



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

“Mejoramiento de la producción de biomasa y triacilglicéridos en la microalga verde *Chlorella saccharophila* mediante la aplicación de reguladores de crecimiento”

Tesis que presenta

Patricia Yolanda Contreras Pool

En opción al título de

Doctor en ciencias

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Patricia Yolanda Contreras Pool** titulado **“Mejoramiento de la producción de biomasa y triacilglicéridos en la microalga verde *Chlorella saccharophila* mediante la aplicación de reguladores de crecimiento”** fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea Biotecnología de Combustibles Alternos, en el Laboratorio de Microalgas y Cultivos Tropicales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Santy Peraza Echeverría, dentro de la opción de doctorado después de maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 24 de Octubre de 2016

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma. _____



Nombre: Patricia Yolanda Contreras Pool

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado: Estudio de genes involucrados en la síntesis de triacilglicéridos (TAGs) en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* y en la microalga oleaginosa *Chlorella saccharophila*: oportunidades para incrementar la acumulación de TAGs en microalgas para la producción de biodiesel (CONACYT, No. 169217) en el que participé bajo la dirección de la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Santy Peraza Echeverría.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis, la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Santy Peraza Echeverria, por la confianza profesional, como personal que tuvieron en mí, así como por el apoyo tanto académico como personal que me brindaron durante todo el transcurso de este trabajo doctoral; sus consejos, comentarios y sugerencias siempre fueron de gran relevancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 224389 otorgada para mis estudios de doctorado, así como al financiamiento del proyecto de ciencia básica No.169217 otorgado para la realización de este proyecto, así como por la beca de movilidad para la participación en el congreso internacional Plant and Animal Genome Conference XXI, January 12-16,2013. San Diego, CA. USA.

A mi comité tutorial: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverria, Dr. Luis Felipe Barahona Pérez, Dr. Carlos Francisco Reyes Sosa, por el apoyo, sus valiosas críticas constructivas y aportes brindados durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mi comité revisor: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverria, Dr. Luis Felipe Barahona Pérez, Dr. Carlos Francisco Reyes Sosa, Dr. Jorge Santamaría Fernández, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, por su apoyo en la revisión de este trabajo de tesis.

A la Unidad de Biotecnología y al Laboratorio de “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales” del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las instalaciones brindadas para el desarrollo de esta tesis.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del CICY, por las facilidades brindadas para la realización de esta tesis de doctorado.

A la Q.B.A. Ileana C. Borges Argáez, por todo el apoyo técnico brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Vallejo Reyna, a la Dra. Melissa Lessen Casais Molina, a la Dra. Elda

Isaura España Gamboa y al Dr. Rodrigo Rivera Solís, por el apoyo tanto académico, técnico, como personal que me brindaron durante el transcurso del doctorado.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio "Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales", que de alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo e hicieron que el venir a trabajar fuese siempre agradable y divertido: Rodrigo, Miguel Ángel, Melissa, Ángeles, María Eugenia, Anayeli, Shirley, Daniela, Iván, Merly, Alejandra y Ernesto.

DEDICATORIAS

A mis padres, Mario Florencio y Ligia Yolanda y a mis hermanos, Verónica y Mario, quienes en los momentos de alegría y gran emoción, como el de ahora, siempre me acompañan, se alegran y emocionan junto conmigo, y quienes en los momentos de tristeza y profundo dolor fueron los cuatro pilares que sostuvieron mi vida...

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES	3
1.1 Microalgas: fuente de materia prima para biocombustibles	3
1.1.1 Biosíntesis de lípidos en microalgas	5
1.1.2 Ventajas de las microalgas verdes oleaginosas como fuente de materia prima para la producción de biodiésel	7
1.1.3 Incremento de la acumulación de TAG en microalgas	10
1.2 Reguladores de crecimiento	11
1.2.1 Fitohormonas	11
1.2.2 Fitohormonas en la proliferación celular	12
1.2.3 Fitohormonas en la acumulación de TAG	16
1.2.4 Fitohormonas en algas.....	17
1.3 Auxinas, citocininas y ABA en microalgas: usos.....	19
1.3 Clasificación botánica de la microalga <i>Chlorella saccharophila</i>	20
1.4 Justificación	22
1.5 Hipótesis	23
1.6 Objetivos	23
1.6.1 Objetivo general	23
1.6.2 Objetivo específico	23
1.7 Estrategia experimental	24

CAPÍTULO II. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AUXINAS Y CITOCININAS EN LA ACUMULACIÓN DE BIOMASA DE <i>CHLORELLA SACCHAROPHILA</i>.....	27
2.1 Introducción	27
2.2 Materiales y Métodos	28
2.2.1 Cepa de microalga y condiciones de cultivo	28
2.2.2 Fitohormonas	28
2.2.3 Estrategia experimental	28
2.2.4 Evaluación del crecimiento celular	29
2.3 Resultados	30
2.3.1 Efecto de AIA sobre el crecimiento de <i>C. saccharophila</i>	30
2.3.2 Efecto de ANA sobre el crecimiento de <i>C. saccharophila</i>	32
2.3.3 Efecto de BAP sobre el crecimiento de <i>C. saccharophila</i>	35
2.3.4 Efecto de DPU sobre el crecimiento de <i>C. saccharophila</i>	38
2.3.5 Efecto de TDZ sobre el crecimiento de <i>C. saccharophila</i>	41
2.4 Discusión.....	45
CAPÍTULO III. EFECTO DE ABA SOBRE EL CRECIMIENTO, LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS Y TAG EN <i>CHLORELLA SACCHAROPHILA</i>	49
3.1 Introducción	50
3.2 Materiales y Métodos	51
3.2.1 Cepas de microalga y condiciones de cultivo	51
3.2.2 Medio de cultivo y fitohormona	51
3.2.3 Estrategia experimental	52
3.2.4 Evaluación del crecimiento	53
3.2.5 Contenido de lípidos y TAG	53
3.3 Resultados	54
3.3.1 Efecto de ABA sobre el crecimiento de <i>C. saccharophila</i>	54
3.3.2 Efecto de ABA sobre el contenido lipídico y acumulación de TAG de <i>C. saccharophila</i>	57
3.3.3 Efecto de la combinación de ABA con deficiencia de nitrógeno sobre el crecimiento de <i>C. saccharophila</i>	65
3.3.4 Efecto de la combinación de ABA con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido lipídico y acumulación de TAG de <i>C. saccharophila</i>	68

3.4 Discusión.....	78
CAPÍTULO 4. Discusión general	85
CAPÍTULO 5. Conclusiones y perspectivas	89
5.1 Conclusiones	89
5.2 Perspectivas.....	90
Bibliografía.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Formación y estructura de triacilglicéridos 4

Figura 1.2 Ruta de síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto.... 6

Figura 1.3 Esquema simplificado de la vía de biosíntesis de TAG en algas..... 7

Figura 1.4 Reacción de transesterificación. 8

Figura 1.5 Ciclo de división celular..... 14

Figura 1.6 Vía de transducción de señales de auxina y citocinina desde los receptores hasta los componentes del ciclo celular 16

Figura 1.7 *Chlorella saccharophila* (100×)..... 20

Figura 1.8 Diseño experimental 25

Figura 2.1 Efecto de diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA) sobre la concentración celular de *C. saccharophila* 31

Figura 2.2 Efecto de diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA) sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*. 32

Figura 2.3 Efecto de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*..... 33

Figura 2.4 Efecto de diferentes concentraciones ácido naftalen acético (ANA) sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*. 35

Figura 2.5 Efecto de diferentes concentraciones de bencilaninopurina (BAP) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*..... 36

Figura 2.6 Efecto de diferentes concentraciones de bencilaninopurina (BAP) sobre la acumulación de biomasa sea de *C. saccharophila*. 38

Figura 2.7 Efecto de diferentes concentraciones de difenilurea (DPU) sobre la

concentración celular de <i>C. saccharophila</i>	39
Figura 2.8 Efecto de diferentes concentraciones de difenilurea (DPU) sobre la biomasa seca de <i>C. saccharophila</i>	41
Figura 2.9 Efecto de diferentes concentraciones de tidiazuron (TDZ) sobre la concentración celular de <i>C. saccharophila</i>	42
Figura 2.10 Efecto de diferentes concentraciones de tidiazuron (TDZ) sobre la acumulación de biomasa seca de <i>C. saccharophila</i>	44
Figura 3.1 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre la concentración celular de <i>C. saccharophila</i>	55
Figura 3.2 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre la acumulación de biomasa seca de <i>C. saccharophila</i>	56
Figura 3.3 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre extracto lipídico de <i>C. saccharophila</i>	58
Figura 3.4 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido lipídico como porcentaje de la biomasa seca de <i>C. saccharophila</i>	59
Figura 3.5 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido de TAG de <i>C. saccharophila</i>	60
Figura 3.6 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido de TAG como porcentaje de biomasa seca de <i>C. saccharophila</i>	62
Figura 3.7 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido de TAG como porcentaje del extracto lipídico de <i>C. saccharophila</i>	63
Figura 3.8 Microscopía confocal de <i>C. saccharophila</i>	65
Figura 3.9 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre la concentración celular de <i>C. saccharophila</i>	66

Figura 3.10 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*.67

Figura 3.11 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre el extracto lipídico de *C. saccharophila*.....69

Figura 3.12 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre el extracto lipídico como porcentaje de la biomasa seca de *C. saccharophila*.70

Figura 3.13 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido de TAG de *C. saccharophila*.....72

Figura 3.14 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido de TAG como porcentaje de biomasa seca de *C. saccharophila*.73

Figura 3.15 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido de TAG como porcentaje del extracto lipídico de *C. saccharophila*.75

Figura 3.16 Microscopía confocal de *C. saccharophila*.....77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Ejemplo de ácidos grasos (Ali y Hanna, 1994)..... 5

Cuadro 1.2 Comparación de algunas fuentes de materia prima para biodiésel (Schenk, 2008). 9

Cuadro 1.3 Contenido de lípidos de algunas microalgas (Chisti, 2007). 10

Cuadro 1.4 Fitohormonas en plantas (Tarakhovskaya et al., 2007). 12

Cuadro 1.5 Fitohormonas identificadas en diversos grupos taxonómicos de algas (Tarakhovskaya et al., 2007)..... 18

Cuadro 2.1 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de AIA 30

Cuadro 2.3 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de AIA..... 31

Cuadro 2.4 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ANA 33

Cuadro 2.5 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ANA 34

Cuadro 2.6 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de BAP 36

Cuadro 2.7 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de BAP 37

Cuadro 2.8 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de DPU 39

Cuadro 2.9 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de DPU 40

Cuadro 2.10 Variación de la concentración celular de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de TDZ	42
Cuadro 2.11 Variación de la acumulación de biomasa seca de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de TDZ.....	43
Cuadro 3.1 Variación de la concentración celular de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de ABA. 54	
Cuadro 3.2 Variación de la acumulación de biomasa seca de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.	56
Cuadro 3.3 Variación del extracto lipídico obtenido de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.	57
Cuadro 3.4 Variación del contenido lipídico como porcentaje de biomasa seca obtenido de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.....	58
Cuadro 3.5 Variación de la acumulación de TAG en <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.	60
Cuadro 3.6 Variación del contenido de TAG como porcentaje de la biomasa seca de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.	61
Cuadro 3.7 Variación del contenido de TAG como porcentaje del extracto lipídico de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.	62
Cuadro 3.8 Variación de la concentración celular de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno.	66
Cuadro 3.9 Variación de la acumulación de biomasa seca de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno.....	67
Cuadro 3.10 Variación del extracto lipídico obtenido de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno.	68
Cuadro 3.11 Variación del contenido lipídico como porcentaje de biomasa seca de <i>C.</i>	

saccharophila en respuesta a la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno.
70

Cuadro 3.12 Variación del contenido de TAG en *C. saccharophila* en respuesta a la
 combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno. 71

Cuadro 3.13 Variación del contenido de TAG como porcentaje de biomasa seca de *C.*
saccharophila en respuesta a la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno.
73

Cuadro 3.14 Variación del contenido de TAG como porcentaje de extracto lipídico de *C.*
saccharophila en respuesta a la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno.
74

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido 1-naftalenacético
BAP	Bencilaminopurina
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Deficiencia de nitrógeno
DPU	N,N'-Difenilurea
FAMES, por sus siglas en inglés	Ésteres metílicos de ácidos grasos
KOH	Hidróxido de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
TAG	Triacilglicéridos
TAP, por sus siglas en inglés	Tris-acetato-fosfato
TAP-N	Tris-acetato-fosfato deficiente de nitrógeno
TDZ	Thidiazurón

RESUMEN

Las microalgas son consideradas como una fuente atractiva y prometedora para la producción de triacilglicéridos (TAG), materia prima para la producción de biodiesel. Como resultado de estudios previos en nuestro grupo de trabajo, se ha propuesto a *Chlorella saccharophila* como una fuente promisoría de lípidos para la producción de biodiésel, debido a que presenta una alta capacidad para acumular biomasa y lípidos, así como un perfil adecuado de ácidos grasos. Recientemente, se ha propuesto el uso de reguladores de crecimiento, incluyendo a las fitohormonas, para incrementar tanto la acumulación de biomasa como la producción TAG en microalgas. Con el objetivo de mejorar la acumulación de biomasa, así como la de TAG en *C. saccharophila*, en este estudio se evaluó el efecto de la adición de las auxinas ácido indol acético (AIA) y ácido 1-naftalenacético (ANA), las citocininas bencilaminopurina (BAP), N,N'-difenilurea (DPU) y thidiazurón (TDZ) en la concentración celular y acumulación de biomasa de *C. saccharophila*. Por otra parte, se evaluó el efecto de la adición de ácido abscísico (ABA) tanto en la acumulación de biomasa como en la acumulación de TAG en esta microalga. Para las auxinas y citocininas se evaluaron siete concentraciones (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM). Los resultados obtenidos demostraron que las auxinas afectaron negativamente la acumulación celular. En cuanto a las citocininas, el uso de 10 μM de BAP y TDZ resultó en el incremento del número de células. Con respecto a ABA, primero se evaluó el efecto de cuatro concentraciones (1, 4, 10 y 20 μM) que se añadieron al inicio de un cultivo en una sola etapa, y se encontró que todas las concentraciones ensayadas aumentaron significativamente tanto la concentración de células como el contenido de TAG. Posteriormente, se evaluó la concentración de 1 μM de ABA, añadido durante la segunda etapa de un cultivo en dos etapas, y se comparó con un tratamiento de deficiencia de nitrógeno (DN), así como con el tratamiento que combina DN y ABA (DN+ABA). Los resultados indicaron que ABA aumentó significativamente los TAG en comparación con el control, durante el cultivo en una sola etapa. En el cultivo en dos etapas, los resultados mostraron que en comparación con su control el tratamiento de DN+ABA presentó el mayor incremento de TAG, seguido de los tratamientos de DN y ABA. Al comparar los resultados obtenidos del cultivo en una etapa y del cultivo en dos etapas se observa que la concentración de 1 μM de ABA al inicio del cultivo en una sola

etapa representa la forma más eficaz y sencilla para obtener el mayor incremento de TAG en *C. saccharophila*.

ABSTRACT

Microalgae are currently a very promising source of biomass and triacylglycerol (TAG) for biofuels. In a previous study we identified *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production since it showed high biomass and lipid content with an appropriate FAME profile. Recently, it has been proposed the use of growth regulators, including phytohormones, to increase both the accumulation of biomass and production of TAG in microalgae. In order to further improve the accumulation of biomass in *C. saccharophila*, we evaluated the effect of auxins (IAA, NAA), cytokinins (BAP, DPU, and TDZ) on cell concentration and dry biomass accumulation in this microalga. Moreover, the effect of addition of abscisic acid (ABA) on biomass accumulation, lipid, and TAG accumulation was evaluated in *C. saccharophila*. Seven concentrations of auxins and cytokinins (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 μM) were evaluated. The results showed that the biomass accumulation is negatively affected by auxins. As for cytokinins, our results showed that only two of the three cytokinins evaluated at a concentration of 10 μM showed an increase in the number of cells. In order to further improve the TAG accumulation in *C. saccharophila*, in this study we evaluated the effect of adding ABA on cell concentration and TAG production in this microalga. In a first strategy, we evaluated the effect of four ABA concentrations (1, 4, 10, and 20 μM) added at the beginning of a single-stage cultivation system, and found that all concentrations tested significantly increased cell concentration and TAG content in *C. saccharophila*. In a second strategy, we evaluated the addition of 1 μM ABA during the second stage of a two-stage cultivation system and compared it with a nitrogen deficiency treatment (DN) and a combination of DN and ABA (DN+ABA). The results showed that ABA significantly increased TAG, compared to the control during cultivation in a single-stage. During a two-stage cultivation the results showed that, compared to control, DN+ABA treatment had the highest increase of TAG, followed by DN and ABA treatments. When comparing the results of both strategies, single-stage cultivation and two-stage cultivation, it is concluded that 1 μM ABA at the beginning of the culture in a single-stage is more effective to obtain the largest increase of TAG. This strategy represents an effective and easy way to increase TAG content in *C. saccharophila*.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas verdes son consideradas como una fuente atractiva y prometedora para la producción de triacilglicéridos (TAG), materia prima para la producción de biodiésel, ya que estos microorganismos fotosintéticos tienen el potencial de acumular grandes cantidades de biomasa y lípidos en un corto tiempo, además de que su cultivo podría realizarse en áreas de tierras marginales evitando competir con la producción de alimentos (Medipally *et al.*, 2015; Tate *et al.*, 2013; Wijffels y Barbosa, 2010). Sin embargo, aún existen retos por superar para que el uso de las microalgas como una fuente de TAG para la producción de biocombustibles sea económicamente viable. Entre estos retos se encuentra la obtención de una mayor acumulación de TAG (Medipally *et al.*, 2015; Wijffels y Barbosa, 2010). En este sentido, varias estrategias han sido estudiadas con el objetivo de incrementar el contenido de lípidos, específicamente TAG, en microalgas. Entre éstas, el cultivo de microalgas bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno ha sido considerada como una buena estrategia para el incremento de TAG. Sin embargo, se ha observado que el incremento de TAG bajo estas condiciones de cultivo va acompañado de la dramática disminución de biomasa, lo cual termina afectando negativamente el rendimiento total de los TAG obtenidos (Rawat *et al.*, 2013). El uso de ingeniería genética también ha sido sugerido para superar este reto y aunque esta estrategia es muy promisoría, el desarrollo de esta tecnología está aún en proceso o no se encuentra disponible para la mayoría de las especies de microalgas (Medipally *et al.*, 2015).

Otras estrategias contemplan el uso de reguladores de crecimiento, incluyendo las fitohormonas, para incrementar la acumulación y producción de TAG en microalgas (Hunt *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2013). En este sentido, la presencia endógena de fitohormonas ha sido confirmada en varias microalgas (Lu y Xu, 2015; Tarakhovskaya *et al.*, 2007), y aunque se conoce poco acerca de su función, la adición exógena de estos reguladores de crecimiento tiene efectos positivos en estos microorganismos. Por ejemplo, se ha observado que la aplicación exógena de auxinas, así como citocininas estimulan el

crecimiento, resultando en un incremento de peso fresco, o en el incremento del número de células de *Chlorella pyrenoidosa* o *Chlorella sorokiniana* (Czerpak *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 2010; Piotrowska y Czerpak, 2009a). De igual forma, se ha observado que la aplicación exógena de ácido abscísico (ABA) aumenta la tolerancia a estrés por deshidratación, estrés oxidativo y salinidad, así como a la deficiencia de nitrógeno en varias microalgas (Lu y Xu, 2015). También se ha reportado que la adición de ABA durante la fase lag de crecimiento de *Chlamydomonas reinhardtii*, incrementó significativamente el rendimiento de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, por sus siglas en inglés), mientras que la densidad celular era negativamente afectada (Park *et al.*, 2013).

Por otra parte, como resultado de estudios previos, en nuestro grupo de trabajo se propuso a *Chlorella saccharophila*, una microalga verde nativa de la Península de Yucatán en México, como una fuente promisoriosa de lípidos para la producción de biodiésel, debido a que presenta una alta capacidad de acumular biomasa y lípidos, así como un perfil adecuado de ácidos grasos (Herrera-Valencia *et al.*, 2011) Por lo tanto, con la finalidad de mejorar aún más la acumulación de TAG sin disminuir la acumulación de biomasa en esta microalga, en este trabajo se evaluó por una parte el efecto de la aplicación exógena de reguladores de crecimiento del grupo de las auxinas ácido indol acético (AIA) y 1-naftalenacético (ANA), las citocininas bencilaminopurina (BAP), N,N'-difenilurea (DPU) y thidiazurón (TDZ) en la concentración celular y acumulación de biomasa de *C. saccharophila*, y por otra parte, se evaluó el efecto de la adición de ABA tanto en la acumulación de biomasa como en la acumulación de TAG en esta microalga.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1 Microalgas: fuente de materia prima para biocombustibles

El término microalga hace referencia a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, y son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Es un grupo bastante heterogéneo, con gran variedad de formas y tamaños, que habita prácticamente la totalidad de los ecosistemas acuáticos, y se encuentra también en suelos, rocas y plantas (Richmond, 2004).

A lo largo de la historia, las microalgas han venido empleándose para distintos fines, siendo el más antiguo de ellos su uso como alimento para consumo humano o animal (Potvin y Zhang, 2010). Los efectos benéficos de la biomasa de microalgas para la salud humana se basan en las propiedades de la gran variedad de compuestos bioactivos que ésta contiene, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que actúan como potentes antioxidantes; vitaminas y carotenoides como β -caroteno, astaxantina, luteína o zeaxantina. Además, se ha demostrado la capacidad de algunas especies para producir compuestos terapéuticos con propiedades antibióticas, antiinflamatorias o antivirales (Brennan y Owende, 2010; Spolaore *et al.*, 2006). En la alimentación animal destaca su uso en la acuicultura donde la biomasa resulta de vital interés para el cultivo de bivalvos (ostras, almejas, navajas, etc.) que se alimentan exclusivamente de microalgas (Borowitzka, 1997). Por otra parte, las microalgas pueden emplearse como biofertilizantes y acondicionadoras del suelo. Hay especies de microalgas que favorecen la fijación de nitrógeno, y han hecho posible, por ejemplo, el cultivo de arroz sin adición de fertilizantes (Abdel-Raouf, 2012).

En los últimos años, la capacidad de las microalgas para fijar CO_2 , y los problemas ambientales que enfrenta el mundo, tales como el calentamiento global, provocado entre otras cosas por el exceso de CO_2 en el ambiente generado por la quema de combustibles de origen fósil, ha despertado un gran interés por el cultivo a gran escala de microalgas con el objetivo de ayudar a mitigar el exceso de emisiones de CO_2 y luchar contra el

cambio climático, ya que estos microorganismos tienen la capacidad de fijar este CO₂ y utilizarlo como su fuente de carbono. Ante estos problemas ambientales, se ha considerado el uso de biocombustibles, entre estos el biodiésel, como una alternativa al uso de combustibles de origen fósil (Medipally *et al.*, 2015; Stephenson *et al.*, 2011). La producción de biodiésel tiende a provenir mayoritariamente de los aceites extraídos de plantas oleaginosas, especialmente girasol, soja y colza (Schenk *et al.*, 2008). Sin embargo, cualquier materia prima que contenga TAG puede utilizarse para la producción de biodiesel (Chisti, 2007). Los triacilglicéridos se encuentran en forma abundante en los granos de cereales, semillas oleaginosas y grasas de origen animal, y en los últimos años varios estudios han revelado que también en las microalgas. La estructura básica de los TAG (Figura 1.1) consiste de una unidad de glicerol (un azúcar de tres oxhidrilos) y tres unidades de ácidos grasos, los cuales pueden ser saturados o no saturados (Cuadro 1.1), y la unión entre los ácidos grasos y los oxhidrilos (también llamados hidroxilos) está en forma de éster (Ali y Hanna, 1994).

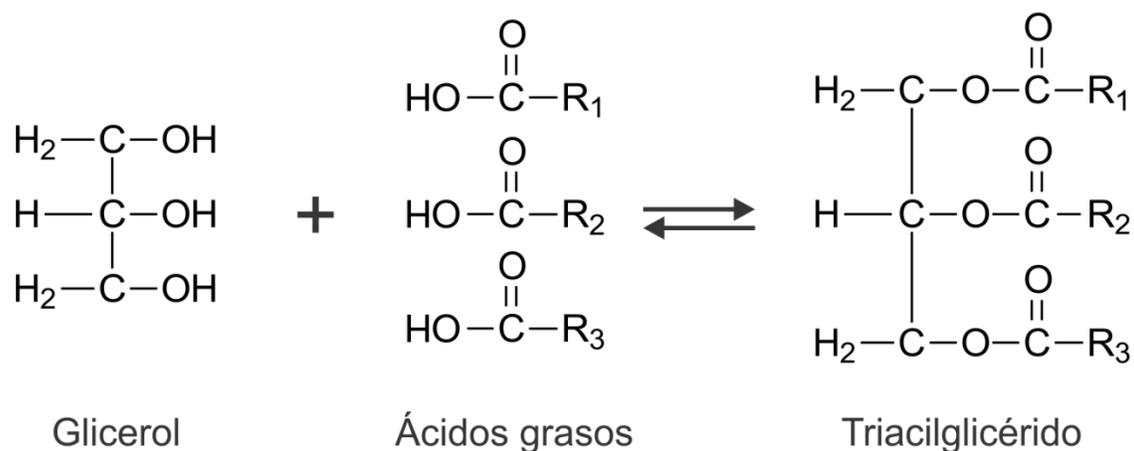


Figura 1.1 Formación y estructura de triacilglicéridos.

Cuadro 1.1 Ejemplo de ácidos grasos (Ali y Hanna, 1994).

Ácidos grasos	Nombre Común	Estructura	Abreviatura
Saturados	Mirístico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	(C14:0)
	Palmítico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	(C16:0)
	Estearico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	(C18:0)
No Saturados	Palmitoleico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C16:1)
	Oleico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C18:1)
	Linoleico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C18:2)
	Linolénico	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C18:3)

1.1.1 Biosíntesis de lípidos en microalgas

El metabolismo de los lípidos, en particular la ruta de biosíntesis de ácidos grasos y TAG, ha sido muy poco estudiado en las microalgas en comparación con las plantas vasculares. Sin embargo, con base en la homología de secuencias y algunas características bioquímicas compartidas de genes y/o enzimas aisladas tanto de microalgas como de plantas vasculares que están involucradas en el metabolismo de lípidos, hacen suponer que la ruta básica de los ácidos grasos y de la biosíntesis de TAG en las microalgas es directamente análoga a las rutas seguidas en las plantas vasculares (Hu *et al.*, 2008).

En las microalgas, la síntesis de ácidos grasos ocurre primordialmente en el cloroplasto. En la Figura 1.2 se muestra un esquema general de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. La ruta produce ácidos grasos de 16 o 18 carbonos o ambos. Estos ácidos grasos son usados como precursores de la síntesis de lípidos neutros, principalmente TAG, los cuales se acumulan en el cloroplasto y otras membranas celulares bajo condiciones ambientales adversas o condiciones limitantes de cultivo (Hu *et al.*, 2008).

Por su parte, la biosíntesis de los TAG en las microalgas se ha propuesto que ocurre por medio de la vía directa del metabolismo del glicerol (Figura 1.3) (Ratledge y Cohen, 2008). Los ácidos grasos producidos en el cloroplasto son secuencialmente transferidos de CoA (coenzima A) a las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-fosfato lo que resulta en la formación del metabolito central ácido fosfatídico (PA). La desfosforilación del PA catalizada por una fosfatasa específica libera diacilglicerol (DAG). En el paso final de la síntesis de TAG un tercer ácido graso es transferido a la posición vacante tres del DAG y esta reacción es catalizada por la diglicerol acetiltransferasa, una reacción enzimática que es única para la biosíntesis de triglicéridos en el retículo endoplásmico.

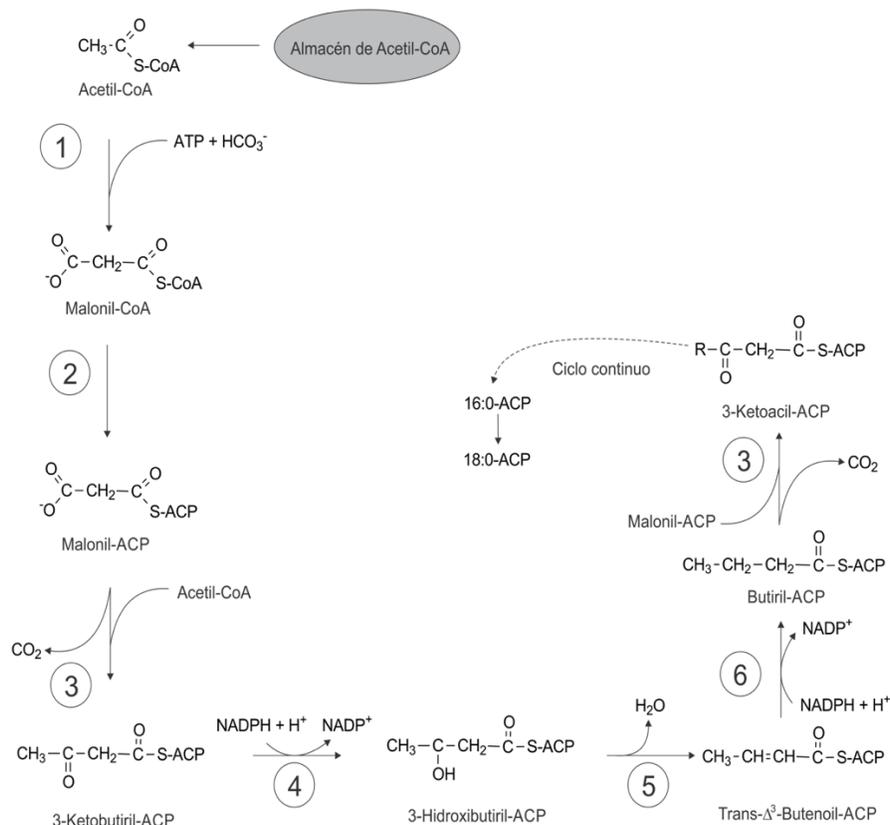


Figura 1.2 Ruta de síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto (Hu *et al.* 2008). Enzimas:(1) Acetil-CoA carboxilasa; (2) Malonil-CoA-ACP transferasa; (3) Ketoacil-ACP reductasa; (4) Ketobutilil-ACP reductasa; (5) 3-Hidroxiacil-ACP deshidrasa; (6) Enoilil-ACP reductasa.

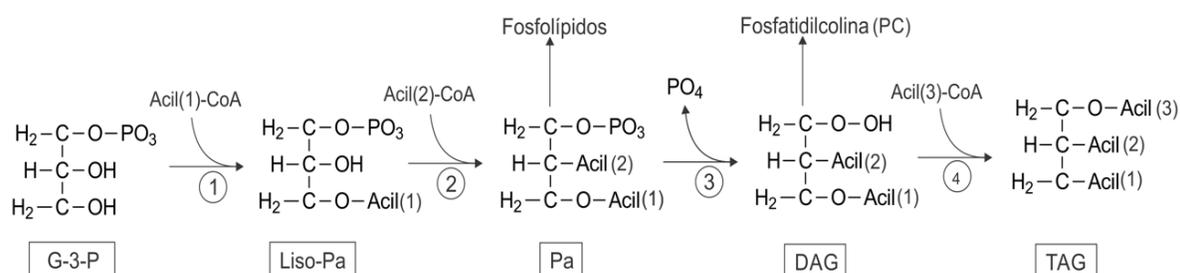


Figura 1.3 Esquema simplificado de la vía de biosíntesis de TAG en algas (modificado de Hu *et al.* 2008). Enzimas: (1) Glicerol-3-fosfato acil transferasa citosólica; (2) Acido lisofosfatídico acil transferasa; (3) Ácido fosfatídico fosfatasa; (4) Diacilglicerol acil transferasa.

Aunque en general la ruta de síntesis de ácidos grasos y TAG es similar entre plantas y microalgas, existe evidencia de diferencias en cómo ocurre el metabolismo de los lípidos. En las microalgas, por ejemplo, la ruta completa desde la fijación del CO₂ hasta la síntesis y acumulación de TAG se lleva a cabo en una sola célula, mientras que en las plantas la síntesis y la acumulación de TAG ocurre en tejidos u órganos específicos (por ejemplo: semillas o frutos) (Hu *et al.*, 2008).

1.1.2 Ventajas de las microalgas verdes oleaginosas como fuente de materia prima para la producción de biodiésel

El biodiésel puede ser obtenido mediante el proceso químico de transesterificación (Figura 1.4); de grasas animales, tales como sebo de búfalo, vaca o cerdo, o de aceites vegetales provenientes de las semillas de girasol, palma aceitera, cocotero, soya, *Brassica carinat*, *Camelia sativa*, *Jatropha curcas*, entre otras. Sin embargo, estos cultivos requieren de grandes extensiones de tierra, grandes cantidades de agua y un tiempo de cultivo largo, ya que son cultivos perennes que tienen un ciclo de vida largo. Además, de acuerdo con Schenk *et al.* (2008) si se pretendiera sustituir la demanda mundial de petróleo por biodiésel se necesitarían 4.875×10^{12} L anualmente. La producción de aceites vegetales necesitaría de áreas exageradamente grandes, desde 819×10^6 ha hasta 15002×10^6 ha, para cubrir esta demanda.

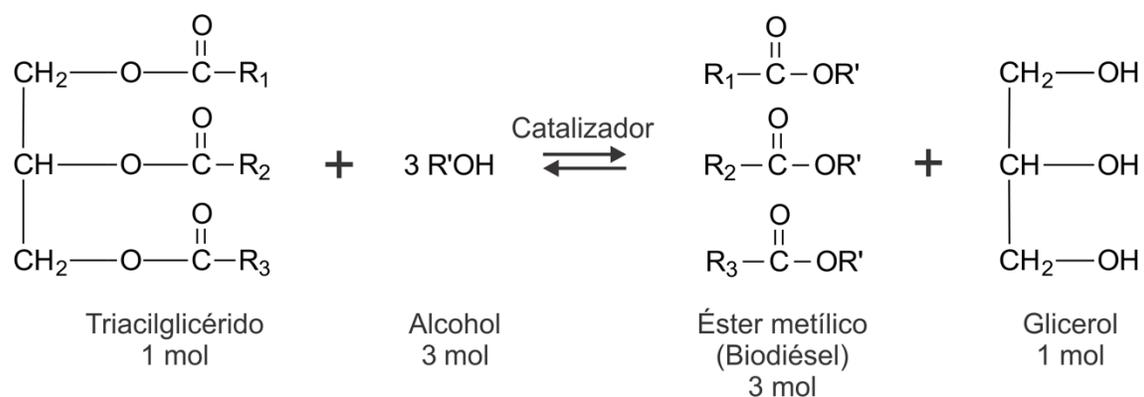


Figura 1.4 Reacción de transesterificación. R₁₋₃ son grupos de hidrocarburos (modificado de Chisti, 2007).

El panorama anterior cambia drásticamente, al menos en teoría, si se utilizan microalgas que pueden acumular grandes contenidos de lípidos para la producción de biodiésel (Chisti, 2007; Medipally et al., 2015; Wijffels y Barbosa, 2010), ya que por ejemplo, para cubrir la demanda mundial anual de petróleo con base en el cultivo de microalgas se considera que sólo se necesitaría entre 20.5% y el 2.5% del área cultivable mundial (Schenk *et al.*, 2008), como se muestra en el Cuadro 1.2, y es por ello que actualmente muchas investigaciones están dirigidas al uso de los lípidos de microalgas para la producción de biodiésel.

Cuadro 1.2 Comparación de algunas fuentes de materia prima para biodiésel (Schenk, 2008).

Cultivo	Biodiésel (L/ha-año)	Superficie de tierra necesaria para producir la demanda mundial de petróleo (M ha).	Área requerida como % de la tierra mundial	Área requerida como % de la tierra cultivable mundial
Algodón	325	15,002	100.7	756.9
Soya	446	10,932	73.4	551.6
Grano de mostaza	572	8,524	57.2	430.1
Girasol	952	5,121	34.4	258.4
Canola	1,190	4,097	27.5	206.7
<i>Jatropha</i> sp.	1,892	2,557	17.3	130 (0 ^a)
Palma aceitera	5,950	819	5.5	41.3
Microalgas(10 gm ⁻² día ⁻¹ con 30% TAG)	12,000	406	2.7	20.5 (0 ^a)
Microalgas(10 gm ⁻² día ⁻¹ con 50% TAG)	98,500	49	0.3	2.5 (0 ^a)

^a Si los estanques y biorreactores de microalgas se encuentran en la tierra no cultivable; *Jatropha* spp. es principalmente cultivada en tierras marginales.

De importancia particular es que las microalgas pueden ser cultivadas todo el año y cosechadas continuamente. Para su cultivo se pueden utilizar tierras marginales, por ejemplo, el desierto y las zonas áridas y semiáridas que no son aptos para la agricultura. Además, se puede aprovechar el agua de ambientes salinos e hipersalinos (para microalgas marinas), de baja calidad de nutrientes o de aguas residuales, que no son buenas para la irrigación agrícola o para el consumo de los seres humanos o animales (Khan *et al.*, 2009).

Las microalgas secas retienen sus aceites en el citosol (Cuadro 1.3), los cuales pueden extraerse mediante prensado y en combinación con disolventes como hexano, benceno y éter. Con la combinación de estos dos procesos, es posible obtener alrededor del 90% del aceite contenido en las algas (Ratledge y Cohen, 2008). La productividad de aceite de

muchas microalgas excede la del mejor cultivo agrícola (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.3 Contenido de lípidos de algunas microalgas (Chisti, 2007).

Microalga	Contenido de lípidos (% de peso seco celular)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

1.1.3 Incremento de la acumulación de TAG en microalgas

Para alcanzar la viabilidad económica de las microalgas como una fuente de TAG para la producción de biodiésel, aún se tienen que superar varios retos, como la obtención de una mayor acumulación de TAG (Medipally et al., 2015; Wijffels y Barbosa, 2010). En este sentido, varias estrategias han sido estudiadas con el objetivo de incrementar el contenido de lípidos, específicamente TAG, en microalgas. Entre estas estrategias se encuentran el cultivo bajo condiciones de pH alcalino, o de alta intensidad lumínica, así como el de baja deficiencia de nutrientes (Guckert y Cooksey, 1990; Mujtaba et al., 2012; Sun et al., 2014). El cultivo de microalgas bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno ha sido considerado como una buena estrategia para el incremento de TAG. Sin embargo, se ha observado que este aumento de lípidos va acompañado de la dramática disminución de la biomasa,

lo cual afecta negativamente el rendimiento total de los TAG obtenidos (Rawat *et al.*, 2013). El efecto negativo en la biomasa se debe a que la deficiencia de nitrógeno provoca cambios fisiológicos en las células reduciendo su eficiencia fotosintética para recolectar la luz, la transducción de energía y la fijación de CO₂, ocasionando una disminución de la concentración de la clorofila a, un aumento en la concentración de los carotenoides, así como una disminución del número de células presentes en los cultivos y de la biomasa seca (Da Silva *et al.*, 2009; Dean *et al.*, 2010; Zhila *et al.*, 2005). El uso de ingeniería genética también ha sido sugerido para promover el incremento de la producción de la biomasa y lípidos en microalgas, y aunque esta estrategia es muy promisoría, el desarrollo de esta tecnología está aún en proceso o no se encuentra disponible para la mayoría de la especies de microalgas (Medipally *et al.*, 2015). Recientemente, se ha propuesto una estrategia que contempla el uso de reguladores de crecimiento, incluyendo las fitohormonas, para incrementar la acumulación y producción de TAG en microalgas.

1.2 Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son sustancias que actúan como mensajeros químicos naturales (fitohormonas) o sintéticos que conjuntamente con las señales ambientales regulan una amplia gama de procesos de crecimiento y desarrollo de plantas (Park *et al.*, 2013).

1.2.1 Fitohormonas

Las fitohormonas se producen en las células de plantas, sin la necesidad de glándulas; se sintetizan en un sitio específico de la planta, lo cual depende de la fitohormona, y pueden ser trasladadas a otro sitio donde también ejercen su acción fisiológica en muy bajas concentraciones, entre 10⁻⁹ M y 10⁻⁶ M, muy por debajo de la concentración de otros compuestos como nutrientes y vitaminas (Park *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2008).

En la actualidad, en las plantas se han identificado varios grupos de compuestos fisiológicamente activos del tipo fitohormonas (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4 Fitohormonas en plantas (Tarakhovskaya *et al.*, 2007).

Fitohormona	Ruta síntesis	Localización subcelular de síntesis	Actividad fisiológica básica
Auxinas	De triptófano o indol	Primordios foliares, hojas jóvenes y frutos en desarrollo	Inducción del crecimiento de elongación, diferenciación de elementos del floema, dominancia apical, tropismos, inicio de formación de raíces, etc.
Citocininas	Modificaciones bioquímicas de adenina	Puntas de las raíces, hojas jóvenes, y el desarrollo de semillas	El control de la división celular, el desarrollo del brote, desarrollo de lámina de la hoja, retrasos en senescencia
Giberelinas	De gliceraldehído-3-fosfato	Tejidos de brotes jóvenes y el desarrollo de semillas	Alargamiento del tallo, el inicio de la germinación de semillas
Etileno	De metionina	Tejidos estresados y de frutas maduras	Inducción de la senescencia, la iniciación de respuestas de defensa
ABA	De carotenoides	Raíces y hojas expandidas	Control de la función del aparato estomático, inhibición del crecimiento, latencia de las semillas, acumulación de sustancias de reserva como TAG
Poliaminas	Por carboxilación de arginina o ornitina	Varios tejidos	Regulación del crecimiento y desarrollo a concentraciones micromolares
Brassino-esteroides	De ácido mevalónico	Varios tejidos	Control de la división, el crecimiento por elongación, la diferenciación del sistema vascular
Jasmonatos	De ácidos grasos poliinsaturados	Varios tejidos	Desarrollo de las respuestas defensivas
Salicilatos	De fenilalanina	Varios tejidos	Inducción del complejo de respuestas defensivas durante la patogénesis
Péptidos de señal	De aminoácidos	Varios tejidos	Inicio de las respuestas defensivas, la identificación de auto-incompatibilidad

1.2.2 Fitohormonas en la proliferación celular

En cuanto a la proliferación celular, se ha encontrado que algunas fitormonas están involucradas en el ciclo de división celular. En las plantas superiores, se ha indicado que

auxinas y citocininas son generalmente estimulantes de proliferación de la mayoría de los tipos de células (Den Boer y Murray, 2000), ejerciendo su acción durante el ciclo de división celular, el cual, como se sabe, es un proceso altamente ordenado y controlado por diversos factores, que resulta en la formación de dos células hijas, y consta de cuatro fases: síntesis de ADN (S), mitosis (M) y dos fases de espera (G1 y G2) (Figura 1.5). Los factores de control del ciclo de división celular proporcionan un marco de regulación bioquímico que permiten que las señales de desarrollo (fitohormonas) o ambientales afecten la división celular y el crecimiento (Hartig y Beck, 2006).

El paso de las células eucariotas a través del ciclo de división celular está controlado por la proteína serina-treonina cinasa dependiente de ciclina (CDK), principal proteína cinasa que se expresa durante todo el ciclo celular y conduce a las células a la transición de G1/S, así como de G2/M. La CDK depende de proteínas ciclinas, tipo A, B y D, para regular su actividad (Hartig y Beck, 2006; Stals y Inzé, 2001; Den Boer y Murray, 2000). Estudios realizados con células de plantas superiores han encontrado elementos de respuesta a auxinas, ABA, GA y etileno en promotores de CDKs y en promotores de inhibidores de ciclinas (ICK), conocidos como KRPs (Kip-related proteins, que bloquean a complejos CDK-ciclinas). De igual forma, se ha sugerido una interacción directa de las citocininas con CDKs y ciclinas (Hartig y Beck, 2006; Den Boer y Murray, 2000).

La interacción de las fitohormonas con CDK y las ciclinas se da a lo largo del ciclo de división celular, y como se observa en la Figura 1.5 durante la fase G1, auxinas, citocininas, ABA, GA y BR regulan la expresión de las ciclinas D (CYCD) y su subunidad catalítica, la cinasa dependiente de ciclina A (CDKA). La activación del complejo CDKA-CYCD requiere de la disociación de la proteína inhibidora de CDK (ICK, cuya transcripción es inducida por ABA) y la fosforilación del residuo Thr160 de CDKA por la cinasa CDKD;1 (regulada por GA). El complejo CDKA-CYCD activo inicia la fosforilación de la proteína retinoblastoma (RB) durante la fase G1 tardía, liberando de esta manera al complejo E2F-DP que promueve la transcripción de genes necesarios para dar inicio a la fase S. Auxinas, citocininas y GA también regulan la actividad cinasa de CDK tipo A y B mediante la activación de la transcripción de ciclinas tipo A y B. La transición de G2 a M es

asociada con la fosforilación de Thr160, activación de CDK por una cinasa denominada CDK-activación (CAK) y por la desfosforilación del inhibidor Tyr fosforilado inducido por citocininas. Finalmente, una ruta de degradación dependiente de ubiquitina se dirige a las ciclinas mediante el complejo promotor de anafase (ACP) en la transición metafase-anafase, activando de este modo la salida de la mitosis (Figura 1.5).

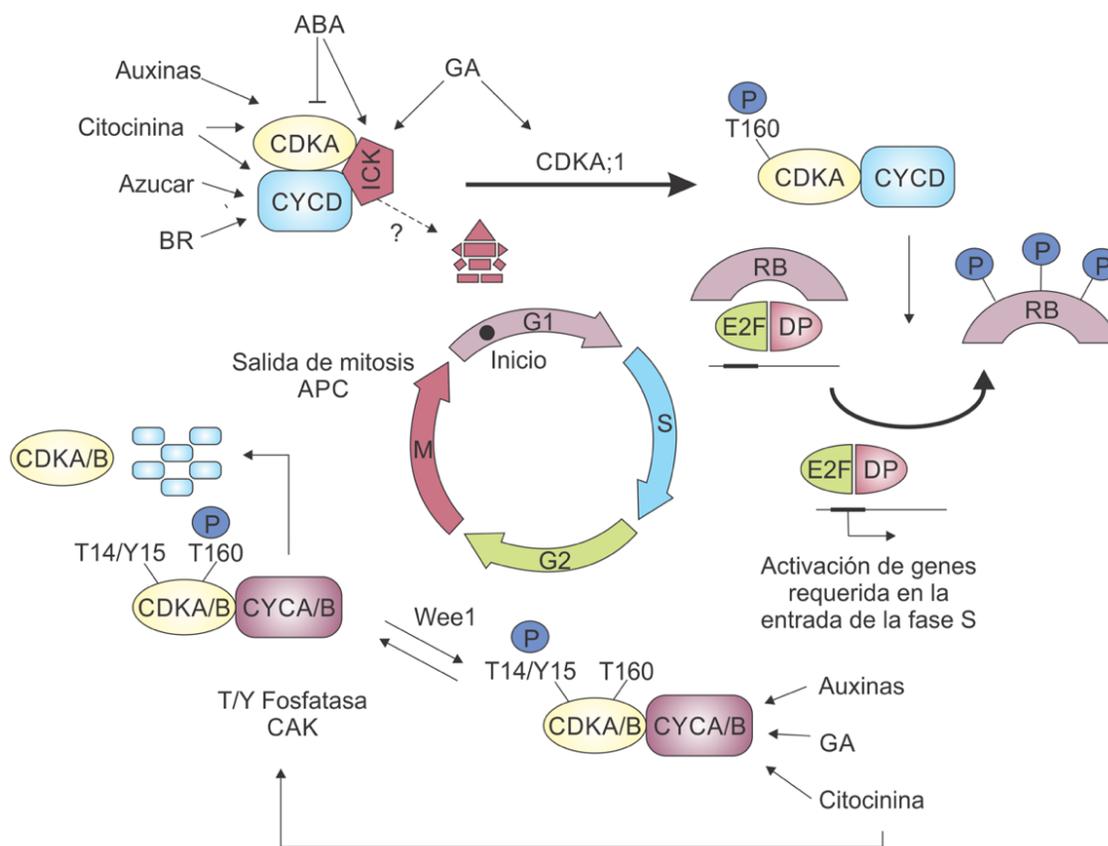


Figura 1.5 Ciclo de división celular (Modificado de Stals y Inzé, 2001).

Por otra parte, se ha mencionado que las fitohormonas podrían afectar el ciclo de división celular de una manera indirecta, tal es el caso de las auxinas que promueve la actividad del ciclo celular mediante la estimulación de la degradación de proteínas inhibitoras y la inducción de la expresión génica en la transición de G1 / S y G2 / M. Este papel central de la auxina en la regulación del ciclo celular ofrece la posibilidad de controlar la ploidía de

las células (Hartig y Beck, 2006). En la Figura 1.6 se observa de forma más detallada cómo las auxinas activan a SCF (Complejo Skp1 p-cullin-F-box) y APC (Complejo Promotor de Anafase), conduciendo a la degradación de proteínas a través del proteosoma 26S. EL TIR1 receptor de auxinas es uno de los componentes del complejo SCF. La degradación de AUX/IAA, inhibidor de la transcripción, facilita la unión de los factores de transcripción ARF, y la posterior expresión de genes diana como Cdk, ciclinas, E2Fs, pero también de KRPs. Por otra parte, en la Figura 1.6 se muestra que la unión de citocininas a los AHK (receptores histidina cinasa) activan su actividad de histidina cinasa, transfiriendo un fosfato a AHP (proteína histidina fosfotransferasa). La fosforilación promueve que AHP migre hacia el núcleo y transfiera los grupos fosfato a los ARRs (reguladores de respuesta de *Arabidopsis*). ARRs tipo B son factores de transcripción inactivos, que se activan por la interacción con ARRs tipo A fosforilados. La activación de ARRs promueve la transcripción de genes involucrados en el ciclo de división celular (Hartig y Beck, 2006).

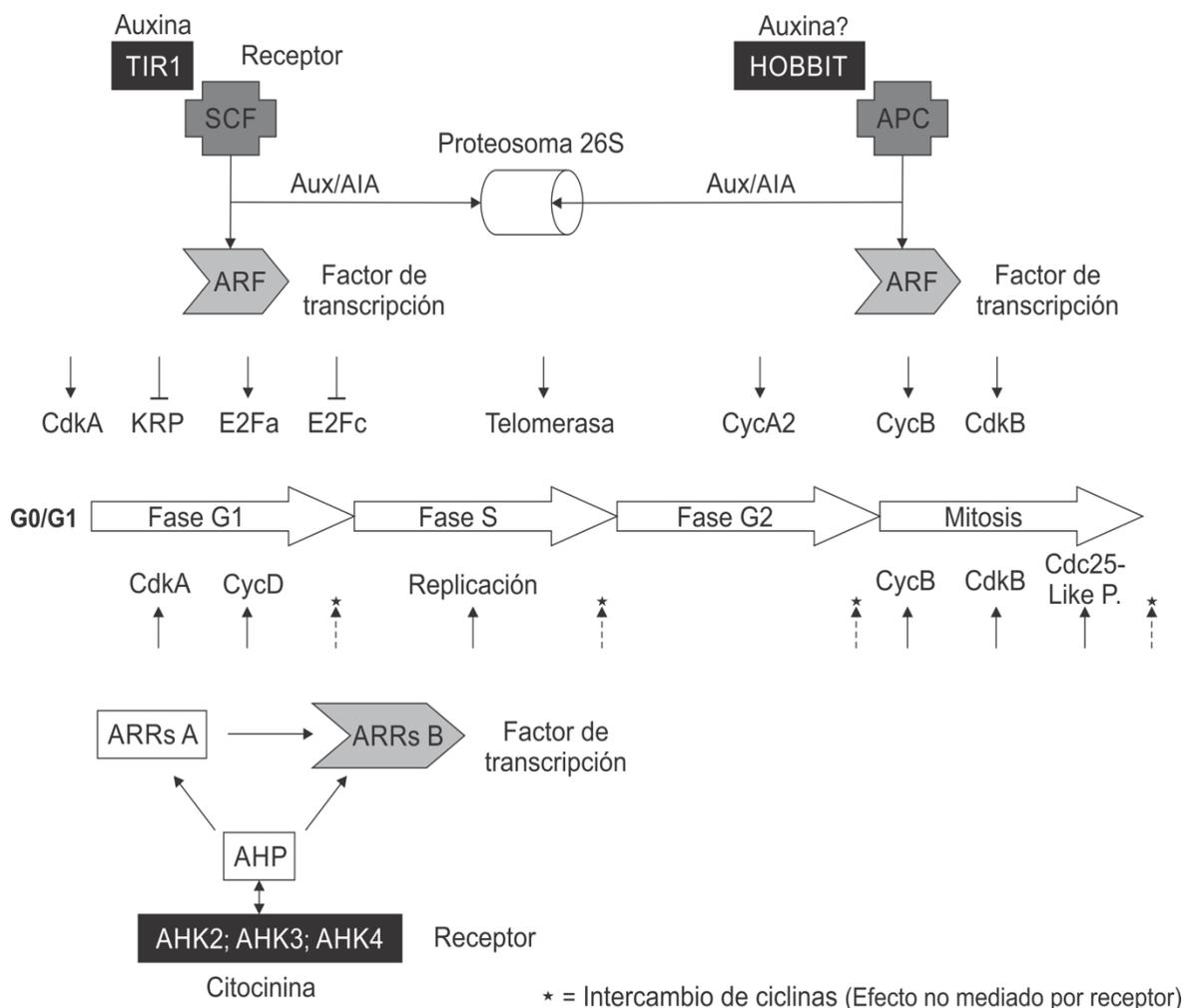


Figura 1.6 Vía de transducción de señales de auxina y citocinina desde los receptores hasta los componentes del ciclo celular (modificado de Hartig y Beck, 2006).

1.2.3 Fitohormonas en la acumulación de TAG

Las funciones de ABA como un regulador de los procesos fisiológicos o de respuesta celular al estrés abiótico han sido ampliamente reportadas en plantas superiores. Por ejemplo, el control de la función del aparato estomático, la latencia de semillas, acumulación de sustancias de reserva, así como la inhibición del crecimiento son actividades fisiológicas que han sido reportadas para ABA (Guo *et al.*, 2011; Komatsu

et al., 2013; Tarakhovskaya *et al.*, 2007). De igual forma, diversos estudios concluyen que ABA induce respuestas protectoras a la salinidad, estrés osmótico, sequía y al estrés por baja temperatura en plantas (Guo *et al.*, 2011; Komatsu *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2003). Por otra parte, se sabe que ABA está implicado en la mediación de la acumulación de TAG durante el desarrollo de semillas (Kharenko *et al.*, 2011), y se ha reportado que los TAG provenientes de embriones de *Brassica napus cv* Reston, tratados con ABA, incrementaron de 3 a 4 veces sus niveles de ácidos grasos monoinsaturados de cadena muy larga (VLCMF, por sus siglas en inglés), principalmente los omega 9: ácido eicosenoico (20:1) y ácido erúxico (22:1), que son utilizados como materia prima para usos industriales en la fabricación de pinturas y barnices. Este aumento de VLCMF fue correlacionado con el aumento de la actividad específica de la enzima elongasa, que también fue observado como consecuencia del tratamiento con ABA al que los embriones fueron sometidos (Reston *et al.*, 1992; Zou *et al.*, 1995).

1.2.4 Fitohormonas en algas

En los últimos años los estudios de fitohormonas, relacionados con algas, han tenido un gran progreso debido al desarrollo de técnicas analíticas tales como cromatografía de gases (CG), espectroscopía de masas (EM), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (Tate *et al.*, 2013).

La presencia de fitohormonas, tales como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, poliaminas, brasinoesteroides, jasmonatos y salicilatos ha sido confirmada en una gran variedad de algas. Tanto en macroalgas como en microalgas (Cuadro 1.5) (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). Lu *et al.* (2014) han reportado que la presencia de los componentes de la ruta de señalización y la presencia de receptores de fitohormonas se toma como evidencia de la existencia de una vía de regulación activa. Por ejemplo, se ha confirmado la presencia de enzimas involucradas en la ruta de síntesis, así como la presencia de genes receptores de auxinas, citocininas y ABA en el genoma de *Chlorella variabilis* NC64A, y otras algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Ostreococcus*

tauri, *Ostreococcus lucimarinus*, *Micromonas* sp Rc299 o *Micromonas* sp CCMP1545 (Blanc *et al.*, 2010).

Cuadro 1.5 Fitohormonas identificadas en diversos grupos taxonómicos de algas (Tarakhovskaya *et al.*, 2007).

División	Género	Fitohormona identificada
Clorofitas	<i>Enteromorpha, Chlorella, Cladophora, Caulerpa</i>	Auxinas, particularmente IAA
	<i>Protococcus, Chlorella, Scenedesmus, Chlamydomonas</i>	Citocininas (IPA, zeatina, zeatina riboside)
	<i>Caulerpa</i>	Giberelinas
	<i>Chlamydomonas Chlorella, Dunaliella, Haematococcus</i>	Ácido abscísico (ABA)
	<i>Enteromorpha</i>	Ácido lunulárico
	<i>Dunaliella, Chlorella</i>	Ácido jasmónico
	<i>Ulva, Chlorella</i>	Diaminas (putrescina) y poliaminas (espermina, espermidina)
	<i>Hydrodictyon</i>	Brasinoesteroides (24-epicastasterona, 28-homocastasterona)
Feofitas	<i>Macrocystis, Laminaria, Fucus, Ascophyllum</i>	Auxinas, particularmente IAA
	<i>Fucus, Ascophyllum, Sargassum, Macrocystis</i>	Citocininas (IPA, zeatina, ribósido de zeatina)
	<i>Fucus</i>	Giberelinas
	<i>Ascophyllum, Laminaria</i>	Ácido abscísico (ABA)
	<i>Dyctiota</i>	Poliaminas (espermina, espermidina)
Rodofitas	<i>Botryocladia, Porphyra</i>	Auxinas, particularmente IAA
	<i>Porphyra</i>	Citocininas
	<i>Gelidium</i>	Ácido jasmónico
	<i>Cyanidium, Gelidium, Grateloupia</i>	Diaminas (putrescina) y poliaminas (espermina, espermidina)
	<i>Griffithsia</i>	Péptido señal (rodomorfin)
Carofitas	<i>Chara</i>	Citocininas
Euglenofitas	<i>Euglena</i>	Citocininas (IPA, zeatina, ribósido de zeatina)
	<i>Euglena</i>	Ácido jasmónico
	<i>Euglena</i>	Diaminas (putrescina) y poliaminas (espermina, espermidina)
Cianofitas	<i>Oscillatoria, Chlorogloea</i>	Auxinas, particularmente IAA
	<i>Arthonema, Calothrix</i>	Citocininas
	<i>Spirulina</i>	Ácido jasmónico

1.3 Auxinas, citocininas y ABA en microalgas: usos

La presencia endógena de fitohormonas ha sido encontrada en varias microalgas (Lu y Xu, 2015; Tarakhovskaya *et al.*, 2007), y aunque se conoce poco acerca de su función, la adición exógena de estos reguladores de crecimiento tiene efectos positivos en estos microorganismos. Recientemente, muchos de los estudios realizados con reguladores de crecimiento, tanto naturales (fitohormonas) como sintéticos, se han enfocado en aumentar la producción de biomasa y metabolitos (proteínas, clorofila a y b, carotenoides y monosacáridos) de las microalgas, con la finalidad de utilizar la biomasa como suplemento alimenticio para humanos o animales, así como para comercializar los metabolitos obtenidos (Piotrowska *et al.*, 2008; Tate *et al.*, 2013). De igual forma, se han realizado estudios enfocados a aumentar la resistencia de las microalgas a la toxicidad causada por la bioabsorción de metales pesados, con la finalidad de mejorar la eficiencia de las microalgas en el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados (Falkowska *et al.*, 2011; Piotrowska-Niczyporuk *et al.*, 2012). Por otro lado, recientemente el interés por los combustibles ha impulsado estudios sobre todo para optimizar el cultivo de microalgas, así como la producción de TAG, proponiendo para ello a los reguladores de crecimiento (Park *et al.*, 2013; Piotrowska-Niczyporuk *et al.*, 2012; Piotrowska y Czerpak, 2009b; Tate *et al.*, 2013). En este sentido, Hunt *et al.* (2010) evaluaron 12 reguladores de crecimiento y encontraron efectos positivos de fitohormonas pertenecientes al grupo de las auxinas, principalmente de ácido 1-naftalenacético (ANA) sobre la productividad de la biomasa de *Chlorella sorokiniana*. Czerpak *et al.* (1994) han encontrado que auxinas como ácido indol acético (AIA) y ácido indol butírico (IBA), así como precursores y análogos de auxinas como ácido antranílico (AA), triptamina (trp-NH₂), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido fenilacético (PAA) y ácido 3-naftilsulfónico (NSA) estimulan el crecimiento, resultando en un incremento de peso fresco en *Chlorella pyrenoidosa*. Por su parte, Pietrowska y Czerpak (2009) analizaron el uso de reguladores de crecimiento del grupo de las citocininas, encontrando que N⁶-benziladenina (BA), N,N'-difenilurea (DPU), cinetina (Kin) y trans-zeatina (Z) incrementaban el número de células de *C. pyrenoidosa*. En cuanto a ABA, se ha

observado que aumenta la tolerancia a estrés por deshidratación, estrés oxidativo y salinidad, así como a la deficiencia de nitrógeno en varias microalgas (Lu y Xu, 2015). Recientemente Park *et al.* (2013) evaluaron el efecto de varias fitohormonas sobre la densidad celular, así como en el rendimiento de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs, por sus siglas en inglés) en la microalga verde *C. reinhardtii*, encontrando que la adición de ABA durante la fase lag de crecimiento incrementaba significativamente el rendimiento de FAMEs, pero la densidad celular era negativamente afectada.

1.3 Clasificación botánica de la microalga *Chlorella saccharophila*

Las microalgas de la especie *Chlorella saccharophila* se clasifican de la siguiente manera (www.algaebase.org).

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

División: Chlorophyta

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Familia Chlorellaceae

Género: *Chlorella*

Especie: *Chlorella saccharophila* Krüger (Migula)

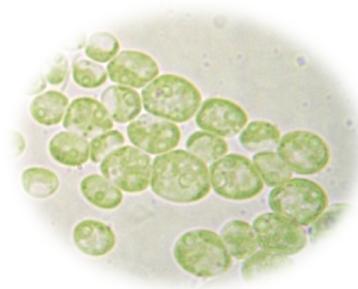


Figura 1.7 *Chlorella saccharophila* (100·)

Foto: Patricia Yolanda Contreras Pool

En particular, las microalgas de la especie *C. saccharophila* han sido poco estudiadas. Hasta donde se ha revisado en la literatura, hasta el 2011 no existían reportes sobre su producción de lípidos y su potencial como materia prima para la producción de biodiésel.

Los únicos estudios que se habían realizado con esta especie de microalgas habían sido enfocados a su capacidad para secuestrar metales pesados como zinc y plomo (Jensen *et al.*, 1982), a su clasificación de acuerdo a las propiedades de su pared celular debidas a la composición de los azúcares (Göbel y Aach, 1985) y para el estudio de la obtención de protoplastos (Takeda, 1988). Sin embargo, en estudios realizados en nuestro grupo de trabajo (Contreras-Pool, 2010; Herrera-Valencia *et al.*, 2011) se utilizó una cepa de *C. saccharophila*, una microalga verde de agua dulce nativa del estado de Yucatán, para evaluar su perfil de ésteres metílicos, así como la variación en la acumulación de lípidos en respuesta a condiciones de estrés por: disminución en la fuente de nitrógeno, pH alcalino 9.5 o 10.5, por estrés osmótico con NaCl y la combinación de éstos con estrés osmótico por NaCl. Con base en los resultados obtenidos, *C. saccharophila* se sugirió como una alternativa atractiva de materia prima para la producción de biodiésel, debido a que además de presentar un perfil de ésteres metílicos adecuado para este fin (éster metílico del ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico del ácido octadecanoico (C-18) y ésteres metílicos del ácido octadecenoico (C-18:1*cis* y C-18:1*trans*), presentó una buena capacidad de acumular biomasa (22.941×10^6 cel·mL⁻¹) y lípidos (Contreras-Pool, 2010; Herrera-Valencia *et al.*, 2011).

1.4 Justificación

En los últimos años, la capacidad de las microalgas para fijar CO₂, y los problemas ambientales que enfrenta el mundo, tales como el calentamiento global, provocado entre otras cosas por el exceso de CO₂ en el ambiente generado por la quema de combustibles de origen fósil, ha despertado un gran interés por el cultivo a gran escala de microalgas con el objetivo de ayudar a mitigar el exceso de emisiones de CO₂ y luchar contra el cambio climático, ya que estos microorganismos tienen la capacidad de fijar este CO₂ y utilizarlo como su fuente de carbono. Ante estos problemas ambientales, se ha considerado el uso de biocombustibles, entre estos el biodiésel, como una alternativa a los combustibles de origen fósil.

Por su parte, las microalgas verdes son consideradas una alternativa atractiva como fuente de materia prima para la producción de biodiésel, ya que son microorganismos fotosintéticos con el potencial de acumular grandes cantidades de biomasa y lípidos en un corto tiempo, además de que su cultivo puede realizarse en áreas de tierras marginales evitando competir con el uso de la tierra para la producción de alimentos. Sin embargo, aún existen retos por superar para que el uso de las microalgas como una fuente de lípidos, particularmente TAG, sea económicamente viable. Entre estos retos se encuentra la obtención de una mayor acumulación de TAG sin la disminución del rendimiento de biomasa, ante la cual, en los últimos años, se ha planteado el uso de reguladores de crecimiento como una estrategia para aumentar la producción de TAG en microalgas.

En este sentido, en este trabajo se evaluó, por una parte, el efecto de la aplicación exógena de reguladores de crecimiento de los grupos de auxinas (AIA, ANA) y citocininas (BAP, DPU y TDZ) en la concentración celular y acumulación de biomasa de *C. saccharophila* y, por otra parte, se evaluó el efecto de la adición de ABA tanto en la acumulación de biomasa como en la acumulación TAG en esta microalga, con lo cual se podrá contribuir a alcanzar a la viabilidad económica del uso de microalgas como materia prima en la producción de biodiésel.

1.5 Hipótesis

La aplicación de reguladores de crecimiento pertenecientes a los grupos de auxinas y citocininas conducirá al incremento en la producción de biomasa. Por su parte, la aplicación de ABA conducirá al incremento de triacilglicéridos en el cultivo de *Chlorella saccharophila*.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Mejorar la producción de biomasa y triacilglicéridos de la microalga verde *Chlorella saccharophila* mediante la aplicación de reguladores de crecimiento.

1.6.2 Objetivo específico

- Evaluar el efecto de la aplicación de dos auxinas (AIA, ANA), y tres citocininas (BAP, DPU y TDZ) sobre la acumulación de biomasa (densidad celular y peso seco) de la microalga verde *C. saccharophila*.
- Evaluar el efecto de la aplicación de ácido abscísico (ABA) sobre la acumulación de biomasa (densidad celular y peso seco), lípidos y TAG de la microalga verde *C. saccharophila*.

1.7 Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se siguió el diseño experimental que se presenta en la Figura 1.8.

El efecto de diferentes concentraciones de auxinas (AIA, ANA), citocininas (BAP, DPU y TDZ) sobre el crecimiento celular y el peso seco de biomasa de *C. saccharophila* fue evaluado siguiendo una estrategia de cultivo en una sola etapa. Los cultivos se dejaron crecer durante 10 días y se colectaron por centrifugación a 3,200 *g* por 5 min para su posterior análisis.

Para evaluar el efecto de ABA en el crecimiento celular, el peso seco de la biomasa, los lípidos y la acumulación de TAG de *C. saccharophila* se utilizó una estrategia de cultivo de una sola etapa. Los cultivos se dejaron crecer durante 10 días y se colectaron por centrifugación a 3,200 *g* por 5 min para su posterior análisis.

Posteriormente, se evaluó el efecto de ABA en combinación con deficiencia de nitrógeno utilizando una estrategia de cultivo en dos etapas. Para lo anterior se inocularon cultivos, después de 10 días las células fueron colectadas por centrifugación, a 3,200 *g* por 5 min, y la biomasa se transfirió a medio TAP fresco con el tratamiento experimental apropiado, las células se dejaron crecer durante 7 días y se colectaron por centrifugación para su posterior análisis. Se evaluaron tres tratamientos experimentales: (1) ABA, medio TAP suplementado con 1 μ M de ABA, (2) DN, medio TAP-N, (3) DN+ABA, medio TAP-N suplementado con 1 μ M de ABA. Se utilizó medio TAP fresco como control.

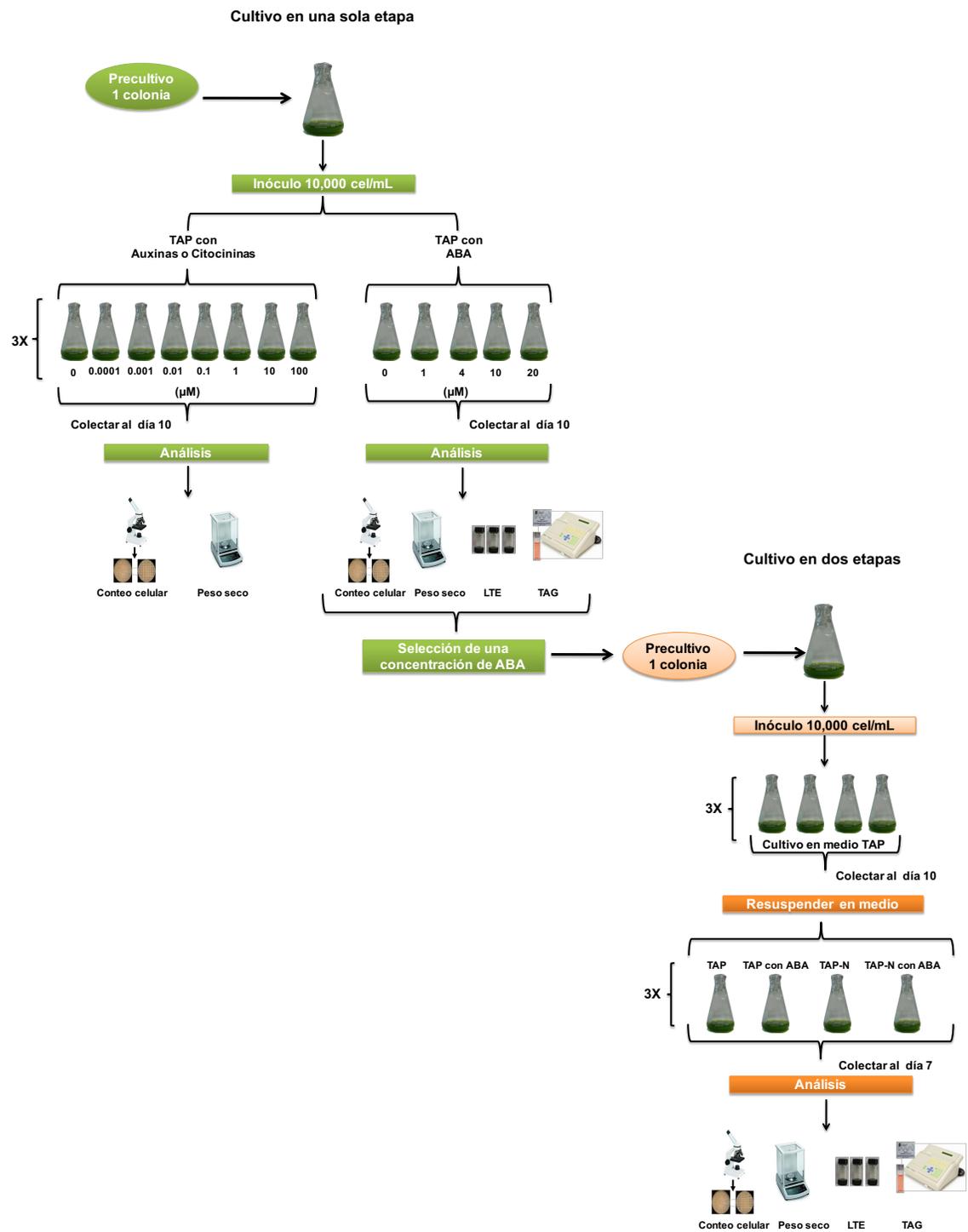


Figura 1.8 Diseño experimental.

CAPÍTULO II. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AUXINAS Y CITOCININAS EN LA ACUMULACIÓN DE BIOMASA DE *CHLORELLA SACCHAROPHILA*

2.1 Introducción

Las microalgas verdes son consideradas como una fuente atractiva y prometedora de materia prima (TAG) para la producción de biodiésel. Con el objetivo de alcanzar la viabilidad económica para el uso de las microalgas como una fuente de TAG en la producción de biocombustibles se ha sugerido que es necesario incrementar el contenido de TAG en las células. En este sentido, el cultivo de microalgas en condiciones de deficiencia de nitrógeno es considerada la mejor estrategia (Rawat *et al.*, 2013), sin embargo, la implementación de esta estrategia no sólo trae consigo el incremento de TAG en las células, sino que también produce un decremento dramático de la biomasa. Por lo tanto, la obtención de una mayor acumulación de TAG sin afectar negativamente el rendimiento de biomasa se presenta como uno de los grandes retos por superar para que el uso de microalgas como una fuente de materia prima para la producción de biodiésel sea económicamente viable.

Con el fin de superar este reto, recientemente se ha sugerido otra estrategia, la cual contempla el uso de reguladores de crecimiento, tanto naturales (fitohormonas) como sintéticos. Entre estos, las fitohormonas pertenecientes a los grupos de las auxinas y citocininas en plantas se encuentran estrechamente relacionadas a la proliferación celular, ya que ejercen su acción en el ciclo de división celular (Den Boer y Murray, 2000; Hartig y Beck, 2006; Stals y Inzé, 2001). En lo que respecta a microalgas, estudios realizados por diferentes autores coinciden en que las auxinas y citocininas promueven el incremento de la concentración celular y/o la acumulación de biomasa seca de estos organismos (Bajguz y Piotrowska-Niczyporuk, 2013; Hunt *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2013). Por ejemplo, Czerpak *et al.* (1994) han encontrado que auxinas (AIA), así como precursores y análogos de auxinas estimulan el crecimiento, resultando en un incremento de peso fresco en *Chlorella pyrenoidosa*. Por su parte, Pietrowska y Czerpak (2009) analizaron el uso de reguladores

de crecimiento perteneciente a las citocininas, como difenilurea (DPU), y encontraron que la aplicación exógena incrementaba el número de células de *C. pyrenoidosa*. Por otro lado, Hunt *et al.* (2010) evaluaron 12 reguladores de crecimiento, incluyendo auxinas, citocininas, giberelinas, poliaminas y diaminas, encontrando efectos positivos de fitohormonas pertenecientes al grupo de las auxinas y citocininas, principalmente de ácido 1-naftalenacético (ANA) y de thidiazurón (TDZ) sobre la productividad de la biomasa de *Chlorella sorokiniana*.

Por lo tanto, en este capítulo se evaluó el efecto de la aplicación exógena de las auxinas AIA y ANA y de las citocininas BAP, DPU y TDZ sobre el crecimiento celular y acumulación de biomasa de *Chlorella saccharophila*.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Cepa de microalga y condiciones de cultivo

La cepa silvestre de *C. saccharophila* (UADY-PRIORI-014-FMVZ-04) se mantuvo en medio Tris-acetato-fosfato (TAP, por sus siglas en inglés) (Harris, 1989) en condiciones axénicas, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en fotoperiodo 16/8 (luz/obscuridad) a una intensidad lumínica de $90\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ y en agitación a 140 rpm.

2.2.2 Fitohormonas

Para preparar las disoluciones patrón 17.5 mg de AIA, 18.6 mg de ANA, 22.5 mg de BAP y 22.0 mg de TDZ se resuspendieron en 1 mL de una disolución 1 M de KOH, y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Para la disolución patrón de DPU 21.2 mg se resuspendieron en 100 mL de sulfóxido de dimetilo (DMSO).

2.2.3 Estrategia experimental

Para evaluar el efecto de las auxinas (AIA y ANA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y las citocininas (BAP, DPU y TDZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en el crecimiento celular y el peso seco de la biomasa de *C. saccharophila*, se inocularon células (10,000

células mL⁻¹) provenientes de la fase exponencial de crecimiento, en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo TAP, el cual fue suplementado con diferentes concentraciones (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μ M) de los diferentes reguladores de crecimiento, según fuese el caso a evaluar (AIA, ANA, BAP, DPU o TDZ), mientras que a las células control se les adicionó agua destilada o DMSO en la misma proporción. Los cultivos se dejaron crecer durante 10 días y se colectaron por centrifugación a 3,200 *g* por 5 min para su posterior análisis.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y cada experimento se llevó a cabo dos veces. Se realizó una prueba estadística ANOVA de una vía, y se utilizó la prueba LSD de Fisher para determinar las diferencias significativas entre las medias de entre el 5% de nivel de significación, utilizando el programa Statgraphics Plus 4.1.

2.2.4 Evaluación del crecimiento celular

La concentración celular fue determinada al final de los experimentos, utilizando un hematocitómetro Neubauer y un microscopio Carl Zeiss Primo Star. Las células fueron colectadas por centrifugación a 3,200 *g* por 5 min y secadas usando una liofilizadora por 48 h. La biomasa obtenida fue pesada y se consideró como el peso seco. La biomasa seca se mantuvo en un desecador a temperatura ambiente hasta su análisis de lípidos y TAG.

2.3 Resultados

2.3.1 Efecto de AIA sobre el crecimiento de *C. saccharophila*

En el primer experimento la concentración celular de *C. saccharophila* disminuyó significativamente, con respecto al control, bajo todas las concentraciones de AIA evaluadas (Cuadro 2.1 y Figura 2.1a). Esta misma tendencia se observó en la réplica del experimento para todas las concentraciones evaluadas y el control (Cuadro 2.1 y Figura 2.1b).

Cuadro 2.1 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de AIA.

AIA (μM)	Concentración celular *	
	($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	10.7 \pm 1.2 a	11.0 \pm 0.35 a
0.0001	6.1 \pm 1.3 c	7.1 \pm 0.47 b
0.001	7.2 \pm 1.2 bc	6.8 \pm 0.48 c
0.01	6.4 \pm 0.05 c	7.2 \pm 0.73 bc
0.1	8.3 \pm 1.2 b	7.2 \pm 0.83 bc
1	6.3 \pm 0.74 c	6.9 \pm 0.46 bc
10	6.7 \pm 0.30 c	7.9 \pm 0.88 bc
100	6.2 \pm 0.22 c	6.9 \pm 0.48 bc

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

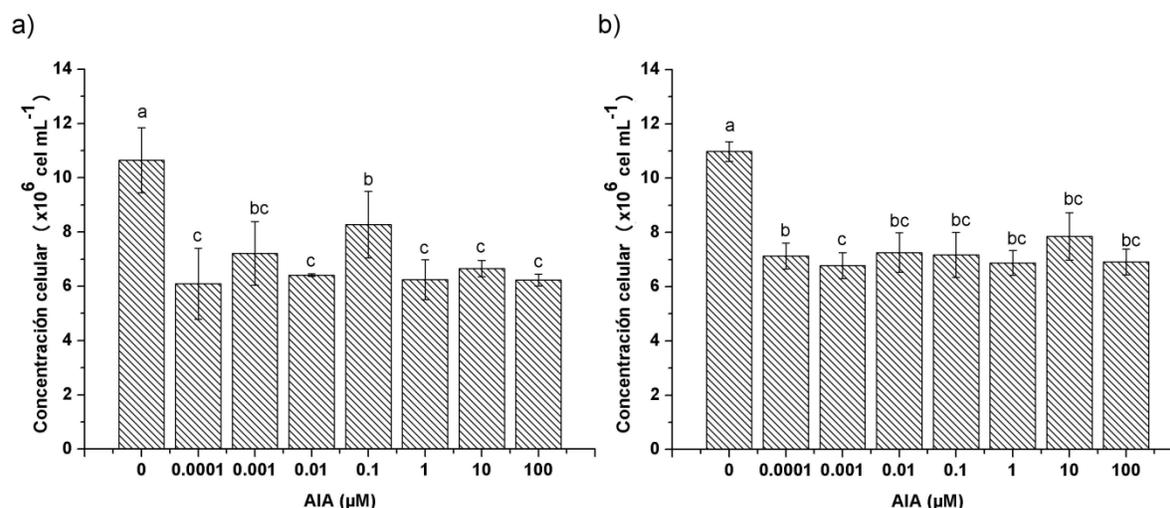


Figura 2.1 Efecto de diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con AIA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En cuanto a la biomasa seca todas las concentraciones de AIA evaluadas no presentaron diferencias significativas respecto al control (Cuadro 2.2 y Figura 2.2a). Este resultado fue corroborado en un segundo experimento en el que se mantuvo esta misma tendencia en cada concentración evaluada (Cuadro 2.2 y Figura 2.2b).

Cuadro 2.2 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de AIA.

AIA (µM)	Biomasa seca *	
	(mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	32.07 ± 4.31 a	36.3 ± 2.50 a
0.0001	36.5 ± 5.12 a	36.13 ± 1.99 a
0.001	34.73 ± 2.38 a	36.33 ± 2.11 a
0.01	33.5 ± 6.37 a	36.23 ± 2.50 a

0.1	31.87 ± 5.78 a	36.36 ± 0.95 a
1	32.53 ± 4.61 a	36.67 ± 3.12 a
10	32.8 ± 1.31 a	36.4 ± 1.50 a
100	35.23 ± 4.14 a	36.43 ± 2.10 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

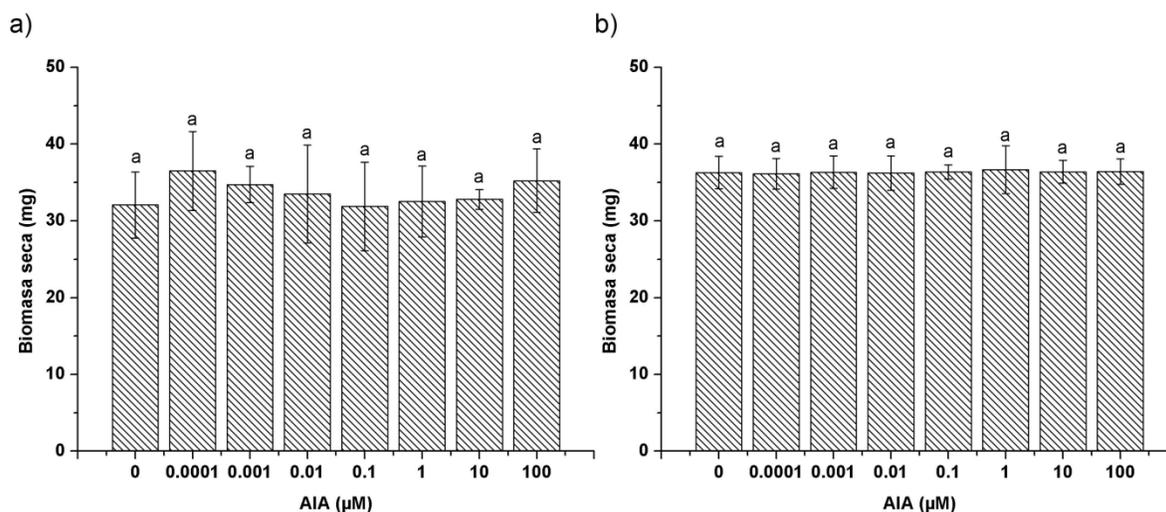


Figura 2.2 Efecto de diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA) sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con AIA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

2.3.2 Efecto de ANA sobre el crecimiento de *C. saccharophila*

La concentración celular de *C. saccharophila* disminuyó significativamente bajo todas las concentraciones de ANA evaluadas, en comparación con el control (Cuadro 2.3 y Figura 2.3a). De nuevo esta tendencia se observó en la réplica del experimento para todas las concentraciones evaluadas, y el control $10.6 \pm 0.30 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 2.3 y Figura 2.3b).

Cuadro 2.3 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ANA.

ANA (μM)	Concentración celular *	
	($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	10.7 \pm 1.2 a	10.6 \pm 0.30 a
0.0001	8.08 \pm 1.1 b	7.78 \pm 0.48 b
0.001	7.5 \pm 0.38 bcd	7.2 \pm 0.46 a
0.01	6.6 \pm 0.35 d	7.2 \pm 0.57 b
0.1	7.7 \pm 0.39 bc	7.5 \pm 0.94 b
1	6.8 \pm 0.19 cd	7.5 \pm 0.46 b
10	7.4 \pm 0.46 bcd	7.9 \pm 0.17 b
100	7.9 \pm 0.54 b	7.7 \pm 0.46 b

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

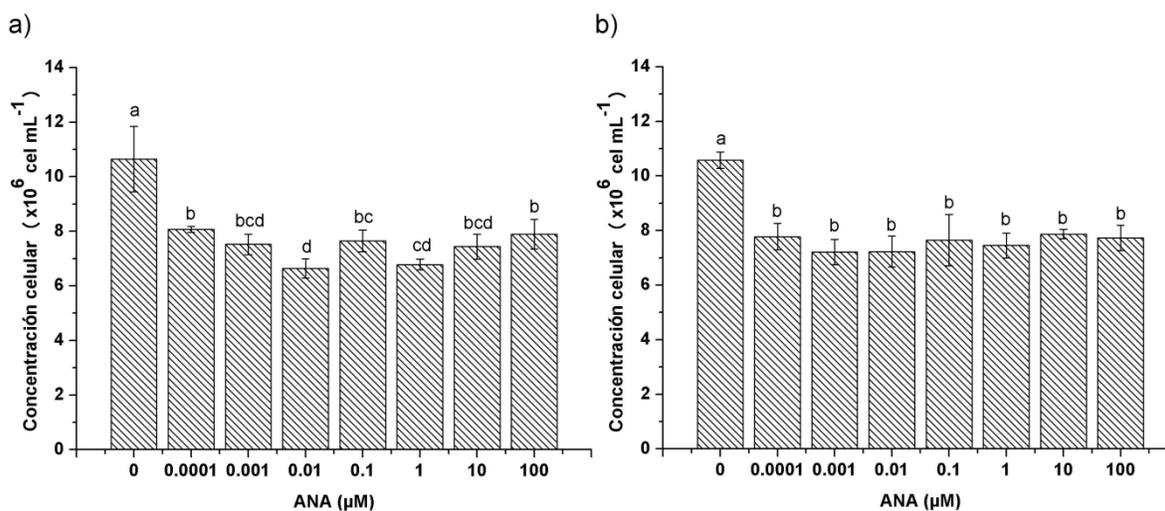


Figura 2.3 Efecto de diferentes concentraciones de ácido 1-naftalenacético (ANA) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ANA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas

en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En cuanto a la biomasa seca, bajo ninguna de las concentraciones de ANA evaluadas se presentaron diferencias significativas respecto al control (Cuadro 2.4 y Figura 2.4a). Este resultado fue corroborado en un segundo experimento en el que se mantuvo esta misma tendencia en cada concentración evaluada, así como para el control (Cuadro 2.4 y Figura 2.4b).

Cuadro 2.4 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ANA.

ANA (μM)	Biomasa seca *	
	(mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	34.17 \pm 1.37 ab	37.34 \pm 2.368 a
0.0001	37.26 \pm 2.95 a	36.73 \pm 4.36 a
0.001	33.6 \pm 1.54 ab	35.27 \pm 1.95 a
0.01	32.3 \pm 0.72 b	34.63 \pm 3.52 a
0.1	34.07 \pm 4.26 ab	38.47 \pm 0.46 a
1	33.47 \pm 4.13 ab	36.23 \pm 3.39 a
10	34.23 \pm 0.95 ab	35.90 \pm 3.93 a
100	35.67 \pm 0.96 ab	36.07 \pm 2.45 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

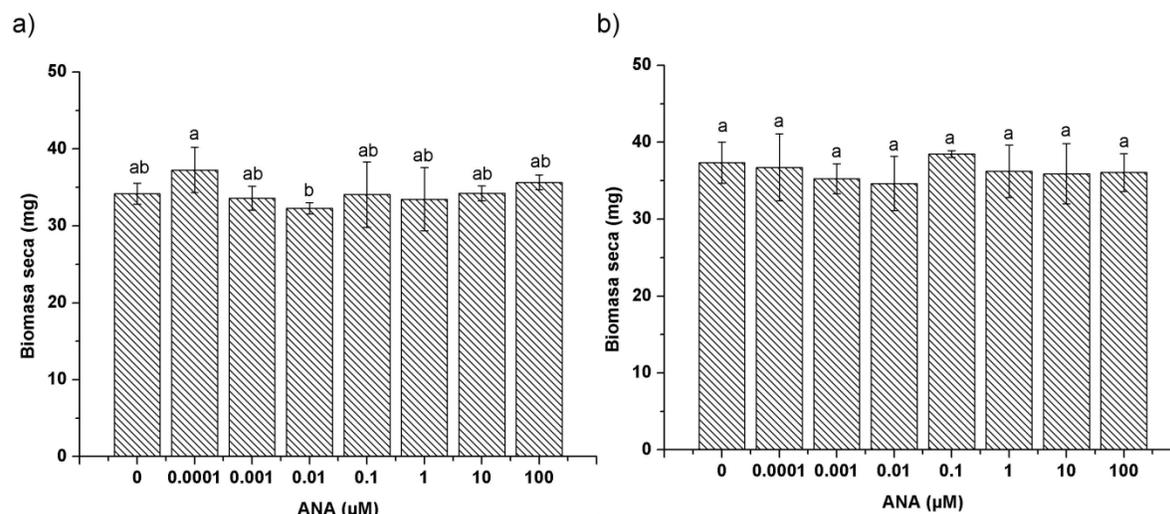


Figura 2.4 Efecto de diferentes concentraciones ácido 1-naftalenacético (ANA) sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ANA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

2.3.3 Efecto de BAP sobre el crecimiento de *C. saccharophila*

La concentración celular de *C. saccharophila* incrementó significativamente por 10 µM de BAP, mientras que con las demás concentraciones evaluadas no se observaron diferencias significativas comparadas con el control (Cuadro 2.5 y Figura 2.5a). Estos resultados fueron corroborados en el segundo experimento, evidenciando que la concentración celular incrementó significativamente por 10 µM de BAP, así como que las demás concentraciones evaluadas no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 2.5 y Figura 2.5b).

Cuadro 2.5 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de BAP.

BAP (μM)	Concentración celular *	
	($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	13.4 \pm 1.1 bc	13.4 \pm 1.1 ab
0.0001	12.7 \pm 0.31 bc	13.0 \pm 2.04 ab
0.001	14.1 \pm 0.37 ba	12.6 \pm 2.30 b
0.01	13.8 \pm 0.73 b	11.5 \pm 1.50 b
0.1	14.0 \pm 1.21 ab	13.0 \pm 0.97 ab
1	12.6 \pm 1.05 bc	11.6 \pm 1.93 b
10	15.8 \pm 1.3 a	15.7 \pm 1.45 a
100	11.8 \pm 1.9 c	11.8 \pm 1.9 b

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

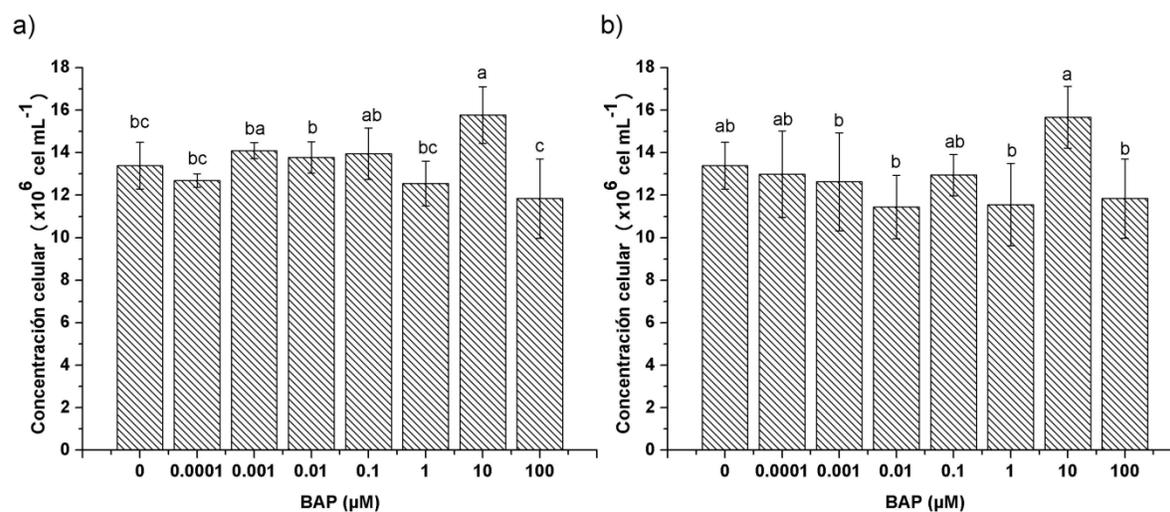


Figura 2.5 Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con BAP durante 10 días. Diferentes letras minúsculas

en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En la biomasa seca bajo ni una de las concentraciones evaluadas de BAP se presentaron diferencias significativas respecto al control (Cuadro 2.6 y Figura 2.6a). En el segundo experimento esta tendencia se confirmó, ni una de las concentraciones evaluadas de BAP presentó diferencias significativas respecto al control (Cuadro 2.6 y Figura 2.6b).

Cuadro 2.6 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de BAP.

BAP (μM)	Biomasa seca *	
	(mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	37.63 \pm 0.60 ab	37.90 \pm 4.67 a
0.0001	38.07 \pm 0.75 a	36.47 \pm 0.55 a
0.001	40.03 \pm 5.26 ab	36.47 \pm 1.12 a
0.01	35.77 \pm 0.35 b	35.2 \pm 1.44 ab
0.1	34.1 \pm 3.73 ab	33.93 \pm 2.46 a
1	37.63 \pm 1.62 ab	40.23 \pm 7.66 a
10	38.83 \pm 3.24 ab	39.43 \pm 4.11 a
100	35.27 \pm 5.45 ab	29.5 \pm 3.94 b

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

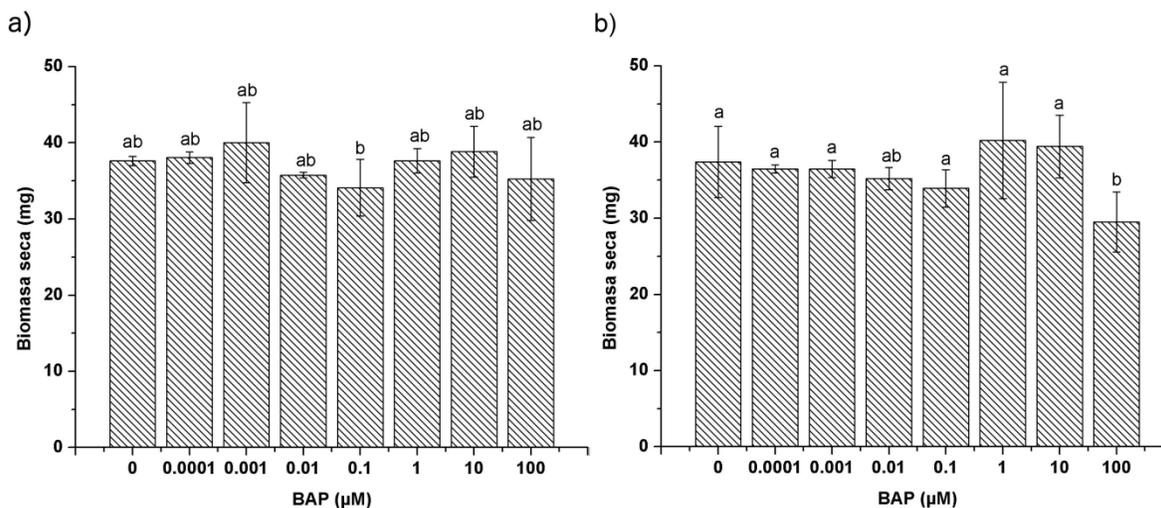


Figura 2.6 Efecto de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con BAP durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

2.3.4 Efecto de DPU sobre el crecimiento de *C. saccharophila*

La concentración celular de *C. saccharophila* disminuyó significativamente por 100 y 10 µM de DPU, mientras que para las otras concentraciones no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 2.7 y Figura 2.7a). En el segundo experimento, tres de las concentraciones evaluadas de DPU (0.0001, 0.001 y 0.01 µM) disminuyeron significativamente la concentración celular, sin embargo, el decremento más dramático se observó a 100 y 10 µM de DPU, mientras que a 0.1 y 1 µM de DPU no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 2.7 y Figura 2.7b).

Cuadro 2.7 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de DPU.

DPU (μM)	Concentración celular *	
	($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	11.3 \pm 1.18 ab	16.9 \pm 0.59 a
0.0001	9.5 \pm 1.28 ab	12.4 \pm 0.55 c
0.001	10.3 \pm 0.67 ab	13.4 \pm 0.93 bc
0.01	8.6 \pm 3.09 ac	14.4 \pm 1.08 bc
0.1	12.3 \pm 3.87 ab	15.2 \pm 2.61 ab
1	12.7 \pm 3.16 b	17.3 \pm 2.0 a
10	5.6 \pm 0.58 cd	6.57 \pm 0.28 d
100	4.3 \pm 0.74 d	6.59 \pm 0.12 d

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

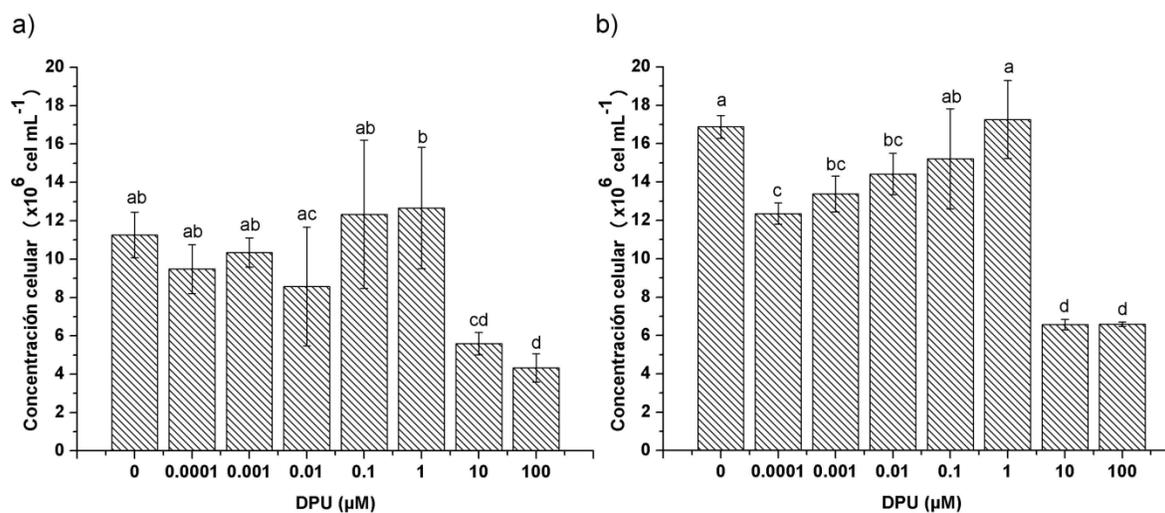


Figura 2.7 Efecto de diferentes concentraciones de difenilurea (DPU) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con DPU durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una

misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

La biomasa seca disminuyó significativamente en dos de las concentraciones evaluadas de DPU (10 y 100 μM), mientras que para las otras concentraciones evaluadas no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 2.8 y Figura 2.8a). En un segundo experimento, las concentraciones 0.001, 0.01 y 0.1 μM de DPU disminuyeron significativamente la biomasa seca, sin embargo, esta afectación no fue tan dramática como con las concentraciones 10 y 100 μM . Mientras que con 0.0001 y 1 μM no se observaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 2.8 y Figura 2.8b).

Cuadro 2.8 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de DPU.

DPU (μM)	Biomasa seca *	
	(mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	40.23 \pm 2.54 a	44.17 \pm 0.86 a
0.0001	36.83 \pm 2.82 a	37.77 \pm 6.40 a
0.001	34.77 \pm 1.12 a	33.8 \pm 3.97 b
0.01	34.77 \pm 7.57 a	35.37 \pm 2.72 b
0.1	37.63 \pm 4.07 a	36.57 \pm 0.46 b
1	39.9 \pm 3.40 a	39.23 \pm 6.03 bc
10	17.07 \pm 2.51 b	20.17 \pm 2.80 c
100	15.67 \pm 1.23 b	23.4 \pm 2.31 c

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

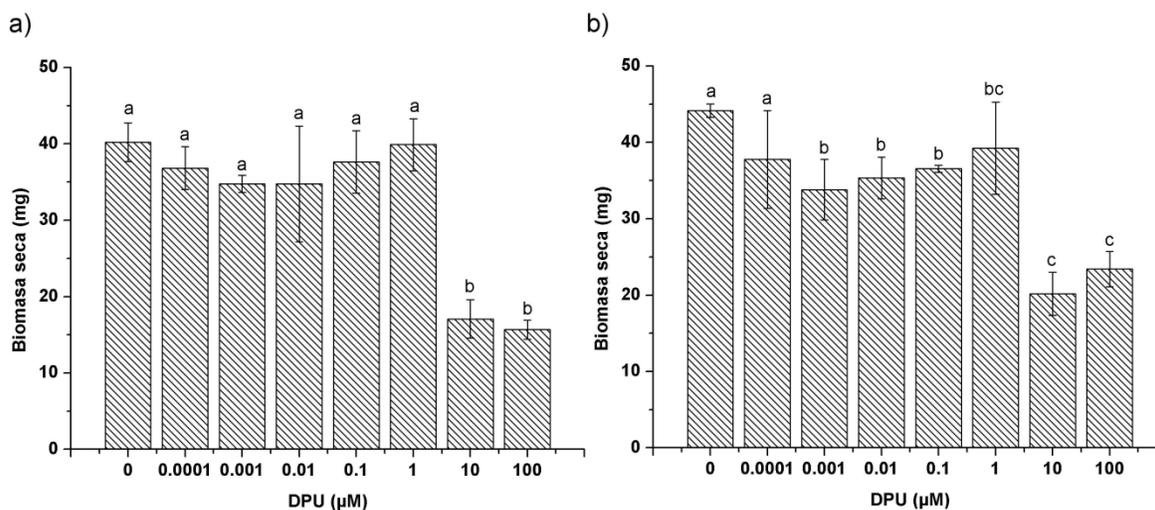


Figura 2.8 Efecto de diferentes concentraciones de difenilurea (DPU) sobre la biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con DPU durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

2.3.5 Efecto de TDZ sobre el crecimiento de *C. saccharophila*

La concentración celular de *C. saccharophila* presentó un incremento significativo por TDZ a 10 µM; también se observó que la concentración disminuyó significativamente a 100 µM, mientras que para las demás concentraciones evaluadas no se observaron diferencias significativas en comparación con el control (Cuadro 2.9 y Figura 2.9a). En el segundo experimento se observó esta misma tendencia, por una parte, la concentración celular disminuyó significativamente a 100 µM, y por otra incrementó significativamente a 10 µM, mientras que con las demás concentraciones no se observaron diferencias significativas en comparación con el control (Cuadro 2.9 y Figura 2.9b).

Cuadro 2.9 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de TDZ.

TDZ (μM)	Concentración celular *	
	($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	11.4 \pm 1.6 bc	11.6 \pm 1.5 b
0.0001	9.5 \pm 0.97 b	11.1 \pm 1.8 b
0.001	10.6 \pm 0.742 bc	11.6 \pm 2.4 b
0.01	10.6 \pm 1.2 bc	8.9 \pm 2.0 bc
0.1	12.4 \pm 0.60 bc	10.7 \pm 1.7 b
1	12.7 \pm 3.16 b	11.8 \pm 1.7 b
10	16.4 \pm 1.4 a	16.2 \pm 0.52 a
100	7.0 \pm 0.68 d	6.6 \pm 0.55 c

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

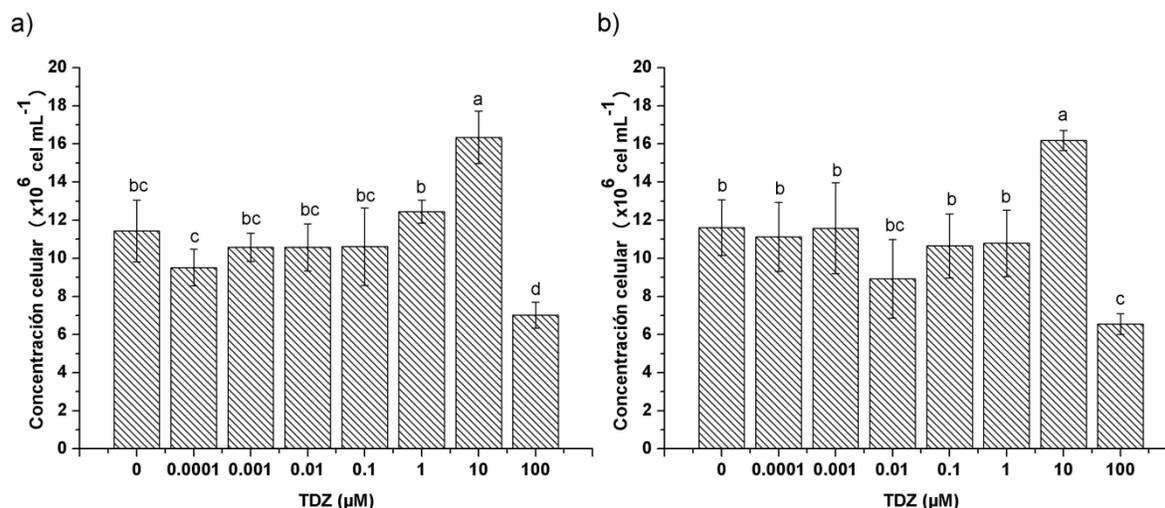


Figura 2.9 Efecto de diferentes concentraciones de thidiazurón (TDZ) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica. Las células se incubaron en TAP suplementado con TDZ durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En cuanto a la biomasa seca ni una de las concentraciones evaluadas de TDZ presentaron diferencias significativas respecto al control (Cuadro 2.10 y Figura 2.10a). En el segundo experimento esta tendencia se confirmó (Cuadro 2.10 y Figura 2.10b).

Cuadro 2.10 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de TDZ.

TDZ (μM)	Biomasa seca *	
	(mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	39.67 \pm 6.18 a	44.17 \pm 0.86 a
0.0001	40.63 \pm 10.20 ab	35.2 \pm 1.21 abc
0.001	48.67 \pm 2.50 a	32.87 \pm 4.39 abc
0.01	44.03 \pm 4.46 ab	35.13 \pm 1.09 abc
0.1	46.13 \pm 3.29 ab	30.4 \pm 4.27 c
1	41.1 \pm 10.85 ab	35.33 \pm 4.71 abc
10	51.37 \pm 10.76 a	35.8 \pm 1.54 ab
100	33.43 \pm 4.55 b	30.96 \pm 0.60 bc

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

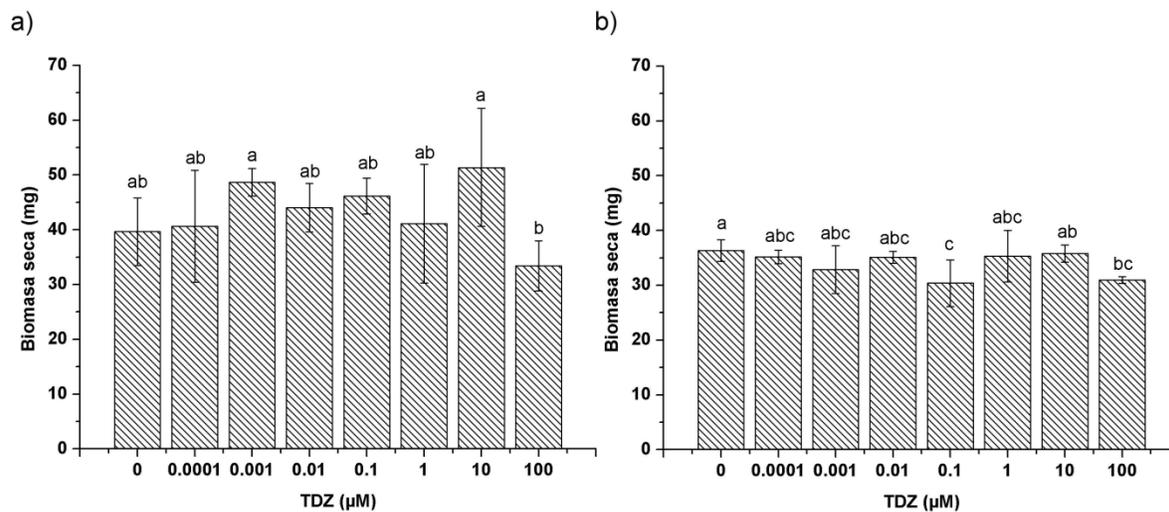


Figura 2.10 Efecto de diferentes concentraciones de thiazurón (TDZ) sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con TDZ durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

2.4 Discusión

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto que la adición de los reguladores de crecimiento AIA, ANA, BAP, DPU y TDZ tiene sobre la acumulación de biomasa de *C. saccharophila*, para lo cual se evaluaron siete concentraciones de estos reguladores de crecimiento (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM) adicionadas al inicio del cultivo.

Con respecto a las auxinas, se encontró que todas las concentraciones evaluadas de AIA y ANA disminuyeron significativamente la concentración celular, pero no el contenido de biomasa seca, donde no se encontraron diferencias significativas con respecto a su control. Este resultado indica que las concentraciones ensayadas para las auxinas afectaron el ciclo de división celular de forma negativa. Aunque para plantas, donde han sido ampliamente estudiadas, se indica que bajo ciertas condiciones de crecimiento podrían afectar el ciclo celular de una manera indirecta, ya que activan a SCF (Complejo Skp1 p-cullin-F-box) y APC (Complejo Promotor de Anafase), lo cual resulta en el aumento de la degradación de proteínas inhibitoras como KRPs o E2Fc (Factor de transcripción) y como consecuencia se promueve el ciclo de división celular, todo dependiendo de la cantidad de auxina, así como de las condiciones ambientales presentes (Hartig y Beck, 2006). Sin embargo, el resultado obtenido en este trabajo era esperado, ya que la actividad fisiológica básica de las auxinas, las involucra en la inducción del crecimiento de elongación, diferenciación de elementos del floema, dominancia apical, tropismos, es decir, crecimiento de la célula más que aumento en el número de células (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). Por otra parte, a pesar de que había una menor cantidad de células, es decir, las auxinas no promovieron el ciclo de división celular, las células obtenidas eran más pesadas, probablemente porque acumularon una mayor cantidad de metabolitos, y es por esta razón que la acumulación de biomasa seca resultó ser igual que la observada para el control.

La adición de concentraciones similares de estas auxinas en el medio de cultivo ha sido evaluada. Por ejemplo, para la adición de AIA en la microalga *C. reinhardtii* se encontró que había un incremento de la biomasa medido como densidad celular g/L , además de

que se producía el incremento de la clorofila y almidón (Park *et al.*, 2013), sin embargo, el número de células no fue determinado. Mientras que para la adición de ANA en *Chlorella sorokiniana* se ha reportado el incremento de la productividad de la biomasa medido en g/L d¹, al igual que el aumento de la clorofila, y de nuevo el número de células no fue determinado (Hunt *et al.*, 2010). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron el incremento de la biomasa seca en comparación con el control, tal como otros autores han reportado. Pero tampoco podemos decir que afectaron negativamente la acumulación de biomasa, ya que los resultados indican que a pesar de tener mucho menos células, la aplicación de las auxinas ayudó a acumular la misma cantidad de biomasa seca que el presentado por el control. Lo que puede estar pasando son dos cosas, por un lado en ninguno de los estudios reportados se ha empleado a *C. saccharophila*, lo cual podría indicar que dependiendo de la microalga es el efecto causado por el regulador de crecimiento, y por otro lado, que hay que hallar la concentración óptima de esta auxinas para *C. saccharophila*, ya que como lo mencionan Czerpak *et al.* (1994) en su estudio con *C. perenoydosa* existe una concentración óptima de AIA y ANA (0.00005 µM) en esta microalga, en la que son observados efectos positivos.

En lo que respecta a las citocininas, se encontró que tanto BAP como TDZ a 10 µM incrementaron la concentración celular en *C. saccharophila*, mientras que las otras concentraciones evaluadas no presentaron diferencias significativas con respecto al control. Por otro lado, no se presentó diferencias significativas en el contenido de biomasa seca con respecto a su control, incluso a 10 µM, donde se observó un incremento del número de células, y por tanto se podría pensar que habría un incremento en la acumulación de biomasa seca. Lo anterior quizá puede deberse a que como a esta concentración se promovió la división celular, las células a pesar de ser más en número acumularon una menor cantidad de metabolitos, ya que la división celular está muy activa. Cabe recordar que la actividad fisiológica básica para las citocininas en plantas es precisamente promover la división celular (Stals y Inzé, 2001). Por lo tanto, lo observado para la concentración de 10 µM tiene sentido. Por otra parte, el hecho de que para las otras concentraciones no se hayan encontrado diferencias significativas con respecto al

control, puede deberse a que 10 μM es la concentración óptima a la que estas dos citocininas ejercen su acción en *C. saccharophila*, mientras que las otras concentraciones evaluadas no ejercieron efecto alguno en *C. saccharophila*. En lo que respecta a la citocinina DPU, la concentración celular fue negativamente afectada a 10 y 100 μM , pero para las otras concentraciones no se observaron diferencias significativas con el control. Esta misma tendencia se observó para la biomasa seca, a 10 y 100 μM fue afectada negativamente, y para las otras concentraciones evaluadas no se observaron cambios con respecto al control. Este resultado nos indica que no es conveniente utilizar concentraciones por arriba de 10 μM de DPU con *C. saccharophila*.

Tomando en cuenta todos estos resultados, podemos decir que para el objetivo de incrementar la acumulación celular de *C. saccharophila* la concentración de 10 μM de BAP o TDZ es la mejor. Pero si se quiere incrementar la acumulación de biomasa seca en *C. saccharophila*, las auxinas parecen ser una alternativa, sin embargo, será necesario seguir evaluando concentraciones más bajas que las evaluadas en este trabajo, con el objetivo de encontrar la concentración adecuada para este propósito. Por otra parte, se requiere investigar más acerca del papel que juegan las auxinas, citocininas y en general los reguladores de crecimiento en *C. saccharophila*, y en general en las microalgas, ya que hasta ahora la mayor parte del conocimiento que se tiene es obtenido de lo que se ha observado para plantas superiores, donde estos reguladores han sido ampliamente estudiados, pero la actividad fisiológica que tienen en plantas no necesariamente es la misma para las microalgas.

CAPÍTULO III. EFECTO DE ABA SOBRE EL CRECIMIENTO, LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS Y TAG EN *CHLORELLA SACCHAROPHILA*

El contenido total de este capítulo se publicó en la revista Algae:

Patricia Yolanda Contreras-Pool¹, Santy Peraza-Echeverria¹, Ángela Francisca Ku-González², Virginia Aurora Herrera-Valencia^{1*} (2016) The phytohormone abscisic acid increases triacylglycerol content in the green microalga *Chlorella saccharophila* (Chlorophyta). *Algae* 31(3):267-276 <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.9.3>

Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo C.P. 97200 Mérida, Yucatán, México. ¹

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo C.P. 97200 Mérida, Yucatán, México. ²

*Corresponding author

3.1 Introducción

Las microalgas verdes son consideradas como una fuente atractiva y prometedora para la producción de triacilglicéridos (TAG), materia prima para la producción de biodiésel. Sin embargo, la obtención de una mayor acumulación de TAG sin afectar negativamente el rendimiento de biomasa se presenta como uno de los grandes retos por superar para que el uso de las microalgas como una fuente de TAG en la producción de biocombustibles sea económicamente viable.

En este sentido el cultivo de microalgas en condiciones de deficiencia de nitrógeno es considerada la mejor estrategia para incrementar el contenido de TAG de las células (Rawat *et al.*, 2013), pero este incremento de lípidos va acompañado de la disminución de biomasa. Con el objetivo de minimizar este decremento en la biomasa, se ha propuesto una estrategia donde se incluye el uso de deficiencia de nitrógeno, pero empleando un sistema de cultivo en dos etapas. Una primera etapa para acumular biomasa, donde las células son cultivadas en un medio completo, es decir, sin ninguna deficiencia de nutrientes, hasta alcanzar su fase exponencial. Posteriormente, una segunda etapa para la acumulación de TAG, para lo cual las células son transferidas a un medio deficiente de nitrógeno. Esta estrategia es considerada de las más exitosas hasta la fecha (Herrera-Valencia *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2010; Rodolfi *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014).

Actualmente otra estrategia contempla el uso de fitohormonas; en microalgas se ha observado que la aplicación exógena de ABA mejora la tolerancia a estrés por deshidratación, estrés oxidativo y por salinidad, así como a estrés por deficiencia de nitrógeno (Lu y Xu, 2015). Además, estudios recientes, realizados con la microalga modelo *C. reinhardtii* demostraron por un lado que la adición de ABA (0.37, 3.78, 11.34, 18.92 y 37.83 μM) desde el inicio del cultivo incrementaba el rendimiento de FAMEs, que es una forma indirecta de medir el contenido de TAG presente en las células, y por otro lado que el cultivo en un medio limitado de nitrógeno pero suplementado con ABA (37.38 μM) durante la fase lag de crecimiento, empleando un sistema de cultivo de una sola

etapa, incrementaba el rendimiento de FAMEs, pero la acumulación de biomasa era negativamente afectada.

Por lo tanto, en este capítulo se evaluó el efecto de la aplicación exógena de ABA sobre la concentración celular, contenido de lípidos y TAG en *C. saccharophila* empleando un sistema de cultivo de una sola etapa. Además, se evaluó el efecto de la aplicación exógena de ABA en combinación con deficiencia de nitrógeno sobre la concentración celular, contenido de lípidos y TAG en *C. saccharophila* utilizando un sistema de cultivo en dos etapas.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Cepas de microalga y condiciones de cultivo

La cepa silvestre de *Chlorella saccharophila* (UADY-PRIORI-014-FMVZ-04) se mantuvo en medio Tris-acetato-fosfato (TAP, por sus siglas en inglés) (Harris, 1989) en condiciones axénicas, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ en fotoperiodo 16/8 (luz/obscuridad) a una intensidad lumínica de $90\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ y en agitación a 140 rpm.

3.2.2 Medio de cultivo y fitohormona

En este trabajo se utilizaron dos medios de cultivo: medio TAP que contiene 104.8 mg L^{-1} de nitrógeno, y el medio TAP deficiente de NH_4Cl como fuente de nitrógeno (TAP-N), que contiene sólo 0.679 mg L^{-1} de nitrógeno proveniente del $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ contenido en los metales traza.

Para prepara la disolución patrón, 26.4 mg de ABA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se resuspendieron en 1 mL de una disolución 1 M de KOH, y se llevó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

3.2.3 Estrategia experimental

Para evaluar el efecto de ABA en el número de células, el peso seco de la biomasa, los lípidos y la acumulación de TAG de *C. saccharophila*, se utilizó una estrategia de cultivo de una sola etapa, en la cual se inocularon células ($10,000 \text{ células mL}^{-1}$), provenientes de la fase exponencial de crecimiento, en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo TAP el cual fue suplementado con 1, 4, 10 o 20 μM de ABA, mientras que a las células control se les adicionó agua destilada en la misma proporción. Los cultivos se dejaron crecer durante 10 días y se colectaron por centrifugación a 3,200 *g* por 5 min para su posterior análisis.

Posteriormente, se evaluó el efecto de ABA en combinación con deficiencia de nitrógeno utilizando una estrategia de cultivo en dos etapas. Para lo anterior, se inocularon células ($10,000 \text{ células mL}^{-1}$), provenientes de la fase exponencial de crecimiento, en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo TAP, después de 10 días las células fueron colectadas por centrifugación a 3,200 *g* por 5 min, la biomasa se transfirió a medio TAP fresco con el tratamiento experimental apropiado, las células se dejaron crecer durante 7 días y se colectaron por centrifugación para su posterior análisis. Se evaluaron tres tratamientos experimentales: (1) ABA, medio TAP suplementado con 1 μM de ABA, (2) DN, medio TAP-N y (3) DN+ABA, medio TAP-N suplementado con 1 μM de ABA. Se utilizó medio TAP fresco como control.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y cada experimento se llevó a cabo dos veces. Se realizó una prueba estadística ANOVA de una vía, y se utilizó la prueba LSD de Fisher, para determinar las diferencias significativas entre las medias de entre el 5% de nivel de significación, utilizando el programa Statgraphics Plus 4.1.

3.2.4 Evaluación del crecimiento

La concentración celular fue determinada al final de los experimentos, utilizando un hematocitómetro Neubauer y un microscopio Carl Zeiss Primo Star. Las células fueron colectadas por centrifugación a 3,200 *g* por 5 min y secadas usando una liofilizadora por 48 h. La biomasa obtenida fue pesada y se consideró como el peso seco. La biomasa seca se mantuvo en un desecador a temperatura ambiente hasta su análisis de lípidos y TAG.

3.2.5 Contenido de lípidos y TAG

Los lípidos fueron extraídos de la biomasa seca de microalgas empleando un procedimiento de extracción en seco con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v) de acuerdo a Widjaja *et al.* (2009). La mezcla de disolventes se separó de la biomasa y se dejó evaporar para obtener el extracto de lípidos. El procedimiento se repitió dos veces con el fin de lograr la extracción completa de los lípidos. Se determinó el contenido de TAG en los lípidos totales extraíbles como está descrito anteriormente por Arias-Forero *et al.* (2013), utilizando Triglicéridos liquicolor GPO-PAP (Stanbio Laboratory, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Arias-Forero *et al.*, 2013).

3.2.5.1 Análisis de microscopía confocal de células vivas

Las células se tiñeron con Rojo Nilo (1 mg/mL de concentración final; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (Cakmak *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2009). Las imágenes fueron adquiridas mediante un microscopio láser confocal de barrido (Olympus) LSCM FV 1000 y aceite de inmersión PLAN UPLFLN 40. Lente del objetivo con una apertura numérica de 1.30. La señal de Rojo de Nilo fue capturada con una línea de excitación del láser a 488 nm, y la emisión se recogió a 510 nm. La fluorescencia de la clorofila fue capturada utilizando una línea de excitación del láser a 633 nm, y se recogió la emisión a 650 nm. Las imágenes se fusionaron utilizando FV 10 ASW software de visualización 4.1 CLSM Olympus.

3.3 Resultados

3.3.1 Efecto de ABA sobre el crecimiento de *C. saccharophila*

La concentración celular fue positivamente afectada por ABA en todas las concentraciones evaluadas en comparación con el control (Cuadro 3.1 y Figura 3.1a). Esta misma tendencia se observó en un segundo experimento, para todas las concentraciones evaluadas (Cuadro 3.1 y Figura 3.1b).

Cuadro 3.1 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

ABA (μM)	Concentración celular *	
	($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	10.8 \pm 0.85 b	11.9 \pm 0.55 b
1	12.6 \pm 0.75 a	14.1 \pm 1.2 a
4	13.4 \pm 1.0 a	14.4 \pm 1.3 a
10	13.0 \pm 0.74 a	14.9 \pm 1.3 a
20	12.4 \pm 0.70 a	15.1 \pm 0.13 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

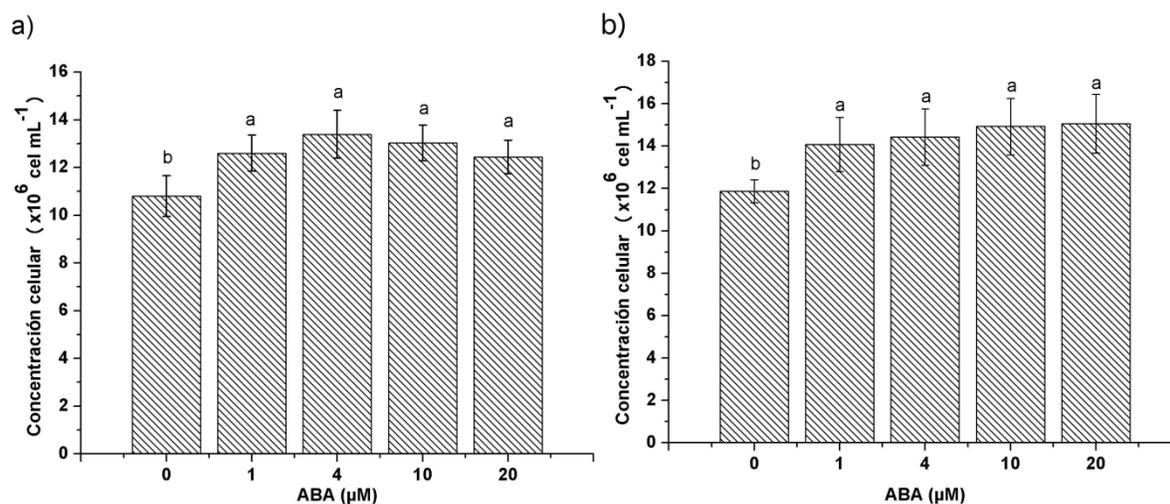


Figura 3.1 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre la concentración celular de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ABA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En cuanto a la biomasa seca todos los tratamientos evaluados de ABA no presentaron diferencias significativas respecto al control (Cuadro 3.2 y Figura 3.2a). Este resultado, fue corroborado en un segundo experimento en el que se mantuvo esta misma tendencia en cada concentración probada (Cuadro 3.2 y figura 3.2b).

Cuadro 3.2 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

ABA (μM)	Biomasa seca *	
	(mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	36.57 \pm 1.17 a	39 \pm 1.08 a
1	35.37 \pm 1.60 a	38.77 \pm 1.10 a
4	36.33 \pm 1.32 a	40.60 \pm 1.73 a
10	35.50 \pm 2.95 a	37.27 \pm 2.21 a
20	36.93 \pm 2.5 a	39.83 \pm 1.81 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

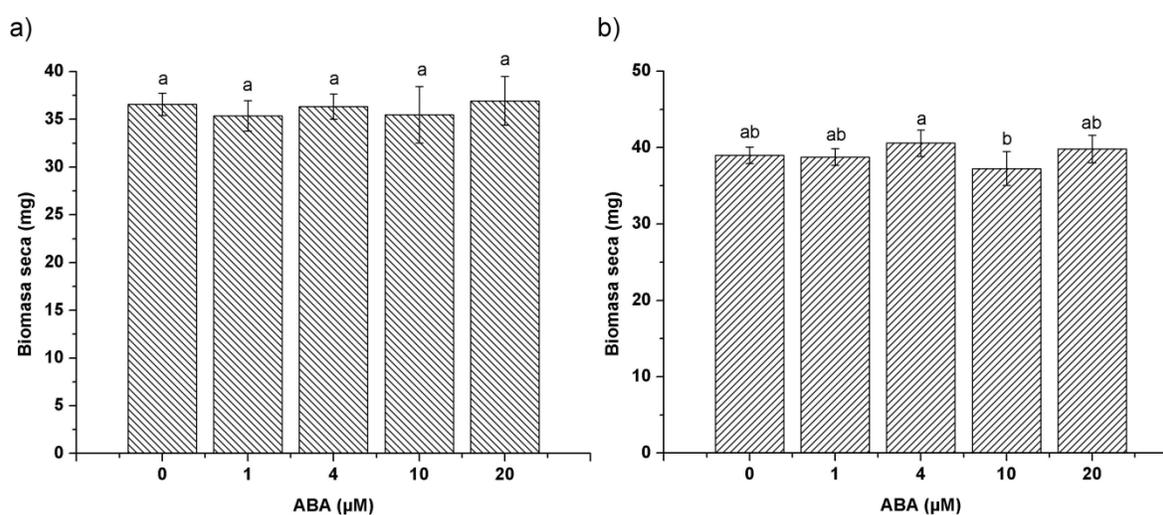


Figura 3.2 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ABA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

3.3.2 Efecto de ABA sobre el contenido lipídico y acumulación de TAG de *C. saccharophila*

El extracto lipídico obtenido a las concentraciones de 1, 4 y 10 μM de ABA no presentó diferencias significativas con respecto al control, mientras que a 20 μM de ABA se observó un incremento (Cuadro 3.3 y Figura 3.3a). En un segundo experimento ninguna de las concentraciones evaluadas de ABA presentaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 3.3 y Figura 3.3b). El hecho de que en el primer experimento con 20 μM de ABA se haya obtenido un incremento del extracto lipídico, pudo deberse a cuestiones de manipulación de la muestra, es decir, que no se haya retirado correctamente toda la biomasa o a que el disolvente no se había evaporado del todo cuando se llevó a cabo la medición (Cuadro 3.3 y Figura 3.3a), ya que en el segundo experimento se comprobó la tendencia de que no hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el control (Cuadro 3.3 y Figura 3.3b).

Cuadro 3.3 Variación del extracto lipídico obtenido de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

ABA (μM)	Extracto lipídico* (mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	20.03 \pm 3.77 b	39 \pm 1.08 a
1	20.63 \pm 3.25 ab	38.77 \pm 1.10 a
4	21.77 \pm 1.81 ab	40.60 \pm 1.73 a
10	21.33 \pm 2.86 ab	37.27 \pm 2.21 a
20	25.47 \pm 1.10 a	39.83 \pm 1.81 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

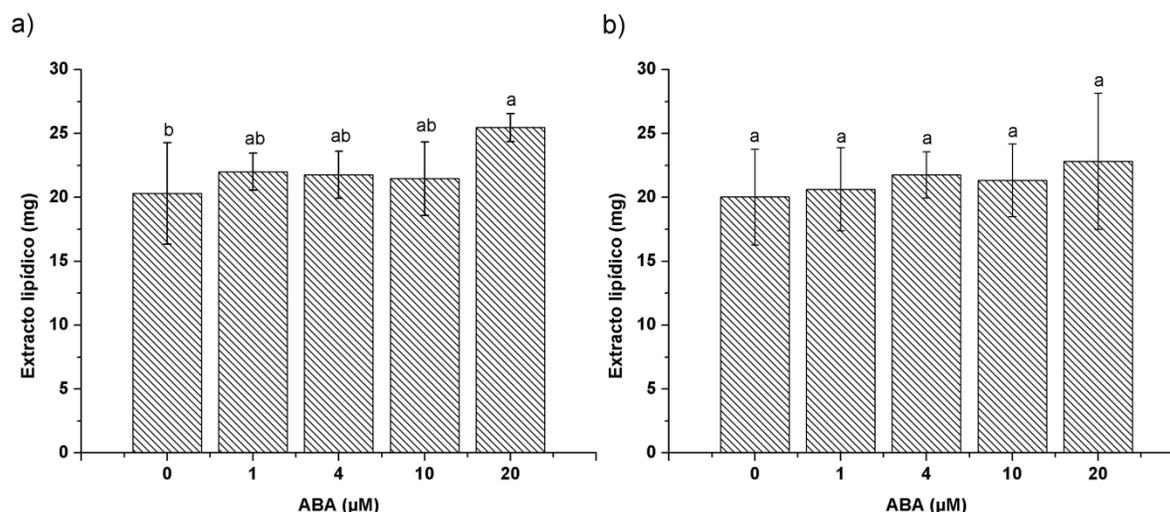


Figura 3.3 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre extracto lipídico de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ABA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

El contenido lipídico como porcentaje de la biomasa seca también fue calculado, y no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos evaluado de ABA (Cuadro 3.4 y Figura 3.4a). Estos resultados fueron corroborados en un segundo experimento donde se observó esta misma (Cuadro 3.4 y Figura 3.4b).

Cuadro 3.4 Variación del contenido lipídico como porcentaje de biomasa seca obtenido de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

ABA (μM)	Contenido lipídico* (% de biomasa seca)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	51.23 ± 8.28 a	55.59 ± 11.37 a
1	53.29 ± 8.94 a	62.37 ± 6.45 a
4	53.56 ± 2.24 a	60.06 ± 7.09 a
10	57.64 ± 10.70 a	61.13 ± 12.66 a
20	69.28 ± 7.35 a	57.74 ± 15.57 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

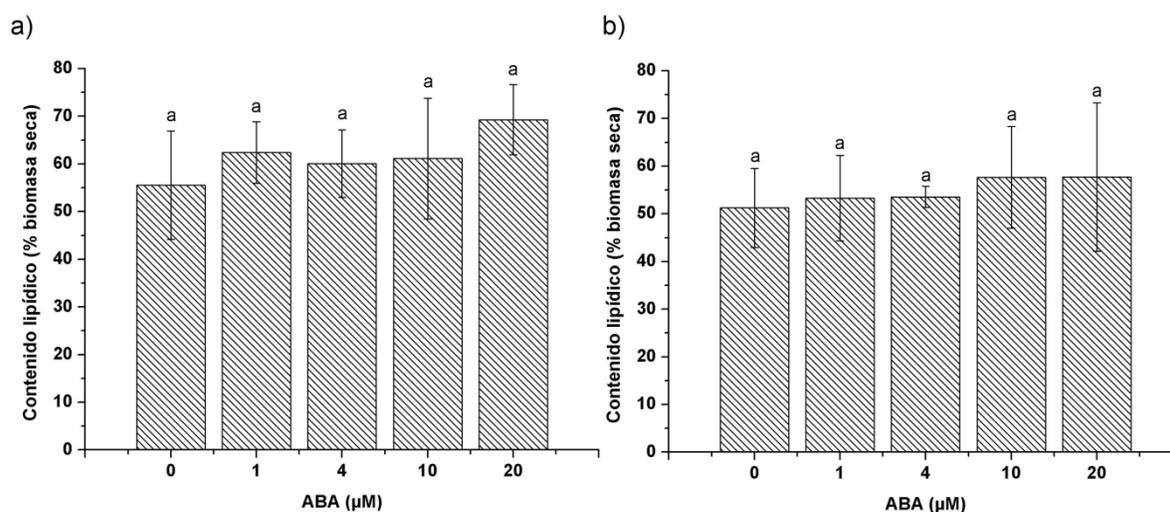


Figura 3.4 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido lipídico como porcentaje de la biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ABA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En cuanto a la acumulación de TAG en *C. saccharophila*, se observó un aumento significativo a todas las concentraciones evaluadas de ABA en comparación con el control (Cuadro 3.5 y Figura 3.5a). Estos resultados fueron corroborados en un segundo experimento, en donde se mantuvo esta misma tendencia para todas las concentraciones de ABA, así como para el control.

Cuadro 3.5 Variación de la acumulación de TAG en *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

ABA (μM)	TAG* (mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	6.48 \pm 2.49 b	7.39 \pm 0.07 b
1	15.54 \pm 3.26 a	18.67 \pm 3.83 a
4	18.99 \pm 3.33 a	20.04 \pm 1.81 a
10	14.81 \pm 3.92 a	19.20 \pm 3.17 a
20	17.25 \pm 2.54a	19.90 \pm 4.72 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

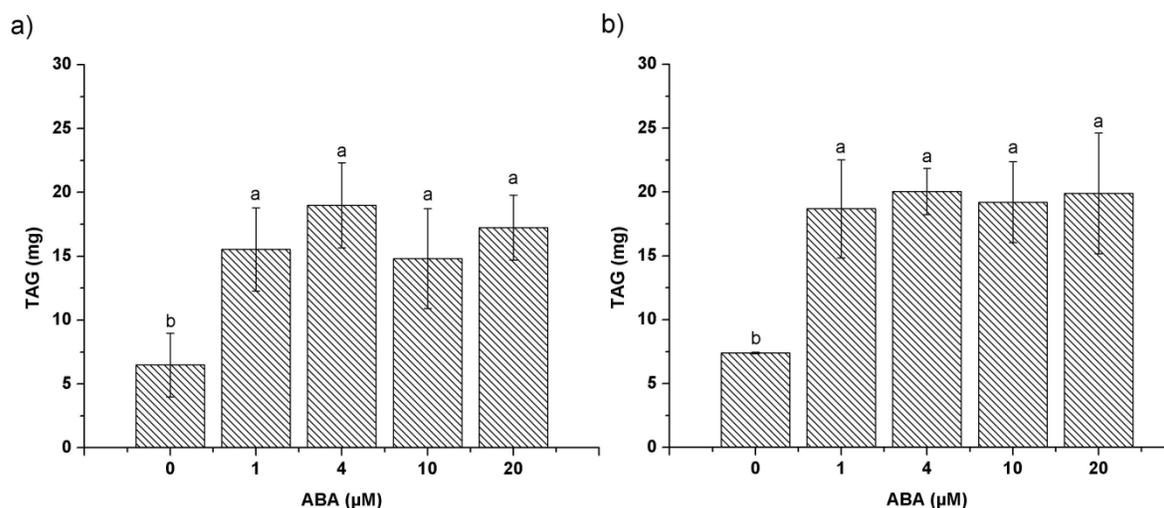


Figura 3.5 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido de TAG de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ABA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

Cuando se calculó el contenido de TAG como porcentaje de biomasa seca se encontró que ninguna de las concentraciones evaluadas de ABA presentó diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 3.6 y Figura 3.6a). Estos resultados fueron corroborados en un segundo experimento en que se observó esta misma tendencia (Cuadro 3.6 y Figura 3.6b).

Cuadro 3.6 Variación del contenido de TAG como porcentaje de la biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

ABA (μM)	Contenido de TAG* (% de biomasa seca)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	17.70 \pm 6.69 b	18.96 \pm 0.64 b
1	44.27 \pm 11.23 a	48.27 \pm 10.29 a
4	52.51 \pm 11.02 a	49.31 \pm 3.18 a
10	42.56 \pm 15.18 a	51.95 \pm 11.27 a
20	46.53 \pm 3.59 a	50.33 \pm 13.63 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

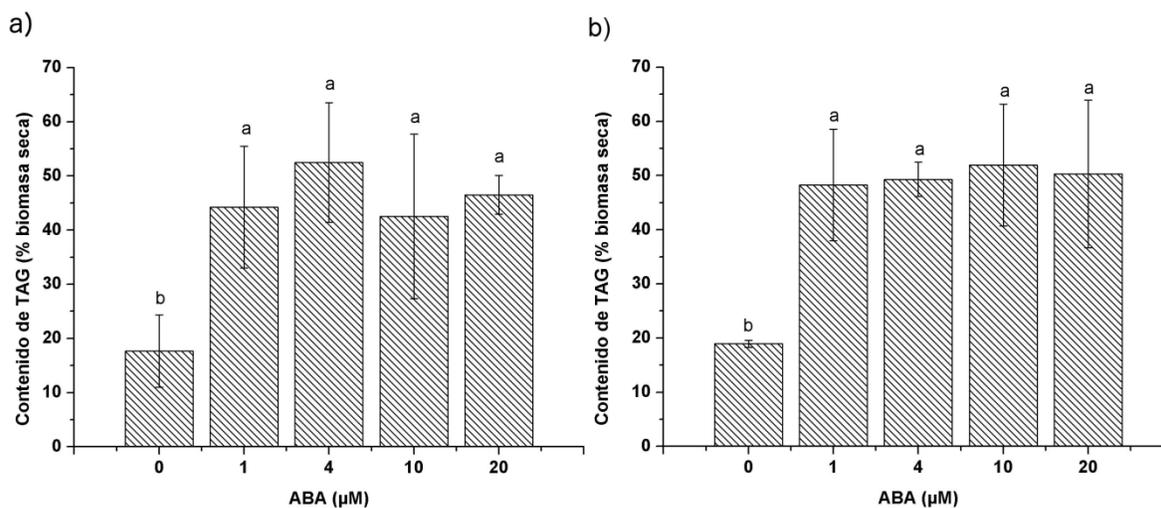


Figura 3.6 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido de TAG como porcentaje de biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ABA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

También se calculó el contenido de TAG como porcentaje de extracto lipídico, y no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas de ABA y el control (Cuadro 3.7 y Figura 3.7a). Esta misma tendencia se mantuvo en un segundo experimento para todas las concentraciones de ABA evaluadas, así como para el control (Cuadro 3.7 y Figura 3.7b).

Cuadro 3.7 Variación del contenido de TAG como porcentaje del extracto lipídico de *C. saccharophila* en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

ABA (μM)	Contenido de TAG* (% de biomasa seca)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
0	34.16 ± 17.05 b	37.75 ± 6.82 b
1	70.36 ± 11.65 a	90.13 ± 4.85 a

4	86.82 ± 7.68 a	92.06 ± 4.013 a
10	68.65 ± 12.23 a	89.74 ± 13.06 a
20	68.05 ± 12.59 a	87.11 ± 1.39 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

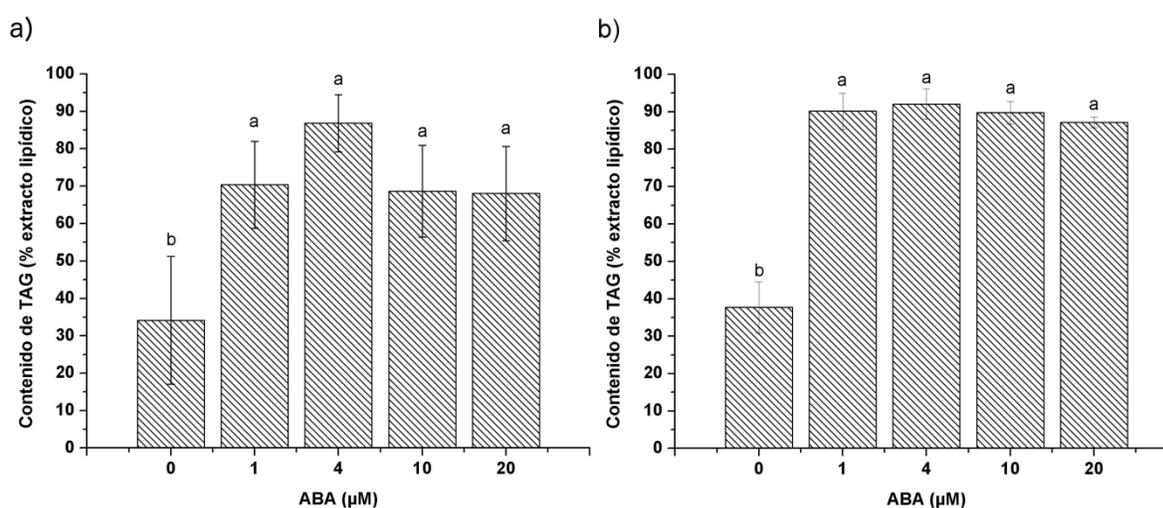
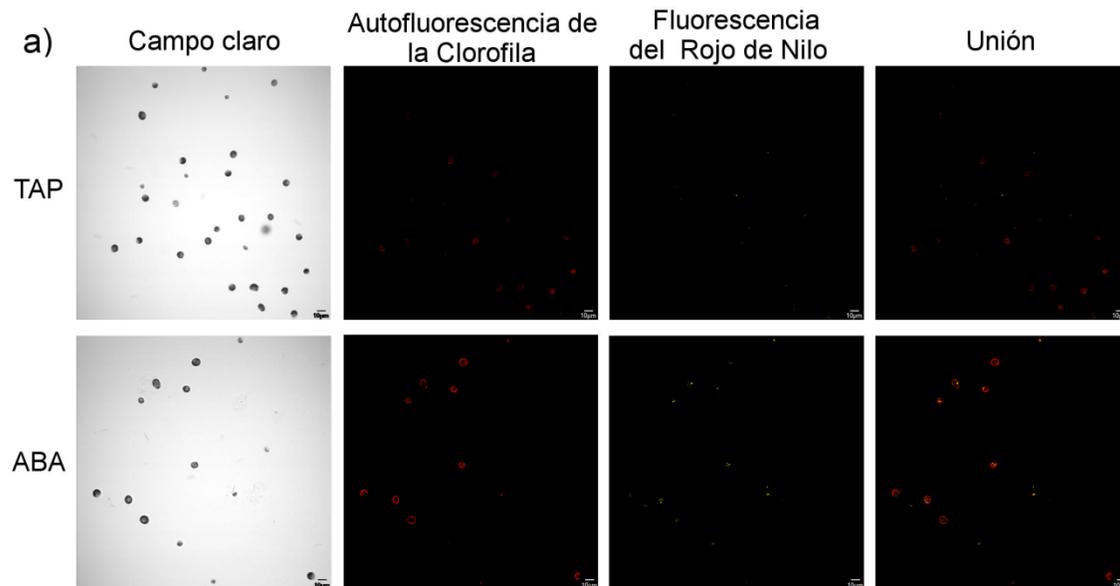


Figura 3.7 Efecto de diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) sobre el contenido de TAG como porcentaje del extracto lipídico de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP suplementado con ABA durante 10 días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados de ABA, se eligió la menor concentración de ABA (1 μM) para el análisis de microscopía confocal. Células vivas de *C. saccharophila* se tiñeron con rojo de Nilo, un reactivo que produce fluorescencia de color amarillo brillante en un entorno de lípidos neutros (Cooksey et al., 1987; Greenspan et al., 1985). El análisis confocal en la Figura 3.8a muestra la presencia de color amarillo brillante, producida por la interacción de rojo de Nilo con lípidos neutros de *C. saccharophila*. Mientras que en la Figura 3.8b se muestra

una magnificación a 6× de una de las secciones analizadas, donde de igual forma se aprecia la presencia de color amarillo brillante, producida por la interacción de rojo de Nilo con lípidos neutros. El análisis confocal nos permitió visualizar los lípidos neutros contenidos en las células de *C. saccharophila* así como detectar cualitativamente un aumento en estos lípidos en el cultivo tratados con 1 μM de ABA en comparación con el control sin ABA.



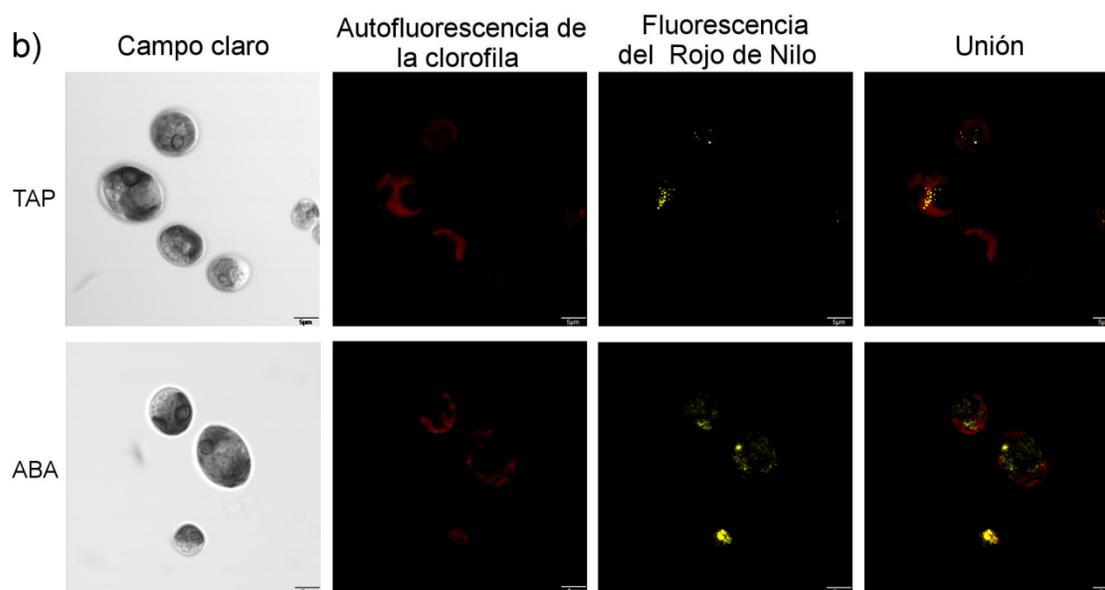


Figura 3.8 Microscopía confocal de *C. saccharophila*. TAP = células incubadas en TAP por 10 días, ABA = células incubadas en TAP suplementado con 1 μM de ABA por 10 días. a) Vista a 1 \times , b) Magnificación a 6 \times de una sección analizada.

3.3.3 Efecto de la combinación de ABA con deficiencia de nitrógeno sobre el crecimiento de *C. saccharophila*

La concentración celular de *C. saccharophila* fue afectada positivamente por el tratamiento DN+ABA, mientras que con el tratamiento de ABA no se observaron diferencias significativas en comparación con el control (TAP), y el tratamiento de DN causó una disminución significativa en la concentración celular (Cuadro 3.8 y Figura 3.9a). Esta misma tendencia se observó en un segundo experimento (Cuadro 3.8 y Figura 3.9b).

Cuadro 3.8 Variación de la concentración celular de *C. saccharophila* en respuesta a la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno.

ABA (μM)	Concentración celular *	
	($\times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
TAP	11.46 \pm 0.41 b	13.31 \pm 0.51 b
ABA	12.06 \pm 0.88 ab	14.09 \pm 0.25 ab
DN	9.82 \pm 0.38 c	10.78 \pm 0.97 c
DN + ABA	12.8 \pm 0.69 a	15.13 \pm 0.78 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

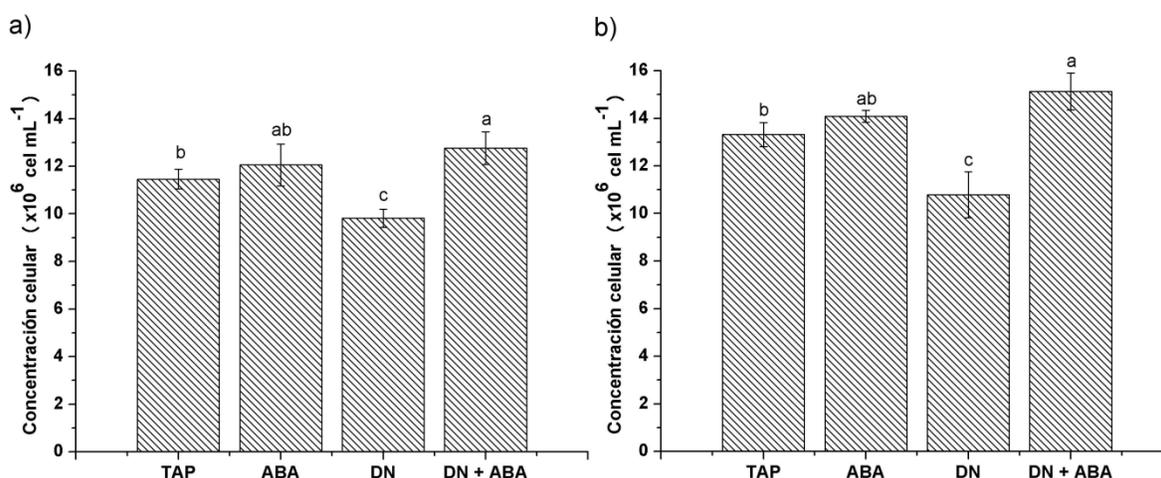


Figura 3.9 Efecto de la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno sobre la concentración celular de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μM por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μM por siete días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En cuanto a la biomasa seca, los tratamientos con ABA, DN y DN+ABA no presentaron diferencias significativas con respecto al control (Cuadro 3.9 y Figura 3.10a). Resultados similares se obtuvieron en un segundo experimento y de nuevo los tratamientos con ABA, DN y DN+ABA no presentaron diferencias significativas en comparación con el control (Cuadro 3.9 y Figura 3.9b)

Cuadro 3.9 Variación de la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno.

ABA (μM)	Biomasa seca*	
	(mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
TAP	72.6 \pm 0.3 ab	76.07 \pm 4.50 ab
ABA	69.67 \pm 1.55 b	69.40 \pm 1.95 b
DN	75.2 \pm 4.2 a	79.2 \pm 5.02 a
DN + ABA	72.57 \pm 2.18 ab	75.90 \pm 2.67 ab

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

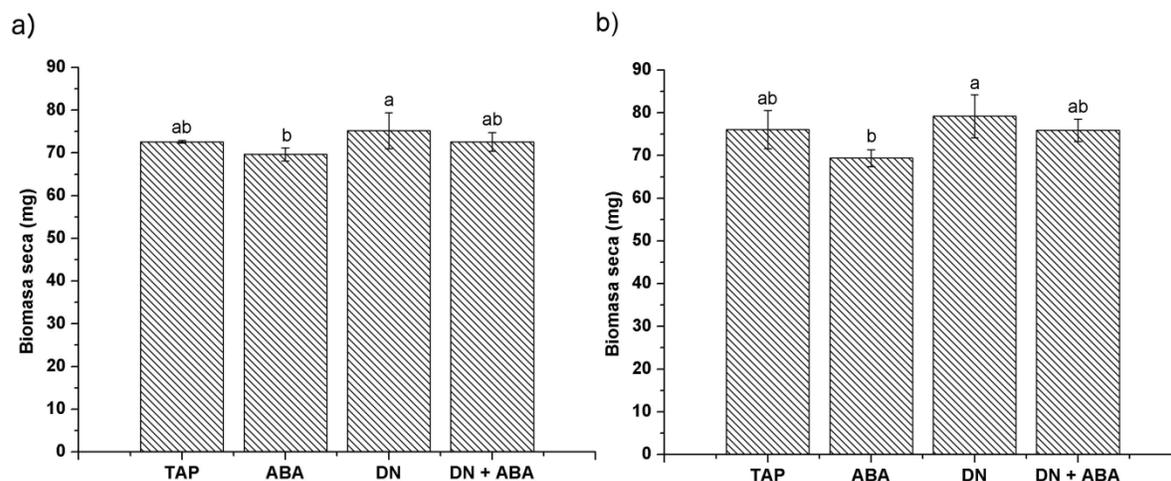


Figura 3.10 Efecto de la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno sobre la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del

experimento. Las células se incubaron con TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μ M por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μ M por siete días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

3.3.4 Efecto de la combinación de ABA con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido lipídico y acumulación de TAG de *C. saccharophila*

Un aumento significativo de extracto lipídico fue obtenido a partir del tratamiento con ABA, mientras que con ND y DN+ABA no hubo diferencias significativas en comparación con el control (Cuadro 3.10 y Figura 3.11a). Esta tendencia fue corroborada en un segundo experimento (Cuadro 3.10 y Figura 3.11b).

Cuadro 3.10 Variación del extracto lipídico obtenido de *C. saccharophila* en respuesta a la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno.

ABA (μ M)	Extracto lipídico* (mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
TAP	32.87 \pm 2.25b	34.63 \pm 3.91 b
ABA	43.67 \pm 3.95 a	43.46 \pm 4.17 a
DN	34.6 \pm 2.40 b	37.23 \pm 1.35 b
DN + ABA	30.87 \pm 0.65 b	32.67 \pm 0.32 b

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

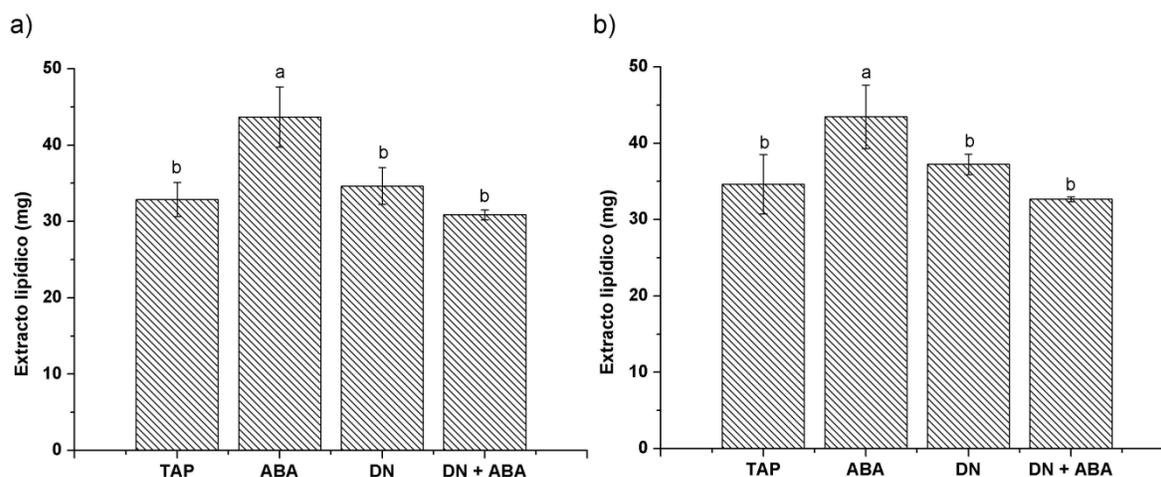


Figura 3.11 Efecto de la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno sobre el extracto lipídico de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μM por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μM por siete días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

El porcentaje del contenido lipídico de *C. saccharophila* con respecto a la biomasa seca fue calculado, y se obtuvo la mayor cantidad a partir del tratamiento con ABA, y no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con DN, DN+ABA con respecto al control (Cuadro 3.11 y Figura 3.12a). Este resultado fue confirmado en un segundo experimento donde se observó esta misma tendencia (Cuadro 3.11 y Figura 3.12b).

Cuadro 3.11 Variación del contenido lipídico como porcentaje de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno.

ABA (μM)	Extracto lipídico* (% de biomasa seca)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
TAP	45.28 \pm 3.25 b	45.46 \pm 3.26 b
ABA	62.66 \pm 5.12 a	62.55 \pm 4.34 a
DN	46.24 \pm 5.32 b	47.20 \pm 4.55 b
DN + ABA	42.57 \pm 1.81 b	43.08 \pm 1.91 b

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

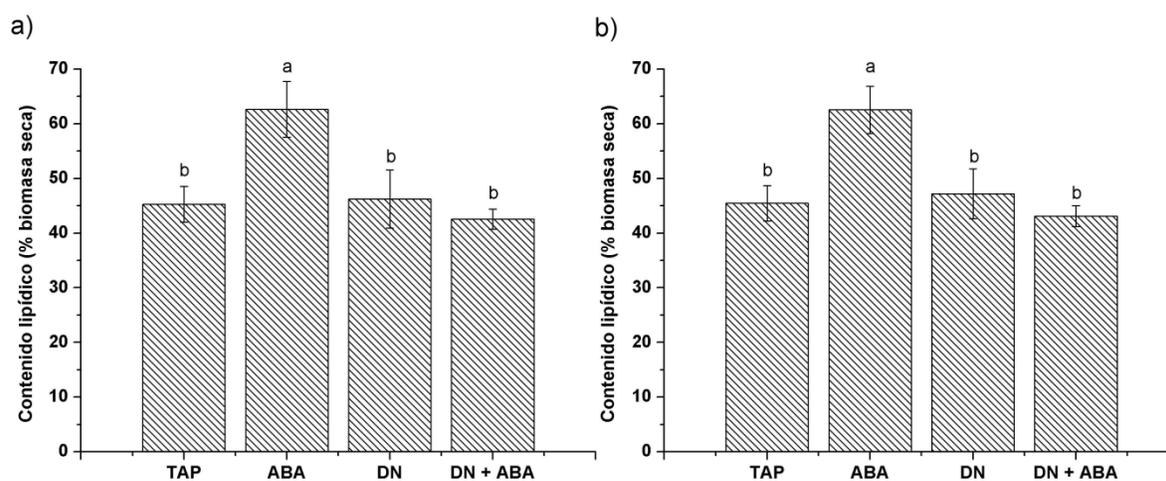


Figura 3.12 Efecto de la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno sobre el extracto lipídico como porcentaje de la biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μM por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μM por siete días.

Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

En cuanto a la acumulación de TAG en comparación con el control se obtuvo un aumento significativo en la acumulación de TAG con todos los tratamientos evaluados, siendo el tratamiento con DN+ABA el que presentó la mayor acumulación, seguido del tratamiento con DN y ABA (Cuadro 3.12 y Figura 3.13a). Resultados similares fueron obtenidos en un segundo experimento para todos los tratamientos evaluados, así como para el control (Cuadro 3.12 y Figura 3.13b).

Cuadro 3.12 Variación del contenido de TAG en *C. saccharophila* en respuesta a la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno.

ABA (μM)	TAG* (mg)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
TAP	5.09 \pm 0.56 d	8.97 \pm 0.38 d
ABA	6.88 \pm 0.83 c	10.58 \pm 0.36 c
DN	8.54 \pm 0.41 b	14.29 \pm 1.38 b
DN + ABA	10.901 \pm 0.80 a	18.44 \pm 0.88 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

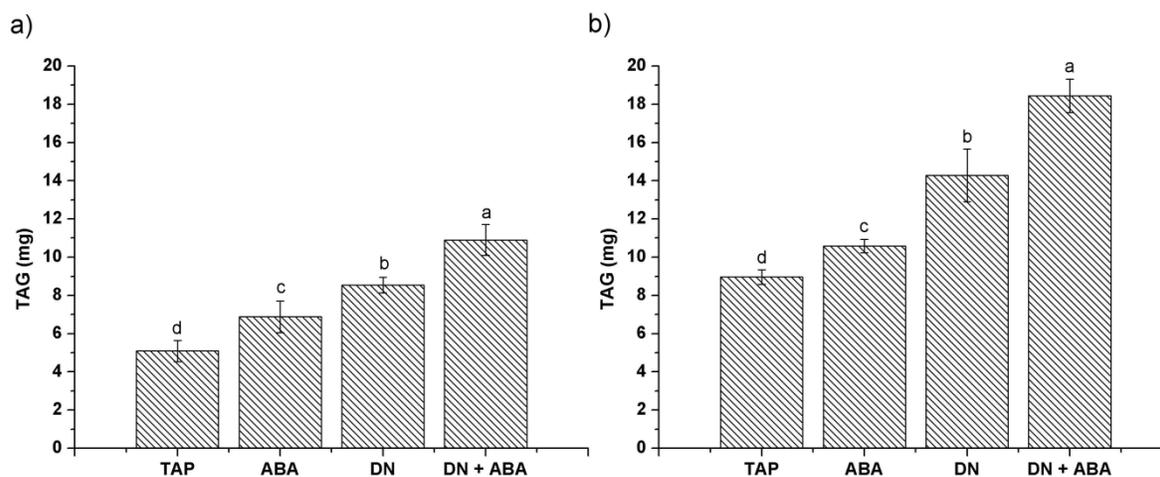


Figura 3.13 Efecto de la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido de TAG de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μM por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μM por siete días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

Se calculó como porcentaje el contenido de TAG con respecto a la biomasa seca y se encontró valores significativamente más altos para todos los tratamientos realizados en comparación con el control, siendo el tratamiento con DN+ABA el que presentó la mayor acumulación, seguido de aquellos con DN y ABA (Cuadro 3.13 y Figura 3.14a). Esta misma tendencia fue observada en un segundo experimento para todos los tratamientos evaluados, así como para el control (Cuadro 3.13 y Figura 3.14b).

Cuadro 3.13 Variación del contenido de TAG como porcentaje de biomasa seca de *C. saccharophila* en respuesta a la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno.

ABA (μM)	TAG* (% biomasa seca)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
TAP	7.01 \pm 0.79 c	11.82 \pm 1.08 c
ABA	9.87 \pm 1.26 b	15.27 \pm 0.92 b
DN	11.39 \pm 0.95 b	18.11 \pm 2.34 b
DN + ABA	15.05 \pm 1.56 a	24.33 \pm 1.68 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

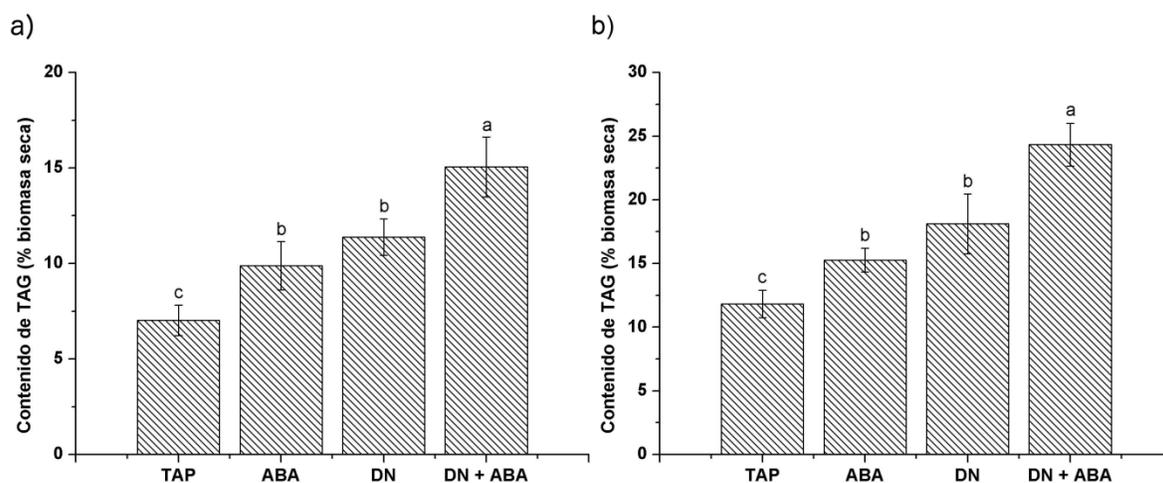


Figura 3.14 Efecto de la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido de TAG como porcentaje de biomasa seca de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μM por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μM por siete días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

También se calculó el porcentaje del contenido de TAG con respecto al extracto lipídico, y con respecto al control se encontraron diferencias significativas para el tratamiento con ABA. Por otra parte, se observó un aumento significativo en el porcentaje del contenido de TAG del extracto lipídico con DN y DN+ABA (Cuadro 3.14 y Figura 3.15a). Resultados similares fueron obtenidos en un segundo experimento para todos los tratamientos realizados, así como para el control (Cuadro 3.14 y Figura 3.15b).

Cuadro 3.14 Variación del contenido de TAG como porcentaje de extracto lipídico de *C. saccharophila* en respuesta a la combinación de ABA 1 μM con deficiencia de nitrógeno.

ABA (μM)	TAG* (% Extracto lipídico)	
	Primer experimento	Réplica del experimento
TAP	15.05 \pm 1.64 c	26.18 \pm 4.06 c
ABA	15.78 \pm 1.49 c	24.56 \pm 3.20 c
DN	24.77 \pm 2.52 b	38.45 \pm 4.56 b
DN + ABA	35.31 \pm 2.30 a	56.46 \pm 2.46 a

*Diferentes letras minúsculas, en una misma columna, indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

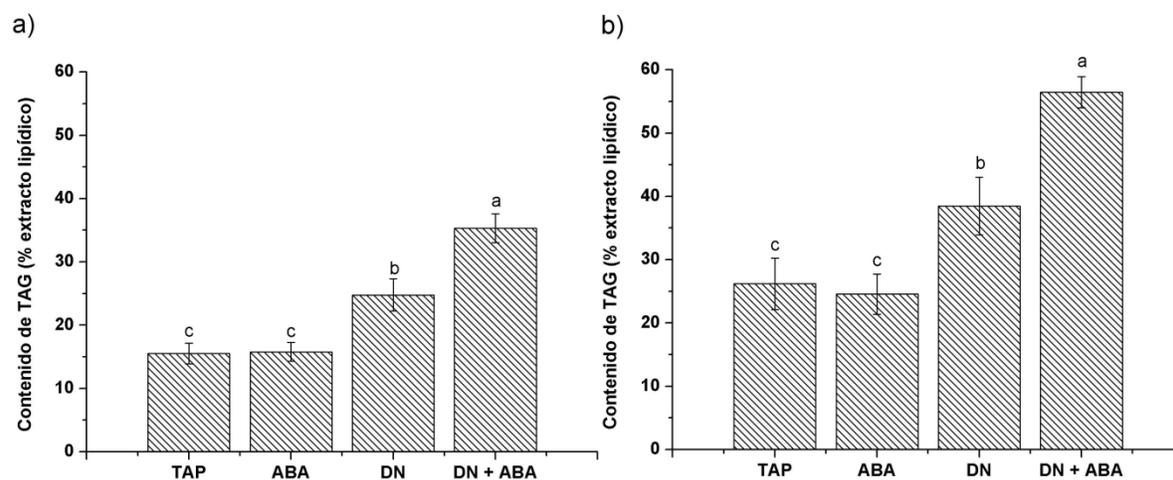
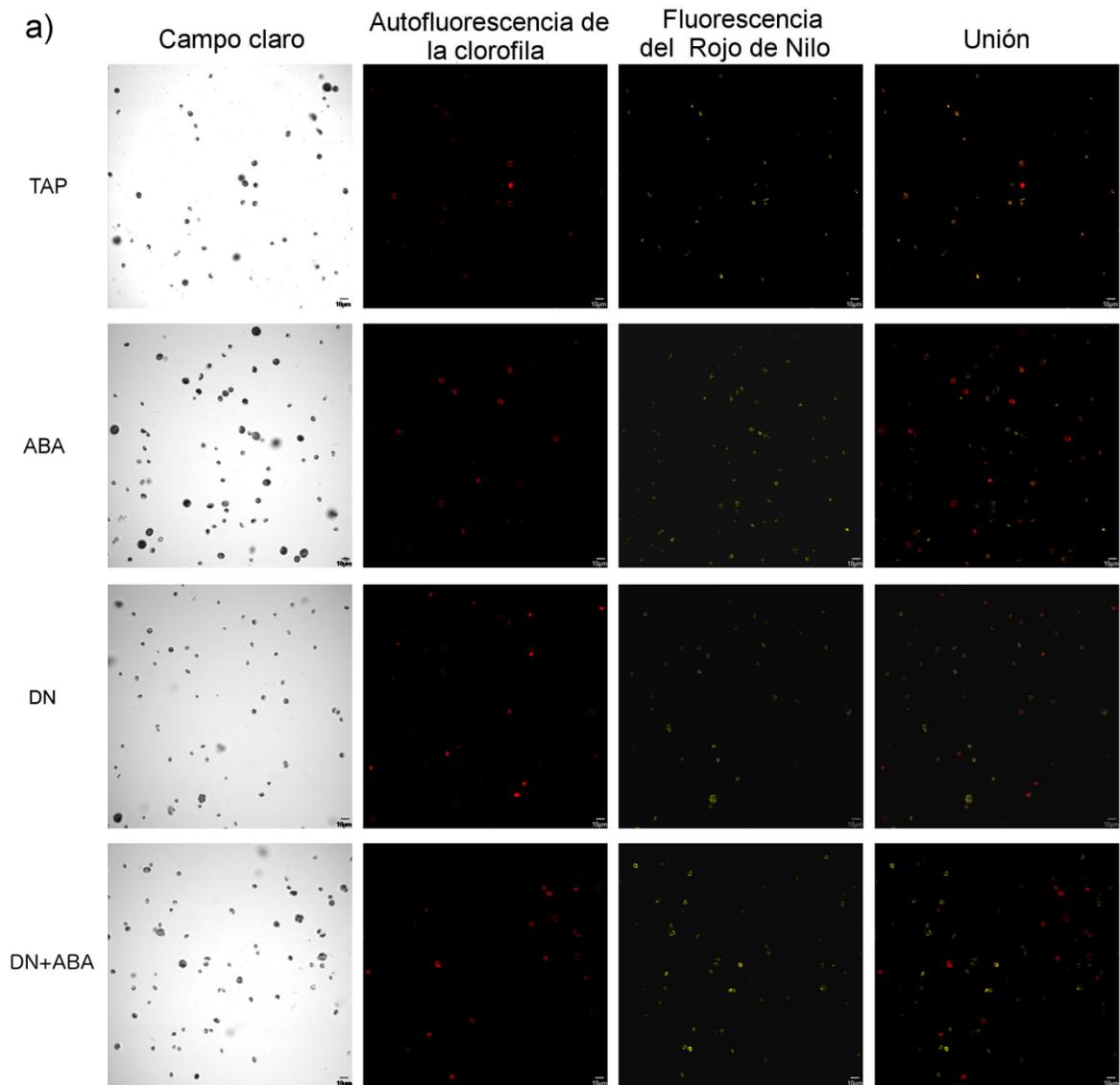


Figura 3.15 Efecto de la combinación de ABA 1 μ M con deficiencia de nitrógeno sobre el contenido de TAG como porcentaje del extracto lipídico de *C. saccharophila*. a) Primer experimento b) Réplica del experimento. Las células se incubaron en TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μ M por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μ M por siete días. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher, $p < 0.05$, $n = 3$).

El análisis de microscopía confocal (Figura 3.16a) nos permitió visualizar la presencia de color amarillo brillante, producida por la interacción de rojo de Nilo con lípidos neutros de *C. saccharophila*. Mientras que en la Figura 3.16b se muestra una magnificación a 6 \times de una de las secciones analizadas, donde de igual forma se aprecia la presencia de color amarillo brillante, producido por la interacción de rojo de Nilo con lípidos neutros. El análisis confocal nos permitió visualizar los lípidos neutros contenidos en las células de *C. saccharophila* así como detectar cualitativamente un aumento en estos lípidos en los cultivos con los diferentes tratamientos con ABA, DN y DN+ABA en comparación con el control.



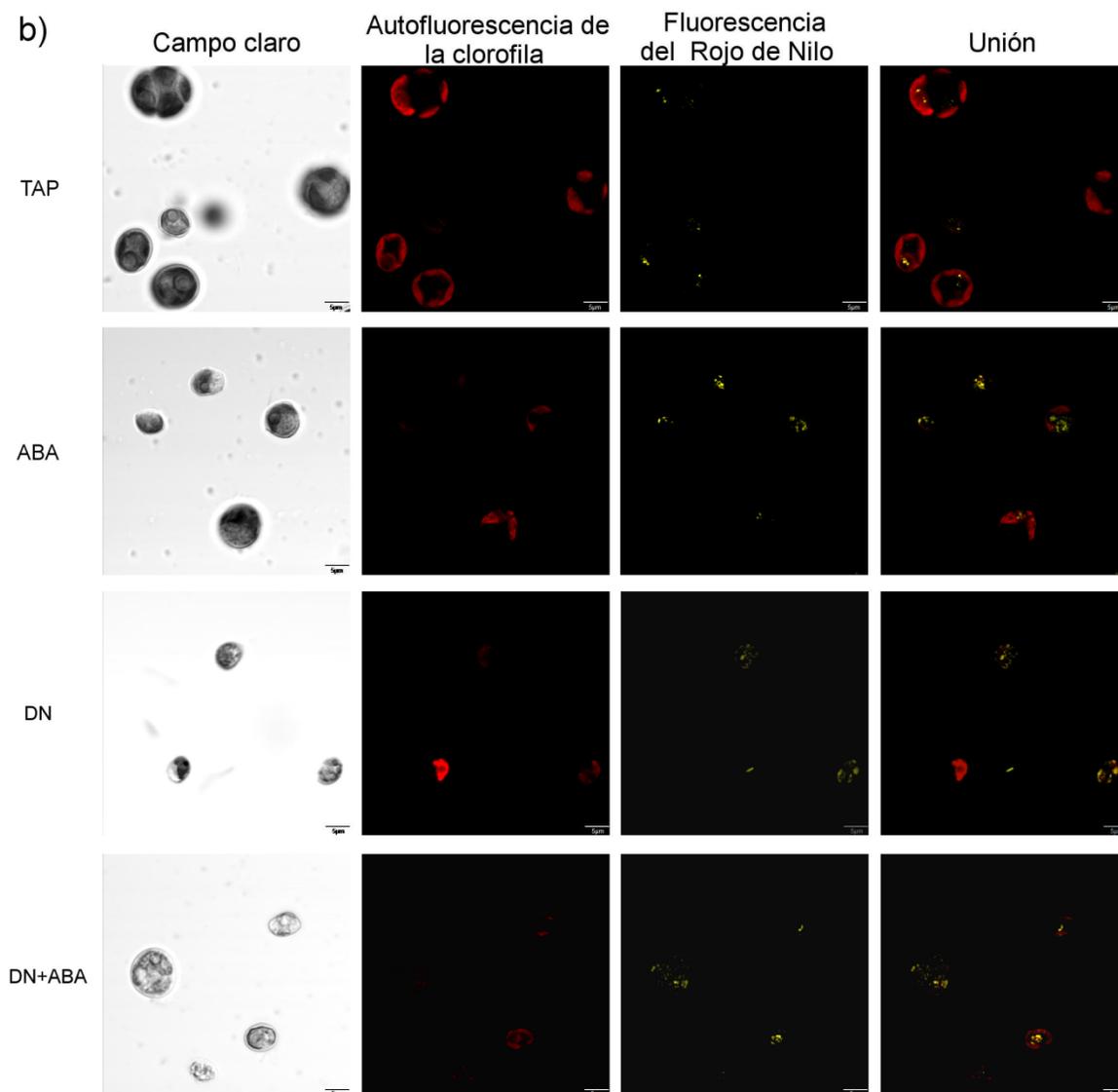


Figura 3.16 Microscopía confocal de *C. saccharophila*. Las células se incubaron en TAP por 10 días, colectadas por centrifugación y transferidas a medio. TAP = TAP por siete días; ABA = TAP suplementado con ABA 1 μ M por siete días; DN = TAP-N por siete días; DN+ABA = TAP-N suplementado con ABA 1 μ M por siete días. a) Vista a 1 \times , b) Magnificación a 6 \times de una sección analizada.

3.4 Discusión

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que la adición de la fitohormona ABA provocaba sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos de *C. saccharophila*. Para lo cual, primero se evaluaron cuatro concentraciones de ABA (1, 4, 10 y 20 μM) aplicadas al inicio de un cultivo de una sola etapa, y se encontró que todas las concentraciones ensayadas aumentaron de forma significativa la concentración celular, mientras que la acumulación de biomasa seca, el extracto lipídico, así como el extracto lipídico por biomasa seca no fue afectada. Además, se encontró que todas las concentraciones evaluadas de ABA condujeron al aumento de la acumulación de TAG en *C. saccharophila* en comparación con el control, tanto como porcentaje de TAG de la biomasa seca, así como porcentaje de TAG con respecto al extracto lipídico. Este resultado indica que aunque las células tratadas con ABA no incrementaron su contenido total de lípidos, sí se produjo un cambio en la composición de éstos, es decir, que en las células había una mayor presencia de TAG debido al tratamiento con ABA. Por otra parte, ABA causó un aumento en el número de células sin afectar la biomasa seca, lo cual resultó inesperado, ya que ABA es conocido como un inhibidor de la división celular en plantas (Stals y Inzé, 2001). La adición de concentraciones similares (0.37, 3.78, 11.34, 18.91 y 37.83 μM) de ABA en el medio de cultivo ha sido evaluado en la microalga verde *C. reinhardtii*, y se encontró que con respecto al control no se presentaban cambios en el crecimiento medido como densidad celular g/L, sin embargo el número de células no fue determinado (Park *et al.*, 2013). Además, en *C. reinhardtii* la adición de 500 μM de ABA en el medio de cultivo causó un incremento en el crecimiento de las células, medido como mg de peso seco/mL, en comparación con el control (Yoshida *et al.*, 2003). Cuando el contenido de clorofila se utilizó como un indicador de crecimiento celular en esta microalga, resultó que 500 μM de ABA también causó un aumento en el crecimiento celular en presencia o ausencia de estrés por salinidad o estrés osmótico (Yoshida *et al.*, 2004).

El hecho que ABA tenga un efecto positivo sobre el número de células resulta ser muy relevante, debido a que, como ya se ha mencionado, ABA en plantas es conocido como un inhibidor de la división celular, y se ha considerado que desempeña una actividad

fisiológica similar en las microalgas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que ABA no presentó un efecto inhibitor en la división celular de *C. saccharophila*. Este resultado, junto con el obtenido previamente por Yoshida *et al.* (2004) sientan un precedente de que ABA en microalgas no actúa como un inhibidor de la división celular.

En lo que respecta a la acumulación de biomasa seca (peso seco), nuestros resultados coinciden con lo que ha sido reportado, es decir, ABA no provoca cambios con respecto al control en este parámetro (Park *et al.*, 2013). Por otra parte, estudios previos han reportado que ABA exógeno incrementa la acumulación de lípidos, específicamente de TAG, en embriones y células en suspensión de plantas superiores (Kharenko *et al.*, 2011; Rodríguez-Sotres y Black, 1994). De igual forma, se reporta que los tratamientos con ABA evaluados en *C. reinhardtii* por Park *et al.* (2013) condujeron a un incremento del 10 al 13% en el rendimiento de FAME, la cual es una forma indirecta de medir la acumulación de TAG en las células. Cabe resaltar que en este trabajo la respuesta de *C. saccharophila* a ABA no produjo cambios en el extracto lipídico, así como tampoco en el contenido lipídico por biomasa seca. Sin embargo, dio lugar a un incremento en la acumulación de TAG, más del doble en cuanto a TAG total, TAG como porcentaje de biomasa seca y TAG como porcentaje del extracto lipídico. Lo anterior sugiere que ABA, más que inducir un incremento en la cantidad de extracto lipídico o del contenido lipídico por biomasa seca, provoca un cambio en la composición de los lípidos, es decir, causa que en el extracto lipídico haya una mayor presencia de TAG. Este resultado apoya el uso de ABA para aumentar el contenido de TAG en el cultivo de microalgas. Por otra parte, para conocer y determinar el papel específico que ABA desempeña en la acumulación de lípidos, particularmente de TAG en microalgas, aún se necesita más investigación.

En el presente trabajo de tesis también se evaluó la aplicación exógena de 1 μ M de ABA, la deficiencia de nitrógeno, y la combinación de ambos, durante la segunda etapa de un cultivo en dos etapas (modificado de Contreras-Pool, 2010). Cuando se adicionó sólo ABA, no se observaron diferencias significativas en el número de células en comparación con el control, contrario a lo observado en los resultados cuando se adicionó ABA al inicio del cultivo en una sola etapa. Lo anterior posiblemente se debió a que, en el momento de

aplicar ABA en la segunda etapa, las células ya se encontraban al final de la fase exponencial del cultivo, por lo tanto, la biomasa ya se había acumulado y el proceso de división celular no estaba activo. En cuanto al tratamiento de DN, este provocó la disminución significativa del número de células, lo cual era esperado. Mientras que la aplicación de ABA en combinación con DN indujo a un aumento del número de células en comparación con el control y el tratamiento DN. Lo anterior podría deberse a un efecto combinado de los tratamientos, donde ABA induce un efecto protector ante el estrés por deficiencia de nitrógeno, activando genes de defensa ante esta condición estresante. La inducción de genes de defensa ante condiciones ambientales estresantes por ABA ya ha sido reportado con anterioridad, tanto para plantas como para microalgas (Guo *et al.*, 2011; Komatsu *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2003). Sin embargo, aún se requiere de más investigación al respecto, para poder determinar el papel que desempeña ABA cuando se combina con estrés por deficiencia de nitrógeno.

Además, contrariamente a lo que se observó cuando ABA se aplicó al principio del cultivo en una sola etapa, durante el cultivo de dos etapas se observó un incremento significativo en el contenido de lípidos totales con el tratamiento de ABA en comparación con el control y los otros tratamientos. Este aumento correspondió al incremento en el contenido de TAG total y TAG como porcentaje de biomasa seca, pero no TAG como porcentaje de extracto lipídico, lo que sugiere que el aumento de TAG fue debido al aumento de los lípidos totales y no al aumento de la cantidad de TAG presente en extracto lipídico. Por su parte, la deficiencia de nitrógeno incrementó significativamente el contenido de TAG en comparación con el control, tal como se esperaba. De manera interesante, las mediciones del contenido de TAG resultaron ser significativamente mayores en el tratamiento de DN+ABA en comparación con los otros tratamientos, incluyendo el de DN. Lo anterior sugiere que hubo un efecto combinado de deficiencia de nitrógeno como estrés y de ABA como una señal de estrés que conduce a las células a acumular más TAG, es decir, por una parte, ABA ejerce un efecto protector ante el estrés por deficiencia de nitrógeno sobre la células, pero a la vez las células perciben que se encuentran en una condición crítica debido a la DN y empiezan a sintetizar TAG. Sin embargo, en este aspecto también se

requiere de más investigación para poder determinar las funciones de ABA bajo condiciones de estrés y específicamente en condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno en microalgas, ya que hoy en día son pocos reportes relativos a las funciones fisiológicas que ABA endógeno desempeña en microalgas en condiciones de estrés. Por ejemplo, se observó el incremento significativo de los niveles endógenos de ABA en *Dunaliella sp.* Cuando se cultivó en condiciones hipertónicas o hipotónicas, así mismo se observó este incremento en *Dunaliella sp.* y *Nannochloropsis oceanica* cuando fueron cultivadas con deficiencia de nitrógeno (Lu *et al.*, 2014; Tominaga *et al.*, 1993). Kobayashi *et al.* (1997) han sugerido que ABA puede actuar como una hormona del estrés en la morfogénesis de *Haematococcus pluvialis*, ya que la biosíntesis de ABA endógeno fue inducida por especies reactivas de oxígeno y ABA exógeno causó la recuperación del enquistamiento de las algas en condiciones de sequía, incluso en presencia de cloranfenicol, inhibidor de enquistamiento. Además, se ha informado que ABA actúa como una señal que aumenta la tolerancia al estrés oxidativo y osmótico en *C. reinhardtii* probablemente ayudando a reducir el daño oxidativo en células derivadas de la exposición al estrés (Kasukabe *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2003).

Por otra parte, varias estrategias se han utilizado para aumentar el contenido de lípidos y la acumulación de TAG en microalgas, y la deficiencia de nitrógeno ha sido la estrategia más utilizada para alcanzar este objetivo (Yoon *et al.*, 2015). Sin embargo, este incremento de lípidos va acompañado de la disminución de biomasa. Con el objetivo de minimizar este decremento en la biomasa, se ha propuesto la estrategia donde se incluye el uso de deficiencia de nitrógeno, pero empleando un sistema de cultivo en dos etapas (Ho *et al.*, 2010; Rodolfi *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014): una primera etapa, para acumular biomasa, donde las células son cultivadas en un medio completo, es decir, sin ninguna deficiencia de nutrientes, hasta alcanzar su fase exponencial. Posteriormente, una segunda etapa, para la acumulación de TAG, para lo cual las células, provenientes de la primera etapa de cultivo, son colectadas y resuspendidas a un medio fresco deficiente de nitrógeno. Esta estrategia es considerada de las más exitosas hasta la fecha (Herrera-Valencia *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2010; Rodolfi *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2014). Sin embargo,

la implementación de esta estrategia a nivel industrial no es aún viable, ya que resulta ser poco práctica y muy costosa, debido a que implica la recuperación de la biomasa, por centrifugación, al final de la primera etapa de cultivo, y la transferencia de la misma a otro biorreactor para iniciar la segunda etapa de cultivo. Varias modificaciones se han tratado de hacer para mejorar esta estrategia; recientemente Fan *et al.* (2014) demostraron la viabilidad de utilizar un modo de cultivo de transición trófica para la producción de lípidos, que consiste en la privación de nitrógeno durante la etapa fotoautotrófica del método de producción de dos etapas. Más recientemente, Li *et al.* (2015) propusieron el cultivo bajo deficiencia de nitrógeno en dos etapas sin necesidad de emplear centrifugación después de la primera etapa de cultivo como un método adecuado, eficaz y de bajo consumo de energía para la acumulación de lípidos en *Scenedesmus sp.* Sin embargo, aunque la estrategia de cultivo en dos etapas, así como las modificaciones que se le han hecho se presentan como la estrategia más eficaz en cuanto al incremento de TAG, requiere de un tiempo de cultivo más extenso, ya que siempre involucra una etapa de cultivo para acumular biomasa y otra para la síntesis de TAG.

Como una alternativa, la adición de fitohormonas al medio de cultivo se ha propuesto como una manera atractiva para aumentar la producción de lípidos. En este sentido, Park *et al.* (2013) propusieron el uso de fitohormonas, incluyendo ABA, para aumentar la biomasa y el rendimiento de FAMES, y de esta forma reducir los costos de producción de biocombustibles a partir de microalgas, utilizando medios limitados en nitrógeno que fueron adicionados con ABA (37.83 μM) en una estrategia de cultivo de una sola etapa, y utilizando a *C. reinhardtii* como un sistema modelo. A pesar de que esta estrategia sí fue efectiva para incrementar rendimiento de FAMES, trajo consigo un dramático decremento de la acumulación de biomasa. Por lo tanto, la combinación de ABA con estrés por deficiencia de nitrógeno en una sola etapa de cultivo no es la más adecuada. A diferencia de lo propuesto en este estudio, utilizando la combinación de ABA (1 μM) con estrés por deficiencia de nitrógeno, pero empleando una estrategia de cultivo en dos etapas para *C. saccharophila*, se demostró que puede incrementar el contenido de TAG sin afectar la acumulación de biomasa.

Por otra parte, cuando comparamos los resultados obtenidos de las dos estrategias propuestas en este estudio, cultivo adicionado con ABA en una sola etapa o cultivo adicionado con ABA y en combinación con estrés por deficiencia de nitrógeno en dos etapas, resulta evidente que los niveles más altos de TAG como porcentaje de biomasa seca y como porcentaje de extracto lipídico se obtuvieron con la adición de tan sólo 1 μM de ABA al inicio del cultivo en una sola etapa. Lo anterior resulta muy alentador, ya que por una parte se incrementa el contenido de TAG sin que el rendimiento de la biomasa sea afectada de forma negativa y, por otra parte, este objetivo se logra empleando tan sólo una sola etapa de cultivo, con lo cual el tiempo total de cultivo es menor, en comparación con la estrategia de dos etapas de cultivo en la que requiere un tiempo de cultivo más extenso, con lo cual hace de esta estrategia propuesta, ABA (1 μM) en una sola etapa de cultivo, la más efectiva para el incremento de TAG en *C. saccharophila*. Además, esta estrategia podría ser útil en otras microalgas oleaginosas para mejorar la acumulación de TAG como materia prima para la producción de biodiésel.

CAPÍTULO 4. Discusión general

Hoy en día el mundo se enfrenta a diversos problemas ambientales, entre ellos el denominado calentamiento global, provocado entre otras cosas por el exceso de CO₂ en el ambiente, generado principalmente por la quema de combustibles de origen fósil. Ante esta situación, en los últimos años se ha considerado el uso de biocombustibles, entre estos el biodiésel, como una alternativa al empleo de combustibles de origen fósil. Por otra parte, las microalgas verdes son consideradas como una fuente atractiva y prometedora para la producción de TAG, materia prima para la producción de biodiésel, y junto con su capacidad para fijar CO₂, utilizado como su fuente de carbono, han despertado un gran interés por su cultivo a gran escala con el objetivo de ayudar a mitigar el exceso de CO₂ presente en el ambiente, y de esta forma contribuir a la lucha contra el cambio climático. Sin embargo, la obtención de una mayor acumulación de TAG se presenta como uno de los grandes retos por superar para que el uso de las microalgas como una fuente de TAG en la producción de biocombustibles sea económicamente viable.

Con el objetivo de incrementar el contenido de lípidos, específicamente TAG, en microalgas, varias estrategias, tales como el cultivo de microalgas bajo condiciones deficientes de nitrógeno, han sido planteadas (Guckert y Cooksey, 1990; Mujtaba *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014), y aunque se han observado efectos favorables en el incremento de TAG, cuando estas estrategias han sido evaluadas, la acumulación de biomasa seca ha sido afectada negativamente.

Ante esta situación, en los últimos años se ha propuesto el uso de reguladores de crecimiento, incluyendo las fitohormonas, para incrementar tanto la acumulación de biomasa, como la producción de TAG en microalgas (Hunt *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2013). Por otro lado, *C. saccharophila* ha sido considerada como una fuente promisoría de lípidos para la producción de biodiésel, debido a que presenta una alta capacidad de acumular biomasa y lípidos, así como un perfil adecuado de ácidos grasos para la producción de biodiésel (Herrera-Valencia *et al.*, 2011).

Tomando en cuenta todo lo anterior, en el segundo capítulo de este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación exógena de reguladores de crecimiento del grupo de las auxinas (AIA, ANA), citocininas (BAP, DPU y TDZ) sobre la acumulación de biomasa de *C. saccharophila*. Por otro lado, en el tercer capítulo de este trabajo, empleando una estrategia de cultivo en una sola etapa, se evaluó el efecto de ABA sobre la concentración celular, acumulación de lípidos y TAG de *C. saccharophila*. Además, empleando una estrategia de cultivo de dos etapas, una para acumular biomasa y otra etapa para acumular TAG, se evaluó la combinación de ABA con deficiencia de nitrógeno sobre la concentración celular, acumulación de lípidos y TAG de *C. saccharophila*.

Con base en los resultados obtenidos, en este trabajo podemos decir que:

Con las auxinas, nuestros resultados no mostraron el incremento de la biomasa seca en comparación con el control, tal como otros autores han reportado para *C. sorokiniana* y *C. reinhardtii* (Hunt *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2013). Pero tampoco se puede decir que afectaron negativamente la acumulación de biomasa, ya que los resultados indican que a pesar de ser mucho menor el número de células, el hecho de haber aplicado las auxinas ayudó a acumular la misma cantidad de biomasa seca que el presentado por el control, es decir, probablemente se acumuló una mayor cantidad de metabolitos. Sin embargo, hay que hallar la concentración óptima de estas auxinas para *C. saccharophila*, para que estos efectos positivos que se han observado hasta ahora sean potencializados aún más, ya que como lo mencionan Czerpak *et al.* (1994) en su estudio con *C. pirenoidosa* existe una concentración óptima para AIA y ANA (0.00005 μM) en esta microalga, en la que se observan efectos positivos.

En cuanto a las citocininas, los resultados indicaron que únicamente BAP y TDZ a 10 μM promovieron y, por lo tanto, incrementaron la división celular en *C. saccharophila*. Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas del contenido de biomasa seca con respecto a su control, incluso a 10 μM , donde se observó un incremento del número de células, y por lo tanto se podría pensar que habría un incremento en la acumulación de biomasa seca. Lo anterior quizá puede deberse a que como a esta concentración se

promovió la división celular, las células, a pesar de ser más en número acumularon una menor cantidad de metabolitos, ya que la división celular es muy activa.

Con el uso de ABA, empleando un sistema de cultivo de una sola etapa, se encontró que todas las concentraciones ensayadas aumentaron de forma significativa la concentración celular, pero no el contenido de la biomasa seca, extracto lipídico o lípidos como porcentaje de biomasa seca. Además, se encontró que todas las concentraciones evaluadas de ABA condujeron al aumento de la acumulación de TAG en *C. saccharophila* en comparación con el control. Por otro lado, ABA causó un aumento en el número de células sin afectar la biomasa seca, lo cual resultó inesperado, ya que ABA es conocido como un inhibidor de la división celular en plantas (Stals y Inzé, 2001), y se ha considerado que desempeña una actividad fisiológica similar en las microalgas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que ABA no presentó un efecto inhibitorio en la división celular de *C. saccharophila*, y como se había mencionado previamente, en el trabajo realizado por Yoshida *et al.* (2004) se reportó que 500 μM de ABA incrementaba el crecimiento celular de *C. reinhardtii*. Este resultado, junto con el obtenido en nuestro trabajo, sienta un precedente de que ABA en microalgas no actúa como un inhibidor de la división celular. Además, contrariamente a lo que se observó cuando ABA se aplicó al principio del cultivo en una sola etapa, durante el cultivo de dos etapas con ABA se observó un incremento significativo en el contenido de lípidos totales en comparación con el control y los otros tratamientos. Por su parte, la deficiencia de nitrógeno incrementó significativamente el contenido de TAG en comparación con el control, tal como se esperaba. Asimismo, las mediciones del contenido de TAG resultaron ser significativamente mayores en el tratamiento de DN+ABA en comparación con los otros tratamientos, incluyendo el de DN. Lo anterior sugiere que hubo un efecto combinado de deficiencia de nitrógeno como estrés y de ABA como una señal de estrés que conduce a las células a acumular más TAG, es decir, por una parte ABA ejerce un efecto protector ante el estrés por deficiencia de nitrógeno sobre las células, pero a la vez las células perciben que se encuentran en una condición crítica debido a la DN y empiezan a sintetizar TAG.

Finalmente, con base en todos los resultados obtenidos, en este trabajo se propone la adición de 1 μM de ABA al principio del cultivo en una sola etapa como una manera eficaz y sencilla de mejorar la acumulación de TAG en *C. saccharophila*, sin que la acumulación de biomasa sea afectada de forma negativa. Además, esta estrategia podría ser transferida a otras microalgas oleaginosas para mejorar la acumulación de TAG como materia prima para la producción de biodiésel.

CAPÍTULO 5. Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos, las auxinas AIA y ANA se presentan como una opción con potencial para incrementar la acumulación de biomasa seca de *C. saccharophila*, ya que a pesar de haber menos células, el hecho de haber aplicado las auxinas ayudó a acumular la misma cantidad de biomasa seca que el presentado por el control, es decir, probablemente se acumuló una mayor cantidad de metabolitos. Sin embargo, se considera que las concentraciones evaluadas de estas fitohormonas no fueron las óptimas para *C. saccharophila*. Por lo cual, se deben ensayar otras concentraciones con la finalidad de encontrar la más óptima a la cual los efectos positivos de AIA y ANA, observados con *C. saccharophila* en este trabajo, sean potencializados.

En lo que respecta a las citocininas, BAP o TDZ se presentan como una opción con gran potencial para incrementar la concentración celular de *C. saccharophila*, ya que los resultados nos indican que la concentración de 10 μM tanto de BAP como de TDZ producen efectos positivos en *C. saccharophila*, incrementando la concentración celular, mientras que la acumulación de biomasa seca no es afectada. En cuanto a DPU, con base en los resultados obtenidos, no es conveniente utilizar concentraciones por arriba de 10 μM de DPU con *C. saccharophila*, ya que afecta dramáticamente tanto la concentración celular como la acumulación de biomasa seca.

Con base en los resultados obtenidos de las dos estrategias de cultivo evaluadas en este trabajo: 1 μM de ABA adicionado al inicio del cultivo en una sola etapa o la combinación de ABA (1 μM) con estrés por deficiencia de nitrógeno empleando una estrategia de cultivo en dos etapas, se presentan con gran potencial para incrementar la acumulación de TAG en *C. saccharophila*, sin afectar negativamente la acumulación de biomasa seca. Sin embargo, comparando los resultados obtenidos de cada una de las estrategias podemos concluir que la adición de 1 μM de ABA al inicio del cultivo en una sola etapa

resulta ser la manera más eficaz y sencilla para incrementar la acumulación de TAG de *C. saccharophila*.

5.2 Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que ABA es una fitohormona con un gran potencial para ayudar a alcanzar la viabilidad económica de la producción de biodiésel a partir de microalgas. Sin embargo, aún hace falta un entendimiento más claro y amplio de su función fisiológica en microalgas.

De manera particular, en este trabajo el uso de ABA demostró ser una opción eficaz y sencilla para incrementar la acumulación de TAG de *C. saccharophila*. Por lo tanto, un entendimiento más amplio acerca de su función en *C. saccharophila*, así como en general en otras microalgas, es muy necesario con el objetivo de poder potencializar aún más los resultados obtenidos en este trabajo.

La determinación del contenido endógeno de ABA en *C. saccharophila* en condiciones óptimas de cultivo, así como en condiciones estresantes ayudará al entendimiento de la función de esta fitohormona en situaciones de estrés. Por otra parte, el análisis del genoma en presencia y ausencia de ABA, ayudaría a visualizar los genes involucrados en la respuesta de *C. saccharophila* ante esta fitohormona.

Todo lo anterior tiene como objetivo alcanzar viabilidad económica en la producción de biodiésel a partir de microalgas, en específico con *C. saccharophila*, con lo cual se contribuirá a futuro al establecimiento de su cultivo y la de otras microalgas oleaginosas a escala industrial para su uso como fuente de materia prima para la producción de biodiésel.

Bibliografía

- Abdel-Raouf, N., 2012. Agricultural importance of algae. *African J. Biotechnol.* 11, 11648-11658.
- Ali, Y., Hanna, M.A., 1994. Alternative diesel fuels from vegetable oils. *Bioresour. Technol.* 50, 153-163.
- Arias-Forero, D., Hayashida, G., Aranda, M., Araya, S., Portilla, T., García, A., Díaz-palma, P., 2013. Protocol for maximizing the triglycerides-enriched lipids production from *Dunaliella salina* SA32007 biomass, isolated from the Salar de Atacama (Northern Chile). *Adv. Biosci. Biotechnol.* 4, 830-839.
- Bajguz, A., Piotrowska-Niczyporuk, A., 2013. Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiol. Biochem.* 71, 290-7.
- Blanc, G., Duncan, G., Agarkova, I., Borodovsky, M., Gurnon, J., Kuo, A., Lindquist, E., Lucas, S., Pangilinan, J., Polle, J., Salamov, A., Terry, A., Yamada, T., Dunigan, D.D., Grigoriev, I. V., Claverie, J.-M., Van Etten, J.L., 2010. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex. *Plant Cell* 22, 2943-55.
- Borowitzka, M.A., 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9, 393-401.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557-577.
- Cakmak, T., Angun, P., Demiray, Y.E., Ozkan, A.D., Elibol, Z., Tekinay, T., 2012. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1947-1957.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294-306.
- Contreras-Pool, P.Y., 2010. Análisis del perfil de los ésteres metílicos obtenidos de dos microalgas verdes: *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila*, y su

variación en respuesta a condiciones de estrés.

- Cooksey, K.E., Guckert, J.B., Williams, S.A., Callis, P.R., 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J. Microbiol. Methods* 6, 333-345.
- Czerpak, R., Bajguz, A., Bialecka, B., Wierzcholowska, L.E., Wolanska, M., 1994. Effect of auxin precursors and chemical analogues on the growth and chemical composition in *Chlorella pyrenoidosa* chick. *Acta Soc. Bot. Pol.* 63, 279-286.
- Da Silva, A.F., Lourenço, S.O., Chaloub, R.M., 2009. Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Aquat. Bot.* 91, 291-297.
- Dean, A.P., Sigeo, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K., 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour. Technol.* 101, 4499-4507.
- Den Boer, B.G.W., Murray, J.A.H., 2000. Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol.* 10, 245-250.
- Falkowska, M., Pietryczuk, A., Piotrowska, A., Bajguz, A., Grygoruk, A., Czerpak, R., 2011. The Effect of Gibberellic Acid (GA₃) on Growth, Metal Biosorption and Metabolism of the Green Algae *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) Beijerinck Exposed to Cadmium and Lead Stress. *Polish J. Environ. Stud.* 20, 53-59.
- Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W., Li, Y., 2014. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnol Biofuels* 7, 17.
- Göbel, E., Aach, H., 1985. Studies of chlorella protoplasts. ii. Isolation and fusion of protoplasts from *Chlorella saccharophila* (Kroger) nadson strain 211-1a. *Plant Sci.* 39, 213-218.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100, 965-973.
- Guckert, J.B., Cooksey, K.E., 1990. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition. *J. Phycol.* 26, 72-79.

-
-
- Guo, J., Yang, X., Weston, D.J., Chen, J.-G., 2011. Abscisic acid receptors: past, present and future. *J. Integr. Plant Biol.* 53, 469-79.
- Harris, E.H., 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook, A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.* Academic Press, Inc., San Diego.
- Hartig, K., Beck, E., 2006. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biol.* 8, 389-396.
- Herrera-Valencia, V.A., Contreras-Pool, P.Y., López-Adrián, S.J., Peraza-Echeverría, S., Barahona-Pérez, L.F., 2011. The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. *Curr. Microbiol.* 63, 151-7.
- Ho, S.-H., Chen, W.-M., Chang, J.-S., 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 101, 8725-30.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621-639.
- Hunt, R.W., Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Das, K.C., 2010. Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 2400-14.
- Jensen, T., Rachlin, J., Jani, V., Wakentine, B., 1982. An X-ray energy dispersive study of cellular compartmentalization of lead and zinc in *Chlorella saccharophila* (chlorophyta), *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* (Bacillariophyta). *Environ. Exp. Bot.* 22,319-328.
- Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., 2004. Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and Up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic *Arabidopsis thaliana* 45, 712-722.
- Khan, S.A., Rashmi, Hussain, M.Z., Prasad, S., Banerjee, U.C., 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 2361-2372.
- Kharenko, O.A., Zaharia, L.I., Giblin, M., Čekić, V., Taylor, D.C., Don Palmer, C., Abrams,

-
-
- S.R., Loewen, M.C., 2011. Abscisic acid metabolism and lipid accumulation of a cell suspension culture of *Lesquerella fendleri*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 105, 415-422.
- Komatsu, K., Suzuki, N., Kuwamura, M., Nishikawa, Y., Nakatani, M., Ohtawa, H., Takezawa, D., Seki, M., Tanaka, M., Taji, T., Hayashi, T., Sakata, Y., 2013. Group A PP2Cs evolved in land plants as key regulators of intrinsic desiccation tolerance. *Nat. Commun.* 4, 1-9.
- Lu, Y., Tarkowská, D., Turečková, V., Luo, T., Xin, Y., Li, J., Wang, Q., Jiao, N., Strnad, M., Xu, J., 2014. Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function. *Plant J.* 80, 52-68.
- Lu, Y., Xu, J., 2015. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends Plant Sci.* 20, 273-282. doi:10.1016/j.tplants.2015.01.006
- Medipally, S.R., Yusoff, F.M., Banerjee, S., Shariff, M., 2015. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. *Biomed Res. Int.* 2015.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.G., Lee, K., 2012. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresour. Technol.* 123, 279-283.
- Park, W.-K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C.W., Choi, Y.-E., Yang, J.-W., 2013. Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1128-42.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E., Godlewska-Żyłkiewicz, B., 2012. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiol. Biochem.* 52, 52-65.
- Piotrowska, A., Czerpak, R., 2009a. Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine- and phenylurea-type cytokinins. *Acta Physiol. Plant.* 31, 573-585.
- Piotrowska, A., Czerpak, R., 2009b. Cellular response of light/dark-grown green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine- and phenylurea-type cytokinins. *Acta Physiol. Plant.* 31, 573-585.

-
-
- Piotrowska, A., Czerpak, R., Pietryczuk, A., Olesiewicz, A., Wędołowska, M., 2008. The effect of indomethacin on the growth and metabolism of green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Plant Growth Regul.* 55, 125-136.
- Potvin, G., Zhang, Z., 2010. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 910-918.
- Ratledge, C., Cohen, Z., 2008. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.* 20, 155-160.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energy* 103, 444-467.
- Reston, L., Holbrook, L.A., Magus, J.R., Taylor, D.C., 1992. Abscisic acid induction of elongase activity, biosynthesis and accumulation of very long chain monounsaturated fatty acids and oil body proteins in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv Reston. *Plant Sci.* 84, 99-115.
- Richmond, A., 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.* Blackwell Science Ltd.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100-112.
- Rodriguez-Sotres, R., Black, M., 1994. Osmotic potential and abscisic acid regulate triacylglycerol synthesis in developing wheat embryos. *Planta* 192, 9-15.
- Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M.L., Cardona-López, X., Rojas-Triana, M., Paz-Ares, J., 2008. Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Mol. Biol.* 69, 361-373.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Res.* 1, 20-43.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96.
- Stals, H., Inzé, D., 2001. When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6, 3593-64.
- Stephenson, P.G., Moore, C.M., Terry, M.J., Zubkov, M. V., Bibby, T.S., 2011. Improving

-
-
- photosynthesis for algal biofuels: Toward a green revolution. *Trends Biotechnol.* 29, 615-623.
- Sun, X., Cao, Y., Xu, H., Liu, Y., Sun, J., Qiao, D., Cao, Y., 2014. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. *Bioresour. Technol.* 155, 204-212.
- Takeda, H., 1988. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry* 27, 3823-3826.
- Tarakhovskaya, E., Maslov, Y., Shishova, M., 2007. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant Physiol.* 54, 163-170.
- Tate, J.J., Gutierrez-Wing, M.T., Rusch, K. a., Benton, M.G., 2013. The Effects of Plant Growth Substances and Mixed Cultures on Growth and Metabolite Production of Green Algae *Chlorella* sp.: A Review. *J. Plant Growth Regul.* 32, 417-428.
- Tominaga, N., Takahata, M., Tominaga, H., 1993. Effects of NaCl and KNO₃ concentrations on the abscisic acid content of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta). *Hydrobiologia* 267, 163-168.
- Wang, Z.T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S., Goodenough, U., 2009. Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell* 8, 1856-1868.
- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329, 796-9.
- Yoon, S.Y., Hong, M.E., Chang, W.S., Sim, S.J., 2015. Enhanced biodiesel production in *Neochloris oleoabundans* by a semi-continuous process in two-stage photobioreactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 1415-1421.
- Yoshida, K., Igarashi, E., Mukai, M., Hirata, K., Miyamoto, K., 2003. Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga , *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid. *Plant, Cell Environ.* 26, 451-457.
- Yoshida, K., Igarashi, E., Wakatsuki, E., Miyamoto, K., Hirata, K., 2004. Mitigation of osmotic and salt stresses by abscisic acid through reduction of stress-derived oxidative damage in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 167, 1335-1341.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., Volova, T.G., 2005. Influence of nitrogen deficiency on

biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. J. Appl. Phycol. 17, 309-315.

Zou, J., Abrams, C., Dennis, B., Taylor, D., Pomeroy, M.K., Abrams, S., 1995. Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+) -abscisic acid and its metabolites in microspore-derived embryos of *Brassica napus*. Plant Physiol. 108, 563-571.