <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	224
TABLA 6.42.	Diversidad genética obtenidos en los loci polimórficos detectados en <i>Gelidium arbuscula</i> . . . . .	225
TABLA 6.43.	Diversidad genética obtenidos en los loci polimórficos detectados en <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	226
TABLA 7.1.	Identidad genética de Nei (I) y similitud genética de Rogers (Sr) detectados en macroalgas marinas. . . . .	249

---

## Índice de figuras.

---

FIGURA 2.1.	Ciclo de vida de <i>Gelidium</i> . . . . .	22
FIGURA 5.1.	Mapa de localización de las poblaciones analizadas. . . . .	132
FIGURA 6.1a.	Representación del patrón total de bandas obtenido para ficoeritrina. . . . .	153
FIGURA 6.1b.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima fosfatasa alcalina. . . . .	154
FIGURA 6.1c.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima NADH-Diaforasa. . . . .	156
FIGURA 6.1d.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima esterasa. . . . .	158
FIGURA 6.1e.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima glutamato deshidrogenasa. . . . .	159
FIGURA 6.1f.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima malato deshidrogenasa. . . . .	162
FIGURA 6.1g.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima fosfoglucoisomerasa. . . . .	163
FIGURA 6.1h.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima fosfoglucomutasa. . . . .	165
FIGURA 6.1i.	Representación del patrón total de bandas obtenido para la enzima superóxido dismutasa. . . . .	166
FIGURA 6.2.	Dendrograma UPGMA empleando las distancias de Nei para las poblaciones de <i>Gelidium</i> <i>arbuscula</i> . . . . .	213
FIGURA 6.3.	Dendrograma UPGMA empleando las distancias de Rogers para las poblaciones de <i>Gelidium</i> <i>arbuscula</i> . . . . .	214
FIGURA 6.4.	Dendrograma UPGMA empleando las distancias de Nei para las poblaciones de <i>Gelidium</i> <i>canariensis</i> . . . . .	215

---

FIGURA 6.5.	Dendrograma UPGMA empleando las distancias de Rogers para las poblaciones de <i>Gelidium canariensis</i> . . . . .	216
FIGURA 6.6.	Dendrograma UPGMA empleando las distancias de Nei para las poblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	217
FIGURA 6.7.	Dendrograma UPGMA empleando las distancias de Rogers para las poblaciones de <i>Gracilaria ferox</i> . . . . .	218

---

**Abreviaciones empleadas.**

---

---

DCPIP	Diclorofenol indofenol.
EDTA	Etilén diamino tetra-acético.
2-Me	2-Mercaptoetanol.
DTT	Dietil ditiotreitól.
MBS	Metabisulfito sódico.
DEDC	Dietil ditio carbámico.
NAD	Nicotín adenina dinucleótido.
NADP	Nicotín adenina dinucleótido fosfato.
PVP	Polivinil pirrolidona.
PVPP	Polivinil polipirrolidona.
ClNa	Cloruro sódico.
Cl <sub>2</sub> Mg	Cloruro magnésico.
Cl <sub>2</sub> Mn	Cloruro manganésico.
ClK	Cloruro potásico.
BSA	Albumina de suero de bovino.
TBS	Tetraborato sódico.
KI	Ioduro potásico.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato sódico.
KBr	Bromuro potásico.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
Cl <sub>2</sub> Ca	Cloruro cálcico.
DMF	Dimetil formamida.
NO <sub>2</sub> Zn	Nitrato de Cinc.
MTT	1-[4,5-dimetil-2-il]-3,5-difenil formazano.
PMS	Fenacin metosulfato.
NBT	Nitro blue tetrazolio.
SDS	Dodecil Sulfato Sódico.
IEF	Isoelectroenfoque.

**INTRODUCCION GENERAL  
Y OBJETIVOS.**

---

## Introducción general y objetivos.

Las macroalgas marinas constituyen un grupo de vegetales pluricelulares de hábitat marino que, debido a su lejanía evolutiva, presentan unas características ecológicas, fisiológicas y bioquímicas diferentes a las plantas vasculares (Lobban *et al.*, 1985).

Dentro de ellas, las Rodofitas constituyen un grupo muy especializado que difieren marcadamente en muchos aspectos fisiológicos y reproductivos del resto de las divisiones (Dixon, 1973). Uno de los aspectos más importantes es la presencia, en determinados géneros, de polisacáridos especializados en las paredes celulares cuyas propiedades físico-químicas los hacen insustituibles para las industrias alimenticias, farmacológicas y cosméticas (Mclachlan, 1985; Chapman y Chapman, 1980). La extracción y comercialización de tales compuestos, agar y carragenatos principalmente, ha generado un mercado anual estimado entre 1 y 2 billones de dólares (Benson y Bird, 1987; Jensen, 1979).

A pesar de su importancia económica, no han sido organismos atractivos para estudios genéticos debido probablemente, entre otras razones a: 1) La complejidad de los ciclos de vida en la mayoría de las especies o a su desconocimiento. 2) Los largos periodos de tiempo necesarios para obtener descendencia. 3) La gran plasticidad morfológica de estos organismos y 4) el desconocimiento general de caracteres mendelianos, lo que dificulta enormemente distinguir y estudiar caracteres constantes con herencia demostrable (Dring, 1982).

A pesar de estos problemas, los conocimientos actuales de la transmisión genética en macroalgas han aumentado desde los primeros trabajos de Fjeld y Lovlie (1976) en *Ulva*, debido fundamentalmente al descubrimiento de clones mutantes de *Gracilaria* y *Porphyra* (van der Meer, 1986; van der Meer *et al.*, 1984; Ma y Miura, 1984; Miura y Kunifuni, 1980) y al descubrimiento de recombinantes mitóticos en regiones maduras de tetrasporofitos de *Gracilaria* (van der Meer y Todd, 1977; van der Meer, 1981; ver revisión van der Meer, 1986).

Sin embargo, el conocimiento de aspectos básicos de genética cuantitativa y poblacional es prácticamente nulo. Estas ramas de la genética son las de mayor incidencia en el desarrollo de programas de mejora genética, que constituyen un requisito imprescindible para el desarrollo de la maricultura macroalgal en occidente.

El conocimiento en macroalgas marinas de un aspecto tan básico como el grado de variabilidad genética se circunscribe a la única especie con la que se ha abordado un programa de mejora genética, *Laminaria japonica* (Fang, 1983).

Como en cualquier programa ortodoxo de mejora genética, el desarrollo en *Laminaria japonica* vino precedido del estudio de la variabilidad genética existente en las poblaciones naturales, (por electroforesis isoenzimática), indicando que la estrategia más adecuada era la de selección y cruzamientos dirigidos, ya que esta especie presentaba una variabilidad genética natural elevada (Fang, 1983).

Relacionado con el desconocimiento general del grado de variabilidad genética de macroalgas marinas lo está el de la metodología para su estudio: la electroforesis isoenzimática.

Los objetivos del presente trabajo se han centrado en los dos aspectos anteriormente mencionados:

- 1) Adecuar los diversos aspectos metodológicos de la electroforesis isoenzimática aplicables a agarofitas y específicamente a *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*.
- 2) Evaluar el grado de variabilidad y diferenciación genética de las poblaciones naturales de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* del archipiélago canario, así como establecer las relaciones filogenéticas existentes entre las tres especies.

Debido a que son dos objetivos dispares en cuanto a su metodología de trabajo y análisis de los resultados, se presentan por separado en dos apartados: A) Metodología y B) Genética.



**I. METODOLOGIA.  
INTRODUCCION.**

### **1.1.- Introducción a la técnica de la electroforesis.**

La mayoría de los polímeros biológicos, tales como proteínas y ácidos nucleicos, tienen grupos ionizables que normalmente les confiere carga negativa en disolución acuosa. En el caso de las proteínas, esta ionización depende directamente del pH de la solución donde se encuentren y de los grupos químicos capaces de ionizarse.

En una extracción proteica existe una gran diversidad de proteínas en cuanto a cargas y masas por lo que, aunque posean la misma carga neta, es muy probable que tengan distintas relaciones carga/masa. Estas diferencias les confiere una migración diferencial al ser sometidas a un campo eléctrico, constituyendo la base de las técnicas electroforéticas aplicadas a proteínas.

La electroforesis es muy versátil y constituye una de las tres técnicas más usadas en la separación de polímeros moleculares, junto con la cromatografía líquida y la ultracentrifugación (Gordon *et al.*, 1988).

A pesar de su popularidad y del gran número de artículos y manuales, donde se describe ampliamente la técnica (Brewer, 1970; Maurer, 1971; Oelshlegel y Stahmann, 1973; Harris y Hopkinson, 1976; Carr y Jonhson, 1980; Soltis *et al.*, 1983; Hames y Rickwood, 1982; Shields *et al.*, 1983; Kephart, 1990; Weeden y Wendel, 1989) no se encuentra estandarizada para todos los organismos, debido fundamentalmente a la gran cantidad de variables que afectan la preparación, separación y resolución electroforética, siendo común que cada autor emplee una metodología diferente, incluso a igualdad de organismo y tejido analizado (Kephart, 1990).

### **1.2.- Técnicas electroforéticas en macroalgas marinas.**

Las variables metodológicas introducidas por diversos autores en el análisis electroforético de macroalgas marinas se incluyen en las 4 etapas en que se puede dividir la electroforesis isoenzimática:

I) Fase de almacenamiento. II) Fase de extracción enzimática. III) Fase de separación en el gel. IV) Fase de tinción.

Aunque las diversas variables metodológicas introducidas dependen fundamentalmente de las especies analizadas, no existe ningún trabajo en

macroalgas donde se hayan comparado y discutido estas variables. En todos los artículos se cita la metodología empleada sin discutir su elección, basada con escasas modificaciones en los métodos empleados en plantas superiores.

La única revisión existente sobre electroforesis isoenzimática en macroalgas (Cheney, 1985) no describe la metodología empleada por otros autores ni discute la técnica electroforética aplicada específicamente a macrófitos marinos (tampones de extracción, sistemas de tampones de separación y métodos de tinción) discutiendo los aspectos metodológicos en base a los trabajos desarrollados en helechos (Soltis *et al.*, 1983) y plantas superiores (Gottlieb, 1981).

La revisión de la metodología aplicada a macroalgas marinas se resume en la Tabla 1.1, donde se resumen los trabajos de electroforesis en estas plantas, señalando los tampones de extracción empleados, las enzimas y especies analizadas, así como el método de separación electroforético utilizado.

TABLA 1.1. Metodología aplicada y enzimas analizadas por electroforesis en macroalgas marinas.

Especies analizadas.	acrilamida (P). Almidón (A).	Almacenamiento.	Tampón extracción.	Homogeneización.	Centrifugación.	Tampón separación.	Enzimas detectadas.	Referencia.
<b>FEOFITAS.</b>								
Chorda filum Chordaria flageliformis Fucus filiformis	P(7.5%)	No almacenan las muestras	Fosfato 7.0. NaCl. Tris-HCl 7.8 P.fosfato 8.35 Borato Na 8.5. Otros.	Homogeneizador mecánico.	12000 x g 30'	Sistema discontinuo Davis.	GP	Young, 1970.
Fucus serratus Alaria esculenta Ascophyllum nodosum	P 6.4%	Plantas secas 4°C 7 días.	MOPS 7.4 Vit.C, DTT PVPP, CaCl <sub>2</sub> , Tween-80	Mortero con N <sub>2</sub> .	5000 x g 5'	Sistema discontinuo Davis.	ACP, ALP PX, MDH, EST	Marsden et al. 1981.
F. serratus F. vesiculosus F. spiralis Laminaria digitata L. hyperborea L. saccharina Pelvetia canaliculata		Iguales condiciones	que Marsden et al. 1981.				ACP, ALP LAP, MAN1PDH	Marsden et al. 1984a, 1984b.

**TABLA 1.1. Continuación.**

Xiphophora gladiata X. chondrophylla. P Hormosira banksii 8.0% Phyllospora comosa Caulocystis uvifera Cystophora xiphocarpa	Plantas frescas 24-48 h. 4°C	Marsden 1981.	Mortero con N <sub>2</sub> . Prensa con bomba hidráulica.	1500 x g 5'	Tris-Citrato 8.6	21 enzimas	Rice y Crowden 1987.
--	---------------------------------------	------------------	---	----------------	------------------	------------	-------------------------

**CLOROFITAS.**

Ulva lactuca           Iguales condiciones que Young, 1970.  
Enteromorpha sp  
Spongomorpha arcta

Enteromorpha linza.	A (12%) P (5-7.5%)	Cultivo. 1-4 semanas	Tris-HCl 8.0 sacarosa.	Homoge- neizador de cristal	3000 x g 10'	Tris-Borato 8.9  TEB 8.7	AMY, GOT PGM, TO  Innes y Yarish 1984. Innes, 1987; 1988.
Codium fragile	A (12%)	4°C. 12 h.	Tris-HCl 7.0, EDTA NADP, Me	Homoge- neizador mecánico	3020 x g 10'	TEB 8.6 TEC 8.0 Tris-Glicina 8.6	ACP, ALP, Malinowsky, 1974. CAT, MDH, GOT, G6PDH PGI, PEP, TO.
Chaetomorpha linum C. atrovirens C. aerea C. melagonium	A (12%)	No almace- nan las muestras	Tris-HCl 6.8, PVP, EDTA	Mortero	No centri- fugan las muestras	Cheney y Babbel, 1978	MDH, PGI, Blair et al., 1982. G6PDH, ACP

**TABLA 1.1. Continuación.**

Ulva mutabilis	A (7.5%)	Cultivo	Tris-HCL 9.4, NaCl EDTA	Prensa francesa	11500 rpm 20' 20000 rpm 20'	Tris-Sulfato 9.0	GP	Hoxmark, 1975.
Ulva mutabilis	A (en gra- diente). IEF.	Cultivo	??	Prensa francesa	110000 x g 15'	SDS-DTT Tris-HCL.	GP	Hushovd et al. 1982
<b>RODOFITAS.</b>								
Chondrus crispus	Ver Young, 1970.						Young, 1970.	
Polysiphonia sp								
Porphyra umbilicalis								
Corallina officinalis								
Rhodymenia palmata								
Eucheuma nudum	A (12%)	Cultivo	Tris-HCl	Mortero	No centri- fugan las	Tris-Glicina 8.3	MDH, ACP	Cheney y Babbel,
E. acanthocladum		1 semana.	6.8, EDTA		muestras	Tris-citrato 7.6	PGI, PGM	1978.
E. isiforme								
E. gelidium								
Chondrus crispus	Iguales condiciones		que Cheney y Babbel, 1978.				MDH, PGI	Cheney y Mathieson,
							PGM, ACP	1979.
Porphyra tenera	A (11.5%)	Congela- ción	Agua destilada	Homoge- neizador de cristal	3500 rpm 10'	Tris-Citrato 7.0	CAT, TO, PX, MDH, GDH, PGI, EST, GOT, LAP.	Miura et al., 1978a
P. yesoensis								
P. kuniedci								
P. pseudolinearis	extracto -20°C 6-16 h.							

TABLA 1.1. Continuación.

P. yesoensis	Iguales condiciones que Miura et al., 1978a					CAT	Miura et al., 1978b.
P. yesoensis	Iguales condiciones que Miura et al., 1978a					CAT, PX, MDH, IDH, PGM, PGI.	Miura et al., 1979.
P. yesoensis	A (11.5%)	Congelación talos y extracto -80°C.	Agua destilada sacarosa	Homogeneizador de cristal	3000 rpm 25'	Fujio, 1984.	12 enzimas. Fujio et al. 1985; 1987.
P. yesoensis Undaria pinnatifida	A (??)	Congelación talos y extracto -20°C.	Agua destilada glicerol	??	3000 rpm 20'	Shaw y Prasad 1970	PGI, PGM GDH Okumura y Fujino 1986.
Goniotrichum alsidii Erythrocladia sp E. carnea Bangia fuscopurpurea Porphyra leucosticta Acrochaetium sagraeanum Nemalion multifidum Trailliella intricata Ceramium fastigiatum Seirospora griffithsiana Spermothamnion turnerii	P (7%)	Cultivo	Tris-HCl 8.0 cisteína	Homogeneizador Duall y Ten-Broeck	20000 x g 30'	Sistema discontinuo Davis	EST, ACP LAP, BP. Mallery y Richardson 1971; 1972.

**TABLA 1.1. Continuación.**

Palmaria palmata P. hecatensis P. mollis P. callophyloides Devaleraea ramentacea Halosaccion glandiforme	A (12.5%)	Cultivo 4 meses Congelación -20°C y -80°C Liofilización.	MOPS 7.4 PVP, EDTA Me, MBS ascórbico	Mortero con N <sub>2</sub> Homogeneizador aspas.	10000 rpm 10'	TEB 8.6	14 enzimas	Lindstrom y South, 1989.
Porphyra fallax P. abbottae P. kanakaensis P. torta P. sanjuanensis	A (12%)	Cultivo Congelación -80°C	Iguales condiciones que Lindstrom y South, 1989.				13 enzimas	Lindstrom y Cole, 1990.
Callithamnion tetricum C. sepositum C. granulatum C. hookeri C. tetragonum	IEF A (SDS)	Congelación talos en N <sub>2</sub> Liofilización extractos.	Marsden et al., 1981.	Mortero N <sub>2</sub> .	5000 rpm 15'	IEF 3.5-9.5 Davis con SDS.	GP.	Price et al., 1987

TEB= Tris-EDTA-Borato. TEC= Tris-EDTA-Citrato. IEF= Isoelectroenfoque. ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. AMY= Amilasa. BP= Biliproteínas. CAT= Catalasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. G6PDH= Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. GOT= Aspartato aminotransferasa. GP= Proteínas totales. IDH= Isocitrato deshidrogenasa. LAP= Leucin aminopeptidasa. MDH= Malato deshidrogenasa. MAN1PDH= Manitol 1 fosfato deshidrogenasa. PEP= Peptidasa. PGM= Fosfoglucomutasa. PGI= Fosfoglucoisomerasa. PX Peroxidasa. TO= Tetrazolium oxidasa.



### 1.2.1.- FASE DE ALMACENAMIENTO.

La imposibilidad de realizar el análisis genético completo en un sólo ensayo y en el mismo momento de recoger las muestras obliga a almacenarlas durante un tiempo hasta su empleo en la electroforesis. En plantas superiores se ha descrito la pérdida de actividad enzimática tras el almacenamiento de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Kephart, 1990), relacionándose esta pérdida con la ruptura de la compartimentalización celular y la consecuente producción de cambios oxidativos que inhiben las enzimas (Loomis, 1974). Por el contrario, la ultracongelación constituye un método de almacenamiento que permite preservar la actividad enzimática de los extractos proteicos de plantas superiores durante espacios de tiempos muy prolongados (hasta 1 ó 2 años), (Kephart, 1990).

La variedad de tipos de almacenamientos empleados en macroalgas (Tabla 1.1) indica claramente el carácter empírico de esta fase.

En Rodofitas y Clorofitas se ha empleado mayoritariamente el cultivo de las especies en laboratorio hasta su posterior utilización (Cheney y Babbel, 1978; Innes y Yarish, 1984; Innes, 1987; 1988; Lindstrom y South, 1989; Hushoud *et al.*, 1982; Malinowsky, 1974; Mallery y Richardson, 1971; 1972). Por lo general se emplea agua de mar filtrada, sin especificarse el régimen de luz empleado. Con diversas especies de *Porphyra*, se ha empleado la congelación de los talos o de los extractos a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  como sistema de almacenamiento, aunque no se menciona el tiempo en que se mantuvieron los talos congelados, ni se ha cuantificado la probable pérdida de actividad enzimática debida a la congelación. Miura *et al.* (1978a; 1978b; 1979) realizan la homogeneización de los individuos inmediatamente después de la recolección, almacenando posteriormente los extractos a  $-20^{\circ}\text{C}$  entre 6 y 16 horas. Fujio *et al.* (1985; 1987) congelan previamente los talos a  $-80^{\circ}\text{C}$  (sin especificar el tiempo de congelación), a continuación realizan la extracción enzimática y vuelven a congelar el extracto durante un día, después del cual centrifugan y lo emplean para la electroforesis. Okumura y Fujino (1986) congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  indistintamente los talos y el sobrenadante, sin especificar el tiempo ni evaluar la pérdida de actividad enzimática.

Lindstrom y South (1989) estudiaron el efecto del almacenamiento de los talos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a  $-80^{\circ}\text{C}$  y tras liofilizar los extractos, encontrando que ciertas enzimas (G6PDH, GOT, PGM, SOD y 6PGDDH) perdían actividad si los talos se almacenaban a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras que la conservaban si se almacenaban a  $-80^{\circ}\text{C}$  o se liofilizaban. Igualmente, Innes y Yarish (1984) almacenaron los extractos de *Enteromorpha linza*, a  $-80^{\circ}\text{C}$  sin encontrar pérdida de actividad enzimática (Tabla 1.1).

En Feofitas, Marsden *et al.* (1981; 1984a; 1984b) y Rice y Crowden (1987) han conservado los talos a  $4^{\circ}\text{C}$  entre 24 h y más de una semana. La extracción proteica posterior no permitió detectar variación alguna en la resolución enzimática después del periodo de tiempo en que se mantuvieron almacenadas las muestras (Tabla 1.1).

Otros autores (Price *et al.*, 1987) almacenan los individuos en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización, encontrando una pérdida importante de actividad enzimática si se emplea otro sistema de almacenamiento (J. Price, 1990. com. pers.).

### 1.2.2.- FASE DE EXTRACCION.

Aunque la extracción enzimática constituye la fase más crítica del proceso electroforético (Cheney, 1985) es uno de los aspectos experimentales menos considerado y discutido en la literatura. La mayoría de los artículos, tanto referidos a plantas superiores como a macroalgas, citan la homogeneización y la composición de los tampones de extracción empleados sin discutir o ensayar otras metodologías (Cheney y Babbel, 1978; Innes y Yarish, 1984; Miura *et al.*, 1979; Kephart, 1990).

**Ruptura del tejido.** Uno de los métodos empleados para la homogeneización del tejido de macroalgas ha sido la trituración manual con ayuda de mortero en nitrógeno líquido (Marsden *et al.*, 1981; 1984a; 1984b; Rice y Crowden, 1987; Lindstrom y South, 1989; Price *et al.*, 1987), (Tabla 1.1). El nitrógeno líquido evita el calentamiento del tejido debido al rozamiento producido durante el proceso de trituración y ayuda a romper los

talos de consistencia cartilaginosa y difíciles de romper (Cheney, 1985), lo que permite reducir el tiempo de extracción. En especies con talos esponjosos el empleo de nitrógeno líquido puede ser perjudicial ya que por su alto contenido en agua aumenta la dureza de los talos y dificulta la homogeneización (Cheney, 1985).

Otros métodos empleados en la homogeneización de tejidos de macroalgas han sido la prensa francesa (Hoxmark, 1975; Hushovd *et al.*, 1982) y homogeneizadores mecánicos de aspas o cristal (Innes, 1984; Innes, 1987; 1988; Malinowsky, 1974; Mallery y Richardson, 1971; 1972; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990), (Tabla 1.1).

**Tampones de extracción.** El empleo de diferentes tipos de tampones y pHs puede variar el número de bandas y la resolución de las enzimas (Young, 1970; Cheney, 1985; Kephart, 1990; Gottlieb, 1981), siendo necesario determinar los tampones de extracción más adecuados para cada especie (Kephart, 1990).

La naturaleza de la especie y su composición bioquímica constituyen los factores más importantes a la hora de elegir un tampón de extracción adecuado (Cheney, 1985). En este sentido, las algas pardas constituyen un grupo especial en cuanto a la extracción enzimática, debido a los elevados contenidos en polifenoles (9-14% de peso seco), mucílagos y alginatos, compuestos que inhiben fuertemente la actividad enzimática. Estos compuestos son los responsables de la compleja metodología de extracción enzimática empleadas en las Feofitas. En todos los trabajos de electroforesis isoenzimática en algas pardas (Marsden *et al.*, 1981; 1984a; 1984b; Vilter y Glombitza, 1983; Rice y Crowden, 1987) se ha empleado un complejo tampón de extracción con numerosos componentes antioxidantes de bajo peso molecular (2-Me, DTT, ácido ascórbico) estabilizadores de proteínas (BSA., PVPP), detergentes (Tween-80) y quelantes (EDTA) (Tabla 1.1).

Por el contrario, en la mayoría de las especies de Rodofitas y Clorofitas se han empleado tampones de extracción más sencillos. En varias especies de *Porphyra* (Miura *et al.*, 1978a; 1978b; 1979; Fujio *et al.*, 1985; 1987; Okumura y Fujino, 1985) se ha realizado la extracción con agua

destilada y algún polisacárido que aumente la densidad del extracto, (sacarosa o glicerol), aunque el tampón Tris-HCl a diferentes pH, ha sido el más empleado (Cheney y Babbel, 1978; Blair *et al.*, 1982; Mallery y Richardson, 1971; 1972; Innes y Yarish, 1984; Malinowsky, 1974; Hoxmark, 1975; Young, 1970) (Tabla 1.1).

La mayoría de los componentes añadidos a los tampones de extracción tienen la función de estabilizar las enzimas, reduciendo la interacción entre los compuestos secundarios, liberados como consecuencia de la ruptura de la compartimentalización celular, y las proteínas o sus productos de reacción (King, 1971; Carr y Johnson, 1980).

Entre los compuestos más empleados en la extracción enzimática en plantas superiores y macroalgas destacan:

- El polímero sintético PVP o PVPP que se une por puentes de hidrógeno a los fenoles formando un complejo insoluble limitando la acción de los polifenoles y taninos (Loomis, 1974).

- Agentes antioxidantes (DTT, ácido ascórbico y metabisulfito sódico) que inhiben la acción fenoxidasa, la cual convierte fenoles en quinonas que interactúan con los grupos aminos de las proteínas inhibiéndolas (King, 1971; Kephart, 1990).

- Agentes quelantes (EDTA) que se unen a iones metálicos que pueden ser inhibidores potenciales de muchas enzimas (Marsden *et al.*, 1981).

- Detergentes que aumentan la liberación de proteínas unidas a membrana (Tween-80, Tritón X-100) (Marsden *et al.*, 1981; Soltis *et al.*, 1983).

- BSA que actúa como competidor de los agentes inhibidores de las enzimas, uniéndose a fenoles de bajo peso molecular (Kephart, 1990; Marsden *et al.*, 1981).

- Otros cofactores que ayudan a conservar o aumentar la actividad enzimática tales como ClNa, Cl<sub>2</sub>Mg, Cl<sub>2</sub>Mn, NAD y NADP (Malinowsky, 1974; Coesel y Menken, 1986).

Otro de los factores que influye en la actividad enzimática es la dilución del tejido con el tampón de extracción. Una dilución excesiva del

tejido origina una escasa actividad enzimática, debido a la relativamente baja concentración de proteínas en macroalgas (Marsden *et al.*, 1981; Cheney, 1985; Price *et al.*, 1987). Aunque la mayoría de los autores no especifican la relación peso fresco:volumen empleada, ésta suele ser de 1:1 ó 1:2 (Hoxmark, 1975; Young, 1970; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990; Malinowsky, 1974). En Feofitas se ha descrito como necesario la concentración y purificación de las proteínas empleando sulfato amónico y cromatografía de intercambio iónico para poder obtener una actividad enzimática adecuada (Marsden *et al.*, 1981; 1984a; 1984b; Rice y Crowden, 1987).

Otro factor que influye en la obtención de actividad enzimática es la centrifugación de los extractos. Cheney y Babbel (1978) han descrito que la extracción de proteínas en *Eucheuma* da mejores resultados sin centrifugación de los extractos, relacionándolo con la menor interacción de los carragenatos con las proteínas. Por lo general, en macroalgas se han empleado bajas velocidades de centrifugación (entre 3.000 y 5.000 x g) (Tabla 1.1).

### 1.2.3.- FASE DE SEPARACION EN EL GEL.

Los dos tipos de matrices empleados en electroforesis isoenzimática han sido los geles de poliacrilamida y de almidón, cuyas ventajas e inconvenientes relativos han sido discutidos ampliamente por varios autores (Oelshlegel y Stahmann, 1973; Shields *et al.*, 1983; Cheney, 1985).

En macroalgas la utilización de los geles de acrilamida o almidón ha dependido directamente del objetivo del trabajo. Los geles de almidón, debido a la posibilidad de teñirlos para varias enzimas en un solo ensayo, a su mayor facilidad de manejo, a la rapidez de su fabricación, a su menor coste y a su nula toxicidad, se han empleado cuando el número de enzimas, el número de individuos y el número de poblaciones es elevado, es decir para estudios genéticos. Todos los autores que han empleado la electroforesis isoenzimática en macroalgas con fines genéticos han utilizado los geles de almidón como matriz separadora (Malinowsky, 1974; Miura *et al.*, 1978a; 1978b; 1979; Cheney y Babbel, 1978; Blair *et al.*, 1982; Fujio *et al.*, 1985;

1987; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990). Por el contrario, los geles de acrilamida se han empleado en estudios analíticos, donde el número de ensayos electroforéticos y el número de poblaciones muestreadas es bajo (Young, 1970; Mallery y Richardson, 1971; 1972; Richardson y Mallery, 1973; Hoxmark, 1976; Hushoud *et al.*, 1982; Marsden *et al.*, 1981; 1984a; 1984b; Vilter y Glombitza, 1983; Rice y Crowden, 1987; Price *et al.*, 1987).

En ocasiones la naturaleza de la enzima analizada es la determinante de elección de una matriz u otra. La amilasa, no puede analizarse en geles de almidón.

Los tampones del gel y de los electrodos dependen de la matriz utilizada. El sistema de tampones más empleado en los geles de acrilamida en macroalgas ha sido el sistema discontinuo descrito por Davis (1964) (Tabla 1.1), mientras que en los geles de almidón el sistema de tampones más empleado ha sido el sistema Tris-EDTA-Borato (TEB) pH 8.6 (Malinowsky, 1974; Innes y Yarish, 1984; Innes, 1987; Innes, 1988; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990) (Tabla 1.1).

#### 1.2.4.- FASE DE TINCION Y ENZIMAS ANALIZADAS.

La fase de tinción es, junto con los tampones de separación, la fase más estandarizada dentro de la electroforesis isoenzimática en macroalgas. La mayoría de los autores han empleado técnicas convencionales de tinción descritas en otros organismos (Scandalios, 1968; Shaw y Prasad, 1970; Harris y Hopkinson, 1976; Hickey, 1979; Soltis *et al.*, 1983; Vallejos, 1983). Los sistemas más ensayados en macroalgas los constituyen los sistemas enzimáticos del metabolismo intermediario que aparentemente no difieren de los sistemas enzimáticos de plantas superiores (Tabla 1.1).

La inexistencia de actividad enzimática es uno de los aspectos menos discutidos en la literatura de la electroforesis de macroalgas marinas. Las excepciones las constituyen los trabajos de Miura *et al.* (1978a) que describen la no detección de actividad enzimática en Me, ADH, IDH, LDH, ODH y

PGM en 4 especies de *Porphyra* y los trabajos de Lindstrom y South (1989), que describen la no detección de actividad en ACP, ALP, CAT, IDH, SkDH y SORDH en 6 especies de *Palmaria*. Otros autores (Cheney y Babbel, 1978; Innes y Yarish, 1984) han mencionado la no inclusión de diversas enzimas debido a su pobre resolución. En ninguno de los casos se ha propuesto una explicación de la inexistencia de actividad enzimática ni se ensayaron metodologías alternativas de extracción o tinción.

#### 1.2.5.- EL EFECTO "SIN DESHIDROGENASA".

Un fenómeno comúnmente descrito en la electroforesis isoenzimática de plantas superiores, microalgas y otros organismos, pero nunca en macroalgas, es la aparición de bandas en ausencia de sustrato. Este fenómeno se ha descrito principalmente en los sistemas de deshidrogenasas, y se le ha denominado en lenguaje anglosajón, "*nothing dehydrogenase effect*" (efecto sin deshidrogenasa), (Wilkinson, 1970; Cheney, 1985). Aunque no se conocen con exactitud las causas que originan este fenómeno, como las bandas suelen ser débiles y se desarrollan más lentamente, se han atribuido a la degradación de diversas enzimas (Kephart, 1990), aunque las especulaciones sobre su origen son muy diversas. Algunos autores (Wilkinson, 1970; Shaw y Koen, 1965) sugieren que tales bandas son consecuencia de la existencia de impurezas (alcoholes) en los reactivos empleados (incluso cuando se encuentran altamente purificados) que pueden ser empleados por la alcohol deshidrogenasa. Harris y Hopkinson (1976) consideran que el "sin deshidrogenasa" puede ser debido a la acción de la enzima LDH (una de las enzimas más activas en los tejidos animales) aunque también se ha atribuido a la acción de la galactosa deshidrogenasa (Cuatrecasas y Segal, 1967), shikimato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa y fosfoglucoisomerasa, debido a la existencia de sustrato endógeno unido a las isoenzimas (Kephart, 1990). Otros autores han observado incluso variabilidad genética en estas bandas, analizándolas como la enzima nothing deshidrogenasa (NDH. EC 1.1.1.?) (Eanes y Koehn, 1978). Otros han considerado que el fenómeno "sin deshidrogenasa" es debido a un exceso de PMS en la tinción, (Hashimoto *et al.*, 1964) o a diversos aspectos metodológicos (tampón de extracción

inadecuado, estado fisiológico del tejido o sobrecalentamiento de los geles durante la separación electroforética) (Kephart, 1990). También se ha descrito que el efecto "sin deshidrogenasa" puede ser debido a la utilización de cantidades excesivas de agentes tiólicos (por ejemplo 2-mercaptoetanol) (Harris y Hopkinson, 1976; Kephart, 1990) o debido a un almacenamiento prolongado de los extractos en solución acuosa, si estos no se han almacenado en condiciones de ultracongelación (-60 a -80°C) (Harris y Hopkinson, 1976; Lindstrom y South, 1989; Kephart, 1990).

Otros factores que pueden aumentar el número de bandas fantasmas en la electroforesis en acrilamida es el empleo de cantidades excesivas de persulfato en la polimerización del gel (Brewer, 1967; Hames y Rickwood, 1983). Los iones libres de persulfato pueden unirse a grupos iónicos de las proteínas inactivándolas, obligando a realizar una pre-electroforesis inicial sin muestras para eliminar estos iones libres (Maurer, 1971; Marsden *et al.*, 1981; Hames y Rickwood, 1983; Soudek y Robinson, 1983).

En cualquier caso, el tiempo y el coste empleados en realizar experiencias diseñadas específicamente para identificar las causas del fenómeno probablemente no compensan los resultados. La estrategia más sencilla, y la comúnmente empleada, es realizar controles sin sustrato durante la tinción para identificar "las bandas fantasmas".



**II. METODOLOGIA.  
MATERIAL Y METODOS.**

## 2.1.- Descripción de las especies.

### 2.1.1.- *Gelidium canariensis*. (Grunow). Seoane-Camba.

Especie perteneciente a la Familia Gelidiaceae, Orden Gelidiales. Son plantas de color rojo-negrusco y ramificación irregular (díctica) con tendencia a una estructura corimbiforme sin diferencias especialmente marcadas entre el eje principal y las ramas (Seoane-Camba, 1979). Los talos, cartilagosos, son generalmente, cilíndricos y fijados al sustrato por rizoides (Foto 1). Aparecen en las poblaciones naturales formando un "césped" que agrupa muchos talos, muy cercanos unos de otros, dificultando el reconocimiento de individuos. Los individuos en fase reproductora, gametofito femenino y esporofito, son fácilmente identificables bajo lupa, por las estructuras reproductoras que presentan, cistocarpos, en el gametofito femenino, y tetraesporangios en el esporofito (Figura 2.1).

### 2.1.2.- *Gelidium arbuscula*. Bory.

Especie perteneciente a la Familia Gelidiaceae, Orden Gelidiales. De morfología similar a *Gelidium canariensis*, pero de talo más aplanado y color más rojizo. Su tamaño es variable, (hasta 10 cm) y con ramificaciones a partir de los bordes. En la base de los talos surgen rizoides a partir de los cuales se produce la regeneración de nuevos talos (Foto 1). Las estructuras reproductoras son muy similares a las descritas en *Gelidium canariensis*, fácilmente observables bajo lupa (Figura 2.1).

### 2.1.3.- *Gracilaria ferox*. J. Agardth.

Especie perteneciente a la familia Gracilariaceae del orden Gigartinales. Son plantas de talo erecto de 4 a 10 cm., de color rojizo-marrón llegando a un color verde oscuro según su estado fisiológico. Las ramas surgen en disposición regular a lo largo del talo, dando una apariencia corimbosa en las zonas superiores y con ápices obtusos o agudos (Foto 1). El gametofito femenino se distingue a simple vista en estado reproductivo por la aparición de cistocarpos prominentes y pigmentados en toda la superficie del talo.



*Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane-Camba



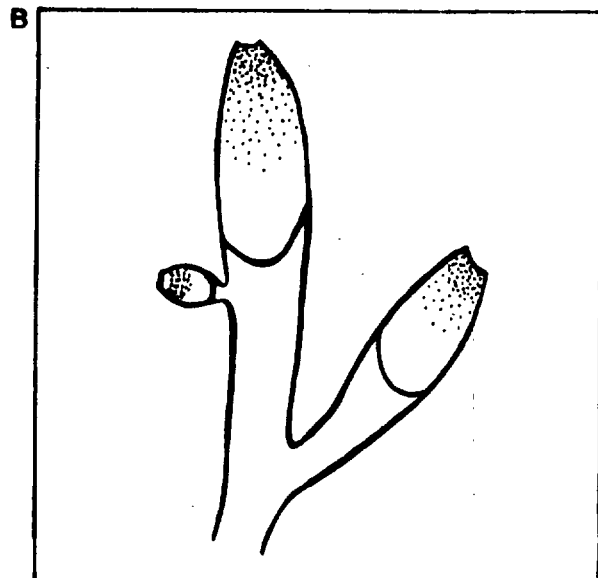
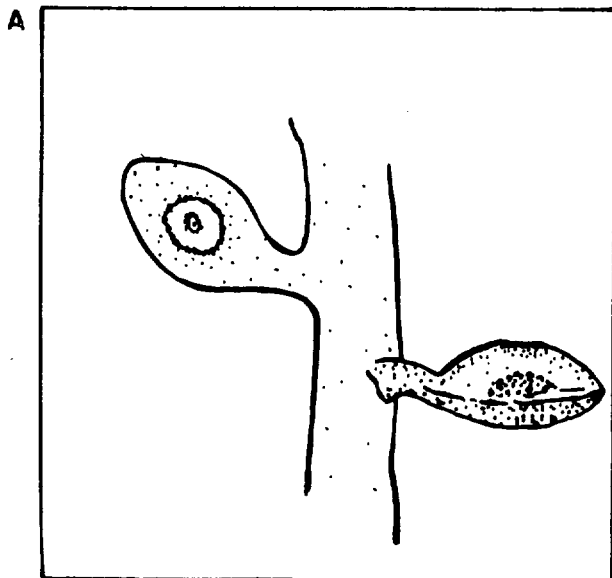
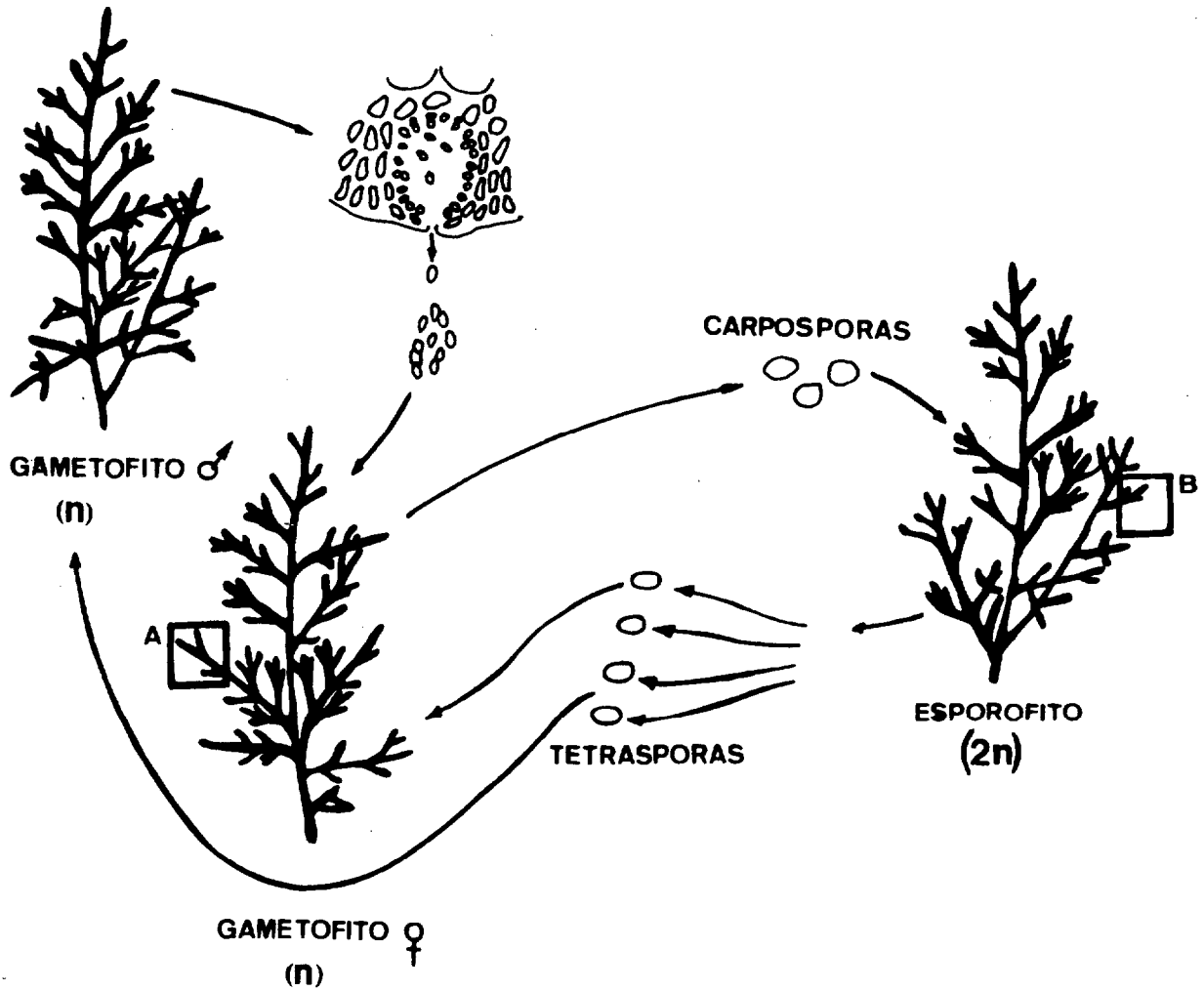
*Gelidium arbuscula* (Bory)



*Gracilaria ferox* (Agardth)

FOTO 1. Especies analizadas.

FIGURA 2.1. Ciclo de vida de *Gelidium*. A: Detalle de los cistocarpos del gametofito femenino. B: Detalle de los tetrasporangios del esporofito.



## **2.2.- Tratamiento de las muestras.**

En el laboratorio las muestras se limpiaban una a una de epífitos y se eliminaba la zona de fijación (generalmente muy epifitada), clasificando cada individuo en tres grupos: 1.- Gametofitos femeninos (estado haploide). 2.- Tetraesporofitos. (estado diploide). 3.- Desconocidos. (cuando no fue posible distinguir ninguna estructura reproductora).

Las condiciones de almacenamiento ensayadas fueron las siguientes:

### **2.2.1.- ALMACENAMIENTO A -20°C.**

Se lavaron las algas con agua destilada o agua de mar durante unos segundos, se eliminó el exceso de agua con papel de filtro, se pesaron y se almacenaron en papel de aluminio a -20°C durante periodos de tiempo que oscilaron desde varias horas hasta aproximadamente dos meses.

### **2.2.2.- CULTIVO.**

Se emplearon cubetas de plástico de 25 x 50 x 8 cm (con 8 a 10 l de medio de cultivo) divididos en 21 cuadrados de 10 x 8 cm aproximadamente, mediante una malla de plástico y con aireación constante. En cada cuadrado se cultivaron los individuos a 21°C con luz fluorescente en un régimen de 16:8 horas (luz:oscuridad), durante periodos de tiempo que oscilaron desde 1 día a más de dos meses. En la elaboración del medio de cultivo se emplearon las soluciones patrón detalladas en la Tabla 2.1.

### **2.2.3.- ALMACENAMIENTO EN NITROGENO LIQUIDO.**

Inmediatamente después de eliminar los epibiontes se introducían los individuos en bolsas de plástico y se almacenaban en el contenedor criogénico hasta su posterior homogeneización.

**TABLA 2.1. Composición de las soluciones stock empleadas en la elaboración del medio de cultivo.** En la elaboración final se añadía 1 ml de la solución de micronutrientes, 0.5 ml de la solución EDTA-Fe y 1 ml de la solución de vitaminas por cada litro de agua de mar filtrada.

**a) Solución de macronutrientes.**

NO <sub>3</sub> Na	70 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	58 g/l

**b) Solución de micronutrientes.**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50.34 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.14 g
SO <sub>4</sub> Mn.H <sub>2</sub>	123 mg
ZnCl <sub>2</sub>	10.5 mg
CoCl <sub>2</sub>	4 mg
EDTA-Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g
Agua	200 ml

**c) Solución EDTA-Fe.**

FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	245 mg
Na <sub>2</sub> -EDTA.2H <sub>2</sub> O	330 mg
Agua	50 ml

## **2.3.- Homogeneización de las muestras.**

### **2.3.1.- TAMPONES DE EXTRACCION.**

Se ensayaron los 10 tampones de extracción descritos en la Tabla 2.2.

### **2.3.2.- HOMOGENEIZACION SIN CENTRIFUGACION.**

Los extractos obtenidos sin centrifugación, se ensayaron únicamente en electroforesis horizontal, homogeneizándolos con nitrógeno líquido o sin él. El material homogeneizado con nitrógeno líquido consistió tanto en fragmentos de individuos vivos (de cultivo) como congelado. Este material se homogeneizó en mortero de porcelana conteniendo aproximadamente unos

TABLA 2.2. Tampones de extracción ensayados.

- 
- 1.- Agua destilada.
  - 2.- Tris-HCl 0.1 M pH 7.4.
  - 3.- Tris-HCl 0.1 M pH 6.8, EDTA Na<sub>2</sub> 1 mM, PVP 3% (Cheney, 1985).
  - 4.- Fosfato 0.1 M pH 7.4, MBS 0.017 M, Ácido ascórbico 0.2 M, DEDC 0.016 M, PVPP 4%, 2-Me 1% (Modificado de Soltis et al. (1983))
  - 5.- Tris-HCl 0.05 M pH 8.0, cisteína 2 mM. (Mallery y Richardson, 1971).
  - 6.- Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, á. ascórbico 0.2 M, EDTA 1 mM, PVPP 3%
  - 7.- Tris-Citrato 0.1 M pH 7.4, DTT 0.05 M, Tween-80 0.1%; Cl<sub>2</sub>Mg 0.01 M; ClK 0.01 M, PVPP 3%
  - 8.- Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, ClNa 0.2 M, NAD 10 mM, NADP 10 mM.
  - 9.- Tris-Citrato 0.015-0.003 M pH 7.8.
  - 10.- Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, EDTA 2 mM, PVPP 3%, ácido ascórbico 0.05 M, tween-80 0.1%, ClNa 0.01 M, NAD 10 mM, NADP 10 mM, 2-Me 0.1%
- 

30 ml de nitrógeno líquido. Sin dejar evaporar el nitrógeno líquido, se maceraron manualmente las muestras hasta convertirlas en un polvo muy fino. A continuación se realizaron dos tipos de ensayos:

En el primero, los individuos homogeneizados se almacenaron entre un día a dos meses, a -20°C antes de añadir el tampón de extracción. Posteriormente, se añadía el tampón de extracción, se descongelaba el extracto y se ensayaba electroforéticamente. En el segundo experimento se almacenó el extracto crudo (con el tampón de extracción) a 4°C durante 1 a 3 días ó a -20°C entre 1 y 30 días.

La homogeneización sin nitrógeno líquido se realizó en mortero o en cubetas de plástico puestos sobre hielo picado para evitar el calentamiento excesivo de las muestras por fricción, depositando las algas (entre 300 y 500 mg) en las cubetas a las que se le añadía 1 ml de tampón de extracción por

gramo de tejido, y ocasionalmente un poco de arena de cuarzo como abrasivo. Los talos homogeneizados se dejaban desde unos minutos hasta 24 horas con el tampón de extracción, agitando ocasionalmente antes de ensayarlos electroforéticamente.

En todos los tratamientos empleados, se impregnaron de 4 a 6 papeles de filtro (Whatman 3MM) con el extracto acuoso, se limpiaban de restos de tejidos y se ensayaban en la electroforesis.

### **2.3.3.- HOMOGENEIZACION CON CENTRIFUGACION.**

Las muestras homogeneizadas y centrifugadas se emplearon tanto en electroforesis horizontal (en almidón), como en vertical (en acrilamida). En todos los casos, se separaron 3 a 5 gramos de algas, que se homogeneizaban en tampón de extracción. Las proporciones de tampón añadidas fueron de 1:1, 1:2 y 1:3 peso:volumen. La homogeneización del tejido se realizó siguiendo el proceso descrito anteriormente, tras lo cual se filtró el extracto por un filtro de nylon, transfiriendo el extracto líquido a un tubo de ensayo, (uno por individuo). Posteriormente se centrifugó a 3.500 rpm entre 20 a 60 minutos a 2°C. El sobrenadante se empleó directamente en la electroforesis o se almacenó a -20°C durante diferentes tiempos (desde un día hasta dos meses).

## **2.4.- Fabricación de los geles.**

### **2.4.1.- GELES DE ALMIDON.**

El procedimiento que se describe a continuación se empleó para fabricar dos geles de 17.5 x 15 x 2 cm con unas concentraciones de almidón que variaron del 11 al 13%.

Una vez pesado el almidón se introducía en un quitasatos de 2 litros perfectamente seco. Por otro lado se disponían 900 ml del tampón de gel, preparados según el procedimiento descrito en el apartado 2.4.2, del cual se separaban en un matraz aforado 650 ml, calentándolos hasta que el tampón comenzase a hervir; en estos momentos, se añadían los 250 ml



restantes del tampón al quitasatos y se disolvía el almidón. A continuación se vertía rápidamente el tampón hirviendo al quitasatos agitando vigorosamente para que no se formasen grumos y se disponía en una placa calentadora hasta que el almidón adquiría una consistencia viscosa de color blanquecina. Con una bomba peristáltica se extraía el aire de la solución hasta que desaparecían las burbujas pequeñas en la solución, (aproximadamente 5 min). Posteriormente y de forma rápida y continua se vertía la solución, de consistencia gelatinosa, sobre moldes de plástico, dejándose enfriar a temperatura ambiente. Si se observaban burbujas en el interior del gel, se eliminaban con una pequeña espátula, antes que el gel se enfriase.

Una vez frío adquiría una mayor textura y rigidez y se despegaba con un bisturí de las paredes laterales del molde, evitando que la contracción del gel, debido al enfriamiento, produjera grietas. Finalmente se cubría con un plástico para evitar la entrada de polvo y se dejaba enfriar hasta el día siguiente.

#### 2.4.2.- SOLUCIONES TAMPON EMPLEADAS EN LA ELECTROFORESIS DE ALMIDON.

Los tampones empleados en la preparación de los geles de almidón, así como los empleados en las cubetas de electrodos fueron los siguientes:

##### Sistema de Poulik. (Cheney, 1985).

- Electroodos. 0.304 M de ácido bórico y 0.1 M de hidróxido sódico, pH 8.6
- Gel. 0.015 M de Tris y 3 mM de ácido cítrico, pH 7.8.

##### Sistema Tris-Citrato. (Soltis *et al.*, 1983).

- Electroodos. 0.223 M de Tris y 0.069 M de ácido cítrico, pH 7.2.
- Gel. 8 mM de Tris y 2.4 mM de ácido cítrico, pH 7.2.

##### Sistema Tris-EDTA-Borato, pH 8.6. (Soltis *et al.*, 1983).

- Electroodos. 0.18 M de Tris, 4 mM de EDTA y 0.1 M de bórico pH 8.6.
- Gel. 0.045 M de Tris, 1 mM de EDTA y 0.025 M de ácido bórico, pH 8.6.

Tris-Glicina, pH 8.3. (Cheney, 1985).

- Electrodo. 0.304 M de ácido bórico y 0.1 M de hidróxido sódico, pH 8.6.
- Gel. 9 mM de Tris, 0.025 M de glicina, pH 8.3.

Citrato-Histidina, pH 7. (Soltis *et al.*, 1983).

- Electrodo. 0.4 M de cítrico pH 7.
- Gel. 5 mM de histidina pH 7.

#### 2.4.3.- GELES DE ACRILAMIDA.

Para la fabricación de los geles de acrilamida se emplearon como soporte dos placas de vidrio de 20 x 18.5 cm, una de ellas con escotadura. Después de limpiar bien las dos placas de vidrio con gasa y alcohol, se impregnaban con parafina tres piezas de plástico de 15 x 200 x 1,5 mm y se colocaban con cuidado en los laterales y extremo inferior de uno de los cristales. A continuación se disponía el siguiente cristal encima de dichos plásticos, creando un espacio estanco donde se alojaba la solución a gelificar. Se sujetaba el conjunto con unas pinzas para que las placas quedaran bien adheridas al teflón espaciador.

Según la concentración de acrilamida empleada, se mezclaban las soluciones descritas en la Tabla 2.3, (excepto el TEMED) en un vaso de precipitado y se tapaban con un poco de papel "Parafilm" al cual se le practicaban unos orificios con un material punzante (para evitar la expulsión de la solución del vaso) y se desgasificaba en el interior de una campana de vacío conectada a una bomba peristáltica durante 10 minutos. A continuación se añadía el TEMED, se agitaba pausadamente y se vertía con cuidado y lentamente entre las placas de vidrio, procurando que no se formaran burbujas.

Para la electroforesis discontinua la solución del gel inferior se añadía en primer lugar, hasta que alcanzara las 3/4 partes del cristal y se cubría con agua destilada, la cual formaba una capa por encima del gel con una interfase uniforme, permitiendo la correcta polimerización del extremo superior del

gel. Una vez polimerizado se eliminaba el agua y en su lugar se añadía la solución del gel superior (hacinador o empaquetador) que se cubría con una pieza de metacrilato (peine) que formaba espacios (pocillos) para cargar entre 15 a 20 muestras. La polimerización de los dos geles oscilaba entre 15 y 20 minutos.

Como en la electroforesis continua sólo se dispone de un gel, el peine se colocaba directamente en la primera solución.

Se emplearon concentraciones de acrilamida en el gel separador que oscilaron entre 5 y 12% , mientras que en el gel hacinador se empleó una concentración de 3.7%. La polimerización de todos los geles de acrilamida fue catalizada siempre por (TEMED) y persulfato amónico (Tabla 2.3).

La pre-electroforesis (conexión de la electroforesis antes de cargar las muestras con el fin de eliminar el exceso de persulfato) se realizó durante 20 a 30 minutos a 20-30 mA por gel. En la electroforesis discontinua se realizó la pre-electroforesis sin añadir el gel superior, y empleando como tampón de electrodos el mismo tampón, con la misma concentración, que el tampón del gel. Cuando posteriormente se cargaron las muestras, se sustituyó el tampón de electrodos por el definitivo.

En la Tabla 2.4 se describen los tipos de cofactores que se añadieron separadamente al tampón de gel y/o electrodos con la finalidad de determinar sus efectos como preservadores de la actividad enzimática.

Antes de realizar la electroforesis vertical se añadió sacarosa sólida o glicerol hasta un 20% p/v al sobrenadante obtenido en la centrifugación, con la finalidad de aumentar la densidad de las muestras antes de aplicarlas en los pocillos.

TABLA 2.3.A. Preparación de los geles de acrilamida. Sistema discontinuo.

	Gel superior.	Gel inferior.					Tampón de electrodos.
		Concentración final de acrilamida en el gel.					
Solución stock.	3.7%	12%	10%	8%	7.5%	5%	
Acrilamida (30:0.8). (ml).	3	14.4	12	9.5	9	6	-
Tampón de gel (ml).	6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	-
Agua destilada (ml).	14	15	17	19	19	23	900
Persulfato 1.5% (ml).	1	2	2	2	2	2	-
TEMED ( $\mu$ l).	36	17	17	17	17	17	-
Tampón de electrodos (ml).							100
<u>Volumen final. (ml).</u>	24	36	36	36	36	36	1000

**TABLA 2.3.B. Preparación de los geles de acrilamida. Sistema continuo.**

Solución stock.	Concentración final de acrilamida en el gel.					Tampón de electrodos.
	12%	10	8%	7.5%	5%	
Acrilamida (30:0.8). (ml).	16	13	10.5	10	7	-
Tampón del gel. (ml).	8	8	8	8	8	200
Agua destilada. (ml).	14	17	19	20	23	800
Persulfato 1.5% (ml).	2	2	2	2	2	-
TEMED ( $\mu$ l).	25	25	25	25	25	-
<u>Volumen final. (ml).</u>	50	50	50	50	50	1000

**TABLA 2.4. Concentración de los componentes ensayados en los tampones de electrodos y gel en poliacrilamida.**

Compuesto.	Concentración.	Tampón de Gel o electrodos.
NAD	1-25 mM	ambos
NADP	1-25 mM	ambos
Tween-80	0.1-0.2%	ambos
2-Me	0.03-0.1%	electrodos
Cl <sub>2</sub> Mg	10-15 mM	ambos
Cl <sub>2</sub> Ca	2-20 mM	ambos
Glicerol	5%	gel
Almidón	0.3-0.5%	gel

#### 2.4.4.-SOLUCIONES TAMPON EMPLEADAS EN ELECTROFORESIS DE ACRILAMIDA.

Se emplearon dos grupos de tampones según el sistema empleado.

##### Sistema discontinuo.

###### Sistema de Davis-Orstein.

- Electrodos. Tris-Glicina pH 8.3. Se ensayaron diferentes concentraciones: 0.025-0.192 M y 0.0125-0.096 M.
- Gel inferior. Tris-HCl pH 8.8, 0.375 M.
- Gel superior. Tris-HCl pH 6.8, 0.125 M.

Se empleó también el sistema discontinuo sin gel superior.

##### Sistema continuo.

###### Sistema Tris-Glicina pH 9.

- Gel y electrodos. Tris 0.2 M y glicina 0.2 M, pH 9.0

Sistema Tris-HCl pH 8.8.

- Gel y electrodos. Tris-HCl 0.1 M y 0.05 M pH 8.8.

Sistema Tris-borato pH 8.8.

- Electrodos. Tris-Borato 0.05 M pH 8.8
- Gel. Tris-Borato 0.1 M pH 8.8.

Sistema Tris-Citrato pH 8.5.

- Gel y electrodos. Tris 0.5 M y citrato 0.03 M, pH 8.5.

## 2.5.- Condiciones de la electroforesis.

### 2.5.1.- ELECTROFORESIS EN ALMIDON.

Se emplearon cubetas de plástico, de 7.5 x 22.5 x 4.5 cm, con un electrodo de platino de 0,5 mm x 3 cm en un lateral de la misma a las que se añadían 250 ml del tampón de electrodos, cubriendo por completo el electrodo.

Con un rotulador se marcaban los moldes del gel en varias zonas:

A 5 cm del extremo inferior donde se realizaba un corte en el gel para introducir los papeles impregnados con las muestras o se situaba el peine que formaba los pocillos, siendo el origen de la electroforesis.

Dos marcas (a 3 cm del extremo inferior y del extremo superior) que indicaban la disposición de las bayetas que ponían en contacto el tampón de electrodos y el gel.

A 10 cm del origen indicando hasta dónde debía llegar el frente de la electroforesis.

Si las muestras se cargaban en papel de filtro, se cortaba el gel de almidón a la distancia anteriormente indicada y se introducían verticalmente en el corte realizado mediante unas pinzas. Se disponían entre 15 y 20 papeles por gel en la ranura formada. Con ayuda de un capilar se impregnaban varios papeles con una solución de azul de bromofenol 0.04% en etanol 95%, para saber en cada momento dónde se encontraba situado el frente.

Para evitar la pérdida de contacto entre las dos partes del gel mientras está corriendo la electroforesis y debido al enfriamiento posterior del mismo, se introducía un trozo de bayeta de 18 x 2 cm entre la pared inferior del molde y el gel. Finalmente se cubría el gel con un plástico de 12 x 17 cm, evitando la desecación durante el tiempo que durase la electroforesis.

Se aplicó una corriente de 250 V, 80 mA durante 5 a 20 minutos, después de los cuales se eliminaban los papeles insertos en él. Posteriormente se volvía a conectar la misma corriente hasta que el azul de bromofenol alcanzara 10 cms desde el origen.

Si las muestras se insertaban sin papeles de filtro se aplicaban mediante una micropipeta automática, introduciendo 50  $\mu$ l en cada pocillo (de 0.4 x 1.5 cm) formado por los peines. A continuación se aplicaba la misma corriente de forma continua.

### **2.5.2.- ELECTROFORESIS EN ACRILAMIDA.**

Se emplearon dos depósitos de 6,5 x 21 x 5,5 cm unidos por una placa de metacrilato de 21 x 25 cm. Ambos depósitos contenían un electrodo de platino de 0,5 mm de diámetro y 3 cm de longitud, conectado a un electrodo de grafito de 10 cm de longitud, lo que permitía una gran uniformidad de la corriente en toda la cubeta.

Las muestras se cargaban en los pocillos mediante una microjeringuilla o una pipeta automática, procurando formar una estrecha capa, minimizando así la difusión de la muestra a medida que se va introduciendo en el gel. Se emplearon pocillos de diferentes capacidades, (0.5 x 1.5 cm, 0.4 x 1.5 cm y 1 x 1.5 cm) variando el volumen de muestra en cada uno entre 50 a 100  $\mu$ l según el peine empleado. Se aplicó inicialmente una corriente de 20 mA, 150 V por gel, con el cátodo situado en el depósito superior de la cubeta. Cuando el frente había penetrado en el gel inferior (origen), la corriente se aumentaba a 30 mA, 250 V hasta que el azul de bromofenol llegara al final del mismo. En ocasiones se permitió que el azul de bromofenol se saliera del gel.



## **2.6.- Preparación de los geles para la tinción.**

### **2.6.1.- GELES DE ALMIDON.**

Una vez concluida la electroforesis, se sacaba el gel, y se medía la distancia que había alcanzado el frente. A continuación se cortaba el gel en lonchas horizontales de 3 mm de grosor con ayuda de un alambre de acero de 0.5 mm de grosor. La primera loncha se eliminaba debido a las rugosidades que normalmente tenía, y el resto se separaba y se introducía en las bandejas de tinción. Se obtenían 4 ó 5 lonchas de cada gel.

### **2.6.2.- GELES DE POLIACRILAMIDA.**

Se procedió de igual forma que los geles de almidón, con la diferencia que los geles de acrilamida no se cortaban en lonchas, introduciéndolos directamente en la cubeta de tinción.

## **2.7.- Métodos de tinción.**

Las soluciones de tinción se preparaban entre 15 y 60 minutos antes de teñir el gel. Sólo las soluciones tampón y otras sales se conservaron en nevera como soluciones stock. Estas fueron:

**Solución tampón de Tris-HCl 1 M.** Se empleó a pH 7.1, 7.4, 8 y 8.5.

**Solución tampón de Fosfatos 0.2 M.** Se empleó a pH 5, 6, 6.8, 7 y 7.4.

**Solución tampón de Tris-Maleico 0.1 M** de tris maleico. pH 5.

**Solución tampón de acetato 0.2 M,** pH 5.

**Solución de cloruro de magnesio (Cl<sub>2</sub>Mg)** al 10%

**Solución de cloruro de manganeso (Cl<sub>2</sub>Mn)** al 10%

**Solución de β-Naftil acetato 1%** en acetona.

**Solución de MTT 1%** Se almacenó a 4°C protegido de la luz.

**Solución de PMS 1%** Al igual que el MTT, se almacenaba protegido de la luz y a 4°C.

**Solución de ácido málico 1 M.** Se añadían 13.4 g de ácido L-málico y 1 g de carbonato sódico a 80 ml de agua destilada. Se agitaba lentamente debido a la formación de burbujas y se ajustaba a pH 8 con NaOH. A continuación se dividía esta solución en alícuotas de 25 ml y se almacenaba a

-20°C. En ocasiones se disolvió el ácido málico en 100 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M a un pH final de 8.

**Solución de ácido glutámico 1 M.** Se siguió el procedimiento descrito para el ácido málico, pero empleando 14.7 g de ácido L-glutámico.

**Solución de carbonato sódico 1 M.** Se disolvían 10.6 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 100 ml de agua, conservando la solución en nevera durante varios meses.

**Solución de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.** Se disolvía la enzima liofilizada procedente de la casa comercial, en el volumen de agua destilada necesario para que en 100  $\mu\text{l}$  hubiesen 40 unidades de la enzima.

Para todas las enzimas se ensayaron dos temperaturas de reacción, (temperatura ambiente y 37°C), diferentes concentraciones de sustratos, diferentes tiempos de reacción y diferentes pH de reacción dependiendo de la enzima. El tiempo de reacción empleado también varió según cada enzima, hasta la aparición nítida de las bandas. Para tinciones donde se emplearon colorantes del tipo diazo, (EST, ALP) se dejaba ocasionalmente que la reacción transcurriese toda la noche, mientras que en las reacciones dependientes de las sales de tetrazolio, (deshidrogenasas, PGI, SOD, DIA y PGM), la reacción sucedía en un máximo de dos o tres horas.

Se ensayaron también diversas concentraciones de PMS (entre 0.032 y 0.13 mM) y de MTT (entre 0.5 y 1 mM), los cuales se añadieron directamente a la solución de tinción a partir de una solución stock al 1%.

En el apartado 2.8 se describen los reactivos y condiciones experimentales ensayadas en cada enzima. La reacción se efectuaba en completa oscuridad excepto donde se menciona específicamente.

## **2.8.- Sistemas enzimáticos estudiados.**

Se estudiaron los 36 sistemas enzimáticos descritos en la Tabla 2.5.

**TABLA 2.5. Sistemas enzimáticos ensayados.** Entre paréntesis se indica la clasificación de la *International Union of Biochemistry, I.U.B. 1979.*

ENZIMA.	ABREVIACION.	CLASIFICACION I.U.B.
1.- Aconitasa	ACO.	(EC 4.2.1.3)
2.- Alanina deshidrogenasa.	ALADH.	(EC 1.4.1.1)
3.- Alcohol deshidrogenasa.	ADH.	(EC 1.1.1.1)
4.- Aldolasa.	ALDO.	(EC 4.1.2.13)
5.- Amilasa.	AMY.	(EC 3.2.1.1)
6.- Ascorbato oxidasa.	AO.	(EC 1.10.3.3)
7.- Aspartato aminotransferasa.	GOT/AAT	(EC 2.6.1.1)
8.- Catalasa.	CAT.	(EC 1.11.1.6)
9.- Dipeptidasa.	DIPEP.	(EC 3.4.11-13)
10.- Endopeptidasa.	ENDOPEP.	(EC 3.4.11-13)
11.- Enzima málico.	Me.	(EC 1.1.1.40)
12.- Esterasa.	EST.	(EC 3.1.1.1)
13.- Fosfatasa alcalina.	ALP.	(EC 3.1.3.1)
14.- Fosfatasa ácida.	ACP.	(EC 3.1.3.2)
15.- Fosfoglucomutasa.	PGM.	(EC 2.7.5.1).
16.- Fosfoglucoisomerasa.	PGI.	(EC 5.3.1.9)
17.- Fumarasa.	FUM.	(EC 4.2.1.2)
18.- Galactosa deshidrogenasa.	GALDH.	(EC 1.1.1.48)
19.- $\alpha$ -Glicerofosfato dh.	$\alpha$ GPDH	(EC 1.1.1.8)
20.- Glucosa-6-fosfato dh.	G6PDH.	(EC 1.1.1.49)
21.- Glucosa deshidrogenasa.	GIDH.	(EC 1.1.1.47)
22.- Glutamato deshidrogenasa.	GDH.	(EC 1.4.1.2)
23.- Hexoquinasa.	HK.	(EC 2.7.1.1)
24.- Isocitrato deshidrogenasa.	IDH.	(EC 1.1.1.42)
25.- Lactato deshidrogenasa.	LDH.	(EC 1.1.1.27)
26.- Leucin aminopeptidasa.	LAP.	(EC 3.4.11.1)

---

**TABLA 2.5. Continuación.**


---

27.- Malato deshidrogenasa.	MDH.	(EC 1.1.1.37)
28.- NADH-deshidrogenasa.	NADH-DH.	(EC 1.6.99.3)
29.- NADH-Diaforasa.	DIA.	(EC 1.6.4.3)
30.- Peroxidasa.	PX.	(EC 1.11.1.7)
31.- Sorbitol deshidrogenasa.	SORDH.	(EC 1.1.1.14)
32.- Shikimato deshidrogenasa.	SKDH.	(EC 1.1.1.25)
33.- Succinato deshidrogenasa.	SUCCDH.	(EC 1.3.99.1)
34.- Superoxido dismutasa.	SOD.	(EC 1.15.1.1)
35.- Triosa fosfato isomerasa.	TPI.	(EC 5.3.1.1)
36.- Xantin deshidrogenasa	XDH.	(EC 1.2.1.37)

---

### 1. ACONITASA. (ACO. EC 4.2.1.3).

*Reacción:* Citrato o Isocitrato → Cis-aconitato + H<sub>2</sub>O

*Reactivos:*

Tris-Hcl 1 M pH 8 .....	20 ml
Agua destilada .....	70 ml
Acido Cis-Aconítico 1% .....	10 ml
NADP .....	30 mg
MTT .....	25 mg
PMS .....	3 mg
Cl <sub>2</sub> Mg 10% .....	2 ml
IDH (3 mg/ml agua) .....	1 ml

37°C.

---

**2. ALANINA DESHIDROGENASA. (ALADH. EC. 1.4.1.1).**

*Reacción:* L-Alanina + NAD → Piruvato + NADH

*Reactivos:*

Tampón fosfato 0.1 M pH 7 .....	100 ml
D,L-Alanina .....	200 mg
NAD .....	50 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
37°C	

### 3. ALCOHOL DESHIDROGENASA. (ADH. EC 1.1.1.1).

*Reacción:* Alcohol + NAD → Aldehído o cetona + NADH

*Reactivos:*

Etanol 96° .....	5 ml.
Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	100 ml
NAD .....	40 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
37°C.	

*Otros ensayos realizados:*

Se aumentó la concentración del etanol a 10 ml.

Se varió el pH desde 6.5 a 8.5.

Se añadió 0.1-1 g de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$

Se sustituyó MTT por NBT.

### 4. ALDOLASA. (ALDO. EC 4.1.2.13).

*Reacción:* Fructosa 1,6 difosfato → Dihidroxiacetona fosfato  
+ D-gliceraldehído 3 fosfato.

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.5 M pH 7.1 .....	10 ml
Fructosa 1,6-difosfato.5H <sub>2</sub> O .....	600 mg
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa .....	0.6 ml
NAD .....	50 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
Agua destilada .....	90 ml
37°C.	

**5. AMILASA. (AMY.EC 3.2.1.1).**

*Reacción:* Endohidrólisis de uniones 1,4- $\alpha$ -glucosídicos en polisacáridos con tres o más unidades 1,4- $\alpha$ -D-Glucosa.

*Reactivos:*

**SOLUCION A.**

Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 ..... 100 ml  
Almidón soluble ..... 1 g  
Cloruro cálcico ..... 0.02 M

**SOLUCION B.**

Iodo ..... 10 g  
Yoduro potásico ..... 20 g  
Agua destilada ..... 100 ml

Se sumergió el gel de acrilamida en la solución A durante dos a 24 horas.  
Se lavó con agua y se añadió la solución B diluída 30 veces.

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH de ambas soluciones desde pH 6 a 8.

Se añadió 1-3 g de ClNa a la solución A.

Se variaron las concentraciones de la solución B.

Se sustituyó el almidón soluble por amilopectina unida con remazol, a una concentración del 1%.

Se eliminó el cloruro cálcico.

Se añadió 0.05 M de  $CL_2Ca$  al tampón de gel y de electrodos.

Se añadió 0.07 g de almidón soluble al gel de acrilamida.

**6. ASCORBATO OXIDASA. (AO. EC 1.10.3.3).**

*Reacción:*  $2 \text{ L-Ascorbato} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ Dehidroascorbato} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

*Reactivos:*

**SOLUCION A.**

Tris HCl 0.1 M pH 8.0 ..... 100 ml

Acido ascórbico ..... 20 ml

**SOLUCION B.**

Agua destilada ..... 100 ml

DCPIP ..... 25 mg

Se incubó en la solución A 15 minutos, se eliminó dicha solución y se colocó sobre el gel una pieza de papel de filtro impregnada en la solución B.



**7. ASPARTATO AMINOTRANSFERASA. Glutamato oxalacetato transaminasa. (AAT, GOT. EC 2.6.1.1).**

*Reacción:* L-Aspartato +  $\alpha$ -Cetoglutarato  $\rightarrow$  Oxalacetato + L-Glutamato.

*Reactivos:*

**SOLUCION A.**

Fosfato 0.2 M pH 7.4 ..... 80 ml  
Piridoxal 5 fosfato ..... 1 mg  
Acido L-Aspártico ..... 400 mg  
 $\alpha$ -cetoglutarico ..... 200 mg  
Se ajustó a pH 7.4 con NaOH 1 M.

**SOLUCION B.**

Fast Blue BB ..... 150 mg  
Agua destilada ..... 20 ml  
Se añadió la solución B en A inmediatamente antes de teñir el gel.

**Otras condiciones ensayadas:**

Se varió el pH desde 6.5 hasta 8.5.

Se sustituyó el Fast Blue BB por Fast Garnet GBC o Fast Blue RR.

Se varió la molaridad del tampón desde 0.1 hasta 0.5 M.

Se varió el tipo de tampón, ensayando Tris-HCl y agua destilada.

Se ensayó la adición separada de todos los componentes después de disolverlos en tampones separados y ajustar los pH de las diferentes soluciones al pH empleado.

Se aumentó la concentración de los sustratos hasta 500 mg de cada uno.

Se añadió PVP 1 g.

Se añadió 0.1 g de BSA a la solución de tinción.

---

**8. CATALASA. (CAT. EC 1.11.1.6).**

*Reacción:*  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

*Reactivos:*

**SOLUCION A.**

$\text{H}_2\text{O}_2$  3% ..... 50 ml

Agua destilada ..... 50 ml

Se incubó el gel entre 15 a 30 minutos, se lavó con agua dos o tres veces, y se añadió la solución B.

**SOLUCION B.**

Agua destilada ..... 100 ml

KI ..... 1.5 g

Acido acético ..... 2 ó 3 gotas

Ambas reacciones se realizaron a temperatura ambiente.

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el orden de adición de las soluciones, añadiendo primero la solución B y después de lavar con agua se añadió la solución A.

Se sustituyó el agua destilada por fosfato 0.1 M pH 6-7.

Se añadió 0.15 g hasta 2 g de MBS a la solución A.

Se varió la temperatura de reacción introduciendo el gel sumergido en la solución A a 4°C.

Se aumentó la concentración de KI hasta 3 g.

**9. DIPEPTIDASA. (DIPEP. EC 3.4.11-13).**

*Reacción:* Dipéptido + H<sub>2</sub>O → L-aminoácido.

*Esta reacción se acopla a:*

Amino-Etil carbazol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + PX → Amino-Etil carbazol oxidado.

*Reactivos:*

Tris-HCl 1 M, pH 8.0 .....	20 ml
3-Amino-9-etil carbazol .....	40 mg
Dimetil formamida .....	2.5 ml
L-Aminoácido oxidasa .....	3 mg
Peroxidasa .....	10 mg
Agua destilada .....	75 ml
L-Leucil-L-Alanina .....	30 mg

**10. ENDOPEPTIDASA. (ENDOPEP. EC 3.4.11-13).**

*Reacción:* Péptido + H<sub>2</sub>O → L-Aminoácido + Péptido.

*Reactivos:*

Fosfato 0.1 M pH 6 .....	10 ml
Dimetil formamida .....	2.5 ml
Black K .....	60 mg
Cl <sub>2</sub> Mg 10% .....	0.5 ml
α-N-benzoil-D-L Arginina-β-Naftilamida .....	100 mg

## 11. ENZIMA MALICO. (Me. EC 1.1.1.40).

*Reacción:* L-Malato + NADP → Piruvato + CO<sub>2</sub> + NADPH

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	75 ml
A. Málico 1,5 M pH 8 (con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1 M) .....	25 ml
NADP .....	15 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
Cl <sub>2</sub> Mg 10% .....	1 ml

37°C.

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH desde 7 a 8.5.

## 12. ESTERASA. (EST. EC 3.1.1.1).

*Reacción:* Ester carboxílico + H<sub>2</sub>O → Alcohol + Acido Carboxílico.

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 7.1 .....	100 ml
Fast Blue RR .....	100 mg
β Naftil acetato (1% en acetona) .....	7 ml

Temperatura ambiente ó 37°C.

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH desde pH 6 hasta 8.

Se ensayó la tinción empleando tampón Fosfato 0.1 M.

Se varió el tiempo de adición del sustrato, añadiendo primero la solución de tinción con el colorante exclusivamente, y después de unos minutos se incorporó el sustrato.

Se añadió 1 g de PVP.

Se ensayó la adición de 0.1 g de Cl<sub>2</sub>Mg, 0.1 g de Cl<sub>2</sub>Mn, 0.5 g de ClNa,

Se probaron por separado, dos tipos de sustratos, α y β Naftil.

**13. FOSFATASA ALCALINA. (ALP. EC 3.1.3.1).**

*Reacción:* Ortofosfórico monoéster + H<sub>2</sub>O → Alcohol + Ortofosfato.

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	100 ml
Fast Blue RR .....	100 mg
Cloruro Magnésico .....	100 mg
α ó β Naftil ácido fosfato disódico .....	100 mg
Temperatura ambiente ó 37°C.	

*Otras opciones ensayadas:*

Se varió el pH desde 7 a 8.8.

Sustitución del colorante Fast Blue por Fast garnet GBC o Black K.

Se añadió PVP, 1-3 g; Cl<sub>2</sub>Mn, 100 mg; Cl<sub>2</sub>Mg, 100-200 mg; ClNa 1-3 g.

Se aumentó la concentración del sustrato hasta 350 mg.

**14. FOSFATASA ACIDA. (ACP. EC 3.1.3.2).**

*Reacción:* Monoéster ortofosfato + H<sub>2</sub>O → Alcohol + Ortofosfato.

*Reactivos:*

Acetato 0.1 M pH 4.5 .....	100 ml
Fast Blue RR .....	100 mg
Cloruro Magnésico .....	100 mg
α ó β Naftil ácido fosfato disódico .....	100 mg
Temperatura ambiente ó 37°C.	

*Otras condiciones ensayadas:*

Se realizaron las mismas variaciones descritas para la fosfatasa alcalina.

Se varió el pH desde 4.5 hasta 5.5

## 15. FOSFOGLUCOMUTASA. (PGM. EC 2.7.5.1).

*Reacción:*  $\alpha$ -D-Glucosa-1,6-bifosfato +  $\alpha$ -D-Glucosa-1-fosfato  $\rightarrow$   $\alpha$ -D-Glucosa-6-fosfato +  $\alpha$ -D-Glucosa-1,6-bifosfato.

La reacción de tinción está acoplada a la siguiente reacción:

Glucosa-6-P + NADP  $\rightarrow$  6-P-Gluconato + NADPH (Glucosa-6-P-dh).

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0	100 ml
NADP	10 mg
MTT 1%	3 ml
PMS 1%	0.5 ml
Cl <sub>2</sub> Mg	100 mg
$\alpha$ -D-Glucosa-1-P, sal disódica	100 mg
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	40 u.

37°C.

En varias ocasiones se realizó la tinción de esta enzima y la PGI en la misma solución de reacción.

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH desde 7 a 8.8.

Se sustituyó el NADP por NAD.

Se eliminó el Cl<sub>2</sub>Mg del medio de tinción.

## 16. FOSFOGLUCOISOMERASA. GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA. (PGI, GPI. EC 5.3.1.9).

*Reacción:* Fructosa-6-P → D-Glucosa-6-P + NAD(P)

Esta reacción está acoplada a:



*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	100 ml
NADP .....	10 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
Cl <sub>2</sub> Mg .....	100 mg
Fructosa-6-P, sal disódica .....	100 mg
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa .....	40 u.

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH desde 7 a 8.8.

Se sustituyó el NADP por NAD.

Se eliminó el Cl<sub>2</sub>Mg del medio de tinción.

---

**17. FUMARASA. FUMARATO HIDRATASA. (FUM. EC 4.2.1.2)**

*Reacción:* Fumarato + H<sub>2</sub>O → L-Malato

Esta reacción está acoplada a:

L-Malato + NAD → Oxalacetato + NADH. (Malato dh)

*Reactivos:*

Tris-HCl 1 M pH 8 .....	25 ml
Acido Fumárico Na <sub>2</sub> .....	3.2 g
NAD .....	30 mg
MTT .....	20 mg
PMS .....	4 mg
Malato deshidrogenasa .....	40 u
Agua destilada .....	75 ml

37°C.

**18. GALACTOSADESHIDROGENASA. (GALDH. EC 1.1.1.48)**

*Reacción:* D-Galactosa + NAD → D-Galactonato + NADH

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	100 ml
D-Galactosa .....	5 g
NAD .....	50 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml



**19. GLICEROFOSFATO DESHIDROGENASA. ( $\alpha$ GPDH. EC 1.1.1.8)**

*Reacción:*  $\alpha$ -Glicerofosfato + NAD  $\rightarrow$  Dihidroxiacetona fosfato

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8 .....	100 ml
Glicerofosfato Na 1 M pH 8 .....	10 ml
NAD .....	50 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH desde 7.5 a 8.0.

Se añadió entre 0.1 y 1 g de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ .

**20. GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA. (G6PDH. EC 1.1.1.49).**

*Reacción:* D-Glucosa-6-fosfato + NADP  $\rightarrow$  6-fosfogluconato + NADP.

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8 .....	100 ml
Glucosa 6 fosfato .....	100 mg
NADP .....	10 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
$\text{Cl}_2\text{Mg}$ .....	100 mg
37°C.	

*Otras condiciones ensayadas:*

Variación del pH desde 7 a 8.8.

Se aumentó la concentración de Glucosa-6-fosfato hasta 300 mg.

Se añadió entre 0.1 y 1 g de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$ .

---

**21. GLUCOSA DESHIDROGENASA. (GDH. EC 1.1.1.47).**

*Reacción:*  $\beta$ -D-Glucosa + NAD  $\rightarrow$  Acido glucónico + NADH

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	100 ml
D-Glucosa .....	18 g
NAD .....	40 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
37°C.	

**22. GLUTAMATO DESHIDROGENASA. (GDH. EC 1.4.1.2).**

*Reacción:* L-Glutamate + NAD + H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  2-Oxoglutarato + NH<sub>3</sub> + NADH

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	100 ml
A. L-Glutámico 1 M pH 8 con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1 M ...	25 ml
NAD .....	40 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
37°C.	

*Otras condiciones ensayadas:*

Se neutralizó el ácido glutámico con NaOH 1 M.

Se variaron los pH de tinción, desde 7 a 8.8.

Se añadió NADP como cofactor.

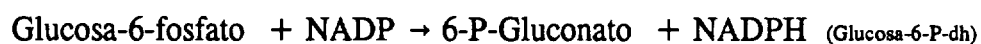
Se ensayó la adición de 0.1 g de Cl<sub>2</sub>Mg.

Se ensayó la adición de 100 mg de EDTA.

**23. HEXOQUINASA. (HK. EC 2.7.1.1).**

*Reacción:* ATP + D-Hexosa → D-Hexosa-6-fosfato.

Esta reacción está acoplada a:



*Reactivos:*

Tris-Hcl 0.1 M pH 8 .....	100 ml
Glucosa .....	180 mg
ATP Na <sub>2</sub> .....	130 mg
Cl <sub>2</sub> Mg .....	100 mg
NADP .....	10 mg
MTT .....	20 mg
PMS .....	4 mg
Glucosa-6-P deshidrogenasa .....	25 u

37°C.

*Otras condiciones ensayadas.*

Se varió el pH desde 7.5 a 8.0.

Se añadió entre 0.1 y 1 g de Cl<sub>2</sub>Mg.

---

**24. ISOCITRATO DESHIDROGENASA. (IDH. EC 1.1.1.42).**

*Reacción:* Isocitrato + NAD(P) → 2-oxoglutarato + CO<sub>2</sub> + NAD(P)H.

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0	100 ml
Acido isocítrico Na <sub>3</sub>	100 mg
NADP	10 mg
MTT 1%	3 ml
PMS 1%	0.5 ml
Cl <sub>2</sub> Mg	100 mg
37°C.	

*Otras condiciones ensayadas:*

Se substituyó NADP por NAD.

Se añadió entre 0.1 y 1 g de Cl<sub>2</sub>Mn.

Se varió el pH desde 7 a 8.5.

Se aumentó la concentración de sustrato hasta 500 mg.

**25. LACTATO DESHIDROGENASA. (LDH. EC 1.1.1.27).**

*Reacción:* L-Lactato + NAD → Piruvato + NADH

*Reactivos:*

Tris-HCl 0,1 M pH 7	75 ml
Acido Láctico 85% pH 8 con NaOH 1 M	25 ml
NAD	35 mg
MTT 1%	3 ml
PMS 1%	0.5 ml
37°C.	

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH desde 7 a 8.8.

Se aumentó la concentración de láctico hasta 50 ml en la reacción.

**26. LEUCIN AMINOPEPTIDASA. (LAP. EC 3.4.11.1).**

*Reacción:* Aminoacil-péptido + H<sub>2</sub>O → Aminoácido + Péptido.

*Reactivos:*

Tris-Maleico 0.2 M pH 6 .....	100 ml
L-Leucil-β-Naftilamida.HCl .....	100 mg
Fast Black K .....	100 mg

*Otras condiciones ensayadas:*

Se ensayó el tampón Fosfato, 0.2 M pH 6.

Se varió el pH desde 5 hasta 8.0.

Se sustituyó el colorante Fast Black K por Fast Garnet GBC.

Se añadió 0.1-1 g de Cl<sub>2</sub>Mg.

Se añadió 0.1-1 g de Cl<sub>2</sub>Mn.

Se añadió 1-3 g de ClNa.

Se añadió 0.2 ml de DMF.

Se aumentó la concentración de sustrato hasta 300 mg.

**27. MALATO DESHIDROGENASA. (MDH. EC 1.1.1.37).**

*Reacción:* L-Malato + NAD → Oxalacetato + NADH

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8 .....	75 ml
Acido L-Málico 1 M pH 8 con NaOH .....	25 ml
NAD .....	45 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
37°C.	

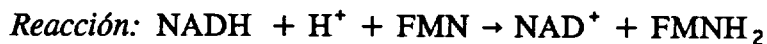
*Otras condiciones ensayadas:*

Se aumentó la concentración del sustrato hasta 50 ml.

Se varió el pH desde 7 hasta 8.8.

Se añadió 0.1 g de Cl<sub>2</sub>Mg.

Se ensayó la adición de 80-100 mg de EDTA.

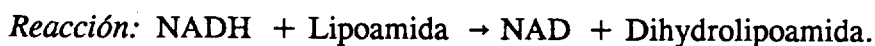
**28. NADH-DESHIDROGENASA. (NADH-DH. EC 1.6.99.3).***Reactivos:*

Fosfato 0.1 M pH 7 .....	100 ml
NADH .....	10 mg
MTT 1% .....	3 ml
Menadión .....	60 mg

*Otros ensayos realizados:*

Se aumentó la concentración de menadión hasta 100 mg.

Se varió el pH desde 7.5 a 8.0.

**29. NADH-DIAFORASA. (DIA. EC 1.6.4.3).***Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 .....	100 ml
(DCPIP) .....	5 mg
NADH .....	10 mg
MTT 1% .....	3 ml
37°C.	

*Otros ensayos realizados.*

Se varió el pH desde 7.0 hasta 8.5

**30. PEROXIDASA. (PX. EC 1.11.1.7)**

*Reacción:* Donador + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Donador oxidado + 2 H<sub>2</sub>O.

*Reactivos:*

3-Amino 9-Etil carbazol	50 mg
Dimetil formamida	5 ml
Acetato sódico 0.05 M pH 5	92 ml
Cl <sub>2</sub> Ca	20 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	0.5 ml

Se disolvió 3-Amino 9-Etil carbazol en dimetil formamida antes de añadir el resto de los ingredientes. Se incubó el gel a temperatura ambiente.

*Otras pruebas ensayadas:*

Se emplearon otros donadores de electrones:

A) BENZIDINA.

Acetato Na <sub>2</sub> 0.1 M pH 4.5	100 ml
Acetato de bencidina	500 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 33%	30 µl

B) O-DIANISIDINA.

Acetato Na <sub>2</sub> 0.2 M pH 5	100 ml
O-Dianisidina	100 mg
Etanol 95%	70 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	2 ml

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió la concentración del donador desde 50 mg hasta 200 mg.

Se substituyó el etanol 95% por metanol.

Se añadió β-Naftol a la solución de tinción.

Se añadieron 10 ml de KI 0.2 M.

Se añadió KBr 100 mg.

Se varió el pH desde 4 hasta 6.5.

**C) PIROGALLOL.****SOLUCION A.**

Agua destilada ..... 100 ml  
Pirogallol ..... 1 g

**SOLUCION B.**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4% ..... 100 ml

Se incubó el gel en la solución A durante 30 minutos a 4°C. Se lavó el gel con agua destilada dos o tres veces y se añadió la solución B a 30°C.

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH de 4 a 5.

Se aumentó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la solución.

**31. SORBITOL DESHIDROGENASA. (SORDH. EC 1.1.1.14).**

*Reacción:* D-Sorbitol + NAD → D-Fructosa + NADH

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8 ..... 100 ml  
Sorbitol ..... 2.0 g  
NAD ..... 50 mg  
MTT 1% ..... 5 ml  
PMS 1% ..... 0.5 ml



**32. SHIKIMATO DESHIDROGENASA. (SKDH. EC 1.1.1.25).**

*Reacción:* Shikimato + NADP → 3-Dihidrosnikimato + NADPH.

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 .....	100 ml
Acido Shikímico .....	100 mg
NADP .....	15 mg
MTT 1% .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml
Cl <sub>2</sub> Mg .....	0.1%
37°C.	

*Otras condiciones ensayadas:*

Se varió el pH desde 7.0 a 8.0.

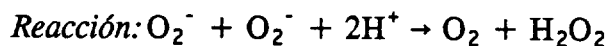
**33. SUCCINATO DESHIDROGENASA. (SUCCDH. EC 1.3.99.1).**

*Reacción:* Succinato + Aceptor (oxidado) → Fumarato + Aceptor (reducido).

*Reactivos:*

Fosfato 0.05 M pH 7 .....	100 ml
EDTA Na <sub>2</sub> .....	400 mg
Succinato sódico .....	250 mg
ATP Na <sub>2</sub> .....	50 mg
NAD .....	70 mg
NBT .....	40 mg
PMS .....	2 mg
37°C.	

**34. SUPEROXIDO DISMUTASA. Tetrazolio oxidasa, Indofenol oxidasa. (SOD, TO, IPO. EC 1.15.1.1).**



*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 .....	100 ml
Riboflavina .....	5 mg
EDTA Na <sub>2</sub> .....	80 mg
MTT 1% .....	3 ml

Se incubó el gel en oscuridad durante 20-30 min. A continuación se puso bajo luz hasta que aparecieran bandas blancas sobre fondo azul.

*Otras condiciones ensayadas.*

Se varió el pH de reacción desde 7 a 8.0.

Se empleó tampón Fosfato 0.05 - 0.2 M pH 7-8.

Se sustituyó el MTT por NBT.

Se eliminó el EDTA Na<sub>2</sub>.

Se añadió 0.4 ml TEMED.

Se varió la concentración de riboflavina de 1 a 10 mg.

Se varió el tiempo de exposición a la luz y a la oscuridad desde 10 a 60 minutos.

*Otras condiciones ensayadas:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8 .....	100 ml
NAD .....	50 mg
MTT .....	3 ml
PMS 1% .....	0.5 ml

Se expuso el gel a la luz durante 2 a 3 horas.

Esta enzima también apareció en los geles teñidos para las deshidrogenasas debido a que emplea el MTT o NBT como sustrato.

**35. TRIOSA FOSFATO ISOMERASA. (TPI. EC 5.3.1.1).**

*Reacción:* D-Gliceraldehído-3-fosfato → Dihidroxiacetona fosfato.

Esta reacción está acoplada a:

Dihidroxiacetona fosfato + NAD → α-glicerofosfato (α-glicerofosfato dh).

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 8	100 ml
Dihidroxiacetona fosfato	18 mg
NAD	20 mg
MTT	20 mg
PMS	4 mg
Gliceraldehido-3-P deshidrogenasa	30 u.

**36. XANTIN DESHIDROGENASA. (XDH. EC 1.2.1.37).**

*Reacción:* Hipoxantin + NAD + H<sub>2</sub>O → Xantin + NADH.

Esta reacción está acoplada a:

Xantin + NAD + H<sub>2</sub>O → Urato + NADH.

*Reactivos:*

Tris-HCl 0.1 M pH 7.5	100 ml
Hipoxantin	700 mg
NAD	30 mg
NBT	20 mg
PMS	4 mg

37°C.

Se añadió la hipoxantin en el tampón y se calentó hasta su total disolución.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió el resto de los componentes.

---

## 2.9.- Fijación de los geles.

Una vez finalizada la reacción, se eliminaba la solución de tinción de las cubetas y se lavaba el gel varias veces con agua. Los geles se fijaron sumergiéndolos en una solución fijadora que, en los geles de almidón, estaba compuesta por 400 ml de metanol, 70 ml de acético y 530 ml de agua, mientras que en los geles de acrilamida estaba compuesta por ácido acético al 7%.

Los geles se fotografiaron con película blanco y negro de alta sensibilidad (50 ASA), con velocidades de 1/4 ó 1/8 de segundo para aumentar el contraste de las bandas.

Después de fijar los geles de almidón, se secaban durante una hora entre papeles de filtro y se envolvían en plásticos, conservándose bien durante algunos meses a 4°C.

Para calcular la movilidad de cada banda en el gel y poder realizar comparaciones entre diferentes geles, se procedió a calcular la movilidad relativa (Rf) de cada una con respecto a la movilidad del frente o del azul de bromofenol empleando la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la banda enzimática}}{\text{Distancia de migración del frente.}}$$

**III. METODOLOGIA.  
RESULTADOS Y DISCUSION.**

### 3.1.- Actividad general de los sistemas enzimáticos.

Los resultados del análisis de la actividad enzimática se expresan en base a la aparición de las bandas (actividad) y resolución sobre el gel.

Los resultados de los 36 sistemas enzimáticos analizados permiten clasificar las enzimas en cuatro grupos (Tabla 3.1).

El primer grupo, "enzimas con actividad" corresponde a las enzimas que mostraban buena actividad y resolución en las tres especies: esterasa (EST), NADH-Diaforasa (DIA), fosfoglucoisomerasa (PGI) y fosfoglucomutasa (PGM). El segundo grupo, "enzimas con actividad variable" corresponde a las enzimas cuya resolución y actividad depende de la especie: superóxido dismutasa (SOD) y malato deshidrogenasa (MDH) (con actividad en las tres especies pero mayor resolución en *Gracilaria ferox*), glutamato deshidrogenasa (GDH) (con gran actividad en *Gelidium arbuscula*, débil en *Gelidium canariensis* y sin actividad en *Gracilaria ferox*), fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida (actividad en *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* baja actividad en *Gelidium arbuscula*).

El tercer grupo, "enzimas sin actividad", lo constituyen 18 sistemas enzimáticos que nunca mostraron actividad en las tres especies, con las diversas metodologías ensayadas: Alcohol deshidrogenasa (ADH), amilasa (AMY), ascorbato oxidasa (AO), aspartato aminotransferasa (GOT), catalasa (CAT), galactosa deshidrogenasa (GALDH), glucosa deshidrogenasa (GluDH), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH),  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ GPDH), hexoquinasa (HK), isocitrato deshidrogenasa (IDH), láctico deshidrogenasa (LDH), leucin aminopeptidasa (LAP), enzima málico (Me), NADH-deshidrogenasa (NADH-DH), peroxidasa (PX), shikimato deshidrogenasa (SKDH) y sorbitol deshidrogenasa (SORDH).

El cuarto grupo, "enzimas sin actividad inicial" comprende 10 sistemas enzimáticos que se ensayaron una sola vez y no se obtuvo actividad enzimática. Las condiciones ensayadas en estas enzimas fueron las siguientes: homogeneización en tampón tris-citrato 0.1 M pH 7.8, sin emplear centrifugación, aplicando la electroforesis horizontal en almidón (sistema de Poulik y Citrato-Histidina) y tiñéndolas según las condiciones descritas, para cada una de ellas, en el capítulo de material y métodos.

**TABLA 3.1. Clasificación de las enzimas según la actividad obtenida.****I. ENZIMAS CON ACTIVIDAD.**

Esterasas.	EST.
NADH-Diaforasa.	DIA.
Fosfoglucoisomerasa.	PGI.
Fosfoglucomutasa.	PGM.

**II. ENZIMAS CON ACTIVIDAD VARIABLE.**

Fosfatasa alcalina.	ALP.
Fosfatasa ácida.	ACP.
Glutamato deshidrogenasa.	GDH.
Malato deshidrogenasa.	MDH.
Superoxido dismutasa.	SOD.

**III. ENZIMAS SIN ACTIVIDAD.**

Alcohol deshidrogenasa.	ADH.
Amilasa.	AMY.
Ascorbato oxidasa.	AO.
Aspartato aminotransferasa.	GOT/AAT.
Catalasa.	CAT.
Galactosa deshidrogenasa.	GALDH.
$\alpha$ -Glicerol fosfato dh.	$\alpha$ GPDH.
Glucosa deshidrogenasa.	GIDH.
Glucosa-6-fosfato dh.	G6PDH.
Hexoquinasa.	HK.
Isocitrato deshidrogenasa.	IDH.
Láctico deshidrogenasa.	LDH.
Leucin aminopeptidasa.	LAP.
Enzima málico.	Me.
NADH-deshidrogenasa.	NADH-DH.
Peroxidasa.	PX.
Shikimato deshidrogenasa.	SKDH.
Sorbitol deshidrogenasa.	SORDH.

---

**TABLA 3.1. Continuación.**


---

**IV. ENZIMAS SIN ACTIVIDAD INICIAL.**

Aconitasa	ACO.
Alanina deshidrogenasa.	ALADH.
Aldolasa.	ALDO.
Dipeptidasa.	DIPEP.
Endopeptidasa.	ENDOPEP.
Fumarasa.	FUM.
Succinato deshidrogenasa.	SUCDH.
Triosa fosfato isomerasa.	TPI.
Xantin deshidrogenasa	XDH.

---

Estas fueron: Aconitasa (ACO), alanina deshidrogenasa (ALADH), aldolasa (ALDO), dipeptidasa (DIPEP), endopeptidasa (ENDOPEP), fumarasa (FUM), succinato deshidrogenasa (SUCCDH), triosa fosfato isomerasa (TPI) y xantin deshidrogenasa (XDH).

La inexistencia de actividad en el gel de determinados sistemas enzimáticos podría ser debido a:

- 1.- Desnaturalización total de la enzima debido a las condiciones de extracción o separación empleadas.
- 2.- Existencia de grandes cantidades de fenoles en las especies analizadas que inhiben las enzimas.
- 3.- Insuficiente ruptura del tejido.
- 4.- Asociación de las enzimas con otros componentes celulares, (glúcidos, lípidos de membrana) disminuyendo la disolución en soluciones acuosas.
- 5.- Método de separación o/y tinción inadecuados.
- 6.- Baja actividad "*per se*" del enzima.
- 7.- Inexistencia de estas enzimas en las especies estudiadas.



1.- **Desnaturalización enzimática.** Es posible que la homogeneización en agua destilada o la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  generen una disminución o pérdida total de la actividad en alguna de las enzimas, tal como se ha descrito en otras especies de Rodofitas (Lindstrom y South, 1989), pero no es probable que el empleo de métodos más complejos y sofisticados (almacenamiento de las muestras en nitrógeno líquido inmediatamente después de recogerlas en la costa, empleo de tampones de extracción con estabilizantes de proteínas, etc) provoquen igualmente la desnaturalización total de las enzimas.

2.- **Existencia de elevadas cantidades de fenoles.** La aparición de actividad en muchas enzimas empleando solamente agua destilada indica claramente que la inhibición de las enzimas del grupo "sin actividad" no puede ser debido a la existencia de elevados contenidos fenólicos en las especies estudiadas.

3.- **Grado de ruptura del tejido.** La ruptura del tejido empleando de nitrógeno líquido es suficientemente elevada para garantizar una buena extracción de las enzimas ya que se detecta actividad enzimática en varios sistemas enzimáticos. La trituración de las algas empleando nitrógeno líquido es un procedimiento ampliamente empleado en la extracción de enzimas en plantas superiores (Kephart, 1990) y macroalgas (Lindstrom y South, 1989; Cheney, 1985; Sato *et al.*, 1984), y no es probable que este factor sea responsable de no detección de enzimas.

4.- **Asociación de enzimas con otros componentes celulares.** Aunque no podemos excluir que algunas enzimas estén asociadas a glúcidos o membranas y sea necesaria la extracción de las mismas con otros solventes como acetona, parece improbable que todos y cada uno de los sistemas enzimáticos en las que no se ha obtenido actividad sean insolubles en soluciones acuosas.

5.- **Métodos de separación y tinción inadecuados.** Como discutiremos en los apartados 3.4, 3.5 y 3.7.2, las diferentes variantes metodológicas de

tinción y separación electroforéticas no afectaron a las enzimas del grupo "sin actividad", lo cual indica que la metodología empleada no es la responsable de la no observación de actividad en este grupo de enzimas.

**6.- Baja actividad del enzima.** La considerable disminución de la actividad enzimática al aumentar la dilución proteica a proporciones 1:2 ó 1:3 (p:v) indican que la inactividad del grupo "enzimas sin actividad" se debe probablemente a la baja actividad específica o concentración de estas enzimas. Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores en macroalgas marinas. Miura *et al.*, (1978a) estudiaron mediante electroforesis en almidón, 15 sistemas enzimáticos en cuatro especies de *Porphyra* y no encontraron actividad enzimática en Me, ADH, IDH, LDH, ODH y PGM. Lindstrom y South (1989) no detectaron actividad en ACP, ADH, ALP, CAT IDH y SkDH y SORDH en seis especies de *Palmaria* empleando electroforesis en almidón y homogeneizando en una combinación de mortero (con nitrógeno líquido) y homogeneizador de aspas en un tampón MOPS pH 7.5 al cual añadieron varios estabilizantes y antioxidantes. Jacobi (1962) no detectó actividad, medida con espectrofotómetro, en HK, ALD, GPDH, ADH, LDH y G6PDH de 4 especies de Rodofitas, mientras que Sato *et al.*, (1984) tampoco obtuvieron actividad GDH en 6 especies de macroalgas.

Asimismo coincide con los resultados descritos por otros autores (Marsden *et al.*, 1981; 1984a; 1984b; Rice y Crowden, 1987) quienes tuvieron que concentrar previamente las proteínas (mediante sulfato amónico y cromatografía) para poder obtener actividad enzimática.

**7.- Inexistencia de las enzimas.** Aunque no podemos descartar la inexistencia de alguna de las enzimas del grupo "sin actividad" en las especies estudiadas, se ha descrito la existencia de la mayoría de ellas en otras especies de macroalgas marinas (Mallery y Richardson, 1972; Fujio *et al.*, 1985; 1987; Innes y Yarish, 1987; Rice y Crowden, 1987; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990; ver apartado 3.7.2) por lo que la hipótesis del punto anterior parece la más probable.

### **3.2.- Efecto del almacenamiento sobre la actividad enzimática.**

#### **3.2.1.- ALMACENAMIENTO A -20°C.**

El estado en que se congelaron las muestras (individuo completo, extracto crudo sin centrifugar o sobrenadante) no tiene influencia apreciable sobre la actividad enzimática. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Lindstrom y South (1989) en 6 especies de la Familia Palmariacea quienes describieron pérdida de actividad en G6PDH, GOT, PGM, 6PGDH y SOD si los talos se almacenaban a -18°C, que por el contrario se mantenía si se almacenaban a -80°C. Sin embargo coinciden con los resultados descritos por Miura *et al.* (1978a; 1978b; 1979) y Fujio *et al.* (1985; 1987) en *Porphyra*, quienes obtuvieron actividad en más de 10 enzimas congelando los talos a -20°C.

En plantas superiores la congelación del tejido es un procedimiento poco usual (entre aquellos laboratorios que emplean la electroforesis isoenzimática) (Kephart, 1990) ya que suele provocar la ruptura en la compartimentalización celular ocasionando cambios oxidativos internos que inhiben las enzimas (Loomis, 1974).

En las especies estudiadas en este trabajo la ruptura de la compartimentalización, si es que existe, no afecta a la actividad enzimática de una forma tan acusada (probablemente debido a la baja concentración o inexistencia de fenoles en estas especies) ya que no se observan diferencias significativas en el modo de congelación.

#### **3.2.2.- EFECTO DEL ALMACENAMIENTO A -20°C.**

El tiempo de permanencia de las muestras a -20°C fue el factor determinante en el mantenimiento o la pérdida de la actividad enzimática. Las algas congeladas directamente mantienen la actividad enzimática si el tiempo de congelación no es superior a 30 ó 40 días y la homogeneización posterior se realiza con nitrógeno líquido. Periodos de almacenamiento superiores y homogeneización sin nitrógeno líquido originaron una pérdida significativa de actividad enzimática. (Bandas de PGI, MDH y EST de

*Gelidium canariensis* desaparecen después de mantener los talos a  $-20^{\circ}\text{C}$  más de 30 días de congelación). Del mismo modo, la congelación del extracto homogeneizado, bien sea anterior o posterior al centrifugado, no afecta la actividad enzimática si los periodos de incubación son inferiores a 30 días. Con periodos de incubación superiores a este tiempo, se apreció una ligera pérdida de actividad enzimática en todas las enzimas, manteniéndose la actividad en el gel en aquellas bandas con mayor intensidad. Tras un periodo de aproximadamente dos meses se produce una pérdida muy importante de la actividad en la mayoría de los enzimas.

Contrariamente a nuestros resultados, Rice y Crowden (1987) almacenaron durante más de 4 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  el extracto proteico de varias especies de Fucales, sin apreciar pérdida de actividad enzimática. Asimismo, Grant y Proctor (1980) conservaron la actividad enzimática de los extractos de *Chara*, almacenados durante más de 1 año a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Resultados similares se han descrito en plantas superiores (Kephart, 1990). Nuestros resultados sugieren que diversos sistemas enzimáticos de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* son más lábiles a los periodos de congelación que otras especies de macroalgas marinas y plantas superiores.

### 3.2.3.- ALMACENAMIENTO EN CAMARA DE CULTIVO.

La especie que más rápidamente se deterioraba (depigmentaba) en cultivo fue *Gelidium canariensis* en comparación a *Gelidium arbuscula*, pero el grupo "enzimas con actividad" mantenían adecuadamente su actividad en ambas especies tras periodos de 20 a 25 días de cultivo. En ningún caso se detectó la aparición de enzimas del grupo "sin actividad" o la aparición de nuevas bandas en las enzimas "con actividad" al aumentar el tiempo en cultivo. Todos los patrones enzimáticos se mantuvieron constantes, exceptuando el efecto "sin deshidrogenasa" en *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis*, que aumentaba con el tiempo en cultivo.

*Gracilaria ferox* no sólo se mantuvo adecuadamente en cultivo durante más de dos meses, sino que además mostró una elevada tasa de crecimiento y aumento de la pigmentación. El aumento progresivo de la pigmentación originó una banda más intensa de ficoeritrina, aunque en ningún caso se

observaron diferencias en sus patrones enzimáticos ni la aparición de enzimas del grupo "sin actividad".

El mantenimiento de los individuos en cultivo ha sido el método de almacenamiento más empleado en macroalgas marinas analizadas por electroforesis (Cheney y Babbel, 1978; Mallery y Richardson, 1972; Innes y Yarish, 1984; Malinowsky, 1974; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990).

Coincidiendo con nuestros resultados, todos los autores que han almacenado los individuos en cámaras de cultivo, han observado la inexistencia de cambios en los patrones isoenzimáticos con el tiempo (Innes y Yarish, 1984; Malinowsky, 1974; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990; Cheney y Babbel, 1978). Sin embargo, ningún autor detecta el fenómeno "sin deshidrogenasa", aunque los periodos de almacenamiento hayan sido superiores a cuatro meses (Cheney y Babbel, 1978; Innes y Yarish, 1984; Lindstrom y South, 1989).

### 3.3.- Efecto del tratamiento de homogeneización.

En las tres especies se observó una mayor, mejor y más rápida ruptura del tejido, con el consecuente aumento de la actividad enzimática, al realizar la homogeneización con nitrógeno líquido en mortero en comparación a la realizada sin nitrógeno líquido. La homogeneización con nitrógeno líquido no indujo la aparición de enzimas del grupo "sin actividad", aunque favoreció la obtención de enzimas que de otra manera se observaban con muy baja actividad o no se advertían (ACP y ALP en *Gelidium arbuscula*, GDH en *Gelidium canariensis*). También mejoró las actividades de enzimas en aquellos talos almacenados a -20°C más de 30 días. Este hecho corrobora que la pérdida de actividad al homogeneizar los talos congelados sin nitrógeno líquido es debida a una ruptura incompleta de los mismos.

La homogeneización sin nitrógeno líquido de individuos sin congelar, dio lugar también a una buena actividad enzimática, aunque era necesario añadir arena u otro abrasivo para romper adecuadamente el tejido de ambas especies de *Gelidium*. Por el contrario, en *Gracilaria ferox* la homogeneización del tejido sin nitrógeno líquido ni abrasivos permitió la obtención de

actividades similares a las obtenidas con nitrógeno líquido.

Aunque la trituración del tejido con homogeneizadores (cristal, aspas) ha sido uno de los métodos más empleados en macroalgas marinas (Fujio, 1985; 1987; Miura, 1978a; 1978b; 1979; Innes y Yarish, 1984; Lindstrom y South, 1989; Mallery y Richardson, 1972; Malinowsky, 1974) (Tabla 1.1), esta elección viene condicionada por la naturaleza del tejido; así, especies de talos esponjosos (como *Codium*) son más fácilmente triturados con homogeneizadores de teflón o cristal que empleando nitrógeno líquido, (el cual provoca una congelación del tejido que por su alto contenido en agua dificulta la maceración). Por el contrario, especies con talos planos y duros, con un bajo contenido en agua (como *Gelidium*) son más fáciles de triturar en nitrógeno líquido que con homogeneizadores. Diversos ensayos preliminares empleando homogeneizadores de teflón y de aspas confirmaron este hecho. Por otro lado la extracción con mortero disminuye considerablemente el tiempo empleado en cada extracción ya que evita el tedioso proceso de limpieza del homogeneizador después del procesado de cada individuo.

No se observaron diferencias en la obtención de actividades enzimáticas o resolución de las bandas con extractos centrifugados a 3.000 x g entre 20 y 60' o sin centrifugar. Estos resultados contrastan con las bajas resoluciones debidas a la centrifugación descritas por Cheney y Babbel (1978) en *Eucheuma*. Estos autores consideraron que la baja resolución era consecuencia de la unión de los carragenatos de *Eucheuma* con las proteínas durante la centrifugación. Nuestros resultados indican que si realmente la causa de la escasa resolución es debida a los coloides, el agar no interactúa con las enzimas en el proceso de centrifugación.

El resto de los autores que han empleado las técnicas isoenzimáticas en macroalgas marinas han centrifugado los extractos sin estudiar su posible efecto (Miura *et al.*, 1978a; 1978b; 1979; Fujio *et al.*, 1985; 1987; Malinowsky, 1974; Innes y Yarish, 1984; Innes, 1987; 1988; Okumura y Fujino, 1985; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990).

La obtención de buenos resultados con los extractos centrifugados pasaba necesariamente por la filtración de los mismos a través de un filtro de nylon. Si este paso no se realizaba, se producía una resuspensión excesiva

de restos de tejidos en el sobrenadante que entorpecía la electroforesis. Esta metodología coincide con la empleada por Marsden *et al.*, (1981), quienes filtraban los extractos crudos antes de la centrifugación para obtener actividad enzimática en *Fucus*, y con la descrita por Oesterman (1984).

### 3.3.1.-TAMPONES DE EXTRACCION.

En la Tabla 3.2 se describen los resultados obtenidos en cada enzima "con actividad", de cada especie según el tampón de extracción ensayado. La valoración de cada sistema en cada enzima se realizó según la resolución observada a simple vista (mayor o menor nitidez de las bandas en el gel) y después de comparar cada sistema de electroforesis. Los valores indican:

1.- Muy baja resolución (poca actividad de las enzimas u observación de bandas no definidas). 3.- Muy buena resolución (gran actividad enzimática y nitidez de las bandas observadas). 2.- Resolución intermedia entre las dos anteriores.

Los resultados se pueden clasificar en dos grupos: a) Las enzimas que mantuvieron la actividad enzimática independientemente del tampón empleado: DIA, GDH, PGM y EST en *Gelidium arbuscula* (Tabla 3.2a); DIA, PGM, ALP, ACP y EST en *Gelidium canariensis* (Tabla 3.2b) y DIA, EST, PGM, ALP y ACP en *Gracilaria ferox* (Tabla 3.2c). b) Las enzimas que variaron su actividad según el tampón empleado: PGI de las tres especies disminuía la actividad de las bandas más débiles al emplearse agua destilada o el tampón N° 2; GDH de *Gelidium canariensis* perdía totalmente su actividad si se empleaba agua destilada o el tampón N° 2 y Tris-citrato pH 7.8, mejorando sustancialmente con los tampones que contenían algún componente antioxidante o estabilizante (tampones 3, 5, 6, 8, y 10) (Tabla 3.2b). Resultados similares se obtuvieron con la enzima ALP de *Gelidium arbuscula*, (Tabla 3.2a) y con MDH de *Gracilaria ferox* (Tabla 3.2c).

En cualquiera de las tres especies no se obtuvieron enzimas del grupo "sin actividad" con la variedad de tampones ensayados.

La adición de BSA a los tampones N° 6 y 10 producía una disminución considerable de la actividad enzimática. Estos resultados coinciden con los resultados descritos por Marsden *et al.* (1981) en Feofitas, quienes detectaron

**TABLA 3.2. Resultados obtenidos con los tampones de extracción en las enzimas del grupo "enzimas con actividad". 1.- Muy baja actividad. 2.- Con actividad. 3.- Muy buena actividad. -- No se ensayó.**

**a. Gelidium arbuscula.**

Enzima.	ACP.	ALP.	EST.	DIA.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
Tampón de extracción.									
Nº 1.-	1	1	3	3	3	2	2	3	2
Nº 3.-	--	--	3	3	3	2	3	3	3
Nº 4.-	--	3	3	3	--	3	3	3	--
Nº 6.-	2	3	3	3	3	--	3	3	3
Nº 7.-	--	--	--	--	3	2	--	--	--
Nº 9.-	--	--	--	--	3	2	--	--	--
Nº 10.-	--	--	--	--	3	3	--	--	--

1. Agua destilada. 3.- Tris-HCl pH 6.8, EDTA, PVP. 4.- Fosfato pH 7.4, MBS, DEDC, PVPP, Ascórbico, 2-Me. 6.- Tris-HCl pH 7.4, ascórbico, PVPP, EDTA. 8.- Tris-HCl pH 7.4, CINA, NAD, NADP. 9.- Tris-Citrato pH 7.8. 10.- Tris-HCl pH 7.4, EDTA, ascórbico, Tween-80, PVPP, CINA, 2-Me, NAD, NADP.



**TABLA 3.2. Continuación.**

**b. Gelidium canariensis.**

Enzima.	ACP	ALP.	EST.	DIA.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
Tampón de extracción.									
Nº 1.-	3	3	3	3	1	2	2	3	2
Nº 2.-	--	--	3	3	1	2	2	3	2
Nº 3.-	--	3	3	3	2	3	3	3	3
Nº 4.-	--	--	3	3	--	3	3	3	2
Nº 5.-	--	--	3	3	2	3	3	3	2
Nº 6.-	--	3	3	3	2	3	3	3	3
Nº 7.-	--	--	3	3	--	3	3	3	2
Nº 8.-	--	--	--	--	2	2	--	--	--
Nº 9.-	3	3	--	--	1	2	--	--	--
Nº 10.-	--	3	--	--	2	--	--	--	3

1. Agua destilada. 2.- Tris-HCl pH 7.4. 3.- Tris-HCl pH 6.8, EDTA, PVP. 4.- Fosfato pH 7.4, MBS, DEDC, PVPP, Ascórbico, 2-Me. 5.- Tris-HCl pH 8.0, cisteína. 6.- Tris-HCl pH 7.4, ascórbico, PVPP, EDTA. 7.- Tris-Citrato pH 7.4, DTT, Tween-80, Cl<sub>2</sub>Mg, ClK, PVPP. 8.- Tris-HCl pH 7.4, ClNa, NAD, NADP. 9.- Tris-Citrato pH 7.8. 10.- Tris-HCl pH 7.4, EDTA, ascórbico, Tween-80, PVPP, ClNa, 2-Me, NAD, NADP.

**TABLA 3.2. Continuación.**

**c. *Gracilaria ferox*.**

Enzima.	ACP	ALP.	EST.	DIA.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
Tampón de extracción.									
Nº 1.-	3	3	3	3	1	2	2	3	2
Nº 3.-	3	3	--	3	--	2	3	3	2
Nº 5.-	3	3	3	3	1	3	3	3	2
Nº 6.-	3	3	3	3	1	3	3	3	3
Nº 9.-	--	3	3	3	1	3	2	3	2
Nº 10.-	--	3	3	3	1	3	3	3	3

1. Agua destilada. 3.- Tris-HCl pH 6.8, EDTA, PVP. 5.- Tris-HCl pH 8.0, cisteína. 6.- Tris-HCl pH 7.4, ascórbico, PVPP, EDTA. 9.- Tris-Citrato pH 7.8. 10.- Tris-HCl pH 7.4, EDTA, ascórbico, Tween-80, PVPP, ClNa, 2-Me, NAD, NADP.

que la adición de BSA dificulta la separación y la actividad enzimática en el gel (Marsden *et al.*, 1981), debido a la adición de proteína inerte en el gel.

Nuestros resultados sugieren la existencia de dos tipos de enzimas: las que no son afectadas por los componentes añadidos al tampón de extracción (ácido ascórbico, DTT, EDTA, PVP, PVPP, MBS, 2-Me, DEDC, cisteína, Tween-80,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , ClK, ClNa, NAD) ni por el pH (6.8, 7.4, 7.8 y 8.0), ni por el tipo de tampón de extracción empleado (agua, Tris, fosfato o tris-citrato), y las enzimas más vulnerables a los procedimientos de extracción y requieren la presencia de compuestos estabilizadores para mantener adecuadamente su actividad enzimática.

La obtención de actividad en diversas enzimas de las tres especies empleando agua destilada y tampones sin componentes antioxidantes (tampones N° 2 y 9), sugieren la inexistencia de cantidades significativas de fenoles, coincidiendo con los resultados descritos en otras especies de macroalgas. En varias especies de *Porphyra* se ha descrito la obtención de actividad enzimática en más de 10 enzimas empleando agua destilada como tampón de extracción (Miura *et al.*, 1978a; 1978b; 1979; Fujio *et al.*, 1985; 1987; Okumura y Fujino, 1985). En *Enteromorpha linza* se obtuvo actividad de 4 enzimas empleando Tris-HCl pH 8.0 como tampón de extracción (Innes y Yarish, 1984).

En general, se detectó mejor actividad enzimática con los tampones que contenían PVP o PVPP y ácido ascórbico (Tampones N° 4, 6 y 10) (Tabla 3.2), indicando que la adición conjunta de ambos productos afectan positivamente la actividad de la mayoría de las enzimas de las tres especies. Resultados similares han sido descritos por Lindstrom y South (1989), quienes añadieron PVP y ascorbato sódico al tampón de extracción de 6 especies de Palmariacea, obteniendo actividad enzimática en 11 sistemas enzimáticos. Otros autores han descrito la necesidad de añadir un compuesto específico al tampón de extracción para obtener una adecuada actividad enzimática. Marsden *et al.* (1981), contrariamente a nuestros resultados, encontraron que la adición de Tween-80 al tampón de extracción aumentaba la concentración de proteínas en el extracto en un 90%. Huber y Lewin (1986) en *Tetraselmis* y Malinowsky (1974) en *Codium fragile*, describen mejores resultados al añadir

NADP o NAD al tampón de homogeneización, relacionándose con un aumento de la estabilidad proteica de las enzimas NAD(P) dependientes (Harris y Hopkinson, 1976). Contrariamente a lo descrito por estos autores, la adición de NAD y NADP al tampón de extracción (Nº 8 y 10) de nuestras especies no varió la actividad en las enzimas dependientes de estos cofactores (MDH, GDH, PGM o PGI).

Pocos autores han estudiado el efecto de diferentes tampones en la extracción, Mallery y Richardson (1972) obtuvieron mayor actividad enzimática con Tris-HCl pH 8.0 entre los tampones de extracción ensayados (sin describir cuales). Sin embargo, el tampón descrito por estos autores dio pobres resultados en la enzima SOD de *Gracilaria ferox* y *Gelidium canariensis* (Tabla 3.2). Young (1970) ensayó diversos tampones de extracción a diversos pHs para detectar proteínas totales de varias macroalgas, pero no analizó la actividad enzimática de ninguna enzima.

En todos los tampones de extracción empleados en *Gelidium canariensis* y *Gelidium arbuscula* donde se realizó una tinción "control" del fenómeno "sin deshidrogenasa" se observó la aparición de dicho fenómeno, independientemente de la naturaleza del tampón. Por el contrario, nunca se observó este fenómeno en *Gracilaria ferox*, lo cual indica claramente que el efecto no es debido a la utilización de compuestos tiólicos como han sugerido Harris y Hopkinson (1976).

### **3.4.- Electroforesis en acrilamida.**

En la Tabla 3.3 se resume la resolución de las enzimas "con actividad" según el sistema de tampones empleados en los geles de acrilamida. Los resultados variaron según las enzimas ensayadas, y el tipo de sistema de tampón utilizado. No se observó pérdida de actividad enzimática al emplear uno u otro sistema de tampones (excepto empleando el sistema Tris-HCl pH 8.8) (Tabla 3.3).

**TABLA 3.3. Resolución obtenida en el grupo "enzimas con actividad" empleando electroforesis en acrilamida. 1.- Enzima con muy baja resolución. 2.- Enzima con resolución y actividad. 3.- Enzima con muy buena resolución y actividad. -- No se ensayó.**

**a. Gelidium arbuscula.**

Enzimas.	ACP.	ALP.	EST.	DIA.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
<u>Tampones.</u>									
<u>Sistema discontinuo.</u>									
Con gel empaquetador	2	2	3	3	--	--	--	--	3
Sin gel empaquetador	1	2	3	3	2	2	2	2	3
<u>Sistemas continuos.</u>									
Tris-Borato pH 8.9	--	--	3	3	--	2	2	2	2
Tris-citrato pH 8.5	--	--	--	2	--	2	--	--	2

ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. DIA= Diaforasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. MDH= Malato deshidrogenasa. PGI= Fosfogluoisomerasa. PGM= Fosfoglucomutasa. SOD= Superóxido dismutasa.

**TABLA 3.3. Continuación.**

**b. Gelidium canariensis.**

Enzimas.	ACP	ALP.	EST.	DIA.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
Tampones.									
<u>S. discontinuo.</u>									
Con gel empaquetador	3	3	3	3	2	2	2	3	3
Sin gel empaquetador	3	3	3	3	2	2	2	3	3
<u>S. continuos.</u>									
Tris-glicina pH 9.0	--	3	2	--	--	--	2	2	--
Tris-Borato pH 8.9	2	2	2	3	--	2	2	2	3
Tris-HCl pH 8.8	--	2	1	1	--	1	1	1	--
Tris-citrato pH 8.5	3	3	2	--	--	2	--	3	2

ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. DIA= Diaforasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. MDH= Malat deshidrogenasa. PGI= Fosfogluoisomerasa. PGM= Fosfoglucomutasa. SOD= Superóxido dismutasa.

**TABLA 3.3. Continuación.**

**c. *Gracilaria ferox*.**

Enzimas.	ACP	ALP.	EST.	DIA.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
<u>Tampones.</u>									
<u>Sistema discontinuo.</u>									
Con gel empaquetador	3	3	3	--	2	2	2	2	3
Sin gel empaquetador	3	3	3	3	2	2	2	2	3
<u>Sistemas continuos.</u>									
Tris-glicina pH 9.0	--	3	3	2	--	2	2	2	2
Tris-Borato pH 8.9	3	3	3	3	2	2	2	2	2
Tris-HCl pH 8.8	--	--	--	--	--	1	1	1	--
Tris-citrato pH 8.5	3	3	3	2	--	--	--	--	--

ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. DIA= Diaforasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. MDH= Malato deshidrogenasa. PGI= Fosfoglucoisomerasa. PGM= Fosfoglucomutasa. SOD= Superóxido dismutasa.

El sistema discontinuo descrito por Davis (1964) (Tris-HCl/Tris-glicina) fue el que dio el mayor grado de resolución y actividad en las tres especies (Tabla 3.3). En ningún caso originó la aparición de enzimas "sin actividad" aunque se apreció un aumento del efecto "sin deshidrogenasa" en comparación con los sistemas continuos.

Con el sistema de Davis, sin gel empaquetador, se detectó una buena resolución para la mayoría de las enzimas, siendo su resolución y actividad comparable al sistema discontinuo con gel empaquetador (Tabla 3.3).

Estos resultados indican que el gel hacinador del sistema discontinuo de Davis (que ayuda a empaquetar la muestra antes de la separación) no afecta la resolución de las enzimas de las tres especies analizadas. Nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por el propio Davis (1964) y otros autores (Hames y Rickwood, 1983; Maurer, 1971), quienes detectan mayor resolución empleando el gel empaquetador. La eliminación del gel empaquetador ha sido empleada, con éxito, por otros autores en la separación de isoenzimas. (Gayler y Morgan, 1976; Esen y Scora, 1977).

Los resultados obtenidos con los sistemas continuos dependieron de la enzima analizada más que del sistema de tampón empleado, excepto el sistema Tris-HCl pH 8.8 con el que se apreció una resolución y actividad muy pobre en la mayoría de los enzimas (Tabla 3.3). En todos los sistemas continuos no se detectan enzimas del grupo "sin actividad".

Comparando las resoluciones obtenidas en cada sistema para cada enzima en cada especie, las enzimas ACP y ALP de *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* y EST de *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox* se obtuvieron con buena resolución y actividad independientemente del sistema de tampones empleados (Tabla 3.3). Por el contrario, las enzimas PGI, MDH y GDH de las tres especies analizadas, nunca se obtuvieron con buena resolución y actividad en ninguno de los sistemas (Tabla 3.3). Sólo SOD y DIA mostraron resoluciones desiguales según el tampón ensayado, resolviéndose mejor en el sistema Tris-Borato pH 8.9. Estos resultados indican que la composición iónica de los tampones no influye significativamente en la separación electroforética, coincidiendo con lo descrito por varios autores (Hames y Rickwood, 1983; Maurer, 1971). Posiblemente, los pHs empleados



en los sistemas continuos (8.5, 8.8, 8.9 y 9.0) están en un rango que no origina grandes diferencias en la carga de la mayoría de las enzimas, obteniéndose resoluciones similares con todos los sistemas continuos.

Contrariamente a nuestros resultados, Sato *et al.* (1984), en *Porphyra yezoensis* y Gayler y Morgan (1976) en *Caulerpa simpliciuscula* separaron con éxito la enzima GDH empleando el sistema discontinuo de Davis. Rice y Crowden (1987) también han separado las enzimas GDH, MDH y PGI en varias especies de Fucales, mediante el sistema discontinuo.

Estos resultados indican que la resolución isoenzimática por electroforesis en macroalgas marinas depende fundamentalmente de la propia naturaleza de la enzima y en segundo término del sistema de separación electroforética y composición iónica del tampón empleado.

No se detectaron diferencias en la movilidad ni en el número de bandas de las enzimas "con actividad" ni surgieron enzimas del grupo "sin actividad" al realizar la pre-electroforesis o no. Estos resultados indican que la concentración de persulfato empleada (0.075%) es suficiente para producir la polimerización del gel sin interferir con las proteínas durante el proceso de separación electroforética.

No existen datos en macroalgas que indiquen la necesidad de realizar la pre-electroforesis. Algunos autores no la realizan y no describen ningún proceso de alteración de la calidad y número de bandas en el gel (Innes y Yarish, 1984; Rice y Crowden, 1987). Otros autores han realizado la pre-electroforesis pero no comparan los resultados sin su realización (Marsden *et al.*, 1981; 1984a; 1984b).

Los mejores resultados de separación electroforética en los geles de acrilamida se obtuvieron con una concentración de acrilamida en el gel separador de 7.5 a 10% p/v. Estos resultados coinciden con las concentraciones empleadas en la mayoría de los trabajos en macroalgas marinas (8%, Innes y Yarish, 1984; 8.1%, Rice y Crowden, 1987; 7.5%, Mallery y Richardson, 1971; 1972; Vilter y Golmbitza, 1983), así como con las concentraciones descritas en la mayoría de los textos generales de electroforesis (Osterman, 1984; Maurer, 1971; Hames y Rickwood, 1981; Harris y Hopkinson, 1976).

No se detectaron enzimas del grupo "sin actividad" después de variar la concentración de acrilamida y el tiempo de desarrollo de la electroforesis. Incluso una hora después de haber dejado escapar el frente del gel y con 5% de acrilamida no se obtuvieron resultados positivos en este grupo de enzimas. Estos resultados contrastan con los descritos por Innes y Yarish (1984) en *Enteromorpha linza*, quienes encontraron actividad de la enzima GOT a las 2 horas de salirse el frente de la electroforesis del gel.

La adición de otros componentes a los tampones del gel y de los electrodos (Tabla 2.4) no indujo la aparición de enzimas "sin actividad" ni mejoró la resolución de otras, contrariamente a los resultados descritos por otros autores. Harris y Hopkinson (1976) han señalado la utilidad de añadir NAD o NADP a los tampones de electroforesis para mejorar la actividad enzimática. Marsden *et al.*, (1981; 1984a; 1984b) encontraron que la adición de Tween-80 y 2-Me en los tampones de electrodos y de Tween-80 en el gel, mejoraban la actividad enzimática durante la separación electroforética. Brewbaker *et al.* (1968) han descrito mejores resoluciones en la separación electroforética de la enzima LAP en varias especies de plantas superiores empleando geles de acrilamida con 0.5% de almidón ofrece.

Nuestros resultados indican que las enzimas de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* no requieren de estos factores para mantener la actividad enzimática (de las enzimas "con actividad") y la eliminación de los mismos no es la causa de la no detección de actividad en las enzimas "sin actividad", lo que coincide con otras especies de macroalgas. En *Enteromorpha linza*, Innes y Yarish (1984) detectaron actividad enzimática en AMY y GOT en geles de acrilamida sin añadir ningún cofactor a los tampones. En *Porphyra yezoensis* (Sato *et al.*, 1984) y en *Caulerpa simpliciuscula* (Gayler y Morgan, 1976) se ha descrito actividad GDH sin necesidad de añadir cofactores a los tampones.

### 3.5.- Electroforesis en almidón.

En todos los sistemas ensayados (Tabla 3.4) se obtuvo actividad enzimática en las enzimas "con actividad" siendo los sistemas Tris-Citrato-/NaOH-Bórico, (sistema de Poulik) y Citrato-Histidina pH 7.0 donde, en

general, se obtuvo una mayor resolución para todas las enzimas. No se detectó ninguna enzima catódica ni enzimas del grupo "sin actividad" con los diferentes sistemas de tampones empleados. Estos resultados coinciden con los descritos por Cheney y Babbel (1978), en *Eucheuma* y en macroalgas, en general, en las que nunca se han descrito enzimas catódicas. Probablemente, en los valores de pH empleados (entre 8.5 y 9) la mayoría de las proteínas estén cargadas negativamente teniendo puntos isoeléctricos que según Hames y Rickwood (1983), oscilan entre pH 4 a 7 con lo cual migrarán, de manera general, hacia el ánodo.

La resolución de las bandas en cada uno de los sistemas de tampones dependió, al igual que en acrilamida, de la enzima ensayada. En las tres especies, la enzima PGM se obtuvo con buena resolución y actividad y con el mismo número de bandas independientemente del tampón. GDH y fosfatasas de las tres especies y DIA de *Gracilaria ferox* mostraron el mismo número de bandas independientemente del tampón aunque con distinta resolución (Tabla 3.4). Por el contrario, no se observaron las bandas débiles de PGI de las tres especies al ensayar los sistemas TEB 8.6, Tris-Glicina 8.3 y Tris-Citrato 7.2 (Tabla 3.4). Resultados similares se observaron en DIA de las dos especies de *Gelidium* al ensayar la separación de esta enzima en TEB 8.6. MDH se observó con resolución en cualquiera de los sistemas ensayados, aunque mejoraba con los sistemas de Poulik y Citrato-Histidina 7.0, independientemente de la especie analizada (Tabla 3.4). En MDH se obtuvieron el mismo número de bandas independientemente del sistema ensayado. EST también se observó con buena resolución en los mismos sistemas que en MDH, aunque en el sistema Citrato-Histidina se obtuvo una menor resolución de EST de *Gelidium*.

**TABLA 3.4. Resolución obtenida en el grupo "enzimas con actividad" empleando electroforesis en almidón.** 1.- Enzima con muy baja resolución. 2.- Enzima con resolución y actividad. 3.- Enzima con muy buena resolución y actividad. -- No se ensayó.

**a. Gelidium arbuscula.**

Enzimas.	ACP	ALP.	DIA.	EST.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
Tampones.									
Poulik pH 7.8	1	3	3	3	3	3	3	3	2
TEB pH 8.6	--	--	2	--	--	2	2	3	--
Tris-Citrato pH 7.2	--	--	--	--	3	2	--	--	--
Tris-Glicina pH 8.3	--	--	--	--	--	2	2	2	--
Citrato-Histidina pH 7.0	1	1	--	2	3	3	3	3	3

ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. DIA= Diaforasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. MDH= Malato deshidrogenasa. PGI= Fosfoglucoisomerasa. PGM= Fosfoglucomutasa. SOD= Superóxido dismutasa.

**TABLA 3.4. Continuación.**

**b. Gelidium canariensis.**

Enzimas.	ACP	ALP.	DIA.	EST.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
Tampones.									
Poulik pH 7.8	2	3	3	3	2	3	3	3	2
TEB pH 8.6	--	--	2	2	1	2	2	3	--
Tris-Citrato pH 7.2	--	--	--	--	2	2	2	2	--
Tris-Glicina pH 8.3	2	2	--	2	1	--	2	2	--
Citrato-Histidina pH 7.0	2	2	--	2	2	3	3	3	2

ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. DIA= Diaforasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. MDH= Malato deshidrogenasa. PGI= Fosfoglucoisomerasa. PGM= Fosfoglucomutasa. SOD= Superóxido dismutasa.

TABLA 3.4. Continuación.

c. Gracilaria ferox.

Enzimas.	ACP	ALP.	DIA.	EST.	GDH.	MDH.	PGI.	PGM.	SOD.
Tampones.									
Poulik pH 7.8	2	3	3	3	2	3	3	3	3
TEB pH 8.6	--	--	2	--	1	2	2	2	2
Tris-Glicina pH 8.3	2	2	--	2	1	2	--	--	--
Citrato-Histidina pH 7.0	2	2	--	3	2	3	3	3	3

ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. DIA= Diaforasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. MDH= Malato deshidrogenasa. PGI= Fosfoglucoisomerasa. PGM= Fosfoglucomutasa. SOD= Superóxido dismutasa.

Al igual que en acrilamida, los resultados obtenidos en geles de almidón indican que la resolución enzimática de macroalgas marinas depende directamente de su naturaleza y del pH del sistema de tampones, más que de la composición del tampón. Este hecho explica el que se hayan descrito diferentes sistemas de tampones según la naturaleza de la enzima, más que las especies analizadas. Cheney y Babbel (1978) emplearon en 4 especies de *Eucheuma*, dos sistemas de tampones (Tris-glicina, pH 8.3 y Tris-citrato pH 7.6) según la enzima analizada, independientemente de la especie. Soltis *et al.* (1983) realizan una revisión de la metodología electroforética en helechos y describen los sistemas de tampones más adecuados para cada enzima pero no para cada especie. Resultados similares se han descrito en plantas superiores (Kephart, 1990).

Nuestros resultados indican que los sistemas de tampones empleados en otras especies de macroalgas marinas (Tris-EDTA-Borato pH 8.6 y Tris-citrato pH 7.2) (Innes y Yarish, 1984; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990; Malinowsky, 1974; Miura *et al.*, 1978a; 1978b; 1979) no son los adecuados para el estudio isoenzimático de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*.

Si no se retiran del gel los papeles impregnados con la muestra a los 5 a 20 minutos de haber comenzado la electroforesis, se obtiene gran cantidad de rastros en las zonas donde han corrido las proteínas, empeorando la resolución de las bandas. Si se retiran antes de transcurridos 5 minutos, se pierde actividad enzimática.

### **3.6.- Diferencias entre los geles de acrilamida y almidón.**

La resolución comparativa de las bandas entre los geles de acrilamida y almidón variaba en función de la enzima. No se detectaron diferencias en PGM, ALP y DIA en las tres especies. Con geles de acrilamida se obtuvieron mejores resoluciones en EST y biliproteínas, mientras que PGI, MDH y GDH mostraron mejor resolución con almidón en las tres especies.

En macroalgas nunca se han comparado los resultados entre geles de almidón y acrilamida. Thomas y Delcarpio (1971) obtuvieron resultados desiguales al comparar los patrones isoenzimáticos de dos especies de

microalgas en geles de almidón y acrilamida. Por un lado encontraron que la enzima LAP no era visible en geles de acrilamida observándose claramente en los geles de almidón. También observaron que los patrones de MDH eran iguales en ambos geles, mientras que al igual que en este trabajo la resolución de EST en acrilamida era superior al almidón.

### 3.7.- Tinción.

Los resultados obtenidos durante el proceso de tinción variaron según las enzimas y las especies analizadas, influyendo de manera desigual el pH, la concentración del sustrato, la temperatura de incubación y la adición de otros componentes a la solución de tinción.

En todas las enzimas "con actividad" las temperaturas empleadas (37°C y ambiente) no influyeron considerablemente en la actividad enzimática, coincidiendo con los resultados descritos por diversos autores en macroalgas marinas y plantas terrestres (Cheney, 1985; Soltis *et al.* 1983; Vallejos, 1983). Asimismo, tampoco influyó en la detección de enzimas del grupo "sin actividad".

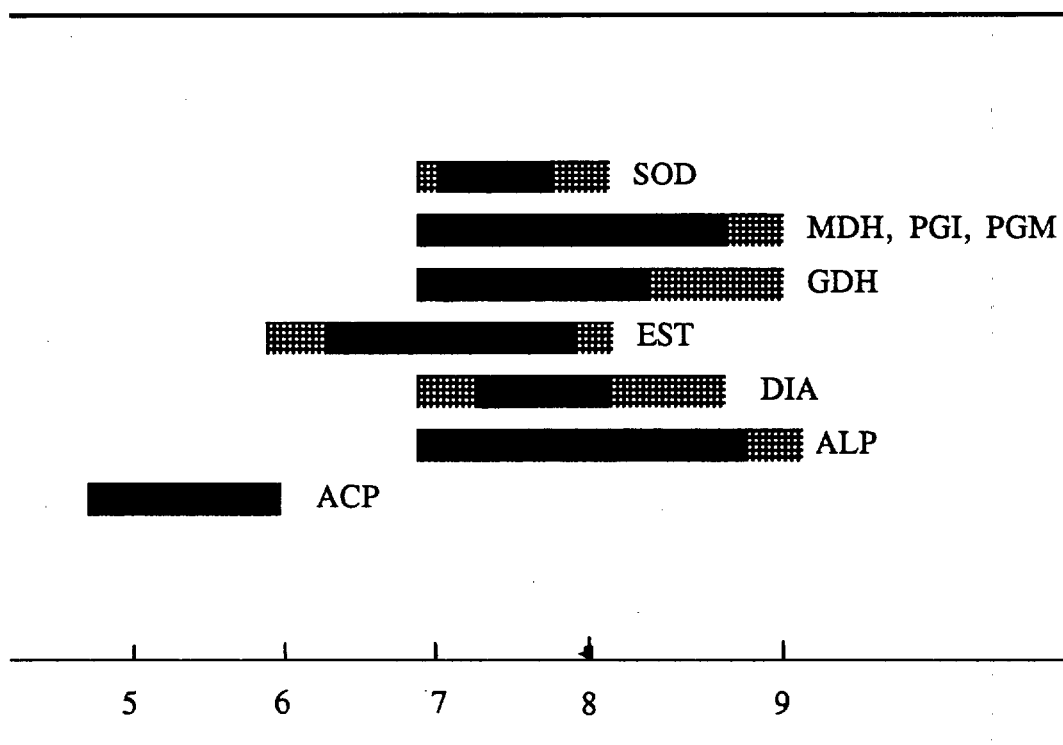
La adición del PMS 1/2 hora ó 1 hora después de la incubación del gel en las soluciones de tinción de PGI, PGM, MDH y GDH ofreció peores resultados que la adición en el mismo momento de la incubación, contrariamente a los resultados descritos por Ayala *et al.* (1972). Las concentraciones más adecuadas de MTT y PMS fueron entre 20 a 30 mg/100 ml de MTT y 3 a 10 mgr/100 ml de PMS. Estos resultados coinciden con los resultados descritos por diversos autores en macroalgas (Lindstrom y South, 1989; Cheney y Babbel, 1978; Cheney, 1985), así como en plantas superiores (Vallejos, 1983; Shaw y Prasad, 1970) y otros organismos (Harris y Hopkinson, 1976).

#### 3.7.1.-ENZIMAS CON ACTIVIDAD.

En la figura 3.1 se muestra el rango de pH empleado en cada una de las enzimas del grupo "enzimas con actividad", indicando aquellos valores con que se obtuvo mayor actividad.



FIGURA 3.1. pH de tinción empleados en las enzimas con actividad. ■ Muy buena actividad. ▨ Baja actividad.



ACP= Fosfatasa ácida. ALP= Fosfatasa alcalina. DIA= Diaforasa. EST= Esterasa. GDH= Glutamato deshidrogenasa. MDH= Malato deshidrogenasa. PGI= Fosfoglucoisomerasa. PGM= Fosfoglucomutasa. SOD= Superóxido dismutasa.

**Fosfatasa.** No se detectó diferencia en el número de bandas y actividad de las fosfatasas de las tres especies, al emplear como sustrato  $\alpha$  ó  $\beta$  naftil fosfato, lo que demuestra la inespecificidad de esta enzima con respecto al sustrato. La adición de 0.1% de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 0.1% de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  a las soluciones de tinción de ambas fosfatasas de las tres especies, aumentaban la intensidad de las mismas, coincidiendo con los resultados descritos por Lindstrom y South (1989) en seis especies de Palmariaceae y por Ayala *et al.* (1972) en *Drosophila*, aunque no coincide con los resultados descritos por Walther y Fries (1976) en varias especies de macroalgas. No obstante se obtuvo

actividad en estas enzimas suprimiendo el  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  del medio de tinción, lo que indica que no son iones imprescindibles para la reacción de estas enzimas.

En *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* no se encontraron diferencias en la intensidad, forma y posición de las bandas de ACP y ALP en un rango de pH entre 4 a 5 para ACP y 7 a 8.8 para ALP (Figura 3.1). En *Gelidium arbuscula* se detectaron diferencias en el número de bandas de estas enzimas, aunque ACP se obtuvo siempre con muy baja actividad, independientemente del pH (entre 4 y 5) y del sustrato empleado ( $\alpha$  ó  $\beta$ ).

Estos resultados indican que ambas fosfatasas (ACP y ALP) de *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* son enzimas diferentes con una misma movilidad electroforética, o que constituyen una sola enzima con actividad en un rango muy amplio de pH (desde 4 a 8.8), (Figura 3.1). Aunque no podemos descartar la primera hipótesis, ya que están clasificadas por la U.I.B. como enzimas diferentes, consideramos que se trata de la misma enzima, debido a la inexistencia de variación en la forma, posición y número de las bandas a cualquier pH. Este amplio rango de pH en el que las fosfatasas muestran actividad, no ha sido descrito en macroalgas. Cheney y Babbel (1978), detectaron en cuatro especies de *Eucheuma* la enzima ACP, pero no pudieron detectar la ALP. Por el contrario, Malinowsky (1974) encontró en *Codium fragile*, un número de bandas diferentes según fuese ACP o ALP la enzima analizada.

**Esterasa.** La tinción de EST mejoraba sensiblemente cuando previamente se incubaba el gel en la solución de tinción sin sustrato, el cual se añadía unos minutos más tarde, coincidiendo con los resultados descritos en varias especies de plantas vasculares por Brewbaker *et al.* (1968).

No se detectaron diferencias en el número de bandas al emplear  $\alpha$  ó  $\beta$  naftil acetato como sustrato, aunque se detectó mayor resolución al emplear  $\beta$ -naftil. Este resultado indica la inespecificidad de las esterases, con respecto al sustrato, lo que coincide con los resultados obtenidos en otras EST de plantas vasculares (Gottlieb, 1981). En macroalgas se han empleado ambos tipos de sustratos ( $\alpha$  y  $\beta$  naftil) en la misma solución de tinción, sin valorarse

las variaciones en los patrones de bandas de EST empleando uno u otro sustrato. Mallery y Richardson (1972) emplearon  $\alpha$ -naftil para teñir EST de 11 especies de macroalgas marinas, mientras que Cheney (1985) en una revisión sobre electroforesis en macroalgas, y Lindstrom y South (1989) en 6 especies de Palmariacea, describen la utilización de  $\alpha$  y  $\beta$  naftil. En plantas vasculares también se han empleado ambos tipos de sustratos en la misma solución de tinción (Vallejos, 1983; Soltis *et al.* 1983).

Se encontró mayor actividad enzimática de EST en *Gracilaria ferox* que en cualquiera de las dos especies de *Gelidium*, cuando se ensayaban en las mismas condiciones de extracción y tinción, aunque en las tres especies se obtuvo mejor resolución a pH 7.1, coincidiendo con la metodología descrita por Shaw y Prasad (1970). Estos resultados corroboran la heterogeneidad de las enzimas según la especie, ya que en otras especies de macroalgas (Lindstrom y South, 1989; Mallery y Richardson, 1972) y en plantas vasculares (Vallejos, 1983; Soltis *et al.* 1983) la enzima EST siempre se ha teñido a pH 6.0 con el que en nuestro caso se obtuvo escasa actividad (Figura 3.1).

**Fosfoglucomutasa. (PGM) y fosfoglucoisomerasa (PGI).** PGM y PGI se teñían muy bien a pH 8.0 en todas las especies, aunque cualquier pH entre 7 y 8.5 dio resultados positivos. Estos resultados coinciden plenamente con los descritos en otras macroalgas marinas. Cheney y Babbel (1978) en cuatro especies de *Eucheuma*, e Innes y Yarish (1984) en *Enteromorpha*, emplearon también pH 8.0 en el revelado de PGM, mientras que Lindstrom y South (1989) emplearon pH 7.5 en la tinción de estas enzimas en seis especies del género Palmariacea. Soltis *et al.* (1983) describieron una mayor resolución en estas enzimas empleando pH 8.0, disminuyendo considerablemente la actividad si se empleaba pH 7.5. Estos resultados sugieren que el rango óptimo de pH de PGM y PGI en *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* es mayor que el detectado en helechos.

La adición de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  no era imprescindible para la actuación de estas enzimas, aunque aumentaban su actividad al igual que en helechos (Soltis *et al.*, 1983). Asimismo, ambas enzimas podían reaccionar con NAD o NADP aunque la actividad enzimática disminuía empleando NAD como cofactor,

coincidiendo igualmente con los resultados descritos por Soltis *et al.* (1983) en helechos. La adición de NADP y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  se ha empleado en la tinción de PGM y PGI de macroalgas marinas (Cheney y Babbel, 1978; Innes y Yarish, 1984; Cheney, 1985, Lindstrom y South, 1989) aunque hasta el momento no se había estudiado su efecto específico.

En las tres especies analizadas se detectó una sola banda de PGM con una gran actividad enzimática. De la enzima PGI se detectaron varias bandas (Figura 3.1), siendo la de mayor actividad la que mostraba mayor movilidad electroforética.

Ambas enzimas ocupaban posiciones muy separadas en el gel, mostrando PGM una movilidad electroforética superior a cualquier banda de PGI. La tinción conjunta de ambas enzimas no alteró su actividad y resolución.

**Glutamato deshidrogenasa (GDH).** En *Gracilaria ferox* no se detectó GDH a pesar de las diferentes temperaturas, ( $37^\circ\text{C}$  y temperatura ambiente) pH (entre 7 y 8), concentraciones de NAD y NADP (entre 0.10 a 0.60 mg/ml) y concentraciones de sustrato (hasta 0.40 M) ensayadas. En *Gelidium canariensis* la actividad GDH fue muy baja en todas las variantes metodológicas descritas para *Gracilaria ferox*. Sólo se detectó actividad enzimática a pH entre 7.4 y 8.0 y con una concentración de sustrato superior a 0.025 M. Por el contrario, en *Gelidium arbuscula* la intensidad de las bandas era muy elevada, incluso con una concentración de sustrato muy inferior a la requerida por *Gelidium canariensis*. Los patrones de GDH en *Gelidium arbuscula* no variaron empleando NAD o NADP como cofactores, obteniéndose una mayor actividad con un rango de pH de 7.5 a 8.0.

Estos resultados coinciden con los descritos en otras especies de macroalgas. La actividad GDH se ha puesto de manifiesto a pH 7.5 en 6 especies de Palmariacea (Lindstrom y South, 1989), mientras que Cheney (1985) describe el pH 8.0 como el más adecuado para teñir esta enzima. Por el contrario, Sato *et al.* (1984) en *Porphyra yezoensis* y Gayler y Morgan (1976) en *Caulerpa simpliciuscula* emplearon pH 8.3. En plantas vasculares se han empleados pHs entre 7.5 y 8.0 (Vallejos, 1983; Shaw y Prasad, 1970; Soltis *et*

al., 1983).

La inespecificidad de la GDH respecto a NAD(P) ha sido descrita en *Porphyra yezoensis*, (Sato *et al.*, 1984) y en *Caulerpa simpliciuscula* (Gayler y Morgan, 1976), aunque en ambos casos la enzima tenía mayor actividad (hasta 75 veces más) empleando NADP. Estos resultados difieren con los obtenidos en ambas especies de *Gelidium*, donde no se detectó variación en la actividad de GDH al emplear NAD o NADP. En Feofitas (Rice y Crowden, 1987) se ha empleado NAD para poner de manifiesto la enzima, mientras que en Rodofitas se ha empleado el NADP como cofactor (Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990). En plantas superiores se ha empleado mayoritariamente el NAD en la reacción de tinción (Shaw y Prasad, 1970; Vallejos, 1983; Soltis *et al.*, 1983).

**Malato deshidrogenasa. (MDH).** Los mejores resultados se obtuvieron en un rango de pH de 7.0 a 8.0, en consonancia con los datos de Malinowsky (1974) en *Codium fragile*, Cheney y Babbel, (1978) en cuatro especies de *Eucheuma*, y Lindstrom y South (1989) en seis especies de Palmariaceae.

La adición a la solución de tinción de otros componentes como EDTA o  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  no produjeron cambios en la resolución de esta enzima, contrariamente a lo descrito por otros autores (Soltis *et al.*, 1983; Brewbaker *et al.*, 1968).

Es de destacar la necesidad de emplear una concentración relativamente elevada de sustrato (entre 0.25 y 0.35 M) en comparación con las concentraciones descritas por otros autores en macroalgas. Cheney y Babbel (1978) emplearon una concentración de 0.22 M, mientras que Malinowsky (1974) en *Codium fragile* empleó una concentración final de 0.01 M. Lindstrom y South (1990) en seis especies de Palmariaceae y Lindstrom y Cole (1990) en cinco especies de *Porphyra*, emplearon 0.1 M de sustrato.

Estos resultados sugieren que MDH de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* tienen unas actividades específicas inferiores a otras macroalgas marinas.

**Diaforasa. (DIA).** El pH óptimo para esta enzima en las tres especies estudiadas osciló entre 7.5 y 8.0. Las tres especies mostraron actividades similares y una gran actividad en la banda con mayor movilidad electroforética.

Esta enzima se ha descrito solamente en *Porphyra yezoensis* (Fujio *et al.*, 1985; 1987). En plantas superiores, y coincidiendo con nuestros resultados, se ha detectado actividad a pH 8.0 (Vallejos, 1983), aunque contrariamente a lo descrito por este autor, no se detectó pérdida progresiva de las bandas en el gel al aumentar el tiempo de tinción.

**Superóxido dismutasa. (SOD).** Las mejores condiciones de tinción de SOD se obtuvieron a pH 7.4, después de incubar el gel a 37°C durante 20 minutos en oscuridad y exponiéndolo posteriormente a temperatura ambiente, que constituye una modificación de las condiciones descritas por Vallejos (1983) y Moore y Collins (1982). El tiempo de aparición de las bandas osciló entre 1 a 2 horas, sobretiéndose al aumentar el tiempo. La adición de TEMED redujo la resolución de las bandas contrariamente al método descrito por Vallejos (1983). También se obtuvo una menor intensidad empleando NBT en vez de MTT, lo cual coincide con la mayor especificidad de este colorante descrita por Vallejos (1983).

También se detectó actividad SOD al emplear MTT en la tinción de otras enzimas (MDH, PGI, PGM y GDH), aunque las intensidades eran considerablemente menores, contrariamente a los resultados obtenidos en otras macroalgas (Cheney y Babbel, 1978; Innes y Yarish, 1984; Lindstrom y South, 1989; Lindstrom y Cole, 1990).

El pH óptimo en SOD en las tres especies estudiadas es ligeramente más bajo que los pH empleados en otras macroalgas. Lindstrom y South (1989) detectaron actividad SOD a pH 7.5 u 8, mientras que Innes y Yarish (1984) en *Enteromorpha linza*, Cheney y Babbel (1978) en *Eucheuma*, y Malinowsky (1974) en *Codium fragile*, emplearon pH 8.0. Valores similares se han descrito en plantas vasculares (Vallejos, 1983; Soltis *et al.*, 1983).

### 3.7.2.- ENZIMAS SIN ACTIVIDAD.

En las enzimas del grupo "sin actividad" no se obtuvieron resultados positivos frente a las variaciones de pH, concentración y composición de los sustratos y temperaturas de tinción.

La imposibilidad de detectar enzimas del grupo "sin actividad" en las especies estudiadas contrasta con su detección en otras especies de macroalgas marinas. La enzima ALD ha sido descrita en 6 especies de Palmariaceae (Lindstrom y South, 1989) y varias especies de Feofitas (Rice y Crowden, 1987). AMY ha sido descrita en *Enteromorpha linza* (Innes y Yarish, 1984). AO ha sido descrita en Feofitas (Rice y Crowden, 1987) y en la Familia Palmariaceae (Lindstrom y South, 1989). GOT ha sido descrita en *Enteromorpha linza* (Innes y Yarish, 1984), en *Porphyra* (Lindstrom y Cole, 1990; Fujio *et al.*, 1985; 1987) y en *Codium fragile* (Malinowsky, 1974). G6PDH ha sido descrita en *Porphyra* (Fujio *et al.*, 1985; 1987), en *Chaetomorpha* (Blair *et al.*, 1982), en la Familia Palmariaceae (Lindstrom y South, 1989) y en *Codium fragile* (Malinowsky, 1974). LAP ha sido descrita en 11 especies de macroalgas marinas de las tres Divisiones biológicas (Mallery y Richardson, 1972), en varias Fucales (Marsden *et al.*, 1984a) y en *Porphyra* (Fujio *et al.*, 1985; 1987). PX ha sido descrita en *Porphyra* (Fujio *et al.*, 1985; 1987; Lindstrom y Cole, 1990), en varias Feofitas (Marsden *et al.*, 1984a; 1984b; Vilter y Glombitza, 1983; Rice y Crowden, 1987).

En la Tabla 3.5 se describen los componentes añadidos a la solución de tinción de varias enzimas "sin actividad". En todos los casos se obtuvieron resultados negativos, contrariamente a los resultados descritos por varios autores en diferentes especies. Miura *et al.* (1978a; 1978b) y Soltis *et al.* (1983), emplearon  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  en la tinción de CAT de *Porphyra yezoensis* y varias especies de helechos respectivamente con resultados positivos. Vallejos (1983) describe la activación con  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  de las enzimas NADP-dependientes (G6PDH, IDH, SkDH). Mientras que Cheney (1985) describe la activación de la enzima LAP al añadir estos iones a la solución de tinción.

La imposibilidad de detectar las enzimas "sin actividad" corrobora la hipótesis de la baja actividad *per se* de estas enzimas en las tres especies estudiadas.

**TABLA 3.5. Compuestos añadidos a las soluciones de tinción del grupo "enzimas sin actividad". El asterisco (\*) indica que se ensayó el compuesto en la solución de tinción en la enzima dada.**

Enzima.	ADH	AMY	CAT	G6P	GOT	IDH	LAP	PX	Me
Compuesto.									
Cl <sub>2</sub> Mg 0.1-1%	*			*		*	*		*
Cl <sub>2</sub> Mn 0.1-1%				*		*	*		
PVP 1-5%					*				
BSA 0.5%					*		*		
ClNa 1-3%		*					*		
Cl <sub>2</sub> Ca 0.02 M		*						*	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.02 M			*					*	

ADH= Alcohol deshidrogenasa. AMY= Amilasa. CAT= Catalasa. GOT= Aspartato aminotransferasa. G6P= Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. IDH= Isocitrato deshidrogenasa. LAP= Leucin aminopeptidasa. PX= Peroxidasa. Me= Máfico enzima.

### 3.7.3.- El efecto "sin deshidrogenasa".

El efecto "sin deshidrogenasa" no se observó en *Gracilaria ferox* pero aparecía en ambas especies de *Gelidium*, con cualquier tampón de extracción, condiciones de congelación y tinción, apareciendo siempre con una alta movilidad electroforética.

Este fenómeno era más acusado al aumentar el tiempo de almacenamiento en cultivo y al teñir para MDH. Por el contrario disminuía al teñir para SkDH, GALDH, ADH y LDH.



Aunque Cheney (1985) describe la existencia del fenómeno "sin deshidrogenasa" en su revisión de las técnicas de electroforesis isoenzimática en macroalgas, ningún autor ha descrito experimentalmente hasta el momento la existencia del mismo en macroalgas. Los únicos autores que han realizado tinciones control de este fenómeno en macroalgas marinas, no han detectado la existencia del mismo (Cheney y Babbel, 1978; Lindstrom y South, 1989).

La observación del efecto "sin deshidrogenasa" con tampones de extracción sin compuestos tiólicos (2-Me) indican que estos agentes no son los causantes del fenómeno como habían sugerido Harris y Hopkinson (1976). Asimismo, el aumento en la concentración de PMS en la solución de tinción no conducía a un aumento en el fenómeno, lo cual indica que este producto no es el causante del efecto, tal y como habían descrito Hashimoto *et al.* (1964).

El fenómeno "sin deshidrogenasa" fue más intenso al teñir para MDH, indicando que los productos de degradación de esta enzima pueden ser los causantes de este efecto. Por el contrario el efecto "sin deshidrogenasa" fue menor al teñir para PGM, PGI, SkDH, GALDH, indicando que estas enzimas (o los productos de su degradación) no originan este fenómeno, hipótesis contraria a las sostenidas por otros autores (Harris y Hopkinson, 1976; Wilkinson, 1970; Whitten y Hayhome, 1986; Shaw y Koehn, 1965; Cuatrecasas y Segal, 1967; Kephart, 1990). Por otro lado la observación de un incremento del fenómeno a medida que aumentaba el deterioro de los individuos en cultivo confirman que el estado fisiológico del tejido es también una de las consecuencias del efecto "sin deshidrogenasa", asociado probablemente al aumento de los productos de la degradación celular.

Es difícil explicar porqué el fenómeno no ocurre en *Gracilaria ferox*, quizás en esta especie se produzcan menos productos utilizables por la MDH y por ello no se aprecia. Asimismo, el grado de degradación de esta especie en cultivo es muy bajo, lo cual también podría explicar la inexistencia del fenómeno en esta especie.

**IV. GENETICA.  
INTRODUCCION.**

#### 4.1.- Aplicación de las técnicas electroforéticas en la genética de poblaciones.

El descubrimiento de las isoenzimas como una consecuencia directa de los genes en los organismos, hizo considerar la técnica de electroforesis isoenzimática como una metodología muy eficaz en la detección de mutaciones. Esta aplicación dio una nueva dimensión al estudio de la acción de los genes que anteriormente se basaba en alteraciones de los caracteres morfológicos, muchas veces difíciles de interpretar o realizar.

La aplicación genética se basa en la colinearidad "un gen - una proteína", considerando que las isoenzimas son las consecuencias bioquímicas de la sustitución, delección o adición de aminoácidos que afectan la migración electroforética de la enzima. Así, el análisis de las estructuras proteicas mediante electroforesis es, indirectamente, el análisis de un gen (Gottlieb 1977a). Es precisamente esta simple relación entre las bandas detectadas en un gel y la secuencia nucleotídica de los genes la que hace a la electroforesis isoenzimática una potente herramienta analítica en genética.

El desarrollo de la técnica en el análisis genético llevó a algunos autores (Harris y Hopkinson, 1976; Gottlieb 1977a), a clasificar las isoenzimas no secundarias (isoenzimas secundarias son aquellas bandas isoenzimáticas sin una naturaleza genética demostrada), en dos grupos, denominando *aloenzimas* aquellas formas diferentes de una enzima que estuviesen especificadas por diferentes alelos de un único gen, manteniendo el término de *isoenzima* si sus polipéptidos están codificados por más de un locus génico.

King y Ohta (1975), propusieron el término de *electromorfo* para designar las diferentes bandas, de procedencia genética, que aparecían en la electroforesis, considerando que un electromorfo puede ser, en realidad, un grupo de isoalelos.

Posteriormente el término isoenzima ha sido modificado por la Unión Internacional de Nomenclatura Bioquímica (1984), y las isoenzimas secundarias no son consideradas como isoenzimas, ya que en parte pueden aparecer debido exclusivamente a la técnica. Por otro lado, el término "aloenzima" sólo se aplica cuando las bandas tienen una naturaleza genética demostrada (Kephart, 1990). Otros autores (Weeden y Wendel, 1989; Werth,

---

1989) diferencian el locus y el producto isoenzimático aplicando el término "loci isoenzimático" en vez de "isoenzima".

Las aplicaciones y ventajas de la técnica, así como las limitaciones y sus bases han sido ampliamente descritas por varios autores (Lewontin, 1979; Selander, 1980; Gottlieb, 1981), destacando las siguientes:

#### **VENTAJAS.-**

- 1) La variación en los patrones de bandas es la consecuencia directa de la variación en los genes, por lo tanto se pueden identificar variantes en genes individuales. Las estimas de la variabilidad genética obtenidas a partir del estudio de unos pocos loci puede extrapolarse a todo el genoma (Dobzhansky *et al.*, 1983).
- 2) Los genes que codifican las isoenzimas son codominantes lo que hace que no existan enmascaramientos de genes debido a dominancia o recesividad.
- 3) El análisis genético se efectúa en el mismo momento en que se realiza la electroforesis, sin necesidad de esperar la aparición de descendencias.
- 4) Las enzimas que se estudian no están influenciadas por el ambiente externo, pudiéndose en muchos casos, compararse enzimas, y por tanto genes, de organismos completamente diferentes, lo cual hace de la técnica una herramienta muy útil en el estudio de relaciones evolutivas entre especies.
- 5) Se requiere sólo una pequeña muestra de material biológico para realizar el estudio, pudiéndose comparar una gran cantidad de individuos en un sólo análisis.

#### **DESVENTAJAS.-**

- 1) Debido a la redundancia en el código genético, muchos cambios nucleotídicos no hacen variar la secuencia de aminoácidos en las proteínas por lo que puede existir cambio nucleotídico sin alteración aminoácida en las proteínas.

- 2) Sólo se pueden detectar aquellas sustituciones de aminoácidos que hagan variar la carga neta de las proteínas. Esto quiere decir que muchas de las bandas con igual movilidad en el gel no necesariamente indican una secuencia de aminoácidos idéntica. 16 de los 20 aminoácidos comunes son electroforéticamente neutrales en el rango de pH empleados en los tampones de los geles. Se ha estimado (King y Wilson, 1975) que la proporción de mutaciones puntuales detectadas por electroforesis es aproximadamente de 0.27. Por tanto, la variabilidad genética detectada por las técnicas electroforéticas convencionales constituye una estima por defecto (Bernstein *et al.*, 1973; Ayala 1982).
- 3) Muchas veces la interpretación genética de las bandas es complicada si el número de genes que están actuando es elevado, siendo imprescindible la realización de cruces y análisis de la descendencia para poder entender bien la estructura genética del organismo. En ocasiones, la aparición de isoenzimas secundarias hace que el zimograma sea muy complejo obligando a realizar gran cantidad de controles para distinguir las bandas de origen genético de aquellas que no lo son.
- 4) Los datos electroforéticos no nos indican el número de sustituciones nucleotídicas que existen entre dos alelos o genes.
- 5) Sólo se pueden detectar genes estructurales que codifican para enzimas solubles.

A pesar de estas desventajas, la electroforesis isoenzimática ha sido la técnica más empleada en el estudio genético de las poblaciones, llegándose a definir como "el método más adecuado para medir las variaciones genéticas cerca del nivel de ADN, libre de efectos ambientales" (Ayala, 1982).

Lewontin (1972) y Brown (1978) consideran que para poder obtener una estima razonable de la variabilidad genética en poblaciones naturales por electroforesis isoenzimática, es necesario tener en cuenta las siguientes condiciones:

1) Estrategia de muestreo. Es necesario, tanto un adecuado tamaño de muestra, (entre 50 y 100 individuos por lugar de recogida) como la aleatoriedad del muestreo, eligiendo el mayor número de localidades posibles, con una amplia variedad de ambientes.

2) Debe analizarse un gran número de loci. Este aspecto es incluso más importante que el análisis de un gran número de individuos. Cheney (1985) estima que se han de analizar un mínimo de 15 a 20 loci. El conjunto de loci analizados ha de ser diverso, y no debe elegirse condicionado por variabilidades ya conocidas, es decir, los loci estudiados deben elegirse totalmente al azar.

Aunque estas son las condiciones ideales para abordar un estudio de genética de poblaciones, el incumplimiento de alguna de ellas no invalida el estudio realizado ya que va a depender de la naturaleza del organismo estudiado y del objetivo propuesto.

#### **4.2.- Aplicación de las técnicas electroforéticas en macroalgas marinas.**

Desde las primeras referencias de la utilización de la electroforesis en el estudio de la variabilidad genética (Harris, 1966; Johnson *et al.*, 1966; Lewontin y Hubby, 1966) esta técnica se ha utilizado ampliamente en el análisis genético de cientos de organismos del Reino animal (Selander, 1980; Avise, 1975) y vegetal (Gottlieb, 1981; Hamrick *et al.*, 1979; Simpson y Withers, 1986) aunque su utilización en el estudio de algas es reciente y muy escaso (Cheney, 1985).

En microalgas, los primeros trabajos de aplicación de las técnicas electroforéticas datan de 1961 con los trabajos desarrollados por Keck (1961) en *Acetabularia*. Aunque posteriormente se han aplicado al estudio de un relativamente elevado número de especies, los objetivos han sido fundamentalmente taxonómicos (Thomas y Delcarpio, 1971; Holton, 1973; Derbyshire y Whitton, 1968; Whitten y Hayhome, 1986; Hayhome y Pfiester, 1983; Hayhome *et al.*, 1987; 1989) y algunos específicos sobre aspectos genéticos (Gallagher, 1980; 1982; 1986; Brand 1981; 1982), siendo el número de

artículos referentes a la aplicación de las técnicas isoenzimáticas en microalgas muy superior a macroalgas (ver Gallagher, 1986).

La primera referencia de la aplicación de las técnicas electroforéticas a macroalgas marinas data de 1970 (Young, 1970). Hasta el presente sólo hemos podido localizar una veintena de artículos científicos que hayan utilizado estas técnicas en macroalgas marinas, de los cuales uno (Cheney, 1985) constituye un artículo de revisión en el que también se incluyen las microalgas.

Los trabajos desarrollados en macroalgas marinas empleando la técnica electroforética se puede dividir en dos grupos: Con fines taxonómicos (sin identificación de loci isoenzimáticos) y con fines genéticos (identificando la naturaleza genética de las bandas).

#### 4.2.1.- APLICACION CON FINES TAXONOMICOS.

Tres de los artículos publicados que aplican la técnica con fines taxonómicos, analizan exclusivamente los patrones electroforéticos de proteínas totales o biliproteínas (Young, 1970; Mallery y Richardson, 1971; Price *et al.*, 1987); el resto (Blair *et al.*, 1982; Mallery y Richardson, 1972; Richardson y Mallery, 1973; Marsden *et al.*, 1981; 1984a; 1984b; Rice y Crowden, 1987; Vilter y Glombitza, 1983) emplearon los patrones isoenzimáticos para comparar diferentes especies, empleando la electroforesis como técnica complementaria.

Young (1970) comparó los patrones de proteínas totales en 12 especies de macroalgas, observando que el número de bandas totales disminuía desde las Clorofitas (con patrones proteicos más complejos) a las Feofitas (con un menor número de bandas), presentando las Rodofitas un número de bandas intermedio.

Mallery y Richardson (1971), compararon 11 géneros de algas rojas empleando inicialmente patrones de proteínas totales y biliproteínas, que posteriormente (Mallery y Richardson, 1972; Richardson y Mallery, 1973) completaron con tres sistemas enzimáticos (EST, ACP y LAP). Sus datos sólo incluyen las movilidades relativas de las bandas isoenzimáticas detectadas, así como el número de ellas en cada especie, omitiendo el análisis de la

---

esterasa y fosfatasa de las posibles relaciones entre cada especie debido a la complejidad de sus patrones.

Hoxmark (1975) empleó la electroforesis para comparar las diferentes fases reproductoras de *Ulva mutabilis*, encontrando diferencias en el número de bandas de proteínas totales entre los individuos gametofitos y los esporofitos. Los gametofitos presentaban una banda, de baja movilidad, que no aparecía en los esporofitos, lo que permitió especular sobre la posible existencia de un factor citoplasmático que controle el ciclo de vida de esta especie. Posteriormente, Hushovd *et al.* (1982) reexaminaron ambas fases mediante electroforesis e isoelectroenfoque, llegando a la conclusión que cuando las condiciones experimentales y del organismo son controladas estrictamente, las diferencias entre los gametofitos y esporofitos desaparecían.

Recientemente, Price *et al.* (1987) emplearon patrones electroforéticos en dodecil sulfato sódico (SDS) e isoelectroenfoque (IEF) para comparar cuatro especies de *Callithamnion* (Rodofita) observando un alto grado de concordancia entre los datos electroforéticos (en cualquiera de su forma, SDS o IEF) con los datos morfológicos. No emplearon ni patrones isoenzimáticos, ni ningún índice estadístico para confirmar este hecho.

En Feofitas también se ha aplicado la electroforesis isoenzimática con fines taxonómicos. Marsden *et al.* (1984a; 1984b) compararon 6 sistemas enzimáticos entre cinco especies del Orden Fucales y cuatro del Orden Laminariales. Sólo compararon uno o dos individuos de cada especie debido a la complejidad de los procedimientos de extracción proteicos, (incluyendo precipitación de las proteínas con sulfato amonio y elución en columnas cromatográficas). La gran cantidad de polifenoles, mucílagos y taninos e inhibidores enzimáticos que contienen las Feofitas, hacen de éstas uno de los organismos más complejos de estudiar isoenzimáticamente (Marsden *et al.*, 1981). Vilter y Glombitza (1983) analizaron los patrones de peroxidasas de 6 Fucales y 5 Laminariales encontrando grandes diferencias entre las especies de ambos órdenes. Rice y Crowden (1987) también compararon seis especies de Fucales, empleando la misma metodología que Marsden *et al.* (1981), pero pudieron comparar 21 sistemas enzimáticos en la mayoría de las especies. La



baja movilidad electroforética encontrada imposibilitó obtener conclusiones precisas.

En Clorofitas, Blair *et al.* (1982) aplicaron el índice de identidad de Hedrick para comparar cuatro especies de *Chaetomorpha* sin poder interpretar las bandas genéticamente debido al desconocimiento de la ploidía de los individuos analizados. (Ver apartado 4.6).

#### 4.2.2.- APLICACION CON FINES GENETICOS.

Dentro de esta clasificación cabe a su vez, distinguir entre los artículos que han estudiado propiamente aspectos de la genética de poblaciones, de aquellos que se han centrado en la correlación entre aspectos ecofisiológicos con la distribución de patrones isoenzimáticos.

Del escaso número de artículos experimentales en los que se han empleado técnicas electroforéticas en macroalgas marinas, únicamente en 11 artículos han analizados aspectos relacionados con la genética de las macroalgas. En la Tabla 4.1 se resumen estos artículos, detallando el número de poblaciones, el número de loci y los parámetros estadísticos estudiados. Algunos autores (Miura *et al.*, 1978a; Lindstrom y South, 1989) aunque identifican loci isoenzimáticos, no calculan los parámetros propios para examinar genéticamente las especies o poblaciones analizadas, por lo que constituyen realmente estudios taxonómicos con genes isoenzimáticos.

Okumura y Fujino (1986) detectaron variantes isoenzimáticas termosensibles asociados a la temperatura del hábitat. Los alelos termorresistentes detectados en las tres enzimas analizadas, PGI, PGM y GDH, se encontraban con mayor frecuencia en los hábitats más cálidos. Recientemente Innes (1987), analizando cinco loci polimórficos, encontró en 16 localidades de *Enteromorpha linza* que los fenotipos enzimáticos encontrados se agrupaban en tan sólo 13 fenotipos multiloci (de los 5400 teóricamente posibles). Las frecuencias relativas de estos 13 clones fenotípicos en las poblaciones localizadas en áreas de baja salinidad eran muy similares entre sí, y diferían genéticamente respecto a otras poblaciones adyacentes con salinidades superiores. Asimismo encontró una diferenciación muy clara en las frecuencias relativas de los clones entre las zonas intermareal alta y baja

**TABLA 4.1. Especies y parámetros empleados en el análisis de la variabilidad incluyen aquellos trabajos donde se hace una identificación genética de las bandas**

Especies.	Nº Poblaciones.	Nº Loci totales.	*Nº Loci <sup>1</sup> polimórficos.	*Proporción loci polimórficos.	
				99%	95%
<i>Codium fragile.</i>	14	14	4	0.310	0.346
<i>Eucheuma nudum.</i>	3	11-12	3-4	0.313	-----
<i>E. isiforme.</i>	3	11	4	0.364	-----
<i>E. gelidium.</i>	1	7	2	0.286	-----
<i>E. acanthocladum.</i>	1	8	2	0.250	-----
<i>Porphyra yesoensis.</i>	17	7	1	-----	-----
<i>P. tenera.</i>	8	7	1	-----	-----
<i>P. kuniedai.</i>	1	7	0	-----	-----
<i>P. pseudolinearis.</i>	2	7	1	-----	-----
<i>P. yesoensis.</i>					
Pob. salvajes.	11	8	6	0.398	-----
Pob. cultivadas.	9	8	0	0.000	-----
<i>P. yesoensis.</i>	3	12	6	0.333	-----
<i>P. yesoensis.</i>	11	12	12	0.583	-----
<i>Enteromorpha linza.</i>	6	5	5	-----	-----
<i>E. linza.</i>	6	5	5	-----	-----
<i>Palmaria palmata.</i>	2	10	1	-----	-----
<i>P. hecatensis.</i>	1	12	1	-----	-----
<i>P. mollis.</i>	1	10	1	-----	-----
<i>P. callophyloides.</i>	1	11	0	-----	-----
<i>Devaleraea ramentacea.</i>	1	11	1	-----	-----
<i>Halosacion glandiforme.</i>	1	12	0	-----	-----

\*. Valores medios entre todas las poblaciones analizadas.

1. Número de loci polimórficos analizados en alguna de las poblaciones.

2. Criterio 99% y 95%. La frecuencia del alelo más común es mayor a 0.99 ó 0.95.

3. Heterocigosidad esperada.

4. Heterocigosidad observada.

5. Realización o no del test de equilibrio de Hardy-Weinberg.

6. Estadístico empleado en el análisis de divergencia genética.

genética mediante electroforesis isoenzimática en macroalgas marinas. Sólo se electroforéticas obtenidas. El guión (----) indica que no se realizó el cálculo.

*He <sup>3</sup>	*Ho <sup>4</sup>	*Nº medio alelos.	Test <sup>5</sup> H.W.	*Identidad genética. <sup>6</sup>	Método filogenia.	Referencia.
0.271	0.150	----	--	(I)	UPGMA	Malinowsky, 1974
----	----	1.31	Si	(I, I <sub>H</sub> )	----	Cheney y Babbel, 1978.
----	----	1.36	Si	(I, I <sub>H</sub> )	----	
----	----	1.29	--	(I, I <sub>H</sub> )	----	
----	----	1.25	--	(I, I <sub>H</sub> )	----	
----	----	----	--	----	----	Miura et al., 1978a
----	----	----	--	----	----	
----	----	----	--	----	----	
----	----	1.50	--	(D <sub>R</sub> )	UPGMA	Miura et al. 1979
----	----	1.00	--	(D <sub>R</sub> )	UPGMA	
----	0.127	1.64	--	----	----	Fujio et al., 1985
----	0.197	----	--	----	----	Fujio et al., 1987
----	----	----	Si	----	----	Innes y Yarish, 1984
----	----	----	--	(I <sub>H</sub> )	----	Innes, 1987; 1988
----	----	----	--	(I)	----	Lindstrom y South, 1989.
----	----	----	--	(I)	----	
----	----	----	--	(I)	----	
----	----	----	--	(I)	----	
----	----	----	--	(I)	----	
----	----	----	--	(I)	----	

$I$  = Identidad de Nei (1972).  $I_H$  = Identidad de Hedrick (1971).  $D_R$  = Distancia de Rogers (1972).

las cuales tenían a su vez diferentes respuestas de crecimiento en función de la temperatura (los clones de las zonas altas tenían mayor crecimiento a 24°C que los clones recogidos de las zonas bajas). Los resultados indicaron la existencia de una relación directa entre genotipos detectados por electroforesis y aspectos eco-fisiológicos en esta especie. También encontró que individuos separados distancias muy cortas tenían una diferenciación mayor que otros individuos separados varios kilómetros, sugiriendo que existía una microdiferenciación en las poblaciones debido, en parte, a la adaptación diferencial de los clones a los diversos ambientes intermareales (Innes, 1988).

Miura *et al.*, (1978b) también encontraron en *Porphyra yezoensis* una relación entre el genotipo de la catalasa y la morfología de los talos, de tal manera que los talos que contenían el alelo CAT-a eran más amplios en longitud y más lisos en textura que aquellos que poseían el alelo CAT-b.

Las comunicaciones sobre resultados preliminares de la aplicación de la electroforesis isoenzimática en otras especies de macroalgas: *Macrocystis integrifolia* (Kemp *et al.*, 1980), *Gracilaria tikvahiae* y *Bryopsis plumosa* (Penniman, 1987) y *Porphyra columbina* (Candia *et al.*, 1984), son insuficientes para entrar en detalle en su discusión.

### **4.3.- Medidas de la variabilidad genética.**

Se han propuesto diversos estadísticos para cuantificar la variabilidad genética de un organismo o población y resumir la información a términos más manejables. Cada estadístico aprecia diferentes aspectos de la variabilidad genética siendo los más empleados los siguientes:

#### **4.3.1.- PROPORCIÓN DE LOCI POLIMÓRFICOS.**

La *proporción de loci polimórficos (P)* constituye una de las formas más simples de cuantificar la variabilidad genética. Se calcula dividiendo el número de loci polimórficos entre el número de loci totales.

Para evitar el error de muestreo es necesario adoptar un *criterio de polimorfismo* (Ayala, 1982). Los criterios más usados son dos: Cuando la frecuencia del alelo más común es igual o menor que 0.95 (criterio del 95%)

---

o cuando es igual o menor que 0.99 (criterio del 99%), siendo el criterio arbitrario.

La proporción de loci polimórficos tiene varios inconvenientes:

- La utilización de cualquiera de los criterios es meramente subjetiva y ello repercutirá en la medida.

- No tiene en cuenta las frecuencias alélicas, de tal forma que un locus ligeramente polimórfico cuenta tanto como otro locus muy polimórfico.

A pesar de estos inconvenientes, esta medida nos da un importante aspecto de la variación génica dentro de las poblaciones (Nei, 1987).

En macroalgas marinas la proporción de loci polimórficos ha sido calculado en dos géneros de Rodofitas, *Porphyra* (Miura *et al.*, 1979; Fujio *et al.*, 1985; Fujio *et al.*, 1987) y *Eucheuma* (Cheney y Babbel, 1978) y en una especie de Clorofita, *Codium fragile* (Malinowsky, 1974) (Tabla 4.1). En *Porphyra*, analizando entre 8 y 12 loci, se obtuvo una proporción de loci polimórficos que varió entre 0.33 a 0.917 según la población, mientras que en *Eucheuma*, se analizaron entre 7 y 11 loci, y la proporción de loci polimórficos fue mucho más baja, entre 0.25 para *E. acanthocladum* y 0.364 para *E. isiforme*. En todos los casos se siguió el criterio de polimorfismo del 99%. En *Codium fragile*, se siguieron ambos criterios, (95 y 99%) en 14 loci analizados (Tabla 4.1). Los resultados empleando ambos criterios sólo diferían en 4 de las 14 poblaciones analizadas, variando la proporción de loci polimórficos entre 0.143 y 0.500, con el criterio del 95% y 0.275 a 0.714 con el criterio del 99% con unos valores medios de 0.31 y 0.346 respectivamente.

No se ha calculado este índice en ninguna otra especie de macroalgas marinas.

#### 4.3.2.- HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA.

La comparación entre la heterocigosis observada y la heterocigosis esperada permite evaluar la estructura genética de las poblaciones (Nei, 1987).

La heterocigosis observada es la frecuencia media de individuos heterocigóticos por locus. Se obtiene dividiendo el número de individuos heterocigóticos para cada locus por el número de individuos totales analizados y calculando posteriormente las frecuencias para todos los loci.

---

La heterocigosidad observada es una buena medida del grado de variación genética porque estima la probabilidad, en organismos con cruzamiento al azar, que dos alelos escogidos en una población sean diferentes. Sin embargo no refleja bien la cantidad de variación genética en las poblaciones de organismos que se reproducen asexualmente o por autofecundación (Ayala, 1982).

Esta dificultad se puede evitar calculando la heterocigosis esperada, a partir de las frecuencias alélicas, como si los individuos en la población se cruzaran unos con otros al azar.

Evidentemente, la heterocigosidad observada no es aplicable a los individuos haploides, con lo cual sólo es de utilidad en las macroalgas marinas, para la fase esporofítica. Este índice sólo se ha determinado en *Codium fragile* (Malinowsky, 1974) y presentaba una heterocigosidad media para todas las poblaciones analizadas del 27.5% (Tabla 4.1), variando entre el 14.7 al 42.9% según la población.

#### 4.3.3.- HETEROCIGOSIDAD ESPERADA.

Una medida más apropiada de la variación genética lo constituye la *heterocigosidad esperada o diversidad génica* (Nei, 1987). Esta medida no depende de la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas.

Aunque en organismos haploides el concepto de heterocigosidad no es aplicable, se puede considerar la probabilidad de que dos genes de una población elegidos al azar sean diferentes. Esta probabilidad es equivalente a la heterocigosidad en una población diploide con cruzamiento al azar y se puede definir en términos de frecuencias alélicas, de la misma forma que la heterocigosidad, aunque se estén analizando individuos haploides. Nei (1973) ha denominado este valor como *Índice de diversidad génica* y se puede emplear para la valoración de todo tipo de organismos, sean estos haploides, diploides o poliploides. Asimismo, puede emplearse para cualquier tipo de sistema reproductivo, asexual o sexual, lo que permite comparar los niveles de variabilidad genética de todas las fases del ciclo biológico de los seres vivos.

La diversidad génica se ha calculado en las poblaciones haploides de *Porphyra yesoensis* (Fujio *et al.*, 1985; 1987) (Tabla 4.1). Los valores de heterocigosidad medios detectados ( $H_e = 0.127$  y  $0.197$  respectivamente) fueron muy similares entre sí y a los valores detectados en esporofitos de *Codium fragile*, diploide, (Malinowsky, 1974) (Tabla 4.1).

#### 4.3.4.- NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS.

El número de alelos totales detectados dividido por el número total de loci analizados (número medio de alelos por locus) constituye otra de las medidas empleadas en cuantificar la variabilidad genética de las poblaciones.

Las reducciones de variabilidad que se producen en las poblaciones como consecuencia del "efecto fundador" o "cuello de botella" afectan fundamentalmente a los alelos que están en baja frecuencia en la población, (Nei *et al.*, 1975; Sytsma y Schaal, 1985) que, pese a su importancia, tienen poca influencia en la medida de la heterocigosis (Zapata, 1987). El número medio de alelos por locus es un estadístico de gran utilidad para medir estas reducciones.

En macroalgas sólo se ha calculado el número medio de alelos por locus en Rodofitas. En *Porphyra* (Miura *et al.*, 1979) se han descrito valores que oscilaron entre 1.0 (en poblaciones cultivadas) a una media de 1.5 (en poblaciones salvajes). Valores muy parecidos fueron encontrados por Fujio *et al.*, (1985) en otras poblaciones salvajes de la misma especie (Tabla 4.1). En las cuatro especies de *Eucheuma* estudiadas por Cheney y Babbel (1978) el número medio de alelos por locus fue menor, oscilando entre 1.25 para *E. acanthocladum* y 1.36 para *E. isiforme* (Tabla 4.1).

#### 4.3.5.- NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS POLIMORFICO.

El número medio de alelos por locus polimórfico (NMAP) es una medida más del grado de variación que presentan las poblaciones. Nos determina la variabilidad dentro del polimorfismo detectado y nunca ha sido calculado en poblaciones de macroalgas marinas.

---

#### 4.4.- Los genes en las poblaciones. La Ley de Hardy-Weinberg.

En términos genéticos, se define *población* como una comunidad de individuos que se reproducen sexualmente entre sí o son capaces de hacerlo. Hasta ahora la mayoría del énfasis teórico y experimental se ha centrado en poblaciones de organismos diploides con reproducción sexual. Las poblaciones, ya sean haploides o diploides se caracterizan por dos atributos básicos: las *frecuencias génicas* o *alélicas* (proporción de los diferentes alelos de un gen en la población), y el *conjunto común de genes* o *acervo génico* "gene pool" (suma total de los genes de los gametos reproductores de una población). Las *frecuencias genotípicas* se definen como la proporción de genotipos diferentes que existe en una población determinada.

En 1908, Hardy en Inglaterra y Weinberg en Alemania demostraron que las frecuencias génicas de una población, bajo ciertas condiciones, permanecían esencialmente constantes de una generación a otra, constituyendo la denominada *Ley de Hardy-Weinberg*. Esta ley contiene tres principios fundamentales:

1) En condiciones de apareamiento al azar (*panmixia*) en una población de gran tamaño en la que todos los genotipos son viables, las frecuencias génicas de una generación a otra permanecen constantes y dependen sólo de las frecuencias génicas de la generación anterior y no de las frecuencias genotípicas.

2) Las frecuencias genotípicas de una población en equilibrio se pueden determinar a partir de las frecuencias génicas de la generación anterior asumiendo apareamiento al azar.

3) Una población panmíctica alcanza el equilibrio en una sola generación.

La ley se cumple basándose en las siguientes suposiciones: 1) La población se cruza totalmente al azar. 2) No actúan fuerzas de selección. 3) No existe migración. 4) No hay mutación.

Consideradas, en conjunto, estas condiciones son suficientes para que la población esté en equilibrio de Hardy-Weinberg, aunque hay que tener en cuenta que la existencia de las proporciones de Hardy-Weinberg no implica



necesariamente que se cumplan todas y cada una de las condiciones enumeradas anteriormente. De hecho, alguna o varias de estas condiciones pueden ser violadas y las frecuencias genotípicas seguir presentando las proporciones predichas por la ley. Por otro lado, existen ciertas condiciones que por sí mismas son capaces de variar las frecuencias esperadas en el equilibrio de Hardy y que nos pueden indicar ciertos aspectos de diferenciación de la especie estudiada. Una de las condiciones que afecta las proporciones esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg es el cruzamiento no al azar de los gametos en una población. Las poblaciones de organismos que se reproducen por autofecundación, reproducción asexual, en cualquiera de sus tipos, o partenogénesis, se esperan, por tanto, que tengan en sus poblaciones, grandes desviaciones del equilibrio.

Este hecho se ha detectado mediante electroforesis isoenzimática en muchos organismos: *Lycopodium* (Levin y Crepet, 1973), zooplancton (Hebert y Crease, 1983), insectos partenogénéticos (Suomalainen *et al.*, 1976), anémonas (Shick y Lamb, 1977; Black y Johnson, 1979), lombrices de tierra (Jaenike *et al.*, 1980), diatomeas (Gallagher, 1980; 1982) etc.

En macroalgas marinas, Innes y Yarish (1984) encontraron en *Enteromorpha linza* (Clorofita) una gran desviación de las frecuencias genotípicas esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg en la mayoría de los loci y poblaciones analizadas. Según los autores, estas desviaciones son consecuencia de la asociación no al azar de los loci estudiados. El análisis isoenzimático de individuos obtenidos a partir de esporas mostró que no existía segregación tal y como se esperaría si los individuos progenitores fuesen esporofitos que producen gametofitos por meiosis como parte de un ciclo de vida sexual, concluyendo que la especie tiene una reproducción asexual mayoritaria. Estos trabajos demuestran la utilidad de las técnicas electroforéticas en la determinación del modo de reproducción de las macroalgas marinas.

Desviaciones del equilibrio de Hardy y Weinberg, detectados mediante electroforesis isoenzimática, se han descrito también en *Eucheuma* (Cheney y Babbel, 1978) y *Codium* (Malinowsky, 1974) llegándose a la conclusión del predominio de la reproducción asexual mayoritaria en estas especies.

---

La capacidad de poder analizar por separado las fases haploides y diploides nos permite enfocar el estudio de la variabilidad genética en macroalgas de una manera muy especial con respecto a los organismos diploides, cuyas fases haploides se limitan exclusivamente a las células reproductoras (gametos) sin posibilidad alguna de analizar sus frecuencias génicas. Debido al ciclo biológico de muchas macroalgas, el análisis de las frecuencias genotípicas esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg podrían ser calculadas a partir de las frecuencias génicas detectadas en la fase haploide (gametofitos) y viceversa; de hecho, los gametofitos de las macroalgas pueden formalmente ser tratados como los gametos producidos, por ejemplo, por una mosca diploide, caso más usual en el tratamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg (van der Meer, 1990. com. pers.).

Debido a esta circunstancia, las implicaciones en el cálculo de los diferentes estadísticos son inmediatas y considerables. Por ejemplo, la heterocigosidad esperada en cada fase, y todos los cálculos derivados de la misma, vendrán determinados por las frecuencias alélicas detectadas en la fase complementaria de la cual procede. Es decir, el cálculo de la heterocigosidad esperada, y otros estadísticos, en la fase esporofítica en el equilibrio de Hardy-Weinberg se calcularía a partir de las frecuencias alélicas de la fase gametofítica y viceversa. Que tengamos conocimiento, es la primera vez que se realiza este procedimiento de cálculo en genética de poblaciones.

#### **4.5.- Distancia genética.**

La evolución consiste en cambios en las frecuencias génicas así como cambios en las asociaciones existentes entre alelos de distintos loci génicos (Dobzhansky *et al.*, 1983).

Uno de los mayores logros de la electroforesis isoenzimática es la posibilidad de detectar los cambios en las frecuencias génicas y establecer relaciones filogenéticas entre diferentes organismos. En este sentido, la transformación de las frecuencias alélicas y genotípicas detectadas en un sólo parámetro, que evalúa el grado de similitud (o divergencia) entre cada par de poblaciones analizadas hace de la técnica una medida "casi universal" para

---

cualquier organismo, permitiendo la comparación directa de los resultados entre especies.

El concepto de "distancia genética" fue usado por primera vez por Sanghvi (1953) en un estudio de clasificación de las poblaciones en términos de caracteres cuantitativos. Posteriormente Cavalli-Sforza y Edwards (1964, 1967) emplearon una distancia genética basada en una transformación de frecuencias génicas para construir un árbol filogenético con razas humanas. A partir de este año muchos genéticos se interesaron en el problema, apareciendo diversos estadísticos al respecto (Balakrishnan y Sanghvi 1968; Hedrick 1971; Nei 1972; Rogers 1972; Prevosti 1974; Thorpe 1979).

Según Fontdevila (1987), estos estadísticos deben cumplir varias condiciones entre las que destacan: Utilizar una muestra aleatoria de genes, ser independiente de las causas que han producido las divergencias, ser independientes del número de alelos por locus y del número de taxones analizados, reflejar lo más fielmente posible el número de cambios genéticos producidos (sustituciones nucleotídicas) y poder caracterizar su distribución estadística (Prevosti, 1974). De todos ellos, el único que cumple estas condiciones y es por tanto el más empleado, es el de Nei (1972). Nei (1972) define la *identidad genética (I)* entre dos poblaciones como la probabilidad de que dos alelos, uno de cada población, sean idénticos. El valor de la Identidad de Nei varía de cero (cuando las poblaciones son completamente diferentes) a uno (cuando son genéticamente idénticas). La distancia genética según Nei, se calcula a partir de la identidad genética empleando la fórmula:

$$D = - \ln I.$$

Por tanto, la distancia genética puede tomar valores de cero a infinito.

La distancia de Nei tiene el inconveniente de no ser métrico, y por tanto no satisface la desigualdad del triángulo, lo que tiene incidencia en la elaboración de dendrogramas en los que no hagan falta suponer que las tasas evolutivas sean homogéneas, como lo presupone Nei.

Esta desigualdad sí la cumple la distancia genética de Rogers (Rogers, 1972) que se emplea en taxonomía numérica, en la clasificación de las poblaciones y en la construcción de dendrogramas filogenéticos, porque permite una interpretación geométrica simple. Sin embargo no es proporcional al tiempo evolutivo o al número de sustituciones de genes. La distancia de Rogers se define a partir del *índice de similitud* ( $S_R$ ) de Rogers. Al igual que en el índice de Nei, alcanza valores entre cero y uno. Las estimaciones de identidades por ambos métodos son bastantes semejantes, si bien  $S_R$  generalmente da valores numéricos más bajos que  $I$  (Avice, 1980). Por el contrario, la distancia de Rogers, se define como:

$$D_R = 1 - S_R$$

Por tanto, la distancia de Rogers alcanza igualmente valores entre cero (poblaciones genéticamente idénticas) y uno.

Otro de los índices empleados es el *índice fenotípico* ( $I_H$ ) de Hedrick (1971) que compara, estadísticamente, las poblaciones empleando las frecuencias genotípicas detectadas. Según Innes (1987) el índice fenotípico de Hedrick proporciona una mejor medida de la similitud entre poblaciones o especies cuando éstas no se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que dos poblaciones con iguales frecuencias génicas pueden tener diferentes frecuencias genotípicas, con lo que los índices que se basan en las frecuencias génicas pueden no detectar la diferenciación genética existente. Este índice tiene la ventaja de no necesitar una interpretación de las bandas electroforéticas en términos de frecuencias génicas, lo cual es un índice ideal en aquellos estudios donde no se ha podido interpretar los zimogramas obtenidos, pero esta misma "ventaja" hace que los datos obtenidos no sean genéticamente fiables. Debido a que su cálculo se realiza a partir de las frecuencias fenotípicas, este estadístico no es aplicable para comparar individuos o fases haploides y diploides entre sí.

La aplicación de la distancia o identidad genética con fines taxonómicos ha sido puesta de manifiesto por gran número de autores (Ayala *et al.*, 1974; Avice, 1975; 1980; Gottlieb, 1977; 1981; Thorpe, 1979; 1982; Crawford, 1983). Ayala *et al.*, 1974 determinaron las identidades genéticas entre diferentes grupos taxonómicos de *Drosophila* encontrando que poblaciones

coespecíficas tenían valores de  $I$  de 0.97. Posteriormente, Thorpe (1982), elaboró la distribución de probabilidades de  $I$  para comparaciones entre géneros confamiliares, entre especies congénicas y entre poblaciones conespecíficas permitiendo establecer amplios intervalos de confianza para valores de  $I$  dentro de cada taxón. Entre poblaciones de la misma especie, el 98% de las observaciones tenían valores de  $I$  mayores a 0.85. A su vez, Gottlieb (1977; 1981) y Crawford (1983) comparando el valor de  $I$  en más de 30 especies de plantas superiores, estimaron que las identidades genéticas entre dos poblaciones de la misma especie variaba entre 0.87 y 1.00, con una media de 0.95. Estos valores elevados de identidad entre diferentes poblaciones de una misma especie se han encontrado en otros organismos (Awise, 1975; 1980). Por otro lado, estos valores de identidades disminuyen considerablemente cuando se analizan especies congénicas (Gottlieb, 1977; 1981; Crawford, 1983; Thorpe, 1979; Awise, 1975; Ayala *et al.*, 1972), detectándose valores que oscilan entre 0.67 para plantas superiores (Gottlieb, 1977; Crawford, 1983) y 0.50 para *Drosophila*. En mamíferos se han detectado valores que oscilan entre 0.50 y 0.84 según las especies (Awise, 1975; Thorpe, 1979).

En macroalgas marinas, aplicando las identidades de Nei (1972), Rogers (1972) y Hedrick (1971), se han encontrado entre poblaciones de una misma especie, valores muy similares a los anteriormente descritos.

Malinowsky (1974) obtuvo valores de  $I$ , entre diferentes poblaciones de *Codium fragile*, entre 0.62 y 1.00 ( $D$  entre 0.00 y 0.467), con un valor medio de 0.927 ( $D = 0.076$ ). Cheney y Babbel (1978), compararon mediante el índice de Nei y de Hedrick cuatro especies de *Eucheuma*, encontrando que la correlación entre los datos de ambos estadísticos era de 0.98. Los valores del índice de Nei variaron entre 0.996 (dentro de *E. isiforme*) a 0.372 (entre las parejas de especies *E. isiforme* - *E. nudum* y *E. gelidium* - *E. acanthocladum*). A partir de estos valores de identidad genética, junto con estudios morfológicos de las especies los autores propusieron separar *E. gelidium* y *E. acanthocladum* del género *Eucheuma*. El índice de Nei también ha sido empleado por Lindstrom y South (1989) en seis especies de Palmariaceae obteniendo valores de identidades que variaron entre 0.092 ( $D = 2.384$ ),

---

entre *Palmaria palmata* y *Halosaccion glandiforme*, y 0.886 ( $D = 0.121$ ) entre dos poblaciones de *Palmaria palmata*.

En *Porphyra*, (Miura *et al.*, 1979) se analizó, mediante la distancia de Rogers (1972), las divergencias entre 3 poblaciones cultivadas y 11 poblaciones salvajes. Los valores variaron entre 0.514 entre dos de las poblaciones salvajes y 0.005 entre dos de las poblaciones cultivadas, con valores mayoritarios entre 0.100 y 0.300.

Blair *et al.*, (1982) compararon cuatro especies de *Chaetomorpha* (Clorofita) combinando las medidas de longitud y anchura de los talos con los datos obtenidos mediante la identidad fenotípica de Hedrick. Los resultados sugerían la agrupación de las cuatro especies en dos grupos. El primer grupo *C. linum* y *C. aerea* tenía una identidad fenotípica de 0.87 mientras que el segundo grupo tenía un valor de 0.84. La comparación entre los dos grupos originaba un valor de identidad menor de 0.40. Estos resultados sugieren que los miembros de cada grupo están más relacionados filogenéticamente entre sí, que con las especies del otro grupo. El análisis de las especies mediante el índice de Hedrick se realizó sin la identificación de loci y/o alelos debido al desconocimiento de la ploidía de los individuos analizados. Este mismo índice fue empleado por Cheney y Mathieson (1979) para comparar 8 poblaciones de *Chondrus crispus* de las costas canadienses. Detectaron 22 bandas, que no fueron resueltas en loci, encontrando valores medios de  $I_H$  de 0.93 entre las poblaciones.

Innes (1987) analizó la distancia genética de Hedrick entre diferentes poblaciones de *Enteromorpha linza*, encontrando que no existía correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Incluso detectó que los individuos en áreas separadas por unos pocos cientos de metros estaban más diferenciadas genéticamente entre sí que con otras localidades alejadas varios kilómetros, sugiriendo que los patrones de diferenciación entre las poblaciones de *E. linza* parecen mantenerse por factores que operan a escala microgeográfica.

#### 4.6.- Loci diagnóstico.

Una de las aplicaciones de la electroforesis isoenzimática en taxonomía es la identificación de *loci diagnóstico*, ya que se ha podido constatar la existencia de diferentes loci y/o alelos exclusivos de una especie. Para que un locus sea diagnóstico la probabilidad de asignar un individuo a un taxón correcto debe ser igual o superior al 99% (criterio 1) ó al 99.9% (criterio 2), (Ayala y Powell, 1972). El cálculo del grado de diagnosis para cada locus se hace calculando la proporción de superposición de la distribución genotípica entre dos especies. El cálculo de los loci diagnóstico se basa en muestras de igual tamaño y en aquellas poblaciones que se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, ya que se comparan frecuencias genotípicas esperadas calculadas a partir de las frecuencias alélicas; pero conociendo las frecuencias genotípicas observadas se puede deducir el valor diagnóstico a partir de ellas (Fontevila, 1987). Los cálculos de diagnosis se pueden realizar entre especies, subespecies y poblaciones geográficas de una misma especie.

Por lo general, dos loci son suficientes para la mayoría de los diagnósticos. Hasta el momento no se han identificado loci diagnóstico entre especies de macroalgas marinas.

#### 4.7.- Relación entre la distancia genética y el tiempo de evolución.

La teoría neutralista de la evolución se basa en la hipótesis de que las tasas de sustitución de aminoácidos en las proteínas son constantes, ya que la gran mayoría de dichos cambios serían selectivamente neutros. Si los distintos alelos que surgen por mutación no afectan la eficacia biológica de sus portadores, los cambios en las frecuencias génicas, es decir, las tasas de sustituciones alélicas de una generación a otra, serían "estocásticamente" constantes.

Si la teoría neutralista de la evolución proteica fuese correcta las implicaciones que supondrían serían trascendentales, ya que la evolución de las proteínas y los genes serviría como un reloj evolutivo (Dobzhansky *et al.*,

1983). En primer lugar, el grado de diferenciación proteica entre las especies sería una medida de su proximidad filogenética. En segundo lugar, podría determinarse el tiempo "cronológico" real de los distintos acontecimientos filogenéticos.

Suponiendo que el número de sustituciones alélicas por locus sigue una distribución de Poisson y que en un gen las sustituciones nucleotídicas se producen independientemente, existiendo una tasa constante de sustituciones de aminoácidos por proteína y por año, la distancia genética de Nei puede interpretarse como el número medio de sustituciones de nucleótidos que pueden detectarse por electroforesis que se han acumulado en la evolución de dos poblaciones desde que se separaron a partir de un antepasado común.

Suponiendo que las poblaciones panmícticas  $X$  e  $Y$  están separadas de tal manera que no ocurre migración entre ellas y siendo  $N$  el tamaño efectivo de las mismas, se puede demostrar (Nei, 1987) que la identidad genética ( $I$ ) de Nei es igual a:

$$I = e^{-2\alpha t}$$

Donde:  $\alpha =$  Tasa de sustitución de codones electroforéticamente detectable por locus y año.

$t =$  Tiempo transcurrido desde que ambas poblaciones divergieron.

Como la distancia genética de Nei (1972) ( $D$ ) entre dos poblaciones se define como:  $D = -\ln I$

Entonces:  $D = 2 \alpha t$

Es decir, la distancia genética es directamente proporcional al tiempo de divergencia evolutivo entre las poblaciones estudiadas.

Dadas las características de las técnicas electroforéticas y que el tiempo de divergencia para dos poblaciones no puede obtenerse con certeza,



---

la tasa de evolución es difícilmente calculable. Nei estimó el valor medio de dicha tasa (detectable por electroforesis) en  $10^{-7}$  (Nei, 1987).

Por tanto, si  $\alpha = 10^{-7}$ , la divergencia temporal será:

$$t \text{ (años)} = 5 \times 10^6 \times D$$

Donde:  $D = \text{Distancia genética de Nei.}$

Al realizar estas estimas, Nei asumió un valor de  $\alpha$  igual para todos los loci, asunción errónea (Chakraborty *et al.*, 1978; Zouros 1979) ya que a medida que aumenta el número de secuencias de proteínas homólogas comparadas, se acumula gradualmente más pruebas en contra de la idea de constancia de las tasas evolutivas a nivel molecular. Por otro lado, los datos actuales sugieren que la variación en la tasa de evolución molecular es mayor que la predicha por la teoría neutralista (Ayala, 1982).

Sea la teoría neutralista cierta o no, parece que la heterogeneidad de las tasas evolutivas no es extremadamente grande por lo que es posible usar los datos genéticos como un reloj evolutivo aproximado, pero para evitar grandes errores, es necesario usar tasas medias obtenidas a partir de muchas proteínas y por largos periodos de tiempo, ya que cuando el tiempo aumenta, los periodos de evolución rápida y de evolución lenta tienden a compensarse los unos con los otros. (Ayala, 1982; Dobzhansky *et al.*, 1983).

En macroalgas marinas sólo se ha empleado la distancia genética de Nei como "reloj molecular" en seis especies de Palmariaceae (Lindstrom y South, 1989). Tomando como una tasa de evolución de 5 a 19 millones de años por unidad de  $D$ , Lindstrom y South (1989) estimaron que las especies más relacionadas divergieron hace aproximadamente entre 3.1 a 11.6 millones de años, mientras que las más distantes lo hicieron hace entre 11.8 y 45.3 millones de años. Estos valores eran muy diferentes a los obtenidos con otros datos geográficos, que proponían una divergencia entre las especies de hace 3 a 3.5 millones de años. Estos autores concluyeron que las discrepancias entre ambos valores podía deberse a varias razones, entre las que destacaban

---

las escasas proteínas analizadas en el estudio electroforético, la posibilidad de una selección diferencial que ha acelerado las tasas de divergencia, o que las poblaciones pasaron por "cuellos de botella" en cada etapa de la especiación. No disponemos de más referencias sobre tiempos evolutivos entre especies de macroalgas empleando la distancia genética.

#### **4.8.- Filogenias electroforéticas.**

Es posible inferir las relaciones de origen evolutivo (filogenias) basándose en las semejanzas y diferencias existentes entre poblaciones o especies. El resultado de las relaciones se observa construyendo *árboles filogenéticos* o *dendrogramas* donde las poblaciones quedan conectadas a una disposición ramificada en la que cada población se une a otra o grupo de otras poblaciones en los nudos de las ramas.

Las filogenias electroforéticas se realizan empleando los valores de las distancias genéticas entre poblaciones, quedándose reflejada la afinidad genética existente entre las mismas.

Existen diversos procedimientos matemáticos para construir los dendrogramas. Aunque los diferentes métodos no dan lugar siempre a dendrogramas idénticos, los resultados son por lo general bastante similares. En este sentido, existen dos tipos de errores en la construcción de los árboles filogenéticos: *Errores topológicos* (errores que existen en la disposición de las ramas (ramificación) del árbol) y *errores en la longitud de sus ramas*. En la práctica, no hay forma de poder saber si un árbol obtenido es realmente el correcto en su forma y longitud, dependiendo fundamentalmente de los datos elegidos para la construcción del árbol (Nei, 1987).

Existen varios métodos para construir árboles filogenéticos, entre los que destacan : el método de Fitch y Margoliash (1967), el método de parsimonia de Eck y Dayhoff (1966), U.P.G.M.A. (*unweighted pair-group arithmetic average*), (Sneath y Sokal, 1973), el método de Wagner (Farris, 1972).

El método comúnmente empleado para establecer las relaciones filogenéticas mediante electroforesis isoenzimática es el método UPGMA,

---

ya que basándose en la media de las distancias genéticas, constituye el método más simple de realizar.

Nei *et al.* (1983) demostraron que cuando las estimas de las distancias entre las poblaciones están sujetas a grandes errores estocásticos, el método de UPGMA es muy superior a otros métodos en la realización de filogenias. UPGMA no requiere el principio de la desigualdad del triángulo, con lo cual se puede emplear cualquier índice de distancia genética en su construcción (Nei, 1987).

UPGMA asume una tasa de sustitución génica constante, con lo cual, si la medida empleada para detectar las distancias genéticas entre las poblaciones es exactamente lineal al tiempo evolutivo, UPGMA da lugar a un árbol filogenético sin errores topológicos ni de longitud de las ramas, permitiendo establecer una escala de tiempo de las divergencias evolutivas de las distintas poblaciones.

Este ha sido el método empleado en los dos trabajos existentes en macroalgas marinas (Tabla 4.1). Miura *et al.* (1979), al representar los resultados de la matriz de distancias genéticas entre poblaciones salvajes y cultivadas de *Porphyra* en el Japón, observaron como todas las poblaciones analizadas se pueden dividir en 6 grupos genéticamente relacionados, siendo el grupo I (en la terminología empleada por los autores) el que incluye todas las poblaciones cultivadas, sugiriendo que éstas se derivaron de las poblaciones salvajes por un proceso de selección y deriva genética. La agrupación de las poblaciones en un árbol filogenético sugiere también, que existía una elevada diferenciación genética entre los diferentes grupos existentes (Miura *et al.*, 1979).

Malinowsky (1974) pudo distinguir dos grupos de afinidades genéticas en 14 poblaciones de *Codium fragile* al agrupar, mediante UPGMA, las distancias genéticas obtenidas. Un primer grupo consistió en las poblaciones de California y Columbia, mientras que un segundo grupo consistía en todas las poblaciones de la costa americana del Atlántico y la población de Inglaterra estudiada. Estos datos, junto con otros estudios morfológicos, indicaban que Europa fue la fuente de introducción de esta especie en el sureste americano.

#### 4.9.- Análisis de la estructura genética de una población subdividida en subpoblaciones.

La estructura genética de un grupo de poblaciones es una consecuencia de los patrones de cruzamiento dentro de la población y de la magnitud del intercambio génico entre las poblaciones (Eanes y Kohen, 1978). Altas tasas de flujo génico entre las poblaciones y una tendencia a cruzamientos al azar disminuirán la cantidad de estructuración genética, mientras que una obstrucción, de cualquier índole, en el movimiento de genes generará una diferenciación genética y una estructura diferenciada.

Las especies autofecundantes, como muchas plantas vasculares, presentan un mayor grado de diferenciación intrapoblacional que las especies con cruzamiento al azar (Brown, 1979; Hamrick *et al.*, 1979). Muchas, anuales o perennes presentan diferenciación genética en pequeñas distancias especiales (Levin, 1977, 1978; Schaal, 1974; Linhard, 1974).

##### 4.9.1.- INDICES DE FIJACION DE WRIGHT.

La estructura genética de una población subdividida en subpoblaciones puede analizarse por medio de los estadísticos de Wright (1951; 1978). Este autor propuso medir las desviaciones de las frecuencias genotípicas en una población subdividida en términos de tres parámetros,  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ , y  $F_{IS}$ . En la terminología de Wright,  $F_{IT}$  se define como la correlación entre los gametos combinantes dentro de los individuos con relación a la población total. Si la población total se encuentra en panmixia, entonces  $F_{IT}$  es cero.  $F_{IS}$  es el componente "no al azar" de  $F_{IT}$  y describe la correlación entre los individuos que se cruzan con respecto a sus subdivisiones, pudiéndose interpretar como una medida de la desviación del cruzamiento al azar dentro de las subdivisiones.  $F_{IS}$  puede variar de 1 a -1. Un valor de  $F_{IS}$  positivo o negativo indica, respectivamente, un defecto o un exceso de heterocigóticos en la población con respecto a las proporciones de Hardy-Weinberg. Por tanto, indica la desviación neta de las proporciones de Hardy-Weinberg debido al efecto de la unión de todas las fuerzas que están actuando sobre el patrón de variación genética de las subpoblaciones, incluyendo selección, cruzamientos no al azar y mutación (Workman y Niswander 1970).

$F_{ST}$  es la correlación entre dos gametos escogidos al azar de cada subpoblación y mide el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones, siendo siempre positivo. Estos tres parámetros son conocidos como *Índices de fijación o F-estadísticos* y están relacionados mediante la fórmula:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

La idea inicial de Wright se basaba en el análisis de un locus con sólo un par de alelos neutrales y otras simplificaciones, como un número infinito de subpoblaciones. Los cálculos de los índices de Wright sólo son aplicables a loci polimórficos y existe gran controversia respecto a la forma de realizar sus cálculos (Weir y Cockerham, 1984; Soltis y Soltis, 1988).

Como para el cálculo de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  es necesario conocer los valores de heterocigosidad observados y las frecuencias genotípicas, estos índices sólo son aplicables en subpoblaciones con individuos diploides. Por el contrario,  $F_{ST}$  se calcula, exclusivamente, a partir de las frecuencias alélicas y por tanto, nos puede indicar la diferenciación existente en poblaciones con fases haploides y diploides.

Fujio *et al.* (1985) aplicaron el índice de diferenciación de Wright ( $F_{ST}$ ) entre distintas poblaciones de *Porphyra yezoensis*, encontrando que el grado de diferenciación genético entre estas poblaciones era mucho mayor ( $F_{ST} = 0.623$ ) que la encontrada en otros organismos diploides. Las causas responsables de este marcado grado de diferenciación, podría ser el ciclo de vida de esta especie (la cual se propaga mayoritariamente por monoesporas). En un trabajo posterior, (Fujio *et al.*, 1987) encontraron que la diferenciación genética entre 11 poblaciones de *Porphyra yezoensis*, diferentes al trabajo anterior, era muy inferior ( $F_{ST} = 0.125$ ), pero seguía siendo superior a la detectada en otros organismos diploides, donde se han encontrado valores de diferenciación de 0.036 en mejillones (Fujio 1979), 0.038 en helechos (Soltis y Soltis, 1988), 0.009 en mariposas (Eanes y Koehn, 1978), ó 0.015 en leguminosas (Schaal y Smith, 1980).

#### 4.9.2.- PARAMETROS DE DIVERSIDAD GENICA.

Nei (1973) desarrolló una metodología similar a la de Wright para analizar la diversidad génica entre y dentro de subpoblaciones, con la diferencia que se podía aplicar para cualquier población, sin tener en cuenta el número de alelos por locus o el patrón de las fuerzas evolutivas implicadas tales como selección, mutación o migración. Asimismo, se podía aplicar a cualquier organismo, con reproducción sexual o asexual, diploide o haploide si sus frecuencias alélicas se podían determinar. Particularmente, Nei (1977), demostró que los índices de fijación podían definirse y calcularse usando heterocigosidades observadas y esperadas para la población en investigación.

Nei (1973) considera que la diversidad genética total ( $H_T$ ) está subdividida en la diversidad génica dentro de las subpoblaciones ( $H_S$ ) (cuyo valor coincide con la heterocigosis esperada para cada subpoblación) y la diversidad génica entre las subpoblaciones ( $D_{ST}$ ), donde:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Nei, define el *coeficiente de diferenciación génica* de la población total como:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

Donde  $G_{ST}$  puede tomar valores entre 0 (cuando  $H_S = H_T$ ) y 1 (cuando  $H_S = 0$ , es decir, cuando las poblaciones están fijadas para diferentes alelos).

$G_{ST}$  de Nei es igual a  $F_{ST}$  de Wright para un locus con dos alelos.

Los índices de Nei, han sido utilizados para calcular la diferenciación genética en diversos organismos entre los que se encuentran plantas vasculares (Schoen, 1982; Systma y Schaal, 1985; Levin y Crepet, 1973), seres humanos (Nei y Roychoudhury, 1982), *Drosophila* (Ayala *et al.*, 1974) entre otros, pero nunca han sido aplicados a las poblaciones de macroalgas marinas.

La descripción detallada de los cálculos de los estadísticos de Wright y Nei se describen en el capítulo de Material y Métodos. Genética.

**V. GENETICA.  
MATERIAL Y METODOS.**

### 5.1.- Muestreo de los individuos.

Los individuos se recolectaron de poblaciones donde abundaban las diferentes especies, en áreas de varios cientos de metros cuadrados en periodos de bajamar. La recolección se realizó totalmente al azar, exceptuando la discriminación por individuos de bajo grado de epifitismo y sin deterioro observable, y a primeras horas del día, con lo que se aseguraba que el tratamiento posterior del material se efectuaba el mismo día. Las algas se arrancaron manualmente, procurando recoger todo el individuo, desde el ápice del talo hasta las estructuras de fijación.

Para distinguir los individuos, debido al crecimiento a modo de césped de las especies estudiadas, se recolectaban las muestras con una separación de, al menos 10 cms unas de otras, y se introducían en bolsas de plástico individuales con agua de mar. A continuación se transportaban al laboratorio en una nevera portátil. El tiempo desde la recolección de los individuos en la costa hasta su tratamiento en el laboratorio no sobrepasaba las 5 horas.

Al coexistir individuos gametofíticos y esporofíticos en cada población de cada especie, la población analizada se divide en la *subpoblación esporofítica* y en la *subpoblación gametofítica*, correspondiendo respectivamente, al conjunto de individuos esporofíticos y gametofíticos analizados de una población.

### 5.2.- Descripción de las poblaciones.

Las tres especies estudiadas fueron recolectadas de poblaciones incluídas en diversas localidades de las islas de Gran Canaria y Tenerife. *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* se recolectaron en Gran Canaria (en la playa de Bocabarranco en Gáldar y en la playa de las Salinas en Agaete) y en Tenerife (en la playa del Charco en el Puerto de La Cruz). *Gracilaria ferox* se recolectó en la playa de Bocabarranco en Gáldar y en la playa de Las Canteras en Las Palmas de Gran Canaria, ambas en Gran Canaria. La latitud y lugares de muestreo en cada isla se describen en la Figura 5.1.



---

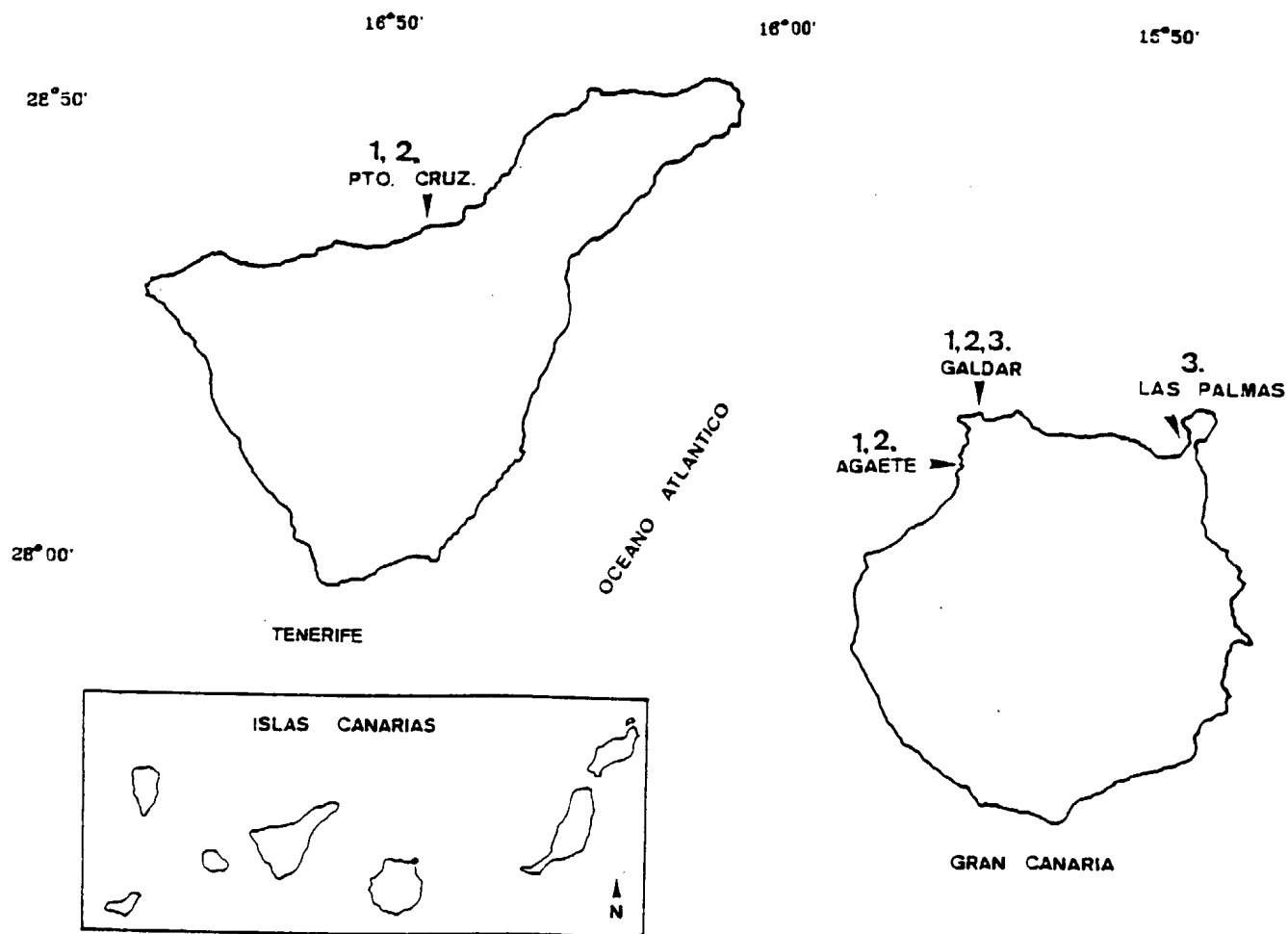
**5.2.1.- Gáldar. (Playa de Bocabarranco).** Situada en el norte de la isla de Gran Canaria, a 1.5 kilómetros de la ciudad de Gáldar y a 30 kilómetros de Las Palmas de Gran Canaria (Figura 5.1). La zona muestreada se encuentra en una entrada de mar fuertemente batida por el oleaje donde cohabitan los individuos de *Gelidium canariensis* y *Gelidium arbuscula*. A unos 200 metros de las poblaciones de *Gelidium canariensis*, en charcos intermareales, se encuentra una de las dos poblaciones de *Gracilaria ferox* analizadas.

**5.2.2.- Agaete. (Playa de Las Salinas).** Localizada en el noroeste de la isla de Gran Canaria, en la Villa de Agaete, cerca de la playa de Las Nieves (Figura 5.1). Al igual que en Bocabarranco, las muestras fueron recogidas en zonas batidas por fuerte oleaje donde también cohabitan ambas especies de *Gelidium*.

**5.2.3.- Pto. Cruz. (Playa del Charco).** Localizada en el norte de la isla de Tenerife, en el municipio del Puerto de la Cruz (Figura 5.1). También es una zona con grandes oleajes cohabitando las dos especies de *Gelidium* en las mismas zonas.

**5.2.4.- Las Palmas de Gran Canaria. (Playa de Las Canteras).** Situada en el noroeste de Gran Canaria, en Las Palmas de Gran Canaria (Figura 5.1). En esta zona se localiza la segunda población de *Gracilaria ferox*, la cual se halla también, en charcos tranquilos durante la marea baja.

**FIGURA 5.1.** Mapa de localización de las poblaciones muestreadas. 1.- Lugares de recogida de *Gelidium arbuscula*. 2.- Lugares de recogida de *Gelidium canariensis*. 3.- Lugares de recogida de *Gracilaria ferox*.



### 5.3.- Condiciones de electroforesis.

Se empleó electroforesis horizontal en geles de almidón al 12% (p/v) según se describen en el apartado 2.4.1. Las muestras (almacenadas en cámaras de cultivo según se describe en el apartado 2.2.2) se homogeneizaron en morteros con nitrógeno líquido, a las que se le añadió posteriormente el tampón de homogeneización (Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0.2 M, PVPP 3%, tampón N° 6, Tabla 2.2) en proporción 1:1. Posteriormente se impregnaban entre 4 a 6 piezas de papel de filtro (Whatmann 3MM) en el extracto acuoso que se empleaban en la electroforesis, tal y como se describe en el apartado 2.5.1. Se empleó el sistema de Poulik (apartado 2.4.2) como sistema de separación electroforética.

Se analizaron los 8 sistemas enzimáticos del grupo "enzimas con actividad" (ALP, DIA, EST, PGI, PGM, SOD, MDH y GDH) y las biliproteínas (ficoeritrina). El procedimiento de tinción empleado para cada enzima fue el descrito en el apartado 2.8.

### 5.4.- Identificación y nomenclatura de loci y alelos.

Ante la imposibilidad de realizar cruzamientos en nuestras especies, y ante la inexistencia de cepas identificadoras, la distinción de los loci y alelos se realizó siguiendo las siguientes premisas:

- 1.- Se comparaba el zimograma obtenido de los individuos haploides (gametofitos) y diploides (esporofitos). Aquellas bandas que aparecían juntas en la fase gametofítica se consideraban loci individuales, asumiendo la inexistencia de dos alelos juntos en los mismos. De la misma forma, cuando dos bandas aparecían juntas en los esporofitos, y sólo una de ellas lo hacía en el gametofito, se consideraban cada una de estas bandas como alelos del mismo locus, y el individuo se clasificaba como heterocigótico. Los individuos de ploidía desconocida no se incluyeron en el análisis.
- 2.- Las bandas cuya interpretación genética era dudosa no se incluyeron en el estudio.
- 3.- Se analizaron individuos de diferentes poblaciones y, en ocasiones, de

diferentes especies en un mismo gel, con la finalidad de comparar sus movilidades relativas.

- 4.- Cuando existían grupos de bandas cuyas movilidades eran muy próximas pudiendo existir la duda de si correspondían a electromorfos distintos, se consideraba este grupo como una sólo banda asumiendo el hecho de que se disminuía el posible polimorfismo del sistema.
- 5.- Los individuos que no mostraban actividad en algún sistema se eliminaban del cómputo, en vez de tratarlos como alelos silentes o nulos, debido a la posible interpretación errónea de los resultados.
- 6.- Se emplearon como patrones internos de movilidad, la distancia de migración del azul de bromofenol con el frente y la migración de la banda más relevante de ficoeritrina con la finalidad de comparar las movilidades relativas de las distintas bandas isoenzimáticas obtenidas en las tres especies estudiadas.

Una vez reconocidos los loci se procedió a su nomenclatura siguiendo las normas propuestas por Hubby & Lewontin (1966) y Lewontin & Hubby (1966). Según estas normas, cuando existen dos o más loci que codifican varios enzimas con la misma actividad funcional, se les da a todos la misma denominación (generalmente la abreviatura de la enzima) y se les distingue por un número. Al locus que en la electroforesis codifica el sistema locídico más alejado del origen se le asignó el número 1 y a los demás, según su menor movilidad, números crecientes correlativos. Para la nomenclatura de los alelos se asignaron letras correlativas, atendiendo a su movilidad anódica; así, al alelo con mayor movilidad, se le asignó la letra *a*, al siguiente en movilidad decreciente se le asignó la letra *b*, y así sucesivamente. La nomenclatura de los loci y alelos se realizó considerando, conjuntamente, todas las diferentes movilidades encontradas en las diferentes poblaciones y especies.

Al no poder distinguir individuos esporofíticos en *Gracilaria ferox*, cuando un individuo se identificaba como heterocigótico en uno de los locus, este locus, en este individuo, se eliminaba del estudio y se procedía a la identificación del resto de sus loci, los cuales se incluían en el estudio como pertene-

cientes a una subpoblación diploide. De esta manera se analizaron las poblaciones diploides de esta especie, eliminando el sesgo que constituía la identificación de los individuos por su heterocigosidad, aunque el número de individuos posibles a analizar disminuyera.

### 5.5.- Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas.

Debido a la existencia de fases haploides y diploides en las poblaciones estudiadas, el cálculo de las frecuencias alélicas (frecuencias génicas) y fenotípicas (frecuencias genotípicas) varió en cada caso.

#### 5.5.1.- FRECUENCIAS GENOTÍPICAS.

Las frecuencias genotípicas ( $X_{ii}$ ) en los individuos diploides se calculó para cada locus mediante la fórmula:

$$X_{ii} = N_{ii} / N_t$$

Donde:  $N_{ii}$  = Número de individuos con el genotipo  $ii$ .  
 $N_t$  = Número de individuos totales analizados para el locus dado.

En los individuos haploides, no es posible calcular frecuencias genotípicas, ya que por su condición de haploide sólo presentan un alelo.

#### 5.5.2.- FRECUENCIAS ALELICAS.

En los individuos haploides, las frecuencias alélicas ( $x_i$ ) se determinaron por la fórmula:

$$x_i = N_i / N_t$$

Donde:  $N_i$  = Número de gametofitos con el alelo  $i$ .  
 $N_t$  = Número de gametofitos totales para el locus dado.

En los individuos diploides, las frecuencias alélicas ( $x_i$ ) se calcularon

para cada locus mediante:

$$x_i = \frac{2 N_{ii} + H_i}{N_t}$$

Siendo:  $N_{ii}$  = Número de individuos homocigóticos  $ii$ .  
 $H_i$  = Número de individuos heterocigóticos para el alelo  $i$ .  
 $N_t$  = Número de esporofitos analizados para cada locus.

### 5.6.- Análisis de las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones.

Para determinar si la heterogeneidad de las frecuencias genotípicas reflejan diferencias en las frecuencias alélicas, así como para establecer la existencia de diferencias significativas entre las fases haploides y diploides y entre las poblaciones estudiadas, se realizó el test de  $X^2$  de Workman y Niswander (1970). Este test consiste en el análisis de la varianza y la media de las frecuencias alélicas entre las poblaciones en estudio.

El estadístico viene dado por la fórmula:

$$X^2 = 2 N_t \sum \frac{\sigma^2_{x_j}}{\bar{x}_j}$$

Donde:  $N_t$  = Tamaño total de la muestra considerando todas las poblaciones y subpoblaciones incluidas en el análisis.

$x_j$  = Media ponderada de las frecuencias del alelo  $j$  del locus estudiado.

$\sigma^2_{x_j}$  = Varianza ponderada de la frecuencia del alelo  $j$  del locus estudiado.

Para cada alelo, la media ponderada se calculó mediante la fórmula:

$$\bar{x}_j = \Sigma (N_k / N_t) x_k$$

Siendo:  $N_k$  = *Tamaño de la muestra de la población k.*  
 $x_k$  = *Frecuencia del alelo en la población k.*

La *varianza ponderada* para cada alelo, se calculó por la fórmula:

$$\sigma^2_{x_j} = \Sigma (N_k / N_t) x_k^2 - x_j^2$$

Los *grados de libertad* se calcularon mediante la fórmula:

$$g.d.l. = (k - 1) (r - 1)$$

Donde:  $k$  = *Número de loci analizados.*  
 $r$  = *Número de poblaciones y subpoblaciones analizadas.*

Otra forma de calcular las diferencias génicas para cada locus entre dos poblaciones y subpoblaciones cuya aplicación nos sirvió para contrastar los valores obtenidos se basa en la siguiente fórmula (Nei, 1987):

$$X^2 = 2n_x n_y \Sigma \frac{(x_i - y_i)^2}{(x_i n_x + y_i n_y)}$$

Donde:  $n_x$  y  $n_y$  = *Número de individuos examinados en las poblaciones x e y.*  
 $x_i$  e  $y_i$  = *Frecuencias génicas de cada locus en las poblaciones x e y.*

Los grados de libertad de este test son:

$$g.d.l. = (m - 1)$$

Donde:  $m$  = *Número de alelos del locus.*

## 5.7.- Medidas de la variación genética.

Los estadísticos de variabilidad genética empleados en nuestro estudio fueron:

1) Proporción de loci polimórficos. 2) Heterocigosidad observada y esperada. 3) Número medio de alelos por locus y 4) Número medio de alelos por locus polimórfico.

### 5.7.1.- PROPORCION DE LOCI POLIMORFICOS.

La *proporción de loci polimórficos (P)* se calculó para cada subpoblación de cada especie empleando la fórmula:

$$P = \frac{N^{\circ} \text{ Loci polimórficos.}}{N^{\circ} \text{ Loci totales.}}$$

Se analizaron los criterios de polimorfismo de 95 y 99% (Ayala, 1982). La proporción de loci polimórfico media en cada especie se calculó hallando la media de entre todas las subpoblaciones analizadas.

### 5.7.2.- HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA.

Se calculó para cada locus como el número de individuos heterocigóticos para el locus en cuestión, dividido por el número de individuos totales.

### 5.7.3.- HETEROCIGOSIDAD ESPERADA.

La *heterocigosidad esperada para un locus ( $h_k$ )* se calculó en los esporofitos por la fórmula:

$$h_k = (1 - \sum x_i^2)$$

Siendo:  $x_i =$  *Frecuencia del alelo i en los gametofitos de la población, del locus dado.*



Para las subpoblaciones gametofíticas, el cálculo de la heterocigosidad esperada se realizó de la misma manera, pero a partir de las frecuencias alélicas obtenidas en los esporofitos de la misma población.

La *heterocigosidad esperada media* ( $He$ ) para  $r$  loci estudiados, incluyendo los loci monomórficos con heterocigosidad nula, se calculó mediante la fórmula:

$$He = \frac{\sum h_k}{r}$$

La *varianza de muestreo* de la heterocigosidad media ( $V$ ) se calculó mediante la fórmula:

$$V = \frac{\sum (h_k - He)^2}{r(r-1)}$$

Siendo:  $h_k =$  *Heterocigosidad esperada del locus k.*  
 $He =$  *Heterocigosidad esperada media.*  
 $r =$  *Número de loci analizados.*

Esta varianza incluye tanto la varianza intralocus como la varianza interloci (Zapata, 1987).

El *error estándar* de la heterocigosidad media esperada ( $es$ ) se calculó mediante la fórmula:

$$es = \sqrt{V}$$

Siendo:  $V =$  *Varianza de muestreo.*

#### 5.7.4.- NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS.

El *número medio de alelos por locus* ( $NMA$ ), se calculó en cada subpoblación mediante la fórmula:

$$NMA = \frac{N^{\circ} \text{ total alelos}}{N^{\circ} \text{ total loci}}$$

### 5.7.5.- NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS POLIMORFICO.

El *número medio de alelos por locus polimórfico (NMAP)*, se calculó mediante la fórmula:

$$NMAP = \frac{N^{\circ} \text{ alelos totales en loci polimórficos}}{N^{\circ} \text{ loci total de loci polimórficos}}$$

### 5.8.- Determinación de las frecuencias genotípicas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Una vez calculadas las frecuencias genotípicas de cada locus en cada subpoblación, se compararon con las frecuencias genotípicas esperadas aplicando la Ley de Hardy-Weinberg mediante un *test de Chi-cuadrado*,  $X^2$ .

El cálculo de las frecuencias genotípicas esperadas de los esporofitos en el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus en cada población, se realizó mediante las fórmulas:

$$X_{ii} = X_i^2$$

$$X_{ij} = 2 X_i X_j$$

Donde:  $X_{ii} X_{ij} =$  *Frecuencia genotípica esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg de los individuos esporofíticos, con los genotipos ii e ij respectivamente del locus dado.*

$X_i$  y  $X_j =$  *Frecuencias alélicas de los gametofitos para el locus dado.*

El número de individuos esperado para cada genotipo se realizó mediante la fórmula de Levene (1949) para tamaños muestrales pequeños:

$$n_{ii} = \frac{n x_i (2n x_i - 1)}{2n - 1} \quad n_{ij} = \frac{4n^2 x_i x_j}{2n - 1}$$

Donde:  $x_i, x_j =$  Frecuencias alélicas de los alelos  $i, j$ .  
 $n =$  Número de individuos esporofíticos analizados.  
 $n_{ii}, n_{ij} =$  Número de individuos esperados con los genotipos  $ii, ij$ .

La desviación del número de genotipos observados del número de genotipos esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó mediante un test de  $X^2$  con  $(k - r)$  grados de libertad, siendo  $k =$  Número de fenotipos y  $r =$  Número de alelos.

Cuando el número de grados de libertad era 1 y una de las clases fenotípicas tenía un valor menor de 5, se aplicó la corrección de Yates (Sokal y Rohlf, 1979). Si el número de grados de libertad era mayor de 1 pero habían clases genotípicas con valores esperados menores que 1, entonces se combinaban las clases con estos valores pequeños hasta conseguir que su valor fuese superior a 1. Al realizar esta agrupación se eliminaba un grado de libertad por cada clase combinada. Cuando el número de grados de libertad era menor de uno o cuando las frecuencias esperadas eran menores de uno, no se efectuaba el cálculo.

### 5.9.- Determinación de loci diagnóstico.

Para detectar los loci diagnóstico entre las especies, se procedió según el método de Ayala y Powell (1972) pero comparando directamente las frecuencias genotípicas observadas de aquellos loci variables entre las especies (Fontevila, 1987). Se realizó el cálculo sólo para los individuos esporofíticos. Como el número de individuos analizados en *Gracilaria ferox* fue inferior a los analizados en ambas especies de *Gelidium*, no se procedió

a realizar el cálculo de diagnóstico en esta especie de forma estadística, aunque el análisis directo de los diferentes loci aparecidos en los zimogramas nos proporcionó el descubrimiento de loci exclusivos de cada especie.

Para calcular los loci diagnóstico entre las especies de *Gelidium* se ignoraron las diferencias en las frecuencias genotípicas entre las diferentes poblaciones y subpoblaciones de la misma especie. Se sumó el número de individuos totales obtenidos y se calcularon las frecuencias genotípicas globales de cada locus en cada especie. A continuación se calculó la proporción de superposición de las distribuciones genotípicas, sumando las frecuencias genotípicas menores, de cada locus, entre las dos especies. La probabilidad de error ( $P_e$ ) al asignar un genotipo individual a la especie es la mitad de la frecuencia de superposición. El grado de diagnóstico de un locus ( $VD$ ), entre dos especies, se calculó mediante la fórmula  $VD = 1 - P_e$  (Ayala y Powell, 1972).

### 5.10.- Estimación de las distancias genéticas entre las poblaciones y subpoblaciones.

Para calcular las distancias e identidades genéticas intra e interespecíficas se emplearon los estadísticos de Nei (1972) y Rogers (1972).

#### 5.10.1.- DISTANCIA DE ROGERS.

Su cálculo se realizó para cada locus empleando la fórmula:

$$D_R = 1/2 \sum (x_i - y_i)^2$$

Donde:  $x_i$  e  $y_i$  = Frecuencias génicas del alelo  $i$  del locus dado, en las poblaciones  $x$  e  $y$ .

La *distancia genética media* se obtuvo calculando la media aritmética de todos los loci analizados, incluyendo los monomórficos.

La *varianza de la distancia genética media* ( $V_r$ ) se calculó mediante la fórmula:

$$V_r = \frac{\sum (D_{rj} - D_R)^2}{r(r-1)}$$

Donde:  $r$  = Número de loci analizados.  
 $D_{Rj}$  = Distancia de Rogers para el locus  $j$ .  
 $D_R$  = Distancia genética media.

El *error estándar* se obtuvo calculando la raíz cuadrada de la varianza.

El *índice de similitud de Rogers* ( $S_R$ ) (valor complementario de la distancia genética) se calculó mediante la fórmula:

$$S_R = 1 - D_R$$

### 5.10.2.- DISTANCIA GENETICA DE NEI.

El *índice de Identidad genética de Nei* (1972), ( $I$ ) para cada locus, viene dado por la expresión:

$$I_i = \frac{\sum x_i y_i}{(\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{1/2}}$$

La *identidad genética media* ( $I$ ) se obtuvo calculando la media de los valores de cada uno de los loci analizados, incluyendo los loci monomórficos. Este valor se calculó mediante la fórmula:

$$I = \frac{\bar{I}_{xy}}{(\bar{I}_x \bar{I}_y)^{1/2}}$$

Donde:  $\bar{I}_{xy}$ ,  $\bar{I}_x$  y  $\bar{I}_y$  = medias aritméticas para todos los loci de  $\sum x_i$ ,  $\sum x_i^2$  y  $\sum x_i^2$ .

La *distancia genética de Nei (D)* se define como:

$$D = - \text{Ln } I$$

Donde:  $I =$  *Identidad genética entre las dos poblaciones.*

### 5.11.- Relación entre la distancia genética y el tiempo de evolución.

Para calcular el tiempo de divergencia entre las tres especies estudiadas se empleó la tasa evolutiva descrita por Nei (1987) Esta tasa se calculó directamente de las matrices de distancia aplicando la fórmula:

$$t \text{ (años)} = 5 \times 10^6 \times D$$

Donde:  $D =$  *Distancia genética de Nei.*

### 5.12.- Análisis de la estructura genética de una población subdividida en subpoblaciones.

Para calcular el grado de diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones se emplearon los índices de Wright (1978) y Nei (1973).

#### 5.12.1.- INDICES DE WRIGHT.

$F_{IS}$  se calculó, para cada locus polimórfico, mediante la fórmula:

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

Donde:  $H_o =$  *Heterocigosis observada del locus dado.*  
 $H_e =$  *Heterocigosis esperada del locus dado.*

De esta forma, se obtuvo un valor de  $F_{IS}$  para cada locus de cada subpoblación esporofítica.  $F_{IS}$  no se aplicó a las subpoblaciones gametofíticas por ser haploides.

Para cada locus, se calculó la media ponderada de  $F_{IS}$ , para la población global empleando la fórmula:

$$\bar{F}_{IS} = \sum (N_i / N_t) F_{ISki}$$

Donde:  $F_{ISki} =$  *Valor de  $F_{IS}$  para el locus  $i$  en la subpoblación  $k$ .*  
 $N_i =$  *Número de individuos analizados en el locus  $i$  en la subpoblación  $k$ .*  
 $N_t =$  *Número de individuos totales analizados en todas las subpoblaciones para el locus dado.*

Asimismo, se calculó la media aritmética de  $F_{IS}$  para cada subpoblación, para todos los loci polimórficos.

$F_{ST}$  se calculó para cada locus polimórfico mediante la fórmula:

$$F_{STk} = \frac{\sigma_{xi}^2}{\bar{x}_{ik} - \bar{x}_{ik}^2}$$

Siendo:  $\sigma_{xi}^2 =$  *Varianza de las frecuencias alélicas  $x$  del locus  $k$  entre las subpoblaciones.*

$\bar{x}_{ik} =$  *Frecuencia alélica media del alelo  $i$  del locus  $k$  para todas las poblaciones analizadas.*

$F_{ST}$  se calculó para cada alelo de cada locus separadamente en las subpoblaciones haploides, en las poblaciones diploides y finalmente en la población global empleando las frecuencias alélicas de ambas fases.

El valor final de  $F_{ST}$  para los locus con más de dos alelos se obtuvo

calculando la media de  $F_{ST}$  para todos los alelos según la fórmula:

$$\bar{F}_{ST} = \Sigma \sigma_x^2 / \Sigma \bar{x}_i (1 - \bar{x}_i)$$

La desviación estadística de  $F_{ST}$  de cero, se calculó mediante el test de  $X^2$ :

$$X^2 = 2 N F_{ST} (k - 1) \text{ con } (k - 1) (s - 1) \text{ grados de libertad.}$$

Siendo:  $N =$  *Número de individuos analizados en todas las subpoblaciones.*  
 $k =$  *Número de alelos del locus dado.*  
 $s =$  *Número de subpoblaciones analizadas.*

$F_{IT}$  se calculó mediante la fórmula:

$$F_{IT} = F_{IS} + (1 - F_{IS}) F_{ST}$$

Siendo:  $F_{ST} =$  *Índice detectado en las subpoblaciones diploides.*

La desviación de la población total de las condiciones de panmixia se detectó mediante el test de  $X^2$  siguiente (Guries y Ledig, 1982):

$$X^2 = F_{IT}^2 N (k - 1) \text{ con } k (k - 1)/2 \text{ grados de libertad.}$$

Donde:  $F_{IT} =$  *Índice de fijación total de cada locus para un tamaño de población  $N$ , con  $k$  alelos.*

### 5.12.2.- INDICES DE NEI.

La diversidad genética de toda la población se calculó para cada locus, sobre todas las poblaciones mediante la fórmula de Nei (1973):



$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Donde:  $H_T$  = *Diversidad genética total.*  
 $H_S$  = *Diversidad génica media dentro de la población.*  
 $D_{ST}$  = *Diversidad génica entre las subpoblaciones.*

La diversidad genética total se calculó mediante la fórmula:

$$H_T = 1 - \sum x_i^2$$

Donde:  $x_i^2$  = *Frecuencia media de todas las subpoblaciones del alelo k.*

La diversidad génica media dentro de la población equivale a la heterocigosidad esperada de cada locus en cada subpoblación.

La diversidad génica entre las subpoblaciones se calculó por la diferencia entre las anteriores cantidades:

$$D_{ST} = H_T - H_S$$

### 5.13.- Establecimiento de relaciones filogenéticas.

Los árboles filogenéticos se elaboraron mediante el dendrograma de UPGMA (*Unweighted pair-group arithmetic average clustering method*) (Nei, 1987) empleándose ambas distancias genéticas en su realización.

Para realizar el cálculo siguiendo el método de UPGMA, se van agrupando los OTU (*operational taxonomic unit*), cada unidad taxonómica, a medida que el árbol se vaya construyendo. Para ello, se agrupan los dos primeros OTUs que tienen el menor valor de distancia genética, o mayor valor de similitud, en la matriz de distancias-identidades genéticas. Estos dos OTUs, constituyen así un nuevo OTU, construyéndose entonces una nueva matriz donde los valores de este nuevo OTU con los anteriores será el valor

---

medio de las distancias de ellos con los que forman este OTU. A continuación se unen nuevamente aquellas dos unidades taxonómicas con el menor valor de distancia y se elabora otra nueva matriz. Este procedimiento se repite hasta que todas las subpoblaciones queden agrupadas. Las agrupaciones de las distintas subpoblaciones quedan unidas por una raíz común.

**VI. GENETICA.  
RESULTADOS.**

### 6.1.- Número de individuos analizados.

En todas las poblaciones analizadas de ambas especies de *Gelidium*, el número de tetraesporofitos fue siempre superior al número de gametofitos (Tabla 6.2, 6.3). En *Gracilaria ferox* por el contrario, nunca pudimos observar individuos esporofíticos en estado reproductor, identificándose mediante los patrones isoenzimáticos, sólo aquellos individuos que eran heterocigóticos (apartado 6.3).

### 6.2.- Interpretación genética de los zimogramas.

En *Gelidium arbuscula* se detectaron entre 23 a 29 alelos distribuidos en 22 loci, 7 de los cuales (ALP-1, DIA-2, EST-2, GDH-1, MDH-1, MDH-3 y PGI-3) fueron polimórficos (Tabla 6.1). En todos los loci polimórficos se detectaron 2 alelos excepto en GDH-1 y DIA-2 que se detectaron 3 alelos en alguna de las subpoblaciones (Tabla 6.1).

En *Gelidium canariensis* se detectaron entre 25 a 28 alelos, según las subpoblaciones, distribuidos en 23 loci. 18 loci fueron invariables en las seis subpoblaciones estudiadas. En 5 loci (ALP-1, DIA-3, EST-2, MDH-1 y PGI-3) se detectó polimorfismo en alguna de las subpoblaciones, siendo todos dialélicos (Tabla 6.1).

En *Gracilaria ferox* se detectaron entre 18 a 20 alelos distribuidos en 18 loci, donde sólo dos fueron polimórficos y ambos dialélicos (EST-3 y PGI-3) (Tabla 6.1).

La Figura 6.1 representa el número total de bandas detectadas en cada una de las enzimas en las especies analizadas, señalando la movilidad relativa (Rf) de cada una con respecto al azul de bromofenol, así como la interpretación genética de las mismas.

---

**TABLA 6.1. Loci fijados y loci polimórficos detectados en las tres especies analizadas.**

---

*Gelidium arbuscula.*

\* Loci invariables.

DIA-1, DIA-4, DIA-3, EST-1, EST-3  
 Fe-1, PGI-1, PGI-2, SOD-1, SOD-2  
 SOD-3, SOD-4, SOD-5, SOD-6, PGM-1.  
 Número total de loci invariables = 15.

\* Loci polimórficos.

ALP-1, DIA-2, EST-2,  
 GDH-1, MDH-1, MDH-3, PGI-3.  
 Número total loci polimórficos = 7.

*Gelidium canariensis.*

\* Loci invariables.

DIA-1, DIA-2, DIA-4, EST-1, EST-3  
 Fe-1, GDH-1, MDH-2, PGM-1, SOD-2,  
 SOD-3, SOD-4, SOD-5, SOD-6, SOD-7,  
 PGI-1, PGI-2, PGI-4.  
 Número total de loci invariables = 18.

\* Loci polimórficos.

ALP-1, DIA-3, EST-2,  
 MDH-1, PGI-3.  
 Número total de loci polimórficos = 5.

*Gracilaria ferox.*

\* Loci invariables.

ALP-1, DIA-1, DIA-2, EST-1, EST-4  
 Fe-1, MDH-1, MDH-2, MDH-3, PGM-1,  
 PGI-1, PGI-2, PGI-4, SOD-3, SOD-4,  
 SOD-6.  
 Número total de loci invariables = 16.

\* Loci polimórficos.

EST-3, PGI-3.  
 Número total de loci polimórficos = 2.

---

### 6.2.1.- FICOERITRINA.

Sin realizar ninguna tinción en el gel, se observó en las tres especies la aparición de un grupo de bandas rojas fluorescentes bajo luz de ultravioleta. En *Gelidium canariensis* se observaron dos bandas muy definidas. La primera de color rojo intenso fluorescente, con una movilidad relativa de 0.38, mientras que la segunda, con una movilidad ligeramente mayor ( $R_f = 0.40$ ) fue de color violáceo. Esta última banda, no se observó con claridad en *Gelidium arbuscula*, y nunca en *Gracilaria ferox* por lo que no se tuvo en cuenta en el cómputo global de las bandas, mientras que la primera se observó con claridad y con la misma movilidad electroforética en todas las especies considerándose como un estándar interno de movilidad. Esta banda se identificó como una banda de biliproteína, concretamente de R-ficoeritrina tal como se ha descrito en otros estudios de Rodofitas, (Fujio *et al.*, 1987; Lindstrom y South, 1989; Mallery y Richardson, 1971; 1972); y se consideró codificada por el locus Fe-1, invariable en todas las subpoblaciones de las tres especies (Figura 6.1.a).

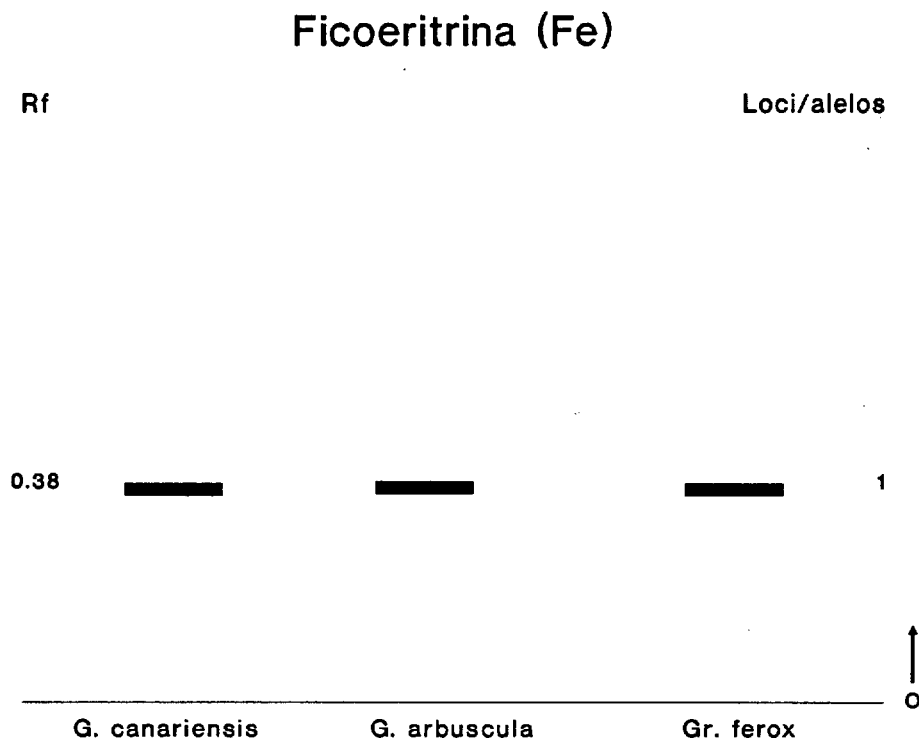
### 6.2.2.- FOSFATASA ALCALINA.

En esta enzima se observaron, en ambas especies de *Gelidium*, dos bandas con igual movilidad relativa. Una de ellas coincidía con la migración de la banda de ficoeritrina ( $R_f = 0.38$ ) siendo, a su vez, la banda más observada en todos los individuos. La segunda poseía una migración mayor, ( $R_f = 0.43$ ) y aparecía sólo en algunos individuos diploides.

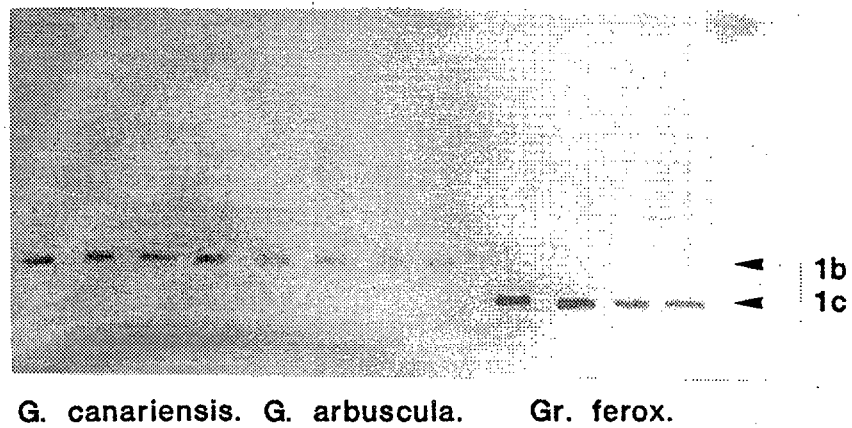
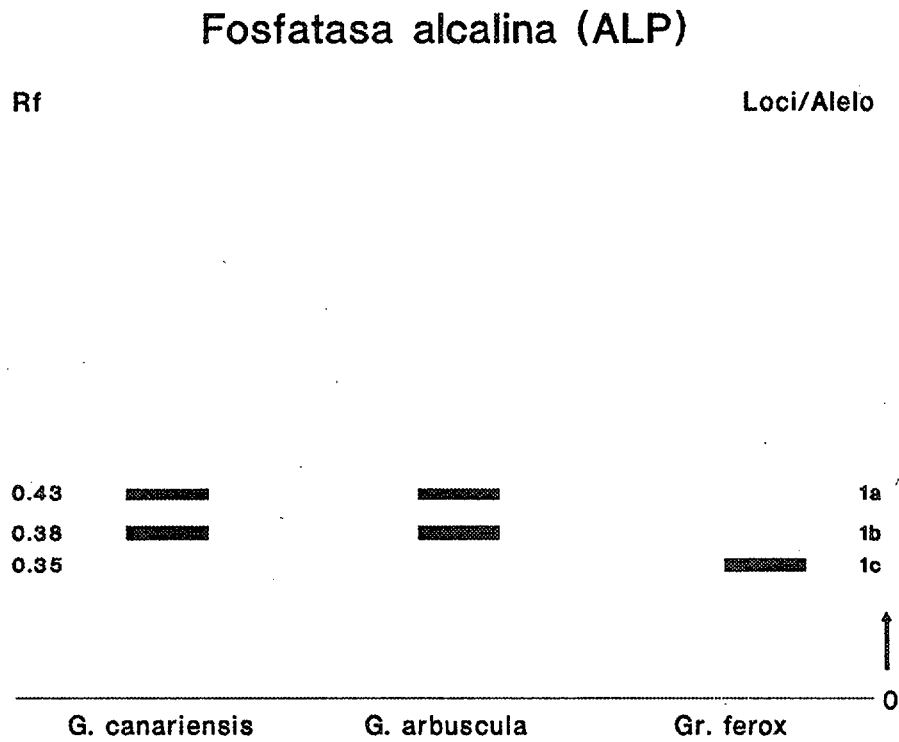
Estos resultados se interpretaron como la expresión de un sólo locus (ALP-1) con dos alelomorfos: ALP-1a (de mayor movilidad) y ALP-1b (de movilidad igual que la banda de ficoeritrina) que codifican cada uno para una enzima monomérica (Figura 6.1.b).

En *Gracilaria ferox* se detectó siempre una sólo banda con una movilidad relativa menor ( $R_f = 0.35$ ) a las dos bandas detectadas en ambas especies de *Gelidium*. Se consideró pues como un sólo locus fijado para el alelo ALP-1c en todas las subpoblaciones estudiadas (Figura 6.1.b).

**FIGURA 6.1a. Representación del zimograma obtenido para la ficoeritrina.**  
Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis.  
Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.



**FIGURA 6.1b. Representación del zimograma obtenido para la enzima fosfatasa alcalina. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.**





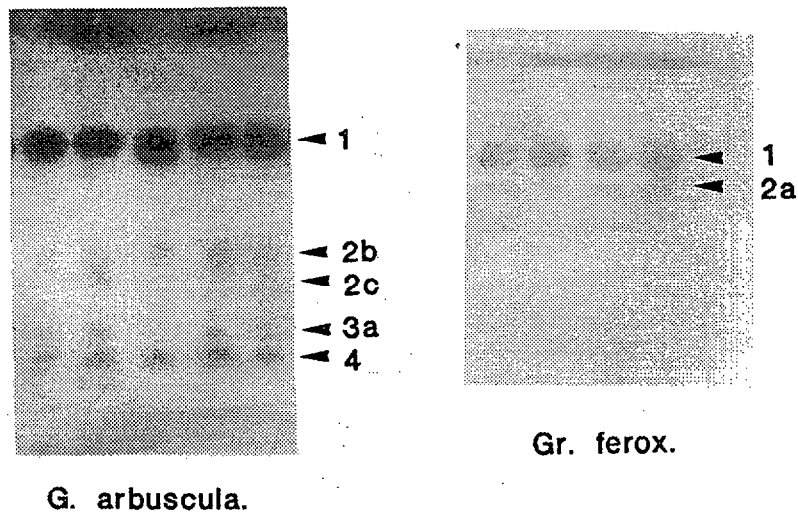
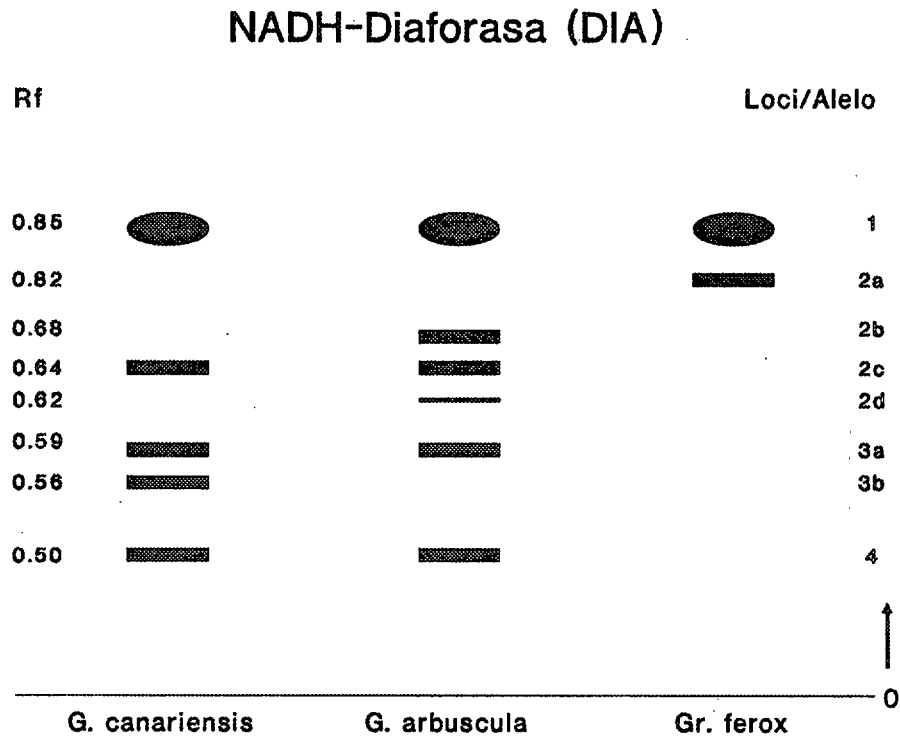
### 6.2.3.- DIAFORASA.

La tinción de los geles para esta enzima en *Gracilaria ferox* sólo dio lugar a la observación de dos bandas con unas movilidades electroforéticas altas (0.85 y 0.82). Al detectarse ambas bandas en los individuos haploides y estar presentes en todos los individuos analizados, se consideraron estar codificadas por dos loci invariables: DIA-1 y DIA-2a. (Figura 6.1.c).

En *Gelidium arbuscula* se detectaron 6 bandas diferentes. Tres de ellas, la de mayor movilidad (0.85) y las dos de menor movilidad (0.50 y 0.59) aparecían en todos los individuos, esporofitos y gametofitos, por lo que se consideraron ser el producto de tres loci invariables, DIA-1, DIA-3a y DIA-4. Las restantes bandas, con una movilidad intermedia, se detectaron por parejas en algunos individuos diploides, mientras que en los individuos haploides sólo se detectó una de las tres bandas. Este resultado se interpretó como una enzima monomérica codificada por un locus (DIA-2), con tres electromorfos, DIA-2b, DIA-2c y DIA-2d.

En *Gelidium canariensis* se detectaron un total de cinco bandas. Tres de estas bandas se encontraron en todos los individuos analizados, coincidiendo en movilidad con tres bandas detectadas en *Gelidium arbuscula* ( $R_f = 0.85, 0.64$  y  $0.50$ ), (Figura 6.1.c). Por todo ello, se consideraron como loci invariables, DIA-1, DIA-2c y DIA-4 respectivamente. Otras dos bandas se detectaron separadamente en los gametofitos, coexistiendo sólo en algunos individuos esporofíticos. Estos resultados sugieren, al igual que en *Gelidium arbuscula*, que estas dos últimas bandas se corresponden con un locus constituido por dos alelos, DIA-3a y DIA-3b de una enzima monomérica que en heterocigosis da lugar a dos bandas en el gel. Las movilidades electroforéticas de estos alelomorfos fueron de 0.59 y 0.56 respectivamente (Figura 6.1.c).

FIGURA 6.1.c. Representación del zimograma obtenido para la enzima Diaforasa.. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.



#### 6.2.4.- ESTERASA.

En *Gelidium* se detectaron cuatro bandas con igual movilidad en ambas especies. Dos de ellas, ( $R_f = 0.35$  y  $0.82$ ) aparecieron en todos los individuos analizados, independientemente de la fase del ciclo biológico; debido a ello, se consideraron como dos loci (EST-1 y EST-4) fijados para el alelo *a* y *b* respectivamente en ambas especies (Figura 6.1.d). Las otras dos bandas detectadas ( $R_f = 0.60$  y  $0.58$ ) variaron, en su aparición, según los individuos analizados. Nunca aparecían las dos bandas juntas en los individuos haploides, sólo en algunos individuos diploides. Debido a que no se detectó ninguna banda de movilidad intermedia se consideró que ambas bandas estaban codificadas por el locus EST-2, con dos alelos variables, EST-2a y EST-2b (Figura 6.1.d).

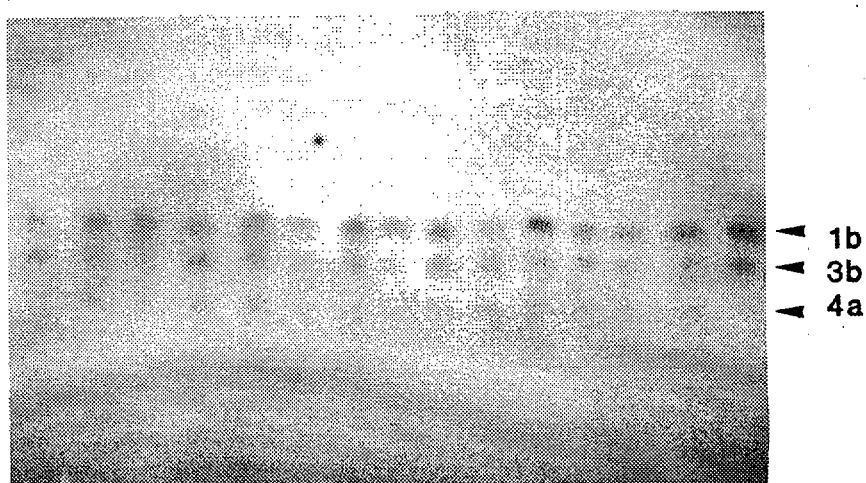
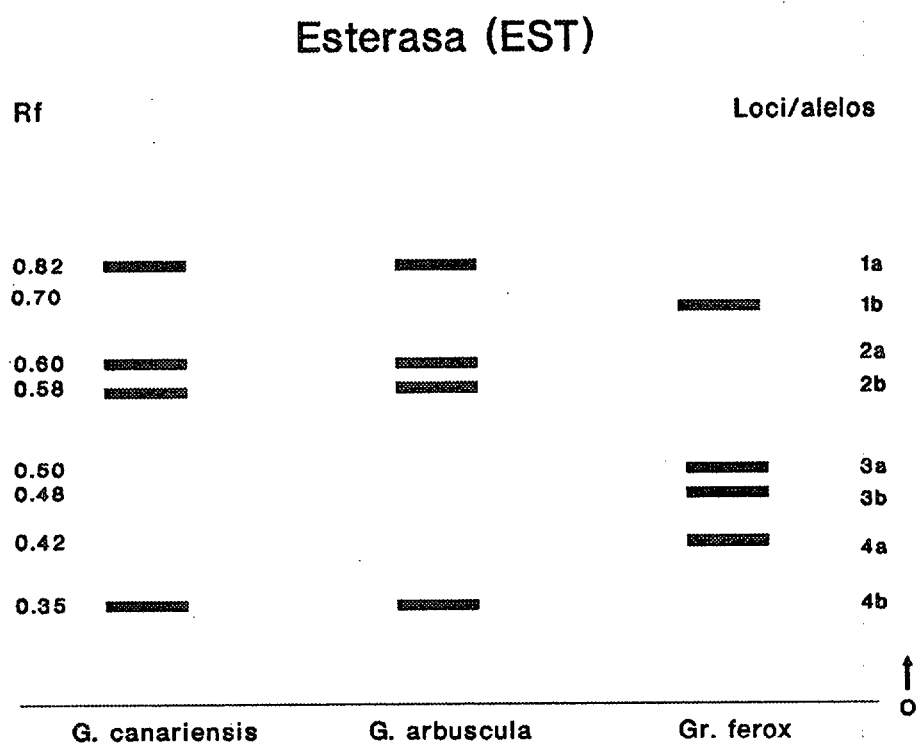
En *Gracilaria ferox* se detectaron cuatro bandas pero sus movilidades electroforéticas no coincidían con ninguna de las movilidades de *Gelidium*. (Figura 6.1.d). Dos de ellas aparecieron igualmente en todos los individuos analizados, incluyendo gametofitos, por lo que se consideró ser el producto de dos loci (EST-1 y EST-4), fijados para el alelo *b* y *a* respectivamente (Figura 6.1.d). Las otras dos bandas sólo se detectaron juntas en la fase esporofítica, nunca en la fase gametofítica. Ambas bandas corrían muy juntas en el gel ( $R_f = 0.50$  y  $0.48$ ); al no coincidir sus movilidades con ninguna de las bandas de *Gelidium*, se consideraron ser el producto de un locus con dos electromorfos, EST-3a y EST-3b respectivamente.

En las tres especies se detectaron otras bandas, pero debido a su inconsistencia no se pudieron interpretar genéticamente.

#### 6.2.5.- GLUTAMATO DESHIDROGENASA.

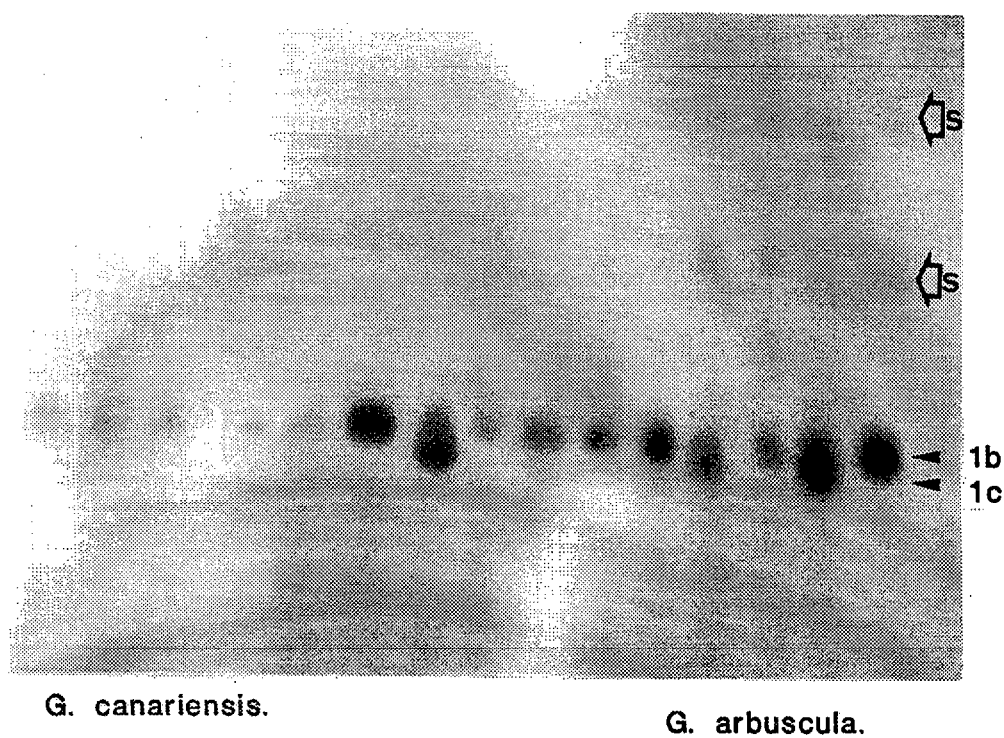
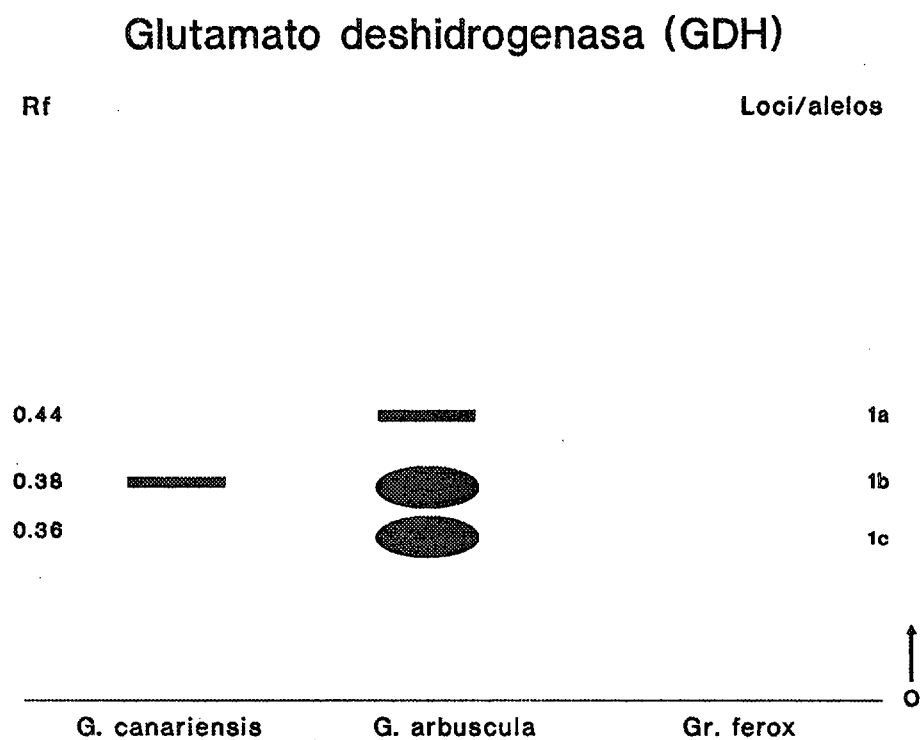
Esta enzima ofreció resultados muy diferentes en cada especie analizada. En *Gelidium arbuscula* se detectaron tres bandas con similares movilidades electroforética (Figura 6.1.e). Estas tres bandas siempre se encontraron por separado en los individuos haploides mientras que en la fase esporofítica se encontraron individuos con una sólo banda o con la combinación de dos de ellas, no detectándose nunca más de dos bandas juntas en un mismo individuo. Estos resultados se interpretaron como la expresión de un

**FIGURA 6.1.d. Representación del zimograma obtenido para la enzima esterasa. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.**



Gr. ferox.

**FIGURA 6.1.e.** Representación del zimograma obtenido para la enzima glutamato deshidrogenasa. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.



locus (GDH-1) con tres electromorfos: GDH-1a, GDH-1b y GDH-1c, siendo GDH una enzima monomérica que en heterocigosis da lugar a dos bandas en el gel.

En *Gelidium canariensis* se obtuvo siempre una banda constante que coincidía, en movilidad, con la banda de ficoeritrina y que se detectó en cualquier estado reproductivo. Dicha banda se consideró como el producto de codificación de un único locus fijado para el alelo *b* (Figura 6.1.e).

En *Gracilaria ferox* no se detectó actividad para este sistema enzimático.

#### 6.2.6.- MALATO DESHIDROGENASA.

En *Gelidium arbuscula* se encontraron 4 bandas diferentes (Figura 6.1.f) que nunca aparecieron juntas en el mismo individuo gametofítico. Este hecho se interpretó como dos loci polimórficos MDH-1 y MDH-3. Los alelomorfos del primer locus (MDH-1a y MDH-1b) poseían unos valores de  $R_f = 0.73$  y  $0.62$  respectivamente, mientras que los alelomorfos del segundo locus, (MDH-3a y MDH-3b) poseían unas movilidades relativas de  $0.55$  y  $0.53$  respectivamente, (Figura 6.1.f).

En *Gelidium canariensis* se observaron tres bandas con iguales movilidades relativas que los alelos MDH-1a, MDH-1b y MDH-3b de *Gelidium arbuscula*, interpretándose como el resultado de dos loci, siendo el primero variable, con dos alelos: MDH-1a y MDH-1b y el segundo fijado en las seis subpoblaciones para el alelo MDH-3b. (Figura 6.1.f).

En *Gracilaria ferox* se detectaron igualmente tres bandas, teniendo las dos primeras igual movilidad que los dos alelomorfos de MDH-1 de ambas especies de *Gelidium*. Al detectarse ambas bandas en individuos haploides, se consideraron como dos loci invariables. Por su igualdad en movilidad con el primer electromorfo de *Gelidium* se consideró al primer locus, MDH-1, fijado para el alelo *a*. Para diferenciar el segundo locus del alelo MDH-1b de *Gelidium*, se denominó MDH-2. (Figura 6.1.f). La tercera banda detectada en *Gracilaria ferox* poseía la menor movilidad electroforética de todas las bandas de MDH de las tres especies ( $R_f = 0.50$ ) y se consideró ser el producto del alelo MDH-3c que se encuentra fijado en esta especie. En

---

esta enzima se detectaron otras bandas en el gel, pero debido a la imposibilidad de interpretación genética, no se incluyeron en el cómputo global.

#### 6.2.7.- FOSFOGLUCOISOMERASA.

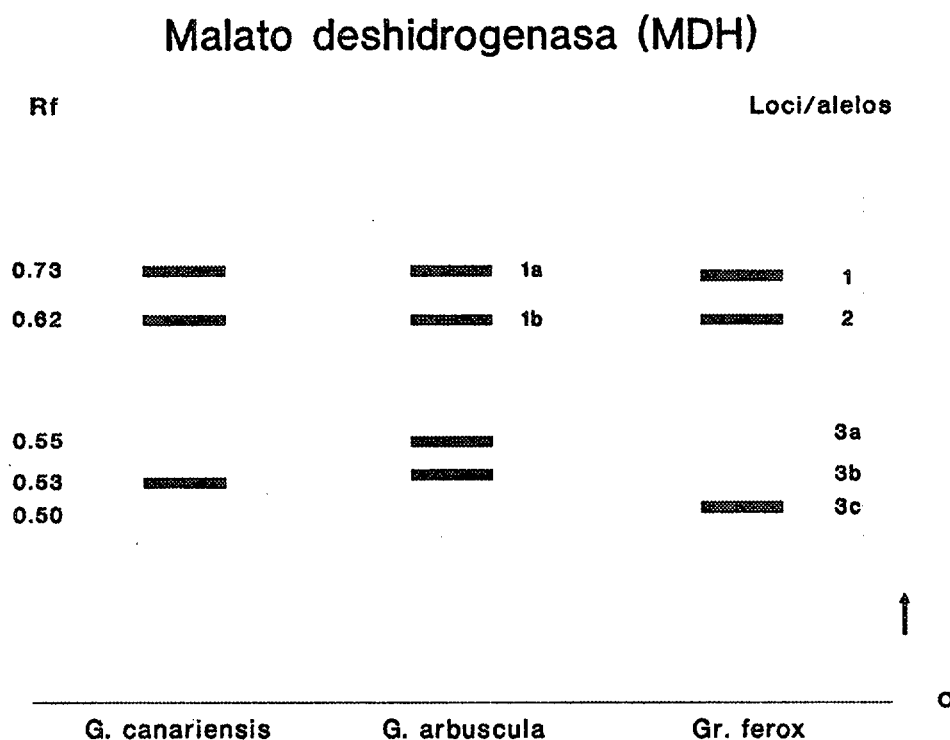
El número de bandas y sus movilidades relativas fueron muy similares en las tres especies analizadas. En *Gelidium arbuscula* se detectaron 5 bandas diferentes, dos de las cuales, las de mayor movilidad electroforética, aparecían en todos los individuos analizados, por lo que se consideraron como dos loci invariables, PGI-1 y PGI-2 (Figura 6.1.g). Las otras tres bandas se detectaron juntas sólo en algunos individuos diploides, mientras que en los individuos haploides aparecía una sólo banda, que nunca fue la banda intermedia. Esta banda intermedia, aparecía con una mayor intensidad que las dos bandas contiguas. Este resultado se consideró como el producto de un locus constituido por dos alelos, PGI-3b y PGI-3c que codifican para una enzima dimérica, apareciendo la banda de movilidad intermedia en los individuos heterocigóticos. Las movilidades relativas de las mismas fueron de 0.55 y 0.49 para ambos alelos, y de 0.52 para la banda intermedia (Figura 6.1.g).

Por la misma razón descrita en *Gelidium arbuscula*, se detectaron dos loci, PGI-1 y PGI-2 en *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*. Asimismo se detectaron dos loci más en *Gelidium canariensis* siendo uno de ellos variable (Figura 6.1.g), correspondiendo con el locus PGI-3, con dos alelos, PGI-3b y PGI-3c con idéntica movilidad que en *Gelidium arbuscula*. La última banda, con la menor movilidad dentro de PGI ( $R_f = 0.40$ ) fue invariable, detectándose en todos los individuos analizados, por lo que se consideró como el producto del locus PGI-5.

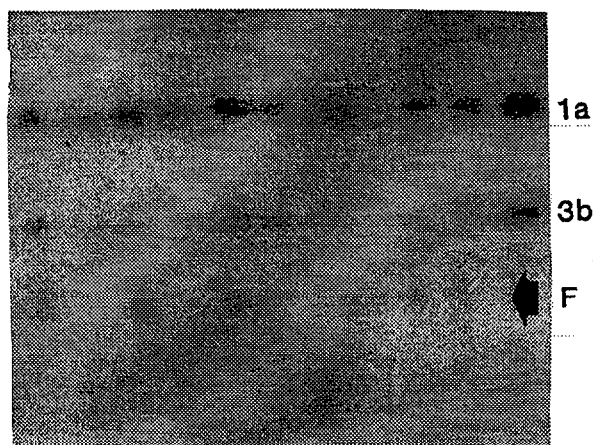
En ambas especies de *Gelidium* se detectaron otras bandas con diferentes movilidades en los geles teñidos para PGI, pero debido a que no se pudieron interpretar genéticamente, no se consideraron en el presente estudio.

En *Gracilaria ferox* se detectó otra banda invariable con una movilidad de 0.49 que se consideró como el producto de un sólo locus, PGI-4. También se observaron tres bandas con unas movilidades de 0.58, 0.56 y

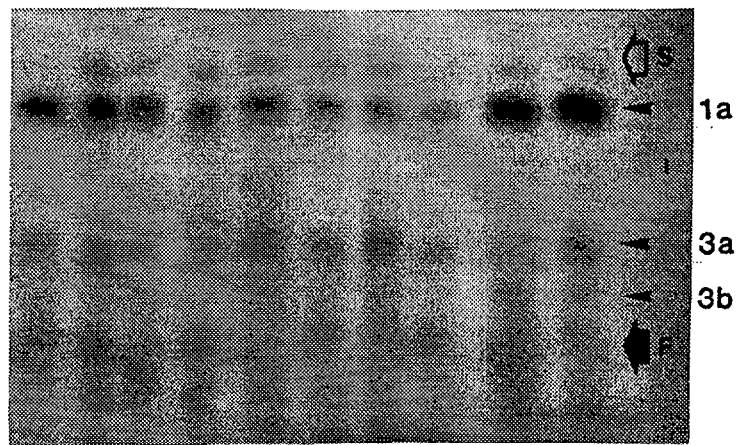
**FIGURA 6.1.f.** Representación del zimograma obtenido para la enzima malato deshidrogenasa. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.



© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2003



G. canariensis.

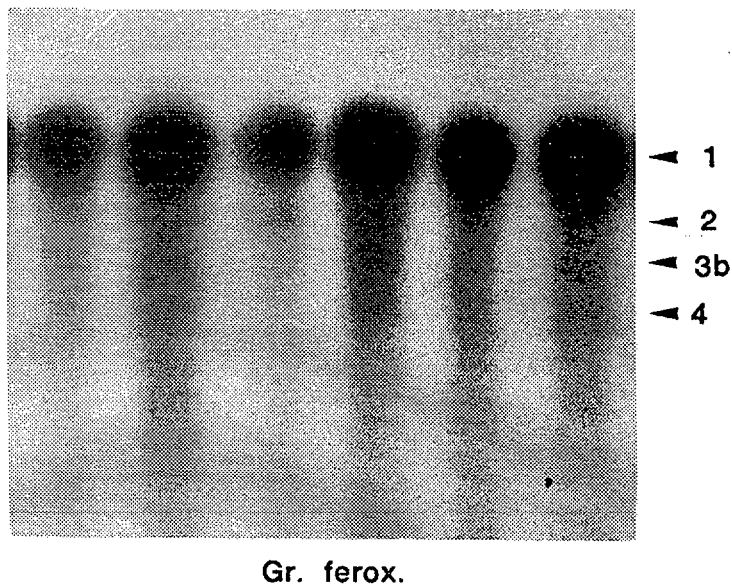
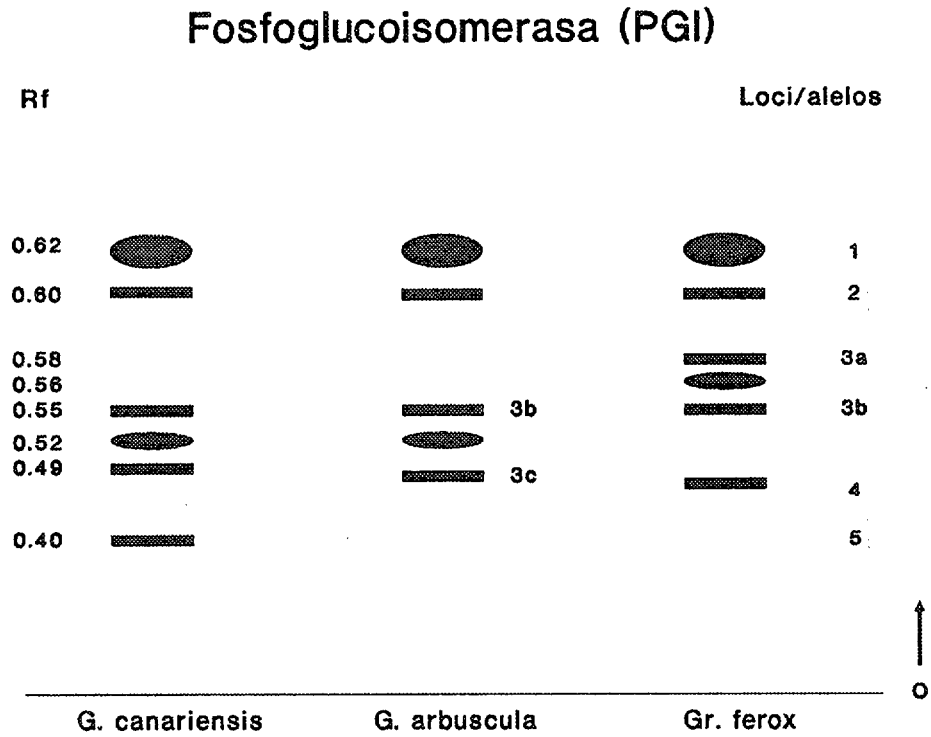


G. arbuscula.

F= Banda de ficoeritrina.  
 S= Efecto "sin deshidrogenasa".



**FIGURA 6.1.g. Representación del zimograma obtenido para la enzima fosfoglucoisomerasa. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.**



---

0.54 respectivamente, que siguiendo la interpretación descrita anteriormente se consideró como el producto de un locus (PGI-3) con dos alelos, PGI-3a y PGI-3b (Figura 6.1.g).

#### 6.2.8.- FOSFOGLUCOMUTASA.

El revelado de esta enzima mostró una sola zona de actividad de igual movilidad en las tres especies analizadas ( $R_f = 0.79$ ) independientemente de la ploidía de los individuos. Esta banda única y constante se interpretó como la codificación de un locus, PGM-1, invariable en las tres especies (Figura 6.1.h).

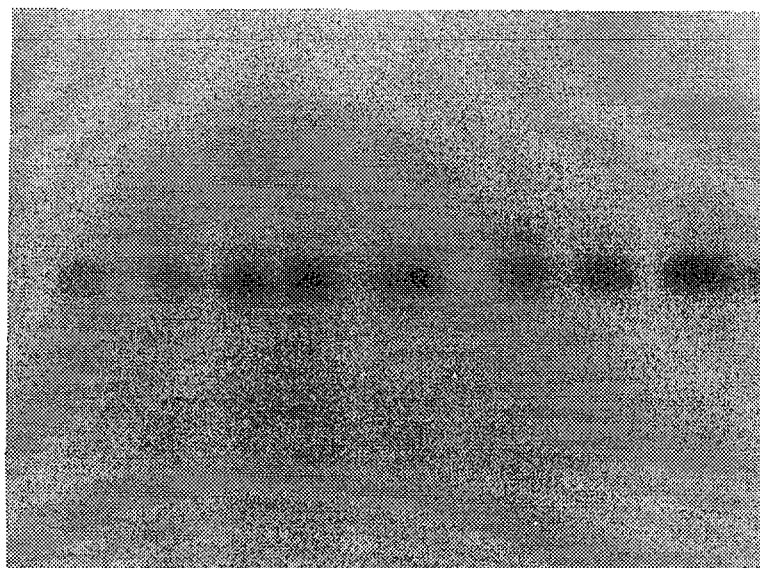
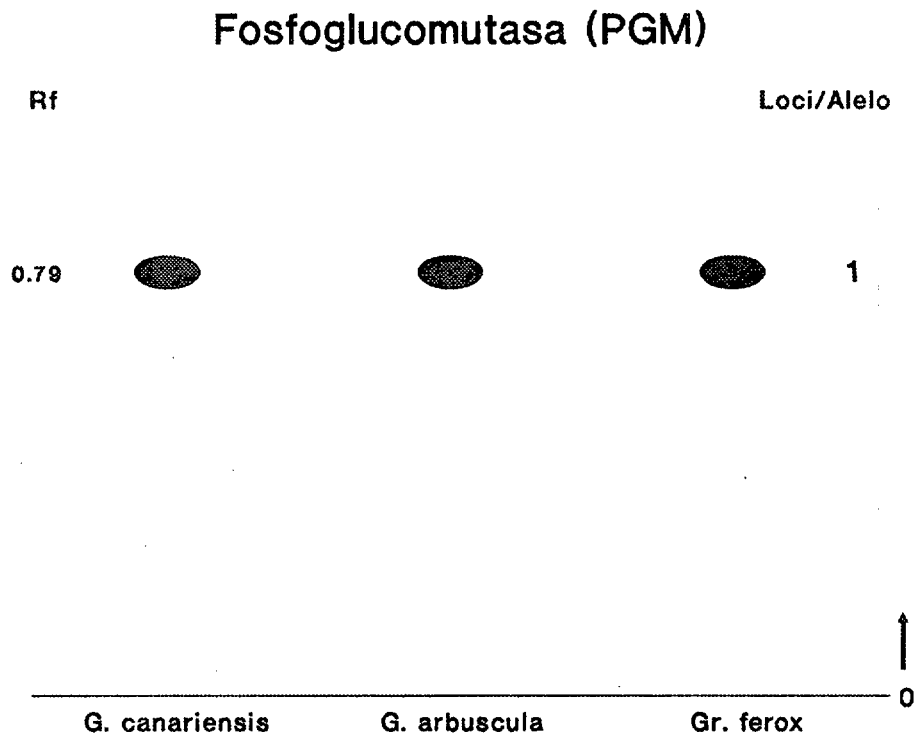
#### 6.2.9.- SUPEROXIDO DISMUTASA.

En *Gelidium canariensis* se detectaron 6 bandas invariables en todos los individuos, no existiendo diferencia entre los individuos haploides y diploides (Figura 6.1.i). Este resultado se interpretó considerando que cada banda constituía un locus, detectándose por tanto 6 loci invariables (SOD-2, SOD-3, SOD-4a, SOD-5, SOD-6 y SOD-7) con las movilidades relativas mostradas en la Figura 6.1.i.

En *Gelidium arbuscula* los resultados fueron muy similares, detectándose también 6 bandas invariables entre los individuos analizados. 5 de estas bandas coincidían en movilidad con las cinco primeras bandas de *Gelidium canariensis*, (Figura 6.1.i), SOD-2, SOD-3, SOD-4a, SOD-5 y SOD-6. La sexta banda presentaba una mayor movilidad en comparación a las detectadas en *Gelidium canariensis* ( $R_f = 0.9$ ) por lo que se consideró como un locus invariable (SOD-1). SOD-7 no se observó en *Gelidium arbuscula*.

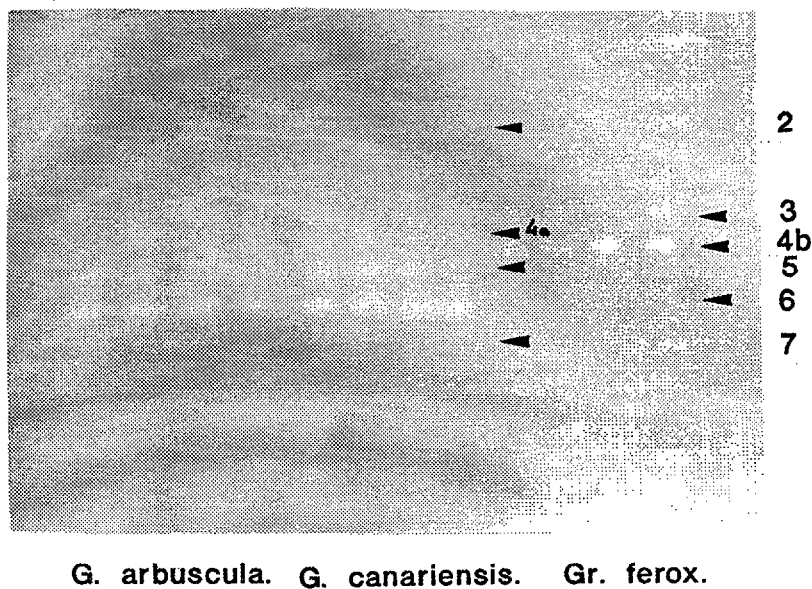
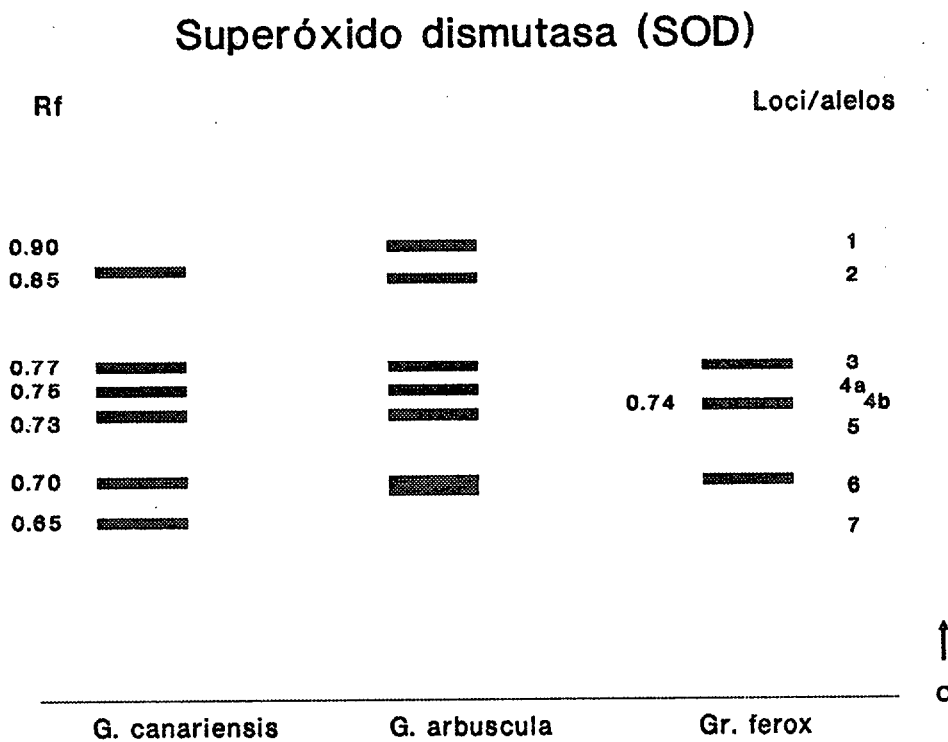
En *Gracilaria ferox* sólo se detectaron 3 bandas que se interpretaron como tres loci. Dos de ellos coincidían en su movilidad relativa con SOD-3 y SOD-6 de ambas especies de *Gelidium*, mientras que la tercera poseía un  $R_f$  ligeramente inferior al alelomorfo SOD-4a, por lo que se consideró como el producto del alelo fijado SOD-4b (Figura 6.1.i).

**FIGURA 6.1.h.** Representación del zimograma obtenido para la enzima fosfoglucomutasa. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.



G. canariensis.                      G. arbuscula.

**FIGURA 6.1.i.** Representación del zimograma obtenido para la enzima superóxido dismutasa. Rf= Movilidad relativa de las bandas. o= Origen de la electroforesis. Loci/alelos= Número de loci y alelos identificados.



### 6.3.- Frecuencias génicas y genotípicas.

En las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4 se describen las frecuencias genotípicas de los loci polimórficos y el número de individuos analizados, en cada subpoblación de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*.

En las Tablas 6.5, 6.6 y 6.7 se muestran las frecuencias alélicas detectadas en cada subpoblación de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*.

En PGI-3 de *Gelidium arbuscula* sólo se detectó variabilidad en la subpoblación esporofítica de Pto. Cruz, mientras que en el resto de las subpoblaciones se encontró fijado el alelo PGI-3b (Tabla 6.5). Resultados similares se encontraron en ALP-1, donde el alelo ALP-1a sólo se encontró en la subpoblación esporofítica de Agaete, estando fijado en el resto de las subpoblaciones. Sólo DIA-2 fue polimórfico en todas las subpoblaciones analizadas, mientras que EST-2 fue polimórfico en todas las subpoblaciones esporofíticas, estando fijado para el alelo EST-2a en todas las subpoblaciones gametofíticas.

En *Gelidium canariensis* sólo PGI-3 fue variable en todas las subpoblaciones analizadas (Tabla 6.6). El alelo mayoritario fue PGI-3c excepto en la subpoblación gametofítica de Gáldar. ALP-1 sólo fue polimórfico en la subpoblación esporofítica de Agaete, siendo el alelo ALP-1b el mayoritario en todas las subpoblaciones. Resultados similares se encontraron en MDH-1, detectándose variabilidad en las subpoblaciones esporofíticas de Agaete y Pto. Cruz.

En EST-3 de *Gracilaria ferox* sólo se encontró polimorfismo en la subpoblación esporofítica de Gáldar, (Tabla 6.7) mientras que PGI-3 fue polimórfico en las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas de Las Palmas y Gáldar respectivamente.

**TABLA 6.2. Frecuencias genotípicas de los loci polimórficos detectados en las poblaciones de *Gelidium arbuscula*. (En cada locus se indica el genotipo de los esporofitos y de los gametofitos). El guión (----) indica la inexistencia de gametofitos heterocigóticos. *Nt* = Número de individuos totales analizados en cada locus.**

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Agate.</i>		<i>Pto. Cruz.</i>	
	<i>Esporo- fitos</i>	<i>Gameto- fitos.</i>	<i>Esporo- fitos.</i>	<i>Gameto- fitos.</i>	<i>Esporo- fitos.</i>	<i>Gameto- fitos.</i>
PGI-3bb/3b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PGI-3cc/3c	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	1.00
PGI-3bc	0.00	----	0.00	----	0.14	----
<i>Nt</i>	39	12	49	19	37	14
EST-2aa/2a	0.13	1.00	0.29	1.00	0.58	1.00
EST-2bb/2b	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
EST-2ab	0.73	----	0.71	----	0.42	----
<i>Nt</i>	45	12	38	15	31	16
GDH-1aa/1a	0.18	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00
GDH-1bb/1b	0.27	0.83	0.85	1.00	1.00	1.00
GDH-1cc/1c	0.06	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
GDH-1ab	0.42	----	0.00	----	0.00	----
GDH-1ac	0.00	----	0.00	----	0.00	----
GDH-1bc	0.06	----	0.05	----	0.00	----
<i>Nt</i>	33	12	39	19	35	11
ALP-1aa/1a	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00
ALP-1bb/1b	1.00	1.00	0.88	1.00	1.00	1.00
ALP-1ab	0.00	----	0.06	----	0.00	----
<i>Nt</i>	42	12	49	16	38	13
MDH-1aa/1a	1.00	1.00	0.67	1.00	0.39	1.00
MDH-1bb/1b	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00
MDH-1ab	0.00	----	0.25	----	0.61	----
<i>Nt</i>	46	15	48	14	31	13
MDH-3aa/1a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MDH-3bb/1b	1.00	1.00	0.96	1.00	0.61	1.00
MDH-3ab	0.00	----	0.04	----	0.39	----
<i>Nt</i>	43	14	48	18	31	11
DIA-2bb/2b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.80
DIA-2cc/2c	0.19	0.10	0.75	0.73	0.04	0.20
DIA-2dd/2d	0.45	0.90	0.00	0.27	0.00	0.00
DIA-2bc	0.00	----	0.06	----	0.52	----
DIA-2bd	0.00	----	0.00	----	0.00	----
DIA-2cd	0.35	----	0.19	----	0.00	----
<i>Nt</i>	31	20	48	22	46	15

**TABLA 6.3. Frecuencias genotípicas detectadas en los loci polimórficos en las poblaciones de *Gelidium canariensis*.** (En cada locus se indica el genotipo de los esporofitos y de los gametofitos). El guión (----) indica la inexistencia de gametofitos heterocigóticos.

*Nt* = Número de individuos totales analizados en cada locus.

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Agæete.</i>		<i>Pto. Cruz.</i>	
	<i>Esporo- fitos</i>	<i>Gameto- fitos.</i>	<i>Esporo- fitos.</i>	<i>Gameto- fitos.</i>	<i>Esporo- fitos.</i>	<i>Gameto- fitos.</i>
<i>EST-2aa/2a</i>	0.00	0.20	0.28	0.75	0.06	0.00
<i>EST-2bb/2b</i>	0.94	0.80	0.22	0.25	0.56	1.00
<i>EST-2ab</i>	0.06	----	0.50	----	0.375	----
<i>Nt</i>	32	15	36	16	32	12
<i>DIA-3aa/2a</i>	0.00	0.00	0.11	0.33	0.07	0.00
<i>DIA-3bb/2b</i>	0.54	1.00	0.67	0.67	0.60	1.00
<i>DIA-3ab</i>	0.45	----	0.22	----	0.33	----
<i>Nt</i>	33	11	37	18	42	12
<i>PGI-3bb/3b</i>	0.32	0.89	0.00	0.22	0.26	0.25
<i>PGI-3cc/3c</i>	0.68	0.11	0.84	0.78	0.51	0.75
<i>PGI-3bc</i>	0.00	----	0.16	----	0.23	----
<i>Nt</i>	44	18	37	18	43	12
<i>ALP-1aa/1a</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>ALP-1bb/1b</i>	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	1.00
<i>ALP-1ab</i>	0.00	----	0.05	----	0.00	----
<i>Nt</i>	32	11	37	18	50	12
<i>MDH-1aa/1a</i>	1.00	1.00	0.96	1.00	0.79	1.00
<i>MDH-1bb/1b</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>MDH-1ab</i>	0.00	----	0.04	----	0.21	----
<i>Nt</i>	40	18	23	17	39	11

**TABLA 6.4. Frecuencias genotípicas de los loci polimórficos detectados en las poblaciones de *Gracilaria ferox*. (En cada locus se indica el genotipo de los esporofitos y de los gametofitos). El guión (----) indica la inexistencia de gametofitos heterocigóticos. *Nt* = Número de individuos totales analizados en cada locus.**

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Las Palmas.</i>	
	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.
EST-3aa/3a	0.00	0.00	0.00	0.00
EST-3bb/3b	0.75	1.00	1.00	1.00
EST-3ab	0.25	----	0.00	----
<i>Nt</i>	8	34	8	47
PGI-3aa/3a	0.00	0.00	0.00	0.60
PGI-3bb/3b	0.87	1.00	1.00	0.40
PGI-3ab	0.13	----	0.00	----
<i>Nt</i>	8	39	16	54



**TABLA 6.5.** Frecuencias alélicas de los loci polimórficos detectados en las poblaciones de *Gelidium arbuscula*. En cada locus se indica la frecuencia de cada alelo en cada población.

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Agate.</i>		<i>Pto. Cruz.</i>		
	<i>Alelo.</i>	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.
PGI-3b		0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00
PGI-3c		1.00	1.00	1.00	1.00	0.93	1.00
EST-2a		0.50	1.00	0.64	1.00	0.79	1.00
EST-2b		0.50	0.00	0.36	0.00	0.21	0.00
GDH-1a		0.39	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00
GDH-1b		0.52	0.83	0.87	1.00	1.00	1.00
GDH-1c		0.09	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00
ALP-1a		0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00
ALP-1b		1.00	1.00	0.91	1.00	1.00	1.00
MDH-1a		1.00	1.00	0.79	1.00	0.69	1.00
MDH-1b		0.00	0.00	0.21	0.00	0.31	0.00
MDH-3a		0.00	0.00	0.02	0.00	0.19	0.00
MDH-3b		1.00	1.00	0.98	1.00	0.81	1.00
DIA-2b		0.00	0.00	0.03	0.00	0.70	0.80
DIA-2c		0.37	0.10	0.88	0.73	0.30	0.20
DIA-2d		0.63	0.90	0.09	0.27	0.00	0.00

**TABLA 6.6. Frecuencias alélicas de los loci polimórficos detectados en las poblaciones de *Gelidium canariensis*. En cada locus se indica la frecuencia de cada alelo en cada población.**

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Agate.</i>		<i>Pto. Cruz.</i>		
	<i>Alelo.</i>	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.
EST-2a		0.03	0.20	0.53	0.75	0.25	0.00
EST-2b		0.97	0.80	0.47	0.25	0.75	1.00
DIA-3a		0.23	0.00	0.22	0.33	0.24	0.00
DIA-3b		0.77	1.00	0.78	0.67	0.76	1.00
PGI-3b		0.32	0.89	0.08	0.22	0.37	0.25
PGI-3c		0.68	0.11	0.92	0.78	0.63	0.75
ALP-1a		0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
ALP-1b		1.00	1.00	0.97	1.00	1.00	1.00
MDH-1a		1.00	1.00	0.98	1.00	0.90	1.00
MDH-1b		0.00	0.00	0.02	0.00	0.10	0.00

**TABLA 6.7. Frecuencias alélicas de los loci polimórficos detectados en las poblaciones de *Gracilaria ferox*. En cada locus se indica la frecuencia de cada alelo en cada población.**

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Las Palmas.</i>		
	<i>Alelo.</i>	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.
EST-3a		0.13	0.00	0.00	0.00
EST-3b		0.87	1.00	1.00	1.00
PGI-3a		0.06	0.00	0.00	0.60
PGI-3b		0.94	1.00	1.00	0.40

#### 6.4.- Variabilidad genética.

Las Tablas 6.8, 6.9 y 6.10 muestran el número medio de alelos por locus (NMA), el número medio de alelos por locus polimórfico (NMAP) y la proporción de loci polimórficos (P), de las subpoblaciones estudiadas en *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* respectivamente.

##### 6.4.1.- NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS.

En todas las localidades analizadas, el NMA de las subpoblaciones gametofíticas fue inferior al NMA de las subpoblaciones esporofíticas, excepto en *Gracilaria ferox*.

El valor medio global dentro de *Gelidium arbuscula* fue de 1.15, siendo la media global de las subpoblaciones gametofíticas de 1.06 y de las esporofíticas de 1.24 (Tabla 6.8).

La variación del NMA en *Gelidium canariensis* fue menor, (Tabla 6.9), encontrándose valores que oscilaron entre 1.08 alelos en las subpoblaciones gametofíticas de Gáldar y Pto. Cruz y 1.21 en la subpoblación esporofítica de Agaete. Por otro lado, el NMA global de la especie fue igual

**TABLA 6.8. Proporción de loci polimórficos y número medio de alelos por locus detectados en las poblaciones de *Gelidium arbuscula*.**

Pobla- ción.	Fase del ciclo.	Nº medio alelos locus.	Nº medio alelos locus polimórfico.	Proporción loci polimórficos.	
				Criterio 95%	99%
Gáldar.	Esporofitos.	1.18	2.33	0.136	0.136
	Gametofitos.	1.09	2.00	0.091	0.091
Agaete.	Esporofitos.	1.32	2.17	0.227	0.273
	Gametofitos.	1.04	2.00	0.045	0.045
Pto. Cruz.	Esporofitos.	1.23	2.00	0.227	0.227
	Gametofitos.	1.04	2.00	0.045	0.045
Media esporofitos.		1.24	2.17	0.196	0.212
Media gametofitos.		1.06	2.00	0.060	0.060
Media de la especie.		1.15	2.08	0.128	0.136

**TABLA 6.9.** Proporción de loci polimórficos y número medio de alelos por locus detectados en las poblaciones de *Gelidium canariensis*.

Población.	Fase del ciclo.	Nº medio alelos locus.	Nº medio alelos locus polimórfico.	Proporción loci polimórficos.	
				Criterio 95%	Criterio 99%
Gáldar.	Esporofitos.	1.13	2.00	0.087	0.130
	Gametofitos.	1.08	2.00	0.087	0.087
Agaete.	Esporofitos.	1.21	2.00	0.130	0.217
	Gametofitos.	1.13	2.00	0.130	0.130
Pto. Cruz.	Esporofitos.	1.17	2.00	0.174	0.174
	Gametofitos.	1.08	2.00	0.043	0.043
Media esporofitos.		1.17	2.00	0.130	0.173
Media gametofitos.		1.10	2.00	0.087	0.087
Media de la especie.		1.13	2.00	0.108	0.130

**TABLA 6.10. Proporción de loci polimórficos y número medio de alelos por locus detectados en las poblaciones de *Gracilaria ferox*.**

Población.	Fase del ciclo.	Nº medio alelos locus.	Nº medio alelos locus polimórfico.	Proporción loci polimórficos.	
				Criterio 99%	Criterio 95%
Gáldar.	Esporofitos	1.11	2.00	0.11	0.11
	Gametofitos	1.00	0.00	0.00	0.00
Las Palmas.	Esporofitos	1.00	0.00	0.00	0.00
	Gametofitos	1.05	2.00	0.05	0.05
Media esporofitos.		1.05	1.00	0.06	0.06
Media gametofitos.		1.02	1.00	0.03	0.03
Media de la especie.		1.04	1.00	0.04	0.04

a 1.13 alelos por locus, siendo la media global de las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas de 1.17 y 1.10 alelos por locus respectivamente.

En *Gracilaria ferox* el NMA varió de 1 alelo por locus en las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas de Las Palmas y Gáldar respectivamente, a 1.11 en la población diploide de Gáldar. La media global de la especie fue más baja que en *Gelidium*, siendo de 1.04 alelos. La media de las subpoblaciones gametofíticas fue la más baja de las tres especies, 1.02 alelos, siendo la media global de las subpoblaciones esporofíticas de 1.06 alelos por locus (Tabla 6.10).

#### 6.4.2.- NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS POLIMORFICO.

El número medio de alelos por locus polimórfico (NMAP) en *Gelidium arbuscula* varió desde 2.00 en todas las subpoblaciones gametofíticas a 2.33 en la subpoblación esporofítica de Gáldar. Siendo la media entre las subpoblaciones esporofíticas de 2.17 y entre las subpoblaciones gametofíticas de 2.00. Considerando toda la especie, la media fue de 2.08 (Tabla 6.8).

En *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*, el NMAP fue de 2.00 en todas las poblaciones, excepto en aquellas poblaciones de *Gracilaria ferox* donde no se detectó variabilidad (Tablas 6.9 y 6.10). La media global en esta última especie fue de un alelo por locus polimórfico.

#### 6.4.3.- PROPORCION DE LOCI POLIMORFICOS.

En *Gelidium arbuscula* y en *Gracilaria ferox* los dos criterios de polimorfismo proporcionaron los mismos resultados en todas las subpoblaciones, excepto en la población diploide de Agaete de *Gelidium arbuscula*. En *Gelidium canariensis* el criterio de polimorfismo elegido varió la proporción de loci polimórficos (P) en dos de las subpoblaciones (las subpoblaciones esporofíticas de Gáldar y Agaete). En las tres especies los valores obtenidos fueron diferentes, pero al igual que el NMA y NMAP, las subpoblaciones esporofíticas fueron, por lo general, más polimórficas que las haploides.

---

En *Gelidium arbuscula*, con el criterio del 95%, el porcentaje de loci polimórficos varió del 22.7% en las subpoblaciones diploides de Agaete y Pto. Cruz, al 4.5% en las subpoblaciones gametofíticas de las mismas localidades. La media dentro de la especie fue de 12.8% de loci polimórficos, siendo la media entre las subpoblaciones gametofíticas del 6%, mientras que entre las esporofíticas fue del 19.6% (Tabla 6.8).

Eligiendo el criterio del 99%, aumentó el grado de polimorfismo sólo en la población diploide de Agaete, alcanzando el 27.3%, siendo el grado de polimorfismo de la especie y de la subpoblación esporofítica del 13.6% y 21.2% respectivamente, no variando la media global de las subpoblaciones gametofíticas.

En *Gelidium canariensis* el grado de polimorfismo al 95% varió entre 4.3% de loci polimórficos en la población haploide de Pto. Cruz a un 17.4% en la fase diploide de la misma localidad. Las subpoblaciones esporofítica y gametofítica de Agaete tenían el mismo grado de polimorfismo, el 13%, siendo la media global de la especie de 10.8% distribuyéndose en un 8.7% de las subpoblaciones haploides y un 13% en las subpoblaciones diploides.

Con el criterio del 99%, el polimorfismo global de la especie aumentó a un 13%, al igual que la media de las subpoblaciones esporofíticas, que alcanzaron un grado de 17.3% (Tabla 6.9).

En *Gracilaria ferox*, la proporción de loci polimórficos no varió con el criterio de polimorfismo. En las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas de Gáldar y Las Canteras respectivamente, no se detectaron loci polimórficos, mientras que en las otras dos subpoblaciones analizadas el grado de polimorfismo fue más bajo que en *Gelidium*. La media global de las subpoblaciones gametofíticas fue del 3% mientras que la de las subpoblaciones esporofíticas fue del 6% siendo la media global de polimorfismo en la especie del 4% (Tabla 6.10).



#### 6.4.4.-HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA.

La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) (Tablas 6.11, 6.12 y 6.13) fue muy diversa entre los loci polimórficos de las diferentes especies, variando desde 0.005 en GDH-1 de Agaete en *Gelidium arbuscula* hasta 0.73 encontrado en EST-2 de la misma especie en la población de Gáldar. Las heterocigosidades medias variaron considerablemente de una especie a otra: 0.075 en *Gelidium arbuscula*, 0.038 en *Gelidium canariensis* y 0.011 en *Gracilaria ferox* (Tablas 6.11, 6.12 y 6.13).

Dentro de cada especie también se encontraron grandes variaciones en la heterocigosidad observada. En *Gelidium arbuscula*,  $H_o$  varió entre 0.060 en Agaete, a 0.094 en Pto. Cruz (Tabla 6.10). El mayor número de individuos heterocigóticos se encontró en el locus EST-2 de Gáldar ( $H_o = 0.733$ ), siendo este locus y DIA-2 donde se detectaron individuos heterocigóticos en todas las subpoblaciones. GDH-1 fue el locus polimórfico donde menos heterocigóticos se detectaron, (población de Agaete,  $H_o = 0.005$ ). En el locus ALP-1 sólo se pudieron detectar individuos heterocigóticos en la población de Agaete.

La heterocigosidad observada media en *Gelidium canariensis* fue menor que en *Gelidium arbuscula*. Su valor varió de 0.022 en Gáldar a 0.050 en Pto. Cruz, siendo la media de la especie de 0.038. Al igual que a *Gelidium arbuscula*, los loci donde más individuos heterocigóticos se detectaron fueron EST-2 y DIA-3, en las subpoblaciones de Agaete y Gáldar respectivamente. Entre todos los loci polimórficos, donde menos individuos heterocigóticos se detectaron fue en MDH-1 de Agaete, ( $H_o = 0.043$ ), (Tabla 6.12).

En *Gracilaria ferox* la heterocigosidad observada fue de 0.021 en Gáldar y de 0.000 en Las Canteras.  $H_o$  medio en la especie fue de 0.011. De los dos loci polimórficos detectados, EST-3 en Gáldar, fue el locus en que mayor individuos heterocigóticos se detectaron ( $H_o = 0.250$ ). En Las Palmas no se detectó ningún individuo heterocigótico en ambos loci (Tabla 6.13).

**TABLA 6.11. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) detectadas en las poblaciones y loci polimórficos de *Gelidium arbuscula*. El guión indica la inexistencia de individuos heterocigóticos en los individuos haploides. es = error estándar. E= Subpoblación esporofítica. G= Subpoblación gametofítica.**

<i>Población.</i>	<i>Locus.</i>	<b>Gáldar.</b>		<b>Agate.</b>		<b>Pto. Cruz.</b>	
		E.	G.	E.	G.	E.	G.
PGI-3.	Ho	0.000	----	0.000	----	0.135	----
	He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.130
EST-2.	Ho	0.733	----	0.711	----	0.419	----
	He	0.000	0.500	0.000	0.458	0.000	0.332
GDH-1.	Ho	0.485	----	0.005	----	0.000	----
	He	0.282	0.569	0.000	0.226	0.000	0.000
ALP-1.	Ho	0.000	----	0.061	----	0.000	----
	He	0.000	0.000	0.000	0.164	0.000	0.000
MDH-1.	Ho	0.000	----	0.250	----	0.613	----
	He	0.000	0.000	0.000	0.320	0.000	0.428
MDH-3.	Ho	0.000	----	0.042	----	0.387	----
	He	0.000	0.000	0.000	0.039	0.000	0.308
DIA-2.	Ho	0.355	----	0.250	----	0.522	----
	He	0.180	0.466	0.394	0.217	0.320	0.420
Media. *	Ho	0.071	----	0.060	----	0.094	----
	es	0.041	----	0.035	----	0.041	----
	He	0.021	0.070	0.018	0.065	0.015	0.074
	es	0.015	0.038	0.017	0.027	0.014	0.031
		Ho (de <i>Gelidium arbuscula</i> ) = $0.075 \pm 0.014$ He (entre las subpoblaciones esporofíticas) = $0.018 \pm 0.002$ He (entre las subpoblaciones gametofíticas) = $0.070 \pm 0.004$ He (de <i>Gelidium arbuscula</i> ) = $0.044 \pm 0.026$					

\* Todos los valores medios de Ho y He incluyen los 15 loci invariables, con heterocigosidad cero, detectados en todas las subpoblaciones.

**TABLA 6.12. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) detectadas en las poblaciones y loci polimórficos de *Gelidium canariensis*. El guión indica la inexistencia de individuos heterocigóticos en los individuos haploides. *es* = error estándar. E= Subpoblación esporofítica. G= Subpoblación gametofítica.**

<i>Población.</i>	<i>Locus.</i>	Gáldar.		Agaete.		Pto. Cruz.	
		E.	G.	E.	G.	E.	G.
EST-2	Ho	0.063	----	0.500	----	0.375	----
	He	0.320	0.058	0.375	0.500	0.000	0.375
DIA-3	Ho	0.454	----	0.216	----	0.333	----
	He	0.000	0.354	0.442	0.343	0.000	0.365
PGI-3	Ho	0.000	----	0.162	----	0.233	----
	He	0.196	0.435	0.343	0.147	0.375	0.466
ALP-1	Ho	0.000	----	0.054	----	0.000	----
	He	0.000	0.000	0.000	0.058	0.000	0.000
MDH-1	Ho	0.000	----	0.043	----	0.205	----
	He	0.000	0.000	0.000	0.039	0.000	0.180
Media. *	Ho	0.022	----	0.042	----	0.050	----
	<i>es</i>	0.020	----	0.024	----	0.024	----
	He	0.022	0.037	0.050	0.047	0.016	0.060
	<i>es</i>	0.016	0.024	0.028	0.026	0.016	0.029

Ho (de *Gelidium canariensis*) =  $0.038 \pm 0.012$

He (entre las subpoblaciones esporofíticas) =  $0.029 \pm 0.015$

He (entre las subpoblaciones gametofíticas) =  $0.048 \pm 0.009$

He (de *Gelidium canariensis*) =  $0.039 \pm 0.016$

\* Todos los valores medios de Ho y He incluyen los 18 loci invariables, con heterocigosidad cero, detectados en todas las subpoblaciones.

**TABLA 6.13. Heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) detectadas en las poblaciones y loci polimórficos de *Gracilaria ferox*. El guión indica la inexistencia de individuos heterocigóticos en los individuos haploides. *es* = error estándar. E = Subpoblación esporofítica. G = Subpoblación gametofítica.**

<i>Población.</i>		<i>Gáldar.</i>		<i>Las Palmas.</i>	
		E.	G.	E.	G.
<i>Locus.</i>					
EST-3	Ho	0.250	-----	0.000	-----
	He	0.000	0.226	0.000	0.000
PGI-3	Ho	0.130	-----	0.000	-----
	He	0.000	0.113	0.480	0.000
Media. *	Ho	0.021	-----	0.000	-----
	<i>es</i>	0.015	-----	0.000	-----
	He	0.000	0.019	0.027	0.000
	<i>es</i>	0.000	0.014	0.026	0.000

Ho (de *Gracilaria ferox*) =  $0.011 \pm 0.011$

He (entre las subpoblaciones esporofíticas) =  $0.014 \pm 0.014$

He (entre las subpoblaciones gametofíticas) =  $0.010 \pm 0.010$

He (de *Gracilaria ferox*) =  $0.012 \pm 0.012$

\* Todos los valores medios de Ho y He incluyen los 16 loci invariables, con heterocigosidad cero, detectados en todas las subpoblaciones.

#### 6.4.5.- HETEROCIGOSIDAD ESPERADA.

La heterocigosidad esperada o diversidad génica ( $He$ ) fue muy similar en ambas especies de *Gelidium*, siendo mayor en las subpoblaciones gametofíticas que en las esporofíticas.

En *Gelidium arbuscula* se encontraron valores medios de  $He$  que oscilaron entre 0.015 y 0.074 (en las subpoblaciones esporofítica y gametofítica de Pto. Cruz, respectivamente). La media de la especie fue de 0.044, siendo la media de todas las subpoblaciones esporofíticas menor ( $He = 0.018$ ) que la media de las subpoblaciones haploides ( $He = 0.070$ ) (Tabla 6.11).

En *Gelidium canariensis* la heterocigosidad esperada varió entre 0.016 (en la subpoblación esporofítica de Pto. Cruz) a 0.060 (en la subpoblación gametofítica de la misma localidad). La  $He$  media de las subpoblaciones esporofíticas fue de 0.029 mientras que la  $He$  media de las subpoblaciones gametofíticas fue de 0.048, siendo la media de la especie de 0.039 (Tabla 6.12).

En *Gracilaria ferox* la  $He$  media de las subpoblaciones esporofíticas fue mayor que las subpoblaciones haploides ( $He = 0.014$  y  $0.010$ , respectivamente), siendo la  $He$  global de la especie de 0.012 (Tabla 6.13).

#### 6.5.- Comparación de las frecuencias genotípicas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La Tabla 6.14 muestra el número de individuos observados y esperados en cada locus polimórfico en las tres poblaciones analizadas de *Gelidium arbuscula*. Debido a que el número de grados de libertad fue menor que uno, no se pudo realizar el cálculo de test de  $X^2$  en ninguno de sus loci. Este hecho es una de las consecuencias de la fijación de la mayoría de los loci en las subpoblaciones gametofíticas.

A pesar de no poder realizar matemáticamente esta comparación, el análisis directo de los genotipos observados y esperados indica que existen diferencias claras entre ellos en la mayoría de los loci con polimorfismo. En EST-2 de las tres poblaciones analizadas apreciamos que el genotipo esperado es EST-2aa, mientras que el genotipo observado mayoritario es

**TABLA 6.14.** Número de esporofitos observados y esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg (entre paréntesis) para cada genotipo en los locus polimórficos de las tres poblaciones de *Gelidium arbuscula*.

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Agate.</i>		<i>Pto Cruz.</i>	
	<i>O</i>	( <i>E</i> )	<i>O</i>	( <i>E</i> )	<i>O</i>	( <i>E</i> )
<i>PGI-3bb</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>PGI-3cc</i>	39	(39)	49	(49)	32	(37)
<i>PGI-3bc</i>	0	(0)	0	(0)	5	(0)
<i>Nt</i>	39		49		37	
<i>EST-2aa</i>	6	(45)	11	(38)	18	(31)
<i>EST-2bb</i>	6	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>EST-2ab</i>	33	(0)	27	(0)	13	(0)
<i>Nt</i>	45		38		31	
<i>GDH-1aa</i>	6	(1)	0	(0)	0	(0)
<i>GDH-1bb</i>	9	(23)	33	(39)	35	(35)
<i>GDH-1cc</i>	2	(0)	4	(0)	0	(0)
<i>GDH-1ab</i>	14	(9.4)	0	(0)	0	(0)
<i>GDH-1bc</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>GDH-1ac</i>	2	(0)	2	(0)	0	(0)
<i>Nt</i>	33		39		35	
<i>ALP-1aa</i>	0	(0)	3	(0)	0	(0)
<i>ALP-1bb</i>	42	(42)	43	(49)	38	(38)
<i>ALP-1ab</i>	0	(0)	3	(0)	0	(0)
<i>Nt</i>	42		49		38	
<i>MDH-1aa</i>	46	(46)	32	(48)	12	(31)
<i>MDH-1bb</i>	0	(0)	4	(0)	0	(0)
<i>MDH-1ab</i>	0	(0)	12	(0)	19	(0)
<i>Nt</i>	46		48		31	
<i>MDH-3aa</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>MDH-3bb</i>	43	(43)	46	(48)	19	(31)
<i>MDH-3ab</i>	0	(0)	2	(0)	12	(0)
<i>Nt</i>	43		48		31	
<i>DIA-2bb</i>	0	(0)	0	(0)	20	(29)
<i>DIA-2cc</i>	6	(0.3)	36	(25.5)	2	(2)
<i>DIA-2dd</i>	14	(25)	0	(3.4)	0	(0)
<i>DIA-2bc</i>	0	(0)	3	(0)	24	(15)
<i>DIA-2bd</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>DIA-2cd</i>	11	(5.7)	9	(19.1)	0	(0)
<i>Nt</i>	31		48		46	

EST-2ab. En GDH-1 de Gáldar, el genotipo observado mayoritario es el heterocigótico GDH-1ab, mientras que el esperado es el homocigótico GDH-1bb.

En general, la observación de más de un alelo en las subpoblaciones esporofíticas y la fijación de un sólo alelo en las subpoblaciones gametofíticas nos indica claramente que las subpoblaciones diploides en esta especie no están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

La Tabla 6.15 muestra el número de individuos observados y esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci polimórficos detectados en *Gelidium canariensis*. La Tabla 6.16 muestra los valores de  $X^2$  obtenidos al comparar los genotipos observados y esperados. En la mayoría de los loci no se pudo realizar el test debido a que los grados de libertad fueron menores que uno o el locus era invariable. Todos los loci, donde se pudo realizar el test, dieron diferencias altamente significativas (Tabla 6.16). Por otro lado, y al igual que en *Gelidium arbuscula*, el análisis directo de aquellos loci donde el test de  $X^2$  no se realizó, nos proporcionó un indicativo más que la mayoría de los loci de las subpoblaciones esporofíticas no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. En DIA-3 de Gáldar y Pto. Cruz se espera, a partir de las frecuencias alélicas de los gametofitos, la aparición de genotipos DIA-3bb, pero se detectaron también esporofitos con los genotipos DIA-3aa y DIA-3ab. Lo mismo sucede con PGI-3 de la población de Gáldar donde no se pudo realizar el test de Chi-cuadrado.

La Tabla 6.17 muestra el número de esporofitos observados y esperados en las dos poblaciones analizadas de *Gracilaria ferox*. No se pudo realizar el test de  $X^2$  debido a que la mayoría de los loci estaban fijados en las subpoblaciones gametofíticas. El análisis directo de las frecuencias genotípicas en estos loci fijados no dio diferencia alguna entre los valores esperados y observados, excepto PGI-3 en el que se esperan en el equilibrio individuos heterocigóticos PGI-3ab y PGI-3aa.

**TABLA 6.15.** Número de esporofitos observados y esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg (entre paréntesis) para cada genotipo en los locus polimórficos de las tres poblaciones de *Gelidium canariensis*.

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Agaete.</i>		<i>Pto Cruz.</i>	
	<i>O</i>	<i>(E)</i>	<i>O</i>	<i>(E)</i>	<i>O</i>	<i>(E)</i>
<i>EST-2aa</i>	0	(1.2)	10	(20.2)	2	(0)
<i>EST-2bb</i>	30	(20.4)	8	(2.1)	18	(32)
<i>EST-2ab</i>	2	(10.4)	18	(13.7)	12	(0)
<i>Nt</i>	32		36		32	
<i>DIA-3aa</i>	0	(0)	4	(3.9)	3	(0)
<i>DIA-3bb</i>	18	(33)	25	(16.5)	25	(42)
<i>DIA-3ab</i>	15	(0)	8	(16.6)	14	(0)
<i>Nt</i>	33		37		42	
<i>PGI-3bb</i>	14	(34.8)	0	(1.7)	11	(2.6)
<i>PGI-3cc</i>	30	(0.5)	31	(22.4)	22	(24.1)
<i>PGI-3bc</i>	0	(9.8)	6	(5.5)	10	(20.3)
<i>Nt</i>	44		37		43	
<i>ALP-1aa</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>ALP-1bb</i>	32	(32)	35	(37)	50	(50)
<i>ALP-1ab</i>	0	(0)	2	(0)	0	(0)
<i>Nt</i>	32		37		50	
<i>MDH-1aa</i>	40	(40)	22	(23)	31	(39)
<i>MDH-1bb</i>	0	(0)	0	(0)	0	(0)
<i>MDH-1ab</i>	0	(0)	1	(0)	8	(0)
<i>Nt</i>	40		23		39	



**TABLA 6.16.** Valores de  $X^2$  en el equilibrio de Hardy-Weinberg en *Gelidium canariensis*. El guión indica que no se pudo realizar el cálculo porque el locus fue invariable o porque el número de grados de libertad fue menor que uno.

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>	<i>Agaete.</i>	<i>Pto. Cruz.</i>
<i>Locus.</i>			
EST-2	10.5***	19.6***	---
DIA-3	---	7.9***	---
PGI-3	---	6.9***	26.2***

\*\*\*  $P < 0.001$

**TABLA 6.17.** Número de esporofitos observados y esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg (entre paréntesis) para cada genotipo en los locus polimórficos de las poblaciones de *Gracilaria ferox*.

<i>Población.</i>	<i>Gáldar.</i>		<i>Las Palmas.</i>	
	O	(E)	O	(E)
<i>Genotipo.</i>				
EST-3aa	0	(0)	0	(0)
EST-3bb	6	(8)	8	(8)
EST-3ab	2	(0)	0	(0)
<i>Nt</i>	8		8	
PGI-3aa	0	(0)	0	(5.8)
PGI-3bb	7	(8)	16	(2.6)
PGI-3ab	1	(0)	0	(0.5)
<i>Nt</i>	8		16	

## 6.6.- Comparación de las frecuencias alélicas entre poblaciones.

En la Tablas 6.18, 6.19 y 6.20 se describen los valores de Chi-cuadrado obtenidos al comparar, en cada especie, las frecuencias alélicas entre las distintas poblaciones y subpoblaciones. Las comparaciones en cada una de las especies se realizaron dentro de cada población, entre las fases haploides y diploides y entre las diferentes poblaciones. También se compararon dentro de la isla de Gran Canaria y entre las islas de Gran Canaria y Tenerife.

En *Gelidium arbuscula* las comparaciones entre las fases esporofíticas y las fases gametofíticas dentro de cada población dieron diferencias significativas en la mayoría de los loci analizados (Tabla 6.18). Este mismo resultado se observó al comparar todas las subpoblaciones entre sí independientemente de su ploidía. Las comparaciones entre pares de subpoblaciones dieron resultados altamente significativos tanto al comparar fases haploides como fases diploides.

En *Gelidium canariensis* también se observaron diferencias significativas en la mayoría de los loci al realizar todas las comparaciones, existiendo sólo un locus polimórfico (ALP-1) donde las diferencias no fueron significativas.

En *Gracilaria ferox* la comparación dentro de cada población fue estadísticamente significativa en los loci analizados. (Tabla 6.20), al igual que al comparar todas las subpoblaciones entre sí independientemente de la ploidía. No se apreciaron diferencias en las frecuencias alélicas entre las fases esporofíticas, mientras que entre las fases gametofíticas sólo se pudo comparar PGI-3, teniendo este locus diferencias altamente significativas entre las fases gametofíticas (Tabla 6.20).

**TABLA 6.18. Valores de  $X^2$  al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en las poblaciones gametofíticas y esporofíticas mediante el test de Workman y Niswander (1970) en *Gelidium arbuscula*. Entre paréntesis se señalan los grados de libertad obtenidos para cada locus. El guión (----) indica que no se realizó el test por ser un locus invariable entre las poblaciones comparadas.**

				Gáldar-Agaete.		Agaete-Gáldar-Pto. Cruz.	
	Dentro Gáldar	Dentro Agaete	Dentro Pto. Cruz.	Gametofitos	Esporofitos	Gametofitos	Esporofitos
PGI-3	----	----	2.1 (1)	----	12.6 (2) ***	----	----
EST-2	19.8 (1) ***	14.3 (1) ***	7.8 (1) **	----	13.4 (2) ***	----	3.5 (1)
GDH-1	7.9 (2) *	4.3 (1) *	----	11.1 (2) ***	74.0 (4) ***	5.5 (1) *	37.7 (2) ***
ALP-1	----	3.1 (1)	----	----	15.0 (2) ***	----	7.9 (1) ***
MDH-1	----	7.0 (1) **	10.3 (1) ***	----	30.1 (2) ***	----	21.6 (1) ***
MDH-3	----	0.7 (1)	4.9 (1) *	----	28.4 (2) ***	----	1.7 (1)
DIA-2	7.3 (1) **	8.8 (2) *	1.1 (1)	116 (4) ***	220 (4) ***	28.4 (1) ***	58.6 (2) ***

\*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$ . \*\*\*  $P < 0.001$ .

**TABLA 6.18. Continuación.**

	Gáldar-Pto. Cruz		Agaete-Pto.Cruz		Gran Canaria.	Todas las poblaciones.
	Gametofitos	Esporofitos	Gametofitos	Esporofitos		
PGI-3	-----	5.6 (1)*	-----	7.1 (1)**	-----	18.76
EST-2	-----	13.1 (1)***	-----	3.5 (1)	38.7 (5)***	59.8
GDH-1	5.8*	41.6 (2)***	-----	8.7 (1)***	59 (6)***	108 (10)***
ALP-1	-----	-----	-----	7.2 (1)**	13.1 (3)***	22.4 (5)***
MDH-1	-----	32.6 (1)***	-----	2.0 (1)	34.3 (5)	53.4 (5)***
MDH-3	-----	17.7 (1)***	-----	13.7 (1)***	3.0 (3)	43.0 (5)***
DIA-2	52.2 (2)***	102 (2)***	53 (2)***	93.7 (2)***	90.1 (6)***	345 (10)***

\* =  $P < 0.05$ . \*\* =  $P < 0.01$ . \*\*\* =  $P < 0.001$ .

**TABLA 6.19.** Valores de  $X^2$  al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en las poblaciones gametofíticas y esporofíticas mediante el test de Workman y Niswander (1970) en *Gelidium canariensis*. g.d.l. = grados de libertad obtenidos para cada comparación. Al ser todos los loci dialélicos, el número de grados de libertad fueron los mismos dentro de cada comparación. El guión indica que no se realizó el test por ser un locus invariable entre las poblaciones comparadas.

	Dentro Gáldar	Dentro Agaete	Dentro Pto.Cruz	Agaete-Gáldar-P.Cruz.		Gáldar-Agaete.	
				Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.
EST-2	7.6**	4.8*	7.3*	40.3***	42.4***	19.8***	40.7***
DIA-3	6.1**	1.5	7.1*	17.7***	0.1	9.1***	0.02
PGI-3	33.2***	4.3*	1.3	39.9***	19.2***	32.7***	13.9***
ALP-1	----	1.1	----	----	5.0	----	1.9
MDH-1	----	0.7	2.4	----	10.4**	----	1.6
<i>g.d.l.</i>	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)	(1)	(1)

\* =  $P < 0.05$ . \*\* =  $P < 0.01$ . \* =  $P < 0.001$ .

**TABLA 6.19. Continuación.**

	Gáldar-Pto.Cruz.		Agaete-Pto.Cruz		Gran Canaria.	Todas las poblaciones.
	Gametofitos	Esporofitos	Gametofitos	Esporofitos		
EST-2	5.4**	12.9***	32.7***	11.1***	86.3***	66.2***
DIA-3	-----	0.02	9.9***	0.09	16.1**	8.8*
PGI-3	27.1***	0.48	0.08	18.5***	76.0***	75.4***
ALP-1	-----	-----	-----	3.0	7.4	3.7
MDH-1	-----	8.4***	-----	2.8	18.6***	2.9
<i>g.d.l.</i>	(1)	(1)	(1)	(1)	(5)	(3)

\* =  $P < 0.05$ . \*\* =  $P < 0.01$ . \*\*\* =  $P < 0.001$ .

**TABLA 6.20.** Valores de  $X^2$  al comparar las frecuencias alélicas obtenidas en las poblaciones gametofíticas y esporofíticas mediante el test de Workman y Niswander (1970) en *Gracilaria ferox*. g.d.l. = grados de libertad obtenidos para cada comparación. Al ser todos los loci dialélicos, el número de grados de libertad fueron los mismos dentro de cada comparación. El guión indica que no se realizó el test por ser un locus invariable entre las poblaciones comparadas.

	Dentro Gáldar	Dentro L.Palmas.	Entre Esporo- fitos.	Entre Gameto- fitos.	Entre todas las poblaciones.
EST-3	9.06***	----	2.22	----	23.4***
PGI-3	4.73*	35.7***	1.96	71.8***	101.2***
<i>g.d.l.</i>	(1)	(1)	(1)	(1)	(3)

\* =  $P < 0.05$  \*\*\* =  $P < 0.001$

### 6.7.- Loci diagnóstico.

En la Tabla 6.21A se exponen los valores de diagnóstico (VD) obtenidos al comparar las frecuencias genotípicas de los loci polimórficos entre las fases esporofíticas de ambas especies de *Gelidium*. Estos cálculos no se realizaron entre el género *Gelidium* y *Gracilaria ferox* debido a que el número de individuos esporofíticos analizados en esta última especie fue muy inferior, siendo necesario un número de individuos muy similar entre las especies para poder comparar estadísticamente los loci diagnóstico.

Ninguno de los loci polimórficos se pudo considerar loci diagnóstico, ya que todos poseían valores de superposición (VD) muy por debajo del 99% necesario para ser considerados como tales.

**TABLA 6.21. Identificación de loci diagnóstico entre *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis*. A. Loci polimórficos y valores diagnóstico (VD) detectados entre los mismos al comparar las frecuencias genotípicas detectadas en ellos. B. Loci invariables. Loci que no fueron comunes a ambas especies.**

<b>A) <u>Loci polimórficos.</u></b>		<b>B) <u>Loci invariables.</u></b>
	(VD)	
EST-2.	75.3%	PGI-5. Exclusivo de <i>G. canariensis</i> .
DIA-2.	82.4%	SOD-1. Exclusivo de <i>G. canariensis</i> .
DIA-3.	96.8%	SOD-7. Exclusivo de <i>G. arbuscula</i> .
PGI-3.	66.5%	
ALP-1.	2.7%	
MDH-1.	66.3%	
MDH-3.	55.7%	
GDH-1.	64.0%	

El análisis de los loci invariables de ambas especies de *Gelidium* dio lugar a la catalogación de tres loci (SOD-1, SOD-7 y PGI-5) como diagnóstico. PGI-5 y SOD-7 se detectaron sólo en *Gelidium canariensis*, mientras que SOD-1 sólo se observó en *Gelidium arbuscula* (Tabla 6.21B y Figuras 6.1g y 6.1i).

Entre todos los loci detectados en *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox*, seis de ellos (DIA-3, DIA-4, EST-2, SOD-1, SOD-2 y SOD-5), se encontraron solamente en *Gelidium arbuscula*, no apareciendo en ninguno de los individuos de *Gracilaria ferox*. Asimismo, MDH-2, EST-3 y PGI-4 fueron loci exclusivos de esta última especie, sin observarse nunca en *Gelidium*



*arbuscula* (Tabla 6.22A, Figura 6.1). Otro grupo de loci (ALP-1, DIA-2, EST-1, EST-4, MDH-3, SOD-4) se detectó en ambas especies, con alelos complementarios fijados en cada una de ellas considerándose también como loci diagnóstico.

Al comparar los zimogramas de *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* (Tabla 6.22B) observamos que 10 loci (DIA-3, DIA-4, EST-2, EST-3, MDH-2, PGI-4, PGI-5, SOD-2, SOD-5 y SOD-7) no son comunes entre ellas y que, por tanto, se pueden considerar como loci diagnóstico. Asimismo, seis loci (ALP-1, DIA-2, EST-1, EST-4, MDH-3 y SOD-4) son comunes a ambas especies pero se encontraron fijados a alelos complementarios en cada una de ellas (Tabla 6.22B; Figura 6.1).

**TABLA 6.22. Comparación entre los loci detectados en *Gracilaria ferox* y ambas especies de *Gelidium*. A. Loci no comunes entre *G. ferox* y *G. canariensis*. B. Loci no comunes entre *G. ferox* y *G. arbuscula*.**

**A. *Gracilaria ferox* - *Gelidium arbuscula*.**

Exclusivos de <i>G. ferox</i> :	EST-3, PGI-4 y MDH-2.
Exclusivos de <i>G. arbuscula</i> :	SOD-1, SOD-2, SOD-5, EST-2, DIA-3, y DIA-4.
Loci comunes con alelos complementarios:	DIA-2, ALP-1, MDH-3, EST-1, EST-4 y SOD-4.

**B. *Gracilaria ferox* - *Gelidium canariensis*.**

Exclusivos de <i>G. ferox</i> :	EST-3, PGI-4 y MDH-2.
Exclusivos de <i>G. canariensis</i> :	EST-2, DIA-3, DIA-4, PGI-5, SOD-5, SOD-7 y SOD-2.
Loci comunes con alelos complementarios:	DIA-2, ALP-1, MDH-3, EST-1, EST-4 y SOD-4.

## 6.8.- Distancia e identidad genética entre las poblaciones.

Debido a que existe una relación directa entre el cálculo de las distancias genéticas y las identidades o similitudes genéticas se analizarán conjuntamente los resultados, primeramente, en cada una de las especies, y posteriormente en conjunto para todas.

En *Gelidium arbuscula* la distancia genética de Nei ( $D$ ), osciló entre 0.009 entre las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas de Pto. Cruz, y 0.047 entre esta última y la subpoblación esporofítica de Gáldar. La distancia genética media dentro de la especie fue de 0.028, sin que este valor variara significativamente en relación a los valores de distancias medias detectadas dentro de las subpoblaciones haploides ( $D = 0.026$ ), dentro de las subpoblaciones diploides ( $D = 0.030$ ) ó entre ellas ( $D = 0.028$ ), (Tabla 6.23). No se detectó correlación directa entre la distancia geográfica y la distancia genética, ya que la distancia genética media entre las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz, ( $D = 0.027$ ) fue menor que entre las dos poblaciones de Gran Canaria ( $D = 0.028$ ) cuya distancia geográfica es mucho menor que entre las dos primeras. La distancia entre la población de Gáldar y la de Pto. Cruz fue de 0.042 (Tabla 6.23).

Los valores de la distancia genética de Rogers ( $D_R$ ), (Tabla 6.24) fueron superiores a los encontrados aplicando la distancia de Nei. El valor medio dentro de la especie fue de 0.059, existiendo mayor distancia entre las subpoblaciones esporofíticas ( $D_R = 0.071$ ) que entre las gametofíticas ( $D_R = 0.038$ ). Por localidades, observamos los mismos resultados relativos que con la distancia de Nei, esto es, las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz están más relacionadas genéticamente ( $D_R = 0.057$ ) que las poblaciones de Gran Canaria entre sí ( $D_R = 0.058$ ). Igualmente, fueron las poblaciones de Gáldar y Pto. Cruz las que más alejadas se encontraron genéticamente ( $D_R = 0.073$ ); (Tabla 6.24). El coeficiente de correlación entre ambas distancias genéticas en *Gelidium arbuscula* fue de 0.795.

En *Gelidium canariensis*, al contrario que en *Gelidium arbuscula*, la menor distancia de Nei entre todas las subpoblaciones, correspondió entre la subpoblación esporofítica de Gáldar y las dos subpoblaciones de Pto. Cruz,

**TABLA 6.23.** Distancia genética de Nei (1972), (sobre la diagonal) e identidades genéticas (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de *Gelidium arbuscula*.

	Gáldar Esporofitos	Gáldar Gametofitos	Agaete Esporofitos	Agaete Gametofitos	Pto. Cruz Esporofitos	Pto. Cruz Gametofitos
Gáldar Esporofitos		0.019	0.024	0.027	0.043	0.047
Gáldar Gametofitos	0.981		0.040	0.019	0.043	0.036
Agaete Esporofitos	0.976	0.961		0.010	0.024	0.035
Agaete Gametofitos	0.973	0.981	0.990		0.026	0.023
Pto. Cruz Esporofitos	0.958	0.958	0.976	0.974		0.009
Pto. Cruz Gametofitos	0.954	0.965	0.966	0.977	0.991	

Distancia genética media dentro de la especie.  $D = 0.028 \pm 0.011$

Distancia genética media entre las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz.  $D = 0.027 \pm 0.005$

Distancia genética media entre las poblaciones de Gáldar y Pto. Cruz.  $D = 0.042 \pm 0.004$

Distancia genética media entre las poblaciones de Gran Canaria.  $D = 0.028 \pm 0.007$

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas.  $D = 0.030 \pm 0.009$

Distancia genética media entre las subpoblaciones gametofíticas.  $D = 0.026 \pm 0.007$

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas.  $D = 0.028 \pm 0.003$

**TABLA 6.24. Distancia genética de Rogers (1972), (sobre la diagonal) y similitud genética (debajo de la diagonal) entre las subpoblaciones de *Gelidium arbuscula*.**

	Gáldar Esporofitos	Gáldar Gametofitos	Agaete Esporofitos	Agaete Gametofitos	Pto. Cruz Gametofitos	Pto. Cruz Esporofitos
Gáldar Esporofitos.		0.048	0.062	0.059	0.090	0.076
Gáldar Gametofitos.	0.952		0.074	0.036	0.080	0.046
Agaete Esporofitos.	0.938	0.926		0.044	0.061	0.070
Agaete Gametofitos.	0.941	0.964	0.956		0.063	0.032
Pto. Cruz Esporofitos.	0.910	0.920	0.939	0.937		0.040
Pto. Cruz Gametofitos.	0.924	0.954	0.930	0.968	0.960	

Distancia genética media dentro de la especie.  $D_R = 0.059 \pm 0.016$

Distancia genética media entre las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz.  $D_R = 0.057 \pm 0.015$

Distancia genética media entre las poblaciones de Gáldar y Pto. Cruz.  $D_R = 0.073 \pm 0.016$

Distancia genética media entre las poblaciones de Gran Canaria.  $D_R = 0.058 \pm 0.014$

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas.  $D_R = 0.071 \pm 0.013$

Distancia genética media entre las subpoblaciones gametofíticas.  $D_R = 0.038 \pm 0.006$

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas.  $D_R = 0.062 \pm 0.014$

ambos con la misma distancia, ( $D = 0.003$ ). Asimismo, la mayor distancia genética correspondió entre las subpoblaciones gametofíticas de Gáldar y Agaete ( $D = 0.039$ ), localizadas ambas en la misma isla (Tabla 6.25). Los valores medios de distancia genética entre las diferentes localidades presentaron una relación inversa con la distancia geográfica, disminuyendo la distancia genética a medida que aumentaba la distancia geográfica. La distancia media entre Agaete y Gáldar fue de 0.029, mientras que entre Agaete y Pto. Cruz fue de 0.017 siendo, entre Gáldar y Pto. Cruz, de 0.010. La distancia genética de Nei dentro de la especie fue de 0.017, detectándose un valor mucho menor entre las subpoblaciones esporofíticas ( $D = 0.008$ ) que entre las subpoblaciones haploides ( $D = 0.030$ ). (Tabla 6.25).

Con respecto a la distancia de Rogers, los valores absolutos fueron mayores que los obtenidos con Nei, pero los resultados relativos fueron muy similares. La distancia media entre todas las subpoblaciones fue de 0.037, encontrándose igualmente que la menor distancia correspondió entre la subpoblación gametofítica de Pto. Cruz y la esporofítica de Gáldar ( $D_R = 0.014$ ). También, las subpoblaciones que se encontraron más alejadas genéticamente fueron las subpoblaciones gametofíticas de Agaete y Gáldar ( $D_R = 0.067$ ) (Tabla 6.26). El coeficiente de correlación entre la distancia de Nei y Rogers en esta especie fue de 0.946.

En *Gracilaria ferox* la distancia de Nei varió de 0.00, entre la subpoblación esporofítica de Las Palmas y la gametofítica de Gáldar, a 0.02 entre las subpoblaciones gametofítica y esporofítica de Las Palmas y ambas gametofíticas de Gáldar y Las Palmas (Tabla 6.27). La media total dentro de la especie fue de 0.010. La distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas fue la misma que dentro de la especie ( $D = 0.010$ ). Con respecto a la distancia de Rogers, los resultados, aunque en valores absolutos mayores, en valores relativos fueron los mismos que con la distancia de Nei. La distancia media dentro de la especie fue de 0.021 (Tabla 6.28). El coeficiente de correlación entre ambas distancias fue de 0.956.

**TABLA 6.25. Distancia genética de Nei (1972), (sobre la diagonal) e identidad genética (debajo de la diagonal) entre las subpoblaciones de *Gelidium canariensis*.**

	Gáldar Esporofitos.	Gáldar Gametofitos.	Agaete Esporofitos.	Agaete Gametofitos.	Pto. Cruz Esporofitos.	Pto. Cruz Gametofitos.
Gáldar Esporofitos		0.018	0.014	0.025	0.003	0.003
Gáldar Gametofitos	0.982		0.037	0.039	0.015	0.020
Agaete Esporofitos	0.986	0.963		0.004	0.008	0.016
Agaete Gametofitos	0.975	0.961	0.996		0.013	0.031
Pto. Cruz Esporofitos	0.997	0.985	0.992	0.987		0.006
Pto. Cruz Gametofitos	0.997	0.980	0.984	0.970	0.994	

Distancia genética media dentro de la especie.  $D = 0.017 \pm 0.012$

Distancia genética media entre las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz.  $D = 0.017 \pm 0.008$

Distancia genética media entre las poblaciones de Gáldar y Pto. Cruz.  $D = 0.010 \pm 0.007$

Distancia genética media entre las poblaciones de Gran Canaria.  $D = 0.029 \pm 0.010$

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas.  $D = 0.008 \pm 0.004$

Distancia genética media entre las subpoblaciones gametofíticas.  $D = 0.030 \pm 0.008$

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas.  $D = 0.015 \pm 0.010$

**TABLA 6.26. Distancia genética de Rogers (1972), (sobre la diagonal) e identidad genética (debajo de la diagonal), entre las subpoblaciones de *Gelidium canariensis*.**

	Gáldar Esporofitos	Gáldar Gametofitos	Agaete Esporofitos	Agaete Gametofito	Pto. Cruz Esporofitos	Pto. Cruz Gametofitos
Gáldar Esporofitos.		0.042	0.034	0.040	0.016	0.014
Gáldar Gametofitos.	0.958		0.061	0.067	0.039	0.036
Agaete Esporofitos.	0.966	0.939		0.022	0.030	0.042
Agaete Gametofitos.	0.960	0.933	0.978		0.036	0.048
Pto. Cruz Esporofitos.	0.984	0.961	0.970	0.964		0.031
Pto. Cruz Gametofitos.	0.986	0.964	0.958	0.952	0.969	

Distancia genética media dentro de la especie.  $D_R = 0.037 \pm 0.014$   
 Distancia genética media entre las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz.  $D_R = 0.039 \pm 0.007$   
 Distancia genética media entre las poblaciones de Gáldar y Pto. Cruz.  $D_R = 0.026 \pm 0.011$   
 Distancia genética media entre las poblaciones de Gran Canaria.  $D_R = 0.051 \pm 0.014$   
 Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas.  $D_R = 0.027 \pm 0.008$   
 Distancia genética media entre las subpoblaciones gametofíticas.  $D_R = 0.050 \pm 0.013$   
 Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas.  $D_R = 0.036 \pm 0.012$





**TABLA 6.27. Distancia genética de Nei (1972), (sobre la diagonal) e identidad genética (debajo de la diagonal) entre las subpoblaciones de *Gracilaria ferox*.**

	Gáldar Esporofitos.	Gáldar Gametofitos	Las Palmas Esporofitos	Las Palmas Gametofitos
Gáldar Esporofitos.		0.001	0.001	0.018
Gáldar Gametofitos.	0.999		0.000	0.020
L. Palmas Esporofitos.	0.999	1.000		0.020
L. Palmas Gametofitos.	0.983	0.980	0.980	

Distancia genética media dentro de la especie.  $D = 0.010 \pm 0.009$ .

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas.  $D = 0.010$

Distancia genética media entre las subpoblaciones gametofíticas.  $D = 0.020$

Distancia genética media entre esporofitos y gametofitos.  $D = 0.010 \pm 0.009$

**TABLA 6.28. Distancia genética de Rogers (1972), (sobre la diagonal) y similitud genética (debajo de la diagonal) entre las subpoblaciones de *Gracilaria ferox*.**

	Gáldar Esporofitos	Gáldar Gametofitos	Las Palmas Esporofitos	Las Palmas Gametofitos
Gáldar Esporofitos.		0.011	0.011	0.037
Gáldar Gametofitos.	0.989		0.000	0.033
L. Palmas Esporofitos.	0.989	1.000		0.033
L. Palmas Gametofitos.	0.963	0.967	0.967	

Distancia genética media dentro de la especie.  $D_R = 0.021 \pm 0.015$

Distancia genética media entre las subpoblaciones esporofíticas.  $D_R = 0.011$

Distancia genética media entre las subpoblaciones gametofíticas.  $D_R = 0.033$

Distancia genética media entre esporofitos y gametofitos.  $D_R = 0.020 \pm 0.015$

### 6.9.- Distancia e identidad genética entre especies.

En la Tabla 6.29 se muestran los valores de distancia genética según Nei (1972) entre las subpoblaciones esporofíticas y gametofíticas de las especies analizadas. No se encontraron diferencias significativas entre las distancias medias entre las subpoblaciones gametofíticas de las diferentes especies y las distancias genéticas entre las subpoblaciones esporofíticas. Por ejemplo, los valores de distancias genéticas de Nei entre las subpoblaciones de *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* fueron muy similares entre sí ( $D = 0.193$ , entre esporofitos), ( $D = 0.205$ , entre esporofitos y gametofitos) y ( $D = 0.211$ , entre gametofitos). Esta similitud también se apreció entre las subpoblaciones de *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox* (Tabla 6.29). Tampoco se encontraron diferencias significativas al realizar estas mismas comparaciones empleando la distancia genética de Rogers (Tabla 6.30).

En la Tabla 6.31 se describen los valores de distancias genéticas media de Nei entre todas las subpoblaciones de las tres especies. Asimismo se muestra la distancia media dentro de cada especie.

La distancia genética media entre las dos especies de *Gelidium* fue de 0.163 mientras que entre *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox* y entre *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* fue de 0.893 y 0.875 respectivamente.

Los valores de la distancia de Rogers entre especies se describen en la Tabla 6.32. La distancia media entre ambas especies de *Gelidium* fue de 0.203, mientras que entre *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox* y entre *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* fue de 0.628 y 0.618 respectivamente.

**TABLA 6.29.** Distancia genética media de Nei (1972), (sobre la diagonal) e identidad genética media (debajo de la diagonal) de todas las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas entre las tres especies analizadas, Desviación típica entre paréntesis.

		<i>Gelidium canariensis.</i>		<i>Gelidium arbuscula.</i>		<i>Gracilaria ferox.</i>	
		Esporo- fitos.	Gameto- fitos.	Esporo- fitos.	Gameto- fitos.	Esporo- fitos.	Gameto- fitos.
<i>Gelidium canariensis.</i>	Esporofitos			0.140 (0.003)	0.164 (0.003)	0.878 (0.014)	0.873 (0.027)
	Gametofitos				0.185 (0.046)		0.873 (0.027)
<i>Gelidium arbuscula.</i>	Esporofitos	0.869				0.890 (0.014)	0.893 (0.012)
	Gametofitos	0.849	0.831				0.895 (0.007)
<i>Gracilaria ferox.</i>	Esporofitos	0.416		0.411			
	Gametofitos	0.417	0.417	0.409	0.408		

**TABLA 6.30.** Distancia genética media de Rogers (1972), (sobre la diagonal) y similitud genética (debajo de la diagonal) de todas las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas entre las tres especies analizadas. Desviación típica entre paréntesis.

		<i>Gelidium canariensis.</i>		<i>Gelidium arbuscula.</i>		<i>Gracilaria ferox.</i>	
		Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.	Esporofitos.	Gametofitos.
<i>Gelidium canariensis.</i>	Esporofitos			0.193 (0.018)	0.205 (0.023)	0.619 (0.004)	0.619 (0.011)
	Gametofitos				0.211 (0.032)		0.617 (0.010)
<i>Gelidium arbuscula.</i>	Esporofitos	0.807				0.625 (0.004)	0.628 (0.008)
	Gametofitos	0.795	0.789				0.631 (0.003)
<i>Gracilaria ferox.</i>	Esporofitos	0.381		0.375			
	Gametofitos	0.381	0.383	0.372	0.369		

**TABLA 6.31. Distancia genética media de Nei (1972), (sobre la diagonal) e identidad genética media (debajo de la diagonal) entre las tres especies analizadas. (Desviación típica entre paréntesis).**

	<i>G. canariensis.</i>	<i>G. arbuscula.</i>	<i>Gr. ferox.</i>
<i>G. canariensis.</i>		0.163 (0.018)	0.875 (0.002)
<i>G. arbuscula.</i>	0.850		0.893 (0.002)
<i>Gr. ferox.</i>	0.417	0.409	

**TABLA 6.32. Distancia genética media de Rogers (1972), (sobre la diagonal) y similitud genética media (debajo de la diagonal) entre las tres especies analizadas. (Desviación típica entre paréntesis).**

	<i>G. canariensis.</i>	<i>G. arbuscula.</i>	<i>Gr. ferox.</i>
<i>G. canariensis.</i>		0.203 (0.007)	0.618 (0.001)
<i>G. arbuscula.</i>	0.797		0.628 (0.002)
<i>Gr. ferox.</i>	0.382	0.372	

### 6.10.- Tiempos de divergencia evolutivo.

El tiempo de divergencia evolutivo entre las subpoblaciones de *Gelidium arbuscula*, (Tabla 6.33) varió de 45.000 años (entre las subpoblaciones de Pto. Cruz) a 235.000 años entre las subpoblaciones gametofíticas de Pto. Cruz y la subpoblación esporofítica de Gáldar. El tiempo de divergencia medio entre todas las subpoblaciones fue de 142.000 años, siendo entre las subpoblaciones de la isla de Gran Canaria de 138.000 años.

En *Gelidium canariensis* la divergencia entre las subpoblaciones varió entre 15.000 años entre ambas subpoblaciones de Pto. Cruz y la subpoblación esporofítica de Gáldar a 195.000 años entre las subpoblaciones gametofíticas de Gáldar y Agaete (Tabla 6.34). La media entre las subpoblaciones de Gran Canaria fue de 144.000 años.

En *Gracilaria ferox* las divergencias variaron desde la inexistencia de divergencia (entre las subpoblaciones esporofítica de Las Palmas y gametofítica de Gáldar) a 102.000 años entre la subpoblaciones gametofítica y esporofítica de Las Palmas y ambas subpoblaciones gametofíticas de Las Palmas y Gáldar (Tabla 6.35). La media de divergencia entre todas las subpoblaciones de *Gracilaria ferox* fue de 49.000 años.

Los valores medios de divergencia evolutiva entre todas las especies, se muestran en la Tabla 6.36. La media entre ambas especies de *Gelidium* se estimó en aproximadamente 815.000 años. La divergencia entre *Gracilaria ferox* y las dos especies de *Gelidium* fue muy similar, estimándose en aproximadamente cuatro millones y medio de años.

**TABLA 6.33. Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las subpoblaciones de *Gelidium arbuscula*, obtenidos a partir de la distancia genética de Nei (1972), suponiendo una tasa evolutiva constante ( $\alpha = 10^{-7}$ ). [t (años) =  $5 \times 10^6 \times D$ ].**

	<b>Gáldar Gametofitos</b>	<b>Agaete Esporofitos</b>	<b>Agaete Gametofitos</b>	<b>Pto. Cruz Esporofitos</b>	<b>Pto. Cruz Gametofitos</b>
<b>Gáldar Esporofitos.</b>	0.095	0.120	0.135	0.215	0.235
<b>Gáldar Gametofitos.</b>		0.200	0.095	0.215	0.180
<b>Agaete Esporofitos.</b>			0.050	0.120	0.175
<b>Agaete Gametofitos.</b>				0.130	0.115
<b>Pto. Cruz Esporofitos.</b>					0.045

Tiempo de divergencia medio entre todas las subpoblaciones ( $t = 0.142 \pm 0.060$ )

Tiempo de divergencia medio entre las poblaciones de Gran Canaria. ( $t = 0.138 \pm 0.026$ )

Tiempo de divergencia medio entre las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz. ( $t = 0.135 \pm 0.024$ )

Tiempo de divergencia medio entre las poblaciones de Gáldar y Pto. Cruz. ( $t = 0.211 \pm 0.020$ )

**TABLA 6.34. Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las subpoblaciones de *Gelidium canariensis*, obtenidos a partir de la distancia genética de Nei (1972), suponiendo una tasa evolutiva constante ( $\alpha = 10^{-7}$ ). [t (años) =  $5 \times 10^6 \times D$ ].**

	<b>Gáldar Gametofitos</b>	<b>Agaete Esporofitos</b>	<b>Agaete Gametofitos</b>	<b>Pto. Cruz Esporofitos</b>	<b>Pto. Cruz Gametofitos</b>
<b>Gáldar Esporofitos</b>	0.090	0.070	0.125	0.015	0.015
<b>Gáldar Gametofitos</b>		0.185	0.195	0.075	0.100
<b>Agaete Esporofitos</b>			0.020	0.040	0.080
<b>Agaete Gametofitos</b>				0.065	0.155
<b>Pto. Cruz Esporofitos</b>					0.030

Tiempo de divergencia medio entre todas las subpoblaciones ( $t = 0.084 \pm 0.057$ )  
 Tiempo de divergencia medio entre las poblaciones de Gran Canaria. ( $t = 0.144 \pm 0.062$ )  
 Tiempo de divergencia medio entre las poblaciones de Agaete y Pto. Cruz. ( $t = 0.085 \pm 0.043$ )  
 Tiempo de divergencia medio entre las poblaciones de Gáldar y Pto. Cruz. ( $t = 0.051 \pm 0.037$ )



**TABLA 6.35.** Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las subpoblaciones de *Gracilaria ferox*, obtenidos a partir de la distancia genética de Nei (1972), suponiendo una tasa evolutiva constante ( $\alpha = 10^{-7}$ ). [t (años) =  $5 \times 10^6 \times D$ ].

	Gáldar Gametofitos	Las Palmas Esporofitos	Las Palmas Gametofitos
Gáldar Esporofitos.	0.005	0.005	0.088
Gáldar Gametofitos.		0.000	0.102
Las Palmas Esporofitos.			0.102

Tiempo medio divergencia entre las subpoblaciones ( $t = 0.049 \pm 0.046$ ).

**TABLA 6.36.** Tiempos de divergencia evolutiva (en millones de años) entre las tres especies analizadas obtenidos a partir de la distancia genética de Nei (1972), suponiendo una tasa evolutiva constante ( $\alpha = 10^{-7}$ ). [t (años) =  $5 \times 10^6 \times D$ ].

	<i>G. canariensis.</i>	<i>G. arbuscula.</i>	<i>Gr. ferox.</i>
<i>Gelidium canariensis.</i>	0.088 (0.046)	0.815 (0.092)	4.380 (0.009)
<i>Gelidium arbuscula.</i>		0.140 (0.008)	4.450 (0.009)
<i>Gracilaria ferox.</i>			0.037 (0.045)

---

### 6.11.- Relaciones filogenéticas entre subpoblaciones.

A partir de los valores de distancias genéticas de Nei y Rogers, se construyeron para cada especie los dendrogramas UPGMA expuestos en las Figuras 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7. Como se observa en ellos, con las dos distancias genéticas empleadas se obtienen los mismos resultados en *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* pero no así en *Gelidium arbuscula*.

En cada población de *Gelidium arbuscula*, empleando la distancia de Nei, ambos estados reproductivos están más relacionados genéticamente entre sí (Figura 6.2), mientras que empleando la distancia de Rogers los gametofitos de las tres subpoblaciones, independientemente de la situación geográfica, están genéticamente más relacionados entre sí, quedando las tres subpoblaciones esporofíticas más alejadas en el dendrograma (Figura 6.3).

En *Gelidium canariensis* se obtuvieron los mismos resultados con las dos distancias (Figura 6.4 y 6.5). Las subpoblaciones en el dendrograma están más relacionadas por su situación geográfica que por su estado reproductor, excepto en la población de Gáldar, donde la subpoblación esporofítica y gametofítica están muy alejadas una de la otra. Son, de hecho, las dos subpoblaciones más alejadas dentro de la especie.

En *Gracilaria ferox* las subpoblaciones más cercanas entre sí son las más alejadas geográficamente (Figura 6.6 y 6.7).

**FIGURA 6.2.** Dendrograma UPGMA empleando las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones de *Gelidium arbuscula*.  
E = Esporofitos. G = Gametofitos. D = Distancia genética de Nei.

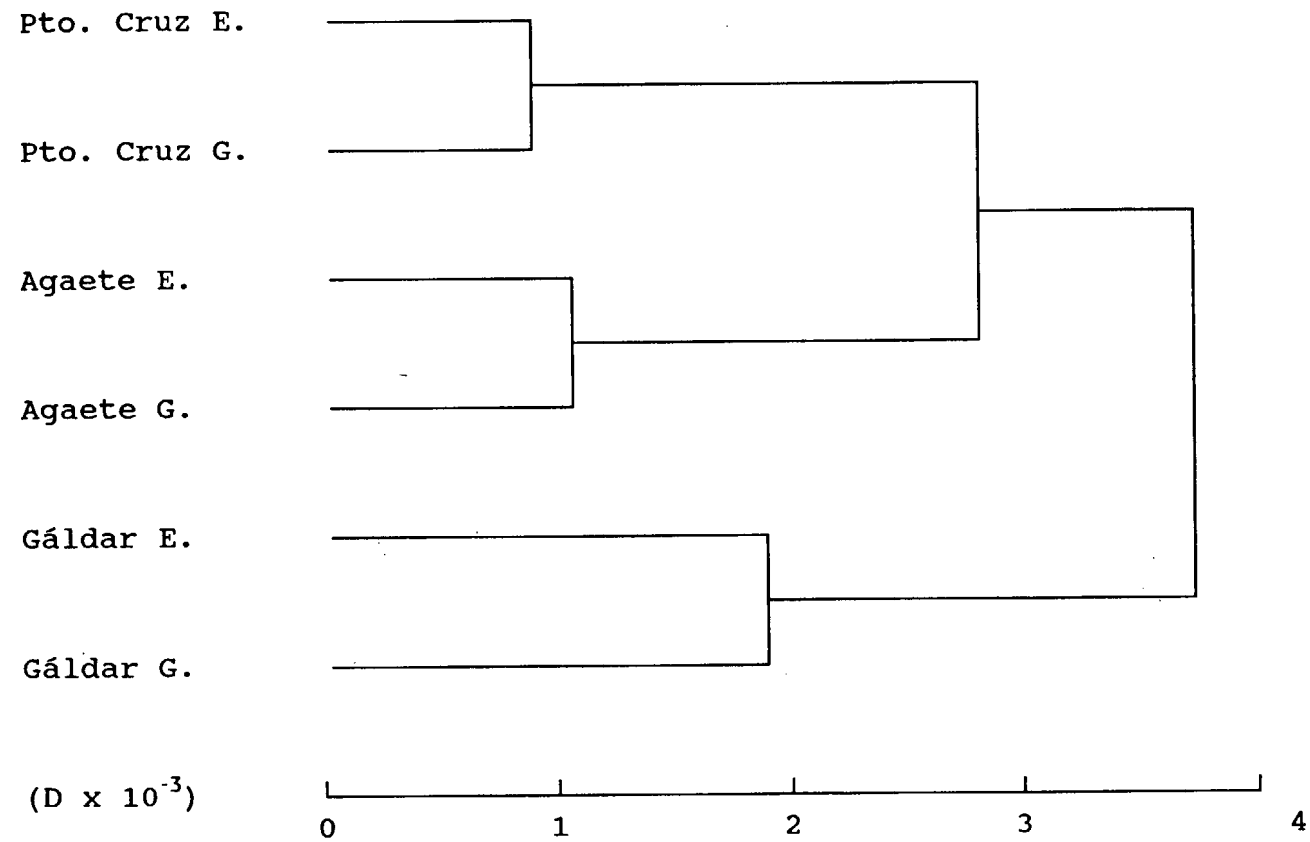
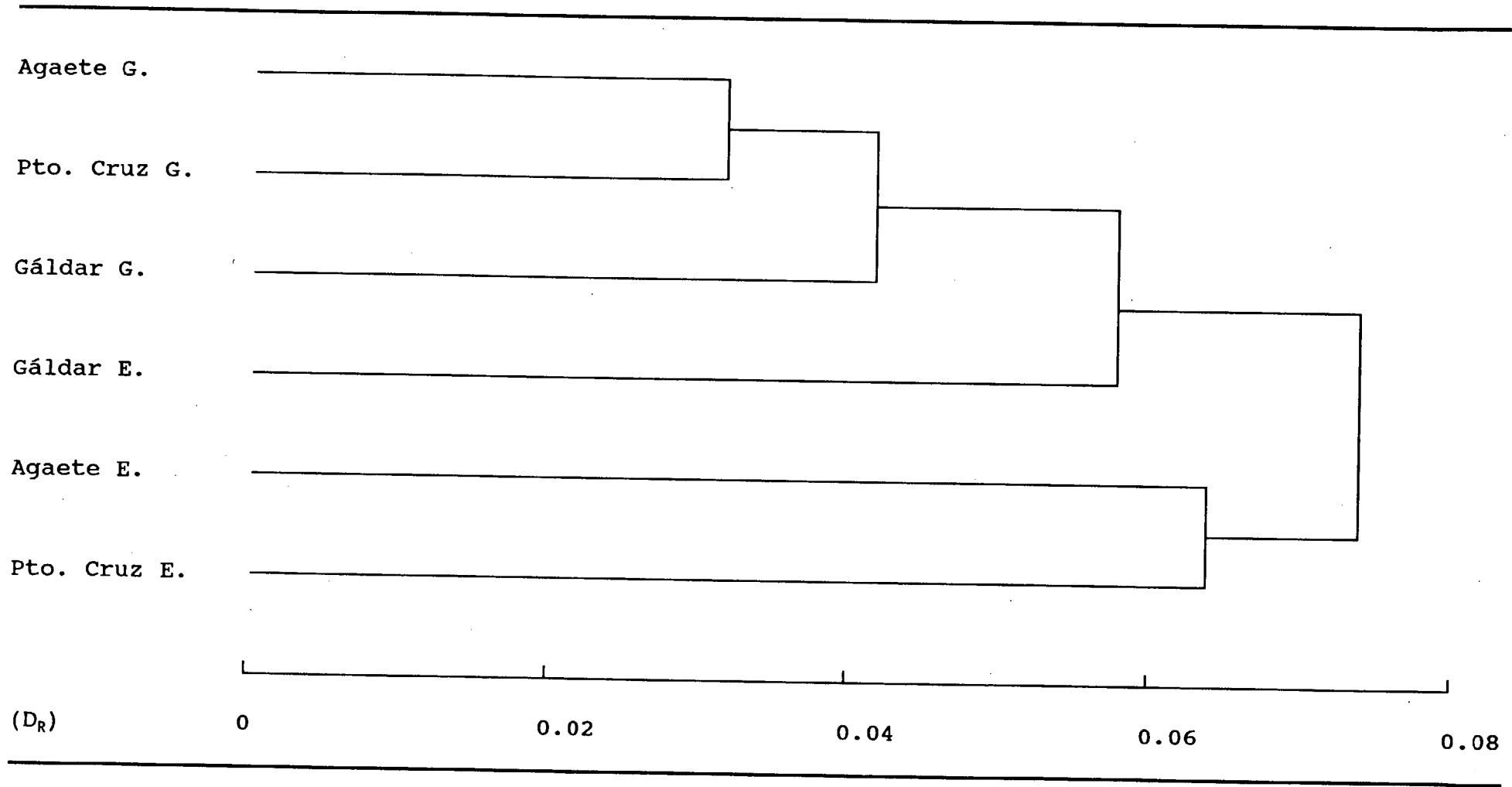
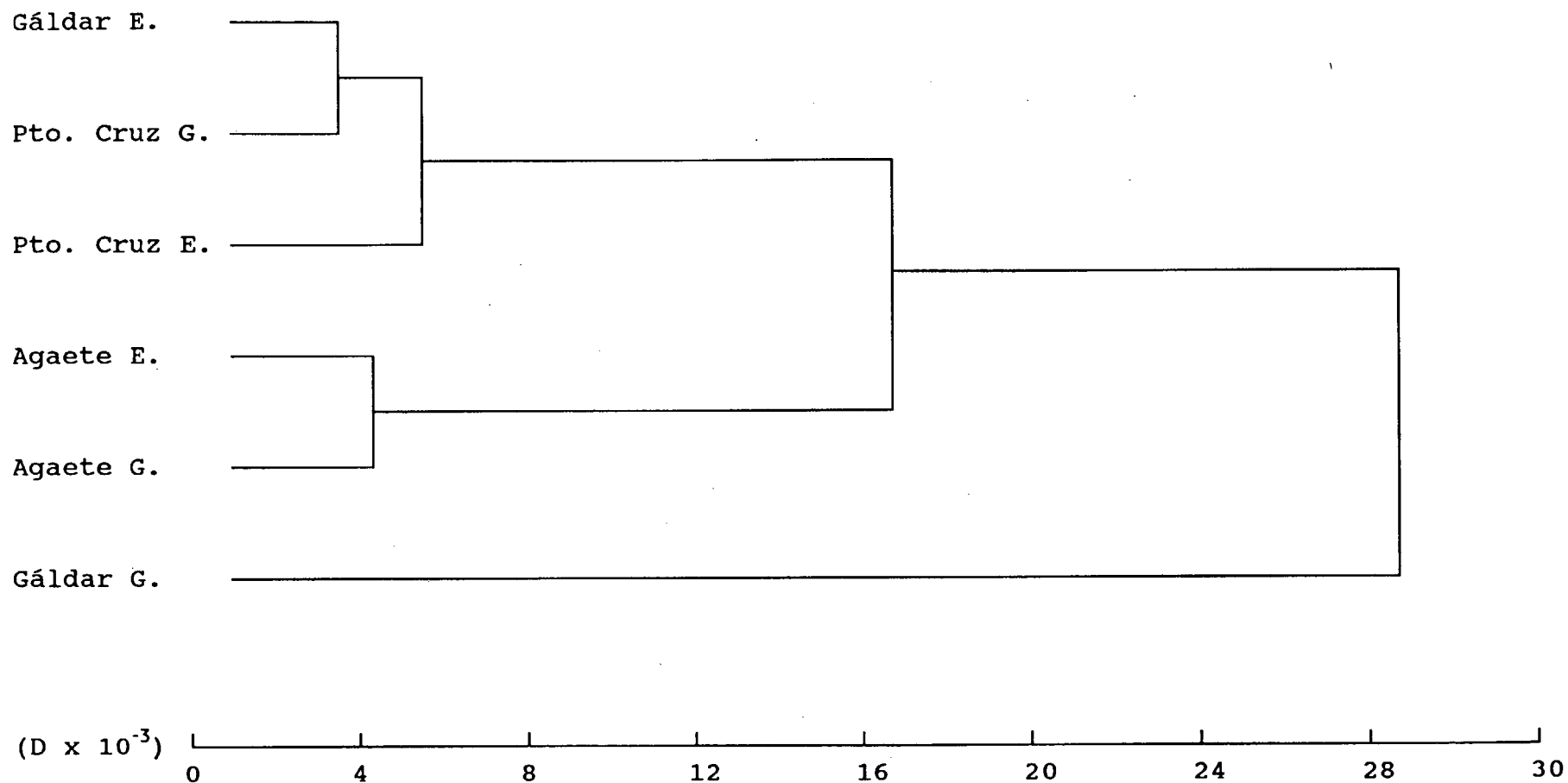


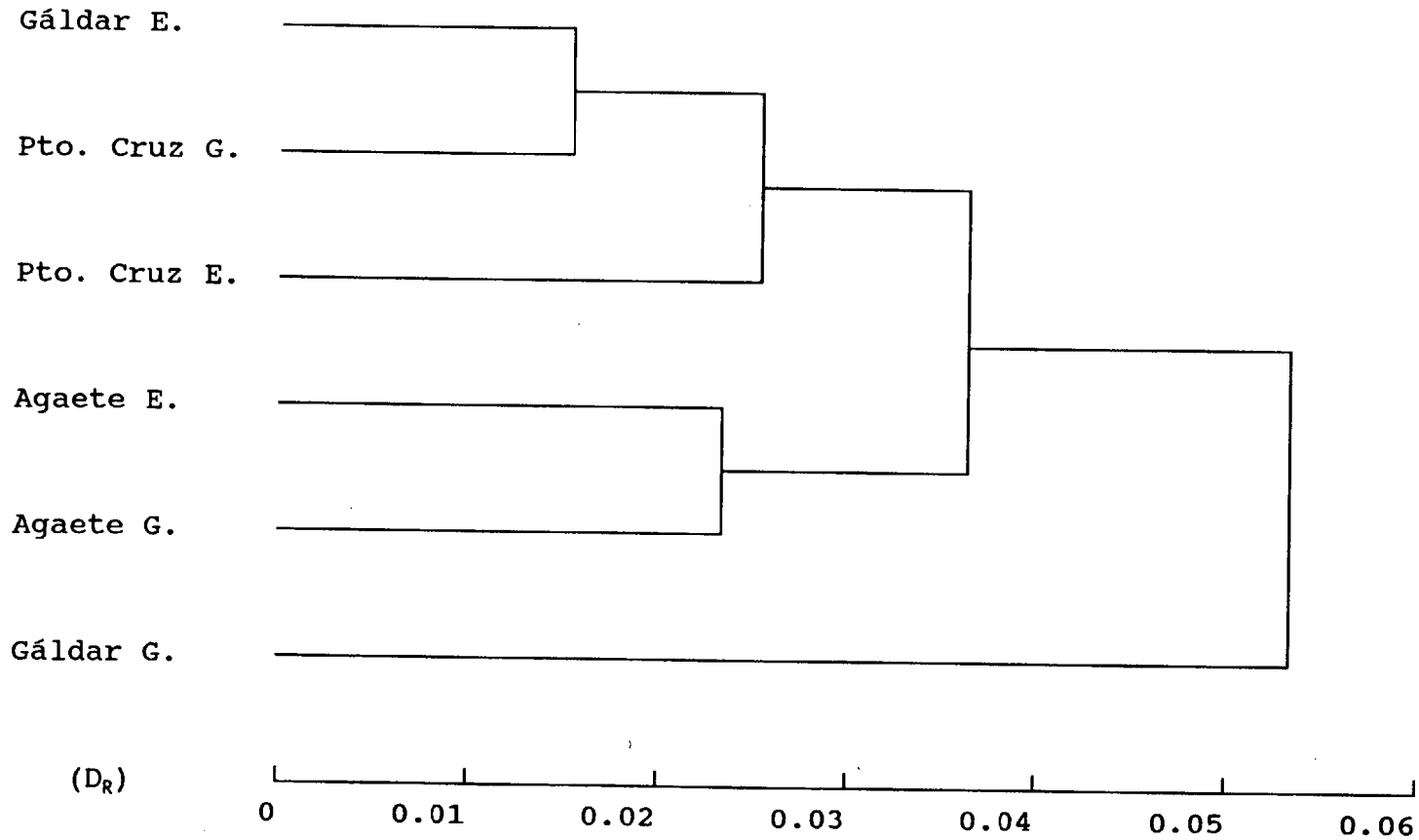
FIGURA 6.3. Dendrograma UPGMA empleando las distancias genéticas de Rogers (1972) para las poblaciones de *Gelidium arbuscula*. E = Esporofitos. G = Gametofitos.  $D_R$  = Distancia genética de Rogers.



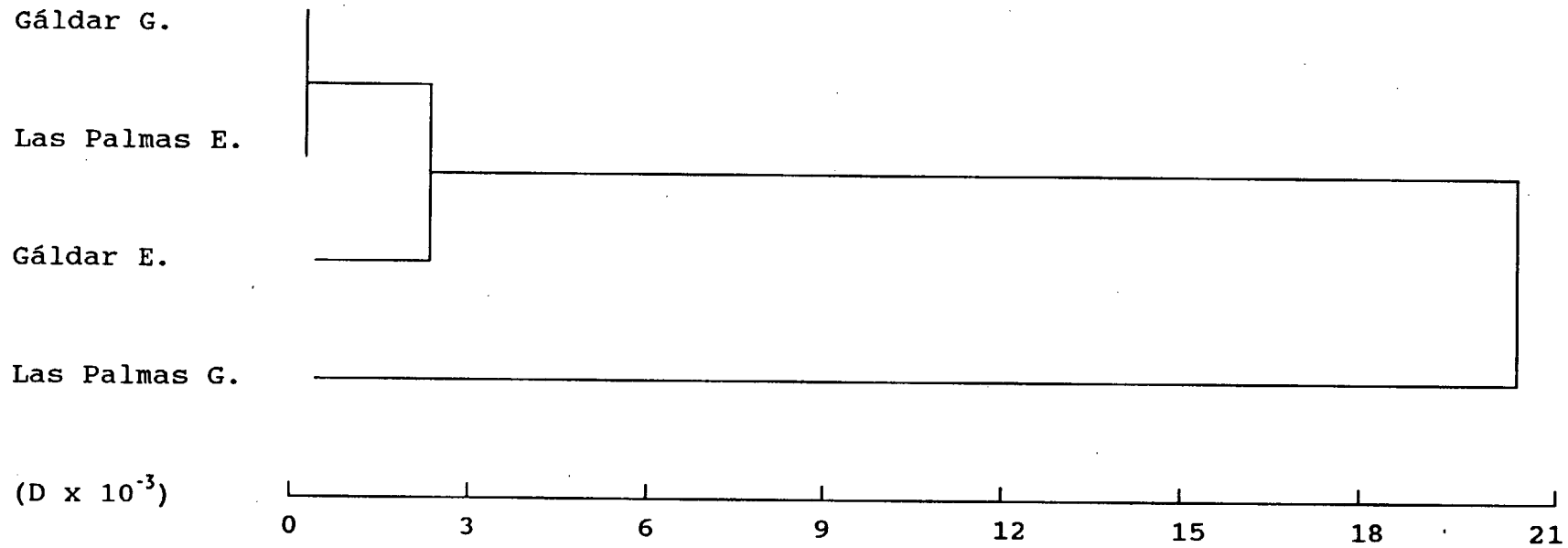
**FIGURA 6.4.** Dendrograma UPGMA empleando las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones de *Gelidium canariensis*. E = Esporofitos. G = Gametofitos. D = Distancia genética de Nei.



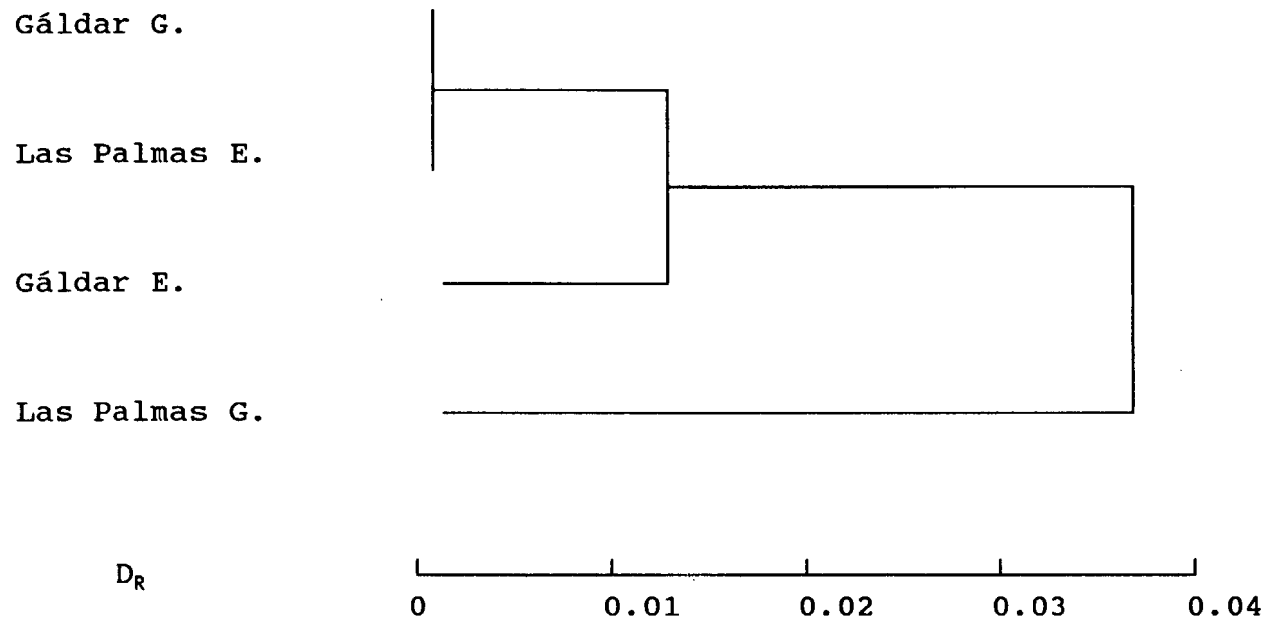
**FIGURA 6.5. Dendrograma UPGMA empleando las distancias genéticas de Rogers (1972) para las poblaciones de *Gelidium canariensis*. E = Esporofitos. G = Gametofitos.  $D_R$  = Distancia genética de Rogers.**



**FIGURA 6.6. Dendrograma UPGMA empleando las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones de *Gracilaria ferox*. E = Esporofitos. G = Gametofitos. D = Distancia genética de Nei.**



**FIGURA 6.7. Dendrograma UPGMA empleando las distancias genéticas de Rogers (1972) para las poblaciones de *Gracilaria ferox*. E = Esporofitos. G = Gametofitos.  $D_R$  = Distancia genética de Rogers.**





## 6.12.- Diferenciación genética entre las subpoblaciones.

### 6.12.1.- INDICES DE FIJACION DE WRIGHT.

En *Gracilaria ferox* no se pudo realizar el cálculo de los índices de fijación debido a que la heterocigosidad esperada en 3 de las 4 subpoblaciones analizadas fue cero.

La Tabla 6.37 muestra los índices de fijación  $F_{IS}$  de cada locus polimórfico (GDH-1 y DIA-2) en cada subpoblación esporofítica analizada de *Gelidium arbuscula*. En ambos loci (excepto DIA-2 de Agaete)  $F_{IS}$  fue menor que cero, lo cual también se reflejó al analizar conjuntamente ambos loci en cada población ( $F_{IS} = -0.841$  en Gáldar y  $-0.631$  en Pto. Cruz). Este valor negativo, que indica un exceso de heterocigóticos observados respecto a los esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg, también se observó al calcular la media de  $F_{IS}$  en cada locus entre todas las subpoblaciones (Tabla 6.39). ( $F_{IS} = -0.718$  en GDH-1 y  $-0.332$  en DIA-2, con una media global de  $-0.525$ ).

En *Gelidium canariensis*  $F_{IS}$  varió desde 1 (en PGI-3 de Gáldar), (lo cual indica un exceso de homocigóticos observados respecto a los esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg) a  $-0.333$  en EST-2 de Agaete (ligero exceso de heterocigóticos observados), (Tabla 6.38). Por poblaciones, analizando todos los loci, los valores oscilaron entre 0.918 en Gáldar, a 0.080 de Agaete, siendo en las tres subpoblaciones mayor que cero (Tabla 6.38). Es decir, en todas las subpoblaciones analizadas hubo en los loci polimórficos un exceso de homocigóticos observados respecto a los esperados.

El análisis de  $F_{IS}$  por locus, analizando todas las subpoblaciones, también dio valores mayores que cero, variando desde 0.202 en EST-2 a 0.644 en PGI-3, siendo la media global de  $F_{IS} = 0.452$ , (Tabla 6.40).

La diferenciación genética entre las subpoblaciones de *Gelidium arbuscula* ( $F_{ST}$ ) y el índice de fijación total, tomando la especie como una sola unidad reproductiva ( $F_{IT}$ ), se muestra para cada locus polimórfico en la Tabla 6.39. La diferenciación genética entre las subpoblaciones gametofíticas ( $F_{ST}(G)$ ) sólo se pudo calcular en GDH-1 y DIA-2. Sus valores fueron de 0.120 y 0.548 respectivamente, existiendo en ambos, una desviación significati-

**TABLA 6.37.** Valores obtenidos del índice de fijación  $F_{IS}$  de cada locus polimórfico analizado en las subpoblaciones esporofíticas de *Gelidium arbuscula*. El guión (---) indica que no se pudo calcular el índice debido a que la heterocigosidad esperada para dicho locus fue cero.

<i>Población.</i>	<b>Gáldar.</b>	<b>Agaete.</b>	<b>Pto. Cruz.</b>
<i>Locus.</i>			
GDH-1	- 0.718	-----	-----
DIA-2	- 0.971	0.366	- 0.631
<i>Media.</i>	- 0.841	0.366	- 0.631

**TABLA 6.38.** Valores obtenidos del índice de fijación  $F_{IS}$  de cada locus polimórfico analizado en las subpoblaciones esporofíticas de *Gelidium canariensis*. El guión indica que no se pudo calcular el índice debido a que la heterocigosidad esperada para dicho locus fue cero.

<i>Población.</i>	<b>Gáldar.</b>	<b>Agaete.</b>	<b>Pto. Cruz.</b>
<i>Locus.</i>			
EST-2.	0.805	- 0.333	-----
DIA-2	-----	0.511	-----
PGI-3	1.000	0.528	0.380
<i>Media</i>	0.918	0.080	0.380

**TABLA 6.39.** Valores de los índices de fijación de Wright detectados en *Gelidium arbuscula* entre todas las subpoblaciones. El guión indica que el locus dado fue invariable. E = Subpoblaciones esporofíticas. G = Subpoblaciones gametofíticas.

<i>Indice.</i>	$F_{IS}$	$F_{ST}$ (E)	$F_{ST}$ (G)	$F_{ST}$ (E/G)	$F_{IT}$
<i>Locus.</i>					
PGI-3	----	0.048 <sup>***</sup>	----	0.060 <sup>***</sup>	----
EST-2	----	0.061 <sup>***</sup>	----	0.264 <sup>***</sup>	----
GDH-1	- 0.718	0.227 <sup>***</sup>	0.120 <sup>*</sup>	0.229 <sup>***</sup>	- 0.512 <sup>***</sup>
ALP-1	----	0.062 <sup>***</sup>	----	0.076 <sup>***</sup>	----
MDH-1	----	0.117 <sup>***</sup>	----	0.200 <sup>***</sup>	----
MDH-3	----	0.111 <sup>***</sup>	----	0.144 <sup>***</sup>	----
DIA-2	- 0.332	0.404 <sup>***</sup>	0.548 <sup>***</sup>	0.489 <sup>***</sup>	0.398 <sup>***</sup>
<i>Media.</i>	- 0.525 <sup>***</sup>	0.147 <sup>***</sup>	0.334 <sup>***</sup>	0.210 <sup>***</sup>	- 0.057 <sup>***</sup>

\* =  $P < 0.05$  \*\* =  $P < 0.01$  \*\*\* =  $P < 0.001$

**TABLA 6.40.** Valores de los índices de fijación de Wright detectados en *Gelidium canariensis* entre todas las subpoblaciones. El guión indica que el locus dado fue invariable. E = Subpoblaciones esporofíticas. G = Subpoblaciones gametofíticas.

<i>Indice.</i>	$F_{IS}$	$F_{ST}$ (E)	$F_{ST}$ (G)	$F_{ST}$ (E/G)	$F_{IT}$
<i>Locus.</i>					
EST-2	0.202	0.212 <sup>***</sup>	0.465 <sup>***</sup>	0.346 <sup>***</sup>	0.573 <sup>***</sup>
DIA-2	0.511	0.000	0.247 <sup>***</sup>	0.112 <sup>***</sup>	0.632 <sup>***</sup>
PGI-3	0.644	0.084 <sup>***</sup>	0.385 <sup>***</sup>	0.286 <sup>***</sup>	0.781 <sup>***</sup>
ALP-1	----	0.020	----	0.025	----
MDH-1	----	0.049 <sup>**</sup>	----	0.068 <sup>***</sup>	----
<i>Media</i>	0.452	0.073 <sup>***</sup>	0.366 <sup>***</sup>	0.167 <sup>***</sup>	0.662 <sup>***</sup>

\* =  $P < 0.05$  \*\* =  $P < 0.01$  \*\*\* =  $P < 0.001$

va respecto a cero. Esta desviación fue detectada también en todos los loci polimórficos al analizar todas las subpoblaciones independientemente de su ploidía. Los valores oscilaron entre 0.489 en DIA-2 a 0.060 en PGI-3, con una media global de 0.210. En todos los casos hubo una desviación muy significativa respecto a cero. La diferenciación genética entre las subpoblaciones diploides ( $F_{ST}(E)$ ) osciló entre 0.404 en DIA-2 a 0.048 en PGI-3. En todos los loci analizados y en la media global,  $F_{ST}$  fue estadísticamente significativo (Tabla 6.39).

$F_{IT}$  sólo se pudo calcular en GDH-1 y DIA-2. En el primer locus se obtuvo un valor de -0.512, mientras que en EST-2 fue de 0.398. La media global de la especie fue de -0.057, lo que indica un ligero exceso de heterocigóticos en esta especie. En todos los casos hubo diferencias significativas (Tabla 6.39).

En *Gelidium canariensis*, la diferenciación genética entre las subpoblaciones diploides ( $F_{ST}(E)$ ) fue menor para todos los loci polimórficos que entre las subpoblaciones haploides ( $F_{ST}(G)$ ) (Tabla 6.40).  $F_{ST}(G)$  no se pudo calcular en los loci ALP-1 y MDH-1 por no ser polimórficos. La media de  $F_{ST}$  entre las subpoblaciones diploides fue de 0.073, entre las subpoblaciones haploides fue de 0.366, mientras que entre todas las subpoblaciones ( $F_{ST}(E/G)$ ) fue de 0.167 (Tabla 6.40). Todos los valores de  $F_{ST}(G)$  y ( $F_{ST}(E/G)$ ) en los loci polimórficos analizados se desviaron significativamente de cero. Por el contrario, entre las subpoblaciones diploides no se detectó desviación significativa de cero en DIA-2 y ALP-1, siendo el análisis global de todos los loci estadísticamente significativo (Tabla 6.40).

$F_{IT}$  en cada locus polimórfico y la media entre estos también se desviaron significativamente de las condiciones de panmixia (Tabla 6.40). En todos los casos  $F_{IT}$  fue positivo, lo que indica una deficiencia de heterocigóticos en la especie.

**6.12.2.- INDICES DE DIVERSIDAD GENETICA DE NEI.**

La Tabla 6.41 resume los valores de diversidad genética obtenidos entre las subpoblaciones de *Gelidium canariensis*. Los resultados se presentan según la ploidía de las subpoblaciones analizadas. Destacar que los valores de  $G_{ST}$  equivalen a  $F_{ST}$  de Wright.

Los valores de diversidad genética entre las subpoblaciones de *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox* se describen en las Tablas 6.42 y 6.43 respectivamente.

En ambas especies de *Gelidium* todos los parámetros de diversidad genética según Nei (1977) fueron superiores en las subpoblaciones haploides que en las subpoblaciones diploides (Tabla 6.41 y 6.42).

En *Gelidium canariensis*, la diversidad total media ( $H_T$ ) en las subpoblaciones haploides fue de 0.375, mientras que en las subpoblaciones diploides fue de 0.245 (Tabla 6.41). En *Gelidium arbuscula*,  $H_T$  en las subpoblaciones haploides fue de 0.383 mientras que en las subpoblaciones diploides fue de 0.277 (Tabla 6.42).

En las subpoblaciones haploides de *Gracilaria ferox* sólo se pudo calcular los parámetros de diversidad para PGI-3, siendo  $H_T$  para este locus de 0.420 (Tabla 6.43). En las subpoblaciones diploides,  $H_T$  fue mucho menor ( $H_T = 0.090$ ).

**TABLA 6.41. Diversidad genética (según Nei, 1973) obtenida en los loci polimórficos detectados en *Gelidium canariensis*. A) Subpoblaciones haploides. B) Subpoblaciones diploides.**

**A) Subpoblaciones haploides.**

<i>Indice.</i>	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
<i>Locus.</i>				
EST-2	0.433	0.232	0.201	0.465
DIA-3	0.198	0.147	0.048	0.247
PGI-3	0.496	0.305	0.191	0.385
<i>Media.</i>	<i>0.375</i>	<i>0.228</i>	<i>0.147</i>	<i>0.366</i>

**B) Subpoblaciones diploides.**

<i>Indice.</i>	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
<i>Locus.</i>				
EST-2	0.394	0.311	0.084	0.212
DIA-3	0.354	0.354	0.000	0.000
PGI-3	0.382	0.350	0.032	0.084
ALP-1	0.020	0.019	0.000	0.020
MDH-1	0.077	0.073	0.004	0.048
<i>Media.</i>	<i>0.245</i>	<i>0.221</i>	<i>0.024</i>	<i>0.073</i>

**TABLA 6.42. Diversidad genética (según Nei, 1973) obtenidos en los loci polimórficos detectados en *Gelidium arbuscula*. A) Subpoblaciones haploides. B) Subpoblaciones diploides.**

**A) Subpoblaciones haploides.**

<i>Indice.</i>	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
<i>Locus.</i>				
GDH-1	0.107	0.094	0.013	0.120
DIA-2	0.659	0.298	0.361	0.548
<i>Media.</i>	<i>0.383</i>	<i>0.196</i>	<i>0.187</i>	<i>0.334</i>

**B) Subpoblaciones diploides.**

<i>Indice.</i>	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
<i>Locus.</i>				
PGI-3	0.046	0.043	0.002	0.048
EST-2	0.458	0.430	0.028	0.061
GDH-1	0.343	0.265	0.078	0.227
ALP-1	0.058	0.055	0.004	0.062
MDH-1	0.287	0.253	0.033	0.116
MDH-3	0.130	0.116	0.015	0.112
DIA-2	0.616	0.368	0.249	0.404
<i>Media.</i>	<i>0.277</i>	<i>0.219</i>	<i>0.058</i>	<i>0.147</i>

**TABLA 6.43. Diversidad genética (según Nei, 1973) obtenidos en los loci polimórficos detectados en *Gracilaria ferox*. A) Subpoblaciones haploides. B) Subpoblaciones diploides.**

**A) Subpoblaciones haploides.**

<u>Indice.</u>	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
<i>Locus.</i>				
PGI-3	0.420	0.240	0.180	0.429

**B) Subpoblaciones diploides.**

<u>Indice.</u>	$H_T$	$H_S$	$D_{ST}$	$G_{ST}$
<i>Locus.</i>				
EST-3	0.122	0.113	0.008	0.070
PGI-3	0.058	0.056	0.002	0.031
<i>Media.</i>	0.090	0.085	0.005	0.050



**VII. GENETICA.  
DISCUSION.**

## 7.1.- Discusión.

La escasa literatura sobre variabilidad genética de las poblaciones de macroalgas marinas y la inexistencia de datos isoenzimáticos en los géneros *Gelidium* y *Gracilaria*, limitan considerablemente la comparación y discusión de los resultados obtenidos.

### 7.1.1.-INDIVIDUOS ANALIZADOS.

El número total de individuos analizados en las subpoblaciones gametofíticas de *Gelidium arbuscula* y *G. canariensis* (Tablas 6.2, 6.3) y de las subpoblaciones esporofíticas de *Gracilaria ferox* (Tabla 6.4) podría considerarse insuficiente, y por tanto dar lugar a una estima errónea del grado de heterocigosidad y variabilidad genética de estas subpoblaciones. No obstante, Nei y Roychoudhury (1974) y Gorman y Renzi (1979) han demostrado que este error está más condicionado por el número de loci analizados que por el tamaño muestral. Asimismo, la estima de la distancia genética de Nei es relativamente independiente del tamaño muestral, aumentando el error al disminuir el número de loci muestreado. Gorman y Renzi (1979) demostraron que en una población con un tamaño muestral de 8 a 12 individuos existía un error del 1% en la medida de la heterocigosidad en comparación con una población de un tamaño muestral mucho más grande.

Todos los loci analizados en las subpoblaciones esporofíticas de *Gelidium arbuscula* (Tabla 6.2) y *Gelidium canariensis* (Tabla 6.3) y de las subpoblaciones gametofíticas de *Gracilaria ferox* (Tabla 6.4) poseen un tamaño muestral superior a 12 individuos, mientras que el número de individuos analizados en las subpoblaciones gametofíticas de ambas especies de *Gelidium* nunca fue inferior a 11 (Tablas 6.2, 6.3). Por otro lado, nuestros resultados constituyen el mayor número de loci analizados en macroalgas marinas mediante electroforesis isoenzimática (Tablas 6.1, 4.1). Por tanto, podemos considerar que los resultados obtenidos en estas subpoblaciones son suficientemente significativos.

El bajo número de esporofitos detectados en las poblaciones de *Gracilaria ferox* podría hacer considerar erróneo el grado de diversidad

genética en estas subpoblaciones ya que los individuos identificados como heterocigóticos en sólo uno de los loci no se incluyeron en el cómputo global, generando, por tanto, una reducción artificial del grado de heterocigosidad de las subpoblaciones. No obstante, la magnitud en la reducción del grado de heterocigosis está compensada por la no inclusión en el cómputo global de los esporofitos homocigóticos, lo cual haría disminuir, aún más, el grado de polimorfismo.

El motivo fundamental del relativamente escaso número de gametofitos analizados en *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis*, y esporofitos de *Gracilaria ferox* se debe a la menor representación de estas fases en las poblaciones naturales, y a la dificultad de distinguir las fases en estas especies en ausencia de estructuras reproductoras. Sin embargo, nuestro estudio ha puesto de manifiesto, por vez primera, la posibilidad de detectar mediante electroforesis isoenzimática, la fase del ciclo biológico de especies isomórficas, eliminando, por tanto, la necesidad de que las plantas muestren estructuras reproductoras para su identificación.

## 7.2.- Loci y enzimas analizadas.

### Ficoeritrina. (Fe).

Sólo se identificó un locus de ficoeritrina, fijado para todas las subpoblaciones de las tres especies analizadas (Figura 6.1d, Tabla 6.1). Estos resultados coinciden con los detectados en *Porphyra yezoensis* (Miura *et al.*, 1979; Fujio *et al.*, 1985, 1987), y difiere de los resultados obtenidos por Lindstrom y South (1989), quienes detectaron dos loci en seis especies de Palmariaceae.

### Fosfatasa alcalina. (ALP).

Nuestros resultados con ALP (Figura 6.1a, Tablas 6.1, 6.2, 6.3) son similares a los descritos en *Codium fragile* por Malinowsky (1974), el cual también detectó un sólo locus fijado en la mayoría de las subpoblaciones para el alelo ALP-1a.

Cheney y Babbel (1978) describieron entre 4 a 6 loci isoenzimáticos para la fosfatasa ácida (ACP) en cuatro especies de *Eucheuma*. En dos especies, (*Eucheuma isiforme* y *E. nudum*) existía variabilidad genética en dos de sus loci, teniendo los otros tres una expresión variable. Innes (1984) encontró un excesivo número de bandas isoenzimáticas para ACP en *Enteromorpha linza* lo que imposibilitó la interpretación genética de las mismas.

En general, las fosfatasas constituyen un grupo isoenzimático con sustratos inespecíficos y funciones diversas que suelen mostrar una alta variabilidad genética (Selander, 1980a). Nuestros datos no coinciden con esta interpretación ni con los resultados obtenidos en *Eucheuma* y *Enteromorpha*, ya que no sólo hemos detectado un sólo locus en cada especie, sino que el grado de variabilidad de este locus es bajo o nulo (Tablas 6.2, 6.3).

#### **Diaforasa. (DIA).**

En macroalgas marinas la enzima Diaforasa sólo ha sido analizada en *Porphyra yezoensis* (Fujio *et al.*, 1985; 1987). En esta especie sólo se detectó un locus con 4 alelos variables según las subpoblaciones. Por el contrario, tanto en *Gelidium arbuscula* como en *Gelidium canariensis* se identificaron cuatro loci (Figura 6.1b) siendo uno de ellos variable (Tablas 6.1, 6.2, 6.3), mientras que en *Gracilaria ferox* se identificaron dos loci (Figura 6.1b), ambos invariables (Tabla 6.1).

#### **Esterasa. (EST).**

En macroalgas marinas la enzima esterasa ha sido analizada y caracterizada genéticamente únicamente en cinco especies de Palmariaceae (Lindstrom y South, 1989). Estos autores detectaron un locus EST-1 con 6 alelos diferentes en todas las especies. Por el contrario, en las tres especies analizadas en el presente trabajo, se identificaron 3 loci, siendo uno de ellos polimórfico (Figura 6.1, Tablas 6.1, 6.2, 6.3, 6.4). EST y PGI fueron las únicas enzimas donde se encontraron loci polimórficos en las tres especies estudiadas.

**Glutamato deshidrogenasa. (GDH).**

La enzima GDH ha sido estudiada genéticamente en 6 especies de *Porphyra* (Miura *et al.*, 1979; Fujio *et al.*, 1987; Lindstrom y Cole, 1990) y en 6 especies de Palmariacea (Lindstrom y South, 1989). En todos los casos se detectó un sólo locus coincidiendo plenamente con nuestros resultados en *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* (Figura 6.1e, Tabla 6.1).

**Malato deshidrogenasa. (MDH).**

La enzima MDH ha sido caracterizada genéticamente en 4 especies de *Eucheuma*, en las cuales se detectaron de 2 a 3 loci siendo sólo uno polimórfico en las 4 especies (Cheney y Babbel, 1978). Malinowsky (1974) detectó 2 loci variables en las poblaciones de *Codium fragile*, mientras que Fujio *et al.* (1985; 1987) identificaron un sólo locus polimórfico en *Porphyra yezoensis*. Estos resultados coinciden con nuestros datos en los que se han detectado dos loci en ambas especies de *Gelidium* (Figura 6.1f), siendo ambos polimórficos en *Gelidium arbuscula* (Tabla 6.2) y sólo uno en *Gelidium canariensis* (Tabla 6.3). Igualmente, en *Gracilaria ferox* se detectaron dos loci, ambos invariables (Figura 6.1f, Tabla 6.1).

**Fosfoglucoisomerasa. (PGI).**

En la mayoría de las macroalgas donde se ha analizado la enzima PGI se ha detectado un bajo número de loci implicados en su codificación. Cheney y Babbel (1978) detectaron un solo locus en 4 especies del género *Eucheuma*, siendo éste invariable. Lindstrom y South (1989) también detectaron un sólo locus con seis alelos en 6 especies de Palmariacea, encontrando polimorfismo sólo en dos de estas especies. En 6 especies de *Porphyra* (Miura *et al.*, 1978a; Fujio *et al.*, 1985; 1987; Lindstrom y Cole, 1990) también se detectó un solo locus. Malinowsky (1974) detectó dos loci en *Codium fragile*, siendo ambos polimórficos en alguna de las poblaciones analizadas. Por el contrario, nuestros datos describen por primera vez más de dos loci de PGI en macroalgas, detectándose 4 loci (uno de ellos polimórfico) en *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* (Figura 6.1g, Tablas 6.1, 6.2, 6.4) y 3 loci (uno de ellos polimórfico) en *Gelidium arbuscula* (Figura 6.1g, Tablas

6.1, 6.2).

#### **Fosfoglucomutasa. (PGM).**

En las tres especies estudiadas se detectó un solo locus invariable en la enzima PGM (Figura 6.1h, Tabla 6.1), coincidiendo con los resultados obtenidos en *Eucheuma isiforme* y *E. nudum* (Cheney y Babbel, 1978), en seis especies de Palmariacea (Lindstrom y South, 1989) y 3 especies de *Porphyra* (Lindstrom y Cole, 1990). También se ha descrito un sólo locus, con un grado de polimorfismo muy bajo, en *Enteromorpha linza* (Innes y Yarish, 1984) y *Porphyra yezoensis* (Fujio *et al.*, 1987). En todas las especies descritas en la literatura, los alelos de este locus tenían elevadas movilidades electroforéticas. Este dato coincide igualmente con nuestros resultados, ya que la movilidad relativa del locus PGM-1 en *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* fue de las mayores entre todas las isoenzimas analizadas (Figura 6.1h).

Estos resultados sugieren una gran conservación evolutiva de esta enzima en las Rodofitas. PGM cataliza la interconversión de glucosa-1-fosfato en glucosa-6-fosfato, lo cual es una reacción de gran importancia fisiológica (une el metabolismo del Ciclo de Calvin con el metabolismo del almidón en los cloroplastos y con el metabolismo de la sacarosa en el citosol (Gottlieb, 1987)) y por tanto, es lógico que haya sido conservada evolutivamente. Esta conservación se observa igualmente en plantas vasculares donde se han encontrado en la mayoría de las especies dos isoenzimas para PGM, localizadas en compartimentos subcelulares diferentes, citosol y cloroplastos y codificadas por genes nucleares independientes (Gottlieb, 1981; 1987).

#### **Superóxido dismutasa. (SOD).**

La enzima SOD ha sido estudiada electroforéticamente en un relativamente elevado número de especies de macroalgas *Eucheuma gelidium*, *E. acanthocladum*, *E. isiforme*, *E. nudum* (Cheney y Babbel, 1978), *Enteromorpha linza* (Innes y Yarish, 1984), *Codium fragile* (Malinowsky, 1974) en seis especies de la familia Palmariaceae (Lindstrom y South, 1989), y en

*Porphyra abbotae*, *P. fallax*, *P. kanakaensis*, *P. perforata*, *P. torta* (Lindstrom y Cole, 1990) y *P. yezoensis* (Fujio *et al.*, 1987). En todas las especies, excepto en *Porphyra abbotae* en la que se describieron dos loci, se detectó un solo locus, invariable en la familia Palmariaceae, en *Eucheuma gelidium*, *E. acanthocladum* y en *Porphyra yezoensis*, siendo polimórfico en el resto de las especies. Nuestros resultados difieren considerablemente de los descritos en la literatura, ya que por un lado detectamos 3 loci en *Gracilaria ferox*, y 6 loci en ambas especies de *Gelidium* (Figura 6.1i), y por otro lado no se detectó variabilidad genética en los loci analizados en ninguna de las tres especies (Tabla 6.1).

### 7.3.- Desviaciones de las frecuencias del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Considerando el ciclo de vida de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* (Figura 2.1), cabría suponer, en condiciones ideales, una proporción paritaria de gametofitos maculinos y femeninos en la población. Por otro lado, en el equilibrio de Hardy-Weinberg las frecuencias alélicas detectadas en los gametofitos femeninos deberían coincidir con las frecuencias alélicas de los gametofitos masculinos, y por tanto, si existiese cruzamiento al azar de ambos gametofitos y si las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg se cumpliesen en estas especies, las frecuencias genotípicas obtenidas en la fase esporofítica deberían coincidir con las frecuencias genotípicas esperadas al cruzarse al azar ambos gametofitos.

Por el contrario, en una población en la que sus individuos no se reproducen sexualmente se espera que existan grandes desviaciones en las frecuencias genotípicas del equilibrio de Hardy-Weinberg, así como una asociación no al azar de loci, además de una diversidad genotípica más baja que aquellas poblaciones que se reproducen sexualmente (Black y Johnson, 1977; Hebert y Crease, 1983; Young, 1979).

En macroalgas marinas se han descrito desviaciones de las condiciones de Hardy-Weinberg en las frecuencias genotípicas, y se ha demostrado o sugerido que la reproducción asexual es la responsable de tales desviaciones (Innes y Yarish, 1984; Cheney y Babbel, 1978; Malinowsky, 1974). Innes y

Yarish (1984) detectaron grandes desviaciones en las proporciones genotípicas en *Enteromorpha linza*, con una distribución no al azar entre los loci analizados, resultando en una distribución multiloci que se desviaba significativamente de los resultados esperados de una reproducción sexual. Esta interpretación se vio avalada posteriormente con el descubrimiento de la elevada tasa de reproducción asexual que presentaba la especie en cultivo (Innes y Yarish, 1984). En dos especies de *Eucheuma*, que mostraban una tendencia hacia una multiplicación vegetativa, Cheney y Babbel (1978) encontraron una deficiencia significativa de individuos heterocigóticos respecto a los valores esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg para dos loci de ACP. En *Codium fragile*, Malinowsky (1974) ha sugerido que la reproducción asexual era la causante de la fijación de heterocigóticos y consecuentemente de las desviaciones de los genotipos esperados. Resultados similares se han detectado en una gran variedad de organismos con reproducción asexual (Levin y Crepet, 1973; Hebert, 1974; Hebert y Crease, 1983; Black y Johnson, 1979; Shick y Lamb, 1977).

Las grandes desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg observadas en las frecuencias genotípicas de la mayoría de los loci polimórficos de los esporofitos de *Gelidium arbuscula*, (Tabla 6.14) y *Gelidium canariensis* (Tabla 6.15, 6.16) indica la existencia de una reproducción no al azar en ambas especies, así como una escasa influencia de la reproducción sexual en su ciclo de vida.

Aunque no se ha publicado ningún trabajo sobre el mecanismo de reproducción de las especies estudiadas, se ha descrito una reproducción mayoritariamente asexual mediante ejes rastreros a partir de individuos establecidos en *Gelidium chilense*, *G. lingulatum* (Santelices, 1989), *G. sesquipedale* (Oliveira 1989; Gorostiaga, 1990) y *G. latifolium* (Rueness y Fredriksen, 1989; Dixon y Irvine, 1977)). En *G. sesquipedale* la reproducción asexual llega a comprender hasta un 95% de los nuevos individuos de las poblaciones (Gorostiaga, 1990). También se ha descrito una reproducción asexual mayoritaria en *Iridaea cordata* (Hansen y Doyle, 1976; May, 1986); en



*Eucheuma* (Dawes *et al.*, 1974); en *Chondrus crispus* (Craigie y Pringle, 1978), en *Gigartina* (Braga, 1990). En general la mayoría de las especies de Clorofitas, Feofitas y Rodofitas presentan reproducción asexual (Santelices, 1990). La propagación vegetativa mediante rizoides se ha interpretado como un mecanismo conservativo de adaptación al medio, ya que los nuevos individuos son genéticamente idénticos a unos progenitores bien adaptados a unas condiciones ambientales determinadas (Stebbins y Hill, 1980; Santelices, 1990; Gorostiaga, 1990). La multiplicación vegetativa hace menos vulnerable la permanencia de la especie a la competencia por el sustrato que el complejo proceso de emisión, fijación y germinación de esporas. La estructura basal y la reproducción por propágulos sería consecuencia de una adaptación vegetativa adecuada, a expensas de la reproducción sexual (Santelices, 1990).

#### **7.4.- Variabilidad genética de las especies.**

Todos los parámetros de variabilidad genética analizados (número de alelos por locus, proporción de loci polimórficos y heterocigosidad) indican un escaso grado de variabilidad genética de las tres especies estudiadas en comparación con otras especies de macroalgas (Tabla 4.1).

##### **7.4.1.- NUMERO MEDIO DE ALELOS POR LOCUS.**

El número medio de alelos por locus (NMA) detectado en 4 especies de *Eucheuma* (Cheney y Babbel, 1978), y *Porphyra yezoensis* (Miura *et al.*, 1979; Fujio *et al.*, 1985), únicas especies de macroalgas en las que se han calculado estos parámetros (Tabla 4.1), es superior al mayor NMA detectado en cualquiera de las subpoblaciones (esporofítica o gametofítica) de *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*. Mientras en poblaciones salvajes de *Porphyra* se detectaron valores que oscilaron entre 1.50 y 1.64 (Miura *et al.*, 1979) y de *Eucheuma* el NMA osciló entre 1.36 de *E. isiforme* y 1.25 de *E. acanthocladum* (Cheney y Babbel, 1978), el NMA en *Gelidium arbuscula* fue de 1.24 (poblaciones esporofíticas) y 1.06 (poblaciones gametofíticas) (Tabla 6.8), y 1.17 y 1.10 en las subpoblaciones haploides y diploides respectivamente de *Gelidium canariensis* (Tabla 6.9). En *Gracilaria*

*ferox* el NMA fue aún más bajo (1.05 en las subpoblaciones esporofíticas y 1.02 en las subpoblaciones gametofíticas).

Los datos de NMA detectados en las agarofitas estudiadas, contrastan aún más con el valor promedio de 1.70 descrito en plantas superiores (Hamrick *et al.*, 1979).

#### 7.4.2.-PROPORCION DE LOCI POLIMORFICOS.

##### 7.4.2.1.-Subpoblaciones esporofíticas.

Empleando el criterio del 99% (criterio empleado en todos los trabajos de macroalgas), los valores obtenidos en las fases diploides de *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* (0.212 y 0.173 respectivamente), (Tablas 6.8, 6.9) y en *Gracilaria ferox* (0.06) (Tabla 6.10) son mucho más bajos que los valores detectados en otras macroalgas (Tabla 4.1). En *Eucheuma*, se ha descrito un grado de polimorfismo que oscilaba entre 0.250 en *E. acanthocladum* a 0.364 en *E. isiforme* (Cheney y Babbel, 1978). En *Codium fragile* (Malinowsky, 1974) se han descrito valores de 0.31 y 0.32 según las poblaciones. El rango de polimorfismo detectado en plantas superiores oscila entre 0.20 y 0.60 (Gottlieb, 1971; Selander, 1980). Hamrick *et al.* (1979) encontraron una media de polimorfismo de 0.368 en más de 100 plantas vasculares de diversa procedencia, y Gottlieb (1981) encontró una media de 0.183 en especies autofecundantes y 0.510 en las especies con reproducción cruzada.

##### 7.4.2.2.-Subpoblaciones gametofíticas.

Los valores medios de polimorfismo en las subpoblaciones (0.06 en *Gelidium arbuscula*, Tabla 6.8, 0.087 en *Gelidium canariensis*, Tabla 6.9, y 0.030 en *Gracilaria ferox*, Tabla 6.10) son incluso más bajos que los valores descritos en otras especies de macroalgas marinas. En *Porphyra yezoensis* el polimorfismo osciló, según las poblaciones, entre 0.333 y 0.583 (Miura *et al.*, 1979; Fujio *et al.*, 1985; 1987), lo cual indica que las fases haploides de *Porphyra* pueden tener un grado de polimorfismo incluso, más elevado que fases diploides (Tabla 4.1).

### 7.4.3.-HETEROCIGOSIDAD OBSERVADA.

La heterocigosidad media observada ( $H_o$ ) en las subpoblaciones diploides (0.075 en *Gelidium arbuscula*, Tabla 6.11, 0.038 en *Gelidium canariensis*, Tabla 6.12 y 0.011 en *Gracilaria ferox*, Tabla 6.13) es inferior al valor 0.271 detectado en la única especie en la que se ha analizado  $H_o$ , (*Codium fragile*) (Tabla 4.1). Los valores descritos en *Codium fragile* oscilaron entre 0.429 y 0.147 según las poblaciones, lo que significa una heterocigosidad observada casi 4 veces superior a la detectada en *Gelidium arbuscula*, 7 veces superior a la detectada en *Gelidium canariensis* y algo más de 25 veces a la detectada en *Gracilaria ferox*. Hay que destacar que en *C. fragile* se encontró, en los cuatro loci polimórficos detectados, que todos los individuos analizados eran heterocigóticos fijados.

En plantas superiores se han detectado valores de  $H_o$  más bajos. En helechos la heterocigosidad observada media en tres especies fue de 0.121, (Soltis y Soltis, 1987), mientras que en árboles forestales  $H_o$  varió entre 0.123 y 0.161 (Guries y Ledig, 1982). En general, la  $H_o$  en plantas oscila entre 0.050 y 0.250 (Gottlieb, 1981). En comparación con las plantas terrestres, la heterocigosidad observada en las tres agarofitas analizadas en el presente estudio constituyen valores considerablemente bajos.

### 7.4.4.-HETEROCIGOSIDAD ESPERADA.

#### 7.4.4.1.-Subpoblaciones esporofíticas.

La media de Heterocigosidad esperada, ( $H_e$ ) detectada en las subpoblaciones esporofíticas de las 3 especies analizadas ( $H_e = 0.018, 0.029$  y 0.014, en *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* respectivamente) (Tablas 6.11, 6.12, 6.13) es también muy baja, en comparación con los valores detectados en otras macroalgas marinas. En *Codium fragile* (Malinowsky, 1974) se ha encontrado un valor medio de  $H_e$  de 0.150 (Tabla 4.1) lo que equivale a una heterocigosidad esperada de 5 a 8 veces superior que la detectada en las especies estudiadas en el presente estudio.

En cualquier caso, los valores encontrados en las tres agarofitas estudiadas están más cercanos a los existentes en plantas superiores

autofecundantes ( $He = 0.033$ ) que en plantas con reproducción cruzada ( $He = 0.086$ ) (Gottlieb, 1981; Hamrick, 1979).

#### 7.4.4.2.-Subpoblaciones gametofíticas.

La heterocigosidad esperada (o diversidad génica) en las subpoblaciones haploides (0.070 en *Gelidium arbuscula* (Tabla 6.11); 0.048 en *Gelidium canariensis* (Tabla 6.12) y 0.010 en *Gracilaria ferox* (Tabla 6.13) dieron también valores más bajos que los encontrados en *Porphyra yezoensis* (0.127 y 0.197), (Fujio *et al.*, 1985; 1987) (Tabla 4.1).

### 7.5.- Causas de la escasa variabilidad genética.

La existencia de una escasa diversidad genética en las poblaciones naturales es debida principalmente, según Soltis y Soltis (1987), a:

- 1.- Cruzamientos no al azar.
- 2.- Mutación.
- 3.- Selección.
- 4.- Deriva genética.
- 5.- Escaso flujo genético entre las poblaciones.

De estas causas, el sistema de cruzamiento se ha descrito como el factor que más profundamente afecta la estructura genética de una población (Baur y Klemm, 1989).

La escasa diversidad genética existente en las poblaciones de las tres especies analizadas, podría ser debido a una reproducción asexual mayoritaria combinada con procesos de mutación, selección o deriva genética. La reproducción asexual sería la responsable del mantenimiento de las frecuencias alélicas y genotípicas de una generación a otra a partir de los clones genotípicos existentes en la población, ya que la asexualidad *per se* no afecta las frecuencias alélicas y genotípicas. En ausencia de segregación y recombinación, la reproducción asexual mantendría los efectos ocasionados

por la selección y la deriva genética, aunque en combinación con estos factores la reproducción asexual produciría una reducción de la diversidad genética (Hebert, 1974; Black y Johnson, 1979).

Aunque no podemos descartar un efecto de la mutación en las tres especies analizadas en este trabajo, parece improbable que la mutación haya producido una elevada tasa de fijación alélica en los mismos loci en todas las poblaciones de las tres especies analizadas.

Para poder estudiar la influencia de la selección y la deriva genética es necesario conocer previamente la estructura y biología de las poblaciones, aspectos poco conocidos en *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*. No obstante se sabe que otras especies del mismo género son perennes, estables y bien adaptadas a las condiciones ambientales, regenerando anualmente nuevos individuos por brotación de los rizoides emitidos por los individuos ya establecidos (Santelices, 1989; Oliveira, 1989; Pinheiro y Bezerra, 1980; Hoffman y Camus, 1989; Amsler y Searles, 1980; Gorostiaga, 1990; Silverthorne, 1977; Hoyle, 1978). Si extrapolamos estos datos a las especies estudiadas en el presente trabajo, resulta muy improbable que la escasa variabilidad genética detectada en las poblaciones, sea debida a un proceso reciente de cuello de botella. Por otro lado, al ser poblaciones localizadas en islas, es probable que haya existido un fenómeno de deriva por efecto fundador, explicándose la alta proporción de loci fijados en todas las poblaciones y su escasa variabilidad genética. El efecto de la deriva genética por efecto fundador se ha calculado en un 65% sobre la reducción de la heterocigosidad (Nei *et al.*, 1975), produciendo igualmente una reducción considerable del número de alelos por locus (Sytsma y Schaal, 1985) como hemos detectado en nuestras especies (Tabla 6.8, 6.9 y 6.10). En nuestro caso, cabría pensar que las especies, una vez establecidas a partir de un bajo número de individuos, son perennes y se reproducen mayoritariamente por vía asexual. Si la inmigración por fragmentos libres o esporas fuese baja, tal como sucede en otras especies de *Gelidium*, aumentaría el aislamiento genético entre las poblaciones disminuyendo aún más la escasa variabilidad genética debido al efecto fundador.

El efecto fundador explicaría el escaso número de alelos por locus detectados en la mayoría de las poblaciones de las tres especies estudiadas y la baja diversidad genética, así como la gran fijación de alelos en las poblaciones (Tablas 6.8, 6.9). Posiblemente el número de gametofitos colonizadores fue menor que el número de esporofitos, lo que explicaría la menor variabilidad genética detectada en las subpoblaciones haploides de *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* (Tablas 6.11, 6.12). En el caso de *Gracilaria ferox* el efecto pudo ser al contrario, es decir, el número de gametofitos colonizadores fue mayor que el de esporofitos. Las diferencias iniciales pueden persistir debido a la asexualidad mayoritaria de los individuos colonizadores, manteniendo los alelos fijados después del efecto fijador. Esta asexualidad mayoritaria actuaría con un efecto conservador en la estructura genética de la población, donde la selección y/o la mutación no ha tenido tiempo de restablecer la heterocigosidad de la misma. Resultados similares han sido descritos en *Lycopodium*, una especie que se reproduce mayoritariamente de forma asexual mediante bulbos (Levin y Crepet, 1973).

Estas circunstancias acentuadas explicarían la bajísima variabilidad genética en las subpoblaciones gametofíticas de *Gracilaria ferox* (Tabla 6.4). La ausencia de polimorfismo se ha descrito en otros organismos. Baur y Klemm (1989) no encontraron variabilidad isoenzimática en 5 poblaciones de la lombriz de tierra *Chondria clienta*. La reproducción por partenogénesis y autofecundación de esta especie, así como un efecto de deriva genética explicarían esta ausencia de variación (Baur y Klemm, 1989).

*Gracilaria* es considerada una especie perenne (Santelices, 1989), y no es probable la existencia de un cuello de botella reciente, por lo que la reproducción asexual mayoritaria y el bajo número de individuos existentes en las dos poblaciones analizadas explicarían la bajísima variabilidad genética. Resultados similares se han descrito en plantas superiores (Ellstrand y Roose, 1987; Hamrick *et al.* 1979) y en otros organismos (Selander y Ochman, 1983; Foltz *et al.* 1982).

### 7.6.- Preponderancia de las fases en las poblaciones.

La preponderancia de esporofitos respecto a gametofitos en las tres poblaciones de *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* coincide con los datos descritos en otras poblaciones canarias (J. Afonso, com. pers.), en otras especies de *Gelidium* [(Akatsuka, 1986, *G. sesquipedale* (Seoane-Camba, 1965; 1969; Gorostiaga, 1990), *G. robustum* (Johnstone y Feeney, 1944; Guzman del Proó y de la Campa de Guzmán, 1969), *G. pristoide* (Carter, 1985; Robertson *et al.*, 1985), *G. pusillum* (Seoane-Camba, 1965), *G. microdon* (Seoane-Camba, 1965)] y otras Rodofitas, [*Iridae cordata*, (May, 1986), *Eucheuma isiforme* (Dawes *et al.*, 1974), *Ceramium sp.* (Edwards, 1973) e *Hypnea musciformis* (Rao, 1970)].

El número de gametofitos fue siempre superior al número de individuos tetrasporofitos y vegetativos en las poblaciones de *Gracilaria ferox* en oposición a lo descrito en otras poblaciones de *Gracilaria* (Hoyle, 1978; Pinheiro y Bezerra, 1980).

Esta desproporción sugiere una vez más que la alternancia de generaciones, y consecuentemente la reproducción sexual, no parece ser el método de reproducción normal en *Gelidium* y *Gracilaria*.

Existen diversas hipótesis para explicar la desproporción de fases en macroalgas marinas, entre las que se incluyen (Santelices, 1990): 1) Mayor viabilidad de las carposporas con respecto a las tetrasporas (Johnstone y Feeney, 1944; Carter, 1985). 2) Mayor mortalidad de las plántulas haploides (Johnstone y Feeney, 1944; Hoyle, 1978; Kain, 1982). 3) Mayor capacidad de propagación vegetativa de los esporofitos en relación a los gametofitos, que se traduce en una mayor viabilidad de los individuos diploides (Hansen y Doyle, 1976; De Wreede y Klinger, 1988; Clayton, 1988; Akatsuka, 1986a). 4) Que la fase inicial colonizadora tenga una multiplicación vegetativa con la capacidad suficiente para mantener la ocupación y proporción inicial (Braga, 1990; Connor, 1985). 5) Diferencias en la duración de la maduración al estado reproductivo de cada fase (Kapraun, 1978). 6) Existencia de apomeiosis (algunas tetrasporas dan lugar directamente a nuevos tetrasporangios) (Magne, 1987; Carter, 1985).

Aunque no podemos descartar que la apomeiosis o las diferencias en el proceso de maduración de cada fase sean los responsables de la diferencia en la proporción de las fases de las especies estudiadas, nunca se han descrito estos fenómenos en ninguna especie de *Gelidium* y *Gracilaria*.

El elevado número de individuos heterocigóticos detectados en varios loci polimórficos de las subpoblaciones esporofíticas de *Gelidium arbuscula* (Tablas 6.2, 6.11, 6.37) coincide con los datos obtenidos en *Codium fragile* (Malinowsky, 1974), donde la mayoría de los individuos eran heterocigóticos fijados en la mayoría de las subpoblaciones, así como en otros organismos con reproducción asexual mayoritaria (Levin y Crepet, 1973; Hebert, 1974; Black y Jonhson, 1979; Hebert y Crease, 1980; Ayre, 1983; Gallagher, 1980; 1982).

Los esporofitos podrían poseer las ventajas del heterocigótico, mostrando una mayor adaptación a cambios ambientales y aptitud colonizadora que los gametofitos. Esta hipótesis ha sido formulada anteriormente en las poblaciones de macroalgas marinas, en base a los superiores límites de distribución geográficos de los esporofitos de *Gelidium* en comparación a las plantas gametofíticas (Dixon, 1965; De Wreede y Klinger, 1988; Clayton, 1988).

No podemos demostrar una relación entre la heterocigosidad de los loci analizados y una mayor preponderancia de la fase esporofítica. Tampoco podemos correlacionar una heterocigosidad observada con un posible vigor híbrido (no medido) ya que no disponemos de datos ecológicos ni datos sobre la viabilidad o desarrollo de los individuos. Tampoco es posible relacionar una mayor capacidad colonizadora de la fase esporofítica con la existencia de distintas formas moleculares de una o varias enzimas. No obstante, existen referencias que han correlacionado la heterocigosis proteica con una mayor eficacia biológica, velocidad de desarrollo y viabilidad en reptiles, coníferas e invertebrados marinos (Mitton y Grant, 1984; Zouros y Foltz, 1987).

En moluscos marinos se ha encontrado de forma clara y frecuente la correlación entre la heterocigosis proteica y varios caracteres relacionados con la eficacia biológica. En *Crassostrea virginica* se detectó una correlación positiva entre la velocidad de desarrollo (medida como peso en gramos al año de edad) y el número de loci heterocigóticos por individuo (Singh y Zouros,



1978; 1981; Zouros *et al.*, 1980; Foltz *et al.*, 1983). Las ostras con mayor grado de heterocigosis poseían menor variabilidad en peso, indicando una mayor capacidad de tamponamiento de los cambios ambientales de los individuos heterocigóticos. Resultados similares se han descrito en otras especies de ostras y mejillones (Fujio, 1979; Singh, 1982; Koehn y Gaffaney, 1984).

Al igual que en moluscos marinos y plantas superiores, se han descrito relaciones directas entre variaciones isoenzimáticas y aspectos ecológicos y morfológicos en macroalgas marinas. Miura *et al.* (1978) encontraron que en todas las poblaciones analizadas la mayoría de los individuos que poseían el gen *CAT<sup>A</sup>* mostraban un talo más largo, ancho y ondulado, mientras que la mayoría de los individuos que contenían el gen *CAT<sup>B</sup>* mostraban un fenotipo más estrecho con márgenes más rizados. Estos autores no pudieron encontrar ligamiento entre el gen de la catalasa y el gen (o genes) que codifican la forma del talo, concluyendo que la catalasa podría jugar un papel regulador en el metabolismo celular y por tanto inducir un cambio en el crecimiento y desarrollo de la especie. Innes (1987) encontró que los individuos de *Enteromorpha linza* de un área de baja salinidad eran genéticamente similares entre sí y muy diferentes a individuos de áreas adyacentes, separadas unos pocos cientos de metros. Analizando cinco loci isoenzimáticos encontró que dichos loci se distribuían en 13 clones (de 5.400 posibles), existiendo una relación entre los clones isoenzimáticos detectados y la salinidad del medio. Clones isoenzimáticos restringidos a localidades de salinidad alta crecía más lentamente que clones asociados a salinidades más bajas. En un artículo posterior, (Innes, 1988) describió la existencia de poblaciones que mostraban una diferenciación significativa entre zonas intermareales altas y bajas con respecto al locus GOT-1. Incluso existía una adaptación de los 13 clones isoenzimáticos a diferentes ambientes intermareales, de tal forma que aquellos clones asociados a una zona intermareal alta crecían más rápidamente a 24°C que los clones asociados a una zona intermareal baja.

Okumura y Fujino (1986) encontraron una asociación entre las frecuencias de los alelos termorresistentes de tres loci de dos enzimas (PGI y GDH) de *Porphyra yezoensis*, y la temperatura del hábitat, sugiriendo que

los tres loci actúan como un sistema poligénico con diferentes grados de contribución a la tolerancia a la temperatura, de tal forma que aquellos individuos con dos o más loci termorresistentes tenían la capacidad de colonizar hábitats más extremos.

Aunque en un principio nuestros datos electroforéticos en *Gelidium arbuscula* muestran un elevado número de individuos heterocigóticos en todas las subpoblaciones esporofíticas analizadas, hay que destacar que ningún loci polimórfico presenta una mayor frecuencia de heterocigóticos en todas las poblaciones analizadas (Tabla 6.2). ALP-1, DIA-1, GDH-1 y MDH-1, muestran al menos una subpoblación que no presenta exceso de heterocigóticos, incluso no se observaron (GDH-1 en Pto. Cruz). Por tanto, en base a los datos obtenidos mediante electroforesis, no podemos asumir una ventaja de heterocigóticos en esta especie como causa de la preponderancia esporofítica de las poblaciones.

En *Gelidium canariensis* tampoco puede justificarse la mayor proporción de esporofitos en base a la ventaja de los heterocigóticos, ya que el número de loci fijados en las subpoblaciones gametofíticas es menor y coincide con los loci menos polimórficos de las subpoblaciones esporofíticas (Tabla 6.3). Por otro lado, en la mayoría de los loci polimórficos detectados en las subpoblaciones esporofíticas de *Gelidium canariensis* existe un defecto de heterocigóticos en relación con los valores esperados en el equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 6.38).

Estos resultados indican que la preponderancia de la fase esporofítica actual en *Gelidium* puede ser debida a una preponderancia colonizadora de esporofitos, que se ha mantenido debido a un predominio de la reproducción asexual. De todas formas no se puede descartar la existencia de una ventaja de los heterocigóticos no detectada por electroforesis isoenzimática o no relacionada con las enzimas analizadas en el presente estudio.

La preponderancia de la fase gametofítica en las poblaciones de *Gracilaria ferox* corrobora la inexistencia de ventajas del heterocigótico y parece no estar asociada a las frecuencias alélicas de esta especie, ya que no se ha detectado variabilidad genética en dos de las cuatro subpoblaciones (Tabla 6.13), siendo cada una de ellas de diferente ploidía. Asimismo, el

número de loci polimórficos detectados en las otras dos subpoblaciones es muy bajo (sólo dos) (Tabla 6.10) lo que no guarda ninguna correlación con el nivel de ploidía. Estos datos sugieren que las poblaciones fueron colonizadas inicialmente por un mayor número de gametofitos que han mantenido esta proporción por la preponderancia de la reproducción asexual.

### **7.7.- Diferenciación genética entre fases.**

Las diferencias entre las frecuencias alélicas de ambas fases en las tres especies (Tablas 6.18, 6.19, 6.20) indica la existencia de diferenciación genética entre las subpoblaciones de gametofitos y esporofitos de una misma especie, localidad y población. Esta diferenciación genética se encuentra más acusada en *Gelidium arbuscula*, donde las diferencias en las frecuencias alélicas entre ambas fases en todas las poblaciones muestreadas fueron significativas (Tabla 6.18). Estos resultados son debido a la multiplicación vegetativa que ocurre en las poblaciones. Una multiplicación vegetativa predominante haría disminuir el flujo genético entre los esporofitos y gametofitos de una misma población y originan con el tiempo una considerable diferenciación genética.

Este flujo genético podría aumentar ocasionalmente si aumenta la incidencia de la reproducción sexual o el número de esporas que germinan en la población, disminuyendo parcialmente el aislamiento genético entre ambas fases, lo cual explicaría la existencia de menores diferencias entre las frecuencias alélicas de ambas fases en *Gelidium canariensis* en el momento de realizarse el presente estudio (Tabla 6.19).

### **7.8.- Diferenciación genética entre poblaciones.**

La heterogeneidad detectada en las frecuencias alélicas entre las poblaciones de *Gelidium arbuscula* (Tabla 6.18) y entre las poblaciones de *G. canariensis* (Tabla 6.19) indica que existe una considerable diferenciación genética entre las poblaciones de ambas especies, explicable por un escaso flujo genético entre las mismas. El flujo genético entre las poblaciones debido a esporas o fragmentos libres es muy escaso o nulo debido a: 1) Un elevado

tamaño y velocidad de sedimentación de las esporas (Gorostiaga, 1990; Okuda y Neushul, 1981; Amsler y Searles, 1980; Coon *et al.*, 1972; Alvarez *et al.*, 1978). 2) La disminución de la capacidad fijadora de las esporas con el tiempo (Salinas, 1987). 3) La lentitud del crecimiento de las plántulas nuevas germinadas por esporas o por fragmentos libres (Gorostiaga, 1990; Santelices, 1989) y 4) La depredación por herbívoros (Schonbeck y Norton, 1978; 1980; Kennelly, 1983; Dayton, 1985). Estas consideraciones, unidas a la considerable distancia que separa las poblaciones estudiadas (más de 20 km) hacen suponer que el flujo genético entre las poblaciones de *Gelidium* es muy escaso o nulo. Esta hipótesis es corroborada por los valores de diferenciación genética obtenidos entre las subpoblaciones haploides de *Gelidium canariensis* ( $G_{ST} = 0.366$ ) (Tablas 6.40, 6.41) y *G. arbuscula* ( $G_{ST} = 0.334$ ) (Tablas 6.39, 6.42).

Entre las subpoblaciones esporofíticas la diferenciación genética fue también altamente significativa respecto a cero (donde no existiría diferenciación) en *Gelidium arbuscula* (Tabla 6.39), mientras que en *Gelidium canariensis* dos de los cinco loci analizados y la media global fueron también estadísticamente significativos (Tabla 6.40). En *Porphyra* se han obtenido diferentes valores según las poblaciones (0.623, 0.472 y 0.125; Fujio *et al.*, 1985; 1987) aunque todos los valores han indicado una elevada diferenciación genética entre las distintas poblaciones. Las causas de estos elevados valores de diferenciación interpoblacional se han asociado con el ciclo de reproducción de *Porphyra yezoensis*, mayoritariamente por monoesporas, lo cual coincide conceptualmente con la interpretación de la incidencia de la reproducción asexual en la explicación de nuestros resultados.

Aunque la diferenciación entre las poblaciones de *Gelidium* fue estadísticamente significativa (Tablas 6.39, 6.40), resulta interesante destacar que la diversidad genética total  $H_T$  tiene un mayor componente dentro de la población; esto es, la diversidad genética intrapoblacional ( $H_S$ ) es mayor que la diversidad genética interpoblacional ( $D_{ST}$ ) (Tablas 6.41, 6.42).

La elevada diversidad genética intrapoblacional puede explicarse por tres causas (Hiebert y Hamrick, 1983): 1) Elevada tasa de cruzamiento. 2) Mantenimiento de tamaños de población elevadas. 3) Adaptación espacial y

temporal a ambientes heterogéneos.

Ya hemos discutido que las tres especies analizadas se reproducen mayoritariamente por vía asexual, por lo que las razones 2 y 3 pueden ser las causantes del aumento del grado de diferenciación dentro de la población.

Como los individuos se recolectaron en una zona de varios metros cuadrados donde existían diferentes microambientes, es lógico asumir la existencia de microdiferenciación genética en clones reproducidos asexualmente adaptados a zonas muy concretas de salinidad, irradiación, emersión etc. Como los individuos se analizaron sin considerar la zona (o microhábitat) de procedencia, es probable que se haya originado un aumento del índice de diferenciación intrapoblacional en comparación con el interpoblacional. Esta interpretación viene avalada por los datos de Innes (1987; 1988), en los que describe la existencia de un mayor grado de diferenciación genética entre individuos muy próximos entre sí, pero en ambientes heterogéneos, que entre poblaciones separadas varias decenas de kilómetros en *Enteromorpha linza*. Innes se basa en el efecto de una presión selectiva diferencial en los microhábitats de una misma población, lo que conlleva la promoción de variabilidad genética dentro de la globalidad de la población. Esta variabilidad se verá favorecida (en cuanto a su permanencia) si la población es perenne (Innes, 1988) y se reproduce vegetativamente.

Esta interpretación viene asimismo, avalada por la consideración de la zona intermareal como una zona que soporta unos niveles de diferenciación genética mayores que las zonas submareales debido a su ambiente heterogéneo (Levinton, 1973; Black y Johnson, 1979; Johnson y Black, 1984; Innes, 1988). La diferenciación genética en escala microgeográfica ha sido ampliamente descrita en especies de plantas superiores: en *Agrostis* (Jain y Bradshaw, 1966), en *Liatris* (Schaal, 1974), en *Veronica* (Linhard, 1974), en *Phlox* (Levin, 1977; 1978), en *Lisianthus* (Systma y Schaal, 1985) y en diversas especies de helechos (Soltis y Soltis, 1988).

Los datos de diferenciación genética obtenidos en *Gracilaria ferox* sugieren igualmente un escaso flujo genético entre las poblaciones, aunque como sólo se ha podido analizar este índice en un escaso número de loci (Tabla 6.43) esta indicación es un tanto discutible.

### 7.9.- Distancia e identidad genética entre poblaciones y subpoblaciones.

Los valores de identidad genética detectados entre las diferentes poblaciones y subpoblaciones de cada especie (Tablas 6.23, 6.24, 6.25, 6.26, 6.27, 6.28) son ligeramente más altos que los obtenidos en otras poblaciones de macroalgas y plantas superiores (Tabla 7.1). Lo mismo sucede con el índice de similitud de Rogers, cuyos valores fueron siempre ligeramente inferiores a los datos obtenidos con la identidad de Nei (Tabla 7.1), coincidiendo con los resultados de Avise (1980) al comparar los cálculos de ambos estadísticos en otros organismos.

Los elevados valores de identidad genética obtenidos entre las subpoblaciones de una misma especie (Tablas 6.23, 6.24, 6.25, 6.26, 6.27, 6.28), es consecuencia del alto número de loci invariables existentes en las subpoblaciones analizadas (Tabla 6.1), e indica que aunque existe diferenciación genética en los loci polimórficos, el genoma de *Gelidium* en su globalidad es muy similar y homogéneo en todas las poblaciones, debido (como anteriormente se indicó) al efecto fundador. Resultados similares se han descrito en helechos (Soltis y Soltis, 1988) y en poblaciones de pinos (Guries y Ledig, 1982).

El elevado valor de identidad en *Gracilaria ferox* (el mayor índice de identidad encontrado) (Tablas 7.1, 6.27, 6.28) es igualmente debido a la elevada fijación de los loci analizados en esta especie.

**TABLA 7.1. Identidad genética de Nei (I) y similitud genética de Rogers (Sr) detectados en macroalgas marinas.**

Especie.	I.	Sr.	
<u>A) Entre poblaciones de una misma especie.</u>			
Dentro de <i>Gelidium arbuscula</i>	0.973	0.941	Presente trabajo.
Dentro de <i>Gelidium canariensis</i>	0.983	0.961	"
Dentro de <i>Gracilaria ferox</i>	0.990	0.979	"
Dentro de <i>Palmaria palmata</i>	0.886	-----	Lindstrom y South, 1989.
Dentro de <i>Porphyra yezoensis</i>	-----	0.729	Miura <i>et al.</i> 1979.
Dentro de <i>Porphyra yezoensis</i>	0.452	0.420	Fujio <i>et al.</i> 1985.
Dentro de <i>Eucheuma isiforme</i>	0.996	-----	Cheney y Babbel, 1978.
Dentro de <i>Eucheuma nudum</i>	0.895	-----	"
Dentro de <i>Codium fragile</i>	0.870	-----	Malinowsky, 1974.
Plantas superiores.			
<u>B) Entre especies congénicas.</u>			
Entre <i>Gelidium arbuscula</i> - <i>G. canariensis</i>	0.850	0.797	Presente trabajo.
Entre <i>Palmaria palmata</i> - <i>P. hecatensis</i>	0.142	-----	Lindstrom y South, 1989.
Entre <i>P. palmata</i> - <i>P. mollis</i>	0.261	-----	"
Entre <i>P. palmata</i> - <i>P. callophyloides</i>	0.097	-----	"
Entre <i>P. mollis</i> - <i>P. callophyloides</i>	0.391	-----	"
Entre <i>P. hecatensis</i> - <i>P. mollis</i>	0.335	-----	"
Entre <i>P. hecatensis</i> - <i>P. callophyloides</i>	0.400	-----	"
Entre <i>Eucheuma isiforme</i> - <i>E. nudum</i>	0.904	-----	Cheney y Babbel, 1978.
Entre <i>E. gelidium</i> - <i>E. acanthocladum</i>	0.857	-----	"
Entre <i>E. nudum</i> - <i>E. gelidium</i>	0.430	-----	"
Entre <i>E. nudum</i> - <i>E. acanthocladum</i>	0.406	-----	"
Entre <i>E. isiforme</i> - <i>E. gelidium</i>	0.421	-----	"
Entre <i>E. isiforme</i> - <i>E. acanthocladum</i>	0.410	-----	"
Plantas superiores.	0.670	-----	Crawford, 1983.

### 7.10.- Relaciones filogenéticas intrapoblacionales.

El análisis de las relaciones filogenéticas entre las subpoblaciones de cada especie empleando el método UPGMA con ambas distancias genéticas, aportaron resultados diferentes en cada especie, aunque en todos los casos quedó patente la inexistencia de una correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética.

En *Gelidium arbuscula*, la distancia genética de Nei y la distancia de Rogers dieron resultados muy diferentes al agrupar las subpoblaciones estudiadas (Figuras 6.2, 6.3). Mientras que empleando la distancia de Nei se obtuvo una mayor identidad por localidad (independientemente de la ploidía de las subpoblaciones) (Figura 6.2), empleando la distancia de Rogers se obtuvo una mayor identidad genética entre las subpoblaciones en base a su condición de ploidía, (independientemente de su localización geográfica) (Figura 6.3). Estas diferencias se reflejaron también en el coeficiente de correlación entre los valores de ambas distancias, que es el más bajo de las tres especies ( $r = 0.795$ ).

En *Gelidium canariensis* se obtuvieron los mismos resultados empleando las dos distancias (Figuras 6.4, 6.5), destacando una menor distancia genética entre las subpoblaciones haploides y diploides de cada localidad, excepto en Gáldar donde las subpoblaciones gametofíticas y esporofíticas presentaron mayor distancia genética (Figuras 6.4, 6.5). Este resultado se debe fundamentalmente a que el alelo mayoritario en el locus PGI en las subpoblaciones haploides fue PGI-3b, mientras que en el resto de las subpoblaciones el alelo mayoritario fue PGI-3c (Tabla 6.6), lo que aleja la subpoblación gametofítica de Gáldar del resto de las subpoblaciones. Asimismo existe una mayor conexión entre las poblaciones de Pto. Cruz y Agaete (separadas por un centenar de kilómetros) que entre las poblaciones de Agaete y Gáldar (separadas sólo unos 20 kilómetros) (Figuras 6.4, 6.5). Estos datos indican la inexistencia de correlación entre la diferenciación genética y la distancia geográfica, lo cual corrobora la existencia de una diferenciación a escala microgeográfica. Estos resultados coincide con los obtenidos por Innes (1987; 1988) en *Enteromorpha linza*, quien encontró también una diferenciación genética independientemente de la distancia



geográfica, no existiendo una relación directa entre la distancia genética (de Hedrick) y la distancia geográfica. Cheney y Babbel (1978) en *Eucheuma nudum* describieron también la inexistencia de relación entre la distancia genética (de Nei) y la distancia geográfica. Resultados similares se han descrito en *Porphyra* (Miura *et al.*, 1979).

Las relaciones filogenéticas entre las subpoblaciones de *Gracilaria ferox* ofrecieron los mismos resultados empleando una u otra medida de distancia (Figuras 6.6, 6.7). En esta especie, las relaciones entre las subpoblaciones no estuvo condicionada por el nivel de ploidía ni por la localización geográfica. Estos resultados se deben, a la elevada fijación de loci en esta especie (Tabla 6.1), a la indetección de polimorfismo en los loci analizados en dos de las cuatro subpoblaciones (Tabla 6.4) y a la diferenciación existente entre las fases (Tabla 6.20).

### 7.11.- Distancia e identidad genética entre especies.

#### Loci diagnóstico.

No existen referencias del cálculo de loci diagnóstico descrito por Ayala y Powell (1972) en macroalgas.

Entre las dos especies de *Gelidium* solamente se detectaron dos loci (PGI-5 y SOD-7) exclusivos de *Gelidium canariensis* y uno (SOD-1) exclusivo de *Gelidium arbuscula* (Tabla 6.21). Entre *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox* se detectaron 9 loci exclusivos de alguna de las especies (Tabla 6.22A) y entre *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox* se encontraron 10 loci exclusivos (Tabla 6.22B). Estas diferencias indican claramente la utilidad de las técnicas isoenzimáticas en la identificación de las especies con la catalogación de loci diagnóstico, y la separación evolutiva existente entre ambos géneros, y que se acusa en las identidades genéticas detectadas. La identidad genética media de Nei entre *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* fue de 0.850 mientras que entre *Gracilaria ferox* y ambas especies de *Gelidium* fue aproximadamente de 0.41 (Tabla 6.31). Estos valores de I están dentro del rango descrito en otras macroalgas (Tabla 7.1). Cheney y Babbel (1978) encontraron valores de identidad entre especies del género

*Eucheuma* de 0.904 y 0.857. Por el contrario, Lindstrom y South (1989) encontraron valores de I que oscilaron entre 0.098 y 0.400 entre especies del género *Palmaria*, que sorprendentemente son más bajos que los valores descritos entre especies del mismo género en otros organismos. En las revisiones de Avise (1975) y Thorpe (1979) se describen identidades genéticas entre especies congénicas que oscilan entre 0.500 y 0.800 con unos valores medios entre 0.50 y 0.60. En plantas superiores se ha descrito un valor medio de 0.67 (Gottlieb, 1977; Crawford, 1983), aunque entre especies vegetales congénicas se han obtenido valores superiores a 0.85 (Gottlieb, 1974a, Babbel y Selander, 1974; Levy y Levin, 1975; Crawford, 1983).

Por tanto, los valores de I entre ambas especies de *Gelidium* son ligeramente más altos que los descritos en plantas superiores y muy similares a los descritos en otras macroalgas (Tabla 7.1). Estos datos corroboran que el genoma, en su globalidad, de las dos especies de *Gelidium* es más homogéneo que el de diversos géneros de plantas superiores.

Aunque existen pocas referencias (tantos en animales como en vegetales) de las estimas de identidad genética intergenéricas, por lo general son inferiores a 0.40 (Thorpe, 1979). Lindstrom y South (1989) encontraron valores de identidad genética entre especies del género *Palmaria*, *Devalerae* y *Halosaccion* que oscilaron entre 0.092 y 0.542, con una media de 0.300. Estos valores de identidad entre especies de diferente género son muy dispares, llegando incluso a alcanzar valores mayores que los encontrados por los mismos autores para especies congénicas. Estos autores encontraron que la mayoría de los loci analizados (15 loci) estaban fijados para un alelo determinado en cada especie. De 43 alelos detectados, sólo 5 de ellos tenían frecuencias, en alguna de las especies, menores de 1. Además, el número de individuos analizados fue relativamente bajo, y recogidos de diferentes áreas geográficas.

Nuestros resultados ( $I = 0.400$  y  $Sr = 0.377$ ) entre ambas especies de *Gelidium* y *G. ferox*, (Tabla 6.31) indican una cierta relación evolutiva entre estas especies, coincidiendo con la hipótesis de Hommesand y Fredericq (1988) que sostienen que las agarofitas son el grupo evolutivo más antiguo de las macroalgas, indicando que Gelidiaceae y Gracilariaceae son miembros

muy relacionados de ese gran grupo.

### 7.12.- Tiempos evolutivos entre especies.

Los cálculos del tiempo evolutivo entre las diferentes especies (815000 años entre ambas especies de *Gelidium*, y aproximadamente 4.4 millones de años entre estas dos especies y *Gracilaria ferox*, Tabla 6.36) reflejan la diferencia genómica entre ambas especies de *Gelidium* y *Gracilaria ferox*. No obstante, hay que tener la cautela de la sobreestima del tiempo evolutivo. En este sentido Nei (1987) expone que en presencia de un cuello de botella o deriva genética la tasa evolutiva de  $10^{-7}$  da una sobreestima del tiempo evolutivo. Asimismo hay que considerar que el reloj evolutivo medido por electroforesis isoenzimática es más exacto con especies relacionadas (Nei, 1987). Por todo lo cual los valores entre ambas especies de *Gelidium* y *Gracilaria ferox* pueden ser mayores que los indicados, lo cual coincide con una posible baja tasa evolutiva en macroalgas marinas. Por otro lado, las especies y poblaciones analizadas no están en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual puede aumentar aún más el grado de error en el cálculo del tiempo evolutivo.

Según los datos electroforéticos, posiblemente el proceso de especiación evolutivo de *Gelidium canariensis*, comenzó hace unos 800.000 años tras la colonización de las islas por un antecesor de *Gelidium arbuscula* y *G. canariensis* que dio lugar al *Gelidium canariensis* actual. Posteriormente a esta se produjo una segunda colonización de *Gelidium arbuscula*, dando lugar al *Gelidium arbuscula* actual. Asimismo sugiere que esta especiación se inició en las islas centrales del archipiélago, posiblemente en Gran Canaria, ya que no se ha detectado *Gelidium* en ninguna de las dos islas orientales (las más antiguas del archipiélago) o que se produjo algún fenómeno catastrófico en las poblaciones de estas islas desapareciendo ambas especies de *Gelidium*. Posteriormente al proceso de especiación y debido a la dirección Sur-Suroeste de las corrientes marinas en Canarias, determinados individuos de ambas especies colonizaron las islas occidentales.

Sería necesario estudiar isoenzimáticamente varias poblaciones de las

---

islas occidentales y de la costa africana, así como analizar datos morfológicos y ecológicos de las especies para poder clarificar este punto.

## **VIII. CONCLUSIONES.**

## 8. Conclusiones.

### 8.1.- CONCLUSIONES METODOLOGIA.

1.- La imposibilidad de detectar 18 sistemas enzimáticos en *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*, se debe probablemente a su escasa actividad enzimática y no a la metodología empleada.

2.- La metodología más adecuada para obtener una buena resolución enzimática por electroforesis de las tres especies estudiadas fue la siguiente:

- \* Almacenamiento de los individuos por cultivo en condiciones ambientales controladas.
- \* Homogeneización con nitrógeno líquido en mortero.
- \* Tampón de extracción Tris-HCl pH 7.4 con PVP o PVPP (1-3%) y ácido ascórbico (0.02-0.5 M).
- \* Geles de acrilamida empleando el sistema discontinuo de Davis con o sin gel hacinador y geles de almidón empleando los sistemas Citrato/histidina pH 7.0 y Tris-citrato pH 7.8/Borato-NaOH pH 8.6.
- \* La temperatura de tinción no afecta la resolución en un rango de 22 a 37°C.

3.- El efecto "sin deshidrogenasa" es un fenómeno común en *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* debido probablemente a la acción de la enzima MDH, aumentando con el deterioro fisiológico de los individuos.

## 8.2.- CONCLUSIONES. GENETICA.

1.- Confirmando la utilidad de la electroforesis isoenzimática en sistemática de macroalgas, se han identificado 3 loci diagnóstico entre *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis*, 9 loci diagnóstico entre *Gelidium arbuscula* y *Gracilaria ferox* y 10 loci diagnóstico entre *Gelidium canariensis* y *Gracilaria ferox*. Asimismo la técnica de electroforesis isoenzimática permite identificar individuos esporofíticos de especies isomórficas en estado no reproductor.

2.- Existen grandes desviaciones en las frecuencias genotípicas del equilibrio de Hardy-Weinberg en la mayoría de los loci polimórficos de todas las poblaciones de *Gelidium arbuscula* y *G. canariensis* así como diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de las fases gametofíticas y esporofíticas de las tres especies estudiadas. Ambas características se deben probablemente a un tipo de reproducción eminentemente asexual.

3.- Las tres especies estudiadas muestran el grado de variabilidad genética más bajo descrito en macroalgas marinas. En este contexto, *Gracilaria ferox* fue la especie con menor variabilidad genética, y *Gelidium arbuscula* la de mayor. Asimismo, la variabilidad genética de las subpoblaciones gametofíticas de *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* es menor que la variabilidad genética de las subpoblaciones esporofíticas. Esta escasa variabilidad genética se debe probablemente a un proceso de deriva genética por efecto fundador, combinado con una reproducción asexual preponderante.

4.- El grado de diferenciación entre las poblaciones y subpoblaciones de cada especie es significativo, consecuencia probable de un inexistente o escaso flujo genético entre las mismas.

5.- El elevado grado de diferenciación genética intrapoblacional unido a la ausencia de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica en ambas especies de *Gelidium* sugieren la existencia de microdife-

renciación genética como consecuencia de un proceso de adaptación diferencial a microhábitats.

6.- La identidad genética entre *Gelidium arbuscula* y *Gelidium canariensis* es muy similares a la descrita en otras macroalgas marinas. Asimismo, la identidad genética entre ambas especies del género *Gelidium* y *Gracilaria ferox* es más elevada que la descrita en otras macroalgas, indicando la existencia de una relación evolutiva relativamente cercana entre ambos géneros.

7.- Asumiendo los posibles errores de cálculo asociados a una aparentemente elevada incidencia de la reproducción asexual y a procesos de deriva genética, los cálculos de distancia genética y tiempos evolutivos indican que la especiación entre ambas especies de *Gelidium* ocurrió hace aproximadamente 800.000 años.



## **BIBLIOGRAFIA.**

---

## Bibliografía.

---

- Akatsuka, I. 1986. Surface cell morphology and its relationship to other genetic characters in non-parasitic Gelidiaceae (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 29:59-68.
- Alvarez, A., M. Caloca, R. Gancedo, M.C. Mosquera y J.M. Salinas. 1978. Estudios sobre algas industrializables en España. Parte 1. Contribución al conocimiento de la estructura microscópica de los filoides fértiles de *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born et Thur. *Bol. Inst. esp. Oceanogr.* 4: 111-124.
- Amsler, C.D. y R.B. Searles. 1980. Vertical distribution of seaweed spores in a water column offshore of North Carolina. *J. Phycol.* 16: 617-619.
- Avise, J.C. 1980. Diferenciación genética durante la especiación. En: *Evolución Molecular*. Cap. 7. Págs. 110-127. Omega. Barcelona.
- Avise, J.C. 1975. Systematic value of electrophoretic data. *Syst. Zool.* 23: 465-481.
- Ayala, F.J. 1982. Population and evolutionary genetics. A primer. The Benjamin/Cummings Publishing. 268 págs.
- Ayala, F.J. y J.R. Powell. 1972. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 1094-1096.
- Ayala, F.J., J.R. Powell, M.L. Tracey, C.A. Mourão y S. Pérez-Salas. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70: 113-139.
- Ayala, F.J., M.L. Tracey, L.G. Barr, J.F. McDonald y S. Pérez-Salas. 1974. Genetic variation in natural populations of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of proteins polymorphisms. *Genetics* 77: 343-384.
- Ayre, D.J. 1983. The effect of asexual reproduction and intergenotypic aggression on the genotypic structure of populations of the sea anemone *Actinia tenebrosa*. *Oecologia* 57: 158-165.
- Babbel, G.R. y R.K. Selander. 1974. Genetic variability in edaphically restricted and widespread plant species. *Evolution* 28: 619-630.

- Balakrishnan, V. y L.D. Sanghvi. 1968. Distance between populations on the basis of attribute data. *Biometrics* 24: 859-865.
- Baur, B. y M. Klemm. 1989. Absence of isozyme variation in geographically isolated populations of the land snail *Chondrina clienta*. 63: 239-244.
- Benson, K.T. y P.H. Bird. 1987. Introduction and foreword. En: Seaweed cultivation for renewable resources. Developments in aquaculture and fisheries science, vol. 16. K.T. Bird y P.H. Benson (Edts.). Elsevier.
- Bernstein, S.C., L.H. Throckmorton y J.L. Hubby. 1973. Still more genetic variability in natural populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70: 3928-3931.
- Black, R. y M.S. Johnson. 1979. Asexual viviparity and population genetics of *Actinia tenebrosa*. *Mar. Biol.* 53: 27-31.
- Blair, S., A.C. Mathieson y D.P. Cheney. 1982. Morphological and electrophoretic investigations selected species of Chaetomorpha. (Chlorophyta, Cladophorales). *Phycologia* 21: 164-172.
- Braga, M.R. 1990. Reproductive characteristics of *Gigartina teedii* (Roth) Lamouroux (Rhodophyta. Gigartinales), a turf-forming species: field and laboratory culture studies. *Bot. Mar.* 33: 401-409.
- 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 reproduction rates of the marine coccolithophores *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Limnol. Oceanogr.* 27: 236-245.
- Brewbaker, J.L., M.D. Upadhyya, Y. Mäkinen y T. Macdonald. 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoretic methods and applications. *Physiologia Plantarum*. 21: 930-940.
- Brewer, J.M. 1967. Artifact produced in disc electrophoresis by ammonium persulfate. *Science*. 156: 256-257.
- Brewer, G.J. 1970. An introduction to isozyme techniques. Academic Press.
- Brown, A.H.D. 1978. Isozymes plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52: 145-157.
- Brown, A.H.D. 1979. Enzyme polymorphism in plant population. *Theoret. Pop. Biol.* 15: 1-42.

- Candia, A., R. Galleguillos y E. Reyes. 1984. Electrophoretic studies in *Porphyra columbina* Montagne of Concepción zone, Chile. Abst. J. Phycol.
- Cavalli-Sforza, L.L. y A.W.F. Edwards. 1964. Analysis of human evolution. En: Proc. 11th Intl. Cong. Genet. págs. 923-933.
- Cavalli-Sforza, L.L. y A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. Amer. J. Hum. Genet. 19: 233-257.
- Carr, B. y G. Johnson. 1980. Polyploidy. Plants and electrophoresis. En W. Lewis Edts.. Polyploidy. 521-528. Plenum Press. New York.
- Carter, A.R. 1985. Reproductive, morphology and phenology, and culture studies of *Gelidium pristoides* (Rhodophyta) from Port Alfred in South Africa. Bot. Mar. 28: 303-311.
- Chakraborty, R., P.A. Fuerst y M. Nei. 1978. Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. II. Gene differentiation between populations. Genetics 88: 367-390.
- Chapman, V.J. y D.J. Chapman. 1980. Seaweeds and their uses. Chapman and Hall. Londres. 497 págs.
- Cheney, D.P. 1985. Electrophoresis. En: Handbook of phycological methods. Ecological field methods: Macroalgae. M.M. Littler and D.S. Littler (Edts). Cambridge University Press. Págs. 87-114.
- Cheney, D.P. y G. Babbel 1978. Biosystematic studies of the red algal genus *Euchuema*. 1. Electrophoretic variation among Florida populations. Marine Biology 47: 251-264.
- Cheney, D.P. y A.C. Mathieson. 1979. Population differentiation in the seaweed *Chondrus crispus*: Preliminary results. Isozyme Bull. 12: 57.
- Clayton, M.N. 1988. Evolution and life histories of brown algae. Bot. Mar. 31: 379-387.
- Coesel, P.F.M y S.B.J. Menken. 1986. Allozymic evidence for aneuploidy in *Closterium ehrenbergii meneghini* (Desmidiaceae. Chlorophyta). Phycologia. 25 (4): 579-582.
- Connor, J.L. 1985. Seasonal changes in an algal community of a tropical fringing reef in Panamá. Berkeley, University of California. Dept. of Botany. Ph. D. Thesis).
- Coon, D., M. Neushul y A.C. Charters. 1972. The settling behaviour of marine algal spores. Proc. Int. Seaweed Symp. 7: 237-242.

- Cuatrecasas, P. y S. Segal. 1966. Electrophoretic heterogeneity of mammalia galactose dehydrogenase. *Science* 154: 533-535.
- Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. En: *Isozymes in plant genetics and breeding*. S.D. Tanksley and T.J. Orton (Edts). Part A. Elsevier. págs. 257-287.
- Craigie, J.S. y J.D. Pringle. 1978. Spatial distribution of tetrasporophytes and gametophytes in four maritime populations of *Chondrus crispus*. *Can. J. Bot.* 56: 2910-2914.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Dayton, P.K. 1985. Ecology of kelp communities. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16: 215-245.
- Dawes, C.J., A.C. Mathieson y D.P. Cheney. 1974. Ecological studies of Floridian *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales) I. Seasonal growth and reproduction. *Bull. Mar. Sci.* 24: 235-273.
- Derbyshire, E. y B.A. Whitton. 1968. A disc electrophoretic study of proteins of blue-green algae. *Phytochem.* 7: 1355-1360.
- De Wreede, R. y T. Klinger. 1988. Reproductive strategies in algae. En: *Plant Reproductive Ecology: Patterns and strategies*. J. Lovett-Doust y L. Lovett-Doust (Edts.), Oxford University Press. Oxford. Págs. 267-284.
- Dixon, P.S. 1965. Perennation, vegetative propagation and algal life histories, with special reference to *Asparagopsis* and other Rhodophyta. *Bot. Gothoburg.* 3: 67-74.
- Dixon, P.S. 1973. Cell structure and function. En: *Biology of the Rhodophyta*. Oliver. Boyd. Edimburgo. págs. 34-38.
- Dixon, P.S. y L.M. Irvine. 1977. Seaweeds of the British isles. Volume 1. Rhodophyta, part 1. Introduction, Nemaliales, Gigartinales. British Museum (Natural History), Londres. 252 págs.
- Dobzhansky, T., F.J. Ayala, G.L. Stebbins y J.W. Valentine. 1983. *Evolución*. Ediciones Omega. Barcelona. 558 págs.
- Dring, M.J.. 1982. *The biology of marine plants*. E. Arnold (Edts). LTD. Londres. 199 págs.
- Eanes, W. y R. K. Koehn. 1978. An analysis of genetic structure in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* L. *Evolution* 32: 784-797.

- Eck, R.V. y M.O. Dayhoff. 1966. Atlas of Protein Sequence and Structure. Silver Spring, Md.: Natl. Biomed. Res. Found.
- Edwards, P. 1973. Life history studies of selected British *Ceramium* species. J. Phycol. 9: 181-184.
- Ellstrand, N.C. y M.L. Roose. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. Amer. J. Bot. 74: 123-131.
- Esen, A. y R. W. Scora. 1977. Amylase polymorphism in Citrus and some related genera. Amer. J. Bot. 64: 305-309.
- Fang, T.C. 1983. A summary of the genetic studies of *Laminaria japonica* in China. En: Proc. of the joint China-USA Phycology Symp. C.K. Tseng (Edt). Serence Press.
- Farris, J.S. 1972. Estimating phylogenetic trees from distances matrices. Amer. Natur. 106: 645-668.
- Fitch, W.M. y E. Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. Science 155: 279-284.
- Fjeld, A. y A. Lovhe. 1976. Genetics of multicellular marine algae. En: The Genetics of Algae. R.A. Lewin (Edts). Blackwell. Oxford. págs. 219-235.
- Foltz, D.W., G.F. Newkirk y E. Zouros. 1983. Genetics of growth rate in the American oyster: Absence of interactions among enzyme loci. Aquaculture. 33: 157-165.
- Foltz, D.W., H. Ochman, J.S. Jones, S.M. Evangelisti y R.K. Selander. 1982. Genetic population structure and breeding systems in arionid slugs (Mollusca: Pulmonata). Biol. J. Linn. Soc. 17: 225-241.
- Fontdevila, A. 1987. Taxonomía y especiación. En: Genética en acuicultura. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Edts). CAICYT. págs. 77-122.
- Fujio, Y. 1979. Enzyme polymorphism and population structure of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Tohoku J. Agr. Res. 30: 32-42.
- Fujio, Y., P.L. Kodaka y M. Hara. 1985. Genetic differentiation and amount of genetic variability in natural populations of the haploid laver *Porphyra yesoensis*. Jpn. J. Genet. 60: 347-354.
- Fujio, Y., M.Y. Tanaka, M. Hara y H. Akiyama. 1987. Enzyme polymorphism and population structure of the haploid laver *Porphyra yesoensis*. Nipp. Suis. Gakkai. 53: 357-362.

- Gallagher, J. 1980. Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay. J. Phycol. 16: 464-474.
- Gallagher, J.C. 1982. Physiological variation and electrophoresis banding patterns of genetically different seasonal populations of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) J. Phycol. 18: 148-162.
- Gallagher, J.C. 1986. Population genetics of microalgae. En Barclay, W.R. & R.P. McDutosh (Edts). Algal biomass technologies: An interdisciplinary perspective, Nova Hedwigia. 83: 6-13.
- Gayler, K.R. y W. R. Morgan. 1976. An NADP-dependent Glutamate Dehydrogenase in Chloroplasts from the Marine Green Alga *Caulerpa simpliciuscula*. Plant. Physiol. 58: 283-287.
- Gordon, M., X. Huang, S. Pentoney y R. Zare. 1988. Capillary electrophoresis. Science. 242: 224-228.
- Gorman, G. y J. Renzi Jr. 1979. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies: Effects of the sample size. Copeia 242-249.
- Gorostiaga, J. 1990. Aspectos demográficos del alga roja *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Thuret. Discusión sobre su adecuada gestión como recurso explotable. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. 313 págs.
- Gottlieb, L.D. 1971. Gel electrophoresis: New approach to the study of evolution. Bioscience. 21: 939-944.
- Gottlieb, L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. Ann. Mo. Bot. Gon. 64: 161-180.
- Gottlieb, 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. Prog. Phytochem. 7: 1-46.
- Gottlieb, L.D. 1987. Phosphoglucosmutase and isocitrate dehydrogenase gene duplications in *Layia* (Compositae). Amer. J. Bot. 74: 9-15.
- Grant, M.C. y V.W. Proctor. 1980. Electrophoretic analysis of genetic variation in the *Charophyta*. I. Gene duplication via polyploidy. J. Phycol. 16: 109-115.
- Guries, R.P. y F.T. Ledig. 1982. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). Evolution 36: 387-402.
- Guzmán del Proó, S.A. y S. de la Campa de Guzmán. 1969. Investigaciones sobre *Gelidium cartilagineum* en la costa occidental de Baja California, México. Proc. Int. Seaweed Symp. 6: 179-186.

- Hamrick, J., Y. Linhart y J.B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200.
- Hames, B. y D. Rickwood. 1982. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. IRL Press. London: 290 págs.
- Hansen, J.E. y W.T. Doyle. 1976. Ecology and natural history of *Iridae cordata* (Rhodophyta, Gigartinaceae): population structure. *J. Phycol.* 12: 273-278.
- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphism in man. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 164: 298-310.
- Harris, H. y D. Hopkinson. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland. Amsterdam.
- Hashimoto, T., J.S. Kaluza y M.S. burstone. 1964. The effect of menadiolone and phenazine methosulfate on the tetrazolium reduction system under histochemical conditions. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 797-804.
- Hayhome, B.A. y L.A. Pfiester. 1983. electrophoretic analysis of soluble enzymes in five freshwater Dinoflagellate species. *Amer. J. Bot.* 70: 1165-1172.
- Hayhome, B.A., D.M. Anderson, D.M. Kulis y D.J. Whitten. 1989. Variation among congeneric Dinoflagellates from the Northeastern United States and Canada. I. Enzyme electrophoresis. *Mar. Biol.* 101: 427-435.
- Hayhome, B.A., D.J. Whitten, K.R. Harkins y L.A. Pfiester. 1987. Intraspecific variation in the Dinoflagellate *Peridinium volzii*. *J. Phycol.* 23: 573-580.
- Hebert, P.D.N. 1974. Enzyme variability in natural populations of *Daphnia magna*. II. Genotypic frequencies in permanent populations. *Genetics* 77: 323-334.
- Hebert, P.D.N. y T. Crease. 1980. Clonal coexistence in *Daphnia pulex* (Leydig): another planktonic paradox. *Science.* 207: 1363-1365.
- Hebert, P.D.N. y T. Crease. 1983. Clonal diversity in populations of *Daphnia pulex* reproducing by obligate parthenogenesis. *Heredity.* 51: 353-369.
- Hedrick, P.W. 1971. A new approach to measuring genetic similarity. *Evolution.* 25: 276-280.



- Hickey, D.A. 1979. Selection on amylase allozymes in *Drosophila melanogaster*: Selection experiments using several independently derived pairs chromosomes. *Evolution* 33: 1128-1137.
- Hiebert, R.D. y J.L. Hamrick. 1983. Patterns and levels of genetic variation in great basin bristlecone pine, *Pinus longaeva*. *Evolution* 37: 302-310.
- Hoffmann, A.J. y P. Camus. 1989. Sinking rates and viability of spores from benthic algae in central Chile. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 126: 281-291.
- Holton, R.W. 1973. Electrophoresis and the taxonomy of algae. *Bull. Torr. Bot. Club* 100: 297-303.
- Hoxmark, R.C. 1975. Protein variation during the life cycle of the alga *Ulva mutabilis*. *Gamete Competition in Plants and Animals*. 279-284.
- Hoyle, M.D. 1978. Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 35: 273-283.
- Huber, M.E. y R.A. Lewin. 1986. An electrophoretic survey of the genus *Tetraselmis* (Chlorophyta. Prasinophyceae). *Phycologia* 25: 205-209.
- Hubby, J.L. y R.C. Lewontin. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 577-594.
- Hushovd, O., O. Gulliksen y O. Nordby. 1982. Absence of major differences between soluble proteins from haploid gametophytes and diploid sporophytes in the green alga *Ulva mutabilis* Foyn. *Planta* 156: 89-91.
- Innes, D.J. 1984. Genetic differentiation among populations of marine algae. *Helgolander Meeresunters* 38: 401-417.
- Innes, D.J. 1987. Genetic structure of asexually reproducing *Enteromorpha linza* (Ulvales: Chlorophyta) in Long Island Sound. *Mar. Biol.* 94: 459-467.
- Innes, D.J. 1988. Genetic differentiation in the intertidal zone in populations of the alga *Enteromorpha linza* (Ulvales: Chlorophyta). *Mar. Biol.* 97: 9-16.
- Innes, D. y C. Yarish. 1984. Genetic evidence for the occurrence of asexual reproduction in populations of *Enteromorpha linza* (Chlorophyta) from Long Island Sound. *Phycologia* 26: 311-320.

- International Union of Biochemistry. 1984. Enzyme nomenclature. Recommendations (1978) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Academic Press. New York.
- Jacobi, J. 1962. Enzyme systems. En: Physiology and biochemistry of algae. R.A. Lewin (Edts.) Academic Press. págs. 125-140.
- Jaenike, J., E. D. Parker Jr. y R.K. Selander. 1980. Clonal niche structure in the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum*. Am. Nat. 116: 196-205.
- Jain, S. y A. Bradshaw. 1966. Evolutionary divergence among adjacent plant populations. I. The evidence and its theoretical analysis. Heredity 21: 407-411.
- Jensen, A. 1979. Industrial utilization of seaweeds in the past. present and future. Proc. Int. Seaweed Symp. 9: 17-34.
- Johnson, F.M., C.G. Kanapi, R.H. Richardson, M.R. Wheeler y W.S. Stone. 1966. An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 56: 119-125.
- Johnson, M.S. y R. Black. 1984. Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Sinphonaria* sp. Mar. Biol. 70: 157-164.
- Johnstone, G.R. y F.L. Feeney. 1944. Perioicity of *Gelidium cartilagineum*, a perennial red alga. Am. J. Bot. 31: 25-29.
- Kain (Jones), J.M. 1982. The reproductive phenology of nine species of Rhodophyta in the subtidal region of the Isle of Man. Br. phycol. J. 17: 321-331.
- Kapraun, D.F. 1978. Field and culture studies on selected North Carolina *Polysiphonia* species. Bot. Mar. 21: 143-153.
- Keck, K. 1961. Nuclear and cytoplasmatic factors determining the species specificity of enzyme proteins in *Acetabularia*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 94: 741-752.
- Kemp, L., R. Riabowol y L. Druehl. 1984. Isoenzyme variation in *Macrocystis integrifolia*. Bory. Abst. J. Phycol. 81.
- Kennelly, S.J. 1983. An experimental approach to the study of factors affecting algal colonization in a sublittoral kelp forest. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68: 257-276.
- Kephart, S.R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: A comparative analysis of techniques. Am. J. Bot. 77: 693-712.

- King, E. 1971. Extraction of cotton leaf enzymes with borate. *Phytochemistry* 10: 2337-2341.
- King, J.L. y T.H. Ohta. 1975. Polyallelic mutational equilibria. *Genetics* 79: 681-691.
- King, M.C. y A.C. Wilson. 1975. Evolution at two levels: Molecular similarities and biological differences between humans and chimpanzees. *Science* 188: 107-166.
- Koehn, R.K. y P.M. Gaffney. 1984. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 82: 1-7.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *Ann. Math. Stat.* 20: 91-94.
- Levin, D.A. 1977. The organization of genetic variability in *Phlox drummondii*. *Evolution* 31: 477-494.
- Levin, D.A. 1978. Genetic variation in annual *Phlox*: Self-compatible versus self-incompatible species. *Evolution* 32: d245-263.
- Levin, D.A. y W.L. Crepet. 1973. Genetic variation in *Lycopodium lucidulum*. a phylogenetic relict. *Evolution* 27: 622-632.
- Levinton, J.S. 1973. Genetic variation in a gradient in a gradient of environmental variability: Marine bivalvia (Mollusca). *Science, Wash. DC* 180: 75-76.
- Levy, M. y D.A. Levin. 1975. Genic heterozygosity and variation in permanent translocation heterozygotes of the *Oenothera biennis* complex. *Genetics* 79: 493-512.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381-398.
- Lewontin, R.C. 1979. La base genética de la evolución. Ediciones Omega. Barcelona. 328 págs.
- Lewontin, R.C. y J.L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Lindstrom, S.C. y K.M. Cole. 1990. An evaluation of species relationships in the *Porphyra perforata* complex (Bangiales. Rhodophyta) using starch gel electrophoresis. *Hydrobiologia* 204/205: 179-183.

- Lindstrom, S.C. y G.R. South. 1989. Evidence of species relationships in the Palmariaceae (Palmariales. Rhodophyta) based on starch gel electrophoresis. *Cryptogamic Botany*. 1: 32-41.
- Linhard, Y.B. 1974. Intrapopulation differentiation in annual plants. I. *Veronica peregrina* L. raised under non-competitive conditions. *Evolution* 28: 232-243.
- Lobban, C.S., P.J. Harrison, M.J. Duncan. 1985. The physiological ecology of the seaweeds. Cambridge Univ. Press. N.Y. 242 págs.
- Loomis, W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. En: *Methods in Enzymology*. S.Fleischer and L. Packer (Edts). Vol 31. págs. 528-545.
- Ma, J. y A. Miura. 1984. Observations on the nuclear division in conchospores and their germlings in *Porphyra yezoensis*. *Veda. Jap. J. Phycol.* 32:373-378.
- Magne, F. 1987. Is the frequency of apomeiosis in the Rhodophyta genetic character?. *Hydrobiologia* 151/152: 221-232.
- Mallery, c. y N. Richardson. 1971. Disc electrophoresis of biliproteins. *Plant and Cell Physiology* 12: 997-1001.
- Mallery, C. y N. Richardson. 1972. Disc gel electrophoresis of proteins of Rhodophyta. En: K. Nisizawa (edt). *Proceeding of the 7th International Seaweed Symposium*. Wiley. N. Y. págs. 292-300.
- Malinowsky, K. 1974. "*Codium fragile*": The Ecology and Population Biology of a Colonizing Species. "Ph. D. dissertation. Yale University. New Haven. Conn. 135 págs.
- Marsden, W.J.N., J.A. Callow y L.V. Evans. 1981. A novel and comprehensive approach to the extraction of enzymes from brown algae and their separation by polyacrylamide gel electrophoresis. *Mar. Biol. Lett.* 2: 353-362.
- Marsden, W.J.N., J.A. Callow y L.V. Evans. 1984a. A preliminary investigation of the electrophoretic characteristics of enzymes from a range of macroscopic brown algae. *Botanica Marina*. 27: 521-526.
- Marsden, W.J.N., L.V. Evans, J.A. Callow y J.N. Keen. 1984b. A preliminary electrophoretic comparison of *Fucus serratus* and *Fucus vesiculosus*. *Botanica Marina* 27: 79-83.
- Maurer, H.R. 1971. Disc electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. W. de Gruyter. Berlin: 219 págs.

- May, G. 1986. Life history variations in a predominantly gametophytic population of *Iridaea cordata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 22: 448-455.
- Mclachlan, J. 1985. Macroalgae. Seaweeds: Industrial resources and their utilization. *Plant and Soil.* 89: 137-157.
- Mitton, J.B. y M.C. Grant. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 479-499.
- Miura, W., Y. Fujio y S. Suto. 1978a. Isozymes from individual thallus of *Porphyra* species. *Japan J. Phycol.* 26: 139-143.
- Miura, W., Y. Fujio y S. Suto. 1978b. Polymorphism of catalasa isozime in *Porphyra*. *Tohoku J. Agri. Res.* 29: 159-166.
- Miura, W., Y. Fujio y S. Suto. 1979. Genetic differentiation between the wild and cultured populations of *Porphyra yezoensis*. *Tohoku J. Agric. Res.* 30: 1250-1256.
- Miura, A. y Y. Kunifuni. 1980. Genetic analysis of the pigmentation types in the seaweed susabinori (*Porphyra yezoensis*). *Indem. Heredity* 34: 14-20.
- Moore, G.A. y G.B. Collins. 1982. Identification of aneuploids in *Nicotiana tabacum* by isozyme banding patterns. *Bioch. Gen.* 20: 555-568.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1977. F-Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genetic.* London. 41: 225.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., T. Maruyama y R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolutionh* 29: 1-10.
- Nei, M. y A.K. Roychoudhury. 1974. Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379-390.
- Nei, M. y A.K. Roychoudhury. 1982. Genetic relationship and evolution of human races. *Evol. Biol.* 14: 1-59.

- Nei, M., F. Tajima y Y. Tatenó. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II Gene frequency data. *J. Mol. Evol.* 19: 153-170.
- Oelshlegel F.J. y M.A. Stahmann. 1973. The electrophoretic technique: A practical guide for its application. *Bull. Torr. Bot. Club.* 100: 260-271.
- Oliveira, J.C. 1989. A note on the elongation rate of *Gelidium sesquipedale* in-situ cages in Portugal. En: Kain (Jones), J.M., J.W. Andrews y B. J. McGregor (Edts). Aquatic primary biomass. Marine macroalgae. Págs. 69-75. Proceedings of the workshop COST 48. Commission of the European Communities. Bruselas.
- Okuda, T. y M. Neushul. 1981. Sedimentation studies on red algal spores. *J. Phycol.* 17: 113-118.
- Okumura, S. y K. Fujino. 1986. Thermostability variations of enzymes in sea algae. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52: 37-40.
- Osterman, L.A. 1984. Electrophoresis. En: Methods of protein and nucleic acid research. 1. Electrophoresis. isoelectric focusing. ultra-centrifugation. págs. 3-98. Springer-Verlag (Edts.). Berlin.
- Penniman, C.A. 1987. Application of isozyme electrophoresis to systematic and genetic studies of marine macroalgae. *Abst. J. Phycol.* 53.
- Pinheiro, F. y C.L.F. Bezerra. 1980. Estudo de fenologia e regeneração de *Gracilaria domingensis* Sonder (Rhodophyta, Gracilariaceae), no estado do Ceará. *Arq. Cién. Mar.* 20: 33-41.
- Prevosti, A. 1974. La distancia genética entre poblaciones. *Miscellanea Alcobé.* págs. 109-118.
- Price, J.H., Pettitt, J.M. y S. Russell. 1987. Indications of species status from total protein signatures in *Callithamnion* (Ceramiaceae). *Hydrobiologia* 151/152: 213-220.
- Rao, K.R. 1970. Studies on growth cycle and phycollid content in *Hypnea musciformis* (Wulf) Lamour. *Bot. Mar. (Berl.)* 13: 163-165.
- Rice, E.L. y R.K. Crowden. 1987. An improved method for the extraction and electrophoresis of proteins and active enzymes from fucaléan macroalgae (Phaeophyta). *Phycologia* 26: 235-246.
- Richardson, N. y C. Mallery. 1973. Some chemosystematic aspects of the *Audodinema* (Acrochaetium-Rhodochorton) complex. *Amer. J. Bot.* 60: 1051-1056.

- Robertson, B.L., A. Onraët y A.C. Smith. 1985. Reproductive ecology of *Gelidium pristoides*. Abs. 2º Inter. Phycol. Congr. Copenhagen. Institute for sporeplanter. University of Copenhagen. 134.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. En: Studies in Genetics VII. págs. 145-153. University of Texas Publication. Austin. Texas.
- Rice, E.L. y R.K. Crowden. 1987. An improved method for the extraction and electrophoresis of proteins and active enzymes from Fucalean macroalgae (Phaeophyta). Phycol. 26: 235-246.
- Rueness, J. y S. Fredriksen. 1989. Culture studies of agarophytes, with reference to *Gelidium* species at their northern limit of distribution. En: Kain (Jones), J.M., J.W. Andrews y B. J. McGregor (Edts). Aquatic primary biomass. Marine macroalgae. Págs. 55-58. Proceedings of the workshop COST 48. Commission of the European Communities. Bruselas.
- Salinas, J.M. 1987. Localización de los campos industriales de *Gelidium sesquipedale*. Perspectivas de cultivo. En: Primeras Jornadas Acuicultura. Comunidad Autónoma de Cantabria. Gobierno de Cantabria. Santander. 127-166.
- Sanghvi, L.D. 1953. Comparison of genetical and morphological methods for a study of biological differences. Amer. J. Phys. Anthropol. 11: 385-404.
- Santelices, B. 1989. Algas marinas de Chile. Distribución, ecología, utilización y diversidad. Universidad Católica de Chile (Edts.). 399 págs.
- Santelices, B. 1990. Patterns of reproduction dispersal and recruitment in seaweeds. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 28: 177-276.
- Sato, M., Y. Sato y Y. Tsuchiya. 1984. Glutamate dehydrogenase of *Porphyra yesoensis*. Hydrobiologia. 116/117: 584-587.
- Scandalios, J.G. 1968. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. Biochem. Genet. 3: 37-79.
- Schaal, B.A. 1974. Balancing selection and population structure in *Liatris cylindraceae*. Ph.D. Dissertation. Yale University, New Haven. 210 págs.
- Schaal, B.A. y W.G. Smith. 1980. The apportionment of genetic variation within and among populations of *Desmodium nudiflorum*. Evolution. 34: 214-221.

- Schick, J.M. y A.N. Lamb. 1977. Asexual reproduction and genetic population structure in the colonizing sea anemone *Haliplanella luciae*. Biol. Bull. 153: 604-617.
- Schonbeck, M. y T.A. Norton. 1978. Factors controlling the upper limits of furoid algal on the shore. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 31: 303-313.
- Schonbeck, M. y T.A. Norton. 1980. Factors controlling the lower limits of furoid algal on the shore. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 43: 131-150.
- Schoen, D.J. 1982. Genetic variation and the breeding system of *Gilia achilleifolia*. Evolution 36: 361-370.
- Selander, R.K. 1980. Variación genética en las poblaciones naturales. En: Evolución molecular. Omega (Edts.). Págs. 21-46. Barcelona.
- Selander, R.K. y H. Ochman. 1983. The genetic structure of populations as illustrated by molluscs. En Rattazi, M.C., J.G. Scandalios y G.S. Whitt (Edts.) Isozymes: current topics in biological and medical research, vol. 10, Genetics and Evolution, A.R. Liss, New York. Págs. 93-123.
- Seoane-Camba, J. 1965. Estudios sobre las algas bentónicas en la costa sur de la península Ibérica (litoral de Cádiz). Investigaciones pesqueras. 29: 3-216.
- Seoane-Camba, J. 1969. Crecimiento, producción y desprendimiento de biomasa en *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Thuret. Proc. Int. Seaweed Symp. 6: 365-374.
- Seoane-Camba, J. 1979. Sobre algunas gelidiaceas nuevas o poco conocidas de las costas españolas. Acta Bot. Malac. 5: 9-112.
- Shaw, C.R. y A.L. Koen. 1965. On the identity of "nothing dehydrogenase". J. Histochem. Cytochem. 13: 431.
- Shaw, C.R. y R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Theor. Genetics. 4: 297-320.
- Shick, J.M. y A.N. Lamb. 1977. Asexual reproduction and genetic population structure in the colonizing sea anemone *Haliplanella luciae*. Biol. Bull. 153: 604-617.
- Shields, C.R., T.J. Orton y C.W. Stuber. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. En: Isozymes in plant genetics and breeding. S.D. Tanksley y T.J. Orton (Edts). Part A. Elsevier. Amsterdam. págs. 443-468.



- Silverthorne, W. 1977. Optimal production from a seaweed resource. *Bot. Mar.* 20: 75-98.
- Simpson, M.J.A. y L.A. Withers. 1986. Characterization Using Isozyme Electrophoresis: A guide to the literature. International Board for Plant Genetic Resources. 102 págs.
- Singh, S.M. 1982. Enzyme heterocigosity associated with growth at different developmental stages in oyster. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 451-458.
- Singh, S.M. y E. Zouros. 1978. Genetic variation associated with growth rate in the American oyster. (*Crassostrea virginica*). *Evolution* 32: 342-353.
- Singh, S.M. y E. Zouros. 1981. Genetics of growth rate in cysters and its implications for aquaculture. *Can. J. Genet. Cytol.* 23: 119-130.
- Sneath, P.H.A. y R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco: Freeman.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume (Edts). 832 págs.
- Soltis, D.E., C.H. Haufler, D.C. Darrow y G.J. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern. J.* 73: 9-27.
- Soltis, P.S. y D.E. Soltis. 1987. Population structure and estimates of gene flow in the homosporous fern *Polystichum munitum*. *Evolution.* 41: 620-629.
- Soltis, P.S. y D.E. Soltis. 1988. Genetic variation and population structure in the fern *Blechnum spicant* (Blechnaceae) from western North America. *Amer. J. Bot.* 75: 37-44.
- Soudek, D. Jr. y G. Robinson. 1983. Electrophoretic analysis of the species and population structure of diatom *Asterionella formosa*. *Can. J. Bot.* 61: 418-433.
- Stebbins, G.L. y G.J.C. Hill. 1980. Did multicellular plants invade the land?. *Am. Nat.* 115: 342-353.
- Suomalainen, E., A. Saura y J. Lokki. 1976. Evolution of parthenogenetic insects. *Evol. Biol.* 9: 209-257.
- Systema, K. y B. Schaal. 1985. Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. *Evolution* 39: 582-593.

- Thomas, D.L. y J.B. Delcarpio. 1971. Electrophoretic analysis of enzymes from three species of *Chlamydomonas*. Amer. J. Bot. 58: 716-720.
- Thorpe, J.P. 1979. Enzyme variation and taxonomy: The estimation of sampling errors in measurements of interspecific genetic similarity. Biol. J. Linn. Soc. 11: 369-386.
- Thorpe, J.P. 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13: 139-168.
- Vallejos, C.E. 1983. Enzyme activity staining. En: Isozymes in plant genetics and breeding. S.D. Tanksley y T.J. Orton (Edts). Part A. Elsevier. Amsterdam. págs. 469-516.
- Van der Meer, J.P. 1981. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). VII. Further observations on mitotic recombination and the construction of polyploids. Can. J. Bot. 59: 787-792.
- Van der Meer, J.P. 1986. Genetic contributions to research on seaweeds. En: Progress in phycological research. Rond y Chapman (edts). Biopress LTD. Págs. 1-38.
- Van der Meer, J.P., M.P. Patwary y C.J. Bird. 1984. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). X. Studies on a bisexual clone. J. Phycol. 20: 42-46.
- Van der Meer, J.P. y E.R. Todd. 1977. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae, Gigartinales). IV. Mitotic recombination and its relationship to mixed phases in the life history. Can. J. Bot. 55: 2810-2817.
- Vilter, H. y K.W. Glombitza. 1983. Peroxidase from Phaeophyceae. II: Analytical Disc-Electrophoresis and Isoelectric focusing of Peroxidases from Phaeophyceae. Bot. Mar. 26: 341-344.
- Walther, K. y L. Fries. 1976. Extracellular Alkaline Phosphatase in Multicellular Marine Algae and their Utilization of Glycerophosphate. Physiol. Plant. 36: 118-122.
- Weeden, N. y J. Wendel. 1989. Genetics of plant isozymes. En: D. Soltis and P. Soltis (Edts.). Isozymes in plant biology. Dioscorides Press. Portland.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
- Werth, C. 1989. The use of isozyme data for inferring ancestry of polyploid pteridophytes. Biochem. Syst. Ecol. 17: 117-130.

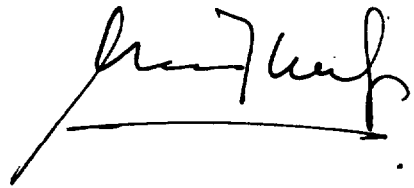
- Whitten, D.J. y B.A. Hayhome. 1986. Comparative electrophoretic analysis of two binucleate dinoflagelates. *J. Phycol.* 22: 348-352.
- Wilkinson, J.H. 1970. Detection and determination of isozymes. En: Chapman y Hall (Edts.). págs. 40-55.
- Workman, P.L. y J.D. Niswander. 1970. Population studies on Southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Amer. J. Hum. Genet.* 22: 24-49.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variability within and among populations. University of Chicago Press. Chicago.
- Young, E. 1970. A comparison of the soluble proteins in various species of algae by disc electrophoresis in polyacrilamide gels. *Phytochem.* 9: 2167-2174.
- Young, 1979. Enzyme polymorphism and cyclic parthenogenesis in *Daphnia magna*. I. Selection and clonal diversity. *Genetics.* 92: 953-970.
- Zapata, C. 1987. La variabilidad genética de las poblaciones. En: *Genética en acuicultura.* J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (Edts.). CAICYT. págs. 33-53.
- Zouros, E. 1979. Mutation rates, population sizes, and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural populations. *Genetics* 92: 623-646.
- Zouros, E., S.M. Singh y H.E. Miles. 1980. Growth rate in oyster: An overdominant phenotype and its possible explanations. *Evolution* 34: 856-867.
- Zouros, E. y D.W. Foltz. 1987. The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. En M.C. Rattazzi, J.C. Scandalios y G.S. Whitt (Edts.). *Isozymes: Current topics in biological and medical research*, 13. A.R. Liss. Nueva York.

Leíde esta Tenis en Las Palmas de  
Gran Canaria, a las 14.00 h. del día  
26 de Abril de 1991, el Tribunal califica-  
dor acuerda por UNANIMIDAD conceder  
la calificación de Dpto Com Laude.

PRESIDENTE



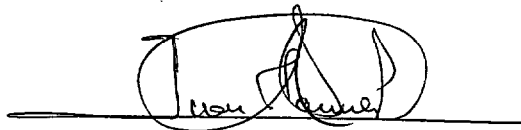
SECRETARIO



VOCAL



VOCAL



VOCAL

