



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTOR EN BIOLOGÍA

EL ALGA ROJA AGARÓFITA *GRACILARIA GRACILIS*
EN BAHÍA BUSTAMANTE (CHUBUT, ARGENTINA):
EVALUACIÓN DEL ESTADO REPRODUCTIVO,
EPIFITISMO Y CARACTERIZACIÓN DEL AGAR

LUCAS ARIEL MARTÍN

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2010



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTOR EN BIOLOGÍA

**EL ALGA ROJA AGARÓFITA *GRACILARIA GRACILIS* EN BAHÍA
BUSTAMANTE (CHUBUT, ARGENTINA): EVALUACIÓN DEL
ESTADO REPRODUCTIVO, EPIFITISMO Y CARACTERIZACIÓN
DEL AGAR**

LUCAS ARIEL MARTÍN

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2010

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y del Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) durante el período comprendido entre el 16/02/06 y el 29/11/10, bajo la dirección de la Doctora Patricia I. Leonardi, Profesora Adjunta de Biología de Algas y Hongos e Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Doctora Alicia L. Boraso de Zaixso, Profesora Titular de Recursos Naturales, su Uso y Conservación (FHCS, UNPSJB) e Investigadora Independiente de CONICET.

29 de noviembre de 2010

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación
Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la
calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas e instituciones hicieron posible esta tesis, colaborando en mayor o menor medida, mi profundo agradecimiento para todos ellos:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, organismos que posibilitaron el desarrollo de este trabajo mediante el otorgamiento de subsidios y becas.

A mis directoras, las Dras. Patricia I. Leonardi y Alicia L. Boraso de Zaixso por guiarme en esta etapa y brindarme su experiencia. Un agradecimiento muy especial a Patricia, por ser impulsora constante de esta tesis y por su ejemplo de pasión por el trabajo.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y el CERZOS por la utilización de sus instalaciones y equipamiento.

Al Dr. Eduardo J. Cáceres, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Ficología y Micología e incorporarme a su grupo de trabajo.

A la empresa Soriano S.A., y a Matías y Gonzalo Soriano por la asistencia logística en la recolección de las muestras.

A la Dra. M. Cristina Matulewicz, y muy especialmente a la Dra. M. Cecilia Rodríguez, por su colaboración en la realización del estudio de las propiedades del agar.

Al Dr. Julio Vásquez por sus sugerencias en la elaboración del diseño experimental y por su colaboración con la bibliografía.

A la Dra. Graciela Casas por colaborar en la obtención de bibliografía.

A la Dra. Alicia Miravalles por su colaboración con el trabajo en microscopía electrónica y en la elaboración de las láminas.

A la Dra. Karina Michetti por sus críticas y sugerencias en la redacción.

A la Lic. Gisela Giulietti por la realización del estudio granulométrico del sustrato.

A la familia Zaixso, por su amabilidad y hospitalidad.

Al personal del Hotel de Huéspedes de la UNPSJB de Comodoro Rivadavia.

Al personal de la empresa Soriano en Bahía Bustamante.

A “las chicas” del Laboratorio: Patricia Leonardi, Virginia Bianchinotti, Karina Michetti, Nora Ferrer, Cecilia Damiani, Alicia Miravalles, Cecilia Popovich y Romina Sánchez, por sus críticas, sugerencias y permanente colaboración, pero más allá de eso, y por sobre todas las cosas, por brindarme su amistad.

A Héctor “Gringo” Durbas, por su predisposición al trabajo en campo, por las fotografías subacuáticas y por su amistad.

A mis padres, por su constante apoyo.

A toda mi familia, en el más amplio de sus sentidos, por su apoyo y buenos deseos.

A Rosario y Lautaro, por soportar las ausencias y darle sentido a cada día.

A mis amigos, por colaborar en lo que estuvo a su alcance, y por acompañarme siempre.

A todos los que tuvieron algo que ver con esta tesis, en mayor o menor medida, directa o indirectamente, y que por cuestiones de espacio y memoria no han sido explícitamente nombrados.

A Ro y Lauti

RESUMEN

El alga roja agarófita *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine & W.F. Farnham crece en Bahía Bustamante, (Chubut, Argentina). El objetivo general de este estudio fue conocer el estado reproductivo actual de esta pradera natural, como así también los epífitos de *G. gracilis* y la estructura y propiedades físicas del agar. Información de base indispensable para un futuro desarrollo de esporocultivos.

Los muestreos y las mediciones de campo se realizaron mensualmente entre marzo de 2006 y febrero de 2008.

Se evaluaron las variaciones temporales de la biomasa y los estados reproductivos, poniendo especial atención en la presencia de carposporofitos, por su potencial utilidad en esporocultivos. En ambos años se observó la mayor biomasa a fines de primavera y verano, y en el invierno de cada año se registraron los valores más bajos. Se encontró la coexistencia de las tres fases del ciclo de vida durante los dos años, con predominio de tetrasporofitos. Dos conjuntos de datos de individuos se analizaron por separado, los provenientes de la reproducción sexual (tetrasporas y carposporas) y de la reproducción asexual por fragmentación del talo. En la fracción de fragmentación, las frecuencias de tetrasporofitos fueron superiores a las de gametofitos. Sin embargo, en la fracción originada a partir de esporas, se observó una tasa de ploidía cercana a 0,5. Los carposporofitos estuvieron siempre presentes, con sus valores máximos en verano y en otoño. Los datos biológicos se relacionaron con factores ambientales por medio de un análisis canónico de correspondencias (ACC). El primer año se caracterizó por valores mayores de biomasa de *G. gracilis* y *Undaria pinnatifida*, menor epifitismo, talos de *Gracilaria* más grandes y una mayor proporción de tetrasporofitos y gametofitos maduros. El segundo año se caracterizó por una alta proporción de talos vegetativos de *Gracilaria* y alta densidad de epífitos. El mejor momento para obtener esporas de talos cistocápicos sería en verano y principios del otoño.

También se estudió la diversidad de epífitos creciendo sobre *G. gracilis*, su variación temporal de abundancia y la estructura anatómica de la interfase hospedante - epífito. Veintinueve especies de algas se registraron como epifitas. La densidad total tuvo valores altos durante todo el segundo año de muestreo.

Las infecciones halladas fueron clasificadas teniendo en cuenta la fuerza de adhesión y el grado de invasión de los epífitos, y el grado de daño que causó al hospedante. El tipo I de infección, que se caracteriza por epífitos débilmente unidos a la superficie del hospedante y sin dañar sus tejidos, se debió principalmente a la cianófita *Calothrix confervicola*, una de las especies más abundantes. *Ceramium rubrum*, junto con *Polysiphonia abscisa* y otras Ceramiales, fueron las especies que causaron más daño al hospedante, debido a que sus rizoides penetraron en la porción cortical, llegando a veces al tejido medular (tipo V de infección). Estas especies fueron las más abundantes durante la mayor parte del estudio.

Se realizó un estudio comparativo de las propiedades, composición y rendimiento del agar de *G. gracilis* obtenido en las cuatro estaciones del año, relacionándolo con factores ambientales y biológicos de la población. Se realizaron extracciones a diferentes temperaturas, obteniéndose el mayor porcentaje de carbohidratos a 70° C, independientemente de la estación de cosecha. En el material de otoño-invierno, se incrementó el contenido de proteínas. La agarosa de muestras de primavera-verano fue la que presentó mayor fuerza de gel. Se concluye que se puede obtener a partir de *G. gracilis* de Bahía Bustamante una agarosa de mejores propiedades gelificantes y de excelente rendimiento extrayendo a temperaturas más bajas de las habituales.

ABSTRACT

The agarophyte *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine & W.F. Farnham grows in Bahía Bustamante, Chubut province, Argentina. The biomass variation and the reproduction of the natural *Gracilaria gracilis* bed in Bahía Bustamante (Argentina) were analyzed during two years, aiming at: knowing the present situation of the population in order to get an updated status overview; establishing the relevant features of the temporal variations in both biomass and reproductive states in relation to three aspects: environmental factors, epiphytes and associated algae; and assessing the carpospore availability for future spore-culture development. Field measurements and sampling were performed monthly between March 2006 and February 2008. In both years *G. gracilis* biomass presented marked seasonal variations, with a minimum in winter and a maximum in late spring and in summer. During both years coexistence of the three life-cycle phases was found, with dominance of tetrasporophytes. Two data sets from individuals originated from sexual reproduction (tetraspores and carpospores) and from asexual reproduction by thallus fragmentation were analyzed separately. In the fragmentation fraction, tetrasporophyte frequencies remained higher than those for gametophytes. However, in the spore- originated fraction, a generation ratio close to 0.5 was observed. Female gametophytes bearing cystocarps were always present, with their maximum values in summer and in autumn. Biological data were related to environmental factors by means of a canonical correspondence analysis (CCA). The first year was characterized by higher biomass values of *G. gracilis* and *Undaria pinnatifida*, lower epiphytism, larger *Gracilaria* thalli and greater proportion of mature tetrasporophytes and gametophytes. The second year was characterized by high *Gracilaria*'s vegetative thalli proportion and high epiphyte density. The best time to obtain spores from cystocarpic thalli would be in summer and early autumn.

In this paper the diversity of epiphytes growing on *G. gracilis*, their temporal variation of abundance, and the anatomical structure of host-epiphyte interfaces were studied. Twenty-nine algal species were recorded as epiphytes during two years of monthly sampling (March 2006 - February 2008). Total epiphyte density ranged between 0.037 ind.cm⁻² (November 2006) and 35.27 ind.cm⁻² (April 2007),

with high density values during all the second sampling year. The different infections were analyzed taking into account the epiphyte attachment strength and invasiveness, and the degree of damage that it caused to the host. The Infection type I, characterized by epiphytes weakly attached to the host surface and without host tissue damage, was mainly caused by the cyanophycean *Calothrix confervicola*, one of the most abundant species. *Ceramium rubrum*, together with *Polysiphonia abscissa* and other Ceramiales were the most abundant species during most of the study. They were the species that caused more damage to the host because their rhizoids penetrated the cortical portion, reaching sometimes the medullary tissue (Infection Type V). This is the first study of epiphytism in a *Gracilaria* species of Southwest Atlantic coast.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	6
Sitio de muestreo	7
Obtención de muestras	7
Procesamiento de las muestras	8
CAPÍTULO I: DINÁMICA POBLACIONAL	10
INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Análisis estadístico multivariado	13
RESULTADOS	15
Caracterización del ambiente	15
Variación de la biomasa de <i>Gracilaria gracilis</i>	17
Fases reproductivas	18
Tamaño de talos de <i>Gracilaria gracilis</i>	25
Algas acompañantes	30
Relación entre variables biológicas y ambientales	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	41
CAPÍTULO II: EPIFITISMO	42
INTRODUCCIÓN	43
MATERIALES Y MÉTODOS	45
Microscopía electrónica de transmisión (MET)	45
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	49
RESULTADOS	51
Diversidad y abundancia de epífitos	51
Relaciones anatómicas entre <i>Gracilaria gracilis</i> y sus epífitos	57
Descripción de <i>Titanoderma</i> sp.	77
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	87

CAPÍTULO III: ESTUDIO ESTACIONAL DE LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS DEL AGAR	88
INTRODUCCIÓN	89
MATERIALES Y MÉTODOS	92
Extracción de polisacáridos	92
Métodos generales	92
Propiedades físicas del gel	93
RESULTADOS	95
DISUSIÓN	98
CONCLUSIONES	101
CONSIDERACIONES FINALES	102
BIBLIOGRAFÍA	104

INTRODUCCIÓN



GENERAL

El género *Gracilaria* Greville, perteneciente a la división Rhodophyta, comprende más de 100 especies. La mayoría de las especies están restringidas a regiones donde la temperatura del agua es igual o mayor a 20° C por al menos tres meses al año; sin embargo hay algunas especies de distribución más amplia (McLachlan y Bird 1986). Los talos son generalmente muy ramificados, de textura cartilaginosa y poseen crecimiento apical (Bold y Wynne 1985). El ciclo de vida de las especies de este género corresponde al llamado “tipo *Polysiphonia*”; este es un ciclo de vida trifásico e isomórfico (Kain y Destombe 1995). Las fases gametofítica haploide y tetrasporofítica diploide son de vida libre y morfológicamente idénticas, mientras que la fase carposporofítica diploide es dependiente del gametofito femenino y de pequeño tamaño. El carposporofito se forma luego de la fecundación de las gametas femeninas, originando gonimoblastos (2n) que producen por mitosis numerosas carposporas, dentro de cistocarpos (n), las cuales se liberan y germinan dando lugar a nuevos tetrasporofitos, que reanudan el ciclo (Fig. 1A).

Muchas de las especies del género *Gracilaria* son de considerable importancia económica a nivel mundial por su uso como fuente de agar-agar (Critchley 1993, Smit 2004). En menor medida, algunas de estas especies también son utilizadas como alimento para humanos (Hoyle 1978, Smith et al. 1984, Abbott 1988) y abalones (Cordero 2005, Rothman et al. 2009), en agricultura y medicina (Zemke-White y Ohno 1999), para remoción de nutrientes en el tratamiento de aguas, y para producción de energía (Oliveira et al. 2000). Distintas especies de *Gracilaria* son cultivadas a escala comercial en Chile, Sudáfrica, China, Taiwán e Israel (Edding et al. 1987, Levy et al. 1990, Buschmann et al. 1995).

El interés económico en este género, ha promovido su estudio desde diversos enfoques, principalmente relacionados con el cultivo. Revisiones del tema han sido realizadas, entre otros, por Santelices y Doty (1989), Critchley (1993), Buschmann et al. (1995) y Oliveira et al. (2000). Otros aspectos estudiados incluyen genética (van der Meer 1986; Destombe et al. 1989; Wattier et al. 1997, Engel et al. 2004), taxonomía (Bird y McLachlan 1982; Reading y Schneider 1986; Bird et al. 1986), reproducción (Oza y Krishnamurthy 1968, Boraso de Zaixso 1983, Infante y Candia 1988, Kain y Destombe 1995) y

contenido, estructura y propiedades físicas del agar (Matsuiro y Urzúa 1990, Pickering et al. 1993b, Marinho-Soriano y Bourret 2003, Rodríguez et al. 2009).

La taxonomía del grupo ha sido muy discutida, debido a las dificultades para identificar y caracterizar muchas de las especies descritas, basándose solo en características anatómicas del talo vegetativo (Bird y McLachlan 1982, McLachlan y Bird 1986, Bird y Rice 1990). En este contexto, diversas poblaciones de *Gracilaria*, de distintas partes del mundo, fueron identificadas como *G. verrucosa* (Romo et al. 1979, Hurtado-Ponce y Umezaki 1987, Rueness et al. 1987, Horrocks et al. 1990, Anderson et al. 1996), algunas veces erróneamente (Bird y McLachlan 1982). La incorporación de técnicas de biología molecular, ha permitido una mejor identificación de las especies descritas. Bird y Rice (1990), mediante perfiles de restricción de ADN plastidial, y Destombe y Douglas (1991) mediante secuenciación de genes, agruparon a *G. verrucosa* de Argentina con las poblaciones de Europa; separándola de las poblaciones de Carolina del Norte y de Brasil. Posteriormente *G. confervoides*, identificada en el norte del Mar Adriático (Simonetti et al. 1970) y parte de *G. verrucosa*, incluyendo las poblaciones europeas y de Argentina, fueron determinadas como *G. gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine & W.F. Farnham (Bird y Kain Jones, 1995; Steentoft et al. 1995). Con la técnica de “código de barras de ADN”, esta especie fue identificada recientemente en la parte norte de África (Guillemin et al. 2008a), y confirmada la identidad de las poblaciones argentinas (Destombe et al. 2010).

G. gracilis (Fig. 1B) se encuentra en diversas partes de Europa y África (Engel et al. 2001; Skriptsova & Yakovleva, 2002; Polifrone et al. 2006; Rebello et al. 1996; Wakibia et al. 2001, Guillemin et al. 2008a). En Argentina, ésta es la única especie del género y crece exclusivamente en la provincia de Chubut. Las praderas comerciales están restringidas a bahías relativamente pequeñas al norte del Golfo San Jorge. Estas praderas son, en orden de importancia por su biomasa y extensión, las de Bahía Bustamante, Bahía Melo y Bahía Arredondo. Varios estudios de su biología, estado reproductivo, dinámica poblacional y ecología fueron realizados durante las décadas del 80 y el 90 (Mayer 1981; Boraso de Zaixso 1983, 1984, 1987, 1989, 1995a; Boraso de Zaixso & Paternoster 1985; Boraso de Zaixso et al. 1991, 1997; Romanello et al. 1993). Sin embargo, de la pradera de Bahía Bustamante sólo se conoce información parcial (Borasos de Zaixso 1989), pese a ser una de las más importantes.

El objetivo general de este estudio fue conocer el estado reproductivo actual de la pradera natural de Bahía Bustamante, como así también los epífitos de *G. gracilis* y la estructura y propiedades físicas del agar. Información de base indispensable para un futuro desarrollo de esporocultivos.

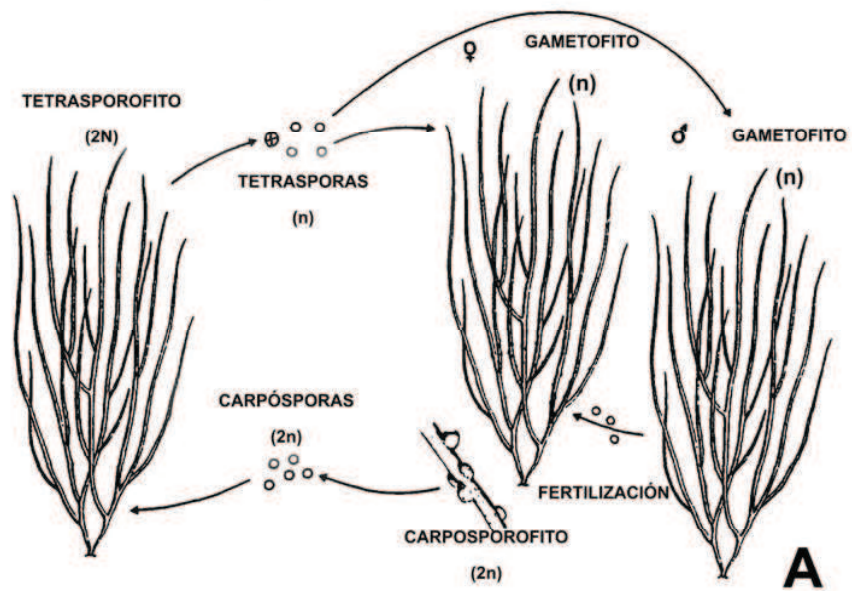
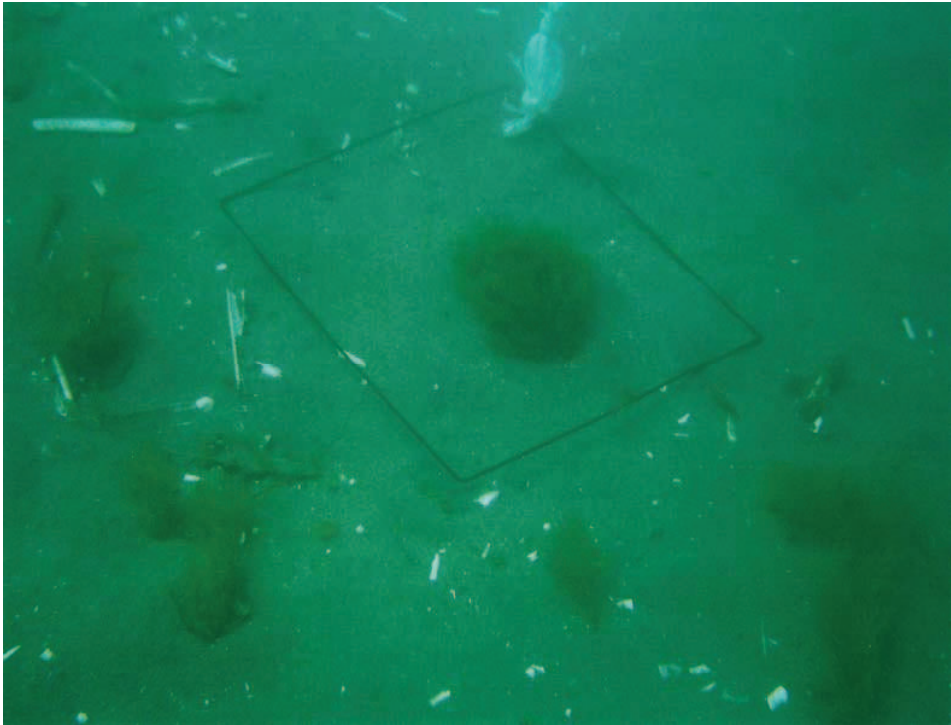


Fig. 1. A. Ciclo de vida general de *Gracilaria*. (Modificado de Kain y Destombe 1995). **B.** Vista general del talo de *Gracilaria gracilis*. Escala: 2 cm.

MATERIALES Y MÉTODOS



GENERALES

Sitio de estudio

Bahía Bustamante (45° 08 S, 66° 32 W) está ubicada en el departamento de Escalante, provincia de Chubut, en el norte del Golfo San Jorge (Fig. 2). La pradera de *Gracilaria gracilis* se desarrolla en la zona sur de la Bahía, entre 0 a 8 metros debajo del nivel medio de marea baja.

Obtención de muestras

Se realizaron mediciones de campo y muestreos mensuales durante dos períodos anuales, entre marzo de 2006 y febrero de 2008. En cuatro meses de este período, abril de 2006 y marzo, julio y diciembre de 2007, no se pudieron realizar los muestreos por condiciones climáticas desfavorables o problemas de logística. En el mes de marzo de 2006 se tomaron muestras de sedimento en cada uno de los sitios muestreados, las que fueron analizadas utilizando la técnica de granulometría tradicional (Wentworth, 1922); separando en tres fracciones: grava, arena y limo.

En cada muestreo se tomaron datos *in situ* de la temperatura subsuperficial del agua, la salinidad (Pinpoint Salinity Monitor, American Marine INC, Ridgefield, USA) y el pH. La longitud del día fue determinada en la fecha en que se realizó el muestreo. También se recolectaron muestras de agua para el análisis de los nutrientes, manteniéndose refrigeradas hasta su traslado al laboratorio. Las concentraciones de nutrientes fueron analizadas por distintas técnicas colorimétricas en un autoanalyzer Technicon II, en el Laboratorio de Química Marina del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO). Para nitratos se siguió la técnica de Treguer & Le Corre (1975), para nitritos a Grasshoff et al. (1983) y para fosfatos a Eberlein & Kattner (1987).

Las muestras de material biológico fueron colectadas por buceo autónomo, cada muestra mensual consistió en 20 unidades muestrales de 0,25 m² cada una. Sobre cuatro transectas paralelas a la línea de la costa, se ubicaron 5 unidades muestrales separadas 100 m entre sí. Al mes siguiente se reubicó cada unidad muestral mediante GPS (Garmin, eTrex Legend).

La baja relación entre la superficie muestreada y el área de muestreo permite asumir que cada muestreo no afectó a los subsiguientes. Las muestras

fueron trasladadas en bolsas plásticas y refrigeradas, para su manipulación en laboratorio.

Procesamiento de las muestras

En cada unidad muestral se determinó separadamente la biomasa húmeda escurrida de *G. gracilis*, de los epífitos de mayor tamaño, de la flora acompañante y en particular de *Undaria pinnatifida*, debido a su importancia como alga invasora, de relativamente reciente presencia en el área (Casas et al. 2004).

En cada fecha se separaron:

- a) 100 talos enteros de *G. gracilis* tomados al azar. Cuando el número total de talos no superaba los 100, se estudió la totalidad de los individuos enteros presentes. Estos talos se destinaron para estudiar sus características físicas y reproductivas (ver Materiales y métodos- Capítulo I) y su condición sanitaria (ver Materiales y métodos- Capítulo II).
- b) Fragmentos de *G. gracilis* con epifitismo evidente fueron fijados para microscopía (ver Materiales y Métodos- Capítulo II).

Para el estudio de la estructura y propiedades físicas del agar se colectaron talos de *G. gracilis*, tomados al azar, en los muestreos de mayo, agosto y octubre de 2006 y enero de 2007 (ver Materiales y Métodos- Capítulo III).

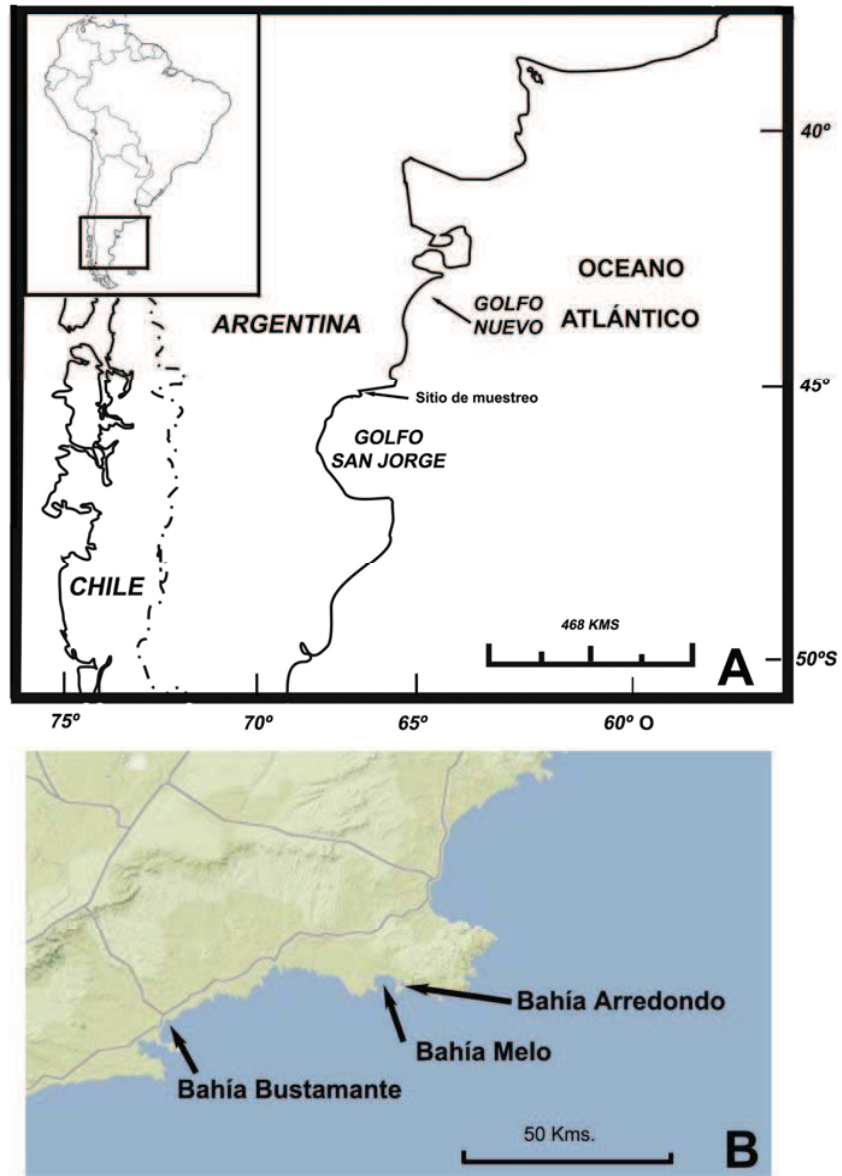


Fig. 2. Sitio de muestreo. A. Ubicación general. B. Detalle de las bahías del Golfo San Jorge donde se encuentra *G. gracilis*.

CAPÍTULO I



DINÁMICA POBLACIONAL

INTRODUCCIÓN

La población de *G. gracilis* de Bahía Bustamante ha sido una de las más productivas del país, y en ella se han realizado cosechas a partir de arribazones desde fines de la década del 60. A pesar de que la cosecha estaba restringida al material arrojado por el mar, la cantidad de algas recolectada en la década del 70, que era de entre 3.000 y 4.000 toneladas en peso seco, descendió durante la década del 80 a valores promedios de 2.000 t (Boraso de Zaixso, 1995b). A partir de la década del 90 la disminución fue aún más marcada, llegando en el año 2003 a sólo 66,1 t (Boraso de Zaixso et al. 2006).

A nivel mundial se ha observado la depleción de las praderas naturales de *Gracilaria* que fueron objeto de explotación, lo que ha llevado a desarrollar diversas técnicas de cultivo para incrementar su biomasa (Santelices & Ugarte 1987, Critchley 1993). Sin embargo, las técnicas de propagación vegetativa utilizadas, producen a la larga un envejecimiento de los cultivos, lo que obliga a un replantado constante de inóculos a partir de la población natural (Buschmann et al. 1995, 2001).

El uso de esporas como “semilla” permite producir una gran biomasa a partir de un número pequeño de talos (Santelices & Doty 1989). En Chile, principal país productor de agar, el fenómeno de envejecimiento de las poblaciones de *G. chilensis* ha ocasionado una considerable disminución de la productividad en las granjas, por lo que se ha implementado el sistema de cultivo por medio de esporas, obtenidas a partir de talos fértiles provenientes de poblaciones naturales (Infante & Candia 1988, Alveal et al. 1997). Las esporas más utilizadas son las carposporas, dado que los talos cistocárpicos, a diferencia de los tetrasporofitos, pueden ser detectados a ojo desnudo (Santelices & Doty 1989). El cultivo a partir de esporas abre perspectivas para la aplicación de técnicas de manipulación genética y desarrollo de procesos de selección de cepas para la producción de talos de mejor calidad. Para el desarrollo de esporocultivos es necesario contar con material reproductivo y conocer su disponibilidad en cada época del año, así como su distribución espacial (Dawes 1995). En Argentina no se han realizado experiencias de cultivo de *G. gracilis* a partir de esporas, solamente se han llevado a cabo algunos intentos de

propagación vegetativa a escala experimental en Golfo Nuevo (Boraso de Zaixso 1984, Casas et al. 1997, Casas & Piriz 1998).

Por todo lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron:

1) establecer los caracteres relevantes de variación temporal de biomasa y estados reproductivos en relación con factores ambientales, epífitos y algas asociadas durante dos años consecutivos

2) determinar la disponibilidad de carposporofitos, por su potencial utilidad para el desarrollo de esporocultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En todas las submuestras de 100 talos tomadas mensualmente (ver Materiales y métodos generales), se determinó el estado reproductivo de cada uno de los talos, mediante la observación con lupa binocular (Wild Heerbrugg, Massachusetts, EEUU) y microscopio óptico (Carl Zeiss Axiolab, Alemania). Los gametofitos femeninos sólo pudieron ser identificados una vez fecundados, por la presencia de cistocarpos, sin la necesidad de utilizar instrumental óptico (Fig. 3). También se determinó la longitud y el peso individual (balanza AND FK-400, \pm 0.001 g) de los talos. Se comprobó además la presencia del disco basal del talo, como indicador de su procedencia a partir de la germinación de una espora.

Análisis estadístico multivariado

Las variables biológicas consideradas en el análisis multivariado fueron: B: biomasa de *G. gracilis* (kg/m^2); ED: densidad de epífitos (ind/cm^2 sobre el talo de *G. gracilis*); UB: biomasa de *Undaria pinnatifida* (kg/m^2); AB: Biomasa de algas asociadas, excepto *U. pinnatifida* (kg/m^2); W: peso promedio de talos de *G. gracilis* (g); L: longitud promedio de talos de *G. gracilis* (cm); C: porcentaje de talos cistocárpicos de *G. gracilis*; M: porcentaje de talos masculinos maduros de *G. gracilis*; T: porcentaje de tetrasporofitos maduros de *G. gracilis*; V: porcentaje de talos vegetativos de *G. gracilis*; BD: porcentaje de talos de *G. gracilis* con disco basal.

Los factores abióticos considerados en el ACC fueron: N: nitratos ($\mu\text{moles/L}$); Ni: nitritos ($\mu\text{moles/L}$); P: fosfatos ($\mu\text{moles/L}$); D: longitud del período luminoso diario; T: temperatura ($^{\circ}\text{C}$); Y: período anual (2006-2007:1; 2007-2008:2).

Los datos biológicos fueron relacionados con los factores ambientales a través de un análisis canónico de correspondencia (ACC) (ter Braak 1986, ter Braak & Smilauer, 1998). Se usaron los datos cuantitativos no transformados y se seleccionaron las variables significativas ($p=0,05$). Un análisis de correspondencias sin tendencias fue realizado previamente para calcular el largo de gradiente y verificar que el ACC constituía un método apropiado de análisis (ter Braak 1995).

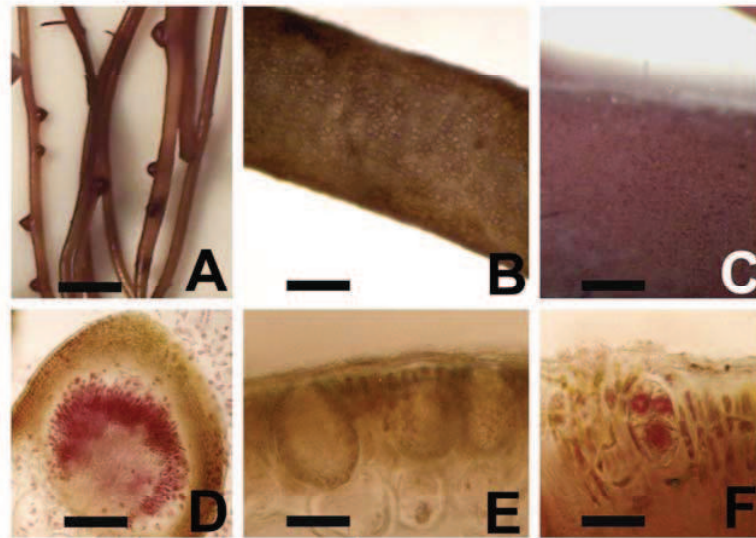


Fig. 3. Estructuras reproductivas de *G. gracilis*. **A- C:** Micrografías estereoscópicas de la superficie del talo. **D-F:** Micrografías ópticas de cortes transversales del talo. **A y D:** Carposporofito; **B y E:** Gametofito masculino; **C y F:** Tetrasporofito. Escala: A= 4000 μm ; B= 1000 μm ; C= 670 μm ; D= 160 μm ; E= 15 μm ; F=12 μm .

RESULTADOS

Caracterización del ambiente

Más de un 80% de los sitios de muestreo presentaron un sustrato correspondiente a arena media a fina, con sólo tres sitios con preponderancia de canto rodado, y un sitio con sustrato rocoso (Tabla 1). La temperatura superficial del agua varió en el período entre 7° C en agosto de 2007 y 18 ° C en febrero de 2008 (Fig. 4A). El pH varió entre 7,3 en agosto de 2007 y 7,8 en enero de 2008 (Fig. 4A). La salinidad osciló entre 33,8 y 34,4 PSU.

Con respecto a los nutrientes disueltos, tanto nitratos como nitritos tuvieron los valores máximos observados en otoño de ambos años, el de nitratos en mayo del 2006, con 5,65 $\mu\text{moles/L}$ y el de nitritos en mayo de 2007, con 0,34 $\mu\text{moles/L}$ (Fig. 4B). Las mediciones de fosfatos tuvieron los máximos valores en otoño y primavera de cada año, alcanzando 2,73 $\mu\text{moles/L}$ en junio de 2007 (Fig. 4B).

Muestra	Arena Fina	Arena Media	Canto Rodado	Roca
1	7,61	91,22	0,80	0
2	8,65	90,25	0,93	0
3	0,80	23,34	75,59	0
4	0,76	99,04	0,09	0
5	3,20	96,56	0,10	0
6	1,12	93,22	5,46	0
7	1,28	98,49	0,60	0
8	0,21	98,57	1,14	0
9	5,53	93,32	0,31	0
10	15,85	83,38	0,31	0
11	11,41	87,15	0,53	0
12	9,66	89,58	0,30	0
13	0,99	22,14	76,68	0
14	10,18	88,43	1,26	0
15	5,87	93,57	0,23	0
16	0,00	0,00	0,00	100
17	4,20	95,40	0,24	0
18	0,23	2,70	97,01	0
19	4,58	92,88	0,86	0
20	4,25	95,21	0,28	0
21	0,99	98,70	0,13	0
22	15,36	84,18	0,09	0

Tabla 1. Composición porcentual del sustrato en Bahía Bustamante en cada unidad muestral.

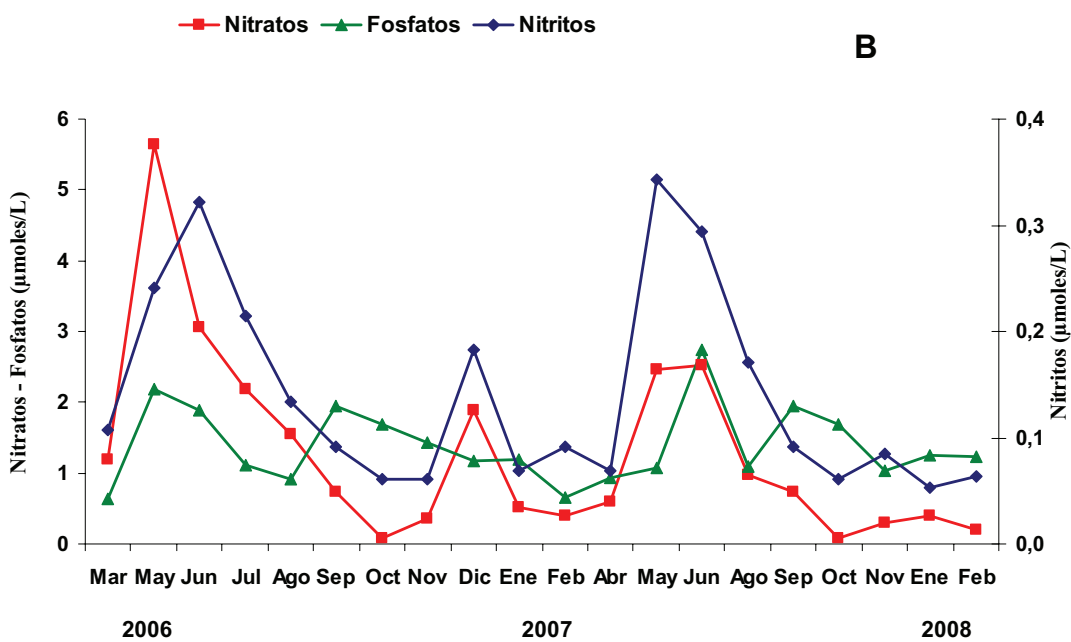
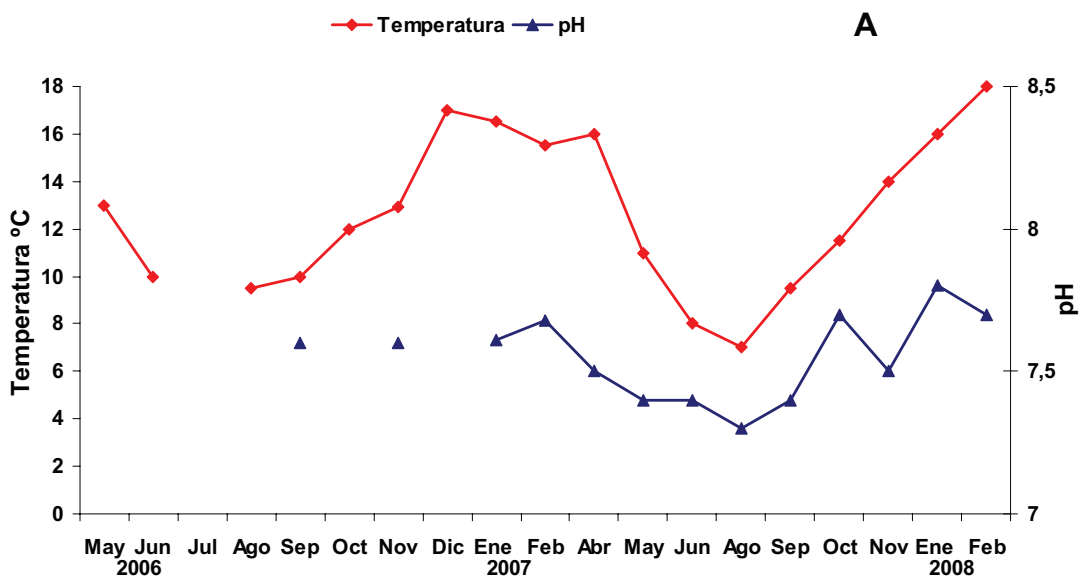


Fig. 4. Variables fisicoquímicas medidas en Bahía Bustamante. **A.** Temperatura y pH. **B.** Nutrientes disueltos.

Variación de la biomasa de *Gracilaria gracilis*

Se encontró una importante variación interanual de la biomasa de *G. gracilis*. Durante el primer período anual la biomasa promedio fue de 1,79 Kg/m² y en el segundo período de 0,79 Kg/m² (Fig. 5). Se hallaron diferencias significativas entre los dos años (ANOVA, $p < 0,05$). La biomasa promedio mensual más alta se observó en diciembre de 2006, con 4,27 Kg/m² ($\pm 5,23$ Kg/m²) y el valor mínimo de biomasa mensual promedio fue de 0,02 Kg/m² ($\pm 0,04$ Kg/m²), en septiembre de 2007, luego de una fuerte tormenta. Una situación especial se observó en noviembre de 2006, donde el promedio de biomasa fue alto (3,7 Kg/m²), pero presentó una gran variación (EE=6.14), debido a valores muy elevados en algunas unidades muestrales y valores nulos en otras.

En ambos años se observó la mayor biomasa a fines de primavera y verano, y en el invierno de cada año se registraron los valores más bajos de biomasa, con un promedio de 1,02 Kg/m² en 2006 y de 0,27 Kg/m² en 2007.

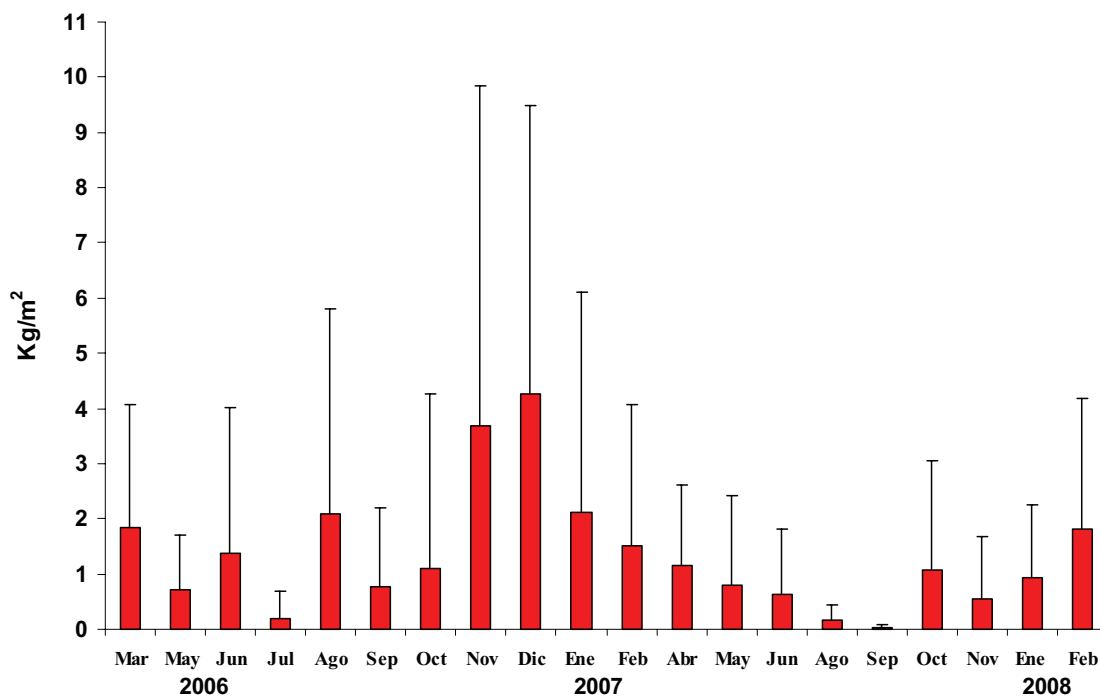


Fig. 5: Variación de la biomasa húmeda de *G. gracilis*. Las barras indican Error Estándar.

Fases reproductivas

En general la proporción de tetrasporofitos fue mayor que la de gametofitos (femeninos + masculinos), observándose un máximo de 70% en noviembre de 2006. Sin embargo, los gametofitos igualaron o superaron a los tetrasporofitos en marzo de 2006, mayo y octubre de 2007 y enero de 2008, alcanzando un valor máximo de 60% en marzo de 2006 (Fig. 6). Los carposporofitos (gametofitos femeninos fecundados) estuvieron presentes durante todo el estudio, excepto en agosto de 2007. El porcentaje máximo se observó en mayo de 2006, con 29% de carposporofitos. Los gametofitos masculinos también estuvieron presentes durante los dos años del estudio, variando su proporción entre 4,3% en septiembre de 2007 y 29% en marzo de 2006, sin presentar una variación estacional evidente. Los talos vegetativos tuvieron un máximo en la primavera del año 2007, representando en el mes de noviembre el 67% de la población. En diez de los muestreos realizados se observó la presencia de talos con fases mezcladas, con ramas carposporofíticas creciendo sobre tetrasporofitos (Fig. 7). La máxima proporción fue registrada en febrero de 2007, con 6 talos sobre un total de 65 observados, todos sin disco basal (Fig. 6).

La proporción de gametofitos y esporofitos fue comparada con el test de χ^2 entre las fracciones de la población originadas por germinación de esporas (provistas de disco basal) y la fracción producida por fragmentación de talos (sin disco). Se encontraron diferencias significativas para el primer año ($\chi^2= 4,82$, 1 *g.l.*, $P<0,05$) y diferencias altamente significativas para el segundo año ($\chi^2= 20,8$, 1 *g.l.*, $P<0,01$). Teniendo en cuenta su diferente composición, las fracciones de la población fueron separadas en los análisis posteriores.

La tasa de ploidía (talos diploides/ (talos diploides + talos haploides)) en la fracción de la población proveniente de fragmentación fue generalmente mayor que 0,5, alcanzando un valor de 0,86 en agosto de 2007 y febrero de 2008. (Fig. 8). La fracción proveniente de esporas (fracción sexual) presentó una tasa de ploidía entre 0,14 en mayo de 2007 y 1, en enero de 2007, con un promedio de 0,5 para todo el período muestreado (Fig. 8).

En la fracción producida por fragmentación (Fig. 9A), la proporción de tetrasporofitos fue mayor que la de gametofitos, alcanzando 75% en febrero de 2008. Los gametofitos sobrepasaron a los tetrasporofitos sólo en junio de 2006,

pero con una tasa de ploidía cercana a 0,5. Los carposporofitos estuvieron ausentes en julio de 2006 y agosto de 2007; el máximo porcentaje de los mismos se observó en mayo de 2006, con 30% de carposporofitos. Los gametofitos masculinos también estuvieron presentes durante los dos años en la fracción producida por fragmentación. Su proporción varió entre 3,4% en febrero de 2008 y 27,1% en marzo de 2006, sin mostrar una variación estacional evidente. La proporción de talos vegetativos tuvo un máximo en la primavera de 2007, representando el 69,4% de la población en noviembre. La proporción de sexos (gametofitos masculinos/gametofitos masculinos + gametofitos femeninos) varió entre 0,2 y 1 en esta fracción. Cuando el número total de talos de los dos años se tomó en cuenta, la proporción de sexos fue 0,54 (Fig. 10).

En la fracción sexual (Fig. 9B), la proporción de tetrasporofitos fue más variable que en la fracción de fragmentación, alcanzando el 100% en enero de 2007, pero con un número de talos de sólo 4. El porcentaje de tetrasporofitos de los demás meses, fluctuó entre 9,1 y 81,2%, en octubre y noviembre de 2006, respectivamente. Los carposporofitos estuvieron ausentes en la fracción sexual en octubre de 2006, enero, junio y agosto de 2007. En mayo de 2007, se observó el máximo de carposporofitos, con 40%. Los gametofitos masculinos tuvieron un máximo de 43% en octubre de 2007. En la fracción sexual, los talos vegetativos mostraron una variación estacional, con una proporción mayor a fines de invierno y principios de primavera de ambos años, alcanzando un máximo de 61% en noviembre de 2007. La proporción de sexos de la fracción proveniente de esporas varió entre 0 y 1, con un valor promedio de 0,54 (Fig. 10). Cuando la proporción de sexos se calculó con el número total de talos, se obtuvo el mismo valor de 0,54.

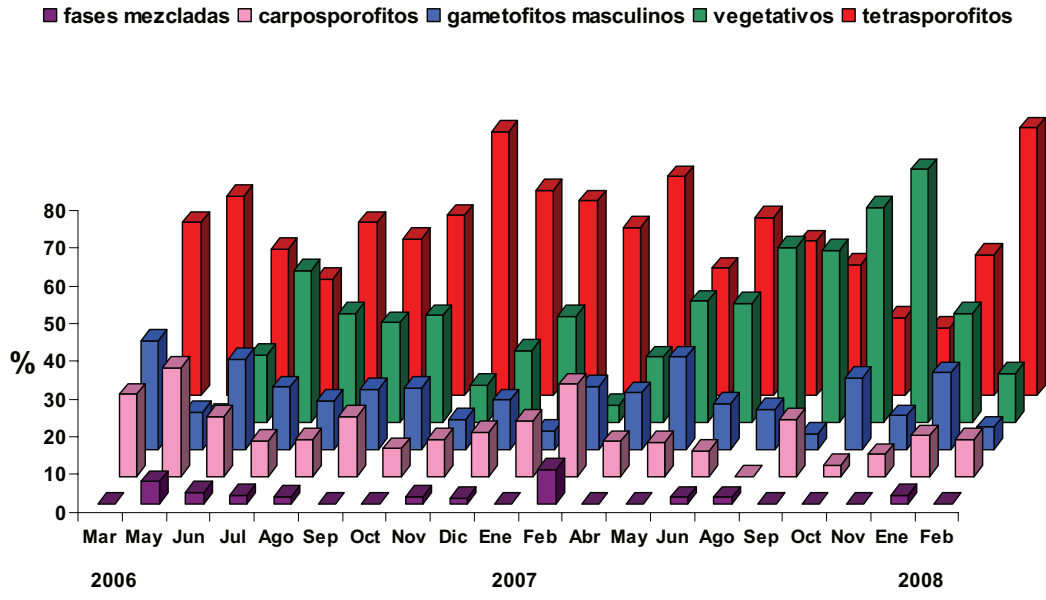


Fig. 6. Variación porcentual de las fases del ciclo de vida de *G. gracilis*.

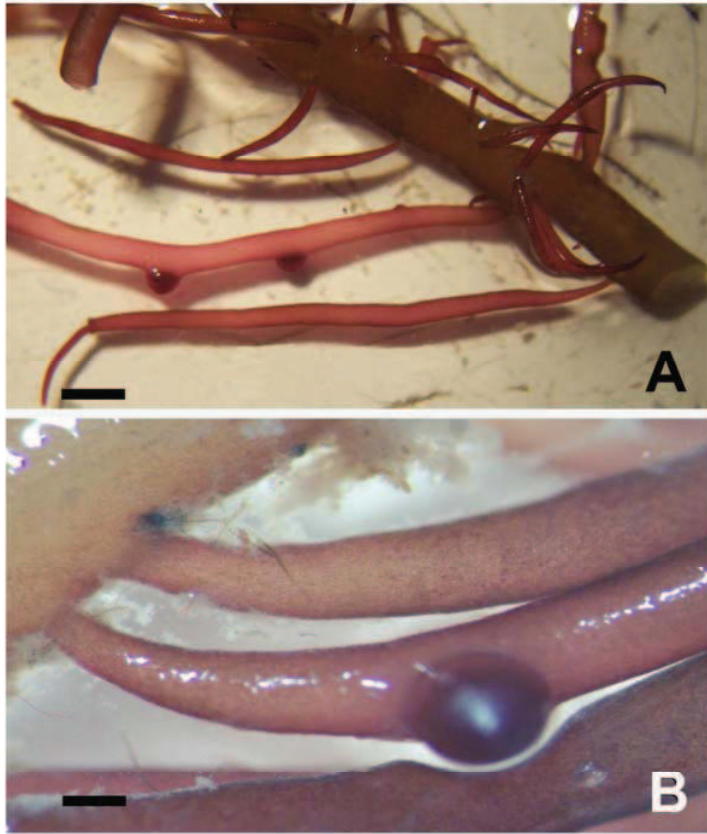


Fig. 7. Talo de *G. gracilis* con fases mezcladas. **A-B.** Micrografías estereoscópicas. **A.** Vista general. **B.** Detalle de una rama con un cistocarpo y una rama con tetrasporangios. Escala: A= 2000 μm ; B= 700 μm .

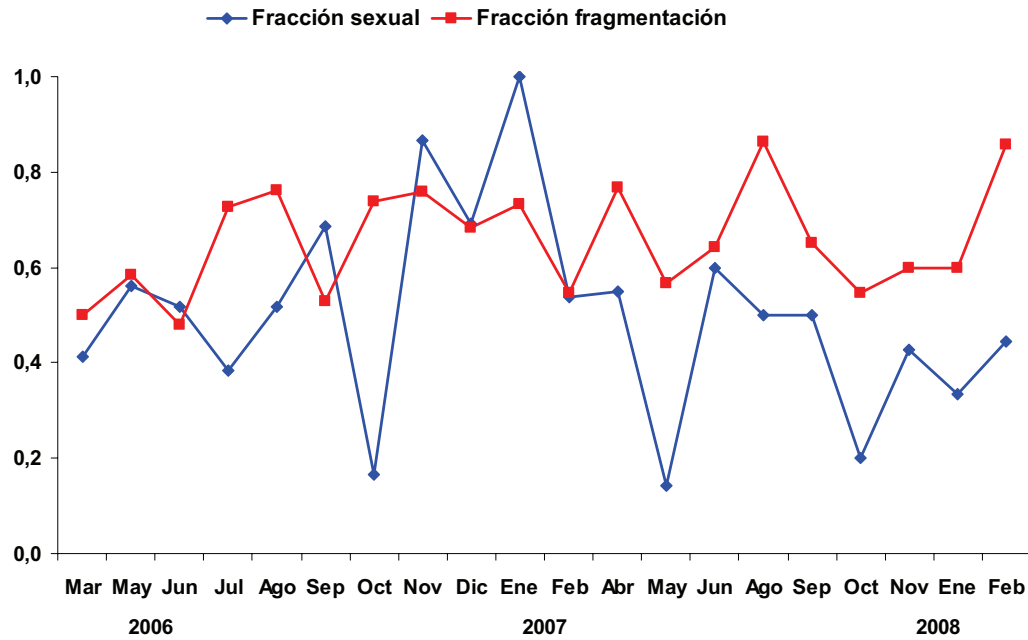


Fig. 8. Tasa de ploidía para la fracción de la población de *G. gracilis* proveniente de la germinación de esporas o sexual y la fracción proveniente de fragmentación de talos.

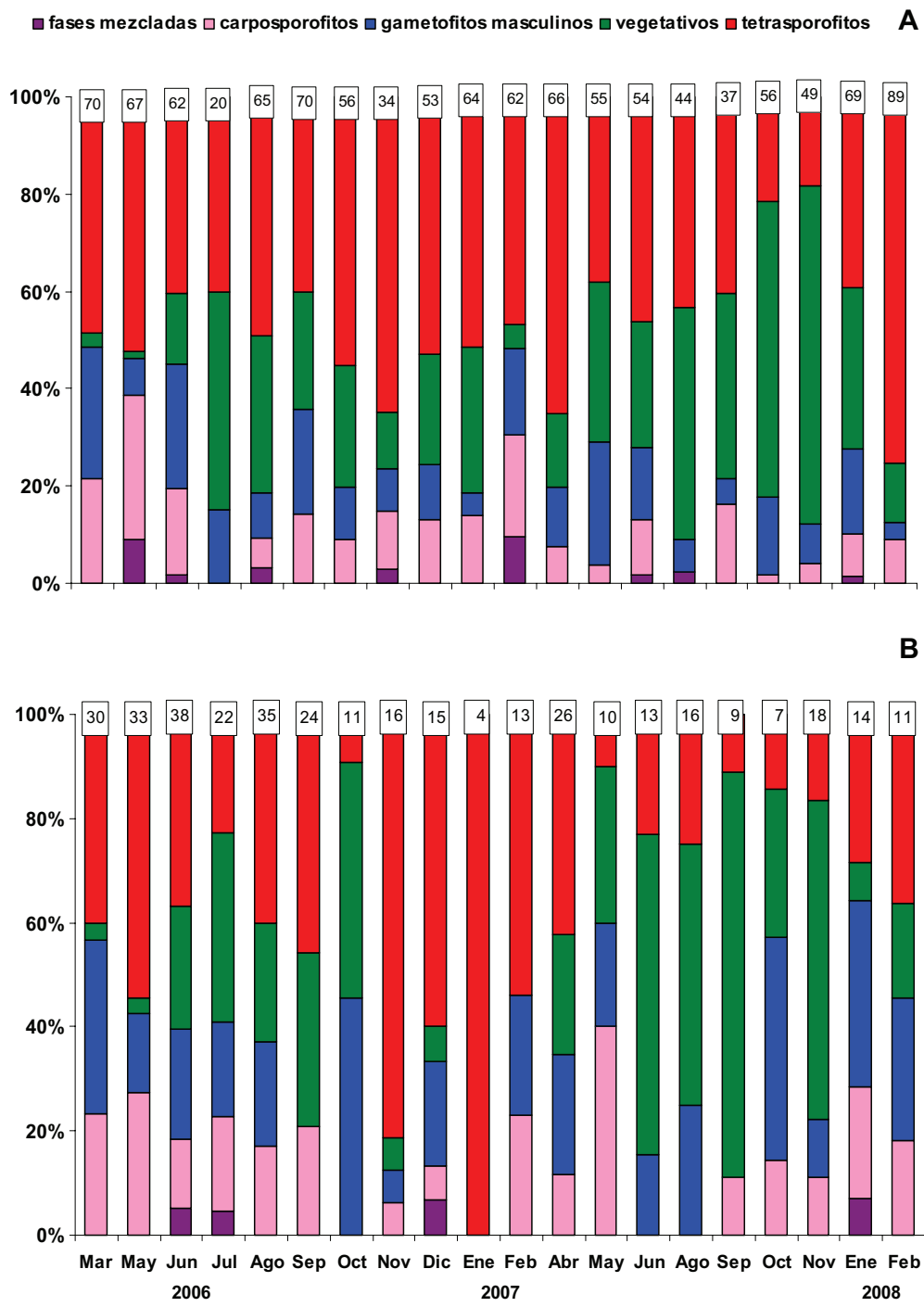


Fig. 9. Fases reproductivas en cada fracción de la población. **A.** Fracción producida por fragmentación. **B.** Fracción sexual o proveniente de esporas. En la parte superior de cada barra se encuentra el número total de talos (N).

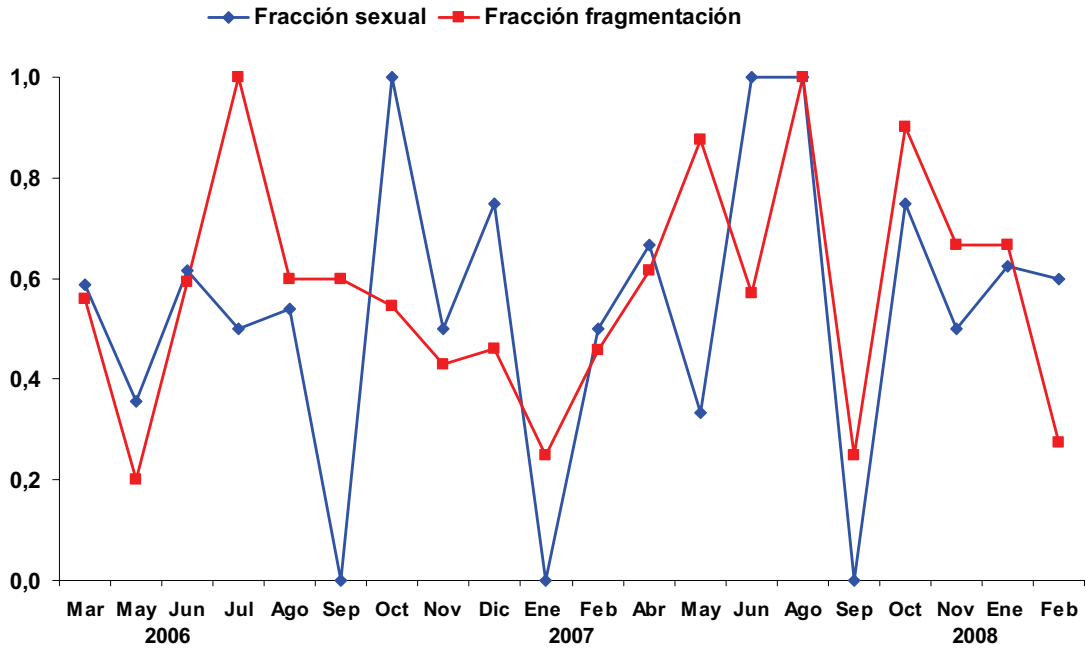


Fig. 10. Variación de la proporción de sexos en la fracción proveniente de la germinación de esporas o sexual y en la fracción proveniente de fragmentación de talos.

Tamaño de talos de *Gracilaria gracilis*

Los promedios de peso y longitud individuales tuvieron una tendencia general decreciente desde principios de 2006 hasta fines de 2007, con variaciones pronunciadas. Ambos valores variaron hacia una tendencia creciente en los primeros meses de 2008 (Fig. 11).

El mayor valor promedio de peso fue en marzo de 2006, con 13,5 g, donde un 37% de los talos estuvo entre 5 y 10 g; mientras que el mínimo se observó en noviembre de 2007 con 1,6 g, con 82% de los talos menores a 5 g. (Figs 11A y 12). La longitud promedio máxima fue de 59,9 cm en marzo de 2006, donde 32% de los talos tuvieron una longitud entre 45 y 60 cm. La longitud promedio mínima fue de 14,3 cm en septiembre de 2007, con 72% de los talos menores a 15 cm (Figs 11B y 13).

Teniendo en cuenta el resultado del test de χ^2 (ver Fases reproductivas, este capítulo), se analizó el tamaño de talos en forma separada para las fracciones producidas, a partir de fragmentación y a partir de esporas. En la fracción producida por fragmentación, el peso promedio máximo fue de 15,1 g en marzo de 2006, mientras el mínimo fue de 1,2 g en noviembre de 2007 (Fig. 14A). En la fracción sexual, el peso promedio máximo fue de 16,4 g en enero de 2007, mientras que el peso mínimo fue de 2,4 g en mayo de 2007 (Fig. 14A).

La mayor longitud promedio en la fracción producida por fragmentación fue de 67,6 cm en marzo de 2006, mientras un mínimo de 14,8 cm fue observado en septiembre de 2007 (Fig. 14B). En la fracción sexual, la máxima longitud promedio fue de 52,4 cm en mayo de 2006, con un mínimo en septiembre de 2007 de 11,5 cm (Fig. 14B).

No se encontraron diferencias significativas entre ambas fracciones, tanto para el peso promedio (ANOVA, 38 g.l., $P=0,054$.) como para la longitud promedio (ANOVA, 38 g.l., $P>0,2$).

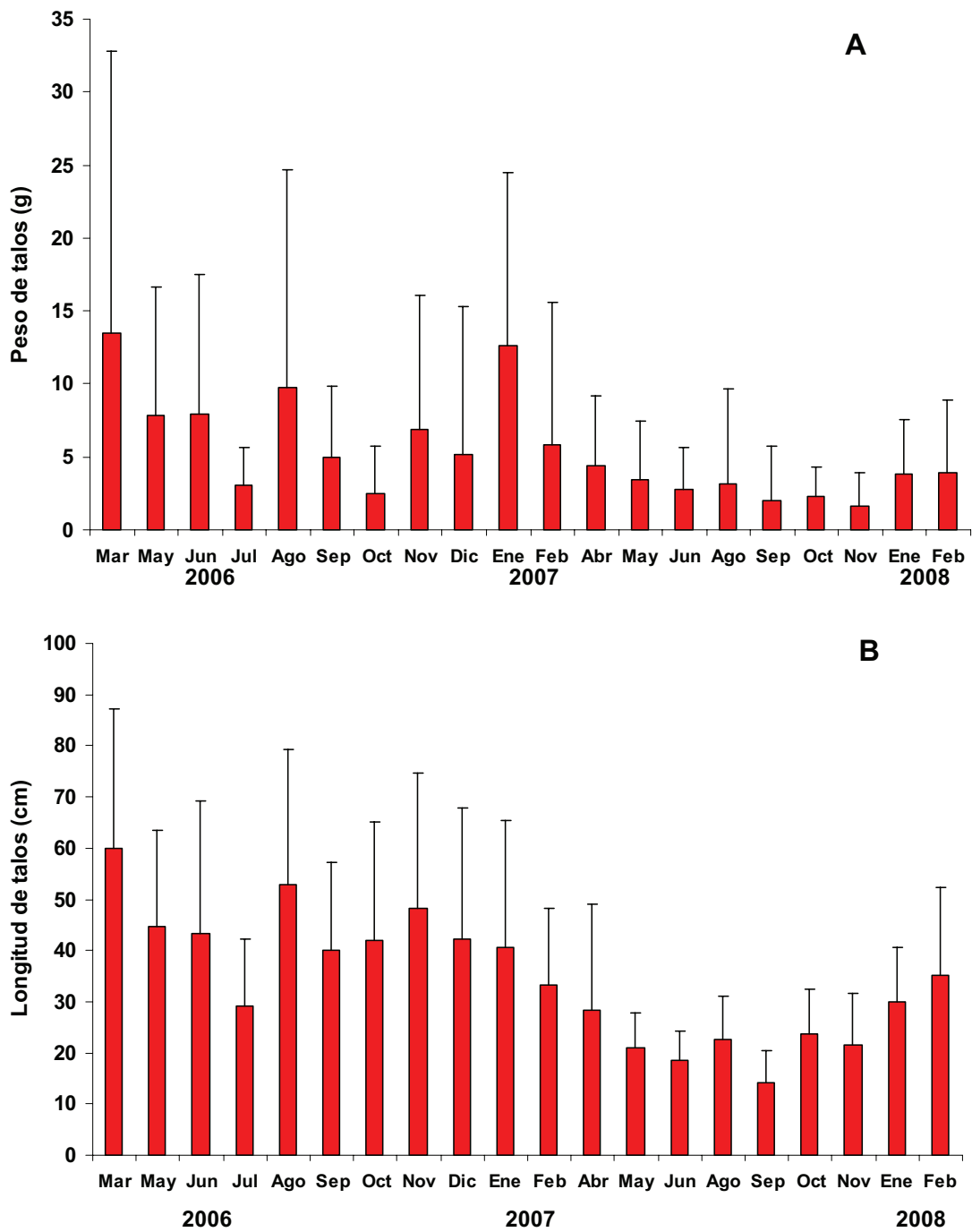


Fig. 11. Tamaño promedio mensual de los talos de *G. gracilis*. **A.** Promedio mensual del peso individual fresco. **B.** Promedio mensual de la longitud. Las barras indican Error Estándar.

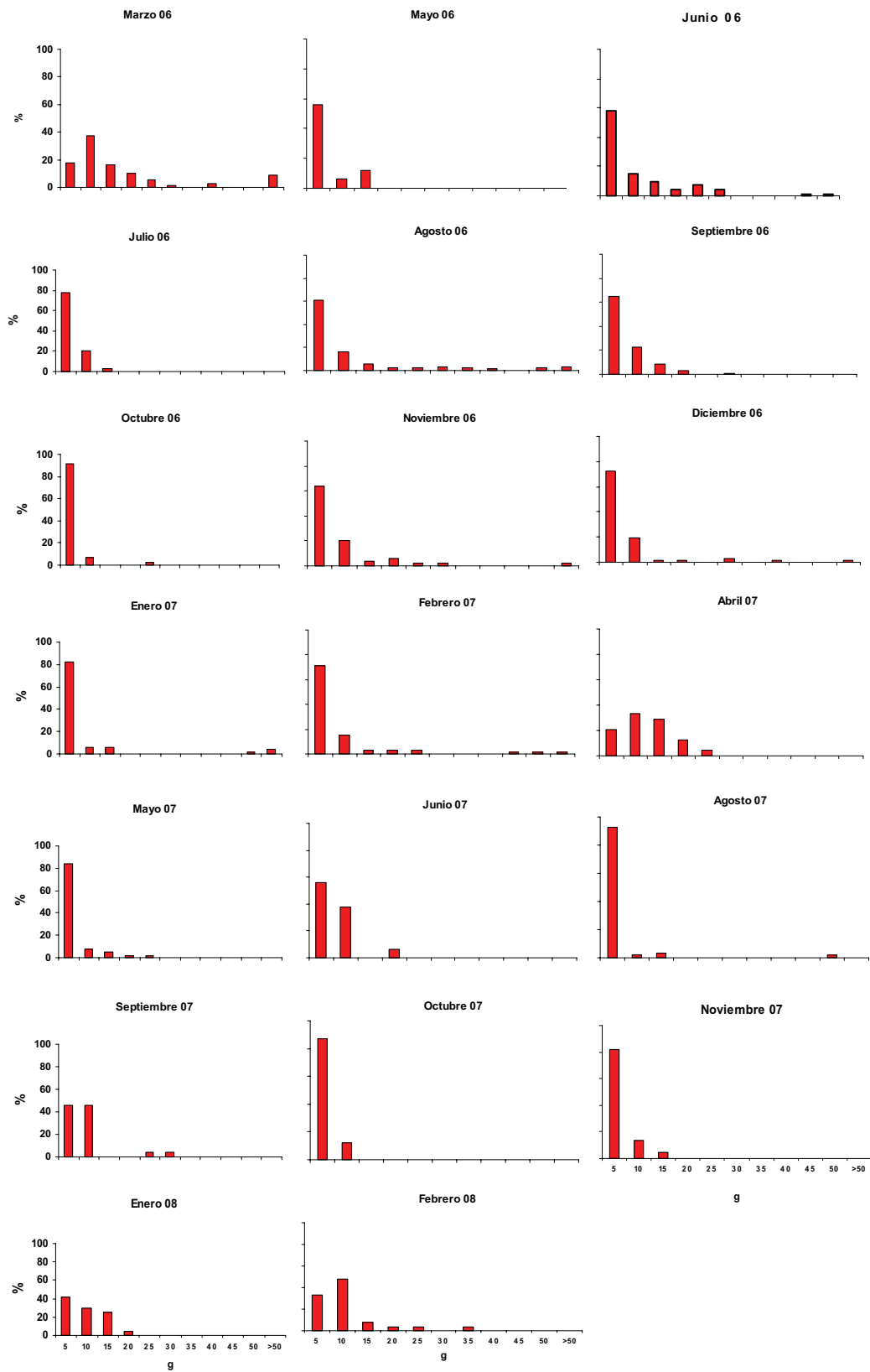


Fig. 12. Frecuencias de los valores de peso fresco individual. Los valores en abscisas representan el valor mayor del rango.

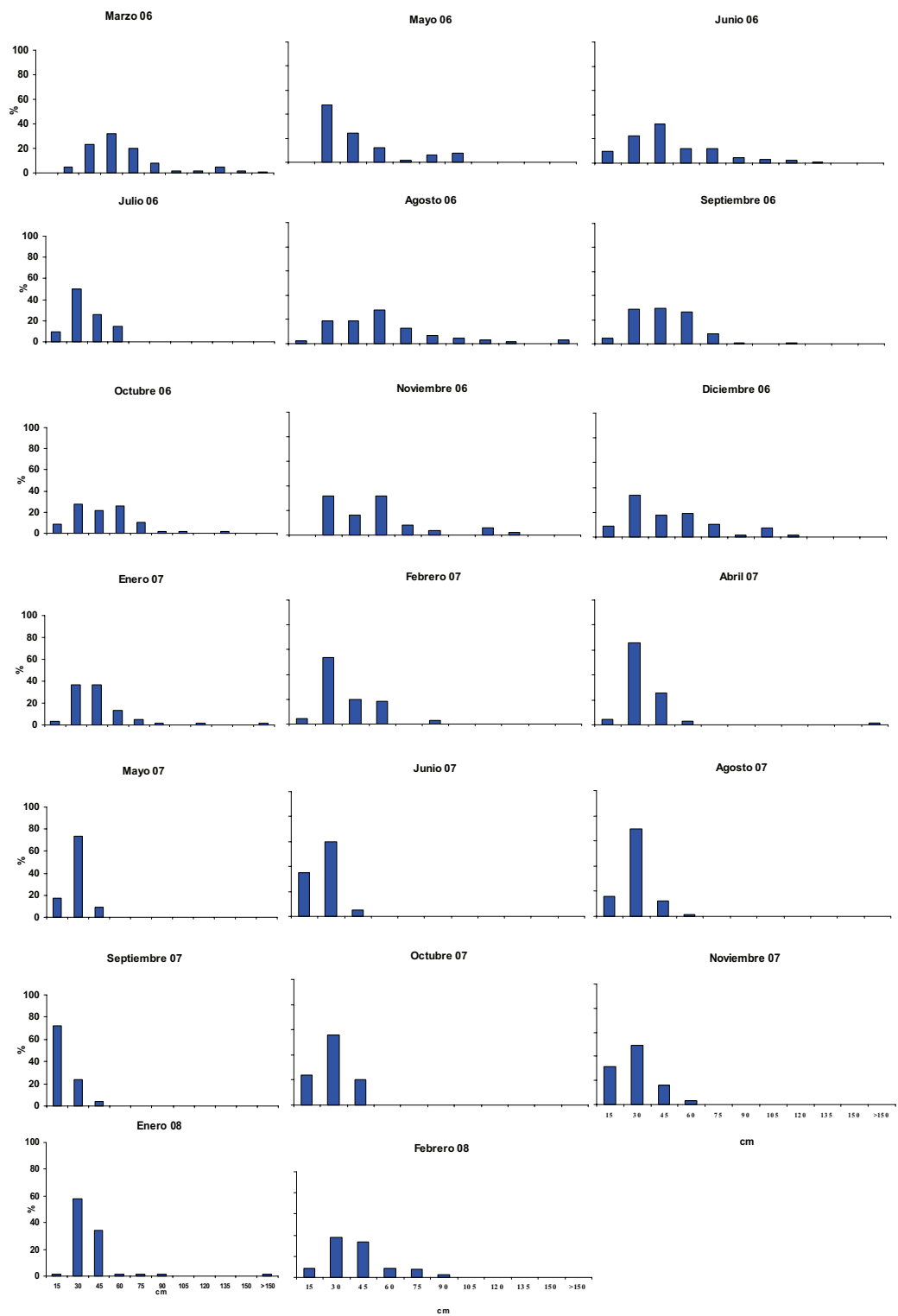


Fig. 13. Frecuencias de los valores de longitud individual. Los valores en abscisas representan el valor mayor del rango.

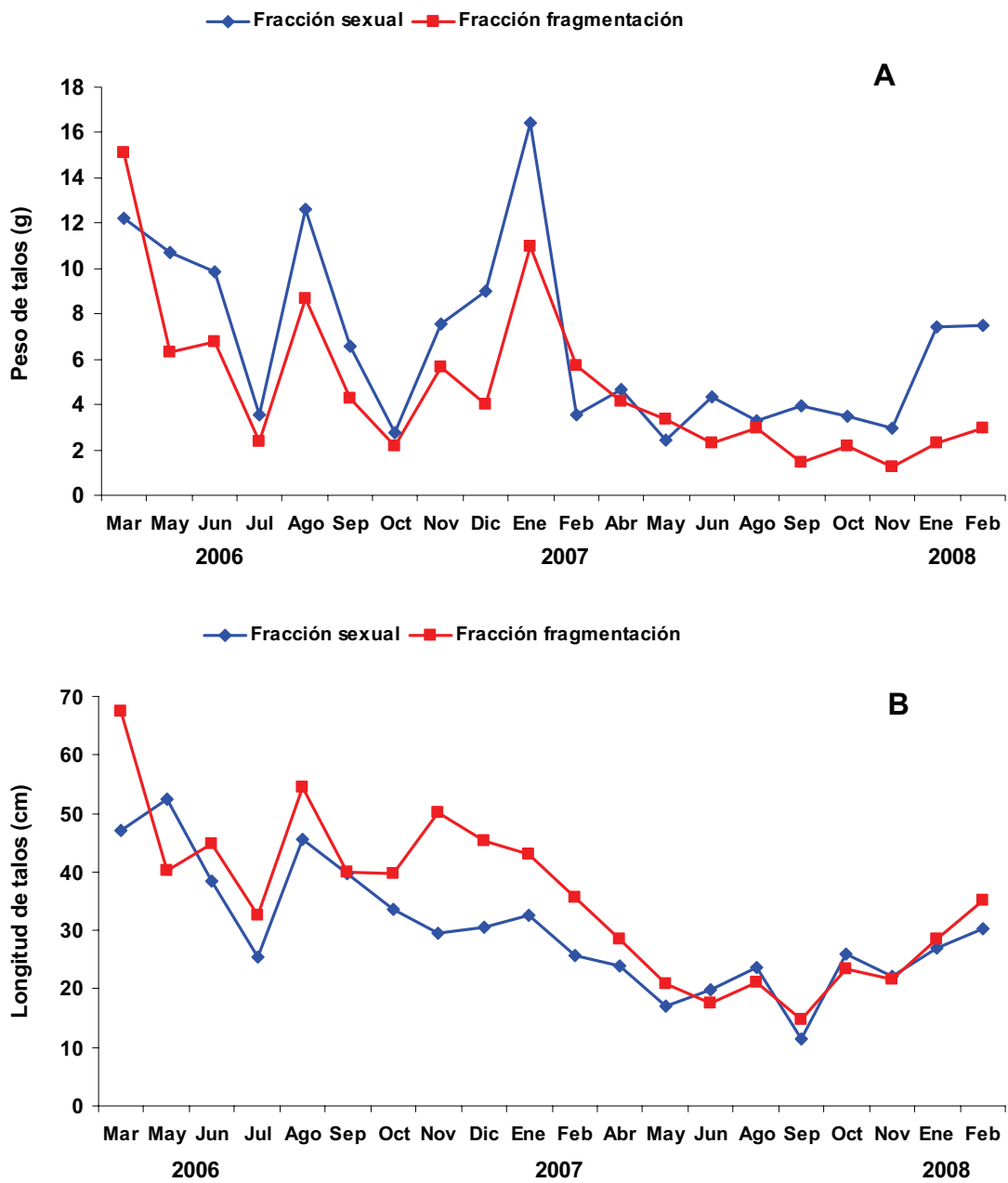


Fig. 14. Tamaño de los talos para cada fracción de la población de *G. gracilis*. **A.** Peso **B.** Longitud.

Algas acompañantes

Las biomásas más altas de algas acompañantes se observaron a fines de invierno y en primavera de ambos años. En el primer año, la mayor parte de la biomasa de algas asociadas fue aportada por *Undaria pinnatifida* (Fig. 15) representando entre el 60 y el 90 % de la biomasa de acompañantes en primavera-verano de 2006, y alcanzando 1,34 kg/m² en noviembre de 2006 (Fig. 16). Durante el segundo período la biomasa de *U. pinnatifida* disminuyó marcadamente, en tanto que las demás algas, principalmente especies del orden Ceramiales, alcanzaron los valores máximos de biomasa (Fig. 16).

Las biomásas promedio de *U. pinnatifida* y *G. gracilis* exhibieron variaciones similares, con valores altos en primavera-verano de 2006 y bajos en otoño-invierno de 2007 (Fig. 16). Una recuperación de la biomasa fue observada en primavera-verano de 2007, sin alcanzar los valores observados durante el primer año. En febrero de 2008, los valores de biomasa de *G. gracilis* y su relación con la biomasa de algas acompañantes, se recompusieron y fueron similares a los observados al comienzo del estudio (Fig. 16).



Fig. 15. Vista general de un talo joven de *Undaria pinnatifida*.
Escala: 2 cm.

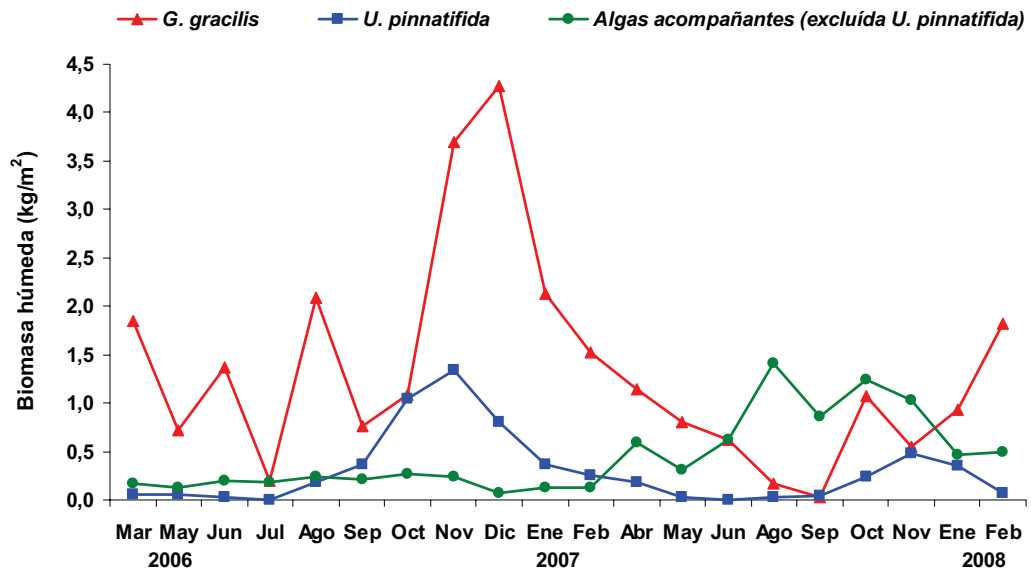


Fig. 16. Variación mensual de la biomasa húmeda de *G. gracilis* y algas acompañantes.

Relación entre variables biológicas y ambientales

De los factores abióticos ingresados al Análisis Canónico de Correspondencias (ACC) resultaron significativos la longitud del día, la temperatura y la concentración de nitrógeno como nitratos, no así la concentración de fosfatos, la cual fue eliminada del modelo explicativo por el programa. La información aportada por la concentración de nitritos resultó redundante por presentar la misma variación que nitratos.

Los tres primeros ejes del ACC explican el 97,4% de la variación conjunta de los factores ambientales y las variables biológicas. (Tabla 2)

El eje I se relaciona principalmente con las diferencias interanuales entre el primer período (marzo de 2006 a febrero de 2007) y el segundo (abril de 2007 a febrero de 2008) (Fig. 17). El primer año de estudio se caracterizó por mayores biomasa de *G. gracilis* y de *U. pinnatifida*, menor epifitismo, talos de *G. gracilis* de mayor tamaño y con mayor proporción de individuos reproductivos, características ubicadas en el semiplano negativo del eje I. El segundo año de muestreo se ubica sobre el semiplano positivo del eje I, caracterizado por baja biomasa de *G. gracilis* y *U. pinnatifida* y alta del resto de las algas acompañantes, alta densidad de epífitos y alta proporción de plantas vegetativas de *G. gracilis*.

La combinación de los ejes I a III ordena a las fechas del muestreo estacionalmente (Fig. 17).

El eje II separa a las fechas de verano- otoño de las de invierno- primavera. El tercer eje refuerza el carácter estacional de la variación biológica, separando otoño e invierno sobre el semiplano positivo, de primavera y verano sobre el semiplano negativo. El nivel relativamente alto de nitratos en otoño aporta también a la definición de este eje (Fig. 17)

Ejes		I	II	III	IV
Autovalores		0,092	0,038	0,008	0,004
Correlación entre variables biológicas y ambientales		0,906	0,806	0,536	0,460
% de varianza acumulada	De descriptores ambientales	34,1	48,4	51,3	52,7
	De relación de descriptores biológicos y ambientales	64,7	91,8	97,4	100,0

Tabla 2. Resultados del ACC para variables biológicas y ambientales.

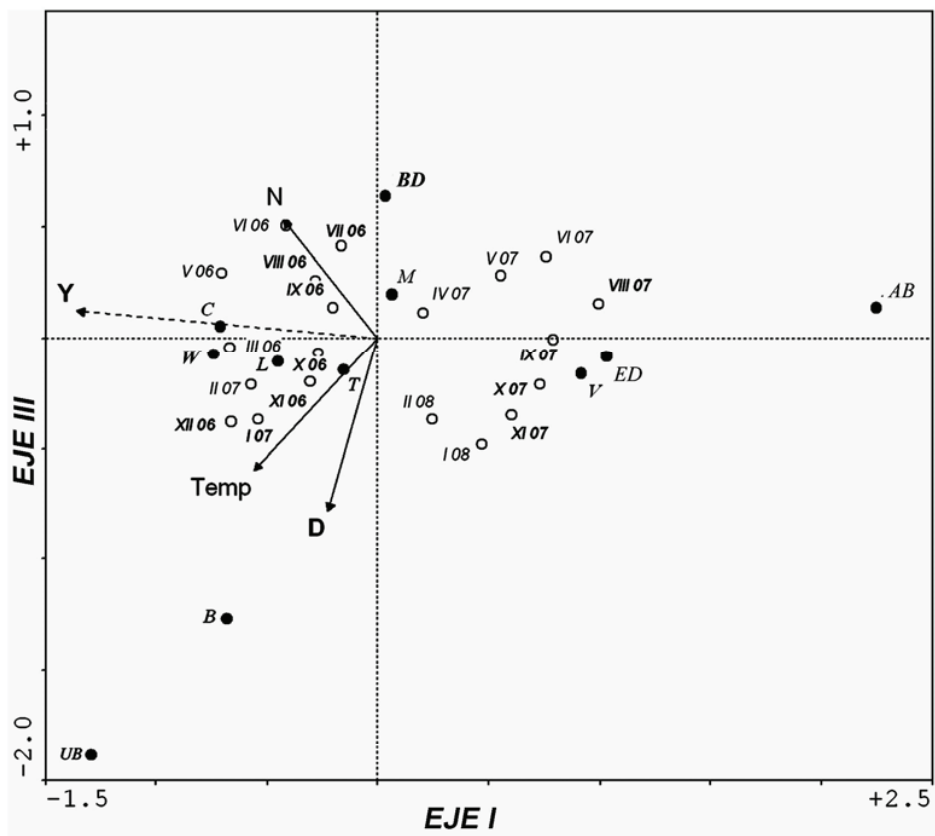


Fig. 17. Biplot de los ejes I y III del ACC: Asociación entre variables biológicas y ambientales. B: biomasa de *G. gracilis*; ED: densidad de epífitos; UB: biomasa de *Undaria pinnatifida*; AB: Biomasa de algas asociadas; W: peso promedio de talos de *G. gracilis*; L: longitud promedio de talos de *G. gracilis*; C: porcentaje de plantas cistocárpicas; M: porcentaje de talos masculinos maduros; T: porcentaje de tetrasporofitos maduros; V: porcentaje de talos vegetativos; BD: porcentaje de talos con disco basal; N: nitratos; D: longitud del período luminoso diario; Temp: temperatura; Y: período anual.

DISCUSIÓN

Durante los dos años muestreados se halló presencia conjunta de las tres fases del ciclo de vida. Se observaron épocas con mayor proporción de talos vegetativos, y épocas en que la mayoría de los talos estuvieron maduros, con preponderancia de tetrasporofitos. Sin embargo, en cuatro de las fechas los gametófitos superaron a los tetrasporofitos. La dominancia de la fase tetrasporofítica también ha sido indicada en poblaciones naturales de varias especies del género, como *G. edulis*, *G. foliifera*, *G. chilensis*, *G. bursapastoris*, *G. coronopifolia*, *Gracilaria* (tipo “verrucosa”); *G. dominguensis*, *G. cervicornis*, *G. cornea* y *G. damaecornis* (Umamaheswara Rao 1973, Hoyle 1978, Romo & Alveal 1979, Whyte et al. 1981, Hay & Norris 1984, Pinheiro-Joventino 1986, Orduña-Rojas & Robledo 2002 y Brito & Silva 2004). Con respecto a *G. gracilis*, dominancia de tetrasporofitos fue indicada para poblaciones de Francia e Italia (Marinho-Soriano et al. 1998, Polifrone et al. 2006). Sin embargo, también se han observado tanto poblaciones sin dominancia de fases en Francia y Argentina (Destombe et al. 1989, Boraso de Zaixso 1989), como poblaciones con predominio de gametofitos en Filipinas e India (Trono & Azanza-Corrales 1981; Oza et al. 1989). La percepción de la abundancia relativa de talos de una fase depende también de la duración del período en que la misma aparece como vegetativa. Los máximos relativos de talos vegetativos encontrados en este estudio son sucedidos, luego de aproximadamente tres meses, por máximos de tetrasporofitos. Una relación similar se encontró entre talos vegetativos y tetrasporofitos en la población de Golfo Nuevo (Borasos de Zaixso 1983). Esta relación permite suponer que estos talos vegetativos son, en su mayoría, tetrasporofitos aún indiferenciados. En Bahía Bustamante no se observó una alternancia clara entre las fases gametofítica y esporofítica, como la señalada para Golfo Nuevo, sino que coexisten ambas fases durante todo el año como en Bahía Arredondo (Borasos de Zaixso & Paternoster 1985, Borasos de Zaixso, 1995a).

Hoyle (1978) ha indicado que idealmente las fases gametofítica y tetrasporofítica en especies de *Gracilaria* podrían ocurrir en una proporción 1:1.

Sin embargo, Destombe et al. (1989) y Thornber & Gaines (2004), elaboraron modelos para rodófitas en los que a igualdad de fertilidad entre haploides y diploides la proporción de diploides sería menor. Engel et al. (2001) indicaron que el balance en la tasa de ploidía, estaría dado fundamentalmente por la dinámica de supervivencia de las distintas fases. Por su parte Scrosati & DeWreede (1999) y Thornber & Gaines (2004) plantearon que la dominancia podría deberse a una diferencia en la producción de esporas de las distintas fases; en tanto que Fierst et al. (2005) indicaron a la fertilización como un proceso clave en la determinación de la proporción haploide:diploide en rodófitas.

Dixon (1965) ha propuesto que la dominancia de una fase podría estar relacionada con la distribución geográfica de la especie, con dominancia de una fase en los límites de distribución de la especie. Esta idea es apoyada por el hecho de que la población de Bahía Bustamante representa el límite sur de distribución de esta especie sobre la costa de Argentina. De acuerdo a Kain & Destombe (1995) y Boraso de Zaixso (1996), el sustrato es otro aspecto que puede influir en la relación de fases, ya que el establecimiento de las esporas se dificulta en un sustrato blando, predominando en este caso la reproducción vegetativa y por consiguiente una fase única. Sin embargo, en este estudio, pese a un predominio de sustrato blando, se observó reclutamiento a partir de esporas, indicado por porcentajes apreciables de talos de *Gracilaria gracilis* con disco, y además presencia simultánea de las tres fases. Comparando con las poblaciones de Golfo Nuevo y de Bahía Melo (Borasos de Zaixso 1983, Borasos de Zaixso et al. 1997), la proporción de talos provenientes de germinaciones en Bahía Bustamante fue la más baja registrada en la zona. Aún así, en julio de 2006 se observó más del 50% de talos con disco. Esto coincidió con uno de los promedios más bajos de peso y longitud de los talos, lo cual refuerza la idea de un reclutamiento.

La presencia de fases mezcladas ha sido indicada en reiteradas oportunidades en ésta y otras especies del género (Oliveira & Plastino 1984; Destombe et al. 1989; Prieto et al. 1991; Brito & Silva 2004; Polifrone et al. 2006). Aunque varias hipótesis han sido propuestas para explicar las causas de la presencia de fases mezcladas (Kain & Destombe 1995), el tipo de anomalía encontrado en nuestro caso, de tetrasporofitos con carposporofitos epífitos, ha sido atribuida principalmente a la germinación de tetrásporas *in situ* (Oliveira &

Plastino 1984, Candia 1988, Polifrone et al. 2006). Esta idea es corroborada por las observaciones de Destombe et al. (1989), que obtuvieron el mismo tipo de anomalía cuando hicieron crecer talos de *G. gracilis* diploides en laboratorio.

Para poblaciones naturales de distintas especies de *Gracilaria*, especialmente en latitudes altas, se ha encontrado una estacionalidad en el crecimiento y reproducción, con mayores tasas de crecimiento en primavera y/o verano y bajo o nulo crecimiento en invierno (Kain & Destombe 1995). Boraso de Zaixso et al. (1997) constataron correlación de la biomasa en *G. gracilis* de Bahía Melo con altos niveles de temperatura y luz. Orduña-Rojas & Robledo (2002) encontraron que la biomasa estaba significativamente correlacionada con la temperatura en *G. cornea*. Estas observaciones acerca de la importancia de la temperatura son apoyadas por trabajos experimentales. Levy et al. (1990), trabajando en laboratorio con ejemplares de *G. gracilis* provenientes de Argentina, obtuvieron los menores valores de crecimiento a 10 ° C, y mayores entre 16 y 28°C. En una cepa de *G. gracilis* proveniente de Puerto Madryn, Argentina, Macchiavello et al. (1998) obtuvieron, tasas de crecimiento mayores a distintas intensidades lumínicas entre los 25 y 28° C. Por otro lado, Rebello et al. (1996), observaron en un cultivo a cielo abierto de *G. gracilis* de Namibia, un crecimiento diario máximo en primavera entre 21,5 y 25,5° C; y mínimo en otoño.

La biomasa de *G. gracilis* en Bahía Bustamante presentó variaciones muy marcadas entre los dos años, con un mínimo en invierno y con una mayor biomasa a fines de primavera y verano en ambos períodos, asociadas al aumento de temperatura y longitud del día. Estas observaciones coinciden con las indicadas para poblaciones naturales de la misma especie en Golfo Nuevo y Bahía Melo (Borasos de Zaixso 1983; Borasos de Zaixso et al. 1997). Así mismo, Casas & Piriz (1998) obtuvieron máximos de biomasa en primavera y verano en ensayos de cultivo en Golfo Nuevo.

DeBoer (1981) ha señalado a la disponibilidad de nutrientes como uno de los principales factores que regula el crecimiento y la reproducción en algas. En este estudio los niveles de fosfatos no parecen haber sido limitantes en el desarrollo de la biomasa de *G. gracilis* o demás descriptores biológicos. Por el contrario, los niveles de nitratos y nitritos mostraron cierta relación inversa con las biomásas de *G. gracilis* y *U. pinnatifida* en la misma fecha o en fechas próximas. Se observó una tendencia decreciente de los nutrientes desde sus máximos en

otoño (nitratos y fosfatos) y primavera (fosfatos) hasta fines de verano, lo que podría deberse al consumo por parte de *G. gracilis* y sus epífitos y algas acompañantes. Estos datos son compatibles con lo que se conoce de la estrategia de *G. gracilis* y otras especies respecto a los nutrientes. Smit et al. (1997) han indicado que *G. gracilis* puede almacenar nitrógeno, soportando períodos prolongados con bajos niveles de nutrientes en el medio, por lo que este nutriente puede ser asimilado por el alga cuando las condiciones ambientales, principalmente la temperatura y la radiación lumínica, son más apropiadas para el crecimiento, como en primavera y comienzo del verano.

De acuerdo a Boraso et al. (2006) los principales factores que regulan la variación temporal de abundancia de las poblaciones de *G. gracilis* de Argentina, son el ciclo reproductivo, la capacidad de propagación vegetativa de la población y las pérdidas de biomasa por tormentas. Algunos de estos mecanismos responderán a factores estacionales y otros a la intensidad, periodicidad y momento de las tormentas, que si bien son más frecuentes en invierno, pueden ocurrir en cualquier época del año. Una evidencia de la influencia de tormentas se observó en este estudio en el mes de septiembre de 2007, donde se obtuvieron los valores más bajos de biomasa pocos días después de fuertes tormentas. Una situación distinta se dio en noviembre de 2006, donde a pesar del elevado promedio de biomasa encontrado, se registró una gran variación espacial, con numerosas unidades muestrales sin individuos, lo que podría también atribuirse a las tormentas previas al muestreo. De acuerdo a Santelices & Fonck (1979) y Santelices et al. (1984) los cambios rápidos espaciales y temporales en la biomasa de *G. chilensis* son consecuencia de la presencia de talos subterráneos, que resisten a las pérdidas por tormenta y regeneran talos erectos con la aparición de condiciones propicias. Este mecanismo se observó también en *G. gracilis*, especialmente en la población de Bahía Melo (Boraso de Zaixso et al. 1997).

Los valores promedio de biomasa de *G. gracilis* obtenidos en este estudio para el período 2006-2008, se encuentran en el rango de variación de estudios anteriores en otras poblaciones de la especie en Argentina, con un máximo superior a los anteriormente citados (Tabla 3). Además, fueron mayores a los observados en la misma localidad en los años 1986-1987 (Boraso de Zaixso 1989), siendo más del doble en el primer año del presente estudio. Esta mayor

biomasa puede deberse, en parte a la recomposición natural de la pradera, pero también puede reflejar el menor aprovechamiento por parte de los concesionarios, como lo indican los datos estadísticos de cosecha de *G. gracilis* a partir de arribazones en la provincia de Chubut en las últimas décadas (Boraso de Zaixso et al. 2006). Esto permitiría que gran parte de la biomasa de arribazones fuera arrastrada nuevamente al mar, favoreciendo la propagación vegetativa.

Con respecto a las algas acompañantes, se evaluó especialmente la presencia del alga parda *Undaria pinnatifida*, por su carácter de invasora (Casas & Piriz 1996, Piriz & Casas 2001), constatándose su presencia durante la mayor parte del estudio, y alcanzando valores de biomasa importantes en cada verano. La interacción entre el alga invasora y *G. gracilis* estaría determinada por el tipo de sustrato, ya que *U. pinnatifida* se desarrolla preferentemente sobre sustratos duros (Martin & Bastida 2008), mientras que la pradera de *G. gracilis* de Bahía Bustamante se asienta sobre sustratos arenosos. Sin embargo, Casas et al. (2004), mediante experimentos manipulativos de la abundancia de *U. pinnatifida* en Golfo Nuevo, comprobaron el desplazamiento de *G. gracilis* de los lugares en los que se encontraba el alga invasora. Por lo tanto, en Bahía Bustamante, si bien *U. pinnatifida* no afectaría a la mayor parte de la población de *G. gracilis*, podría estar evitando una mayor expansión de esta pradera. Para comprobar fehacientemente esta hipótesis, serían necesarios experimentos manipulativos en la zona en estudio.

La proporción de biomasa de *G. gracilis* respecto del total de biomasa algal varió entre un 3% en septiembre de 2007 y un 87 % al principio del estudio, y la calidad de biomasa como materia prima fue muy baja durante 2007, debido al elevado epifitismo. Al final del estudio, en febrero de 2008, tanto los valores de biomasa como la proporción de *G. gracilis* con respecto a la biomasa total, se encontraron recompuestos y similares a los indicados al comienzo del estudio.

	Golfo Nuevo ¹	Bahía Arredondo ^{1,2,3}	Bahía Melo ^{3,4,5}	Bahía Bustamante ⁴	Bahía Bustamante (este estudio)
Biomasa húmeda (g/m ²)	22,5 -947,9	342,6 - 3120	68,1- 3316,5	200 - 1000	30 - 4270
Proporción de fases (%)					
Tetrasporofitos	2-64	0-61	<10	30	18-71
Carposporofitos	1-47	0-30			0-36
Gametofitos masculinos	2-32	0-11			4-35
Vegetativos	4-83	24-92			1-67
Longitud (cm)	15-40	80 (máximo)	16-65		14,3-59,9
Peso individual (g)	0,5-9,23	5,3-71,9			1,6-13,5

Tabla 3. Comparación de biomasa, proporción de fases, tetrasporofitos, carposporofitos, gametofitos masculinos, talos vegetativos, longitud y peso individual de poblaciones de *G. gracilis* en distintos sitios de Chubut, Argentina. 1: Boraso de Zaixso 1983; 2: Mayer 1981; 3: Boraso de Zaixso 1995; 4: Boraso de Zaixso 1989; 5: Romanello et al. 1993.

CONCLUSIONES

Tanto la propagación vegetativa como la reproducción a través de esporas, con preponderancia de la primera, están involucradas en el mantenimiento de la pradera de *G. gracilis* en Bahía Bustamante.

El sustrato arenoso juega un rol importante en esta pradera, al reducir la propagación mediante esporas, y favorecer la propagación vegetativa de la población.

Hay una coexistencia de las distintas fases del ciclo de vida de *G. gracilis* durante todo el año, en vez de una alternancia entre gametofitos y esporofitos. La dominancia de los tetrasporofitos sobre los gametofitos estaría dada principalmente por una mayor ventaja en la propagación vegetativa de esta fase, como lo indica el análisis por separado de las fracciones de la población.

Las variables biológicas, incluyendo la biomasa, mostraron claras diferencias interanuales, sin estar relacionadas a cambios significativos de las variables ambientales. Estos resultados indican la importancia de extender los estudios por más de un año.

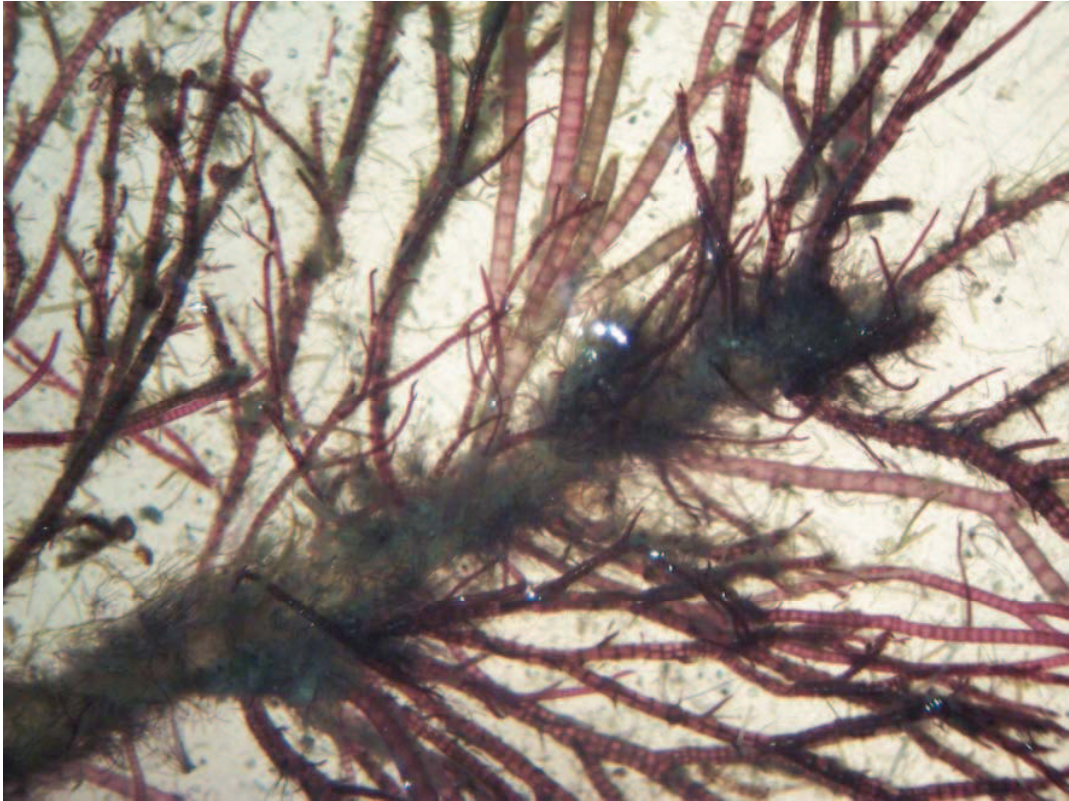
Las variaciones estacionales de biomasa y estados reproductivos están relacionados principalmente con los cambios de temperatura del agua y la longitud del día. Además hay una incidencia importante de eventos ocasionales como las tormentas.

Los valores de biomasa obtenidos fueron mayores que los observados en la misma localidad en los años 1986-1987 (Boraso de Zaixso 1989), siendo más del doble en el primer año del presente estudio.

La presencia de *Undaria pinnatifida* en Bahía Bustamante no estaría representando un problema importante para la población de *G. gracilis*, dado que hay una diferenciación en el sustrato utilizado por cada especie.

La mejor época para disponer de talos cistocárpicos sería en los meses de verano y principios de otoño, cuando fue registrada la mayor proporción de carposporofitos y los valores de biomasa fueron elevados. Se evidenció además la viabilidad de las carposporas por la presencia en el medio natural de tetrasporofitos con disco basal, provenientes de la germinación de las mismas.

CAPÍTULO II



EPIFITISMO

INTRODUCCIÓN

En el ambiente marino, uno de los recursos que puede ser limitante, es el sustrato a colonizar. Muchas especies han adoptado el epifitismo como estrategia para evadir esta limitación. Los epífitos pueden afectar al hospedante de diversas maneras. El crecimiento del hospedante se puede ver reducido marcadamente debido al efecto de sombreado que provocan los epífitos (Kuschel & Buschmann 1991, Buschmann & Gomez 1993) y a la remoción competitiva de nutrientes y carbón inorgánico de la columna de agua (Sand Jensen, 1977). Otro efecto desfavorable es el incremento en el peso y el “efecto arrastre” ejercido sobre el hospedante por los epífitos; éstos debilitan al hospedante, haciéndolos mucho más vulnerables a la fragmentación o pérdida del talo entero del sustrato, especialmente en períodos de incremento del movimiento de agua (Kuschel & Buschmann 1991, Buschmann & Gomez 1993, González et al. 1993). El daño causado en el tejido del hospedante, puede promover, además, la entrada de bacterias y patógenos (Vairappan 2006, Vairappan et al. 2008). En el caso de hospedantes de interés económico, una carga importante de epífitos causa además una reducción en el valor del recurso explotado (Buschmann et al. 2001, Vairappan 2009).

También se pueden encontrar algunos efectos positivos de los epífitos sobre el hospedante, por ejemplo, protegerlo de herbívoros, o de otros factores de estrés, como la desecación en los ambientes intermareales.

Los hospedantes, a su vez, pueden afectar su comunidad de epífitos, a través de la defensa mecánica o química (Davis et al. 1989, Wahl 1989). Muchos estudios han indicado que los metabolitos secundarios de algas pueden afectar el establecimiento de esporas algales y larvas de invertebrados (Clare 1995, Steinberg et al. 2001). Gran parte de los metabolitos secundarios con acción sobre epífitos han sido encontrados en algas pardas (Sieburth & Conover 1965, Poore 1994, Jennings & Steinberg 1997), aunque hay algunos trabajos sobre algas rojas (de Nys et al. 1995), incluyendo especies de *Gracilaria* (Weinberger & Friedlander 2000).

Dado su interés económico, se han estudiado los epífitos de distintas especies de *Gracilaria*, generalmente relacionados con los cultivos, tanto en

sistemas abiertos, submareales e intermareales (Kuschel & Buschman 1991, Buschmann et al. 1997, Buschmann et al. 2001, Leonardi et al. 2006); como en cultivos cerrados (Edding et al. 1987, Friedlander 1992, Pickering et al. 1993, Svirski et al. 1993, Friedlander et al. 1996, 2001). Una revisión sobre epifitismo en cultivos de *Gracilaria* fue efectuada por Fletcher (1995). Algunos trabajos han sido realizados en praderas naturales (Brawley & Xiugeng 1988, González et al. 1993, Buschman et al. 1997) y hay un número reducido de trabajos experimentales (Buschman & Gómez 1993). Varios investigadores se han ocupado de las relaciones químicas entre los epífitos y su hospedante (Santelices & Varela 1993, Friedlander et al., 1996; Weinberger & Friedlander 2000, Friedlander et al., 2001), mientras que pocos trabajos han abordado la relación anatómica entre el epífito y el hospedante (Dawes et al. 2000, Leonardi et al. 2006, Muñoz & Fotedar 2010).

Respecto a *G. gracilis*, es casi nula la información referida a la diversidad de sus epífitos y a su variación estacional. Boraso de Zaixso (1983) enumera los principales epífitos encontrados en Golfo Nuevo y Bahía Arredondo, sin cuantificarlos; y Casas & Piriz (1998) citan los más abundantes en Golfo Nuevo.

De acuerdo a lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron:

- 1) identificar las especies de epífitos creciendo sobre *G. gracilis* en Bahía Bustamante.
- 2) determinar su abundancia y variación temporal.
- 3) describir los diferentes tipos de relaciones anatómicas entre los epífitos y *G. gracilis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En cada submuestra mensual (ver Materiales y métodos generales) se evaluó la densidad de epífitos mediante observación con lupa binocular, expresándola como número de epífitos por cm² de talo de *G. gracilis*.

Para la identificación de las especies se empleó la siguiente bibliografía: Skottsberg (1907, 1921), Taylor (1939), Papenfuss (1964), Mendoza (1969), South (1980), Lazo (1982), Ricker (1987), Horta (2002), Wiencke & Clayton (2002), Mateo Cid et al. (2003), Boraso de Zaixso & Akselman (2005). El esquema taxonómico se organizó siguiendo el utilizado en Guiry & Guiry (2008).

El mecanismo de infección de cada especie se estudió con microscopía óptica y electrónica.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Fijación primaria: Se seleccionaron fragmentos de talos que contenían la interacción epífito-hospedante. El material fue fijado en glutaraldehído al 3 %, paraformaldehído 1,5 % en buffer cacodilato de sodio 0,1 M y sacarosa 0,25 M, en baño de hielo durante 2 horas.

Lavados: Se realizaron 4 lavados de 10 minutos en buffer cacodilato 0,1 M con concentraciones decrecientes de sacarosa de 0,25 M, 0,2 M, 0,1 M y sin sacarosa, en baño de hielo durante 20 minutos cada uno.

Fijación secundaria: se postfijó en tetróxido de osmio al 2 % en buffer cacodilato en baño de hielo en oscuridad durante 2 horas. Al fijador se le agregó ferricianuro de potasio al 1 % para la mejor preservación de las membranas.

Lavados: se realizaron 4 lavados de 15 minutos en buffer cacodilato en baño de hielo.

Deshidratación: el material fue deshidratado por inmersión en series de concentración crecientes de acetona: 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 % (en baño de hielo hasta acetona 70 %) durante 15 minutos cada uno; dos pasajes de acetona 100 % durante 10 minutos cada uno y un cambio de 15 minutos.

Imbibición: se procedió a la imbibición del material en una serie de soluciones acetona - resina Spurr de baja viscosidad (Spurr 1969) en concentraciones crecientes.

Preparación de la resina Spurr:

La resina Spurr consta de los siguientes elementos:

VCD: dióxido vinil ciclohexano (monómero)	10 gr
DER: éter de diglicidil polipropilenglicol (flexibilizador)	15 gr
NSA: anhídrido nonenil succínico (endurecedor)	41 gr
S1: dimetil amino etanol (acelerador)	41,4 gr

La imbibición se realizó por dos métodos:

1- Goteo: Se gotearon sobre el material las soluciones acetona - resina Spurr en concentraciones crecientes (25%-100%):

Spurr 25 %: 1 gota cada 5 minutos durante 1 hora y media; 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Spurr 50 %: 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Spurr 75 %: 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Spurr 100 %: 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Se dejó el material toda la noche en Spurr 100 % destapado bajo campana hasta la evaporación total de la acetona.

Cambio de Spurr 100 %.

2- En rotor: Se colocó al material en rotación continua en las soluciones acetona - resina Spurr en concentraciones crecientes (25%-100%):

Spurr 25 % durante 8 horas

Spurr 50 % durante 15 horas

Spurr 75 % durante 6 horas

Spurr 100 % Tubos Eppendorf tapados durante 4 horas aproximadamente y destapados hasta la mañana siguiente.

Cambio de Spurr 100 %

Inclusión: Se acondicionó a material para su ulterior polimerización. Se utilizaron dos métodos:

a- Inclusión plana (Reymond & Pickett-Heaps 1983): este método se usó con materiales pequeños y permitió elegir bajo microscopio la porción de material a

cortar. Se lavaron portaobjetos nuevos, se secaron y flamearon para eliminar la humedad. Se rociaron con teflón en aerosol en una cara del portaobjetos y dejaron secar. Una vez secos, se frotaron con servilleta satinada hasta que estuvieron brillantes, para que quede sobre el vidrio una capa de teflón delgada y de espesor uniforme.

Se ubicó bajo lupa el material sobre la cara teflonada del portaobjetos y luego se agregó resina para cubrir todo el portaobjetos. Se colocó otro portaobjetos teflonado encima, dejando parte de cada uno de los extremos sin superponer.

b- Inclusión en cápsulas BEEM: este método se usó cuando el material era grande y no era necesario elegir previamente la zona para cortar. Se colocó el material en el fondo de una cápsula BEEM y se acomodó con una aguja bajo lupa. Luego se llenó la cápsula con resina hasta completar su volumen.

Polimerización: se polimerizó en estufa a 70 °C durante 9 horas.

Preparación de las pirámides: se separaron los portaobjetos de la inclusión plana con ayuda de un bisturí y se eligió el material deseado al microscopio óptico. Bajo lupa binocular se cortó con trincheta el trozo de resina elegido y se pegó con pegamento instantáneo sobre una pirámide truncada de resina Spurr previamente polimerizada en una cápsula BEEM. Se dejó secar un día a temperatura ambiente.

Tallado: bajo lupa binocular, con una hoja de afeitar nueva se fue tallando una pirámide de base trapezoidal alrededor del material elegido, tanto de inclusiones planas como de cápsulas BEEM.

Preparación de grillas

Limpieza de grillas: las grillas de cobre, nuevas y usadas, fueron lavadas en cloroformo, etanol, dos veces en agua bidestilada, etanol y dos veces en cloroformo. Se dejaron secar en cajas de Petri sobre papel de filtro.

Preparación de la película de formvar (polivinilformal): se lavaron, secaron y flamearon portaobjetos nuevos. En un recipiente se ubicó un portaobjetos sobre el que se hizo subir y bajar el formvar de forma rápida. Se dejó secar en forma horizontal. Se marcó un rectángulo de la película de formvar con una aguja. Se desprendió la película de formvar en un recipiente con agua destilada en forma inclinada hasta que quedó el trozo flotando. Sobre esta película se ubicaron las grillas de cobre (con la cara opaca hacia abajo) hasta cubrir con grillas la

superficie disponible de la película. Con un portaobjetos de aluminio se recogió la película con las grillas hundiendo el portaobjetos de aluminio junto con la película con las grillas. Se dejó secar y estabilizar en posición vertical a temperatura ambiente.

Confección de cuchillas de cristal: para la obtención de cortes semifinos se utilizaron cuchillas de cristal que se confeccionaron a partir de barras de cristal de 25 mm de ancho, mediante un Knife-Maker LKB. En primer lugar se cortaron cuadrados de cristal para luego cortarlo en forma diagonal obteniendo dos piezas triangulares. En la zona del filo de la cuchilla se confeccionó una piletita con cinta plateada, la cual se selló a la superficie del cristal con cera dental. La piletita se llenó con agua bidestilada luego de que la cuchilla se fijó al ultramicrotomo.

Ultramicrotomía: el material seleccionado y tallado se cortó en un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut UM2 con cuchilla de diamante Diatom 45°, obteniendo cortes ultradelgados. Las tiras de cortes que flotaban en el agua de la piletita fueron estiradas con vapores de cloroformo. Se recogieron en grillas de cobre cubiertas con formvar aquellos cortes con colores de interferencia plata y oro, que indicaban un espesor de corte de 60 nm y 90 nm respectivamente.

Los cortes semifinos fueron obtenidos mediante cuchillas de cristal cortados a 0,5 - 1 μm que se corresponde con el color verde-rosado. Fueron observados en un microscopio con contraste de fases o coloreados durante 15 minutos con azul de toluidina 1 % en agua destilada para su observación en campo claro (Hayat 1986).

Contrastado: Se contrastó con acetato de uranilo y citrato de plomo siguiendo el procedimiento en un soporte Iraoka. Para ello se colocaron las grillas en una placa plástica flexible con ranuras para poder contrastar hasta 40 grillas simultáneamente. Para poder colocar las grillas, la placa se colocó en un soporte curvado, permitiendo que las ranuras se abrieran. Una vez ubicadas todas las grillas se retiró la placa del soporte curvado, las ranuras se cerraron y sujetaron a las grillas.

Luego se preparó una solución sobresaturada de acetato de uranilo (0,05 g en 5 ml de agua bidestilada) y se filtró con filtro Watman 0,45 μm . Se colocó esta solución en un recipiente ad hoc sobre el que se ubicó la placa con las grillas hacia abajo durante 25 - 30 minutos en oscuridad. Se lavó rápidamente con agua

bidestilada contenida en 4 vasos de precipitado y se secó minuciosamente cada grilla de la placa con papel de filtro.

Finalmente se preparó una solución de citrato de plomo en un tubo de hemólisis: 2,1 ml de nitrato de plomo (solución madre: 31,25 g en 500 ml de agua bidestilada a la que se agregan 10 g de ácido nítrico para prevenir la hidrólisis), 2,1 ml de citrato de sodio (solución madre: 41,5 g en 500 ml de agua bidestilada filtrada a la que se agregan 5 gotas de nitrato de plomo como preservante), se agitó y luego se agregó 0,8 ml de NaOH 1N, se agitó y se colocó la solución en el mismo recipiente ad hoc. Luego se colocó la placa con las grillas durante 20 - 25 segundos. Se lavó rápidamente por 4 vasos con agua bidestilada. Al primer vaso se le agregó 2 ml de NaOH 1 N. Se secó minuciosamente cada grilla con papel de filtro. Los tiempos que mejores resultados produjeron fueron 25 minutos en acetato de uranilo y 20 segundos en citrato de plomo.

El soporte flexible conteniendo las grillas se colocó nuevamente en el soporte curvado y las grillas fueron transferidas a un portagrillas hasta el momento de la observación.

Observación y fotografiado: las secciones fueron observadas y fotografiadas en un Microscopio Electrónico Jeol 100 CX-II operando a 80 kV, ubicado en el CCT-BB (Centro Científico Tecnológico de Bahía Blanca ex CRIBABB).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Fijación: se fijaron porciones de talos en glutaraldehído 3 % en buffer cacodilato 0,05 M con el agregado de 0,25 M de sacarosa durante al menos 24 horas y se mantuvieron en heladera a 4 °C.

Lavados: se realizaron 4 lavados para eliminar el fijador: el primero en buffer cacodilato 0,05 M y 0,2 M de sacarosa; el segundo en buffer cacodilato 0,05 M y 0,1 M de sacarosa; el tercero en buffer cacodilato 0,05 M sin sacarosa y el cuarto en agua bidestilada. Cada lavado se realizó durante 15 minutos.

Deshidratación: se deshidrató en series de concentraciones crecientes de acetona: 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % durante 15 minutos cada uno.

Punto crítico: se realizó el secado por punto crítico.

Metalizado: se colocaron los fragmentos sobre tacos de bronce y se metalizaron con oro-paladio en un “sputter” (Robinson et al. 1987).

Observación y fotografiado: el material se observó y fotografió digitalmente en un Microscopio Electrónico de Barrido EVO 40 XVP Leo en el CCT-BB.

RESULTADOS

Diversidad y abundancia de epífitos

Se identificaron 29 especies de epífitos creciendo sobre *G. gracilis*, 17 pertenecientes a la división Rhodophyta (Fig. 18), 9 a Heterocontophyta (Fig. 19), 2 especies de Chlorophyta y 1 Cyanophyta (Tabla 4).

La densidad total de epífitos sobre *G. gracilis* varió entre 0,037 ind/cm² en noviembre de 2006 y 35,27 ind/cm² en abril de 2007, manteniéndose en niveles altos durante todo el segundo año de muestreo (Fig. 20). Aunque no se observó una clara estacionalidad en la cantidad de epífitos, se pudieron apreciar, para cada año, 2 máximos relativos, uno en otoño y principio de invierno y otro en verano.

Las especies o grupos de algas más frecuentes y abundantes fueron: Ceramiales, Acrochaetiales, Sphacelariales, y la Cyanophyta *Calothrix confervicola* (Tabla 4). Los epífitos del orden Ceramiales fueron los más abundantes durante la mayor parte del estudio; dentro de este grupo, la especie más abundante fue *Ceramium rubrum* (Fig 21). Su densidad varió entre 0,09 ind/cm² (57,8% del total) en septiembre de 2006 y 17,4 ind/cm² (44,2%) en abril de 2007. En agosto de 2006, la densidad de *C. rubrum* representó un 73,9 % del total de epífitos. Los epífitos de la familia Rhodomelaceae no presentaron densidades elevadas, sus máximos fueron en verano, llegando a 2,17 ind/cm² en enero de 2007. Gran parte del aumento de la densidad de epífitos del verano fue debida a la presencia de estadios microscópicos de Ceramiales (menores a 1 mm) (Fig. 22).

Calothrix confervicola fue el epífito más abundante en enero, febrero, mayo y noviembre de 2007 y en enero de 2008, representando el 57,1% del total de epífitos en febrero de 2007. La densidad máxima alcanzada por *C. confervicola* fue de 15,8 ind/cm² (40,1%) en abril de 2007 (Fig. 20).

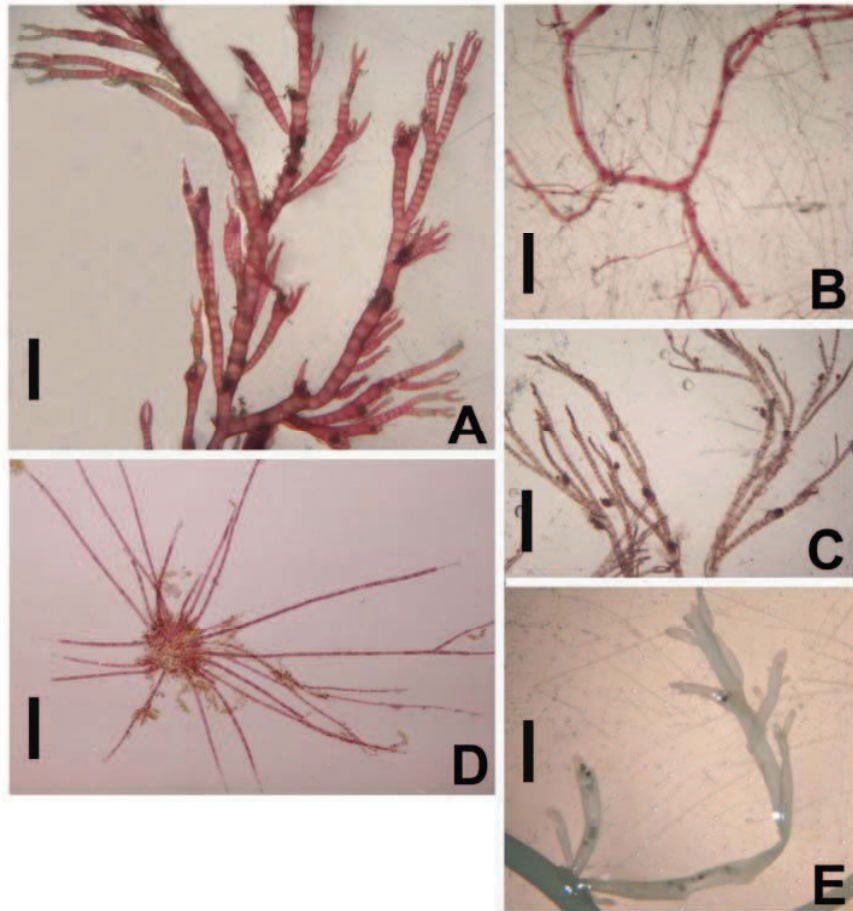


Fig. 18. Micrografías estereoscópicas de epífitos de *G. gracilis* pertenecientes a la División Rhodophyta. **A.** *Ceramium rubrum*. **B.** *Anotrichium furcellatum*. **C.** *Polysiphonia abscissa*. **D.** *Acrochaetium* sp. **E.** *Lomentaria clavellosa*.
Escala: A= 200 μ m; B= 50 μ m; C= 300 μ m; D= 0,5 mm; E= 2500 μ m.

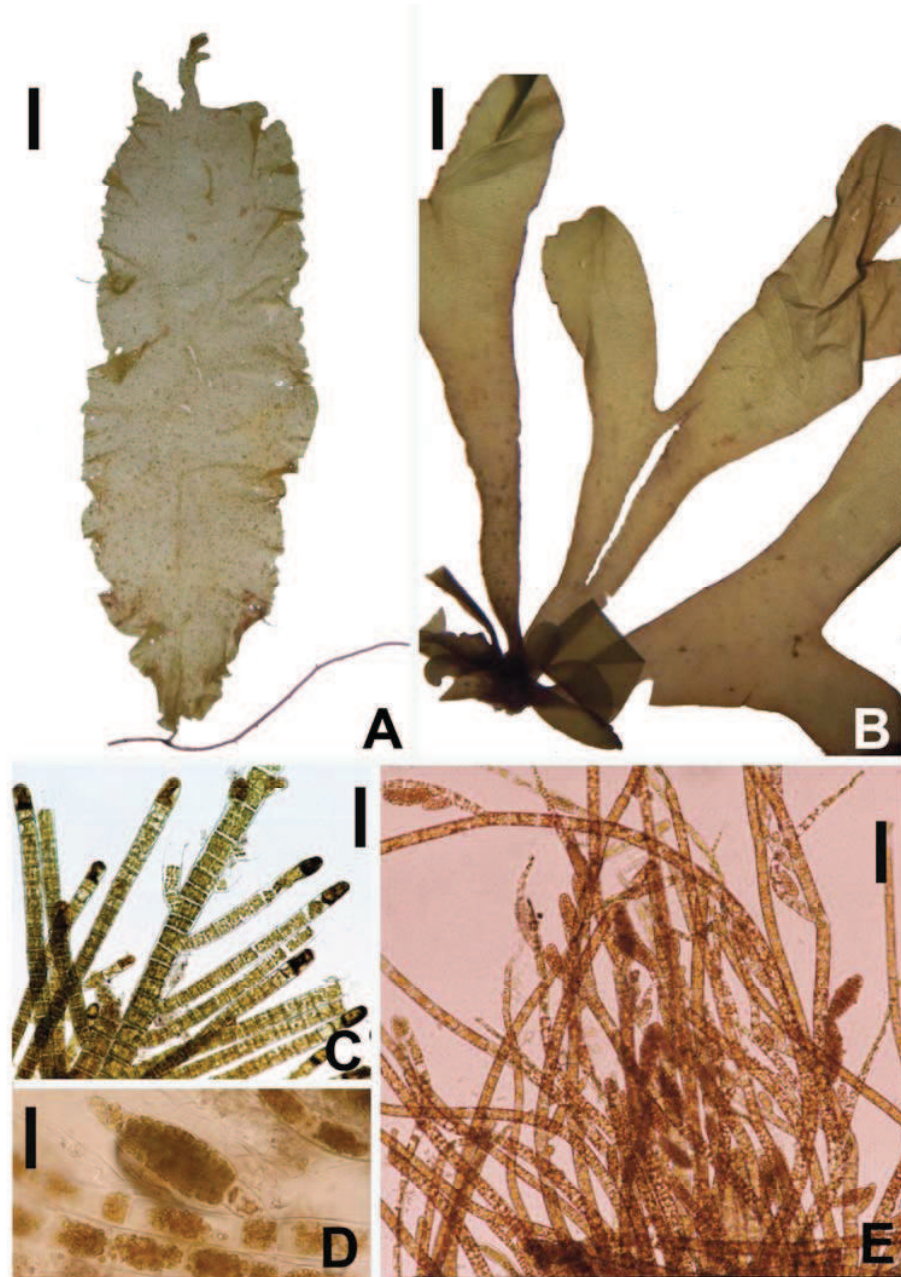


Fig. 19. Micrografías ópticas de epífitos de *G. gracilis* pertenecientes a la División Heterocontophyta, Clase Phaeophyceae. A. *Punctaria latifolia*. B. *Dictyota dichotoma*. C. *Sphacelaria fusca*. D. *Ectocarpus constanciae*. E. *Hincksia mitchelliae*. Escala: A= 2,5 cm; B= 17 mm; C= 150 μ m; D= 40 μ m; E= 100 μ m.

	Tipo de Infección	Ocurrencia
División Rhodophyta		
Orden Compsopogonales		
<i>Sahlingia subintegra</i> (Rosenvinge) Kornmann	II	R
Orden Acrochaetiales		
<i>Acrochaetium</i> sp. Nägeli	II	F
<i>Rhodocorton</i> sp. Nägeli	II	R
Orden Ceramiales		
<i>Anotrichium furcellatum</i> (J. Agardh) Baldock	II	R
<i>Antithamnion densum</i> (Suhr) Howe	II	R
<i>Antithamnionella</i> sp. Lyle	II	R
<i>Callithamnion gaudichaudii</i> C. Agardh	II	R
<i>Callithamnion montagnei</i> Hooker & Harvey	II	R
Fam. Ceramiaceae		
<i>Ceramium rubrum</i> (Hudson) C. Agardh	V	A
<i>Ceramium strictum</i> Greville ex Harvey	V	R
Fam. Rhodomelaceae		
<i>Heterosiphonia merenia</i> Falkenberg	V	R
<i>Neosiphonia harveyi</i> (J.Bailey) Kim, Choi, Guiry & Saunders	V	F
<i>Polysiphonia abscissa</i> Hooker & Harvey	V	A
<i>Streblocladia camptoclada</i> (Mont.) Falkenberg	II	R
Orden Rhodymeniales		
<i>Lomentaria clavellosa</i> (Turner) Gaillon	II	R
Orden Corallinales		
<i>Corallina officinalis</i> L.	IV	R
<i>Titanoderma</i> sp. Nägeli	IV	F
Div. Heterocontophyta. Clase Phaeophyceae		
Orden Ectocarpales		
<i>Acinetospora crinita</i> (Carmichael) Kornman	I	R
<i>Ectocarpus constanciae</i> Hariot	I	F
<i>Hincksia mitchelliae</i> (Harvey) Silva	I	F
<i>Leathesia difformis</i> (L.) Areschoug	I	R
<i>Punctaria latifolia</i> Greville	II	R
Orden Dictyotales		
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) Lamouroux	II	R
Orden Sphacelariales		
<i>Sphacelaria fusca</i> (Hudson) S.F. Gray	II	A
<i>Petalonia fascia</i> (O. F. Müller) O. Kuntze	II	R
<i>Halopteris</i> sp. Kützing	II	A
División Chlorophyta		
Orden Ulvales		
<i>Sporocladopsis novae-zelandiae</i> Chapman	II	R
<i>Chaetomorpha</i> sp. Kützing	II	R
División Cyanophyta		
<i>Calothrix confervicola</i> (Dillwyn) C. Agardh	I	A

Tabla 4. Especies de epífitos creciendo sobre *G. gracilis*. R: rara; F: frecuente; A: abundante.

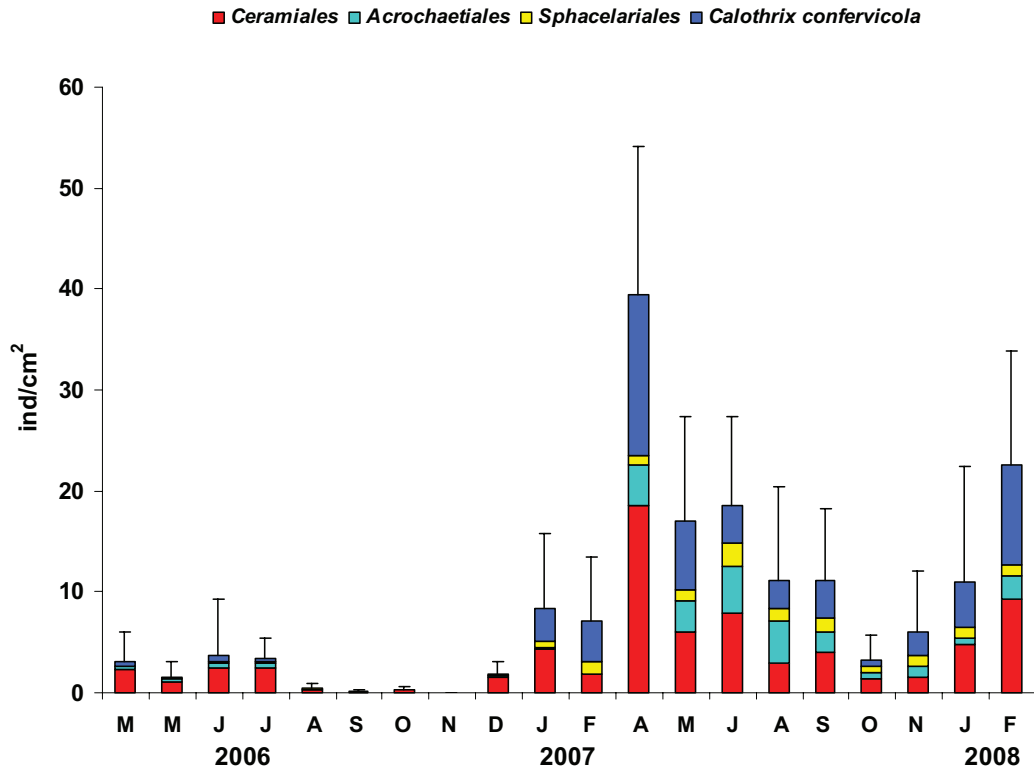


Fig. 20. Variación mensual de la densidad de epífitos. Las barras indican Error Estándar.

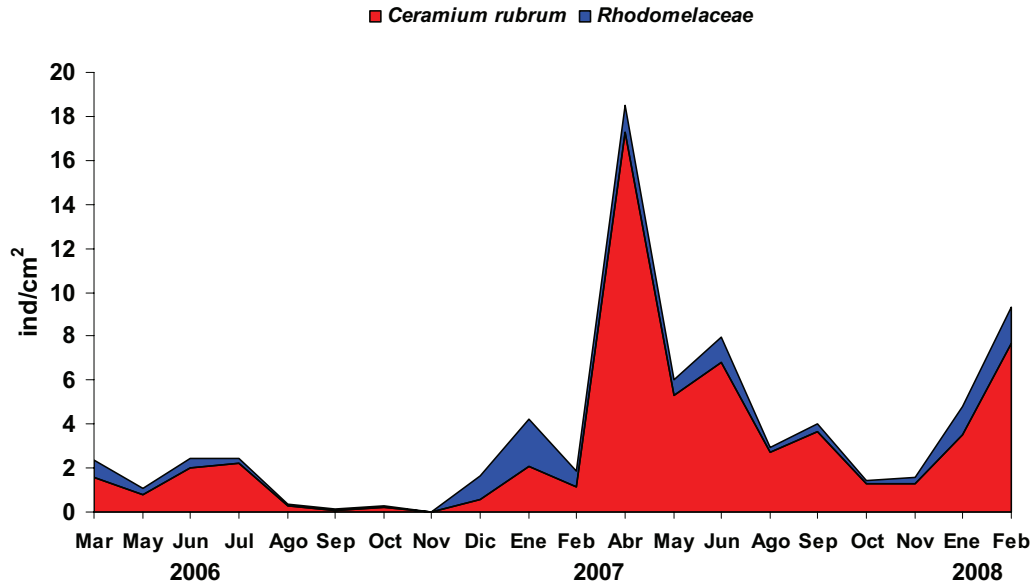


Fig. 21. Variación mensual de la densidad de epífitos del orden Ceramiales.

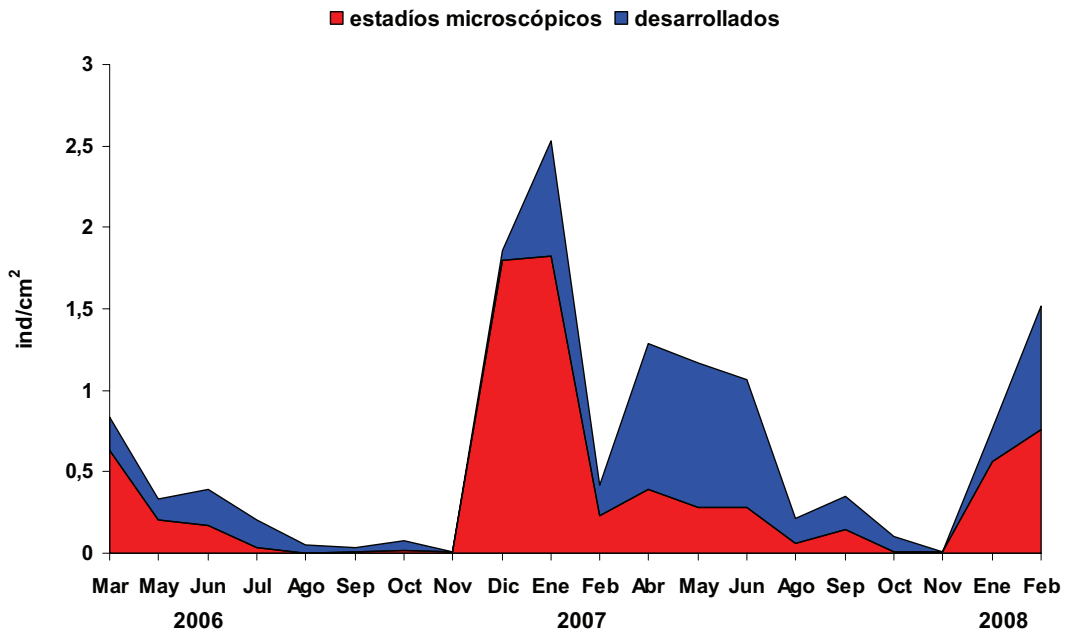


Fig. 22. Variación mensual de epífitos del orden Ceramiales en estadios microscópicos y desarrollados.

Relaciones anatómicas entre *Gracilaria gracilis* y sus epífitos

El talo saludable de *G. gracilis* presentó en sección transversal dos a tres estratos de células corticales y varios estratos de células medulares (Fig. 23A). La pared celular externa estuvo compuesta por un estrato externo o cutícula y dos estratos de pared, uno externo y otro interno (Fig. 23B). Cada célula cortical presentó un núcleo central, rodeado por gránulos de almidón florídeo y numerosos cloroplastos, que ocuparon la mayor parte del citoplasma (Fig. 23C).

Tipos de infección:

Las infecciones halladas fueron clasificadas en alguno de los 5 tipos propuestos por Leonardi et al. (2006) para *G. chilensis*, teniendo en cuenta: la fuerza de adhesión y el grado de invasión de los epífitos, y el daño causado al hospedante.

Tipo I de infección: los epífitos están débilmente unidos a la superficie de *Gracilaria*, es decir, se desprenden fácilmente al manipularlos. El talo del hospedante no es dañado. Este tipo de infección fue causado principalmente por la Cyanophyta *Calothrix confervicola* (Fig. 24A-C) y por especies del orden Ectocarpales, como *Ectocarpus constanciae* y *Hincksia mitchelliae* (Fig. 25).

Tipo II de infección: En este caso los epífitos están fuertemente unidos al hospedante, sin embargo tampoco ocasionan daño en él. Este tipo de infección fue causado por algunas especies de algas rojas, como *Antithamnion densum* (Fig. 26A-B) y *Acrochaetium* sp., por las algas verdes *Chaetomorpha* sp. (Fig. 27A-C) y *Sporocladopsis novae-zelandiae*, y por varias especies de Phaeophyceae. *Dictyota dichotoma* estuvo representada por fragmentos de talos (Fig. 28A) y talos jóvenes, unidos al hospedante a través de rizoides hialinos (Figs. 28B-C y 29). Detalles de la interfase revelaron una estrecha asociación entre el epífito y el hospedante, sin embargo, la pared celular de *G. gracilis* conservó su típica morfología (Fig. 28D-E). *Punctaria latifolia* presentó un patrón de infección similar (Fig. 30A), pero en este caso el estrato externo de la pared de *G. gracilis* exhibió una disposición más laxa de sus componentes, comparada con las células control (Figs 30B-C). *Sphacelaria fusca* (Figs 31A-B) fue una excepción dentro del tipo II, pues si bien la pared celular de *G. gracilis* permaneció

intacta (Figs 32B-C), sus células corticales aparecieron altamente vacuolizadas (Figs 31C, 32A).

Tipo III de infección: Los epífitos rompen la cutícula y penetran la capa externa de la pared del hospedante, sin dañar las células corticales. Este tipo de infección no fue hallado en *G. gracilis*.

Tipo IV de infección: En este tipo de infección, los epífitos penetran la cutícula y el estrato externo de la pared celular del hospedante, desorganizando la porción cortical. Los talos jóvenes del alga roja calcárea *Corallina officinalis* (Fig. 33A) presentaron este tipo de infección. Sus rizoides penetraron la pared celular del hospedante, perdiendo gran parte de su cutícula en el área en contacto con el epífito (Fig. 33B). Además, la pared celular de *G. gracilis* se presentó engrosada, se observó un incremento en el número de capas de células corticales y el estrato externo de células corticales presentó gran vacuolización (Fig. 33B). En el alga roja incrustante calcárea *Titanoderma* sp. se encontró un tipo de infección similar (Fig. 34A). Sin embargo, en esta especie no hubo penetración de rizoides en la pared celular del hospedante, la cual apareció compacta y sin diferenciación de los estratos externo e interno (Figs 34A-B).

Tipo V de infección: Los epífitos que presentan este tipo de infección penetran profundamente en la porción cortical del hospedante, alcanzando la porción medular. Varias especies de Ceramiales, como *Ceramium rubrum*, *C. strictum*, *Polysiphonia abscissa*, *Neosiphonia harveyi* y *Heterosiphonia merenia* presentaron este tipo de infección (Figs. 35-40). Los rizoides del epífito penetraron intercelularmente en el hospedante (Figs. 35A-C, 36A-C, 37A, 38, 39B-C, 40A-B) y en algunos casos atravesaron perpendicularmente la pared celular epidérmica (Fig. 37B-C). Se observaron diferentes grados de daño en las células de *G. gracilis* en contacto con los rizoides del epífito: i) gran vacuolización celular (Fig. 37A-B), ii) perfiles ondulados del plasmalema y el estrato interno de pared (Figs. 36C, 38, 39A, C) y iii) una severa compresión celular donde solo se pueden distinguir los gránulos de almidón florídeo, especialmente en la infección causada por *P. abscissa* (Figs 35A-B, 38, 39B).

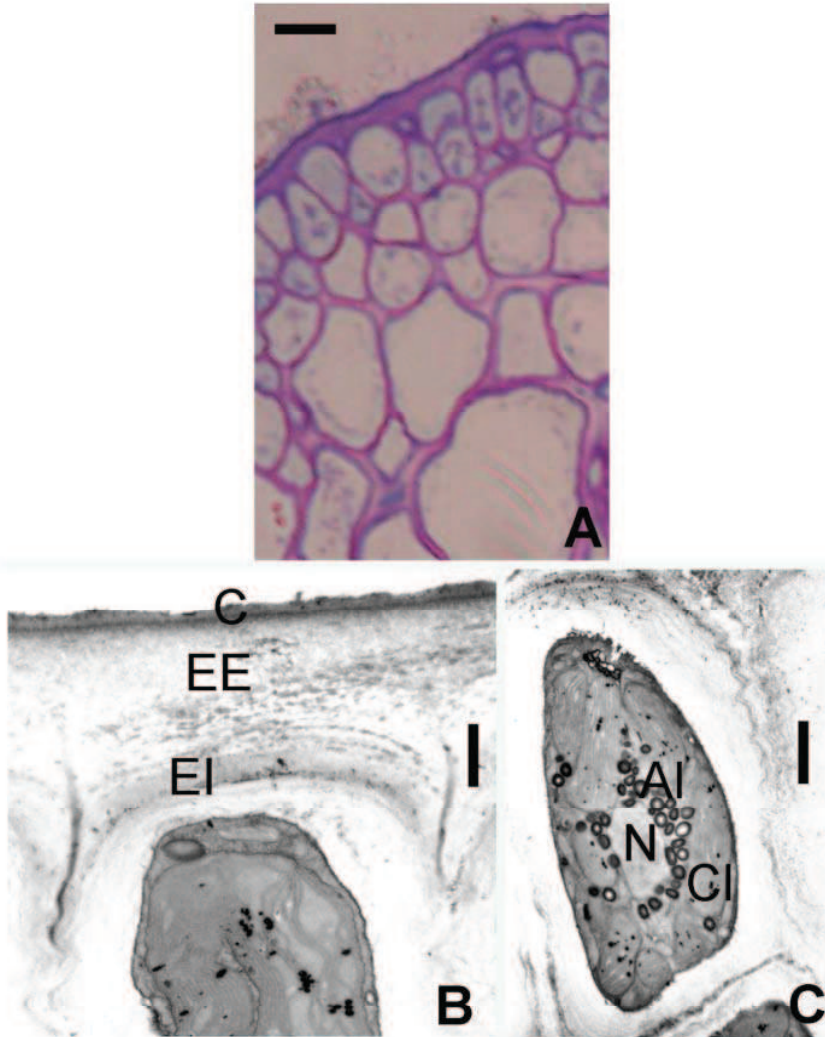


Fig. 23. Talo saludable de *G. gracilis*. **A.** Micrografía óptica. Corte semifino transversal de una porción del talo. **B-C.** Micrografías electrónicas de transmisión. **B.** Detalle de la pared celular epidérmica. **C.** Detalle de una célula cortical.
 AI: almidón florídeo, C: cutícula, Cl: cloroplasto, EE: estrato externo de pared, EI: estrato interno de pared, N: núcleo.
 Escala: A= 6 μm ; B= 0,8 μm ; C= 1 μm .



Fig. 24. Tipo I de infección: *Calothrix confervicola*. **A.** Micrografía óptica. Vista general de *C. confervicola*. **B-C.** Micrografías electrónicas de transmisión. **B.** Vista general de la interfase. Se observan dos filamentos del epífito cortados transversalmente **C.** Detalle de la interfase. Se observa un filamento del epífito cortado longitudinalmente. E: epífito, H: hospedante. Escala: A= 24 μm ; B= 5 μm ; C= 3 μm .

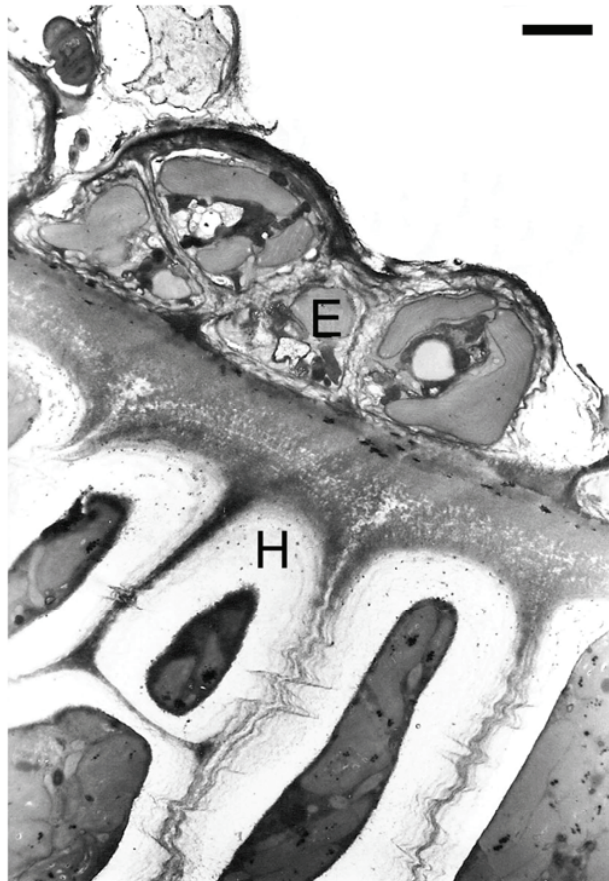


Fig. 25. Tipo I de infección: *Hincksia mitchelliae*. Micrografía electrónica de transmisión. Detalle de la interfase.
E: epifito, H: hospedante
Escala: 1,5 μm .

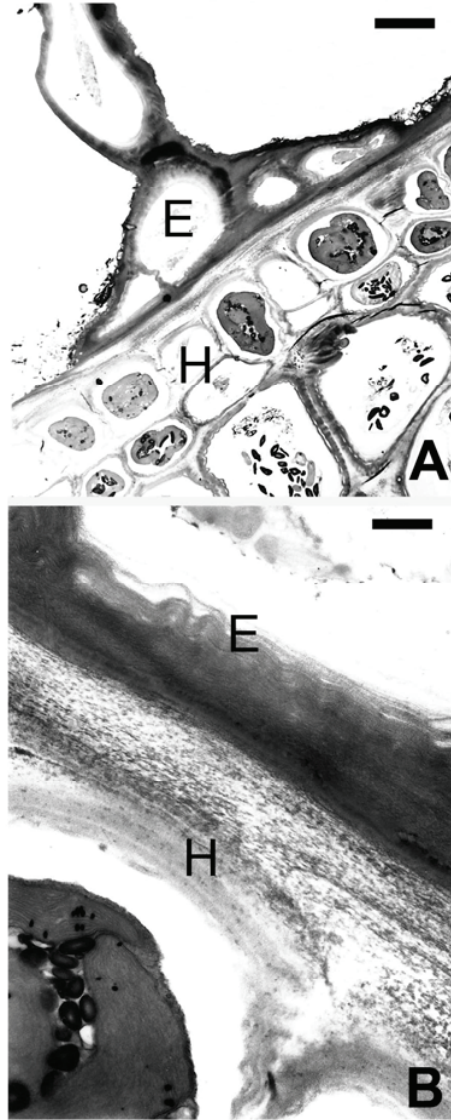


Fig. 26. Tipo II de infección: *Antithamnion densum* A-B. Micrografías electrónicas de transmisión. A. Vista general de la porción basal de *A. densum* sobre *G. gracilis*. B. Detalle de la interfase.
E: epífito, H: hospedante.
Escala: A= 3,5 μm ; B= 1 μm .

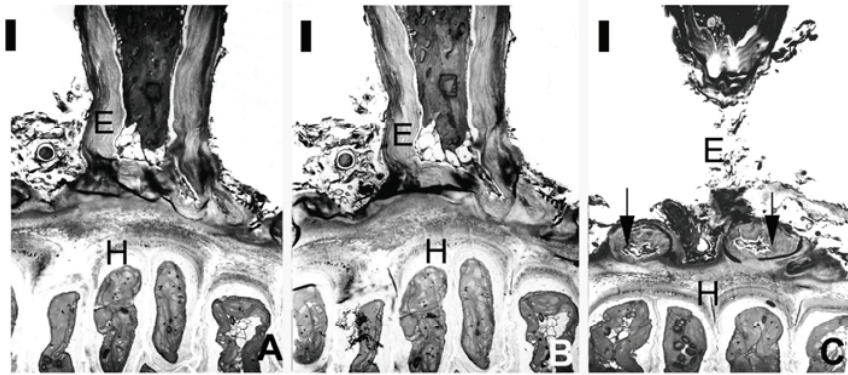


Fig. 27. Tipo II de infección: *Chaetomorpha* sp. **A-C.** Micrografías electrónicas de transmisión. Cortes seriados no consecutivos donde se observa que los rizoides de *Chaetomorpha* sp. (flechas) no penetran en el talo de *G. gracilis*.
E: epífito, H: hospedante.
Escala: 2,5 μ m.

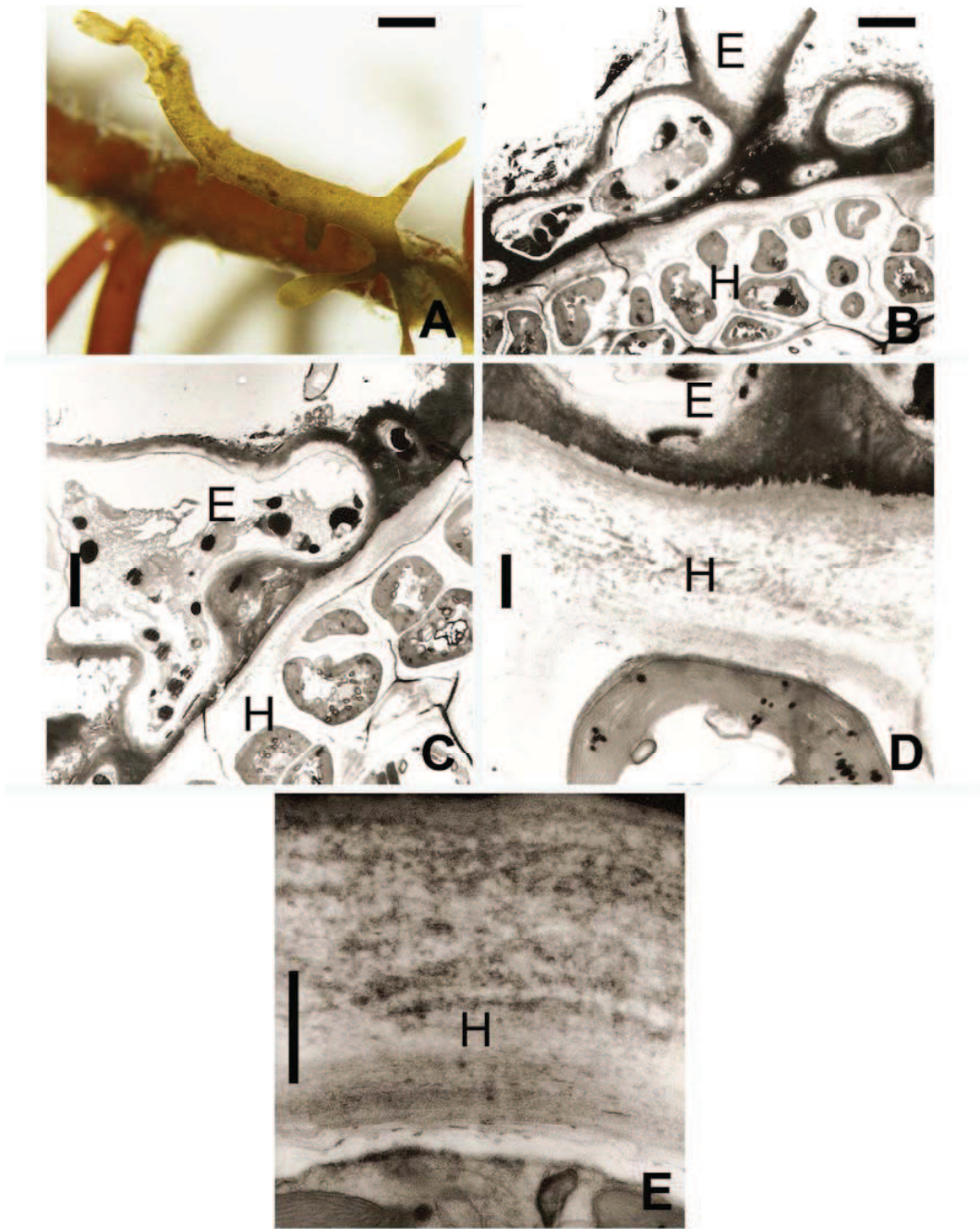


Fig. 28. Tipo II de infección: *Dictyota dichotoma*. **A.** Micrografía óptica. Vista general de un fragmento de *D. dichotoma* sobre *G. gracilis*. **B-E.** Micrografías electrónicas de transmisión. **B.** Interfase donde se observa una porción rizoidal del epífito sobre el hospedante **C.** Interfase donde se observa la porción basal de un talo joven del epífito sobre el hospedante **D.** Detalle de la interfase. **E.** Detalle de la pared celular de *G. gracilis* en contacto con el epífito. E: epífito, H: hospedante.
Escala: A= 2 μ m; B, C= 6 μ m; D= 1 μ m; E= 0,1 μ m.

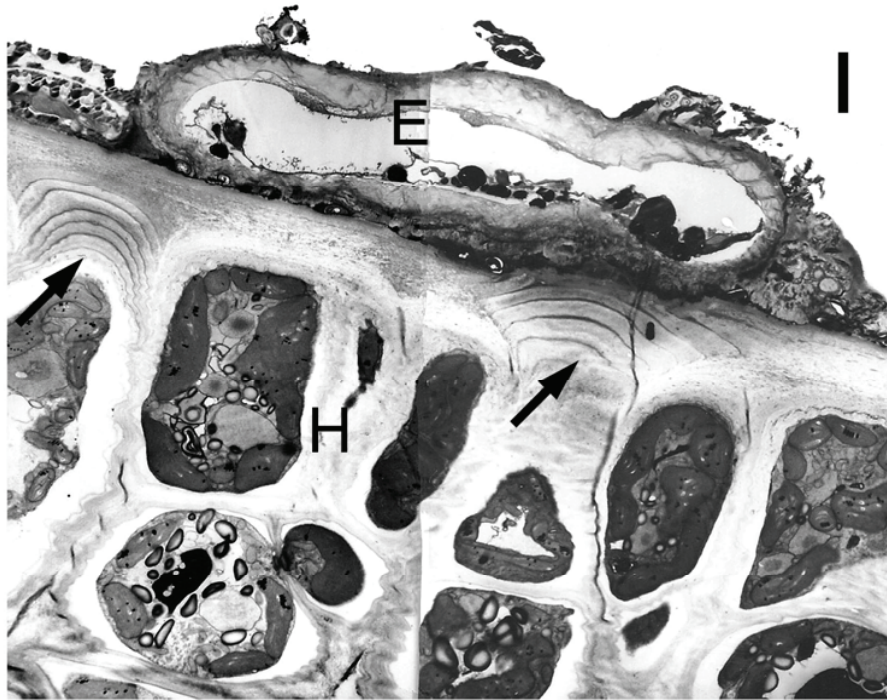


Fig. 29. Tipo II de infección: *Dictyota dichotoma*. Micrografía electrónica de transmisión. Detalle de la interfase. Las flechas indican dos células formadoras de pelos de *G. gracilis*.
E: epífito, H: hospedante.
Escala: 2,5 μ m.

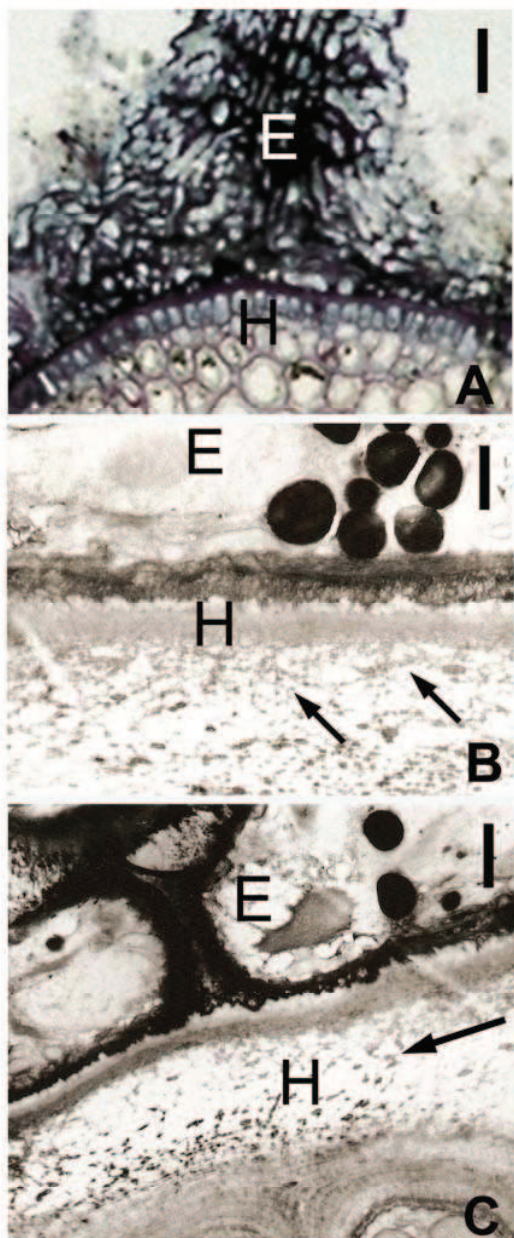


Fig. 30. Tipo II de infección: *Punctaria latifolia*. **A.** Micrografía óptica. Vista general de la porción basal de *P. latifolia* sobre *G. gracilis*. **B-C.** Micrografías electrónicas de transmisión. Detalle de la interfase. Las flechas indican la disposición laxa del estrato externo de pared de *G. gracilis* en la zona en contacto con el epífito. E: epífito, H: hospedante. Escala: A= 15 μ m; B-C= 1 μ m.

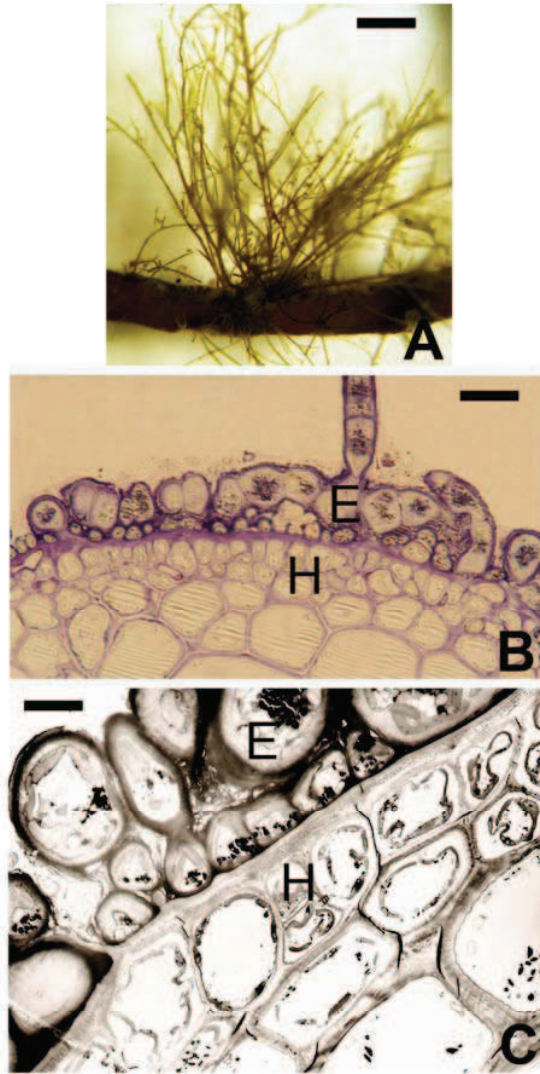


Fig. 31. Tipo II de infección: *Sphacelaria fusca*. **A-B.** Micrografías ópticas. **A.** Vista general del talo de *S. fusca* sobre *G. gracilis*. **B.** Vista general de la porción basal de *S. fusca* sobre *G. gracilis*. **C.** Micrografía electrónica de transmisión. Detalle de la interfase. Notar las células corticales muy vacuolizadas.
 E: epifito, H: hospedante.
 Escala: A= 2500 μm ; B= 10 μm ; C= 7 μm .

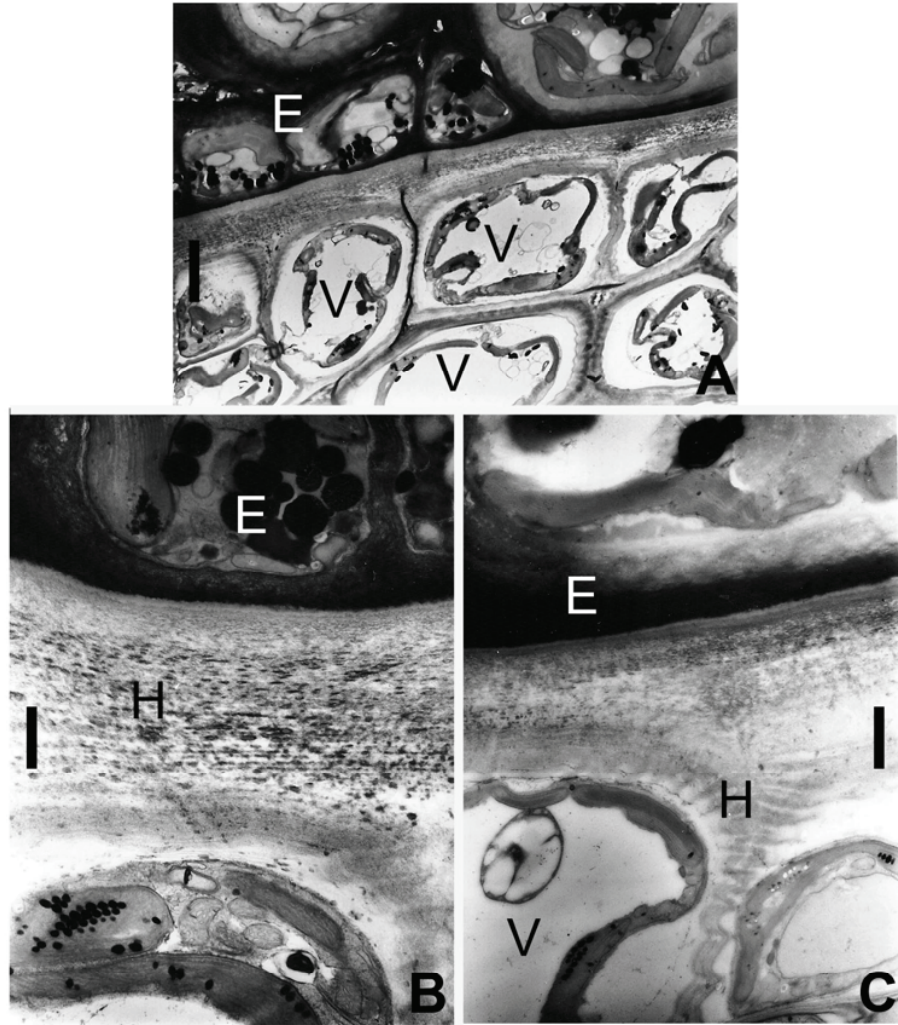


Fig. 32. Tipo II de infección: *Sphacelaria fusca*. **A-C.** Micrografías electrónicas de transmisión. **A.** Detalle de la interfase. Notar las células corticales muy vacuolizadas. **B-C.** Interfases con mayor magnificación donde se observa la pared celular de *G. gracilis* sin alteraciones. E: epífita, H: hospedante, V: vacuola. Escala: A= 3 μ m; B,C= 1 μ m.

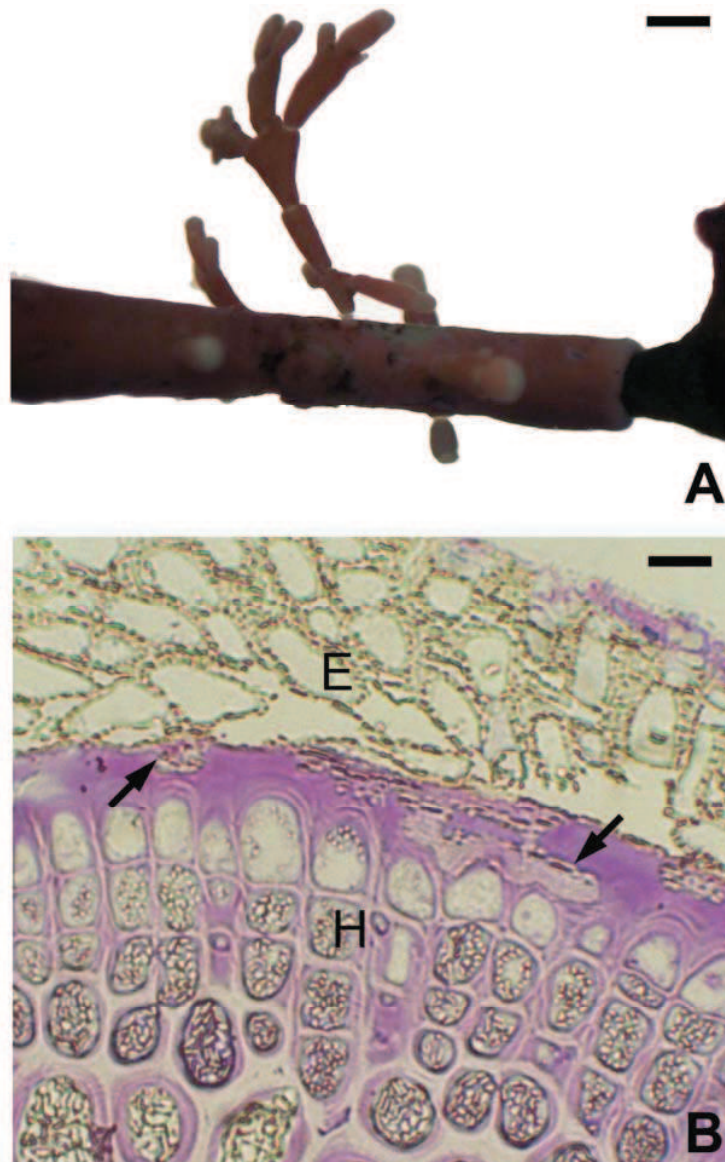


Fig. 33. Tipo IV de infección: *Corallina officinalis*. **A.** Micrografía estereoscópica de la vista general de un talo joven de *C. officinalis* sobre *G. gracilis*. **B.** Micrografía óptica. Detalle de la interfase donde se observan los rizoides del epífito penetrando la pared celular del hospedante (flechas), un incremento en el número de células corticales y vacuolización del estrato más externo.

E: epífito, H: hospedante.

Escala: A= 2000 μm ; B= 3 μm .

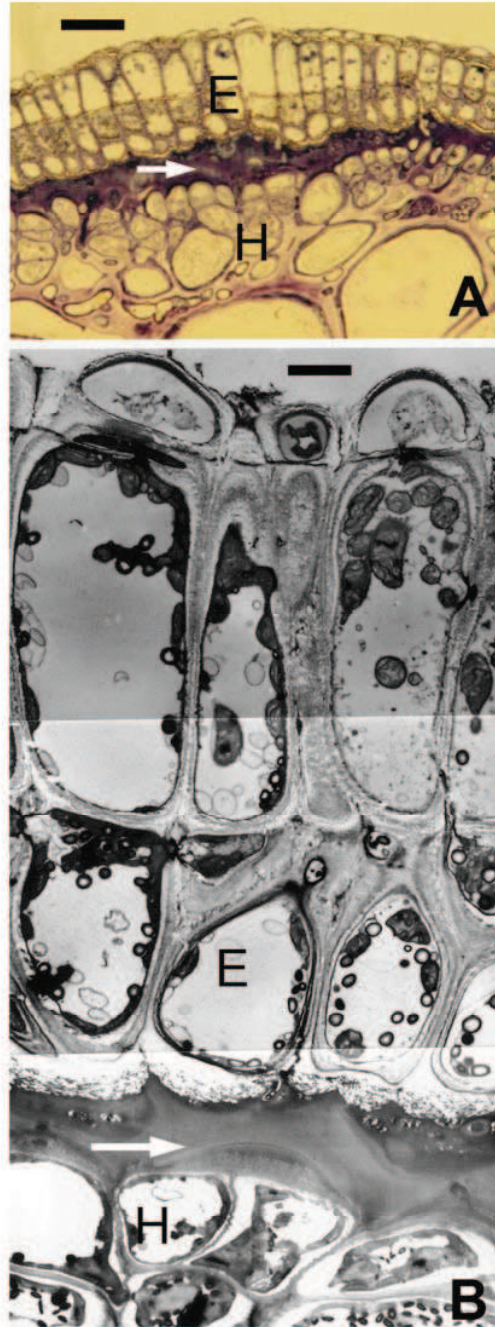


Fig. 34. Tipo IV de infección: *Titanoderma* sp. **A.** Micrografía óptica. Vista general de una porción del talo de *Titanoderma* sp. sobre *G. gracilis*. **B.** Micrografía electrónica de transmisión. Detalle de la interfase donde se observa la pared celular de *G. gracilis* compacta y sin diferenciación de los sus estratos (flechas).

E: epífito, H: hospedante.

Escala: A= 25 μ m; B= 4,5 μ m.

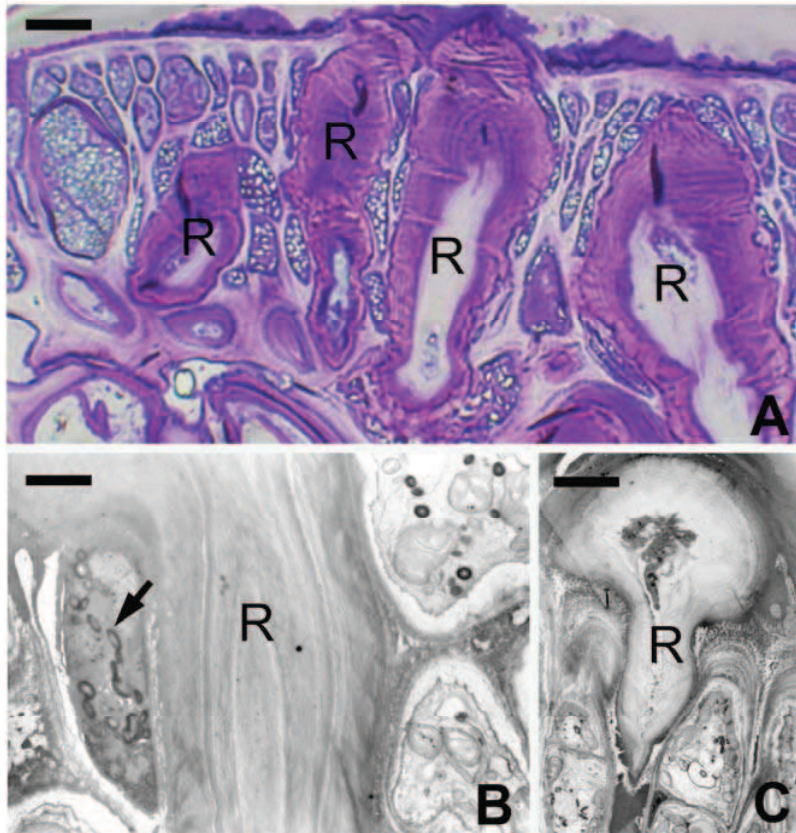


Fig. 35. Tipo V de infección: *Polysiphonia abscissa*. **A.** Micrografía óptica. Vista general de rizoides de *P. abscissa* penetrando en el talo de *G. gracilis*. Se observan numerosas células con una severa compresión. **B-C.** Micrografías electrónicas de transmisión. Detalles de rizoides ingresando intercelularmente. En la figura B la flecha indica una célula del hospedante donde solo se distinguen gránulos de almidón florideo.
 E: epífito, H: hospedante, R: rizoide.
 Escala: A= 4 μ m; B= 2 μ m; C= 5 μ m.

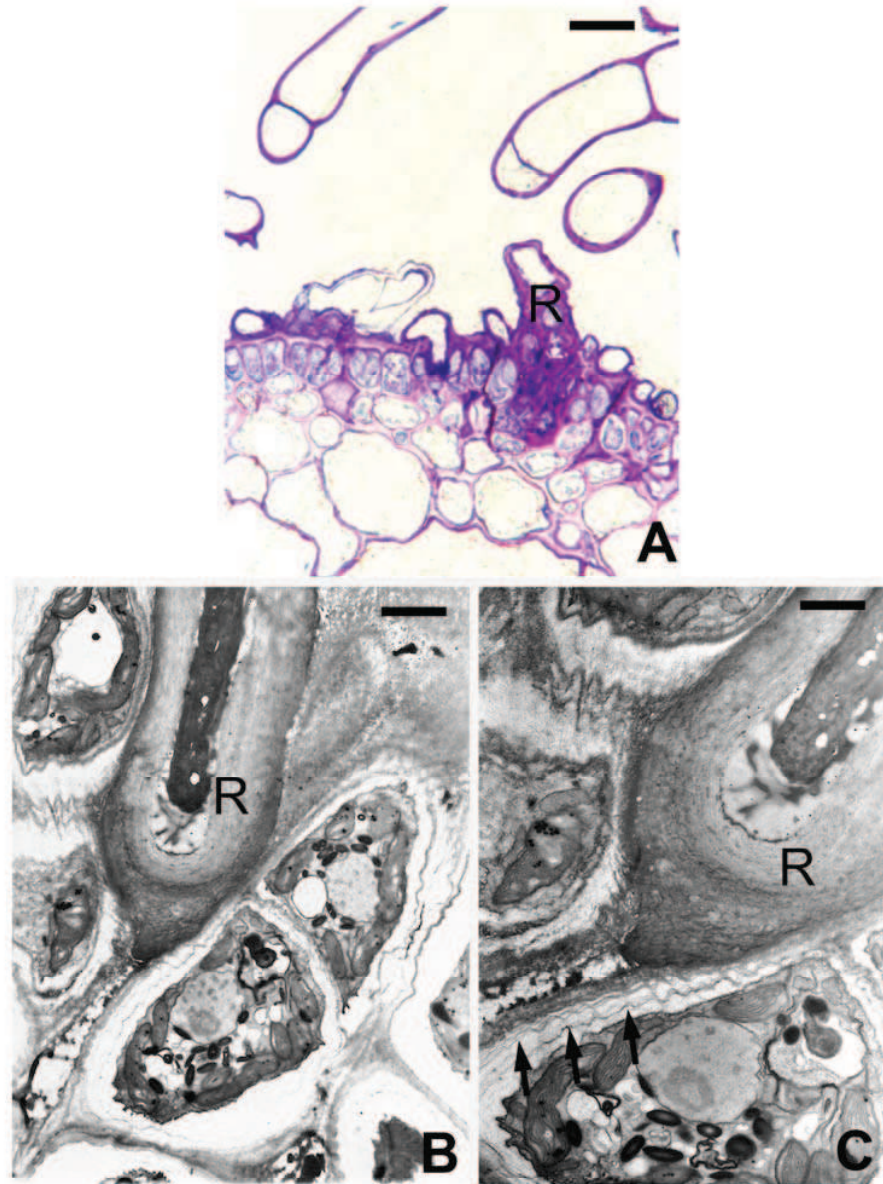


Fig. 36. Tipo V de infección: *Ceramium rubrum*. **A.** Micrografía óptica. Vista general de un rizoide de *C. rubrum* penetrando en el talo de *G. gracilis*. **B-C.** Micrografías electrónicas de transmisión. Detalles de rizoides ingresando intercelularmente. En la figura C se observan las células del hospedante con perfiles ondulados del plasmalema y del estrato interno de pared (flechas).

E: epífito, H: hospedante, R: rizoide.
Escala: A= 4 μ m; B= 2 μ m; C= 1 μ m.

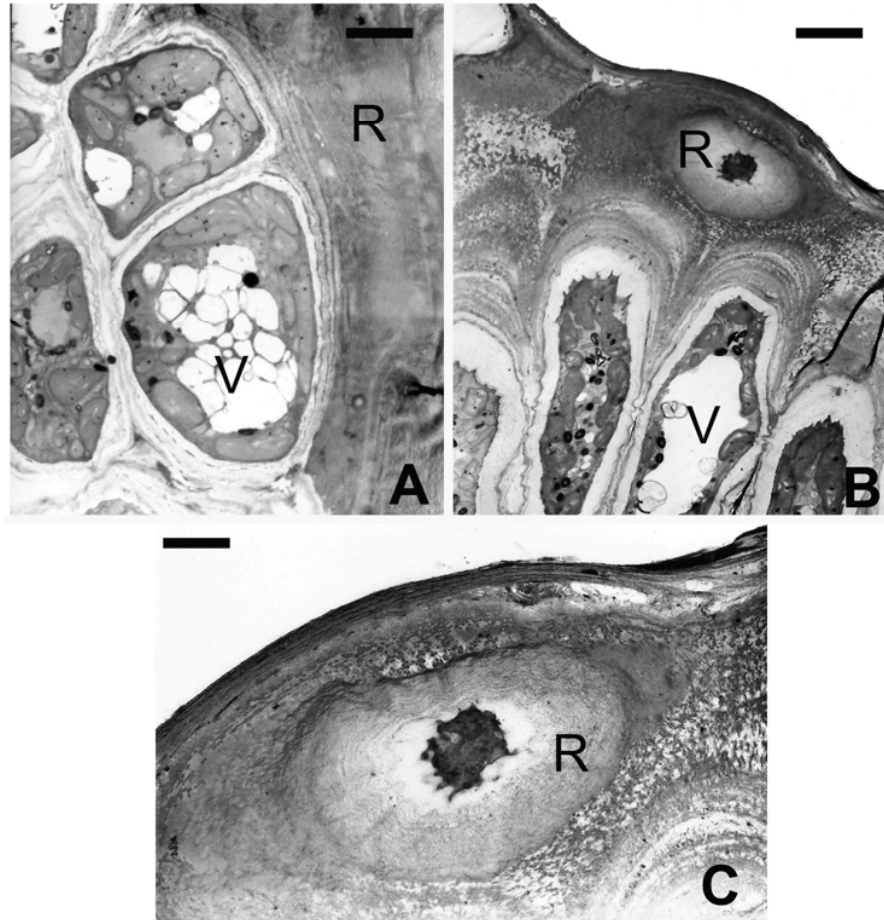


Fig. 37. Tipo V de infección: *Ceramium rubrum*. Micrografías electrónicas de transmisión. **A.** Detalle de una célula cortical muy vacuolada de *G. gracilis* en contacto con el rizoide de *C. rubrum*. **B.** Vista general de un rizoide atravesando perpendicularmente la pared epidérmica del hospedante. **C.** detalle de B.
 E: epífita, H: hospedante, R: rizoide, V: vacuola.
 Escala: A= 2 μ m; B= 3 μ m; C= 1 μ m.



Fig. 38. Tipo V de infección: *Ceramium rubrum*. Micrografía electrónica de transmisión. Detalle de un rizoide en corte longitudinal y otro en corte transversal penetrando en el hospedante. Se observan células de *G. gracilis* adyacentes al rizoide severamente comprimidas y otras células con ondulaciones del plasmalema y del estrato interno de pared (flecha). E: epífito, H: hospedante, R: rizoide.
Escala: 3,5 μm .

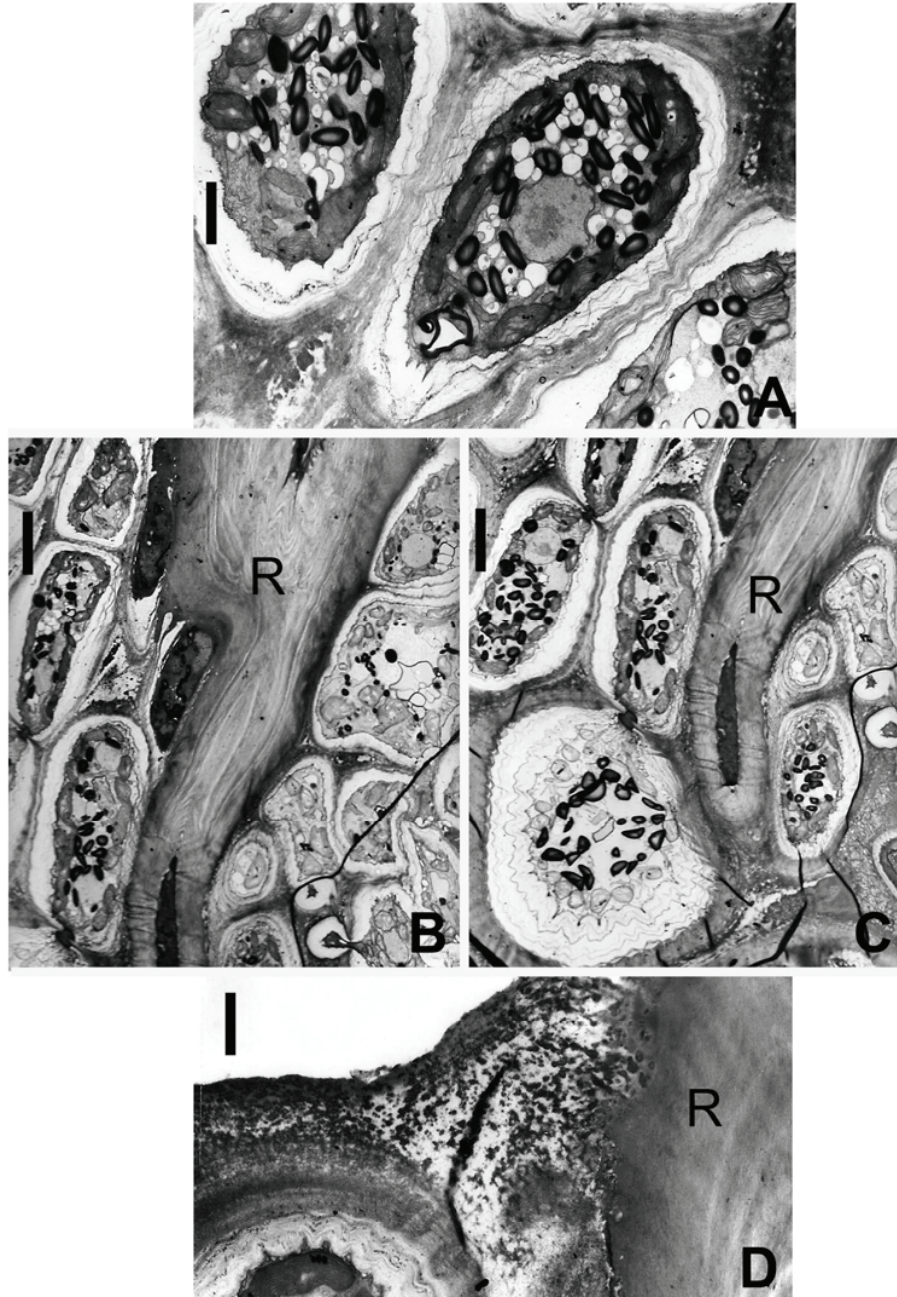


Fig. 39. Tipo V de infección: *Ceramium rubrum*. Micrografías electrónicas de transmisión. **A.** Detalle de una célula de *G. gracilis* con perfiles ondulados del plasmalema y el estrato interno de pared, y abundante almidón florídeo. **B-C.** Detalles de un rizoide en corte longitudinal penetrando en el hospedante. Se observan células de *G. gracilis* adyacentes al rizoide con severa compresión y otras con perfiles ondulados del plasmalema y el estrato interno de pared (flecha). **D.** Detalle de una porción rizoidal ingresando en la pared celular epidérmica de *G. gracilis*.
 E: epífito, H: hospedante, R: rizoide.
 Escala: A= 1,5 μm ; B,C= 4 μm ; D= 1 μm .

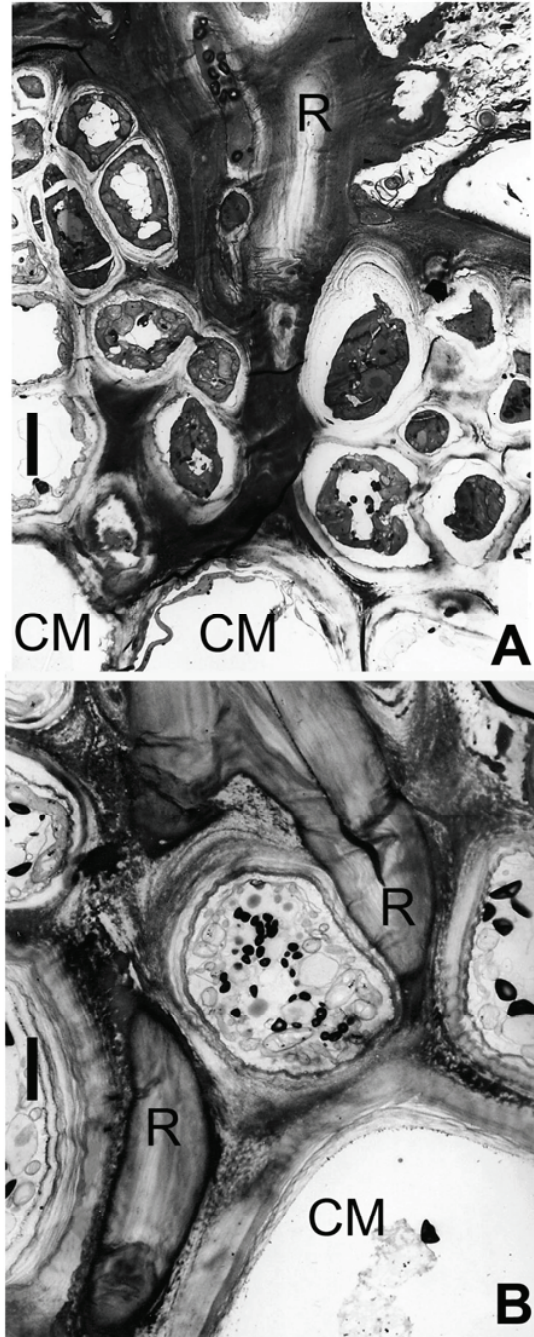


Fig. 40. Tipo V de infección: *Ceramium rubrum*. Micrografías electrónicas de transmisión. **A-B.** Detalles de rizoides en corte longitudinal penetrando intercelularmente en el hospedante hasta la porción medular.
CM: célula medular, E: epífito, H: hospedante, R: rizoide.
Escala: A= 6 μm ; B= 3,5 μm .

Debido a la gran dificultad que presentan las algas rojas coralinales para ser determinadas, debió realizarse un estudio exhaustivo de la especie incrustante hallada como epífita de *G. gracilis*.

Descripción de *Titanoderma* sp.

Talo no geniculado calcificado de forma irregular y color rosa (Fig. 41A). Talo aplanado, de (3) 4 (5) capas de células y 20-100 μm de alto, completamente adherido al hospedante (Fig. 41A-C). La construcción interna del talo es pseudoparenquimatosa y dimera. Filamentos basales compuestos por 1 capa en empalizada (Fig. 41B, C), las células de 5-6 μm de diámetro y 8-12 μm de alto. Los filamentos erectos (peritalo), de 1 a 3 células de longitud, alineadas, de 4-6 μm de diámetro por 10-40 μm de alto (Fig. 41B, C); epitalo de 1 célula, en forma de domo o triangular, de 4-6 μm de ancho por 2,5-3 μm de alto (Fig. 41C, E). La superficie observada con MEB mostró algunas células con proyecciones centrales (Fig. 41D).

Conexiones secundarias presentes (Fig. 42A-D), fusiones celulares y tricocistos ausentes.

Conceptáculos bisporangiales uniporados (Fig. 43A), elípticos, de 162 μm de diámetro por 75 μm de alto (Figs 43B, C). Cámaras del conceptáculo con columella (Fig. 43B). El piso de la cámara está situado 3-4 capas de células debajo de la superficie del talo (Fig. 43C). El techo del conceptáculo es de 2-3 células de espesor (incluyendo las células del epitalo). Células del poro perpendiculares al techo del esporangio (Fig. 43C). Bisporangios de 21 μm de diámetro por 31 μm de largo (Fig. 43D). Talos tetrasporangiales y gametangiales no observados.

Hábitat: Epífita de *G. gracilis*, en el submareal.

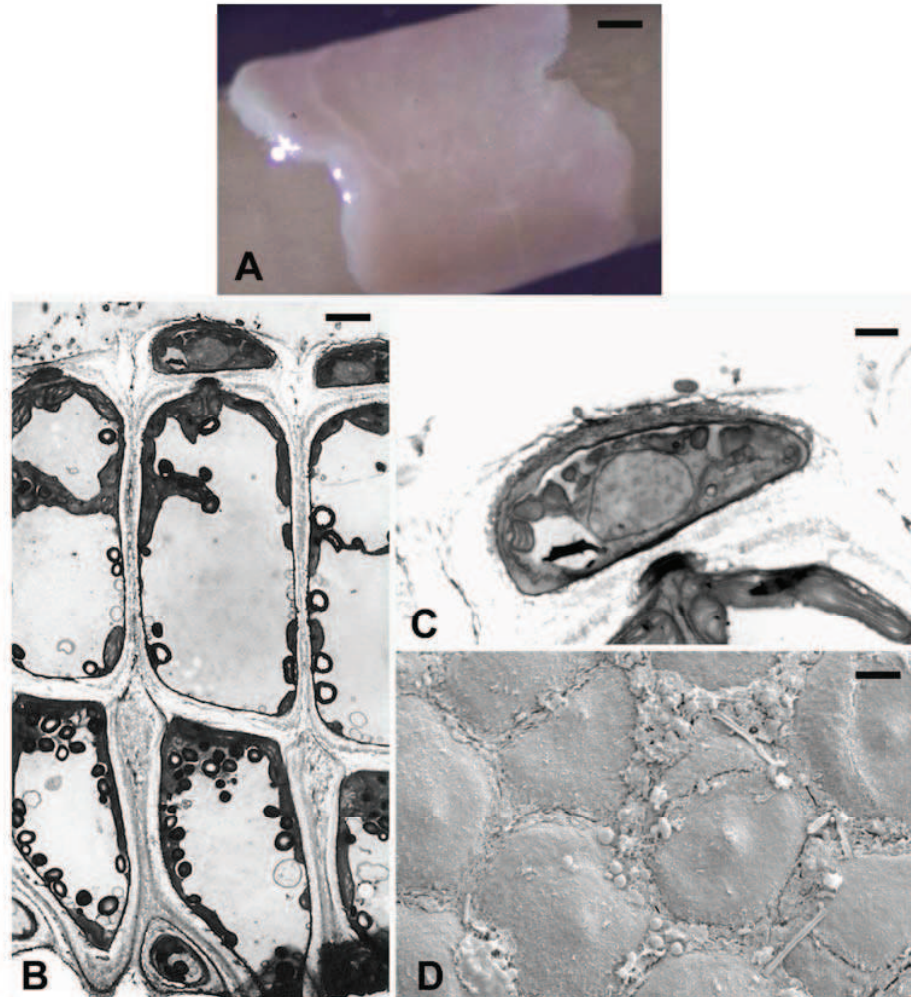


Fig. 41. *Titanoderma* sp. **A.** Micrografía estereoscópica. Vista general del talo sobre *G. gracilis*. **B y C.** Micrografías electrónicas de transmisión. **B.** Detalle de la disposición de las células del talo. **C.** Detalle de una célula del epitalo. **D.** Micrografía electrónica de barrido. Detalle de la superficie del talo, donde se observan las proyecciones centrales. Escala: A= 500 μm ; B= 4,5 μm ; C= 1,5 μm ; D= 3 μm .

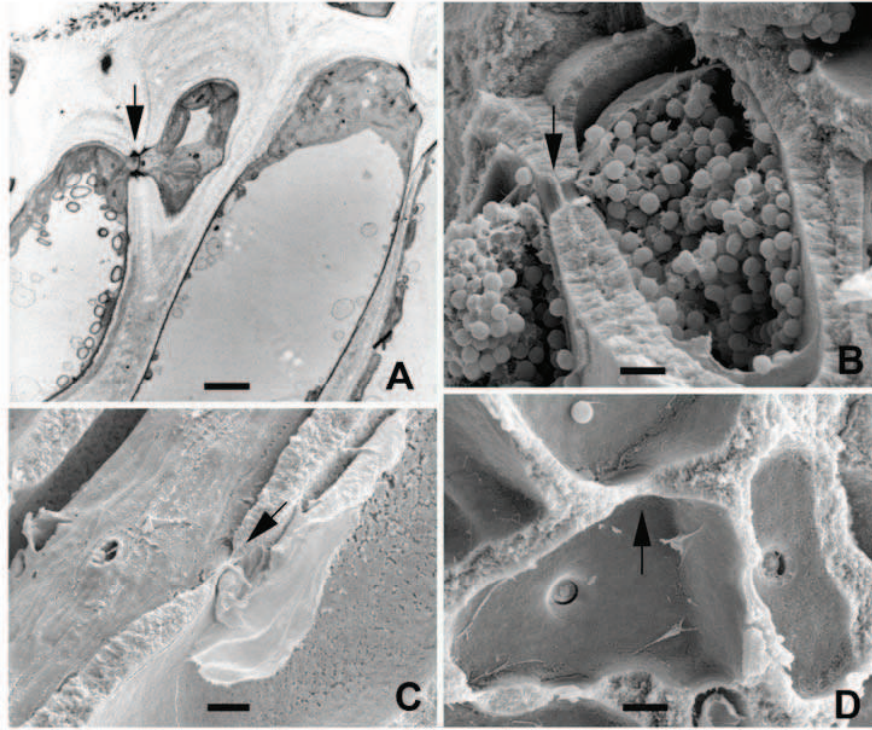


Fig 42. *Titanoderma* sp. Conexiones secundarias (flechas). **A.** Micrografía electrónica de transmisión. **B-D.** Micrografías electrónicas de barrido. Escala: A= 3 μ m; B-D= 2 μ m.

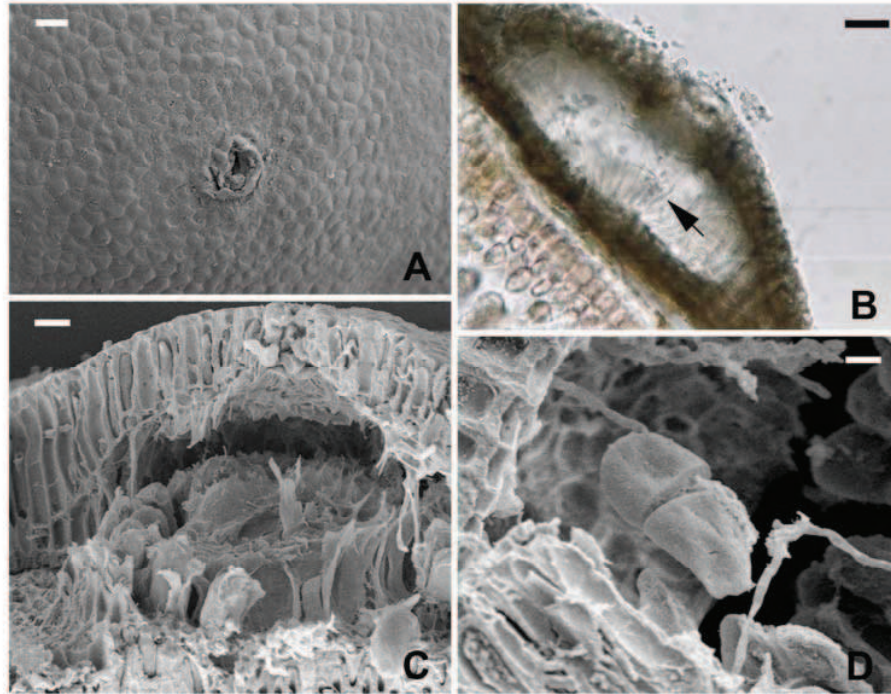


Fig. 43. Esporangios de *Titanoderma* sp. **A, C y D.** Micrografías electrónicas de barrido. **B.** Micrografía óptica. **A.** Detalle de la vista superficial de un esporangio uniporado. **B.** Vista general de un corte longitudinal del esporangio, donde se observa la columella central (flecha). **C.** Corte longitudinal de un esporangio. **D.** Detalle de las bisporas. Escala: A y C= 20 μ m; B= 17 μ m; D= 6,5 μ m.

DISCUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados las especies de epífitos que crecen sobre *G. gracilis* no son específicas de este hospedante, sino que han sido encontradas sobre otras macroalgas de la región estudiada y también creciendo libremente (Eyras & Sar 2003, Piriz et al. 2003, Casas et al. 2004, Rico et al. 2007, Giulietti & Boraso de Zaixso 2009, Miravalles 2009, Raffo & Schwindt 2009).

Las especies *Antithamnionella* sp., *Ceramium rubrum*, *Hinckesia mitchelliae*, *Dictyota dichotoma*, *Chaetomorpha* sp. y *Cladophora* sp. encontradas en este estudio han sido citadas previamente por Boraso de Zaixso (1983) como epífitas de *G. gracilis* (como *G. verrucosa*) creciendo en Golfo Nuevo (Tabla 5). Casas & Piriz (1998) también encontraron las especies *C. rubrum*, *Polysiphonia* spp., y *Dictyota* aff *dichotoma*. Además, muchos de los géneros y especies de epífitos descritos aquí han sido hallados como epífitos en otras especies de *Gracilaria* (Brawley & Xiugeng 1988, Fletcher 1995; Leonardi et al. 2006, Muñoz & Fotedar 2010). Es notoria la ausencia de epífitos del género *Ulva*, el cual ha sido citado en muchas ocasiones como epífito de otras especies de *Gracilaria* (Poblete & Inostroza 1987, Santelices & Varela 1993, Svirski et al. 1993, Buschmann et al. 1997, Dawes et al. 2000, Friedlander et al. 2001, Leonardi et al. 2006, Muñoz & Fotedar 2010), y de *G. gracilis* (Anderson et al. 1996, Dural et al. 2006), incluso en Golfo Nuevo (Casas & Piriz 1998) (Tabla 5). En Bahía Bustamante, *U. lactuca* se encontró como flora acompañante (Giulietti & Boraso de Zaixso 2009) pero nunca como epífito.

Titanoderma sp. se cita por primera vez para la provincia de Chubut. La única especie del género citada hasta el momento en Argentina es *T. conspectum*, para Tierra del Fuego (Mendoza & Molina 1993, Mendoza 1999). La especie *T. dispar* ha sido hallada como epífita de *Gracilaria pachydermatica* en México (Mateo-Cid & Mendoza-González 1997).

Los epífitos del orden Ceramiales fueron los más abundantes sobre *G. gracilis* y los que provocaron mayor daño. Ellos también han sido indicados como dominantes y de impacto negativo en otras rodófitas de importancia económica como *Gracilaria chilensis* (Kuschel & Buschmann 1991, Westermeier et al. 1991, González et al. 1993, Buschmann et al. 1997, Leonardi et al. 2006),

Chondracanthus chamissoi (Vásquez & Vega 2001) y *Kappaphycus alvarezii* (Hurtado et al. 2006, Vairappan 2006, Vairappan et al. 2008). Aún cuando el patrón estacional de epifitismo puede diferir en intensidad y tiempo de ocurrencia entre diferentes hospedantes y áreas de estudio (Buschmann et al. 1995), los patrones de abundancia de Ceramiales parecen ser comunes en diferentes hospedantes, latitudes y ambientes.

Es difícil establecer una comparación en la densidad de epífitos con trabajos anteriores, dado que la mayor parte de los estudios han medido la abundancia de epífitos en términos cualitativos o como porcentaje de cobertura o peso (Hurtado et al. 2006, Muñoz & Fotedar 2010). Una excepción es el trabajo de Vairappan et al. (2008) con densidades de una única especie de epífito, *Neosiphonia apiculata*, sobre *Kappaphycus alvarezii*, donde encontraron densidades superiores (entre 42 y 88,5 ind/cm²) a las halladas para el total de los epífitos observado en este trabajo.

No se encontró una variación estacional clara en la abundancia de los epífitos de *G. gracilis*. Sin embargo, se pudo observar una mayor abundancia relativa para cada año, en verano y otoño-invierno. Muchos trabajos han reportado picos en la biomasa de epífitos en primavera y verano, asociados al incremento de la irradiación y de la temperatura del agua (Ugarte & Santelices 1992, González et al. 1993, Westermeier et al. 1993, Fletcher 1995). Sin embargo, Buschmann et al. (1994) han reportado un incremento en la abundancia durante el invierno. Vairappan (2006) también observó 2 picos, relacionados con aumentos y descensos abruptos en la salinidad y temperatura del agua. En nuestro estudio, para un aumento de temperatura de 2° C entre noviembre de 2007 y enero de 2008, se observó un aumento de la abundancia de epífitos de dos veces. Contrariamente, para un descenso de 3° C entre mayo y junio de 2006, se observó un aumento en la abundancia de epífitos también del doble. En los picos observados en verano, se encontró un gran aporte dado por el reclutamiento de juveniles de Ceramiales, que si bien estuvieron presentes durante todo el año, tuvieron un considerable aumento en esta estación. Buschmann et al. (1997) obtuvieron resultados similares, con reclutamiento de esporas de Ceramiales sobre sustrato artificial, y con una mayor densidad de estadíos microscópicos sobre *G. chilensis*, en verano.

La variación más notoria en la densidad de epífitos fue el incremento de hasta 10 veces en la densidad de epífitos del segundo año con respecto al primero. Este gran incremento en la intensidad del epifitismo puede estar relacionado con un cambio en la estructura poblacional de *G. gracilis*. En el primer año los talos de *G. gracilis* fueron grandes (longitud y peso individual promedio altos), con gran presencia de talos reproductivos, y se observaron valores de biomasa altos. En cambio el segundo año, donde se registró una mayor densidad de epífitos, estuvo caracterizado por una biomasa baja, tamaño pequeño de los talos y proporción alta de talos vegetativos de *G. gracilis*, (ver capítulo I). El pequeño tamaño de los talos de *G. gracilis*, estaría dado en parte por reclutamiento por esporas, pero en gran medida también por fragmentación. Los talos provenientes de fragmentación presentan tejido dañado, que favorece la colonización de esporas de epífitos (Lobban & Baxter 1983, Longtin & Scrosati 2009). Esto concuerda con la observación de un gran reclutamiento de Ceramiales a comienzos de 2007. Otra posible causa de éste aumento en los epífitos acompañando un descenso de biomasa del hospedante, podría deberse a que al haber menor densidad de *G. gracilis*, y al ser los talos presentes más pequeños, habría un menor efecto de rozamiento, lo que puede provocar una autolimpieza a través del movimiento de los talos (Pizarro, 1986; Lignell et al., 1987; Lobban & Baxter, 1983; Dawes, 1992). Una mayor biomasa del hospedante, puede, a su vez prevenir la colonización de los epífitos (Li et al., 1987; Edding et al., 1987).

Calothrix confervicola fue una de las especies de epífitos más abundante. Sin embargo, *C. confervicola* no representó un serio problema para el hospedante, dado que esta especie no causó daño en el talo. Además, su pequeño tamaño no añadió peso importante a *G. gracilis*. Tampoco produjo sombreado importante, aunque podría tener cierto efecto en las densidades más altas observadas.

Sahlingia subintegra presentó una infección de Tipo II en *G. gracilis*; sin embargo, en *G. chilensis* fue incluida dentro del Tipo III de infección (Leonardi et al., 2006). Esta diferencia en el grado de infección entre las dos especies de *Gracilaria* podría deberse al pequeño tamaño de los talos de *S. subintegra* encontrados sobre *G. gracilis*, los que muy probablemente no hallan alcanzado un desarrollo suficiente como para atravesar la cutícula del hospedante.

C. rubrum, además de ser la especie más abundante durante la mayor parte del estudio, junto con el resto de las Ceramiales, fueron las especies que causaron mayor daño al hospedante, ya que sus rizoides penetraron claramente en la porción cortical de *G. gracilis*, alcanzando en algunos casos la porción medular. La ondulación del plasmalema y del estrato interno de la pared de *G. gracilis*, junto con la compresión celular, indican una acción mecánica de los rizoides al ingresar en el hospedante. Este grado de invasión de los epífitos puede aumentar la fragmentación de los talos de *G. gracilis*, como también la pérdida entera de talos por el aumento de la biomasa total (Poblete & Inostroza 1987). La rotura de la pared celular también puede favorecer la entrada de bacterias (Vairappan 2006).

En este estudio no se encontraron evidencias de digestión enzimática del tejido del hospedante, a diferencia de lo observado para *Neosiphonia harveyi* (como *Polysiphonia harveyi*) sobre *G. chilensis* (Leonardi *et al.* 2006). Esta discrepancia en el comportamiento del epífito podría deberse a diferencias en la estructura de las paredes celulares de los hospedantes (Dawes *et al.* 2000). *G. chilensis* presenta al tacto una consistencia más rígida que *G. gracilis*, lo que podría forzar al epífito a utilizar la digestión enzimática para penetrar en el hospedante. Estudios detallados de este aspecto deberían realizarse para corroborar o descartar dicha hipótesis.

Boraso de Zaixso 1983*

Ceramium rubrum
Callithamnion polyspermum (= *Aglaothamnion hookeri*)
Polysiphonia urceolata (= *P. stricta*)
Bangia sp.
Erythrotrichia sp.
Ectocarpus spp.
Giffordia mitchellae (= *Hinncksia mitchellae*)
Sphacelaria variabilis (= *S. rigidula*)
Antithamnionella ternifolia
Dictyota dichotoma
D. linearis
Punctaria latifolia
Chaetomorpha sp.
Bryopsis sp.
Cladophora sp.
Oscillatoria aff. *limosa*

Steentoft et al. 1995

Ceramium nodulosum
Holmsella pachyderma

Rebello et al. 1996

Polysiphonia spp.
Cladophora sp.
Ectocarpus spp.
Ulva sp.
Ulothrix sp.

Anderson et al. 1998

Ceramium diaphanum

Casas & Piriz 1998

Polysiphonia spp.
Ulva lactuca
Dictyota aff. *dichotoma*
Ceramium rubrum
Ectocarpus sp.

Wakibia et al. 2001

Ceramium diaphanum

<p><i>Ulva</i> sp.</p> <p><i>Cladophora</i> sp.</p> <p><i>Enteromorpha</i> sp.</p> <p>Choi et al. 2006*</p> <p><i>Enteromorpha compressa</i></p> <p><i>Enteromorpha</i> sp.</p> <p><i>Polysiphonia</i> spp.</p> <p><i>Ceramium</i> sp.</p> <p><i>Goniotrichum alsidii</i></p> <p><i>Leathesia difformis</i></p> <p><i>Punctaria latifolia</i></p> <p><i>Porphyra</i> sp.</p> <p>Dural et al. 2006</p> <p><i>Ulva</i> spp.</p> <p><i>Polysiphonia</i> spp.</p>

Tabla 5. Lista de epífitos de *G. gracilis* encontrados en trabajos anteriores. * como *G. verrucosa*

CONCLUSIONES

Con este estudio se demostró que *Gracilaria gracilis* está expuesta a una gran diversidad de epífitos y además, sufre diversos grados de infección; desde epífitos que tienen escasa relación anatómica, hasta los que causan daños celulares importantes.

Los epífitos del orden Ceramiales, principalmente *C. rubrum*, fueron los más importantes, tanto ecológicamente como por su impacto en la producción. Éstos fueron los más abundantes y los que causaron más daño, provocando pérdida de biomasa de *G. gracilis*.

La variación de la densidad de epífitos estuvo más relacionada con características propias de la población del hospedante, o con eventos azarosos, como tormentas, que con variaciones estacionales.

Si bien no es clara una estacionalidad en la densidad de epífitos, hubo una tendencia de mayor abundancia en verano y principios de otoño. Además se registró un importante reclutamiento de Ceramiales en el verano.

Este es el primer estudio sobre la diversidad, abundancia y anatomía de la infección de epífitos de *Gracilaria gracilis*, y de una especie del género *Gracilaria* del sudoeste Atlántico.

CAPÍTULO III

ESTUDIO ESTACIONAL DE LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS DEL AGAR

INTRODUCCIÓN

La matriz amorfa de las paredes de las algas rojas (Rhodophyceae) está compuesta mayoritariamente por polisacáridos de galactosa, ampliamente utilizados como aditivos alimenticios y con innumerables aplicaciones biotecnológicas, médicas y farmacéuticas (Critchley 1993, Zemke-White & Ohno 1999, Smit 2004).

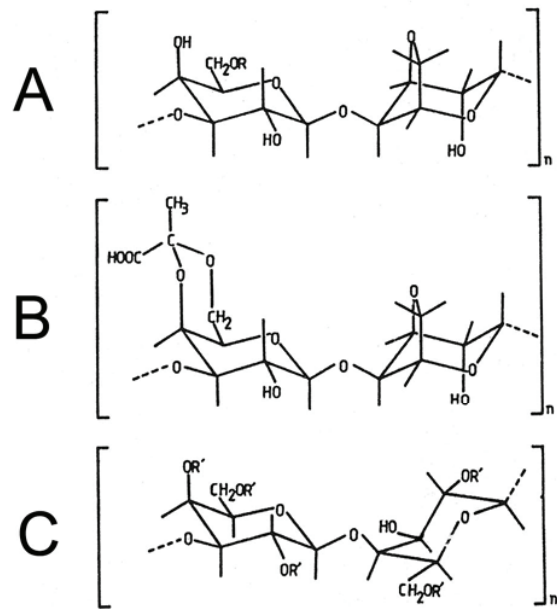
Estos galactanos presentan una cadena en la que se alternan unidades de β -galactopiranosas unidas por la posición 3 (unidades A) y unidades de α -galactopiranosas unidas por la posición 4 (unidades B). Las unidades A siempre pertenecen a la serie D-, mientras que las unidades B pueden pertenecer a la serie D- o L-. De acuerdo a si la unidad B pertenece a la serie D- o L-, se distinguen dos clases de galactanos: los carragenanos y los agaranos, respectivamente (Murano 1995, Stortz & Cerezo 2000) (Fig. 44). Adicionalmente, la unidad B puede aparecer como D- o L- 3,6-anhidrogactopiranosas (Fig. 44) o presentar sustituciones de sus grupos hidroxilo con grupos ésteres sulfato, metoxilos, cetales de ácido pirúvico y/o cadenas laterales. Estos sustituyentes enmascaran en mayor o menor grado la cadena lineal esquelética común a todos los galactanos.

Dada la variabilidad en la sustitución de las cadenas esqueléticas, la clasificación de estos galactanos sulfatados no siempre es sencilla. Dentro de la familia de los agaranos, en un extremo del abanico de posibilidades encontramos a la agarosa (Fig. 44A) que presenta la estructura repetitiva de D-galactosa unida en 3 y 3,6-anhidro-L-galactosa unida en 4. La agarosa es la responsable de las propiedades gelificantes del agar.

Los grupos sustituyentes modifican las propiedades físicas del agar. Por ejemplo, un aumento en la sustitución con ésteres sulfato disminuirá la fuerza de gel, mientras que el incremento en el contenido de 3,6 anhidro-L-galactosa la incrementa (Yaphe & Duckworth 1972, Lahaye & Rochas 1991). Por otro lado, la temperatura de gelificación está directamente correlacionada con la sustitución con un grupo metilo sobre el carbono 6 de la unidad de D-galactosa (Guiseley 1970, Murano et al. 1992, Falshaw et al. 1998). La cantidad y localización de estos grupos sustituyentes en la molécula pueden variar con los factores medioambientales y con diferentes procedimientos de extracción incidiendo en la

calidad del agar obtenido (Cote & Hanisak 1986, Marinho-Soriano & Bourret 2003, Marinho-Soriano et al. 2006, Romero et al. 2008). Rodríguez et al. (2009) caracterizaron exhaustivamente la estructura y propiedades físicas de los agaros de ejemplares estivales de *G. gracilis* de Bahía Bustamante extraídos a 70 y 90 ° C.

Dado el bajo grado de sulfatación de estos productos y sus propiedades gelificantes, se decidió encarar un estudio comparativo de las propiedades, composición y rendimiento del polisacárido obtenido en las cuatro estaciones del año y determinar si existía alguna correlación entre éstas y los factores ambientales y/o biológicos.



R= H o CH₃

R'= H o SO₃⁻

Fig. 44. Estructuras de polisacáridos de la familia de agaranos. **A.** R=H: agarosa, R=OCH₃: 6-O-metilagarosa. **B.** Agarosa piruvilada. **C.** Galactanos sulfatados. De Matsuhiro et al. 1992.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los talos de *Gracilaria gracilis* separados en los muestreos de mayo, agosto y octubre de 2006 y enero de 2007 (ver Materiales y métodos generales), fueron secados al aire libre y enviados una vez secos al Centro de Investigaciones de Hidratos de Carbono (CIHIDECAR-CONICET) y Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Extracción de polisacáridos

Se molieron porciones de 10 g de los talos de las distintas estaciones a fin de someterlos posteriormente a extracción acuosa mediante agitación mecánica. Las sucesivas extracciones se realizaron empleando 1 litro de agua cada vez y reuniendo cada etapa en una única fracción; a) 24 h a temperatura ambiente (×3) (producto TA), 4 hs a 70 °C (×3) (productos A701-3) y finalmente, 4 hs a 90 °C (×3) (productos A901-3). El sobrenadante de cada paso de extracción se clarificó por centrifugación, se concentró y se liofilizó. Los productos obtenidos a temperatura ambiente se sometieron a diálisis exhaustiva usando Spectra/Por tubing (Spectrum Laboratories Inc., USA) con un peso molecular de corte de 3500 Da antes de la liofilización.

Los productos iniciales y residuos de extracción se monitorearon por microscopía electrónica de transmisión (MET) según la metodología descrita para el estudio de epifitismo (ver Materiales y métodos, capítulo II).

Métodos generales

El contenido de carbohidratos fue analizado por el método de fenol-H₂SO₄ (Dubois et al. 1956) sin hidrólisis previa del polisacárido, usando galactosa como estándar. El sulfato fue medido mediante el método turbidimétrico de Dodgson & Price (1962) luego de la hidrólisis de las muestras con HCl 1 M por 4-5 hs, a 105-110 °C. El contenido de proteínas fue estimado por el método de Lowry et al. (1951).

Para la determinación de los monosacáridos componentes los polisacáridos se sometieron a hidrólisis reductiva según el método de Stevenson

& Furneaux (1991), obteniendo luego los alditoles peracetilados según Shea & Carpita (1988).

Para el tratamiento alcalino (Navarro & Stortz 2003) se disolvieron 10 mg del polisacárido en 5 ml de agua, con la adición de 2 mg de NaBH₄. Luego de 1 h, se adicionaron 1.7 ml de NaOH 5 M y la solución calentada a 80 °C. De acuerdo a resultados previos (Rodríguez et al. 2009), la reacción de ciclación fue detenida a las 5 hs mediante la neutralización con CF₃CO₂H (ácido trifluoroacético) 4M. El solvente fue evaporado y el residuo derivatizado a acetato de alditoles (Stevenson & Furneaux 1991).

La cromatografía gaseosa líquida (CGL) de los alditoles peracetilados se llevó a cabo en un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 5890A (Hewlett Packard, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador y las corridas se efectuaron a valores de flujo entre 1-1,3 ml/min y una relación de split cercana a 80:1. Se empleó una columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de film. La presión de cabeza de columna fue de 15 psi y las temperaturas del inyector y detector de 240 °. Las corridas se llevaron a cabo en forma isotérmica a 220 °C. La conversión de las áreas del cromatograma en porcentajes molares se hizo según la teoría de respuesta efectiva del carbono (Sweet et al. 1975), utilizando los coeficientes de 0,72 y 0,64 para el 1,2,4,5-tetra-O-acetil-3,6-anhidrogalactitol y 1,4,5-tri-O-acetil-3,6-anhidro-2-O-metilgalactitol, respectivamente.

La identidad de los monosacáridos se corroboró por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GLC-EM) en un equipo de cromatógrafo Shimadzu GC-17A conectado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMS-QP5050 a un potencial de ionización de 70 eV y utilizando helio como gas *carrier* (4,4 ml min⁻¹). Se empleó una columna capilar SP-2330 y las mismas condiciones de corrida descriptas anteriormente.

Propiedades físicas del gel

La fuerza de gel se midió en cilindros de agarosa (1% peso/peso en agua) de 16 mm de diámetro por 10 mm de alto usando un equipo Instron Modelo 3345. (Instron Corp, USA). Los tests de compresión fueron realizados hasta la fractura usando una tasa de compresión de 1 mm/min. Para todos los ensayos se empleó

una sonda cilíndrica de 30 mm de diámetro. Se calculó la fuerza de gel (g/cm^2), y los índices de elasticidad, resiliencia y adhesividad según Rosenthal (1999). Estas mediciones se realizaron en el Departamento de Industrias (UBA) y estuvieron a cargo de la Dra. Lía Gerschenson.

RESULTADOS

La Tabla 6 muestra la composición de los extractos acuosos obtenidos para el material algal de las cuatro estaciones. Independientemente de la estación de cosecha, el valor más alto de carbohidratos fue obtenido con la extracción a 70 °C. Los agaranos no mostraron diferencias significativas, tanto en su composición (principalmente agarosa) como en su grado de sulfatación (entre 4 y 6 %). El tratamiento alcalino no incrementó el porcentaje molar de 3,6-anhidrogalactosa, indicando la ausencia de sulfatación en la posición C-6 de la unidad de α -L-galactosa. Una comparación estacional de los porcentajes molares de glucosa sugiere un mayor contenido de almidón florídeo en el material de verano. Coincidentemente, las observaciones con microscopía electrónica de transmisión de los especímenes de verano mostraron abundantes gránulos de almidón florídeo cuando se comparan con los de otoño. (Fig. 45). El contenido de proteínas tuvo una tendencia creciente en otoño-invierno (Tabla 6).

La mayor fuerza de gel fue observada para la agarosa aislada de *G. gracilis* en primavera-verano (octubre de 2006 ó enero de 2007) con valores de aproximadamente 60 g/cm² (Tabla 7). La adhesividad más elevada se registró para la agarosa de talos de *G. gracilis* colectados en mayo de 2006.

Producto	Rendimiento (%) ^a	Carbohidratos (%)	Proteínas (%)	Sulfatos (%)	AG	6-O-MeGal	Xyl	3/4 O-MeGal	Gal	Glc
TA										
May-06	2	48	20	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ago-06	2	59	16	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Oct-06	3	57	15	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ene-07	3	63	12	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A70										
May-06	30	61	9	4	45	7	1	1	41	5
					44^b	8	2	1	42	3
Ago-06	15	55	9	4	40	9	1	1	41	8
					37	11	2	1	43	6
Oct-06	19	74	8	6	41	9	1	2	38	9
					41	9	1	2	38	9
Ene-07	41	64	4	4	40	5	1	1	39	14
					41	6	2	1	38	12
A90										
May-06	8	69	12	6	41	11	2	4	34	8
Ago-06	7	74	12	6	34	4	0	3	41	18
Oct-06	6	88	7	6	38	12	1	3	35	11
Ene-07	3	75	6	5	33	8	3	3	32	21

Tabla 6. Caracterización general de los productos de extracción acuosa a temperatura ambiente (TA), 70° (A70) y 90° (A90) de las muestras de *G. gracilis* colectadas en otoño (may), invierno (ago), primavera (oct) y verano (ene).

^a expresado como porcentaje de alga liofilizada.

^b los números en negrita corresponden a porcentajes molares de monosacáridos en los productos hidrolizados después del tratamiento alcalino.

	Fuerza de gel (g/cm ²)	Adhesividad (g.min)	Temperatura (°C)	Nitrógeno (µmoles/L)	Relación talos vegetativos/reproductivos
Mayo 2006	40	3,08	13	5,89	0,03
Agosto 2006	12	0,24	9.5	1,69	0,71
Octubre 2006	61	0,57	12	0,14	0,4
Enero 2007	60	0	16.5	0,58	0,4

Tabla 7: Propiedades físicas del gel de sistemas 0.5% peso/peso (25°C) y factores biológicos y ambientales en las fechas de muestreo respectivas.

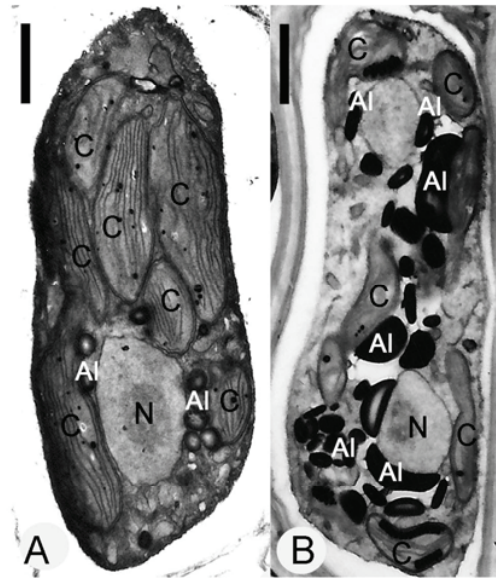


Fig. 44. Micrográficas electrónicas de transmisión de células de *G. gracilis*. **A.** Muestra de otoño. Se destacan los cloroplastos bien desarrollados. **B.** Muestra de verano. Se destacan los abundantes gránulos de almidón florídeo.
C: cloroplasto; Al: almidón florídeo; N: núcleo.
Escala = 2 μ m.

DISCUSIÓN

El rendimiento total de las dos fracciones de agarosa (A70 y A90) para los talos de primavera y verano es concomitante con el aumento de la productividad fotosintética debida al alargamiento de los días. Varios autores registraron una correlación positiva entre aumento en la producción de biomasa y rendimiento de agaranos tanto en *G. gracilis* (Rebello et al. 1996, Marinho-Soriano & Bourret 2003, Wakibia et al. 2001) como en *G. edulis* (Durairatnam 1987), *Gracilaria* sp. (Chirapart & Ohno 1993) y *Gracilaria vermiculophylla* (Vergara-Rodarte et al. 2010). Por otro lado, también existen registros de un mayor rendimiento en talos otoñales (Mollet et al. 1998).

El incremento en la biomasa de la población implica que los talos están atravesando una etapa de rápido crecimiento, es decir, produciendo tejidos jóvenes en los ápices y ramas laterales. Chirapart & Ohno (1993) y Craigie & Wen (1984) indican que el rendimiento de agar declina durante el crecimiento rápido y en tejidos jóvenes, mientras que las fuerzas de gel de las agarosas tienden a incrementar durante la temporada de rápido crecimiento. Los talos en activo crecimiento producen agaranos con proporciones más elevadas de galactosa no sustituida, al igual que mayores proporciones de 3,6-anhidrogalactosa; consecuentemente rindiendo geles de mayor dureza. En nuestro caso, no podemos atribuir la mayor fuerza de gel de las agarosas de primavera y verano a diferencias en el grado de sulfatación o en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa. Incluso, el tratamiento alcalino evidenció la escasa sulfatación sobre el C-6 de la galactosa. La única explicación posible sería un mayor peso molecular en los polisacáridos de mayor fuerza de gel. Recientemente, Araño et al. (2000) encontraron una correlación positiva entre la fuerza de gel y mayor rendimiento de agaranos para *G. firma*.

El incremento de almidón en los talos de verano coincide con la disminución de la carga de nitrógeno en el agua. La acumulación de almidón y floridósidos es frecuente en situaciones de limitación de nutrientes (Collén et al. 2004). Sin embargo, la menor disponibilidad de nitrógeno no parece limitar la producción de biomasa (ver Capítulo I). Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta la estrategia de acumulación de nitrógeno de esta especie para su eventual asimilación cuando aumentan la temperatura y las horas diarias de luz.

Tanto el almidón como los floridósidos pueden funcionar como reservas de carbono (Collén et al. 2004). Incluso las existencias de floridósido pueden ser utilizadas para promover la producción de agaros en condiciones de día largo. Un mecanismo similar podría servir para explicar el mayor rendimiento de agarosa en los talos estivales de *G. gracilis* de Bahía Bustamante.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta el efecto negativo del almidón sobre la fuerza de gel de la agarosa (Lai et al. 2002, Rodríguez et al 2009). A pesar del mayor contenido de almidón para A70 de primavera-verano, la fuerza de gel sigue siendo alta. Este hecho está claramente relacionado con la temperatura de extracción. Nótese que al aumentar la temperatura (A90) aumenta aún más el contenido de glucosa en la fracción de agarosa. En un trabajo anterior, se observó en *G. gracilis* que este aumento estaba directamente relacionado con la disminución de la fuerza de gel (Rodríguez et al 2009). En suma, pese a su mayor contenido de almidón respecto de las agarosas de otoño e invierno, el producto A70 de primavera-verano sigue conservando buenas propiedades gelificantes. Debe tenerse en cuenta que la sola presencia de almidón puede no alterar significativamente el entrecruzamiento de las moléculas de agarosa durante el proceso de gelificación. Para que ello ocurra, existe un umbral mínimo de concentración de almidón (Mohammed et al. 1998). Por debajo de dicho umbral el almidón se comporta como una fase dispersa de gránulos hinchados dentro de la trama tridimensional del gel de agarosa, sin alterar significativamente la fuerza de dichos geles. Este hecho podría explicar las buenas propiedades gelificantes de los productos de primavera-verano, pese a su mayor contenido de almidón florídeo respecto de los talos de otoño-invierno y la disminución de la misma al aumentar en contenido de almidón previamente informada para los productos extraídos con agua a 90°C (Rodríguez et al. 2009). Por otro lado, se puede obtener a partir de *G. gracilis* de Bahía Bustamante una agarosa de mejores propiedades gelificantes y de excelente rendimiento extrayendo a temperaturas más bajas de las habituales, hecho nada desdeñable a la hora de hacer una estimación de costos de producción industrial.

Las observaciones ultraestructurales indican también un mayor desarrollo tilacoidal en concomitancia con el aumento del nitrógeno en el agua. Con el acortamiento de los días, se verifica la disminución de la tasa de crecimiento y un aumento en los pigmentos antena (ficobiliproteínas) en relación a la clorofila

(Rosenberg & Ramus 1982, Carnicas et al. 1999). Esta modulación de los fotosistemas es dependiente de la disponibilidad de nitrógeno (Sánchez et al. 1993). Así, el mayor contenido de proteínas en los talos de otoño-invierno es esperable dado que la mayor proporción de proteína celular se debe a los fotosistemas. Este hecho puede jugar un papel doble: por un lado mejora la capacidad de captación de fotones bajo condiciones de intensidad lumínica limitante y por otro, los pigmentos pueden actuar como reservorios accesibles de nitrógeno para la temporada de mayor crecimiento (primavera-verano). El desfase estacional entre acumulación y asimilación de nitrógeno ha sido informado para *G. gracilis* de Bahía Saldanha, Namibia (Smit et al. 1997).

Un hecho particularmente llamativo en las propiedades físicas del agarano de otoño es su mayor adhesividad. Nuevamente, no podemos encontrar explicación en la diferencia de composición del producto respecto del de las demás estaciones. Pero cabe señalar que en esta temporada se registra un aumento significativo de la frecuencia de fases reproductivas (gametofitos y esporofitos) y quizás esta diferencia cobra sentido en un contexto biológico, dado que la mayor adhesividad del polisacárido podría facilitar la fijación de esporas al sustrato durante las etapas iniciales de desarrollo.

CONCLUSIONES

Se encontró un mayor rendimiento de agar en la extracción a 70 °C independientemente de la estación de cosecha.

Se evidenciaron cambios estacionales en la composición de *G. gracilis*, con mayor contenido de proteínas y desarrollo tilacoidal en las muestras de otoño-invierno y mayor contenido de almidón en primavera-verano. La fuerza de gel más elevada se observó en las muestras de primavera-verano.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados obtenidos en este trabajo brindan un marco apropiado para iniciar esporocultivos en la zona de estudio. Este método permitiría un aumento tanto de la biomasa como de la variabilidad genética de la población.

La información biológica básica obtenida en este trabajo es indispensable para una línea de investigación orientada al desarrollo de cultivos de *G. gracilis* a partir de carposporas, que ya se ha iniciado en el CERZOS (Michetti et al. 2009, 2010).

Los aspectos sobresalientes surgidos de esta tesis a tener en cuenta en el desarrollo de esporocultivos son:

- La disponibilidad de carposporofitos durante gran parte del año, con mayor abundancia en verano-otoño.
- La comprobación de la viabilidad de las carposporas y la supervivencia de los tetrasporofitos jóvenes originados a partir de ellas, aspectos que fueron corroborados en cultivos de laboratorio (Michetti et al. 2009).
- El reclutamiento de esporas de epífitos del orden Ceramiales en el verano, aspecto que plantea la necesidad de una estrategia de manejo al momento de instalar los talos obtenidos por esporocultivo en la pradera, como por ejemplo una cosecha previa de *Gracilaria*.
- El efecto de autolimpieza de epífitos que ocurre en las densidades más altas de *G. gracilis*, fenómeno que debe considerarse al momento de determinar la densidad de instalación de las plántulas de *Gracilaria* en la pradera.
- El aprovechamiento de nitrógeno por parte de *G. gracilis* en los meses de mayor disponibilidad, y su acumulación para los meses de crecimiento más rápido, aspectos que también deberán ser evaluados.

Por otro lado, los resultados del análisis de las propiedades del agar, alientan el aprovechamiento del recurso, dado que se ha obtenido un buen rendimiento y calidad. Además, la extracción a una temperatura menor a la

utilizada habitualmente (este estudio) y la posibilidad de obviar el tratamiento alcalino previo a la extracción (Rodríguez et al. 2009) son resultados nada desdeñables a la hora de hacer una estimación de costos de producción industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, I.A. 1988. *Food and food products from algae*. En: Lembi, C.A. & Waaland, J.R. (eds.) *Algae and Human Affairs*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 135–147.
- Alveal, K.; Romo, H.; Werlinger, C. & Oliveira, C. 1997. Mass cultivation of the agar-producing *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) from spores. *Aquaculture* 148: 77-83.
- Anderson, R.; Monteiro, P.M.S. & Levitt, G. 1996. The effect of localized eutrophication on competition between *Ulva lactuca* (Ulvaceae, Chlorophyta) and a commercial resource *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327: 291–296.
- Araño, K.G.; Trono, G.C.; Montaña, N.E.; Hurtado, A.Q. & Villanueva, R.D. 2000. Growth, agar yield and quality of selected agarophyte species from the Philippines. *Bot.* 43: 517–524.
- Bird, C.J. & Kain Jones, J.M. 1995. Recommended names of included species of Gracilariaceae. *J. Appl. Phycol.* 7: 335-338.
- Bird, C.J. & McLachlan, J. 1982. Some underutilized taxonomic criteria in *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot. Mar.* 25: 557-562.
- Bird, C.J.; de Oliveira, E.C. & McLachlan, J. 1986. *Gracilaria cornea*, the correct name for the western Atlantic alga hitherto known as *G. debilis* (Rhodophyta, Gigartinales). *Can. J. Bot.* 64(9): 2045–2051.
- Bird, C.J. & Rice, E.L. 1990. Recent approaches to the taxonomy of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) and the *Gracilaria verrucosa* problem. *Hydrobiologia* 204/205: 111-118.

- Bold, H.C. & Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae: Structure and Reproduction*. 2º Ed. Prentice Hall, New Jersey, 720 pp.
- Boraso de Zaixo, A.L. 1983. Ecología de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss en poblaciones de la provincia de Chubut (Argentina). Tesis, Universidad Nacional de Buenos Aires, 172 pp.
- Boraso de Zaixso, A.L. 1984. Crecimiento de *Gracilaria verrucosa* en condición suspendida. *Mem. Soc. Latinoam. Acuic.* 5:415-418.
- Boraso de Zaixso, A.L. 1987. *Gracilaria verrucosa* in Golfo Nuevo, Chubut, Argentina. I. Population parameters and environmental factors. *Hydrobiologia* 151/152: 238-244.
- Boraso de Zaixso, A.L. 1989. Ecological considerations for the possibility of culturing *Gracilaria verrucosa* in Argentina. En: *Cultivation of Seaweeds in Latin America*. Univ. of Sao Paulo - International Foundation for Science: 51-58.
- Boraso de Zaixso, A.L. 1995a. La población de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss en Bahía Arredondo (Chubut, Argentina). *Nat. Pat. Ser. Cs. Biol.* 3: 85-106.
- Boraso de Zaixso, A.L. 1995b. *Utilización de algas marinas*. En: Ferrario, M. & Sar, E. (eds.). *Macroalgas de Interés Económico*. Universidad Nacional de La Plata. Red de Editoriales Universitarias, La Plata. pp 15-55.
- Boraso de Zaixso, A.L. 1996. Seaweed Resources Evaluation. Three cases from the patagonic region. *Simp. Intern. Utilización del espacio oceánico costero (COSU' 96)*: 7 pp.
- Boraso de Zaixso, A. L. & Akselman, R. 2005. *Anotrichium furcellatum* (Ceramiaceae, Rhodophyta) en Argentina. *Bol. de la Soc. Arg. Bot.* 40: 207-213.

- Boraso de Zaixso, A.L.; Casas, G. & Romanello, E. 1991. Análisis de la influencia de los factores ambientales en el crecimiento de *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Investigaciones 1985-1988*, Universidad Nacional de La Patagonia San Juan Bosco: 169-171.
- Boraso de Zaixso, A.L. & Paternóster, I. 1985. Demografía, reproducción y propagación en poblaciones de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss de la provincia del Chubut (Rep. Argentina). I. Golfo Nuevo. *Contrib. CENPAT* 99: 26pp.
- Boraso de Zaixso, A.L.; Zaixso, H.E. & Romanello, E. 1997. Estudios sobre la población de *Gracilaria gracilis* de Bahía Melo (prov. de Chubut, Argentina). *Nat. Pat. Ser. Cs. Biol.* 5:1-27.
- Boraso de Zaixso, A.L.; Ciencia, M. & Cerezo, A. 2006. *Seaweed resources of Argentina*. En: Critchley, A.T.; Ohno, M. & Largo, D.B. (eds.) *World Seaweed Resources— An Authoritative Reference System*. Electronic version 1.0. Eti Information Services Ltd: www.etiis.org.uk: 26.
- Brawley, S.H. & Xiugeng, F. 1988. Ecological studies of *Gracilaria asiatica* and *Gracilaria lemaneiformis* in Zhanshan Bay, Qingdao. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 6: 22-34.
- Brito, L.L. & Silva, S.T. 2004. Fases reproductivas de *Gracilaria damaecornis* J. Agardh (Gracilariaceae: Rhodophyta). *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*: 43: 33-36.
- Buschmann, A.H.; Correa, J.A.; Westermeier, R.; Hernández-González, M. & Norambuena, R. 2001. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture* 194: 203-220.
- Buschmann, A.H. & Gómez, P. 1993. Interaction mechanisms between *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and epiphytes. *Hydrobiologia* 260/261: 345–351.

- Buschmann, A.H.; Retamales, C.A. & Figueroa, C. 1997. Ceramialean Epiphytism in an Intertidal *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) Bed in Southern Chile. *J. Appl. Phycol.* 9: 129-135.
- Buschmann, A.H.; Westermeier, R. & Retamales, C.A. 1995. Cultivation of *Gracilaria* on the sea-bottom in southern Chile: a review. *J. Appl. Phycol.* 7: 291-301.
- Buschmann, A.H.; Mora, O.; Gómez, P.; Böttger, M.; Buitano, S.; Retamales, C.; Vergara, P. & Gutierrez, A. 1994. *Gracilaria chilensis* outdoor tank cultivation in Chile: use of land-based salmon culture effluents. *Aquacult. Engng.* 13: 283-300.
- Candia, A.I. 1988. Ciclo reproductivo *in vitro* de dos poblaciones de *Gracilaria* Greville (Rhodophyta, Gracilariaceae) de Lenga, Bahía San Vicente. *Gayana Bot.* 45:357-364.
- Carnicas, E.; Jimenez, C. & Niell, F.X. 1999. Effects of changes of irradiance on the pigment composition of *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang et Xia. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 50: 149–158.
- Casas, G.N. & Piriz, M.L. 1996. Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hydrobiologia* 326/327: 213–215.
- Casas, G.N. & Piriz, M.L. 1998. Cultivo experimental de la agarífera *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) en golfo Nuevo, Argentina. *Nat. Pat. Ser. Cs. Biol.* 6:51-69.
- Casas, G.N.; Romanello, E. & García, H. 1997. Observaciones sobre el crecimiento y brotación de *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) en Golfo Nuevo, Chubut (Argentina). *Nat. Pat. Ser. Cs. Biol.* 5: 39-54.
- Casas, G.N.; Scrosati, R. & Piriz, M.L. 2004. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biol. Invasions* 6:411- 416.

- Chirapart, A. & Ohno, M. 1993. Seasonal variation in the physical properties of agar and biomass of *Gracilaria* sp. (Chorda type) from Tosa Bay, southern Japan. *Hydrobiologia* 260/261: 541–547.
- Clare, A. S. 1995. Chemical signals in barnacles: old problems, new approaches. En: Schram, F. R. & Hoeg, J. T. (Eds.) *New Frontiers in Barnacle Evolution*. A. A. Balkma, Rotterdam, pp. 49–67.
- Collén, P.N.; Camitz, A.; Hancock, R.D.; Viola, R. & Pedersen, M. 2004. Effect of nutrient deprivation and resupply of metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 40: 305–314.
- Cordero, R.A., 2005. Desarrollo de ensilado del alga *Gracilaria chilensis* para la alimentación de abalón rojo *Haliotis rufescens*, (Swainson, 1822). Tesis de grado. Universidad Católica de Temuco, 92 pp.
- Cote, G. L. & Hanisak, M. D. 1986. Production and properties of native agars from *Gracilaria tikvahiae* and other red algae. *Bot. Mar.* 29 (4): 359–366.
- Craigie, J.S. & Wen, Z.C. 1984. Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *Can. J. Bot.* 62: 1665–1670.
- Critchley, A.T. 1993. *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales): An economically important agarophyte. En: Ohno, M. & Critchley, A.T. (eds.) *Seaweed Cultivation and Marine Ranching*. JICA, Japón, pp 89–112.
- Davis, A.R.; Targett, N.M.; McConell, O.J. & Young, C.M. 1989. *Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and growth*. En: Scheuer, P.J. (ed.) *Bioorganic Marine Chemistry*. Springer, Berlin, pp. 85–114.

- Dawes, C.J. 1992. Rope cultivation of *Gracilaria* in Namibia: Prospects. En: Mshigeni, K.E.; Bolton, J.; Critchley, A. & Kiangi, G. (eds.) *Proceedings of the First International Workshop on Sustainable Seaweed Resource Development in Sub-Saharan Africa*. 99–102.
- Dawes, C.P. 1995. Suspended cultivation of *Gracilaria* in the sea. *J. Appl. Phycol.* 7:303-313.
- Dawes, C.J.; Teasdale, B.W. & Friedlander, M. 2000. Cell wall structure of the agarophytes *Gracilaria tikvahiae* and *G. cornea* (Rhodophyta) and penetration by the epiphyte *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 12: 567–575.
- DeBoer, J. A. 1981. *Nutrients*. En: Lobban, C. S. & Wynne, M. J. (eds.) *The biology of seaweeds*. Blackwell Scient. Publ., Oxford, pp 356-392.
- de Nys, R.; Steinberg, P. D.; Willemsen, P.; Dworjano, S. A.; Gabelish, C. L. & King, R. J. 1995. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Bifouling*. 8: 259–71.
- Destombe, C. & Douglas, S.E. 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Curr. Genet.* 19: 395-398.
- Destombe, C.; Valero, M.; Vernet, P. & Couvet, D. 1989. What controls haploid–diploid ratio in the red alga, *Gracilaria verrucosa*? *J. Evol. Biol.* 2:317–338.
- Destombe, C.; Valero, M. & Guillemin, M.L. 2010. Delineation of two sibling red algal species: *Gracilaria gracilis* and *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta) using multi DNA markers: resurrection of the species *G. dura* previously described in the northern atlantic 200 years ago. *J. Phycol.* 46: 720-727.

- Dixon, P.S. 1965. Perennation, vegetative propagation and algal life histories, with special reference to *Asparagopsis* and other Rhodophyta. *Bot. Gotheburg. III Proc. Vth Mar. Biol. Symp. Goteborg.*, pp. 67-74.
- Dodgson, K.S. & Price, R.G. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* 84: 106–110.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350–366.
- Durairatnam, M. 1987. Studies of the yield of agar, gel strength and quality of agar of *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva from Brazil. *Hydrobiologia* 151/152: 509–512.
- Dural, B.; Demir, N. & Sunlu, U. 2006. A pilot scale unit for suspended cultivation of *Gracilaria gracilis* in Izmir Bay, Aegean Sea Turkey. *Pak. J. Biol. Sci.* 9: 1043–1046.
- Eberlein, K. & Kattner, G. 1987. Automatic method for the determination of orthophosphate and total dissolved phosphorous in the marine environment. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 326: 354–357.
- Edding, M., Macchiavello, J. & Black, J. 1987. Culture of *Gracilaria* sp. in outdoor tanks: Productivity. *Hydrobiologia* 151: 369-379.
- Engel, C.; Aberg, P.; Gaggiotti, O.E.; Destombe, C. & Valero, M. 2001. Population dynamics and stage structure in a haploid-diploid red seaweed, *Gracilaria gracilis*. *J. Ecol.* 89:436-450.
- Engel, C.; Destombe, C. & Valero, M. 2004. Mating system and gene flow in the red seaweed *Gracilaria gracilis*: effect of haploid–diploid life history and intertidal rocky shore landscape on fine-scale genetic structure. *Heredity* 92: 289–298.

- Eyras, C. & Sar, E. A. 2003. Arribazones estivales en Puerto Madryn, Argentina, como materiales para la obtención de compost. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 38: 105-111.
- Falshaw, R.; Furneaux, R. & Stevenson, D.E. 1998. Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 308: 107–115.
- Fierst, J.; terHorst, C.; Kübler, J.E. & Dudgeon, S. 2005. Fertilization success can drive patterns of phase dominate in complex life histories. *J. Phycol.* 41: 238-249.
- Fletcher, R.L. 1995. Epiphytism and fouling in *Gracilaria* cultivation: an overview. *J. Appl. Phycol.* 7: 325–333.
- Friedlander, M. 1992. *Gracilaria conferta* and its epiphytes: the effect of culture conditions on growth. *Bot. Mar.* 35: 423-428.
- Friedlander, M.; Gonen, Y.; Kashman, Y. & Beer, S. 1996. *Gracilaria conferta* and its epiphytes: 3. Allelopathic inhibitions of the red seaweed by *Ulva* cf. *lactuca*. *J. Appl. Phycol.* 8: 21-25.
- Friedlander, M.; Kashman, Y.; Weinberger, F. & Dawes, C.J. 2001. *Gracilaria* and its epiphytes 4. The response of two *Gracilaria* species to *Ulva lactuca* in a bacteria-limited environment. *J. Appl. Phycol.* 13: 501–507.
- Giulietti, E.G. & Boraso de Zaixso, A.L. 2009. Comunidad de macroalgas de Bahía Bustamante (Golfo San Jorge, Chubut). *VII Jor. Nac. Cas. Mar.* Resúmenes en CD-Rom (ISBN 978-987-25479-0-5): 286.
- González, M.A.; Barrales, H.L.; Candia, A. & Cid, L. 1993. Spatial and temporal distribution of dominant epiphytes on *Gracilaria* from a natural subtidal bed in central-southern Chile. *Aquaculture* 116: 135–148.

- Grasshoff, K.; Ehrhardt, M. & Kremling, K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. 2^o ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. 419 pp.
- Guillemin, M.L.; Akki S.A.; Givernaud, T.; Mouradi, A.; Valero, M. & Destombe, C. 2008a. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to delineate species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquat. Bot.* 89: 324-330.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2010. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. búsqueda realizada el 1^o de Noviembre de 2010.
- Guiseley, K.B. 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. *Carbohydr. Res.* 13: 247–256.
- Hay, M.E. & Norris, J.N. 1984. Seasonal reproduction and abundance of six sympatric species of *Gracilaria* Grev. (Gracilariaceae; Rhodophyta) on a Caribbean subtidal sand plain. *Hydrobiologia* 116/117: 63-72.
- Hayat, M.A. 1986. *Basic techniques for transmission electron microscopy*. Academic Press, Orlando, 411 pp.
- Horrocks, J.L.; Stewart, G.R. & Dennison, W.C. 1990. Tissue nutrient content of *Gracilaria* spp. (Rhodophyta) and water quality along an estuarine gradient. *Phycologia* 29: 501-510.
- Horta, P.A. 2002. Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15: 7-44.
- Hoyle, M.D. 1978. Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 35:273-283.

- Hurtado, A.Q.; Critchley, A.T.; Trespoey, A. & Bleicher-Lhonneur, G. 2006. Occurrence of *Polysiphonia* epiphytes in *Kappaphycus* farms at Calaguas Is., Camarines Norte, Philippines. *J. Appl. Phycol.* 18: 301–306.
- Hurtado-Ponce, A.Q. & Umezaki, I. 1987. Growth rate studies of *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 30: 223-226.
- Infante, R. & Candia, A. 1988. Cultivo de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss e *Iridaea ciliata* Kützing (Rhodophyta, Gigartinaceae) en laboratorio: esporulación inducida y colonización de carposporas en diferentes sustratos. *Gayana Bot.* 45: 297-304.
- Jennings, J.G. & Steinberg, P.D. 1997. Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Ecklonia radiata*. *Oecologia* 109 (3): 461-473.
- Kain, J.M. & Destombe, C. 1995. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7: 269-281.
- Kuschel, F.A. & Buschmann, A.H. 1991. Abundance, effects and management of epiphytes in intertidal cultures of *Gracilaria* (Rhodophyta) in Southern Chile. *Aquaculture* 92: 7-19.
- Lahaye, M. & Rochas, C. 1991. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *Hydrobiologia* 221: 137–148.
- Lai, L.N. ; Karim, A.A. ; Norziah, M.H. & Seow, C.C. 2002. Effects of Na₂CO₃ and NaOH on DSC thermal profiles of selected native cereal starches. *Food Chemistry* 78 : 355–362.
- Lazo, M. L. 1982. Novedades en Rhodophyta argentinas. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 21: 65-80.

- Leonardi, P.I., Miravalles, A.B., Faugeron, S., Flores, V., Beltran, J. & Correa, J.A. 2006. Diversity, phenomenology and epidemiology of epiphytism in farmed *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) in northern Chile. *Eur. J. Phycol.* 41: 247–257.
- Levy, I.; Beer, S. & Friedlander, M. 1990. Growth, photosynthesis and agar in wild-type strains of *Gracilaria verrucosa* and *G. conferta* (Gracilariales, Rhodophyta), as a strain selection experiment. *Hydrobiologia* 204/205: 381–387.
- Li, R.Z.; Chong, R.Y. & Meng, Z.C. 1984. A preliminary study of raft cultivation of *Gracilaria verrucosa* and *Gracilaria sjoestedtii*. *Hydrobiologia* 116/117: 252–254.
- Lignell, A.; Ekman, P. & Pedersén, M. 1987. Cultivation technique of marine seaweeds allowing controlled and optimized conditions in the laboratory and on a pilot scale. *Bot. Mar.* 30: 417–424.
- Lobban, C.S. & Baxter, D.M. 1983. Distribution of the red algal epiphyte *Polysiphonia lanosa* on its brown algal host *Ascophyllum nodosum* in the Bay of Fundy, Canada. *Bot. Mar.* 26: 533–538.
- Longtin, C. & Scrosati, R. 2009. Role of surface wounds and brown algal epiphytes in the colonization of *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae) fronds by *Vertebrata lanosa* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 45: 535–539.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Macchiavello, J.; De Paula, E.J. & Oliveira, E.C. 1998. Growth rate responses of five commercial strains of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gracilariales) to temperature and light. *J. World Aquac. Soc.* 29: 259–266.

- Marinho-Soriano, E. & Bourret, E. 2003. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* 90(3): 329–333.
- Marinho-Soriano, E. & Bourret, E. 2005. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* 96: 379-382.
- Marinho-Soriano, E.; Fonseca, P.C.; Carneiro, M.A.A. & Moreira, W.S.C. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour. Technol.* 97: 2402–2406.
- Marinho-Soriano, E.; Laugier, T & De Casabianca, M.L. 1998. Reproductive strategy of two *Gracilaria* species, *G. bursa-pastoris* and *G. gracilis*, in a Mediterranean Lagoon (Thau, France). *Bot. Mar.* 41: 559-564.
- Martin, J.P. & Bastida, R.O. 2008. El alga invasora *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar en la Ría Deseado (Patagonia Austral, Argentina): ciclo del esporofito y factores ambientales determinantes de su distribución. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43: 335-344.
- Mateo-Cid, L.E. & Mendoza-González, A.C. 1997. Nuevos registros de algas marinas para Oaxaca, México. *Polibot.* 4: 54-74.
- Mateo Cid, L. E.; Mendoza González, A. C. & Searles, R. B. 2003. La Tribu Callithamnieae (Ceramiaceae, Rhodophyta) en la costa del Atlántico de México. *Hidrobiológica* 13: 39–50.
- Matsuhiro, B. & Urzúa, C. 1990. Agars from *Gracilaria chilensis* (Gracilariales). *J. Appl. Phycol.* 2: 273–279.
- Matsuhiro, B.; Rivas, P. & Lamba, D. 1992. Polisacáridos de fases nucleares de *Gracilaria chilensis*. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 37: 89-95.

- Mayer, A.M.S. 1981. Studies on *Gracilaria* sp. in Bahía Arredondo, Chubut Province, Argentina. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 705–710.
- McLachlan, J. & Bird, C.J. 1986. *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. *Aquatic Botany* 26: 27–49.
- Mendoza, M. L. 1969. Estudio sistemático y ecológico de las Ceramiaceae (Algae-Rhodophyta) de Puerto Deseado. Provincia de Santa Cruz. *Darwiniana* 15: 287-362.
- Mendoza, M.L. 1999. State of knowledge of the Corallinales (Rhodophyta) of Tierra del Fuego and the Antarctic Peninsula. *Sci. Mar.* 63: 139-144.
- Mendoza, M.I. & Molina, S. 1993. Preliminary comments on a redescription of *Pseudolithophyllum fuegianum* and *Titanoderma conspectum* (Rhodophyta, Corallinales) in Tierra del Fuego, Argentina. *Hydrobiologia* 260/261: 51-56.
- Michetti, K. M.; Martín, L. & Leonardi, P.I. 2009. Liberación y germinación de carpósporas in vitro del alga agarófito *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *VII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar*. Resúmenes en CD-Rom (ISBN 978-987-25479-0-5): 341.
- Michetti, K. M.; Martín, L. & Leonardi, P.I. 2010. Evaluación de la liberación de carposporas in vitro del alga agarófito *Gracilaria gracilis* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *X Simposio Argentino y XIII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica*, Córdoba.
- Miravalles, A.B. 2009. Biología y ultraestructura de *Codium* spp. (Bryopsidophyceae, Chlorophyta): morfologías vegetativa y reproductiva, ciclos de vida y epifitismo. Tesis, Universidad Nacional del Sur, 196pp.

- Mohammed, Z. H.; Hember, M. W. N.; Richardson, R. K. & Morris, E. R. 1998. Kinetic and Equilibrium Processes in the Formation and Melting of Agarose Gels. *Carbohydr. Polym.* 36: 15-26.
- Mollet, J.C.; Rahaoui, A. & Lemoine, Y. 1998. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *J. Appl. Phycol.* 10: 59–66.
- Muñoz, J. & Fotedar, R. 2010. Epiphytism of *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar & Kraft) from Western Australia. *J. Appl. Phycol.* 22: 371-379.
- Murano, E. 1995. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7: 245–254.
- Murano, E.; Toffanin, R.; Zanetti, F.; Knutsen, R.H.; Paoletti, S. & Rizzo, R. 1992. Chemical and macromolecular characterization of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Polym.* 18: 171–178.
- Navarro, D.A. & Stortz, C.A. 2003. Determination of the configuration of 3, 6-anhydrogalactose and cyclizable α -galactose 6-sulfate units in red seaweed galactans. *Carbohydr. Res.* 338: 211–218.
- Oliveira, E.C.; Alveal, K. & Anderson, R.J. 2000. Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. *Rev. Fisch. Sci.* 8: 345-377.
- Oliveira, E.C. & Plastino, E.M. 1984. The life history of some species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Brasil. *Jpn. J. Phycol.* 32: 1–6.
- Orduña-Rojas, J. & Robledo, D. 2002. Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, México. II. Biomass assessment and reproductive phenology. *Bot. Mar.* 45: 459-464.

- Oza, R.M. & Krishnamurthy, V. 1968. Carpospore germination and early stages of development in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. *Phykos* 6: 84-86.
- Oza, R.M.; Tewari, A. & Rajyaguru, M.R. 1989. Growth and phenology of red alga *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. *Indian J. Mar. Sci.* 18: 82-86.
- Papenfuss, G. F. 1964. Catalogue and bibliography of antarctic and subantarctic benthic marine algae. *Antarctic Research Series American Geophysical Union* 1: 1-76.
- Pickering, T.D.; Gordon, M.E. & Tong, L.J. 1993a. Effect of nutrient pulse concentration and frequency on growth of *Gracilaria chilensis* plants and levels of epiphytic algae. *J. Appl. Phycol.* 5: 525-533.
- Pickering, T.D.; Sladden, V.H.; Furneaux, R.H.; Hemmingson, J.A. & Redfearn, P. 1993b. Comparison of growth rate in culture, dry matter content, agar content and agar quality of two New Zealand red seaweeds, *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan & Oliveira and *Gracilaria truncata* Kraft. *J. Appl. Phycol.* 5: 85-91.
- Pinheiro-Joventino, F. 1986. Ecological studies of *Gracilaria cervicornis* (Turn.) J. Ag. in Ceará State, Brazil. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 12: 87.
- Piriz, M.L. & Casas, G. 2001. *Introducción de especies y su impacto en la biodiversidad. El caso Undaria pinnatifida (Phaeophyta, Laminariales)*. En: Alveal, K. & Antezana, T. (eds.) *Sustentabilidad de la biodiversidad. Un problema actual. Bases científico-técnicas. Teorizaciones y proyecciones*. Universidad de Concepción, Chile. pp 679–692.
- Piriz, M.L.; Eyra, M.C. & Rostagno, C.M. 1986. Changes in biomass and botanical composition of beach-cast seaweeds in a disturbed coastal area from Argentine Patagonia. *J. Appl. Phycol.* 15: 67-74.

- Pizarro, A. 1986. Conocimiento actual y avances recientes sobre el manejo y cultivo de *Gracilaria* en Chile. *Monogr. Biol.* 4: 63-96.
- Poblete, A. & Inostroza, I. 1987. Management of a *Gracilaria* natural bed in Lenga, Chile: A case study. *Hydrobiologia* 151/152: 307-311.
- Polifrone, M.; De Masi, F. & Gargiulo, G.M. 2006. Alternative pathways in the life history of *Gracilaria gracilis*. *Aquaculture* 261: 1003-1013.
- Poore, A.G.B. 1994. Selective herbivory by amphipods inhabiting the brown alga *Zonaria angustata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 107: 113-123.
- Prieto, I.; Westermeier, R. & Muller, D. 1991. Variación de fenofases de *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan y Oliveira (Rhodophyta, Gigartinales), en condiciones de cultivo en laboratorio y terreno. Presencia de fases mezcladas. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 64: 343-352.
- Raffo, M.P. & Schwindt, E. 2009. Patrones de diversidad y abundancia de macroalgas en intermareales rocosos de la Provincia de Chubut (Patagonia - Argentina) *VII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar*. Resúmenes en CD-Rom (ISBN 978-987-25479-0-5): 374.
- Reading, R.P. & Schneider, C.W. 1986. On the male conceptacles of two terete species of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) from North Carolina. *J. Phycol.* 22: 395-398.
- Rebello, J.; Ohno, M.; Critchley, A.T. & Sawamura, M. 1996. Growth rates and agar quality of *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft from Namibia, Southern Africa. *Bot. Mar* 39: 273-279.
- Reymond, O. L. & Pickett Heaps, J. D. 1983. A routine flat embedding method for electron microscopy of microorganisms allowing selection and precisely orientated sectioning of single cells by light microscopy. *J. Microsc.* 130: 79-84.

- Ricker, R.W. 1987. *Taxonomy and biogeography of Macquarie Island Seaweeds*. British Museum (Nat. Hist.), London. 344 pp.
- Rico, A.; Peralta, R.; Bergalio, M. & López Gappa, J. 2007. Microalgas submareales sobre sustratos artificiales portuarios. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 42 (supl.): 186.
- Robinson, D. G.; Ehlers, U.; Herken, R.; Herrmann, B.; Mayer, F. & Schürmann, F. W. 1987. *Methods of Preparation for Electron Microscopy*. Springer Verlag, Berlin, 190 pp.
- Rodríguez, M.C.; Matulewicz, M.C.; Nosedá, M.D.; Ducatti, D.R. & Leonardi, P.I. 2009. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina. Content, structure and physical properties. *Biores. Technol.* 100: 1435-1441.
- Romanello, E.E.; Arnoldi G.; García H.; Taylor R. & Medina, M. 1993. Evaluación del área y biomasa de la pradera de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss en la bahía Melo, provincia del Chubut, Argentina. *Nat. Pat. Ser. Cs. Biol.* 1: 111–114.
- Romero, J.B.; Villanueva, R.D. & Montañó, M.N.E. 2008. Stability of agar in the seaweed *Gracilaria eucheumatoides* (Gracilariales, Rhodophyta) during postharvest storage. *Bioresour. Technol.* 99 (17): 8151-8155.
- Romo, H. & Alveal, K. 1979. Estudios poblacionales en la pradera de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss de la Isla de los Reyes. Bahía de Concepción. *Ciencia y Tecnología del Mar, CONA* 4: 15-26.
- Romo, H.; Alveal, K. & Dellarossa, V. 1979. Biología de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss en Chile central. *Actas I Symp. Algas Mar. Chil.*: 155-163.

- Rosenberg, G. & Ramus, J. 1982. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): photosynthesis and antenna composition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*8: 233-241.
- Rosenthal, A.J. 1999. *Relation between instrumental and sensory measures of food texture*. En: Rosenthal, A.J. (ed.) *Food texture measurement and perception*. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, Md. pp 1–17.
- Rothman, M.D.; Anderson, R.J.; Boothroyd, C. J. T.; Kemp, F. A. & Bolton, J.J. 2009. The gracilarioids in South Africa: long-term monitoring of a declining resource. *J. Appl. Phycol.* 21: 47-53.
- Rueness, J.; Mathisen, H.A. & Tananger, T. 1987. Culture and Field Observations on *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (Rhodophyta) from Norway. *Bot. Mar.* 30: 267–276.
- Sánchez, M.J.; Fernández, J.A. & Niell, F.X. 1993. Biochemical and physiological responses of *Gracilaria tenuistipitata* under two different nitrogen treatments. *Physiol. Plantarum* 88: 631–637.
- Sand-Jensen, K. 1977. Effect of epiphytes on eelgrass photosynthesis. *Aquat. Bot.* 3: 55-63.
- Santelices, B. & Doty, M.S. 1989. A review of *Gracilaria* farming. *Aquaculture* 78: 95-133.
- Santelices, B. & Fonck, E. 1979. Ecología y cultivo de *Gracilaria lemaneiformis*. En: Santelices, B. (ed.) *Actas I Simp. Algas Mar. Chil.* Subsecretaría de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Santiago, Chile. pp. 165-200.
- Santelices, B. & Ugarte, R. 1987. Production of Chilean *Gracilaria*: problems and perspectives. *Hydrobiologia* 151/152: 295-299.
- Santelices, B. & Varela, D. 1993. Exudates from *Gracilaria chilensis* stimulate settlement of epiphytic ulvoids. *Hydrobiologia* 260/261: 327–333.

- Santelices, B.; Vásquez, J.; Ohme, U. & Fonck, E. 1984. Managing wild crops of *Gracilaria* in central Chile. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 12: 77-89.
- Scrosati, R. & DeWreede, R.E. 1999. Demographic models to simulate the stable ratio between ecologically similar gametophytes and tetrasporophytes in populations of the Gigartinaceae (Rhodophyta). *Phycol. Res.* 47: 153-157.
- Shea, E.M. & Carpita, N.C. 1988. Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *J. Chromatogr.* 445: 424-428.
- Sieburth, J.M. & Conover, J.T. 1965. *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling. *Nature* 208: 52-53.
- Simonetti, G.; Giaccone, G. & Pignatti, S. 1970. The seaweed *Gracilaria confervoides*, an important object of autecologic and cultivation research in the northern Adriatic Sea. *Helv. wiss. Meer.* 20: 89-96.
- Skottsberg, C. 1907. Zur Kenntnis der subantarktischen und antarktischen Meeresalgen. I. Phaeophyceen. En: *Otto Nordensjöld, Wissenschaftliche Ergebnisse der schwedischen Südpolar Expedition 1901-1903* 4: 1-172.
- Skottsberg, C. 1921. Marine Algae. I. Phaeophyceae. En: *Botanische Ergebnisse der schwedischen Expedition nach Patagonien und dem Feuerlande 1907-1909*. VIII. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademien Handlingar* 61: 1-56.
- Skriptsova, A.V. & Yakovleva, I.M. 2002. The influence of variations in irradiance upon morphology in an unattached form of *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft during field cultivation, South Primorye, Russia. *Aquat. Ecol.* 36: 511-518.
- Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* 16: 245-262.

- Smit, A.J.; Robertson, B.L. & du Preez, D.R. 1997. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. *J. Appl. Phycol.* 8: 473–481.
- Smith, A.B.; Nichols, K. & McLachan, J. 1984. Cultivation of seamoss (*Gracilaria*) in St. Lucia, West Indies. *Hydrobiologia* 116/117: 249-251.
- South, G. R. 1980. Observations on the life history of *Punctaria plantaginea* (Roth) Greville and *Punctaria orbiculata* Jao (Punctariaceae, Phaeophyta). *Phycologia* 19: 266-272.
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastr. Res.* 26: 31–43.
- Steentoft, M.; Irvine, L.M. & Farnham, W.F. 1995. Two terete species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. *Phycologia* 34: 113–127.
- Steinberg, P. D.; de Nys, R. & Kjelleberg, S. 2001. *Chemical mediation of surface colonization*. En: McClintock, J. B. & Baker, B. J. (eds.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 335–387.
- Stevenson, T.T. & Furneaux, R.H. 1991. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydr. Res.* 210: 277-298.
- Stortz, C.A. & Cerezo, A.S. J. 2000. Conformational analysis of neocarrabiose and its sulfated and/or pyruvylated derivatives using the MM3 force-field. *Carbohydr. Chem.* 19: 1115–1130.
- Svirski, E., Beer, S. & Friedlander, M. 1993. *Gracilaria conferta* and its epiphytes: (2) Interrelationship between the red seaweed and *Ulva* cf. *lactuca*. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 14: 391-396.

- Sweet, D.P.; Shapiro, R.H. & Albersheim, P. 1975. Quantitative analysis by various
g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated
alditol acetates. *Carbohydr. Res.* 40: 217–225.
- Taylor, W. M. 1939. Algae collected by the "Hassler", "Albatross" and "Shmitt"
expeditions. II. Algae from Uruguay, Argentina, The Falklands and the Strait
of Magellan. *Michigan Academy of Science, Arts & Letters* 24: 127-164.
- ter Braak, C.J.F. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector
technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 67: 1167–1179.
- ter Braak, C.J.F. 1995. *Ordination*. En: Jongman, R.H.G.; ter Braak, C.J.F. & van
Tongeren, O.F.R. (eds.) *Data analysis in community and landscape
ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 91–173.
- ter Braak, C.J.F. & Smilauer, P. 1998. *CANOCO reference manual and user's
guide to Canoco for Windows. Software for canonical community ordination
(version 4)*. Microcomputer Power, Ithaca, New York, 351 pp.
- Thornber, C.S. & Gaines, S.D. 2004. Population demographics in species with
biphasic life cycles. *Ecology* 85: 1661-1674.
- Treguer, P. & LeCorre, P. 1975. *Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de
mer. (Utilisation de l'Autoanalyser II)*. 2^o ed. Univ. Bretagne occidentale, 110
pp.
- Trono, G.C. & Azanza-Corrales, R. 1981. The seasonal variation in the biomass
and reproductive states of *Gracilaria* in Manila Bay. *Proc. Int. Seaweed
Symp.* 10: 743:748.
- Ugarte, R. & Santelices, B. 1992. Experimental tank cultivation of *Gracilaria
chilensis* in central Chile. *Aquaculture* 101: 7–16.

- Umamaheswara Rao, M. 1973. Growth and reproduction in some species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* in the Palk Bay. *Indian J. Fish.* 20: 182-192.
- Vairappan, C.S. 2006. Seasonal occurrences of epiphytic algae on the commercially cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 18: 611–617.
- Vairappan, C.S. 2009. Effects of epiphyte infection on the quantity and quality of carrageenan produced by carrageenophytes, *Kappapnycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). En: Ishida, K.I.; Nozaki, H.; Miyashita, H.; Horiguchi, T. & Kawai, H. (eds.) 9th Int. Phycol. Congress. *Phycologia* 48: 136.
- Vairappan, C.S.; Chung, C.S.; Hurtado, A. Q.; Soya, F.E.; Lhonneur, G.B. & Critchley, A. 2008. Distribution and symptoms of epiphyte infection in major carragenophyte-producing farms. *J. Appl. Phycol.* 20: 477-483.
- van der Meer, J. 1986. Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) XI: further characterization of a bisexual mutant. *J. Phycol.* 22: 151-158.
- Vásquez, J.A. & Vega, A. 2001. Ecological considerations related to the management of *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) in northern Chile. *J. Appl. Phycol.* 13: 267–277.
- Vergara-Rodarte, M.A.; Hernández-Carmona, G.; Rodríguez-Montesinos, Y.E.; Arvizu-Higuera, D.L.; Riosmena-Rodríguez, R. & Murillo-Álvarez, J.I. 2010. Seasonal variation of agar from *Gracilaria vermiculophylla*, effect of alkali treatment time, and stability of its Colagar. *J. Appl. Phycol.* 22: 753-759.
- Wahl, M. 1989. Marine epibiosis. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58: 175-189.
- Wakibia, J.G.; Anderson, R.J. & Keats, D.W. 2001. Growth rates and agar properties of three gracilarioids in suspended open-water cultivation in St. Helena Bay, South Africa. *J. Appl. Phycol.* 13: 195-207.

- Wattier, R.; Dallas, J. F.; Destombe, C.; Saumitou-Laprade, P. & Valero, M. 1997. Single locus microsatellites in Gracilariales (Rhodophyta): high level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species. *J. Phycol.* 33: 868–880.
- Weinberger, F. & Friedlander, M. 2000. Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligogars results in defence against agar-degrading epiphytes. *J. Phycol.* 36: 1079–1086.
- Wentworth, C.K. 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *J. Geology* 30: 377-392.
- Westermeier, R.; Gómez, I. & Rivera, P. 1993. Suspended farming of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gigartinales) at Cariquilda River, Maullin, Chile. *Aquaculture* 113: 215–229.
- Westermeier, R.; Rivera, P. & Gómez, I. 1991. Cultivo de *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan y Oliveira, en la zona intermareal y submareal del estuario Cariquilda, Maullín, Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 64: 307-321.
- Whyte, J.N.; Englar, J.R.; Saunders, R.G. & Lindsay, J.C. 1981. Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria (verrucosa)* type). *Bot. Mar.* 23: 493-501.
- Wiencke, C. & Clayton, M. N. 2002. *Antarctic seaweeds*. En: J.W. Wägele. *Synopses of the antarctic benthos*, vol. 9, A.R.G. Gantner Verlag KG Ruggell/Lichtenstein, pp. 1-237.
- Yaphe, W. & Duckworth, M. 1972. The relationship between structures and biological properties of agar. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 7: 15–22.
- Zemke-White, W.L. & Ohno, M. 1999. World seaweed utilization: An end-of-century summary. *J. Appl. Phycol.* 11: 369-376.

Durante el período de realización de esta tesis parte de los resultados obtenidos fueron publicados:

Comunicaciones a Congresos.

Martín, L.; Miravalles, A.; Boraso de Zaixo, A. & Leonardi, P.I. “Epífitos del alga agarófita *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta) en Bahía Bustamante (Chubut, Argentina)”.

VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Puerto Madryn, Chubut, Argentina. Diciembre de 2006.

Martín, L.; Boraso de Zaixso, A.L. & Leonardi, P.I.. “Estudios poblacionales en una pradera natural de *Gracilaria gracilis* en Bahía Bustamante (Chubut, Argentina) e interacción con sus principales epífitos”. *XII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar.* Florianópolis, Brasil. Abril de 2007.

Martín, L.; Boraso de Zaixso, A.L. & Leonardi, P.I. “*Ceramium rubrum* epífito de *Gracilaria gracilis* en las costas de Chubut, Argentina”. *XXXI Jornadas Argentinas de Botánica-VII Simposio Argentino de Ficología.* Corrientes. Noviembre de 2007.

Martín, L. A., Boraso de Zaixso, A. L., Michetti, K. M. y Leonardi, P. I. “Fenología reproductiva de *Gracilaria gracilis* en Bahía Bustamante (Chubut) e implicancias para el desarrollo de espora-cultivos”. *XXXII Jornadas Argentinas de Botánica-VIII Simposio Argentino de Ficología.* Huerta Grande, Córdoba, Argentina. Octubre de 2009.

Martín, L. A.; Boraso de Zaixo, A.L.; Miravalles, A. & Leonardi, P.I. “Rhodomelaceae epífitas del alga agarófita *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta)”. *VII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar.* Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Diciembre de 2009.

Martín, L. A.; Rodríguez, M. C.; Matulewicz, M. C. & Leonardi, P. I. “Fenología y producción de agaranos en *Gracilaria gracilis* de Bahía Bustamante (Chubut,

Argentina)". *VII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar*. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Diciembre de 2009.

Publicaciones en revistas de aparición periódica.

Martín, L.A.; Boraso de Zaixso, A.L. & Leonardi, P.I. 2010. Biomass variation and reproductive phenology of *Gracilaria gracilis* in a Patagonian natural bed (Chubut, Argentina). *J. Appl. Phycol.* DOI: 10.1007/s10811-010-9555-1. Netherlands (ISSN 0921-8971)