



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis Doctoral en Biología

VALORACIÓN DE POBLACIONES NATURALES DEL ALGA PARDA
LEATHESIA MARINA DE LAS COSTAS PATAGÓNICAS
PARA EMPRENDIMIENTOS DE MARICULTURA CON FINES
BIOTECNOLÓGICOS

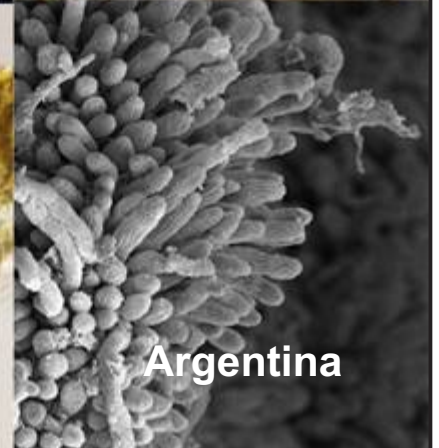
Lic. Ailen Melisa Poza



Directora: Dra. Elisa R. Parodi
Co- directora: Dra M. Cecilia Gauna



Bahía Blanca



Argentina



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis Doctoral en Biología

**VALORIZACIÓN DE POBLACIONES NATURALES DEL ALGA PARDA
LEATHESIA MARINA DE LAS COSTAS PATAGÓNICAS PARA
EMPREDIMIENTOS DE MARICULTURA CON FINES BIOTECNOLÓGICOS**

Lic. Ailen Melisa Poza

***Directora:* Dra. Elisa R. Parodi**

***Co-directora:* Dra. María Cecilia Gauna**

Bahía Blanca

Argentina

2018

PREFACIO

Esta Tesis es presentada 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 otras.

La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Ficología Aplicada del Área de Biología Marina del Instituto Argentino de Oceanografía (I.A.D.O) y en el Laboratorio de Ecología Acuática del Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia (U.N.S.) en el período comprendido entre abril de 2014 a junio de 2018 bajo la dirección de la Doctora Elisa R. Parodi, Profesora Titular de Ecología Acuática y de Botánica Marina e Investigadora Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Co-dirección de la Dra. María Cecilia Gauna, Investigadora Asistente de CONICET.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A las Dras. Elisa R. Parodi y María Cecilia Gauna, por haberme brindado la posibilidad de continuar con mis estudios de posgrado en la Universidad Nacional del Sur, por su dirección y colaboración en la investigación científica, confianza y apoyo incondicional durante el curso de este estudio.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme brindado la oportunidad de usufructuar una beca doctoral y en forma conjunta a la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNS, porque en el marco de los subsidios para proyectos de investigación otorgados a la Dra. Parodi, posibilitaron la realización de este trabajo de tesis.

Al Instituto Argentino de Oceanografía (IADO) por brindarme el lugar de trabajo, especialmente al Laboratorio de Fisiología Aplicada del Área Biología Marina.

A la Estación Meteorológica Automática del Laboratorio de Climatología el CENPAT (CONICET) por brindarme información esencial para el desarrollo de la tesis.

A los Dres. M.E. Croce, W.J.E. Santiañez y K. Kogame por su colaboración en los estudios moleculares.

Al Sr. Juan F. Escobar por su enorme dedicación y colaboración en los muestreos a campo.

A Dras. Carolina Fernández y Emilia Croce por su compañerismo, amistad, apoyo y colaboración a lo largo de todos estos años.

A mis amigos del IADO por todos los buenos momentos compartidos.

A mi familia porque me alentaron siempre a buscar nuevos horizontes y son la razón de que hoy este aquí.

Al amor de mi vida Julián Zarate que con mucho amor y comprensión hicieron de este camino recorrido una etapa muy feliz.

A todas las personas que de alguna manera me han ayudado en la realización de este estudio.

Algunos de los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados bajo los siguientes títulos:

- **2018. Poza AM**, Fernández C, Gauna MC, Parodi ER. Biochemical properties and culture optimization of *Leathesia marina* (Phaeophyceae). *Algal Research*. 33: 379-388. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.015>
- **2017. Poza AM**, Gauna MC, Escobar JF, Parodi ER. Temporal dynamics of algal epiphytes on *Leathesia marina* and *Colpomenia sinuosa* macrothalli (Phaeophyceae). *Marine Biology Research*. 14: 65-75. doi:10.1080/17451000.2017.138606
- **2017. Poza AM**, Gauna MC, Escobar JF, Parodi ER. The heteromorphic phases of *Leathesia marina* (Ectocarpales, Ochrophyta) over time from northern Patagonia, Argentina". *Phycologia*. 56:579-589. <https://doi.org/10.2216/16-117.1>

Financiación de la tesis:

La presente tesis doctoral fue financiada con los proyectos de investigación dirigidos por la Dra. Parodi: Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNS (PGI 24B/234), CONICET PIP 2016-2018 (Cód.11220130100070CO) y el proyecto institucional CONICET P-UE IADO (22920160100057CO).

RESUMEN

Esta tesis representa el primer estudio integral de dos poblaciones de *Leathesia marina*, Phaeophyceae, en la Patagonia argentina. La misma involucra aspectos ecológicos de la especie tales como ciclo de vida, demografía poblacional, estudios fenológicos y de la comunidad de epífitos; así como sus formas de manejo mediante la optimización de su cultivo: control de la fertilidad y caracterización bioquímica del alga, para su posible utilización en la industria farmacéutica o alimentaria.

El estudio del ciclo de vida en condiciones de cultivo *in vitro*, se basó en un enfoque integrado, involucrando observaciones morfológicas, análisis de los niveles de ploidía y estudios moleculares. *L. marina* presentó un ciclo de vida heteromórfico, que comprende tres morfologías diferentes, dos morfotipos haploides diferentes (gametófito y esporófito), a) un microtalo de morfología globosa, y b) un microtalo postrado y c) un morfotipo diploide (macrotalo o esporófito). Los cambios en el nivel de ploidía durante las diferentes fases del ciclo de vida, se evidenciaron usando citometría de flujo y fluorescencia del DNA. Los análisis filogenéticos basados en *cox3* y el conjunto de datos concatenados *cox3* y *rbcL* confirmaron la identidad de los especímenes argentinos como *L. marina*, que fueron conespecíficos con las poblaciones de *L. marina* de Nueva Zelanda, Alemania y Japón.

A su vez, el estudio fenológico y dinámica poblacional de *L. marina* en la naturaleza, permitió comprender que el ciclo de vida heteromórfico se encuentra en completa interacción y en respuesta a las presiones selectivas del entorno altamente cambiante de la Patagonia. El talo macroscópico estuvo presente desde septiembre a abril, durante la temporada cálida, mientras que la fase microscópica se observó en dos períodos, marzo-abril y septiembre-octubre, presentando una superposición temporal entre ambas fases. La población del esporofito macroscópico presentó una curva de supervivencia tipo III, las cuales son frecuentes en algas pardas con fases microscópicas, capaces de crecer rápidamente dejando un reclutamiento masivo, seguido de una alta mortalidad. A su vez, la cobertura, la densidad y el tamaño de los macrotalos se relacionaron con los meses más cálidos, pero la capacidad reproductiva fue mayor en los meses más fríos, previo al final de la temporada de los mismos y coincidentemente con la aparición de los microtalos en la naturaleza.

Además esta tesis comprende el primer estudio exhaustivo sobre la dinámica temporal de las comunidades epífitas, no solo sobre *L. marina*, sino que también sobre *Colpomenia sinuosa*, debido a la morfología análoga de ambas especies y por presentar un papel ecológico similar en la zona intermareal. Esto permitió evaluar el estado sanitario de *L. marina* y compararlo con otra especie que ocupa el mismo nicho espacial. La comunidad de epífitos se estudió en términos de riqueza, diversidad y abundancia; y su relación con los hospedadores y los factores ambientales. Un total de 31 taxones de epífitas se registraron en ambas especies, las cuales compartieron el 64,5% de las especies epífitas encontradas. Las algas rojas fue el grupo de epifitos con la mayor abundancia en ambos hospedadores y las diatomeas presentaron la mayor riqueza de especies. La riqueza específica fue similar entre ambos hospedadores, pero *L. marina* presentó menor diversidad y equitatividad y un claro dominio de las especies *U. penicilliformis* y *E. carnea*.

A causa del interés reciente en la composición de las algas y el arte de cultivarlas por sus beneficios nutricionales y de salud, en esta tesis se analizó la composición bioquímica de *L. marina*: materia orgánica, alginatos, carbohidratos totales, contenido de proteínas, pigmentos, polifenoles, actividad antioxidante y composición elemental, así como las mejores condiciones de cultivo, evaluando diferentes temperaturas del agua de mar y nutrientes en las fases esporofíticas y gametofíticas. *L. marina* mostró un contenido relativamente bajo de carbohidratos y proteínas, pero un alto contenido de polifenoles y actividad antioxidante. En los experimentos de cultivo, las mejores condiciones para el cultivo de gametófitos y esporófitos fueron a 8 °C y a 1 PES. El crecimiento de los esporófitos fue mayor que el de los gametófitos. Los gametófitos se pudieron mantener en latencia en condiciones controladas durante 18 meses.

El estudio integral realizado en esta tesis, que analiza el ciclo de vida, parámetros demográficos (tasa de mortalidad, supervivencia, rendimiento reproductivo), así como las características morfológicas, puede ayudar a explicar de qué forma las especies como *L. marina* lograron adaptarse a un ambiente adverso, con grandes cambios estacionales. A su vez el análisis de la composición bioquímica y la optimización de sus cultivos, constituyen las bases fundamentales para realizar un manejo adecuado y sustentable evitando la sobreexplotación de las poblaciones naturales.

ABSTRACT

This thesis is the first integral study of two *Leathesia marina*, Phaeophyceae, populations in Argentinian Patagonia. It includes ecological aspects of the species, such as, the life cycle, population demography, phenological studies and the community of epiphytes, as well as the optimization of conditions for *L. marina* culture and management, through fertility control and biochemical characterization of the alga, for its possible use in the pharmaceutical or food industry.

The study of the life cycle of *Leathesia marina* under *in vitro* culture conditions was based on an integrated approach, involving morphological observations, ploidy levels and molecular studies. *Leathesia marina* has a heteromorphic life cycle comprising three different morphologies, two morphotypes of the haploid generation (microthallus or gametophyte and sporophyte) and one morphotype of the diploid generation (macrothallus or sporophyte). Changes were observed in the ploidy level during the different phases in the life cycle using DNA flow and fluorescence cytometry. The phylogenetic analyzes based on *cox3* and concatenated *cox3* and *rbcL* data set confirmed the identity of the Argentinian specimens as *L. marina*, which is conspecific with *L. marina* from New Zealand, Germany and Japan.

In turn, the phenological study and population dynamics of *L. marina* in nature, allowed us to understand that the heteromorphic life cycle of the species is in complete interaction and response to the selective pressures of the highly changing environment of Patagonia. The macroscopic phase was observed from September to April during the warm season, whereas the microscopic phase was observed in two different periods, March–April and September–October. A temporal overlap was observed between the microscopic and macroscopic phases. The macroscopic sporophyte population presented a type III survival curve, which is frequent in brown algae with microscopic phases, capable of growing rapidly and leaving a massive recruitment, followed by high mortality. In turn, the cover, density and size of the macrothalli were related to the warmer months, but reproductive output was higher in the colder months, prior to the end of the season and coincident with the occurrence of the microthalli in nature.

In addition, this thesis includes the first exhaustive study on the temporal dynamics of epiphytic communities, not only on *L. marina*, but also on *Colpomenia sinuosa*, due to the analogous morphology of both species and for presenting a similar

ecological role in the intertidal zone. This makes it possible to evaluate the health status of *L. marina* and compare it with another species that occupies the same spatial niche. The community of epiphytes was studied in terms of richness, diversity and abundance and their relationships with the environmental factors and host abundance. A total of 31 epiphyte taxa were recorded and it was found that the two hosts shared 64.5% of these epiphytic species. The red algal epiphytic group had the highest abundance on both hosts and the diatoms presented the highest species richness. The specific richness was similar between both hosts, but *L. marina* presented less diversity and evenness, and there was a clear dominance of the species *Urospora penicilliformis* and *Erythrotrichia carnea*.

Due to the recent interest in the composition of algae, and the art of farming them for their nutritional and health benefits, this thesis analyzed the biochemical composition of *L. marina*: organic matter, alginates, total carbohydrates, protein content, pigments, polyphenols, antioxidant activity and elemental composition, as well as the best conditions for optimizing their culture, evaluating the effect of different temperatures and nutrients in the sporophytic and gametophytic phases. *L. marina* showed a relatively low carbohydrate and protein content, but a high polyphenol content and antioxidant activity. In the culture experiments, the best conditions for gametophyte and sporophyte survival were 8 °C at 1 PES. The growth of the sporophytes was greater than that of the gametophytes. The gametophytes could be maintained in latency under controlled conditions for 18 months.

The integral study carried out in this thesis, which analyzes the life cycle, demographic parameters (mortality rate, survival, reproductive performance), as well as the morphological characteristics, can help explain how species such as *L. marina* manage to adapt to an adverse environment with large seasonal changes. At the same time, the analysis of the biochemical composition and the culture optimization constitute the fundamental bases for adequate and sustainable management, avoiding overexploitation of the natural populations.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

Comunidades de macroalgas marinas de Argentina	1
Objetivos	5

CAPÍTULO I

***Leathesia marina*: Filogenia, caracterización taxonómica y ciclo de vida**

1. Introducción	8
2. Materiales y métodos	12
2.1. Área de estudio	12
Figura 1. Localización del área de estudio. Intermareal de Las Grutas. y de Puerto Madryn.	13
2.2. Preparación de ejemplares de herbario	14
2.3. Morfología de <i>Leathesia marina</i>	15
2.4. Análisis filogenético molecular	15
2.5. Cultivos <i>in vitro</i>	16
2.6. Aislamiento de los núcleos y citometría de flujo	17
2.7. Contenido de ADN de núcleos individuales utilizando microscopía de fluorescencia	18
2.8. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	19
3. Resultados	20
3.1. Clasificación taxonómica de <i>Leathesia marina</i>	20
3.2. Filogenia de <i>Leathesia marina</i>	20
3.3. Bioecología de <i>Leathesia marina</i>	21
Figura 2: <i>Leathesia marina</i> en la naturaleza: Población de Las Grutas y de Puerto Madryn.	22
Figura 3. Filogenia de <i>Leathesia marina</i> basada en <i>cox3</i> . .	23
Figura 4. Filogenia de <i>Leathesia marina</i> basada en secuencias concatenadas (<i>cox3</i> + <i>rbcL</i>).	24
3.4. Descripción del macrotalo de <i>L. marina</i>	25
Figura 5. Macrotalo de <i>Leathesia marina</i> .	26

3.5. Morfología de <i>L. marina</i> en cultivo bajo el régimen “día largo” (DL)	28
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Leathesia marina</i> en cultivo: desarrollo de microtalo globoso	29
3.6. Morfología de <i>L. marina</i> en cultivo bajo régimen “día corto” (DC)	30
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Leathesia marina</i> en cultivo: desarrollo del microtalo postrado	31
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Leathesia marina</i> en cultivo: fecundación y desarrollo del macrotalo.	32
Figura 9. Ciclo de vida de <i>L. marina</i> bajo condiciones de Día Corto (DC) y Día largo (DL)	33
3.7. Ploidía de las distintas fases en talos adultos	34
Figura 10. Contenido de ADN nuclear en talos adultos de <i>Leathesia marina</i> estimada con citometría de flujo.	35
3.8. Ploidía de las diferentes morfologías del ciclo de vida de <i>L. marina</i>	36
Figura 11. Cambios de ploidía de diferentes fases del ciclo de vida de <i>Leathesia marina</i> registrados por fluorescencia de áreas transversales nucleares.	37
4. Discusión	38

CAPÍTULO II

***Leathesia marina*: Fenología y dinámica poblacional**

1. Introducción	44
2. Materiales y métodos	48
2.1. Área de estudio	48
Figura 12. Localización y área de estudio en Punta Este, Golfo Nuevo.	49
2.2. Dinámica de la población de <i>L. marina</i>	50
2.3. Preparación de la tabla de vida y supervivencia	50
2.4. Abundancia de microtalos	52
2.5. Morfología y reproducción de <i>Leathesia marina</i>	52
2.6. Identificación del microtalo	53
2.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	54
2.8. Análisis de los datos	54
3. Resultados	56
3.1. Fenología del macrotalo de <i>L. marina</i>	56
Figura 13. Macrotalo de <i>Leathesia marina</i> (flecha blanca) epífito sobre <i>Corallina officinalis</i> (flecha negra).	57

Tabla 1. Variaciones de las estructuras vegetativas y reproductivas de <i>Leathesia marina</i> desde septiembre hasta abril.	58
Figura 14. Macrotalo de <i>Leathesia marina</i> .	61
Figura 15. Macro y microtalo de <i>Leathesia marina</i> .	62
3.2. Microtalo de <i>Leathesia marina</i>	63
3.3. Dinámica poblacional de <i>Leathesia marina</i> en la naturaleza	63
Figura 16. Densidad del macrotalo y cobertura de <i>Leathesia marina</i>	64
Figura 17. Tasas de supervivencia y de mortalidad del macrotalo de <i>Leathesia marina</i> .	67
Tabla 2: Tabla de vida del macrotalo de <i>L. marina</i> .	68
Figura 18. Capacidad reproductiva del macrotalo de <i>L. marina</i> .	69
3.4. Relación entre caracteres bioecológicos de <i>Leathesia marina</i> y factores ambientales	70
Figura 19. Relación temporal entre los parámetros ambientales y vegetativos, poblacionales y reproductivos de <i>L. marina</i> (Gráfico PCA).	72
4. Discusión	73

CAPÍTULO III

Efecto de las comunidades epífitas algales sobre *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

1. Introducción	78
2. Materiales y métodos	83
2.1. Área de Estudio	83
2.2. Poblaciones hospedadoras: <i>L. marina</i> y <i>C. sinuosa</i>	83
2.3. Identificación y cuantificación de la comunidad epífita sobre la población <i>L. marina</i> y <i>C. sinuosa</i>	84
2.4. Aislamiento de epífitos bajo condiciones de cultivo	85
Figura 20. Algas epífitas sobre <i>Leathesia marina</i> desarrollados en cultivo.	86
2.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	87
2.6. Análisis estadísticos	89
3. Resultados	91
3.1. Poblaciones hospedadoras: <i>L. marina</i> y <i>C. sinuosa</i>	91
Figura 21. <i>Leathesia marina</i> y <i>Colpomenia sinuosa</i> en la naturaleza	92
Figura 22. Parámetros ambientales y Abundancia de <i>Leathesia marina</i> y <i>Colpomenia sinuosa</i>	94

3.2. Identificación y cuantificación de la comunidad de epífitos en <i>L. marina</i> y <i>C. sinuosa</i>	95
Tabla 3. Algas epífitas sobre <i>Leathesia marina</i> y <i>Colpomenia sinuosa</i>	96
Figura 23. Morfología del macrotalo de <i>Leathesia marina</i> y <i>Colpomenia sinuosa</i>	99
Figura 24. Abundancia de taxones epífitos	100
Figura 25. Abundancia mensual de epífitos sobre <i>Leathesia marina</i> y <i>Colpomenia sinuosa</i>	101
3.3. Estacionalidad de la comunidad epifítica	102
Figura 26. Diagrama de escalonamiento multidimensional no métrico (nMDS)	103
Tabla 4: Resultado del análisis SIMPER, disimilitud.	104
Tabla 5: Resultado del análisis SIMPER, similitud.	105
Tabla 6: Resultado del análisis SIMPER, similitud.	106
3.4. Riqueza, diversidad, equitatividad y dominancia del ensamble de epífitos	107
Figura 27. Índices de diversidad	108
3.5. El epifitismo asociado a la abundancia de los hospedadores y los parámetros ambientales	109
Figura 28. Gráfico de análisis de correspondencia canónica (CCA)	110
4. Discusión	111

CAPÍTULO IV

Propiedades bioactivas de *Leathesia marina* y optimización de su cultivo

1. Introducción	118
2. Materiales y métodos	122
2.1. Composición química y actividad antioxidante de <i>L. marina</i>	122
2.1.1. Contenido de materia orgánica	122
2.1.2. Contenido de carbohidratos	123
Figura 29. Protocolo para la extracción de carbohidratos aplicado en <i>Leathesia marina</i> .	124
2.1.3. Contenido de alginatos	125
Figura 30. Protocolo para la extracción de alginatos aplicado en <i>Leathesia marina</i> .	127
2.1.4. Extracción de proteínas	128
2.1.5. Análisis del contenido de proteínas por el método de Lowry	129
Figura 31. Protocolo para la extracción de proteínas a partir del extracto acuoso aplicado en <i>Leathesia marina</i> .	130

Figura 32. Protocolo para la extracción por precipitación de proteínas con TCA a partir del extracto acuoso aplicado en <i>Leathesia marina</i> .	131
2.1.6. Determinación de pigmentos	132
2.1.7. Determinación de polifenoles	133
2.1.8. Determinación de la actividad antioxidante	134
2.1.9. Determinación de la composición elemental	135
2.2. Ensayos de cultivo de <i>L. marina</i>	135
2.2.1. Control de fertilidad del gametófito	137
2.3. Análisis estadísticos	138
3. Resultados	140
3.1. Propiedades bioquímicas y actividad antioxidante de <i>L. marina</i>	140
Tabla 7. Características bioquímicas del esporófito de <i>L. marina</i>	142
Figura 33. Análisis MEB-EDX del esporófito de <i>L. marina</i>	143
3.2. Ensayos de cultivos	144
Figura 34. Ciclo de vida abreviado de <i>L. marina</i> . Fases esporofítica y gametofítica	144
3.2.1. Asentamiento de cigotos y esporas	145
3.2.2. Supervivencia de esporófitos y gametófitos	145
Tabla 8. Análisis GLM y GLMM	147
Figura 35. Ensayos de cultivo de <i>L. marina</i>	148
3.2.3. Crecimiento de esporófitos y gametófitos	149
Tabla 9. Datos de curvas de crecimiento vegetativo	151
Tabla 10. Datos de curvas de crecimiento vegetativo	152
3.2.3. Mantenimiento de gametófitos bajo condiciones de cultivo controladas	153
4. Discusión	154
CONCLUSIONES FINALES	161
Generales	161
Metodológicas	164
Líneas de investigación futuras	165
REFERENCIAS	166

INTRODUCCIÓN GENERAL

Comunidades de macroalgas marinas de Argentina

Las macroalgas bentónicas marinas son un componente dominante y esencial para los ecosistemas marinos, debido a que constituyen el hábitat de cría y la principal fuente de alimento para la fauna bentónica, incluidos peces e invertebrados de interés comercial (Dean y Connell 1987, Worm *et al.* 2000, Schmidt *et al.* 2011). Además son altamente productivas, producen grandes cantidades de biomasa, almacenando y reciclando importantes cantidades de carbono y nitrógeno (Smith 1981, Karez *et al.* 2004, Schmidt *et al.* 2011).

Debido a su condición sésil, las macroalgas marinas están expuestas a las condiciones de estrés ambiental, manifestando una respuesta rápida a las perturbaciones, lo que resulta en cambios continuos en el ensamble de sus comunidades (Eriksson *et al.* 2002, Karez *et al.* 2004, Kraufvelin *et al.* 2006, Pinedo *et al.* 2007). Por lo tanto, las variaciones en su biomasa permiten detectar alteraciones ambientales, siendo útiles para describir la calidad ecológica de cualquier cuerpo de agua costero según los criterios adoptados por *Water Framework Directive* (WFD; 2000/60/EC, Pinedo *et al.* 2007).

La temperatura del agua, la salinidad, la intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes, la exposición a las olas y la composición del sustrato se encuentran entre los factores abióticos más influyentes en las comunidades de algas intermareales (Dring 1992). Los factores bióticos, como la competencia y la

presión por pastoreo también influyen en la distribución y abundancia de algas en un hábitat en particular (Dayton 1971, Korpinen *et al.*, 2007). Por lo tanto, los factores abióticos como bióticos determinan la dinámica, composición y estructura de las comunidades de algas marinas (Dawes 1998, Dethier y Williams 2009).

En nuestras costas, la estructura de comunidades algales fue estudiada recientemente (Boraso y Zaixso 2008, Liuzzi *et al.* 2011, Croce *et al.* 2015, Gauna *et al.* 2016) y actualmente se reportan aproximadamente 400 especies de algas marinas en la costa atlántica argentina (Boraso 2013).

La costa atlántica de Argentina está constituida por dos provincias biogeográficas: Argentina y Magallanes. Hacia el norte encontramos la provincia Argentina que se extiende hasta la Patagonia Norte, alrededor de Península Valdez a 42°- 43° S, con aguas más cálidas y un predominio de arena, grava y conchillas (Lutz *et al.* 2003).

A lo largo de la costa bonaerense, las asociaciones de algas muestran limitación en su desarrollo por falta de sustratos duros y por la baja penetración de la luz debido al exceso de sedimentos, quedando limitada a especies adaptadas a las condiciones estuarinas como Ulvales y Cladophorales (Bolton 1994, Acha *et al.* 2004, Boraso y Zaixso 2007). Sin embargo, en presencia de sustratos consolidados, la flora alcanza buen desarrollo en los niveles altos del submareal, destacándose la presencia de algas rojas filamentosas y verdes como *Codium* sp. (Parodi 2004, Boraso y Zaixso 2007, Croce *et al.* 2015)

Por otro lado, la provincia de Magallanes que cubre la Patagonia austral se caracteriza por presentar aguas más frías, sedimentos lodosos y fondos rocosos. Las costas rocosas del intermareal se caracteriza por la presencia de un denso

césped de algas calcáreas que cubren los sitios protegidos por olas (Bertness *et al.* 2006) y en la zona inferior y piletas de marea se encuentran céspedes de algas filamentosas como *Polysiphonia* Greville y *Ceramium* Roth (Wieters *et al.* 2012). En el submareal se encuentran algas asociadas a los bosques de *Macrocystis pyrifera*, especialmente *Lophurella* F. Schmitz, *Cladostephus* C. Agardh, *Lessonia fuscescens* Bory, *Stypocaulon* Kützing, *Aphanocladia* Falkenberg, *Rhodymenia* Greville, *Desmarestia* J.V. Lamouroux, *Bossiella* P.C. Silva, *Plocamium* J. V. Lamouroux y una gran variedad de Ceramiaceae y Ectocarpaceae epífitas (Boraso y Zaixso 2007). Sin embargo, los límites entre ambas provincias no se encuentran bien definidos. La región correspondiente al Golfo San Matías y Península Valdés se considera generalmente una zona de transición entre estas dos provincias (Wieters *et al.* 2012). Esta transición ocurre debido a que estos límites biogeográficos presentan discontinuidades en las características oceanográficas, causada por la convergencia de las corrientes de Brasil y de Malvinas, que producen gradientes de temperatura (Boschi 2000, Balech y Ehrlich 2008, Liuzzi *et al.* 2011). En esta zona, los sedimentos arenosos móviles y suspendidos de la provincia Argentina dan paso a superficies consolidadas más consistentes en la zona de transición (Wieters *et al.* 2012). Allí especies subtropicales, tales como *Dictyota* spp. convergen con especies subantárticas como *Bryopsis australis* Sonder y *Myriogloia major* Asensi (Huovinen y Gómez 2012). En el intermareal de esta región sobre los sustratos semiduros se encuentran franjas de *Blidingia minima* (Nägeli) ex Kützing) Kylin *Enteromorpha prolifera* (O. F. Müller) J. Agardh y *Enteromorpha compressa* (Linnaeus) Nees. En las piletas de mareas de los niveles altos e intermedios de intermareal se desarrolla *Cladophora falklandica* (J.

D. Hooker & Harvey) J. D. Hoocker & Harvey, mientras que en las de los niveles inferiores del intermareal abunda *Ulva rigida* C. Agardh y *Polysiphonia brodiaei* (Dillwyn) Sprengel. Sobre *Corallina officinalis* Linnaeus se observan *Leathesia marina* (Lyngbye) Decaisne, *Colpomenia sinuosa* (Mertens ex Roth) Derbès & Solier y *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg (Boraso y Zaixso 2007). También se encuentra *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss restringidas a bahías relativamente pequeñas al norte del Golfo San Jorge. En el submareal *Gigartina skottsbergii* Setchell & N.L.Gardner se distribuye de forma discontinua desde la latitud 44° S hasta Tierra del Fuego.

Estudios realizados por John *et al.* (1994) revelaron que la diversidad de especies es considerablemente mayor en las costas de la Patagonia, Tierra del Fuego y las islas Malvinas que en cualquier otra parte del Océano Atlántico austral. La diversidad de algas aumentan en gran medida hacia el sur, siendo un elemento menor en la estructura funcional de las comunidades en toda la provincia Argentina y zona de transición, hasta ser uno de los grupos funcionales más abundantes en la provincia de Magallanes (Wieters *et al.* 2012). De la misma manera ocurre en las costas del Pacífico de Sudamérica (Santelices 1980; Meneses 2000) donde el número de especies de algas marinas bentónicas aumenta hacia el sur, en contraste con el paradigma ampliamente aceptado que establece un aumento de la biodiversidad hacia los trópicos (Liuzzi *et al.* 2011).

Sin embargo, los estudios ecológicos sobre algas marinas de la región sudeste de América del Sur todavía son escasos, por lo que se conoce poco de los patrones de distribución y abundancia, así como los roles funcionales de las algas marinas en estos ecosistemas (Huovinen y Gómez 2012).

El estudio de las macroalgas puede ser abordado desde la ecología de sus comunidades, la demografía poblacional, la ecología de la producción, los estudios fenológicos y los mapeos de los genomas (Chapman 1974), enfoques que aportan información básica para comprender el comportamiento de las poblaciones naturales, y proveen soporte racional para desarrollar actividades de maricultura (Brito y Silva 2005).

En las costas argentinas existen macroalgas de elevado interés económico tales como: *Gracilaria verrucosa* utilizada para la producción de agar, *Gigartina skottsbergii* en la preparación de carragenanos. También para consumo humano, en forma de harinas o secas, son cosechadas informalmente *Macrocystis*, *Pyropia* (como *Porphyra*) y, en menor cantidad, *Ulva* y *Lessonia* sp. (FAO, 2007).

Por esta razón, para esta tesis se propone un estudio integrador de las poblaciones naturales del alga parda *Leathesia marina* (Phaeophyceae) para un manejo sustentable de la especie. Esto implica investigaciones relacionadas a la ecología de la especie: demografía poblacional, estudios fenológicos y sanitarios; así como formas de manejo mediante cultivos controlados: ciclos de vida, optimización de la fertilidad y caracterización bioquímica del alga para su posible utilización en la industria farmacéutica o alimentaria.

Se formularon los siguientes **objetivos**:

1. *Analizar las poblaciones de Leathesia marina (Lyngbye) Decaisne integrando a su biología aspectos ecológicos como su distribución en el intermareal, su abundancia relacionada con parámetros medio ambientales y su estado sanitario.*

2. *Obtener compuestos antioxidantes naturales y/o sustancias bioactivas a partir de la macroalga y optimizar su producción, relacionándola con los estados fenológicos del alga y de su ciclo de vida para establecer los momentos de cosecha que garanticen un manejo sustentable de la especie.*

3. *Evaluar las potencialidades para desarrollar emprendimientos de maricultura del alga y aportar elementos de juicio fundados para la implementación de estrategias de manejo de sus poblaciones como productoras de compuestos bioactivos de interés industrial.*

Tanto la metodología aplicada como los resultados obtenidos y su discusión están presentados en cuatro capítulos:

Capítulo I: *Leathesia marina*: Filogenia, caracterización taxonómica y ciclo de vida

Se propone un estudio integrador que involucra observaciones morfológicas de dos poblaciones de *L. marina* de las costas Patagónicas, junto a estudios filogenéticos que permiten corroborar la identidad de la especie y el análisis de los niveles de ploidía de las distintas etapas del ciclo de vida heteromórfico que permiten dilucidar el ciclo de vida completo.

Capítulo II: Fenología y dinámica poblacional

Se analizan los cambios morfológicos y reproductivos de *L. marina* a lo largo de los meses en condiciones naturales, en conjunto con la dinámica poblacional y su relación con las variaciones ambientales.

Capítulo III: Efecto de las comunidades epífitas algales sobre *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

Se determina el efecto sobre el estado sanitario de *L. marina* de sus comunidades algales epífitas contrastándolas con las de *Colpomenia sinuosa*, especie de morfología análoga y con un papel ecológico similar en la zona intermareal.

Capítulo IV: Propiedades bioactivas de *Leathesia marina* y optimización de su cultivo

Se evaluó la composición bioquímica del esporófito de *L. marina* para su potencial uso como fuente de compuestos bioactivos optimizándose las condiciones de cultivo controlado de la especie, cuyos aspectos son fundamentales a la hora de realizar emprendimientos de maricultura.

Por último se presentan las **Conclusiones Generales.**

CAPÍTULO I

***Leathesia marina*: Filogenia, caracterización taxonómica y ciclo de vida**

1. Introducción

Las algas pardas constituyen un grupo taxonómicamente diverso y ecológicamente importante en los ambientes marinos (Mann 1982, Andersen 1992). Estas algas son de particular interés en estudios evolutivos dado que han desarrollado características como una organización multicelular y metabólica compleja, paredes celulares que contienen varios polisacáridos y alta resistencia al estrés osmótico, independientemente de otros linajes como Plantae, Fungi y Metazoa (Charrier *et al.* 2008).

Varios miembros del grupo también han desarrollado biomoléculas tales como polisacáridos y elicitores de defensa que tienen una amplia gama de aplicaciones en la industria (Klarzynski *et al.* 2000, McHugh 2003). Por lo tanto, el conocimiento de las diferentes etapas del ciclo de vida de las algas pardas es esencial para la optimización del cultivo debido a su alto valor comercial.

Los sistemas de clasificación tradicionales sugieren que las algas pardas han evolucionado en una trayectoria lineal simple de formas morfológicas sencillas a más complejas (Kylin 1933a, Fritsch 1945, Papenfuss 1953, Scagel 1966, van den Hoek *et al.* 1995). El ciclo de vida ancestral implicó la alternancia sexual entre dos

generaciones multicelulares isomórficas (Cho *et al.* 2004, Kawai *et al.* 2007, Phillips *et al.* 2008).

Sin embargo, luego surgieron diversas variaciones del ciclo básico y actualmente se encuentran tres tipos de ciclos, que se diferencian en la morfología relativa de las generaciones gametofíticas y esporofíticas: a) alternancia de generaciones heteromórficas, b) alternancia de generaciones isomórficas y c) ciclos de vida en los que el esporófito es la única generación de vida libre (Clayton 1988). Russell (1986) propuso que los diferentes tipos de ciclos de vida son el resultado de una adaptación compleja y una solución exitosa a un problema ecológico particular. Las variaciones en el ciclo de vida incluso se pueden observar dentro de un solo orden algal. Las Ectocarpales contienen no solo familias con generaciones isomórficas (Acinetosporaceae, Ectocarpaceae), sino también familias con generaciones fuertemente heteromórficas, donde los esporófitos (Scytosiphonaceae) o los gametófitos (Chordariaceae, Adenocystaceae) son microscópicos (Peters y Ramirez 2001).

Dentro de las Ectocarpales, la familia Chordariaceae es la más grande y morfológicamente más diversa. Sus miembros tienen ciclos de vida heteromórficos que poseen una alternancia entre un gametófito microscópico haploide y un esporófito macroscópico erecto que puede ser o no parenquimatoso (van den Hoek *et al.* 1995).

El ciclo de vida de las algas pardas representa un conjunto de elementos particularmente interesantes para explorar la función del ciclo de vida en relación con las condiciones ambientales (Cock *et al.* 2014). En los ciclos heteromórficos, cada una de las fases suelen exhibir un alto grado de independencia y

diferenciación y muchas veces, cada fase tiene limitaciones ecológicas y evolutivas únicas (Schiel y Foster 2006). En numerosas especies de macroalgas marinas con alternancia de generaciones heteromórficas, una generación suele ser más tolerante a las condiciones ambientales desfavorables (Carney y Edwards 2006).

Estudios previos sobre el ciclo de vida de *L. marina* revelaron un ciclo de vida heteromórfico típico, donde un gametófito microscópico alterna con un esporófito macroscópico (Dangeard 1965, Peters 1987). Kylin (1933 b), informó el desarrollo de microtalos a partir de esporas producidos por el macrotalo, aunque, no observó fusión de gametas, ni la regeneración del macrotalo.

En otros estudios, Dangeard (1969) sugiere que *L. marina* posee dos alternativas en su ciclo de vida sexual: un ciclo abreviado con reconstitución directa del macrotalo, al asumir que esto ocurre después de la fusión de meiósporas, ya que no observó las gametas, y un segundo ciclo con una generación de gametófitos microscópicos intermedios.

Sin embargo, actualmente aún existen controversias con respecto al ciclo de vida de *L. marina*.

Por otro lado, la determinación de la ploidía se ha utilizado con frecuencia para resolver las diferentes etapas del ciclo de vida de las algas y se han desarrollado varios métodos para analizarla. El conteo de cromosomas es un método clásico para determinar la fase nuclear. Sin embargo, los estudios cromosómicos muchas veces utilizan técnicas de tinción que a menudo no son eficaces, debido al pequeño tamaño de núcleos y cromosomas y la rapidez de la división celular (God

Ward 1966, Cole 1990). La microespectrofotometría puede usarse para identificar niveles de ploidía nuclear (Goff y Coleman 1990, Kapraun y Nguyen 1994).

Otro método para determinar el nivel de ploidía nuclear se basa en la relación entre el contenido de ADN y el tamaño nuclear (Sparrow y Miksche 1961, Price 1976, Whittick 1986), donde mediante la utilización de un fluorocromo para teñir los núcleos y un sistema de análisis de imágenes es posible determinar los niveles relativos de ploidía (Choi *et al.* 1994). Hace ya un tiempo comenzó a utilizarse la citometría de flujo como un procedimiento para cuantificar el contenido de ADN nuclear en algas marinas (Le Gall *et al.* 1993). Esta técnica permite el análisis de miles de núcleos en corto tiempo y proporciona una alternativa conveniente al recuento de cromosomas.

El objetivo formulado para este capítulo fue:

*Analizar filogenéticamente las poblaciones de *Leathesia marina* de Puerto Madryn y Las Grutas para evaluar la variabilidad genética entre ambas y su relación con otras a nivel mundial y el ciclo de vida en cultivo a través de un enfoque integrado basado en la morfología de las diferentes fases y sus niveles de ploidía.*

2. Materiales y métodos

2.1. Área de estudio

Los esporófitos, en adelante llamados macrotalos, de *L. marina* fueron recolectados en el intermareal de dos localidades patagónicas: Las Grutas sobre la costa del Golfo San Matías (40°50'33,09"S - 65°6'59,78"O, Fig. 1a y b) y Puerto Madryn sobre la costa del Golfo Nuevo (42°46'32,57"S - 62°59'23,49"O, Fig. 1 a y c) separadas ambas localidades por 260 km.

Ambos golfos pertenecen al sistema de los tres golfos patagónicos. La región de Las Grutas se caracteriza por poseer un clima semiárido, con una temperatura media de 15°C y precipitaciones que rondan los 250 mm al año. Los vientos más fuertes soplan del cuadrante suroeste. En Puerto Madryn el clima es árido y se caracteriza por presentar condiciones climáticas más extremas, con predominio de fuertes vientos del oeste y baja humedad durante todo el año (Paruelo *et al.* 1998). La precipitación media anual ronda los 239 mm y a temperatura media anual es de 13,4°C.

El régimen de mareas en ambas localidades es semi-diurno. En las Grutas la amplitud media es de 4,5 m con amplitudes extraordinarias de hasta 7 m y en Puerto Madryn la amplitud media es de 4,13 con una máxima de 5,86 m (SHN 2014).

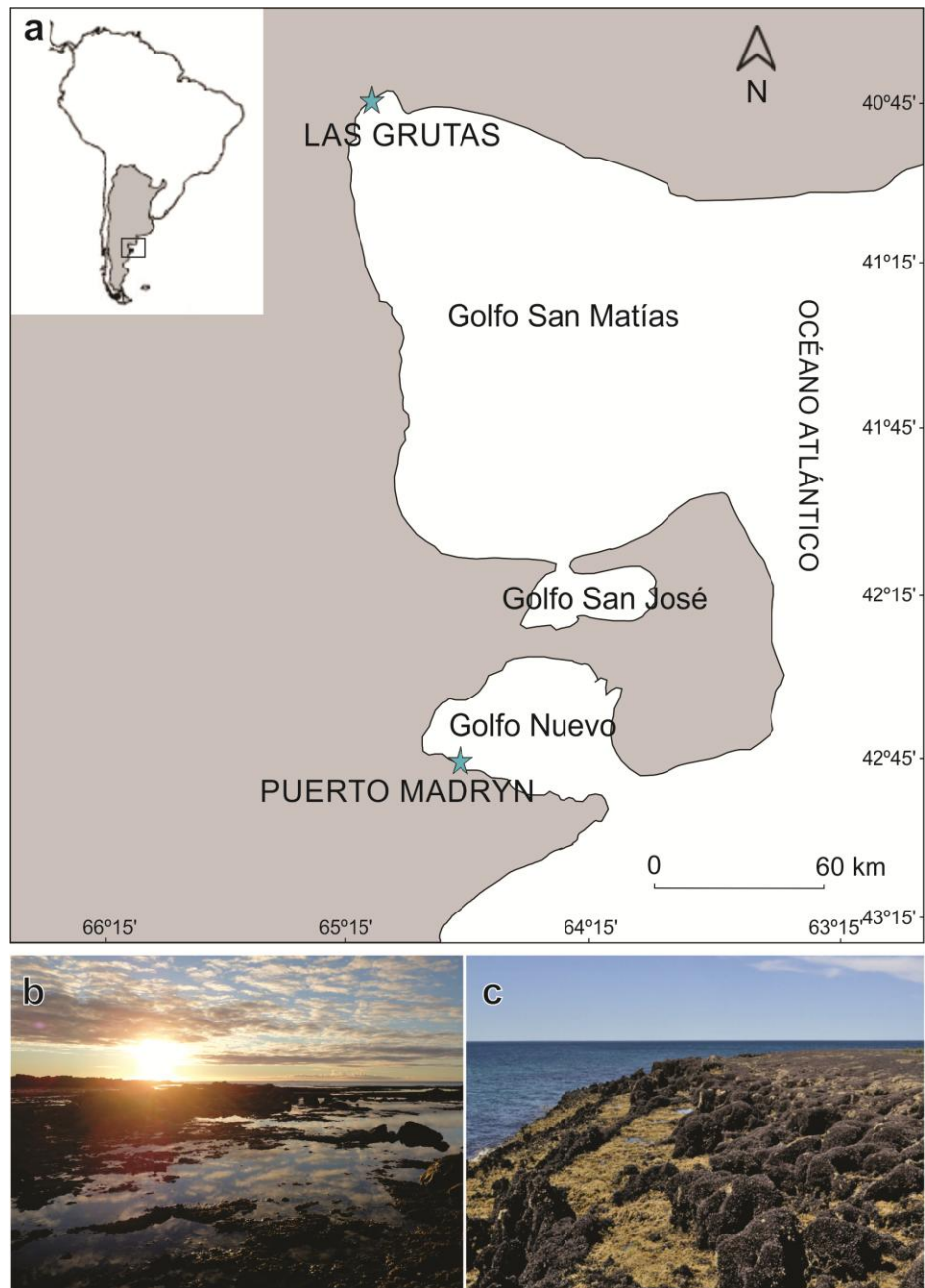


Figura 1. Sitios de muestreo. a. Localización del área de estudio. b. Intermareal de Las Grutas. c. Intermareal de Puerto Madryn.

En ambas regiones existen, ambientes costeros expuestos y moderadamente expuestos. Las playas muestran una notable alternancia desde extensas playas arenosas y cantos rodados de poca altura, hasta sectores con barrancas que dificultan el acceso al mar, formando restingas profundas (Olivier *et al.* 1966, Piola y Scasso 1988). El sustrato predominante en la zona intermareal consiste en una plataforma de piedra caliza consolidada, conocida localmente como "tosca" (Casal 1946) y se caracteriza por la presencia de numerosas pozas de marea. Las orillas están cubiertas en su mayor parte por diminutos mejillones como *Brachidontes rodriguezii* d'Orbigny (1842) y *Perumytilus purpuratus* Lamarck (1819); el nivel inferior está dominado por *Corallina officinalis* (Rechimont *et al.* 2013).

2.2. Preparación de ejemplares de herbario

Los especímenes recolectados fueron incorporados al Herbario BBB de la Universidad Nacional del Sur (UNS): AP0073, AP0070, AP0097, AP0098, AP0099, AP0100.

La preparación de los ejemplares de herbario consistió en aplicar la técnica de montaje del material biológico, para la cual se lavó el material y extendió a los macrotalos en una hoja de montaje. Previamente se extrajeron pequeños fragmentos que fueron fijados en solución FAA (Formaldehído, Ácido acético glacial y Etanol, en proporción 8:1:1) para llevar a cabo las observaciones morfológicas y anatómicas. También se extrajeron pequeños fragmentos para su posterior análisis filogenético y realización de los cultivos.

2.3. Morfología de *Leathesia marina*

El material fijado conservó la estructura de las células vegetativas y reproductivas, consiguiéndose características de la morfología y anatómicas.

El tamaño de los macrotalos de *L. marina* se estimó a través de las variables altura, diámetro y peso escurrido. Se realizaron observaciones microscópicas de diferentes etapas del ciclo de vida, para distinguir diferentes morfologías, utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE 300 (Tokio, Japón) equipado con una cámara Nikon FDX 35 y se registraron datos morfológicos a partir de las imágenes utilizando el software *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU.).

2.4. Análisis filogenético molecular

El análisis filogenético se basó en los datos moleculares, aportados por los Dres. M. Emilia Croce, Kazuhiro Kogame y Wilfred Santiañez de la Universidad de Hokkaido, Sapporo, Japón, quienes extrajeron ADN genómico de muestras de macrotalos y microtalos de *L. marina* pertenecientes a las dos localidades estudiadas, secadas con sílica gel, mediante la utilización del Kit de extracción de ADN QuickExtract™ FFPE, siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación y secuenciación de los genes de ADN mitocondrial *cox3* y plastidios *rbcL* se llevaron a cabo como se describe en Santiañez *et al.* (2017). La alineación global para los análisis de un solo gen (*cox3*: 650 pb) y conjunto de datos concatenados (*rbcL*: 1.399 pb + *cox3*: 509 pb = 1.908 pb) se construyeron junto

con los datos de secuencia disponibles para Chordariaceae en GenBank. Los análisis filogenéticos basados en un solo gen y un conjunto de datos concatenados (divididos por genes y posición del codón) se realizaron usando máxima verosimilitud (ML) y la Inferencia Bayesiana (BI) bajo el modelo $GTR + I + \Gamma$. Los análisis de ML se llevaron a cabo en RAxML v.8 (Stamatakis 2014) con 1000 datos pseudoreplicados bootstrap a través del Cipres Phylogenetic Portal (Miller *et al.* 2010). BI se realizó en MrBayes v.3.2.1 (Huelsenbeck y Ronquist 2001) en donde se estableció una marca de 25% antes de calcular los árboles. Además, también se calcularon las diferencias de secuencia por pares (distancias p) dentro de MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013).

2.5. Cultivos *in vitro*

Se iniciaron a partir de fragmentos fértiles de macrotalos que presentaban esporangios uni y pluriloculares. Estos fragmentos se colocaron en tubos de ensayo con un cubreobjetos en el fondo, conteniendo agua de mar estéril enriquecida con medio PES (Provasoli 1968). Este medio es el más empleado en el cultivo de algas marinas bentónicas y consiste básicamente en:

- i) nitrógeno y fósforo en concentraciones relativamente elevadas,
- ii) macronutrientes,
- iii) micronutrientes,
- iv) vitaminas, solución tampón y,
- v) solución quelante para iones poco solubles.

Los metales traza fueron previamente diluidos, mantenidos en congelador y agregados conforme a dilución.

Este medio se utilizó diluyendo 2 ml de la solución madre por litro de agua de mar. Esta proporción es recomendable para el caso de algas pequeñas, con buenos resultados de crecimiento. El medio de cultivo se renovó semanalmente, para evitar cambios de concentraciones de los distintos componentes que lo integran.

Se incubaron con una intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes blancos y monitoreado con un medidor de flujo cuántico (Apogee MQ-200, Logan, Utah, USA).

El ciclo de vida se estudió bajo dos regímenes de fotoperiodo y temperatura: día largo (DL) con 16:8 h. (luz: oscuridad) a 20°C para simular condiciones de verano y día corto (DC) con 8:16 h. (luz: oscuridad) a 8°C para simular las condiciones invernales. Los cultivos fueron observados cada dos días hasta completar todo el ciclo de vida.

2.6. Aislamiento de los núcleos y citometría de flujo

Se aislaron los núcleos de talos correspondientes a diferentes fases del ciclo de vida. Para eso, pequeñas porciones se colocaron en una solución buffer helado [30 mM de MgCl, 120 mM de citrato trisódico, 120 mM de sorbitol, 55 mM de ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-etanosulfónico (HEPES) pH 8, EDTA 5 mM suplementado con 0,1% (v/v) Triton X-100 y bisulfito sódico 5 mM; pH 8,0] siguiendo a Peters *et al.* (2004) y se procedió a cortar el talo con bisturí en

pequeñas porciones a fin de disgregarlo completamente, ya que el grado de corte determina empíricamente la concentración de núcleos en la muestra. Luego se mezcló el homogeneizado pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces para evitar la formación de burbujas. A continuación, se filtró la solución con filtro de nylon de 30 μm y luego de 10 μm para evitar el paso de fragmentos de talo. Finalmente se añadió una alícuota de 100 μL de solución de PI-ARNasa (yoduro de propidio (PI), 50 μg /ml, ARNasa 50 μg /ml en agua ultrapura) a la suspensión de núcleos y se midió su contenido de ADN después de 20 min. de incubación mediante citometría de flujo FACSCalibur equipada con un LASER argón (emisión a 488nm) del INBIOSUR-UNS-CONICET.

2.7. Contenido de ADN de núcleos individuales utilizando microscopía de fluorescencia

La ploidía nuclear de cada fase del ciclo de vida se estimó mediante el contenido de ADN de núcleos individuales utilizando microscopía de fluorescencia. Se fijaron muestras de diferentes etapas del ciclo de vida con Carnoy (100% de alcohol etílico: 100% de ácido acético= 3:1) durante al menos 24 h. Luego se transfirieron a tubos Eppendorfs con alcohol 100% y se mantuvieron a 4°C hasta que se llevó a cabo el análisis del contenido de ADN nuclear. La determinación del nivel de ploidía nuclear basada en la correlación del contenido de ADN y el tamaño nuclear, se realizó en núcleos teñidos con 4',6 diamino-2-fenilindol (1h. de incubación con DAPI) y se midió el área de los núcleos usando un software de

procesamiento de imágenes *ImageJ* 1.46v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.8. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para los estudios con microscopía electrónica de barrido (MEB), se fijaron talos de las distintas fases del ciclo de vida obtenidas en cultivo en glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato de sodio 0,01 M (pH 7,2) a 5°C durante 2 h. Posteriormente, se llevaron a cabo tres lavados con el buffer de cacodilato de sodio (0,005 M) durante 10 min. cada uno. Las porciones fijadas se deshidrataron en una serie ascendente de acetonas, de 10-100%, siguiendo el protocolo de Cáceres (1995). Las muestras fueron montadas en portaobjetos cubiertos con poli D-lisina al 0,5%. Finalmente, las muestras se secaron por punto crítico durante 1 h. y se cubrieron con oro por medio de pulverización catódica 9100 modelo 3 (Pelco, Clovis, California, EEUU), siguiendo a Sorrivas de Lozano y Morales (1986). Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de barrido Leo Evo 40 (Jena, Alemania) del CCT Bahía Blanca - CONICET.

3. Resultados

3.1. Clasificación taxonómica de *Leathesia marina*

La especie estudiada en esta tesis pertenece a la siguiente clasificación:

Phyllum: Ochrophyta

Clase: Phaeophyceae

Subclase: Fucophycidae

Orden: Ectocarpales

Familia Chordariaceae

Género: *Leathesia* S. F. Gray

3.2. Filogenia de *Leathesia marina*

Los especímenes de *L. marina* de Las Grutas y Puerto Madryn (Fig. 2) fueron genéticamente similares y estuvieron estrechamente relacionados con los de Nueva Zelanda, con solo un 0,3% de divergencia de secuencia. La divergencia de secuencia intraespecífica en *cox3* fue de hasta 7.7%. Estos resultados surgieron del análisis de un total de nueve secuencias nuevas, que representan ocho secuencias *cox3* y una *rbcL*, basadas en ocho muestras de macrotalos *Leathesia* recogidas en ambas localidades y microtalos provenientes de cultivos.

En relación a los árboles *cox3* y concatenados (Figs. 3 y 4), *L. marina* de Argentina formó un clado bien respaldado con sus conespecíficos de Nueva Zelanda, Alemania y Japón.

3.3. Bioecología de *Leathesia marina*

Los macrotalos de *L. marina* estuvieron presentes de agosto a abril en Las Grutas y de septiembre a abril en Puerto Madryn, desde finales de invierno hasta principios de otoño en ambos sitios de muestreo. El resto de los meses, los macrotalos estuvieron ausentes en la naturaleza.

La población de *L. marina* estuvo ubicada en el intermareal inferior y se encontró a menudo como una epífita sobre las matas de *C. officinalis* (Fig. 5a). Los especímenes de *L. marina* colectados en ambos sitios exhibieron el mismo tipo de ciclo de vida y formas de desarrollo. El ciclo en cultivo, se completó en seis meses y presentó tres morfologías diferentes: dos morfotipos haploides (microtalos o gametófitos) y un morfotipo diploide (macrotalo o esporófito).

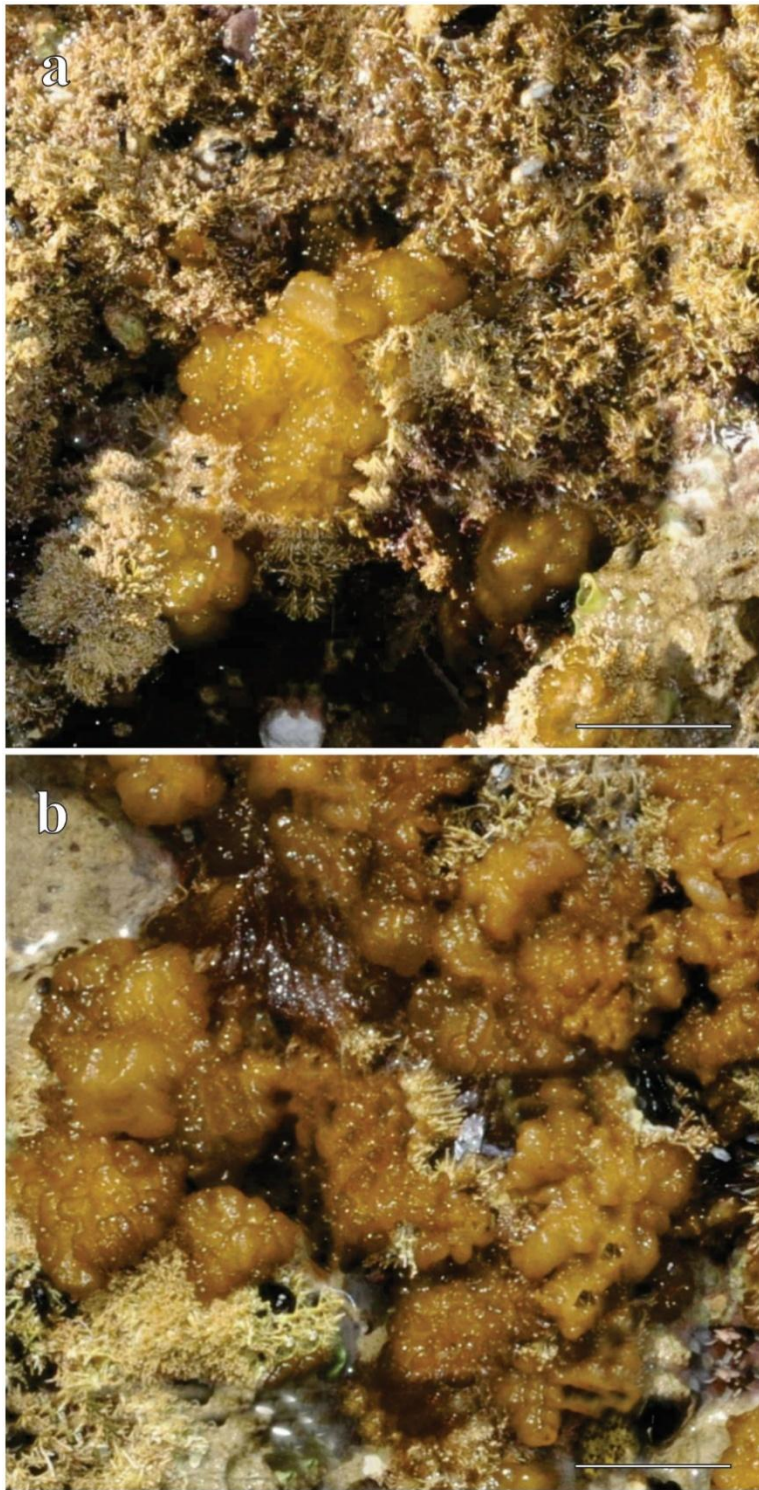


Figura 2: *Leathesia marina* en la naturaleza. **a.** Población de Las Grutas. **b.** Población de Puerto Madryn. Barras escala =2,5 cm.

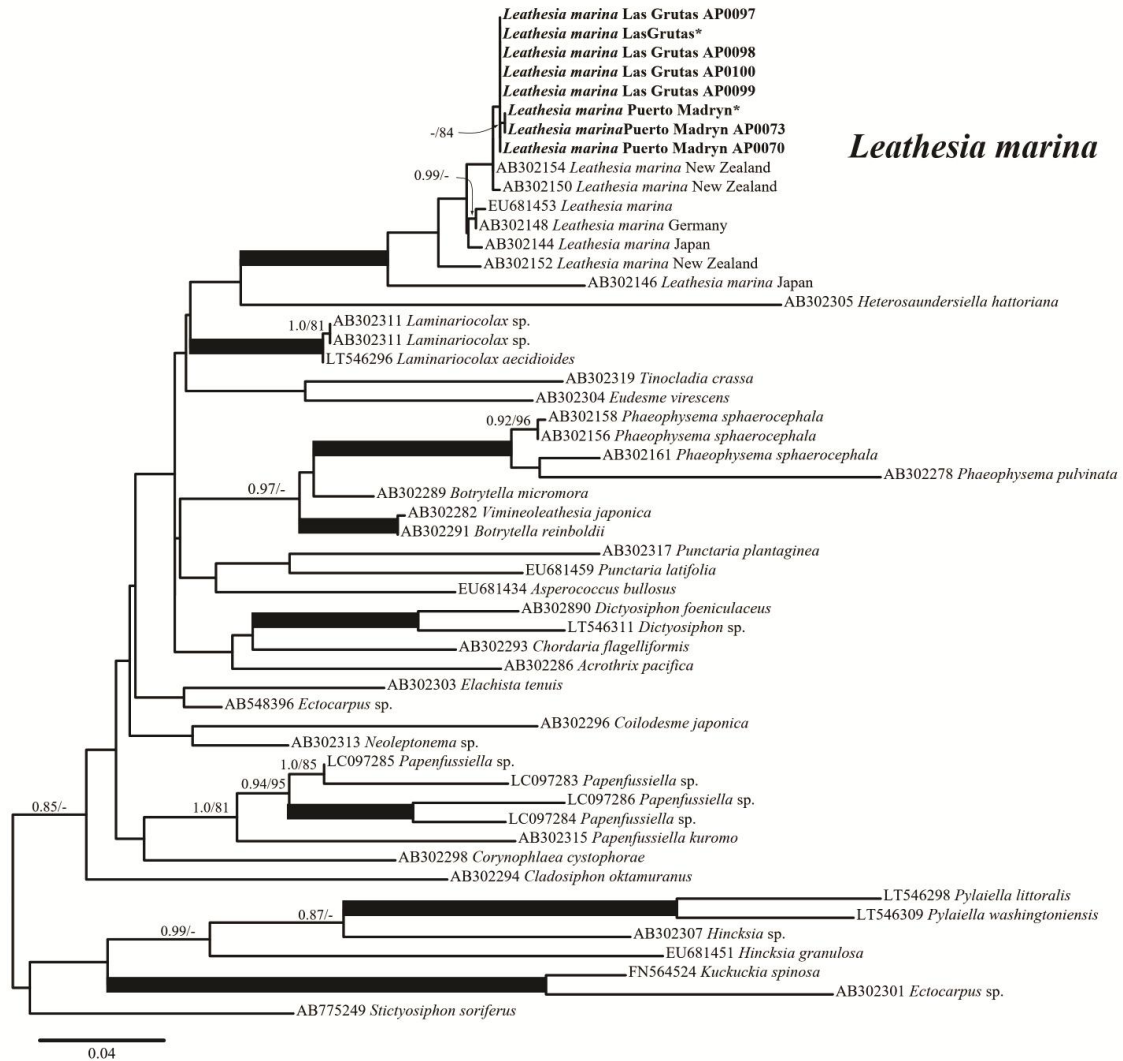


Figura 3. Filogenia de *Leathesia marina* basada en *cox3*. Los valores agregados en cada nodo son Probabilidades Posteriores bayesianas (PP) y “bootstrap” (BP) porcentajes de máxima verosimilitud. Las líneas engrosadas indican nodos altamente compatibles (PP: ≥ 0.98 y BP: $\geq 95\%$). Se eliminan los valores $< 80\%$ de PA y $< 0,80$ PP. **Nombres** = secuencias generadas recientemente. * = utilizado en estudios de ciclos de vida.

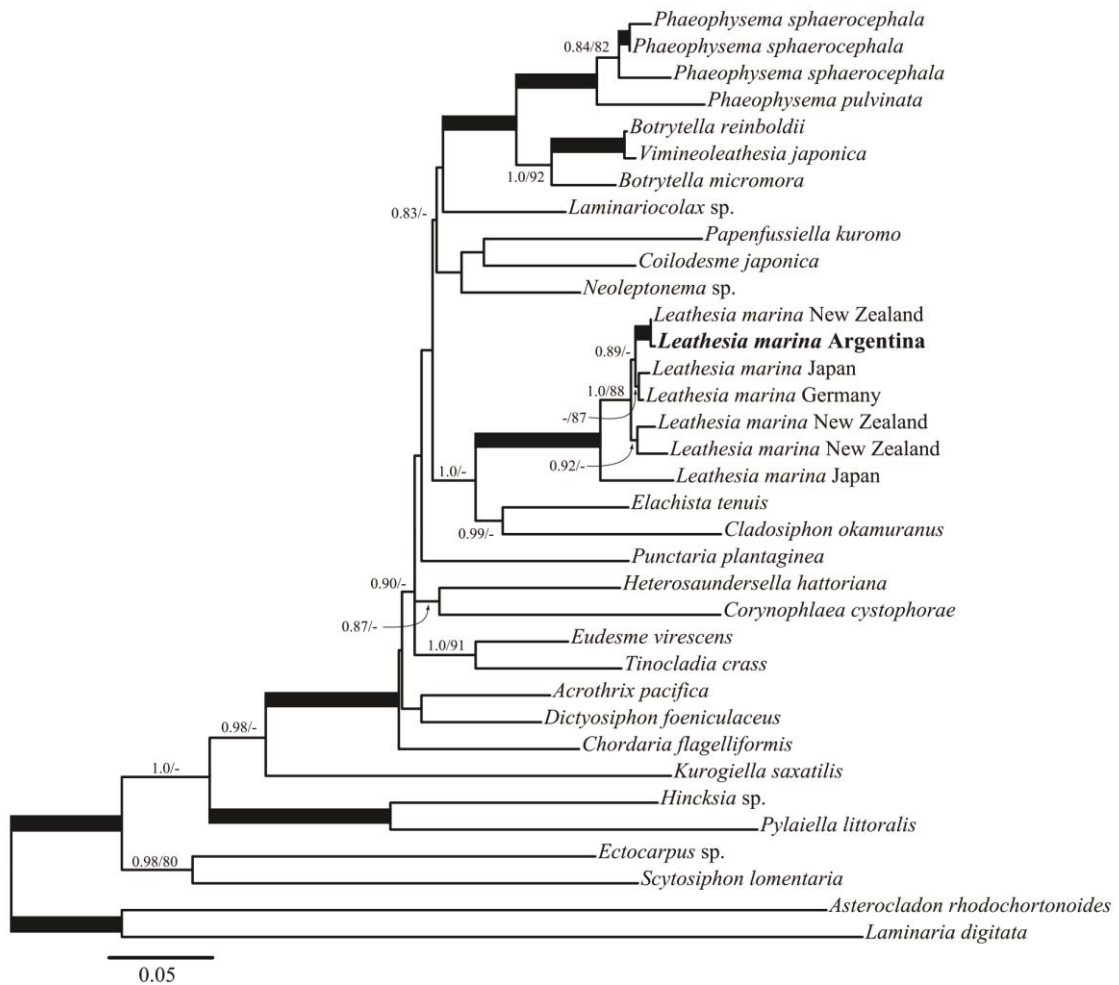


Figura 4. Filogenia de *Leathesia marina* basada en secuencias concatenadas (cox3 + rbcl). Los valores agregados en cada nodo son Probabilidades Posteriores bayesianas (PP) y bootstrap (BP) porcentajes de máxima verosimilitud. Las líneas engrosadas indican nodos altamente compatibles (PP: ≥ 0.98 y BP: $\geq 95\%$). Se eliminan los valores $< 80\%$ de PA y $< 0,80$ PP. **Nombres** = secuencias generadas recientemente.

3.4. Descripción del macrotalo de *L. marina*

Los macrotalos jóvenes de *L. marina* son globosos y se expanden superficialmente para convertirse en un talo rugoso (Fig. 5a). Los mismos presentaron un diámetro (mín - máx) de 1,7 – 4,5 cm, una altura de 0,8 – 1,2 cm y un peso escurrido de 3,7- 0,3 g.

En corte transversal, la zona medular estuvo compuesta por tres capas de células hialinas de paredes delgadas (primer orden, segundo orden y tercer orden). Estas células dieron origen a otras más pequeñas y se dividieron dicotómicamente hacia la superficie (Fig. 5b). La capa medular más externa presentó células oblongas con células de primer orden de 27 - 32 μm de largo y 18 - 19,5 μm de ancho y células de segundo orden de 38,2 - 49 μm de largo y 27,6 - 32,7 μm de ancho (Fig. 5c). Las células medulares de tercer orden se ubicaron en las capas inferior y media; presentaron forma irregular con anastomosis y midieron entre 60,8 - 72,2 μm de largo y 37,8 - 45 μm de ancho (Fig. 5d).

La capa subcortical estuvo formada por células similares a las células medulares, excepto que fueron más pequeñas (14,5 – 17,1 μm x 9,2 - 11 μm) y presentaban filamentos asimiladores unidos (Fig. 5b). La capa cortical de *L. marina* estuvo formada por filamentos asimiladores que se intercalaron con los esporangios uniloculares y pluriloculares (Fig. 5c). Esos filamentos asimiladores presentaron de tres a cuatro células y nacieron en tripletes o individualmente sobre las células subcorticales. La célula terminal varió de ovoide o globosa y contuvo numerosos cloroplastos (Fig. 5c), mientras que las células medulares más internas fueron estrelladas y sin cloroplastos (Fig 5d). También presentó pelos

hialinos dispersos que crecieron solitarios en la superficie del macrotalo y se originaron en las células medulares más externas (Fig. 5e). Los esporangios pluriloculares uniseriados de 24,5 - 35 μm largo \times 5,2 - 6 μm de ancho se formaron solos o en tripletes de células subcorticales. Los esporangios uniloculares ovoides y sésiles de 19,4 - 35,2 μm de largo \times 12,4 - 16,7 μm de ancho se formaron a partir de las células basales de los filamentos asimiladores (Fig. 5c).

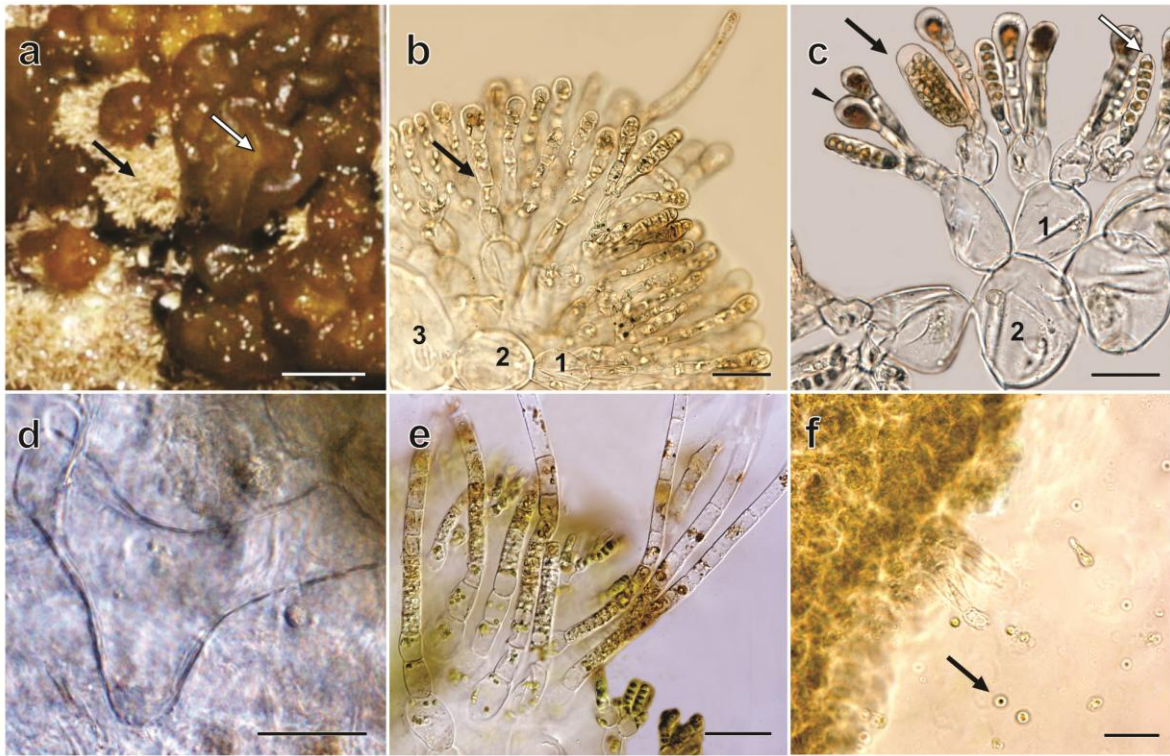


Figura 5. Macrotalo de *Leathesia marina* **a.** Macrotalo (flecha blanca) epífito de *Corallina officinalis* (flecha negra). **b.** Macrotalo en CT; filamento asimilador (flecha negra); células medulares de primer (1), segundo (2) y tercer orden (3). **c.** Esporangio unilocular en la célula basal del filamento asimilatorio (flecha negra); células medulares de primer orden (1) y de segundo orden (2); esporangios pluriloculares uniseriados con numerosos loculi (flecha blanca); célula ovoide con numerosos cloroplastos (cabeza de flecha). **d.** Detalle de una célula medular de tercer orden en sección transversal que muestra forma irregular. **e.** Pelos naciendo de células medulares. **f.** Macrotalo liberando esporas (flecha negra). *Barras de escala:* **a**= 1,5 cm. **b, c y e**= 20 μ m. **d, f** =10 μ m. CT: corte transversal.

3.5. Morfología de *L. marina* en cultivo bajo el régimen “día largo” (DL)

Los cultivos fueron iniciados a partir de esporangios provenientes de los macrotalos (Fig. 5f). Bajo condiciones de día largo, de los esporangios pluriloculares, por mitosis, se formaron plurísporas diploides de 2 - 2,4 μm de longitud con un estigma y dos flagelos heterocontos que no se desarrollaron (Fig. 6a).

De los esporangios uniloculares, por meiosis, se originaron unísporas de 0,9 - 1,5 μm de longitud, también con un estigma y dos flagelos heterocontos que se liberaron después de 12 h de incubación y se asentaron 12 h después de su liberación. Éstas germinaron de forma unipolar y se observaron dos tipos de crecimiento del talo: tubular con divisiones transversales a lo largo del tubo germinal, uniseriado, ramificado (Fig. 6b) y bilobular con divisiones radiadas formando discos pequeños (Fig. 6c). Ambos tipos de crecimiento generaron microtalos globosos que no superaron los 3 mm de diámetro (Figs. 6d-h). Estos resultaron ser esporofitos haploides que se caracterizaron por presentar una estructura medular similar a la del macrotalo diploide, con células medulares de primer (9 - 12 μm longitud x 9 - 10 μm ancho), segundo (16 - 21 μm de longitud y 13 - 17 μm de ancho) y tercer orden (24 - 32 μm de longitud y 13 - 17 μm de ancho). En la zona cortical nacen, filamentos asimiladores cortos de 2 a 3 células (7 - 5 μm de longitud), pelos y esporangios pluriloculares biseriados (15 - 30 μm longitud x 3 - 5 μm ancho) (Fig. 6i). La esporogénesis en estos microtalos globosos ocurrió después de 20 días de incubación. Una vez liberadas las esporas, éstos se desprendieron del sustrato dejando su descendencia de nuevos

microtalos idénticos a sus talos progenitores, repitiendo el mismo ciclo asexual bajo las condiciones de DL.

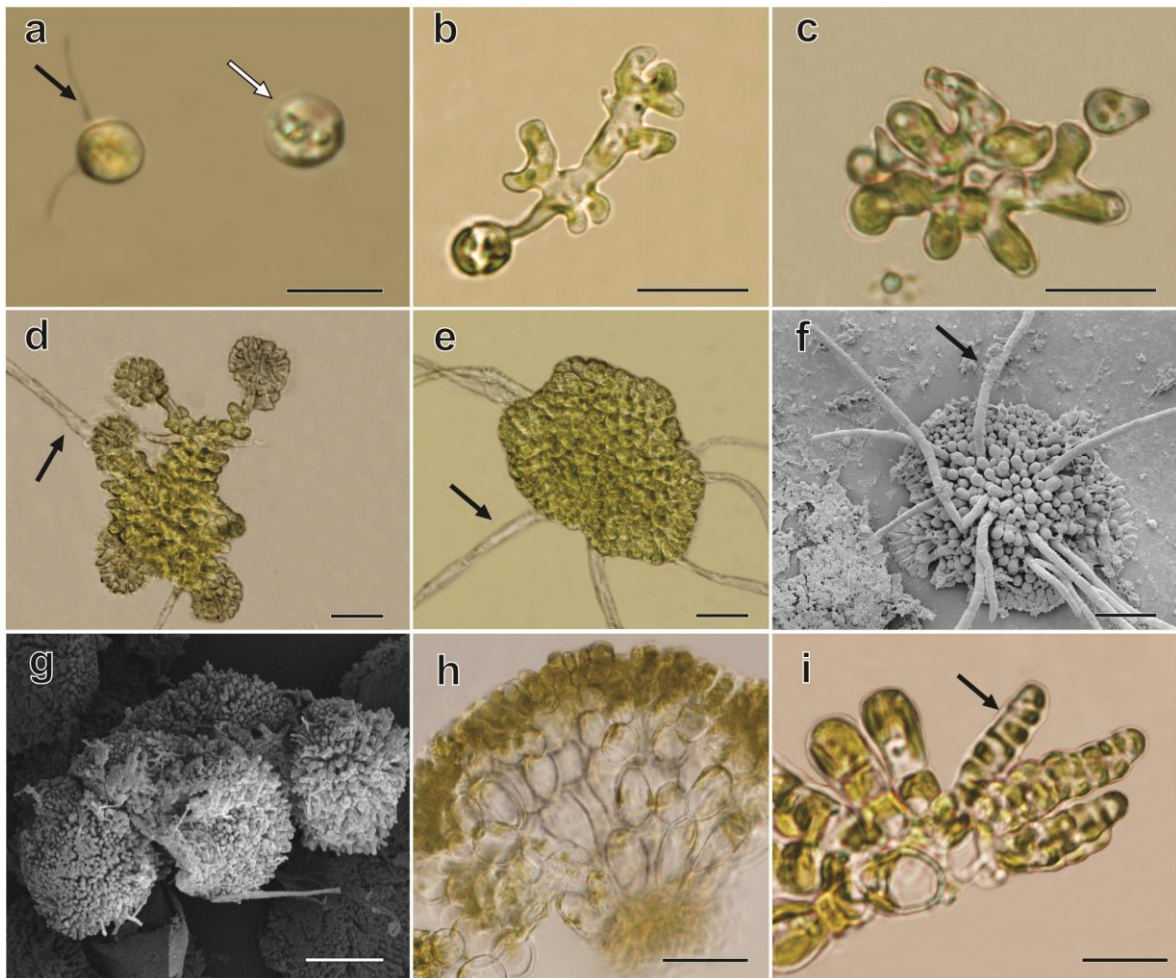


Figura 6. Ciclo de vida de *Leathesia marina* en cultivo: desarrollo de microtalo globoso. a. Plurísporas originadas a partir del macrotalo: libre (flecha negra), nótese los dos flagelos heterocontos y pluríspora asentada (flecha blanca). **b.** Primeros estadios filamentosos en la formación del microtalo globoso. **c.** Primeros estadios discoides en la formación del microtalo globoso **d.** Etapa más avanzada de b, obsérvese que comienza a desarrollar la estructura medular y formación de pelos (flecha negra). **e y f.** Etapas más avanzadas de c, con comienzo del desarrollo de la estructura medular y pelos (flecha negra). **g.** Microtalo globoso maduro. **h.** Detalle de las células medulares en sección transversal del microtalo globoso. **i.** Esporangios pluriloculares (flecha negra). *Barras escalas:* **a** = 5 μ m; **b, c, d, e, f, i** = 10 μ m; **f, h** = 30 μ m; **g** = 1,5 mm. *MO:* **a, b, c, d, e, h, i.** *MEB:* **f, g.**

3.6. Morfología de *L. marina* en cultivo bajo régimen “día corto” (DC)

Las unísporas generadas en el macrotalo se liberaron después de 24 h de incubación y se establecieron después de 12 h. Durante la F1 estas dieron origen a microtalos globosos con la misma estructura que en el régimen DL. La esporogénesis en los microtalos globosos en este régimen ocurrió después de 25 días de incubación. Sin embargo, durante la F2 las plurísporas de los microtalos globosos (Fig. 7a), provenientes de esporangios pluriloculares, originaron una generación gametofítica caracterizada por microtalos filamentosos uniseriados postrados con células cilíndricas de 8 - 12 μm de longitud y 4 - 6 μm de ancho (Figs. 7 a-d). Estos microtalos postrados permanecieron en latencia, sin gametogénesis en el régimen DC por un período largo de 18 meses (Figs. 7 c-d). Sin embargo, cuando fueron pasados a condiciones de DL, formaron gametangios pluriloculares biseriados de 20 - 30 μm longitud y 6 - 8 μm de ancho (Figs. 7 e-f). Los gametos desarrollados en microtalos postrados maduros se liberaron después de 24 h de incubación y se fusionaron después de 12 h (Figs. 8 a-c), generando macrotalos ($2n$) bajo las condiciones de DL (Figs. 8 d-f).

Un resumen del ciclo de vida en condiciones de cultivo DL y DC se presenta en Fig. 9.



Figura 7. Ciclo de vida de *Leathesia marina* en cultivo: desarrollo del microtalo postrado. a y b. Microtalo postrado originado de esporas (flecha negra) producidos en microtalo globoso. **c y d.** Microtalo postrado maduro en latencia. **e.** Gametangio plurilocular del microtalo postrado en régimen DL. **f.** Liberación de gametas (flecha negra). *Barras escalas: a, b, e, f = 10 μ m; c = 20 μ m.; d = 30 μ m. MO: a, b, c, e, f. MEB: d.*

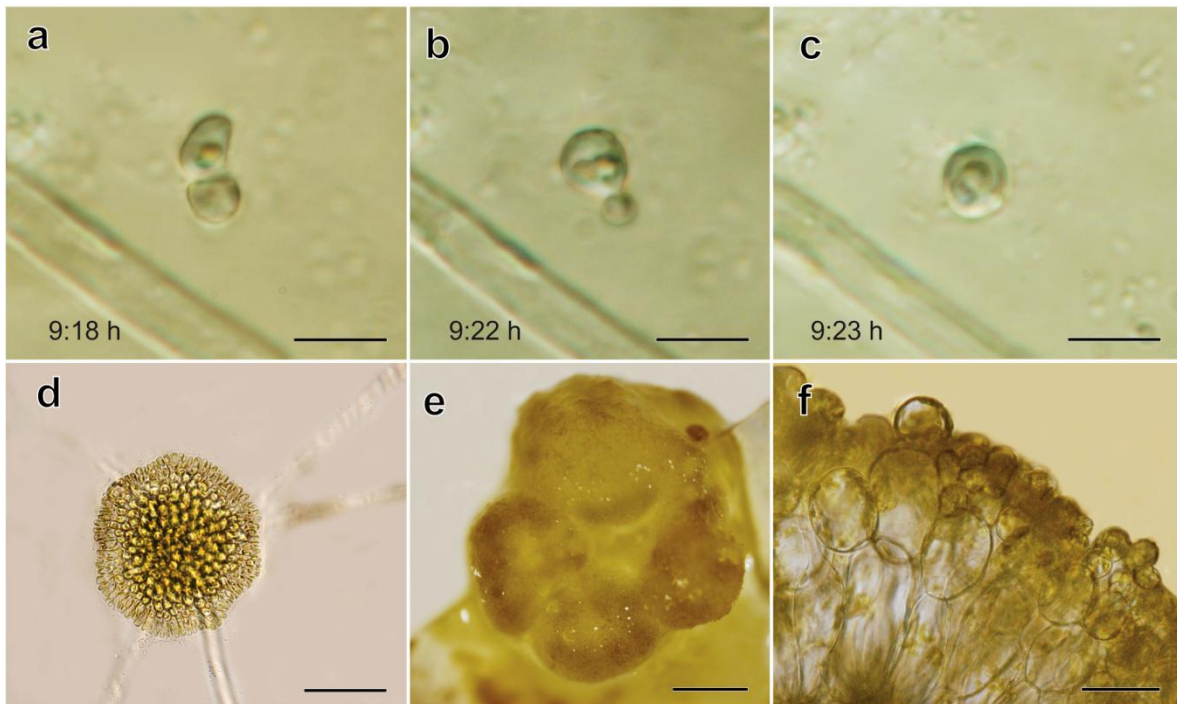


Figura 8. Ciclo de vida de *Leathesia marina* en cultivo: fecundación y desarrollo del macrotalo. a-c. Singamia. Secuencia de la misma. **d y e.** Macrotalos jóvenes nacidos después de la fusión de gametos. **f.** Sección transversal de un macrotalo joven. *Barras escalas:* **a, b y c** = 5 μ m; **d** = 20 μ m; **e** = 3 mm; *MO:* **a, b, c, e y f.**

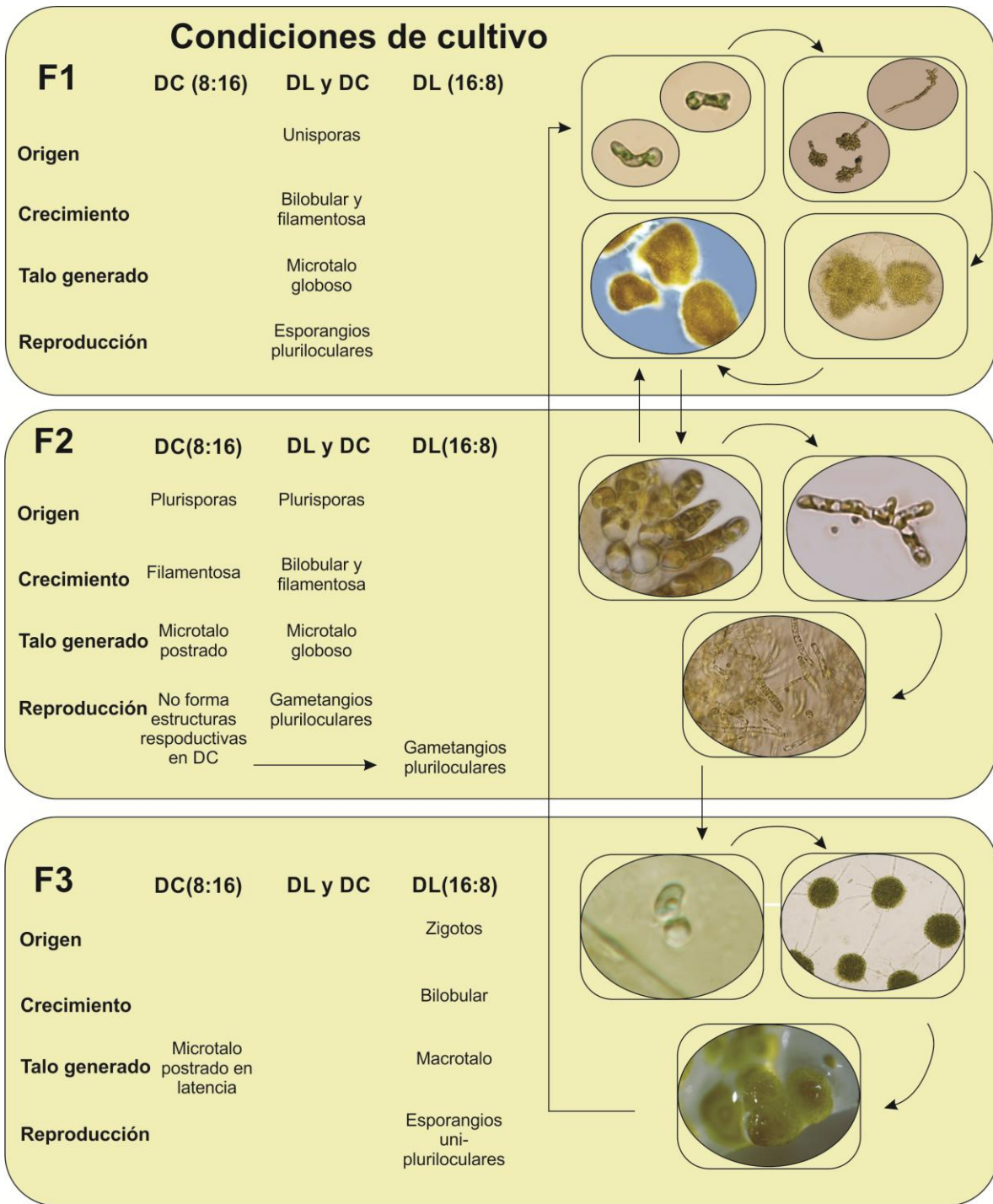


Figura 9. Ciclo de vida de *L. marina* bajo condiciones de Día Corto (DC) y Día largo (DL) mostrando tipo de germinación, talo generado y reproducción.

3.7. Ploidía de las distintas fases en talos adultos

La citometría de flujo se utilizó para analizar la ploidía en estadios adultos, comparando las diferentes morfologías que conforman el ciclo de vida de *L. marina*. En un histograma de ADN típico, un pico representará células en la fase G1 del ciclo celular, seguido de una meseta o fase S y un segundo pico, con el doble del valor representará células en estadios posteriores a la replicación del ADN en la fase G2/M. Los individuos diploides fueron representados por el esporófito, cuyas células en G1 producen grandes picos 2C y cuyas células en G2 producen picos 4C más pequeños (Fig. 10 a). El microtalo globoso sexualmente maduro presentó núcleos 1C y 2C (Fig. 10 b). Sin embargo, las muestras de microtalos postradas en condiciones de latencia presentaron solo núcleos en la fase G1 con picos 1C, sin división celular (Fig. 10 c).

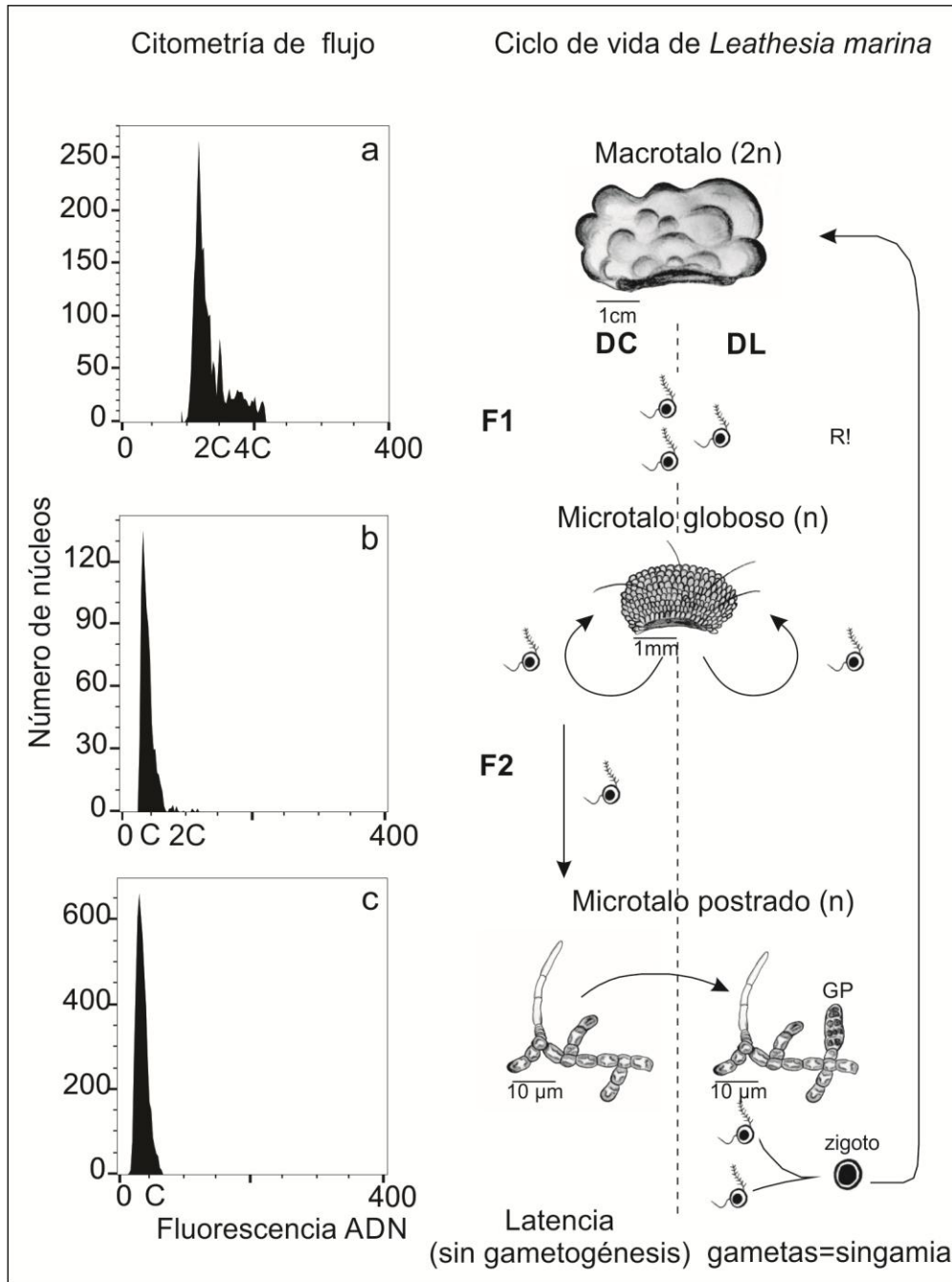


Figura 10. Contenido de ADN nuclear en talos adultos de *Leathesia marina* estimada con citometría de flujo. a. Población de esporófitos (macrotalo) que contiene núcleos 2C y 4C. **b.** Población de esporófitos haploides (microtalo globoso) que contienen principalmente núcleos 1C y una pequeña cantidad de núcleos 2C. **c.** Poblaciones de gametófitos del microtalo postrado en latencia con solo núcleos 1C. *Referencias:* DC: día corto; DL: día largo; R!: meiosis; F1: primera generación; F2: segunda generación; GP: gametangio plurilocular.

3.8. Ploidía de las diferentes morfologías del ciclo de vida de *L. marina*

La tinción con DAPI permitió distinguir los cambios en el nivel de ploidía durante las diferentes fases que componen el ciclo de vida de *L. marina*.

Las esporas presentaron un área de sección transversal nuclear fluorescente de $1,26 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ (media \pm EE) (Fig. 11 a), formaron microtalo globoso, cuyo área nuclear fue de $1,83 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ (Fig. 11 b). En el régimen DC, el microtalo globoso originó un nuevo microtalo postrado filamentosos uniseriados con un área fluorescente nuclear de $1,78 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ (Fig. 11 c). En ambas morfologías de microtalo no se observaron diferencias significativas de las áreas nucleares ($F_{(1; 200)} = 0,606$, $P = 0,43$). Las gametas presentaron áreas nucleares fluorescentes de $0,9 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ (Fig.11 d) y los cigotos núcleos (Fig.11 e) con un área de sección transversal de $3,6 \pm 0,12 \mu\text{m}^2$ significativamente mayor que el área de los gametos ($F_{(1; 76)} = 792,4$; $P < 0,001$). Los cigotos luego desarrollaron talos jóvenes con áreas transversales nucleares de $3,45 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ (media \pm EE) que finalmente crecieron y se transformaron en nuevos macrotalos $2n$ (Fig. 11 f).

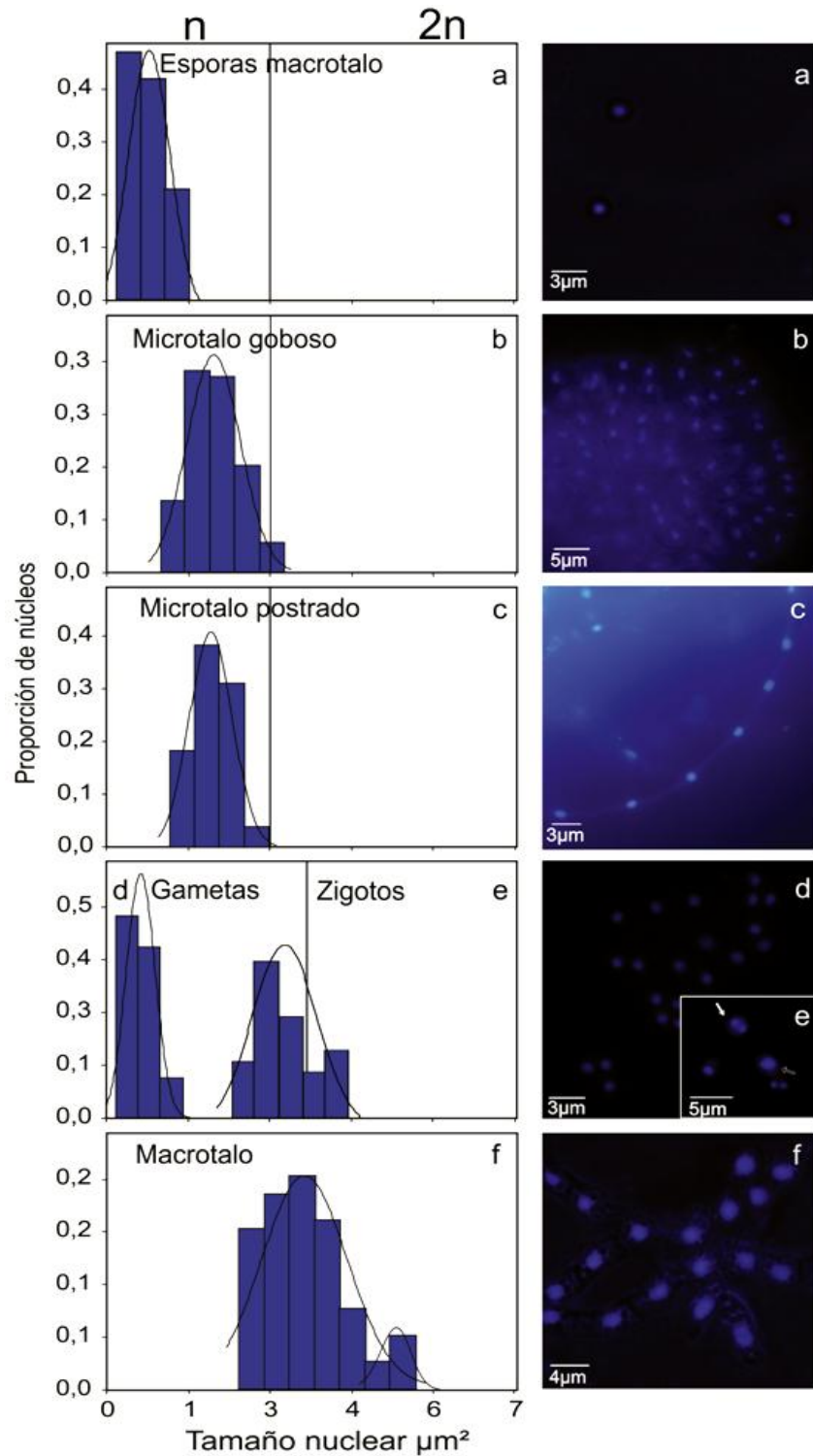


Figura 11. Cambios de ploidía de diferentes fases del ciclo de vida de *Leathesia marina* registrados por fluorescencia de áreas transversales nucleares. Los histogramas muestran las distribuciones del contenido de ADN, y picos (n) y (2n). **a.** Esporas de macrotalo. **b.** Microtalo globoso. **c.** Microtalo postrado. **d.** Gametas libres antes de la fertilización. **e.** Zigotos en fusión nuclear. **f.** Macrotalos jóvenes.

Discusión

Inagaki (1958) clasificó a *Leathesia* en dos secciones: sección *Leathesia* y sección *Primariae*. La sección *Leathesia* difiere de *Primariae* sobre la base de la presencia de células medulares irregulares y anastomosis en la región inferior y media, así como una disposición dicotómica en la parte superior con células redondeadas o alargadas (Fritsch 1945, Fletcher 1987, Womersley 1987). Por el contrario, la sección *Primariae*, representada por *Leathesia primaria* Takamatsu, presentan largas células elípticas que se adhieren fuertemente entre si y carecen de anastomosis, con disposición di- tricotómica (Takamatsu 1939, Inagaki 1958) e incluía a *Leathesia sphaerocephala* Yamada y *Leathesia japonica* Inagaki. Sin embargo, la similitud morfológica entre las dos secciones dificultó la identificación, generándose especies crípticas con morfologías similares o estados crípticos con ciclos de vida heteromórficos.

Estudios filogenéticos y morfológicos en el género *Leathesia* (Tanaka *et al.* 2010) revelaron la existencia de un clado polifilético generando la necesidad de una revisión completa de las especies, dando como resultado el surgimiento de nuevos géneros. Especies que pertenecían a la sección *Primariae*, como *L. sphaerocephala* y *L. japonica*, actualmente se reconocen en nuevos géneros, siendo renombradas como *Phaeophysema sphaerocephala* (Yamada) A. Tanaka, S. Uwai *et* H. Kawai, antes *L. sphaerocephala* y *Vimineoleathesia japonica* (Inagaki) A. Tanaka, S. Uwai *et* H. Kawai, antes *L. japonica*.

L. marina, la especie estudiada en esta tesis, es reconocida como sinónimo de *Leathesia difformis* Areschoug (1847), aunque por el Principio de Prioridad corresponde llamarla *Leathesia marina* (Lyngbye) Decaisne (1842).

Los datos moleculares analizados permitieron confirmar la identidad de la especie tanto en la etapa macroscópica como microscópica y la similitud genética de ambas poblaciones estudiadas. Además, los análisis filogenéticos también revelaron que *L. marina* de la Patagonia están estrechamente relacionados con *L. marina* de Nueva Zelanda, con solo un 0,3% de divergencia.

Muchos organismos con ciclos de vida heteromórficos muestran marcadas diferencias morfológicas, fisiológicas y ecológicas entre las diferentes fases (Couceiro *et al.* 2015).

Durante el presente estudio el ciclo de vida de *L. marina* de Las Grutas y Puerto Madryn exhibió las mismas formas de desarrollo y morfologías revelando la presencia de tres morfologías diferentes que involucran un macrotalo diploide y dos microtalos haploides. Otros autores también informaron algunas de estas morfologías. Por un lado, Kylin (1933a) y Cole *et al.* (1968) detectaron un microtalo globoso y su regeneración durante varias generaciones en cultivo. También Dangeard (1965) encontró un microtalo postrado. Sin embargo, el ciclo de vida completo, no se había informado hasta la fecha y no existían referencias con respecto a la fusión de gametos, ni regeneración de los macrotalos.

La amplia variedad de morfologías, durante el ciclo de vida de muchas algas pardas, generalmente solo pueden detectarse en condiciones ambientales específicas y en algunos casos extremas (Cock *et al.* 2014, Luthringer *et al.* 2014).

Este estudio demostró que, bajo las condiciones de cultivo DL y DC, el ciclo de vida de *L. marina* se vio afectado por la temperatura y el fotoperíodo, y que las generaciones haploides prevalecieron sobre las diploides. Según Klinger (1993), esta prevalencia de la fase haploide no debe interpretarse como una ventaja evolutiva, ya que en muchos taxones los ciclos de vida haplo-diploide son una estrategia evolutivamente estable, con los beneficios genéticos de ambas fases. La ventaja genética de la fase diploide radica en que, casi todas las mutaciones deletéreas dentro del genoma están enmascaradas, porque la gran mayoría de las mutaciones que afectan el “fitness” son principalmente recesivas (Crow y Kimura 1965). Sin embargo, las mutaciones se eliminan de manera más eficiente en los organismos haploides, por lo tanto, las poblaciones haploides tienden a tener menos mutaciones y tienen una aptitud más alta que las poblaciones diploides (Otto y Marks 1996, Mable y Otto 1998).

La presencia de dos microtalos con diferentes estrategias reproductivas brinda a esta especie la posibilidad de explotar una gama más amplia de condiciones ambientales. Algunos autores sugirieron la hipótesis, que explica que la estabilidad evolutiva de los ciclos de vida haplo-diploides se debe a la capacidad, de las diferentes fases, para adaptarse a diferentes nichos, permitiendo que estas especies sobrevivan en un entorno fluctuante. Aquí, las diferencias entre nichos se entiende en un sentido amplio y pueden incluir factores abióticos (por ejemplo, estacionales) y bióticos (por ejemplo, patógenos y competidores) (Lubchenco y Cubit 1980, Zupan y West 1990, Cunningham *et al.* 1993).

El microtalo globoso (esporofito haploide) de *L. marina* produjo estructuras fértiles a los 20 - 30 días, y originó asexualmente un microtalo postrado solo bajo

condiciones invernales, aunque, en condiciones de verano generó también asexualmente la regeneración de un nuevo microtalo globoso. Este fenómeno también fue observado en *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye, donde meiósporas se convierten en esporofitos en lugar de gametófitos dando origen a esporofitos haploides, que su vez repiten esta fase durante sucesivas generaciones (Müller y Schmidt 1988, Peters *et al.* 2004, Coelho *et al.* 2011). A su vez, por la capacidad del microtalo globoso de subsistir a condiciones de verano e invierno, se lo podría considerar como una fase transicional, que se reproduce constantemente hasta que las condiciones sean las adecuadas para formar el microtalo postrado.

El microtalo postrado, por otro lado se puede mantener en latencia por períodos superiores a un año, aunque produce gametogénesis en condiciones de verano. El mismo comportamiento también fue observado en otras algas pardas como *Glossophora kunthii* (C. Agardh) J. Agardh y *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux, donde las bajas temperaturas inhiben la formación de estructuras reproductivas (Hoffmann y Malbrán 1989, Hwang *et al.* 2005). Los microtalos postrados podrían proporcionar una mayor protección y estabilidad en el medio ambiente (Cunningham *et al.* 1993) y le brinda a la especie la capacidad de sobrevivir largos períodos desfavorables hasta que mejoren las condiciones ambientales. Además, Carney y Edwards (2006) han señalado que las algas marinas que entran en latencia en forma de gametofitos haploides, en lugar de esporófitos diploides, una vez que reanuden su desarrollo, es posible que se reproduzcan con individuos no emparentados que se acumulen con el tiempo, disminuyendo así las posibilidades de autofecundación. De esta manera esta fase

es crucial para la persistencia de las poblaciones que habitan en entornos temporalmente variables.

A su vez, la fase diploide que aparece en las condiciones de verano nunca deja de estar presente en el ciclo de vida de *L. marina*, lo que brinda ventajas genéticas de tener dos conjuntos de cromosomas homólogos y una tasa alta de mutaciones beneficiosas (Crow y Kimura 1965).

Estas características en el ciclo de vida de *L. marina*, le permiten una buena adaptación al clima extremo de la Patagonia cuyos fuertes vientos secos, combinados con poca lluvia, le otorgan a la zona intermareal patagónica uno de los lugares de mayor estrés por desecación registrado para las comunidades costeras rocosas (Bertness *et al.* 2006). En condiciones naturales se evidenció un solapamiento temporal entre las fases microscópica y macroscópica en los estudios demográficos realizados de esta especie en Puerto Madryn (Poza *et al.* 2017). Durante esos meses también se observó un mayor rendimiento reproductivo de la fase macroscópica, con gran aumento en el número de esporangios y liberación de esporas. Este hecho coincidió con los meses donde se encontraron los microtalos en la naturaleza y la llegada de los meses más fríos, cuando el macrotalo desaparece. Una condición importante para que las etapas microscópicas de macroalgas sobrevivan cuando las formas macroscópicas están ausentes es que las etapas microscópicas tienden a ser más tolerantes a las condiciones desfavorables de luz, temperatura y nutrientes como ya lo señalaran Chapman y Burrows (1971), Wiencke y tom Dieck (1989, 1990); Hoffmann y Santelices (1991). Sin embargo, estas etapas son muy sensibles a otros factores

como la sedimentación (Devinny y Volse 1978) y el pastoreo de invertebrados (Dean *et al.* 1988, Leonard 1994).

La observación y el análisis del desarrollo de las etapas del ciclo de vida de *L. marina* en diferentes condiciones de cultivo, realizados en este estudio, resultó ser el enfoque más adecuado para dilucidar su ciclo de vida y al haber sido combinado con técnicas específicas para la determinación de la ploidía proporcionó la posibilidad de lograr un entendimiento integral del mismo.

L. marina es un buen ejemplo de organismo con un ciclo de vida heteromórfico, con diferentes morfologías que implican estados transitorios (microtalo globoso) y en reposo (microtalo postrado). Estas características permiten a la especie sobrevivir largos períodos desfavorables y recuperarse después de graves perturbaciones. Por ello, la comprensión de los ciclos de vida y el desarrollo de los estados microscópicos de las macroalgas es fundamental para la protección de las poblaciones naturales.

CAPÍTULO II

***Leathesia marina*: Fenología y dinámica poblacional**

1. Introducción

En los ambientes marinos, sobre todo en la zona intermareal rocosa, las algas se encuentran sometidas a presiones ejercidas tanto por el entorno físico, como por la competencia con otras algas y la depredación (Littler y Littler 1980, Lubchenco y Cubitt 1980). Estas presiones generan una amplia variedad de adaptaciones, que influyen en la evolución de los ciclos de vida, en los patrones fenológicos y morfologías de las algas, la dinámica poblacional y las probabilidades de supervivencia (Istock 1967). En estos ambientes es común el desarrollo de fases de vida alternativas, como una adaptación crucial para sobrevivir en ambientes variables y para establecer patrones espaciales en fases adultas (Swanson y Druehl 2000).

El surgimiento y la evolución de los ciclo de vida heteromórficos comprende el desarrollo secuencial de distintas fases, en una misma especie de alga, con marcadas diferencias en la morfología (Littler y Littler 1980). Las algas marinas con estos ciclos de vida muestran un alto grado de independencia y diferenciación entre las diferentes fases. Cada fase tiene limitaciones ecológicas y evolutivas únicas, y debe ser capaz de sobrevivir y reproducirse (Schiel y Foster 2006). Una

ventaja del ciclo de vida heteromórfico es que las dos fases pueden explotar nichos ecológicos, que difieren en temperatura, fotoperiodo, competidores o presiones por herbivoría (Lubchenco y Cubitt 1980, Zupan y West 1990, Cunningham *et al.* 1993).

La diferenciación espacio-temporal entre las dos generaciones fue estudiada por Hughes y Otto (1999), utilizando el modelo de competencia Lotka-Volterra entre especies (Lotka 1925, Volterra 1926). Estos autores determinaron que la diferenciación de nichos entre las dos fases era necesaria para prevenir la competencia de una fase con la otra, evitando de ese modo la pérdida de una de las dos generaciones.

En muchas especies de macroalgas marinas, una etapa del ciclo de vida es más tolerante a condiciones ambientales desfavorables (Couceiro *et al.* 2015). Las algas rojas y las pardas a menudo muestran diferencias ecológicas entre una etapa de reposo resistente al estrés biótico o abiótico y una etapa efímera de crecimiento rápido, que aparece cuando las condiciones estacionales son adecuadas (Carney y Edwards 2006, Vergés *et al.* 2008).

La capacidad de las algas para sobrevivir largos períodos en condiciones ambientales desfavorables y para recuperarse tras perturbaciones graves, es crucial para la persistencia de las poblaciones en estos entornos temporalmente variables (Carney y Edwards 2006).

Muchas especies de algas dependen de las etapas microscópicas para sobrevivir períodos de estrés ambiental y producen nuevas etapas macroscópicas cuando las condiciones mejoran (Hoffmann y Santelices 1991, Edwards 2000). Las etapas microscópicas tienden a ser más tolerantes a condiciones de luz,

temperatura y nutrientes desfavorables (Chapman y Burrows 1971, Nakahara 1984, Wiencke y tom Dieck 1989, 1990). En las algas pardas con dinámica poblacional anual, el desarrollo prolongado de las etapas microscópicas es crítico, porque los talos macroscópicos pueden estar ausentes durante varios meses (McConnico y Foster 2005, Schiel y Foster 2006). Estas formas microscópicas representadas por el gametófito, presentan una vida útil más larga que contrasta con las fases macroscópicas, esporofíticas con una vida útil relativamente efímera. Por su parte el esporofito se caracteriza por presentar una mortalidad elevada que compensa con una gran producción de esporas; esto permite colonizar rápidamente diferentes sustratos dentro de un ambiente variable (De Wreede y Klinger 1988).

Leathesia marina es una macroalga cosmopolita que se encuentra en las comunidades rocosas intermareales de climas templados a fríos. En el Atlántico Norte se está presente en las costas de Isla de Terranova en Canadá Cáliz en España, Gran Bretaña, Portugal, en Atlántico Sur en Argentina y en Sudáfrica. En el Pacífico Norte en Japón, Estados Unidos y Canadá y en el Pacífico Sur en Australia, Nueva Zelanda, Tasmania, Chile. Aunque esta especie no ha sido citada en aguas tropicales y subtropicales, como así tampoco en la Antártida. En nuestro país fue citada para Tierra del Fuego y la Patagonia como *L. difformis* (Skottsberg 1921, Quartino y Boraso de Zaixso 1996, Feldman *et al.* 1999).

Esta especie tiene un ciclo de vida heteromórfico, alternando entre una fase microscópica, gametofítica y una fase esporofítica macroscópica (Sauvageau 1925, Kylin 1933a, Dangeard 1965, Peters 1987). Hasta la fecha, pocos estudios han relacionado las características y dinámica del ciclo de vida de *L. marina* con

los patrones fenológicos y morfológicos (Chapman y Goudey 1983, Quartino y Boraso de Zaixso 1996). Por lo tanto, para este capítulo el objetivo formulado fue:

*Analizar temporalmente las variaciones morfológicas y reproductivas del esporófito y gametófito de *Leathesia marina* y su dinámica poblacional en relación a las variaciones ambientales.*

2. Materiales y métodos

2.1. Área de estudio

El muestreo se llevó a cabo en Punta Este (42°46'32.57" S, 62°02'59'23.49" O) en la costa este del Golfo Nuevo, Chubut, de diciembre de 2013 a noviembre de 2014 (Fig. 12).

La precipitación media anual durante el período estudiado fue de 239 mm y la temperatura media anual de 13,4°C. Los vientos del oeste tuvieron una velocidad media anual de 16,6 km h⁻¹ y alcanzaron 90 km h⁻¹. Estos vientos fuertes y secos, combinados con pocas precipitaciones, hacen de la zona intermareal patagónica un lugar con alto estrés por desecación para las comunidades costeras rocosas (Bertness *et al.* 2006).

La temperatura del agua de mar varió entre 17,5°C en verano y 9,8°C en invierno, con un promedio anual de 13,4°C. Las horas de luz estuvieron dentro de un rango de 15 h en verano y 9 h en invierno. La radiación solar fue máxima en verano (8342 W m⁻²) y mínima en invierno (1584 W m⁻²). El régimen de mareas es semidiurno, con una amplitud máxima de 5,86 m y un promedio anual de 4,13 m (SHN 2014). En este estudio, los parámetros ambientales como la temperatura del agua de mar, la duración del día y la radiación solar, fueron proporcionados por el Estación Meteorológica Automática del Laboratorio de Climatología del CENPAT-CONICET.

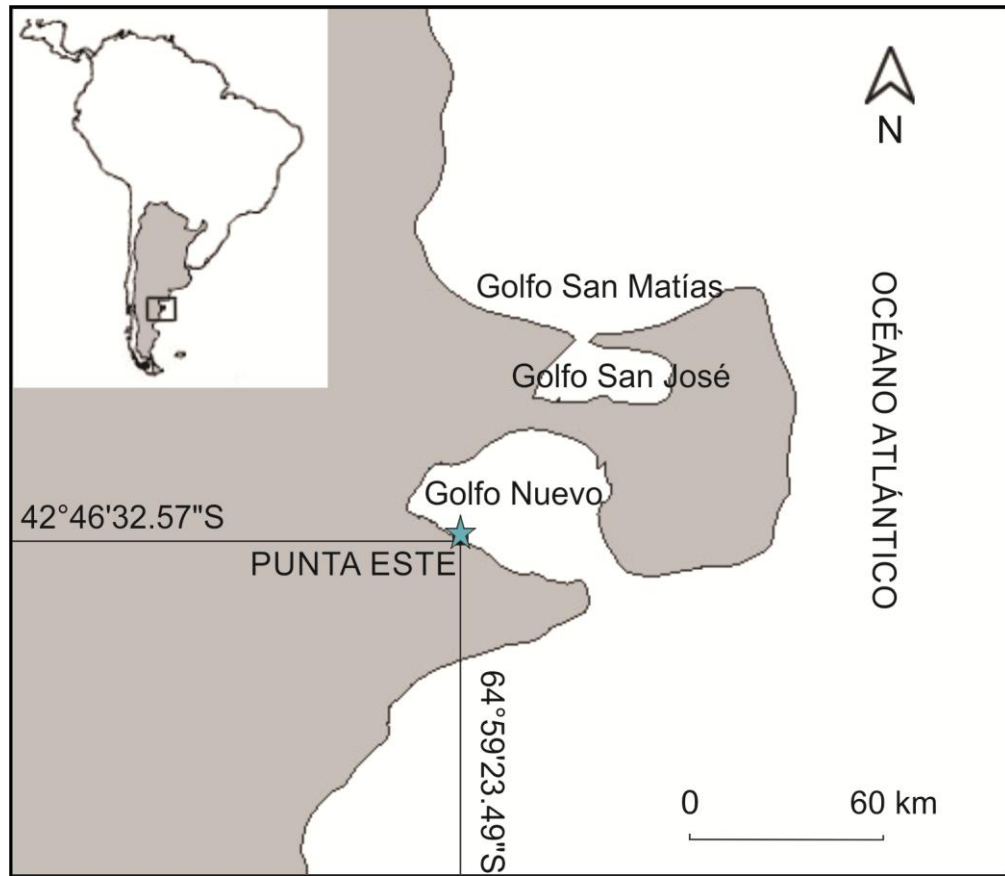


Figura 12. Mapa de sitio de muestreo. Localización y vistas del área de estudio ubicada en Punta Este, Golfo Nuevo, Chubut.

2.2. Dinámica de la población de *L. marina*

Para evaluar la dinámica de la población se trabajó con análisis fotográfico de parcelas, sin eliminación de los macrotalos. Para ello, se colocaron aleatoriamente, en la zona intermareal baja, seis cuadrantes fijos (25 cm x 25 cm) y se fotografiaron cada 15 días durante un año. Se determinaron diferentes parámetros demográficos como: densidad, cobertura, supervivencia, mortalidad de los macrotalos. La densidad y cobertura del macrotalo se evaluó en cada fotografía de los cuadrantes utilizando el software de procesamiento de imágenes *ImageJ* 1.46v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EEUU).

2.3. Preparación de la tabla de vida y supervivencia

Los datos de supervivencia se usaron para elaborar una tabla de vida de cohortes (Deevey 1947), la cual se construyó realizando un seguimiento de los individuos vivos durante 120 días, a intervalos de 15 días, desde enero hasta abril. Los meses restantes no se consideraron, ya que *L. marina* no estuvo presente en la naturaleza como macrotalo durante ese tiempo.

A partir del conteo de los individuos se obtuvo una tasa teórica de supervivencia (l_x) para intervalos (x) periódicos de 15 días. A partir de este valor, se obtuvieron los restantes valores que constituyeron la tabla de vida y cuyo significado y forma de cálculo fue el siguiente:

- n_x : Número de supervivientes al inicio del intervalo de edad x . Hemos considerado que en el momento inicial ($x = 0$) correspondiente a enero.
- l_x : Tasa teórica de supervivencia. Es la proporción de individuos que sobreviven al inicio del intervalo x .
- d_x : Número de individuos que murieron entre el intervalo x y el siguiente, es decir, entre x y $x + 15$.

$$d_x = n_x - n_{x+15}$$

- q_x : índice de mortalidad durante el intervalo x y $x + 15$.

$$q_x = d_x/n_x$$

- L_x : Número promedio de individuos vivos, durante el intervalo de edad que va desde x a $x + 15$

$$L_x = \frac{(n_x + n_{x+15})}{2}$$

- T_x : Expresa el número de individuos por unidades de tiempo. Es decir, número de individuos \times 15 días.

$$T_x = \sum_x L_x$$

- e_x : Esperanza de vida media adicional para los individuos que están vivos al comienzo de edad x .

$$e_x = T_x/n_x$$

2.4. Abundancia de microtalos

Considerando que los microtalos de *L. marina* crecieron asociadas al macrotalo, su abundancia fue calculada determinado la presencia o ausencia en un área de 3 mm x 3 mm sobre 20 macrotalos recolectados al azar cada mes.

2.5. Morfología y reproducción de *Leathesia marina*

Para describir las estructuras vegetativa y reproductiva de las dos fases de *L. marina*, 20 macrotalos y microtalos asociados fueron recolectados aleatoriamente cada mes. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico durante la noche a 5°C. Al día siguiente, cada muestra se lavó cuidadosamente con agua de mar para quitar la arena adherida y luego se fijaron en solución FAA (Formaldehído, Ácido acético glacial y Etanol-proporción 8:1:1).

En cada macrotalo se registraron tres variables morfológicas vegetativas: diámetro máximo (cm), altura máxima (cm) y peso escurrido (g). De cada uno de ellos, pequeñas secciones de 3 mm x 3 mm fueron seleccionados al azar para el posterior análisis mediante microscopía óptica de estructuras vegetativas y reproductivas.

Las **estructuras vegetativas internas** consideradas fueron longitud y ancho de las células subcorticales y medulares (primer, segundo y tercer orden), longitud y ancho de los filamentos asimiladores y ancho de los pelos.

Las **estructuras reproductivas** fueron: número, longitud (μm) y ancho de esporangios uniloculares y pluriloculares (μm); y número de lóculos en esporangios pluriloculares biseriados y uniseriados.

En los microtalos, las variables medidas fueron: longitud (μm) y ancho de las células de los filamentos prostrados (μm); número, longitud (μm) y ancho de gametangios pluriloculares (μm) y número de lóculos.

Además se estimó el **estado reproductivo** de macrotalos y microtalos en 20 especímenes por mes. Para este propósito, se seleccionaron al azar cinco transectas de 125 μm por talo (total de 625 μm por talo), donde se cuantificaron los esporangios uniloculares y pluriloculares en macrotalos y gametangios en los microtalos usando microscopía óptica con 400x de aumento.

2.6. Identificación del microtalo

Para confirmar la identidad de los microtalos asociados con el macrotalo de *L. marina*, se realizaron cultivos *in vitro*. Para este propósito, se seccionaron fragmentos reproductivos de microtalos y se enjuagaron cuidadosamente con agua de mar estéril. Los fragmentos se colocaron en tubos de ensayo con un cubreobjetos en el fondo, conteniendo agua de mar enriquecida con medio PES (Provasoli 1968). El cultivo fue realizado a 20°C con un régimen de luz/oscuridad de 16:8 h para simular las condiciones del verano y una intensidad de luz de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes blancos fríos, la cual fue monitoreada con un medidor de flujo cuántico (Apogee MQ-200, Logan, Utah, EEUU).

Bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se observó y monitoreó la liberación y fusión de gametas y posterior crecimiento de los cigotos adheridos a los cubreobjetos. Los cultivos fueron observados hasta la formación de la fase esporofítica.

2.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para los estudios con microscopía electrónica de barrido (MEB), se fijaron fragmentos de macro y microtalos en glutaraldehído al 2,5% en buffer cacodilato de sodio 0,01 M (pH 7,2) a 5°C durante 2 h y se procedió con la misma la metodología explicada en el capítulo 1.

2.8. Análisis de los datos

Cada conjunto de datos se examinó para determinar la normalidad usando la test de Shapiro-Wilk y probar la homocedasticidad de la varianza usando el test de Barlett. Para evaluar las diferencias en la población de *L. marina*, se examinaron los parámetros vegetativos y reproductivos de los macrotalos y microtalos usando análisis de varianza (ANOVA) seguido de comparaciones múltiples utilizando el test de diferencia honestamente significativa de Tukey (HSD de sus siglas en inglés).

La curva de supervivencia se ajustó usando el modelo de distribución Weibull (1951):

$$F(x; k; \lambda) = 1 - e^{-(x/\lambda)^k}$$

Las principales ventajas de este modelo es su simplicidad y la capacidad de describir las curvas de supervivencia cóncava hacia abajo ($k < 1$) y convexo hacia arriba ($k > 1$), indicando en el primer caso ($k < 1$) una fuerte mortalidad temprana (Wilson 1994).

Las relaciones entre las variables poblacionales (densidad y cobertura), vegetativas (peso, altura y diámetro mayor) y reproductivas (número de esporangios/ gametangios) de macrotalos y microtalos de *L. marina* con las variables ambientales: la temperatura del agua de mar, el fotoperiodo y la radiación solar se analizaron usando el análisis del componente principal (PCA de su sigla en inglés) y los coeficientes de correlación de Spearman con previa estandarización de los datos. Se utilizaron los programas estadísticos R Studio (Team 2016) y PRIMER (rutinas de Plymouth en investigación ecológica multivariante) (Clarke y Warwick 2001) con un nivel de significancia de 0,05.

3. Resultados

3.1. Fenología del macrotalo de *L. marina*

Los macrotalos de *L. marina* estuvieron presentes desde diciembre de 2013 a abril de 2014 y de septiembre a noviembre de 2014, correspondiendo a las temporadas templadas y cálidas. La población de *L. marina* se desarrolló predominantemente en la zona intermareal inferior. Solo unos pocos talos fueron encontrados en el nivel medio.

La zona intermareal inferior estuvo además colonizada por invertebrados, incluyendo *Brachidontes rodriguezii* y *Perumytilus purpuratus*, y se asoció con una comunidad de macroalgas integrada por *Corallina officinalis*, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, *Myriogloea major* Asensi, *Ralfsia verrucosa* (Areschoug) Areschoug y ocasionalmente *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg. *L. marina* en muchas ocasiones se la encontró como epífita sobre césped de *C. officinalis* (Figs. 13 a, b).

Los macrotalos jóvenes de *L. marina* fueron globosos y posteriormente se expanden horizontalmente para convertirse en un talo rugoso (Fig. 14 a).

El diámetro máximo, la altura y el peso fresco escurrido de los talos presentaron diferencias significativas al comparar los meses (Tabla 1). El diámetro máximo varió entre $2,93 \pm 0,9$ cm a $1,7 \pm 0,4$ cm (media \pm DE). La altura de los talos varió entre $1,2 \pm 0,4$ cm y $0,8 \pm 0,2$ cm y el peso entre $2,1 \pm 2$ y $0,3 \pm 0,03$ g. Estas tres

variables morfológicas vegetativas presentaron valores mínimos en septiembre y máximos durante noviembre, enero y febrero (Tabla 1).

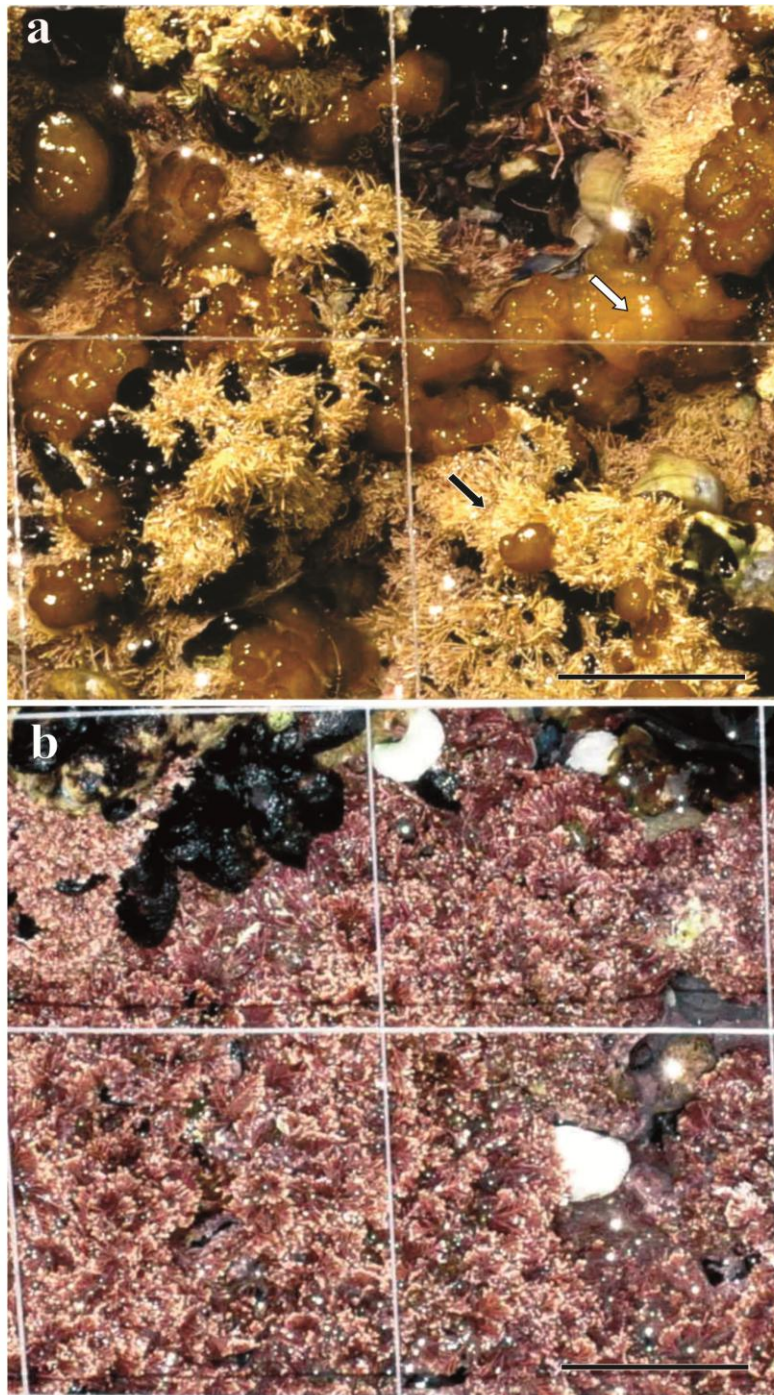


Figura 13. Macrotalo de *Leathesia marina* en la naturaleza. a. Macrotalo globoso de *L. marina* (flecha blanca) epífito sobre *Corallina officinalis* (flecha negra). Nótese macrotalos jóvenes de forma globosa (fotografía tomada en enero de 2014). **b.** Mismo cuadrante fotografiado en junio de 2014 mostrando césped de *C. officinalis*. Barras de escala = 5 cm.

Tabla 1. Tabla de ANOVA mostrando **variaciones de las estructuras vegetativas y reproductivas de macro y microtalo *Leathesia marina*** Diferencias significativas obtenidas ($\alpha < 0.05$) por test HSD fueron indicadas con letras. *Referencias:* E (enero), F (febrero), M (marzo), A (abril), S (septiembre), O (octubre), N (noviembre), D (diciembre). *df:* grados de libertad, *CM:* cuadrados medios, *F:* estadístico, *P:* probabilidad.

Parámetro		df	CM	F	P	HSD
En macrotalo						
Diámetro máximo (cm)		7	3,976	8,37	<0,0001	a) S, ab) D-M-A, ac) N, c) E-F
Altura del talo (cm)		7	0,338	2,65	0,014	a) S, ab) D-O, ac) E-M-A-N, c) F
Peso escurrido (g)		7	6,953	6,03	<0,0001	a) S, ab) A, b) D-M-O, bc) E, c) F-N
Células medulares: 1° orden	Largo	7	0,110	3,95	<0,0001	ab)D-M, ac)F-S, b) A, bc) E-O, c) N
	Ancho	7	0,032	0,78	0,60	-
Células medulares: 2° orden	Largo	7	0,320	5,70	<0,0001	a) D, ab) E-A, ac) S, bc) F-M-O, c) N
	Ancho	7	0,061	1,35	0,23	-
Células medulares: 3° orden	Largo	7	0,750	6,02	<0,0001	a) D, ab) E, ac) S-O, bc) A, c) F-M-N
	Ancho	7	0,350	5,37	<0,0001	a) D, ab) S, ac) M-O, bc) E-A-N, c) F
Células subcorticales	Largo	7	0,056	4,70	<0,0001	a) M-A; ab) D-S, ac) O-N, bc) E, c) F
	Ancho	7	0,003	0,88	0,52	-
Filamentos asimiladores	Largo	7	0,726	9,00	<0,0001	a) D-M-A-O-N, ab) S, b) E-F
	Ancho	7	0,065	11,43	<0,0001	a) A, ab) M, ac) O-S, c) D-E-F-N
Pelos	células (n°)	7	0,982	3,33	0,0026	a) N, ab) D-F-M-S-O, b) E
	Ancho	7	0,006	1,31	0,25	-
Esporangio unilocular	Largo	7	0,927	9,60	<0,0001	a) D-A-O-N, ab) S, ac) M, b) E, bc) F
	Ancho	7	0,050	3,72	0,0011	a) D-A, ab) M-S-O-N, b) E-F
	Número	7	431,370	8,04	<0,0001	a) D, ab) E-F-N, b) M-O, abc) S, c) A
	Largo	7	0,323	3,18	0,0041	a) N, ab) D-E-F-M-S, b) A
	Ancho	7	0,041	1,74	0,11	-
Esporangio plurilocular	Número	7	2147,800	12,90	<0,0001	a) F-M, ab) E, b) D-N, abc) A-S, c) O
	Lóculo uniseriado (n°)	7	16,538	10,32	<0,0001	a) S, ab) N-O, ac) E-F-A c) M
	Lóculo biseriado (n°)	5	1,590	0,40	0,84	-
Cobertura (%)		7	218,650	18,55	<0,0001	a) F-M-A-S-O-N, b) D-E
Abundancia		7	2230,310	15,01	<0,0001	a) A-S-O, ab) M-N, ac) F, c) D-E
En microtalo						
Células filamento postrado	Largo	3	0,04	2,6	0,05	-
	Ancho	3	0,01	2,07	0,11	-
Esporangio plurilocular	Largo	3	0,24	2,11	0,1	-
	Ancho	3	0,041	4,01	0,01	a) M, ab) A-O, b) S
	Número	3	36,09	0,88	0,45	-
	Lóculo biseriado (n°)	3	89,69	9,52	0,0001	a) M-A-O, b) S
Abundancia		3	0,750	4,16	0,008	a) S, ab) M-O, b) A

Se pudieron identificar células medulares de primer, segundo o tercer orden. Estas últimas, fueron irregulares con anastomosis (Figs. 14 b, c) y se ubicaron en las capas interna y media. La longitud y el ancho de las células medulares de tercer orden fueron significativamente diferentes entre los meses analizados (Tabla 1). Las células más largas alcanzaron entre $70 - 72 \pm 8 \mu\text{m}$ y las más cortas $57 \pm 12 \mu\text{m}$. Las más anchas tuvieron $42,2 \pm 6,7 \mu\text{m}$ y las más angostas $38 \pm 7,5 \mu\text{m}$. Para estas dos variables, los valores mínimos se observaron en diciembre y los máximos en febrero, marzo y noviembre.

La capa medular más externa presentó células oblongas de primero y segundo orden dispuestas en forma dicotómica (Fig. 14 d). La longitud de las células medulares de primer y segundo orden varió significativamente entre los meses, aunque el ancho fue similar (Tabla 1). La mayor longitud de las células de primer orden se observó en noviembre ($32 \pm 3 \mu\text{m}$), y las más cortas en diciembre y marzo ($27 \pm 6 \mu\text{m}$). En cuanto a la mayor longitud de las células de segundo orden también fueron observadas en noviembre ($49 \pm 4,7 \mu\text{m}$) y las más pequeñas en diciembre, con $38,2 \pm 6,7 \mu\text{m}$. El ancho de las de primer orden fue de $19,5 \pm 1 \mu\text{m}$ y de segundo orden fue de $30,3 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (Tabla 1).

La morfología de las células que formaron la capa subcortical fueron similares a las células medulares, pero fueron de menor tamaño. La capa subcortical se caracterizó por la presencia de filamentos asimiladores adheridos. Las longitudes de las células subcorticales fueron significativamente diferentes entre los meses, pero el ancho se mantuvo homogéneo (Tabla 1). La mayor longitud se observó en febrero ($17,3 \pm 2,5 \mu\text{m}$) y las más cortas en marzo y abril $13,5 \pm 2 \mu\text{m}$ y $13,3 \pm 1,5 \mu\text{m}$, respectivamente. El ancho de estas células fue $10,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$.

La capa cortical de *L. marina* estuvo formada también por filamentos asimiladores intercalando esporangios uniloculares y pluriloculares (Fig. 14 d). La longitud de los filamentos asimiladores fue significativamente diferente entre los meses; siendo más largos en enero y febrero ($42,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$ y $44,8 \pm 8,7 \mu\text{m}$, respectivamente), y más cortos en los meses restantes ($33,3 \pm 4,2 \mu\text{m}$) (Tabla 1). El ancho varió entre $7,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$ y $10,2 \pm 2,5 \mu\text{m}$; los más anchos fueron observados en diciembre, enero, febrero y noviembre, y los más estrechos en abril (Tabla 1).

Los pelos hialinos en la superficie del macrotalo tuvieron un ancho de $8 \pm 1,5 \mu\text{m}$ (Fig. 14 f, Tabla 1).

Los esporangios pluriloculares nacieron de las células subcorticales, individuales o en triplete (Fig. 14 d y Fig. 15 a). La longitud de los esporangios pluriloculares varió significativamente entre los meses, pero el ancho fue homogéneo (Tabla 1). La mayor longitud se encontró en abril, con $35 \pm 11,5 \mu\text{m}$, y los más cortos en noviembre, con $24,3 \pm 3,5 \mu\text{m}$. El ancho fue constante de $6 \pm 2 \mu\text{m}$. En la mayoría de los talos, los esporangios pluriloculares fueron uniseriados con $5 - 9 \pm 1$ lóculos. Ocasionalmente, se registraron esporangios biseriados, que tenían $12 - 13 \pm 2,1$ lóculos (Fig. 15 a).

Los esporangios uniloculares ovoides y sésiles, crecieron a partir de las células basales de los filamentos de asimilación (Figs. 15 b y c). El tamaño de los mismos cambió con el tiempo (Tabla 1), los esporangios uniloculares más grandes se observaron en enero y febrero y la longitud y el ancho máximos fueron de $35,2 \pm 10,7 \mu\text{m}$ y $16,8 \pm 2,5 \mu\text{m}$, respectivamente. La longitud mínima fue de $20,0 \pm 4,5$

μm , registrada en diciembre, abril, octubre y noviembre, y el ancho mínimo fue de $12,4 \pm 4,7 \mu\text{m}$, registrado en diciembre y abril.

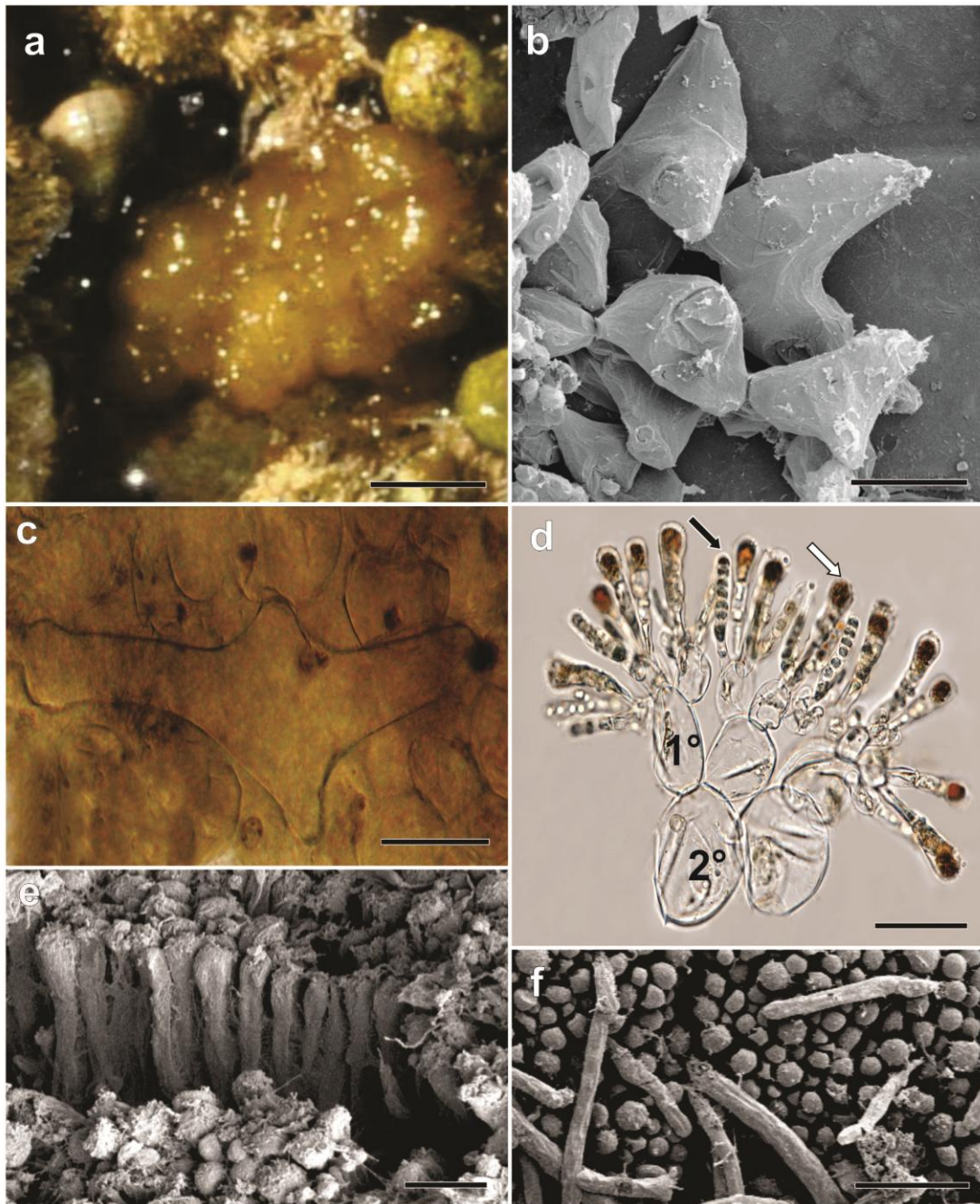


Figura 14. Macrotalo de *Leathesia marina*. a. Macrotalo irregular con numerosos intersticios. b. Obsérvense las células medulares de tercer orden con forma estrellada. c. Detalle de la célula medular de tercer orden en sección transversal. d. Células medulares de primer orden (1°), medulares de segundo orden (2°), filamentos de asimilación (flecha blanca) y esporangios pluriloculares uniseriados (flecha negra) con numerosos lóculos. e. Filamentos asimiladores en vista lateral. f. Detalle de la capa cortical con pelos hialinos. MO: c y d. MEB: b, e y f. Barras escala: a = 1cm, b c y d = 10 μm , e = 20 μm , g = 30 μm ,

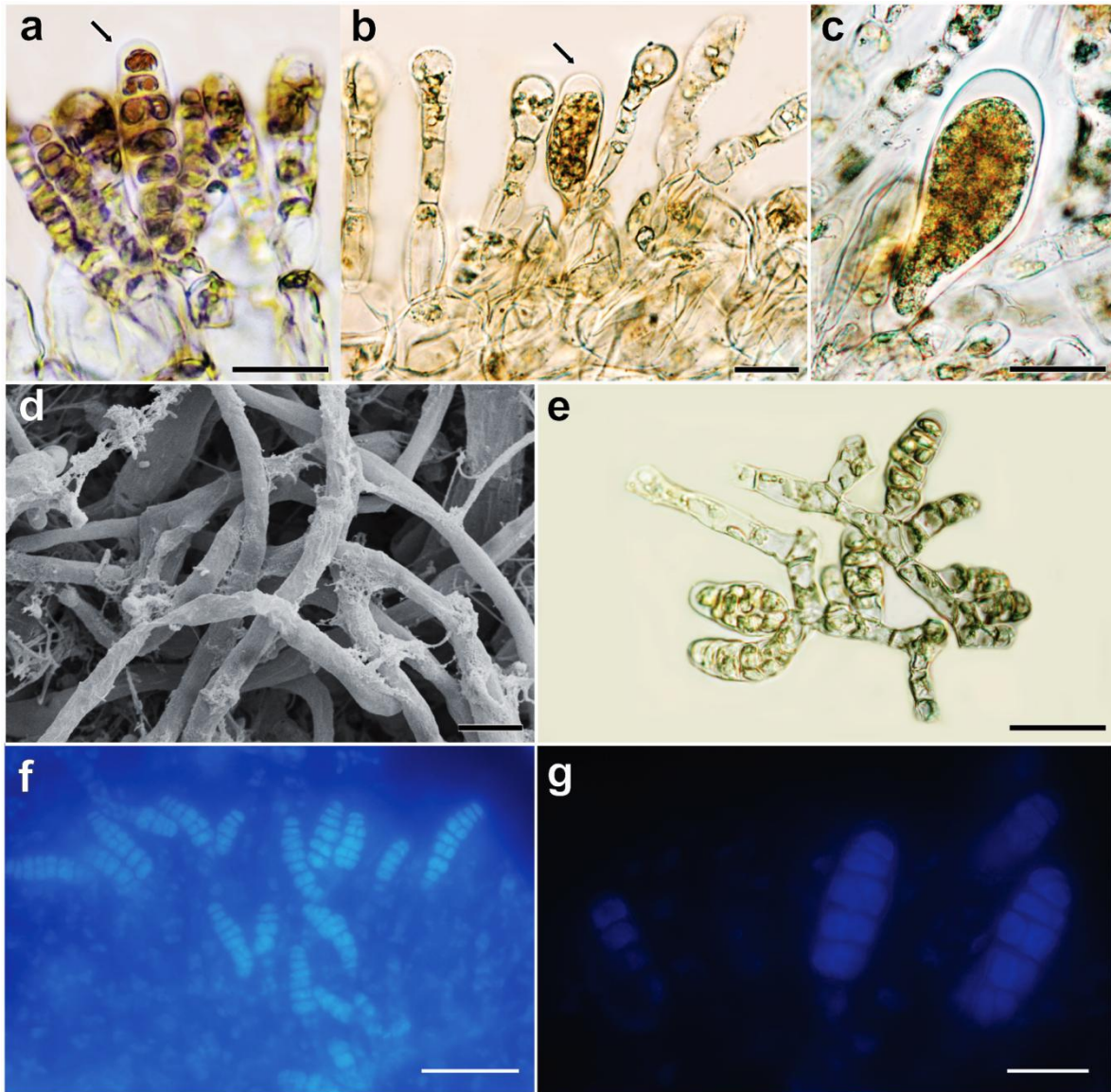


Figura 15. Macro y microtalo de *Leathesia marina*. **a.** Esporangios pluriloculares con dos o más filas de lóculos. **b.** Esporangio unilocular generada en la célula basal del filamento asimilador. **c.** Detalle del esporangio unilocular con numerosas esporas en el interior. **d.** Microtalo: filamentos en condiciones de cultivo. **e – g. Microtalo en la naturaleza.** **e.** Filamento postrado con gametangios pluriloculares con más de una fila de lóculos. **f.** Vista de microtalo reproductivo teñido con DAPI. **g.** Detalle de gametangios pluriloculares. *MO:* **a, b, c, e, f y g.** *MEB:* **d.** *Barras escala:* **c y e, g =10 μ m, a y b = 30 μ m, d = 6 μ m, f = 20 μ m. Tinción DAPI: **f y g.****

3.2. Microtalo de *Leathesia marina*

Los microtalos se encontraron asociados con macrotalos de *L. marina* y estuvieron presentes en la naturaleza en marzo-abril y septiembre-octubre. Estos microtalos estuvieron formados por filamentos postrados de células cilíndricas, con ramas laterales de disposición irregular (Figs. 15 c y d). Estas células tuvieron un único cloroplasto. Las células midieron $14,2 \pm 2,2 \mu\text{m}$ de largo y $4,7 \pm 0,9 \mu\text{m}$ de ancho. Estas dimensiones fueron homogéneas en los diferentes meses de muestreo (Tabla 1).

La longitud de los gametangios fue homogénea en diferentes muestras, alcanzando $16,7 \pm 4,1 \mu\text{m}$, pero hubo diferencias significativas en el ancho, registrándose el mayor ($13,8 \pm 2 \mu\text{m}$) en marzo y el más menor en septiembre ($10,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$). El número de lóculos/gametangio (L/G) varió entre los meses, siendo mayor en septiembre ($17,2 \pm 4 \text{ L/G}$) y menor en marzo, abril y octubre ($11,6 \pm 2 \text{ L/G}$) (Figs. 15 e – g, Tabla 1).

3.3. Dinámica poblacional de *Leathesia marina* en la naturaleza

La cobertura y la densidad de macrotalos de *L. marina* fueron significativamente diferentes entre los meses (Tabla 1). La cobertura y densidad más elevadas se registraron a fines de diciembre y principios de enero, alcanzando $10,7 - 12,0 \pm 8,5 \%$ y $54 - 69 \pm 31$ (media \pm DE) individuos m^{-2} , respectivamente (Figs. 16 a y b). En el resto de los meses, tanto la cobertura como la densidad disminuyeron. La

cobertura de septiembre alcanzó su mínimo ($0,08 \pm 0,1\%$) y la densidad fue de dos individuos m^{-2} en abril, septiembre y octubre (Figs. 16 a y b).

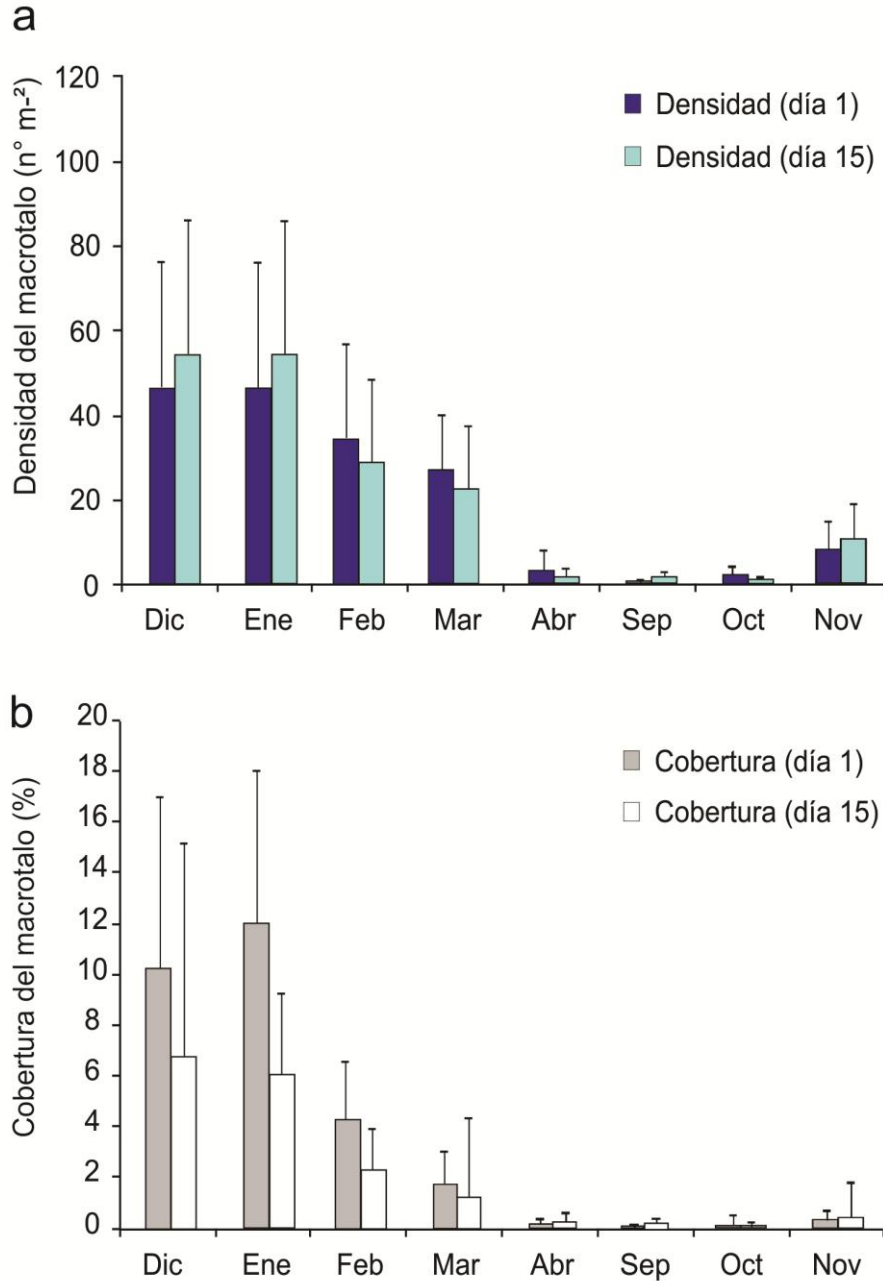


Figura 16. Dinámica poblacional de macrotalo de *Leathesia marina*. a. Densidad (media \pm DE) **y b. cobertura** (media \pm DE) Estimación quincenal, desde diciembre a noviembre. Día 1: primer día del mes, Día 15: a los 15 días del mes.

La tasa de crecimiento demográfico calculada cada 15 días durante todos los meses mostró la incorporación de nuevos individuos a la población de *L. marina* durante el periodo de septiembre hasta principios de enero. El reclutamiento de nuevos individuos fue más alto en octubre y noviembre, alcanzando valores de 129% y 133%, respectivamente. El nacimiento de nuevos individuos coincidió con el inicio de la temporada del macrotalo, al comienzo de los meses más cálidos. La mortalidad en diciembre, fue nula ya que durante ese periodo se observó crecimiento demográfico. A finales de enero, la tasa de crecimiento demográfico comenzó a ser negativa, ya que se inició un retroceso poblacional dado por la ausencia de nuevos individuos.

La supervivencia de los reclutas de *L. marina* durante 105 días de observación de enero a abril se muestra en la Fig. 17 (a) y la Tabla 2. Los datos se ajustaron a una curva de Weibull como se muestra a continuación:

$$F(nt/N) = 1 - e^{-(t/16,75)^{-0,01}} \quad (p=0,004, r^2=0,90),$$

donde N = número total de individuos, nt = número de individuos que sobreviven al tiempo t , t = edad medido en días.

En enero (0 - 15 días), se observó una fuerte disminución de la supervivencia, seguida de un período estable, con una disminución gradual de individuos durante febrero y marzo (30 - 75 días). En marzo, alrededor del día 75, se observó una segunda disminución en la supervivencia, y finalmente en abril, desaparecieron los macrotalos de *L. marina* al comenzar la temporada más fría. La curva de

supervivencia se ajustó a una curva tipo III, lo que indicó una alta mortalidad de juveniles y baja mortalidad de los talos adultos (Fig. 17 a). Observando la curva de la tasa de mortalidad (1000 qx), se notaron dos picos de alta mortalidad (Fig. 17 b, Tabla 2). El primero ocurrió fue en enero (días 0 - 15) y coincidió con un alto porcentaje de cobertura de *L. marina* y el segundo a fines de marzo (día 75). La tabla de vida (Tabla 2) mostró que la esperanza de vida (ej.) disminuyó con el tiempo.

La capacidad reproductiva de los macrotalos de *L. marina* fue significativamente diferente entre los meses (Tabla 1). El mayor cantidad de esporangios uniloculares estuvieron presentes en abril, alcanzando $17 \pm 0,7$ esporangios a lo largo de 625 μm de talo examinado. También en este mes, se observó el mayor número de esporangios uniloculares vacíos: $13 \pm 5,2$ esporangios. En septiembre, todos los esporangios presentaron esporas (Fig. 18 a, Tabla 1). El número más bajo de esporangios fue en diciembre, cuando solo se observó 1 esporangio. En cuanto a los esporangios pluriloculares, el mayor número fue en octubre, con 33 ± 19 esporangios y el más bajo en febrero y marzo, con 3 ± 3 esporangios (Fig. 18 b, Tabla 1).

La abundancia de microtalos de *L. marina* fue significativamente diferente entre los meses. La mayor abundancia (frecuencia relativa) fue en abril ($0,55 \pm 0,5$) y la más baja en septiembre ($0,10 \pm 0,3$). La capacidad reproductiva de los microtalos fue homogénea en los diferentes meses con 11 ± 6 gametangios pluriloculares a lo largo de 625 μm de talo examinado en cada mes.

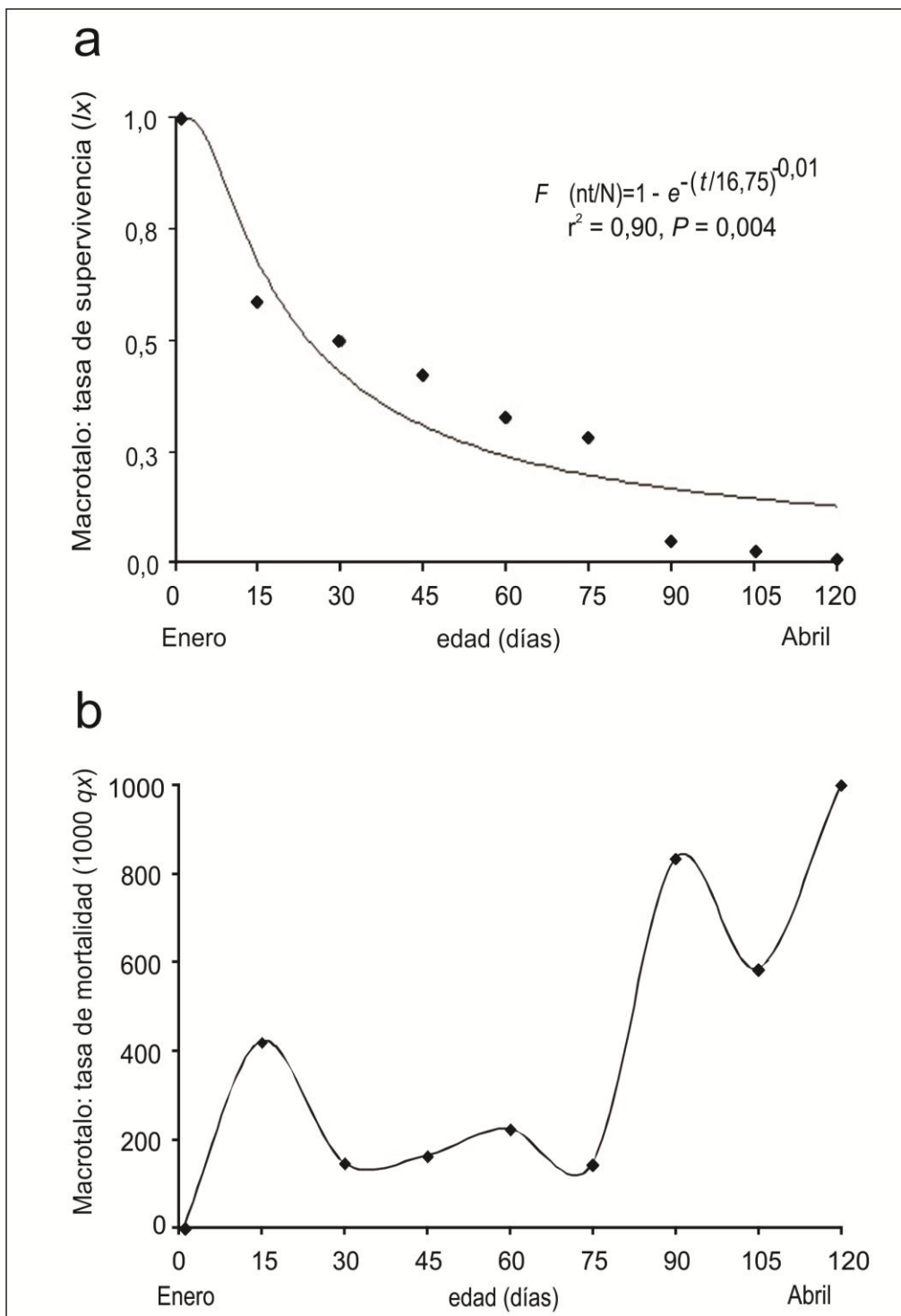
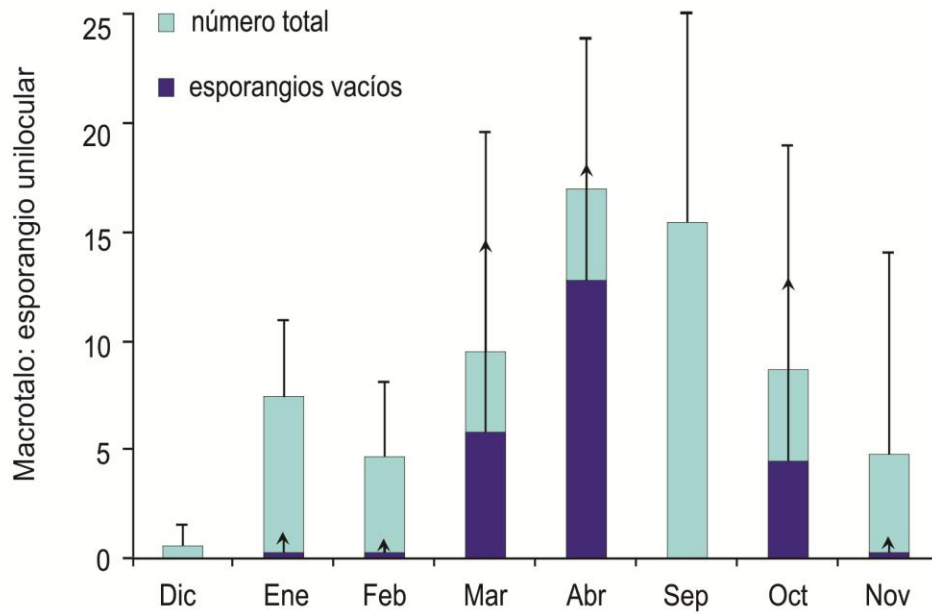


Figura 17. Tasas de supervivencia (l_x) y de mortalidad (1000 q_x) del macrotalo de *Leathesia marina*. Estimación realizada cada 15 días, desde diciembre a noviembre. **a. Curva de supervivencia ajustada al modelo de distribución de Weibull. **b.** Curva de mortalidad.**

Tabla 2: Tabla de vida del macrotalo de *L. marina*. n_x : Número de supervivientes al inicio del intervalo de edad x , l_x : Proporción de individuos que sobreviven al inicio del intervalo x , d_x : Número de individuos que mueren entre el intervalo x y el siguiente, $1000 q_x$: Tasa de mortalidad por día; L_x : Números promedio de individuos vivos durante el intervalo de edad desde x a $(x + 15)$, T_x : número de individuos por unidad de tiempo (días), e_x : Esperanza de vida media adicional para los individuos vivos al comienzo de la edad x .

Días	n_x	l_x	d_x	$1000 q_x$	L_x	T_x	e_x
0	260	1,00	109	419,2	205,5	691	2,66
15	151	0,58	22	145,7	140	485,5	3,22
30	129	0,50	21	162,8	118,5	345,5	2,68
45	108	0,42	24	222,2	96	227	2,10
60	84	0,32	12	142,8	78	131	1,56
75	72	0,28	60	833,3	42	53	0,74
90	12	0,05	7	583,3	8,5	11	0,92
105	5	0,02	0	1000	2,5	2,5	0,50

a



b

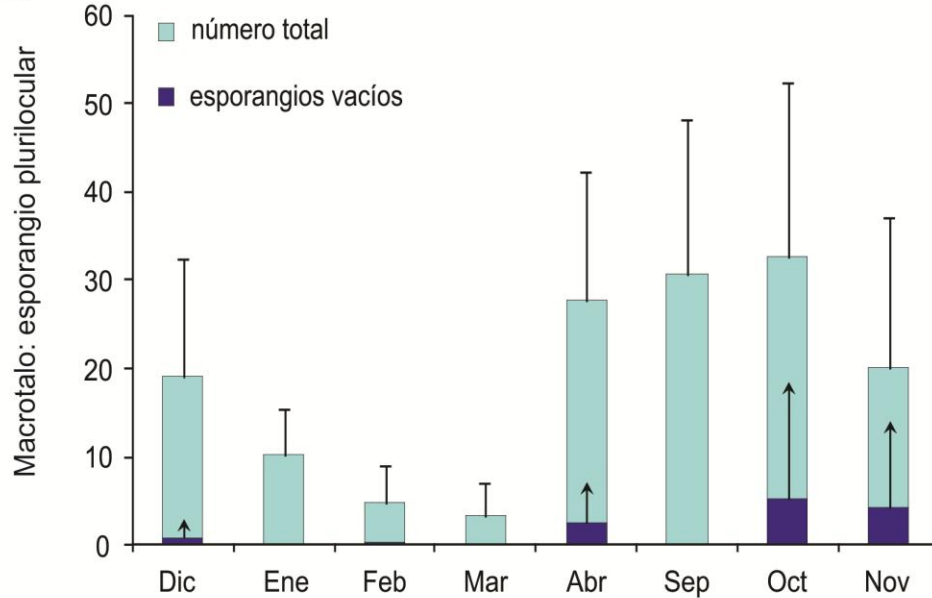


Figura 18. Capacidad reproductiva del macrotalo de *L. marina*. Número total de esporangios uniloculares y pluriloculares y esporangios vacíos estimados desde diciembre a noviembre (625 μm de talo examinado). **a.** Esporangios uniloculares. **b.** Esporangios pluriloculares.

3.4. Relación entre caracteres bioecológicos de *Leathesia marina* y factores ambientales

La dinámica poblacional y la morfología de *L. marina* se relacionaron con los parámetros ambientales. Los primeros dos ejes del PCA explicaron el 80,7% de la variación conjunta entre los factores ambientales y biológicos (Fig. 19). El primer componente (PC 1) se relacionó principalmente con la variabilidad estacional de las muestras. Las muestras de los meses más cálidos (noviembre a febrero) se agruparon en el plano negativo del eje 1, mientras que las muestras de los períodos templados (marzo-abril y septiembre-octubre) se ubicaron en el plano positivo del eje 1 del PCA. El lado izquierdo del PC 1 (noviembre-febrero) se caracterizó por una alta densidad, cobertura y tamaño de macrotalos, junto con altas temperaturas del agua de mar, fotoperiodos largos y alta radiación. La densidad y cobertura de los macrotalos se correlacionaron positivamente con la radiación y el fotoperiodo (Correlación de Spearman, N = 96, cobertura - radiación: $r_s = 0,82$; $P = 0,014$; fotoperiodo - cobertura: $r_s = 0,74$; $P = 0,035$; radiación - densidad: $r_s = 0,70$; $P = 0,045$; fotoperiodo - densidad: $r_s = 0,74$; $P = 0,034$). El peso y la altura del macrotalo se correlacionaron positivamente con la radiación ($r_s = 0,74$; $P = 0,033$) y la temperatura del agua de mar ($r_s = 0,76$; $P = 0,031$), respectivamente. Estas correlaciones indicaron que el crecimiento vegetativo de *L. marina* estuvo favorecido por las condiciones estacionales de verano.

El lado derecho del PC 1 (marzo-abril y septiembre-octubre) se caracterizó por la alta abundancia y capacidad reproductiva del microtalo, alto número de esporangios en macrotalo y alto número de gametangios en el microtalo,

conjuntamente con bajas temperaturas del agua de mar, bajo fotoperiodo y baja radiación.

La abundancia de microtalos se correlacionó negativamente con la radiación y fotoperiodo (correlación de Spearman: $N = 96$, $r_s = -0,82$; $P = 0,02$; $r_s = -0,83$; $P = 0,01$, respectivamente).

El número de esporangios uniloculares en el macrotalo y gametangios pluriloculares en los microtalos se correlacionaron negativamente con la radiación, el fotoperiodo y la temperatura del agua de mar (esporangios - radiación: $r_s = -0,85$; $P = 0,0076$; esporangios - fotoperiodo: $r_s = -0,93$; $P < 0,0001$; $r_s = -0,82$; $P = 0,01$; $r_s = -0,83$; $P < 0,01$; gametangios - radiación: $r_s = -0,75$; $P = 0,033$; gametangios - temperatura del agua de mar: $r_s = -0,88$; $P = 0,0043$).

Además, el desarrollo de estructuras reproductivas se asoció con condiciones invernales, es decir, situaciones que no fueron óptimas para el crecimiento vegetativo del macrotalo. Este resultado también se observó en la correlación negativa entre la densidad del macrotalo y el número de esporangios uniloculares y pluriloculares (densidad - esporangios uniloculares: $r_s = -0,74$, $P = 0,032$, densidad - esporangios pluriloculares: $r_s = -0,71$; $P = 0,045$), lo que indicó que, a medida que disminuye la densidad del macrotalo, aumenta el número de ambos tipos de esporangios.

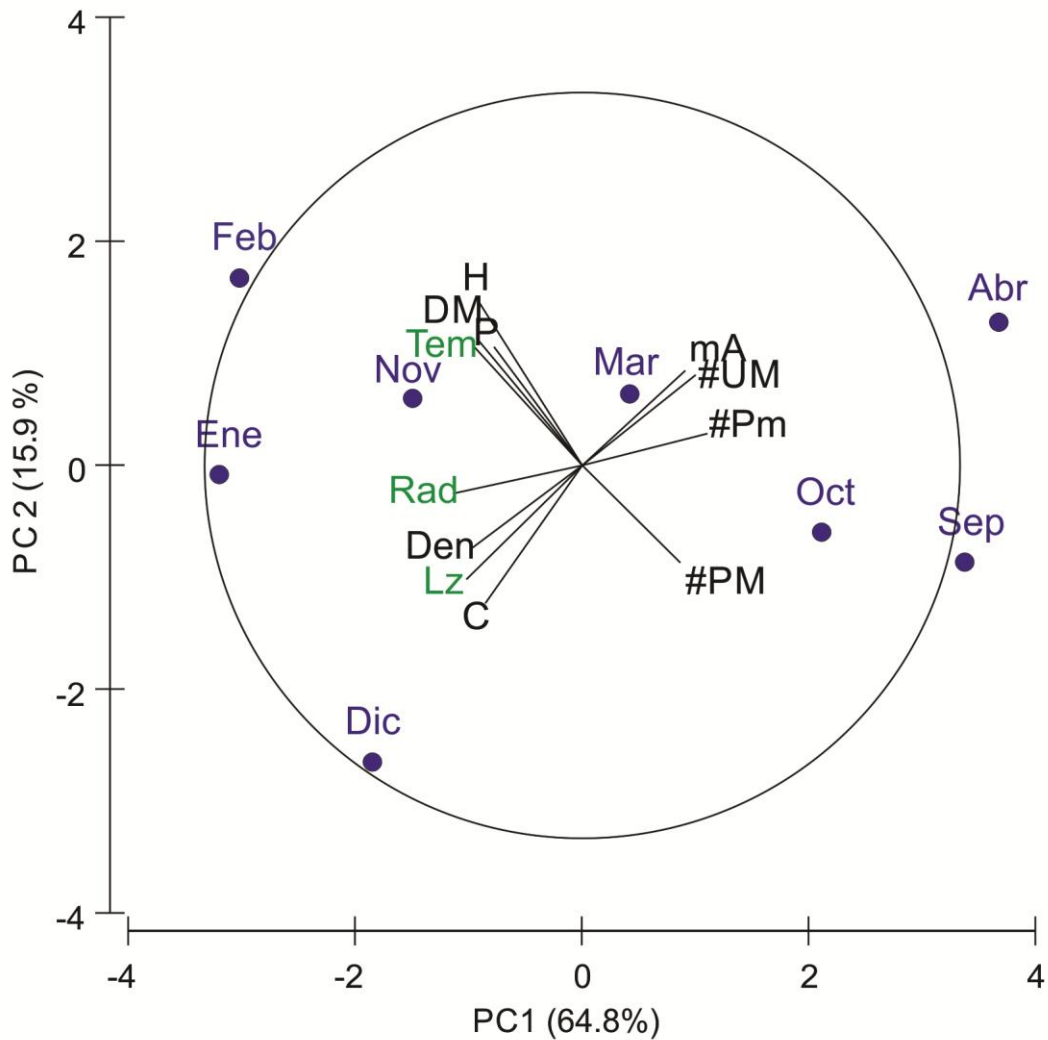


Figura 19. Relación temporal entre los parámetros ambientales y vegetativos, poblacionales y reproductivos de *Leathesia marina* (Gráfico PCA). Referencias: Tem: temperatura del agua de mar, Lz: horas de luz, Rad: radiación, DM: diámetro mayor, P: peso escurrido, H: altura del talo, #PM: número de esporangios pluriloculares del macrotalo, #UM: número de esporangios uniloculares del macrotalo, #Pm: número de esporangios pluriloculares del microtalo, Den: densidad poblacional del macrotalo, C: cobertura del macrotalo, mA: abundancia relativa del microtalo. Se consideraron los valores medios mensuales de cada parámetro.

4. Discusión

La población de *Leathesia marina* de Punta Este se estableció en el nivel inferior del intermareal rocoso. Los macrotalos mostraron un hábito preferentemente epífitos sobre *Corallina officinalis* y en ocasiones sobre mejillones, aunque nunca se encontraron sobre el sustrato desnudo. Estudios previos realizados en esta misma zona por Quartino y Boraso de Zaixso(1996) y en Puerto Deseado por Kühnemann (1969), también revelaron la presencia de *L. marina* como epífita sobre *C. officinalis* y epizoica sobre mitílidos. En concordancia, en las costas del sur de California también se encontró a *L. marina* sobre césped de *Corallina* sp. lo que indicaría que esta asociación es esencial para el asentamiento y el desarrollo de la estructura globosa característica de la especie (Oates 1989). Los céspedes de algas coralinas, se caracterizan por adherirse fuertemente al sustrato rocoso, atrapan grandes cantidades de sedimento y retienen abundante agua durante las mareas bajas (Akioka *et al.* 1999). De esa forma, las matas de *C. officinalis* junto con mejillones son críticos en la estructura y función de la población en general y producen un hábitat favorable para el crecimiento de *L. marina*, ya que los efectos de la luz, las altas temperaturas, el estrés por desecación y el efecto de las olas, potencialmente letales, se reducen significativamente, mientras que la carga de sedimentos y la humedad relativa aumentan (Scrosati y DeWreede 1998, Rechimont *et al.* 2013).

Por esta razón, las altas temperaturas parecieran afectar el reclutamiento de los macrotalos en *L. marina*, observándose una mayor densidad y cobertura en los

meses más calurosos. En estudios previos, Chapman y Goudey (1983) y Quartino y Boraso de Zaixso (1996) observaron una mayor densidad de *L. marina* durante los meses más calurosos. Además, la morfología en forma de cojín irregular con numerosos intersticios, junto con los filamentos asimiladores más largos, observados durante los meses cálidos, podría favorecer la retención de agua y así evitar la desecación. Este fenómeno también se observó en otras algas pardas con morfología, tales como *Colpomenia* spp. (Oates 1985).

En otras regiones, como en Nova Scotia, Canadá, los macrotalos de *L. marina* se observaron desde de junio a agosto (Chapman y Goudey 1983). En cambio, en la costa patagónica, la ocurrencia de la fase macroscópica fue más extensa, encontrándose durante 8 meses correspondientes a las estaciones cálidas. Además, se encontraron microtalos microscópicos durante 4 meses desde marzo-abril y septiembre-octubre. Este hecho evidenció un solapamiento temporal entre las fases microscópica y macroscópica. Durante esos meses también se observó un mayor rendimiento reproductivo de la fase macroscópica, con gran aumento en el número de esporangios y liberación de esporas. Esto último, coincidió con los meses en que estuvieron presentes los microtalos y con condiciones ambientales de bajas temperaturas del agua de mar, cortos fotoperiodos y baja radiación. En consecuencia, se supone que la etapa microscópica podría persistir los meses más fríos (mayo-agosto). A pesar de que no se han observado microtalos en la naturaleza durante los meses de invierno, se sabe que las etapas microscópicas son críticas para la dinámica anual de las especies.

Por otra parte, en lo que se refiere al éxito reproductivo, en muchas ocasiones fue asociado al tamaño del talo, ya que los talos más grandes presentan mayor

número de células para generar mayor número de esporangios (Thornber 2006). Sin embargo, a diferencia de lo esperado, el rendimiento reproductivo de *L. marina* no se relacionó con el tamaño del talo, sino que estuvo negativamente correlacionado con su densidad y cobertura. Esta reducción del rendimiento reproductivo, posiblemente refleja el impacto de la competencia intraespecífica a altas densidades de macrotalos (De Wreede y Klinger 1988).

Los aspectos de la morfología vegetativa y reproductiva de los macrotalos se encontraron dentro de los límites observados por otros autores (Okamura 1936, Takamatsu 1939, Abbott y Hollenberg 1976, Womersley 1987, Tanaka *et al.* 2010, Boraso 2013). Sin embargo, en descripciones previas de la especie, los esporangios pluriloculares biseriados nunca fueron antes mencionados. Aquí, los esporangios se encontraron esporádicamente durante todo el año y fueron similares a los gametangios pluriloculares encontrado en microtalos.

La dinámica poblacional de *L. marina* podría explicarse como una respuesta al ciclo de vida heteromórfico, donde cada fase presentó adaptaciones particulares a los parámetros ambientales (Lubchenco y Cubit 1980, Zupan y West 1990, Cunningham *et al.* 1993). El estudio demográfico realizado en *L. marina* por Chapman y Goudey (1983) mostró que la dinámica de los macrotalos estaba regulada por el hacinamiento poblacional y, por lo tanto, las tasas de mortalidad aumentaban a lo largo de la vida. En estudios previos de Quartino y Boraso de Zaixso (1996) en la Patagonia, no se observó hacinamiento y se atribuyó la desaparición de macrotalos a la senescencia de los mismos, durante la estación fría. En este estudio, se observó un primer declive poblacional cuando *L. marina* alcanzó su cobertura máxima en enero y un segundo aumento de la mortalidad a

fines de marzo con la llegada de los meses fríos, coincidentemente con lo señalado con estas autoras.

Las curvas de supervivencia tipo III encontradas para los macrotalos de *L. marina* también han sido reportadas para otras algas pardas, tales como *Cystoseira osmundacea* (Turner) C. Agardh, *Laminaria farlowii* Setchell y *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh (Dayton *et al.* 1984). Este fenómeno es frecuente en algas pardas que tienen fases microscópicas y que son capaces de crecer rápidamente con un reclutamiento masivo seguido de una alta mortalidad. Ha sido reportado que la tasa de mortalidad disminuye entre los reclutas que logran sobrevivir (De Wreede y Klinger 1988). Sin embargo, un estudio realizado por Chapman y Goudey (1983) sobre *L. marina* de Nova Scotia mostró una curva de supervivencia de tipo I, caracterizada por una baja mortalidad pre-reproductiva y una alta mortalidad pos-reproductiva. La diferencia entre las poblaciones de *L. marina* de Patagonia y Nueva Escocia podría atribuirse a las condiciones extremas presentes en Nova Scotia, donde la temperatura del agua de mar era inferior a 5°C en invierno y no superó los 12°C en verano (junio a septiembre) (Wilson *et al.* 2015). En el golfo Nuevo, en cambio las condiciones ambientales son claramente más favorables con temperatura elevadas del agua de mar, mayor radiación y fotoperiodos más largos.

Se observó una alta capacidad reproductiva de la fase macroscópica de *L. marina* durante todo el período de ocurrencia en la naturaleza. Un fenómeno similar fue señalado para poblaciones del alga parda *Ralfsia californica* Setchell & N.L. Gardner en Washington (Dethier 1981). Además, la alta capacidad reproductiva de la fase macroscópica podría ser una respuesta a la susceptibilidad

diferencial a la desecación entre las diferentes etapas del ciclo de vida (Thornber 2006). La fase microscópica postrada podría encontrar una mayor protección y estabilidad en el medio ambiente (Cunningham *et al.* 1993).

Un estudio de este tipo, que analiza parámetros demográficos como tasa de mortalidad, supervivencia, rendimiento reproductivo, así como las características morfológicas, explica de qué forma las especies efímeras como *L. marina* lograron adaptarse a un ambiente adverso, con grandes cambios estacionales, como son las costas patagónicas.

CAPÍTULO III

Efecto de las comunidades epífitas algales sobre *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

1. Introducción

En todos los ambientes acuáticos, el sustrato disponible es rápidamente colonizado por una gran variedad de organismos. Allí, las interacciones entre las especies, que coinciden en tiempo y espacio pueden ser recíprocas o unidireccionales, positivas o negativas (Odum 1984). Los tipos de interacciones más comúnmente encontrada en la naturaleza son competencia, parasitismo, mutualismo, neutralismo, proto-cooperación, amensalismo y comensalismo (Krebs 1985). Estas relaciones interespecíficas entre organismos determinan el tiempo y la distribución de las especies presentes.

Diferentes teorías sobre la organización de las comunidades marinas bentónicas destacan la importancia de la competencia, de la depredación, de los gradientes ambientales y de las distintas perturbaciones que puedan afectar el desarrollo de una comunidad (Keough y Downes 1982, Roughgarden *et al.* 1986). La competencia por el sustrato, por la exposición a la luz y por la disponibilidad de nutrientes disueltos es un fenómeno generalizado en estos ambientes (Harlin 1980).

El epifitismo es un fenómeno generalizado principalmente en la zona intermareal rocosa (Harlin 1980, Kraberg y Norton 2007) y se define como una forma de vida que ocurre cuando un organismo utiliza como sustrato de colonización a otro organismo (Borowitzka y Lethbridge 1989). En estos ambientes tanto las fanerógamas marinas, como las macroalgas constituyen el sustrato vegetal por excelencia. Estas, son epifitadas por una variedad de propágulos presentes en la naturaleza y la tasa de reclutamiento de los mismos puede contribuir a la diversidad de especies, estructura y dinámica de toda la comunidad (Keough y Downes 1982).

Los organismos epífitos más abundantes y diversos son las algas, desde las diatomeas unicelulares y dinoflagelados encontrados en casi todas las fanerógamas y macroalgas (Kita y Harada 1962; Buia *et al.* 1996; Mazzella 1999) hasta grandes macroalgas como *Laurencia* spp., *Metagoniolithon* Weber Bosse y *Hypnea* spp. (Lethbridge *et al.* 1988).

El establecimiento y desarrollo de una comunidad de algas epífitas están relacionados con factores bióticos, como la abundancia, la diversidad y el éxito de germinación de los propágulos algales, así como el grado de herbivoría. Estos factores, junto con los factores abióticos como la disponibilidad de luz, la temperatura, el movimiento del agua y los nutrientes disueltos influyen en el reclutamiento y la colonización de las algas epífitas (Lavery *et al.* 2007, Lee *et al.* 2007).

Las algas epífitas normalmente representan la mayor parte de las especies algales existentes en ambientes bentónicos, lo que aumenta la heterogeneidad de un hábitat particular (Cardoso *et al.* 2004). Los estudios sobre comunidades de

algas epífitas también han revelado que la productividad primaria epífita a menudo puede exceder la productividad anual de las macrófitas (Moncreiff y Sullivan 2001). Por lo tanto, las variaciones en la biomasa epifítica, se consideran como indicadores naturales y sensibles de las variaciones ambientales (Richardson 2006; Martínez-Crego *et al.* 2010). Además, el aumento de las epífitas está estrechamente relacionado con el aumento del nivel de nutrientes (Frankovich *et al.* 2003, Hays 2005, Peterson *et al.* 2007).

Actualmente aún existen controversias al respecto de si existe una relación huésped-hospedador (Morcom y Woelkerling 2000). Se considera que, en realidad, el tipo de relación es esencialmente de carácter facultativo (no obligatorio) sin una asociación específica con el huésped (Wahl y Mark 1999). La presencia de cloroplastos bien desarrollados ha dado lugar a la idea generalizada de considerar a los organismos epífitos como “intrusos casuales”, ya que son carbono-independientes de sus huéspedes. Estudios realizados revelan que muchas de las algas epífitas que fueron aisladas pudieron crecer separadas de sus anfitriones (Garbary 1979, Correa 1994, Eggert *et al.* 2010, Siniscalchi *et al.* 2012).

A nivel ecológico, son reconocidos los efectos negativos que producen los epífitos sobre las algas hospedadoras, llegando a comprometer el estado sanitario de sus poblaciones, y reducir el “fitness” (Sand-Jensen 1977), debido a la disminución de la actividad fotosintética por una menor penetración de la luz (Hurd *et al.* 2000), alteración del flujo y reducción de la velocidad de difusión de los nutrientes y del CO₂.

En la naturaleza existen diversas interacciones químicas entre el hospedador y el epífito, ya que la presencia de ciertos compuestos secretados desde la superficie del hospedador puede ser requerida por los epífitos por su valor nutritivo (Round 1992). Por el contrario, diferentes algas desarrollaron mecanismos químicos para liberarse de sus epífitos y patógenos microbianos, tales como la presencia de compuestos bioactivos, formados por una amplia gama de metabolitos secundarios (Pereira *et al.* 1994), o bien, mecanismos de defensa físicos como el desprendimientos de porciones de la cutícula (Hay 1996, Yamamoto *et al.* 2013).

Las diferentes macroalgas no alojan algas epífitas de la misma manera, ya que el asentamiento de los organismos epífitos depende de la arquitectura morfológica del alga hospedadora, de su ciclo de vida y la presencia de defensas químicas (Michael *et al.* 2008). Estas características propias del hospedador determinan el grado de epifitismo sobre sus talos. En muchos casos, un alto grado de epifitismo puede estar asociado a una mayor superficie de colonización y biomasa del hospedador (Ortuño-Aguirre y Riosmena Rodríguez 2007).

Las algas pardas de estructura globosa como *L. marina* y *Colpomenia sinuosa* (Mertens ex Roth) Derbès & Solier se distribuyen alrededor de todo el mundo, sobre el intermareales rocosos de zonas de climas templados a fríos (Oates 1989). Exhiben un ciclo de vida anual que consiste en la alternancia de una fase microscópica filamentosos (microtalos) y una fase macroscópica globosa (macrotalos) (Dangeard 1965). Como se mencionò anteriormente en esta tesis, en *L. marina*, los microtalos representan la fase haploide gametofítica y el macrotalo

la fase esporofítica, mientras que en *C. sinuosa*, el gametófito es macroscópico y el esporófito es microscópico.

En la costa patagónica, ambas especies habitan las zonas intermareales inferiores. El macrotalo de *L. marina* es típico de los períodos de clima templados a cálidos, mientras que el macrotalo de *C. sinuosa* es típico de períodos templados a fríos. Debido a su morfología análoga, estas dos especies presentan un papel ecológico similar en la zona intermareal.

El objetivo de este capítulo fue:

- *Analizar y comparar las comunidades de epífitos algales en macrotalos esporofíticos de L. marina y macrotalos gametofíticos de C. sinuosa, especie de morfología análoga y que ocupa el mismo nicho espacial en la zona intermareal, a través de su dinámica temporal en términos de riqueza, abundancia y diversidad, y sus relación con la abundancia de los hospedadores y con los factores ambientales.*

Materiales y métodos

1.1. Área de Estudio

Las muestras fueron recolectadas en el intermareal de Punta Este (42°46'32,57 "S, 62°02'59'23,49" O). El sitio de muestreo seleccionado correspondió a un área pequeña cuya superficie fue aproximadamente 12 m de largo y 5 m de ancho.

Para este estudio, los parámetros ambientales como la temperatura del agua de mar, el fotoperiodo, la radiación solar y las precipitaciones fueron proporcionados por la Estación Meteorológica Automática del Laboratorio de Climatología de CENPAT (CONICET).

2.2. Poblaciones hospedadoras: *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

Las muestras de *L. marina* y *C. sinuosa* se recolectaron aleatoriamente de diciembre de 2013 a noviembre de 2014., El macrotalo de *L. marina* estuvo presente durante dos períodos (diciembre de 2013 a -abril de 2014 y de octubre a noviembre de 2014) correspondiente a la temporada templada a cálida en las costas patagónicas. El macrotalo de *C. sinuosa* estuvo presente desde abril a octubre de 2014, correspondiente a la temporada templada y fría. El nivel inferior también estuvo colonizado por *Brachidontes rodriguezii* y *Perumytilus purpuratus*.

Durante estos períodos, se recolectaron mensualmente al azar 20 macrotalos de cada especie. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico durante la noche a 5°C. Previa a la fijación, cada talo se lavó cuidadosamente con agua de

mar para eliminar el sedimento adherido. Luego, los talos se fijaron en FAA en proporción 8:1:1. Para cada hospedador macroalgal, se registraron dos variables morfológicas: diámetro máximo (cm) y peso húmedo (g) para cada individuo de estudio.

Adicionalmente, para evaluar la abundancia de las poblaciones de *L. marina* y *C. sinuosa* en el área de estudio, se fijaron aleatoriamente, seis cuadrantes (25 cm x 25 cm) y se fotografiaron cada 15 días durante todo un año desde diciembre de 2013 hasta noviembre de 2014.

2.3. Identificación y cuantificación de la comunidad epífita sobre la población *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

Los 20 talos de *L. marina* y *C. sinuosa* recolectados para evaluar la dinámica de las variables morfológicas (diámetro mayor y peso escurrido), también se utilizaron para estudiar la comunidad de epífitos. Por lo tanto, cada macrotalo se muestreó considerando tres regiones diferentes del talo (superior, lateral y basal). En cada región del talo, se seleccionó aleatoriamente una submuestra de 35 mm². El área total observada fue de 105 mm² para cada talo y de 2100 mm² mensualmente por cada hospedador.

Los epífitos se identificaron a nivel de género o de especie y se cuantificaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE 300 (Tokio, Japón) equipado con una cámara Nikon FDX 35. Los conteos se realizaron manualmente utilizando un objetivo de 400x.

Para registrar la incidencia de epífitos en macrotalos de *L. marina* y *C. sinuosa* se reconocieron cuatro grupos epifíticos: (i) muy abundante (presente en más de 100 talos hospedadores), (ii) abundante (50-100 talos hospedadores), (iii) raro (24-49 talos hospedadores) y (iv) ocasionales (menos de 24 talos hospedadores) (Gauna *et al.* 2016).

2.4. Aislamiento de epífitos bajo condiciones de cultivo

Con el fin de identificar correctamente algunas especies epífitas, se realizaron cultivos *in vitro* bajo condiciones controladas de laboratorio y de esa forma generar estructuras reproductivas esenciales para la identificación. Se cultivaron especies epífitas tales como *Erythrotrichia carnea* (Dillwyn) J. Agardh, *Urospora penicilliformis* (Roth) Areschoug y *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye durante cuatro semanas (Fig. 20). Para la iniciación de los cultivos, se tomaron porciones pequeñas de *L. marina* y *C. sinuosa*, las cuales fueron lavadas tres veces en agua de mar estéril. Luego se colocaron en cajas de Petri que contuvieron agua de mar enriquecida con medio Provasoli (PES) (Provasoli 1968), a 17°C con un régimen de luz/oscuridad de 12:12 h., con irradiación de luz de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provista por tubos fluorescentes blancos fríos y monitorizada con un medidor de flujo cuántico (Apogee MQ-200, EEUU). Bajo estas condiciones, se obtuvieron diferentes estructuras reproductivas de los organismos epífitos, que fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de cultivo.

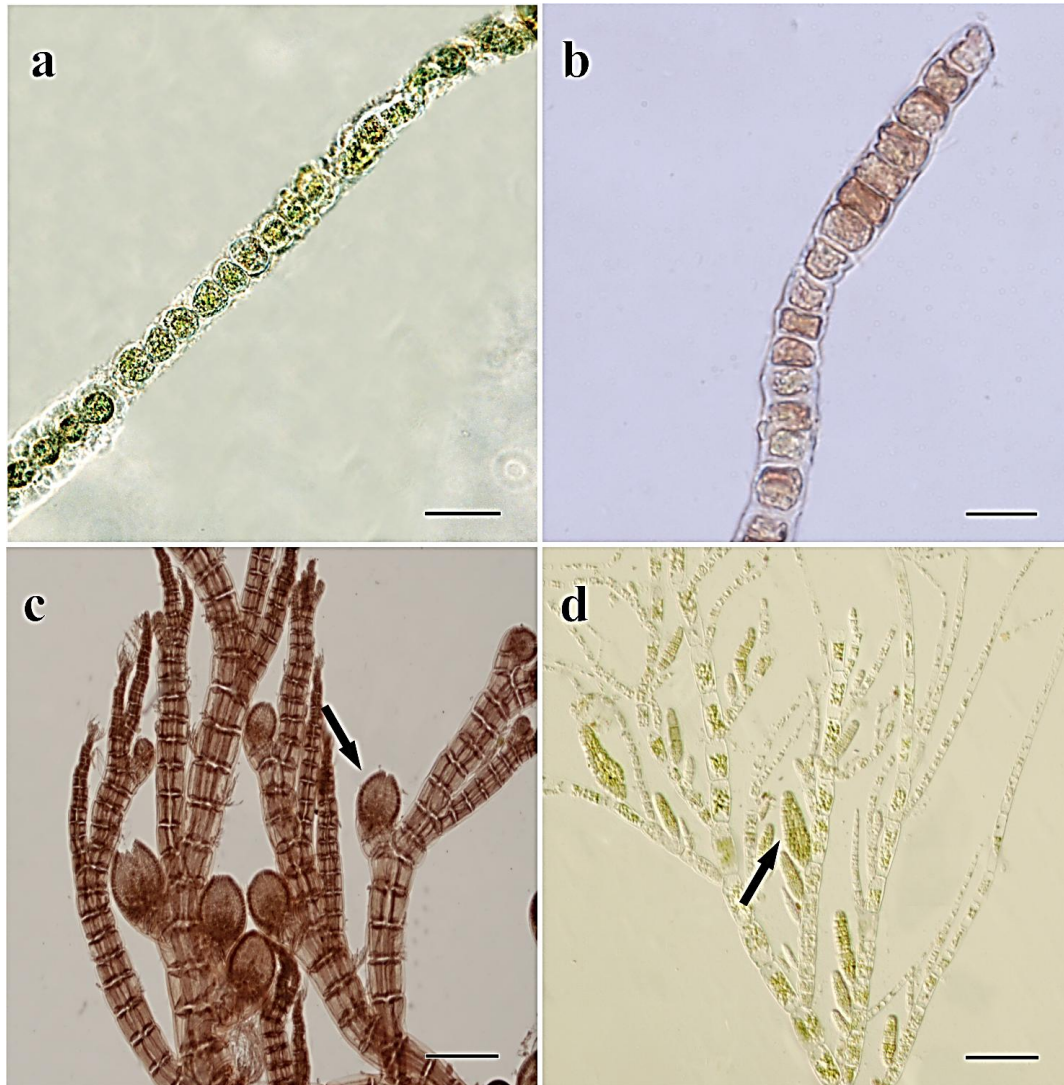


Figura 20. Algas epífitas sobre *Leathesia marina* desarrollados en cultivo. a. *Urospora penicilliformis*, b. *Erythrotrichia carnea*, c. *Polysiphonia* sp. con estructuras reproductivas, d. *Ectocarpus siliculosus* con estructuras reproductivas. Barras escala: a y b= 10 μ m; c y d: 20 μ m.

2.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para microscopía electrónica de barrido (MEB), fragmentos de *L. marina* y *C. sinuosa* se fijaron en glutaraldehído al 2,5% que contuvo 0,01 M de buffer cacodilato de sodio (pH 7,2) a 5°C durante 2 h. Posteriormente, se continuó con la misma metodología expuesta en Capítulo I.

2.6. Índices ecológicos descriptivos de la comunidad de epífitos

Se calcularon los Índice de diversidad Shannon-Wiener (H') (Shannon y Weaver 1949), de equitatividad de Pielou (J') (Pielou 1975), dominancia de Simpson (λ) (Simpson 1960) y la riqueza epífita en las comunidades epifitas de *L. marina* y *C. sinuosa*. Los índices fueron calculados siguiendo las formulas:

- Índice de diversidad Shannon-Wiener (H')

$$H' = - \sum_{i=1}^s (p_i \times \log_2 p_i)$$

Dónde: p_i = proporción del número de individuos del taxon ("i") con respecto al total de ejemplares (n_i/N).

El índice de Shannon-Wiener (H') como índice de diversidad, mide el contenido de información por individuo en muestras obtenidas al azar, provenientes de una comunidad 'extensa' donde se conoce el número total de especies (S). Por lo tanto, el índice indica que cuando $H' = 0$, la muestra contiene solo una especie, y H' es máxima cuando todas las especies (S) están representadas por el mismo

número de individuos (n_i), es decir, que la comunidad presenta una distribución de abundancias perfectamente equitativa.

- Índice de equitatividad de Pielou (J')

$$J' = \frac{H'}{\log_2 S}$$

Dónde: $\log_2 S$ = es la diversidad máxima (H'_{\max}) que se obtendría si la distribución de las abundancias de las especies en la comunidad fuesen perfectamente equitativas.

Si todas las especies en una muestra presentan la misma abundancia el índice usado para medir la de equitatividad debería ser máximo y, por lo tanto, debería decrecer tendiendo a cero a medida que las abundancias relativas se hagan menos equitativas. El índice de equitatividad J' es modificado con cambios mínimos en la riqueza de especies (se modifican sustancialmente con el agregado a la muestra de sólo una especie rara (Peet 1975).

- Dominancia de Simpson (λ)

$$\lambda = \sum p_i^2$$

Dónde: p_i = abundancia proporcional de una especie (n_i / N). A medida que la dominancia se incrementa, la diversidad decrece entonces éste índice se presenta a la inversa: $1/\lambda = 1 / \sum p_i^2$

Este índice constituye un parámetro inverso al concepto de equidad de la comunidad. Toman en cuenta la representatividad de las especies con mayor valor de importancia sin evaluar la contribución del resto de las especies.

2.7. Análisis estadísticos

A cada conjunto de datos se le examinó la normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de varianza utilizando el test de Bartlett.

Para evaluar las diferencias en la abundancia de macrotalos, diámetro máximo y peso húmedo de *L. marina* y *C. sinuosa*, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples mediante Honestly Significant Difference (HSD-Tukey).

También se realizaron tests de ANOVA para determinar las diferencias de la abundancia de epífitos entre las diferentes regiones del talo hospedador (superior, lateral y basal) a lo largo de los meses examinados. Además, se realizaron análisis multivariados con el propósito de describir la variabilidad en el ensamble de epífitos durante los meses para ambas especies hospedadoras. Para ello, los datos se estandarizaron y se transformaron previamente utilizando $\log_{10}(x+1)$ y se realizó un análisis de Escalonamiento Multidimensional no métrico (nMDS) usando el índice de similitud de Bray-Curtis con 999 permutaciones (Bray y Curtis 1957, Clarke y Warwick 2001).

Para analizar las relaciones entre la dinámica de la comunidad de epífitos con los huéspedes, junto con las variables ambientales a lo largo de los meses, se realizó un análisis de Correspondencia Canónica (CCA) (Ter Braak 1994) en base a los datos de abundancia para los taxones epifíticos, variables ambientales, como la temperatura del agua de mar, fotoperiodo y la radiación solar, y la abundancia de *L. marina* y *C. sinuosa*.

El programa estadístico R Studio (Team 2016) y el paquete PRIMER (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) (Clarke y Warwick 2001) fueron utilizados para realizar los análisis con un nivel de significación de 0,05.

3. Resultados

3.1. Poblaciones hospedadoras: *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

Los esporófitos de *L. marina* presentaron talos hemisféricos a irregulares en forma de cojín con muchos intersticios. Por otro lado, los gametófitos de *C. sinuosa* tuvieron una forma globular a irregular con una superficie lisa. Ambas algas pardas, *L. marina* y *C. sinuosa*, se establecieron predominantemente en la zona intermareal inferior. Ambos macrotalos a menudo se encontraron como epífitas sobre talos *C. officinalis* (Fig. 21 a y b).

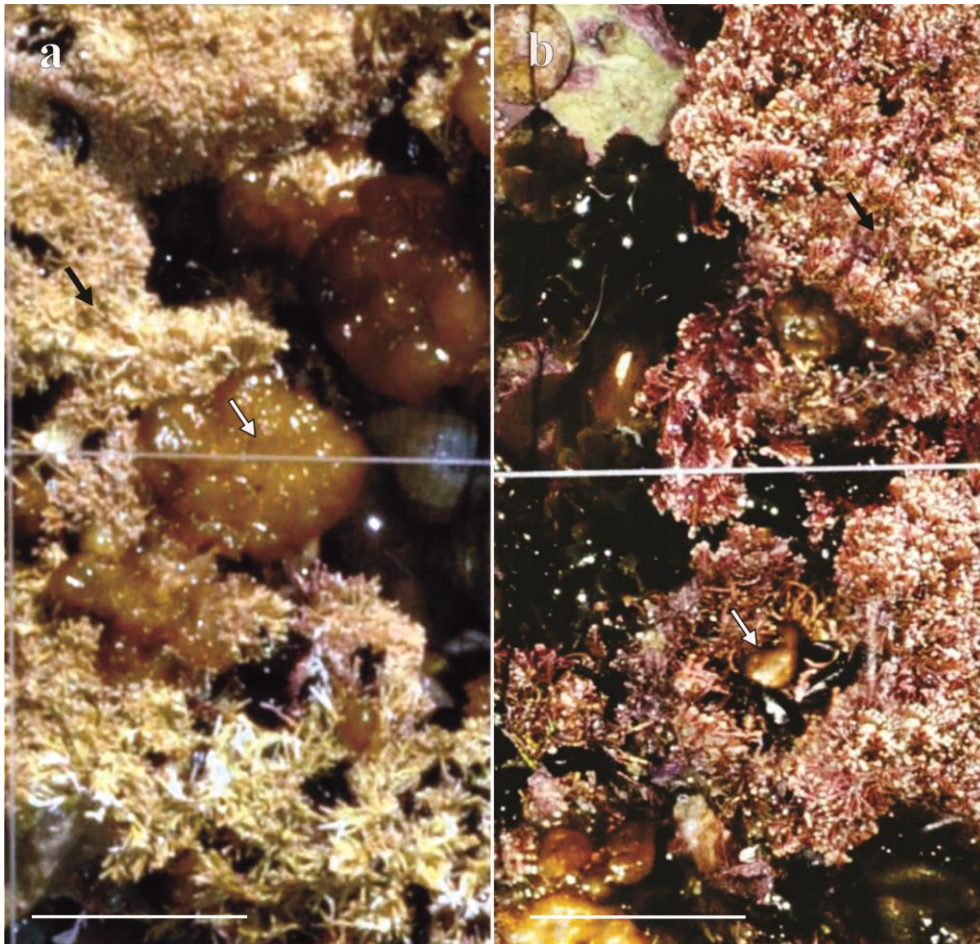


Figura 21. *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa* en la naturaleza. a. Esporófito de *L. marina* (flecha blanca) epífita sobre *C. officinalis* (flecha negra). b. Gametófito de *C. sinuosa* (flecha blanca) epífita sobre *C. officinalis* (flecha negra). Barras escala = 2,5 cm.

En el período estudiado, la temperatura del agua de mar varió de $17,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a $9,8 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ (media \pm ES), siendo máxima durante febrero y mínima en agosto (Fig. 22 a). La duración del día varió entre $15:15 \pm 0:05$ h y $9:05 \pm 0:06$ h, siendo máxima en diciembre y mínima en junio. La radiación solar promedio osciló entre $8341 \pm 1182 \text{ W m}^{-2}$ y $2060 \pm 1033 \text{ W m}^{-2}$, con valores máximos durante enero y mínimos en junio.

La abundancia de *L. marina* (19 ± 16 ind./625 cm²) fue significativamente mayor que la de *C. sinuosa* (3 ± 1 ind./625 cm²) (ANOVA: $F_{(1; 84)} = 21,4$, $P < 0,001$) (Fig. 22 b). La abundancia más alta de *L. marina* se registró durante enero y de *C. sinuosa* en mayo.

El peso húmedo de los macrotalos de *L. marina* fueron significativamente mayor que los de *C. sinuosa* (ANOVA: $F_{(1; 280)} = 16,2$, $P < 0,001$). Los macrotalos de *L. marina* presentaron un peso de $1,3 \pm 1$ g. mientras que el peso de *C. sinuosa* fue de $0,7 \pm 0,6$ g. El diámetro máximo fue similar en ambas especies (ANOVA: $F_{(1; 280)} = 0,6$, $P = 0,42$). *L. marina* tuvo un diámetro de $2,36 \pm 0,8$ cm y *C. sinuosa* de $2,44 \pm 0,8$ cm.

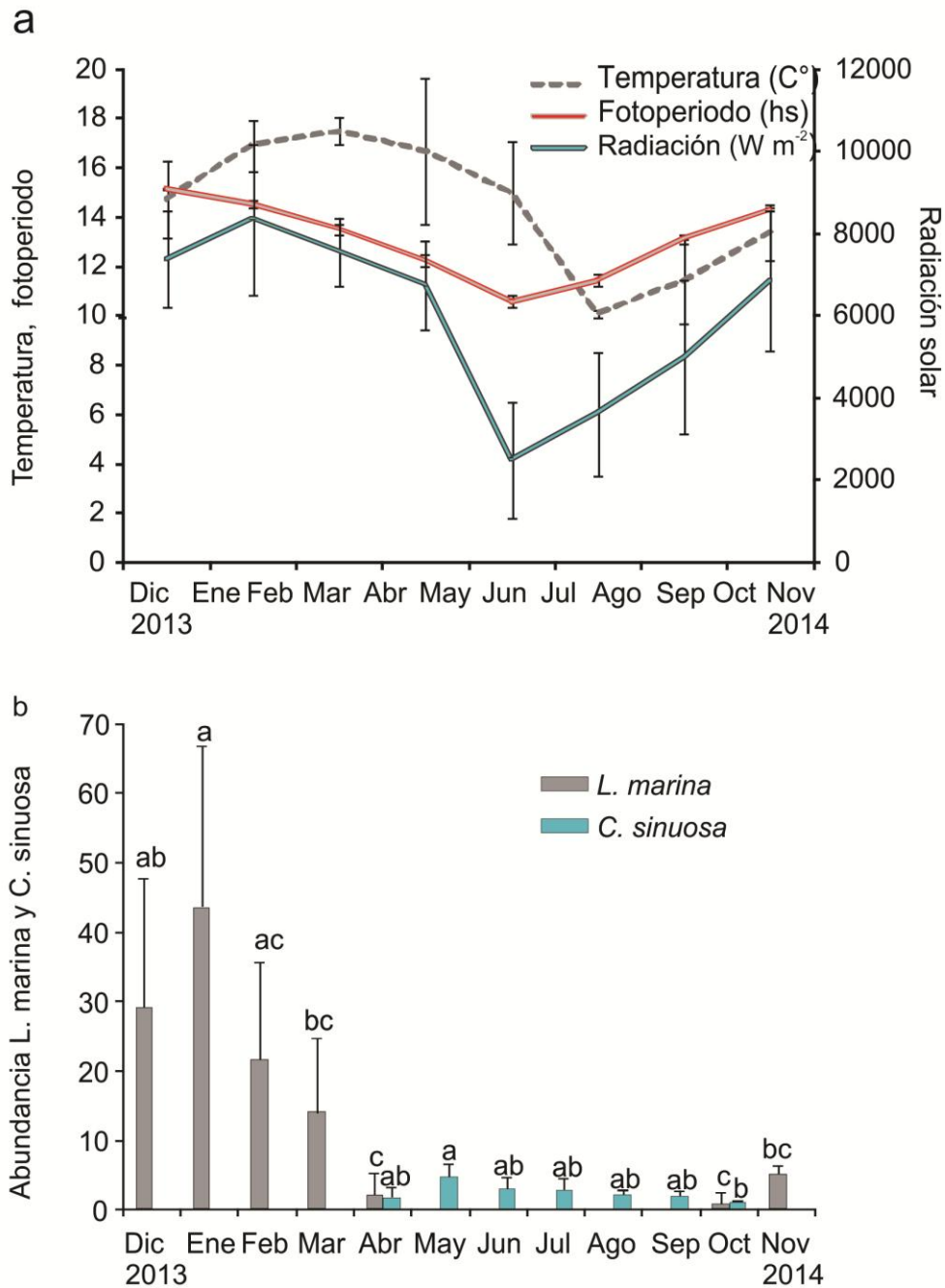


Figura 22. a. Variación de parámetros ambientales (media \pm ES): temperatura del agua de mar ($^{\circ}$ C), fotoperiodo (h) y radiación solar (Wm^{-2}) a lo largo de los meses. **b. Abundancia de *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*** (n°. individuos/625 cm^2 , media \pm ES) a lo largo de los meses. Las diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) están indicadas por diferentes letras según comparaciones múltiples mediante HSD-Tukey.

3.2. Identificación y cuantificación de la comunidad de epífitos en *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

Se registró un total de 31 taxones de epífitas sobre *L. marina* y *C. sinuosa*, de los cuales 20 taxones estuvieron presentes en ambos hospedadores, compartiendo el 64,5% de las especies epífitas encontradas (Tabla 3).

En *L. marina*, los taxa de epífitos pertenecieron a cinco clases taxonómicas diferentes: Cyanophyceae representada por una especie, Rhodophyceae por cuatro taxones, Bacillariophyceae por 17 taxones, Phaeophyceae por dos especies y Chlorophyceae por dos especies. En *C. sinuosa*, la Clase Cyanophyceae estuvo representada por la única especie, las Rhodophyceae por cuatro taxones, las Bacillariophyceae por 14 taxones, las Phaeophyceae por tres especies y las Chlorophyceae por tres taxones epifíticos. Las diatomeas mostraron la mayor riqueza de especies en ambos hospedadores.

Tabla 3. Algas epífitas sobre *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*

Taxones de epífitos	En <i>L. marina</i>		En <i>C. sinuosa</i>	
	N° talos epífitadas	Incidencia	N° talos epífitadas	Incidencia
<u>Cyanophyceae</u>				
<i>Oscillatoria corallinae</i> Gomont ex Gomont	17	ocasional	15	ocasional
<u>Rhodophyceae</u>				
<i>Anotrichium furcellatum</i> (J. Agardh) Baldock	-		1	ocasional
<i>Colaenema daviesii</i> (Dillwyn) Stegenga	3	ocasional	41	ocasional
<i>Erythrotrichia carnea</i> (Dillwyn) J. Agardh	108	muy abundante	68	abundante
<i>Polysiphonia</i> spp. <i>Stylonema alsidii</i> (Zanardini) K.M. Drew	83	abundante	6	ocasional
	3	ocasional	-	ocasional
<u>Bacillariophyceae</u>				
<i>Achnanthes</i> sp.	2	ocasional	-	
<i>Bacillaria</i> sp.	1	ocasional	1	ocasional
<i>Cocconeis</i> spp.	26	rara	12	ocasional
<i>Cymbella</i> sp.	1	ocasional	-	
<i>Fragilaria</i> sp.	2	ocasional	5	ocasional
<i>Grammatophora oceanica</i> Ehrenberg	7	ocasional	35	rara
<i>Gyrosigma</i> sp.	3	ocasional	14	ocasional
<i>Licmophora</i> sp.	17	ocasional	15	ocasional
<i>Navicula</i> spp.	45	rara	39	rara
<i>Nitzschia</i> sp.	1	ocasional	26	rara
<i>Parlibelus</i> sp.	4	ocasional	-	-
<i>Pinnularia</i> spp.	27	rara	22	ocasional
<i>Pleurosigma</i> sp.	2	ocasional	1	ocasional
<i>Rhabdonema</i> sp.	9	ocasional	5	ocasional
<i>Rhoicosphenia</i> sp.	-		21	ocasional
<i>Surirella</i> sp.	2	ocasional	1	ocasional
<i>Synedra</i> sp.	1	ocasional	1	ocasional
<i>Tubularia</i> sp.	14	ocasional	-	
<u>Phaeophyceae</u>				
<i>Ectocarpus siliculosus</i> (Dillwyn) Lyngbye	71	abundante	37	rara
<i>Pylaiella littoralis</i> (Linnaeus) Kjellman,	-		37	rara
<i>Sphacelaria cirrosa</i> (Roth) C. Agardh	2	ocasional	1	ocasional
<u>Chlorophyceae</u>				
<i>Acrochaete polymorpha</i> (L. Moewus) R. Nielsen	1	ocasional	25	rara
<i>Epicladia</i> sp.	-		23	ocasional
<i>Ulvela lens</i> P. Crouan & H. Crouan	-		5	ocasional
<i>Urospora penicilliformis</i> (Roth) Areschoug	18	ocasional	-	

Nota: El número de talos de *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa* epífitadas (n=140 para cada huésped) de diciembre de 2013 a noviembre de 2014 y la incidencia (muy abundante: presente en más de 100 talos hospedantes; abundante: 50-100 talos; rara: 24-49 talos, y ocasionales: menos de 24 talos).

La abundancia de epífitos mostró diferencias significativas entre los dos hospedadores (ANOVA, $F_{(6; 21)} = 24$, $P < 0,001$). *L. marina* mostró una mayor abundancia de epífitos, con 1276 ± 1123 (ind./mes, media \pm EE) y *C. sinuosa* presentó una abundancia de epífitos de 154 ± 86 ind./mes, siendo muy inferior en relación a la abundancia encontrada en *L. marina*.

La superficie del macrotalo de *L. marina* presentó una textura rugosa colonizado por epífitas (Figs. 23 a, c, e), mientras que la morfología de *C. sinuosa* fue más suave y lisa con una cutícula morfológicamente distinta de polisacáridos neutros, que mostró una abundancia inferior de epífitos (Figs. 23 b, d, f).

Rhodophyceae fue el grupo con mayor abundancia en ambos hospedadores; en *L. marina* se observaron 3392 ± 2920 ind./mes y en *C. sinuosa* se observaron 216 ± 191 ind./mes (Fig. 24). Las epífitas pertenecientes a la Clase Phaeophyceae fueron considerablemente menos abundantes con 220 ± 200 ind./mes en *L. marina* y 177 ± 149 ind./mes en *C. sinuosa*. Las Bacillariophyceae fueron igualmente abundantes tanto en *L. marina* y *C. sinuosa*. La abundancia media de Bacillariophyceae en *L. marina* fue de 171 ± 64 ind./mes y en *C. sinuosa* fue de 154 ± 139 ind./mes. Las epífitas Cyanophyceae y Chlorophyceae fueron las menos abundantes tanto en *L. marina* como en *C. sinuosa*. La abundancia media de Cyanophyceae en *L. marina* fue de 50 ± 36 ind./mes y en *C. sinuosa* fue 3 ± 1 ind./mes. La abundancia media de Chlorophyceae en *L. marina* fue solo 1 ± 1 ind./meses y 22 ± 2 ind./meses en *C. sinuosa*.

Las algas rojas *Erythrotrichia carnea* fueron los epífitos más abundantes en *L. marina*, presentando la mayor incidencia (Tabla I). Otros dos taxa, *Polysiphonia* spp. y *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye fueron especies abundantes en *L.*

marina. Las diatomeas *Cocconeis* spp., *Pinnularia* spp. y *Navicula* spp. fueron especies raras y los 20 taxones restantes registrados fueron epífitos ocasionales.

Las diatomeas *Navicula* spp., *Grammatophora oceanica* Ehrenberg y *Nitzschia* spp., las algas pardas *E. siliculosus* y *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman, y las algas verdes *Ulveella leptochaete* (Huber) R. Nielsen, C.J. O'Kelly y B. Wylor fueron epífitas raras en *C. sinuosa* y los 19 taxones restantes registrados fueron epífitas ocasionales. No se observaron epífitas muy abundantes en los talos de *C. sinuosa*.

La abundancia de epífitos en *L. marina* mostraron diferencias significativas entre los meses examinados (ANOVA, $F_{(6; 21)} = 24$; $P < 0,001$) (Fig. 25). La mayor abundancia se registró en abril, con 3064 ± 771 ind. observados y el más bajo en los períodos diciembre-enero y octubre-noviembre, con 49 ± 18 , 296 ± 43 , 132 ± 26 y 87 ± 10 ind., respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia de epífitas en las diferentes regiones del talo de *L. marina* (superior, lateral y basal) (ANOVA, $F_{(2; 21)} = 0,202$; $P = 0,8175$).

En *C. sinuosa*, la abundancia de epífitos fue similar entre los meses (ANOVA, $F_{(6; 21)} = 1,14$; $P = 0,38$) (Fig. 25). Sin embargo, las abundancias de epífitos en las diferentes regiones del talo de *C. sinuosa* fueron significativamente diferentes (ANOVA, $F_{(2; 21)} = 4,51$; $P = 0,02$). La mayor abundancia se registró en las regiones basales del talo huésped, con 222 ± 84 ind., y la más baja en las regiones lateral y superior, con 112 ± 67 y 127 ± 65 ind., respectivamente.

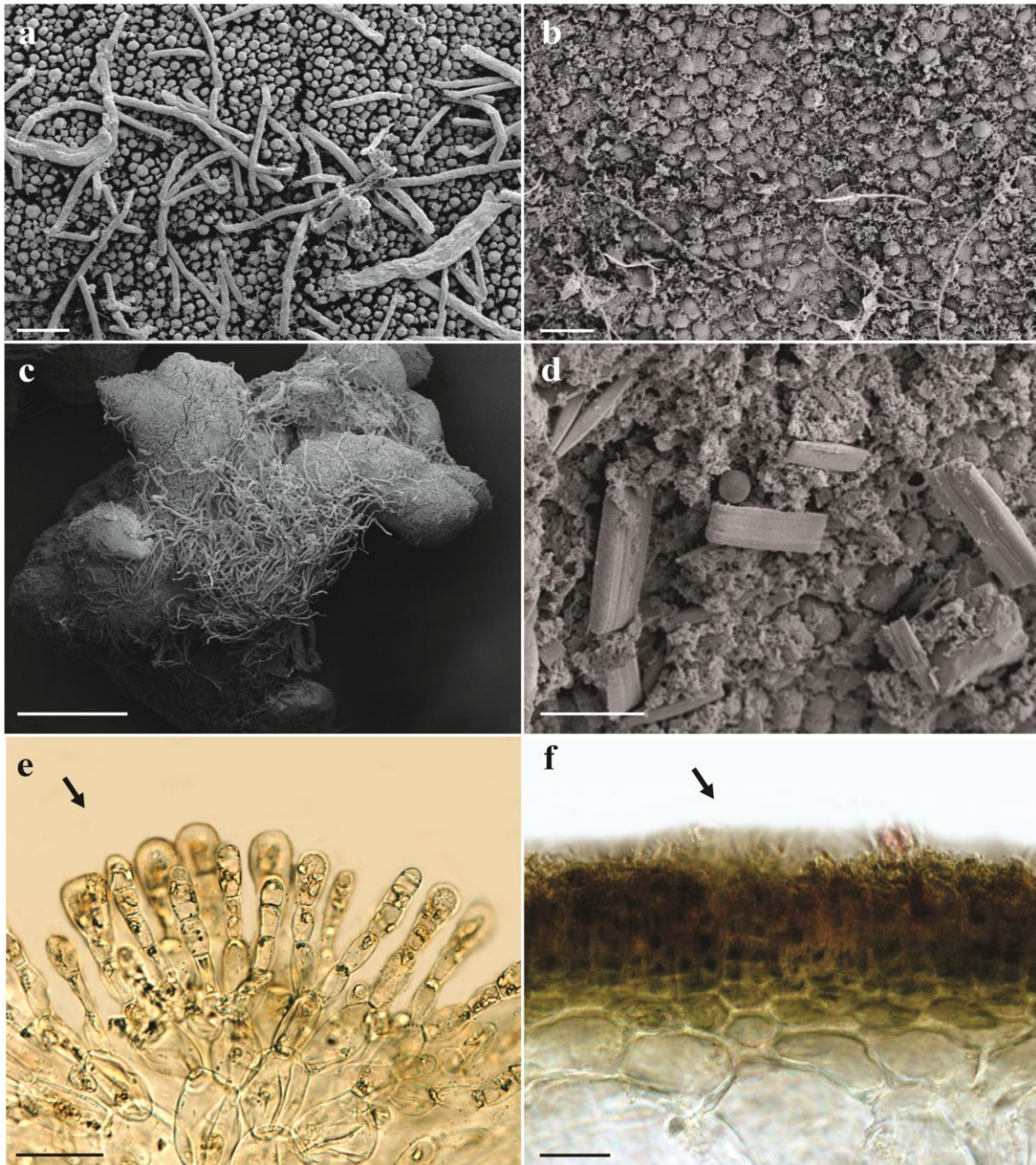


Figura 23. Morfología del macrotalo de *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*. a. Macrotalo de *L. marina*. Detalles de la capa cortical con pelos hialinos. b. Macrotalo de *C. sinuosa*. Detalle de la capa cortical con cutícula. c. Epífitos sobre *L. marina*. d. Epífitos en *C. sinuosa*. e. *L. marina* en CT mostrando células medulares, capa cortical y filamentos asimiladores (flecha). f. *C. sinuosa* en CT que muestra células medulares y capa cortical con cutícula (flecha). Barras escala: a= 40 μm , b, d, e y f= 20 μm , c= 1 mm MO: e y f. MEB: a, b, c, d. CT: corte transversal.

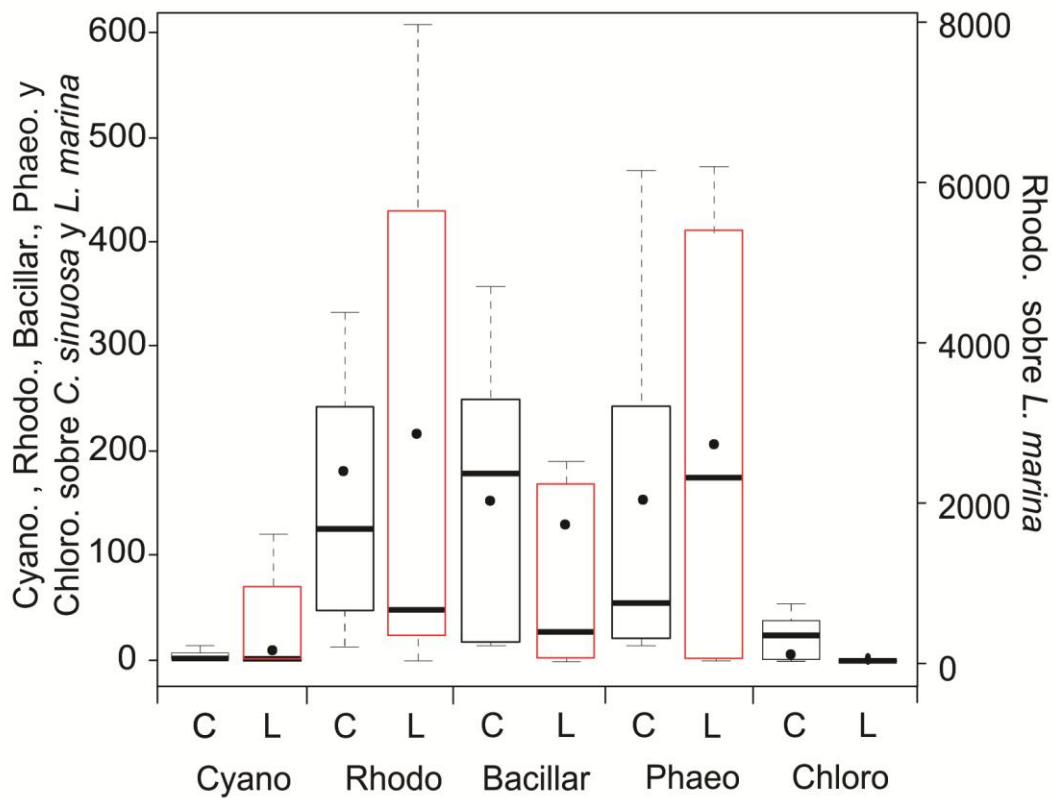


Figura 24. Abundancia de taxones de Cyanophyceae (Cyano), Rhodophyceae (Rhodo), Bacillariophyceae (Bacillar), Phaeophyceae (Phaeo) y Chlorophyceae (Chloro) en *Colpomenia sinuosa* (C) y *Leathesia marina* (L) durante el período de muestreo. Las cajas comprenden los cuartiles de 25 y 75% de todos los datos de abundancia. La línea central representa la mediana y los valores promedio fueron marcados con un punto. La longitud de las barras representa el 25% de los datos superiores e inferiores.

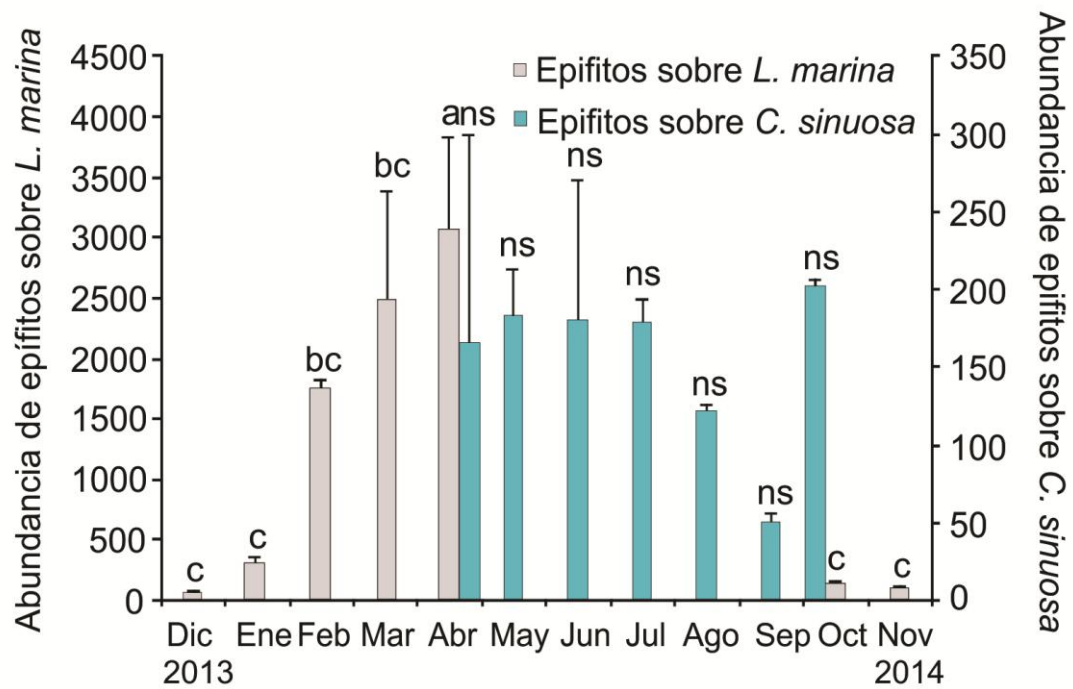


Figura 25. Abundancia mensual de epífitos sobre *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa* (nº 2100 mm²; media ± EE). Las diferencias significativas (α < 0,05) están indicadas por diferentes letras usando el test HSD Tukey.

3.3. Estacionalidad de la comunidad epifítica

Los resultados obtenidos de los análisis de nMDS y SIMPER con el índice de Bray- Curtis, para determinar la contribución de las especies durante los meses muestreados se muestran en la figura 26 y tablas 4-6. Los mismos señalaron una clara diferenciación en la composición epifítica y la abundancia a lo largo de los meses en ambos hospedadores con la aplicación del análisis SIMPER.

Se observó una marcada separación entre diciembre y los otros meses en la comunidad de epífitos en *L. marina*. Esta diferenciación se debió a la gran abundancia del alga verde *Urospora penicilliformis* (Roth) Areschoug. En junio, julio y agosto se observó un segundo grupo que muestra la comunidad epifítica sobre *C. sinuosa* correspondiente a los meses fríos. Este grupo integró muestras con una gran abundancia de diatomeas, como *Navicula* spp., *G. oceanica* y *Nitzschia* spp. También fue posible visualizar un grupo común integrado por epífitas observadas tanto en *L. marina* como en *C. sinuosa* que incluyó abundancias altas de *E. carnea*, *E. siliculosus* y *Polysiphonia* spp.

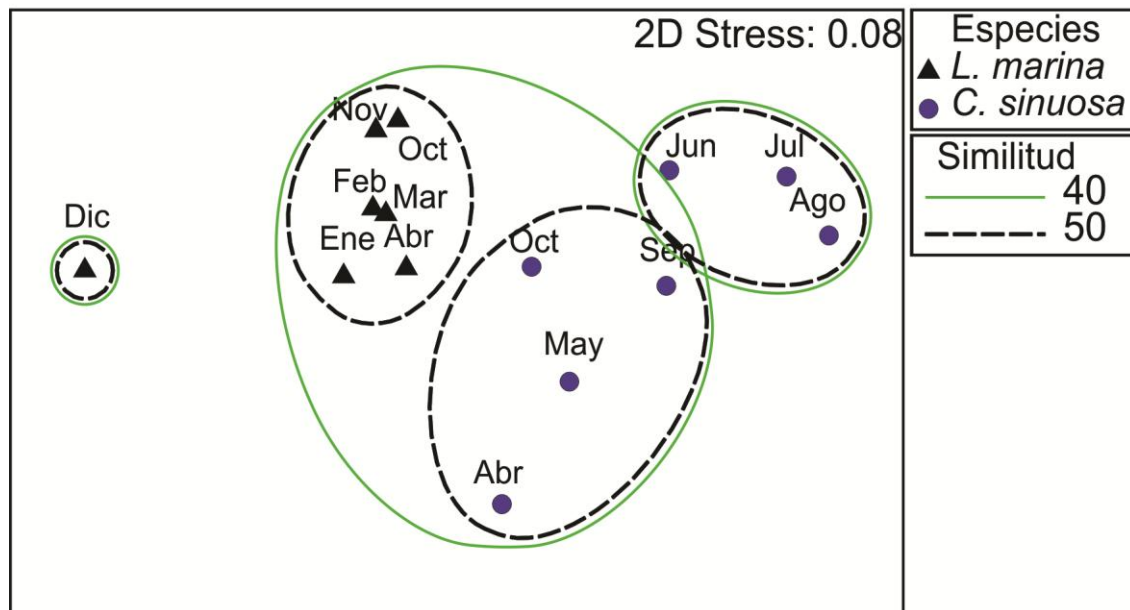


Figura 26. Diagrama de escalonamiento multidimensional no métrico (nMDS) que muestra la variabilidad que separa los grupos de epífitos en cuanto a abundancia y composición en *Leathesia marina* y *Colpomenia sinuosa*. Niveles de similitud de 40-50%.

Tabla 4: Resultado del análisis SIMPER. Solo fueron considerados los meses que difieren en más del 50% de disimilitud.

		Disimilitud (%)											
		Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
Disimilitud (%)	Diciembre	-	64,3	75,78	77,56	83,03	84,29	86,18	89,21	91,27	89,04	82,74	71,28
	Enero	64,3	-	-	-	-	-	62,18	78,04	84,08	-	-	-
	Febrero	75,78	-	-	-	-	-	57,89	74,2	82,57	56,17	-	-
	Marzo	77,56	-	-	-	-	-	61,22	77,69	86,71	58,8	-	-
	Abril	83,03	-	-	-	-	-	66,83	75,07	82,34	60,47	57,77	59,1
	Mayo	84,29	-	-	-	-	-	52,7	57,67	64,4	56,44	59,33	60,96
	Junio	86,18	62,18	57,89	61,22	66,83	52,7	-	-	-	51,28	53,31	54,95
	Julio	89,21	78,04	74,2	77,69	75,07	57,67	-	-	-	55,2	68,92	76,86
	Agosto	91,27	84,08	82,57	86,71	82,34	64,4	-	-	-	59,15	73,58	83,36
	Septiembre	89,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,1
	Octubre	82,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Noviembre	71,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 5: Resultado del análisis SIMPER. En la tabla se consideraron las especies con mayor contribución en los meses de Diciembre – Abril con más del 50% de similitud.

Hospedador	Mes	Número	Especies	Contribución%	Similitud%
<i>L. marina</i>	Diciembre	Sp. 28	<i>Urospora penicilliformis</i>	79,54	74,73
		Sp. 3	<i>Polysiphonia</i> spp.	11,5	
		Total %		91,04	
<i>L. marina</i>	Enero	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	42,91	80,75
		Sp. 26	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	30,02	
		Sp. 3	<i>Polysiphonia</i> spp.	12,87	
		Sp. 9	<i>Navicula</i> spp.	7,51	
		Total %		93,31	
<i>L, marina</i>	Febrero	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	47,78	82,29
		Sp. 26	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	20,12	
		Sp. 9	<i>Navicula</i> spp	10,81	
		Sp. 3	<i>Polysiphonia</i> spp.	10,65	
		Sp. 1	<i>Oscillatoria corallinae</i>	4,07	
		Total %		93,44	
<i>L, marina</i>	Marzo	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	53,51	81,59
		Sp. 26	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	23,39	
		Sp. 3	<i>Polysiphonia</i> spp.	13,45	
		Total %		90,35	
<i>L. marina</i> y <i>C. sinuosa</i>	Abril	Sp. 26	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	32,78	52,33
		Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	23,24	
		Sp. 27	<i>Pylaiella littoralis</i>	14,99	
		Sp. 3	<i>Polysiphonia</i> spp.	12,13	
		Sp. 13	<i>Licmophora</i> sp.	8,12	
		Total %		91,25	

Tabla 6: Resultado del análisis SIMPER. En la tabla se consideraron las especies con mayor contribución en los meses de Mayo – Junio con más del 50% de similitud.

Hospedador	Mes	Número	Especies	Contribución%	Similitud%
<i>C. sinuosa</i>	Mayo	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	33,92	54,23
			<i>Grammatophora</i>		
		Sp. 17	<i>oceanica</i>	20,23	
		Sp. 9	<i>Navicula</i> spp.	14,35	
		Sp. 13	<i>Licmophora</i> sp.	9,89	
		Sp. 26	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	7,87	
		Sp. 27	<i>Pylaiella littoralis</i>	6,73	
	Total %		93		
<i>C. sinuosa</i>	Junio	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	38,05	58,04
		Sp. 4	<i>Colaconema daviesii</i>	25,79	
		Sp. 9	<i>Navicula</i> spp.	11,23	
		Sp. 27	<i>Pylaiella littoralis</i>	10,13	
		Sp. 23	<i>Nitzschia</i> spp.	8,29	
		Total %		93,49	
<i>C. sinuosa</i>	Julio	Sp. 9	<i>Navicula</i> spp.	19,53	74,38
		Sp. 23	<i>Nitzschia</i> spp.	15,33	
		Sp. 4	<i>Colaconema daviesii</i>	12,84	
		Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	11,93	
			<i>Grammatophora</i>		
		Sp. 17	<i>oceanica</i>	9,54	
		Sp. 30	<i>Ulvella lens</i>	6,86	
		Sp. 27	<i>Pylaiella littoralis</i>	5,18	
		Sp. 8	<i>Pinnularia</i> spp.	4,12	
		Sp. 7	<i>Cocconeis</i> sp.	3,87	
Sp. 21	<i>Rhoicosphenia</i> sp.	3,73			
	Total %		92,92		
<i>C. sinuosa</i>	Agosto		<i>Grammatophora</i>		59,91
		Sp. 17	<i>oceanica</i>	21,91	
		Sp. 9	<i>Navicula</i> spp.	17	
		Sp. 21	<i>Rhoicosphenia</i> sp.	15,4	
		Sp. 23	<i>Nitzschia</i> spp.	13,93	
		Sp. 29	<i>Acrochaete polymorpha</i>	13,69	
		Sp. 20	<i>Rhabdonema</i> sp.	5,9	
		Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	5,03	
	Total %		92,86		
<i>C. sinuosa</i>	Septiembre	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	26,33	67,79
		Sp. 26	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	25,51	
		Sp. 31	<i>Epicladia</i> sp.	21,13	
		Sp. 4	<i>Colaconema daviesii</i>	10,16	
		Sp. 23	<i>Nitzschia</i> spp.	4,72	
		Sp. 27	<i>Pylaiella littoralis</i>	4,68	
	Total %		92,54		
<i>L. marina</i> y <i>C. sinuosa</i>	Octubre	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	61,61	52,67
		Sp. 4	<i>Colaconema daviesii</i>	9,63	
		Sp. 27	<i>Pylaiella littoralis</i>	8,87	
		Sp. 26	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	7,67	
		Sp. 3	<i>Polysiphonia</i> spp.	4,12	
	Total %		91,9		
<i>L. marina</i>	Noviembre	Sp. 2	<i>Erythrotrichia carnea</i>	77,65	75,75
		Sp. 3	<i>Polysiphonia</i> spp.	17,67	
		Total %		95,32	

3.4. Riqueza, diversidad, equitatividad y dominancia del ensamble de epífitos

La riqueza de especies fue homogénea en ambos hospedadores (ANOVA, $F_{(1; 42)} = 0,99$; $P = 0,32$). Se registraron 27 taxones de epífitos en *L. marina* y 25 taxones de epífitos en *C. sinuosa*. Los índices de diversidad de epífitos mostraron diferencias significativas entre ambos hospedadores (ANOVA, $F_{(1; 42)} = 18,81$; $P < 0,001$) siendo mayor en *C. sinuosa*, que en *L. marina*. La mayor diversidad fue registrada en julio con un índice de $H' = 2,4 \pm 0,21$ sobre *C. sinuosa* y la más baja en diciembre $H' = 0,42 \pm 0,06$ (Fig. 27 a). En cuanto a los índices de equitatividad de epífitos también mostraron diferencias significativas entre ambos hospedadores (ANOVA, $F_{(1; 42)} = 91,2$; $P < 0,001$), registrándose mayor equitatividad en *C. sinuosa* que en *L. marina*.

La mayor equitatividad de epífitos fue registrada en septiembre ($J' = 0,83 \pm 0,19$) sobre *C. sinuosa* y el más baja en octubre ($J' = 0,17 \pm 0,05$) sobre *L. marina* (Fig. 27 b). La menor diversidad y equitatividad observada en los macrotalos de *L. marina* estuvo relacionada con un alta dominancia del alga verde *Urospora penicilliformis* ($\lambda = 0,87 \pm 0,02$) observada durante diciembre y el alga roja *Erythrotrichia carnea* durante los meses restantes, siendo especialmente elevada durante octubre ($\lambda = 0,90 \pm 0,1$) y noviembre ($\lambda = 0,82 \pm 0,04$). *C. sinuosa* no presentó dominancia de ninguna especie de epífitos durante el período analizado (Fig. 27 c).

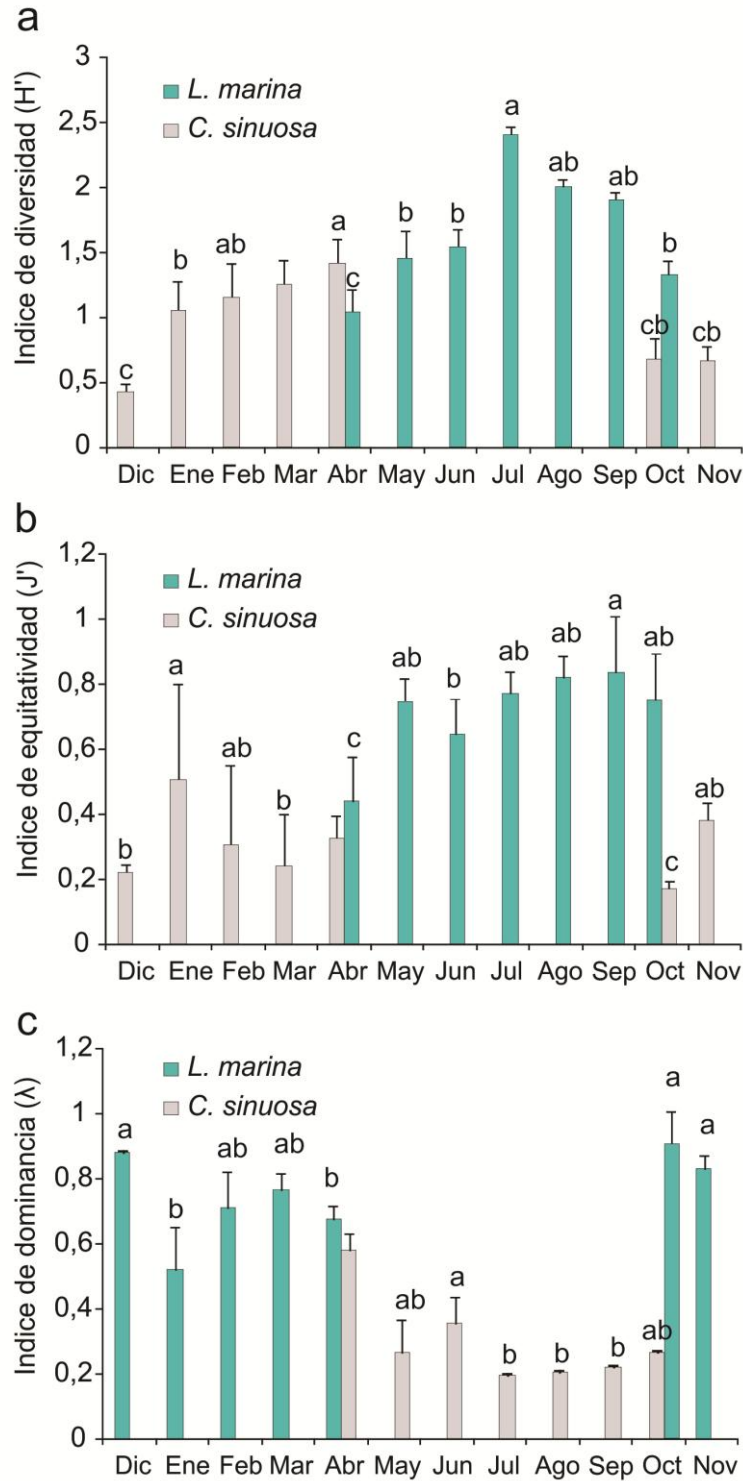


Figura 27. Índices ecológicos en la comunidad de epifitos de *Leathesia marina* y de *Colpomenia sinuosa*. a. Índice de diversidad de Shannon-Wiener H' b. Índice de equitatividad ecológica de Pielou J' , c. Índice de *dominancia* de Simpson (λ). Las diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) están indicadas por diferentes letras usando el test HSD Tukey.

3.5. El epifitismo asociado a la abundancia del los hospedadores y los parámetros ambientales

En el análisis de correspondencia canónica (CCA) los dos primeros ejes explicaron el 93,75% de la variación conjunta de los datos ambientales (temperatura del agua de mar, fotoperiodo y radiación solar), abundancia de *L. marina* y de *C. sinuosa* y abundancia de epífitos (Fig. 28).

Los epífitos tales como *Erythrotrichia carnea*, *Polysiphonia* spp., *Cocconeis* spp. y *Pinnularia* spp., se agruparon junto con una alta abundancia del macrotalo de *L. marina* y correspondientes a los meses más calurosos y cálidos, caracterizados por la alta temperatura del agua de mar, fotoperiodos más largos y una alta radiación solar. Las diatomeas *Navicula* spp., *G. oceanica*, *Nitzschia* spp. y el alga roja *Colaçonema daviesii* (Dillwyn) Stegenga estuvieron asociadas con los meses más fríos, caracterizados por la baja temperatura del agua de mar, fotoperiodos más cortos y una baja radiación solar. El alga parda *Ectocarpus siliculosus* se asoció con una gran abundancia de *C. sinuosa* reportada en octubre.

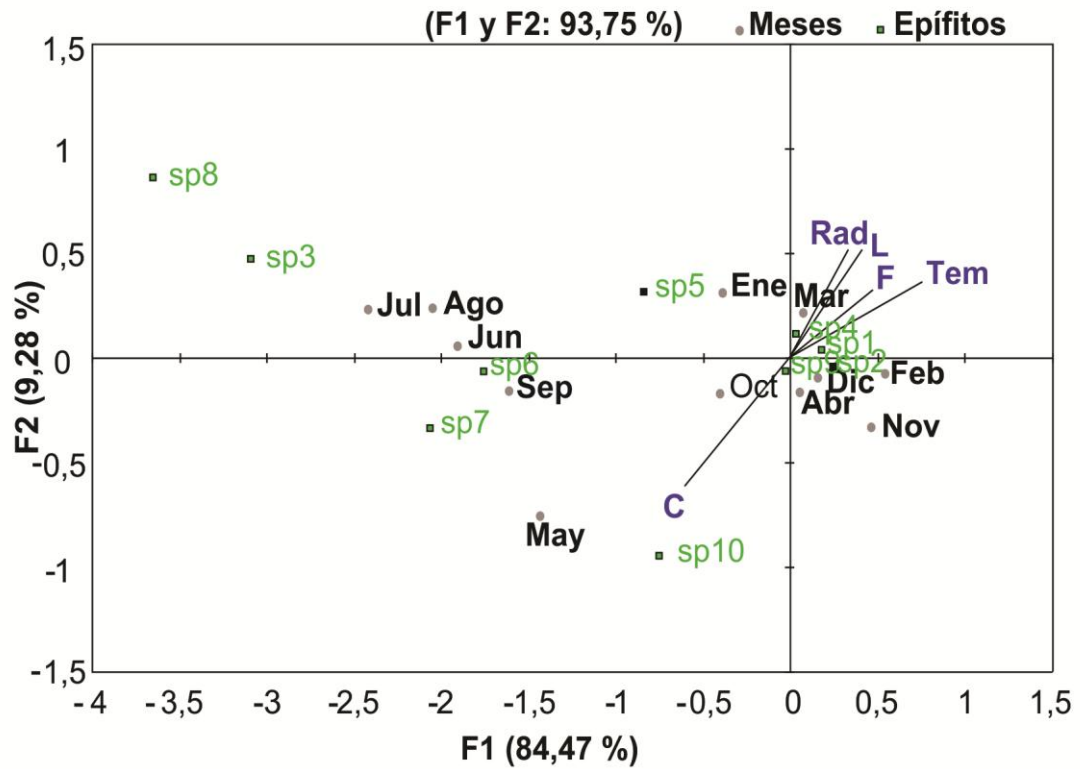


Figura 28. Gráfico de análisis de correspondencia canónica (CCA). Relación temporal entre la abundancia de epífitos: *Erythrotrichia carnea* (sp. 1), *Polysiphonia* spp. (sp. 2), *Colaconema daviesii* (sp. 3), *Cocconeis* spp. (sp. 4), *Pinnularia* spp. (sp. 5), *Navicula* spp. (sp. 6), *Grammatophora oceanica* (sp. 7), *Nitzschia* spp. (sp. 8), *Ectocarpus siliculosus* (sp. 9), *Pylaiella littoralis* (sp. 10); y parámetros ambientales: temperatura del agua de mar (Tem), fotoperiodo (F), radiación solar (Rad), y abundancia de *Leathesia marina* (L) y *Colpomenia sinuosa* (C).

4. Discusión

En nuestro país, las relaciones interespecíficas ya han sido estudiadas en otras macroalgas como *Hymenena* (Gauna y Parodi 2008), *Undaria* (Gauna *et al.* 2009 c) *Rhodymenia* (Gauna *et al.* 2009 a y b), *Dictyota* (Gauna *et al.* 2015), *Ulva* (Siniscalchi *et al.* 2012, Gauna *et al.* 2016). Sin embargo, el epifitismo sobre especies de *Leathesia* y *Colpomenia* se describe por primera vez en este estudio.

Se observó una sucesión bien marcada entre los macrotalos de ambos hospedadores pardos, con una superposición de ocurrencia de solo dos meses (abril y octubre), indicando una estacionalidad bien marcada asociada con las condiciones ambientales.

En un sentido ecológico, ambos hospedadores presentaron una naturaleza efímera, caracterizados por un ciclo de vida corto, una morfología del talo simple, con susceptibilidad a cambios estacionales, formando parches solo cuando las condiciones estacionales fueron favorables, y caracterizados por presentar una relación alta superficie/volumen (Eriksson *et al.* 2002, Piazzini *et al.* 2012).

Ambos macrotalos hospedadores comparten el mismo nicho ecológico espacial, pero se encuentran separados en el tiempo.

Varias especies epífitas de esporófitos de *L. marina* y gametófitos de *C. sinuosa* fueron anteriormente mencionadas en hospedadores pertenecientes a las Chlorophyceae (Nielsen y McLachlan 1986, Nielsen 1988), a las Rhodophyceae (Russell y Fielding 1974, Kitayama y Garrigue 1998), a las Bacillariophyceae (Mendoza-González y Mateo-Cid 1996), a las Pheophyceae (Gauna 2016), a las

Cyanophyceae (Crispino y Sant'Anna 2006) y en fanerógamas marinas, lo que indicaría que son típicos representantes de hábito epifítico.

Además, la mayoría de las algas epífitas identificadas y cuantificadas en este estudio presentaron un talo filamentoso no-corticado y se observaron principalmente como individuos inmaduros sin ningún desarrollo de estructura reproductiva. Este hecho puede deberse a la naturaleza efímera de los macrotalos de *L. marina* y *C. sinuosa*. Esta naturaleza efímera de ambas especies hospedadoras fue discutida por Vandermeulen y DeWreede (1986), Somsueb *et al.* (2001) y Eriksson *et al.* (2002). Se trata de poblaciones muy dinámicas con picos conspicuos de abundancia estacional y una alta proporción de estructuras reproductivas durante toda la temporada.

La variación en la abundancia estacional en una comunidad de algas epífitas puede estar relacionada con la variación en el ambiente físico, la estacionalidad, la presión de pastoreo o las necesidades y preferencias de las algas epífitas por el sustrato del huésped (Michael *et al.* 2008). Según González y Goff (1989) la relación entre el alga epífita y el hospedador se establece sobre bases químicas, físicas y ecológicas. Al hospedador se le asientan las algas epífitas de acuerdo con los recursos que proporciona, como la disponibilidad de espacio, refugio, trampa de sedimentos y nutrientes (Jones y Thornber 2010).

El número elevado de especies epifíticas encontradas sobre los talos de *L. marina* y *C. sinuosa* probablemente se relacionó con dos principales factores: 1) la coincidencia de la distribución de las macroalgas en una región caracterizada por la presencia de varias especies con hábito de vida predominantemente epifítico no especie específico y 2) la morfología del hospedador.

Ambos hospedadores analizados, *L. marina* y *C. sinuosa*, compartieron el 64,5% del conjunto de algas epífitas encontradas. Este resultado indicó que el ensamble de epífitos no estuvo asociado con un huésped en particular. Sin embargo, se observaron marcadas diferencias en la abundancia de algas epífita entre los hospedadores, siendo mayores en el esporófito de *L. marina* durante las estaciones templadas y cálidas en comparación con una menor abundancia epifítica, que en el gametófito de *C. sinuosa* durante la estación fría.

En estudios previos realizados en la costa patagónica, se encontró un ensamble similar de epífitos sobre una población de *Ulva* sp. que crece en la zona intermareal inferior. También se observó una mayor abundancia epifítica en esta macroalga verde durante las estaciones templadas y cálidas y una menor abundancia durante la estación fría (Gauna *et al.* 2016). Esta observación sugiere que la abundancia de las algas epífitas en ambas especies analizadas en este estudio se relacionó con las condiciones ambientales. A lo largo de este estudio se observó un aumento gradual en la abundancia de epífitas hacia el final de la temporada del esporófito de *L. marina* en la naturaleza. Este fenómeno podría deberse a la mayor facilidad de colonización a medida que el talo hospedador se vuelve senescente y presenta una disminución de los mecanismos de defensa contra organismos epífitos, a su vez, por un aumento en el tiempo de permanencia del hospedador. Esto también fue observado por Ortuño-Aguirre y Riosmena-Rodríguez (2007) en el alga parda *Padina concrescens* Thivy donde la abundancia epifítica fue más alta cuando el hospedador era senescente. Además, Steinberg y De Nys (2002) y Lane y Kubanek (2008) explicaron que algunas especies solo

tienen mayor cantidad de epífitas durante ciertos períodos del año, lo que puede correlacionarse aparentemente con cambios metabólicos en el hospedador.

Se observó una marcada temporalidad en la composición de las algas epífitas en *L. marina*. Además una baja diversidad y equitatividad estuvo acompañada de una clara dominancia de las especies *Urospora penicilliformis* y *Erythrotrichia carnea*. Sin embargo, en lo que respecta a *C. sinuosa*, no se observó una temporalidad de las algas epífitas. Esto a su vez estuvo acompañado de una mayor equitatividad y diversidad, pero de una menor abundancia de algas epífitas sobre los gametófitos de *C. sinuosa*, sin la dominancia de ninguna especie epífita. En relación a las clases de algas epífitas, Bacillariophyceae fue el grupo con la mayor riqueza de especies en ambos hospedadores. Las diatomeas son generalmente los componentes más abundantes de las comunidades de epífitas y colonizadores primarios de las superficies marinas, por lo tanto, juegan un papel crucial en la estructura de las comunidades de algas (Hernández-Almeida y Siqueiros-Beltrones 2008, Kumar *et al.* 2011). Esta preferencia hacia los sustratos algales se ha atribuido a la naturaleza oportunista de muchas de ellas y a la ulterior modulación de la superficie para la fijación de especies pioneras (Sieburth y Thomas 1973, Siqueiros-Beltrones *et al.* 1985).

Las diatomeas epífitas se agrupan sobre la base de su fuerza de adhesión (Tanaka 1986). El grupo de géneros con fuerzas de adhesión más débiles está integrado, entre otros por *Pleurosigma* W. Smith el cual incluye especies predominantemente bentónicas, aunque en este estudio, el taxa *Pleurosigma* sp. presentó abundancias bajas en ambos hospedadores.

Por otro lado, algunas especies que se adhieren con mayor fuerza, como *Navicula* spp., presentaron una mayor incidencia sobre *L. marina* y *C. sinuosa*, mientras que *Grammatophora oceanica* y *Nitzschia* spp. fueron más abundantes en *C. sinuosa*. Es probable que estos taxones sean desprendidos de la superficie hospedadora por la corriente de agua, permitiendo una colonización ocasional, ya que no se adhieren firmemente al sustrato (Hudon y Legendre 1987).

En este estudio, la abundancia de epífitos en diferentes regiones del talo del huésped fue homogénea en los esporófitos de *L. marina*. Sin embargo, se observó un patrón de zonificación sobre *C. sinuosa*, disminuyendo la abundancia epifítica hacia las secciones laterales y superiores. Las algas epifitas con mayor persistencia en el tiempo fueron las que crecieron en las partes inferiores del macrotalo de *C. sinuosa*. La distribución de epífitos en diferentes partes del huésped también ha sido reportada por otros autores. Arrontes (1990) observó diferentes zonas para la posición de epífitos, como los ápices del talo, partes inferiores o intermedias del talo anfitrión, estípites y rizoides. La causa de esta distribución desigual puede deberse a muchos factores, como a las variables condiciones ambientales (por ejemplo, movimiento del agua, la proximidad a la luz) en diferentes partes del huésped, incluidos los efectos de sombreado en el talo (Dayton 1975). Además, una la distribución desigual de los componentes químicos presentes en los hospedadores, podrían actuar como disuasión epifítica (Bjærke y Fredriksen 2003). Adicionales efectos disuasivos han sido también relacionados a las diferente edades celulares y por lo tanto variabilidad temporal en el desarrollo de la comunidad epifita (Ballantine 1979, Krumhansl *et al.* 2015); y

diferencias en la tensión superficial dada por la rugosidad del talo hospedador (Dodds y Biggs 2002).

En las macroalgas con crecimiento meristemático apical, los organismos epífitos generalmente muestran claros patrones de zonación, y el número de especies generalmente disminuye hacia las partes más jóvenes (Bjærke y Fredriksen 2003, Krumhansl *et al.* 2015). Sin embargo, en especies globosas como *Leathesia* y *Colpomenia*, donde el eje multiaxial se reduce a las células que recubren el interior de la corteza (Boraso 2013), la distribución de epífitas no está relacionada con la edad del macrotalo.

La abundancia de epífitos registrada sobre *C. sinoussa* estuvo asociada a caracteres morfológicos, tales como, la textura más suave en las regiones laterales y superiores lo cual proporcionó un área más expuesta a las condiciones ambientales, evitando la colonización por varios organismos epífitos. Además, la presencia de una cutícula de polisacáridos en la superficie de esta especie hospedadora indudablemente afectó la colonización por otras algas, ya sea proporcionando sustratos para el crecimiento pionero de bacterias y pequeñas diatomeas o dificultando el establecimiento de esporas como también fue señalaron por Round (1984) y Yamamoto *et al.* (2013) en *Myagropsis myagroides* (Mertens ex Turner) Fensholt y *Sargassum hemiphyllum* (Turner) C. Agardh.

Se observó un patrón epifítico diferente en *L. marina*, la cual tuvo una textura rugosa con mayor cantidad de intersticios, lo que favoreció el reclutamiento y la colonización de los taxones epífitos. Este mismo fenómeno fue además observado por Arrontes (1990), Reyes y Afonso-Carrillo (1995), Kanamori *et al.* (2004) y Ortuño-Aguirre y Riosmena-Rodríguez (2007) sobre *Padina concrescens* Thivy,

Cystoseira sp., *Gelidium* sp. y *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, donde se observó una mayor abundancia de epífitos en las algas con una mayor área superficial y mayor biomasa para colonizar.

En las costas patagónicas, *L. marina* y *C. sinuosa* ocupan el mismo espacio ecológico pero se separan en el tiempo, ya que cada especie está adaptada a diferentes condiciones ambientales. A pesar de esta separación temporal, ambas especies compartieron una gran proporción de las especies epífitas. De esta manera en este estudio, se demuestra que la variabilidad temporal no juega un papel clave en la explicación del ensamblaje de epífitos del intermareal inferior. Sin embargo, la diferente estructura morfológica de cada especie hospedadora podría explicar la mayor abundancia de epífitas en el macrotalo de *L. marina*. Los factores estudiados, como la morfología y la temporalidad del huésped, contribuyeron significativamente a la variabilidad de la abundancia de las especies y el dominio de la estructura de las epífitas en *L. marina* y *C. sinuosa*.

Este capítulo de tesis representa el primer estudio completo sobre la variabilidad temporal de las comunidades epífitas en las poblaciones de *L. marina* y *C. sinuosa*, con el objetivo de comprender las interacciones entre la dinámica de la comunidad de algas epífitas con los parámetros medioambientales y la dinámica de la población de algas hospedadoras.

Finalmente el conocimiento de la dinámica de la comunidad epífica en esta tesis resultó clave para comprender el estado sanitario ideal de *L. marina* y así seleccionar los momentos de cosecha adecuados cuando el objetivo es realizar cultivos bajo condiciones de controladas con escasa carga epifítica.

Capítulo IV

Propiedades bioactivas de *Leathesia marina* y optimización de su cultivo

1. Introducción

En la actualidad, el interés reciente por cultivar algas se relaciona con una amplia gama de usos, que incluyen: alimentos, fertilizantes, biocombustibles y compuestos bioactivos. Sin embargo, sus usos y aplicaciones todavía están poco explotados o no han alcanzado todo su potencial (Baweja *et al.* 2016).

A nivel mundial, la utilización de algas para consumo humano se reporta históricamente en poblaciones costeras, principalmente en países asiáticos, donde son apreciadas por sus beneficios nutricionales y en la salud (Kumar *et al.* 2015).

Recientemente varios estudios se centraron en el valor nutricional de las algas marinas enfocándose en el contenido bioquímico, para explorar su posible uso como fuente de proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, minerales y pigmentos (Holdt y Kraan 2011, Cazón *et al.* 2014, Verma *et al.* 2017). Además, los extractos de algas marinas presentan variados beneficios ya que contienen sustancias bioactivas como polifenoles con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Kumar *et al.* 2008). Esto le proporciona a las algas un

gran potencial como suplemento en alimentos funcionales o para la extracción de compuestos.

Entre las algas pardas, se conoce que las especies del género *Leathesia* son fuentes de abundantes metabolitos secundarios, dada la presencia de altos contenidos de bromofenoles (Xu *et al.* 2004, Shi *et al.* 2009), florotaninos (Heo *et al.* 2005) y polisacáridos sulfatados (Feldman *et al.* 1999). Estos compuestos tienen actividad antitumoral y antioxidante; también han demostrado ser agentes antivirales selectivos contra el virus del herpes simple (VHS) tipos 1 y 2 y el citomegalovirus humano. Por otra parte, los extractos de *Leathesia* demostraron actividad tripanocida *in vitro*, actividades leishmanicida y antimicobacterianas (Spavieri *et al.* 2010).

Como fue mencionado en los capítulos anteriores, *L. marina* presenta un ciclo de vida heteromórfico típico, alternaran entre una fase gametofítica filamentosa microscópica y una fase esporofítica globosa macroscópica. Ambas fases, exhiben un alto grado de independencia y diferenciación y presentan limitaciones ecológicas y evolutivas únicas; siendo capaz de sobrevivir y/o reproducirse bajo diferentes recursos y condiciones ambientales (Schiel y Foster 2006).

De esta forma, el estudio de la supervivencia de las diferentes fases, luego del asentamiento de esporas y cigotos, es fundamental para comprender la dinámica del asentamiento exitoso de las poblaciones en condiciones de cultivo (Yoneshigue-Valentin 1990). Además, la mortalidad temprana de muchas algas, en los días posteriores al asentamiento, podría ser el cuello de botella para el reclutamiento exitoso (Mc Lachlan 1974, Vadas *et al.* 1992).

Los procesos que influyen en el asentamiento de esporas y cigotos, correspondiente a las primeras etapas de la vida del alga, se pueden clasificar según Vadas *et al.* (1992) en factores intrínsecos y extrínsecos. Las variables intrínsecas son aquellas inherentes a la especie y que no se encuentran afectadas por el medio ambiente, por ejemplo, aspectos relativos a la edad del individuo/tiempo de incubación, requisitos específicos de germinación, hacinamiento, etc. En las etapas iniciales, el asentamiento y supervivencia dependen en gran medida de procesos intrínsecos. Sin embargo, las variables abióticas, como la temperatura del agua de mar, la radiación y las concentraciones de nutrientes, considerados como factores extrínsecos, también afectan la colonización y el reclutamiento, ya que intervienen en el proceso de fotosíntesis, la excreción de mucilago, el crecimiento, etc. y, por lo tanto, tienen efecto sobre la dinámica de las poblaciones naturales de algas (Underwood y Fairweather 1989).

Por ese motivo la necesidad de ajustar las condiciones de crecimiento en los cultivos de *Leathesia* resulta fundamental para proporcionar mayor de biomasa del alga para su utilización con fines biotecnológicos y evitar la sobreexplotación de las poblaciones naturales.

A pesar del potencial de *L. marina* en campos de la ficología aplicada, actualmente no se han publicado datos sobre los métodos de cultivo y las condiciones óptimas de crecimiento.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- *Analizar la composición bioquímica del esporófito de *L. marina* para evaluar su potencial uso como fuente de compuestos bioactivo, mediante la determinación del contenido de materia orgánica, alginatos, carbohidratos, proteínas, polifenoles, evaluación de la actividad antioxidante y composición elemental.*
- *Establecer cuáles son las mejores condiciones de cultivo controlado para (i) el crecimiento, la supervivencia y el almacenamiento de esporófitos y gametófitos y (ii) el control de la fertilidad de los gametófitos y su almacenamiento a largo plazo, evaluando los efectos de tres variables: temperatura, concentración de nutrientes y tiempo de incubación para las fases esporofítica y gametofítica.*

2. Materiales y métodos

Las muestras de *L. marina* se recolectaron en Punta Este sobre el Golfo Nuevo (Fig. 1, ver capítulo I).

2.1. Composición química y actividad antioxidante de *L. marina*

Los análisis químicos se realizaron sobre la fase esporofítica macroscópica, ya que constituye la mayor biomasa en la naturaleza, en relación a la fase gametofítica microscópica. En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado.

2.1.1. Contenido de materia orgánica

Para la determinación del contenido de materia orgánica, 50 g. de alga fresca se secaron en estufa a 60°C hasta alcanzar peso constante, y así determinar el peso seco; luego se incineraron a 500°C en una mufla para determinar el contenido de la ceniza. El porcentaje de materia orgánica se calculó restando el peso de la ceniza al peso seco del alga.

2.1.2. Contenido de carbohidratos

Para determinar el contenido de carbohidratos, se analizaron dos extractos siguiendo el método propuesto por Andrade *et al.* (2004). Para la preparación del primer extracto, se molieron 250 mg. de alga liofilizada y se sumergieron en 15 ml de agua Milli-Q con agitación durante 24 h. El segundo extracto se preparó también con 250 mg de alga liofilizada molida que se sumergió en 15 ml de KOH al 5% y se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Luego, el alga molida se separó del sobrenadante por centrifugación (4°C, 10,000 g, durante 20 min.). La determinación de carbohidratos totales para ambos extractos se cuantificaron siguiendo el método de Dubois *et al.* (1956). Para ello, se colocaron 2 ml del extracto en tubos de vidrio que se mezclaron con 0,5 ml de fenol al 3% y 5 ml de H₂SO₄ concentrado. Se dejó incubar en baño de hielo durante 30 min., luego se leyó en el espectrofotómetro a 490 nm. (Fig. 29).

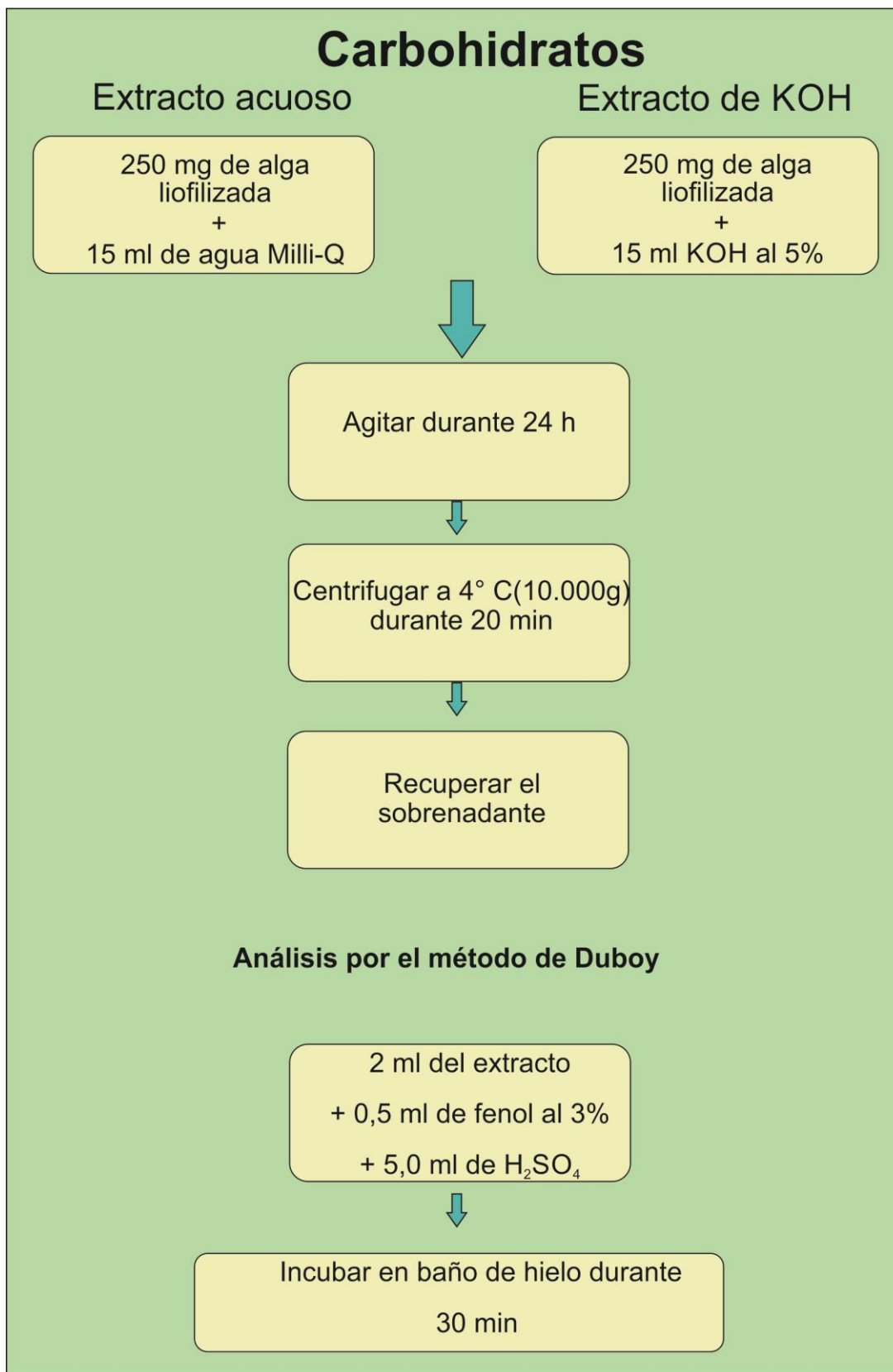


Figura 29. Protocolo para la extracción de carbohidratos en *Leathesia marina*.

2.1.3. Contenido de alginatos

El pre-tratamiento de la muestra y extracción para la cuantificación del alginato se basaron en Mc Hugh (1987). Para el pre-tratamiento de la muestra se mezclaron 5 g. de alga seca, triturada y tamizada con 160 ml de solución de formaldehído al 0,4% bajo agitación constante, durante 30 min. Las soluciones se desecharon y el material algal triturado se lavó con agua destilada. Luego, las algas se pusieron en 160 ml de HCl 0,1 N durante 2 h. Estos tratamientos de lavado resultaron necesarios para eliminar los compuestos fenólicos y aclarar la biomasa (Bertagnolli *et al.* 2014).

La extracción propiamente dicha se realizó con 110 ml de Na₂CO₃ al 2% durante 5 h a 60°C. Como resultado se obtuvo una mezcla viscosa que se filtró para separar el residuo sólido de la solución de alginato (conservando el residuo). El alginato se precipitó con etanol-agua destilada (1:1) y luego se secó en estufa a 60°C hasta alcanzar peso constante. Luego se realizó una segunda extracción utilizando el residuo. Para ella se secó el residuo en estufa a 60°C hasta llevar a peso constante. Posteriormente, se puso nuevamente en contacto con 160 ml de Na₂CO₃ al 2% durante 5 h a 60°C y la precipitación de alginato fue nuevamente lograda con etanol-agua.

El rendimiento de alginato se calculó como un porcentaje del peso final, basado en el peso seco inicial del alga como expresan las siguientes ecuaciones (Fig. 30):

$$\text{Rendimiento de alginato}(\%) = \left(\frac{\text{peso seco del alginato}}{\text{peso seco del alga antes de la extracción}} \right) \times 100$$

$$\text{Rendimiento del residuo}(\%) = \left(\frac{\text{peso seco del alginato}}{\text{peso seco del residuo del alga}} \right) \times 100$$

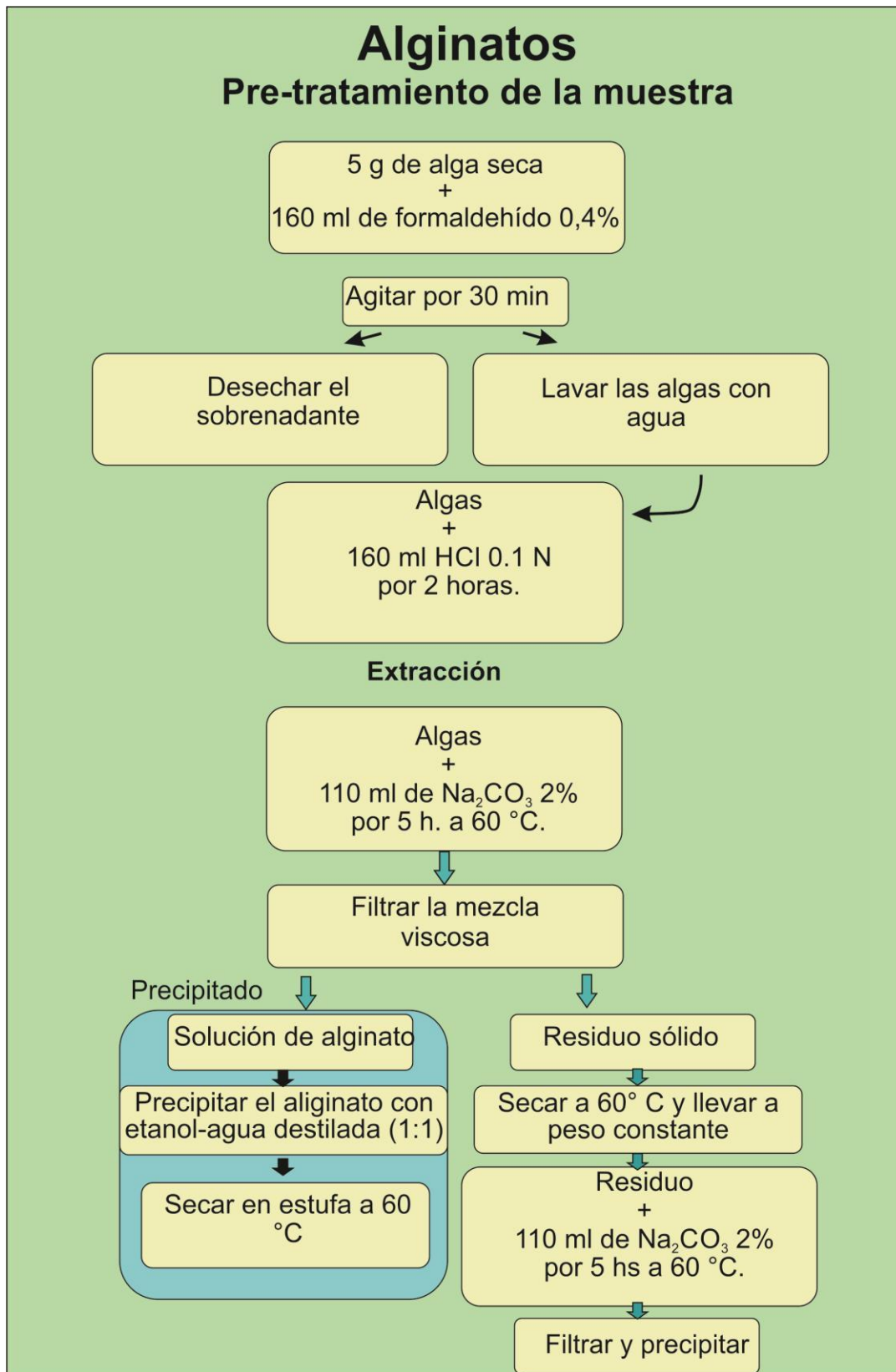


Figura 30. Protocolo para la extracción de alginatos en *Leathesia marina*.

2.1.4. Extracción de proteínas

El procedimiento de extracción de proteínas se basó en el protocolo de Barbarino y Lourenço (2005). Para ello se sumergieron 50 mg de alga liofilizadas en 4 ml de agua Milli-Q durante 12 h a 4°C. Después del período de incubación, se centrifugó a 4°C a 10.000 g durante 20 min., el sobrenadante se recogió y se mantuvo a 4°C. En el precipitado se volvió a realizar una extracción con 2 ml de NaOH 1 N por 1 h. Luego, el extracto se centrifugó a 4°C a 10.000 g durante 20 min. El primero y segundo sobrenadante se mezclaron y el sedimento se descartó. Se usaron alícuotas de estos extractos “crudos” para realizar la cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry (1951).

Una parte de los extractos obtenidos previamente se utilizaron para realizar una precipitación de proteínas siguiendo a Berges *et al.* (1993). Para ello se añadió ácido tricloroacético (TCA) frío al 25% en una proporción de 2,5:1 (TCA: sobrenadante). Los tubos conteniendo TCA y proteína se incubaron en baño de hielo durante 30 min. y luego se centrifugaron durante 20 min a 10.000 g y a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con TCA frío al 10% y luego se centrifugó nuevamente. El precipitado que se formó después de una segunda centrifugación se resuspendió en TCA al 5% a temperatura ambiente, en una proporción de 5:1 (5% TCA: precipitado) y se centrifugó a 21°C y 10.000 g durante 20 min. Los pellet de proteína se almacenaron a -20°C hasta ser analizados. La proteína precipitada se resuspendió en 2 ml de NaOH 0,1 N y se cuantificó mediante el método de Lowry (1951).

2.1.5. Análisis del contenido de proteínas por el método de Lowry

Para el método Lowry, a 1 ml de muestra se le incorporó 5 ml del reactivo "C" formado por: 50 volúmenes del reactivo "A" (Na_2CO_3 al 2% + NaOH 0,1 N) + 1 volumen del reactivo "B" (0,5 volumen de CuSO_4 al 0,5% + H_2O + 0,5 volumen de $\text{C}_4\text{H}_4\text{NaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ al 1%). Luego se añadió 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu 1927) diluido en dos volúmenes de agua ultrapura (1:2). Después de la adición de cada reactivo, las muestras se agitaron la homogeneización. La absorbancia se midió a 750 nm, 35 min. después del inicio de la reacción química a temperatura ambiente. El contenido de proteína se evaluó por medio de una curva de calibrado, utilizando como estándar una solución de albúmina de suero bovino (BSA) con máxima concentración de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figs. 31 y 32).

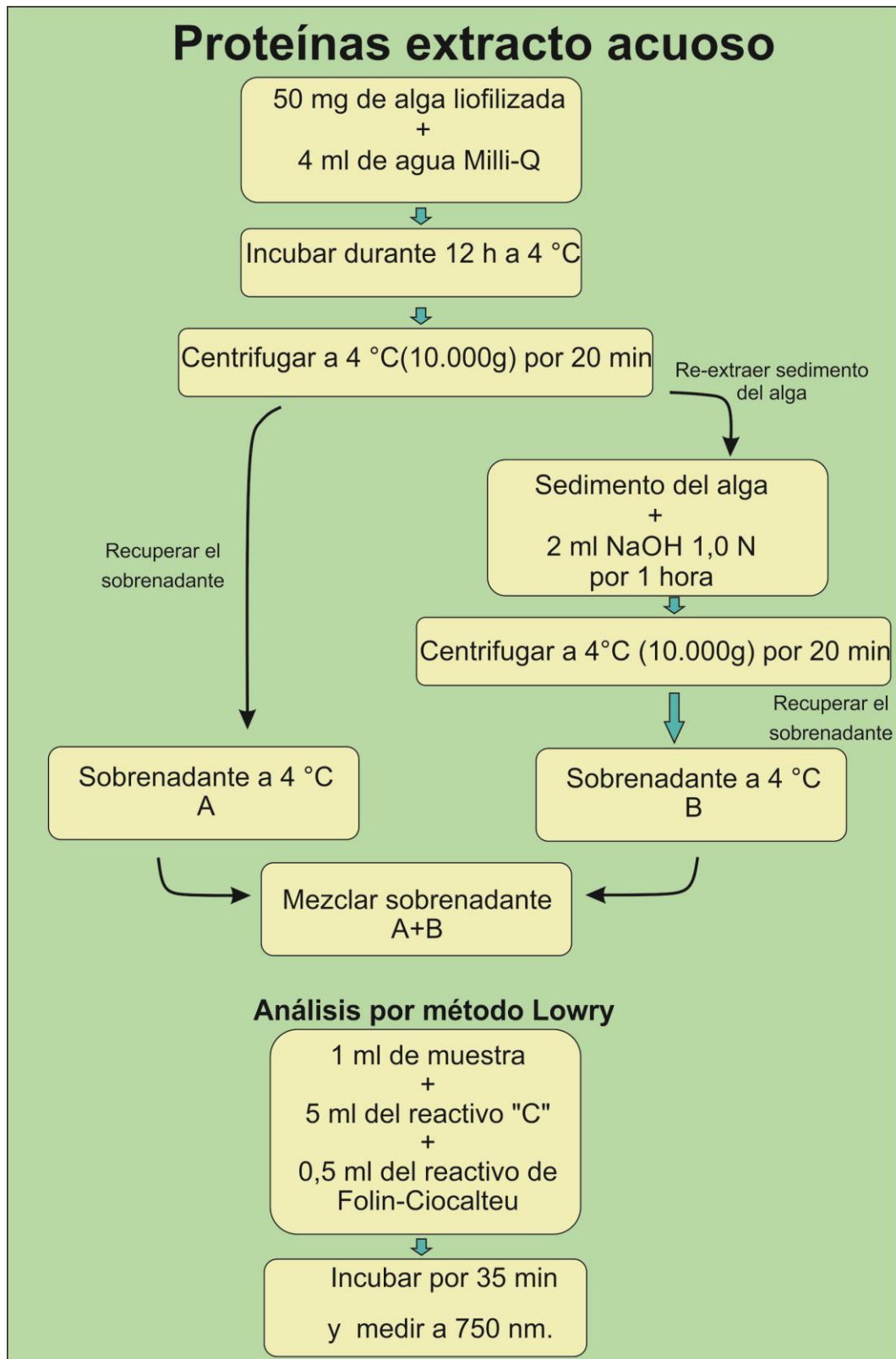


Figura 31. Protocolo para la extracción de proteínas a partir del extracto acuoso aplicado en *Leathesia marina*.

Precipitación de proteínas con TCA

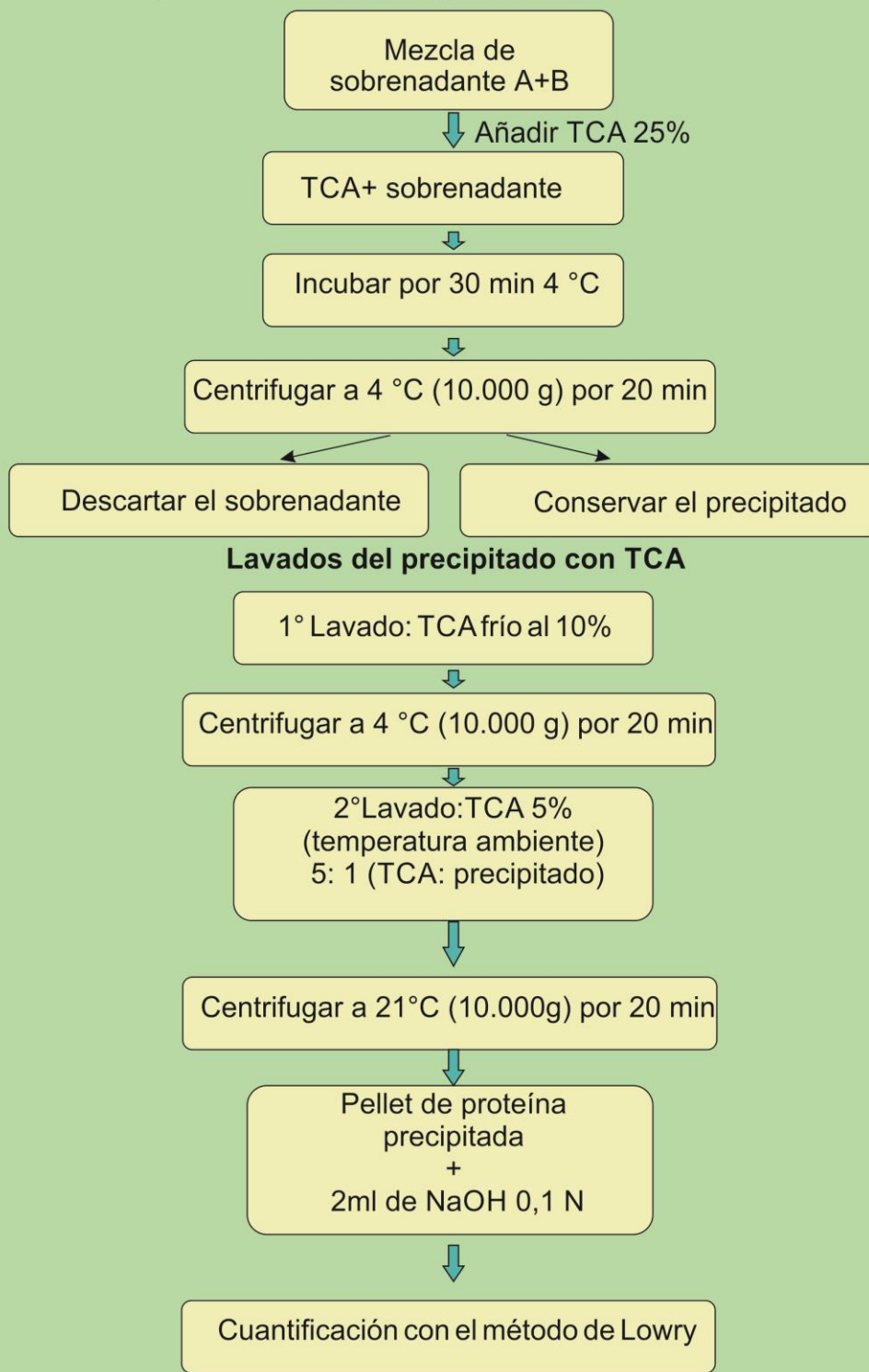


Figura 32. Protocolo para la extracción por precipitación de proteínas con TCA a partir del extracto acuoso aplicado en *Leathesia marina*.

2.1.6. Determinación de pigmentos

Para evaluar el contenido de diferentes pigmentos se testearon dos tipos de extracción con dos disolventes distintos: 80% de acetona y DMSO, según la metodología sugerida por Vimala y Poonghuzhali (2015). La clorofila *a* y el contenido total de clorofila se expresaron en mg/g de alga seca usando las ecuaciones formuladas por Arnon (1949) de la siguiente manera:

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/ml}) = [12,7 (A663) - 2,69 (A645)]$$

$$\text{Total de Clorofila } (\mu\text{g/ml}) = [20,2 (A645) + 8,02 (A663)]$$

El contenido de clorofila *c1* + *c2* se determinó usando la siguiente ecuación según Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } c1 + c2 \text{ } (\text{mg/g}) = [24,36 (A630) + 3,73 (A664)]$$

La cantidad de carotenos se estimó mediante la fórmula de Kirk y Allen (1965):

$$\text{Carotenos } (\text{mg/g}) = [A480 + (0,114 \times A663) - (0,638 \times A645)]$$

La cantidad de fucoxantinas se estimó usando la ecuación de Seely *et al.* (1972):

Fucoxantinas (mg/g)

$$= [A_{470} - 1,239 (A_{631} + A_{581} - 0,3 \times A_{664}) - 0,0275(A_{664})] / 141$$

Donde A = Absorbancia a una longitud de onda particular, considerando el volumen total del extracto y el peso de la muestra utilizada para la extracción.

2.1.7. Determinación de polifenoles

El contenido total de polifenoles se analizó tanto en extractos metanólicos (3 g. de muestra de alga liofilizadas en 10 ml de metanol al 80%) como en extractos acuosos (3 g de muestra de algas liofilizadas en 17,5 ml de agua Milli-Q) usando el método Folin-Ciocalteu (1927). Para la reacción, a 100 µl del extracto se le añade 400 µl del reactivo de Folin y 1300 µl H₂O reactivo y se dejó reposar de 1 a 5 minutos. Luego se incorporó 1200 µl Na₂CO₃ y se dejó 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura a una longitud de onda de 760 nm.

Se usó una curva de calibrado con solución de ácido gálico como estándar, cuyas concentraciones oscilaron entre 10 - 280 µg ml⁻¹. El contenido fenólico total se expresó como µg de equivalentes de ácido gálico por mg de alga seca (µg GAE mg⁻¹ alga seca).

2.1.8. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se midió en el extracto metanólico (3 g de muestra de algas liofilizadas en 10 ml de metanol al 80%) utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). La reacción se preparó añadiendo 250 µl de extracto a 3 ml de solución metanólica de radical DPPH con absorbancia igual a 1 a 517 nm (Chaillou y Nazareno 2006). La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 30 min. a temperatura ambiente en oscuridad. La absorbancia de la solución resultante se midió a 517 nm. El porcentaje de inhibición del radical DPPH en las muestras se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times \left[1 - \left(\frac{A \text{ muestra} - A \text{ blanco}}{A \text{ control}} \right) \right]$$

Donde: el *A control* es la absorbancia del control (solución DPPH sin muestra), la *A muestra* es la absorbancia de la muestra que se desea medir (solución DPPH más muestra de prueba), y el *A blanco* es solo la absorbancia de la muestra (muestra sin solución DPPH).

La concentración de la muestra que captura el 50% de los radicales DPPH se obtuvo calculando el porcentaje de inhibición medio (IC₅₀) utilizando diferentes concentraciones de extracto (6,5; 12,98 y 19,48 mg/ml). También la actividad antioxidante total se expresó como la capacidad antioxidante equivalente a la vitamina C (VCEAC).

2.1.9. Determinación de la composición elemental

Para determinar la presencia de los diferentes elementos en esporófitos de *L. marina*, se fijaron fragmentos del talo en glutaraldehído al 2,5% que contuvieron buffer cacodilato de sodio 0,01 M (pH 7,2) a 5°C durante 2 h. Posteriormente, se realizaron tres lavados en buffer cacodilato de sodio a 0,005 M durante 10 min. cada uno. Los fragmentos fijados se deshidrataron en acetona siguiendo el protocolo de Cáceres (1995). Finalmente, las muestras se secaron por punto crítico durante 1 h y se revistieron con oro en un Sputter Coater 9100 modelo 3 (Pelco, Clovis, California, EE.UU) según Sorrivias de Lozano y Morales (1986). Las muestras se observaron bajo un microscopio electrónico de barrido (MEB) Leo Evo 40 (Jena, Alemania) equipado con el sistema de microanálisis de rayos X Dispersivo de Energía OXFORD X-Max50 (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido), del CCT Bahía Blanca – UNS - CONICET.

2.2. Ensayos de cultivo de *L. marina*

Los cultivos se iniciaron a partir de esporas que se formaron en las estructuras reproductivas de los talos esporófitos recolectados en la naturaleza. A partir de la germinación de las esporas se generaron talos gametofíticos bajo condiciones de cultivo. Para ello, los talos esporófitos se cepillaron y se enjuagaron con agua de mar estéril y filtrada (malla de 0,2 μm) para eliminar algas epífitas y sedimentos, para evitar la contaminación de los cultivos.

Una vez obtenidos los talos gametofíticos, estos fueron mantenidos bajo condiciones constantes hasta obtener un stock (C.15) para luego ser usado en los diferentes ensayos.

De los talos gametofíticos fueron generados cigotos, los cuales, se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio. Los cultivos stock se mantuvieron en agua de mar a temperatura de 8°C y una concentración de nutrientes dada por el agregado de 2 ml de medio Provasoli (PES) por litro de agua de mar.

Todos los experimentos de cultivo se realizaron en cajas de Petri de 2,5 cm de diámetro, que contenían fragmentos fértiles de 2 mm² de esporófitos o gametófitos sobre un cubreobjetos de 1,5 cm². Tanto en los cultivos iniciados a partir de esporófitos y gametófitos, una vez liberadas las esporas o luego de la fusión de gametos, se monitoreó el desarrollo de tanto de esporas como de cigotos. El fotoperiodo seleccionado fue de 12:12 h luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada por tubos fluorescentes blancos fríos. La intensidad lumínica se controló usando un medidor de flujo cuántico (Apogee MQ-200, EE.UU).

Para determinar el crecimiento óptimo y la supervivencia de las fases esporofítica y gametofítica, se llevó a cabo un experimento factorial donde se evaluaron cuatro concentraciones de nutrientes y tres temperaturas de incubación. Para el caso de los nutrientes, la concentración de PES agregada al agua de mar fue drásticamente reducida o aumentada, siendo 0; 0,1; 1 y 10 veces la concentración sugerida por Oliveira *et al.* (1995) (2 ml de PES/litro). El medio de cultivo se renovó cada dos días en todos los casos. La incubación en cada concentración de nutrientes se realizó por triplicado y se expuso a diferentes

temperaturas: 8°C, 16°C y 24°C. El efecto de los nutrientes y la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia, se evaluaron cada dos días, durante un período de incubación de 10 días, considerando de esta manera, el tiempo como una tercera variable influyente.

La supervivencia de los talos se analizó cuantificando individuos vivos en un área de 3 cm² usando un microscopio Nikon Eclipse TE 300 (Tokio, Japón) equipado con una cámara Nikon FDX 35. Los recuentos se realizaron en 400x de aumento. El crecimiento vegetativo se midió contando el número de células de cada individuo. Los datos de supervivencia y crecimiento vegetativo se tomaron cada dos días de ensayo.

2.2.1. Control de fertilidad del gametófito

Para evaluar las condiciones de cultivo que regulan la gametogénesis, se sometieron los gametófitos a diferentes temperaturas de incubación 8°C, 16°C y 24°C, en agua de mar enriquecida con PES (2 ml de PES/litro) con un fotoperiodo de 12:12 h de luz/ oscuridad y una intensidad lumínica de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provistos por tubos fluorescentes blancos fríos.

Los gametangios pluriloculares se contabilizaron tomando fragmentos de 2 mm² en un total de 20 talos gametófitos por cada temperatura de incubación. Los recuentos se realizaron usando un microscopio óptico en un aumento de 400x.

2.3. Análisis estadísticos

Para evaluar las diferencias en la composición química de *L. marina* dependiendo del solvente de extracción, se usó una prueba *t* Student (prueba *t* de dos muestras no emparejada) utilizando el programa estadístico R Studio (Team 2016) con un nivel de significancia de 0,05.

Para la evaluación de la densidad de cigotos y esporas asentadas (n° cigotos/esporas/3 cm²), se utilizó un modelo lineal generalizado con distribución Binomial Negativa (GLM.nb) como modelo alternativo a la distribución de Poisson con sobredispersión.

Los análisis se realizaron utilizando el paquete MASS en R (Venables y Ripley 2002). Para analizar la supervivencia, se utilizó un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) con una distribución Binomial. Todos los GLMM se realizaron con el paquete lme4 en R (Bates *et al.* 2015).

Para la evaluación de la supervivencia en relación con los tiempos de incubación, las temperaturas y las concentraciones de nutrientes, se consideraron modelos aditivos y con interacción. El mejor modelo se seleccionó según el criterio de información de Akaike (AIC), donde el AIC más pequeño constituye el modelo que mejor se ajusta a los datos. Para los datos obtenidos en esta tesis, el modelo aditivo presentó un AIC más pequeño.

Para analizar los datos de fertilidad, se utilizó una distribución de Poisson inflado a cero (ZIP) debido a que la mayoría de los gametófitos incubados a 16 °C no presentaron gametangios. Los análisis se realizaron usando un paquete pscl en R (Jackman 2015).

Para analizar el crecimiento vegetativo, los datos se ajustaron a una reparametrización del modelo de Gompertz (Tjørve y Tjørve 2017):

$$W(t) = A \exp \left(- \exp \left(-K_G (t - T_i) \right) \right)$$

Donde $W(t)$ es el valor esperado (número de celdas) en función del tiempo, A es el valor máximo de crecimiento, K_G es la tasa de crecimiento (que afecta la pendiente), t es el tiempo (días) y T_i representa el tiempo en el punto de inflexión (días).

Este modelo de crecimiento de Gompertz fue el que mejor se ajustó al lote de datos con respecto al modelo de crecimiento logístico, ya que presentó el menor AIC. Esta curva se determinó usando la estimación de máxima verosimilitud (ML), con la función `varPower` para controlar el efecto heterocedasticidad utilizando el paquete `nlme` en R (Pinheiro *et al.* 2016).

3. Resultados

3.1. Propiedades bioquímicas y actividad antioxidante de *Leathesia marina*

Los esporófitos de *L. marina* mostraron un contenido de carbohidratos de $19,9 \pm 2,4$ (media \pm EE) carbohidratos/100 mg de materia orgánica para el extracto de KOH y de $16,9 \pm 2,3$ mg carbohidratos para el extracto acuoso. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas en contenido de carbohidratos al comparar los 2 tipos de extracción (Tabla 7).

En cuanto al contenido de alginatos en *L. marina* se registró un porcentaje de $15,55 \pm 1,10\%$.

El contenido de proteína en los extractos “crudos” mostraron valores más altos que los obtenidos de las muestras con proteínas precipitadas, siendo $1,01 \pm 0,06\%$ (Tabla 7).

Los principales pigmentos fotosintéticos, clorofila, carotenos y fucoxantinas, presentaron valores más altos en los extractos de acetona 80%, que en los de DMSO; excepto la clorofila *c1 + c2*, que no presentó diferencias significativas entre los dos tipos de extracción (Tabla 7).

La clorofila *a* (Chl *a*) fue el pigmento más abundante, seguido por los carotenos (Cart) y la clorofila *c1 + c2* (Chl *c1 + c2*). El pigmento con más baja concentración fue la fucoxantina.

El contenido fenólico fue mayor en el extracto acuoso con $0,99 \pm 0,04$ mg GAE/g (Tabla 7).

Por otro lado, la actividad antioxidantes por eliminación de radicales DPPH solo fue posible medirla en el extracto metanólico, ya que el extracto acuoso en contacto con la solución de DPPH-metanol formó un precipitado de polisacáridos, resultando imposible su medición. La concentración del extracto metanólico requerida para reducir la concentración inicial de DPPH al 50% (IC₅₀) fue de 16,9 mg/ml, y la actividad de eliminación de radicales, expresada como equivalente de vitamina C fue de 17,44 ± 0,61 mg de VCE / 100 g de alga seca.

La microscopia electrónica de barrido (MEB) junto con la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) para el análisis elemental de la superficie externa de las paredes celulares de *L. marina*, revelaron la presencia de diferentes elementos, tales como Cu, Na, Ca, S, Mg y Si, mientras que el Al y Fe se encontraron en muy baja proporción. La presencia de oro correspondió al recubrimiento realizado en este metal, necesario para la observación en el MEB (Fig. 32).

Tabla 7. Características bioquímicas del esporófito de *L. marina* (porcentaje de peso seco, cenizas, materia orgánica, carbohidratos totales, alginato, proteína, pigmento, contenido de polifenoles) y actividad antioxidante (actividad de eliminación de radicales DPPH). Los datos representan la media de tres réplicas \pm E.E. (n = 3). La prueba t de Student se usó para evaluar la diferencia en la composición química dependiendo del solvente de extracción; *df*, grados de libertad; valor de p (< 0,05). Abreviaturas: clorofila (Chl), carotenoides (cart), muestra seca (MS).

Características bioquímicas	Solvente	Media \pm EE	Estadístico (t)	df	p-valor
Peso seco (%)		70,53 \pm 0,69			
Cenizas (%)		41,79 \pm 1,38			
Material orgánica (%)		29,46 \pm 0,69			
Total carbohidratos (mg/100 mg material orgánica)	agua	16,9 \pm 2,3	0,89	4	0,4192
	extracto de KOH	19,9 \pm 2,4			
Alginatos (%)		15,55 \pm 1,10			
Proteínas (%)	agua	1,01 \pm 0,06	3,70	4	0,0207
	Precipitado con TCA	0,53 \pm 0,12			
Pigmentos					
Chl a (mg/g DS)	DMSO	0,14 \pm 0,008	21,63	4	< 0,0001
	Acetona 80%	0,46 \pm 0,013			
Total Chl a+b (mg/g MS)	DMSO	0,16 \pm 0,009	23,42	4	< 0,0001
	Acetona 80%	0,53 \pm 0,014			
Chl c1+c2 (mg/g MS)	DMSO	0,11 \pm 0,016	2,48	4	0,0693
	Acetona 80%	0,17 \pm 0,019			
Cart (mg/g MS)	DMSO	0,15 \pm 0,009	26,40	4	<0,0001
	Acetona 80%	0,36 \pm 0,005			
Fucoxantinas (mg/g MS)	DMSO	0,002 \pm 0,001	28,06	4	<0,0001
	Acetona 80%	0,006 \pm 0,001			
Total polifenoles (mg GAE/g MS)	agua	0,99 \pm 0,04	10,61	4	0,0004
	Metanol 80%	0,51 \pm 0,02			
IC ₅₀ (mg/mL)	Metanol 80%	16,96 \pm 0,66			
VCEAC (mg VCE/100g MS)	Metanol 80%	17,44 \pm 0,61			

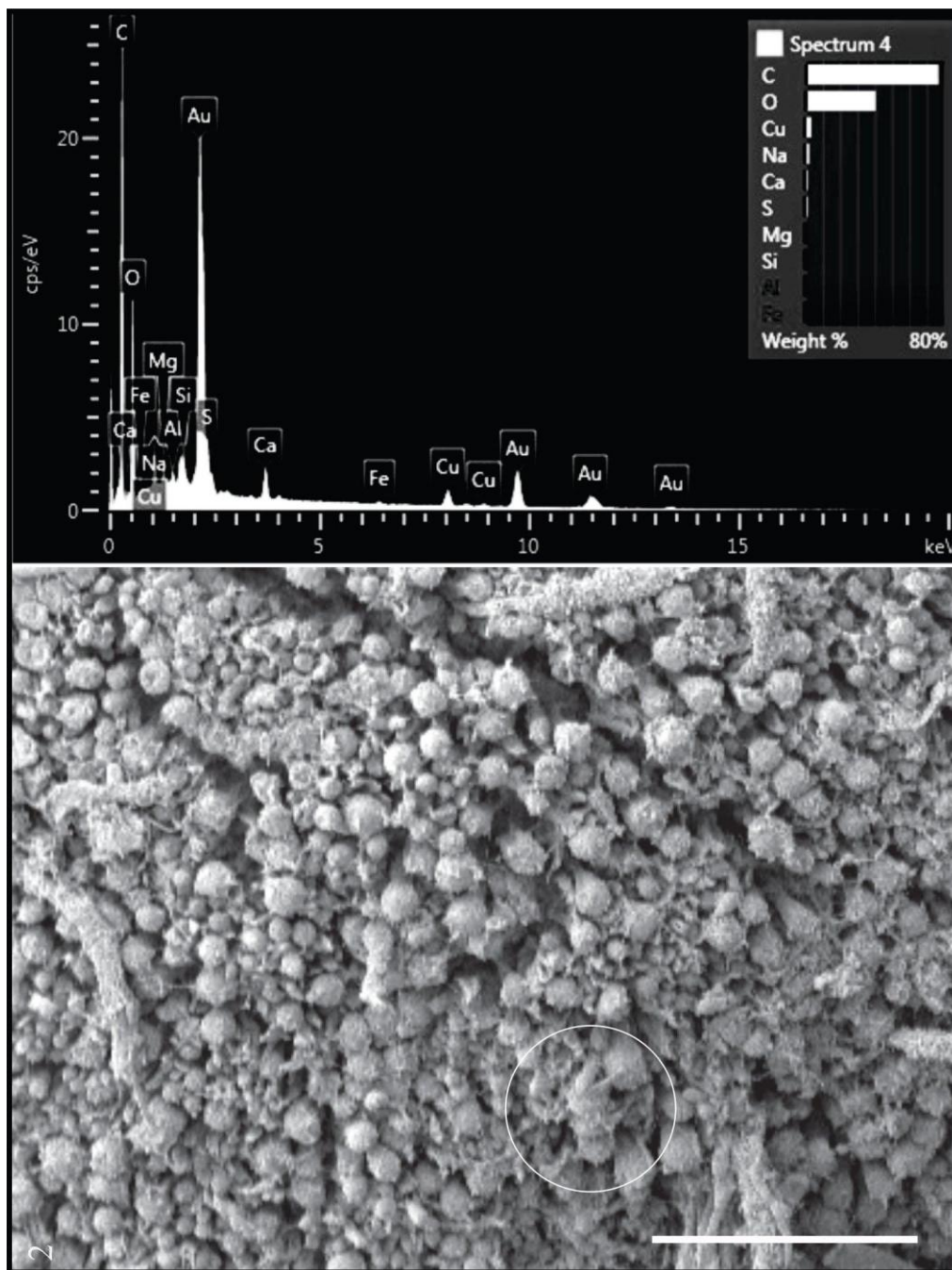


Figura 33. Análisis MEB-EDX de superficie externa de esporófito de *L. marina*: a: Gráfico mostrando espectro de los diferentes elementos detectados sobre la superficie. b: Vista superficial de talo de *L. marina*.. Barra de escala = 100 µm.

3.2. Ensayos de cultivos

La figura 34 muestra un esquema abreviado del ciclo de vida heteromórfico de *L. marina* alternando entre una fase esporofítica diploide y una fase gametofítica haploide.

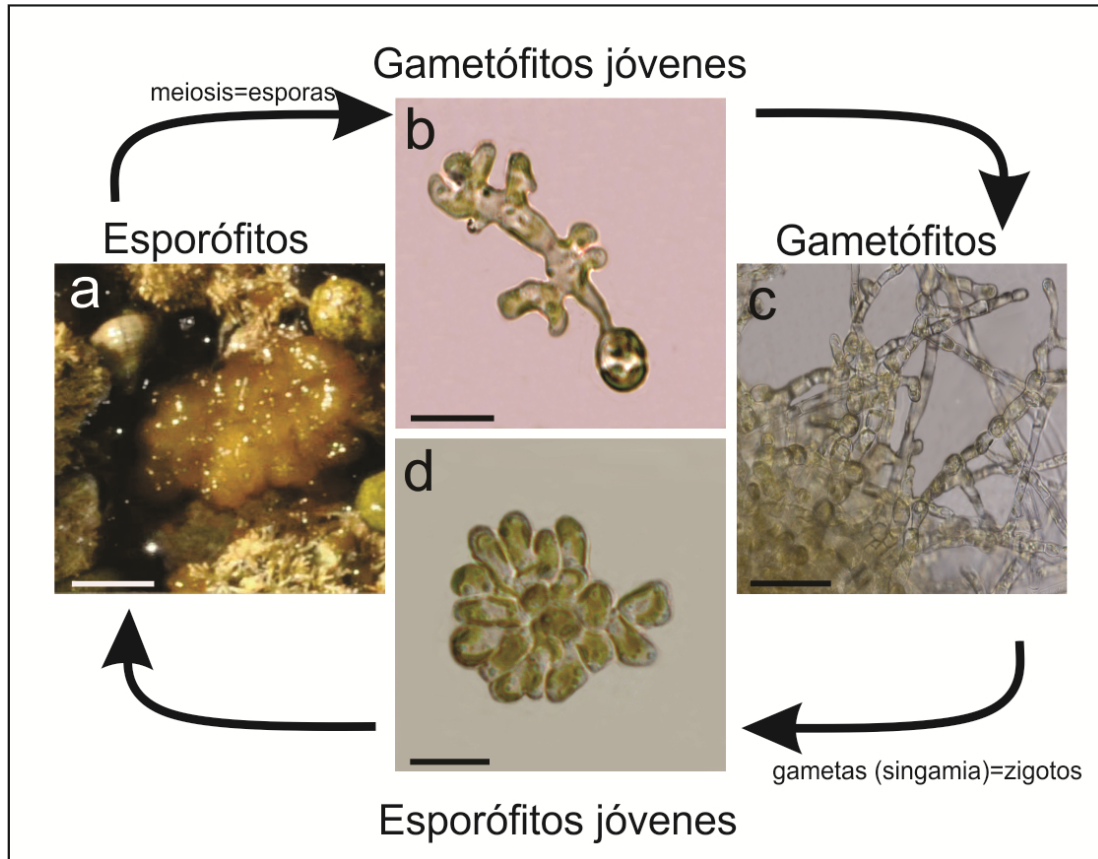


Figura 34. Ciclo de vida abreviado de *L. marina*. Fases esporofítica y gametofítica. a. Macrotalo correspondiente a la fase esporofítica. **b.** Gametófito joven generado de esporas. **c.** Microtalo postrado o fase gametofítica en cultivo. **d.** Esporófito joven generado de cigoto. *Barra de escala:* a = 1 cm, b, d=10 μ m, c =30 μ m.

3.2.1. Asentamiento de cigotos y esporas

La liberación de gametos desarrollados en los gametófitos se produjo luego de 24 h de incubación y se asentaron posteriormente a su fusión aproximadamente a las 48 h. En cambio, las esporas desarrolladas en esporófitos se liberaron después de 12 h de incubación y se asentaron luego de las 36 h. Esto reveló un más rápido reclutamiento de las esporas sobre los cigotos.

Las densidades de cigotos y esporas estuvieron significativamente influenciadas por las diferentes concentraciones de nutrientes (Tabla 8). Sin embargo, la temperatura no tuvo un efecto significativo en el asentamiento de cigotos y esporas. Bajo todas las concentraciones de nutrientes y temperaturas, el número de esporas asentadas (44 ± 9 esporas) fue mayor que el número de cigotos (21 ± 2 cigotos). El mayor número de esporas se registró a la concentración 1 PES (52 ± 25 esporas) y el de cigotos a 10 PES (31 ± 6 cigotos). El número más bajo de cigotos se obtuvo en cultivos sin la adición de PES (12 ± 2 cigotos) y las esporas en una concentración de PES de 0,1 (14 ± 5 esporas) (Fig. 35 a).

3.2.2. Supervivencia de esporófitos y gametófitos

Se observaron diferencias significativas en la supervivencia de esporófitos y gametófitos, siendo $42,4 \pm 7,82\%$ y $52,14 \pm 7,19\%$, respectivamente (Tabla 8).

La supervivencia de los esporófitos estuvo influenciada por la temperatura del agua de mar y el tiempo de incubación. En cambio, la concentración de nutrientes no presentó un efecto significativo (Tabla 8) sobre la supervivencia. Por otro lado,

la supervivencia de los gametófitos estuvo afectada por las tres variables analizadas: el tiempo de incubación, la temperatura y la concentración de nutrientes.

La variable, tiempo de incubación, afectó negativamente la supervivencia de esporófitos y gametófitos, ya que se observó una disminución de la misma a medida que avanzó el tiempo de incubación. La supervivencia más alta de esporófitos y gametófitos se observó luego de 2 días de incubación (alcanzando valores de $90,9 \pm 1,2\%$ y $98,2 \pm 10,3\%$, respectivamente) y la más baja después de 10 días ($48,22 \pm 4,2\%$ y $52,25 \pm 6,27\%$, respectivamente). Fue observada una abrupta disminución de la supervivencia al comienzo del cuarto día de incubación (Fig. 35 b).

La temperatura óptima para la supervivencia de esporófitos y gametófitos fue de 8°C , (alcanzando valores $51,74 \pm 5,10\%$ y $58,2 \pm 6,3\%$, respectivamente). La menor supervivencia, tanto para esporófitos como gametófitos, se registraron a 16°C ($43,43 \pm 3,53\%$ y $44,2 \pm 6,14\%$, respectivamente) y a 24°C ($39,93 \pm 2,07\%$, $42 \pm 9,28\%$, respectivamente) (Fig. 35 c).

Como se mencionó anteriormente, las diferentes concentraciones de nutrientes mostraron diferencias significativas en la supervivencia de los gametófitos (Tabla 2). La mayor supervivencia se registró en la concentración de 1 PES con $64,9 \pm 4,7\%$ y la menor supervivencia de talos en cultivos sin la adición de PES, con $37,81 \pm 5,64\%$ (Fig. 35 d).

Tabla 8. Análisis GLM.nb de las variables: temperatura y concentración de nutrientes sobre la densidad de esporas y cigotos asentados (n° esporas/cigotos/3 cm²), y la relación entre las densidades de cigoto y esporas. Análisis GLMM de las variables: tiempo de incubación, temperatura y concentración de nutrientes sobre la supervivencia de esporófito y gametófito de *L. marina* y la relación entre la supervivencia de ambas fases. Análisis ZIP que prueba los efectos de la temperatura de incubación en el número de gametangios pluriloculares. *df*, grados de libertad, valor P (< 0,05).

GLM.nb	<i>df</i>	Estadístico (χ^2)	<i>p</i> -valor
Zigotos vs esporas	1	15,21	< 0,0001
N° esporas			
Concentración de nutrientes	3	8,32	0,039
Temperatura	2	0,52	0,7684
N° cigotos			
Concentración de nutrientes	3	16,42	< 0,0001
Temperatura	2	2,31	0,3165
GLMM			
Supervivencia de esporófitos vs gametófitos	1	7,45	0,006
Supervivencia de esporófitos			
Tiempo	4	1560,7	< 0,0001
Temperatura	2	45,471	< 0,0001
Concentración de nutrientes	3	0,1406	0,9866
Tiempo + Temperatura	6	444,81	< 0,0001
Supervivencia de gametófitos			
Tiempo	4	606,52	< 0,0001
Temperatura	2	45,471	< 0,0001
Concentración de nutrientes	3	19,009	< 0,0001
Tiempo+ Temperatura + Nutrientes	9	766,35	< 0,0001
ZIP: Microtalos			
N° de gametangios pluriloculares			
Temperatura	1	76,92	<0,0001

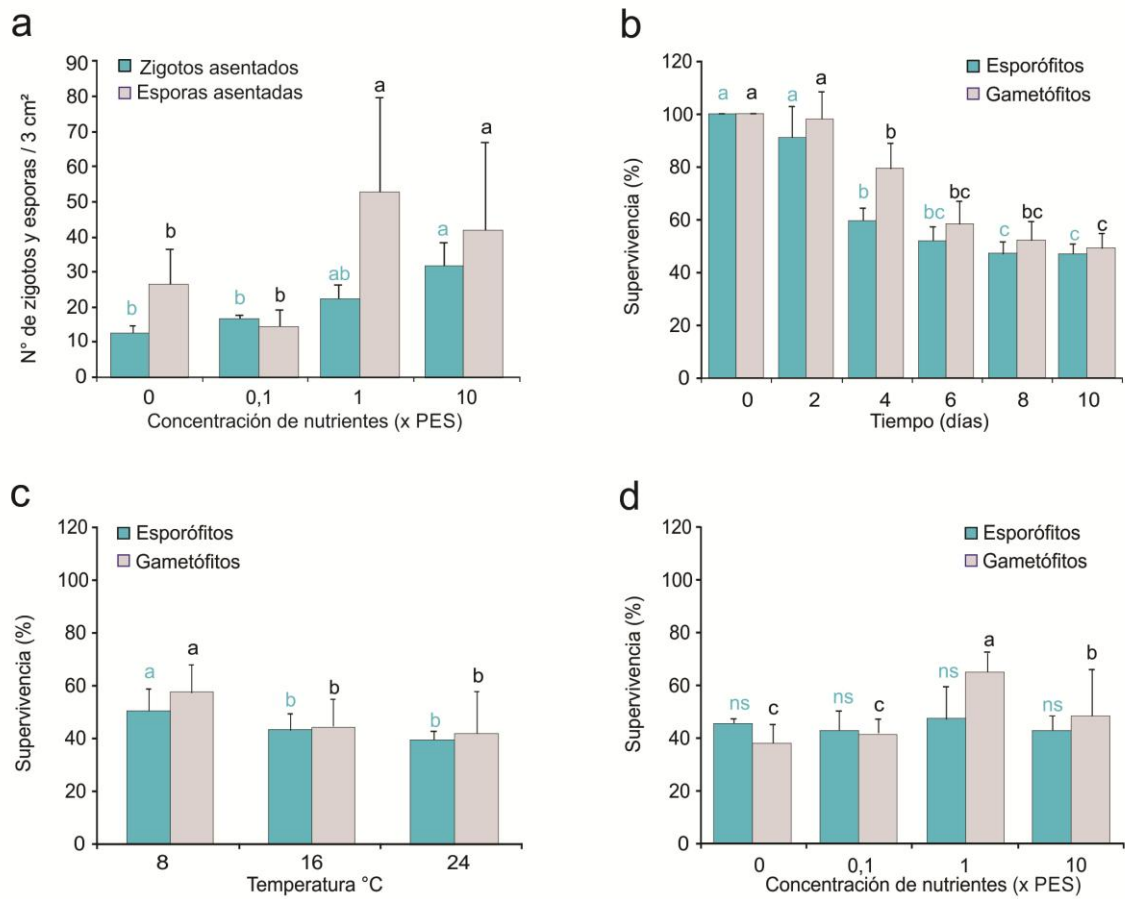


Figura 35. Ensayos de cultivo de *L. marina*. **a.** Efecto de la concentración de nutrientes sobre la densidad de zigotos y esporas asentadas. **b, c** y **d.** Efectos de distintos parámetros sobre la supervivencia de esporófitos y gametófitos. **b.** Efecto del tiempo de incubación. **c.** Efecto de la temperatura de incubación. **d.** Efecto de la concentración de nutrientes. Las barras muestran errores estándar. Las diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) están indicadas por diferentes letras usando el test HSD de Tukey. La letra en azul compara los zigotos asentados/esporófito y la letra en negro las esporas sedimentadas/gametófito.

3.2.3. Crecimiento de esporófitos y gametófitos

El modelo final de crecimiento de los esporófitos ajustado a la curva de Gompertz, según las diferentes temperaturas y concentraciones de nutrientes se muestran en la Tabla 9. Tanto la temperatura de incubación, como la concentración de nutrientes tuvieron un efecto significativo sobre el número máximo de células al final del experimento (A) y la tasa de crecimiento (K_G). Los esporófitos que se incubaron a 16°C y 24°C mostraron mayor número de células y un crecimiento más rápido, mientras que los esporófitos incubados a 8°C presentaron menos células y una tasa de crecimiento más baja. En relación a las concentraciones de nutrientes, el mayor crecimiento se registró en concentraciones de 1 PES y 10 PES, mientras que el menor crecimiento se observó en los cultivos sin PES (Tabla 9).

Se pudo observar que, ni la temperatura, ni la concentración de nutrientes tuvieron algún efecto sobre el parámetro tiempo de inflexión (T_i), lo que indica que todos los talos alcanzaron un crecimiento máximo aproximadamente al mismo tiempo durante el período analizado (Tabla 9).

El modelo final de crecimiento de los gametófitos a diferentes temperaturas y concentraciones de nutrientes, también son muestreados en la Tabla 9. En este caso, también la temperatura y concentración de nutrientes tuvieron efectos significativos en el número de células al final del experimento (A) y en la tasa de crecimiento (K_G). Los talos incubados a 8°C y 16°C presentaron mayor número de células y tuvieron un crecimiento más rápido que los gametófitos incubados a 24°C.

En relación a los nutrientes, los gametófitos incubados a una concentración de 1 PES presentaron mayor número de células, mientras el menor número se observó en el tratamiento sin PES (Tabla 9). Sin embargo, la tasa de crecimiento más alta se registró en concentraciones de 0,1 PES.

Al igual que en los talos esporófitos ni la temperatura, ni la concentración de nutrientes mostró algún efecto sobre el tiempo de inflexión (T_i) (Tabla 9).

Se observaron diferencias significativas en el crecimiento de gametófitos vs esporófitos, con respecto al número máximo de células y tasa de crecimiento (Tabla 9). Los esporófitos alcanzaron mayor número de células y tasa de crecimiento que los gametófitos. Sin embargo no se observaron diferencias significativas con respecto al tiempo de inflexión, ya que ambas fases alcanzaron un crecimiento máximo aproximadamente al mismo tiempo (Tabla 10).

Tabla 9. Curvas de crecimiento de esporófito y gametófito de *L. marina*: ajustado a una re-parametrización del modelo de Gompertz, donde A es el valor de crecimiento máximo (número de células) KG es el coeficiente de crecimiento y T_i representa el tiempo en inflexión medido en días. El modelo de Gompertz se determinó usando la máxima verosimilitud (ML), *df*, grados de libertad; valor de p (<0,05).

Esporofitos								
	Máximo crecimiento (A)	N° de células (media ± EE)	<i>df</i>	Estadístico (F)	<i>p</i> -valor			
Temperaturas (°C)	8	20,86 ± 9,28	160	12,2	< 0,0001			
	16	35,35 ± 7,08						
	24	43,16 ± 10,3						
	Tasa de crecimiento (K_G)	Tasa (media ± EE)						
	8	0,17 ± 0,05						
Temperaturas (°C)	16	0,18 ± 0,03	160	21,47	< 0,0001			
	24	0,19 ± 0,03						
	Días. (T_i)	7,57 ± 2,46				160	0,06	0,9383
	Máximo crecimiento (A)	N° de células (media ± EE)						
	0	19,91 ± 7,01						
0,01	25,83 ± 4,48							
1	40,87 ± 10,97							
Concentración de nutrientes	10	45,11 ± 13,72	157	194,14	< 0,0001			
	Tasa de crecimiento (K_G)	Tasa (media ± EE)						
	0	0,15 ± 0,05						
	0,01	0,17 ± 0,04						
	1	0,21 ± 0,04						
Concentración de nutrientes	10	0,26 ± 0,04	157	33,35	< 0,0001			
	Días (T_i)	7,57 ± 2,32				157	0,16	0,9175
	Máximo crecimiento (A)	N° de células (media ± EE)						
	0	14,83 ± 7,97						
	0,01	14,97 ± 5,73						
1	28,37 ± 6,97							
Temperaturas (°C)	10	19,21 ± 6,46	160	1,26	0,2626			
	Tasa de crecimiento (K_G)	Tasa (media ± EE)						
	8	0,82 ± 0,15						
	16	0,30 ± 0,13						
	24	0,16 ± 0,10						
Temperaturas (°C)	Días. (T_i)	5,50 ± 1,34	160	1,26	0,2626			
	Máximo crecimiento (A)	N° de células (media ± EE)						
	0	14,83 ± 7,97						
	0,01	14,97 ± 5,73						
	1	28,37 ± 6,97						
Concentración de nutrientes	10	19,21 ± 6,46	157	36,78	< 0,0001			
	Tasa de crecimiento (K_G)	Tasa (media ± EE)						
	0	0,38 ± 0,21						
	0,01	0,51 ± 0,19						
	1	0,35 ± 0,23						
Concentración de nutrientes	10	0,39 ± 0,21	157	174,73	< 0,0001			
	Días (T_i)	9,09 ± 2,32				157	0,82	0,4413
	Máximo crecimiento (A)	N° de células (media ± EE)						
	0	14,83 ± 7,97						
	0,01	14,97 ± 5,73						
1	28,37 ± 6,97							

Tabla 10. Comparación en el crecimiento de esporófitos y gametófitos de *L. marina*: ajustado a una re-parametrización del modelo de Gompertz, donde A es el valor de crecimiento máximo (número de células) KG es el coeficiente de crecimiento y T_i representa el tiempo en inflexión medido en días. El modelo de Gompertz se determinó usando la máxima verosimilitud (ML), *df*, grados de libertad; valor de p (<0,05).

Comparación de esporófitos y gametófitos				
Máximo crecimiento	Nº de células (media ± EE)	<i>df</i>	Estadístico (<i>F</i>)	<i>p</i> -valor
(A)				
Esporófitos	36,97 ± 15,97	353	1087,65	< 00001
Gametófitos	19,28 ± 8,87			
Tasa de crecimiento				
(K_G)				
Esporófitos	0,17 ± 0,05	353	271,51	< 0,0001
Gametófitos	0,14 ± 0,02			
Días (T_i)				
Esporófitos	8,26 ± 2,63	353	0,14	0,7132
Gametófitos				

3.2.3. Mantenimiento de gametófitos bajo condiciones controladas de cultivo

El tiempo de incubación y la temperatura del agua de mar afectaron la gametogénesis. Considerando esto, los gametófitos microscópicos se pudieron mantener en latencia en condiciones controladas de cultivo durante un tiempo prolongado. La supresión del proceso de gametogénesis se observó a 8°C, con un fotoperiodo de 12:12 h y una concentración de 2 ml de PES/litro. Bajo estas condiciones, los gametófitos se mantuvieron durante 18 meses con reemplazo semanal del medio de cultivo, sin que se produzca la formación de gametangios pluriloculares sobre sus talos. Sin embargo, la gametogénesis se inició elevando la temperatura a 16°C y 24°C. Bajo estas nuevas condiciones, se observó una clara formación y desarrollo de gametangios. Luego de 20 días de incubación se observaron diferencias significativas en el número de gametangios pluriloculares en ambas temperaturas. A 24°C la formación de gametangios pluriloculares fue considerablemente mayor ($25,4 \pm 12,23$ gametangios en $58,74 \text{ mm}^2$ de microtalo) que a 16°C ($2,3 \pm 1,15$ gametangios en $58,74 \text{ mm}^2$ de microtalo).

4. Discusión

La importancia del consumo de algas marinas no solo se basa en su valor nutricional, sino que también se relaciona con la prevención y/o tratamiento de diferentes patologías relacionadas con el estrés oxidativo. Este enfoque ha servido como guía para la investigación de sus propiedades antioxidantes (Jiménez-Escrig y Sánchez-Muñiz 2000, Funahashi *et al.* 2001, Yuan y Walsh 2006). Por esta razón, no solo se analizaron las propiedades bioquímicas de *L. marina* utilizando diferentes métodos de extracción y solventes, sino también sus propiedades antioxidantes.

Los esporófitos de *L. marina* mostraron un porcentaje bajo de materia orgánica y contenido total de carbohidratos, en comparación con otras algas pardas, por ejemplo *Cytoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh, *Sargassum dentifolium* (Turner) C. Agardh y *Sargassum asperifolium* Hering y G. Martens ex J. Agardh (Larsen *et al.* 2003). Sin embargo, *Macrocystis pyrifera* (L) C. Agardh y *Undaria pinnatifida* (Harvey) Seringar de la Patagonia mostraron un contenido total de carbohidratos similar al encontrado en *L. marina* (Cazón *et al.* 2014).

Los alginatos extraídos de algas pardas son polisacáridos dietéticos que no se encuentran en ninguna planta terrestre. Estos están disponibles tanto en forma de ácido como de sal. Se ha informado en estudios previos, que los alginatos favorecen a la disminución del colesterol, ejercen un efecto anti-hipertensivo, pueden prevenir la absorción de sustancias químicas tóxicas y juegan un papel importante como fibra dietética, beneficiosa para salud de animales y humanos

(Kim y Lee 2008; Nishide y Uchida 2003). El porcentaje de alginatos observado en este estudio fue similar al encontrado para *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* que habitan las costas patagónicas, siendo entre 10-30% del peso seco del alga (Cazón *et al.* 2014).

El contenido de proteína de algas varía según las especies y *phyla*, y a veces se relaciona con factores, tales como la estación del año, distribución geográfica, temperatura del agua, concentración de nutrientes, salinidad, tiempo de cosecha e incluso tipo de población (Ito y Hori 1989, Fleurence 1999). El contenido de proteína de las algas pardas es generalmente pequeño, con un promedio de 3-15% del peso seco (Fleurence 2004). El valor encontrado en *L. marina* es menor que el valor promedio; sin embargo, fue similar al del alga parda *U. pinnatifida* de la Patagonia (Cazón *et al.* 2014). Mabeau y Fleurence (1993) sugieren que un alto contenido fenólico en algas pardas podría limitar la disponibilidad de proteínas *in vivo* y por lo tanto moderar los valores *in vitro*. Esta limitación no se observa en las algas verdes y rojas, que poseen bajos niveles de fenoles y mayores contenidos de proteínas. Por ejemplo, se informó un contenido de proteína de 35% para *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber y D. Mohr y 44% para *Ulva* spp. (Murata y Nakazoe 2001).

Con respecto al contenido de pigmento, la clorofila *a* fue el principal pigmento en *L. marina*. Ésta es esencial en el centro de reacción del tilacoide, estructuras que captan la luz para llevar a cabo la fotosíntesis (Lobban y Harrison 1994, Rasmussen y Morrissey 2007). Se conoce que la clorofila se convierte en feofitina, pirofeofitina y feoforbida en alimentos vegetales procesados después de la ingestión por humanos. Según lo señalado por Chernomorsky *et al.* (1999), estos

derivados muestran efectos anti-mutagénicos y podrían jugar un importante papel en la prevención del cáncer.

Las algas pardas son particularmente ricas en carotenos, los cuales se caracterizan por ser poderosos antioxidantes que previenen las patologías humanas relacionadas con el estrés oxidativo (Okuzumi *et al.* 1993, Sachindra *et al.* 2007). Los esporófitos de *L. marina* mostraron un contenido de carotenoides similar a los de *Padina gymnospora* (Kützinger) Sonder (Chinnadurai y Kalyanasundaram 2013), y un contenido promedio de fucoxantinas similar a los encontrados en *Sargassum polycystum* C. Agardh, *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützinger e *Hydroclathrus clathratus* (C. Agardh) M. Howe (Vimala y Poonghuzhali 2015).

Los polifenoles de algas han sido muy apreciados por sus importantes funciones dietéticas, como antioxidantes y agentes quimiopreventivos, con propiedades antimicrobianas y antivirales (Bravo 1998) y antitumorales (Lezcano *et al.* 2018). *L. marina* mostró un alto contenido fenólico en el extracto acuoso, similar al otras algas pardas, como *Desmarestia confervoides* (Bory) M.E. Ramírez & A.F Peters (anteriormente conocido como *Desmarestia viridis*) y *Dictyopteris divaricata* (Okamura) Okamura (Zhang *et al.* 2007).

En relación al ensayo de eliminación de radicales DPPH, la concentración de muestra necesaria para proporcionar 50% de inhibición de DPPH fue de 16 mg/ml y la actividad de eliminación de radicales expresada como equivalente de vitamina C fue $17,44 \pm 0,61$ mg de VCE/100 g de alga seca. Resultados similares fueron informados en *Dictyota ciliolata* Sonder ex Kützinger para la inhibición del 50% de DPPH (Zubia y Robledo 2007).

Varios estudios sobre la dinámica poblacional de algas pardas se centraron en los procesos que regulan la supervivencia, el crecimiento y la fertilidad de las diferentes etapas del ciclo de vida (Kinlan y Gaines 2003, Muñoz *et al.* 2004, Bogaert *et al.* 2016). Se sabe que los factores abióticos, como la temperatura del agua de mar, las concentraciones de nutrientes y los requerimientos de luz, regulan el desarrollo y la fenología de las algas marinas (Santelices *et al.* 2002, Carney y Edwards 2006, Demes *et al.* 2011). En este estudio, se evaluó cómo los factores abióticos, como la temperatura y las concentraciones de nutrientes, afectan el desarrollo de *L. marina* en condiciones de cultivo. Estos estudios son fundamentales para establecer las condiciones óptimas para realizar cultivos controlados, cuya regulación es esencial para el manejo del ciclo de vida de *L. marina*.

La supervivencia de las fases tempranas posteriores a la colonización de esporas y cigotos es fundamental para el establecimiento exitoso de las poblaciones bentónicas de algas. El asentamiento de esporas y cigotos ocurrió después de 24 a 48 h de incubación y sus densidades estuvieron favorecidas por altas concentraciones de nutrientes, pero no fueron afectadas por la temperatura de incubación. Estos resultados demostraron que *L. marina* tolera un amplio rango de temperaturas, pero las bajas concentraciones de nutrientes limitan el asentamientos de esporas y cigotos.

El medio de cultivo Provasoli contiene altas concentraciones de nitrógeno y fósforo, junto con micronutrientes y vitaminas. En áreas costeras templadas, se supone que la disponibilidad de N y P inorgánico es el principal regulador del crecimiento de macroalgas (Mc Glathery *et al.* 1994, Oviatt *et al.* 1995, Howarth

2000, Lapointe y Bedford 2010). Amsler y Neushul (1989) demostraron que las esporas móviles de algas pardas, como *Macrocystis pyrifera* y *Pterygophora californica* Ruprecht, respondieron activamente a la variación en los nutrientes inorgánicos y orgánicos, donde por quimiotaxis, las esporas pueden detectar microhábitats que son nutricionalmente favorables para su desarrollo. Esto podría explicar la mayor densidad y supervivencia de esporas y cigotas registrado en este estudio, en los tratamientos con mayor concentración de nutrientes.

A pesar de que los pequeños talos de *L. marina* sobrevivieron a las tres temperaturas de incubación (8°C, 16°C y 24°C), la temperatura óptima de supervivencia fue la más baja a 8°C. Las especies de macroalgas de climas templados con ciclos de vida heteromórficos, como *L. marina*, exhiben mayor "amplitud de rendimiento" y típicamente crecen en ambientes con grandes fluctuaciones en la temperatura del agua de mar. De esta forma, por la tolerancia de *L. marina* a temperaturas bajas y altas se podría considerar que se trata de una especie euriterma (tom Dieck 1993 y Bischoff y Wiencke 1995) cuya dinámica de crecimiento típicamente se correlaciona con el régimen de temperatura local (Eggert 2012).

En este estudio se encontraron diferencias en el crecimiento óptimo para los talos esporófitos y gametófitos. Los esporófitos no solo crecieron más rápido que los gametófitos, sino que presentaron una temperatura óptima diferente. El mayor crecimiento de esporófitos fue a temperaturas cálidas, mientras que el mayor crecimiento de gametófitos fue en temperaturas frías. Este patrón también se observó en *Myriotrichia clavaeformis* Harvey que tiene una fase gametofítica de invierno y una fase esporofítica de verano (Peters 1988). Esto refleja la capacidad

de las diferentes fases de los ciclos de vida heteromórficas para explotar diferentes nichos ecológicos al adaptarse a entornos que difieren, en términos de temperatura, niveles de luz y concentraciones de nutrientes (Lubchenco y Cubitt 1980, Zupan 1990, Cunningham *et al.* 1993). Otras especies, como *Ectocarpus crouaniorum* Thuret y *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye, también presentan gametófitos y esporófitos que ocupan diferentes nichos espacio-temporales, donde los gametófitos se encontraron como epífitas sobre el alga *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) Link durante la primavera, mientras que los esporófitos están presentes todo el año sobre sustratos abióticos (Couceiro *et al.* 2015). Esto refleja que las condiciones óptimas para las poblaciones de algas en la naturaleza están influenciadas por las condiciones locales donde habitan. En la costa patagónica, la fase macroscópica de *L. marina* se encontró durante ocho meses correspondientes a la estación cálida, mientras que la fase microscópica gametofítica se encontró durante los meses más fríos (Poza *et al.* 2017).

La temperatura también afecta la permanencia de la fase gametofítica, la cual es esencial para el reclutamiento de la fase esporofítica y, por lo tanto, clave para controlar la variabilidad en las poblaciones (Graham 1996).

Los gametófitos microscópicos de *L. marina* se pudieron almacenar durante un largo período de tiempo a 8°C sin que se produzca el proceso de gametogénesis. La formación de estructuras reproductivas solo se inició en temperaturas más altas. El mismo comportamiento también ha sido informado en otras algas pardas, tales como *Glossophora kunthii* (C. Agardh) J. Agardh y *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux, donde las bajas temperaturas inhibieron la formación de estructuras reproductivas (Hoffmann y Malbrán 1989, Hwang *et al.* 2005).

Los aumentos y disminuciones en las concentraciones de nutrientes causaron diferencias en las tasas de crecimiento y supervivencia de *L. marina*. Según Carney y Edwards (2010), la limitación de nutrientes genera un retraso en el desarrollo e inhibe la reproducción.

En este estudio, los gametófitos y esporófitos jóvenes presentaron tasas de crecimiento más bajas en cultivos sin la adición de PES o con baja concentración de este medio, pero se vieron favorecidos en concentraciones altas. Sin embargo, la supervivencia de los esporófitos no estuvo afectada significativamente por las concentraciones de nutrientes. Estos resultados demuestran que los esporófitos jóvenes fueron más resistentes a las concentraciones desfavorables de nutrientes.

En este capítulo, se enfatizó la necesidad de conocer la composición bioquímica de *L. marina* para su uso en la industria. También, se brindaron las condiciones de cultivo óptimas para establecer un manejo controlado de su ciclo de vida, lo que junto al mantenimiento de gametófitos en latencia bajo condiciones controladas durante mucho tiempo se transforman en una herramienta valiosa que permitiría la protección de las poblaciones naturales, evitando la sobreexplotación.

Además, valorizó la población de *L. marina* como una novedosa fuente de compuestos bioactivos y de productos antioxidantes.

CONCLUSIONES FINALES

Generales

- Esta tesis representa el primer estudio integrador de dos poblaciones de *Leathesia marina*, localizadas sobre las costas patagónicas, que involucra aspectos bioecológicos de la especie tales como ciclo de vida, demografía poblacional, estudios fenológicos y de la comunidad de epífitos; así como sus formas de manejo, mediante la optimización de su cultivo: control de la fertilidad y caracterización bioquímica del alga, para su futura utilización en la industria farmacéutica o alimentaria.

- La descripción del ciclo de vida heteromorfo de *L. marina* evidenció, cómo diferentes morfologías que lo integran: dos morfotipos haploides (microtalo globoso y postrado) y un morfotipo diploide (macrotalo), le permiten a esta especie una perfecta adaptación al ambiente, con marcados cambios estacionales.

La presencia de dos microtalos con diferentes estrategias reproductivas brinda a esta *L. marina* la posibilidad de explotar una gama más amplia de condiciones ambientales. El microtalo postrado, adaptado a condiciones invernales, al poseer la capacidad de permanecer en latencia durante largos períodos de tiempo, le otorga a esta especie una ventaja evolutiva, que contribuye a su permanencia en la naturaleza durante las condiciones desfavorables en las costas patagónicas.

Por otro lado, los microtalos globosos, al presentar un alto rendimiento reproductivo, ya que produce estructuras fértiles cada 20-30 días, sumado a la capacidad para crecer en condiciones verano e invierno, constituyen una fase transicional, esencial para esta especie que habita un entorno muy fluctuante, con cambios bruscos de temperatura y radiación, fuertes vientos y elevado estrés por desecación.

Finalmente el macrotalo adaptado a condiciones de verano, representado por la fase diploide, surge como respuesta a la reproducción sexual, aportando una mayor variabilidad genética y mejor capacidad de adaptación poblacional en la naturaleza.

- La ecología y dinámica poblacional de *L. marina* se encuentran en una compleja interacción con los factores medioambientales que permite explicar cómo las especies efímeras, como *L. marina* lograron adaptarse a un ambiente adverso, con grandes cambios estacionales, como son las costas patagónicas. En estas costas, el establecimiento de comunidades más complejas, competitivamente superiores, resultaría más difícil.

La dinámica poblacional de *L. marina* presentó una curva de supervivencia tipo III, las cuales son frecuentes en algas de naturaleza efímera, con fases microscópicas. Las mismas poseen la capacidad de crecer rápidamente dejando un reclutamiento masivo, seguido de una alta mortalidad cuando las condiciones ambientales dejan de ser favorables.

La cobertura, la densidad y el tamaño de los macrotalos fueron mayores durante los meses más cálidos, en concordancia con las condiciones óptimas para el desarrollo de los macrotalos. Sin embargo, el mayor rendimiento reproductivo y liberación de esporas, ocurre en los meses más fríos, previo al final de la temporada del macrotalo y en concordancia con el reclutamiento de microtalos en la naturaleza.

A su vez la fase macroscópica presentó estructuras reproductivas durante todo el período, evidenciando un alto rendimiento reproductivo. Esto es típico en especie de naturaleza efímera y permite una gran colonización de las fases microscópicas haploides, que aseguran el asentamiento de generaciones futuras de la especie en el ambiente.

- El primer estudio exhaustivo sobre la dinámica temporal de las comunidades epífitas sobre las poblaciones de *Leathesia marina* resultó clave para comprender el estado sanitario ideal de las mismas y así seleccionar los momentos de cosecha adecuados. Las comunidades algales epífitas sobre *L. marina* y *Colpomenia sinuosa* se encuentran en completa interacción con el tipo de hospedador.

L. marina y *C. sinuosa* presentaron un amplio rango de algas epífitas, pertenecientes en su gran mayoría a Bacillariophyceae. Ambas especies compartieron más del 60% de las especies epífitas presentes en el área, posiblemente como resultado de la morfología análoga de ambos huéspedes y por presentar un papel ecológico similar en la zona intermareal.

A su vez tanto *L. marina* como *C. sinuosa* constituyen microhábitats capaces de alojar algas epífitas de diferente manera, según la morfología y el tiempo de permanencia del hospedador en la naturaleza. Por un lado, *L. marina* con una capa cortical rugosa y mayor cantidad de intersticios, proporciona mayor superficie disponible para ser colonizadas por las algas epífitas, lo que se refleja en una mayor capacidad de carga. En contraste, *C. sinuosa* con una capa cortical más lisa y la presencia de cutícula, ofrece una superficie menos amigable para el asentamiento de algas epífitas, presentando menor abundancia en general.

- La optimización de las condiciones de cultivo de *Leathesia marina*, revelaron las mejores condiciones para realizar el manejo controlado de las diferentes etapas del ciclo de vida, otorgando herramientas útiles para futuros emprendimientos de acuicultura. Sumado a ello, las características bioquímicas y la elevada actividad antioxidante de *L. marina*, la posiciona como una especie de elevado interés comercial, para su aprovechamiento tanto en la industria alimenticia como de la salud.

Metodológicas

- Las técnicas de cultivo empleadas, para la caracterización e identificación del microalga de *L. marina* en la naturaleza (capítulo II), así como para la correcta identificación taxonómica de las algas epífitas (capítulo III) demostraron ser procedimientos fundamentales durante el desarrollo de la tesis.

- La utilización de técnicas integradas: morfológicas, nivel de ploidía y filogenia de *L. marina* resultaron ser esenciales, para dilucidar correctamente el ciclo de vida de la especie y su correcta identificación. La utilización del citómetro de flujo para determinar la ploidía, de las distintas morfologías en el ciclo de vida de las algas, proporciona una herramienta fundamental que otorga resultados confiables.

- La puesta a punto de diferentes técnicas para los análisis bioquímicos y de actividad antioxidante, demostraron ser eficaces y permitieron dar un paso adelante en la investigación de productos de interés comercial. Además la optimización de los cultivos controlados de *L. marina* con fines productivos es desarrollada por primera vez, otorgando información fundamental para futuros emprendimientos de acuicultura en el país.

Líneas de investigación futuras

- Optimización de las condiciones de cultivo de otras especies de algas generadoras de sustancias bioactivas de interés comercial para el desarrollo de una promisoriosa acuicultura de estos recursos, garantizando un manejo sustentable, sin atentar contra las poblaciones naturales de nuestro país.

REFERENCIAS

- Abbott IA, Hollenberg GJ (1976) *Marine algae of California*. Stanford University Press, Stanford, California. 827 pp.
- Acha EM, Mianzan HW, Guerrero RA, Favero M, Bava J (2004) Marine fronts at the continental shelves of austral South America physical and ecological processes. *J. Mar. Syst.* 44: 83-105.
- Akioka H, Baba M, Masaki T, William Johansen H (1999) Rocky shore turfs dominated by *Corallina* (Corallinales, Rhodophyta) in northern Japan. *Phycol. Res.* 47: 199–206.
- Amsler CD, Neushul M (1989) Chemotactic effects of nutrients on spores of the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Pterygophora californica*. *Mar. Biol.* 102: 557–564.
- Andersen RA (1992) Diversity of eukaryotic algae. *Biodivers. Conserv.* 1: 267-292.
- Andrade LR, Salgado LT, Farina M, Pereira MS, Mourao PA, Amado Filho GM (2004) Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *J. Struct. Biol.* 145: 216-225.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant. Physiol.* 2: 1-15.
- Arrontes J (1990) Composition, distribution on host and seasonality of epiphytes on three intertidal algae. *Bot. Mar.* 33: 205-211.
- Balech E, Ehrlich MD (2008) Esquema biogeográfico del mar Argentino. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero.* 19: 45-75.
- Ballantine DL (1979) The distribution of algal epiphytes on macrophyte hosts offshore from La Parguera, Puerto Rico. *Bat. Mar.* 22: 107-111.
- Barbarino E, Lourenço SO (2005) An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro and microalgae. *J. Appl. Phycol.* 17: 447-460.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 6: 48–71.
- Baweja PS, Kumar D, Sahoo I (2016) Levine Biology of Seaweeds. En: Fleurence J, Levine I (Eds.), *Seaweed in Health and Disease Prevention*, Academic Press (Elsevier), Lewiston. pp. 41-106.
- Berges JA, Fischer AE, Harrison PJ (1993) A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Mar. Biol.* 115: 187-193.
- Bertagnolli C, da Silva MGC, Guibal E (2014) Chromium biosorption using the residue of alginate extraction from *Sargassum filipendula*. *Chem. Eng. J.* 237: 362-371.
- Bertness MD, Crain CM, Silliman BR, Bazterrica MC, Reyna MV, Hidalgo FJ, Farina K (2006) The community structure of western Atlantic Patagonian rocky shores. *Ecol. Monogr.* 76: 439-460.
- Bischoff B, Wiencke C (1995) Temperature ecotypes and biogeography of Acrosiphoniales (Chlorophyta) with Arctic-Antarctic disjunction and Arctic/cold-temperature distributions. *Eur. J. Phycol.* 30: 19-27.
- Bjærke MR, Fredriksen S (2003) Epiphytic macroalgae on the introduced brown seaweed

- Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phaeophyceae) in Norway. *Sarsia*. 88: 353-364.
- Bogaert K, Beeckman T, De Clerck O (2016) Abiotic regulation of growth and fertility in the sporophyte of *Dictyota dichotoma* (Hudson) JV Lamouroux (Dictyotales, Phaeophyceae). *J. Appl. Phycol.* 28: 2915-2924.
- Bolton JJ (1994) Global seaweed diversity: patterns and anomalies. *Bot. Mar.* 37: 241-245.
- Boraso A, Zaixso JM (2007) Algas Marinas Bentónicas. En: D. Boltovskoy (Ed.). *Atlas de Sensibilidad ambiental del mar y de la costa*. http://atlas.ambiente.gov.ar/tematicas/mt_02/macroalgas.htm.
- Boraso A, Zaixso JM (2008) Algas Marinas Bentónicas. En Boltovskoy D (Ed.) *Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino* [<http://atlas.ambiente.gov.ar>, acceso en marzo de 2018].
- Boraso AL (2013) *Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina*. Universidad de la Patagonia. Comodoro Rivadavia. 204 pp.
- Borowitzka MA, Lethbridge RC (1989) Seagrasses epiphytes. En: Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd SA (Eds.) *Biology of Seagrasses. Aquatic Plant Studies 2*, Elsevier, Amsterdam. pp. 458-499.
- Boschi EE (2000) Species of decapod crustaceans and their distribution in the American marine zoogeographic provinces. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*. 13: 7-136.
- Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333.
- Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27: 325-349. Brito L, Silva S (2005). Fenología y ciclo de vida del alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariaceae) en Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53: 67-73.
- Buia MC, Zupo V, Mazzella L (1996) Biodiversità della comunità epifita delle foglie di *Cymodocea nodosa* di un prato antistante l'isola d'Ishia (Golfo de Napoli). *Biol. Mar. Mediterr.* 3: 136-142.
- Cáceres EJ (1995) Métodos de preparación de algas para su observación con microscopía electrónica de transmisión convencional (METC). En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E (Eds) *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile, Concepción. pp. 147-168.
- Cardoso PG, Pardal MA, Lillebø AI, Ferreira SM, Raffaelli D, Marques JC (2004) Dynamic changes in seagrass assemblages under eutrophication and implications for recovery. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 302: 233-248.
- Carney LT, Edwards MS (2006) Cryptic processes in the sea: a review of delayed development in the microscopic life stages of marine macroalgae. *Algae*, 21: 161-168.
- Carney LT, Edwards MS, (2010) Role of nutrient fluctuations and delayed development in gametophyte reproduction by *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) in southern California. *J. Phycol.* 46: 987-996.
- Casal PS (1946) El litoral argentino y las islas de la República Argentina. *Soc. Argen. Est. Geog.* 3: 199-353.

- Cazón JP, Viera M, Sala S, Donati E (2014) Biochemical characterization of *Macrocystis pyrifera* and *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) in relation to their potentiality as biosorbents. *Phycologia*, 53: 100-108.
- Chaillou LL, Nazareno MA (2006) New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8397-8402.
- Chapman ARO (1974) The ecology of macroscopic marine algae. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 5. *Annual Reviews*. pp. 65-80.
- Chapman ARO, Burrows EM (1971) Field and culture studies of *Desmarestia aculeata* (L.) Lamour. *Phycologia*. 10: 63-76.
- Chapman ARO, Goudey CL (1983) Demographic study of the macrothallus of *Leathesia difformis* (Phaeophyta) in Nova Scotia. *Can. J. Bot.* 61: 319-323.
- Charrier B, Coelho SM, Le Bail A, Tonon T, Michel G, Potin P, Kloareg B, Boyen C, Peters AF, Cock JM (2008) Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytol.* 177: 319-332.
- Chernomorsky S, Segelman A, Poretz RD (1999) Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 19: 313-322.
- Chinnadurai S, Kalyanasundaram G (2013) Estimation of major pigment content in seaweeds collected from Pondicherry coast. *Int. J. Sci. Tech.* 9: 522-25.
- Cho GY, Lee S, H, Boo SM (2004) A new brown algal order, Ishigeales (Phaeophyceae), established on the basis of plastid protein-coding *rbcl*, *psaA*, and *psbA* region comparisons. *J. Phycol.* 40: 921-936.
- Choi HG, Lee YK, Lee IK (1994) Measurement of DAPI-stained DNA in *Dasysiphonia chejuensis* Lee et West (Rhodophyta) by a video interfaced digital image processor. *Kor. J. Phycot.* 9: 21-28.
- Clarke KR, Warwick RM (2001) A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216: 265-278.
- Clayton MN (1988) Evolution and life histories of brown algae. *Bot. Mar.* 31: 379-387.
- Cock JM, Godfroy O, Macaisne N, Peters AF, Coelho SM (2014) Evolution and regulation of complex life cycles: a brown algal perspective. *Curr. Opin. Plan. Biol.* 17: 1-6.
- Coelho SM, Godfroy O, Arun A, Le Corquille G, Peters AF, Cock JM (2011) OUROBOROS is a master regulator of the gametophyte to sporophyte life cycle transition in the brown alga *Ectocarpus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 11518-11523.
- Cole KM (1990) Chromosomes. En Cole KM, Sheath RGI (Eds) *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 73-101.
- Cole KM, Bourne V, Lin SC (1968) Electron microscope observations on chloroplasts of cultured *Leathesia difformis* (L.) Aresch. *Can. J. Genet. Cytol.* 10: 63-67.
- Correa JA (1994) Infections by pigmented algal endophytes: misuse of concepts and terminology. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 67: 4-8.
- Couceiro L, Le Gac M, Hunsperger HM, Mauger S, Destombe C, Cock JM, Ahmed S, Coelho SM, Valero M, Peters AF (2015) Evolution and maintenance of haploid-diploid life cycles in natural populations: The case of the marine brown alga *Ectocarpus*. *Evolution*, 69: 1808-1822.

- Crispino LMB, Sant'Anna CL (2006) Cianobactérias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do Estado de São Paulo. *Brasil. Rev. Bras. Bot.* 29: 639-656.
- Croce ME, Gauna MC, Fernández C, Parodi ER (2015) Intertidal seaweeds from North Atlantic Patagonian coasts, Argentina. *Check List.* 11: 1-8.
- Crow JF, Kimura M (1965) Evolution in sexual and asexual populations. *Am. Nat.* 99: 439-450.
- Cunningham EM, Guiry MD, Breeman AM (1993) Environmental regulation of development, life history and biogeography of *Helminthora stackhousei* (Rhodophyta) by daylength and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 171: 1-21.
- Dangeard P (1965) Recherches sur le cycle évolutif de *Leathesia difformis* (L.) Areschoug. *Botaniste*, 48: 5-43.
- Dangeard P (1969) A propos des travaux récents sur le cycle évolutif de quelques Pheophycées, Phéosporées. *Botaniste*, 52: 59-102.
- Dawes CJ (1998). *Marine botany*. John Wiley & Sons, inc. New York. 496 pp.
- Dayton PK (1971) Competition, disturbance, and community organization: the provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal community. *Ecol. Monogr.* 41: 351-389.
- Dayton PK (1975) Experimental evaluation of ecological dominance in a rocky intertidal algal community. *Ecol. Monogr.* 45: 137-159.
- Dayton PK, Currie V, Gerrodette T, Keller BD, Rosenthal R, Tresca DV (1984) Patch dynamics and stability of some California kelp communities. *Ecol. Monogr.* 54: 253-289.
- Dean RL, Connell JH (1987). Marine invertebrates in algal succession. III. Mechanisms linking habitat complexity with succession. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 109: 249-273.
- Dean TA, Jacobsen FR, Thies K, Lagos SL (1988) Differential effects of grazing by white sea urchins on recruitment of brown algae. *Mar. Ecol. Prog. Sear.* 48: 99-102.
- Deevey ES (1947) Life tables for natural populations of animals. *Quart. Rev. Biol.* 22: 283-314.
- Demes KW, Carrington E, Gosline J, Martone PT (2011) Variation in anatomical and material properties explains differences in hydrodynamic performances of foliose red macroalgae (Rhodophyta). *J. Phycol.* 47: 1360-1367.
- Dethier MN (1981) Heteromorphic algal life histories: the seasonal pattern and response to herbivory of the brown crust *Ralfsia californica*. *Oecologia* 49: 333-339.
- Dethier MN, Williams SL (2009) Seasonal stresses shift optimal intertidal algal habitats. *Mar. Biol.* 156: 555-567.
- Devinsky JS, Volse LA (1978) Effects of sediments on the development of *Macrocystis pyrifera* gametophytes. *Mar. Biol.* 48: 343-348.
- De Wreede RE, Klinger T (1988) Reproductive strategies in algae. En Lovett DJ, Lovett DL (Eds) *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*. Oxford University Press, New York. pp. 344.
- Dodds WK, Biggs BJ (2002) Water velocity attenuation by stream periphyton and macrophytes in relation to growth form and architecture. *J. N. Am. Benthol. Soc.*

- 21: 2-15. d'Orbigny A (1842) Voyage dans l'Amérique Méridionale. Tome 3(3): Mollusques. Paris: V. Levrault. 152 pp.
- Dring MJ (1992) *The biology of marine plants*. Cambridge University Press. New York. 199 pp.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Edwards MS (2000) The role of alternate life-history stages of a marine macroalga: A seed bank analogue? *Ecology*, 81: 2404-2415.
- Eggert A (2012) Seaweed Responses to Temperature. En: Wiencke C, Bischof K (Eds.) *Seaweed Biology: Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization*. Ecological Studies. Springer. Heidelberg. pp 135-156.
- Eggert A, Peters AF, Küpper FC (2010) The potential impact of climate change on endophyte infections in kelp sporophytes. En: Seckbach J, Einav R, Israel A (Eds) *Seaweeds and their Role in Globally Changing Environments*. Springer Netherlands. pp. 139-154.
- Eriksson BK, Johansson G, Snoeijs P (2002) Long-term changes in the macroalgal vegetation of the inner Gullmar Fjord, Swedish Skagerrak coast. *J. Phycol.* 38: 284-296.
- Feldman SC, Reynaldi S, Stortz CA, Cerezo AS, Damonte EB (1999) Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*. *Phytomedicine*, 6: 335-340.
- Fletcher RL (1987) *Seaweeds of the British Isles*, vol.3. Fucophyceae. Part 1. (Phaeophyceae). Publications. Natural History Museum, London.
- Fleurence J (1999) Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends. Food Sci. Technol.* 10: 25-28.
- Fleurence J (2004) Seaweed proteins. En: Yada RY (Ed.) *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing. Cambridge. pp. 197-210.
- Folin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 73: 627-650.
- Frankovich TA, Zieman JC, Peterson BJ, Fourqurean JW (2003) Nutrients, gastropod grazers, and seagrass leaf turnover rate as controls of epiphyte loading on *Thalassia testudinum*. *Gulf Mex. Sci.* 21: 114-115.
- Fritsch FE (1945) *The Structure and Reproduction of the Algae. Vol. 2. Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae and a Foreword*. Cambridge University Press. Cambridge. 939 pp.
- Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, Shibata, A.; Hayashi T, Nishikawa M, Suda N, Hibi Y, Mizuno Y, Tsukamura K, Hayakawa A, Tanuma S (2001) Seaweed prevents breast cancer? *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 483-487.
- Garbary D (1979) A revised species concept for endophytic and endozoic members of the Acrochaetiaceae (Rhodophyta). *Bot. Not.* 132: 451-455.
- Gauna MC, Parodi ER (2008) Green epi-endophytes in *Hymenena falklandica* (Rhodophyta) from the Patagonian coasts of Argentina: Preliminary observations. *Phycol. Res.* 56: 172-182.

- Gauna MC, Parodi ER, Cáceres EJ (2009 a) The occurrence of *Laminarionema elsbetiae* (Phaeophyceae) on *Rhodymenia pseudopalmata* (Rhodophyta) from the Patagonian coasts of Argentina: characteristics of the relationship in natural and experimental infections, and morphology of the epi-endophyte in unialgal free cultures. *Algae*, 24: 249-256.
- Gauna MC, Parodi ER, Cáceres EJ (2009 b) Epiphytic relationships of *Pseudendoclonium submarinum* Wille (Ulvophyceae) and *Rhodymenia pseudopalmata* (Rhodophyta) from the Patagonian coast of Argentina. *Phycol. Res.* 57: 313-322.
- Gauna MC, Parodi ER, Cáceres EJ (2009c) Epi-endophytic symbiosis between *Laminariocolax aecidioides* (Ectocarpales, Phaeophyceae) and *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) growing on Argentinian coasts. *J. Appl. Phycol.* 21: 11-18.
- Gauna MC, Cáceres EJ, Parodi ER (2015) Spatial and temporal variability in algal epiphytes on Patagonian *Dictyota dichotoma* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Aquat. Bot.* 120: 338-345.
- Gauna MC, Escobar JF, Odorisio M, Cáceres EJ, Parodi ER (2016) Spatial and temporal variation in algal epiphyte distribution on *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta) from northern Patagonia in Argentina. *Phycologia*, 56: 125-135.
- Godward MBE (1966) *The chromosomes of the algae*. Edward Arnold Ltd. London, 212 pp.
- Goff LJ, Coleman AW (1990) DNA: microspectrofluorometry. En Cole KM, Sheath RG (Eds.) *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 43-71.
- González MA, Goff LJ (1989) The red algal epiphytes *Microcladia coulteri* and *M. californica* (Rhodophyceae: Ceramiaceae). II Basiphyte specificity. *J. Phycol.* 9: 230-232.
- Graham MH (1996) Effect of high irradiance on recruitment of the giant kelp *Macrocystis* (Phaeophyta) in shallow waters. *J. Phycol.* 32: 903-906.
- Harlin MM (1980) Seagrass Epiphytes. En: Phillips RC, McRoy CP (Eds.) *Handbook of Seagrass Biology: An Ecosystem Perspective*. Garland STPM Press, New York. pp. 117-151.
- Hay M (1996) Marine chemical ecology: what's known and what's next?. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 200: 103-134.
- Hays CG (2005) Effect of nutrient availability, grazer assemblage and seagrass source population on the interaction between *Thalassia testudinum* (turtle grass) and its algal epiphytes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 314: 53-68.
- Heo S, Cha S, Lee K, Cho SK, Jeon Y (2005) Antioxidant activities of Chlorophyta and Phaeophyta from Jeju Island. *Algae*, 20: 251-260.
- Hernández-Almeida OU, Siqueiros-Beltrones DA (2008) Variaciones en la estructura de asociaciones de diatomeas epifitas de una zona subtropical. *Hidrobiologica*, 18: 51-61.
- Hoffmann AJ, Malbrán ME (1989) Temperature, photoperiod and light interactions on growth and fertility of *Glossophora kunthii* (Phaeophyta, Dictyotales) from Central Chile. *J. Phycol.* 25: 129-133.

- Hoffmann AJ, Santelices B (1991) Banks of algal microscopic forms: hypotheses on their functioning and comparisons with seed banks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 185-194.
- Holdt S, Kraan S (2011) Bioactive compounds in seaweed; functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* 23: 543-597.
- Howarth RW, Anderson D, Cloern J, Elfring C, Hopkinson C, Lapointe B, Malone T, Marcus N, McGlathery K, Sharpley AN, Walker D (2000) Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. *Iss. Ecol.* 7: 1-15.
- Hudon C, Legendre P (1987) The ecological implications of growth forms in epibenthic diatoms. *J. Phycol.* 23: 434-441.
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics*, 17: 754-755.
- Hughes JS, Otto SP (1999) Ecology and the evolution of biphasic life cycles. *Am. Nat.* 154: 306–320.
- Huovinen P, Gómez I (2012) Cold-temperate seaweed communities of the southern hemisphere. En Wiencke C, Bischof K (Eds.) *Seaweed biology*. Springer, Heidelberg, Berlin. pp. 293-313.
- Hurd CL, Durante KM y Harrison PJ (2000) Influence of bryozoan colonization on the physiology of the kelp *Macrocystis integrifolia* (Laminariales, Phaeophyta) from nitrogen-rich and poor sites in Barkley Sound, British Columbia, Canada. *Phycologia*, 39: 435-440.
- Hwang IK, Kim HS, Lee WJ (2005) Polymorphism in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Dictyotales, Phaeophyceae) from Korea. *Mar. Biol.* 147: 999-1015. Inagaki K (1958) A systematic study of the order Chordariales from Japan and its vicinity. *Sci. Pap. Inst. Algol. Res. Fac. Sci. Hokkaido Univ.* 4: 87-197.
- Istock CA (1967) The evolution of complex life cycle phenomena: an ecological perspective. *Evolution.* 21: 592-605.
- Ito K, Hori K (1989) Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food. Rev.* 5: 101-144.
- Jackman S (2015) pscl: classes and methods for R Developed in the Political Science Computational Laboratory. Department of Political Science. Stanford University. Stanford. California. R package version 1.4.9. URL: <http://pscl.stanford.edu/>
- Jeffrey ST, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.
- Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muñoz FJ (2000) Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr. Res.* 20: 595-598.
- John DM, Tittley I, Lawson GW, Pugh PJA (1994) Distribution of seaweed floras in the Southern Ocean. *Bot. Mar.* 37: 235-239.
- Jones E, Thornber CS (2010) Effects of habitat-modifying invasive macroalgae on epiphytic algal communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 400: 87-100.

- Kanamori M, Goshima S, Mukai H (2004) Seasonal variation in host utilization of epiphytic *Lacuna* species in mixed algal and surfgrass stands in Japan. *Mar. Ecol.* 25: 51-69.
- Kapraun DF, Nguyen MN (1994). Karyology, nuclear DNA quantification and nucleus-cytoplasmic domain variations in some multinucleate green algae. *Phycotogia*, 33: 42-45.
- Karez R, Engelbert S, Kraufvelin P, Pedersen MF, Sommer U (2004) Biomass response and change in composition of ephemeral macroalgal assemblages along an experimental gradient of nutrient enrichment. *Aquat. Bot.* 78: 103-117.
- Kawai H, Hanyuda T, Draisma SGA, Müller DG (2007) Molecular phylogeny of *Discosporangium mesarthrocarpum* (Phaeophyceae) with a reinstatement of the order Discosporangiales. *J. Phycol.* 43: 186-194.
- Keough MJ y Downes BJ (1982) Recruitment of marine invertebrates: the role of active larval choices and early mortality. *Oecologia*, 54: 348-352.
- Kim IH, Lee JH (2008) Antimicrobial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from macroalgae. *J. Ind. Eng. Chem.* 14: 568-572.
- Kinlan BP, Gaines SD (2003) Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*, 84: 2007-2020.
- Kirk JTO, Allen RL (1965) Dependence of chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21: 523-530.
- Kita T, Harada E (1962) Studies on the epiphytic communities. I. Abundance and distribution of microalgae and small animals on the *Zostera* blades. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.* 10: 245-257.
- Kitayama Y, Garrigue C (1998) Marine algal endophyte and epiphyte new to New Caledonia. *Bull. Natn. Sci. Mus. Ser. B.* 24: 93-101.
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B (2000) Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* 124: 1027-1038.
- Klinger T (1993) The persistence of haplodiploidy in algae. *Evol. Biol.* 6: 263-280.
- Korpinen S, Jormalainen V, Honkanen T (2007) Effects of nutrients, herbivory, and depth on the macroalgal community in the rocky sublittoral. *Ecology*, 88: 839-852.
- Kraberg AC, Norton TA (2007). Effect of epiphytism on reproductive and vegetative lateral formation in the brown, intertidal seaweed *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Phycol. Res.* 55: 17-24.
- Kraufvelin P, Salovius S, Christie H, Moy FE, Karez R, Pedersen MF (2006). Eutrophication induced changes in benthic algae affect the behaviour and fitness of the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Aquat. Bot.* 84: 199-209.
- Krebs CJ (1985) *Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia*. HARLA. México. 353 pp.
- Krumhansl KA, Demes KW, Carrington EH, Harley CDG (2015) Divergent growth strategies between red algae and kelps influence biomechanical properties. *Am. J. Bot.* 102: 1938-1944.
- Kühnemann O (1969) Vegetación marina de la Ría de Puerto Deseado Universidad Nacional de Tucuman, Centro de Investigacion de Biología Marina. pp. 5–46.

- Kumar CS, Ganesan P, Suresh PV, Bhaskar N (2008) Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review. *J. Food Sci. Technol.* 45: 1–13.
- Kumar V, Rao D, Thomas T, Kjelleberg S, Egan S (2011) Antidiatom and antibacterial activity of epiphytic bacteria isolated from *Ulva lactuca* in tropical waters. *World J. Microb. Biot.* 27: 1543-1549.
- Kumar CS, Sahoo D, Levine I (2015) Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. *Algal. Res.* 9: 117-125.
- Kylin H (1933a) Über die Entwicklungsgeschichte der Phaeophyceen. *Lunds Universitets Arsskrift, Ny Földj, Avd, 2.* 29: 1-102.
- Kylin H (1933b) Über einige kalkbohrende Chlorophyceen. *Kungl. Fysiogr. Sallsk. i Lund, Forhandl.* 5: 1-19.
- Lamarck JBP (1819) *Histoire Naturelle des Animaux sans Vértébrés*, volume 7. Paris: Verdiere, Libraire. 204 pp.
- Lane AL, Kubanek J (2008) Secondary metabolite defenses against pathogens and biofoulers. En: Amsler CD (Ed.) *Algal Chemical Ecology*. Springer, Berlin. pp 229-243.
- Lapointe B, Bedford B (2010) Ecology and nutrition of invasive *Caulerpa brachypus* f. *parvifolia* blooms on coral reefs off southeast Florida, USA. *Harmful Algae.* 9: 1-12.
- Larsen B, Salem DMSA, Sallam MAE, Mishrikey MM, Beltagy AI (2003) Characterization of alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea Coast. *Carbohydr. Res.* 338: 2325–2336.
- Lavery PS, Reid T, Hyndes GA, Van Elven BR (2007) Effect of leaf movement on epiphytic algal biomass of seagrass leaves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 338: 97-106.
- Lee KS, Park SR, Kim YK (2007) Effects of irradiance, temperature, and nutrients on growth dynamics of seagrasses: A review. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 350: 144-175.
- Le Gall Y, Brown S, Marie D, Mejjad M, Kloareg B (1993) Quantification of nuclear DNA and G-C content in marine macroalgae by flow cytometry of isolated nuclei. *Protoplasma*, 173: 123-132.
- Leonard GH (1994) Effect of the bat star *Asterina miniata* on recruitment of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* C. Agardh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 179: 81-89.
- Lethbridge RC, Borowitzka MA, Benjamin K (1988) The development of an artificial *Amphibolis*-like seagrass of complex morphology and preliminary data on its colonisation by epiphytes. *Aquat. Bot.* 31: 153–168
- Lezcano V, Morelli S, Fernandez C, Parodi ER (2018) Antitumoral and antioxidant activity of the freshwater macroalga *Cladophora surera*. *J. Appl. Phycol.* 30: 2913-2921.
- Littler MM, Littler DS (1980) The evolution of thallus form and survival strategies in benthic marine macroalgae: field and laboratory tests of a functional form model. *Amer. Naturalist.* 116: 25-44.
- Liuzzi MG, Gappa JL, Piriz ML (2011) Latitudinal gradients in macroalgal biodiversity in the Southwest Atlantic between 36 and 55° S. *Hydrobiologia*, 673: 205-214.

- Lobban CS, Harrison PJ (1994) *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 384.
- Lotka AJ (1925) *Elements of physical biology*. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins Company. 435 pp.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lubchenco J, Cubitt J (1980) Heteromorphic life histories of certain marine algae as adaptations to variations in herbivory. *Ecology*, 61: 676-687.
- Luthringer R, Cormier A, Ahmed S, Peters AF, Cock JM, Coelho SM (2014) Sexual dimorphism in the brown algae. *Perspect. Phycol.* 1: 11-25.
- Lutz VA, Boschi EE, Bremec CS, Cousseau MB, Figueroa DE, Rodríguez DH, Scarlato N, Viñas MD, Lewis MN, Penchaszadeh PE, Acuña FH, Aguirre ML, Akselman R, Alder VA, Baldoni A, Barría MS, Bastida RO, Boraso AS, Calvo J, Campagna C, Cañete G, Cassia MC, Cervellini PM, Chiaramonte GE, Costagliola M, Cosulich G, Daponte MC, Díaz de Astarloa JM, Elias R, Esnal GB, Excoffon AC, Freije H, Garcia de la Rosa S, Genzano GN, Giberto DA, Guerrero R, Helbling W, Hoffmeyer MS, Incorvaia IS, Iribarne O, Jaureguizar AJ, Kogan M, Lovrich GA, Madirolas AO, Martin JP, Martos P, Mendoza ML, Marque SM, Mianzán HW, Morriconi ER, Negri RM, Obenat S, Pastor de Ward CT, Pérez de Fankhauser LB, Quintana F, Reta R, Rico R, Roux AM, Sabatini ME, Scelzo MA, Schejter L, Schiavini ACM, Silva RI, Silvoni MG, Spivak E, Trucco MI, Vallarino EA, Zelaya DG (2003) Perspectives of marine biodiversity studies in Argentina. *Gayana*, 67: 371-382.
- Mabeau S, Fleurence J (1993) Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects, *Trends Food Sci. Technol.* 4: 103-107.
- Mable BK, Otto SP (1998) The evolution of life cycle with haploid and diploid phases. *BioEssays*, 20: 453-462.
- Mann KH (1982) *Ecology of Coastal Waters*. University of California Press, Berkeley, California, 322 pp.
- Martínez-Crego B, Prado P, Alcoverro T, Romero J (2010) Composition of epiphytic leaf community of *Posidonia oceanica* as a tool for environmental biomonitoring. *Estuar. Coast Shelf. Sic.* 88: 199-208.
- Mazzella L (1999) Epiphytic diatoms of seagrasses (*Posidonia australis*, *P. sinuosa*, *P. coriacea*) from Western Australia. En: Walker DI, Wells FE (Eds.) *The Seagrass Flora and Fauna of Rottnest Island*. Western Australian Museum, Perth. pp 89-100.
- Mc Connico LA, Foster MS (2005) Population biology of the intertidal kelp, *Alaria marginata* Postels and Ruprecht: a non-fugitive annual. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 324: 61-75.
- Mc Glathery KJ, Marino R, Howarth RW (1994) Variable rates of phosphate uptake by shallow marine carbonate sediments: Mechanisms and ecological significance. *Biogeochem.* 25: 127-146.

- Mc Hugh DJ (1987) Production, properties and uses of alginates, Production and Utilization of Products From Commercial Seaweeds, FAO. Fish. Tech. Pap. 288 pp. 58–115.
- Mc Hugh DJ (2003) *A guide to the seaweed industry*. FAO Fisheries Technical Paper no. 441. Rome: FAO, 105 pp.
- Mc Lachlan J (1974) Effects of temperature and light on growth of embryos of *Fucus edantatus* and *F. distichus* ssp. *distichus*. Can. J. Bot. 52: 943-951.
- Mendoza-González AC, Mateo-Cid LE (1996) Contribucion al estudio de la ficoflora marina de la costa del estado de Chiapas, Mexico. Polibotánica, 2: 61-118.
- Meneses I (2000) Patterns and breaking points in the distribution of benthic algae along the temperate Pacific coast of South America. Rev. Chi. Hist. Nat. 73: 615-623.
- Michael TS, Shin HW, Hanna R, Spafford DC (2008) A review of epiphyte community development: Surface interactions and settlement on seagrass. J. Environ. Biol. 29: 629-638.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, pp. 1–8.
- Moncreiff CA, Sullivan MJ (2001) Trophic importance of epiphytic algae in subtropical seagrass beds: evidence from multiple stable isotope analyses. Mar. Eco. Prog. Series. 215: 93-106.
- Morcom NF, Woelkerling WJ (2000) A critical interpretation of coralline-coraline (Corallinales, Rhodophyta) and coralline-other plant interactions. Cryptogamie Algol. 21: 1-31.
- Müller DG, Schmidt VV (1988) Culture studies on the life history of *Elachista stellaris* Aresch. (Phaeophyceae, Chordariales). Br. Phycol. J. 23: 153-158.
- Muñoz J, Freile-Pelegrín Y, Robledo D (2004) Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. Aquaculture, 239: 161-177.
- Murata M, Nakazoe J (2001) Production and use of marine algae in Japan. Jpn. Agr. Res. Q. 35: 281-290.
- Nakahara H (1984) Alternation of generations in some brown algae in unialgal axenic cultures. Sci. Pap. Inst. Algol. Res. 7: 91-184.
- Nielsen R (1988) Small green algae from brackish water in th Tvärminne area, southern Finland. An. Bot. Fen. 25: 237-257.
- Nielsen R, McLachlan J (1986) *Acrochaete marchantiae* comb. nov. and *Trichothyra irregularis* gen. et. sp. nov. with notes on other species of small filamentous green algae from St. Lucia (West Indies). Nord. J. Bot. 6: 515-524.
- Nishide E, Uchida H (2003) Effects of *Ulva* powder on the ingestion and excretion of cholesterol in rats. En: Chapman ARO, Anderson RJ, Vreeland VJ, Davison IR (Eds.) *Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium*. Oxford University Press. Oxford. pp. 165-168.

- Oates BR (1989) Articulated coralline algae as a refuge for the intertidal saccate species, *Colpomenia peregrina* and *Leathesia difformis* in Southern California. *Bot. Mar.* 32: 475-478.
- Odum EP (1984) *Ecología*. Interamericana. México. 639pp.
- Okamura K (1936) *Japanese algae*. Tokyo: Uchida-rokakuho. 964. pp.
- Okuzumi J, Takahashi T, Yamane T, Kitao Y, Inagake M, Ohya K, Nishino H, Tanaka (1993) Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 68: 159-168.
- Oliveira EC, Paula EJ, Plastino EM, Petti R (1995) Manual de métodos ficológicos. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E (Eds.) *Metodologías para cultivo no axénico de macroalgas marinas in vitro*. Universidad de Concepción. Concepción. pp. 429-447.
- Olivier SR, Paternoster IK, Bastida R (1966) Estudios biocenóticos en las costas de Chuhut (Argentina) I. Zonación biocenológica de Puerto Pardelas (Golfo Nuevo). *Boletín del Instituto de Biología Marina*, 10: 1-74.
- Ortuño-Aguirre C, Riosmena-Rodríguez R (2007) Dynamics of epiphytism on *Padina concrescens* (Dictyotales: Phaeophyta) from the southwestern coast of the Baja California Peninsula, México. *Cienc. Mar.* 33: 311-317.
- Otto SP, Marks JC (1996) Mating systems and the evolutionary transition between haploidy and diploidy. *Biol. J.* 57: 197-218.
- Oviatt C, Doering P, Nowicki B, Reed L, Cole J, Frithsen J (1995) An ecosystem level experiment on nutrient limitation in temperate coastal marine environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116: 171-179.
- Parodi ER (2004). Marismas y algas bentónicas. En: Piccolo MC, Hoffmeyer MS (Eds.), *Ecosistema del estuario de Bahía Blanca*. IADO. Bahía Blanca. pp. 101-107
- Papenfuss GF (1953) Problems in the classification of the marine algae in the tropical and southern Pacific. *Proc. 7th Int. Bot. Congr.* 5: 822-823.
- Paruelo JM, Beltran A, Jobbagy E, Sala OE, Golluscio RA (1998) The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. *Ecol. Austral*, 8: 85-101.
- Peet RK (1975) Relative Diversity Indices. *Ecology*. 56: 496-498.
- Pereira R, Teixeira V, Kelecom A (1994) Chemical defenses against herbivores in marine algae. 1. The brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux from Brazil. *An. Acad. Bras. Ci.* 66: 229-235.
- Peters AF (1987) Reproduction and sexuality in the Chordariales (Phaeophyceae). A review of culture studies. *Prog. Phycol. Res.* 5: 223-263.
- Peters AF (1988) Culture studies of a sexual life history in *Myriotrichia clavaeformis* (Phaeophyceae, Dictyosiphonales). *Br. Phycol. J.* 23: 299-306.
- Peters AF, Ramírez ME (2001) Molecular phylogeny of small brown algae, with special reference to the systematic position of *Caepidium antarcticum* (Adenocystaceae, Ectocarpales). *Cryptogam. Algol.* 22: 187-200.

- Peters AF, Marie D, Scornet D, Kloareg B, Cock JM (2004) Proposal of *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) as a model organism for brown algal genetics and genomics. *J. Phycol.* 40: 1079-1088.
- Peterson BJ, Frankovich TA, Zieman JC (2007) Response of seagrass epiphyte loading to field manipulations of fertilization, gastropod grazing and leaf turnover rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 349: 61-72.
- Phillips N, Calhoun S, Moustafa A, Bhattacharya D, Braun EL (2008) Genomic insights into evolutionary relationships among heterokont lineages emphasizing the Phaeophyceae. *J. Phycol.* 44: 15-18.
- Piazzi L, Gennaro P, Balata D (2012) Threats to macroalgal coralligenous assemblages in the Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 64: 2623-2629.
- Pielou EC (1975) *Ecological diversity*. Wiley- Interscience, New York. 165 pp.
- Pinedo S, García M, Satta MP, De Torres M, Ballesteros E (2007) Rocky-shore communities as indicators of water quality: a case study in the Northwestern Mediterranean. *Mar. Pollut. Bull.* 55: 126-135.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RC (2016) *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3. 128 pp.
- Piola AR, Scasso LM (1988) Circulación en el golfo San Matías. *Geoacta*, 15: 33-51.
- Poza AM, Gauna MC, Escobar JF, Parodi ER (2017) Heteromorphic phases of *Leathesia marina* (Ectocarpales, Ochrophyta) over time from northern Patagonia, Argentina. *Phycologia*, 56: 579-589.
- Price HJ (1976) Evolution of DNA content in higher plants. *Bot. Rev.* 42: 27-52.
- Provasoli L (1968) Media and prospects for the cultivation of marine algae. En Watanabe A, Hattori A (Eds.) *Cultures and Collections of Algae* . Proceedings of US-Japan Conference, Hakone, September 1966. Japanese Society for Plant Physiology, Tokyo. pp. 63-75.
- Quartino ML, Boraso de Zaixso AL (1996) *Leathesia difformis* en Punta Este, Chubut, Argentina. *Rev. Bras. Biol.* 56: 139-146.
- Rasmussen R.S., Morrissey MT,(2007) Marine biotechnology for production of food ingredients. En: Taylor SL. (Ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. vol. 52, Elsevier, New York. pp. 237-292.
- Rechimont ME, Galván DE, Sueiro MC, Casas G, Piriz ML, Diez ME, Primost M, Zabala MS, Márquez F, Brogger M, Alfaya JEF, Bigatti G (2013) Benthic diversity and assemblage structure of a north Patagonian rocky shore: a monitoring legacy of the NaGISA project. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 93: 2049-2058.
- Reyes J, Afonso-Carrillo J (1995) Morphology and distribution of nongeniculate coralline algae (Corallinaceae: Rhodophyta) on the leaves of the seagrass *Cymodocea nodosa* (Cymodoceae). *Phycologia*. 34: 179-190.
- Richardson SL (2006) Response of epiphytic foraminiferal communities to natural eutrophication in seagrass habitats of Man O'War Cay, Belize. *Mar. Ecol.* 27: 404-416.
- Roughgarden J, Gaines SD, Pacala SW (1986) Supply side ecology: The role of physical transport Past and present. En: Gee JHR, Giller PS (Eds.) *Organization of*

- communities Publications: Past and present*. Blackwell Scientific processes. Oxford. pp. 491-518.
- Round FE (1984) *The Ecology of Algae*. Cambridge University Press. Cambridge. 657 pp.
- Round FE (1992) A re-investigation of some fragilarioid diatoms in the Provasoli/Guillard culture collection. *Diatom. Res.* 7: 303-311.
- Russell G (1986) Variation and natural selection in marine macroalgae. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 24: 309-377.
- Russell G, Fielding AH (1974) The competitive properties of marine algae in culture. *J. Ecol.* 62: 689-698
- Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K (2007) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites, *J. Agric. Food Chem.* 55: 8516-8522.
- Sand-Jensen K (1977) Effects of epiphytes on eelgrass photosynthesis. *Aquat. Bot.* 3: 55-63.
- Santelices B (1980) Phytogeographic characterization of the temperate coast of Pacific South America. *Phycologia*, 19: 1-12.
- Santelices B, Aedo D, Hoffman A (2002) Banks of microscopic forms and survival to darkness of propagules and microscopic stages of macroalgae. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 75: 547-555.
- Santiañez WJE, Lee KM, Uwai S, Kurihara A, Geraldino PJL, Ganzon-Fortes ET, Boo SM, Kogame K (2017) Untangling nets: elucidating the diversity and phylogeny of the clathrate brown algal genus *Hydroclathrus*, with the description of a new genus *Tronoella* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae). *Phycologia*. 57: 61–78.
- Sauvageau C (1925) Sur le developpement d'une algue phéosporeé, *Leathesia difformis* Aresch. *C. R. Acad. Sci.* 180: 1632-1635.
- Scagel RF (1966) The Phaeophyceae in perspective. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 4: 123-194.
- Schiel DR, Foster MS (2006) The population biology of large brown seaweeds: Ecological consequences of multiphase life histories in dynamic coastal environments. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 343-372.
- Schmidt AL, Coll M, Romanuk TN, Lotze HK (2011) Ecosystem structure and services in eelgrass *Zostera marina* and rockweed *Ascophyllum nodosum* habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 437: 51-68.
- Scrosati R, DeWreede RE (1998) The impact of frond crowding on frond bleaching in the clonal intertidal alga *Mazzaella cornucopiae* (Rhodophyta, Gigartinaceae) from British Columbia, Canada. *J. Phycol.* 34: 228–232.
- Seely GR, Duncan MJ, Vidaver WE (1972) Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Mar. Biol.* 12: 184-188.
- Shannon CE, Weaver W (1949) *The mathematical theory of communication*. University Illinois Press, Urbana, IL. 132 pp.
- Shi D, Li J, Guo S, Su H, Fan X (2009) The antitumor effect of bromophenol derivatives in vitro and *Leathesia nana* extract in vivo. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 27: 277-282.

- SHN (2014) Tablas de Marea. Servicio de Hidrografía Naval, Armada Argentina. 264 pp.
- Sieburth JM, Thomas C (1973) Fouling on eelgrass (*Zostera marina*). J. Phycol. 24: 132-140.
- Simpson GG (1960) Notes on the measurement of faunal resemblance. Amer J Sci. 258: 300-311.
- Siniscalchi AG, Gauna MC, Cáceres EJ, Parodi ER (2012) *Myrionema strangulans* (Chordariales, Phaeophyceae) epiphyte on *Ulva* spp. (Ulvophyceae) from Patagonian Atlantic coasts. J. Appl. Phycol. 24: 475-486.
- Siqueiros-Beltrones DA, Ibarra Obando SE, Loya-Salina DH (1885) Una aproximación a la estructura florística de las diatomeas epífitas de *Zostera marina* y sus variaciones temporales en Bahía Falsa, San Quintín, B.C. Cs. Marinas. 11: 69-88.
- Skottsberg C (1921). Botanische Ergebnisse der schwedischen Expedition nach Patagonien und dem Feuerlande 1907-1909, vol. VIII. Marine Algen. I. Phaeophyceae. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar. 63:1-56
- Smith S (1981) Marine macrophytes as a global carbon sink. Science 211: 838-840.
- Somsueb S, Ohno M, Kimura H (2001) Development of seaweed communities on suspended substrata with three slope angles. J. Appl. Phycol. 13: 109-115.
- Sorrivas de Lozano, V Morales A (1986) *Introducción a la Microscopía Electrónica*. Centro Regional de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Bahía Blanca Press (CRIBABB). Steinberg, Argentina, Bahía Blanca. 220 pp.
- Sparrow AH, Miksche JP (1961) Correlation of nuclear volume and DNA content with higher plant tolerance to chronic radiation. Science, 134: 282-283.
- Spavieri J, Allmendinger A, Kaiser M, Casey R, Hingley-Wilson S, Lalvani A, Tasdemir D (2010) Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty one brown algae (Phaeophyceae) from British and Irish waters, Phytother. Res. 24: 1724-1729.
- Stamatakis A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 30: 1312–1313.
- Steinberg PD, De Nys R (2002) Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. J. Phycol. 38: 621-629.
- Swanson AK, Druehl LD (2000) Differential meiospore size and tolerance of ultraviolet light stress within and among kelp species along a depth gradient. Mar. Biol. 136: 657-664.
- Takamatsu M (1939) The species of *Leathesia* from Northeastern Honshu, Japan. Saito Ho-on Kai Mus. Res. Bull. 17: 1-19.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
- Tanaka N (1986). Adhesive strength of epiphytic diatoms on various seaweeds. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 52: 817-821.
- Tanaka A, Uwai S, Nelson W, Kawai H (2010) *Phaeophysema* gen. nov. and *Vimineoleathesia* gen. nov., new brown algal genera for the minute Japanese members of the genus *Leathesia*. Eur. J. Phycol. 45: 107-115.

- Team RC (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ter Braak CJF (1994) Canonical community ordination. Part I: basic theory and linear methods. *Ecoscience* 1: 127-140.
- Thorner CS (2006) Functional properties of the isomorphic biphasic algal life cycle. *Integr. Comp. Biol.* 46: 605-614.
- Tjørve KM, Tjørve E (2017) The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS One*, 12 e0178691.
- tom Dieck I (1993) Temperature tolerance and survival in darkness of kelp gametophytes (Laminariales, Phaeophyta): ecological and biogeographical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100: 253-264.
- Underwood AJ, Fairweather PG (1989) Supply-side ecology and benthic marine assemblages. *Trends Ecol. Evol.* 4: 16-20.
- Vadas Sr RL, Johnson S, Norton TA (1992) Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae. *Br. Phycol. J.* 27: 331-351.
- van den Hoek C, van den Mann DG, Jahns HM (1995) *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts. 576 pp.
- Vandermeulen H, Dewreede RE (1986) The phenology, mortality, dispersal and canopy species interaction of *Colpomenia peregrina* (Sauv.) Hamel in British Columbia. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 99: 31-47.
- Venables WN, Ripley BD (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition, Springer, New York, USA.
- Vergés A, Paul NA, Steinberg PD (2008) Sex and life-history stage alter herbivore responses to a chemically defended red alga. *Ecology*, 89: 1334-1343.
- Verma P, Kumar M, Mishra G, Sahoo D (2017) Multivariate analysis of fatty acid and biochemical constituents of seaweeds to characterize their potential as bioresource for biofuel and fine chemicals, *Bioresour. Technol.* 226: 132-144.
- Vimala T, Poonghuzhali TV (2015) Estimation of pigments from seaweeds by using acetone and DMSO. *I.J.S.R.* 4: 1850-1854.
- Volterra V (1926) Fluctuations in the abundance of a species considered mathematically. *Nature*, 118: 558-560.
- Wahl M, Mark O (1999) The predominantly facultative nature of epibiosis: experimental and observational evidence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187: 59-66.
- Weibull W (1951) A statistical distribution function of wide applicability. *J. Appl. Mech.* 18: 293-297.
- Whittick A (1986) Observations of the relationship between cell volume, nuclear volume, and DNA level in two species of the Ceramiaceae (Rhodophyta). *Br. Phycol. J.* 21: 314.
- Wiencke C, tom Dieck I (1989) Temperature requirements for growth and temperature tolerance of macroalgae endemic to the Antarctic region. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 54: 189-197.

- Wiencke C, tom Dieck I (1990) Temperature requirements for growth and survival of macroalgae from Antarctica and southern Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59: 157-170.
- Wieters EA, McQuaid C, Palomo G, Pappalardo P, Navarrete SA (2012) Biogeographical boundaries, functional group structure and diversity of rocky shore communities along the Argentinean coast. *PLoS one.* 7: e49725.
- Wilson DL (1994) The analysis of survival (mortality) data: fitting Gompertz, Weibull, and logistic functions. *Mechanisms of Ageing and Development* 74: 15-33.
- Wilson KL, Kay LM, Schmidt AL, Lotze HK (2015) Effects of increasing water temperatures on survival and growth of ecologically and economically important seaweeds in Atlantic Canada: implications for climate change. *Mar. Biol.* 162: 2431-2444.
- Womersley HBS (1987) *The marine benthic flora of southern Australia*, Part II. Southern Australian Government Printing Division, Adelaide, Australia. 484 pp.
- Worm B, Lotze HK, Sommer U (2000) Coastal food web structure, carbon storage, and nitrogen retention regulated by consumer pressure and nutrient loading. *Limnol. Oceanogr.* 45: 339-349.
- Yamamoto K, Endo H, Yoshikawa S, Ohki K, Kamiya M (2013) Various defense ability of four sargassacean algae against the red algal epiphyte *Neosiphonia harveyi* in Wakasa Bay, Japan. *Aquat. Bot.* 105: 11-17.
- Yoneshigue-Valentin Y (1990) The life cycle of *Laminaria abyssalis* (Laminariales, Phaeophyta) in culture. *Hydrobiologia*, 204: 461-466.
- Xu N, Fan X, Yan X, Tseng CK (2004) Screening marine algae from China for their antitumor activities. *J. Appl. Phycol.* 16: 451-456.
- Yuan YV, Walsh NA (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1144-1150.
- Zhang WW, Duan XJ, Huang HL, Zhang Y, Wang BG (2007) Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyclocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *J. Appl. Phycol.* 19: 97-108.
- Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula. Mexico. *J. Appl. Phycol.* 19: 449-458,
- Zupan JR, West JA (1990) Photosynthetic responses to light and temperature of the heteromorphic marine alga *Mastocarpus papillatus*. *J. Phycol.* 26: 232-239.