



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

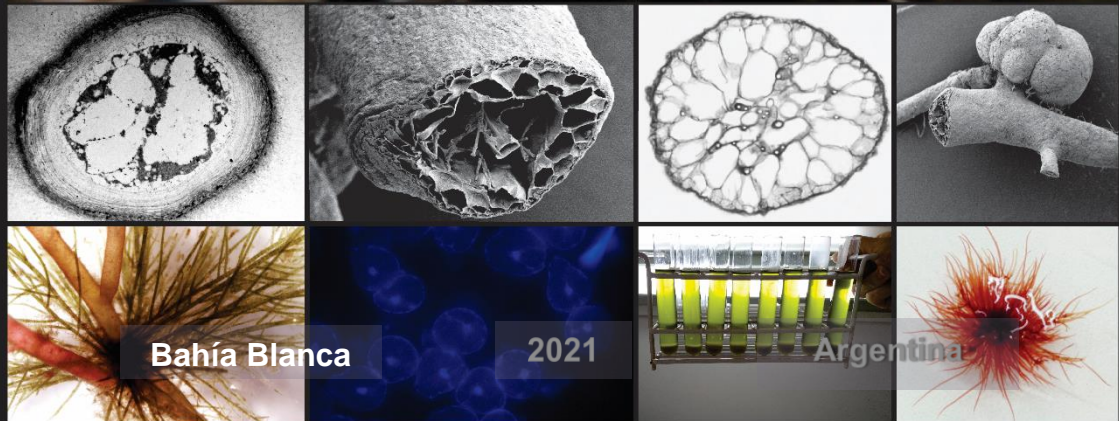
Tesis Doctoral en Biología

EVALUACIÓN BIOECOLÓGICA DE *MERIDIONELLA*  
*OBTUSANGULA* (RHODOPHYTA) DEL GOLFO SAN  
MATÍAS Y SU VALORACIÓN COMO FUENTE DE  
FICOCOLOIDES

Lic. Gina A. Tonicelli

Directora:  
Dra. Elisa R. Parodi

Co- directora:  
Dra. M. Cecilia Gauna





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**Tesis Doctoral en Biología**

**EVALUACIÓN BIOECOLÓGICA DE *MERIDIONELLA  
OBTUSANGULA* (RHODOPHYTA) DEL GOLFO SAN  
MATÍAS Y SU VALORACIÓN COMO FUENTE DE  
FICOCOLOIDES**

**Lic. Gina A. Tonicelli**

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

**Co- directora: M.  
Cecilia Gauna**

**2021**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

## 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. 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 2016 a diciembre de 2020, bajo la dirección de la Dra. Elisa R. Parodi, Profesora Titular de Ecología Acuática y de Botánica Marina e Investigadora Principal *Ad Honorem* del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Co-dirección de la Dra. María Cecilia Gauna, Profesora de Botánica Marina y Acuicultura General e Investigadora Adjunta 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 M. 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 y CONICET, porque en el marco de los subsidios para proyectos de investigación otorgados a la Dra. Parodi, que 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 empresa de buceo Cota Cero por haberme brindado sus servicios para la recolección de las algas mediante buceo autónomo a lo largo de mis campañas, así como su buena predisposición a la hora de trabajar.

Al Servicio Meteorológico Nacional por brindarme información esencial para el desarrollo de la tesis.

A las Dras. Viviana Cambi y Vanesa Pérez Cuadra por su predisposición en la enseñanza de técnicas histológicas y el acceso a las instalaciones del laboratorio de Plantas Vasculares, de la UNS.

Al Dr. Marcelo Villar por brindarme acceso a las instalaciones de su laboratorio en la Planta Piloto de Ingeniería Química, para desarrollar el estudio con los polisacáridos.

A los Dres. M. Emilia Croce, Díaz-Tapia Pilar, Freshwater D. Wilson, Fredericq Suzanne y Hommersand Max H. por su colaboración en los estudios moleculares y morfológicos de la especie.

A las Dras. M. Emilia Croce y Ailén M. Poza por su incontable apoyo en los diferentes estudios de esta tesis.

A mi familia y mis amigos de la vida, por haberme sostenido en cada momento de este trayecto.

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

Resultados parciales de esta tesis han sido publicados:

- **2021.** Tonicelli, G. A., Croce, M. E., Díaz-Tapia, P., Fredericq, S., Freshwater, D. W., Gauna, M. C., Parodi R. E., Verbruggen H. & Hommersand, M. H. *Meridionella* gen. nov., a new genus of Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta) from the southern Hemisphere, including *M. obtusangula* comb. nov. and *M. antarctica* sp. nov. *Journal of Phycology*, 57(3), 797-816.

#### **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 2014-2016 *prorrogado* (Cód.11220130100070CO) y el proyecto institucional CONICET P-UE IADO (22920160100057CO).

## RESUMEN

Esta tesis se centra en una población de *Meridionella obtusangula* (Floridiophyceae, Gigartinales, Rhodophyta) una macroalga roja recientemente descubierta en el Golfo San Matías, Argentina. Incluye estudios que integran tanto aspectos básicos de su taxonomía, biología y ecología, como aplicados que resultaron en la obtención y caracterización de polisacáridos sulfatados de sus paredes celulares. La identidad taxonómica de las macroalgas como miembro de las Cystocloniaceae se basó en observaciones morfológicas aplicando diversas técnicas de microscopía óptica y electrónica. Asimismo, se complementó con estudios filogenéticos realizados en colaboración con expertos en la familia Cystocloniaceae concluyendo en el reconocimiento de los taxones como un nuevo género *Meridionella* Tonicelli, ME. Croce & Hommersand *nov. gen.* y la confirmación de la identidad de los especímenes argentinos como *Meridionella obtusangula* Tonicelli, ME. Croce & Hommersand *nov. comb.* El ciclo de vida fue analizado en condiciones de cultivo *in vitro*, e incluyó observaciones morfológicas y estudios de ploidía, tanto para talos de la naturaleza como en cultivo. *M. obtusangula* presenta un ciclo de vida triplobionte haplo-diplonte típico de las algas rojas, con gametofitos y tetrasporofitos isomórficos. La reproducción asexual en ambos talos fue por estolones o por apomeiosis en tetrasporofitos. Para un mejor conocimiento de la especie, se realizaron ensayos de cultivo *in vitro* para analizar las condiciones abióticas (selección del medio de cultivo, concentraciones del mismo, temperaturas y fotoperiodos) que producirían un crecimiento óptimo. Las condiciones óptimas para desarrollo de los talos tetraspóricos y gametofíticos, se lograron en medio de cultivo enriquecido Von Stosch. El crecimiento fue mayor a temperaturas elevadas, mientras que la supervivencia óptima se logró en una franja de valores más bajos. Además, crecimiento y supervivencia de talos tetraspóricos fue mayor que el de los gametofíticos. Estos resultados observados *in vitro*, sumado a los registros de mayor densidad de tetrasporofitos por sobre gametofitos en el ambiente natural, brinda elementos para comprender el desbalance entre los distintos estadios reproductivos de la población de *M. obtusangula* estudiada. Los estudios fenológicos y poblacionales realizados en la naturaleza, así como

un estudio a nivel comunidad de las macroalgas acompañantes, permitieron entender su dinámica temporal, basándose en las presiones del entorno en la costa atlántica. Talos reproductivos como vegetativos tuvieron un comportamiento estacional, coexistiendo en otoño, invierno y primavera, aunque en diferentes proporciones. En verano al no hallarse talos macroscópicos durante los muestreos, se asumió que se encontraban en estadios microscópicos que dificultaron su recolección y posterior estudio. La abundancia y el tamaño de los talos estuvieron fuertemente influenciados por las condiciones ambientales: temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidad del viento, lo que indica que esta especie está fenológicamente y poblacionalmente sujeta a los cambios estacionales. A nivel comunidad, *M. obtusangula* se encontró acompañada por un gran número de especies pertenecientes a algas rojas (Rhodophyta), pardas (Ochrophyta) y verdes (Chlorophyta). Este ensamble de macroalgas integrado por especímenes de los géneros *Ahnfeltia*, *Antithamnion*, *Ceramium*, *Corallina*, *Gelidium*, *Heterosiphonia*, *Polysiphonia*, *Dictyota*, *Scytosiphon*, *Lomentaria*, *Codium*, *Ulva*, *Punctaria*, *Ectocarpus*, *Antithamnionella* y *Undaria* es frecuentemente hallado en la zona de estudio. El análisis de la dinámica temporal de la comunidad epifítica sobre los talos de *M. obtusangula* brindó elementos para la caracterización de dicha comunidad. Se registraron un total de 26 taxa de epifitos y endófitos. Además, su distribución a lo largo de los talos hospedadores y su inferencia con respecto al tamaño de los mismos y estado vegetativo o reproductivo en que se encuentre el alga pudo relacionarse con variaciones de los parámetros ambientales a lo largo del año. Sumado a esto, se pudo atribuir ciertas diferencias a las presiones ambientales entre las comunidades intermareales inferiores y submareales a las que se encuentran sometidas estas especies epifitas. Se realizó un análisis de las morfologías anómalas presentes en talos recolectados en el ambiente natural mediante diversas técnicas de microscopía que permitieron dilucidar el desarrollo de agallas a través de hipertrofia e hiperplasia de las células medulares, con intensa actividad nuclear. En condiciones de cultivo *in vitro* se comprobó la potencialidad de las agallas para dar origen a nuevos talos de apariencia totalmente normal. Los estudios realizados en sus paredes celulares han permitido obtener y caracterizar polisacáridos sulfatados pertenecientes al grupo de los i-carragenanos, los cuales presentaron un buen rendimiento en su extracción (20

- 15 %) y calidad similar a la de carragenanos comerciales, haciendo de esta especie un potencial recurso valioso de las costas Argentinas.

## ABSTRACT

This thesis focuses on a population of *Meridionella obtusangula* (Florideophyceae, Gigartinales, Rhodophyta), a recently discovered red macroalgae from Golfo San Matías, Argentina. It includes integrative studies about basic aspects of taxonomy, biology, and ecology, and applied ones about the characterization of cell wall sulfated polysaccharides. The taxonomic identity of the macroalgae as a member of the Cystocloniaceae was based on morphological observations with light and electron microscopy. It was also complemented by phylogenetic studies carried out in collaboration with experts in the family Cystocloniaceae, which led to the recognition of the taxa as a new genus *Meridionella* Tonicelli, ME. Croce & Hommersand gen. nov. and confirmed the identity of the Argentinean specimens as *Meridionella obtusangula* Tonicelli, ME. Croce & Hommersand comb. nov. The life cycle was analyzed under *in vitro* culture conditions, and involved morphological observations and ploidy studies, both of thalli from nature and culture. *M. obtusangula* has a triplobiont haplo-diplont life cycle, typical of red algae, with isomorphic gametophytes and tetrasporophytes. Asexual reproduction was by stolons or apomeiosis in tetrasporophytes. *In vitro* culture assays were carried out to test abiotic conditions (concentration of culture medium, temperature, and photoperiod) that would produce optimal growth. The optimal conditions for the development of tetrasporic and gametophytic thalli were achieved with seawater enriched with Von Stosch culture medium. Growth was higher at higher temperatures, while optimal survival was achieved in a lower temperature range. In addition, the growth and survival of tetrasporic thalli were higher than gametophytic thalli. These results found *in vitro*, added to the records of higher density of tetrasporophytes over gametophytes in the natural environment, provided elements to understand the unbalance between the different reproductive stages of *M. obtusangula* population. Phenological and population studies carried out in the nature, as well as a community-level study of the accompanying macroalgae, allowed to understand the temporal dynamics, based on environmental pressures on the Atlantic coast. The reproductive and vegetative thalli showed a seasonal behavior, coexisting in autumn, winter, and spring, although in different

proportions. In summer, no macroscopic thalli were found during sampling, but it was assumed that they remained as microscopic stages. The abundance and size of the thalli were strongly influenced by environmental conditions: water temperature, photoperiod and wind intensity, indicating that this species is phenologically and population-wise subject to seasonal changes. At community level, *M. obtusangula* was accompanied by a large number of red, brown and green macroalgae. This macroalgal assemblage was composed of specimens of the genera *Ahnfeltia*, *Antithamnion*, *Ceramium*, *Corallina*, *Gelidium*, *Heterosiphonia*, *Polysiphonia*, *Dictyota*, *Scytosiphon*, *Lomentaria*, *Codium*, *Ulva*, *Punctaria*, *Ectocarpus*, *Antithamnionella*, and *Undaria*. The analysis of the temporal dynamics of the epiphytic community on *M. obtusangula* thalli provided elements for the characterization of this community. A total of 26 epiphyte and endophyte taxa were recorded. In addition, their distribution along the host thalli and their inference concerning their size and vegetative or reproductive state was related to variations in environmental parameters throughout the year. Certain differences could be attributed to environmental pressures between the lower intertidal and subtidal communities to which these epiphytic species are subjected. An analysis of the anomalous morphologies found in thalli collected from the natural environment was carried out using different microscopy techniques, allowing us to elucidate the galls development by hypertrophy and hyperplasia of the medullary cells, with intense nuclear activity. Under culture conditions, portions of thallus with the galls originated new thalli of completely normal appearance. The study of the cell wall sulfated polysaccharides have allowed obtaining and characterizing polysaccharides belonging to the group of ι-carrageenans, which showed a high extraction yield (20 - 15 %) and quality similar to that of commercial carrageenans, making this species a potentially valuable resource of the Argentinean coasts.



## ÍNDICE

CAPÍTULO I .....	1
GENERALIDADES .....	1
1. Introducción General .....	2
1.1. Comunidades macroalgales y su distribución en el ambiente .....	2
1.2. Uso de las macroalgas .....	3
1.3. Algas rojas y sus polisacáridos .....	5
1.4. Macroalgas marinas en Argentina .....	6
2. Hipótesis .....	8
3. Objetivo General .....	8
4. Materiales y Métodos Generales .....	9
4.1. Área de estudio .....	9
4.1.1. Toma de muestras .....	10
4.2. Estudios morfológicos al Microscopio Óptico (MO) .....	12
4.2.1. Fijación del material de estudio .....	12
4.2.2. Preparación de muestras .....	12
4.2.2.1. Preparados semipermanentes .....	12
4.2.2.1.1. Corte de los ejemplares .....	12
4.2.2.1.2. Tinciones .....	12
4.2.2.2. Preparados histológicos permanentes .....	14
4.2.2.2.1. Tratamiento de las muestras .....	14
4.2.2.2.2. Infiltración .....	15
4.2.2.2.3. Armado de bloques e inclusión del material .....	15
4.2.2.2.4. Microtomía .....	16
4.2.2.2.5. Desparafinación .....	16
4.2.2.2.6. Coloración de los preparados .....	17
4.2.2.2.7. Montado de los cortes .....	19
4.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) .....	20
4.3.1. Fijación primaria .....	20
4.3.2. Fijación secundaria .....	20
4.3.3. Deshidratación .....	20
4.3.4. Infiltración .....	20
4.3.5. Inclusión .....	21
4.3.6. Polimerización .....	21
4.3.7. Ultramicrotomía .....	22
4.3.7.1. Cortes ultrafinos .....	22

4.3.7.2. Cortes semi-finos.....	22
4.3.7.2.1. Remoción de resina Spurr .....	22
4.3.7.2.2. Tinción con hematoxilina- verde malaquita- fucsina básica .....	23
4.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB) y Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX) .....	24
4.4.1. Fijación .....	24
4.4.2. Montaje de las muestras.....	24
4.4.3. Deshidratación del material .....	24
4.4.4. Secado y metalizado.....	24
4.4.5. Observación del material .....	24
4.5. Medios de cultivo .....	25
4.5.1. Recolección del agua de mar.....	25
4.5.2. Medios de enriquecimiento .....	25
4.5.2.1. Medio PES .....	25
4.5.2.2. Medio Von Stosch (Grund).....	26
4.5.2.3. Prevención de la contaminación de cultivos.....	27
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>28</b>
<b><i>MERIDIONELLA OBTUSANGULA</i> nov. comb. ....</b>	<b>28</b>
1. Introducción .....	29
1.1. Filogenia de las algas rojas .....	29
1.2. <i>Cystoclonium obsusangulum</i> : una controversial especie .....	30
2. Objetivos .....	32
3. Materiales y métodos .....	33
3.1. Ejemplares de herbario .....	33
3.2. Estudios morfológicos .....	33
3.3. Análisis filogenético molecular.....	33
4. Resultados .....	37
4.1. Clasificación taxonómica .....	37
4.2. Filogenia .....	37
4.3. Morfología.....	43
4.3.1. Morfología vegetativa .....	43
4.3.2. Morfología reproductiva .....	54
5. Discusión .....	61
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>67</b>
<b>CICLO DE VIDA DE <i>MERIDIONELLA OBTUSANGULA</i> .....</b>	<b>67</b>
1. Introducción .....	68
2. Objetivos .....	71

3.	Materiales y Métodos .....	72
3.1.	Ciclo de vida .....	72
3.1.1.	Cultivo a partir de esporas .....	72
3.1.2.	Análisis del nivel de ploidía .....	73
3.2.	Optimización de las condiciones de cultivo de las distintas fases del ciclo de vida.....	75
3.2.1.	Liberación de carpósporas y tetrásporas .....	75
3.2.1.1.	Evaluación de medios de enriquecimiento PES y Von Stosch.....	76
3.2.1.2.	Determinación de las temperaturas óptimas .....	77
3.2.1.3.	Optimización del fotoperíodo .....	77
3.2.2.	Crecimiento y supervivencia de plántulas.....	77
3.2.2.1.	Ensayo 1: Evaluación de medios de enriquecimiento: Von Stosch y PES .....	80
3.2.2.2.	Ensayo 2: Optimización de temperatura y concentraciones del medio de enriquecimiento Von Stosch .....	82
3.2.2.3.	Evaluación del crecimiento y supervivencia de los talos .....	84
3.2.3.	Análisis estadísticos.....	84
3.2.3.1.	Liberación de esporas .....	84
3.2.3.2.	Crecimiento y supervivencia de las plántulas .....	84
4.	Resultados .....	86
4.1.	Ciclo de vida de <i>M. obtusangula</i> .....	86
4.1.1.	Reproducción asexual .....	86
4.1.2.	Reproducción sexual .....	86
4.1.3.	Germinación de carpósporas y tetrásporas .....	89
4.1.4.	Nivel de ploidía de las diferentes fases del ciclo de vida .....	96
4.2.	Liberación de esporas bajo diferentes condiciones .....	100
4.2.1.	Medios de enriquecimiento .....	100
4.2.2.	Temperatura.....	103
4.2.3.	Fotoperíodo.....	106
4.3.	Crecimiento y supervivencia de talos tetrasporofíticos y gametofíticos .....	108
4.3.1.	Evaluación de medios Von Stosch y PES .....	108
4.3.2.	Evaluación del medio Von Stosch sobre el crecimiento vegetativo y supervivencia de tetrasporofitos y gametofitos .....	115
5.	Discusión .....	124
5.1.	Ciclo de vida .....	124
5.2.	Germinación, crecimiento y supervivencia de esporas.....	127
CAPÍTULO IV .....		133
FENOLOGÍA Y DINÁMICA POBLACIONAL .....		133
MACROALGAS ACOMPAÑANTES .....		133

1.	Introducción .....	134
1.1.	Fenología de macroalgas.....	134
1.2.	Dinámica poblacional y comunidades macroalgales acompañantes.....	135
2.	Objetivos .....	136
3.	Materiales y métodos .....	137
3.1.	Toma y procesamiento de muestras.....	137
3.2.	Estudios poblacionales de <i>M. obtusangula</i> y de la comunidad macroalgal acompañante .....	137
3.4.	Variables consideradas en los estudios fenológicos .....	138
3.4.1.	Determinación de la eficiencia reproductiva .....	138
3.4.1.1	Estimación de la densidad de cistocarpos y tetrasporangios .....	139
3.4.1.2.	Estimación del área de cistocarpos y tetrasporangios.....	140
3.5.	Análisis estadísticos de los datos .....	140
3.5.1.	Análisis de parámetros poblacionales y fenológicos.....	140
3.5.2.	Análisis de la comunidad de macroalgas acompañantes y su relación con <i>M. obtusangula</i> .....	141
4.	Resultados .....	143
4.1.	Fenología.....	143
4.1.1.	Relación entre caracteres morfométricos de los talos y su dinámica a temporal.143	
4.1.2.	Evaluación de la eficiencia reproductiva.....	150
4.1.2.1.	Eficiencia reproductiva de talos tetraspóricos.....	150
4.1.2.2.	Eficiencia reproductiva de talos cistocápicos .....	155
4.2.	Dinámica poblacional de <i>M. obtusangula</i> .....	160
4.2.1.	Relación entre caracteres bioecológicos y morfológicos con factores ambientales.....	163
4.3.	Composición y relación temporal entre la comunidad de macroalgas acompañantes y la abundancia de <i>M. obtusangula</i> .....	167
5.	Discusión .....	177
<b>CAPÍTULO V .....</b>		<b>181</b>
<b>COMUNIDADES ALGALES EPÍFITAS Y ENDÓFITAS DE <i>MERIDIONELLA OBTUSANGULA</i> .....</b>		<b>181</b>
1.	Introducción .....	182
2.	Objetivos .....	185
3.	Materiales y métodos .....	186
3.1.	Caracterización de la población hospedadora .....	186
3.2.	Caracterización y cuantificación de la comunidad epífita.....	186
3.2.1.	Abundancia total de epífitos .....	188

3.2.2. Análisis estadísticos.....	189
3.2.3. Identificación de epífitos sobre <i>M. obtusangula</i> .....	191
3.2.3.1. Aislamiento de epífitos bajo condiciones de cultivo.....	191
3.2.3.2. Identificación de diatomeas epífitas .....	191
3.2.3.3. Observaciones al MEB y TEM.....	192
4. Resultados .....	193
4.1. <i>M. obtusangula</i> como organismo hospedador .....	193
4.2. Caracterización de la comunidad epifítica de <i>M. obtusangula</i> .....	195
4.2.1. Asociación de <i>M. obtusangula</i> con <i>Acrochaete heteroclada</i> y <i>Audoinea</i> sp.....	203
4.3. Variación espacio-temporal de la abundancia de epífitos sobre talos de <i>M. obtusangula</i> .....	208
4.3.1. Comparación entre intermareal y submareal .....	208
4.3.2. Dinámica espacial de la abundancia de la comunidad de epífitos.....	210
4.3.3. Categorización de taxa epífitos de <i>M. obtusangula</i> según su incidencia. ....	213
4.3.4. Dinámica espacio-temporal de la riqueza, diversidad, equitatividad y dominancia de la comunidad de epífitos.....	218
4.3.5. Estacionalidad de la comunidad epifítica en las zonas intermareal y submareal.....	221
4.4. Epifitismo asociado a los talos reproductivos de <i>M. obtusangula</i> .....	224
4.5. Relación entre parámetros ambientales - abundancia de epífitos - población hospedadora. ....	231
5. Discusión .....	234
5.1. Comunidad de epífitos .....	234
5.2. Distribución de epífitos en tipos de talos reproductivos y zonas del hospedador ....	237
5.3. Estacionalidad de epífitos .....	241
5.4. Distribución de epífitos en intermareal vs. submareal .....	243
CAPÍTULO VI.....	246
AGALLAS SOBRE TALOS DE <i>MERIDIONELLA OBTUSANGULA</i> .....	246
1. Introducción .....	247
2. Objetivos .....	250
3. Materiales y métodos .....	251
3.1. Recolección y toma de muestras .....	251
3.2. Procesamiento de muestras.....	251
3.2.1. Estudios de prevalencia y su relación con parámetros ambientales a lo largo de las estaciones.....	251
3.2.2. Observaciones morfológicas de las agallas .....	252
3.2.3. Mantenimiento de talos producto de esporocultivos con presencia de agallas ....	252
3.2.4. Estudio de núcleos de células de agallas mediante microscopía de fluorescencia	253

3.2.5. Análisis estadísticos.....	254
4. Resultados .....	255
4.1. Morfología de las agallas.....	255
4.1.1. Agallas en talos recolectados en el ambiente natural .....	255
4.1.1.1. Estructura interna de agallas en talos recolectados en la naturaleza .....	260
4.1.2. Agallas de cultivo.....	269
4.2. Estudios de fluorescencia.....	271
4.3. Estudios de prevalencia de agallas sobre los talos de <i>Meridionella obtusangula</i> .....	273
5. Discusión .....	277
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>281</b>
<b>MERIDIONELLA OBTUSANGULA COMO UN POTENCIAL RECURSO .....</b>	<b>281</b>
1. Introducción .....	282
2. Objetivos .....	284
3. Materiales y métodos .....	285
3.1. Caracterización de la pared celular .....	285
3.2. Extracción de los polisacáridos .....	285
3.2.1. Procedimiento.....	285
3.2.1.1. Pretratamiento.....	286
3.2.1.2. Primera extracción .....	286
3.2.1.3. Segunda extracción .....	286
3.2.1.4. Obtención de polisacáridos.....	286
3.3. Caracterización de los polisacáridos .....	290
3.3.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	290
3.3.2. Reología.....	290
4. Resultados .....	292
4.1. Caracterización de la pared celular .....	292
4.2. Caracterización de los polisacáridos .....	295
5. Discusión .....	301
<b>Conclusiones.....</b>	<b>304</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>307</b>

# **CAPÍTULO I**

## **GENERALIDADES**





# **1. Introducción General**

## **1.1. Comunidades macroalgales y su distribución en el ambiente**

Los ecosistemas marinos presentan una vasta diversidad de organismos, donde las macroalgas marinas constituyen un componente dominante y esencial. Su importancia no solo radica por ser productores primarios, sino que muchas especies son formadoras de hábitat, proporcionan una estructura tridimensional al ambiente y otorgan alimento y condiciones ambientales que sustentan a una amplia gama de organismos asociados (Lee 2008, Martínez *et al.* 2018).

Las macroalgas pertenecen a las Divisiones Rhodophyta, Ochrophyta y Chlorophyta, conocidas vulgarmente como algas rojas, pardas y verdes de acuerdo al color que presentan sus talos, como consecuencia de sus pigmentos fotosintéticos. Estos organismos pueden presentar individuos con estructura simples a complejas, tomando formas filamentosas, laminares, globosas, tubulares, saculiformes, etc. (Barsanti & Gualtieri 2006).

La distribución espacial de las distintas comunidades de macroalgas en el ambiente acuático depende de muchos factores, tales como el tipo de sustrato, temperatura, intensidad lumínica, entre otros (Falkowski & Raven 1997, Franklin & Forster 1997). Aquellas que se encuentran localizadas en zonas intermareales durante las mareas bajas, pueden verse sometidas a duras condiciones ambientales caracterizadas por altas variaciones de temperatura y de radiación solar, baja humedad, condiciones de viento y exposición al oleaje (Legrand *et al.* 2018), mientras que las que crecen en el submareal a mayores profundidades pueden ser perturbadas mayormente por el aumento de la turbidez por la mezcla

de la columna de agua ocasionada por el viento, que obstaculiza la captación de la energía lumínica o por el afloramiento de agua fría y profunda, lo cual en conjunto modifican los patrones generales y las condiciones locales del sitio (Cappelatti *et al.* 2019, Glenn *et al.* 2020).

Asimismo, se ha determinado que la dinámica, composición y estructura de las comunidades de algas marinas se encuentra influenciada por factores bióticos. Esto ha mostrado la importancia del entendimiento de relaciones interespecíficas como la competencia, el epifitismo por otras algas y la presión por pastoreo que ejercen los herbívoros bentónicos, generándose interacciones depredador-presa en varios niveles tróficos (Korpinen *et al.* 2007, Barner *et al.* 2018).

## **1.2. Uso de las macroalgas**

Las algas marinas han sido utilizadas de diversas maneras desde tiempos ancestrales. Se las utilizó con fines domésticos, para consumo humano y producción de objetos, y actualmente se las emplea para fines industriales (Dillehay *et al.* 2008, Delaney *et al.* 2016). En el presente, la explotación de estos recursos se ha enfocado en la obtención de bioproductos con distintos fines, como ser alimenticios, farmacéuticos, nutracéuticos y cosmetológicos. Como consecuencia indirecta de ello, surgió la necesidad de prestar mayor atención a aspectos ecológicos para preservar las poblaciones naturales algales sujetas a explotación (Hafting *et al.* 2015, Delaney *et al.* 2016). Precisamente el uso de las algas en la industria, se ha enfocado primeramente en la explotación de sus arribazones y posteriormente a partir de cosechas de praderas naturales (Buschmann *et al.* 2013). La fuerte presión de explotación de estas praderas en

los últimos 60 años, ha superado la capacidad de suministrar biomasa necesaria a partir de ellas, lo que provocó un crecimiento considerable de la producción de algas marinas a partir prácticas de acuicultura (Hafting *et al.* 2015, Delaney *et al.* 2016).

Actualmente en el mundo, varias especies macroalgales son cultivadas a gran escala, cuyas prácticas de cultivo permiten la obtención de una importante biomasa. Entre estas especies se puede citar a *Laminaria japonica* Areschoug, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, *Kappaphycus alvarezii* (Doty) LM Liao, y géneros como *Euचेuma*, *Gracilaria*, *Porphyra*, entre las más importantes (FAO 2016). *Porphyra*, vulgarmente conocida como Nori; *Laminaria* como Kombu y *Undaria* como Wakame se cultivan específicamente para fines alimenticios, mientras que *Kappaphycus alvarezii*, *Euचेuma* y *Gracilaria* son producidas para su utilización principalmente en la industria alimenticia para la extracción de carrageninas y agar-agar (FAO 2013, Torres *et al.* 2019).

El avance actual en el cultivo de las macroalgas de interés, se debe al desarrollo de técnicas de manipulación y sobre todo al entendimiento de sus ciclos sexuales (Buschmann *et al.* 2017). Afortunadamente el avance del desarrollo del ficocultivo de interés comercial en muchos países, no sólo aporta conocimiento de las especies y de sus ciclos de vida, sino que representa una alternativa para obtener biomasa algal que contrarreste la explotación de las praderas naturales (Buschmann *et al.* 2017). Esta alternativa, ha desarrollado nuevas líneas en búsqueda para optimizar las condiciones que permitan un mejor desarrollo de las especies en etapas de laboratorio y su escalamiento para sus instancias industriales (Sahoo & Yarish 2005, Hurtado *et al.* 2019, Massad *et al.* 2020).

### 1.3. Algas rojas y sus polisacáridos

Las macroalgas marinas son valoradas como productoras de varias macromoléculas biológicamente activas como polifenoles, diterpenos, fibras, proteínas y polisacáridos. Estos componentes presentan diferentes propiedades estructurales, fisicoquímicas y funcionales. En base a la producción de estas sustancias bioactivas, las algas son consideradas la fuente más abundante de polisacáridos tanto sulfatados (fucooidanos, carrageninas, galactanos y agares) como no sulfatados (alginatos, laminarina) (Hentati *et al.* 2020). Estos polisacáridos son los principales componentes de las paredes celulares de las algas marinas y se los denomina hidrocoloides debido a la capacidad de disolución que presentan en agua y por consiguiente la formación de una solución con propiedades coloidales. Sus usos alimentarios y procesos de extracción se conocen desde hace mucho tiempo. En la actualidad, la comercialización de los hidrocoloides derivados de macroalgas, representa la mayor proporción del procesamiento de algas (McHugh 2003).

Específicamente, las algas rojas, han sido extensamente estudiadas por la presencia de polisacáridos sulfatados y producción de hidrocoloides (Zemke-White & Ohno 1999, Bixler & Porse 2011, Pérez-Recalde *et al.* 2016, Gheda *et al.* 2018, Sánchez *et al.* 2019, Kravchenko *et al.* 2020). Existen varios géneros productores de hidrocoloides entre los que se encuentran *Gelidium*, *Gracilaria*, *Pterocladia* y *Gelidiella*, que se caracterizan por su alto contenido de agar y *Kappaphycus*, *Eucheuma*, *Gigartina*, *Sarcothalia* y *Chondrus* por sus carragenanos. El incremento de la demanda mundial de estos productos impulsó la búsqueda de nuevas especies productoras de hidrocoloides (Castro *et al.* 2018, Jiang *et al.* 2019, Kravchenko *et al.* 2020, Nagle *et al.* 2020).

#### **1.4. Macroalgas marinas en Argentina**

En Argentina se han reportado aproximadamente 400 especies de macroalgas marinas (Boraso 2013). Sus estudios datan desde hace varias décadas, planteando diversos enfoques para aunar en mejores conocimientos de la flora marina de nuestras costas.

A lo largo de toda la costa atlántica Argentina se observa un marcado gradiente en el aumento de diversidad y complejidad de los ensamblajes macroalgales. En las costas bonaerense donde se observa una falta de sustratos duros y baja penetración de la luz debido al exceso de sedimentos, las especies macroalgales quedan limitadas a condiciones estuarinas (Bolton 1994, Acha et al. 2004, Boraso & Zaixso 2007). En la medida que se va evidenciando la presencia de sustratos consolidados, la flora alcanza buen desarrollo en los niveles altos del submareal, por lo que en dirección sur, en la transición hacia y sobre las costas patagónicas se destacan la presencia de algas filamentosas, foliosas y de gran porte (Parodi 2004, Boraso & Zaixso 2007, Wieters *et al.* 2012, Boraso 2013), precisamente 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. Por dicho motivo, es que se han estudiado con mayor énfasis las importantes comunidades macroalgales presentes en la región patagónica (Asensi 1966, 1971, 1981, Mendoza 1969, 1999, Boraso de Zaixso *et al.* 1998, Liuzzi *et al.* 2011, Boraso de Zaixso 2013) entre otros. También han sido analizadas sus interacciones bióticas (Gauna & Parodi 2008, Gauna *et al.* 2009 a,b, Gauna *et al.* 2016, Gauna *et al.* 2017, Poza *et al.* 2018b), su cultivo y aprovechamiento (Casas & Piriz 1993, Martín 2010, Croce 2013, Croce *et al.*

2015b, Poza 2018, Poza *et al.* 2018a, Hughes *et al.* 2019, Dellatorre *et al.* 2020, Hughes *et al.* 2020), entre otros aspectos.

Asimismo, se han llevado a cabo diversos estudios sobre metabolitos bioactivos presentes en las macroalgas, como proteínas, terpenos, alcaloides, cumarinas, flavonoides y polifenoles que resultan de gran interés tanto para la industria farmacéutica como alimenticia (Stortz & Cerezo 1986, 1993, 2000, Stortz *et al.* 1994, Flores *et al.* 1997, 2000a b, Arata *et al.* 2016, Becerra 2016, Uhrich *et al.* 2016).

Otros grupos de investigación de reconocida trayectoria han llevado a cabo estudios de polisacáridos presentes en *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Gaillon, *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, L. M. Irvine & Farnham, *Nemalion elminthoides* (Velley) Batters, *Sarcothalia crispata* (Bory) Leister, *Sarcopeltis skottsbergii* (Setchell & N.L. Gardner) Hommersand, Hughey, Leister & P.W.Gabrielson (= *Gigartina skottsbergii*) (Matulewicz & Cerezo 1980, Stortz & Cerezo 1986, 2000, Matulewicz *et al.* 1989, Piriz & Cerezo 1991, Ciancia *et al.* 1993, 1997, Carlucci *et al.* 1997) y siguiendo esa línea, nuevos grupos que continúan los estudios sobre dichas especies, hacen hincapié en la búsqueda de otras especies alternativas como nuevas fuentes de polisacáridos (Carlucci *et al.* 1997, Rodríguez *et al.* 2009, Croce *et al.* 2015b, Pérez-Recalde *et al.* 2016, Hughes *et al.* 2018).

A pesar del amplio conocimiento de las macroalgas y potencialidad de aprovechamiento en Argentina, la utilización de estas comunidades a escala industrial es casi nula. Hasta el momento, sólo fue industrializada el alga roja *Gracilaria*. Desde el inicio de su explotación hasta la actualidad, se ha registrado una importante disminución de sus praderas naturales, lo que lleva a pensar que

la búsqueda de nuevas alternativas de explotación de las macroalgas, deben ser acopladas a los estudios poblacionales que permitan el manejo sustentable del recurso (Boraso *et al.* 2015, Croce *et al.* 2015b, Becherucci *et al.* 2016, Hughes *et al.* 2019, Poza 2018, Hughes *et al.* 2020). No obstante, existen registros de una extensa lista de especies de macroalgas registradas para nuestro país (Boraso *et al.* 2015), que han sido valoradas por sus características pero que aún no se han utilizado en la industria.

## **2. Hipótesis**

El nuevo hallazgo de una macroalga roja en las costas del Golfo San Matías constituye un recurso donde su valoración como tal, incluye los aspectos intrínsecos de su biología, ecología e interacción con otros organismos, así como su potencial para la producción de ficocoloides de interés industrial.

## **3. Objetivo General**

Identificar sobre bases morfológicas y moleculares una nueva especie de Rhodophyta que ha desarrollado poblaciones conspicuas en el Golfo San Matías y valorizarla integrando aspectos bioecológicos, caracterizando los biopolímeros estructurales de la pared celular y analizando las potencialidades de su cultivo.



## 4. Materiales y Métodos Generales

### 4.1. Área de estudio

Las muestras fueron colectadas en las costas del Golfo San Matías en la localidad de Las Grutas, Provincia de Río Negro (40°50' S, 65°06' O) (Fig. 1 A).

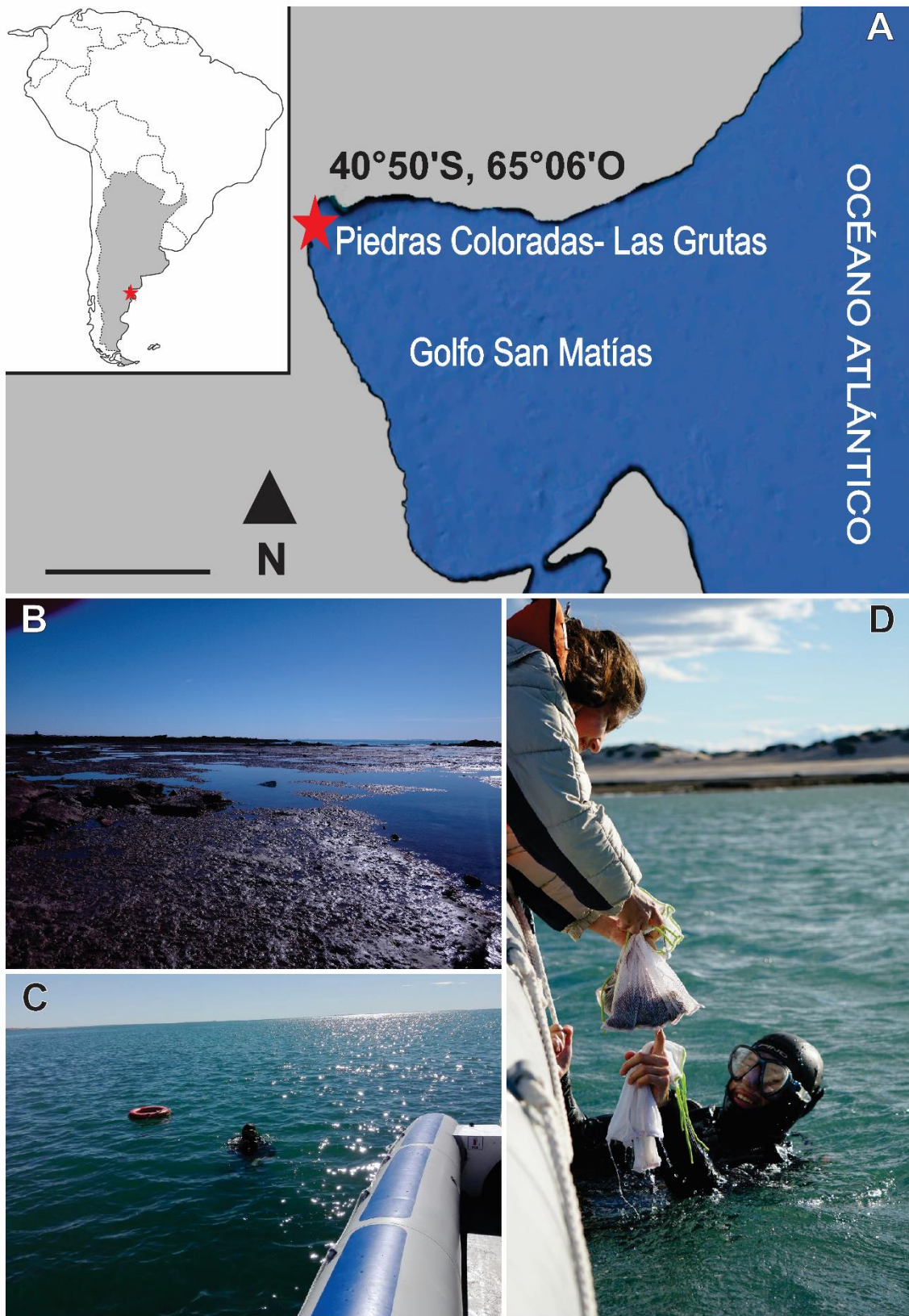
El Golfo San Matías es el segundo Golfo más extenso de Argentina con 18.000 km<sup>2</sup>, una profundidad máxima de hasta 200 m y una boca de 100 km de extensión cuya profundidad alcanza los 60 m, restringiendo de este modo la comunicación con el mar abierto. Los tipos de fondos que predominan pueden variar desde uno mixto de arena, grava y/o rodados, con predominio de arena, arenisca y arcillitas con fases arenosas, a otro areno-fangoso y un último tipo rocoso o mixto predominante en la costa occidental por debajo de la isobata de los 70 m (Fucks *et al.* 2012). Presenta un litoral dominado por acantilados de unos 10 m de altura, cuyo intermareal es una plataforma de roca abrasiva parcialmente cubierta por arena y grava no consolidadas, que se continua hacia el submareal a modo de parches (Mouzo 2014, 2017).

En la región norte del Golfo San Matías se halla la localidad de Las Grutas caracterizada por playas con gran amplitud de marea y un cordón de acantilados localmente (Fucks *et al.* 2012). Al sur, sobre la zona intermareal se halla un sitio costero conocido como Piedras Coloradas donde afloran formaciones de granito de grano fino a mediano, de colores rosado y gris (Giacosa 1997), semicubiertas por arena que durante la marea alta quedan parcialmente sumergidas. Presenta dunas primarias y un extenso intermareal que alterna entre playa de arena y roca de origen volcánico, donde al descubrirse en marea baja deja a su paso numerosas pozas de marea (Fucks *et al.* 2012, Mouzo 2014, 2017).

#### **4.1.1. Toma de muestras**

Los ejemplares de estudio de esta tesis fueron recolectados manualmente en pozas de marea de la región intermareal inferior y en el submareal por medio de buceo autónomo a una profundidad de 3 m (Fig. 1 B-D).

Los talos algales recolectados fueron escurridos, colocados en bolsas plásticas herméticas y trasladados, dentro de las 24 hs. posteriores a la recolección, en contenedores refrigerados al Laboratorio del Grupo de Investigación en Bioecología y Biotecnología Acuática (GIBBEA), IADO, UNS-CONICET, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina, donde se realizaron todos los estudios.



**Figura 1. Sitio de muestreo.** A. Mapa mostrando sitio de muestreo. B. Zona intermareal. C y D. Colecta submareal mediante buceo autónomo. Barra escala: A = 50 km.

## **4.2. Estudios morfológicos al Microscopio Óptico (MO)**

### **4.2.1. Fijación del material de estudio**

Se prepararon dos soluciones fijadoras para la conservación y análisis de los ejemplares:

- Fijador FAA: solución de formol, ácido acético glacial y alcohol (1:1:8).
- Carnoy: solución de alcohol etílico y ácido acético glacial (3:1).

La observación de los ejemplares se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico Nikon Eclipse TE 300 equipado con una cámara Nikon FDX 35.

### **4.2.2. Preparación de muestras**

#### **4.2.2.1. Preparados semipermanentes**

##### **4.2.2.1.1. Corte de los ejemplares**

Se realizaron secciones a mano alzada de ejemplares colectados fijados previamente en FAA o Carnoy, utilizando hojas de bisturí. Se colorearon los cortes utilizando distintas tinciones pertinentes al estudio a realizar. Los preparados fueron montados sobre portaobjetos usando como medio de montaje miel de maíz incolora Karo® Corn Syrup.

##### **4.2.2.1.2. Tinciones**

Se utilizaron las siguientes tinciones:

- a) **Azul de metileno:** en solución de 0,1 % (Armiñana *et al.* 2006).
- b) **Azul de Anilina:** en solución de 1% (Armiñana *et al.* 2006).

c) **Lugol:** disolución de 5 g de KI y 1 g de I<sub>2</sub> en 330 ml de agua destilada. (Armiñana et al. 2006).

d) **Hematoxilina aceto - férrica con hidrato de cloral** (Wittmann 1965):

*Solución madre:* se disolvieron 4 g de hematoxilina y 1 g de alumbre férrico en 100 ml de ácido acético al 45%. Se dejó reposar como mínimo 24 horas antes de su utilización.

*Solución de trabajo:* Se tomaron 5 ml de solución madre y se le agregó 2 g de hidrato de cloral. Una vez disuelto completamente el hidrato de cloral, la solución se encontró lista para ser utilizada. La solución de trabajo fue filtrada antes de su uso.

*Protocolo de tinción* (Harada & Yamagishi 1971):

- 1) Fijación del material en Carnoy por 24 horas a 4°C.
- 2) Transferencia del material a un portaobjeto y absorción del fijador con papel de filtro, evaporando por calentamiento el alcohol remanente.
- 3) Preparación del material con HCL 1N y una gota de alumbre férrico al 1% en ácido acético al 45%. Calentamiento y absorción del líquido excedente con papel de filtro.
- 4) Agregado de unas gotas de hematoxilina aceto-férrica con hidrato de cloral.
- 5) Calentamiento. Cuando la solución se tornó roja, se absorbió con papel de filtro y se agregó solución nueva.
- 6) Colocación sobre un portaobjetos y nuevamente calentamiento y posteriormente se cubrió con un cubreobjetos para su observación al microscopio óptico.

#### 4.2.2.2. Preparados histológicos permanentes

##### 4.2.2.2.1. Tratamiento de las muestras

Se aplicaron las técnicas D'Ambrogio de Argüeso (1996) en las muestras fijadas en FAA.

Día 1: Primero se deshidrataron con alcohol etílico 50 % (por el tiempo mínimo de 6 horas), lavando así el fijador del material.

Posteriormente: Se hicieron 2 lavados en alcohol 50 %. Y se dejaron por un tiempo mínimo de 4 horas.

Finalmente se colocaron en una solución de alcohol ter-butílico (TBA 1), por un tiempo mínimo de 8 horas.

Día 2: Primero: se colocaron en TBA 2, por un mínimo de 4 horas.

A continuación: se pasaron a TBA 3, dejándolo por 4 horas.

Posteriormente se pasaron las muestras a TBA 4, por un mínimo de 4 horas.

Finalmente: se colocaron en TBA 5, con 3 ml de azul de metileno al 1%, por un mínimo de 8 horas.

Día 3: Primero: se colocaron las muestras en TBA 100% en estufa a una temperatura de 32 °C, por un mínimo de 8 horas.

Posteriormente: se realizó un segundo cambio de TBA 100%, manteniendo la temperatura y se dejó por un mínimo de 10 horas.

**Tabla 1.** Detalle de series de TBA utilizadas.

	TBA 1	TBA 2	TBA 3	TBA 4	TBA 5
Agua destilada	50%	30%	15%		
ETOH 96°	40%	50%	50%	45%	
TBA	10%	20%	35%	55%	75%
Alcohol Absoluto					25%

#### 4.2.2.2. Infiltración

Día 4: El material en TBA (ya encontrado en estufa) fue cambiado a recipiente con tapa y se le agregó virutas de parafina, manteniendo una temperatura mínima de 32 °C, dejándolo por el término de 24 horas.

Día 5: Primero se agregó más virutas de parafina hasta completar unas 10 veces el volumen del material y se lo llevó a una temperatura de 56-60°C, dejándolo por el mínimo de 8 horas.

Posteriormente los recipientes se destaparon y se mantuvieron en estufa con la puerta entreabierta para permitir el escape de TBA, por el mínimo de 8 horas.

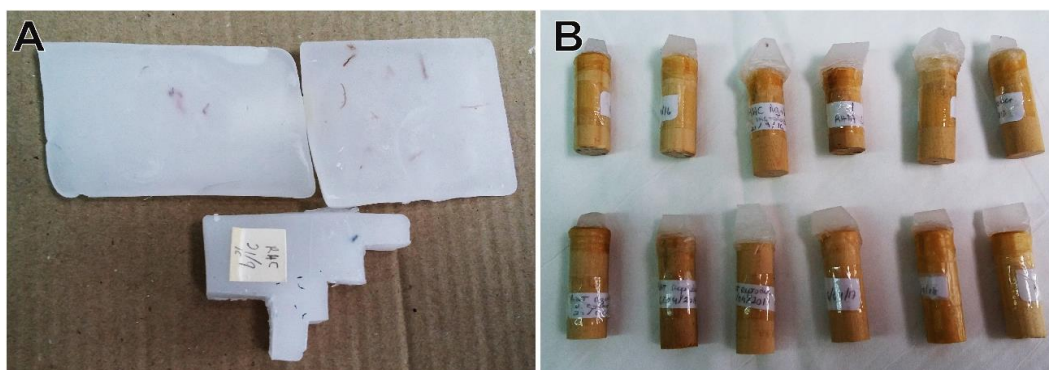
Día 6: Se infiltró con parafina bajo vacío. Se realizaron dos cambios, cada 8 horas cada uno.

Día 7: Se cambió la parafina por parafina paraplast. Se dejó en vacío por 24 horas.

#### 4.2.2.3. Armado de bloques e inclusión del material

Día 8: Armado de los bloques.

- a- En moldes de papel conteniendo parafina paraplast fundida, se orientó el material algal en la posición deseada.
- b- Posteriormente, se sumergieron los moldes en baño de agua fría para acelerar el proceso de solidificación.
- c- Al alcanzar la consistencia deseada se procedió a desmoldar los bloques de parafina para colocarlos sobre tacos de madera para su posterior tallado (Fig. 2).



**Figura 2. Material para inclusión del material para cortes histológicos. A.** Bloques de paraplast con material algal. **B.** Tacos listos para utilizar en la etapa de microtomía.



#### **4.2.2.2.4. Microtomía**

- a- Se realizaron cortes transversales y tangenciales de un espesor entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ , utilizando un micrótopo de rotación Leica RM 2145- Reichert- Jung (Leica GmbH)-Alemania.
- b- Los cortes fueron montados sobre portaobjetos cubiertos con adhesivo de Haup. Se los dejó secar durante 24 horas sobre una plancha caliente a una temperatura aproximada de 35°C.

##### *Preparación Adhesivo de Haup:*

Se disolvió 1 g de gelatina pura en 100 cc de agua destilada a una temperatura de 30°C. Cuando la gelatina estuvo completamente disuelta se añadieron 2 g de cristales de fenol y 15 cc de glicerina pura. Esta preparación se la mezcló y luego se la filtró.

#### **4.2.2.2.5. Desparafinación**

Una vez secos los preparados, previo a la coloración, se los desparafinó con xilol puro (100%) y en una serie descendente de alcohol etílico (90%-50%) (Fig. 3 A):

- 1) Xilol puro 1: 5 minutos
- 2) Xilol puro 2: 5 minutos
- 3) Xilol puro + Alcohol absoluto (1:1): 5 minutos
- 4) Alcohol absoluto: 5 minutos
- 5) Alcohol 95%: 5 minutos
- 6) Alcohol 80%: 5 minutos
- 7) Alcohol 70%: 5 minutos
- 8) Alcohol 50% + Safranina (solución saturada en alcohol 96%) Se le agregaron unas gotas de la solución madre de safranina hasta tomar una leve coloración. El tiempo mínimo de coloración fue de 8 horas. En caso

de sobretinción se aumentó el tiempo en el siguiente paso en alcohol 50 % y 70 %.

Posteriormente, las muestras se sometieron a una serie de concentraciones ascendentes de alcohol etílico hasta llegar a xilol puro durante 30 s. siguiendo los pasos inversos desde el punto 7 al 1.

#### **4.2.2.2.6. Coloración de los preparados**

Se utilizaron los siguientes tipos de coloraciones:

a- Safranina (1%) + azul de toluidina (1%) en etanol 50% (proporción 3:1), modificada por Pérez-Cortéz *et al.* (2003), reemplazando azul de toluidina por azul de metileno\* (Fig. 3 B):

- a) Xilol puro: 5 minutos
- b) Xilol puro: 5 minutos
- c) Etanol absoluto + Xilol (1: 1): 5 minutos
- d) Etanol absoluto: 5 minutos
- e) Etanol 96%: 5 minutos
- f) Etanol 80%: 5 minutos
- g) Etanol 70%: 5 minutos
- h) Safranina + Azul de metileno (en etanol 50%): 45 minutos (o más)
- i) Agua: 30 segundos
- j) Etanol 50%: 10 minutos
- k) Etanol 70%: 10 minutos
- l) Etanol 80%: 10 minutos
- m) Etanol 96%: 10 minutos
- n) Etanol absoluto: 10 minutos
- o) Etanol absoluto: 10 minutos
- p) Carboxilol: 5 minutos
- q) Xilol puro: 5 minutos
- r) Xilol puro: 5 minutos

\*Coloración de safranina más azul de metileno, ambos se prepararon por separado al 1% en alcohol 50% y luego se generó la mezcla de 3:1 de ambos obteniendo una coloración violácea.

b- *Fast-green* saturado en etanol 96% (Jensen 1962) (Fig. 3 C).

- a) Xilol puro: 5 minutos
- b) Xilol puro: 5 minutos
- c) Etanol absoluto + Xilol puro (1: 1): 5 minutos
- d) Etanol absoluto: 5 minutos
- e) Etanol 96%: 5 minutos
- f) Etanol 80%: 5 minutos
- g) Etanol 70%: 5 minutos
- h) Etanol 50%: 1 hora
- i) Agua: 30 segundos
- j) Etanol 50%: 10 minutos
- k) Etanol 70%: 10 minutos
- l) Etanol 80%: 10 minutos
- m) Etanol 96%: 10 minutos
- n) *Fast-green* (en etanol 96%) \*: 20 segundos
- o) Etanol absoluto: 10 minutos
- p) Etanol absoluto: 10 minutos
- q) Carboxilol (fenol-xilol 1:4): 5 minutos
- r) Xilol puro: 5 minutos
- s) Xilol puro: 5 minutos

c- Azul de metileno (0,1%) en agua destilada, modificado por Tejas *et al.* (1994), usando azul de metileno en reemplazo de azul de anilina.

- a) Xilol puro 1: 5 minutos
- b) Xilol puro 2: 5 minutos
- c) Etanol absoluto + Xilol (1:1): 5 minutos
- d) Etanol absoluto: 5 minutos
- e) Etanol 96%: 5 minutos

- f) Etanol 80%: 5 minutos
- g) Etanol 70%: 5 minutos
- h) Etanol 50%: 5 minutos
- i) Azul de metileno (en agua destilada): 15 a 30 minutos (o más)
- j) Etanol 50%: 10 minutos
- k) Etanol 70%: 10 minutos
- l) Etanol 80%: 10 minutos
- m) Etanol 96%: 10 minutos
- n) Etanol absoluto: 10 minutos
- o) Etanol absoluto: 10 minutos
- p) Carboxilol: 5 minutos
- q) Xilol puro 3: 5 minutos
- r) Xilol puro 4: 5 minutos

#### 4.2.2.2.7. Montado de los cortes

Los cortes teñidos se montaron entre porta y cubreobjetos con bálsamo de Canadá.



**Figura 3. Tren de tinción utilizado para los estudios histológicos. A.** Desparafinación mediante una serie de alcoholes. **B.** Coloración con Safranina y Azul de toluidina. **C.** Coloración con *Fast Green*.

### **4.3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Para la preparación de las muestras de este estudio se siguió el protocolo propuesto por Cáceres (1995) y Sorrivas de Lozano *et al.* (2014).

#### **4.3.1. Fijación primaria**

a- En tubos Eppendorf conteniendo glutaraldehído ( $C_5H_8O_2$ ) al 2,5 % diluido en buffer cacodilato de sodio 0,005 M, se colocaron fragmentos de la macroalga de interés de estudio. El tiempo de fijación fue de 2 horas a 5 °C.

b- Posteriormente se realizaron tres lavados, en buffer cacodilato de sodio 0,01 M, cada uno de 10 minutos de duración.

#### **4.3.2. Fijación secundaria**

a- Los fragmentos fueron post-fijados utilizando tetróxido de Osmio ( $OsO_4$ ) al 1% durante 2 horas a 5°C. Para vehiculizar el mismo, se empleó el mismo buffer empleado en la fijación primaria (Wood & Luft 1965).

b- Posteriormente se realizaron tres lavados con buffer cacodilato de sodio, de 10 minutos cada uno.

#### **4.3.3. Deshidratación**

Se realizó a temperatura ambiente. Los fragmentos del alga se colocaron en una serie de acetonas, en concentraciones crecientes (10 a 100%), cada cambio tuvo una duración de 15 minutos. Se utilizó acetona previamente tratada con tamices moleculares (MS 4 Å).

#### **4.3.4. Infiltración**

Fueron utilizadas resinas Spurr de baja viscosidad, que hacen posible infiltraciones mejores y más rápidas (Spurr 1969). Para ello, se procedió a mezclar sus distintos constituyentes siguiendo las proporciones:

**Tabla 2.** Composición y proporciones para la preparación de la resina SPURR

1. ERL 4206: Dióxido vinilciclohexeno: monómero	10,0 g
2. DER 736: Éter diglicil polipropilenglicol: flexibilizador	5,0 g
3. NSA: Anhídrido noneil succínico: endurecedor	26,0 g
4. DAME (S-1): Dimetil aminoetanol: acelerador	0,4 g
Total	4,4 g

El esquema de imbibición utilizado fue el siguiente (Cáceres 1995):  
Spurr 25% (1 gota cada 5 minutos) durante 3 horas.

Spurr 50% (1 gota cada 5 minutos) durante 3 horas.

Spurr 50% (2 gotas cada 5 minutos) durante 3 horas.

Spurr 50% (3 - 4 gotas cada 5 minutos) durante 3 horas.

Spurr 100% (1 gota cada 5 minutos) durante 3 horas.

Spurr 100% (1 gota cada 5 minutos) durante 1 hora.

#### **4.3.5. Inclusión**

Para la realización de las inclusiones planas se colocó el material, previamente embebido en Spurr 100%, entre dos portaobjetos, provistos con un film antiadherente permitiendo la separación de los mismos luego de la polimerización (Reymond & Pickett- Heaps 1983).

#### **4.3.6. Polimerización**

Se realizó en estufa a 70°C durante 8 – 12 horas.

#### **4.3.7. Ultramicrotomía**

Se realizaron secciones del material embebido en resinas SPURR, utilizando un ultramicrotomo marca Reichert, modelo Ultracut OM U2 del laboratorio de Biología de Algas y Hongos de la Universidad Nacional del Sur.

##### **4.3.7.1. Cortes ultrafinos**

Los cortes fueron transferidos a grillas con Forward a temperatura ambiente donde se secaron y adhirieron para ser posteriormente observadas bajo el MET Jeol 100CX-II (Jeol Ltd., Japan). El contrastado de los cortes estuvo a cargo del Centro de Microscopía Electrónica del CCT Bahía Blanca.

##### **4.3.7.2. Cortes semi-finos**

Las secciones obtenidas en el ultramicrotomo fueron montadas sobre portaobjetos con la utilización de un ansa. Los mismos se secaron a temperatura ambiente. Las observaciones de estos cortes se realizaron bajo MO.

##### **4.3.7.2.1. Remoción de resina Spurr**

Se siguió el método de Hayat (1986), para ello se utilizó una mezcla de sodio, benceno y alcohol metílico. Para la preparación de la misma a 25 ml de alcohol metílico a 55°C se agregaron 2,5 g de sodio metálico en pequeños trozos. Una vez disuelto se añadieron 25 ml de benceno. Los portaobjetos se expusieron de 1 a 3 minutos con la mezcla de solventes para remover las resinas de las secciones. Posteriormente se enjuagaron, primero en una mezcla 1:1 de benceno y alcohol metílico y luego se realizaron dos cambios de acetona y agua destilada.

#### 4.3.7.2.2. Tinción con hematoxilina- verde malaquita- fucsina básica

Se siguió el protocolo propuesto por Berkowitz *et al.* (1968):

- a) **Hematoxilina ferro-clorhídrica** se preparó mezclando los siguientes componentes:

75 ml de agua destilada

0,5 ml de HCl

0,62 g de cristales de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

1,12 g de cristales de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Una vez disueltas las sales, a 25 ml de la preparación, se le agregó una solución alcohólica de hematoxilina al 1%.

- b) **Verde malaquita** 100 ml de etanol

0,4 g de Azul B

1 g de verde malaquita

1 ml de anilina

1 g de cristales de fenol

- c) **Fucsina básica**

5 ml de etanol

2 g de fucsina básica

45 ml de agua destilada

##### *Protocolo de tinción*

Los portaobjetos se colocaron en recipientes con hematoxilina ferro-clorhídrica durante 20 minutos, pasado ese tiempo fueron retirados y enjuagados. En una segunda etapa los mismos fueron sumergidos en la solución de verde malaquita durante 2 minutos y enjuagados rápidamente



con agua corriente. Finalmente, fueron inmersos en fucsina básica a 37 °C durante 20 – 120 segundos y enjuagados en agua corriente.

#### **4.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB) y Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX)**

##### **4.4.1. Fijación**

Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf conteniendo glutaraldehído al 2,5% preparado en buffer cacodilato 0,01 M, la fijación se realizó en frío durante 2 horas. Luego se realizaron tres enjuagues con el buffer de 10 minutos cada uno.

##### **4.4.2. Montaje de las muestras**

Las muestras se colocaron sobre fragmentos de cubreobjetos que contaban previamente con una capa delgada y uniforme de Poly-D-lysina al 0,5 %, que actuó como agente adhesivo del material biológico depositado en ella.

##### **4.4.3. Deshidratación del material**

Se colocó la placa con el material en un tubo Eppendorf y se reemplazó la solución buffer por sucesivas soluciones de acetona en concentraciones crecientes (10 % - 80 %).

##### **4.4.4. Secado y metalizado**

Se aplicó secado por punto crítico durante una hora y se metalizó con oro en un Sputter Coater 9100 mod. 3, según Sorrivas de Lozano *et al.* (2014), realizado por Centro de Microscopía Electrónica del CCT Bahía Blanca.

##### **4.4.5. Observación del material**

Las observaciones se realizaron en el microscopio electrónico de barrido Leo Evo 40 (Jena, Alemania) equipado con el Sistema de microanálisis de rayos X dispersivo de energía (EDX) OXFORD X- Max<sup>50</sup> (Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, Reino Unido), del Centro de Microscopía Electrónica del CCT Bahía Blanca.

#### **4.5. Medios de cultivo**

##### **4.5.1. Recolección del agua de mar**

El agua de mar utilizada en los diferentes ensayos fue trasladada en bidones plásticos desde el mismo sitio de colecta de los ejemplares hasta el laboratorio, en donde se la acondicionó para su uso. El agua de mar fue filtrada utilizando una bomba de vacío y un set de filtración Millipore® de membrana de fibra de vidrio (0,2 µm), además de un disco de nylon de 5 µm. Posteriormente, se colocó en botellas de Nalgene® y fue esterilizada en autoclave durante a 121°C durante 20 minutos. Una vez esterilizada, se almacenó en heladera a una temperatura de 4°C (± 1°C) hasta el momento de su uso.

##### **4.5.2. Medios de enriquecimiento**

Se elaboraron dos soluciones de nutrientes para enriquecer el agua de mar utilizada en los diferentes ensayos de cultivo.

###### **4.5.2.1. Medio PES**

**Elaboración según Provasoli (1968):** se preparó en agua destilada una solución producto de la combinación de los componentes que se detalla a continuación en la Tabla 3, hasta alcanzar un volumen final de 2 litros.

**Tabla 3.** Composición de la solución stock del medio de enriquecimiento PES

<b>Componente</b>	<b>Soluciones en agua destilada</b>	<b>Volúmenes utilizados</b>
<b>Na<sub>2</sub>-glicerofosfato.5H<sub>2</sub>O</b>	5 g / 100 ml	16 ml
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	6 g / 100 ml	150 ml
<b>Cianocobalamina (Vitamina B<sub>12</sub>)</b>	0,01 g / 100 ml	1,6 ml
<b>Tiamina</b>	0,1 g / 100 ml	8 ml
<b>Biotina</b>	0,01 g/ 100 ml	0,8 ml
<b>Tampón Tris (Llevar a pH 7,5-8,5 con HCl)</b>	6,5440 g / 150 ml	150 ml
<b>Fe EDTA:</b>		
<i>Na<sub>2</sub>EDTA+</i>	0,2640 g / 500 ml +	500 ml
<i>Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</i>	0,2808 g	
<b>Mezcla de metales traza:</b>		500 ml
Na <sub>2</sub> EDTA	0,4 g	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4480 g	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0192 g	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0480 g	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0088 g	
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0019 g	

#### 4.5.2.2. Medio Von Stosch (Grund)

**Elaboración según Von Stosch (1963), modificado por Guiry & Cunningham (1984):** se elaboró una solución stock con 470 ml de agua de mar filtrada y esterilizada y agregando 5 ml de cada una de las soluciones descritas en la Tabla 4, hasta alcanzar un volumen final de 500 ml con agua destilada. Esta solución stock se esterilizó en autoclave (20 minutos) en botellas de vidrio Duran® y se almacenó en freezer hasta el momento de su uso.

**Tabla 4.** Composición del medio enriquecedor de cultivo von Stosch, tomado de Andersen (2005).

<b>Componente</b>	<b>Solución Stock (g.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O destilada)</b>	<b>Cantidad a usar</b>
Na <sub>2</sub> β-glicerofosfato	5,36	5 ml
NaNO <sub>3</sub>	42,52	5 ml
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,28	5 ml
MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	1,96	5 ml
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	3,72	5 ml
<i>Solución stock de vitaminas:</i>		5 ml
Tiamina. HCl (vitamina B <sub>1</sub> )		100 mg
Biotina (vitamina H)	0,1	0,5 ml
Cianocobalamina (vitamina B <sub>12</sub> )	0,2	0,5 ml

#### **4.5.2.3. Prevención de la contaminación de cultivos**

Se utilizó una solución de dióxido de germanio (GeO<sub>2</sub>) (Chapman 1980), para evitar el crecimiento de diatomeas en los diferentes ensayos realizados.

*Elaboración:*

- 100 mg de GeO<sub>2</sub> en 80 ml de solución de NaOH 1 N

Esta solución se calentó hasta ebullición. Posteriormente se dejó enfriar y se completó el volumen hasta llegar a 100 ml (Lewin 1966). La dosis de esta solución utilizada en los cultivos fue de 1-5 ml por cada litro de medio de cultivo. Cuando las diatomeas se eliminaron de los cultivos, el uso de GeO<sub>2</sub> se suspendió.

## CAPÍTULO II

### *MERIDIONELLA OBTUSANGULA* nov. comb.



# 1. Introducción

## 1.1. Filogenia de las algas rojas

El enfoque actual de la biología evolutiva de los grandes grupos o reinos está basado en la combinación de datos morfológicos, fisiológicos y moleculares. Las macroalgas, constituyen un grupo polifilético altamente diverso (Nielsen 2007), es decir que no comparten un ancestro en común, por lo que su definición es muy compleja. Históricamente han recibido los nombres vulgares de algas rojas, pardas y verdes como consecuencia de los pigmentos fotosintéticos que presentan. En la clasificación actual basada en datos morfológicos y moleculares estos organismos se enmarcan dentro de las Divisiones Rhodophyta, Ochrophyta y Chlorophyta, respectivamente. No obstante, estudios moleculares, están resolviendo eficazmente los problemas de la taxonomía macroalgal, aclarando las relaciones filogenéticas y conduciendo al descubrimiento de nuevos taxones (Díaz-Tapia *et al.* 2013, Verbruggen 2014, Hardesty & Freshwater 2018, Díaz-Tapia *et al.* 2019).

En particular las algas rojas, son un linaje eucariota complejo, si bien no presentan características morfológicas generales por las que se las pueda caracterizar, sus miembros han sido agrupados a lo largo de los años, por medio del uso de análisis filogenéticos de genes nucleares, plástidos y mitocondriales y de caracteres morfológicos (Freshwater *et al.* 1996, Van de Peer & De Wachter 1997, Yoon *et al.* 2002, 2004, Muñoz-Gómez *et al.* 2017, Lee *et al.* 2018). En la actualidad, dentro de esta división se reconocen ocho clases (Guiry & Guiry 2021), siendo la Clase Florideophyceae la más rica en taxones integrando un

95% (6.752) de las especies actualmente descritas y posiblemente conteniendo numerosos taxones crípticos (Yang *et al.* 2016).

Muchas familias y géneros dentro de la Clase Florideophyceae experimentan una sustancial reorganización taxonómica como resultado de nuevos enfoques en los estudios ultraestructurales, bioquímicos y moleculares (Saunders & Kraft 1994, 1996, Lee & Kim 2014, Billard *et al.* 2015, Guillemin *et al.* 2018). Incluido en esta clase, el Orden Gigartinales corresponde a un grupo diverso de algas rojas en el cual la aplicación de datos moleculares está conduciendo a un sistema más natural de clasificación y al descubrimiento de especies crípticas (Hommersand *et al.* 1999, Payo *et al.* 2013, Kraft & Saunders 2014, 2017). Esto es especialmente cierto para la familia Cystocloniaceae (Orden Gigartinales), en la que se han descrito varios taxones nuevos y se han propuesto reordenamientos taxonómicos especialmente a partir de datos moleculares (Geraldino *et al.* 2009, Díaz-Tapia *et al.* 2013, D'Archino *et al.* 2015, Won *et al.* 2016, Yang & Kim 2017, Soares *et al.* 2019).

### **1.2. *Cystoclonium obsusangulum*: una controversial especie**

La Familia Cystocloniaceae fue creada por Kützing (1843) como Cystoclonieae sobre la base de su género monoespecífico *Cystoclonium*. Actualmente, incluye 13 géneros aceptados (Guiry & Guiry 2021), de los cuales *Calliblepharis*, *Hypnea* y *Rhodophyllis* son los más diversos en especies.

Las especies de esta familia se caracterizan por la presencia de talos uniaxiales; células axiales acompañadas cada una por dos células periaxiales; una corteza compacta compuesta de células internas grandes y células externas pequeñas; ramas carpogoniales constituidas por tres células dirigidas hacia el interior; gametofitos procápicos con la célula auxiliar originada a partir de la célula de

soporte y soportando una única célula inicial gonimoblástica dirigida hacia el interior; carposporangios en cadenas; carposporofito generalmente carente de filamentos envolventes; cistocarpos inmersos o salientes, en su mayoría no ostiolados y tetrasporangios divididos zonalmente (Womersley 1994, Saunders & Hommersand 2004).

Una de las especies identificada como *Cystoclonium obtusangulum* Kützing se describió originalmente como *Gracilaria obtusangula* J.D. Hooker & Harvey, basándose en los especímenes colectados por J.D. Hooker en Cabo de Hornos y en las Islas Malvinas (Hooker & Harvey 1845). Posteriormente, Hooker & Harvey ampliaron su discusión sobre esta especie y la subsumieron en la nueva combinación *Gracilaria nigrescens* basándose en aportes de Montagne realizados sobre especímenes identificados como *Sphaerococcus subulatus* C. Agardh,  $\beta$ . *nigrescens* de (Hooker 1847). La nominación genérica se citó como cuestionable debido a la falta de ejemplares reproductivos y fue Kützing en 1849, quien transfirió la especie a *Cystoclonium*, declarando que la estructura del talo presentaba similitud con *Cystoclonium purpureum* (Hudson) Batters. Asimismo, Kützing en 1849 describió a *Cystoclonium obtusangulum* señalando como característica distintiva la presencia de una médula interna fibrosa longitudinal. Más tarde, en 1868, Kützing incluyó ilustraciones del espécimen y describió la anatomía interna en su *Tabulae Phycologicae* coincidiendo con la anatomía que había sido descrita anteriormente.

Un estudio detallado de la morfología de *Acanthococcus antarcticus* J.D. Hooker & Harvey basado en especímenes procedentes del sur de Argentina y de Chile propuso la sinonimia de *C. obtusangulum* bajo el nombre de *A. antarcticus* (Fredericq *et al.* 1992). Esta sinonimia se basó en el desarrollo de caracteres



anatómicos de muchos especímenes antiguos, incluidos los ejemplares de *C. obtusangulum* depositados en el herbario del Museo de Historia Natural de Londres (BM) y el ilustrado por Kützing del Herbario de Leiden (L), siendo esta la propuesta seguida en AlgaeBase (Guiry & Guiry 2021). Nuevamente, Hommersand *et al.* (2009) pusieron en tela de discusión la identificación de *C. obtusangulum*, a partir de especímenes fértiles morfológicamente similares a la especie recogidos en la Península Antártica (1994), en Punta Arenas (1997) y en las Islas Malvinas (1998). No obstante, sin estudios moleculares no se generaron nuevos cambios con respecto a la identidad de *C. obtusangulum*.

## 2. Objetivos

Sobre la base de los antecedentes mencionados, para el comienzo del estudio de la nueva especie hallada en Las Grutas se formularon los siguientes objetivos:

- Analizar la morfología mediante la utilización de diversas técnicas histológicas y observaciones bajo lupa, microscopía óptica y electrónica.
- Establecer las relaciones filogenéticas de la población en estudio con las provenientes de Chile e Islas Malvinas y otros géneros y especies incluidos en la familia Cystocloniaceae mediante el análisis y comparación de datos moleculares.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Ejemplares de herbario**

Ejemplares recolectados de las zonas submareal e intermareal de Piedras Coloradas (Fig. 1) fueron herborizados y posteriormente incorporados al Herbario BBB de la Universidad Nacional del Sur (UNS), bajo las denominaciones GT297, GT298, GT300, GT301, GT302. Previo a la herborización de los talos, se tomaron submuestras para la realización de estudios morfológicos y filogenéticos.

#### **3.2. Estudios morfológicos**

Para el análisis de la morfología se realizaron diferentes estudios:

- a) *MO*: Las submuestras fueron fijadas en solución FAA, para realizar preparados semipermanentes y permanentes. Las tinciones utilizadas para este estudio fueron las siguientes: *fast-green*, azul de metileno al 0,1 %, hematoxilina de Wittmann y azul de anilina 1% (ver *Cap. I*).
- b) *TEM* y *SEM* (ver *Cap. I*).

#### **3.3. Análisis filogenético molecular**

El análisis filogenético se basó en los datos moleculares aportados por las Dras. M. Emilia Croce (UNS) y Pilar Díaz-Tapia (Universidad de La Coruña, España) (Tabla 5) quienes extrajeron ADN genómico de muestras pertenecientes a la localidad de estudio para esta tesis. Para ello, la extracción de ADN y amplificación de los marcadores nucleares 18S y el plastidio *rbcl*, se realizó

según los protocolos descritos en Díaz-Tapia *et al.* (2013, 2018) (Fig. 4). Los productos de la PCR fueron purificados y secuenciados comercialmente por el servicio Macrogen y el servicio de secuenciación de la Universidad de La Coruña. Así mismo, se contrastaron con secuencias de nucleótidos provistas por los Dres. D. Wilson Freshwater (Universidad Carolina del Norte, USA) y Suzanne Fredericq (Universidad de Luisiana en Lafayette, USA) de seis ejemplares de especímenes recolectados en localidades de Chile, Islas Malvinas y Antártida, identificados como Sintipos de "*Cystoclonium obtusangulum*" depositados en los Herbarios de la Universidad de Carolina del Norte y de la Universidad de Luisiana, USA (Tabla 5, Fig. 4). Los mismos fueron extraídos, amplificados y secuenciados por los Dres. Freshwater y Fredericq, en la Universidad de Luisiana en Lafayette, siguiendo los protocolos de Fredericq *et al.* (1999) y Freshwater & Rueness (1994). Las secuencias *rbcL* y 18S utilizadas para los análisis filogenéticos se limpiaron y editaron con MEGA X (Kumar *et al.* 2018) y se compilaron como dos conjuntos de datos separados. El conjunto de datos de *rbcL* analizados incluyó doce nuevas secuencias, de las cuales 6 pertenecieron a los ejemplares de Argentina, 1 a las Islas Malvinas, 1 a Chile y 4 a la Antártida (Tabla 5). Adicionalmente se utilizaron 35 secuencias de diferentes especies de Gigartinales disponibles en el GenBank (Fig. 4). El conjunto de datos 18S analizados incluyó una nueva secuencia del espécimen de la Argentina con su número de *voucher* GT297 y 32 secuencias de especies de Gigartinales disponibles en GenBank. Se crearon múltiples alineaciones globales para cada conjunto de datos con MEGA X utilizando el método ClustalW. Los análisis filogenéticos realizados basados en el marcador *rbcL* se basó en p-distancias y utilizando el algoritmo *Neighbor Joining* (NJ) (eliminación por pares, 1000

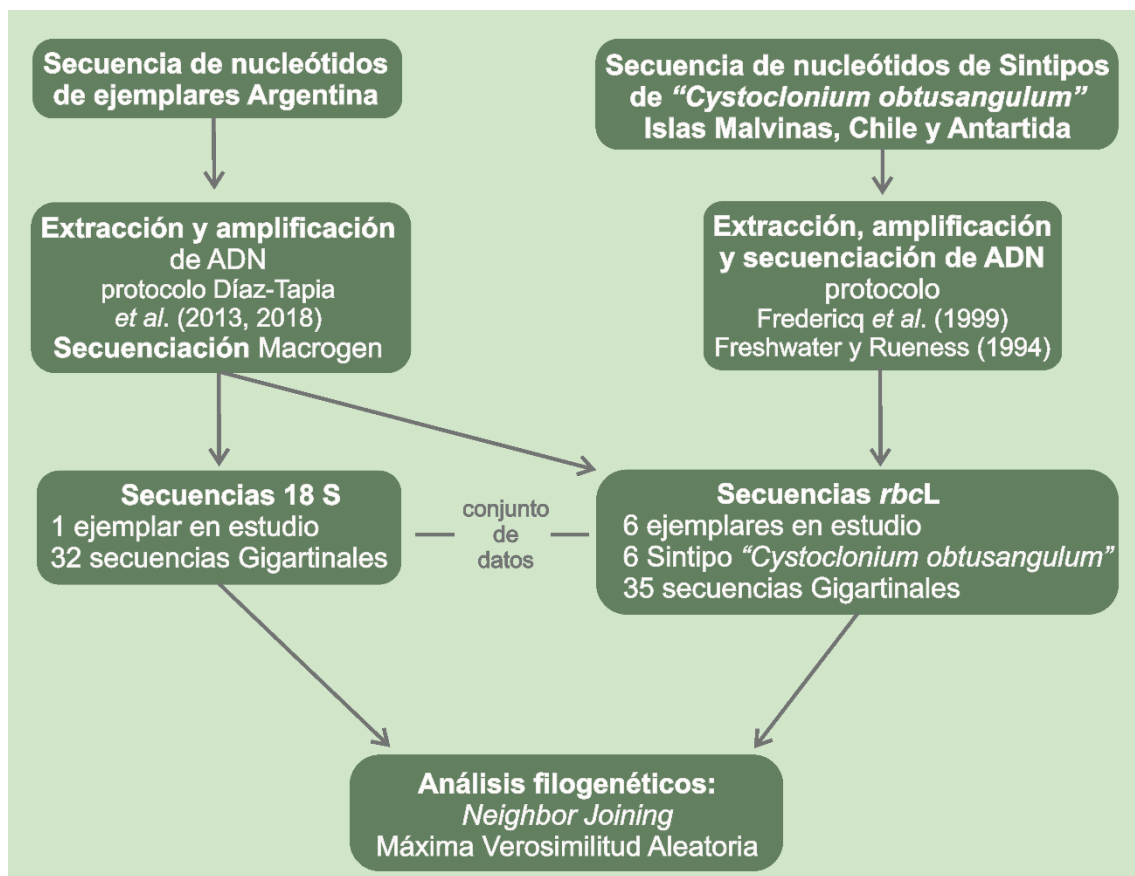
réplicas de *bootstrap*) en MEGA X (Kumar *et al.* 2018). La relación entre los especímenes estudiados se determinó inicialmente sobre la base de los clados monofiléticos formados en el árbol de NJ y las divergencias porcentuales entre las secuencias del conjunto de datos *rbcl*.

Los modelos de evolución correspondientes para los genes *rbcl* y 18S se estimaron con jModeltest v2.1.10 (Darriba *et al.* 2012). Los modelos sugeridos fueron TIM1 + I +  $\Gamma$  y GTR + I +  $\Gamma$  para los genes *rbcl* y 18S, respectivamente.

La filogenia se infirió utilizando los modelos evolutivos sugeridos con Análisis de Máxima Verosimilitud Aleatoria (RAxML-NG) v.0.9.0, con 100 réplicas *bootstrap* (BP) (Kozlov *et al.* 2019) (Fig. 4). En el caso del gen *rbcl*, la filogenia de las Cystocloniaceae se dedujo utilizando los mismos tres grupos que en el análisis de NJ, mientras que en el caso de los genes 18S la filogenia se dedujo de las Gigartinales. Las probabilidades posteriores bayesianas (BPP) se estimaron utilizando el Sr. Bayes v3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

**Tabla 5.** Detalle de los ejemplares secuenciados utilizados en esta tesis.

Localidad	Voucher/ N° de acceso Genbank Marcador <i>rbcl</i>	Voucher/ N° de acceso Genbank Marcador 18S
<b>Argentina</b>		
<i>Las Grutas</i>	BBB GT297 a 302 / MT240899 a MT240904	BBB GT297 / MT193823
<i>Islas Malvinas</i>	LAF1342 / MT240906	
<b>Chile</b>	NCU-A-0009088 / MT240905	
<b>Antártida</b>	LAF 3025 / MT240907	
	WNC 34178 / MW001289	
	WNC 34180 / MW001290	
	NCUA0009091 / MT240908	



**Figura 4.** Esquema de procesamiento de muestras para estudios filogenéticos.

## 4. Resultados

### 4.1. Clasificación taxonómica

Filo: Rhodophyta

Clase: Florideophyceae

Subclase: Rhodymeniophycidae

Orden: Gigartinales

Familia: Cystocloniaceae

Género: *Meridionella* Tonicelli, M.E. Croce & Hommersand nov. gen.

Especie: *Meridionella obtusangula* (J.D. Hooker & Harvey) Tonicelli, M.E. Croce & Hommersand nov. comb.

### 4.2. Filogenia

Sobre la base de los resultados moleculares obtenidos al determinar doce secuencias *rbcL* y una secuencia 18S incluyendo en las alineaciones finales de *rbcL* 1279 pb y 1691 pb para el marcador 18S, los especímenes en estudio fueron identificados como *Meridionella* (Tonicelli, ME. Croce & Hommersand) *gen. nov.* (Fig. 5). Los especímenes de Argentina, Chile e Islas Malvinas conformaron un grupo y fueron clasificados como *M. obtusangula* (= *ex Cystoclonium obtusangulum*), los cuales estuvieron estrechamente relacionados con la especie *Meridionella antarctica* Hommersand (*ex Cystoclonium obtusangulum*) proveniente de la Península Antártica.

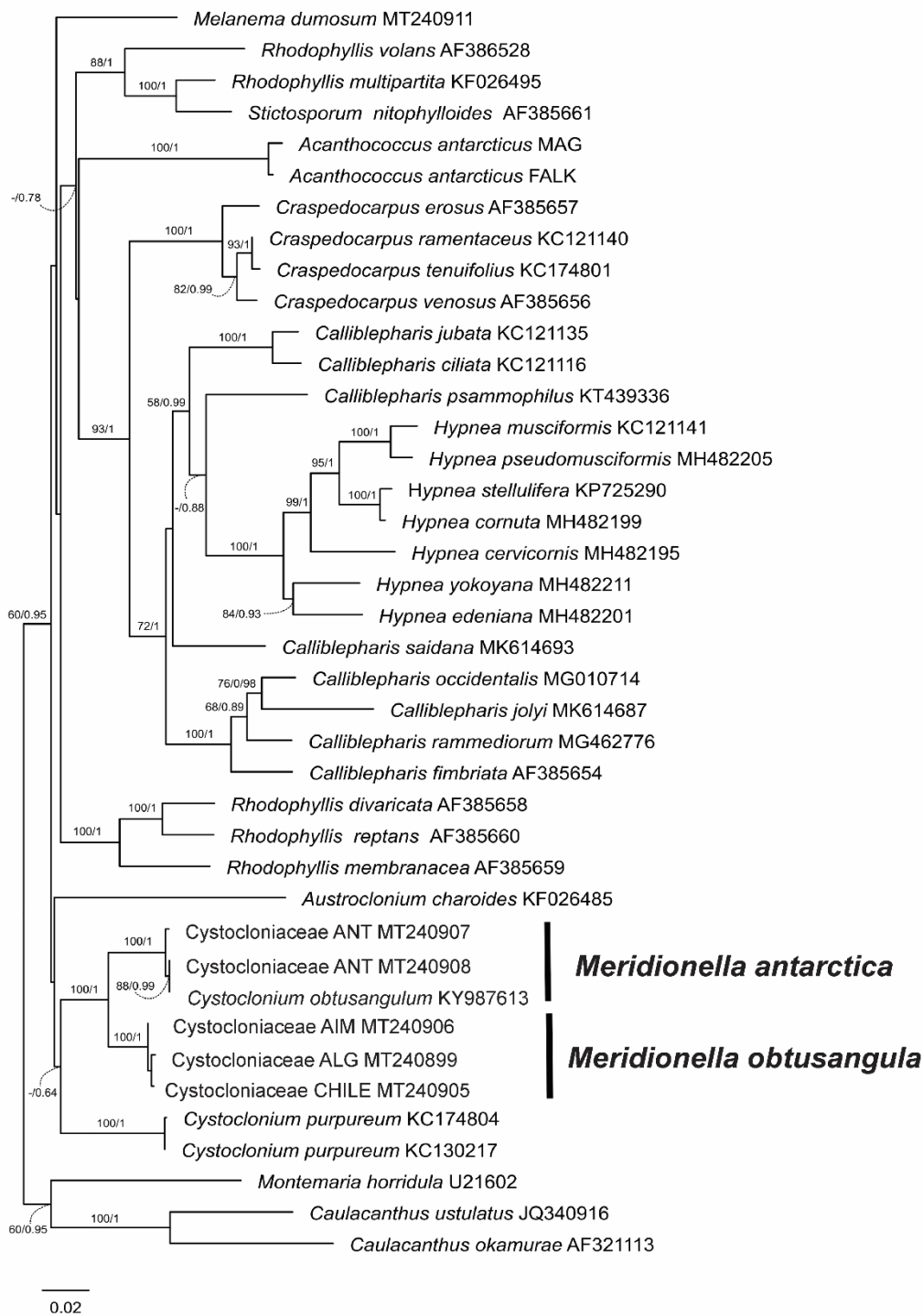
En relación a los análisis de p-distancias de *rbcL*, los especímenes de *M. obtusangula* de Las Grutas fueron genéticamente similares a los ejemplares de

Chile y de las Islas Malvinas, presentando un 0,2-0,4% de divergencia de secuencia (Figs. 6 y 7). Asimismo, el grupo de especímenes de *M. obtusangula* estuvo fuertemente relacionado con los ejemplares de la Península Antártica, con 4-5% de divergencia de secuencia (Figs. 6 y 7). La divergencia de secuencia interespecífica entre *M. obtusangula* de Argentina y *M. antarctica* de la Península Antártica basado en el análisis de p-distancias del 18S fue de 0,3 %. En relación a los árboles de rbcL y 18 S *M. obtusangula* formó un clado bien definido con su especie críptica *M. antarctica* y los especímenes de la familia Cystocloniaceae (Fig. 8).

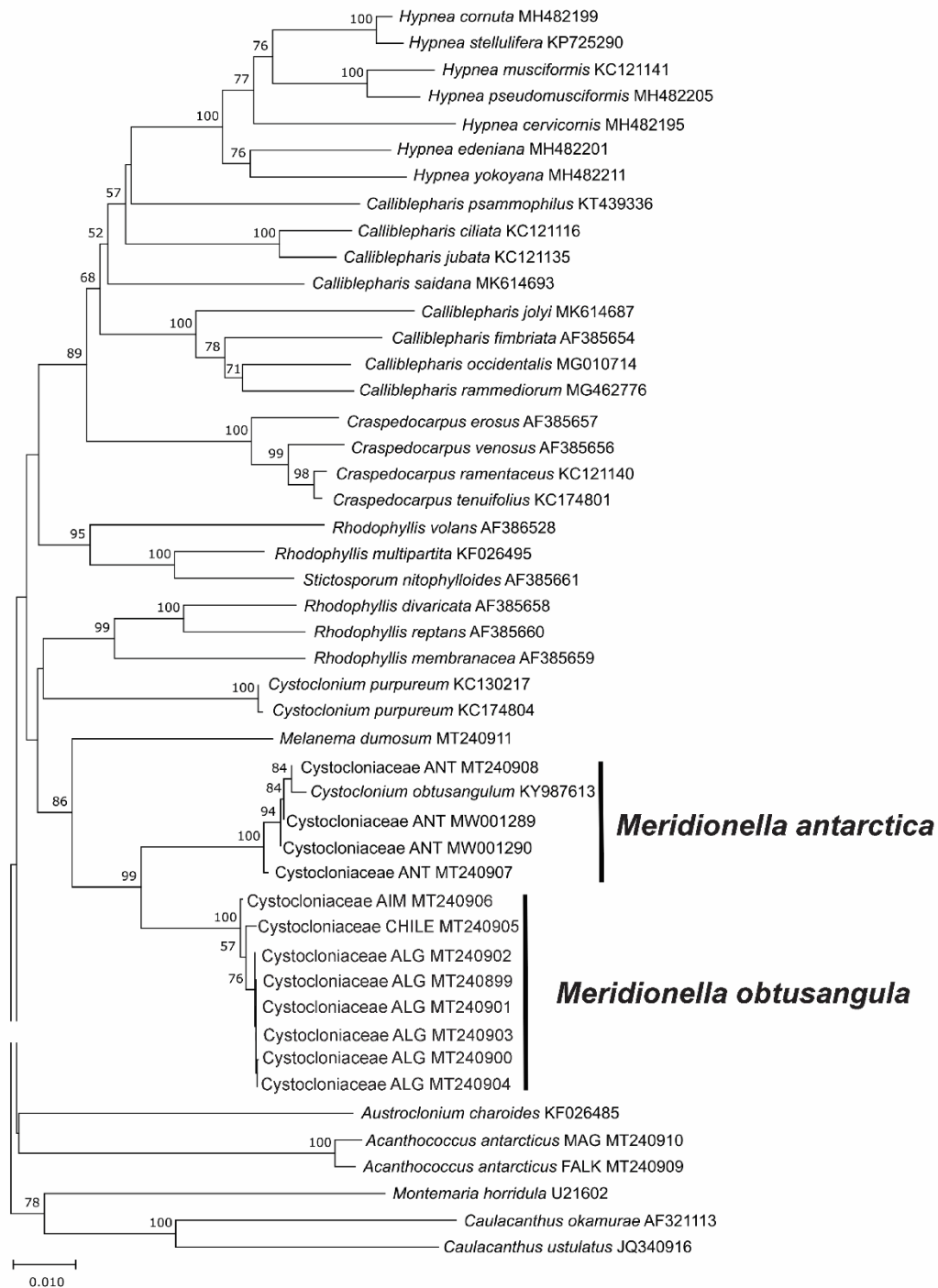


**Figura 5.** *Meridionella obtusangula*. Ejemplar recolectado de la localidad de Las Grutas, Río Negro, Argentina. *Barra escala* = 1 cm

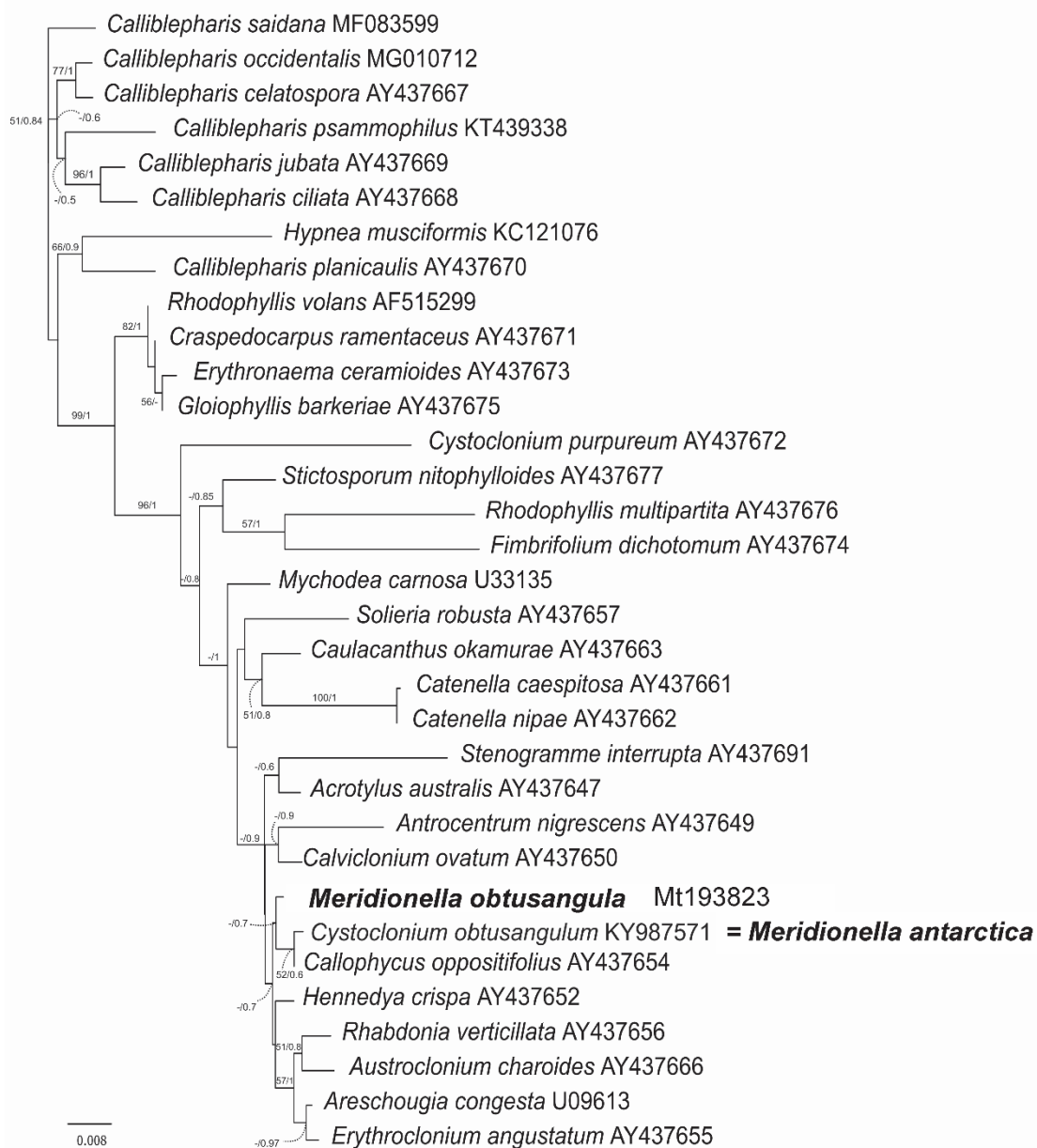




**Figura 6. Filogenia del género *Meridionella* basada en el gen *rbcL*.** Los números en las ramas representan los porcentajes de máxima probabilidad de *bootstrap* (izquierda) y probabilidades posteriores bayesianas (derecha). ANT: Antártida, ALG: Argentina Las Grutas, AIM: Argentina Islas Malvinas.



**Figura 7. Árbol neighbor joining de los especímenes estudiados en base a p-distancias.** Los números en las ramas representan los porcentajes de *bootstrap* (PB). ANT: Antártida, ALG: Argentina Las Grutas, AIM: Argentina Islas Malvinas.



**Figura 8. Filogenia del género *Meridionella* basado en el gen 18S.** Los números en las ramas representan los porcentajes de máxima probabilidad de *bootstrap* (izquierda) y probabilidades posteriores bayesianas (derecha).

### 4.3. Morfología

#### 4.3.1. Morfología vegetativa

*Meridionella obtusangula* presentó talos macroscópicos tetrasporofitos y gametofitos isomórficos. Los mismos tuvieron una coloración rojiza oscura y un aspecto general arborescente (Fig. 9 A), escasamente ramificados en la parte inferior y densamente en la superior (Fig. 9 B-E). Los talos alcanzaron como máximo hasta 15 cm de largo, variando la mayoría entre 9 ( $\pm 2,84$ ) (media  $\pm$  error estándar) y 12 ( $\pm 2,91$ ) cm de largo (Fig. 9 C y D).

Las ramas fueron sub-dicotómicas y pennadas en la región apical e irregulares y profusas cerca de la base, otorgándole al talo un aspecto dendroide. Las ramas de primer y segundo orden fueron cilíndricas de hasta 2-3 mm de grosor. Las ramas de tercer orden fueron más cortas agudizándose hacia los ápices (Fig. 9 B y E).

Los talos presentaron como estructura de fijación al sustrato un disco basal de adhesión de 2 a 8 mm de diámetro (Fig. 10 A), en los cuales se observó coalescencia entre varios discos (Fig. 10 B y C). En talos cultivados bajo condiciones controladas de laboratorio, a partir de los discos basales se observó el desarrollo de rizoides conformados por células cortas cilíndricas con un largo de 5,16 ( $\pm 0,34$ )  $\mu\text{m}$  y 3,85 ( $\pm 0,23$ )  $\mu\text{m}$  de ancho (Figs. 10 C y D). Asimismo, se observaron nuevos talos desarrollados directamente desde el disco de fijación sobre la cara abaxial (Fig. 10 E), así como el desarrollo de estolones con células cilíndricas con un largo de 11,53 ( $\pm 0,50$ )  $\mu\text{m}$  y un ancho de 5,72 ( $\pm 0,34$ )  $\mu\text{m}$ , a partir de los cuales se observó la formación de nuevos talos vegetativos (Fig. 10 F y G).

Se evidenció la presencia de pelos hialinos multicelulares, constituidos por 2 a 5 células. La célula basal fue más alargada que las siguientes, que alcanzaron  $1,52 (\pm 0,04) \mu\text{m}$  de ancho. La mayoría de los pelos se localizaron en las regiones media  $\pm$  y apical de los talos (Fig. 11).

La vista superficial de los talos de *M. obtusangula*, mostró una corteza, constituida por dos tipos de células corticales diferenciadas en su forma: de sección poligonal y desigualmente poligonal (Fig. 12 A-C).

Sobre la superficie de los talos tetrasporofíticos se observó la presencia de rosetas, estructuras asociadas con la formación de los tetrasporangios. Estas estructuras consistieron de pequeñas células corticales que rodearon a una célula cortical central de mayor tamaño (Fig. 12 C y D).

### **Organización celular del talo**

Los talos de *M. obtusangula* fueron uniaxiales, con células apicales prominentes y de forma ovoide (Fig. 13 A). Cada célula axial originó alternativamente una célula periaxial mediante divisiones oblicuas, originando células subapicales ligeramente desplazadas sobresaliendo en los tres radios del eje (Fig. 13 A). Las células axiales fueron alargadas, con paredes gruesas, dispuestas en zigzag (Fig. 13 B) y presentaron *pit-connections* primarias con otras células axiales y *pit-connections* secundarias con células medulares y corticales (Fig. 13 C y D). Asimismo, los talos presentaron filamentos rizoidales rodeando al filamento axial central. Los mismos aumentaron en cantidad desde la región apical hacia la región basal (Fig. 14). En las regiones media y basal del talo, estos filamentos rizoidales muy abundantes, se entrelazaron con el filamento axial haciéndose indistinguibles en las secciones longitudinales (Fig. 14 C y D). Los filamentos

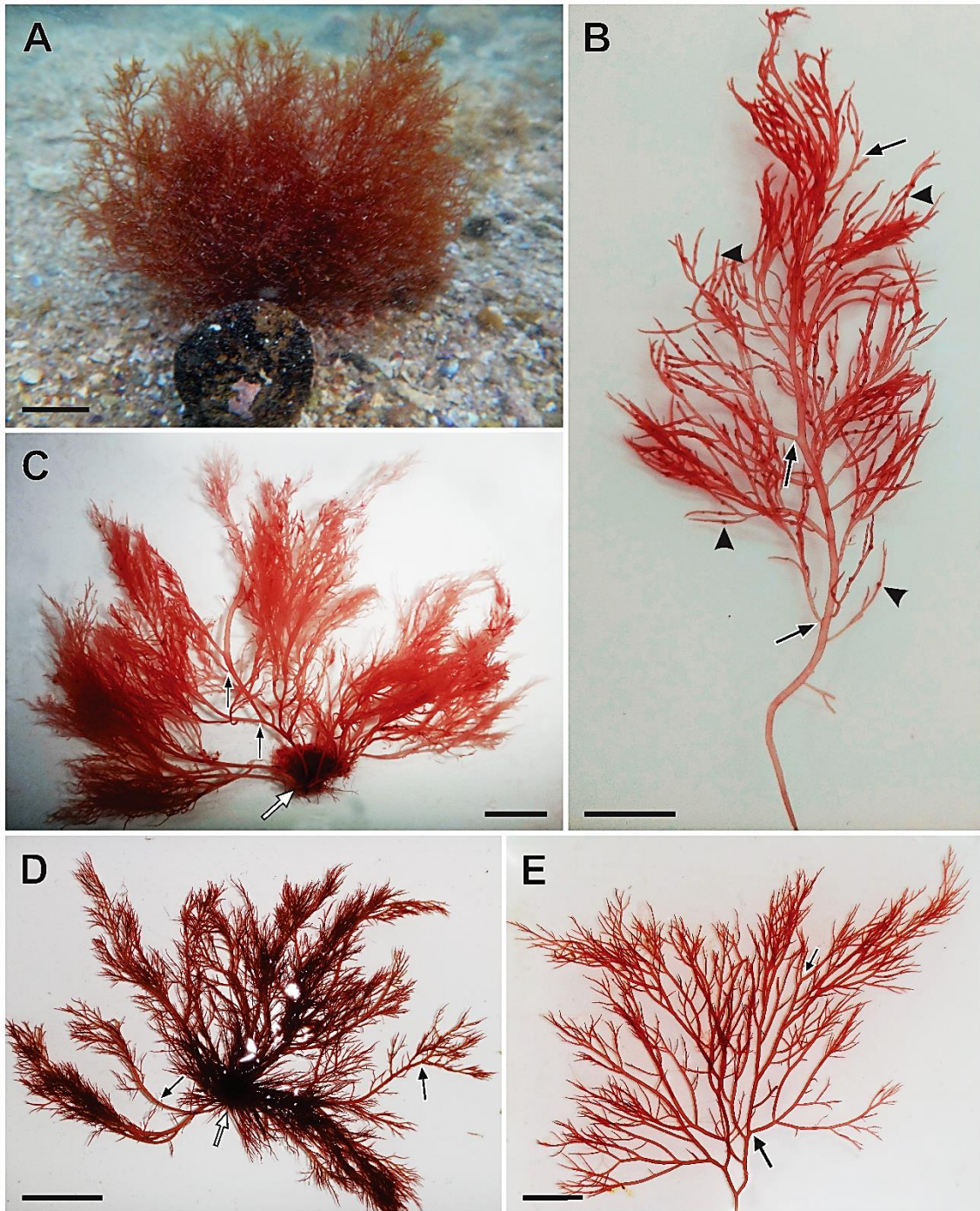
rizoidales presentaron *pit-connections* secundarias con las células axiales, medulares y corticales (Fig.13 C y D).

La médula estuvo formada por dos o tres capas de células hialinas redondeadas (36,91 ( $\pm$  7,73)  $\mu$ m de largo) con cloroplastos dispersos de aspecto reticular y por filamentos rizoidales. La estructura de la médula varió a lo largo del talo (Fig. 15). En secciones transversales de los ápices, se observó que el filamento axial estuvo rodeado por unos pocos filamentos rizoidales (Fig. 15 B y C), mientras que, en las regiones medio-basales, el eje central estuvo densamente rodeado por rizoides empaquetados que formaron una estructura más sólida dentro de la médula (Fig. 15 D).

La corteza de *M. obtusangula* en la región apical y media del talo estuvo formada por dos o tres capas de células pequeñas y pigmentadas distribuidas irregularmente de 11,08 ( $\pm$  2,22)  $\mu$ m de ancho. En la región basal del talo, la corteza fue más gruesa (2 - 4 mm), y compuesta por cinco a ocho capas de células de 13,10 ( $\pm$  6,29)  $\mu$ m de ancho. En las partes más viejas del talo, las capas corticales y los filamentos rizoidales formaron haces alrededor del filamento axial (Fig. 15 E).

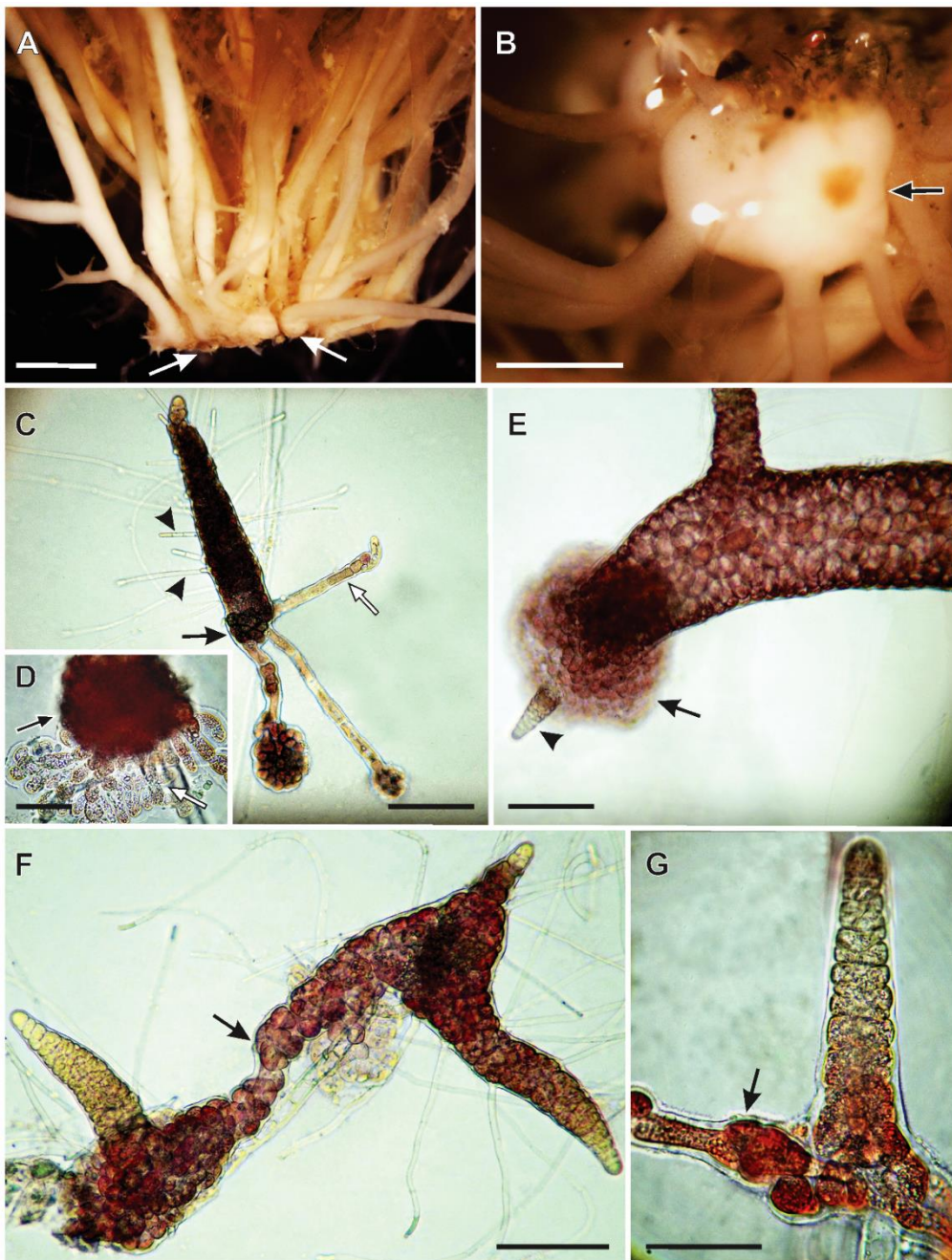
Bajo MEB, la sección transversal de una rama mostró células corticales externas pequeñas, células medulares internas más grandes y el filamento axial central acompañado por algunos vestigios de los filamentos rizoidales corriendo paralelamente a dicho eje (Fig. 16).





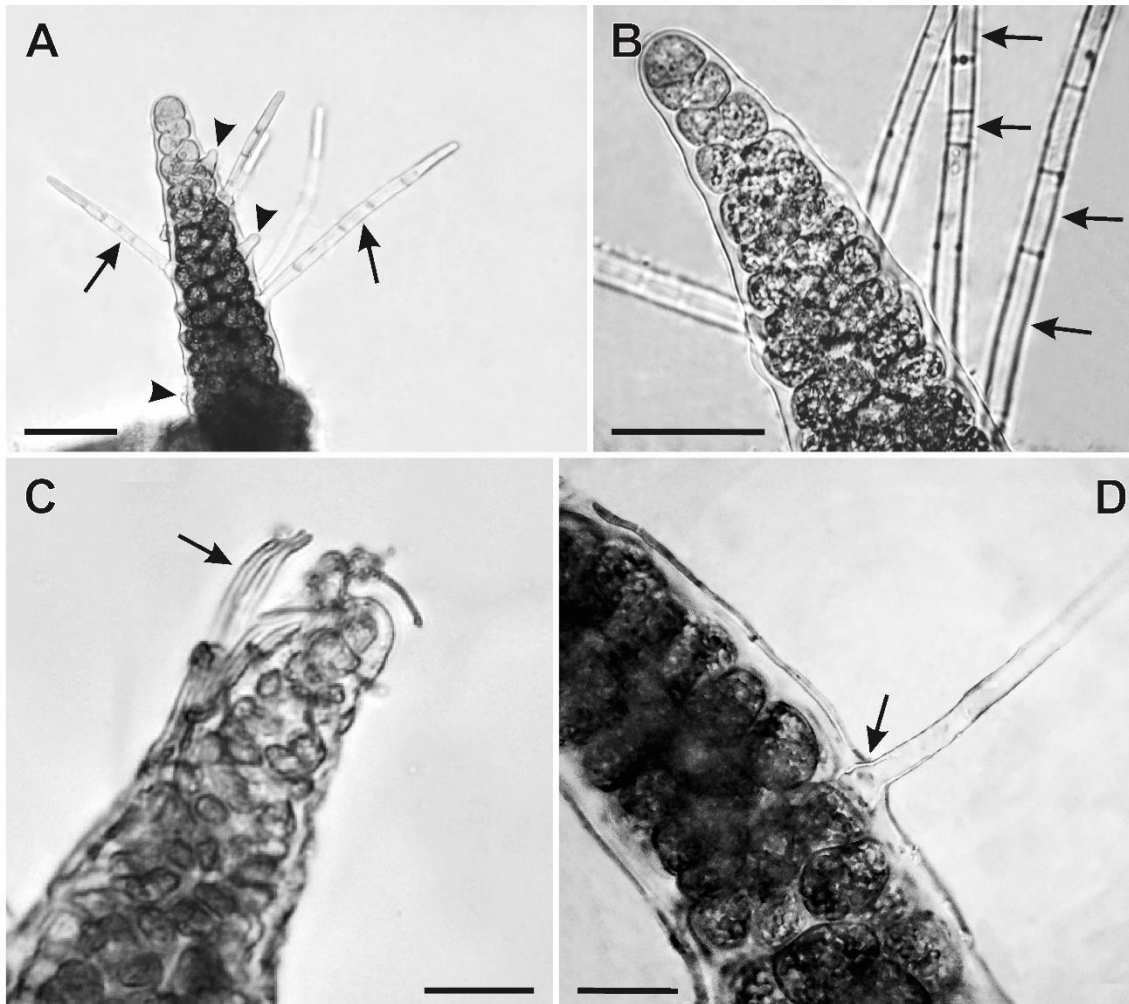
**Figura 9. *Meridionella obtusangula*. Aspecto general del talo en la naturaleza. A.** Talo adherido al sustrato en una poza de marea. **B y C.** Carposporofitos con ramificaciones sub-dicotómicas y pennada en la región apical-media (flechas negras) y profusas cerca de la base (flecha blanca), nótese, en **B**, los carposporangios (cabezas de flechas). **D y E.** Tetrasporofitos con ramificaciones sub-dicotómicas y pennada en la región apical-media (flechas negras) y profusas cerca de la base (flechas blancas) *Barras escala: B= 5 mm; C, D y E = 1 cm; A = 2 cm.*



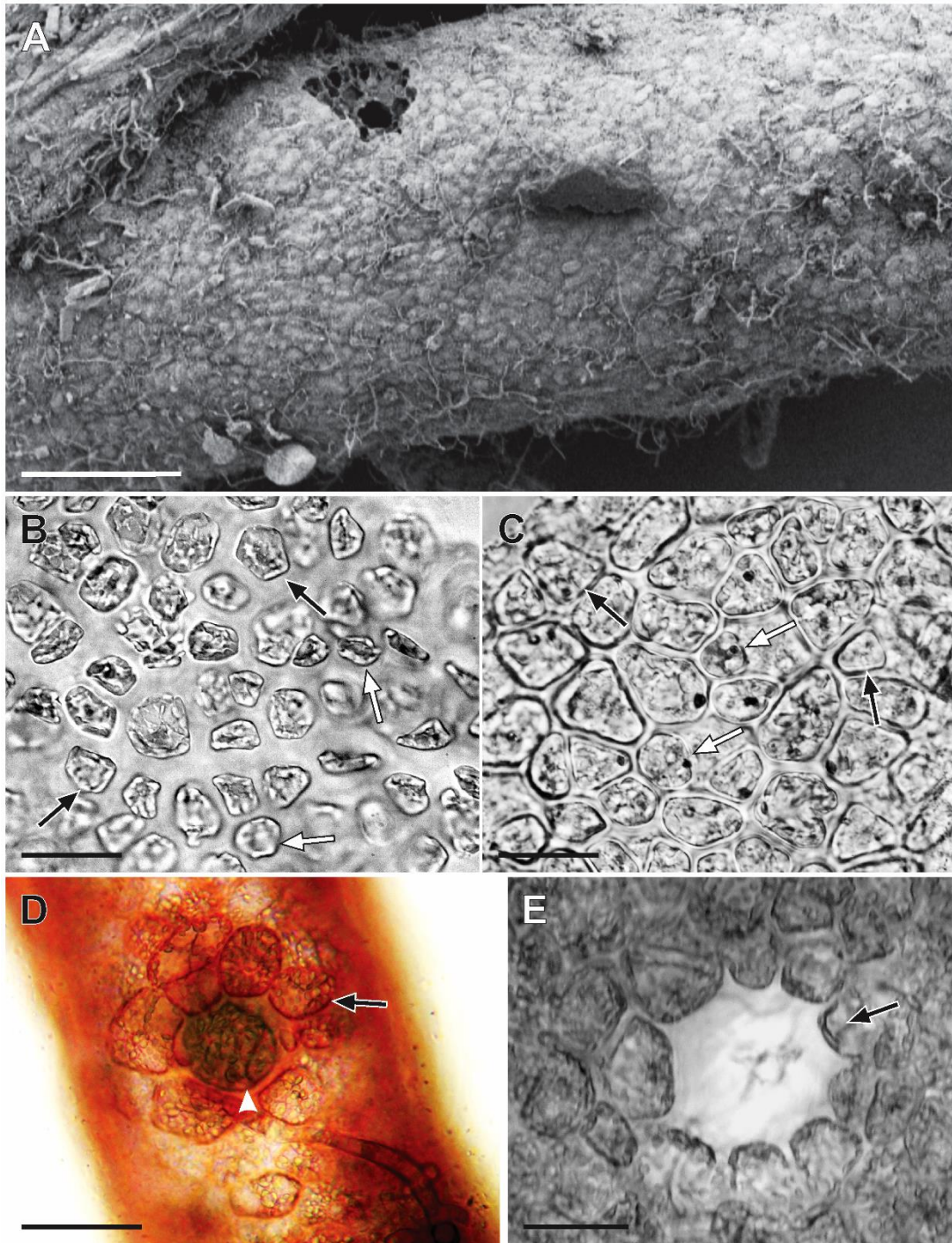


**Figura 10. *Meridionella obtusangula*. Estructuras de fijación. A - B.** Talos colectados de la naturaleza. **A.** Discos de fijación (flechas). **B.** Detalle de coalescencia entre varios discos de fijación (flecha). **C - G.** Talos obtenidos en cultivo. **C.** Aspecto general de un talo con pelos hialinos (cabezas de flechas), rizoides (flecha blanca) emergiendo del disco de fijación (flecha negra) **D.** Detalle del disco (flecha negra) con los rizoides en formación (flecha blanca). **E.** Talo con desarrollado más avanzado con disco de fijación (flecha negra) a partir del cual se originó un nuevo talo sobre la cara abaxial (cabeza de flecha). **F.** Talos conectados mediante un estolón (flecha negra) originado a partir del disco de fijación. **G.** Detalle de rizoide originando el estolón (flecha negra) *Barras escalas:* **D, G** = 50 µm; **C, E, F** = 100 µm; **B** = 0,5 mm; **A** = 1 mm. Lupa: **A** y **B**. MO: **C-G**.



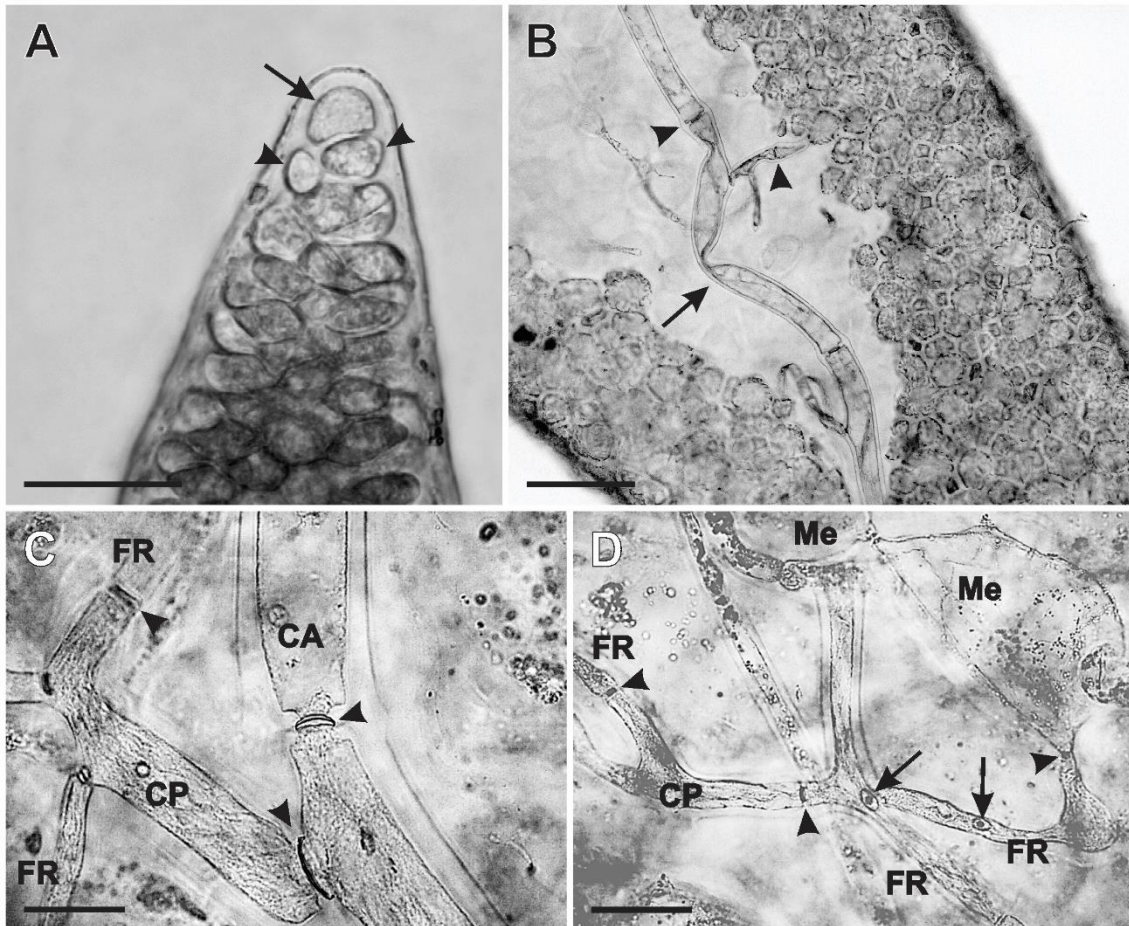


**Figura 11. *Meridionella obtusangula*. Pelos hialinos multicelulares. A.** Estadio juvenil de un talo, obsérvese pelos en distintas regiones (flechas) y pelos incipientes a lo largo del talo (cabezas de flechas). **B.** Pelos multicelulares con la célula basal más alargada que las siguientes (flechas). **C.** Ápice con pelos hialinos en formación (flecha). **D.** Inserción de un pelo en el talo (flecha). *Barras escalas:* C y D = 25  $\mu\text{m}$ ; A y B = 50  $\mu\text{m}$ . MO: A, B, C y D.

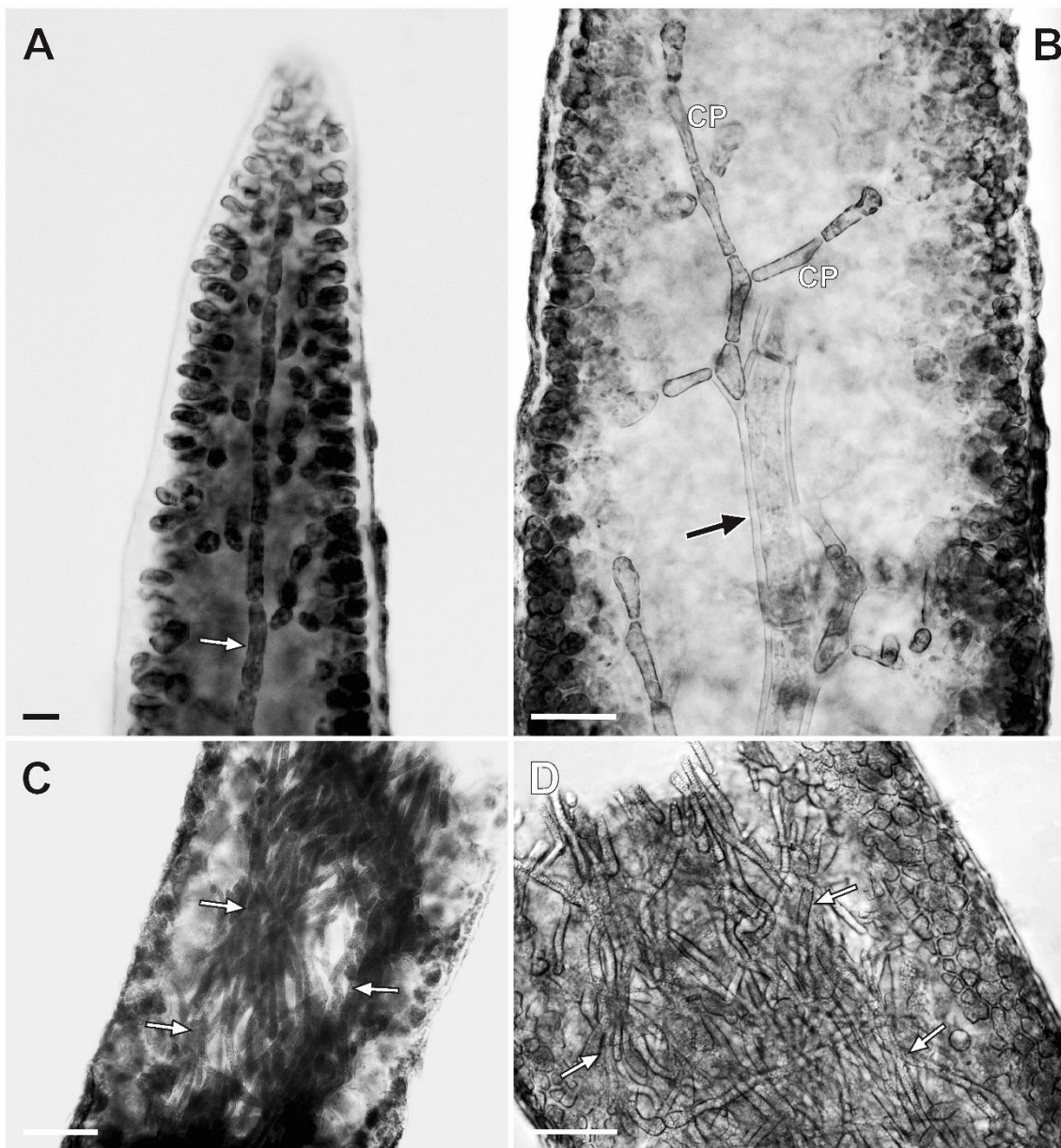


**Figura 12. *Meridionella obtusangula*. Vista superficial del talo. A.** Porción de rama mostrando las células corticales. Nótese la gran carga de epífitos. **B.** Gametofito, células corticales de sección poligonales (flechas negras) y otras irregularmente poligonales (flechas blancas) más separadas entre sí. **C - E.** Tetrasporofito. **C.** Células corticales poligonales (flechas negras) y otras irregularmente poligonales (flechas blancas) con una disposición más estrecha entre sí. **D y E.** Rosetas sobre la superficie del talo (flecha), mostrando una célula cortical interna de mayor tamaño en el centro (cabeza de flecha) en **D**. **Barras escala: B, C y E= 25 µm; D = 50 µm; A= 100 µm. MEB: A. MO: B, C, D y E.**



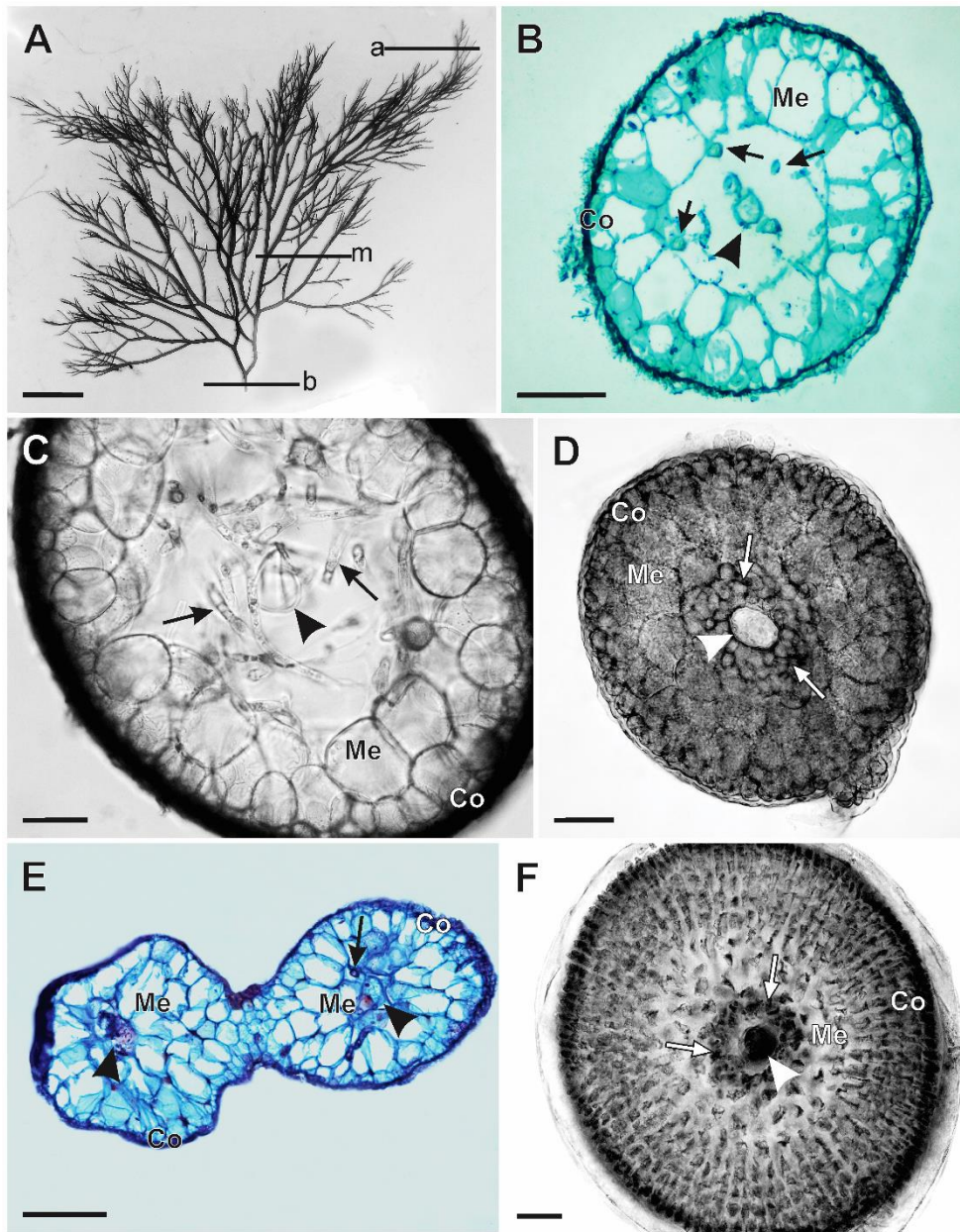


**Figura 13. *Meridionella obtusangula*.** **A.** Célula apical ovoide (flecha) y células subapicales ligeramente desplazadas (cabezas de flechas). **B.** Corte longitudinal del talo mostrando el filamento axial (flecha) con *pit-connections* entre células axiales y periaxiales (cabezas de flecha). **C.** *Pit-connections* (cabeza de flecha), entre células axiales (CA) y células periaxiales (CP) y entre células periaxiales y filamentos rizoidales (FR). **D.** *Pit-connections* (cabezas de flecha), entre filamentos rizoidales (FR) y células medulares (Me) y entre células periaxiales (CP) y filamentos rizoidales, detalle de núcleos (flechas negras) (*Tinción Azul de Anilina*). *Barras escala: A y B = 25 μm; C y D = 50 μm. MO: A, B, C y D.*

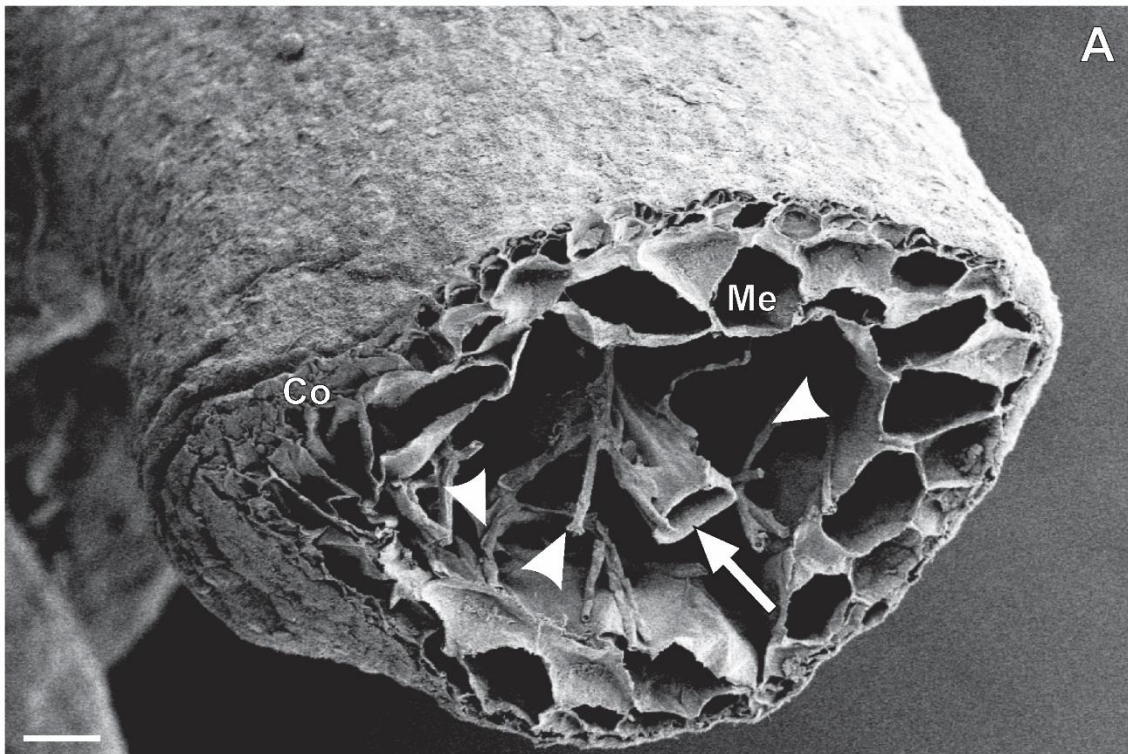


**Figura 14. *Meridionella obtusangula*. Cortes longitudinales del talo. A.** Región apical del talo, evidenciando el filamento axial (flecha). **B.** Región medio-apical mostrando el filamento axial (flecha) y células periaxiales (CP). **C.** Región medio-basal del talo con filamentos rizoidales (flechas). **D.** Región basal del talo, obsérvese los filamentos rizoidales (flechas). *Barras escalas:* A = 10  $\mu$ m B, C y D = 100  $\mu$ m. MO: A, B, C y D.





**Figura 15. *Meridionella obtusangula*. Cortes transversales del talo. A.** Distribución de los cortes, a: apical; m: media; b: basal. **B.** Sección apical: corteza (Co) constituida por una a dos capas de células; médula (Me) de células grandes y pocos filamentos rizoidales (flechas) alrededor del eje (cabeza de flecha) (*Tinción Fast-green*). **C.** y **D.** Sección media: corteza (Co) con mayor número de capas de células; médula con células grandes (Me) y filamentos rizoidales abundantes (flechas) alrededor del eje (cabeza de flecha). **E.** Corte a nivel de ramificación: corteza (Co) de pocas capas de células; médula (Me) con células (Me) grandes, algunos filamentos rizoidales (flecha) alrededor del eje (cabezas de flechas) (*Tinción Azul de metileno*). **F.** Sección basal: corteza (Co) constituida por 5 a 8 capas de células; médula (Me) con células más pequeñas y compactas entre sí y filamentos rizoidales (flechas) formando haces alrededor del eje (cabeza de flecha). *Barras escalas: A = 1 cm; C, D y E = 50 µm; B y F = 100 µm.*



**Figura 16. *Meridionella obtusangula* (MEB).** A. Corte transversal del talo, obsérvese el filamento axial (flecha), filamentos rizoidales (cabezas de flecha), capas de células medulares (Me) y capas de células corticales (Co). *Barra escala: A = 20  $\mu$ m.*

### 4.3.2. Morfología reproductiva

*M. obtusangula* presentó talos tetraspóricos y gametofíticos isomórficos. Los tetrasporofitos presentaron una longitud media de 12 ( $\pm$  2,91) cm (Fig. 9) con tetrasporangios dispersos sub-superficialmente en las ramas laterales (Fig. 18 A - D). Los mismos, se originaron a partir de células corticales internas (Fig. 18 E y F) y protruyeron a la superficie por orificios constituidos en la corteza por estructuras denominadas rosetas. Los tetrasporangios fueron zonados, ovoides, de 80-100  $\mu$ m de longitud y 60 - 80  $\mu$ m de ancho (Fig. 18). Las tetrásporas presentaron un diámetro de 23,66 ( $\pm$  1,7)  $\mu$ m. Se observaron esporangios con polisporas (Fig. 18 G y H).

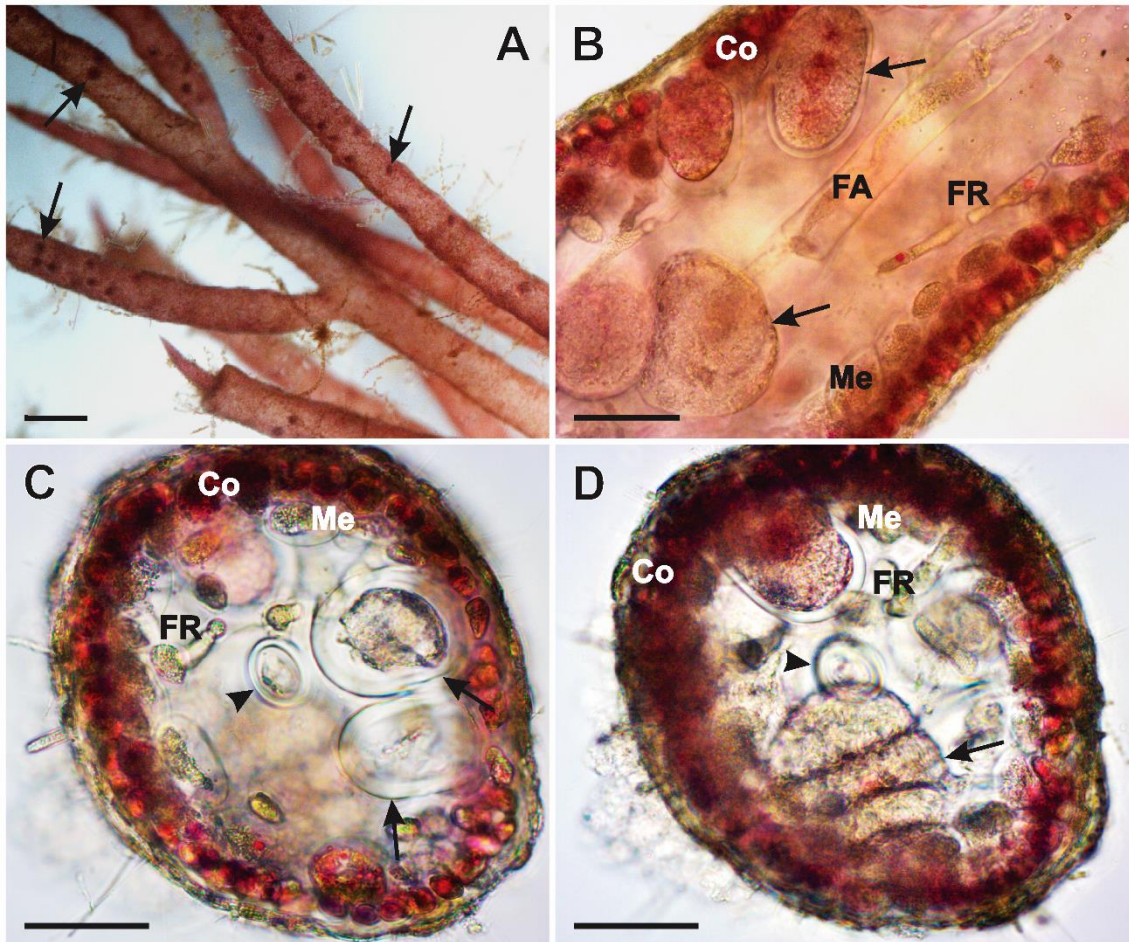
Los gametofitos femeninos tuvieron una longitud media de 9 ( $\pm$  2,84) cm (Fig. 9 B y C). Los cistocarpos presentaron ostiolas evidentes, se dispusieron de manera solitaria o en grupos pequeños de hasta tres. Los mismos se ubicaron lateralmente sobre las ramas cortas, en la cuales fue evidente una fuerte protrusión. Los cistocarpos presentaron un pericarpio grueso a través del cual fueron visibles las masas de carposporangios fuertemente pigmentadas (Fig. 19).

Las ramas carpogoniales se originaron de las células corticales internas y corrieron paralelas a la superficie del eje axial, con sentido hacia el ápice (Fig. 20 A y B). Éstas fueron procárpicas; la célula auxiliar fue hija de la célula de soporte, próxima a la rama carpogonial. La célula de soporte estuvo constituida por una célula intercalar situada dos o tres capas celulares debajo de la superficie (Fig. 20 C). Las ramas carpogoniales estuvieron formadas por cuatro células, tres células provenientes de la rama carpogonial y un carpogonio (Fig. 20 C y D). El carpogonio fue ligeramente triangular y sostuvo una tricógina

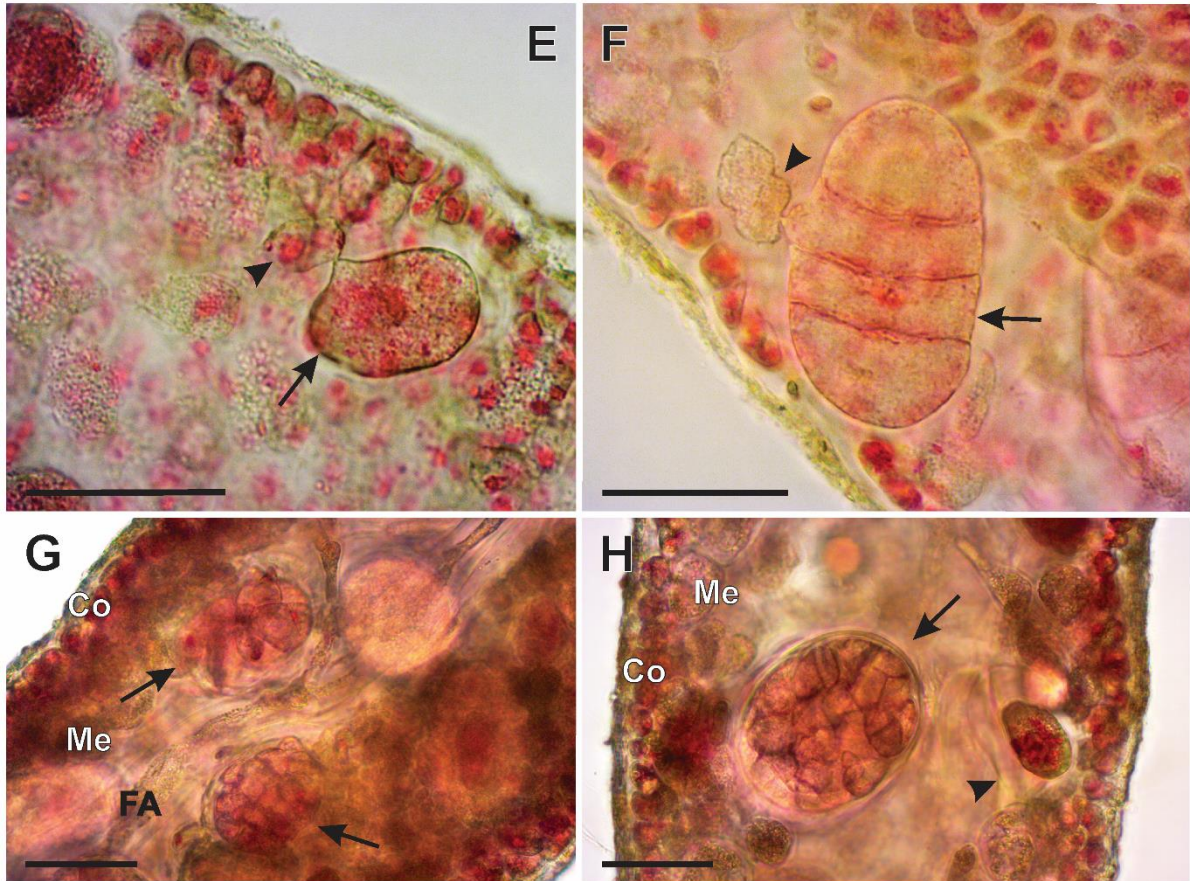
alargada y retorcida que penetró en las 2 ó 3 capas de la corteza emergiendo hacia el exterior sobre la superficie de los talos. Asimismo, el carpogonio estuvo adyacente a la célula auxiliar y la tricógina se extendió parcialmente a su alrededor (Fig. 20 C y D). La primera y segunda célula de la rama carpogonial fueron ovoides, siendo esta última más grande. Las células de la rama carpogonial fueron uninucleadas antes de la fertilización (Fig. 20 C). El desarrollo del complejo de células auxiliares se evidenció asociado con las células corticales internas a partir de los cuales se originan los filamentos nutritivos (Fig. 21 A y B). El inicio de la formación del cistocarpo fue registrado a partir de la observación de la célula de fusión que sostuvo los gonimoblastos a partir de los cuales, los filamentos irradiados se fusionaron con las células corticales (Fig. 21 C).

Los carposporangios maduros tuvieron circunferencia ovoide, presentaron un diámetro de  $35,56 (\pm 2,5) \mu\text{m}$ , carecieron de tejido filamentoso circundante, pero estuvieron cubiertos por una capa hialina (Fig. 21 D). Cada filamento gonimoblástico sostuvo una cadena de carposporangios (Fig. 21 E) que se irradiaron desde el centro, entremezcladas con filamentos gametofíticos secundarios de células cortas que no llegaron a rodear al cistocarpo (Fig. 21 F). Las carpósporas fueron redondeadas a ovaladas con apariencia granular, midiendo un diámetro  $26,8 (\pm 1,1) \mu\text{m}$ .



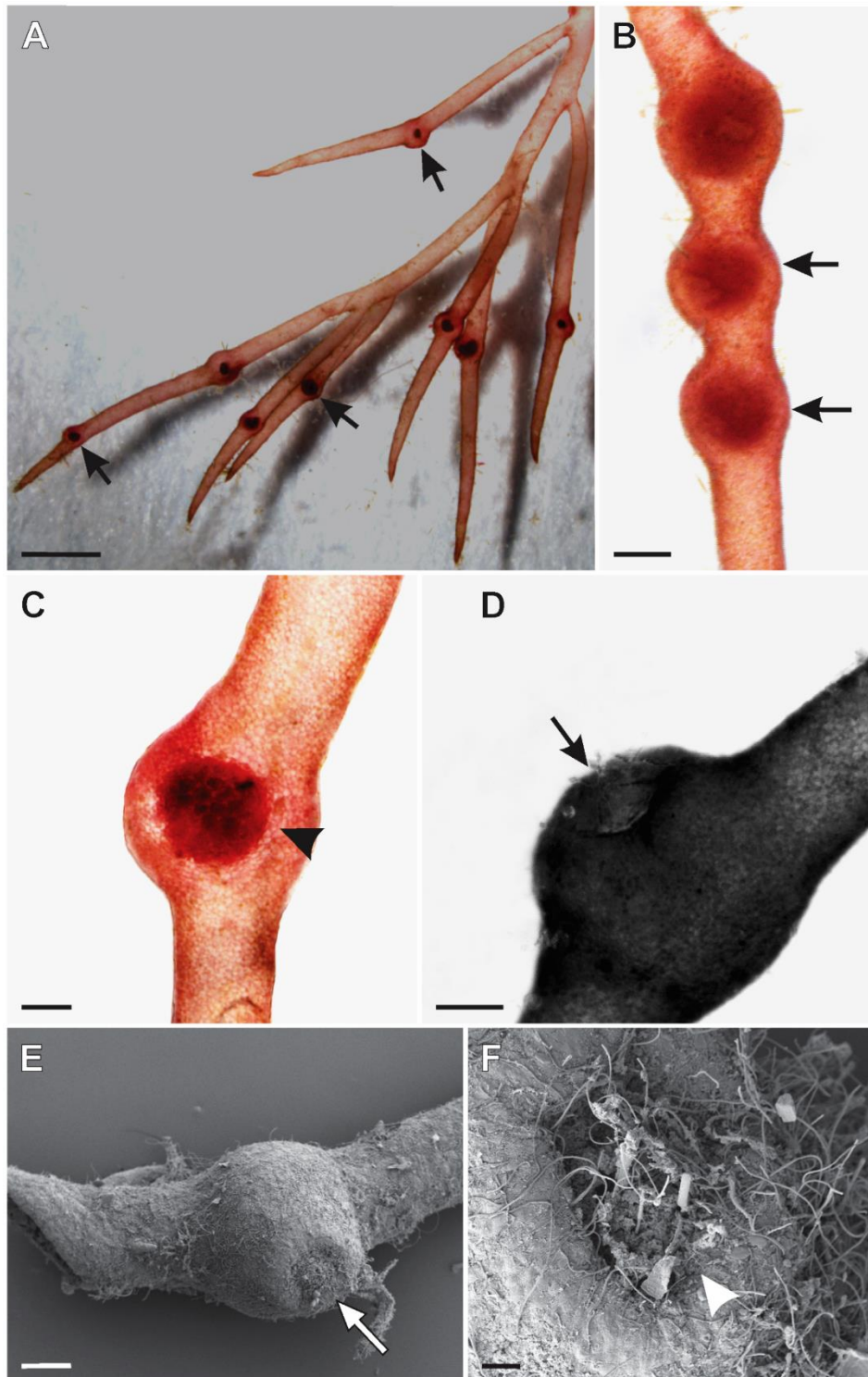


**Figura 18. *Meridionella obtusangula*. Talo tetraspórico. A.** Aspecto general con tetrasporangios dispersos en las ramas (flechas). **B.** Corte longitudinal mostrando tetrasporangios inmaduros (flechas) entre las células corticales, filamento axial (FA) y filamentos rizoidales (FR). **C y D.** Cortes transversales de rama con tetrasporangios maduros e inmaduros (flechas) sobre la capa cortical (Co), rodeando al filamento axial (cabeza de flecha).

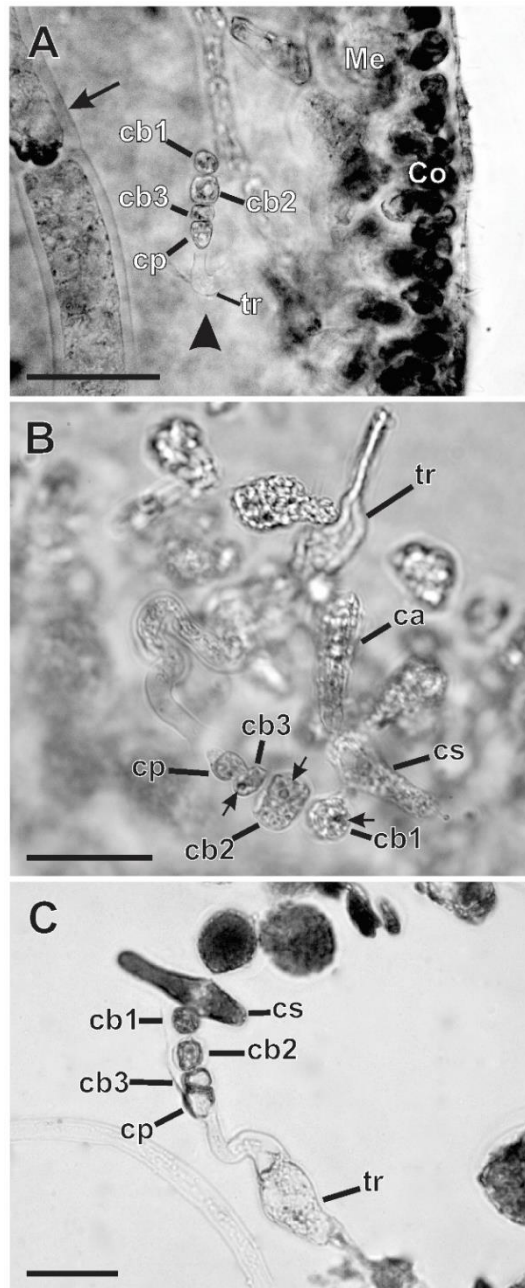


**Figura 18. *Meridionella obtusangula*. Talo tetraspórico. (continuación).** **E.** Corte longitudinal mostrando detalle de *pit-connection* entre célula cortical (cabeza de flecha) y célula madre de un tetrasporangio (flecha). **F.** Corte longitudinal mostrando *pit-connection* entre célula cortical (cabeza de flecha) y tetrasporangio maduro (flecha). **G y H.** Esporangios portando polisporas (flechas), dispuestos entre células corticales (Co), nótese una célula madre de un tetrasporangio (cabeza de flecha). Co: capa cortical; Me: capa medular, FR: filamentos rizoidales, FA: filamento axial. *Barra escala:* **B, C, D, E, F, G y H** = 50  $\mu$ m; **A** = 0,5 mm. *Lupa:* **A.** *MO:* **B, C, D, E, F, G y H.**

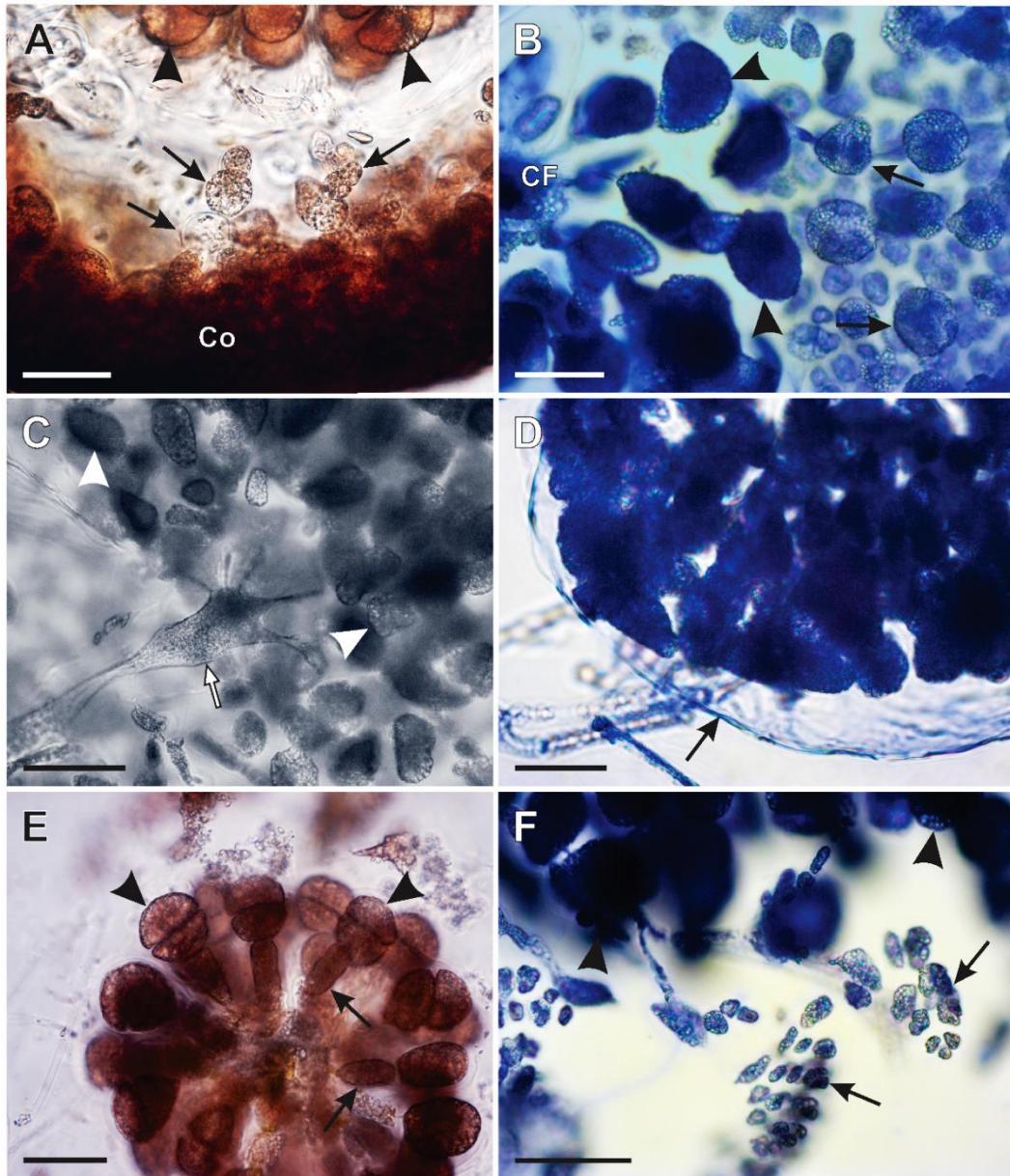




**Figura 19. *Meridionella obtusangula*. Talo cistocárpicos. A.** Aspecto general con cistocarpos haciendo protrusión sobre las ramas (flechas). **B.** Cistocarpos en hilera. **C.** Cistocarpo solitario, nótese la masa de carpósporas de coloración más oscura (cabeza de flecha). **D.** Cistocarpo con ostiolo (flecha). **E.** Cistocarpo y su ostiolo (flecha) bajo MEB. **F.** Detalle de ostiolo (flecha). *Barras escala:* F = 20  $\mu$ m, C, D y E = 100  $\mu$ m; B = 200  $\mu$ m, A = 1 mm. *Lupa:* A. MO: B, C, D. MEB: E y F.



**Figura 20. *Meridionella obtusangula*. Rama carpogonial. A.** Estructura interna de una rama observándose la capa de células corticales (Co), capa de células medulares (Me) y disposición de la rama carpogonial (cabeza de flecha) paralela al eje del talo (flecha). **B.** Corte longitudinal detallando la rama carpogonial, célula de soporte y célula auxiliar, nótese la tricógina emergiendo hacia el exterior y células uninucleadas de la rama (flechas) (*Tinción Hematoxilina de Wittmann*). **C.** Detalle de una rama carpogonial producto de un *squash*. cs: célula de soporte; ca: célula auxiliar; tr: tricógina; cp: carpogonio; cb1, cb2, cb3: células de la rama carpogonial. *Barras escalas: B y C = 25 μm; A = 50 μm. MO: A, B y C.*



**Figura 21. *Meridionella obtusangula*. Estructuras reproductivas. A y B.** Complejo de células auxiliares. **A.** Cistocarpo en corte transversal. Obsérvense células del complejo auxiliar (flechas) asociado a las células de la corteza interna (Co) y parte de los carposporangios (cabezas de flecha). **B.** Detalle de células del cistocarpo, nótese parte de la célula de fusión (CF), rodeada por los carposporangios (cabezas de flecha) y el complejo de células auxiliares (flechas). **C.** Detalle de la célula de fusión (flecha) y de los carposporangios (cabezas de flecha). **D.** Detalle de la envoltura hialina (flecha) rodeando a un cistocarpo maduro. **E.** Filamentos gonimoblásticos (flechas) sosteniendo en forma de cadena a los carposporangios (cabezas de flecha). **F.** Filamentos gametofíticos secundarios (flechas) entre los carposporangios (cabezas de flecha). *Barras escalas: C y F= 25  $\mu$ m; A, B, D y E = 50  $\mu$ m. Tinción azul de anilina.*



## 5. Discusión

En 2013 observaciones realizadas por el mismo grupo de trabajo realizaron las primeras colecciones de un alga roja filamentosa en pozas de marea en el Golfo de San Matías. Las observaciones iniciales mostraron que esos talos presentaban gran similitud con los identificados como *Rhabdonia coccinea* (Harvey) Harvey. La morfología de los talos vegetativos y tetrasporofíticos fué semejante a los talos descritos por Min-Thein & Womersley (1976) y Womersley (1994) presentando crecimiento uniaxial, talo no segmentado, médula rizoidal formada por filamentos entremezclados, una única célula periaxial originada por la célula axial, tetrasporangios zonados y dispersos en las ramas. Además, otros ejemplares localizados sobre el Golfo San Jorge en la Patagonia argentina anteriormente habían sido identificados basándose en la descripción de *R. coccinea* (Boraso 2013). No obstante, sucesivas y precisas observaciones de los caracteres reproductivos femeninos y los análisis moleculares realizados durante el desarrollo de esta tesis, permitieron demostrar que los especímenes presentes en la costa del Golfo San Matías no corresponden a la especie *R. coccinea*.

Los especímenes colectados para esta tesis se incluyeron en la familia Cystocloniaceae, a partir de la información procedente de secuenciación y comparación con ejemplares de colecciones identificados como *Cystoclonium obtusangulum* de las Islas Malvinas, Chile y Antártida. La ubicación de esta especie dentro del género *Cystoclonium* fue cuestionada en diversos trabajos (Hooker & Harvey 1845, Hooker 1847, Kützing 1849, Fredericq *et al.* 1992, Hommersand *et al.* 2009). Sin embargo, con el respaldo de datos moleculares y descripciones morfológicas exhaustivas se concluyó que se trató de un nuevo

género de la familia Cystocloniaceae: *Meridionella nov. gen.* que dio como resultado una nueva combinación *Meridionella obtusangula comb. nov.* (Tonicelli *et al.* 2021).

Los ejemplares considerados en esta tesis exhibieron la mayoría de los caracteres diagnósticos de la familia Cystocloniaceae descritos por Kylin (1932) y Womersley (1994). Entre ellos se destacan: 1) talos uniaxiales con el filamento axial desarrollado a partir de una célula apical prominente y rodeado de una corteza bien desarrollada; 2) filamento axial en ocasiones imperceptible; 3) talos sexuales dioicos, monocarpogoniales y procárpicos con célula auxiliar la cual origina un único gonimoblasto inicial; 4) ramas carpogoniales dirigidas lateralmente; con 3 ó 4 células y tricógina dirigida hacia el exterior; 4) carposporofitos con una gran célula de fusión o varias células centrales, con filamentos gonimoblásticos radiantes que terminan en cadenas de carposporangios; 5) normalmente ausencia de tejido filamentoso envolvente a los carposporangios; 6) cistocarpos inmersos o salientes, generalmente sin ostiolas y 7) tetrasporangios divididos zonalmente.

Los métodos histológicos empleados permitieron observar y describir minuciosamente los caracteres relacionados con el desarrollo reproductivo femenino en los ejemplares examinados. A partir de estas observaciones, se puede asumir que luego de la diploidización, se produce una gran célula de fusión con cadenas cortas ramificadas radialmente de carposporangios, cada una de las cuales presenta un tallo de fusión basal que se conecta a uno de los filamentos axiales. Este carácter también se ha observado en especies de *Acanthococcus* J.D. Hooker & Harvey, *Austroclonium* Min-Thein & Womersley y *Cystoclonium* (Kylin 1923, Min-Thein & Womersley 1976, Fredericq *et al.* 1992,

Thrainsson & Hommersand 2012). Además, los filamentos gametofíticos secundarios que se encontraron en los especímenes estudiados fueron también un carácter compartido con otros miembros de las *Cystocloniaceae* (Hommersand & Fredericq 1990).

Como se mencionó anteriormente, *M. obtusangula* fue identificada previamente como *Cystoclonium obtusangulum* (Hooker & Harvey 1845, Kützing 1849), al compartir varios caracteres con la especie tipo del género *Cystoclonium*: *C. purpureum*. Entre ellos se pueden mencionar un talo terete, ramas con puntas atenuadas, cistocarpos que sobresalen de ramas cortas, la presencia de un núcleo denso de filamentos rizoidales dentro de la médula en las partes más antiguas del talo y la presencia de filamentos gametofíticos secundarios de células cortas entre los filamentos de gonimoblastos (Kylin 1923, Thrainsson & Hommersand 2012). Sin embargo, *C. purpureum* difiere de *M. obtusangula* en las siguientes características: presencia de 1) células axiales que originan dos células periaxiales, 2) células axiales sin *pit-connections* secundarias con células medulares y corticales, 3) de un filamento lateral que se apoya en la rama carpogonial, 4) cistocarpos no ostiolados y 5) ausencia de rosetas (Kylin 1923, Thrainsson & Hommersand 2012).

Asimismo, Fredericq *et al.* (1992) trataron a *C. obtusangulum* como un sinónimo de *Acanthococcus antarcticus* basándose en la morfología vegetativa compartida, pero los análisis posteriores de la morfología reproductiva desarrollados durante esta tesis han revelado claras diferencias (Tonicelli *et al.* 2021). *A. antarcticus* presenta ramas carpogoniales de tres células con las células de la rama carpogonial proximal y la célula hipógina en particular mucho más grande que el carpogonio (Fredericq *et al.* 1992). En cambio, *M.*



*obtusangula* presenta ramas carpogoniales de cuatro células y mientras que la primera y segunda células de la rama carpogonial son algo más grandes que el carpogonio, la célula hipógina es similar al carpogonio en tamaño. Sumado a ello, *A. antarcticus* produce filamentos nutritivos secundarios en estadios de pos fecundación (Fredericq *et al.* 1992), los cuales no se han observado en *M. obtusangula*. Además, los cistocarpos de *A. antarcticus* se caracterizan por la presencia de brotes espinosos sobre los cistocarpos (Hooker 1847, Fredericq *et al.* 1992), no siendo estos últimos observados en *M. obtusangula*.

Los talos identificados como *M. obtusangula* en esta tesis responden a la especie tipo del género *Meridionella*. La especie exhibe una combinación única de caracteres morfológicos que hacen diferir al género *Meridionella* de cualquier otro género agrupadas en las Cystocloniaceae, proporcionando una justificación adicional para su segregación (Hansen 1980, Schneider 1988, Fredericq *et al.* 1992, Womersley 1994, Díaz-Tapia *et al.* 2013, Soares *et al.* 2019, Tonicelli *et al.* 2021). Los caracteres morfológicos son: talos arborescentes con ejes terete, presencia de células corticales que a veces forman rosetas, médula rizoidal, ramas carpogoniales de 4 células, desarrollo de una célula de fusión central, carposporangios en cadenas, cistocarpos con ostiolos prominentes situados en ramas cortas y tetrasporangios dispersos en ramas laterales. Además, una característica notable de *M. obtusangula* fue la marcada variación de la construcción interna de la corteza y médula, desde las partes más viejas a las más jóvenes del talo. En los ejes y ramas más jóvenes, la estructura interna se evidenció ligeramente suelta, formada por unos pocos filamentos rizoidales y rodeada por una corteza delgada, mientras que en las partes más viejas del talo las capas corticales fueron numerosas y los filamentos rizoidales formaban un

núcleo denso alrededor del eje central. Este carácter también se observó en *A. antarcticus* y *C. purpureum* (Fredericq *et al.* 1992, Thrainsson & Hommersand 2012), pero no se ha destacado para otros géneros de Cystocloniaceae. Por otro lado, la característica que cada célula axial origina una sola célula periaxial observado en *M. obtusangula*, se encontró citado también en especies de los otros géneros como *Rhabdonia*, *Areschougia* y *Melanema* de las familias *Solieriaceae* y *Areschougiaceae* (Min-Thein & Womersley 1976) y en una especie de Cystocloniaceae, *A. antarcticus* (Fredericq *et al.* 1992).

Varios miembros de las Cystocloniaceae presentan una corteza discontinua debido a la presencia de rosetas en la superficie del talo (Min-Thein & Womersley 1976, Hansen 1980, Díaz-Tapia *et al.* 2013). En los especímenes estudiados de *M. obtusangula* estas estructuras fueron observadas, aunque muy escasamente. Estas estructuras representaron zonas de la corteza donde las células corticales externas estuvieron dispuestas alrededor de células corticales más grandes. Las rosetas han sido relacionadas con la formación de estructuras reproductivas, en los talos tetrasporofíticos aparecieron rodeando la abertura a través de la cual se liberan los tetrasporangios y en los talos masculinos estuvieron involucradas en la formación de espermatangios (Min-Thein & Womersley 1976, Hansen 1980).

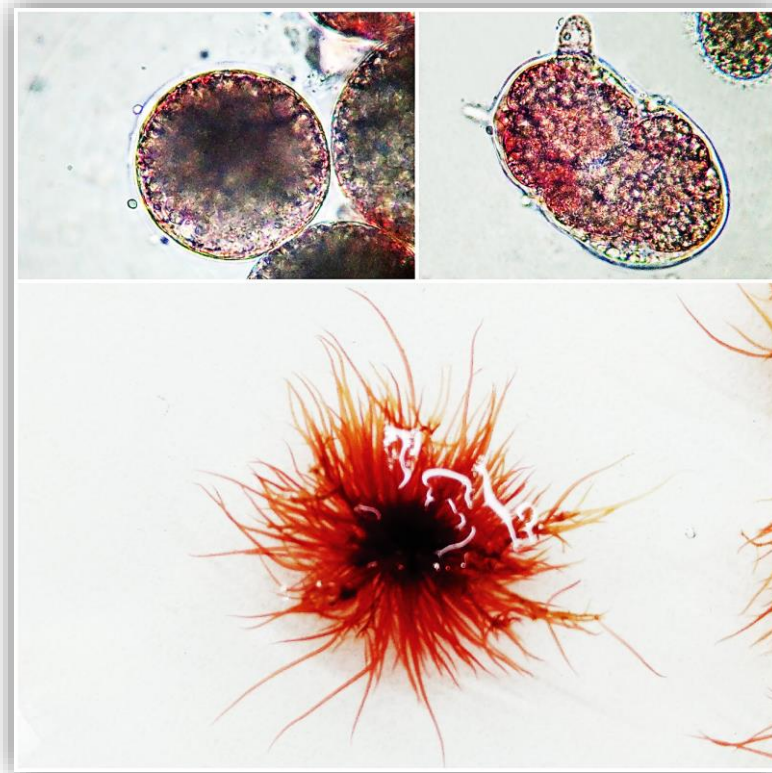
Por otra parte, como bien se mencionó, los talos de *M. obtusangula* son procárpicos donde la célula auxiliar se desarrolla cerca de la rama carpogonial. Este carácter distingue a las especies de *M. obtusangula* de los géneros no procárpicos de las familias *Areschougiaceae* y *Solieriaceae* (Min-Thein & Womersley 1976).

La ausencia de un ostiolo es un carácter de la familia Cystocloniaceae (Kylin 1932), como se mencionó anteriormente *M. obtusangula* presenta un ostiolo prominente al igual que otros miembros de la familia de los géneros *Austroclonium*, *Calliblepharis*, *Rhodophyllis*, *Stictosporum* y *Hypnea* (Díaz-Tapia *et al.* 2013). Otro carácter particular de la estructura reproductiva femenina de *M. obtusangula* es que presencia de la rama carpogonial constituida por cuatro células en lugar de tres células como en la mayoría de las especies de los géneros de Cystocloniaceae, siendo este rasgo compartido con las especies de *Craspedocarpus* y *Rhodophyllis* (Min Thein & Womersley 1976).

Se puede concluir que *M. obtusangula* es una especie con caracteres compartidos por otros miembros de la familia Cystocloniaceae, pero sin embargo presenta diferencias morfológicas y los resultados moleculares la enmarcan dentro de este nuevo género de la familia como una nueva combinación.

## CAPÍTULO III

### CICLO DE VIDA DE *MERIDIONELLA OBTUSANGULA*



## 1. Introducción

Las algas rojas pertenecientes a la Clase Florideophyceae presentan un ciclo de vida característico triplobionte haplodiplonte, en el cual se desarrollan tres generaciones: gametofítica, tetrasporofítica y carposporofítica, siendo de vida libre las dos primeras. En estos ciclos de vida, una de las etapas diploides comienza por la fusión de gametos haploides en la superficie del gametofito femenino, originando el carposporofito, el cual es de vida corta. El carposporofito se desarrolla unido al gametofito femenino del cual adquiere nutrientes y genera rápidamente una masa de esporas diploides, las carpósporas. Éstas se liberan en la columna de agua, se adhieren a un sustrato y germinan desarrollando nuevos tetrasporofitos de vida libre. Los tetrasporofitos cuando maduran, producen tetrásporas haploides a través de meiosis, las cuales se liberan en la columna de agua, se adhieren al sustrato y al germinar y desarrollarse, se convierten en gametófitos haploides masculinos o femeninos (Hawkes 1990, Scagel *et al.* 1991, Kamiya & Kawai 2002, Thornber 2006, Lee 2008).

El ciclo de vida de las algas rojas ha sido intensamente estudiado no sólo para el conocimiento de las especies y determinar relaciones filogenéticas entre los grupos (Kapraun *et al.* 1992, Kapraun & Nguyen 1994, Kapraun & Dunwoody 2002, Martin Martin *et al.* 2016), sino para establecer metodologías de cultivo que permitan la obtención de las plántulas en condiciones controladas. Podemos citar como ejemplo, a las macroalgas rojas de importancia comercial dada la presencia de bioproductos, como es el caso de *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, LM. Irvine & Farnham, *Sarcopeltis skottsbergii*, *Sarcothalia crispata*

(Bory) Leister., *Gelidium* sp. y *Pyropia columbina* (Montagne) WA. Nelson, entre otras (Avila *et al.* 1999 a, b, Cardoso *et al.* 2014, Norouzi *et al.* 2017, Ajjabi *et al.* 2018, Okolie *et al.* 2018, Morais *et al.* 2021). Precisamente, especies del orden Gigartinales, que se explotan comercialmente en todo el mundo, han sido objeto de interés tanto su biología como su cultivo (Prajapati *et al.* 2014, Baweja *et al.* 2019). La importancia de encontrar alternativas sostenibles para hacer frente a la creciente demanda industrial de biomasa de algas de alta calidad mediante el cultivo, permite la protección ante una sobreexplotación de las praderas naturales (Robaina Romero *et al.* 2008, Charrier *et al.* 2017).

Es bien sabido que la diversidad de métodos de cultivo de macroalgas marinas es muy amplia y los requerimientos dependen en gran medida de las especies a cultivar y de los objetivos del cultivo (Croce 2013). En muchas especies de algas rojas que presentan ciclos isomórficos, como es el caso de *Euclima sp.*, *Kappaphycus alvarezii* y *Gracilaria* spp. los cultivos son principalmente clonales (Oliveira *et al.* 2000, Hayashi *et al.* 2007, FAO 2016). Sin embargo, estas técnicas enfrentan diversas consecuencias como el requerimiento de grandes cantidades de material de propagación para iniciar los cultivos masivos, aumento de la susceptibilidad a las enfermedades, envejecimiento de los lotes de siembra y finalmente pérdida de productividad después de muchos ciclos productivos (Alveal *et al.* 1995, Glenn *et al.* 1996, Nelson & Glenn 2000, Oliveira *et al.* 2000, Titlyanov & Titlyanova 2006, Buschmann *et al.* 2017, Charrier *et al.* 2017, Massad *et al.* 2020). Esto lleva a repensar que el cultivo iniciado a partir de esporas tiene ventajas comparativas sobre las estrategias clonales (Massad *et al.* 2020).

La ausencia de flagelos en las algas rojas, limita la distancia de dispersión y el establecimiento exitoso de nuevas poblaciones, esto conlleva al estudio de las

fases tempranas de asentamiento, germinación y pos-supervivencia, por lo tanto, las fases de establecimiento de las algas deben ser identificadas en instancias de laboratorio para su posterior cultivo en mar abierto, para un exitoso cultivo de la especie (Vadas *et al.* 1992, Bobadilla & Santelices 2005, Westermeier *et al.* 2012, Redmond *et al.* 2019). Asimismo, se sabe que las primeras etapas del alga están controladas por diferentes factores tanto abióticos como temperatura del agua de mar, radiación y concentraciones de nutrientes, como propios de la especie, relativos a la edad del individuo/tiempo de incubación, requisitos específicos de germinación, etc. (Vadas *et al.* 1992, Gupta *et al.* 2011), los cuales son trasladables al entendimiento de la dinámica de las poblaciones naturales (Bellgrove *et al.* 2017).

La familia Cystocloniaceae se caracteriza presentar un ciclo de vida triplobionte haplo-diploide típico de las algas rojas, incluyendo dos estados de vida libre, el tetrasporofito (diploide) y el gametofito (haploide) con formas de dispersión, esporas y gametos, respectivamente (Geraldino *et al.* 2006, Thrainsson & Hommersand 2012, Díaz-Tapia *et al.* 2013). Asimismo, es característico de la familia, que ambos tipos de talo; tetrasporofito y gametofito sean isomórficos, con poca diferenciación de las dos fases (Kylin 1932, Kützinger 1843, Valero *et al.* 1992, Thrainsson & Hommersand 2012). Miembros de esta familia han sido estudiado en cultivo, no sólo para esclarecer aspectos sobre sus ciclos de vida sino con el objetivo de optimizar las condiciones *in vitro*, de aquellas especies que presentan cierto interés para su explotación (Farahpour *et al.* 2010, Vázquez-Delfín *et al.* 2016, Nauer *et al.* 2019 a,b).

Los estudios en *M. obtusangula* sobre estos aspectos son nulos, por lo tanto, el entendimiento de las condiciones óptimas para su cultivo en sus primeras

etapas, así como la determinación de su ciclo de vida proporcionarían información que permita un mejor conocimiento de la especie.

## **2. Objetivos**

- Analizar el ciclo de vida bajo condiciones de cultivo, integrando aspectos morfológicos de cada fase y niveles de ploidía.
- Establecer condiciones abióticas adecuadas para la optimización de la liberación de carpósporas y tetrásporas, su germinación, crecimiento y supervivencia de los estadios tempranos de los talos tetrasporofíticos y gametofíticos de *M. obtusangula*.



### **3. Materiales y Métodos**

Todos los cultivos se llevaron a cabo en una cámara de cultivo con fotoperiodo y temperatura controlados.

Los ejemplares seleccionados fueron lavados con agua de mar y pasados por unos segundos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% (en agua destilada) y posteriormente enjuagados con agua de mar filtrada para la reducción de la carga epifitaria.

#### **3.1. Ciclo de vida**

##### **3.1.1. Cultivo a partir de esporas**

Se seleccionaron talos cistocárpicos y tetraspóricos fértiles, en los cuales se realizaron secciones de 1 cm de largo en los filamentos con tetrasporangios o con cistocarpos, a partir de los cuales se indujo la liberación de esporas para su seguimiento. Los recipientes de vidrio o polipropileno utilizados para cultivo fueron previamente lavados con detergente no iónico Noión Wiener lab® y esterilizados en una cámara con luz UV por el periodo de 20 minutos (Hamilton 1980). Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones controladas con un régimen de fotoperiodo 12:12 a temperatura de 12°C con el agregado de medio de enriquecimiento PES en una concentración de 20 ml.l<sup>-1</sup>, el medio de cultivo fue renovado semanalmente. Para una primera etapa de esporulación y germinación de las esporas, se utilizaron placas multiceldas. Para una segunda etapa, de crecimiento de las plántulas, fueron utilizados frascos de vidrios equipados con un sistema de aireación constante.

Para determinar y documentar el proceso de germinación de carpósporas y tetrásporas, se realizó un seguimiento periódico utilizando MO.

### **3.1.2. Análisis del nivel de ploidía**

Se llevaron a cabo análisis de espectrofotometría para estimar el tamaño nuclear para cada fase del ciclo de vida y se analizó el nivel de ploidía mediante la cuantificación del ADN nuclear siguiendo los protocolos de Kapraun & Nguyen (1994).

Para este estudio, se seleccionaron muestras recolectadas en el ambiente natural y provenientes de cultivos, en diferentes estadios reproductivos. Las mismas fueron fijadas con solución Carnoy (punto 2.2.1., *Capítulo 1*) y posteriormente en alcohol 70% y luego fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de su análisis (Kapraun *et al.* 1992).

Las muestras fijadas, se lavaron con agua destilada, luego se aplicó un tratamiento con EDTA al 5% durante 24 horas, cuya función fue ablandar los tejidos y permitir la separación de las células para facilitar la penetración del fluorocromo (Goff & Coleman 1990). Transcurrido ese tiempo se realizó un *squash* del material sobre cubreobjetos usando el fluorocromo de base acuosa DAPI 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (4',6 diamino-2-fenilindol) durante 30 minutos, según los protocolos propuestos por Goff & Coleman (1990) y Kapraun & Nguyen (1994). Luego, se procedió a retirar el fluorocromo con ayuda de una pipeta de vidrio y montar el material sobre portaobjetos. En los casos que fue requerido en el proceso de montaje, se añadió una gota de DAPI para eliminar posibles burbujas de aire. Las muestras fueron observadas inmediatamente.

Las dimensiones nucleares y el número de núcleos se determinaron por medio de análisis de imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia. Se utilizó como sistema de procesamiento de imágenes al software *ImageJ* 1.46v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Las fotomicrografías fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400 (Tokio, Japón) equipado con una cámara Nikon FDX 35. Siguiendo el trabajo de Kapraun & Nguyen (1994), se utilizaron las siguientes ecuaciones para el cálculo de los volúmenes nucleares (VN):

$$VN = \frac{\pi d^3}{6}, \text{ donde } d = \frac{\text{ancho} + \text{largo} + \text{alto}}{3},$$

$$\text{y } \text{alto} = 0,3 \times \text{largo} \text{ (Kapraun et al. 1988)}$$

El contenido de ADN (pg) se calculó a partir de las estimaciones de VN:

$$\text{Tamaño del genoma} = \frac{VN}{15 \mu\text{m}^3} \times 1 \text{ pg}$$

El “tamaño del genoma” se define como el contenido de ADN que tiene un juego haploide de cromosomas de una especie (Bennett 1998). Por otro lado, se introduce aquí el término “Valor C”, éste se define como el contenido de ADN de un gameto no replicado (Swift, 1950) en donde este valor se entiende como constante (por eso se define como “C”), ya que esta cantidad de ADN sería independiente del nivel de ploidía del individuo. El valor “C”, permite separar las distintas generaciones de una misma especie, o situar el lugar exacto de la meiosis de una especie con ciclo desconocido, o bien describir para una especie el modelo nuclear de crecimiento según los niveles de ploidía dentro de un mismo individuo (Salvador Soler et al. 2009). En este estudio, se ha utilizado

para estimar el nivel de ploidía de la fase de interés de *M. obtusangula* y contrastarlos con valores registrados para las especies del orden Gigartinales disponibles en el banco de datos Kew Royal Botanic Garden (<https://cvalues.science.kew.org/>), según lo recomendado por Martín Martín (2014).

### **3.2. Optimización de las condiciones de cultivo de las distintas fases del ciclo de vida**

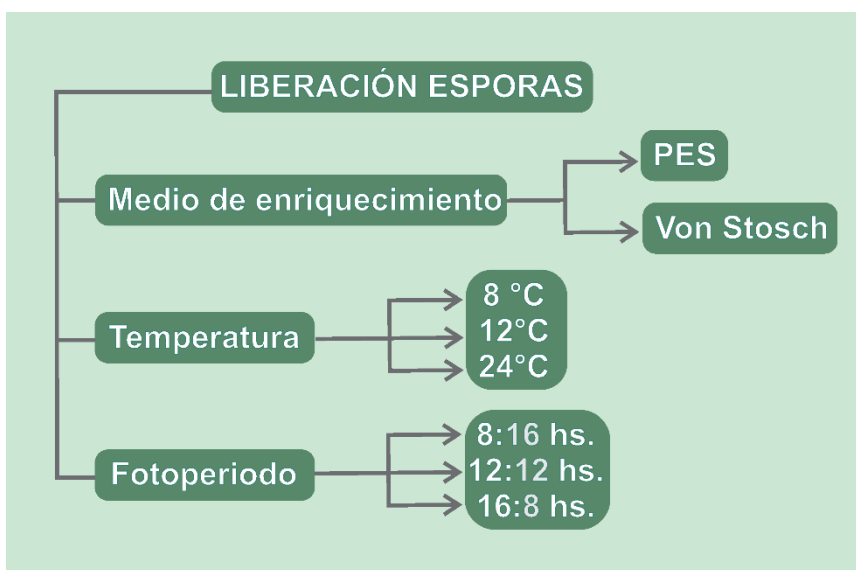
#### **Acondicionamiento del material de uso**

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando placas multiceldas, las cuales fueron lavadas con detergente no iónico Noión Wiener lab® para eliminar la materia orgánica adherida a las mismas y enjuagadas con agua destilada. La esterilización se realizó primeramente con alcohol 70% y posteriormente se colocaron en una cámara con luz UV durante 1 h (Hamilton 1980). Asimismo, por cada celda se colocó un cubreobjetos de Melinex previamente esterilizado con UV (tiempo estimado de 20 minutos).

#### **3.2.1. Liberación de carpósporas y tetrásporas**

Para evaluar distintos factores que podrían afectar a la liberación de carpósporas y tetrásporas, se iniciaron ensayos de liberación de esporas bajo diferentes condiciones en laboratorio (Fig. 22). Para ello se seleccionaron talos cistocárpicos y tetraspóricos fértiles, se limpiaron y se fragmentaron. En placas multiceldas se colocaron por celda 2 fragmentos de 1 cm de longitud, previamente pesados. Una vez establecida la cantidad de cistocarpos y tetrasporangios por trozo (de peso conocido), se obtuvo la cantidad de

tetrasporangios y cistocarpos por gramo (g). Se pudo estimar aproximadamente 30571,99 ( $\pm 205,3$ ) tetrasporangios/g de talo y 3018,48 ( $\pm 64,4$ ) cistocarpos/g de talo. Luego se agregaron 3,5 ml de agua de mar enriquecida según el ensayo realizado. Los resultados se expresaron como esporas/g talo (media  $\pm$  error estandar).



**Figura 22.** Esquema de ensayos para la liberación de esporas de *M. obsusangula* en cultivo.

### 3.2.1.1. Evaluación de medios de enriquecimiento PES y Von Stosch

Se evaluaron dos medios de enriquecimiento para la liberación de esporas: PES y Von Stosch, en una concentración de 40 ml.l<sup>-1</sup>. Los fragmentos de talo se incubaron a  $16 \pm 1$  °C, 12:12 y 25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El medio de cultivo se renovó cada 48 horas. Se utilizaron cinco réplicas para cada medio y para cada una se contabilizaron las esporas presentes sobre los cubreobjetos colocados en las placas multiceldas. El ensayo se llevó a cabo a lo largo de siete días realizando observaciones cada 2 días.

### **3.2.1.2. Determinación de las temperaturas óptimas**

Se evaluó la liberación de esporas a partir de talos cistocárpicos y tetráspóricos a 8, 12 y 24 °C. en agua de mar enriquecida con Von Stosch a una concentración de 40 ml.l<sup>-1</sup>. Se utilizaron cinco réplicas por tipo de talo y temperatura durante siete días. Cada 48 horas se renovó el medio de cultivo y se realizaron recuentos por duplicado de las esporas contenidas en cada celda de la placa.

### **3.2.1.3. Optimización del fotoperíodo**

Se evaluó la liberación de esporas de talos cistocárpicos en tres fotoperíodos diferentes: corto: 8:16, neutro: 12:12 y largo: 16:8 a 16 ± 1 °C y 25 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, con medio de cultivo PES a una concentración de 20 ml.l<sup>-1</sup>, con dos réplicas cada fotoperíodo. El ensayo se llevó a cabo durante siete días, con renovación del medio y observaciones cada 48 horas.

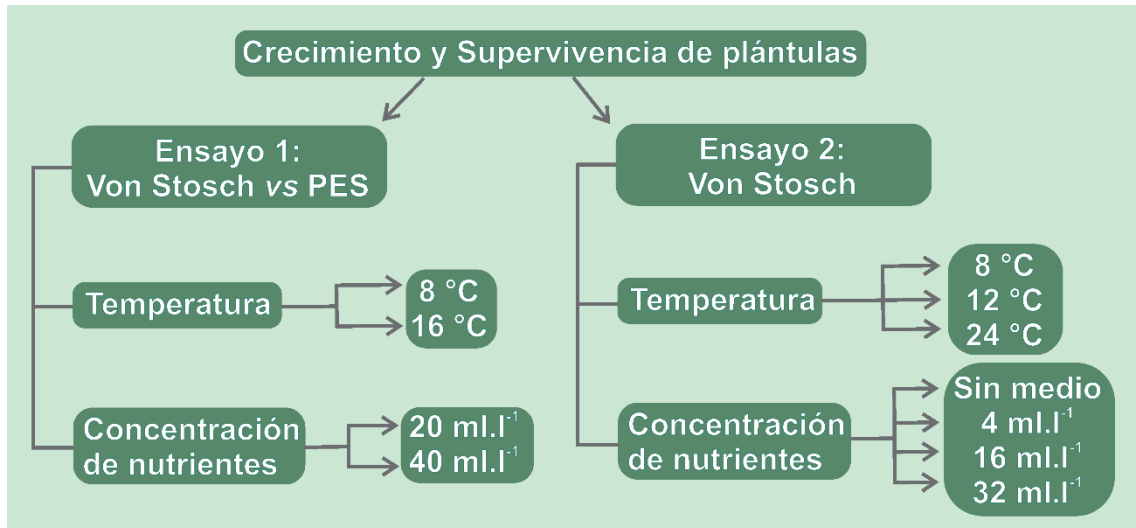
### **Estimación de tamaño de carpósporas y tetrásporas**

El área de las carpósporas y tetrásporas liberadas se estimó mediante fotomicrografías tomadas al MO con un aumento de 40x y analizadas con el software *ImageJ* 1.46v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

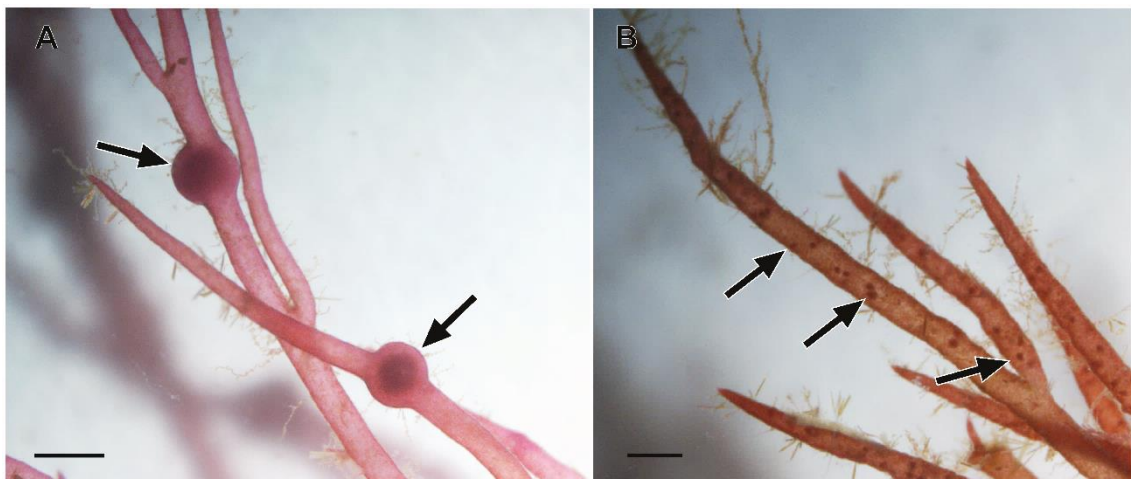
### **3.2.2. Crecimiento y supervivencia de plántulas**

El proceso de crecimiento y supervivencia de carpósporas y tetrásporas se estudió mediante la incubación de esporas bajo dos ensayos diferentes utilizando placas multiceldas (Fig. 23). Para ello se realizó una selección de 10 ejemplares de tetrásporofitos y 10 ejemplares de carpósporofitos. De los talos, se seleccionaron secciones de aproximadamente 1 cm bajo lupa, portando estructuras reproductivas (tetrásporangios y cistocarpos) (Fig. 24) y se colocaron

3 fragmentos por celda. El fotoperíodo fue de 12:12 con una intensidad lumínica de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ésta última se controló periódicamente mediante un medidor de flujo cuántico (Apogee MQ-200, USA.).



**Figura 23.** Esquema de ensayos para el crecimiento y supervivencia de plántulas de *M. obtusangula*.



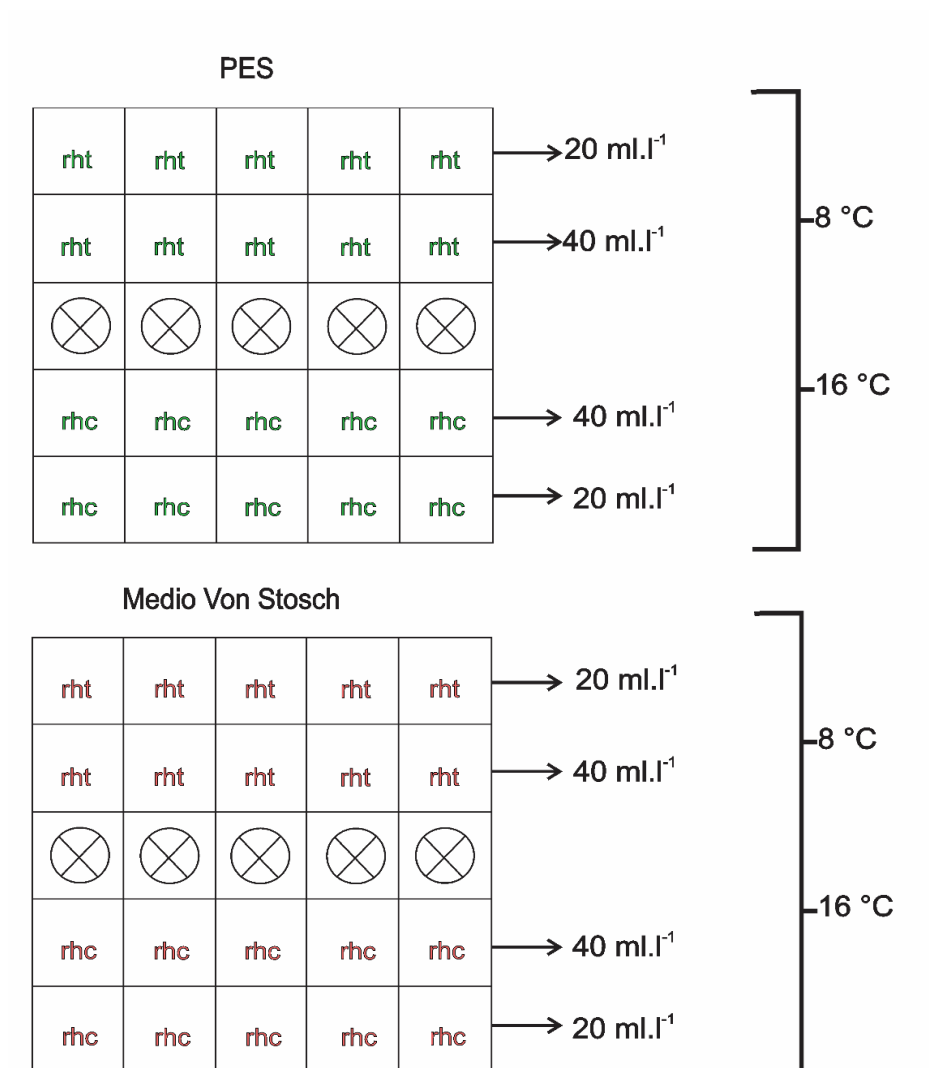
**Figura 24.** *Meridionella obtusangula*. **A.** Carposporofito con carposporangios maduros (flechas). **B.** Ramas del tetrasporofito con tetrasporangios maduros (flechas). *Barras escalas:* 0,5 mm.



### 3.2.2.1. Ensayo 1: Evaluación de medios de enriquecimiento: Von Stosch y PES

Con el fin de determinar el crecimiento óptimo y la supervivencia de las tetrásporas y las carpósporas se llevó a cabo un experimento factorial. Se analizaron dos medios de cultivo, el medio de enriquecimiento Von Stosch y PES, utilizando diferentes concentraciones añadidas al agua de mar. Se aplicaron dos concentraciones, 20 ml.<sup>-1</sup> y 40 ml.<sup>-1</sup> para ambos medios. Los cultivos para cada concentración de nutrientes, se realizaron por quintuplicado y se cultivaron bajo dos regímenes de temperatura, a 8 °C y 16 °C (Fig. 25).

Las observaciones se registraron cada dos días durante un período de 4 semanas de incubación. Las variables consideradas en esta experiencia fueron el medio de cultivo, las concentraciones de nutrientes, las temperaturas de incubación y la fase de la población de talos (tetrasporofitos y gametofitos) durante el tiempo de incubación. Los medios de cultivo se renovaron cada dos días durante el tiempo de experimentación.



**Figura 25. Diseño del ensayo de evaluación de los medios de enriquecimiento: PES y Von Stosch.** Fragmentos de tetrasporofitos (rht) y fragmentos de carposporofitos (rhc) cultivados en placas multiceldas en las concentraciones de 40 ml.l<sup>-1</sup> y 20 ml.l<sup>-1</sup> bajo dos regímenes de temperaturas 8 °C y 16 °C, con 5 réplicas por cada tratamiento. Nota: los círculos en el centro fueron celdas sin uso.

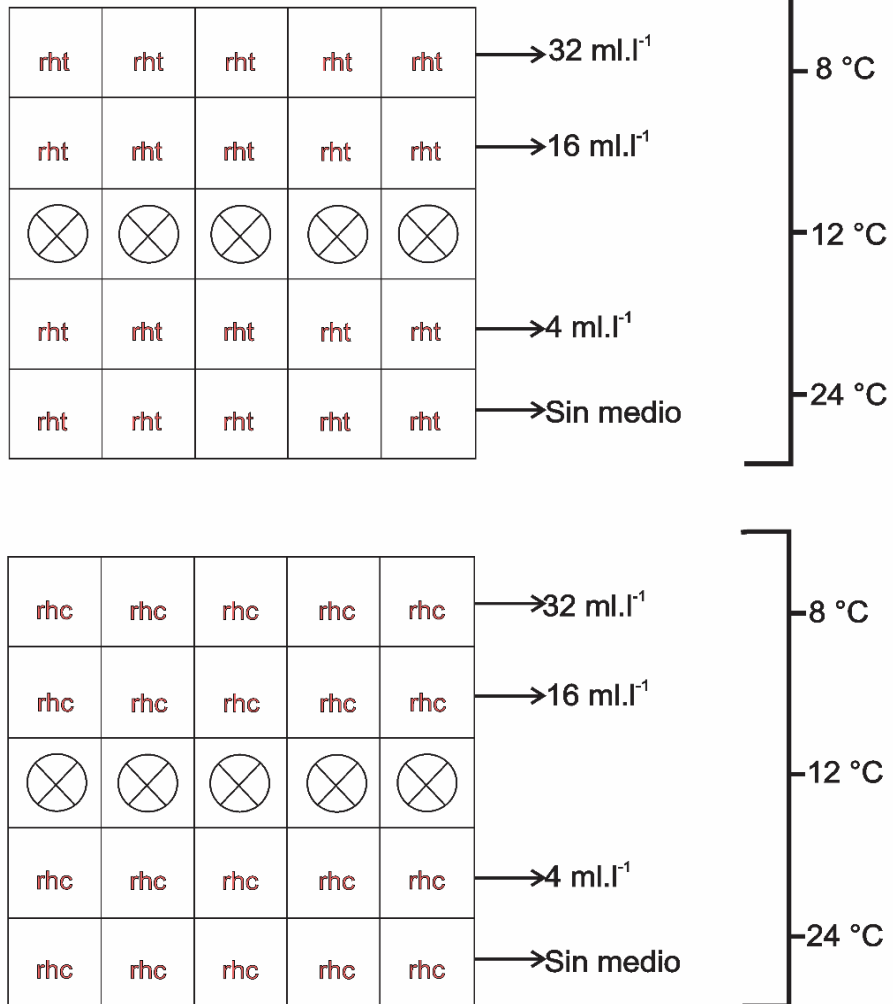
### 3.2.2.2. Ensayo 2: Optimización de temperatura y concentraciones del medio de enriquecimiento Von Stosch

En este ensayo para establecer los requerimientos óptimos, en el crecimiento y la supervivencia de las plántulas a partir de tetrásporas y carpósporas, se utilizó el medio de cultivo Von Stosch, recomendado en la literatura para el cultivo de algas rojas (Souza *et al.* 2019, Machado *et al.* 2019).

Se realizó un experimento factorial en poblaciones tetrasporofíticas y gametofíticas para evaluar cuatro condiciones de nutrientes (sin agregado de medio, 4 ml.l<sup>-1</sup>, 16 ml.l<sup>-1</sup> y 32 ml.l<sup>-1</sup>) y tres regímenes de temperaturas de incubación (8, 12 y 24 °C) (Fig. 26). Estas dos variables fueron evaluadas por quintuplicado.

Las observaciones se registraron cada dos días, durante un período de 54 días de incubación.

Medio Von Stosch



**Figura 26. Diseño del ensayo de evaluación del medio de enriquecimiento Von Stosch.** Fragmentos de tetrasporofitos (rht) y fragmentos de carposporofitos (rhc) cultivados en placas multiceldas en las concentraciones de 4 ml.l<sup>-1</sup>, 16 ml.l<sup>-1</sup> y 32 ml.l<sup>-1</sup> bajo tres regímenes de temperaturas 8 °C, 12 °C y 24 °C, con 5 réplicas por cada tratamiento. Nota: los círculos en el centro fueron celdas sin uso.

### 3.2.2.3. Evaluación del crecimiento y supervivencia de los talos

En todos los ensayos se midió la supervivencia de los talos contabilizando los individuos vivos en un área de 3 cm<sup>2</sup> con un microscopio Nikon Eclipse TE 300 (Tokio, Japón) equipado con una cámara Nikon FDX 35. Los conteos se realizaron usando un aumento total de 400X. También se registró el crecimiento vegetativo a través de la longitud talo (mm) para el ensayo 1 y el área del talo (mm<sup>2</sup>) para el ensayo 2.

## 3.2.3. Análisis estadísticos

### 3.2.3.1. Liberación de esporas

En los conjuntos de datos se llevaron a cabo tests de normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk y de homocedasticidad de la varianza utilizando el test de Bartlett. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar. Se realizaron test de ANOVA y comparaciones múltiples HSD de Tukey para comparar la densidad y el total de esporas liberadas entre tratamientos y tipos de esporas para cada ensayo. Se utilizó el software R 4.0.3 (R Core Team 2020) con un nivel de significación de 0,05.

### 3.2.3.2. Crecimiento y supervivencia de las plántulas

Se realizaron análisis con una serie de modelos mixtos lineales generalizados (GLMM), se utilizó una distribución de errores binomial para la supervivencia con el paquete "lme4" en R (Bates *et al.* 2015). La supervivencia a lo largo del tiempo se estimó sobre la base de diferentes temperaturas, concentraciones de nutrientes, tipos de medios de cultivo, tanto en talos tetraspóricos como en

gametofitos, y se consideraron modelos aditivos y de interacción. El modelo fue seleccionado de acuerdo al criterio de información de los Akaike's (AIC), donde el AIC más pequeño era el modelo que mejor se ajustaba a los datos. En este caso, se consideraron los modelos de interacción que fue el que presentó el valor más bajo de AIC.

En cuanto a la tasa de crecimiento vegetativo a lo largo del tiempo influenciada por la temperatura, la concentración de nutrientes y el tipo de medio tanto para los talos tetraspóricos como para los gametofitos, se analizó con modelos lineales de efectos mixtos. Los modelos se determinaron utilizando la estimación de máxima probabilidad (ML) con un paquete "nlme" en R (Pinheiro *et al.* 2016); la función "varPower" para controlar el efecto de heterocedasticidad y la bondad de ajuste con Pseudo-R2 para los modelos se estimó con un paquete "piecewiseSEM" en R (Lefcheck 2016). En el ensayo 1 el modelo aditivo tenía el AIC más bajo, mientras que en el ensayo 2 el modelo con el AIC más bajo era el modelo de interacción.

En todos los análisis, las diferencias significativas entre los tratamientos se indicaron con letras diferentes utilizando la prueba HSD de Tukey utilizando un paquete "multcomp" en R (Hothorn *et al.* 2008).

## **4. Resultados**

### **4.1. Ciclo de vida de *M. obtusangula***

#### **4.1.1. Reproducción asexual**

*Meridionella obtusangula* presentó dos mecanismos de reproducción asexual. El primer mecanismo es una generación de nuevos talos filamentosos a partir de estolones, originados del disco de fijación. Este mecanismo fue observado tanto en talos tetraspóricos como gametófitos (Fig. 27).

Un segundo mecanismo se observó en talos tetraspóricos provenientes de la naturaleza, el mismo consistió en el desarrollo de esporangios, de estructura similar a los tetrasporangios, productores de polisporas (Fig. 18 G y H), proceso que se conoce como apomeiosis (Fig. 27).

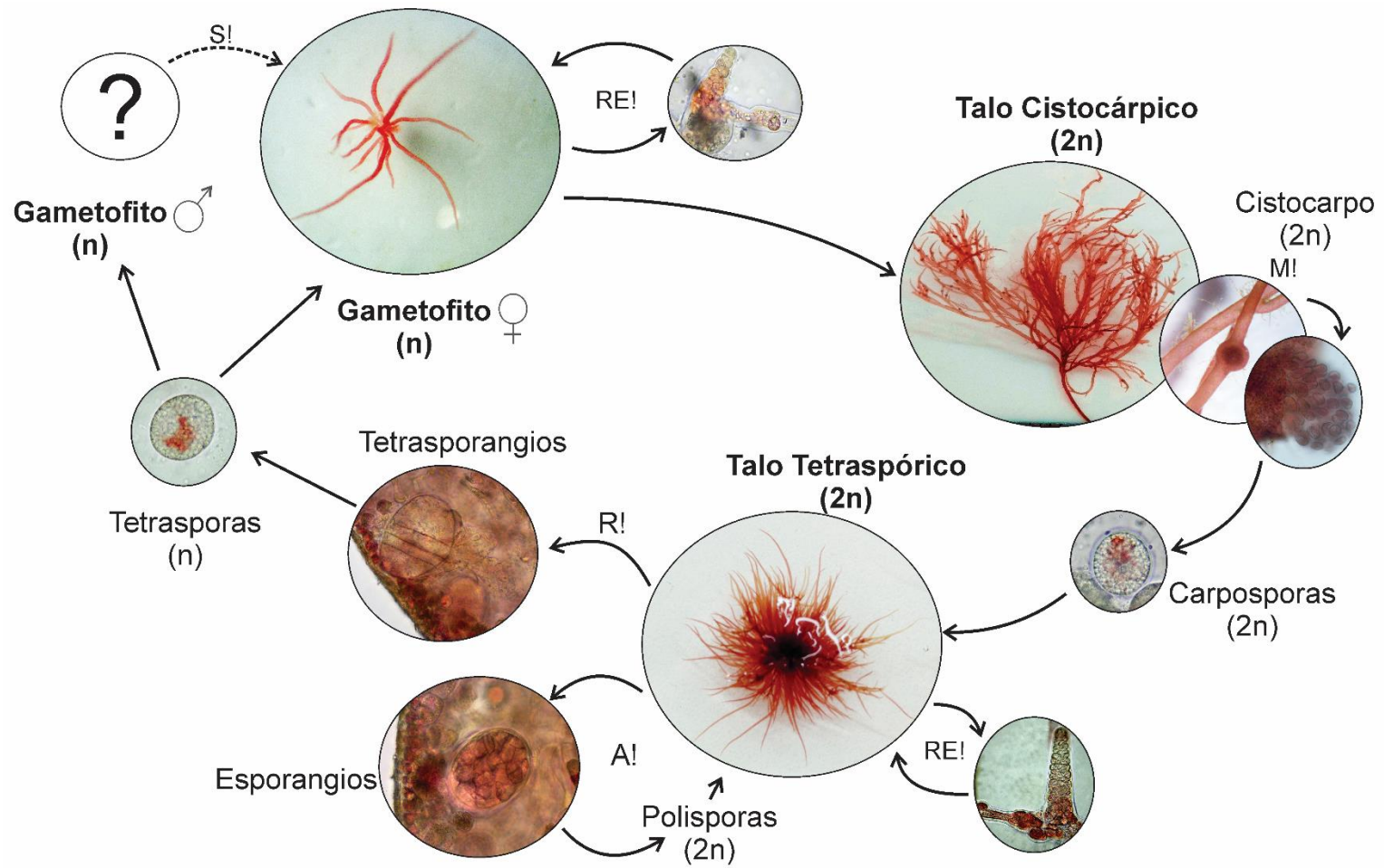
#### **4.1.2. Reproducción sexual**

Las observaciones realizadas permitieron establecer que *M. obtusangula* presentó un ciclo de vida trifásico, con alternancia de generaciones, con talos gametofíticos femeninos y talos tetraspóricos de vida libre e isomórficos (Fig. 27). Los gametofitos masculinos no fueron observados.

En los talos tetraspóricos ( $2n$ ), a partir de células madre de origen cortical se formaron los tetrasporangios del tipo zonado que, por división meiótica, dieron como resultado 4 tetrásporas ( $n$ ). La liberación y germinación de las tetrásporas dió origen a los gametofitos ( $n$ ) de vida libre, presumiblemente dioicos. Probablemente la fecundación ocurrió sobre el talo femenino y el cigoto

resultante generó mediante mitosis, cientos de carpósporas ( $2n$ ) en una estructura denominada cistocarpo. Este proceso, dio como resultado el desarrollo de la tercera generación denominada fase cistocárpica formada por talos cistocárpicos o carposporofíticos ( $2n$ ), parásitos de los talos gametofíticos femeninos. Las carpósporas liberadas al ambiente se desarrollaron en tetrasporofitos, completando de esta manera el ciclo de vida.





**Figura 27. *Meridionella obtusangula*. Ciclo de vida.** S!: Singamia; R!: meiosis; M!: mitosis, A! apomeiosis, RE!: reproducción por estolón n: haploide; 2n: diploide.

#### 4.1.3. Germinación de carpósporas y tetrásporas

Las carpósporas y tetrásporas fueron esféricas, densamente pigmentadas, de  $26,11 (\pm 11,68) \mu\text{m}$  y  $23,66 (\pm 1,78) \mu\text{m}$  de diámetro, respectivamente (Figs. 28 A y 29 A).

La germinación de ambas no fue sincronizada, pudiéndose observar simultáneamente esporas en distintos estadios de germinación bajo condiciones de cultivo. No obstante, ambas esporas evidenciaron el mismo patrón de germinación del tipo Dumontia.

Las carpósporas germinaron al segundo día una vez iniciados los ensayos, donde ocurrió la primera división que tuvo lugar en el plano medio dando como resultado el estadio bicelular (Fig. 28 B). Después de 2 a 3 días cada célula se dividió perpendicularmente con respecto a la primera división, originando un estadio tricelular y tetracelular, respectivamente (Fig. 28 D). En algunas carpósporas luego de iniciada las primeras divisiones se observó un tubo de germinación que se manifestó al cuarto día (Fig. 28 C). Entre el quinto y sexto día luego de la germinación ocurrieron varias divisiones que dieron lugar a estadios postrados multicelulares (Fig. 28 E y F), originando a los días siguientes un disco basal multicelular (Fig. 28 G y H) con la presencia de algunos rizoides (Fig. 28 H y J) a partir de ese momento, comenzó a observarse coalescencia entre algunos discos basales (Fig. 28 I). Luego del séptimo día se lograron registrar estadios donde ya se manifestaba la porción erguida constituida por unas pocas células (Fig. 28 F-H), alcanzando a los quince días un tamaño de aproximadamente  $56,19 (\pm 3,36) \mu\text{m}$  de largo (Fig. 28 K). Algunas de las plántulas evidenciaron la presencia temprana de pelos hialinos. Asimismo, desde

el disco basal se observaron filamentos constituidos por células rectangulares con contenido de aspecto granular a modo estolón, a partir de los cuales se originó de manera vegetativa a talos propiamente dicho (Fig. 28 L). Las plántulas tetraspóricas a los veinte días de iniciados los cultivos alcanzaron una longitud de  $80,40 (\pm 6,49) \mu\text{m}$ .

Para el caso de la tetrásporas, el patrón de germinación fue similar al de las carpósporas, con ligeras diferencias en los tiempos de manifestación de los estadios. El estadio bicelular (Fig. 29 B) se manifestó al tercer día de iniciados los cultivos. Los estadios 3-celular y 4-celular fueron observados también entre los 2 y 3 días siguientes (Fig. 29 C). Algunas de las tetrásporas luego de las divisiones evidenciaron un tubo de germinación que se manifestó recién al séptimo día. Aquellos estadios sin la presencia de esta estructura, finalizando la primera semana de incubación, luego de varias divisiones se observaron diferentes estadios postrados multicelulares dando lugar a la formación de un disco basal, algunos a partir de los cuales se diferenciaron rizoides (Fig. 29 D y E). Al igual que en las carpósporas, aquí se pudo observar la coalescencia entre algunos discos (Fig. 29 F). Los gametofitos (con un desarrollo posterior) alcanzaron  $41,79 (\pm 5,20) \mu\text{m}$  de longitud a los veinticinco días (Fig. 29 G), desarrollando algunas plántulas estolones a partir del disco basal (Fig. 29 H).

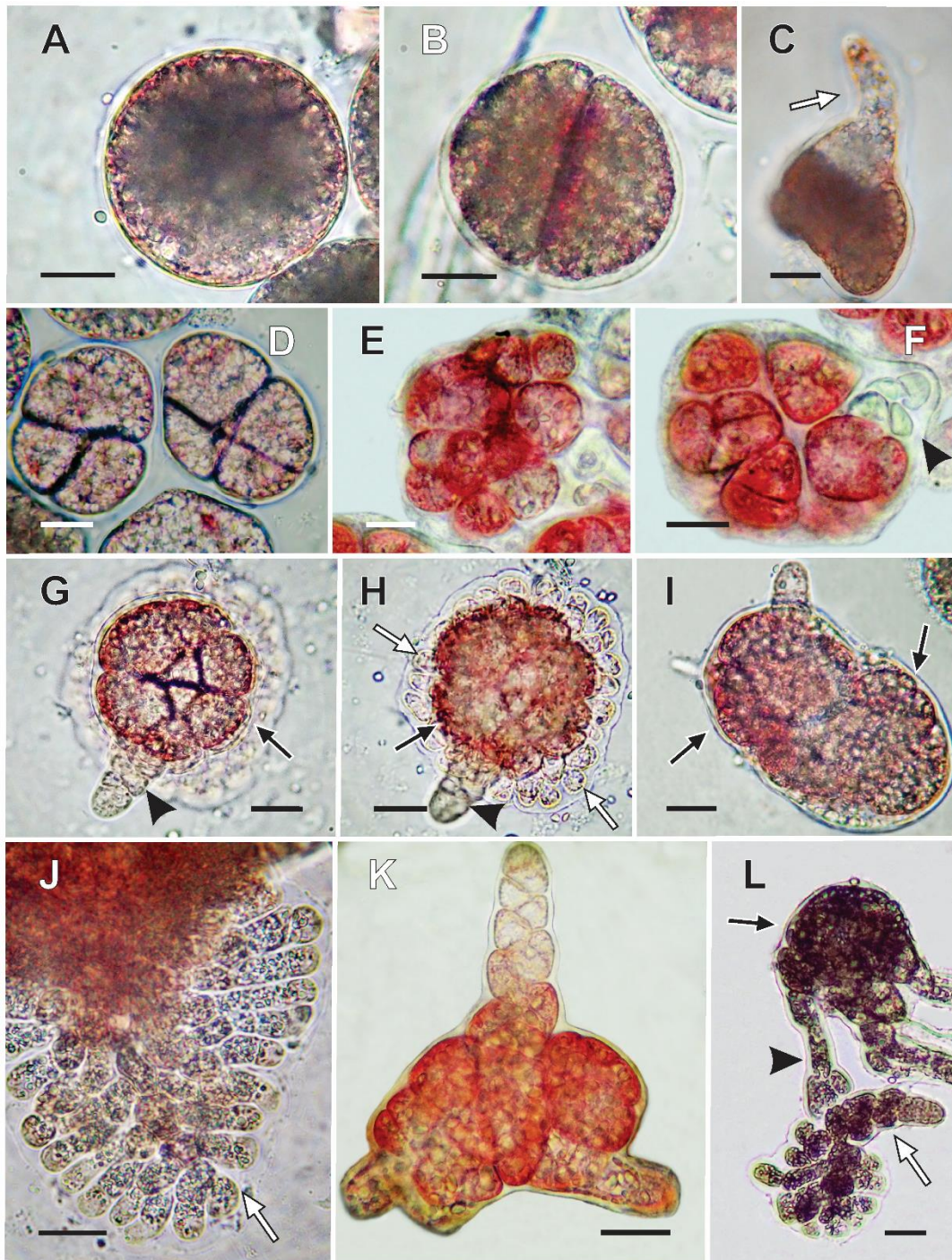
Llegando a los dos meses de cultivo las plántulas tetrasporofíticas alcanzaron una longitud de  $191,53 \pm (19,5) \mu\text{m}$ , mientras que los gametófitos de  $144,55 (\pm 14,8) \mu\text{m}$ .

El inicio de las ramificaciones de las plántulas tetraspóricas se observó a los 2 meses (Fig. 30 A), registrando un mayor grado de ramificación a los seis meses con una longitud de  $10,21 (\pm 0,57) \text{mm}$  (Fig. 30 B). El desarrollo de estructuras

reproductivas fue evidenciado a los 18 meses de iniciados los cultivos en plántulas con un tamaño de  $16,03 (\pm 0,51)$  mm (Fig. 30 C). Luego de la inducción de la esporulación mediante un shock de temperatura llevado a cabo por 24 hs. siguiendo los protocolos de Palacios Giraldo (2009), se observó la liberación de las tetrásporas. Las mismas fueron re suspendidas y colocadas en cajas de Petri para el posterior seguimiento de la nueva progenie de gametofitos, los que después de un tiempo de cultivo se necrosaron y murieron no logrando completar su desarrollo.

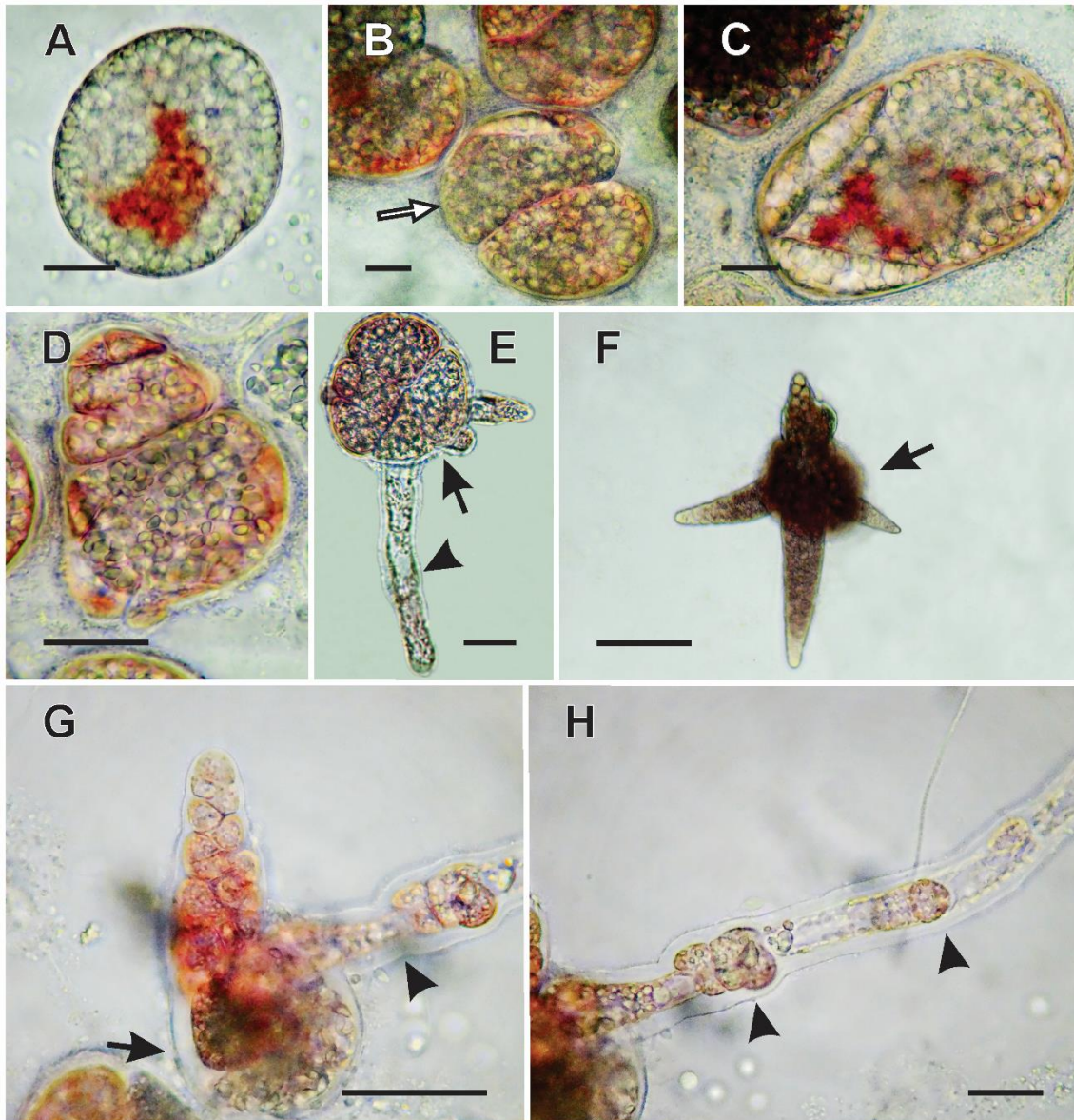
La germinación de la nueva progenie gametofítica siguió el descrito para las tetrásporas provenientes de la naturaleza (Fig. 29), el crecimiento fue más lento en comparación con los gametofitos provenientes de tetrásporas de la naturaleza, evidenciando talos de unos  $486,33 (\pm 54,11)$   $\mu\text{m}$  a los tres meses de cultivo (Fig. 30 D). Las ramificaciones comenzaron a observarse a los 5 meses en plántulas con una longitud promedio de  $5,25 (\pm 0,44)$  mm (Fig. 30 E) y finalmente las plántulas alcanzaron valores máximos de  $6,05 (\pm 0,6)$  mm a los seis meses (Fig. 30 F), sin la observación del desarrollo de estructuras reproductivas.

Un fenómeno muy particular observado durante el cultivo en talos tetraspóricos luego de la esporulación fue la germinación de tetrásporas dentro de los mismos talos, denotando cierto comportamiento parasitario por parte de los talos gametofíticos (Fig. 31). Estas observaciones fueron también notadas en talos de la naturaleza evidenciándose el mismo comportamiento, indicando que no fue un fenómeno debido a las condiciones de cultivo.

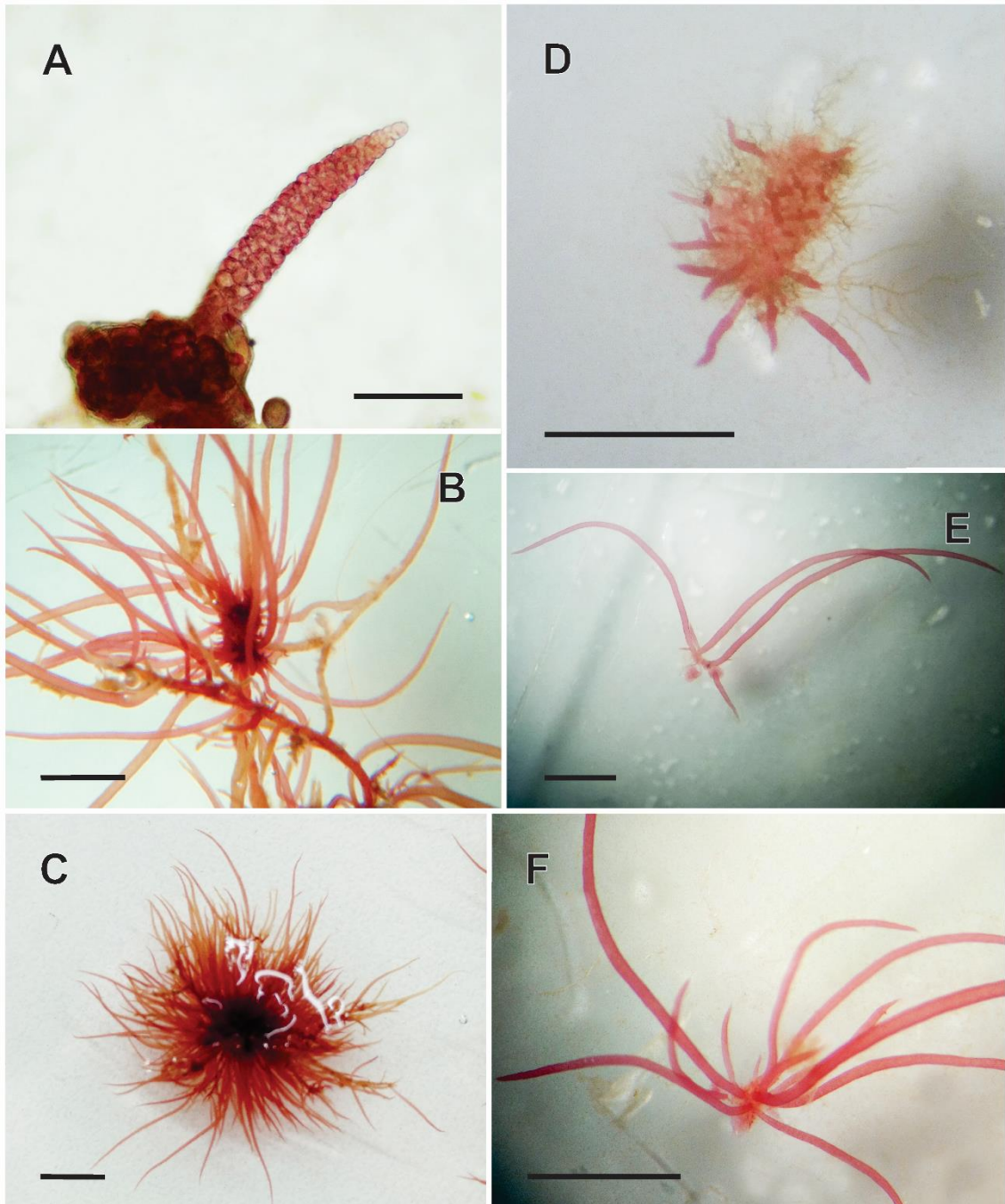


**Figura 28. *Meridionella obtusangula*. Germinación de carpósporas. A.** Carpósporas. **B.** Estadio bicelular. **C.** Estadio con tubo de germinación (flecha). **D.** Estadio tricelular y tetracelular. **E-F.** Estadios multicelulares, con desarrollo temprano de la porción erguida del talo (**F**) (cabeza de flecha). **G-H.** Discos basales (flechas). **I.** Coalescencia de los discos basales (flechas). **J.** Estadio multicelular con desarrollo de rizoide (flecha). **K.** Plántula luego de 15 días en condiciones de cultivo. **L.** Detalle de rizoide, nótese inicio de un nuevo talo (flecha). *Barras escalas: A, B, C, D, E, F, I, J y K = 10 µm; G y H = 25 µm.*



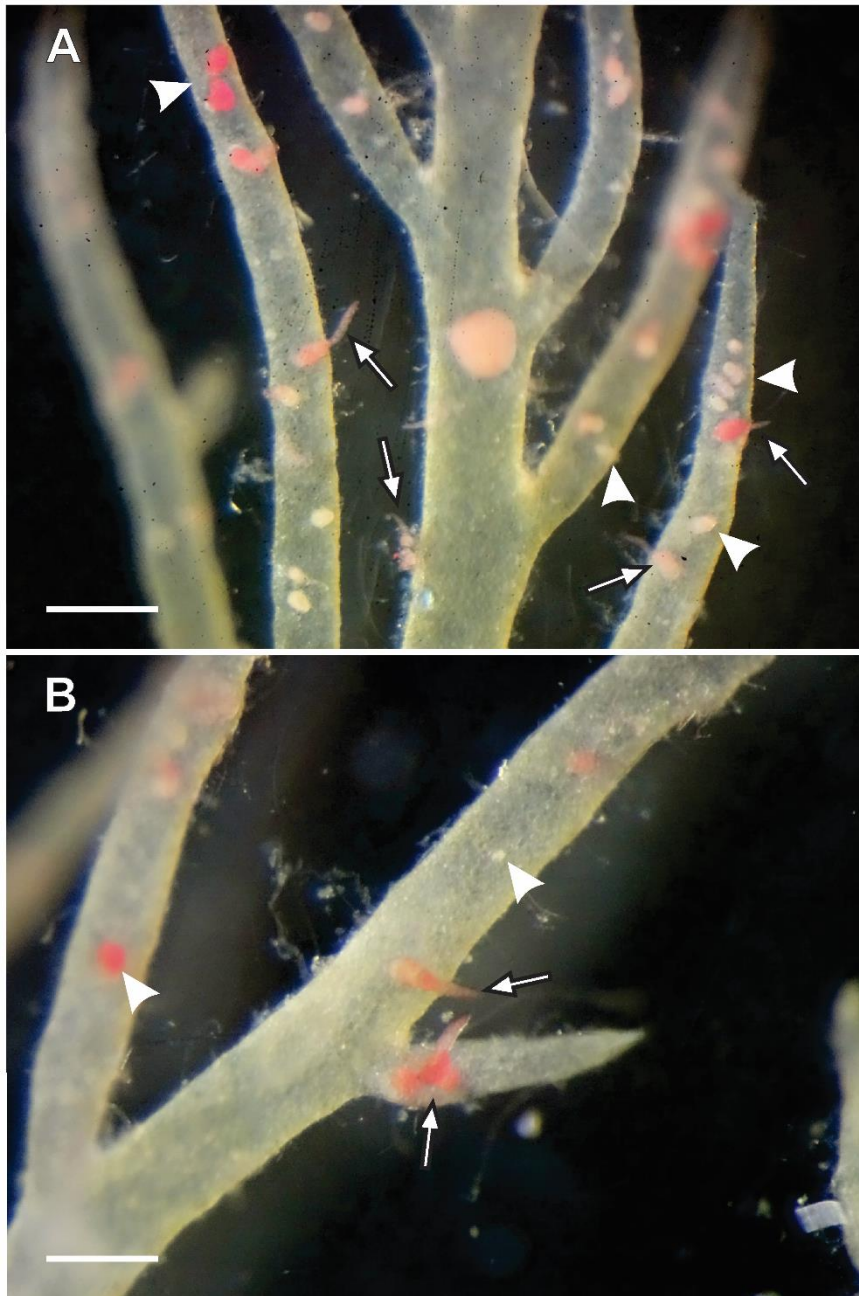


**Figura 29. *Meridionella obtusangula*. Germinación de tetrásporas. A.** Tetrásporas. **B.** Estadio bicelular. **C.** Estadio tricelular. **D-E.** Estadios multicelulares, con desarrollo de disco basal (flecha) y rizoide (cabeza de flecha) en **E**. **F.** Coalescencia de los discos basales (flecha). **G.** Plántula de 25 días con detalle de disco basal (flecha) y rizoide (cabeza de flecha) más consolidado. **H.** Detalle de rizoide, nótese inicio de nuevos talos (cabeza de flecha). *Barras escalas:* **A** y **H** = 10  $\mu\text{m}$ ; **B** y **C** = 20  $\mu\text{m}$ ; **D** y **E** = 25  $\mu\text{m}$ ; **G** = 50  $\mu\text{m}$ ; **F** = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 30. *Meridionella obtusangula*. Desarrollo de plántulas. A-B-C.** Talos tetraspóricos. **D-E-F.** Talos gametofitos. **A.** Talos de dos meses. **B.** Talos 6 meses no reproductivos. **C.** Talos de 18 meses en estado reproductivo. **D.** Talo de tres meses. **E.** Talos de cinco meses. **F.** Talos de seis meses. *Barras escalas:* **A** = 100 µm; **D** y **E** = 1 mm; **B** y **F** = 2 mm; **C** = 5 mm.





**Figura 31. *Meridionella obtusangula*. Talos en cultivo. A y B.** Talos tetraspóricos, nótese desarrollo de los tetrasporangios (cabeza de flecha) y la germinación de tetrasporas sobre el talo (flechas). *Barras escalas: A y B = 1mm.*

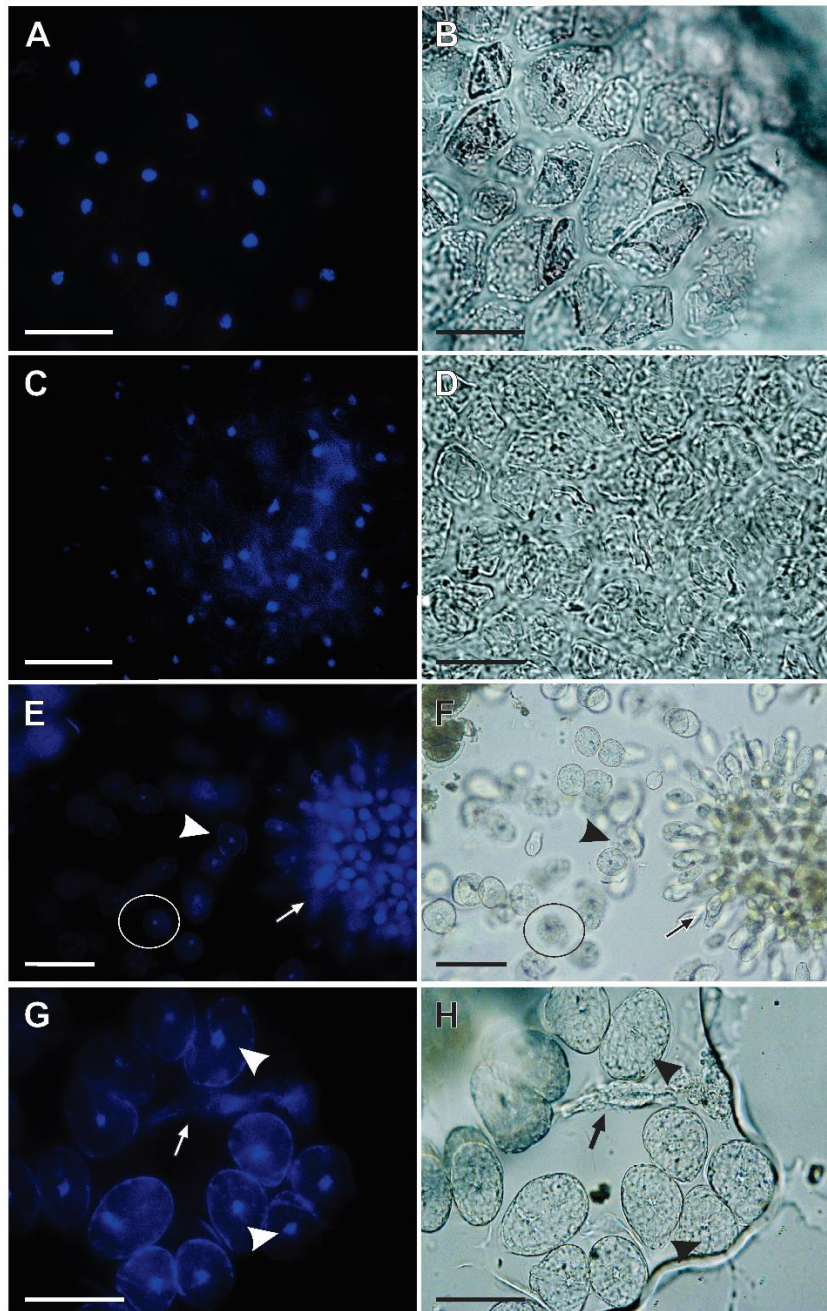


#### 4.1.4. Nivel de ploidía de las diferentes fases del ciclo de vida

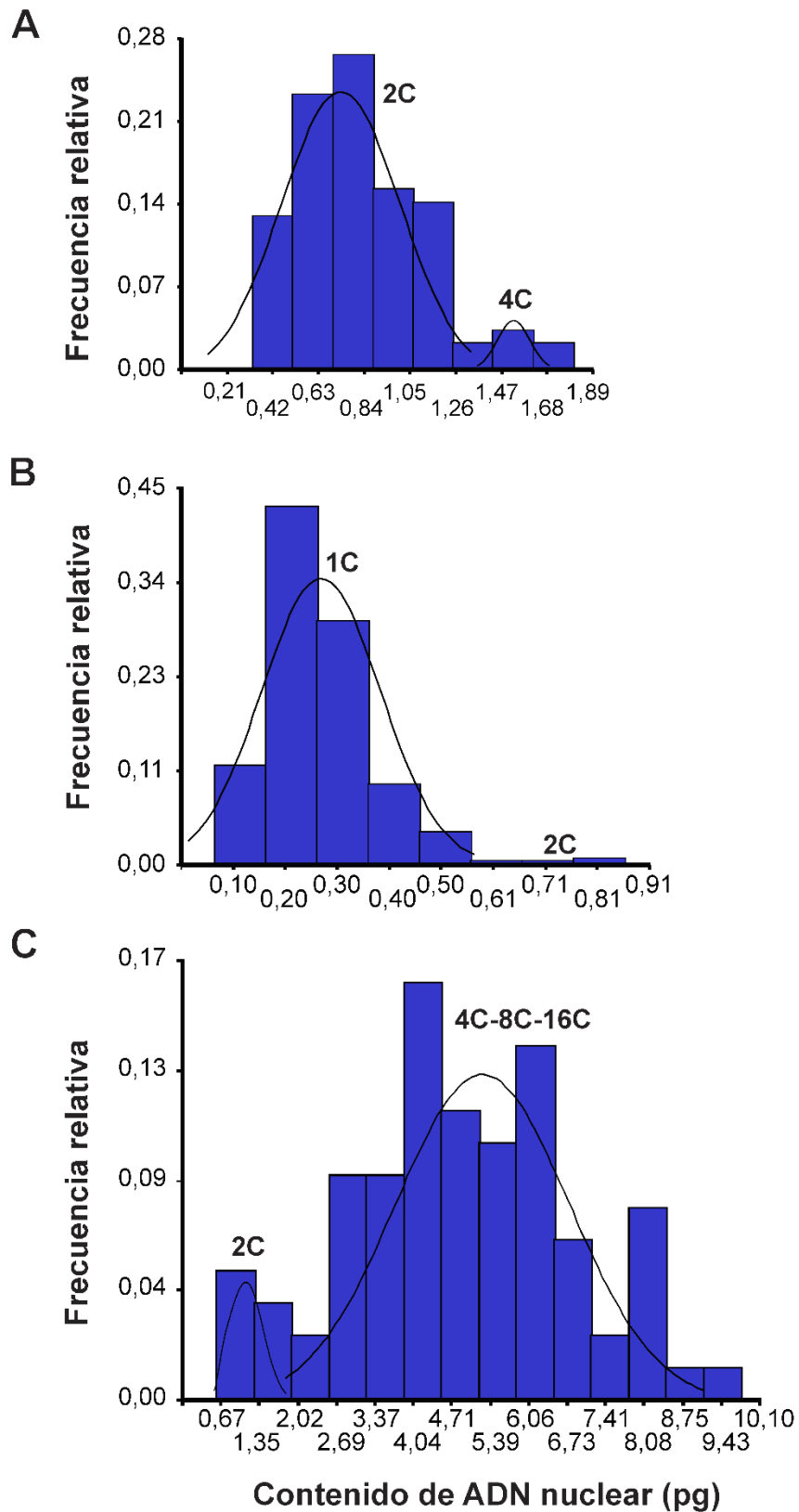
Se examinaron un total de 639 núcleos de células corticales tetraspóricas, células corticales gametófitas y células carposporofíticas (Fig. 32). La cuantificación del ADN nuclear se utilizó para analizar la ploidía en estadios adultos que conforman las diferentes fases que integraron el ciclo de vida de *M. obtusangula* (Tabla 6). En un histograma de ADN típico, un pico representa células en la fase G1 del ciclo celular, seguido de una meseta o fase S y continuando con un pico, con el doble del valor, que presenta células en estadios posteriores a la replicación del ADN en la fase G2/M. En referencia al orden Gigartinales el valor medio de todas las especies estudiadas es de  $1C=0,2$  pg (<https://cvalues.science.kew.org/>) (Tabla 6). Los individuos diploides fueron representados por los tetrasporofitos de vida libre, cuyas células en G1 producen grandes picos 2C y cuyas células en G2 producen picos 4C más pequeños (Fig. 33 A). La fase haploide representada por los talos gametofitos de vida libre presentó núcleos 1C y 2C (Fig. 33 B), y los individuos diploides representados por la fase carposporofítica, “parásita” de la gametofítica, presentó núcleos mitóticamente activos, con elevado contenido de ADN (endopoliploides) en fase G1 con picos 2 C y núcleos en fase G2 con picos 4 C, donde los núcleos poliploides registraron valores de ADN 8 C y 16 C (definido por Goff & Coleman (1990)) (Fig. 33 C).

**Tabla 6.** Estimación del tamaño del genoma (pg) para los núcleos de *M. obtusangula* (Tinción DAPI), siguiendo el protocolo de Kapraun & Nguyen (1994).

Generaciones	Contenido de ADN nuclear (pg)				
	1 C	2 C	4 C	8 C	16 C
<i>Gametofítica femenina</i>	0,27 ± 0,004	0,50 ± 0,01			
<i>Tetrasporofítica</i>		0,71 ± 0,01	1,31 ± 0,03		
<i>Cistocárpica</i>		0,69 ± 0,09	2,48 ± 0,15	4,14 ± 0,09	6,51 ± 0,19



**Figura 32. *Meridionella obtusangula*. Tinción DAPI. A y B.** Núcleos de células corticales tetraspóricas. **C y D.** Núcleo de células corticales gametofíticas. **E-H.** Núcleos de células carposporofíticas. **E y F.** Squash de cistocarpo, nótese carposporofito (flecha), carposporangios libres (cabeza de flecha) y carpósporas (círculo). **G y H.** Detalle de filamento gonimoblastico (flecha) sosteniendo diferentes células cistocárpicas con diferentes tamaños nucleares (cabezas de flechas). *Barras escalas: A, B, C, D, G y H = 25  $\mu$ m; E y F = 100  $\mu$ m.*

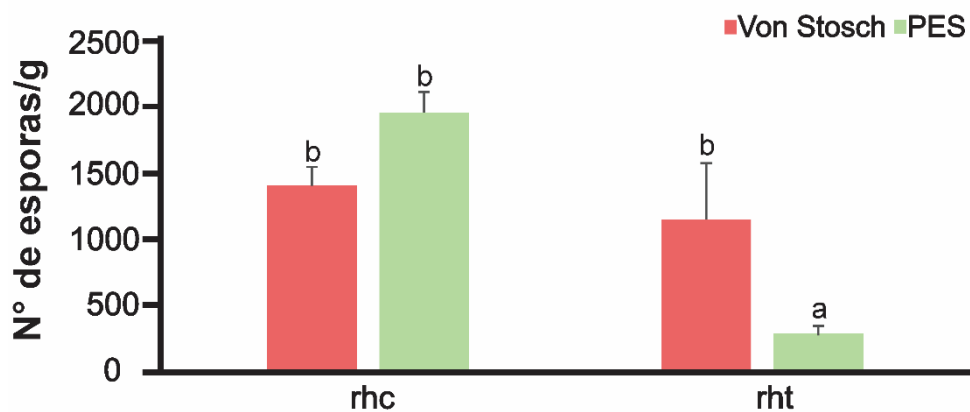


**Figura 33. *Meridionella obtusangula*. Histograma del contenido de ADN nuclear medido en pg. en talos adultos. A.** Talos tetrasporofíticos con núcleos en fases G1 y G2. **B.** Talos gametofíticos con núcleos en fases G1 y G2. **C.** Talos carpoforofitos con núcleos en diferentes estadios de duplicación.

## 4.2. Liberación de esporas bajo diferentes condiciones

### 4.2.1. Medios de enriquecimiento

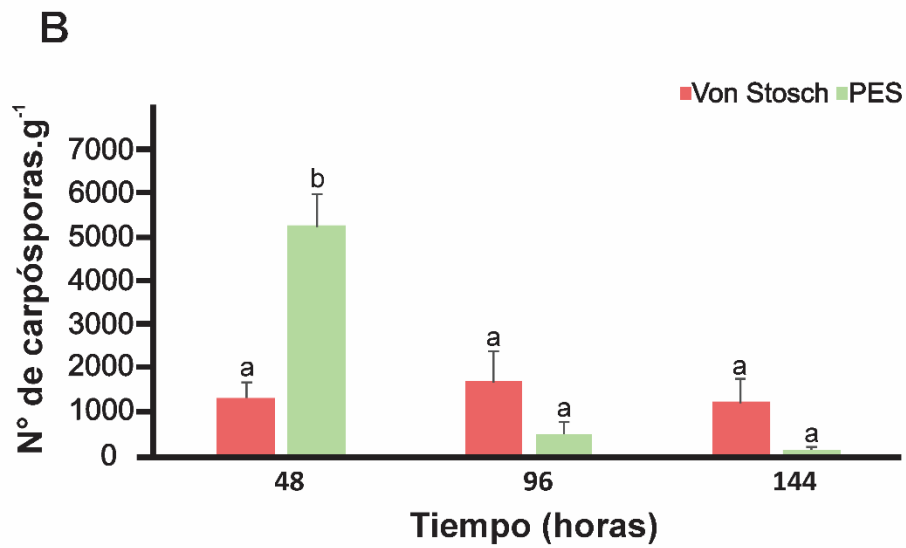
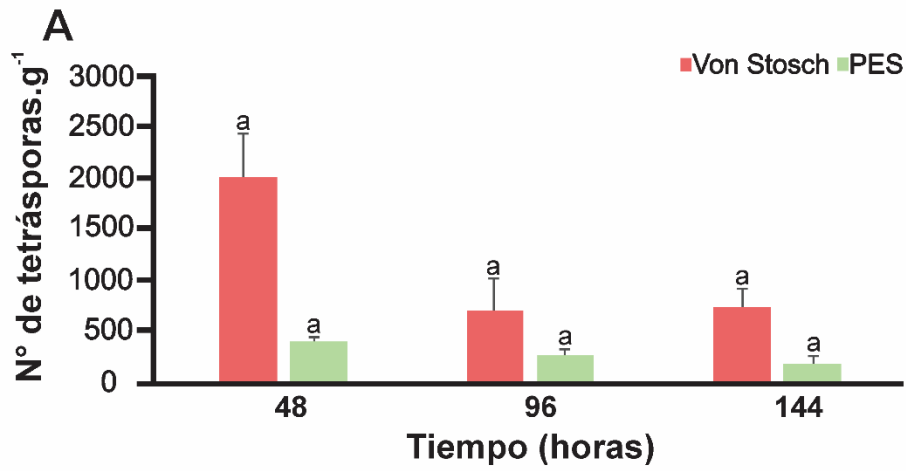
Se observó una interacción significativa entre la cantidad total de carpósporas y tetrásporas liberadas en el tiempo de observación para los dos medios de enriquecimiento analizados ( $F_{(2; 48)} = 13,75; p < 0,0001$ ). La mayor cantidad de carpósporas liberadas se observó con el medio PES, mientras que la mayor cantidad de tetrásporas fueron liberadas en la utilización de Von Stosch (Fig. 34, Tabla 7). Asimismo, el patrón de liberación mostró diferencias significativas entre los dos medios evaluados a lo largo del tiempo para los talos cistocárpicos ( $F_{(2; 24)} = 16,9; p < 0,0001$ ), mientras que no arrojó valores significativos para los talos tetraspóricos ( $p = 0,3644$ ). Se observó una liberación homogénea de tetrásporas a las 48, 96 y 144 horas (Fig. 35 A), mientras que se observó una alta liberación de carpósporas a las 48 horas siendo considerablemente menor a las 96 y 144 horas (Fig. 35 B).



**Figura 34. Total de carpósporas y tetrásporas liberadas por gramo en una semana, a partir de talos incubados utilizando dos medios de enriquecimiento.** Los valores representan la **media ± error estándar** para n = 5. **rht**: talos tetraspóricos, **rhc**: talos cistocárpicos.

**Tabla 7. Total de esporas por gramo de talo reproductivo liberadas durante una semana de cultivo utilizando dos medios de enriquecimiento.** Los valores representan la **media ± error estándar**.

Medio de enriquecimiento	Carpósporas	Tetrásporas
<i>Von Stosch</i>	1391,17 ± 144,11	1138,8 ± 430,55
<i>PES</i>	1941,17 ± 179,1	268,05 ± 63,88



**Figura 35. Liberación de esporas por gramo de talo a las 48, 96 y 144 horas, a partir de fragmentos incubados con dos medios de enriquecimiento. A. Tetrásporas. B. Carpósporas. Los valores representan la media ± error estándar.**

#### 4.2.2. Temperatura

Se observaron diferencias significativas en cuanto a la liberación de esporas totales para las diferentes temperaturas de 8, 12 y 24 °C ( $F_{(2; 72)} = 26,35$ ;  $p < 0,0001$ ), así como en la liberación de esporas por parte de los diferentes tipos de talos ( $F_{(1; 72)} = 4,68$ ;  $p = 0,0339$ ) (Fig. 36, Tabla 8). La mayor liberación para ambos tipos de talo se manifestó en la condición de 12°C, mientras que la menor fue evidenciada para la temperatura de 8°C. Asimismo, los talos tetraspóricos presentaron mayor cantidad de esporas liberadas que los talos cistocárpicos (Fig. 36).

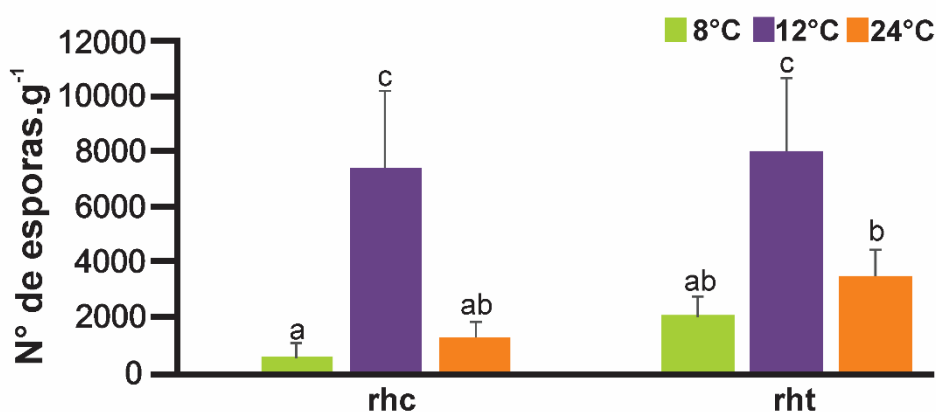


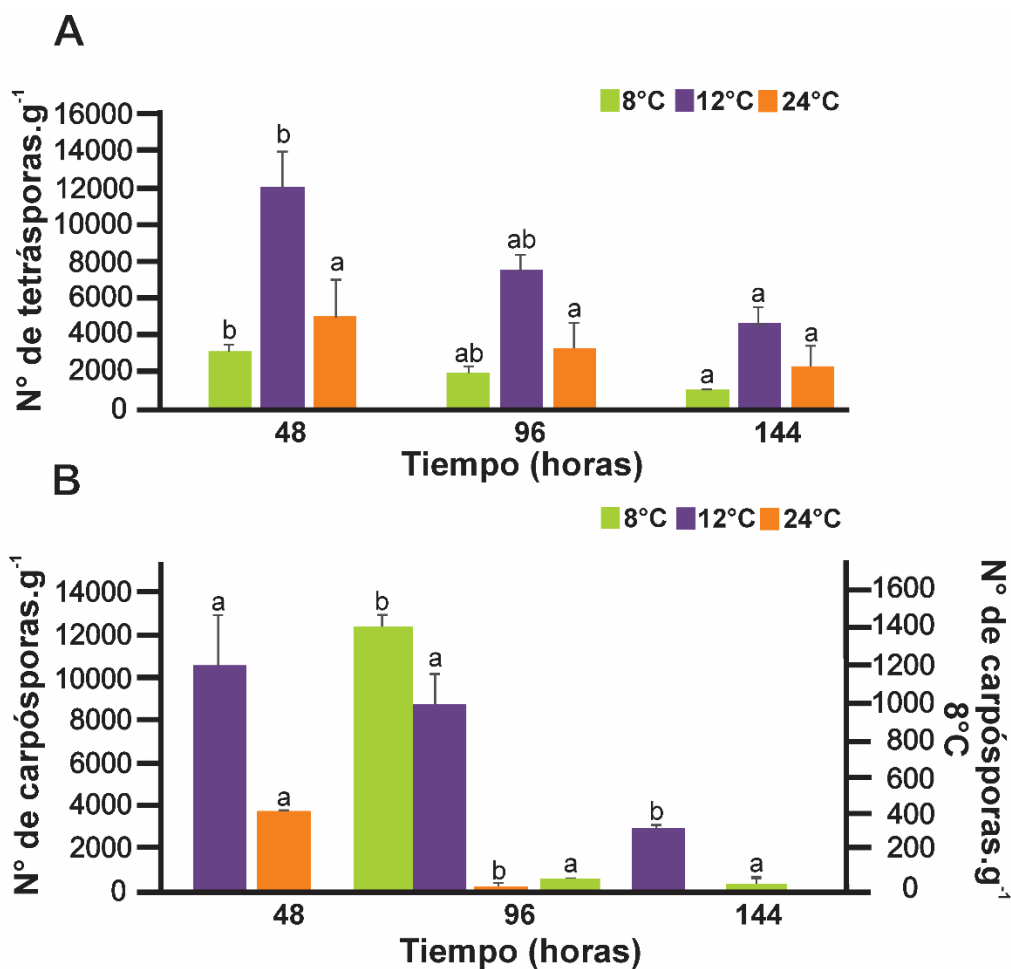
Figura 36. Tetrásporas y carpósporas totales liberadas por gramo de talo en una semana, en talos incubados bajo distintas temperaturas. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar. rht: talos tetraspóricos, rhc: talos cistocárpicos.



**Tabla 8: Esporas totales liberadas por gramo y tipo de talo reproductivo durante una semana de cultivo utilizando tres temperaturas. Los valores representan la media  $\pm$  error.**

<b>Temperatura</b>	<b>Carpósporas</b>	<b>Tetrásporas</b>
8°C	500,01 $\pm$ 57,73	2000 $\pm$ 738,33
12°C	7372,05 $\pm$ 2823,52	8000,01 $\pm$ 2642,03
24°C	1235,29 $\pm$ 500,02	3472,22 $\pm$ 960,02

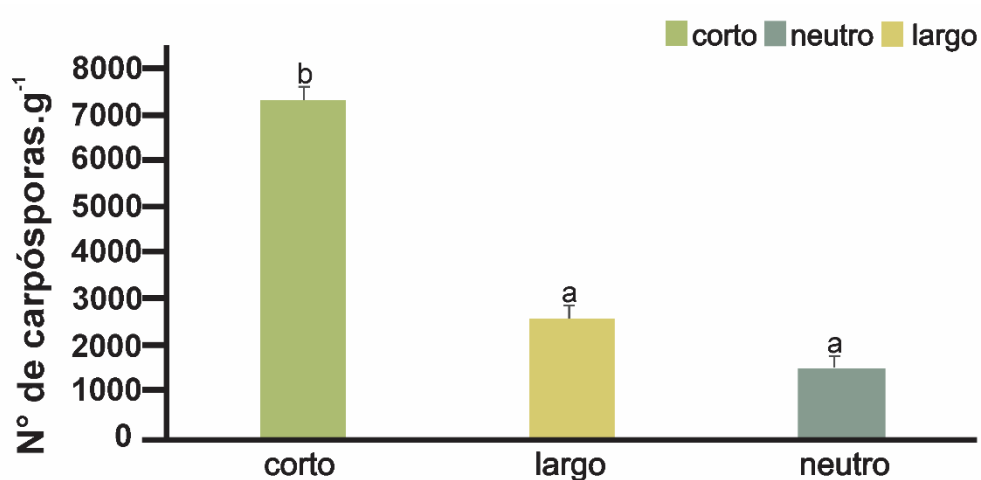
En cuanto al patrón de liberación, se encontraron diferencias significativas para los talos cistocárpicos ( $F_{(2; 36)} = 15,08$ ;  $p < 0,0001$ ) y los talos tetráspóricos ( $F_{(2; 36)} = 11,53$ ;  $p < 0,000$ ) para las tres temperaturas evaluadas. Con respecto a la liberación de tetrásporas fue elevada dentro de las primeras 48 horas, disminuyendo paulatinamente a medida que transcurrieron las horas (Fig. 37 A). Por otro lado, los talos cistocárpicos, presentaron una mayor liberación de esporas en las primeras 48 horas. de observación para todas las temperaturas, encontrándose valores considerablemente más bajo en los registros posteriores (Fig. 37 B).



**Figura 37. Liberación de esporas por gramo de talo a lo largo del tiempo de observación, en talos incubados bajo distintas temperaturas. A. Carpóscopas. B. Tetráscopas, eje primario representadas las temperaturas de 12 y 24°C, eje secundario representada la temperatura de 8°C. Los valores representan la **media ± error estándar**.**

### 4.2.3. Fotoperiodo

Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de carpósporas totales liberadas en los 3 fotoperiodos analizados ( $F_{(2; 18)} = 10,21$ ;  $p < 0,000$ ) (Fig. 38). Bajo fotoperiodo corto, se registraron los mayores valores, mientras que, bajo un neutro y un largo, los valores fueron más bajos (Tabla 9).



**Figura 38.** Carpósporas totales liberadas por gramo en una semana por parte de los talos cistocárpicos incubados bajo distintos fotoperiodos. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

**Tabla 9.** Carpósporas totales liberadas por gramo de tejido durante una semana, a partir de talos cistocárpicos incubadas bajo distintos fotoperiodos. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

Corto	Neutro	Largo
8:16	12:12	16:8
7288,23 $\pm$ 319,80	1486,76 $\pm$ 254,02	2532,35 $\pm$ 297,20

No se encontraron diferencias significativas entre el patrón de liberación para los fotoperiodos analizados a lo largo de la semana de incubación. No obstante, considerando los valores absolutos de carpósporas liberadas, como se observa en la Figura 39 para los fotoperiodos largo y neutro hubo una disminución en la liberación de esporas llegando a las 96 horas aunque la misma retomo con mayor intensidad al final del tiempo de observación; próxima a las 144 horas.

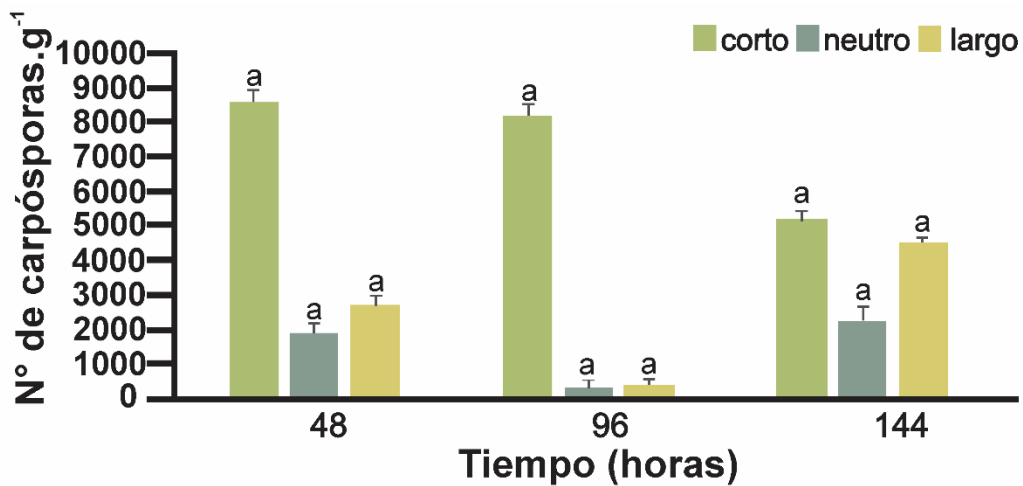


Figura 39. Liberación de carpósporas en el tiempo, a partir de talos incubados bajo distintos fotoperiodos. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar.

### **4.3. Crecimiento y supervivencia de talos tetrasporofíticos y gametofíticos**

#### **4.3.1. Evaluación de medios Von Stosch y PES**

En el modelo analizado: crecimiento a lo largo del tiempo de incubación en función de las variables: el medio de cultivo, las concentraciones de nutrientes, la temperatura de cultivo y las fases del talo (tetrasporofito o gametofito) se pudieron detectar diferencias significativas para todas las variables (Tabla 10). Las tasas de crecimiento expresada como longitud del talo (mm), medida tanto en gametofitos como tetrasporofitos para los medios de cultivo analizados fueron significativamente diferentes (Tabla 10) los talos tetraspóricos fueron los que evidenciaron mayores tasas de crecimiento por sobre la de los gametofitos en la mayoría de las condiciones (Tabla 10), alcanzando un crecimiento máximo de  $1,004 (\pm 0,008)$  mm, mientras que los últimos obtuvieron un valor de  $0,365 (\pm 0,004)$  mm (Fig. 40 A y B). La velocidad de crecimiento fue mayor para las condiciones donde se utilizó como medio de cultivo PES (Tabla 10), sin embargo, el máximo fue alcanzado en los cultivos enriquecidos con el medio Von Stosch (Fig. 40).

Con respecto a las dos temperaturas y dos concentraciones de nutrientes probadas en los ensayos de cultivo, las tasas de crecimiento mostraron diferencias significativas (Tabla 10). Los talos tetrasporofíticos incubados a  $16^{\circ}\text{C}$  tuvieron un crecimiento más rápido tanto en el medio PES como Von Stosch. Sin embargo, este rápido crecimiento se observó a diferentes concentraciones, a una concentración de  $20 \text{ ml.l}^{-1}$  de PES y de  $40 \text{ ml.l}^{-1}$  de Von Stosch (Tabla 10, Figs. 40 A y C). En los talos gametofíticos, los resultados fueron más similares para

ambos medios de cultivo, el crecimiento óptimo fue a 16°C y a una concentración de 40 ml.l<sup>-1</sup> (Tabla 10, Figs. 40 B y D).

Las tasas más bajas de crecimiento para los tetrasporofitos se encontraron a 16°C y una concentración de 20 ml.l<sup>-1</sup> de Von Stosch y a 8°C en una concentración de PES de 40 ml.l<sup>-1</sup> (Tabla 10). En estas condiciones, los tetrasporofitos obtuvieron valores máximos de crecimiento de 0,085 ( $\pm$  0,002) mm y 0,088 ( $\pm$  0,003) mm respectivamente (Fig. 40 A y C). Sin embargo, en el caso de los gametofitos, las tasas de crecimiento más bajas se evidenciaron para ambos tipos de medios en los ensayos de cultivo a 8°C y a una concentración de 20 ml.l<sup>-1</sup> (Tabla 10), llegando a valores de crecimiento al final de la experiencia de 0,12 ( $\pm$  0,006) mm en el medio enriquecido con PES y 0,07 ( $\pm$  0,002) con el medio de cultivo Von Stosch (Fig. 40 B y D).

El tiempo de incubación medido en semanas afectó negativamente la supervivencia tanto de los talos tetrasporofitos como de los talos gametofitos. Se observó una disminución en la supervivencia a medida que progresó el tiempo de incubación de cuatro semanas (Fig. 41). Al final de la experiencia en la cuarta semana, se observó un 43,7 ( $\pm$  2,8%) de tetrasporofitos y un 23,5 ( $\pm$  0,94) % de gametofitos vivos. Este resultado mostró un evidente y alto porcentaje de supervivencia de los tetrasporofitos por sobre los gametofitos (Fig. 41).

Las variables evaluadas: medio de cultivo, temperatura y concentración de nutrientes influenciaron la supervivencia a lo largo del tiempo dado que se registraron diferencias significativas (Tabla 11). Se observó un comportamiento significativamente diferente por parte de los talos gametofitos como tetraspóricos ante el medio de cultivo utilizado (Tabla 11). La mayor tasa de supervivencia de ambas fases se observó en los cultivos enriquecidos con el medio Von Stosch

(Fig. 41). Para la población de gametofitos, se observó una supervivencia del 19,04 ( $\pm 0,84$ ) % a 8°C a una concentración de 20 ml.l<sup>-1</sup> (Fig. 41 A), mientras que en la población de tetrasporofitos se evidenció una mayor supervivencia siendo de 49,61 ( $\pm 2,45$ ) % a 8°C a una concentración de 40 ml.l<sup>-1</sup> (Fig. 41 A y C).

Como resultado de estos ensayos con dos medios de cultivo diferentes, el mayor número de talos vivos se evidenció a 8°C, aunque la mayor tasa de crecimiento fue a 16°C. El medio de cultivo óptimo para alcanzar mayores tamaños de talos, así como para su supervivencia (tanto tetrasporofitos como los gametofitos) fue el medio de enriquecimiento Von Stosch.

**Tabla 10. Estadísticas resumidas del análisis del GLMM.** Se probaron los efectos de temperatura, concentración de nutrientes y medio de enriquecimiento sobre el crecimiento de tetrasporofito y gametofito en el tiempo de incubación. Además, se mostró un crecimiento diferencial entre tetrasporofitos y gametofitos y sus tasas de crecimiento absoluto. gl, grados de libertad; valor p (< 0,05), probabilidad.

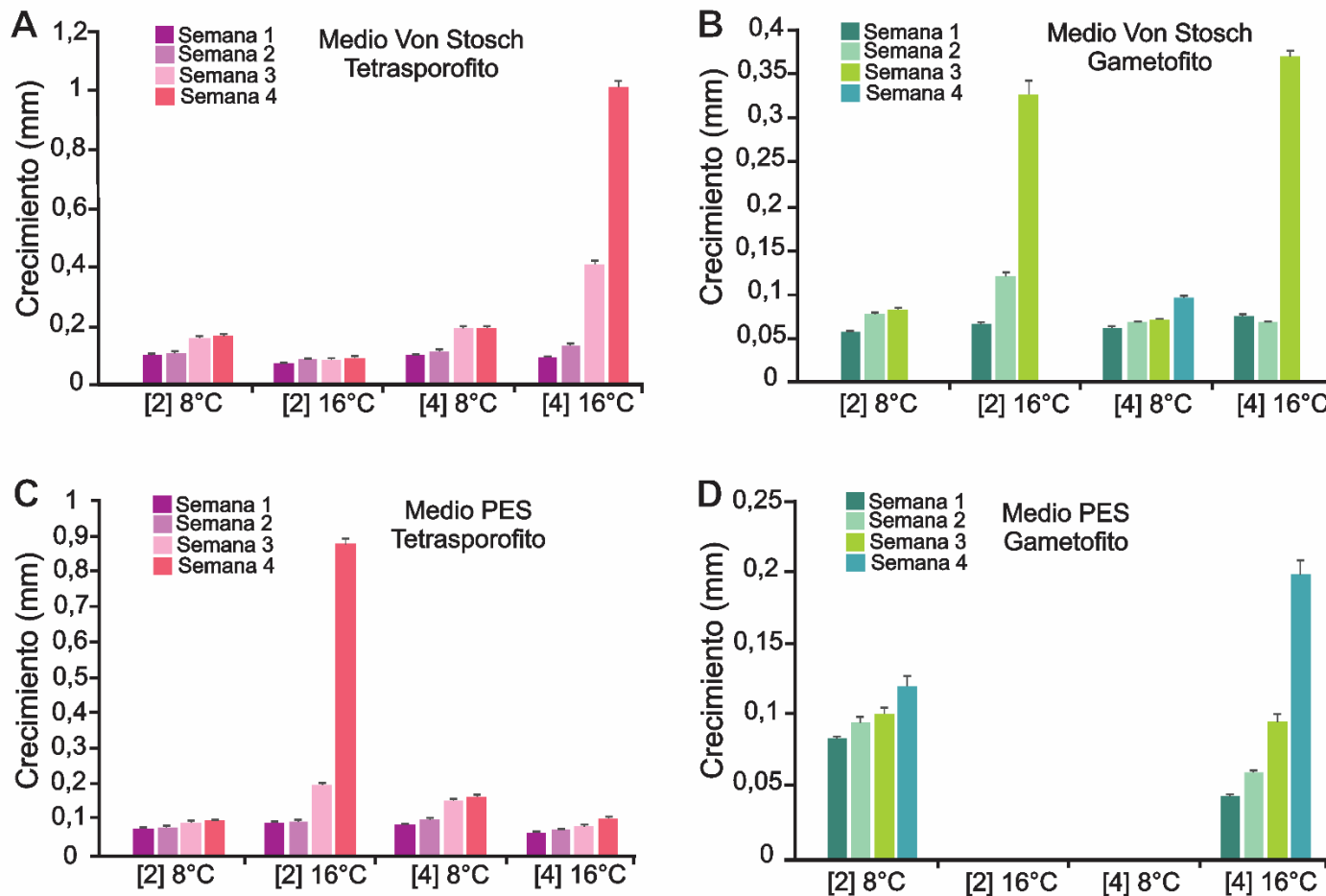
**Modelo: Crecimiento en longitud (mm)~Tiempo: Fase de talo + Tiempo: Temperatura + Tiempo: Nutrientes + Tiempo: Medio de cultivo (Pseudo-R<sup>2</sup> = 0,99)**

	gl	Estadístico (F)	Valor p
Temperatura	178	8,0898	0,0050
Nutrientes	178	5,0066	0,0265
Medio de cultivo	178	7,4183	0,0071
Fase del talo	178	5,2313	< 0,0001

**Tasa de Crecimiento (mm) (media ± error estándar)**

	PES		Von Stosch	
	<i>Tetrasporofitos</i>	<i>Gametofitos</i>	<i>Tetrasporofitos</i>	<i>Gametofitos</i>
[20 ml.l <sup>-1</sup> ] 8°C	0,081 ± 0,008	0,009 ± 0,001	0,016 ± 0,0008	0,008 ± 0,0004
[20 ml.l <sup>-1</sup> ] 16°C	3,165 ± 0,007	-	0,004 ± 0,0001	0,087 ± 0,0004
[40 ml.l <sup>-1</sup> ] 8°C	0,033 ± 0,001	-	0,023 ± 0,0008	0,009 ± 0,0002
[40 ml.l <sup>-1</sup> ] 16°C	0,162 ± 0,009	0,039 ± 0,002	0,229 ± 0,004	0,098 ± 0,0010

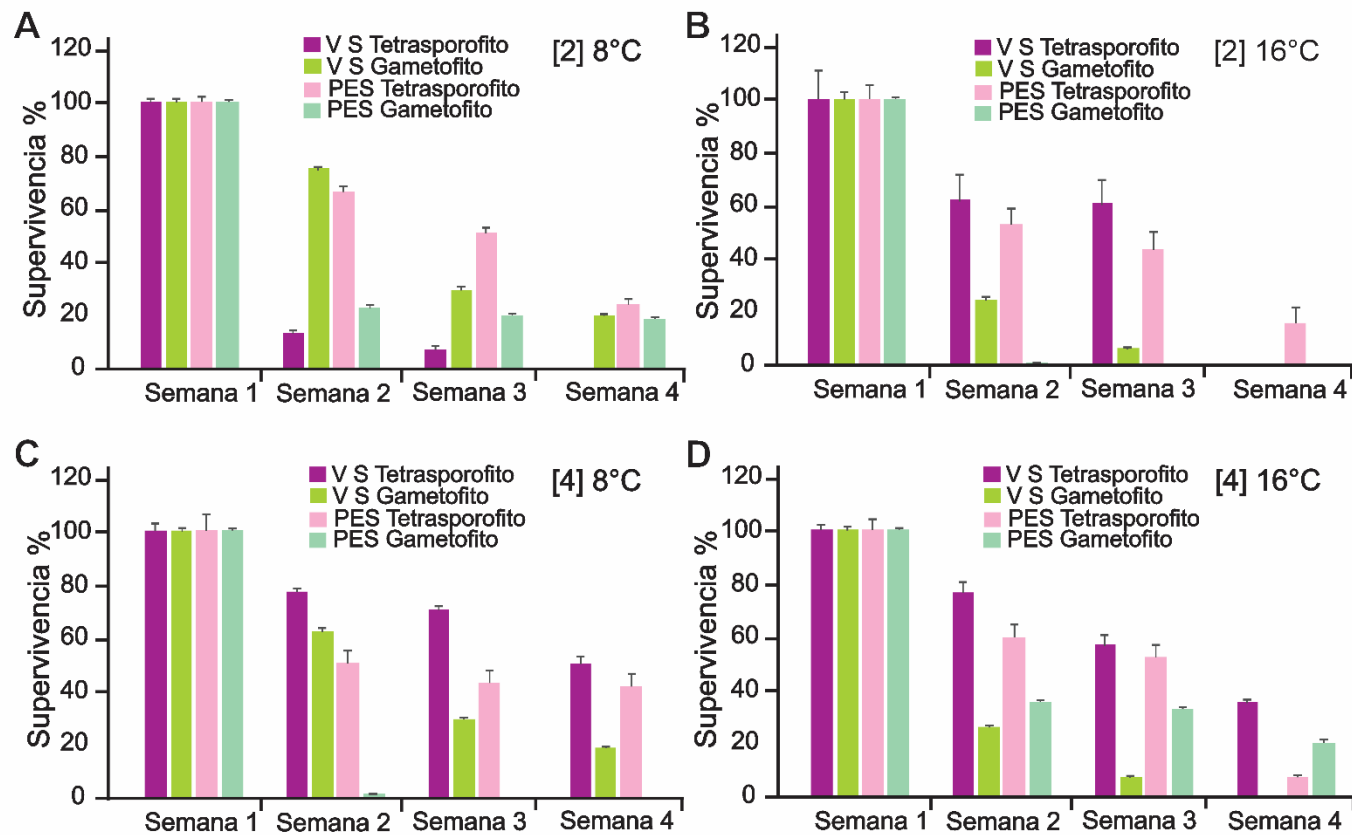




**Figura 40. Crecimiento máximo de talos tetrasporofitos y gametofitos en ensayos con dos medios de enriquecimiento: PES y Von Stosch. A y B.** Crecimiento en longitud a lo largo de cuatro semanas de los tetrasporofitos (A) y gametofitos (B) en medio enriquecido con Von Stosch. **C y D.** Crecimiento en longitud a lo largo de cuatro semanas de los tetrasporofitos (C) y los gametofitos (D) en medio enriquecido PES. Los valores representan la **media ± error estándar**. [2]= concentración de 20 ml.l<sup>-1</sup>, [4]= concentración de 40 ml.l<sup>-1</sup>. 8°C y 16° C son las temperaturas.

**Tabla 11. Resumen estadístico del análisis GLMM.** Se probaron los efectos de la temperatura, concentración de nutrientes, medio de enriquecimiento sobre la supervivencia de gametofitos y tetrasporofitos en el tiempo de incubación. gl, grados de libertad; valor p (< 0,05), probabilidad.

GLMM	gl	Estadístico ( $\chi^2$ )	p-value
Tiempo + Medio de cultivo + gametofitos - tetrasporofitos	4	10,4843	0.0330144
Concentración de nutrientes	16	237,7052	<0,0001
Temperatura	15	328,0851	<0,0001



**Figura 41. Supervivencia de talos tetrasporofíticos y gametofíticos en ensayos con dos medios de enriquecimiento: PES y Von Stosch.** Cada gráfico representa la supervivencia a lo largo de las cuatro semanas del ensayo en los diferentes tratamientos. **A.** Tratamiento con una concentración de nutrientes de 20 ml.l<sup>-1</sup> [2] y una temperatura de 8°C. **B.** Tratamiento con una concentración de nutrientes de 20 ml.l<sup>-1</sup> [2] y una temperatura de 16°C. **C.** Tratamiento con una concentración de nutrientes de 40 ml.l<sup>-1</sup> [4] y una temperatura de 8°C. **D.** Tratamiento con una concentración de nutrientes de 40 ml.l<sup>-1</sup> [4] y una temperatura de 16°C. Los valores representan la **media ± error estándar**.

#### **4.3.2. Evaluación del medio Von Stosch sobre el crecimiento vegetativo y supervivencia de tetrasporofitos y gametofitos**

La supervivencia de los talos en el tiempo de incubación fue influenciada por la temperatura del agua de mar y las concentraciones de nutrientes de Von Stosch. Esta triple interacción fue estadísticamente significativa (Tabla 12). Se observó una supervivencia diferencial entre los tetrasporofitos y los gametofitos (Fig. 42). La mayor supervivencia observada fue de 26,93 ( $\pm 0,6$ ) % para los tetrasporofitos y 24,49 ( $\pm 1,16$ ) % para los gametofitos (Fig. 43).

En el ensayo se observó una fuerte disminución de la supervivencia de los tetrasporofitos y los gametofitos, aunque en el caso de los gametofitos, el mayor porcentaje de individuos vivos correspondió a esporas no germinadas, que permanecían latentes a lo largo de las semanas de incubación en los diferentes tratamientos.

En los tetrasporofitos se pudo observar una marcada mortalidad que se produjo en los primeros días de la experiencia, manteniendo a partir del décimo día una supervivencia constante hasta finales de la experiencia. Por otra parte, en los talos gametofíticos, la mortalidad fue más equitativa a lo largo del tiempo, lo que dio lugar a curvas de supervivencia más constantes en el tiempo. La supervivencia fue significativamente diferente a diferentes temperaturas, así como a diferentes concentraciones de nutrientes (Fig. 42, Tabla 12).

Las condiciones óptimas de incubación para la supervivencia de los gametofitos fueron 24°C y 16 ml.l<sup>-1</sup> (Figs. 42 y 43 C), mientras que a 12°C y 32 ml.l<sup>-1</sup> fueron para los tetrasporofitos (Fig. 43 D), siendo 24,29 % y 24,34 % respectivamente.

Por otro lado, la supervivencia más baja en los talos tetraspóricos, se registró a 8°C con una concentración de Von Stosch de 16 ml.l<sup>-1</sup>, mientras que para los talos gametófitos fue a 12°C con una concentración de 4 ml.l<sup>-1</sup>, alcanzando valores de 2,08 (± 0,40) % y 5,51 (± 1,16) %, respectivamente (Fig. 43).

La tasa de crecimiento absoluto de los tetrasporofitos en el tiempo de incubación se vio influenciada por la interacción de las variables tanto temperatura como concentración de nutrientes (Tabla 13). Las diferentes temperaturas y concentraciones de Von Stosch se muestran en la Figura 44, indicando una interacción entre las temperaturas y las concentraciones de nutrientes con una diferencia significativa en el crecimiento vegetativo a lo largo del tiempo (Tabla 13).

Los tetrasporofitos cultivados a 24° C y una concentración de Von Stosch de 32 ml.l<sup>-1</sup> mostraron un crecimiento más rápido, mientras que los gametofitos incubados a 8° C y sin adición Von Stosch tuvieron la menor tasa de crecimiento (Tabla 13).

En la población de gametofitos no hubo diferencias significativas en la interacción de las variables durante el tiempo de incubación (Tabla 14). Esto coincide con el hecho de que el mayor porcentaje de gametofitos fueron tetrásporas no germinadas e inactivas. Sin embargo, aquellos talos que prosperaron y evidenciaron un crecimiento, éste fue mayor a 24°C con una tasa de 0,342 (± 0,06) mm<sup>2</sup> y a una concentración de nutrientes de 32 ml.l<sup>-1</sup> con una tasa promedio de 0,323 (± 0,06) mm<sup>2</sup>.

Por último, la tasa de crecimiento a lo largo del tiempo de ambas fases del talo al final del experimento, fue significativamente diferente ( $F_{(1;367)} = 38,2813$

$p < .0001$ ), siendo de  $0,42 (\pm 0,03) \text{ mm}^2$  para los tetrasporofitos y de  $0,58 (\pm 0,03) \text{ mm}^2$  para los gametofitos.

**Tabla 12. Resumen estadístico del análisis GLMM.** Se prueban los efectos de la temperatura y concentración de nutrientes sobre la supervivencia de tetrasporofitos y gametofitos en el tiempo de incubación. gl, grados de libertad; valor p (< 0,05), probabilidad.

<b>GLMM</b>	<b>gl</b>	<b>Estadístico (<math>\chi^2</math>)</b>	<b>p-value</b>
Fase de talo	6	4136,5	<0,0001
<i>Supervivencia del Gametofito</i>			
Tiempo	1	2069,07	<0,0001
Temperatura	2	580,73	<0,0001
Concentración de nutrientes	3	506,95	<0,0001
Tiempo + Concentración de nutrientes + Temperatura	6	128,07	<0,0001
<i>Supervivencia del Tetrasporofito</i>			
Tiempo	1	4253,897	<0,0001
Temperatura	2	79,598	<0,0001
Concentración de Nutrientes	3	44,114	<0,0001
Tiempo + Concentración de nutrientes + Temperatura	6	212,259	<0,0001

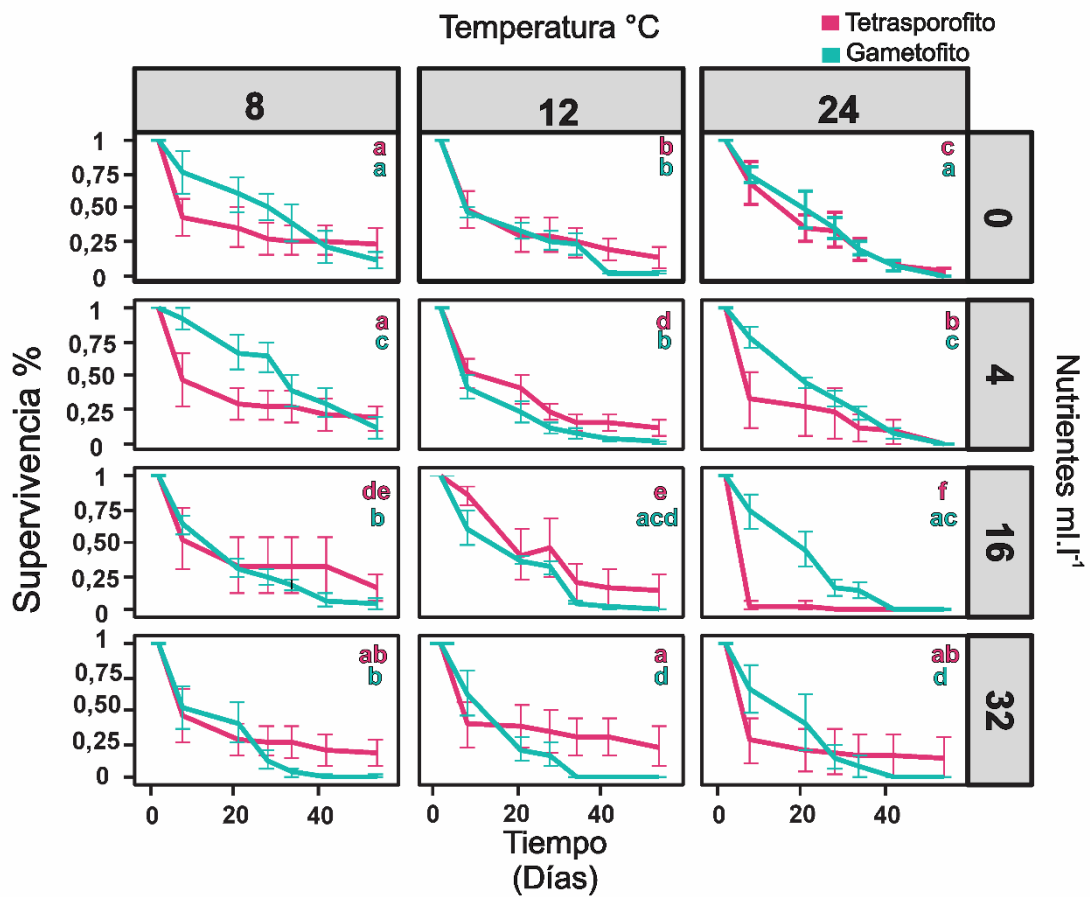
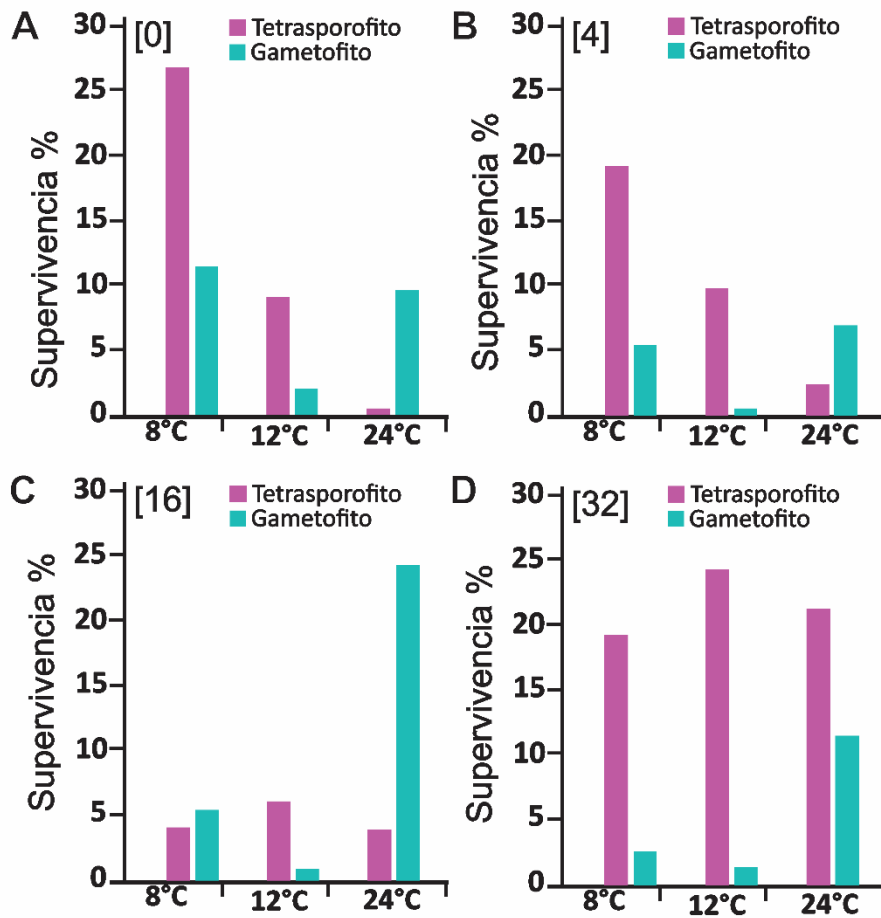


Figura 42. Supervivencia de talos tetrasporofíticos y gametofíticos de *M. obtusangula* con el medio de cultivo enriquecido con Von Stosch. Registro a lo largo de 54 días de incubación evidenciando en una triple interacción. Los valores representan la **media ± error estándar**.

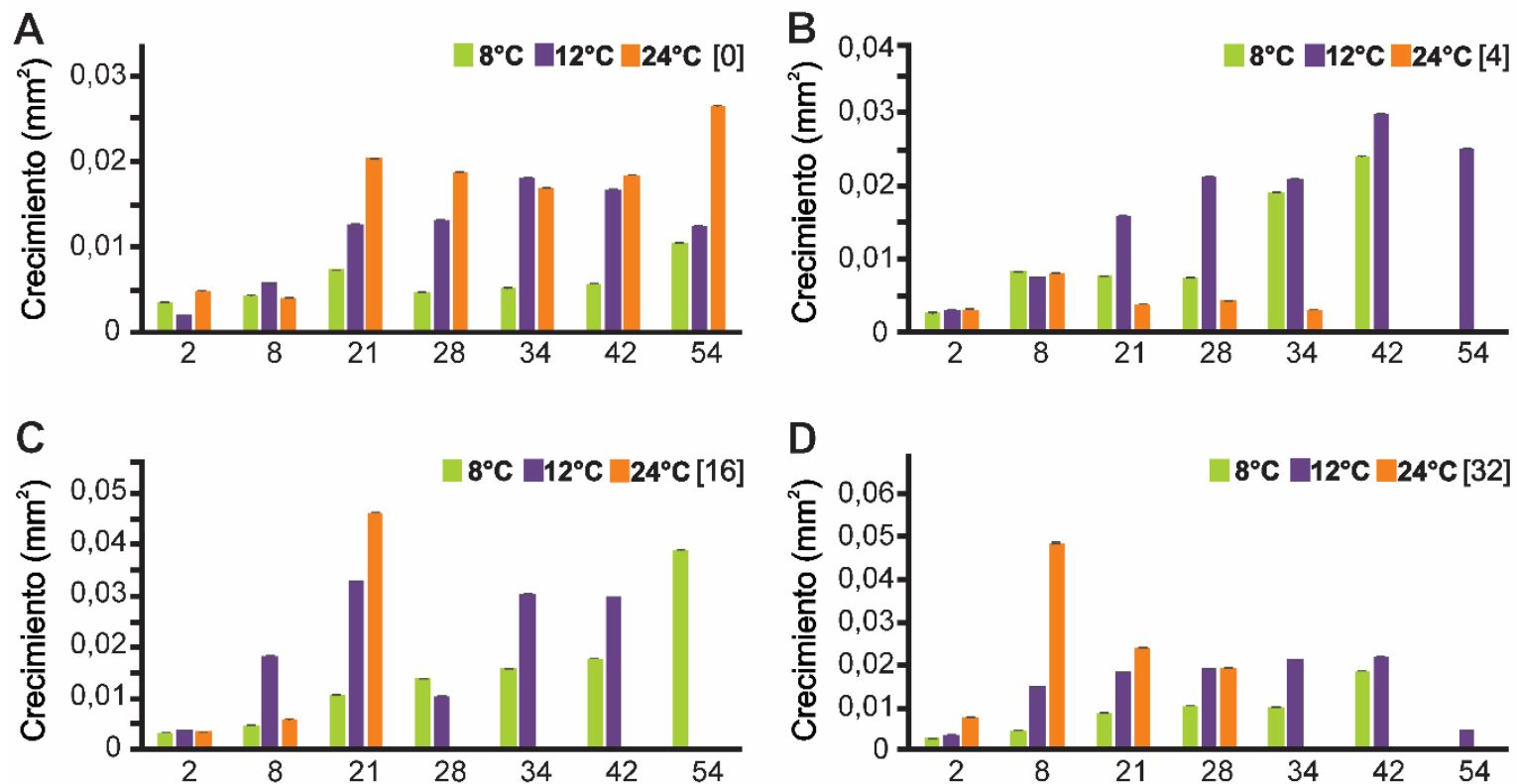




**Figura 43. Supervivencia (%)** con el medio de cultivo enriquecido con Von Stosch en las diferentes temperaturas (8°C, 12°C y 24°C). [0]: Sin medio de cultivo. [4] con una concentración de 4 ml.l<sup>-1</sup>. [16] con una concentración de 16 ml.l<sup>-1</sup>. [32] con una concentración de 32 ml.l<sup>-1</sup>.

**Tabla 13. Datos estadísticos analizados con modelos lineales de efectos mixtos.** Se probaron los efectos de temperatura y concentración de nutrientes en el tiempo de incubación sobre el crecimiento vegetativo de los tetrasporofitos de *M. obtusangula* y se muestran las tasas de crecimiento para cada condición. gl, grados de libertad; valor p (< 0,05), probabilidad. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

<b>Tetrasporofito</b>					
<b>Modelo: Crecimiento en área (mm<sup>2</sup>) ~Tiempo + Concentración de nutrientes + Temperatura +Tiempo: Concentración de nutrientes: Temperatura</b>					
<b>(Pseudo-R<sup>2</sup> = 0.99)</b>					
<b>Concentración (ml.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tasa de crecimiento (media ± error estándar)</b>	<b>gl</b>	<b>Estadístico (F)</b>	<b>p-valor</b>	<b>HSD</b>
<b>Temperatura °C</b>					
0-8	0,009 ± 0,003				a
0-12	0,042 ± 0,007				bd
0-24	0,045 ± 0,007				c
4-8	0,039 ± 0,008				b
4-12	0,061 ± 0,01				bd
4-24	-	175	6,4116	<0,001	ns
16-8	0,044 ± 0,009				bc
16-12	0,064 ± 0,016				cd
16-24	0,148 ± 0,068				bcd
32-8	0,025 ± 0,006				b
32-12	0,060 ± 0,013				d
32-24	0,203 ± 0,076				d



**Figura 44. Crecimiento del área (mm<sup>2</sup>) de los talos tetraspóricos en diferentes concentraciones de medio Von Stosch y temperaturas. a lo largo de 54 días de incubación A. Crecimiento llevado a cabo en [0]: Sin medio de cultivo. B. Crecimiento llevado a cabo en [4] con una concentración de 4 ml.l<sup>-1</sup>. C. Crecimiento llevado a cabo en [16] con una concentración de 16 ml.l<sup>-1</sup>. D. Crecimiento llevado a cabo en [32] con una concentración de 32 ml.l<sup>-1</sup>. 8°C, 12°C y 16°C las temperaturas. Los valores se expresaron como **media ± error estándar**.**

**Tabla 14. Resumen de la estadística con GLMM para talos gametofitos crecidos en medio enriquecido con Von Stosch.** Se probaron los efectos de la temperatura y concentración de nutrientes en el crecimiento a lo largo del tiempo. Se detallan las tasas de crecimiento para cada condición. gl: grados de libertad, valor p (< 0,05).

<b>Gametofito</b>				
<b>Modelo: Crecimiento en área (mm<sup>2</sup>) ~Tiempo: Concentración de nutrientes +</b>				
<b>Tiempo: Temperatura + Tiempo + Concentración de nutrientes + Temperatura</b>				
<b>(Pseudo-R<sup>2</sup> = 0,99)</b>				
<b>Concentración (ml.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tasa de crecimiento (media ± error estándar)</b>	<b>gl</b>	<b>Estadístico (F)</b>	<b>p - valor</b>
0	0,291 ± 0,02			
4	-	158	1,1091	0,3324
16	0,272 ± 0,04			
32	0,323 ± 0,06			
<b>Temperatura °C</b>	<b>Tasa de crecimiento (media ± error estándar)</b>	<b>gl</b>	<b>Estadístico (F)</b>	<b>p - valor</b>
8	0,291 ± 0,02			
12	0,286 ± 0,04	158	1,346	0,2662
24	0,342 ± 0,06			
<b>Tiempo</b>		158	3,2791	0,0721

## 5. Discusión

### 5.1. Ciclo de vida

*Meridionella obtusangula* presentó un típico ciclo de vida triplobionte haplodiplonte isomórfico, al igual que otras especies de los géneros *Cystoclonium*, *Hypnea*, *Calliblepharis*, *Rhodophyllis*, pertenecientes a la familia Cystocloniaceae (Valero *et al.* 1992, Womersley 1994, Thrainsson & Hommersand 2012, Díaz-Tapia *et al.* 2013). La presencia de carposporofitos de *M. obtusangula* indica que la reproducción sexual efectivamente ocurrió, a pesar de no haberse observado gametangios masculinos.

Asimismo, durante las experiencias de cultivo se logró identificar la presencia de gametofitos y tetrasporofitos, alcanzando estos últimos la maduración reproductiva que dio origen a talos haploides en condiciones controladas. La supervivencia de los individuos diploides fue considerablemente mayor que la de los individuos haploides, resultados similares en cultivos de *Agarophyton chilense* (C. J. Bird, McLachlan *et* E. C. Oliveira) Gurgel, J. N. Norris *et* Fredericq (*ex Gracilaria chilensis*), observados por Guillemin *et al.* (2008) y Oyarzún (2011).

En *M. obtusangula*, concordando con lo observado también en otras macroalgas se han observado rizoides formando parte de la morfología de sus estructuras de adherencia (Guillemin *et al.* 2008, Martin *et al.* 2011, Croce 2013). Asimismo, en cultivo se pudo observar la presencia de estolones a partir de los discos de fijación implicados en un mecanismo de reproducción asexual de *M. obtusangula*, donde se constató el crecimiento, tanto en talos tetraspóricos como

gametófitos de nuevos talos idénticos al progenitor, que podrían interpretarse como una estrategia de reproducción.

Uno de los aspectos interesantes de las algas rojas con ciclos de vida con alternancia de fases (una gametofítica haploide posiblemente dioica, una tetrasporofítica diploide y una tercera fase, la carposporofítica diploide que se desarrolla sobre el gametofito femenino), es suponer una alternancia de fases haplo-diplónticas en una proporción equilibrada (1:1) de gametofitos y tetrasporofitos (Santelices 1990, Salinas 1991, Melo & Neushul 1993, Ardito & Gómez 2005). No obstante, diversos estudios han señalado una marcada desproporción de fases siendo la tetraspórica más frecuente en varios órdenes de magnitud que la gametofítica (Santelices 1990, Maggs & Rico 1991, Salinas 1991, Juanes & Puente 1993, Rico & Guiry 1997, Ardito & Gómez 2005). *M. obtusangula* no ha sido la excepción, dado que se han registrado mayores cantidades de talos tetraspóricos que gametofíticos. Ante este fenómeno, diferentes hipótesis se han propuesto para explicar este desbalance en la proporción 1:1, como lo ha sido el caso de la reproducción vegetativa que ocurre en diferentes especies del género *Gelidium* (Montalva & Santelices 1981, Ardito & Gómez 2005) y como se ha observado en *M. obtusangula* por su reproducción asexual mediante estolón.

Por otra parte, en algunas poblaciones el gametofito puede ser capaz de producir nuevos gametofitos sin atravesar la fase esporofítica y viceversa (Müller & Salazar Orquera 1996, Reis & Yoneshigue-Valentin 2000; West *et al.* 2001, Croce 2013). Este comportamiento ha sido propuesto como otra de las hipótesis para explicar este desbalance entre poblaciones haploides y diploides

(Santelices 1990, Hawkes 1990, Anderson *et al.* 1991, Salinas 1991, Juanes & Puente 1993, Kain & Destombe 1995). En algunos tetrasporofitos de *M. obtusangula* recolectados en el ambiente natural se observaron propágulos de tipo polisporas que serían originadas por apomeiosis según Lobban & Harrison (1994). No obstante, si bien no se han desarrollado cultivos a partir de ellas, se podría asumir que este proceso sea una de las causas de ello, debido a la mayor ocurrencia en la naturaleza de tetrasporofitos por sobre los gametofitos. La ocurrencia de polisporangios ha sido reportada en varios géneros de Florideophyceae (Dixon 1977) y se ha sugerido que podrían representar un tipo ancestral de esporangio (Church 1919).

Se ha informado que los ciclos de vida de las algas rojas implican una alternancia entre gametofitos haploides (1N) y esporofitos diploides (2N) (Bodenbender & Schnetter 1990). Por consiguiente, los perfiles de contenido de ADN estudiados sobre *M. obtusangula* arrojaron para poblaciones mixtas de núcleos haploides y diploides distintos niveles de ADN de 1 C, 2 C y 4 C, establecidos para gametofitos (n) y tetrasporofitos y cistocarpos (2n) en otros estudios de algas (Kapraun *et al.* 1992, Kapraun & Nguyen 1994, Martin Martin *et al.* 2016). Sumado a ello, otra característica evidenciada en los estudios de ploidía de *M. obtusangula* es la presencia de núcleos poliploides típico del tejido gonimoblástico del carposporofito, evidenciados mediante valores elevados en niveles de C (Schnetter *et al.* 1984, Beutlich *et al.* 1990, Bodenbender & Schnetter 1990) hecho que coincide con otros estudios realizados para algas rojas, donde se caracterizan por la presencia de estos tipos de núcleos (Kapraun & Nguyen 1994, Martin Martin *et al.* 2016).

Es sabido que en algunas especies de algas rojas que tienen un ciclo de vida isomórfico donde tetrasporofitos como gametofitos son macroscópicamente similares, ambas generaciones pueden ser cosechadas y utilizadas para la extracción de productos bioactivos (Croce *et al.* 2015b, Charrier *et al.* 2017, Hughes 2018). *M. obtusangula* también presenta un ciclo vital isomórfico de tres fases con la posibilidad de que ambos talos macroscópicos sean explotables.

## **5.2. Germinación, crecimiento y supervivencia de esporas**

Los resultados muestran claramente que la temperatura, concentración de nutrientes y el medio de enriquecimiento tienen un efecto tanto sobre el crecimiento y la supervivencia de una o ambas fases del ciclo de vida de *M. obtusangula*. En estudios anteriores se ha documentado que el desarrollo de macroalgas se ve afectado por diferentes variables como el medio de cultivo seleccionado, la concentración del medio y la temperatura que influyen tanto en la liberación de las esporas como el éxito de la germinación y crecimiento en sus primeros estadios (Bulboa *et al.* 2001, Bogaert *et al.* 2016, Poza *et al.* 2018a, Arbaiza *et al.* 2019, Hughes *et al.* 2019, 2020).

En muchas algas rojas se sabe que las tetrásporas se liberan continuamente durante un período de hasta una semana, al contrario que las carpósporas que son liberadas al mismo tiempo en un período de sólo unas pocas horas (Santelices 1990). *M. obtusangula* presentó un patrón de liberación de esporas diferencial entre los talos tetraspóricos y cistocárpicos. Los primeros evidenciaron una liberación más lenta en el tiempo tanto en diversas temperaturas como en diferentes medios de cultivo, mientras que los segundos



realizaron una masiva liberación de esporas en el primer tiempo de observación mientras que fue aminorando su descarga con el paso de los días. Estudios similares fueron registrados sobre especímenes de *Gelidium* sp., los talos tetraspóricos mostraron una liberación paulatina a lo largo del tiempo, mientras que los talos cistocárpicos realizaron su liberación de carpósporas en las primeras horas de los ensayos (Santos & Duarte 1996). No obstante, evidencias sobre la especie *Sarcopeltis skottsbergii* mostró un comportamiento inverso (Hughes *et al.* 2020). Esta diferencia en el patrón de liberación de esporas podría implicar que para lograr un alto porcentaje de liberación de esporas y obtener un mayor rendimiento del material fértil, habría que mantener los talos tetraspóricos más días que los cistocárpicos. De esta manera, podría significar un mayor riesgo de contaminación por parte de organismos epífitos que suelen estar asociados a los talos fértiles, lo que constituye un problema importante al momento de cultivar las algas (Buschmann *et al.* 2001, Leonardi *et al.* 2006, Vairappan *et al.* 2007, Martin *et al.* 2011).

Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de esporas liberadas por área de talo entre los talos tetraspóricos y talos cistocárpicos, siendo estos últimos los que evidenciaron un mayor número de esporas liberadas para los diferentes ensayos. Este mismo comportamiento fue citado por Avila *et al.* (2011) para ejemplares de *Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützing, la cantidad de esporas liberadas por las estructuras reproductivas fue mayor durante la fase gametofítica que durante la esporofítica. Así mismo, ciertos estudios han relacionado este diferencial número de esporas liberado con la predominancia

de la fase esporofítica en los lechos naturales para algunas algas rojas (Santos & Duarte 1996, González *et al.* 1997, Avila *et al.* 2011).

Es sabido que una amplia variedad de factores fisiológicos y biológicos, como la variabilidad entre las algas, los requerimientos nutricionales, la fase del ciclo vital y la morfología, influyen en el crecimiento y la absorción de los nutrientes (Mansilla *et al.* 2006). En esta tesis, se destacó que, el crecimiento de los talos gametofitos y tetrasporofitos fue diferente en los dos medios de cultivo seleccionados, alcanzando un mayor tamaño en Von Stosch. Este medio de cultivo se utiliza ampliamente en el cultivo de algas rojas, evidenciando altas tasas de crecimiento como se observó por ejemplo en *Gracilaria cornea* J. Agardh (Ferreira *et al.* 2006) y *Polysiphonia morrowii* (Croce 2013). Este medio de cultivo descrito originalmente por Von Stosch (1963) y modificado por Guiry & Cunningham (1984), presenta una mayor concentración de vitaminas que el medio enriquecido PES (Provasoli 1968), lo que puede llegar a explicar el crecimiento diferencial.

Así mismo, es importante considerar en la composición del medio de PES, es decir, una solución de metales traza, ausente en Von Stosch, que tal vez no sea esencial para el crecimiento de *M. obtusangula*. En estudios sobre *Kappaphycus alvarezii*, cuando se cultivaron con el medio de PES se observó una disminución en la tasa de crecimiento, y estos efectos se atribuyeron al tampón tris (hidroximetil) aminometano presente en el medio (Paula *et al.* 2006). Este amortiguador presente en la preparación del medio PES, puede ser también una explicación para la respuesta del crecimiento diferencial de *M. obtusangula*.

En la naturaleza, en *M. obtusangula* se ha observado un fuerte predominio de la fase tetrasporofítica sobre la gametofítica, lo que indicaría que esta fase diploide tiene mayores ventajas adaptativas en esta zona latitudinal (ver *Cap. IV*). Esta observación puede estar en concordancia con el resultado observado en el cual se evidencia un mayor crecimiento de tetrasporofitos sobre gametofitos. Estudios similares sobre *Chondracanthus chamissoi* mostraron un crecimiento diferencial entre las fases del talo, con los gametofitos alcanzando mayores tamaños que los tetrasporofitos (Bulboa & Macchiavello 2001), en contraste con el crecimiento de *M. obtusangula*.

En cuanto a los regímenes de temperatura, el mayor crecimiento se evidenció en altas temperaturas, a 16°C y 24°C. Esta apreciación, es consistente con el predominio de los individuos encontrados durante el otoño y primavera en la costa norpatagónica (ver *Cap. IV*) donde las temperaturas fueron más altas, sobre todo en otoño. Asimismo, esta tolerancia térmica puede verse influida por condiciones de luz como la irradiación y la duración del día (Bjærke & Rueness 2004), factores que no se han probado en los experimentos.

Se han encontrado pruebas de crecimiento óptimo a altas temperaturas en el cultivo *in vitro* de otras algas rojas como, por ejemplo, *Chondracanthus chamissoi*, *Agarophyton chilense* (C.J. Bird, McLachlan et E.C. Oliveira) Gurgel, J.N. Norris et Fredericq, *Gigartina stellata* (Stackhouse) Batters, *Kappaphycus alvarezii*, *Sarcopeltis skottsbergii*, *Chondrus crispus* y *Sarcothalia crispata* (Chen & McLachlan 1972, Edding et al. 1987, Bulboa & Macchiavello 2001, Paula et al. 2001, Hughes 2019, 2020).

En este estudio, las pruebas de las concentraciones de nutrientes tanto con Von Stosch como con PES, revelaron una diferencia significativa en la tasa de crecimiento. Se observó el mayor crecimiento de tetrasporofitos y gametofitos en las concentraciones máximas de Von Stosch para los dos ensayos llevados a cabo.

En ambas experiencias hubo germinación de esporas y posterior crecimiento de los talos juveniles, aunque no llegaron a formar estructuras reproductivas como también fue observado en otras especies de algas rojas donde se atribuyó este fenómeno a la influencia otros factores que podrían afectar la reproducción, como temperatura, salinidad, fotoperiodo o irradiación (Ferrerira *et al.* 2006, Barufi *et al.* 2015, Adharini *et al.* 2016, Marambio *et al.* 2016).

Aunque los nuevos tetrasporofitos de *M. obtusangula* sobrevivieron en todas las temperaturas evaluadas (8, 12, 16, 24 °C), se observó que la supervivencia óptima se produjo a 8 °C. Sin embargo, para los gametofitos, la temperatura óptima de supervivencia fue de 24°C, no obstante, la mayoría de las tetrásporas se mantuvieron en estado de latencia. Muchos estudios señalan que la esporulación de tetrasporofitos de algas rojas está favorecida por altas temperaturas, aunque no hay información sobre la supervivencia y crecimiento de los talos hasta alcanzar el estado reproductivo (Guzmán-Urióstegui & Robledo 1999, Bjærke & Rueness 2004). Por otra parte, es posible que el estado de latencia de las tetrásporas, a altas temperaturas, sea un mecanismo de supervivencia en condiciones ambientales adversas. Se sabe que los estados microscópicos de las macroalgas son más tolerantes permitiendo la supervivencia de la especie en momentos donde las condiciones de luz,

temperatura y nutrientes son desfavorables (Hoffmann & Santelices 1991, Carney & Edwards 2006).

La supervivencia de las diferentes fases del ciclo de vida fue muy diferente al variar las concentraciones de nutrientes. Para los tetrasporofitos la supervivencia óptima ocurrió con una concentración de nutrientes entre 32 - 40 ml.l<sup>-1</sup>. En cambio, para gametofitos se logró entre 16 - 20 ml.l<sup>-1</sup>. Se ha observado en otras especies que los factores abióticos como la temperatura del agua de mar y las concentraciones de nutrientes actúan como reguladores del desarrollo de las algas e influyen en la supervivencia y la fenología (Santelices *et al.* 2003, Harley *et al.* 2012, Hughes 2018).

Este estudio es la primera aproximación en la comprensión del ciclo de vida de *M. obtusangula* y de los requerimientos en los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, lo cual es fundamental a la hora de plantear estrategias de aprovechamiento y protección de sus poblaciones naturales.

**CAPÍTULO IV**

**FENOLOGÍA Y DINÁMICA POBLACIONAL**

**MACROALGAS ACOMPAÑANTES**



## **1. Introducción**

Las macroalgas constituyen uno de los elementos más importantes de las comunidades marinas bentónicas, son consideradas organismos formadores de hábitats, propicios para el asentamiento y refugio de otras especies (Round 1984, Duggins & Eckman 1994, Bustamante & Branch 1996). Las comunidades macroalgales juegan un rol fundamental en la estructuración y funcionamiento de los ecosistemas marinos (Nielsen 2007) y por ello, el estudio de su dinámica poblacional y su relación con otras comunidades.

### **1.1. Fenología de macroalgas**

La fenología de las macroalgas ha sido definida por Espinoza-Avalos (2005) como el momento en que se producen eventos biológicos recurrentes, así como las causas subyacentes del equilibrio temporal con respecto a factores bióticos y abióticos. Por lo tanto, la fenología representa de esta manera una herramienta muy útil para el entendimiento de la ecología de las especies de macroalgas (Dougherty *et al.* 1994). Particularmente, los estudios fenológicos de una especie analizan proporciones de gametofitos y esporofitos conjuntamente con parámetros biológicos con cierta periodicidad, tales como la densidad y tamaño de talos por unidad de superficie, reclutamiento de propágulos, entre muchos otros (Avila *et al.* 1997, Kinlan *et al.* 2003, Elatouani *et al.* 2021).

En diferentes especies de macroalgas rojas han sido realizados diferentes estudios que describen la fenología y la biología reproductiva como por ejemplo

en *Hypnea* spp. (Shameel *et al.* 2012, Caires *et al.* 2013), *Chondracanthus tenellus* (Harvey) Hommersand (Hayakawa *et al.* 2017), *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss (Surget *et al.* 2017), *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Royer *et al.* 2019) entre otras. Estos estudios han permitido constatar que la fenología está fuertemente influenciada por factores ambientales.

## **1.2. Dinámica poblacional y comunidades macroalgales acompañantes**

Se ha señalado anteriormente que la variabilidad de factores físicos como salinidad, nutrientes, turbidez y sedimentación pueden tener un fuerte efecto e influenciar de diferente manera a las comunidades de macroalgas (Thomsen *et al.* 2007, Weinberger *et al.* 2008, Nylund *et al.* 2011, Nejrup & Pedersen 2012, Roleda *et al.* 2012, Gonzalez *et al.* 2013). Asimismo, otros factores como temperatura del agua de mar, fotoperiodo, intensidad de los vientos traducida en el movimiento del agua, han sido identificados como estructurantes de la distribución y de la reproducción de las macroalgas marinas. Particularmente, el movimiento del agua producto de la acción de los vientos puede provocar el desprendimiento de gran número de talos enteros o porciones de algas como consecuencia de un fuerte oleaje (Espinoza-Avalos 2005, Carney & Edwards 2006, Vermeij *et al.* 2010, Linares *et al.* 2012).

Los factores biológicos particularmente la competencia por los recursos y la herbivoría ejercen fuerte presiones sobre las comunidades macroalgales, las cuales han generado variedades de adaptaciones estructurales, como químicas, determinantes en el ciclo de vida, en la dinámica poblacional y en la supervivencia (Istock 1967, Lubchenco & Cubit 1980).



La alternancia de generaciones isomórficas o heteromórficas características de los ciclos de vida de las algas ha sido interpretada como una adaptación a diferentes condiciones ecológicas, como consecuencia a la fuerte presión de factores físicos y biológicos (Littler & Littler 1980, Valero *et al.* 1992, Swanson & Druehl 2000). También se ha señalado que la presencia de talos isomórficos en una determinada especie de macroalga, puede presentar diferencias en la supervivencia y en el uso de los recursos, indicando que ecológicamente no se comportan de la misma manera (Dyck & DeWreede 1995, Hughes & Otto 1999). Considerando lo anterior, el estudio de la relación de los factores físicos y biológicos con la dinámica poblacional de una determinada especie permite la caracterización y entendimiento de su comportamiento en un ambiente interactuante.

## **2. Objetivos**

- Analizar la fenología vegetativa y reproductiva de *M. obtusangula*.
- Establecer la dinámica poblacional de *M. obtusangula* relacionándola con variaciones ambientales.
- Analizar la comunidad de macroalgas acompañantes de *M. obtusangula* y su dinámica temporal.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Toma y procesamiento de muestras**

La población de *M. obtusangula* de Las Grutas se estudió estacionalmente desde el otoño 2017 hasta el verano 2019. Las colectas de los ejemplares se realizaron en la zona submareal mediante buceo autónomo. En cada muestreo, se distribuyeron 20 cuadrantes (de 50 cm x 50 cm de lado) al azar y se recolectó la totalidad de talos macroalgales arraigados dentro de ellos.

#### **3.2. Estudios poblacionales de *M. obtusangula* y de la comunidad macroalgal acompañante**

Los talos colectados de *M. obtusangula* fueron clasificados en:

- talos tetraspóricos caracterizados por la presencia de tetrasporangios,
- talos cistocárpicos portadores de carposporangios y,
- talos juveniles no reproductivos, sin formación evidente de estructuras reproductivas.

La abundancia de *M. obtusangula* se estimó por medio del recuento de talos individuales ( $n^{\circ}$  talos.m<sup>-2</sup>) y en términos del peso escurrido g.m<sup>-2</sup> de los mismos. Los datos fueron expresados media  $\pm$  error estándar.

La composición de las macroalgas acompañantes de *M. obtusangula* fue determinada por identificación a nivel genérico y/o específico de los talos presentes. La determinación de la abundancia de esta comunidad incluyendo los

talos de *M. obtusangula*, se realizó por estimación del peso seco ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ ) de los diferentes organismos observados.

### **3.3. Análisis de parámetros ambientales**

Los parámetros ambientales considerados en los análisis fueron: temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidad del viento. Los datos de temperatura y fotoperiodo fueron proporcionados por la empresa de Buceo Cota-Cero ubicado en Las Grutas. Los registros de la intensidad del viento fueron cedidos por el Servicio Meteorológico Nacional. Los datos considerados en los análisis de este capítulo de tesis se correspondieron al periodo de estudio.

### **3.4. Variables consideradas en los estudios fenológicos**

En la totalidad de talos de talos tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles de *M. obtusangula* recolectados en cada cuadrante, se determinaron las siguientes variables morfométricas:

- a. *Longitud del talo* (cm): medida desde la base de fijación hasta el ápice.
- b. *Grosor máximo del talo* (mm): en sección transversal, para su medición se empleó un trozo de hilo que envolvió todas las ramificaciones a la altura más gruesa del talo.
- c. *Peso escurrido del talo* (g): se dejó secar el talo sobre papel absorbente durante 20 minutos para evaporar el excedente de agua y luego se pesó en balanza analítica de precisión 0,001 g.

#### **3.4.1. Determinación de la eficiencia reproductiva**

La eficiencia reproductiva de *M. obtusangula* fue evaluada estacionalmente en otoño, invierno y primavera, en un periodo comprendido entre julio de 2017 a octubre de 2018. Durante los meses de verano no se registraron talos de *M. obtusangula* en la naturaleza, por lo cual no se contaron con datos para los respectivos análisis.

Además, se estimaron las siguientes variables: densidad y área de estructuras reproductivas presentes: tetrasporangios y cistocarpos. Para ello, en cada muestreo se recolectaron al azar, diez talos cistocárpicos y diez talos tetraspóricos de *M. obtusangula* y se transportaron al laboratorio donde se realizaron las estimaciones indicadas anteriormente.

#### **3.4.1.1 Estimación de la densidad de cistocarpos y tetrasporangios**

La estimación de la densidad de los cistocarpos y tetrasporangios se realizó mediante recuento en submuestras de talos de *M. obtusangula*. En cada talo reproductivo de *M. obtusangula* se seleccionó al azar 3 porciones de 1 cm de longitud con un área aproximada de  $5,26 (\pm 0,96) \text{ mm}^2$ , bajo microscopio estereoscópico. En cada submuestra se contabilizaron las estructuras reproductivas, y los recuentos fueron expresados como densidad de cistocarpos/tetrasporangios/10  $\text{mm}^2$  de talo.

Conjuntamente, se estableció una clasificación de los cistocarpos y tetrasporangios según su estado de maduración. Los cistocárpicos y tetrasporangios se clasificaron en maduros e inmaduros. Los cistocarpos maduros se caracterizaron por presentar un aspecto globoso protruyente, mientras que en los inmaduros se evidenciaron la masa de carpósporas por

transparencia, sin globosa protrusión notoria. Por otro lado, los tetrasporangios maduros fueron los que presentaron septos esporangiales bien marcados y los inmaduros caracterizados por la ausencia de divisiones tetrasporangiales evidentes.

#### **3.4.1.2. Estimación del área de cistocarpos y tetrasporangios**

El área de los cistocarpos y de los tetrasporangios se analizó en tres submuestras tomadas de cada talo de *M. obtusangula*. Cada submuestra correspondió a una porción de 1 cm con un área aproximada de 5,26 ( $\pm$  0,96) mm<sup>2</sup> de las ramas terminales, conteniendo cistocarpos o tetrasporangios. La toma de las submuestra se realizó bajo microscopio estereoscópico. El área de las estructuras reproductivas se estimó por medio de fotomicrografías tomadas al MO y posteriormente analizados con el software *ImageJ* 1.46v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

### **3.5. Análisis estadísticos de los datos**

#### **3.5.1. Análisis de parámetros poblacionales y fenológicos**

Cada conjunto de datos se examinó para determinar la normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk y se probó la homocedasticidad de la varianza usando el test de Barlett. En el caso de la variable: peso de los talos, los datos fueron transformados empleando la función logaritmo natural ( $Ln$ ) para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Para evaluar las diferencias en la población de *M. obtusangula* respecto a los parámetros vegetativos y reproductivos registrados a lo largo de las estaciones, se analizaron los datos mediante análisis de varianza (ANOVA) por comparaciones múltiples utilizando el test de Tukey (HSD).

Para determinar posibles relaciones entre las variables poblacionales (densidad y abundancia), vegetativas (longitud, peso y grosor del talo) de los talos tetraspóricos y de los cistocárpicos con las variables ambientales (temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidad del viento), se realizó un análisis de la varianza multivariado. Para tal propósito, se realizaron análisis de componentes principales (PCA) y se determinaron coeficientes de correlación de Spearman con previa estandarización de los datos.

### **3.5.2. Análisis de la comunidad de macroalgas acompañantes y su relación con *M. obtusangula***

Una vez comprobados los supuestos de normalidad y homocedasticidad se realizaron tests de ANOVA y comparaciones múltiples mediante el test de Tukey, para determinar posibles diferencias entre el peso seco estimado en las macroalgas acompañante de *M. obtusangula* en un periodo bianual. Posteriormente, se realizaron análisis multivariados con el propósito de describir la variabilidad en el ensamble de macroalgas acompañantes durante las estaciones a lo largo de los dos años de muestreo. Para ello, los datos se estandarizaron y se transformaron previamente utilizando la función raíz cuadrada ( $\sqrt{v}$ ). Luego se realizó un análisis de escalonamiento multidimensional no métrico (nMDS) usando el índice de similitud de Bray-Curtis con 999

permutaciones (Bray & Curtis 1957, Clarke & Warwick 2001). Se utilizaron los porcentajes de similitud (SIMPER) para explicar cuáles especies de macroalgas caracterizaron cada grupo.

Para analizar las relaciones entre la dinámica de la comunidad de macroalgas acompañante en relación a la abundancia de *M. obtusangula* conjunto con las variables ambientales a lo largo de las estaciones, se efectuó un análisis de correspondencia canónica (CCA) (Ter Braak 1994) en base a los datos de abundancia de especies, variables ambientales (temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidad del viento) y la abundancia de *M. obtusangula*. Para la selección de los diferentes métodos de ordenamiento (PCA, nMDS, CCA), previamente se determinó si el *pool* de datos presentó respuesta lineal (monotónica) o respuesta unimodal (distribución en campana), asumiendo una distribución normal y usando la desviación estándar como medida del tipo de respuesta (Espinosa 2016). Para ello, fue utilizado el paquete de análisis “Vegan”, función “decorana” en R y para cada uno de los ordenamientos se utilizaron las diferentes funciones dentro del paquete “Vegan” (Oksanen *et al.* 2013).

En todos los casos, los análisis fueron ejecutados con un nivel de significancia de 0,05, utilizando los programas estadísticos R 4.0.3 (R Core Team 2020) y PRIMER (Clarke & Warwick 2001).

## 4. Resultados

### 4.1. Fenología

#### 4.1.1. Relación entre caracteres morfométricos de los talos y su dinámica a temporal.

##### a. Longitud de los talos

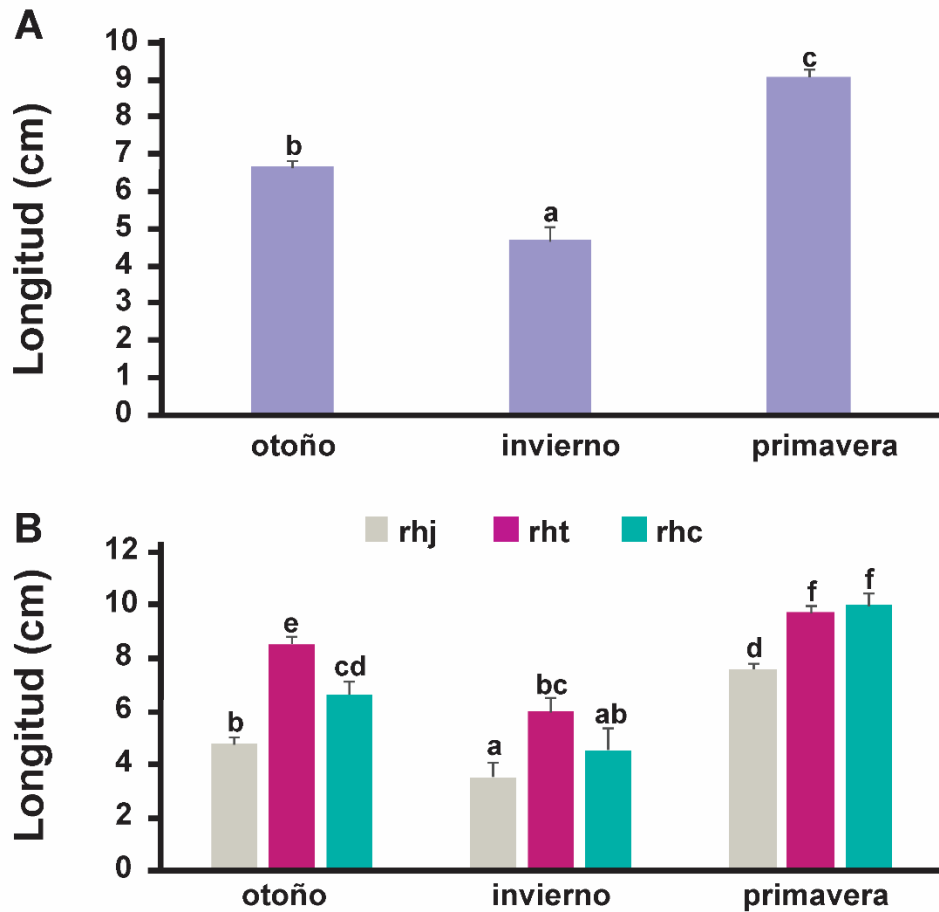
Cuando se analizó la longitud de los talos de *M. obtusangula* a lo largo de las estaciones se pudieron encontrar diferencias significativas ( $F_{(2; 1422)} = 68,65$ ;  $p < 0,001$ ). Los talos fueron más largos durante la primavera alcanzando valores medios de  $9,08 (\pm 0,32)$  cm, en otoño longitudes medias de  $6,64 (\pm 0,2)$  cm y menores en invierno ( $4,67 (\pm 0,38)$  cm) (Fig. 45 A).

Con respecto a los diferentes tipos de talos reproductivos, también se encontraron diferencias significativas al comparar sus longitudes ( $F_{(2; 1422)} = 41,22$ ;  $p > 0,0001$ ). Los talos tetraspóricos tuvieron mayor longitud, alcanzando valores medios de  $8,07 (\pm 0,21)$  cm. Los talos cistocárpicos presentaron longitudes medias de  $7,05 (\pm 0,36)$  cm, mientras que los talos juveniles fueron los de menor longitud, alcanzando  $5,28 (\pm 0,22)$  cm.

Cuando se analizó la longitud de los talos de *M. obtusangula* discriminados por su estado reproductivo, a lo largo de las estaciones muestreadas, se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas ( $F_{(4; 1422)} = 3,23$ ;  $p = 0,0119$ ). En otoño los tres tipos de talos evidenciaron longitudes diferentes, los tetraspóricos fueron mayores, de longitudes intermedias los cistocárpicos y menores los juveniles. En invierno también los talos tetraspóricos fueron de mayor longitud, pero los cistocárpicos y juveniles no se diferenciaron. En primavera los talos reproductivos registraron mayores valores y los juveniles



continuaron siendo de menor longitud, aunque comparativamente alcanzaron valores mayores que en otoño e invierno (Fig. 45 B).



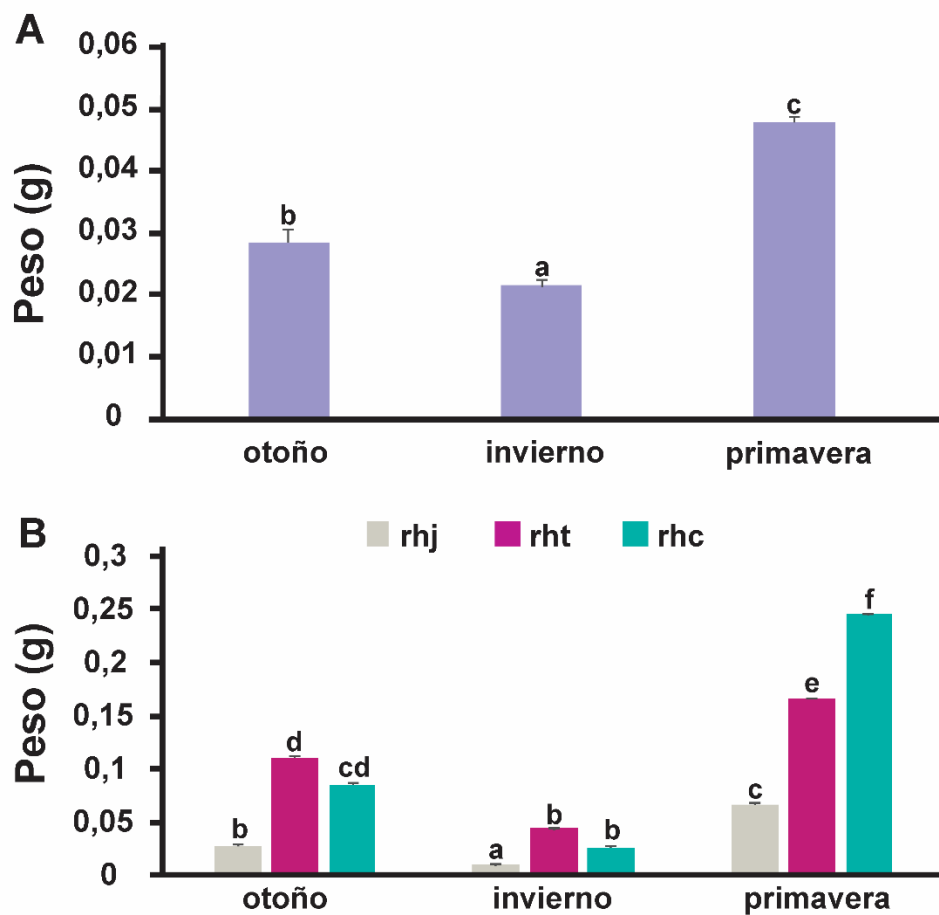
**Figura 45. *Meridionella obtusangula*. Variaciones temporales de la longitud de los talos.** **A.** Longitud (cm) de talos, sin discriminar etapa reproductiva. **B.** Longitud (cm) de los diferentes estados reproductivos de los talos. Valores expresados como la **media ± error estándar**. Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) están indicadas por diferentes letras usando el test HSD Tukey. rhj: talos juveniles, rht: talos tetraspóricos, rhc: talos cistocárpicos.

## **b. Peso de los talos**

El peso de los talos presentó diferencias estacionales significativas ( $F_{(2; 1422)} = 17,78; p < 0,001$ ). En primavera se registraron los mayores valores ( $0,047 (\pm 0,001)$  g), mientras que en otoño e invierno los menores ( $0,028 (\pm 0,002)$  g y  $0,021 (\pm 0,001)$  g.), respectivamente (Fig. 46 A).

Cuando se diferenciaron los tres tipos de talos en tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles, se pudieron detectar diferencias significativas entre ellos ( $F_{(2;1428)} = 93,34; p < 0,001$ ). Los resultados indicaron que los estadios reproductivos tetraspóricos y cistocárpicos fueron similares en peso, alcanzando  $0,12 (\pm 0,002)$  g y  $0,10 (\pm 0,001)$  g. respectivamente, diferenciándose de los talos juveniles que presentaron valores considerablemente más bajos de  $0,03 (\pm 0,001)$  g.

Asimismo, se encontraron diferencias temporales significativas en el peso de los distintos talos ( $F_{(2; 1422)} = 3,89; p < 0,001$ ). Tanto en otoño, invierno y primavera, los talos reproductivos fueron más pesados que los juveniles y al comparar talos reproductivos entre sí, se observa que en otoño e invierno sus pesos no se diferenciaron estadísticamente. Sin embargo, en primavera, los talos cistocárpicos fueron más pesados ( $0,24 (\pm 0,01)$  g.), respecto a los tetraspóricos ( $0,16 (\pm 0,02)$  g.) (Fig. 46 B). También en primavera los talos juveniles alcanzaron el mayor peso registrado ( $0,065 (\pm 0,002)$  g.) (Fig. 46 B).

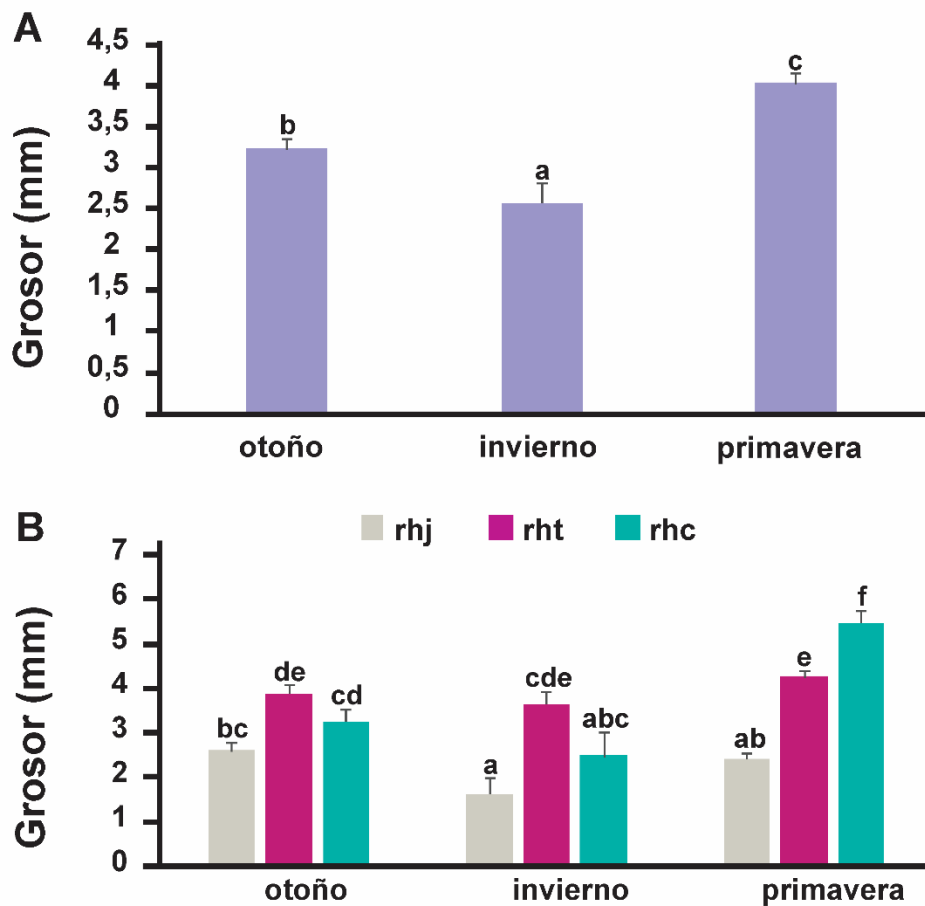


**Figura 46. *Meridionella obtusangula*. Variaciones temporales del peso de los talos. A.** Peso (g) de talos, sin discriminar etapa reproductiva. **B.** Peso (g) de los diferentes estados reproductivos de los talos. Valores expresados como la **media  $\pm$  error estándar**. Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) están indicadas por diferentes letras usando el test HSD Tukey. rhj: talos juveniles, rht: talos tetraspóricos, rhc: talos cistocápicos.

### c. Grosor de los talos

El grosor de los talos evidenció diferencias estacionales significativas ( $F_{(2; 1421)} = 18,56; p < 0,001$ ). En primavera los talos de *M. obtusangula* presentaron mayor grosor ( $4,03 \pm 0,13$  mm), en otoño alcanzaron grosores medios ( $3,23 \pm 0,14$  mm) mientras que en invierno se registraron los menores valores ( $2,56 \pm 0,24$  mm) (Fig. 47 A). Estos resultados coincidieron con que aquellos talos con mayor grosor, presentaron mayor número de ramas secundarias y terciarias. Asimismo, se registraron diferencias entre los tres tipos de talos ( $F_{(2;1421)} = 41,09; p < 0,001$ ), los juveniles que registraron valores promedios de  $2,19 (\pm 0,14)$  mm con respecto a los tetraspóricos y cistocárpicos que presentaron grosores similares de  $3,91 (\pm 0,14)$  y  $3,70 (\pm 0,23)$  mm, respectivamente.

Respecto las estaciones analizadas, el grosor de los distintos talos evidenciaron diferencias significativas ( $F_{(4; 1421)} = 7,3; p < 0,001$ ). En otoño e invierno los grosores de los talos no se diferenciaron, no obstante, en primavera se observó una clara diferenciación, presentando valores menores los juveniles ( $2,4 (\pm 0,14)$  mm), intermedios los tetraspóricos ( $4,24 (\pm 0,16)$  mm) y mayores los talos cistocárpicos ( $5,44 (\pm 0,31)$  mm) (Fig. 47 B).



**Figura 47. *Meridionella obtusangula*. Variaciones temporales del grosor de los talos. A.** Grosor (mm) de talos, sin discriminar etapa reproductiva. **B.** Grosor (mm) de los diferentes estados reproductivos de los talos. Valores expresados como **media ± error estándar**. Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) están indicadas por diferentes letras usando el test HSD Tukey. **rhj**: talos juveniles, **rht**: talos tetraspóricos, **rhc**: talos cistocárpicos.

## 4.1.2. Evaluación de la eficiencia reproductiva

### 4.1.2.1. Eficiencia reproductiva de talos tetraspóricos

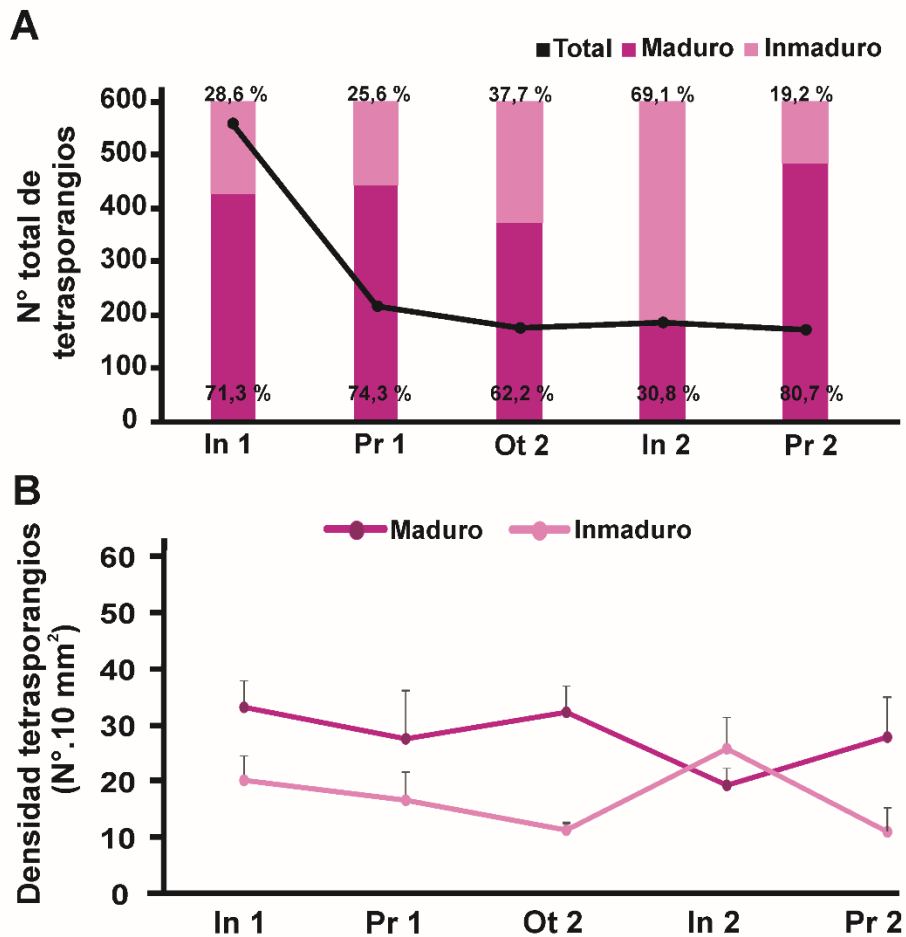
#### a. Densidad de tetrasporangios

La densidad total de tetrasporangios evaluada a lo largo de las estaciones en un ciclo de dos años se mantuvo constante, no encontrándose diferencias significativas ( $p = 0,84$ ). Sin embargo, al final del estudio, la densidad media total de tetrasporangios maduros e inmaduros fue significativamente diferente ( $F_{(1;38)} = 5,97$ ;  $p = 0,0193$ ), siendo los esporangios maduros más abundantes que los inmaduros, registrándose 28,07 ( $\pm 3,17$ ) y 16,98 ( $\pm 3,25$ ) tetrasporangios cada 10 mm<sup>2</sup> de superficie de talo, respectivamente. En el primer año, la proporción de los tetrasporangios maduros fue mayor que la de inmaduros, disminuyendo hacia el segundo invierno y volviendo a aumentar hacia la primavera siguiente (Fig. 48 A).

Al analizar por separado los diferentes estadios de maduración, la densidad de tetrasporangios maduros sobre los talos de *M. obtusangula* a lo largo de las estaciones, no se encontraron diferencias estadísticamente ( $p = 0,435$ ), no obstante, se pudo observar que la densidad (en valores absolutos) fue mayor en invierno del primer período muestreado con 33,21 ( $\pm 4,07$ ) tetrasporangios cada 10 mm<sup>2</sup> y en otoño del segundo con 27,7 ( $\pm 5,28$ ) tetrasporangios cada 10 mm<sup>2</sup> (Fig. 48 B). Asimismo, con respecto a la densidad de los tetrasporangios inmaduros, tampoco se encontraron diferencias estadísticas ( $p = 0,636$ ), sin embargo, se registraron mayores valores absolutos medios en ambos inviernos,

registrando para el primer y segundo año 20 ( $\pm 4,96$ ) y 25,8 ( $\pm 6,28$ ) tetrasporangios inmaduros cada  $10 \text{ mm}^{-2}$ , respectivamente (Fig. 48 B).



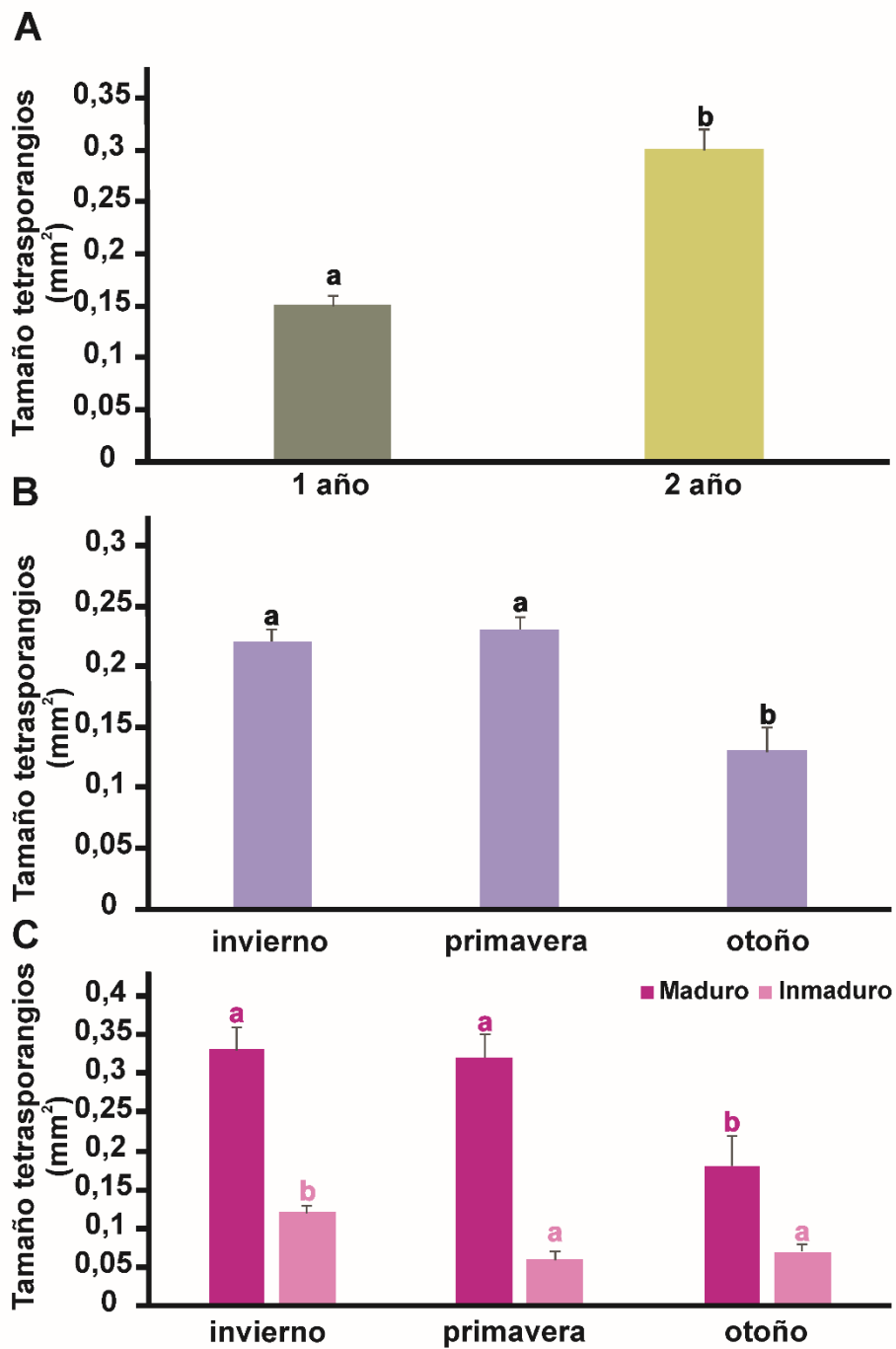


**Figura 48. *M. obtusangula*. Variaciones temporales en las estructuras reproductivas. A.** Número total de tetrasporangios (gráfico de líneas) y proporción de estructuras maduras e inmaduras (gráfico de barras). **B.** Densidad promedio de tetrasporangios ( $N^{\circ} \cdot 10 \text{ mm}^{-2}$ ) (expresados como **media  $\pm$  error estándar**). **In:** invierno, **Pr:** primavera, **Ot:** otoño. **1:** Primer año, **2:** Segundo año.

## **b. Tamaño de tetrasporangios**

El tamaño de los tetrasporangios, considerando su totalidad, entre los dos años analizados ( $F_{(1; 40)} = 20,98$ ,  $p < 0,0001$ ) y a lo largo de las estaciones ( $F_{(1;40)} = 5,26$ ,  $p < 0,0001$ ) fue estadísticamente diferente. El valor promedio del área de los tetrasporangios en el primer año fue de  $0,15 (\pm 0,01) \text{ mm}^2$ , mientras que  $0,30 (\pm 0,02) \text{ mm}^2$  fue para el segundo (Fig. 49 A). Con respecto a las estaciones, en invierno y primavera el tamaño medio de los tetrasporangios fue similar, registrándose valores de  $0,23 (\pm 0,01)$  y  $0,22 (\pm 0,01) \text{ mm}^2$ , respectivamente, mientras que en otoño se caracterizó por presentar tetrasporangios con un tamaño promedio de  $0,13 (\pm 0,02) \text{ mm}^2$  (Fig. 49 B).

Al discriminar el área de los tetrasporangios maduros e inmaduros, se pudo determinar diferencias significativas entre sus valores medios ( $F_{(1; 40)} = 84,25$ ;  $p < 0,0001$ ). Los tetrasporangios maduros presentaron un área mayor ( $0,30 (\pm 0,015) \text{ mm}^2$ ) respecto a los inmaduros ( $0,09 (\pm 0,016) \text{ mm}^2$ ). Además, los tetrasporangios maduros registraron diferencias significativas entre sus tamaños a lo largo de las estaciones ( $F_{(2; 22)} = 3,15$ ;  $p = 0,0498$ ), registrando valores similares para el invierno y primavera ( $0,33 (\pm 0,03)$  y  $0,32 (\pm 0,03) \text{ mm}^2$ , respectivamente) y tamaños menores para el otoño ( $0,18 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 49 C). En los tetrasporangios inmaduros, también se encontraron diferencias significativas en su área a lo largo de las estaciones ( $F_{(2; 22)} = 5,31$ ;  $p = 0,014$ ). Los valores más bajos se registraron en otoño y primavera, con un área de  $0,07 (\pm 0,01)$  y  $0,06 (\pm 0,01) \text{ mm}^2$ , mientras que el invierno los tamaños fueron mayores ( $0,12 (\pm 0,009) \text{ mm}^2$ ) (Fig. 49 C).



**Figura 49.** *M. obtusangula*. Variaciones temporales de las estructuras reproductivas: Área de tetrasporangio (mm<sup>2</sup>). **A.** En dos años de estudio. **B.** A lo largo de las estaciones. **C.** A lo largo de las estaciones discriminando estado de maduración. Los valores representan **media ± error estándar**. Las letras muestran las comparaciones múltiples. En **C**, la diferencia de color corresponde a comparaciones realizadas por cada estado de maduración.

#### 4.1.2.2. Eficiencia reproductiva de talos cistocárpicos

##### a. Densidad de cistocarpos

La densidad de los cistocarpos evaluada sobre los gametofitos femeninos, mostraron diferencias significativas entre los dos años analizados ( $F_{(1;21)} = 4,75$ ;  $p = 0,04$ ). La densidad de cistocarpos fue mayor para el segundo año ( $3,44 \pm 0,36$  cistocarpos cada  $10 \text{ mm}^{-2}$ ) y menor para el primer año ( $2,19 \pm 0,34$  cistocarpos cada  $10 \text{ mm}^{-2}$ ). No obstante, cuando analizamos la densidad a lo largo de las estaciones, notamos ausencia de diferencias entre ellas ( $p = 0,16$ ). En términos del número total de cistocarpos si bien no hubo diferencias significativas ( $p = 0,4$ ), se observó una tendencia creciente hacia el final del estudio (Fig. 50 A).

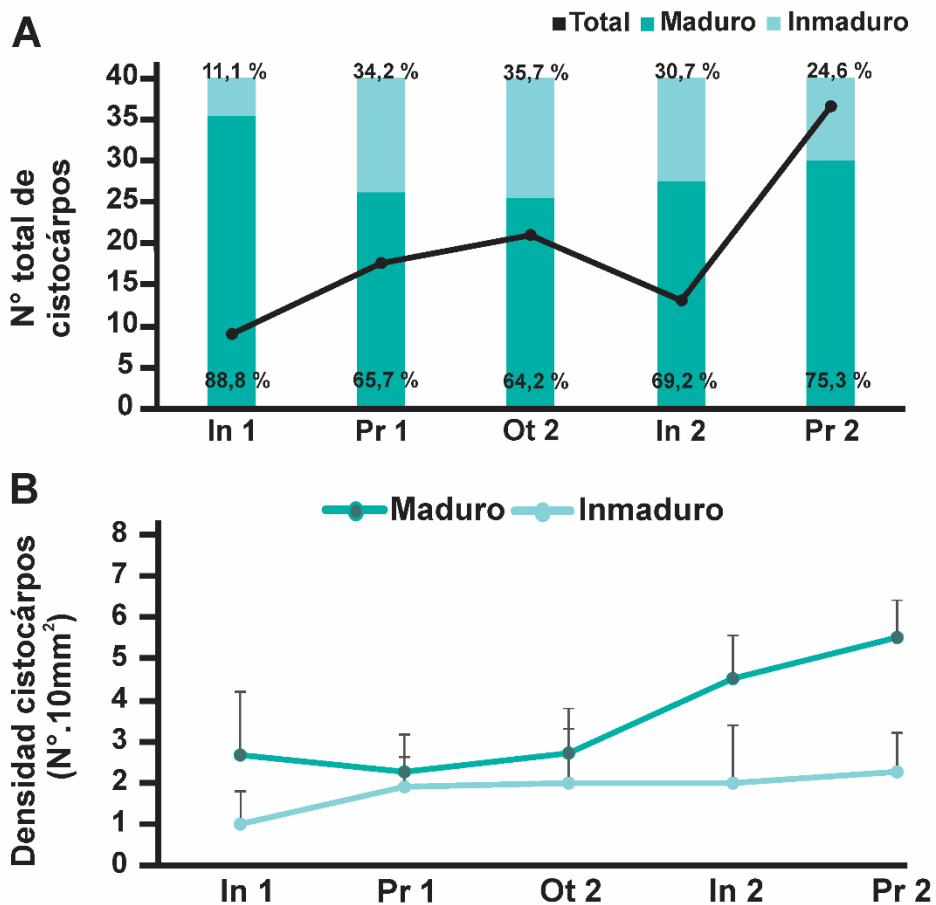
Al analizar la densidad, cuando discriminamos entre cistocarpos maduros e inmaduros, notamos que el número de estructura cada  $10 \text{ mm}^{-2}$ , presentó diferencias estadísticamente significativas ( $F_{(1;21)} = 9,56$ ;  $p = 0,0055$ ), encontrándose  $3,44 (\pm 0,36)$  cistocarpos maduros y  $1,78 (\pm 0,49)$  inmaduros cada  $10 \text{ mm}^{-2}$  de talo. La proporción de cistocarpos maduros fue mayor a la de cistocarpos inmaduros a lo largo de las estaciones superando el 64 % del número total para cada estación (Fig. 50 A).

Al analizar la densidad de cistocarpos maduros sobre los talos de *M. obtusangula* hubo diferencias significativas en la densidad promedio entre los dos años ( $F_{(1;14)} = 6,57$ ;  $p = 0,02$ ), registrándose valores mayores para el segundo año ( $5 \pm 0,71$  cistocarpos cada  $10 \text{ mm}^{-2}$ ) y menores para el primero ( $2,75 \pm 0,5$  cistocarpos cada  $10 \text{ mm}^{-2}$ ). No obstante, no se registraron diferencias estadísticas a lo largo de las estaciones ( $p = 0,2419$ ). Sin embargo, en términos de valores absolutos

la densidad fue mayor en el invierno para el primer año, con valores de 2,67 ( $\pm$  0,83) cistocarpos cada 10 mm<sup>-2</sup>, mientras que lo fue en primavera, para el segundo año (5,5 ( $\pm$  0,64) cistocarpos cada 10 mm<sup>-2</sup>) (Fig. 50 B).

La densidad de cistocarpos inmaduros no registro diferencias estadísticas entre los dos años ( $p = 0,5$ ), así como a lo largo de las estaciones ( $p = 0,1$ ). No obstante, se pudo observar que, tanto para el primer como el segundo año, los mayores valores promedios fueron en primavera, con 2 ( $\pm$  0,83) y 2,25 ( $\pm$  0,72) cistocarpos cada 10 mm<sup>-2</sup>, respectivamente (Fig. 50 B).

Observando la figura 50 B notamos un patrón inverso durante el invierno y primavera del primer año analizado. Este patrón se caracterizó por una alta densidad de cistocarpos maduros y baja de inmaduros en invierno y a la inversa en la estación siguiente. Estos resultados indican que la maduración y posterior liberación de carpósporas ocasionó un nuevo periodo de regeneración de cistocarpos, el cual fue observado en el otoño del siguiente año.



**Figura 50. *Meridionella obtusangula*. Variaciones temporales de las estructuras reproductivas. A.** Número total de cistocarpos (gráfico de líneas) y proporción de estructuras maduras e inmaduras (gráfico de barras). **B.** Densidad promedio de cistocarpos (N°.10 mm<sup>-2</sup>) (expresados como **media ± error estándar**). **In:** invierno, **Pr:** primavera, **Ot:** otoño. **1:** Primer año, **2:** Segundo año.

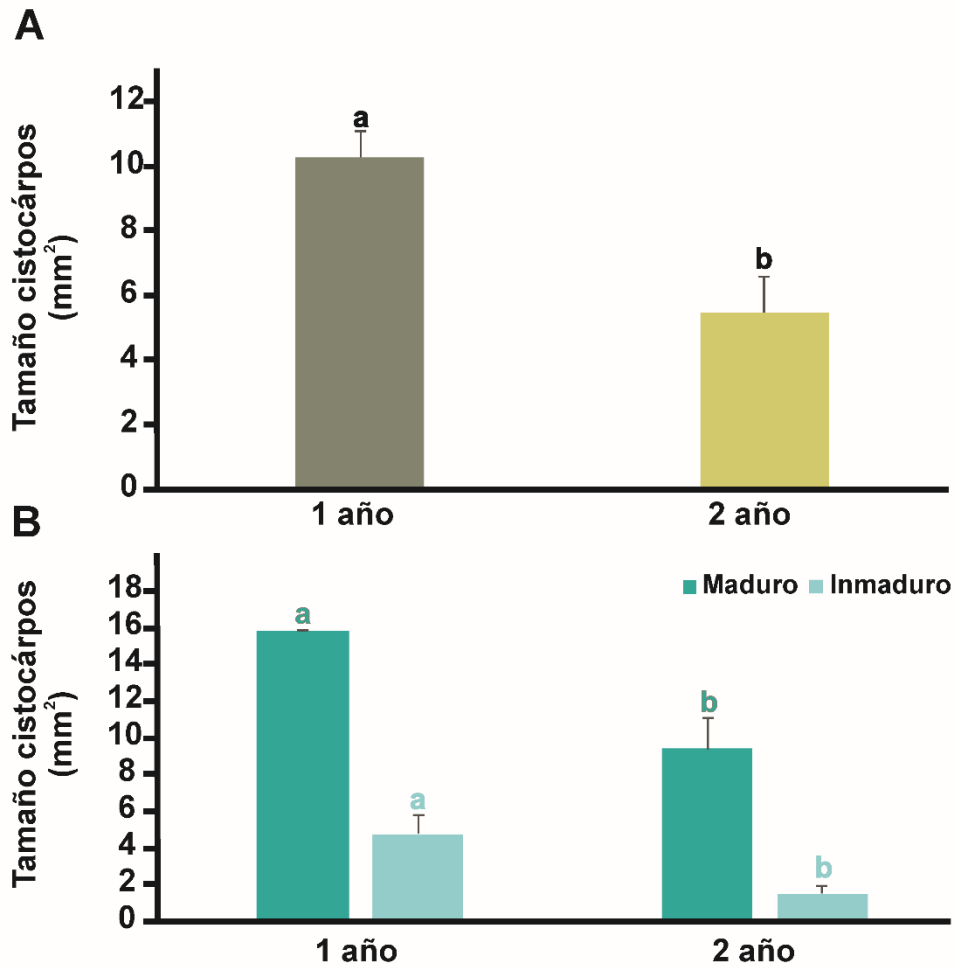
## **b. Área de cistocarpos**

Con respecto a esta variable, se pudo determinar diferencias significativas en el área de los cistocarpos entre los dos años muestreados ( $F_{(1; 23)} = 6,13; p = 0,02$ ), se registraron mayores valores para el primer año ( $10,26 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ ) y menores valores para el segundo año ( $5,44 \pm 1,44 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 51 A). No obstante, no hubo diferencias entre las estaciones ( $p = 0,07$ ).

Con respecto a la comparación del área estimada en los cistocarpos maduros e inmaduros se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos ( $F_{(1;23)} = 60, p < 0,0001$ ). Los cistocarpos maduros ( $1,3 (\pm 0,001) \text{ mm}^2$ ) presentaron mayor área que los inmaduros ( $0,34 (\pm 0,001) \text{ mm}^2$ ), indicando que la maduración implica aumento de tamaño en estas estructuras.

Con respecto al área de los cistocarpos maduros, se registraron diferencias significativas entre los dos años ( $F_{(1; 12)} = 10,22 p < 0,0001$ ), presentando valores mayores para el primer año ( $15,78 \pm 0,12 \text{ mm}^2$ ) y valores más bajos para el segundo ( $9,37 \pm 1,37 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 51 B). No hubo diferencias significativas a lo largo de las estaciones ( $p = 0,7$ ).

En cuanto a los cistocarpos inmaduros, se evidenciaron diferencias significativas en su área entre los dos años ( $F_{(1;12)} = 3,73 p = 0,03$ ), registraron un mayor área para el primer año ( $4,74 \pm 1,02 \text{ mm}^2$ ) mientras que para el segundo fue menor ( $1,51 \pm 0,45 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 51 B). Al igual que las estructuras maduras, el área de los cistocarpos inmaduros no presentó diferencias significativas a lo largo de las estaciones ( $p = 0,1$ ).



**Figura 51. *Meridionella obtusangula*. Variaciones temporales de las estructuras reproductivas: Tamaño de cistocarpos (mm<sup>2</sup>). A. En los dos años de estudio. B. Entre los dos años discriminando estado de maduración. Los valores representan **media ± error estándar**. Las letras muestran las comparaciones múltiples. En B, la diferencia de color corresponde a comparaciones realizadas por cada estado de maduración.**

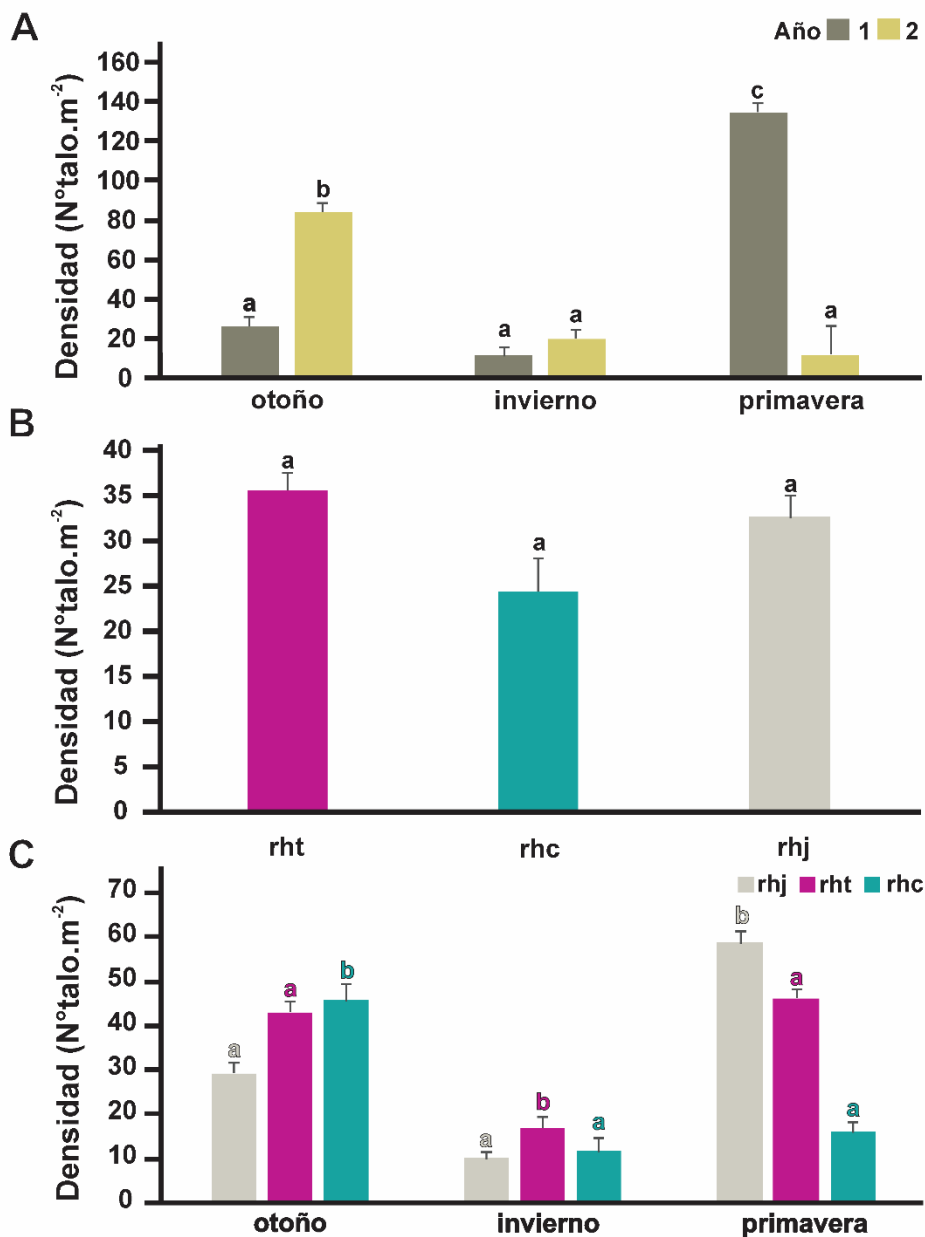


## 4.2. Dinámica poblacional de *M. obtusangula*

*M. obtusangula* mostró una dinámica estacional evidente, estando únicamente presente como macrotalo en las estaciones de otoño, invierno y primavera. Durante los meses de verano no se registraron talos macroscópicos en las colectas. Comparando la densidad de talos en las 3 estaciones en las cuales fue posible encontrar los macrotalos, se determinó que la misma fue significativamente diferente al largo de un periodo de dos años ( $F_{(2;144)} = 20,23$ ;  $p < 0,001$ ). Durante el primer año muestreado se pudo observar que la densidad de los talos fue menor en otoño e invierno y considerablemente mayor en primavera  $134,6 (\pm 4,65)$  individuos.m<sup>-2</sup>. En el segundo año de muestreo el patrón fue diferente, la mayor densidad de *M. obtusangula* fue encontrada en otoño  $84 (\pm 4,6)$  individuos.m<sup>-2</sup>. Tanto en el primer como en el segundo año analizado, las densidades de talos en invierno fueron bajas. En ambos casos no superaron los 25 individuos.m<sup>-2</sup> (Fig. 52 A).

Cuando consideramos los tipos de talos, aunque no hubo diferencias estadísticas al final del estudio en la densidad promedio de los diferentes estadios reproductivos ( $p = 0,4$ ). Se observó que la densidad promedio en términos de valores absolutos de los talos tetraspóricos fue mayor ( $35,4 \pm 2,17$  individuos.m<sup>-2</sup>), respecto a los talos juveniles ( $32,55 \pm 2,41$  individuos.m<sup>-2</sup>) y a los talos cistocárpicos ( $24,35 \pm 3,7$  individuos.m<sup>-2</sup>) (Fig. 52 B). Contemplando a nivel estacional, estadísticamente el número de talos tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles varió significativamente ( $F_{(4; 171)} = 2,72$ ;  $p = 0,03$ ). En la población de talos juveniles, la densidad fue similar para las estaciones de otoño e invierno, siendo considerablemente mayor para la primavera ( $F_{(2; 81)} = 10,2$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig.

52 C). En la población de talos cistocárpicos, la densidad fue similar entre las estaciones de invierno y primavera, mientras que en otoño arrojaron valores mayores ( $F_{(2;33)} = 3,37$ ;  $p = 0,046$  (Fig. 52 C). La población de talos tetraspóricos, evidenció diferencias significativas entre las estaciones ( $F_{(2;57)} = 3,31$ ;  $p = 0,047$ ), se registraron densidades similares entre las estaciones de otoño y primavera mientras que mostraron valores menores para la estación de invierno (Fig. 52 C).



**Figura 52. *M. obtusangula*. Dinámica poblacional. A.** Densidad de talos en otoño, invierno y primavera. **B.** Densidad de los talos tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles. **C.** Número de talos totales de acuerdo a su estado reproductivo a lo largo de las estaciones. Valores expresados como **media ± error estándar**. Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) están indicadas en colores referentes a las poblaciones de talo. **rhj:** talos juveniles, **rht:** talos tetraspóricos, **rhc:** talos cistocárpicos.

#### **4.2.1. Relación entre caracteres bioecológicos y morfológicos con factores ambientales**

Diferentes parámetros evaluadores de la dinámica poblacional y de la morfología de *M. obtusangula* fueron relacionados con los parámetros ambientales. La variación conjunta entre los factores ambientales y biológicos fue explicada por los dos primeros ejes del PCA, explicando el 75,9 % de la información (Fig. 53). Las variables morfológicas como el largo y el peso de todas las fases reproductivas, así como las abundancias de los talos cistocárpicos y juveniles se relacionaron positivamente con el primer componente (PC 1). Por otro lado, la abundancia de los talos tetraspóricos en conjunto con la temperatura del agua del mar fueron relacionadas positivamente con el segundo componente (CP 2), mientras que las variables ambientales: fotoperiodo e intensidades del viento lo hicieron de manera negativa.

La primavera del primer año estuvo dominada por una predominancia de talos cistocárpicos, tetraspóricos y juveniles de un aspecto más robusto dado por su mayor peso, estando representados los talos juveniles en mayor número. Con respecto a la estación de otoño del segundo año, los talos registrados tuvieron un aspecto grácil y fueron de mayor longitud que los registrados en la primavera. Además, los talos cistocárpicos y tetraspóricos presentaron mayores abundancias. Por otra parte, las estaciones de invierno estuvieron correlacionadas negativamente con la abundancia tanto de talos cistocárpicos, tetraspóricos como juveniles. La presencia de una mayor abundancia de los talos de *M. obtusangula* de mayor longitud y menos pesados se asoció a estaciones que presentaron fotoperiodos más cortos, menores intensidades del viento, y

elevadas temperaturas del agua del mar. Por el contrario, una menor abundancia de talos más cortos y robustos se asociaron a estaciones con mayores intensidades del viento, fotoperiodos más largos, así como temperaturas del agua del mar más bajas.

Con respecto a los resultados de la correlación de Spearman de las variables biológicas; abundancia y tamaño (peso y longitud) de los talos tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles se observaron correlaciones significativas (Tabla 15). Se observó una correlación positiva entre la abundancia de los talos tetraspóricos y juveniles, así como una correlación negativa de los primeros, respecto a la intensidad del viento (Tabla 15). Por otra parte, la abundancia de los talos cistocárpicos se correlacionaron positivamente con los talos juveniles, aunque estos, no evidenciaron una correlación significativa con los parámetros ambientales evaluados.

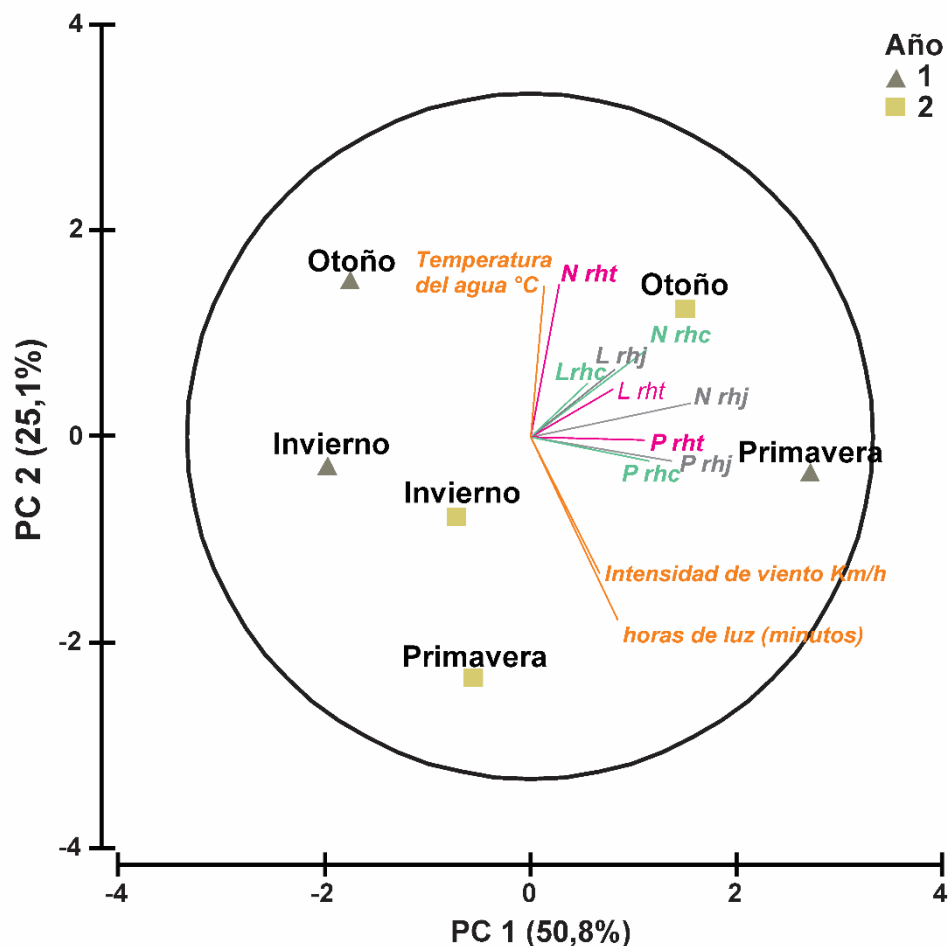


Figura 53. *M. obtusangula*. Relación temporal entre parámetros ambientales y morfológicos (Gráfico PCA). Referencias: **N rht**: abundancia de talos tetraspóricos, **N rhc**: abundancia de talos cistocárpicos, **N rhj**: abundancia de talos juveniles, **L rht**: longitud de talos tetraspóricos, **L rhc**: longitud de talos cistocárpicos, **L rhj**: longitud de talos juveniles, **P rht**: peso escurrido de talos tetraspóricos, **P rhc**: peso escurrido de talos cistocárpicos, **P rhj**: peso escurrido de talos juveniles. Se consideraron los valores medios estacionales de cada parámetro

	N rht	N rhj	N rhc	L rht	L rhj	L rhc	P rht	P rhj	P rhc	IV	F	T
N rht		0,01	0,11	0,01	0,01	0,02	0,14	0,09	0,11	0,01	0,1	0,59
N rhj	0,83		0,001	0,01	0,01	0,04	0,01	0,002	0,001	0,13	0,61	0,43
N rhc	0,61	0,93		0,02	0,02	0,11	0,001	0,001	0,001	0,27	1	0,19
L rht	0,83	0,86	0,78		0	0,001	0,02	0,03	0,02	0,19	0,43	0,3
L rhj	0,83	0,86	0,78	1		0,001	0,02	0,03	0,02	0,19	0,43	0,3
L rhc	0,81	0,73	0,61	0,93	0,93		0,14	0,17	0,11	0,22	0,49	0,24
P rht	0,57	0,83	0,95	0,78	0,78	0,57		0,001	0,001	0,24	0,82	0,13
P rhj	0,64	0,9	0,98	0,76	0,76	0,54	0,98		0,001	0,17	0,75	0,22
P rhc	0,61	0,93	0,9	0,78	0,78	0,61	0,95	0,98		0,27	1	0,19
IV	-0,83	-0,59	-0,44	-0,51	-0,51	-0,49	-0,47	-0,54	-0,44		0,03	0,31
F	-0,63	-0,22	0	-0,33	-0,33	-0,29	-0,1	-0,13	0	0,75		0,93
T	-0,23	-0,32	-0,51	-0,42	-0,42	-0,47	-0,59	-0,49	-0,51	0,38	-0,04	

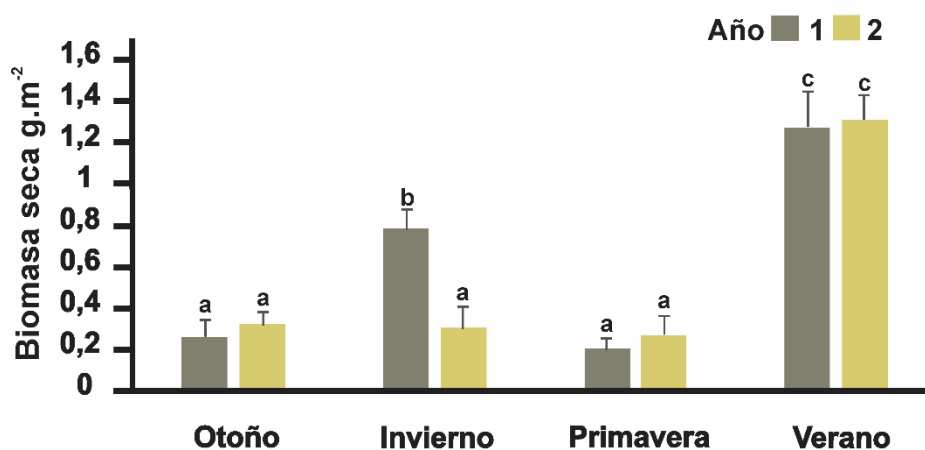
**Tabla 15.** Matriz de correlación de Spearman para los datos biológicos y los parámetros ambientales. **N:** abundancia; **L:** largo de los talos; **P:** peso de los talos; **rht:** talos tetraspóricos; **rhj:** talos juveniles; **rhc:** talos citocárpicos; **IV:** Intensidad del viento; **F:** fotoperiodo; **T:** temperatura.

### 4.3. Composición y relación temporal entre la comunidad de macroalgas acompañantes y la abundancia de *M. obtusangula*

La comunidad macroalgal acompañante de los talos de *M. obtusangula* estuvo integrada por *Ahnfeltia* sp., *Antithamnion* sp., *Ceramium* sp., *Corallina* sp., *Gelidium* sp., *Heterosiphonia* sp., *Polysiphonia* sp., *Dictyota* sp., *Lomentaria* sp., *Scytosiphon* sp., *Codium* sp., *Ulva* sp., *Punctaria* sp., *Antithamnionella* sp., *Ectocarpus* sp. y *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar.

Cuando se analizó la abundancia de la biomasa total macroalgal acompañante, se evidenciaron diferencias significativas a lo largo de las estaciones en los dos años de muestreo ( $F_{(3; 2264)}$ ;  $p < 0,001$ ). La mayor biomasa se obtuvo en verano, y durante el segundo año, alcanzando los  $1,31 (\pm 0,12) \text{ g.m}^{-2}$ , mientras que los valores más bajos se registraron en otoño y primavera de ambos años e invierno del segundo año. (Fig. 54). La biomasa de *M. obtusangula* representó sólo un 0,35 % del total con respecto a las macroalgas acompañantes. Asimismo, *Antithamnionella* sp., *Ectocarpus* sp., *Heterosiphonia* sp., *Scytosiphon* sp., *Ulva* sp. y *U. pinnatifida* representaron menos del 1 % de la biomasa total. El mayor aporte de biomasa se registró por parte de los taxones *Antithamnion* sp., *Codium* sp., *Corallina* sp., *Dictyota* sp. y *Polysiphonia* sp. (Tabla 16).





**Figura 54.** Biomasa seca de las macroalgas acompañantes de *M. obtusangula* a lo largo de las estaciones en un periodo de dos años. Los valores representan la **media**  $\pm$  **error estándar**.

**Tabla 16.** Porcentaje de biomasa total de cada una de los taxa observados al final del estudio.

<u>Taxa</u>	<u>% Biomasa total</u>
<i>M. obtusangula</i>	0,35
<i>Ahnfeltia</i> sp.	2,42
<i>Antithamnion</i> sp.	22,86
<i>Antithamnionella</i> sp.	0,99
<i>Ceramium</i> sp.	2,70
<i>Codium</i> sp.	11,55
<i>Corallina</i> sp.	21,07
<i>Dictyota</i> sp.	11,40
<i>Ectocarpus</i> sp.	0,25
<i>Gelidium</i> sp.	4,36
<i>Heterosiphonia</i> sp.	0,13
<i>Lomentaria</i> sp.	5,89
<i>Polysiphonia</i> sp.	13,49
<i>Punctaria</i> sp.	1,05
<i>Scytosiphon</i> sp.	0,33
<i>Ulva</i> sp.	0,93
<i>U. pinnatifida</i>	0,19

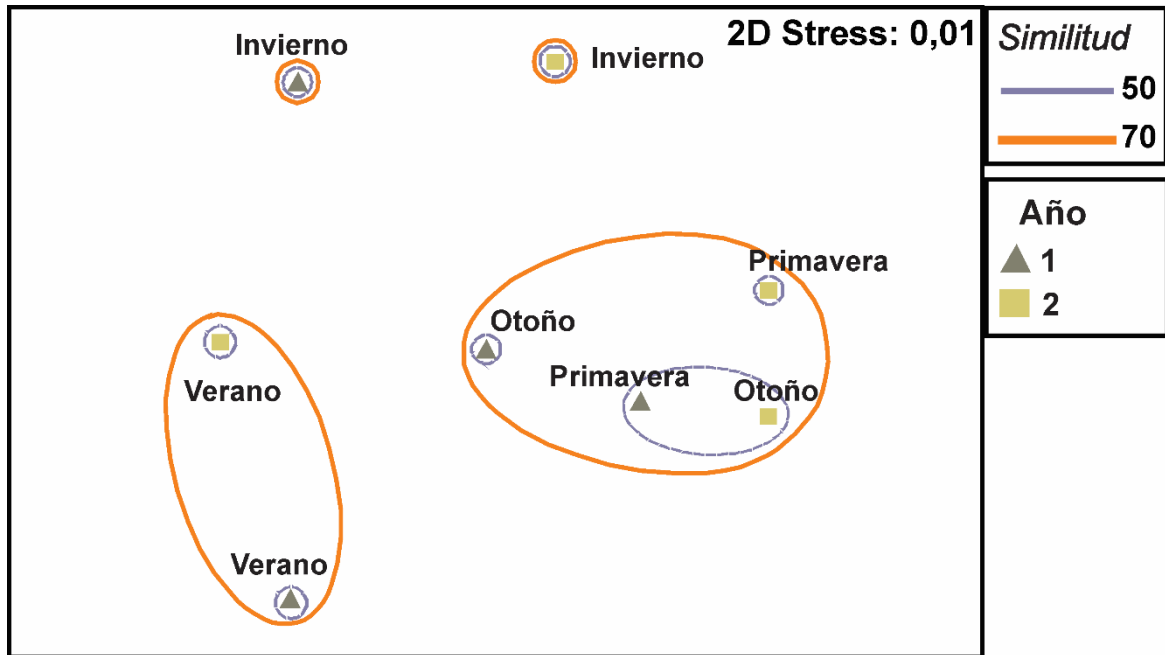
Los resultados obtenidos de los análisis de nMDS y SIMPER aplicando el índice de Bray- Curtis, para determinar la contribución de las especies durante los meses de estudio se muestran en la Figura 55 y en la Tabla 17. Los resultados del nMDS con respecto a la composición de la comunidad de macroalgas acompañantes de *M. obtusangula*, revelaron una marcada separación entre las estaciones evidenciando cuatro grupos bien definidos (Fig. 55). Un primer grupo estuvo conformado por las muestras de verano de ambos años, atribuible a la ausencia de estadios macroscópicos de *M. obtusangula*, en la estación más cálida. Un segundo grupo estuvo conformado por las estaciones templadas otoño y primavera, con una clara asociación entre la primavera del primer año y el otoño del segundo año. Por otra parte, el tercer y cuarto grupo, estuvo determinado por cada invierno que formaron grupos separados del resto de las estaciones.

Los veranos estuvieron caracterizados por la ausencia de *Antithamnionella* sp., *Ceramium* sp., *Ectocarpus* sp., *Heterosiphonia* sp., *Punctaria* sp., *Scytosiphon* sp., *Ulva* sp., *U. pinnatifida* y *M. obtusangula*, lo cual contribuyó un 55,84 % de similitud entre ellos (Tablas 17 y 18). La estación de verano del primer año se caracterizó por una mayor abundancia de *Polysiphonia* sp., pero el verano del segundo año se caracterizó por una mayor abundancia de *Lomentaria* sp. y *Corallina* sp., estando esta última ausente en el verano del primer año (Tabla 18). Asimismo, la ausencia de *Corallina* sp. contribuyó al 30% de disimilitud con el invierno del primer año muestreado, ya que durante ese periodo este género presentó la mayor abundancia (Tabla 17).

Como se mencionó anteriormente el invierno del primer año estuvo caracterizado por una gran abundancia de *Corallina* sp. pero el invierno del segundo año por *Codium* sp. Asimismo, para ambos inviernos se registraron bajas abundancias de *Heterosiphonia* sp. y *Gelidium* sp. Además el invierno del primer año, se caracterizó por la presencia de *Ahnfeltia* sp., *Punctaria* sp., *Scytosiphon* sp., *Ulva* sp. y *U. pinnatifida*, ausentes en el segundo año (Tabla 17). Asimismo, *Antithamnionella* sp. presentó una baja abundancia para el primer invierno, pero mucho mayor para el segundo. Observaciones similares se registraron para *Antithamnion* sp. sin embargo, estuvo ausente en el primer invierno (Tabla 18).

Los taxones *Corallina* sp., *Polysiphonia* sp., *Punctaria* sp. y *Codium* sp., fueron quienes contribuyeron a más del 50% de disimilitud entre las estaciones invernales y estivales (Tabla 17).

Las estaciones templadas, se caracterizaron por una alta abundancia de *Antithamnion* sp. y de *Dictyota* sp. Respecto a los otoños, durante el primer año se destacaron valores de abundancia de *Polysiphonia* sp. mayores a los registrados para el segundo año, mientras que *Gelidium* sp., evidenció el patrón inverso (Tabla 18). Con respecto a las primaveras, si bien *Corallina* sp., *Lomentaria* sp., *Punctaria* sp. y *Scytosiphon* sp. registraron valores bajos de abundancia para el primer año, se encontraron ausentes en la primavera del segundo periodo (Tabla 18). Los taxones *Antithamnion* sp., *Corallina* sp., *Polysiphonia* sp. y *Lomentaria* sp., fueron quienes contribuyeron más del 50% de disimilitud entre las estaciones templadas con respecto a las invernales y estivales (Tabla 17).



**Figura 55. Diagrama de escalonamiento multidimensional no métrico (nMDS).** Muestra la variabilidad que separa los grupos de estaciones en cuanto a la abundancia de los diferentes taxones de macroalgas acompañantes. Niveles de similitud de 40-60%.

**Tabla 17. Resultado del análisis SIMPER.** En la tabla se consideraron los taxones con mayor contribución en las comparaciones entre verano, otoño y primavera con más del 60% de disimilitud.

Grupo	Especie	% acumulado	% Disimilitud
Invierno 1- Verano 1	<i>Corallina</i> sp.	30,13	69,39
	<i>Polysiphonia</i> sp.	13,74	
	<i>Punctaria</i> sp.	9,35	
	<i>Ulva</i> sp.	8,81	
	<i>Dictyota</i> sp.	6,82	
	<i>Ceramium</i> sp.	6,42	
	<i>Antithamnion</i> sp.	6,29	
	<i>Scytosiphon</i> sp.	4,45	
	<i>U. pinnatifida</i>	4,06	
	Total	90,08	
Invierno 1- Otoño 2	<i>Antithamnion</i> sp.	28,37	61,76
	<i>Corallina</i> sp.	23,39	
	<i>Gelidium</i> sp.	9,84	
	<i>Punctaria</i> sp.	8,11	
	<i>Ulva</i> sp.	7,64	
	<i>Ahnfeltia</i> sp.	5,66	
	<i>Scytosiphon</i> sp.	3,86	
	<i>Undaria</i> sp.	3,52	
Total	90,39		
Verano 1 – Otoño 2	<i>Antithamnion</i> sp.	29,01	66,86
	<i>Polysiphonia</i> sp.	18,75	
	<i>Gelidium</i> sp.	12,22	
	<i>Dictyota</i> sp.	10,42	
	<i>Ahnfeltia</i> sp.	8,57	
	<i>Ceramium</i> sp.	6,91	
	<i>Lomentaria</i> sp.	5,41	
Total	91,29		
Verano 1- Invierno 2	<i>Codium</i> sp.	33,94	62,35
	<i>Polysiphonia</i> sp.	17,28	
	<i>Corallina</i> sp.	17,11	
	<i>Antithamnionella</i> sp.	8,08	
	<i>Lomentaria</i> sp.	6,72	
	<i>Ceramium</i> sp.	6	
	<i>Dictyota</i> sp.	6	
Total	95,15		
Invierno 1 – Primavera 2	<i>Corallina</i> sp.	31,53	61,80
	<i>Antithamnion</i> sp.	14,91	
	<i>Punctaria</i> sp.	9,79	
	<i>Ulva</i> sp.	7,87	
	<i>Lomentaria</i> sp.	6,31	
	<i>Antithamnionella</i> sp.	4,82	
	<i>Scytosiphon</i> sp.	4,66	
	<i>U. pinnatifida</i>	4,25	
	<i>Ahnfeltia</i> sp.	4,03	
	<i>Polysiphonia</i> sp.	3,68	
Total	91,85		
Verano 1-Primavera 2	<i>Polysiphonia</i> sp.	26,11	63,48
	<i>Lomentaria</i> sp.	12,6	
	<i>Antithamnion</i> sp.	12,03	
	<i>Ceramium</i> sp.	11,98	
	<i>Dictyota</i> sp.	8,97	

	<i>Antithamnionella</i> sp.	8,91	
	<i>Ahnfeltia</i> sp.	7,77	
	<i>Codium</i> sp.	3,37	
	Total	91,74	
Otoño 2-Verano 2	<i>Antithamnion</i> sp.	23,85	
	<i>Corallina</i> sp.	21,54	
	<i>Lomentaria</i> sp.	14,55	
	<i>Dictyota</i> sp.	10,32	60,69
	<i>Gelidium</i> sp.	8,52	
	<i>Polysiphonia</i> sp.	8,13	
	<i>Ceramium</i> sp.	6,2	
	Total	93,12	
Primavera 2- Verano 2	<i>Corallina</i> sp.	29,22	
	<i>Lomentaria</i> sp.	21,23	
	<i>Polysiphonia</i> sp.	9,84	
	<i>Ceramium</i> sp.	9,25	63,37
	<i>Dictyota</i> sp.	8,08	
	<i>Antithamnionella</i> sp.	6,88	
	<i>Antithamnion</i> sp.	6,69	
	Total	91,19	

**Tabla 18. Biomasa de macroalgas.** En la tabla se expresan los valores de biomasa seca (g) de las diferentes especies de macroalgas a lo largo de las estaciones en los dos años de estudio.

Taxones	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
	Primer año				Segundo año			
<i>M. obtusangula</i>	0,049	0,006	0,055	-	0,013	0,008	0,05	-
<i>Ahnfeltia</i> sp.	0,05	0,01	0,59	-	0,37	-	0,16	0,07
<i>Antithamnion</i> sp.	0,68	-	2,42	0,24	6,49	0,29	1,23	0,44
<i>Antithamnionella</i> sp.	-	0,01	-	-	-	0,29	0,21	-
<i>Ceramium</i> sp.	0,15	0,25	0,215	-	0,24	0,16	0,38	-
<i>Codium</i> sp.	-	-	-	0,03	-	5,93	-	-
<i>Corallina</i> sp.	0,13	5,5	0,09	-	0,06	1,3	-	3,79
<i>Dictyota</i> sp.	0,57	0,69	2,33	0,09	1,08	0,49	0,58	0,05
<i>Ectocarpus</i> sp.	-	-	0,11	-	-	-	0,02	-
<i>Gelidium</i> sp.	0,05	0,09	0,11	0,1	1,4	0,08	0,16	0,26
<i>Heterosiphonia</i> sp.	0,01	0,02	-	-	0,01	0,02	-	-
<i>Lomentaria</i> sp.	0,24	0,22	0,05	0,42	0,07	0,04	-	2
<i>Polysiphonia</i> sp	1,15	0,42	0,77	2,95	0,15	0,32	0,14	1,06
<i>Punctaria</i> sp.	-	0,53	0,01	-	-	-	-	-
<i>Scytosiphon</i> sp.	-	0,12	0,05	-	-	-	-	-
<i>Ulva</i> sp	-	0,47	-	-	-	-	0,01	-
<i>U. pinnatifida</i>	-	0,1	-	-	-	-	-	-

La relación temporal entre la abundancia de *M. obtusangula* y la comunidad de macroalgas acompañantes con los parámetros ambientales se muestra en la figura 56. En el análisis de correspondencia canónica (CCA) los dos primeros ejes explicaron el 90,49% de la variación conjunta de los datos ambientales (temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidad del viento), de la abundancia de *M. obtusangula* y de la abundancia de las macroalgas acompañantes a lo largo de las estaciones (Fig. 56). Tanto los parámetros

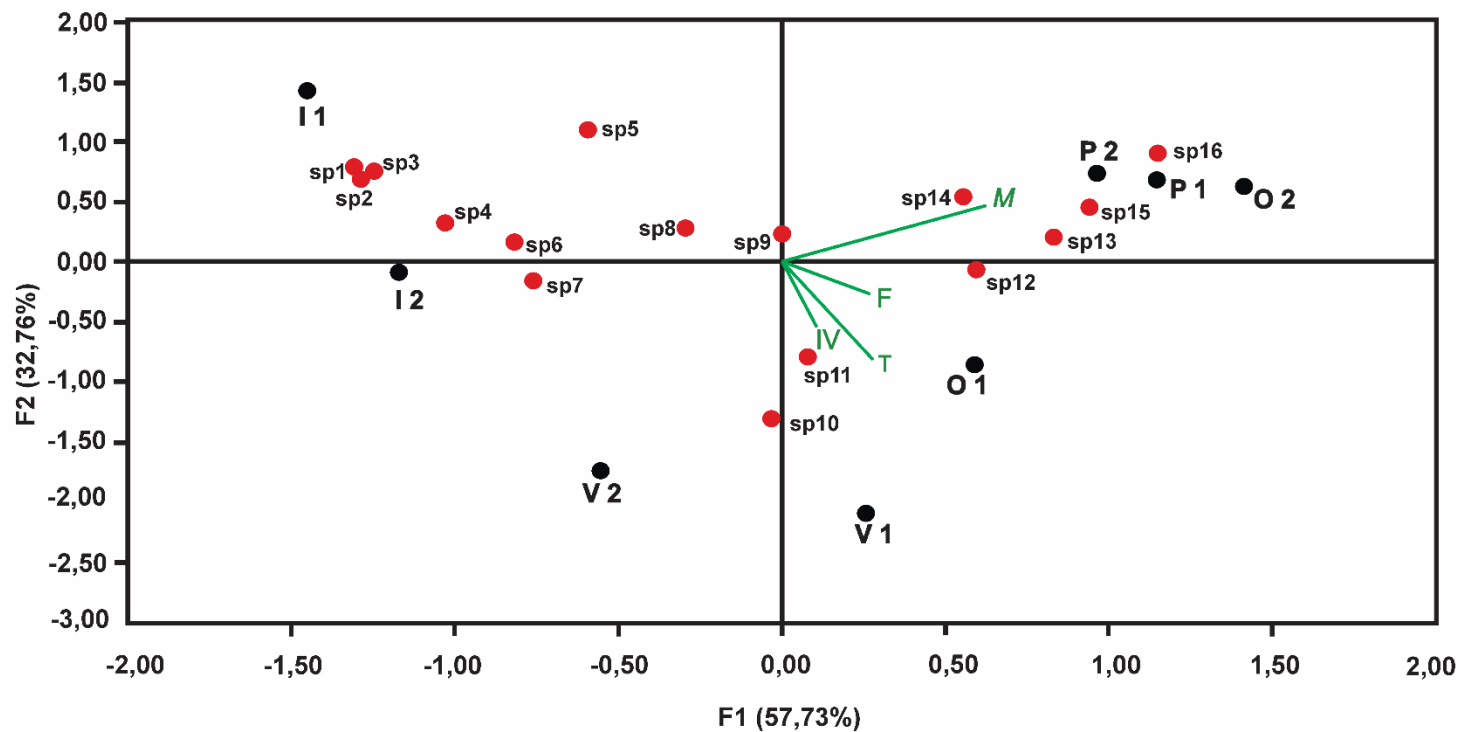
ambientales como biológicos considerados en este estudio, fueron suficientes para explicar la distribución del total de las macroalgas acompañantes con los dos primeros ejes.

La primavera y otoño del segundo año, caracterizadas por la presencia de *Antithamnion* sp., *Dictyota* sp., *Ahnfeltia* sp., y *Ectocarpus* sp. (sólo presente en primavera), se asociaron con una mayor abundancia de talos de *M. obtusangula*.

Las macroalgas tales como *U. pinnatifida*, *Ulva* sp., *Punctaria* sp., *Corallina* sp. y *Scytosiphon* sp, se asociaron con la estación de invierno del primer año, mientras que *Codium* sp. y *Antithamnionella* sp. estuvieron asociadas a la estación de invierno del segundo año. Las mismas se caracterizaron por presentar fotoperiodos más cortos, así como temperaturas del agua del mar más frías y menos intensidad del viento.

Las altas abundancias de *Polysiphonia* sp. se asociaron a la estación estival del primer año caracterizada por valores elevados en la intensidad del viento, así como en la temperatura del agua de mar. En cambio, *Ceramium* sp. no se registró para las estaciones de verano, sin embargo, se hizo presente en las otras estaciones con valores constantes. De manera similar, ejemplares de *Heterosiphonia* sp. estuvieron ausentes tanto en verano como en primavera, pero se registraron para el otoño e invierno, presentando mayores abundancias en esta última estación.





**Figura 56. Análisis de correspondencia canónica (CCA). Relación temporal entre la abundancia de macroalgas acompañantes: *U. pinnatifida* (sp 1), *Ulva* sp. (sp 2), *Punctaria* sp. (sp 3), *Corallina* sp. (sp 4), *Scytosiphon* sp. (sp 5), *Antithamnionella* sp. (sp 6), *Codium* sp. (sp 7), *Heterosiphonia* sp. (sp 8), *Ceramium* sp. (sp 9), *Lomentaria* sp. (sp 10), *Polysiphonia* sp. (sp 11), *Gelidium* sp. (sp 12), *Antithamnion* sp. (sp 13), *Dictyota* sp. (sp 14), *Ahnfeltia* sp. (sp 15) y *Ectocarpus* sp. (sp 16) y parámetros ambientales: temperatura del agua de mar (T), fotoperiodo (F), Intensidad del viento (IV) y abundancia de *M. obtusangula* (M), otoño del primer año (O 1), otoño del segundo año (O 2), invierno del primer año (I 1), invierno del segundo año (I 2), primavera del primer año (P 1), primavera del segundo año (P 2).**

## 5. Discusión

El análisis de las variables morfométricas (largo, peso y grosor) de los talos de *M. obtusangula* y su variación temporal en el hábitat, indicaron que su crecimiento no fue independiente de las variaciones estacionales. Se han registrado cambios en la morfología relacionados con variables abióticas en otros géneros de Rhodophyta, tanto en poblaciones provenientes de la naturaleza como en cultivo, como ocurre en *Porphyridium purpureum* (Bory) KMDrew & R. Ross, *Polysiphonia*, *Hildenbrandia rubra* (Sommerfelt) Meneghini, *Gracilaria cornea* J. Agardh, *Porphyra* y *Gelidium*, (Levy & Gantt 1990, Guzmán-Urióstegui & Robledo 1999, Subba Rangaiah *et al.* 2003, Kim & Garbary 2006, Tala & Chow 2014, Croce *et al.* 2015b).

*M. obtusangula* presentó una marcada dinámica estacional, donde los talos macroscópicos estuvieron presentes sólo en otoño, invierno y primavera. Se admite, sin embargo, que la especie fue registrada en verano en el ambiente natural, en estadios iniciales microscópicos, lo que impidió su colecta. Durante el periodo muestreado se constató la presencia conjunta de talos en estado reproductivo y juveniles. Estudios en *Polysiphonia* sp. y *Gracilaria* sp localizadas en la costa patagónica han señalado también la coexistencia de talos en diferentes estados reproductivos con juveniles no productivos (Martín 2010, Croce 2013).

Los resultados indicaron que las proporciones de talos fértiles y juveniles no se mantuvieron constantes a lo largo del periodo estudiado. En otoño e invierno la mayor densidad de talos por metro cuadrado correspondió a estadios reproductivos. Resultados similares han sido observado en otras especies de

algas rojas tales como *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss, *Iridaea* sp. *Gracilaria cornea*, *Gelidium serrulatum* J. Agardh, *Polysiphonia scopulorum* var. *villum* (J. Agardh) Hollenberg y *Agarophyton chilense* (Dellarossa *et al.* 1980, Santelices 1990, Orduña-Rojas & Robledo 2002, Ardito & Gómez 2005, Guillemín *et al.* 2008, Aguilar-Rosas & Aguilar-Rosas 2010). Como se indicó en este capítulo, la densidad promedio de los talos tetraspóricos fue mayor que la de los cistocárpicos y juveniles. Diferentes hipótesis se propusieron para explicar las posibles razones de predominancia hacia los individuos diploides en las poblaciones naturales, basada principalmente en una mayor fecundidad o supervivencia de una fase con respecto a otra, o la presencia de un mecanismo de reproducción como la propagación vegetativa y/o apomeiosis (Akatsuka 1990, Santelices 1990, Hawkes 1990, Salina 1991, Destombe *et al.* 1993, Juanes & Puente 1993, Huérfano 1998). *M. obtusangula* presentó la capacidad de crecimiento vegetativo por medio de estolones, y desarrollo de polisporas, ambos mecanismos nos permitirían explicar la preponderancia de los talos tetraspóricos por sobre los talos gametofíticos encontrados en la naturaleza.

La eficiencia reproductiva de los talos tetraspóricos estuvo marcada por un elevado número de tetrasporangios maduros por unidad de área en otoño e invierno, disminuyendo su densidad hacia la primavera. Con respecto a talos cistocárpicos, hubo una mayor densidad de cistocarpos maduros en invierno coincidiendo con los registros para *Sarcopeltis skottsbergii*, presente en la costa patagónica de Argentina y Chile (Avila *et al.* 1997, 1999b, Hughes 2018). La maduración de las estructuras reproductivas tanto de los talos tetraspóricos como cistocárpicos hacia finales de las estaciones más frías, pudo indicar una

posible liberación de esporas hacia la primavera que justificaría la predominancia de talos juveniles en esa estación.

La mayor abundancia de los talos de *M. obtusangula* se observó en las estaciones templadas. En este estudio ocurrió en otoño, coincidentemente con temperaturas del agua del mar más elevadas debido a la particularidad térmica propia del Golfo San Matías cuyas temperaturas llegan a superar a las estivales (Williams 2017). Por otra parte, es sabido que la cantidad de horas de luz a las cuales se encuentran expuestos los frondes, tiene incidencia directa sobre la fotosíntesis y la generación de biomasa (Scrosati & DeWreede 1998) lo cual podría justificar la mayor abundancia de *M. obtusangula* en primavera.

Las abundancias de talos más robustos de *M. obtusangula* se encontraron en primavera cuando la intensidad del viento fue mayor y por ende el incremento del oleaje indicando una posible estrategia de resistencia. Es sabido que una exposición a las olas influye en la estructura de las comunidades macroalgales a través del movimiento del agua (Lobban & Harrison 1994), afectando la dispersión de esporas, fertilización, asentamiento y reclutamiento (Vadas *et al.* 1992, Serrao *et al.* 1996). Estudios sobre este fenómeno en especímenes de *Chondrus crispus* Stackhouse, *Mazzaella lilacina* (Postels & Ruprecht) Leister y *Mazzaella oregona* (Doty) Hughey, P. C. Silva & Hommersand, han señalado una dominancia en zonas de marcado oleaje, evidenciando también resistencia a dicho factor (Phillips 1994, Carrington *et al.* 2001, Scrosati & Mudge 2004).

La población de *M. obtusangula* estudiada en esta tesis se encontró acompañada de un característico ensamble de macroalgas bentónicas, integrado por algas rojas, verdes y pardas. Una mayor abundancia de *M.*

*obtusangula* en primavera y otoño, estuvo asociada a *Antithamnion* sp., *Ahnfeltia* sp., *Dictyota* sp. y *Ectocarpus* sp. Por el contrario, en invierno cuando los talos de *M. obtusangula* fueron escasos estuvo acompañada mayoritariamente por las algas rojas *Corallina* sp., *Antithamnionella* sp., *Heterosiphonia* sp.; pardas *Punctaria* sp., *Scytosiphon* sp., *U. pinnatifida* y verdes *Codium* sp. y *Ulva* sp. Estudios sobre estas especies de la costa patagónica también señalan sus máximos de abundancia en invierno (Martin 2010, Croce 2013, Marambio *et al.* 2016). En los muestreos de verano, si bien no hubo talos macroscópicos de *M. obtusangula* se registró una mayor abundancia de *Polysiphonia* sp y *Lomentaria* sp. coincidentemente con lo ya reportado para la costa patagónica (Díaz *et al.* 2002, Croce 2013).

El presente estudio es la primera evaluación de la dinámica fenológica y poblacional de *M. obtusangula*, así como la relación de su abundancia con la estructura de la comunidad de macroalgas acompañante. Si bien la especie objeto de estudio, no fue el principal componente de la comunidad macroalgal bentónica en términos de abundancia en la zona de estudio, su estandarización reveló importantes observaciones, las cuales pueden ser extendidas al resto de la comunidad macroalgal.

**CAPÍTULO V**  
**COMUNIDADES ALGALES EPÍFITAS Y ENDÓFITAS DE**  
***MERIDIONELLA OBTUSANGULA***



## 1. Introducción

El epifitismo es una de las estrategias más frecuentes adoptadas por los organismos acuáticos. Es una relación comensalística que ocurre principalmente por competencia por un espacio limitado (Ortuño-Aguirre & Riosmena-Rodríguez 2007). Esta interacción biótica entre un basífito y un epífito o un epizoo es un fenómeno generalizado en las comunidades bentónicas marinas, dado que un gran número de microalgas y macroalgas pueden crecer epifíticamente sobre otros organismos bentónicos autótrofos (Rindi & Guiry 2004). Estos hospedadores ofrecen al epífito-epizoo además de espacio, refugio y condiciones propicias para su crecimiento (Aguilar-Rosas & Galindo 1990, Viejo & Aberg 2003, Simpson *et al.* 2010). Es por ello que los organismos epífitos de macroalgas marinas han sido de interés de estudio por años, con el principal objetivo de determinar la interacción entre el huésped y su hospedador (Viejo & Aberg 2003, Rindi & Guiry 2004, Villaseñor-Parada & Neill 2011, Majewska *et al.* 2013, Mabrouk *et al.* 2014).

A pesar que el epifitismo es un fenómeno ampliamente extendido en las comunidades de macroalgas, los basífitos no albergan los diferentes epífitos de la misma manera, sino que la distribución y la abundancia epifítica está asociada tanto a la superficie de colonización, como a la morfología, biomasa, ciclo de vida y defensas químicas presentes en el hospedador (Ortuño-Aguirre & Riosmena Rodríguez 2007, Michael *et al.* 2008). Por lo tanto, estas particularidades propician diferentes condiciones para el asentamiento de los epífitos (Fraschetti *et al.* 2005). Además, la distribución de los organismos epífitos no siempre es al

azar, sino que obedece a patrones definidos con los requerimientos de los propios epibiontes como cantidad y calidad de luz, exposición a corrientes, flujo de agua, etc. (Borowitzka *et al.* 1989, Schanz *et al.* 2002, Romagnoli *et al.* 2007). La mayoría de las especies epífitas son esencialmente facultativas, indicando que no están asociadas específicamente con una especie huésped (Wahl & Mark 1999), reforzando la idea que el epifitismo es una estrategia habitual y frecuente para evadir la limitación del sustrato a colonizar (Martín 2010). Se ha observado que la capacidad de algunas algas epífitas de crecer en diferentes especies de macrófitos, depende de los mecanismos de fijación (Thornber *et al.* 2016). Hasta el presente, solo se han podido identificar pocos ejemplos de epifitismo obligado. Ejemplos de ello es la relación de *Vertebrata lanosa* (Linnaeus) T.A. Christensen (Rhodophyta) y *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (Phaeophyceae) (Garbary *et al.* 2005) y de *Microcladia californica* Farlow (Rhodophyta) y *Egregia menziesii* (Turner) Areschoug (Phaeophyceae) (Gonzalez & Goff 1989). En el caso de *Vertebrata lanosa* se ha observado un mecanismo de fijación particular sobre *Ascophyllum nosodum* (Garbary *et al.* 2005), reforzando el hecho de que la especificidad de adherencia o colonización con un único huésped le confiere menos capacidad a la hora de colonizar nuevos hospedadores con respecto a otros epífitos generalistas (Thornber *et al.* 2016).

Varios autores han documentado que la presencia de los epífitos puede reducir las condiciones fisiológicas del hospedador. Se ha demostrado que el epifitismo reduce el crecimiento del basífito provocado por el efecto de sombreado y por la competencia por los nutrientes presentes en la columna de agua (Viejo & Aberg 2003, Jormalainen & Honkanen 2008). También fueron observados efectos



adversos mecánicos, sobre todo cuando los organismos epífitos se desarrollan con gran abundancia ya que agregan peso al talo basifito, generando reducción en la flexibilidad, ruptura de porciones del talo o pérdidas de láminas enteras. Estos efectos son mayores cuando los epífitos son organismos briozoos porque desarrollan talos duros ocasionando importantes pérdidas de biomasa (Dixon *et al.* 1981, D'Antonio 1985, Hemmi *et al.* 2005). Sin embargo, se han reconocido algunos efectos beneficiosos directos para el hospedador, como la protección a la predación por herbívoros, protección a la desecación y al exceso de luz sobre todo para macroalgas expuestas en periodos de bajamar en zonas intermareales (Schanz *et al.* 2002, Gauna *et al.* 2015).

A pesar de que existen varios estudios sobre epifitismo algal, la dinámica de las comunidades epífitas en relación con las peculiaridades de los hospedadores algales aún continúa siendo objeto de estudio. En Argentina, la mayoría de las investigaciones que se han llevado a cabo en comunidades epífitas de macroalgas pardas y verdes (Gauna & Parodi 2008, Gauna *et al.* 2009 a,c, 2015, Miravalles 2009, Gauna 2010, Gauna *et al.* 2016, Poza 2018, Poza *et al.* 2018b). En algas rojas, sólo existen estudios en poblaciones de *Gracilaria gracilis* (Martín 2010), *Hymenena falklandica* Kylin (Gauna & Parodi 2008) y *Rhodymenia pseudopalmata* (Lamouroux) Silva (Gauna *et al.* 2009b).

Considerando la morfología de *M. obtusangula*, con el desarrollo de grandes talos filamentosos con aspecto arborescentes es posible detectar una diversa comunidad epifítica. Por ello, resulta de importancia determinar su composición, abundancia y dinámica en la población de interés, para el entendimiento de la interacción entre basifitos y epibiontes.

## 2. Objetivos

- Evaluar la composición y abundancia de la comunidad epifítica y endofítica de *M. obtusangula* proveniente de poblaciones intermareales y submareales.
- Comparar la distribución de la comunidad de epífitos sobre el talo del hospedador y entre talos tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles.
- Determinar la dinámica estacional de las comunidades de epífitos algales, relacionándolas con los parámetros ambientales, en el intermareal y submareal.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Caracterización de la población hospedadora**

Se colectaron al azar 20 talos de *M. obtusangula* en el intermareal inferior y 10 en el submareal de la costa de Piedras Coloradas (Las Grutas), en los muestreos de otoño, invierno y primavera realizados en 2017.

Los parámetros ambientales registrados fueron: temperatura del agua de mar (°C), fotoperíodo (horas) e intensidad del viento (km/h).

En el laboratorio, los talos fueron lavados con agua de mar para eliminar el sedimento adherido y posteriormente fueron clasificados en tres categorías:

- *talos hospedadores tetraspóricos*: identificados por la presencia de tetrasporangios desarrollados,
- *talos hospedadores cistocárpicos*: con desarrollo de cistocarpos y
- *talos hospedadores juveniles*: carentes de estructuras reproductivas desarrolladas.

En cada categoría se registró la longitud máxima (cm). Para ello, se midió la longitud del talo desde el disco basal hasta la rama de mayor longitud. Posteriormente fueron fijados en FAA y conservados para su posterior análisis.

#### **3.2. Caracterización y cuantificación de la comunidad epífita**

Cada talo previamente clasificado como tetrasporofito, carposporofito o juvenil se sub-muestreó en tres regiones diferentes: apical, media y basal. Las muestras apicales se tomaron de los extremos distales de las ramas terminales; las mediales de las porciones medias del eje principal, mientras que las basales

fueron seleccionadas en el extremo más próximo al disco de fijación. Para cada una de las muestras se seleccionaron aleatoriamente 3 réplicas de 5 mm<sup>2</sup>, alcanzando una superficie total de observación de 15 mm<sup>2</sup>. Teniendo en cuenta las tres regiones del talo hospedador y el número total de frondes colectados, el área total de observación fue de 45 mm<sup>2</sup>. Estacionalmente, para la zona submareal (N=10 por estación) se analizó un área de 450 mm<sup>2</sup>, mientras que para la intermareal (N=20 por estación) fue de 900 mm<sup>2</sup>; resultando al final del estudio para la zona submareal un área total examinada de 1350 mm<sup>2</sup>, mientras que para el intermareal de 2700 mm<sup>2</sup>.

Los epífitos y endófitos observados bajo microscopio sobre *M. obtusangula* fueron identificados a nivel de género y/o de especie utilizando claves tradicionales. Para una mejor observación de los organismos epífitos, cada réplica fue teñida con Lugol (ver *Cap. I*). Los conteos se realizaron al MO utilizando el objetivo de 40x.

Se determinó la incidencia de epífitos según las zonas: intermareal y submareal, tipo de talo (tetrasporofitos, juveniles y carposporofitos) y regiones del talo hospedador (apical, medio y basal), agrupando los epífitos en 4 categorías, según Peters & Schaffelke (1996), modificada por Gauna *et al.* (2015):

- (i) *Muy abundantes*: Epífitos presentes en más del 70% de los talos hospedadores,
- (ii) *Abundantes*: entre el 70 – 35 % de los talos hospedadores,
- (iii) *Raros*: entre el 35 – 20% de los talos hospedadores,
- (iv) *Ocasionales*: presentes en < 20 % de los talos hospedadores.

### 3.2.1. Abundancia total de epífitos

Para el análisis espacial y temporal de la comunidad epifítica, se consideró el número total de epífitos por cada talo observado y a partir del cual se estimaron diferentes índices ecológicos (Begon *et al.* 1999, Krebs 1999):

**Riqueza específica** (medida como número de especies): riqueza específica total de la comunidad epifítica de la población intermareal y submareal de *M. obtusangula*, así como respecto a cada estación.

**Índice de diversidad de Shannon-Wiener ( $H'$ )**

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

Dónde:  $p_i$  = proporción del número de individuos del taxon ("i") con respecto al total de ejemplares ( $n_i/N$ ), (Shannon & Weaver 1949).

**Índice de equidad de Pielou ( $J'$ )**, empleado para medir la proporción de la diversidad observada en cada estación y zona muestreada, con relación a la máxima diversidad esperada. Su valor va de 0 a 1, de forma que 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes (Magurran 1988). El cálculo se efectuó siguiendo la siguiente expresión:

$$J' = \frac{H'}{H'_{max}}$$

Dónde:  $H'_{max}$  =  $\log_2 S$  es la diversidad máxima y  $H'$  = medida logarítmica de la diversidad.

**Dominancia de Simpson ( $\lambda$ )**, toma en cuenta la representatividad de las especies con mayor valor de importancia sin evaluar la contribución del resto de las especies. Puede considerarse un parámetro inverso al concepto de equidad de la comunidad:

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

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:  $1/\lambda = 1/ \sum p_i^2$ .

### 3.2.2. Análisis estadísticos

A cada conjunto de datos se examinó la normalidad utilizando el test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de la varianza por el test de Bartlett. Para evaluar las diferencias en la abundancia de talos tetrasporofitos, carposporofitos y juveniles de *M. obtusangula*, con respecto a su longitud máxima, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples mediante la prueba de diferencia significativa HSD-Tukey.

Se realizaron análisis de ANOVA para determinar diferencias en la abundancia de epífitos y endófitos entre las zonas intermareales y submareales, las estaciones primavera, otoño e invierno, las diferentes regiones apicales, medias y basales del talo hospedador, así como en las distintas fases del talo de *M. obtusangula*: cistocárpicos, tetraspóricos y juveniles.

Se realizaron análisis multivariados con el propósito de describir la variabilidad en el ensamble de epífitos durante las estaciones del año para ambos sitios de muestreo. 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 & Curtis 1957, Clarke & Warwick 2001).

Para analizar las relaciones entre la dinámica de la comunidad de epífitos y las variables ambientales a lo largo de las estaciones del año, se realizó un análisis de Correspondencia Canónica (CCA) (Ter Braak 1994). En este análisis se utilizaron datos de abundancia de los taxones epifíticos, variables ambientales, como la temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidad del viento y la longitud de los talos de *M. obtusangula*. Para la selección de los diferentes métodos de ordenamiento (nMDS, CCA) se siguió el análisis propuesto por Espinosa (2016), donde se analizó el conjunto asumiendo una distribución normal y se utilizó la desviación estándar como una medida del tipo de respuesta. En los análisis se consideraron dos posibilidades: la presencia de una dispersión con menos de tres desviaciones estándar, lo cual permitió asumir una respuesta lineal (monotónica), o la presencia de más de tres desviaciones asumiendo una respuesta unimodal (distribución en campana). En base al tipo de respuesta observada se seleccionó el tipo de ordenamiento. Para ello, se utilizó el paquete “Vegan” (Oksanen *et al.* 2013), la función “decorana” en R. Se utilizaron las funciones “cca” y “dca” para realizar algunos de los ordenamientos.

Para realizar los análisis estadísticos se utilizaron los programas R 4.0.3 (Core Team 2020), PRIMER 6 & PERMANOVA (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) (Clarke & Warwick 2001) y Past, con un nivel de significancia de 0,05.

### **3.2.3. Identificación de epífitos sobre *M. obtusangula***

#### **3.2.3.1. Aislamiento de epífitos bajo condiciones de cultivo**

La correcta identificación de los organismos epifíticos o endofíticos, implicó la observación de características morfológicas y frecuentemente del desarrollo de estructuras reproductivas no presentes en los talos provenientes de la naturaleza, haciéndose necesario el aislamiento de los talos para su cultivo *in vitro* bajo condiciones de laboratorio.

Para la iniciación de los cultivos, se tomaron porciones pequeñas de *M. obtusangula* colonizadas con el epífito o endófito de interés. Las mismas fueron lavadas varias veces en agua de mar estéril. Para un exitoso desarrollo de los epífitos se probaron dos diferentes medios nutritivos y temperaturas de cultivo. Para ello, cada sección epifitada de *M. obtusangula* se colocó en cajas de Petri que contuvieron agua de mar estéril y enriquecida con medio PES o con medio Von Stosch. Las secciones fueron incubadas por un periodo de tres meses, a 16°C y 12°C, con un fotoperíodo 12:12 h y a una irradiancia de 25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### **3.2.3.2. Identificación de diatomeas epífitas**

Se seleccionaron fragmentos de talos de *M. obtusangula* colonizados por distintas especies de diatomeas, previamente fijados en FAA y posteriormente lavados con agua destilada. Luego se centrifugaron por 10 minutos a 2000 rpm, reemplazando en los sucesivos enjuagues el sobrenadante por agua destilada.



Este procedimiento se realizó 2 o 3 veces hasta eliminar por completo el fijador. Luego se procedió a realizar la limpieza de los frústulos, siguiendo la técnica propuesta por Licursi & Gómez (2003). El método consistió en agregar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 100 % a la muestra en una relación 1:3 y luego calentarla a baño María durante 4 o 5 horas, hasta que el tejido tomó coloración blanquecina. Luego las muestras fueron lavadas en agua destilada por centrifugación, empleando ciclos de 10 minutos a 2000 rpm. En cada ciclo se descartó el sobrenadante y el material resultante se colocó sobre portaobjetos y cubreobjetos para su observación al MO.

### **3.2.3.3. Observaciones al MEB y TEM**

Material obtenido en la sección anterior fue colocado sobre cubreobjetos previamente cubiertos con Poly-D-lisina 0,5 %. Luego, las muestras fueron cubiertas por oro (Pelco 9100) para su posterior observación al microscopio electrónico de barrido (CCT-BB, CONICET).

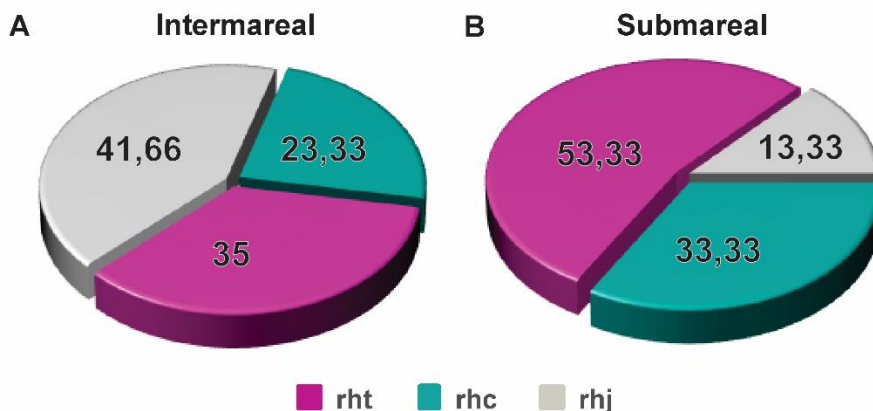
Para una correcta identificación de las diatomeas, fragmentos de *M. obtusangula* fueron preparados para la observación al MEB. Asimismo, para la observación de organismos endófitos, fragmentos de talos de *M. obtusangula* fueron fijados y procesados para estudios de microscopía electrónica de transmisión (*ver Cap. 1*).

## 4. Resultados

### 4.1. *M. obtusangula* como organismo hospedador

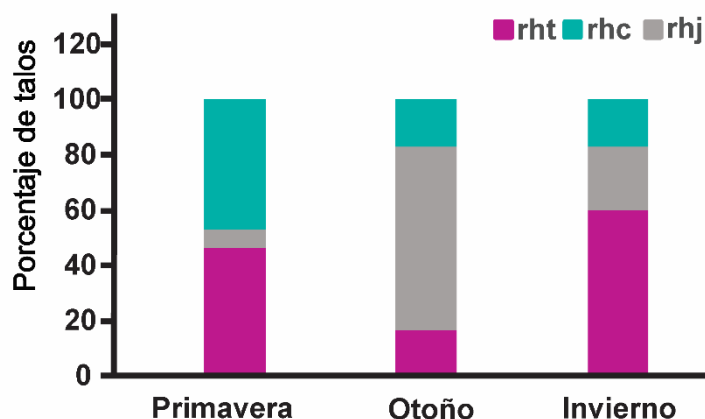
La proporción de talos tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles de *M. obtusangula* recolectados para este estudio en las zonas intermareal y submareal fue diferente. En la primera, se observó que los talos juveniles representaron un 41,66% del total de talos colectados. Los talos tetraspóricos representaron un 35%, mientras que los cistocárpicos fueron los menos abundantes alcanzado un 23% (Fig. 57 A).

Una proporción diferente se registró en la zona submareal. Allí los talos juveniles representaron sólo el 13,33%, mientras que los talos tetraspóricos superaron el 50% del total de los frondes colectados. En cambio, los talos cistocárpicos presentaron proporciones intermedias (Fig. 57 B).



**Figura 57.** Gráfico de torta del porcentaje de diferentes talos de *M. obtusangula* registrados en ambas zonas. **A.** Intermareal. **B.** Submareal. **rht:** talos tetraspóricos, **rhc:** talos cistocárpicos, **rhj:** talos juveniles

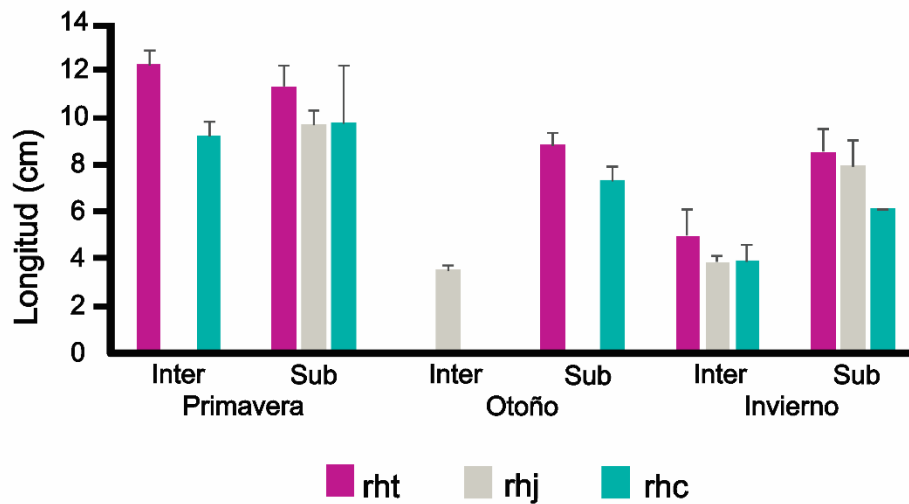
El porcentaje de los distintos talos de *M. obtusangula* dentro de las muestras tomadas a lo largo de las estaciones, se representa en la figura 58. Durante la primavera la proporción de los talos tetrasporofitos y cistocárpicos fue equivalente (46,66%) y superior a la de los juveniles (6,6%), indicando que los talos recolectado en esta estación estuvieron mayormente reproductivos. Un patrón totalmente diferente se observó en las muestras de otoño, las cuales estuvieron caracterizadas por la presencia de talos juveniles (66,6%) y sólo un 16,6% por frondes tetrasporofitos y cistocárpicos. En las muestras de invierno las proporciones de los frondes cambiaron nuevamente, allí se reportó una mayor frecuencia de talos tetraspóricos (60%), mientras que los juveniles representaron el 23,33% y los cistocárpicos sólo el 16,6 %.



**Figura 58.** Porcentaje de diferentes talos de *M. obtusangula* colectados en las tres estaciones. **rht**: talos tetraspóricos, **rhc**: talos cistocárpicos, **rhj**: talos juveniles

La longitud (cm) máxima de los talos tetraspóricos, cistocárpicos y juveniles de *M. obtusangula* fueron significativamente diferentes (ANOVA:  $F_{(2; 107)} = 23,65$ ;  $p < 0,001$ ). Los talos tetrasporofitos presentaron una longitud significativamente

mayor de 9,51 ( $\pm 0,58$ ) cm, respecto a los talos cistocarpicos (8,25  $\pm 0,55$  cm) y a los juveniles (4,18  $\pm 0,33$  cm) (Fig. 59).



**Figura 59. *M. obtusangula*.** Variación estacional de la longitud máxima de sus talos en las regiones intermareal y submareal. **rht**: talos tetrasporofitos, **rhj**: talos juveniles, **rhc**: talos carposporofitos. Los valores representan la **media  $\pm$  error estándar**.

#### 4.2. Caracterización de la comunidad epifítica de *M. obtusangula*

Sobre los talos de *M. obtusangula* se registró un total de 26 taxones de epífitos (Tabla 19). De ellos, 23 estuvieron presentes tanto en talos recolectados en la zona intermareal inferior como en la submareal. Solo tres taxones, *Achnanthes* sp., *Griffithsia* sp. y *Pylaiella* sp., se registraron exclusivamente en el intermareal. Estos resultados indicaron que ambas zonas compartieron un 88,4% de los organismos epífitos observados sobre *M. obtusangula*.

Los epífitos pertenecieron a seis clases taxonómicas diferentes: Bacillariophyceae (Bacillariophyta), Florideophyceae y Stylonematophyceae (Rhodophyta), Ulvophyceae (Chlorophyta), Phaeophyceae (Ochrophyta) y Cyanophyceae (Cyanobacteria).

Más del 95% de la abundancia total de epífitos estuvo representada por Bacillariophyta con diez taxones correspondientes a diatomeas pennadas y un grupo de diatomeas centrales indeterminado (GDCI). El resto de las algas epífitas representaron sólo el 3,23% de la abundancia total. Algas rojas de la Clase Florideophyceae contribuyeron con seis taxones y la Clase Stylonematophyceae sólo con un taxa y en conjunto alcanzaron el 2,74% de la abundancia total. Las Clases Ulvophyceae, Phaeophyceae y Cyanophyceae presentaron porcentajes de la abundancia total muy bajos 0,33%, 0,07% y 0,08%, respectivamente. La Clase Ulvophyceae estuvo integrada por tres taxones, Phaeophyceae por dos y el grupo de Cyanobacteria (GC) por *Calothrix* sp. y *Lyngbya* spp. (Tabla 19, Figs. 60 y 62 E).

Rhodophyta estuvo representada por cinco géneros del Orden Ceramiales: *Polysiphonia* sp., *Griffithsia* sp., *Antithamnion* sp., *Ceramium* sp. y *Antithamnionella* sp. y por sólo un género de Acrochaetiales: *Audouinella* y una especie pertenecientes a las Stylonematales: *Stylonema alsidii* (Zanardini) KMDrew (Tabla 19, Fig. 61).

Dentro de Phaeophyceae se registró a los géneros *Ectocarpus* sp. y *Pylaiella* sp. pertenecientes al Orden Ectocarpales (Tabla 19, Fig. 62 A y B), así como en Ulvophyceae a *Chaetomorpha* sp., *Ulvella* sp., *Ulothrix* sp. y *Acrochaete*

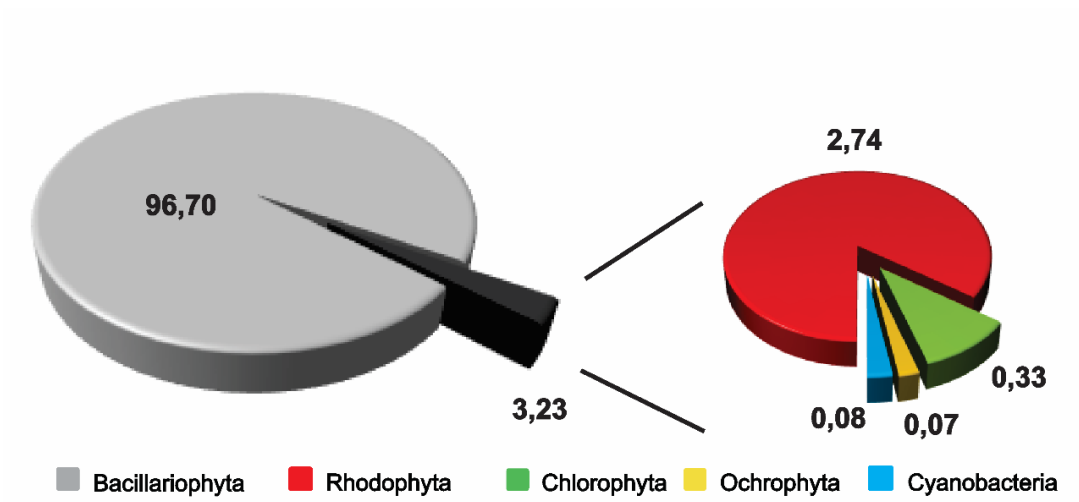
*heteroclada* JA Correa & R. Nielsen pertenecientes a los Órdenes Chaetophorales, Ulvales y Ulotrichales (Fig. 62 C y D).

Entre los organismos epizoos se destacó la presencia de *Vorticella* L. (1767), organismo perteneciente a la Clase Oligohymenophorea (Fig. 62 F).

Bacillariophyta fue la más diversa en cuanto a la cantidad de taxones epífitos presentes: *Cocconeis* sp., *Grammatophora marina* (Lyngbye) Kützing, *Navicula* sp., *Fragilaria* sp., *Nitzschia* sp., *Rhabdonema* sp., *Pinnularia* sp., *Licmophora* sp., *Synedra* sp., *Achnanthes* sp. y el GDCI (Tabla 19, Fig. 63).

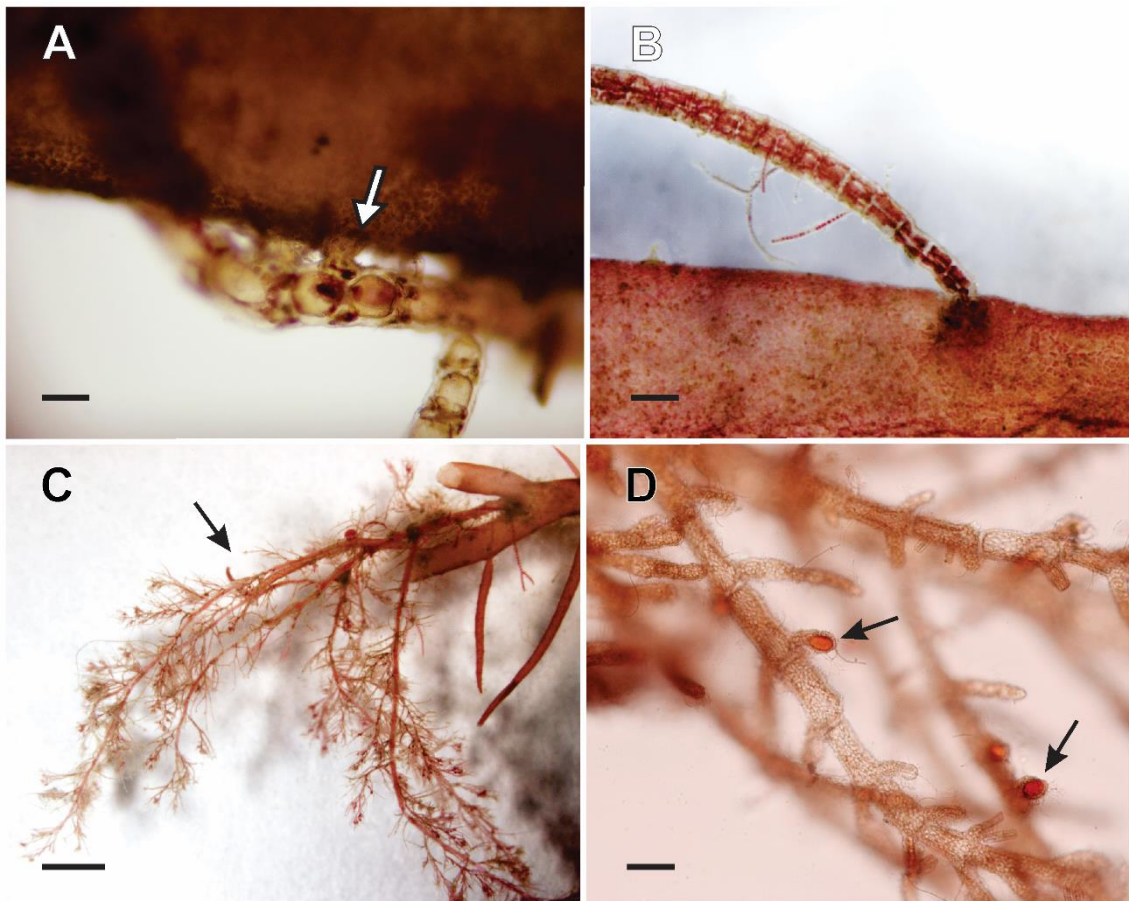
**Tabla 19.** Taxones, especies y grupos epífitos y endófitos encontrados sobre los talos de *M. obtusangula*. GDCI: grupo de diatomeas Centrales indeterminadas; GC: grupo de Cyanobacteria.

<b>Filo</b>	<b>Clases</b>	<b>Orden</b>	<b>Taxones</b>
Bacillariophyta	<b>Pennales</b>	Cocconeidales	<i>Cocconeis</i> sp. <i>Grammatophora marina</i>
		Rhabdonematales	<i>Rhabdonema</i> sp.
		Naviculales	<i>Navicula</i> sp. <i>Pinnularia</i> sp.
		Fragilariales	<i>Fragilaria</i> sp. <i>Synedra</i> sp.
		Bacillariales	<i>Nitzschia</i> sp.
		Licmophorales	<i>Licmophora</i> sp.
		Mastogloiales	<i>Achnanthes</i> sp. <i>GDCI</i>
		<b>Centrales</b>	
Rhodophyta	<b>Florideophyceae</b>	Acrochaetiales	<i>Audouinella</i> sp. <i>Antithamnionella</i> sp. <i>Ceramium</i> sp.
		Ceramiales	<i>Antithamnion</i> sp. <i>Griffithsia</i> sp. <i>Polysiphonia</i> sp.
			<b>Stylonematophyceae</b>
Ochrophyta	<b>Phaeophyceae</b>	Ectocarpales	<i>Ectocarpus</i> sp. <i>Pylaiella</i> sp.
Chlorophyta	<b>Ulvophyceae</b>	Ulvales	<i>Acrochaete heteroclada</i> <i>Ulvella</i> sp.
		Ulotrichales	<i>Ulothrix</i> sp.
		Cladophorales	<i>Chaetomorpha</i>
Cyanobacteria (GC)	<b>Cyanophyceae</b>	Nostocales	<i>Calothrix</i> sp.
		Oscillatoriales	<i>Lyngbya spp.</i>

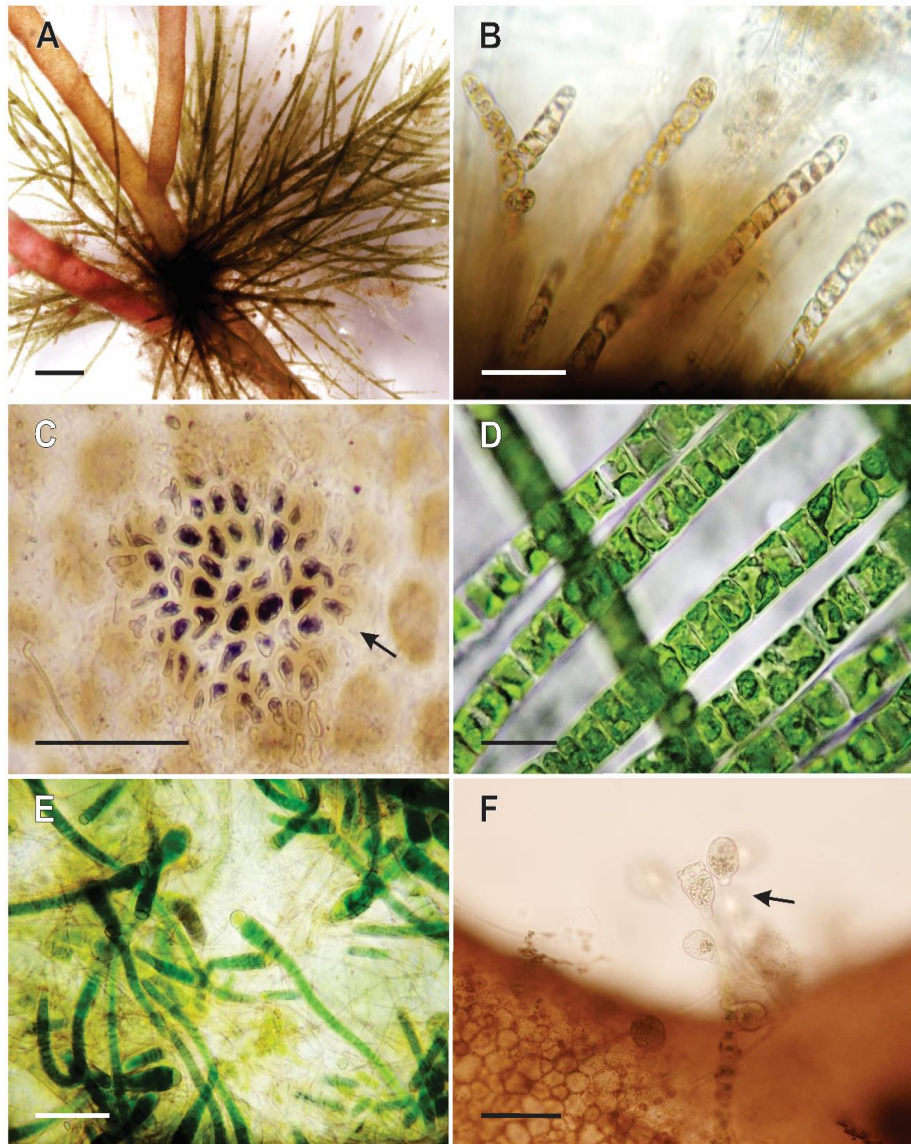


**Figura 60.** Abundancia total (%) de cada grupo de epífitos registrados sobre *M. obtusangula*.



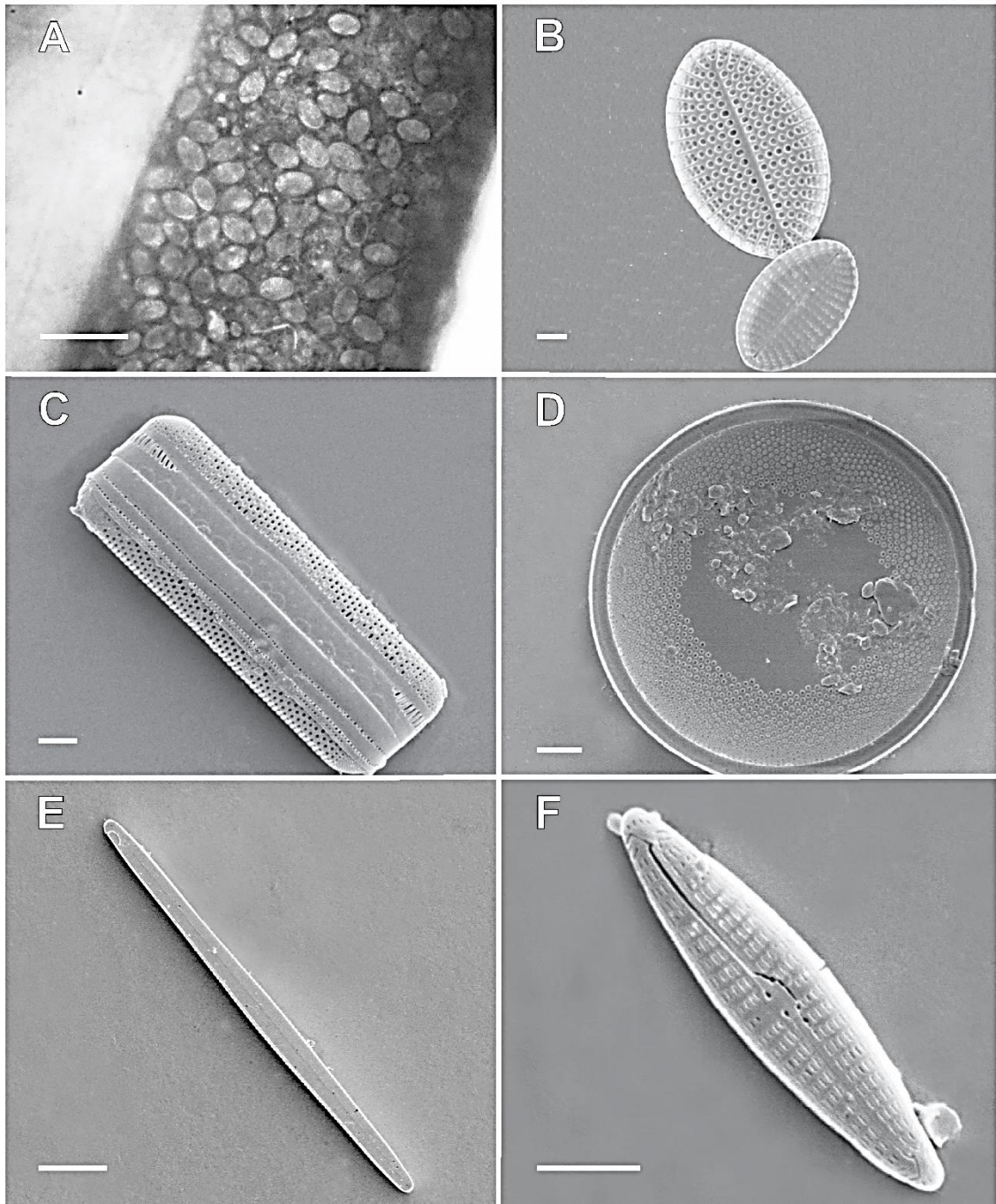


**Figura 61. Epífitos sobre talos de *M. obtusangula* pertenecientes a la clase Florideophyceae. A. *Ceramium* sp. sobre la superficie del hospedador mostrando conexiones con las células corticales de *M. obtusangula* (flecha). B. Epífito perteneciente al género *Polysiphonia*. C. Vista superficial de ejemplares de *Antithamnionella* (flecha). D. Detalle de *Antithamnion* sp. con estructuras reproductivas (flechas). Barras escalas: A, B y D = 100  $\mu$ m; C = 1 mm.**



**Figura 62. Epífitos sobre los talos de *M. obtusangula* pertenecientes a las clases Phaeophyceae, Ulvophyceae, Cyanophyceae y Oligohymenophorea. A.** Talo hospedador epifitado por *Pylaiella* sp. **B.** *Pylaiella* sp. Detalle de filamentos uniseriados obtenidos en cultivos de laboratorio. **C.** *M. obtusangula* epifitada por *Ulvella* sp. (flecha). **D.** *Ulothrix* sp. Filamentos aislados desde el hospedador bajo condiciones de cultivo. **E.** *Calothrix* sp. colonizando la superficie del hospedador. **F.** *Vorticella* sp. (flecha) sobre *M. obtusangula*. Barras escalas: **B, C, D** y **E** = 50 µm; **F** = 100 µm; **A** = 1 mm. **C** y **F**: Tinción Lugol





**Figura 63. Epífitos pertenecientes al filo Bacillariophyta. A.** Superficie de *M. obtusangula* epifitada por *Cocconeis* sp. **B.** Frustulos de *Cocconeis* sp. **C.** *Grammatophora marina*. **D.** Diatomea central. **E.** *Nitzschia* sp. **F.** *Navicula* sp. Barras escalas: **B, C, D y F** = 2  $\mu\text{m}$ ; **E** = 20  $\mu\text{m}$ ; **A** = 50  $\mu\text{m}$ . **A:** MO; **B, C, D, E y F:** MEB

#### **4.2.1. Asociación de *M. obtusangula* con *Acrochaete heteroclada* y *Audoinella* sp.**

A través de técnicas de aislamiento y cultivo se logró identificar a un organismo epi-endófito de *M. obtusangula* como *Acrochaete heteroclada* (Clase Ulvophyceae).

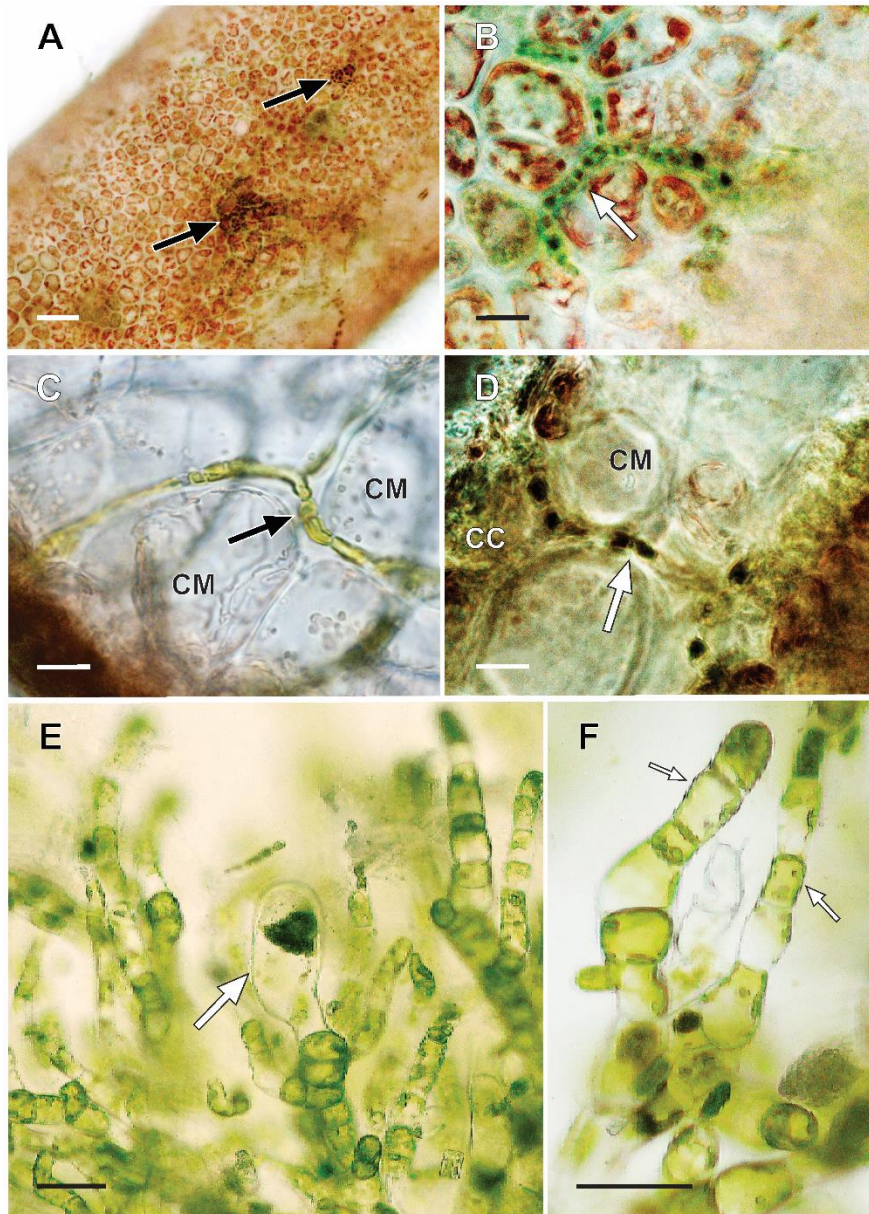
En la superficie del hospedador, *A. heteroclada* presentó talos de hábito heterótrico, constituidos por filamentos uniseriados de células alargadas. El crecimiento epifítico de los filamentos se produjo a lo largo de los espacios intercelulares de las células superficiales de la corteza de *M. obtusangula*, llegando a conformar un entramado de filamentos verdosos sobre los talos del hospedador (Fig. 64 A).

También, filamentos de *A. heteroclada* fueron observados en el interior del hospedador donde se observa la estructura de los pirenoides característica de la clase Ulvophyceae (Fig. 65 A y B). La extensión de los filamentos alcanzó a las células medulares (Fig. 64 C y D). Este desarrollo y crecimiento en el interior de los talos del hospedador, definen a *A. heteroclada* como una especie de hábito epi-endófito. La fase endófito de *A. heteroclada* comenzó con la penetración de los filamentos entre las células corticales internas (Fig. 65 B), hasta alcanzar la región medular del hospedador. No se evidenció penetración de los talos del endófito al interior de las células del hospedador. En todas las muestras observadas, *A. heteroclada* se desarrolló entre las paredes celulares corticales y en algunos sitios se pudo observar cierta compresión y deformación en la pared celular y la membrana plasmática debido a su desarrollo (Fig. 65 D).

En condiciones de cultivo y aislado de su hospedador *A. heteroclada* formó talos microscópicos constituidos por filamentos con células isodiamétricas a alargadas. En algunos de ellos fueron observados esporangios apicales piriformes (Fig. 64 E y F).

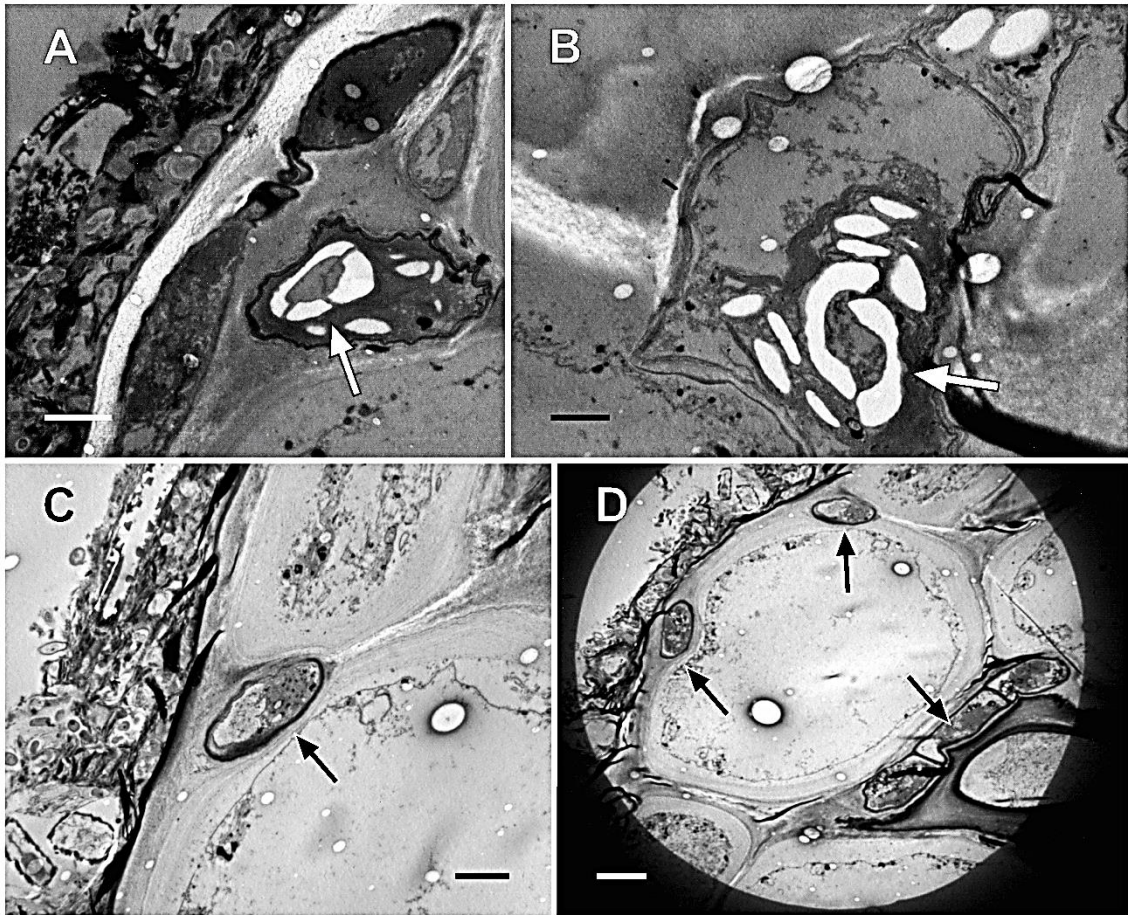
Otro organismo de gran interés por su alta frecuencia de incidencia y abundancia en talos *M. obtusangula* colectados en el ambiente natural fue *Audouinella* sp. perteneciente a la clase Florideophyceae. Presentó un talo filamentosamente ramificado, constituido por una porción basal y otra erecta (Fig. 66 A). La porción basal fue postrada, estolonífera con desarrollo de rizoides, la cual se mantuvo sólidamente adherida al huésped. La porción erecta estuvo constituida por filamentos ramificados uniseriados que se adhirió a la superficie del hospedador mediante células basales adyacentes más pequeñas e irregulares, mientras que las erectas fueron cilíndricas y de mayor tamaño, presentando estas últimas, una gruesa pared celular. Sobre la porción erecta, se observaron tetrasporangios solitarios o agrupados de a pares sobre ramas laterales. Los esporangios fueron de tipo cruciados (Fig. 66 B).

Individuos de *Audouinella* sp. aislados del hospedador y en cultivo formaron matas de filamentos de células cilíndricas conteniendo un cloroplasto parietal. Los filamentos estuvieron ramificados y en los extremos se desarrollaron entre 6 y 8 ramas también de células cilíndricas (Fig. 66 C y D).

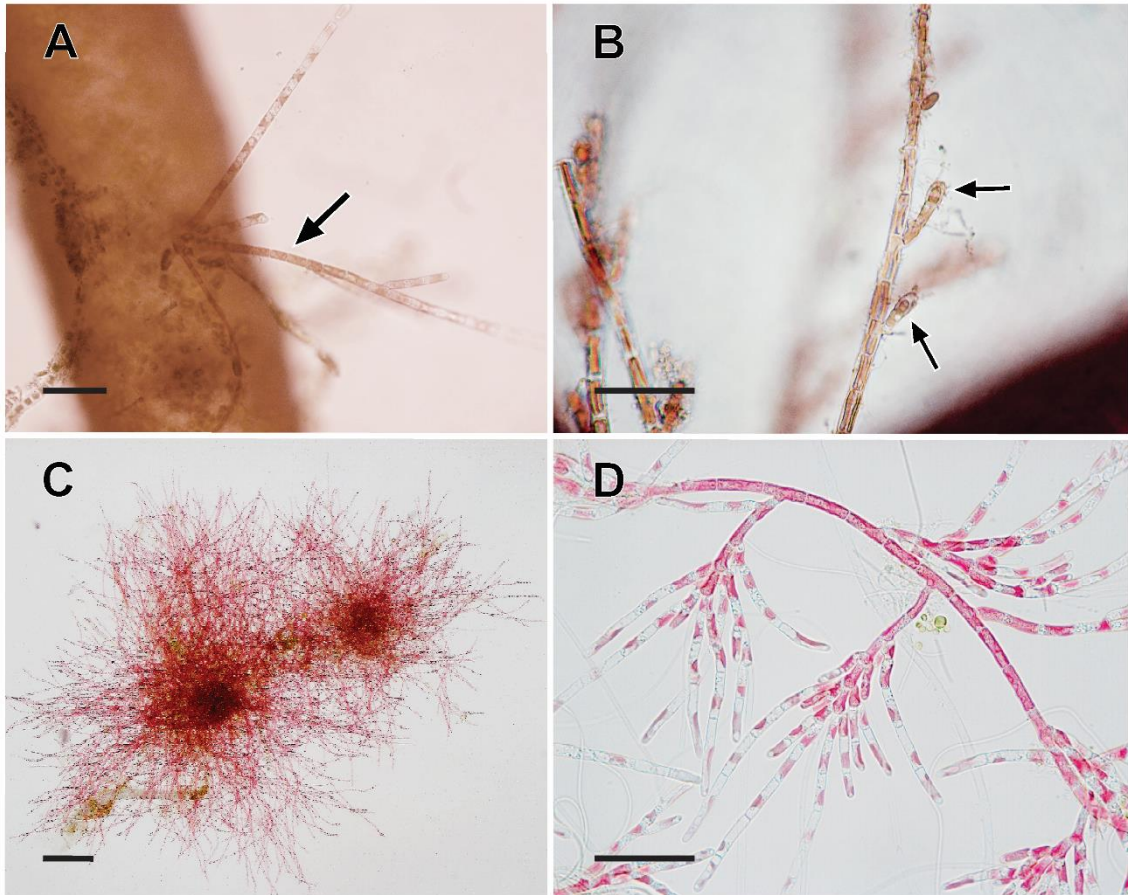


**Figura 64. *Acrochaete heteroclada* sobre *M. obtusangula*.** **A y B:** Superficie de *M. obtusangula* con filamentos de *A. heteroclada* entre las células corticales (flechas). **C y D:** *M. obtusangula*. Corte transversal donde se observan filamentos endófitos de *A. heteroclada* entre las células medulares del hospedador (flechas). **E.** *A. heteroclada* con desarrollo de esporangios apicales piriforme (flecha), se evidencia su disposición irregular a modo de matas. **F.** Detalle de filamento con células isodiamétricas a alargadas (flechas). *Barras escalas:* **B, C y D** = 10 µm; **A, E y F** = 50 µm. **CM:** células medulares; **CC:** células corticales.





**Figura 65. *M. obtusangula* mostrando filamentos endófitos de *A. heteroclada* (MET). A y B:** Detalle de células de *A. heteroclada* mostrando pirenoide rodeado por casquetes de almidón (flechas) característico de la Clase Ulvophyceaeae. **C y D.** Células y filamento endófitos (flechas) en la zona cortical del talo hospedador, nótese cierta compresión y deformación en la pared celular y la membrana plasmática dado por el desarrollo de los filamentos del endófito. *Barras escalas:* **B** = 1  $\mu$ m; **A y C** =2  $\mu$ m; **D**=4  $\mu$ m.



**Figura 66. *Audouinella* sp. A. *M. obtusangula*.** Superficie epifitada por *Audouinella* sp. (flecha). **B.** Detalle de los filamentos de *Audouinella* sp. mostrando estructuras reproductivas (flechas). **C.** *Audouinella* sp. Filamentos creciendo bajo condiciones de cultivo. **D.** Detalle de los filamentos uniseriados ramificados. *Barras escalas:* **A, B y D** = 50  $\mu$ m; **C** = 100  $\mu$ m.



### **4.3. Variación espacio-temporal de la abundancia de epífitos sobre talos de *M. obtusangula***

#### **4.3.1. Comparación entre intermareal y submareal**

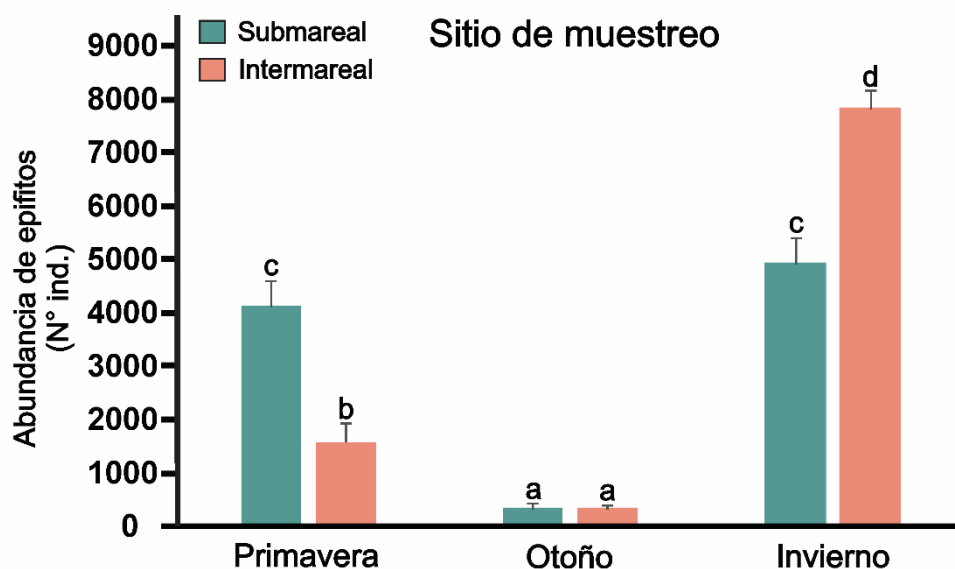
Al analizar la abundancia de epífitos totales registradas por talo de *M. obtusangula* recolectados en el submareal e intermareal a lo largo de primavera, otoño e invierno se pudieron observar diferencias significativas entre la doble interacción de las variables (ANOVA,  $F_{(2; 84)} = 20,64$ ;  $p < 0,001$ ) (Fig. 67). Los talos del intermareal mostraron una mayor abundancia total de epífitos con 3237,97 ( $\pm 199,75$ ) (ind./talo, media  $\pm$  estándar), mientras que en los del submareal la abundancia fue menor 3117,77 ( $\pm 282,48$ ) ind./talo.

Respecto a la abundancia total de epífitos en talos de *M. obtusangula*, en las tres estaciones, se pudieron encontrar diferencias significativas entre ellas tanto en el intermareal (ANOVA,  $F_{(2; 57)} = 214,57$ ;  $p < 0,001$ ) como en el submareal (ANOVA,  $F_{(2; 27)} = 14,05$ ;  $p < 0,001$ ). En ambos sitios la mayor abundancia de epífitos se registró en invierno y la menor en otoño (Fig. 67).

Como se observa en la Figura 67, los talos del intermareal durante los meses invernales presentaron mayor abundancia que la registrada en el submareal. El número de epífitos del intermareal fue de 7815,35 ( $\pm 345,97$ ) ind./talo, mientras que en sitios sumergidos se registraron 4917,95 ( $\pm 489,28$ ) ind./talo. Como se mencionó anteriormente, durante el otoño se registraron las menores abundancias de organismos de epífitos con respecto a las otras estaciones, pero se registraron valores similares para ambas zonas de muestreo (Fig. 67). En el

submareal, la abundancia de epífitos fue de 325,05 ( $\pm$  89,10) ind./talo y en el intermareal de 332,08 ( $\pm$  45,30) ind./talo (Fig. 67).

Durante la primavera la situación fue diferente, la zona submareal siempre sumergida, presentó una mayor abundancia de epífitos respecto a la intermareal. Allí la abundancia media registrada alcanzó valores de 4110,3 ( $\pm$  489,28) ind. mientras que zona intermareal con emersión periódica, se observaron valores próximos a 1566,48 ( $\pm$  345,97) ind./talo (Fig. 67).



**Figura 67. *M. obtusangula*. Abundancia de epífitos.** Abundancia de epífitos en el submareal e intermareal a lo largo de las estaciones muestreadas. (n° individuos totales/talo, para el intermareal y n° de individuos totales/talo, para el submareal). Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) están indicadas por las diferentes letras según las comparaciones múltiples determinadas por el test HSD-Tukey.

#### 4.3.2. Dinámica espacial de la abundancia de la comunidad de epífitos

Al comparar las abundancias de las diferentes clases de epífitos se pudo determinar que hubo diferencias significativas entre los grupos a lo largo de las estaciones en las dos zonas de muestreo (ANOVA,  $F_{(8; 432)} = 16,86$ ;  $p < 0,001$ ). La Clase Bacillariophyceae presentó las mayores abundancias sobre las otras clases. Le continuaron como más abundantes, los taxones pertenecientes al grupo de las algas rojas y en menor medida los grupos Ochrophyta, Cyanophyta y Chlorophyta.

Las diatomeas presentaron una abundancia media significativamente diferente a lo largo de las estaciones para las dos zonas evaluadas (ANOVA,  $F_{(2; 84)} = 17,73$ ;  $p < 0,001$ ), registrándose los mayores valores en invierno en el intermareal  $7524,78 (\pm 355,75)$  ind. Las menores abundancias fueron observadas en otoño y no superaron los 300 ind., para ninguna de las dos zonas (Fig. 68 A).

Las algas rojas no evidenciaron diferencias significativas a lo largo de las estaciones con respecto a las zonas submareal e intermareal ( $p=0,45$ ) registrando valores de abundancia media por estación de  $25,82 (\pm 7,29)$  ind, y  $118,94 (\pm 48,93)$  ind., respectivamente. No obstante, estacionalmente la mayor abundancia fue registrada en invierno con  $263,18 (\pm 16,65)$  ind. mientras que en primavera y otoño se encontraron valores menores 70 ind. (Fig. 68 B).

El mismo patrón, pero con diferencias estadísticamente significativas se observó en Phaeophyceae (ANOVA,  $F_{(2; 87)} = 4,62$ ;  $p = 0,012$ ), en invierno las algas pardas encontradas sobre talos de *M. obtusangula* colectados en el intermareal fueron considerablemente más abundantes. No obstante, los valores de

abundancia de epífitos fueron considerablemente menos que los registrados para las algas rojas tanto en la zona submareal e intermareal. La abundancia media estacional de las Phaeophyceae en el submareal fue de 1,83 ( $\pm 0,74$ ) ind. y de 2,54 ( $\pm 0,51$ ) ind. en el intermareal (Fig. 68 C).

Los epífitos pertenecientes a la Clase Ulvophyceae registraron diferencias significativas entre otoño, invierno y primavera tanto para el intermareal como submareal (ANOVA,  $F_{(2; 87)} = 17,38$ ;  $p < 0,001$ ), siendo más abundantes en los talos hospedadores que crecieron en primavera en el submareal ( $22,9 \pm 3,75$  ind.) e invierno en el intermareal ( $20,55 \pm 2,65$  ind.). (Fig. 68 D).

Con respecto a la abundancia de Cyanophyceae no se observaron diferencias entre las zonas ( $p=0,27$ ), pero sí hubo una diferencia significativa contemplando las estaciones (ANOVA,  $F_{(2; 87)} = 3,32$ ;  $p = 0,04$ ) siendo mayor en otoño  $5,18 (\pm 1,05)$  ind. (Fig. 68 E).

La abundancia de Oligohymenophorea fue extremadamente baja. *Vorticella* sp. sólo fue registrada ocasionalmente sobre talos hospedadores de *M. obtusangula* recolectada en el intermareal.

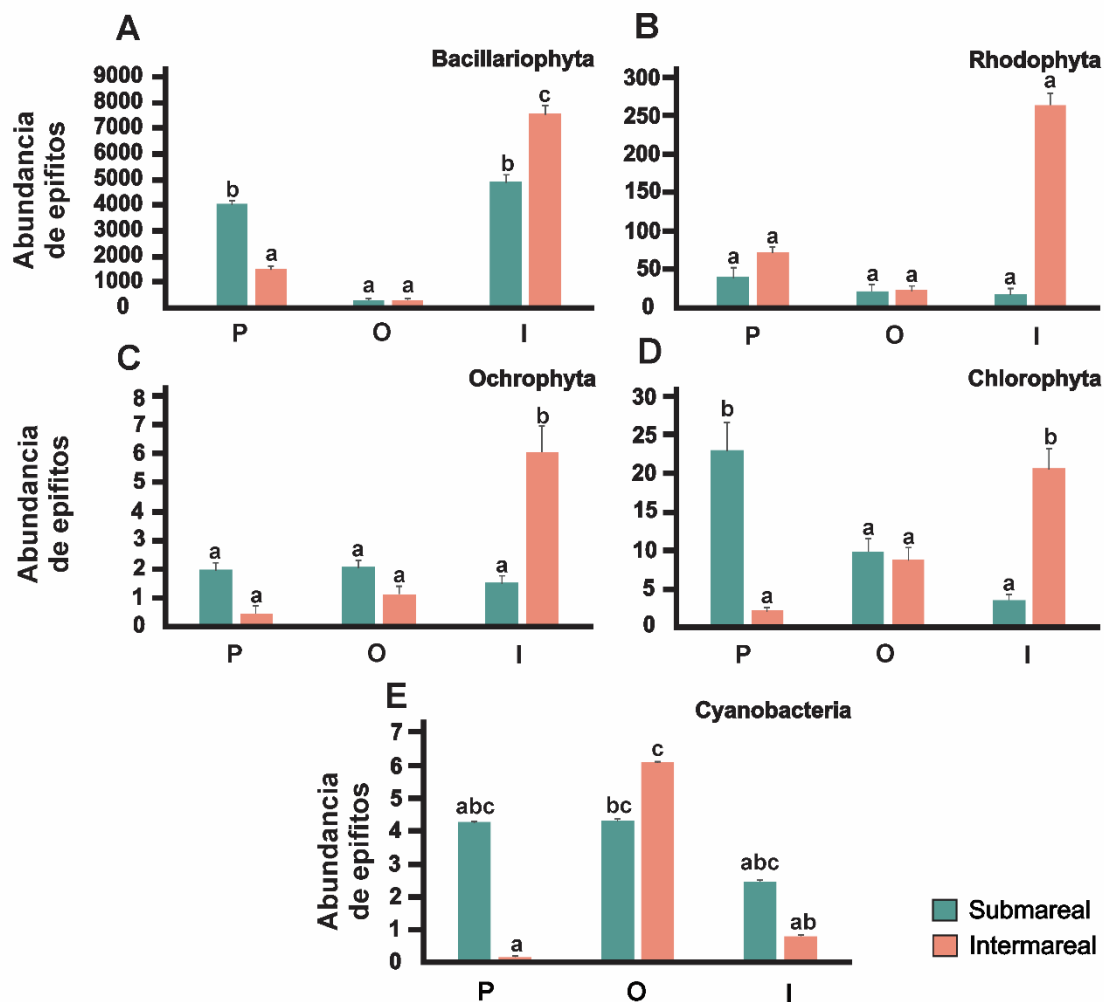


Figura 68. Abundancia media estacional de los taxones epífitos sobre *M. obtusangula*. A. Bacillariophyta. B. Rhodophyta. C. Ochrophyta. D. Chlorophyta. E. Cyanobacteria. P= primavera; O=otoño; I= invierno. Los valores representan la **media** ± error estándar.

#### 4.3.3. Categorización de taxa epífitos de *M. obtusangula* según su incidencia.

Considerando la totalidad de muestras sin discriminar sitios de colecta ni estaciones del año, se identificaron como: **muy abundantes** 7 taxones y al GDCl, **abundantes** 7 taxones y al GC, **raros** 3 taxones y **ocasionales** 7 (Tabla 20). Dentro del grupo de **muy abundantes** se registraron a las diatomeas *Cocconeis* sp., *Grammatophora marina*, *Navicula* sp. y GDCl, las algas rojas *Stylonema alsidii* y *Audouinella* sp., el alga parda *Ectocarpus* sp. y el alga verde *Ulothrix* sp. Se registraron incidencias mayores al 70% en estos organismos (Tabla 20). Asimismo, los taxones *Rhabdonema* sp., *Pinnularia* sp., *Synedra* sp., *Antithamnionella* sp., *Polysiphonia* sp., *Acrochaete heteroclada*, *Ulrella* sp. y las CG se registraron como epífitos **abundantes**, con incidencias variando entre el 35 y 58% de los talos infectados. Los taxones **raros** fueron identificados con una incidencia de colonización variable entre el 24 y 33% de los talos hospedadores. En este grupo fueron categorizados los siguientes taxones: *Nitzschia* sp., *Antithamnion* sp. y *Ceramium* sp. Los restantes taxones presentaron menores incidencias y fueron categorizados como epífitos **ocasionales**. Esta categoría presentó una incidencia entre el 3 y 11 % de los talos hospedadores (Tabla 20).

El patrón de incidencia de los epífitos sobre los talos de *M. obtusangula* colectados en el submareal e intermareal fue similar. Los taxones que se registraron como **muy abundantes** con una incidencia mayor al 73% fueron los mismos en ambas zonas, con la excepción de *Synedra* sp. se sumó a esta categoría en el intermareal.

Los epífitos categorizados como **abundantes** de la región submareal fueron *Rhabdonema* sp., *Antithamnionella* sp. y GC, cuyas incidencias en el hospedador variaron entre el 53 y 60%. Taxones **raros** fueron: *Synedra* sp., *Polysiphonia* sp. y *Ulvella* sp., con porcentajes de incidencia del 23 y 33%, respectivamente. Los 8 taxones restantes se categorizaron como **ocasionales** con porcentajes de incidencia que variaron entre 3,33 y 11,11% (Tabla 21).

La gran diferencia entre intermareal y submareal fue observada en el número de taxones epífitos categorizados como **abundantes**. Siendo considerablemente mayor el número de taxa registrados en el intermareal.

En la zona intermareal, como epífitos **abundantes** se identificaron 6 taxones *Pinnularia* sp., *Rhabdonema* sp., *Ceramium* sp., *Polysiphonia* sp., *Acrochaete heteroclada* y *Ulvella* sp. y GC. Como epífitos **ocasionales** se registraron *Achnanthes* sp., *Fragilaria* sp., *Licmophora* sp., *Griffithsia* sp., *Pylaiella* sp. y *Chaetomorpha* sp. Respecto a los epífitos **raros** los taxa identificados correspondieron a: *Nitzschia* sp., *Antithamnion* sp. y *Antithamnionella* sp. (Tabla 22).

**Tabla 20. Incidencia de taxones epífitos sobre *M. obtusangula*.** En la tabla se reporta el número de talos de *M. obtusangula* epifitados (n=90) y la incidencia de los epífitos (muy abundante: > 70%, abundante: 70-35%, rara: 35-20% y ocasional: <20%). GDCI: grupo diatomeas centrales indeterminadas.

Taxones de epífitos	N° de talos epifitados	% de talos epifitados	Incidencia
<b>Bacillariophyceae</b>			
<i>Achnanthes</i> sp.	6	6,67	ocasional
<i>Cocconeis</i> sp.	90	100	muy abundante
<i>Fragilaria</i> sp.	6	6,67	ocasional
<i>Grammatophora marina</i>	90	100	muy abundante
<i>Licmophora</i> sp.	10	11,11	ocasional
<i>Navicula</i> sp.	74	82,22	muy abundante
<i>Nitzschia</i> spp.	22	24,44	raro
<i>Rhabdonema</i> sp.	49	54,44	abundante
<i>Pinnularia</i> sp.	32	35,56	abundante
<i>Synedra</i> sp.	53	58,89	abundante
<i>GDCI</i>	66	73,33	muy abundante
<b>Florideophyceae</b>			
<i>Antithamnion</i> sp.	21	23,33	raro
<i>Antithamnionella</i> sp.	32	35	abundante
<i>Audouinella</i> sp.	90	100	muy abundante
<i>Ceramium</i> sp.	30	33,33	raro
<i>Griffithsia</i> sp.	5	5,56	ocasional
<i>Polysiphonia</i> sp.	38	42,22	abundante
<b>Stylonematophyceae</b>			
<i>Stylonema alsidii</i>	72	80	muy abundante
<b>Phaeophyceae</b>			
<i>Ectocarpus</i> sp.	71	78,89	muy abundante
<i>Pylaiella</i> sp.	3	3,33	ocasional
<b>Ulvophyceae</b>			
<i>Acrochaete heteroclada</i>	33	36,67	abundante
<i>Chaetomorpha</i> sp.	6	6,67	ocasional
<i>Ulothrix</i> sp.	72	80	muy abundante
<i>Ulvella</i> sp.	33	36,67	abundante
<b>Cyanophyceae (GC)</b>			
<i>Vorticella</i> sp.	3	3,33	ocasional



**Tabla 21. Incidencia de taxones epífitos sobre *M. obtusangula* colectada de la región submareal.** En la tabla se reporta el número de talos de *M. obtusangula* epífitados (n=10 para cada huésped en cada estación) y la incidencia de los epífitos (muy abundante: > 70%, abundante: 70-35%, rara: 35-20% y ocasional: <20%). GDCI: grupo diatomeas centrales indeterminadas

Región submareal			
Taxones de epífitos	N° talos epífitados	% talos epífitados	Incidencia
<b>Bacillariophyta</b>			
<i>Cocconeis</i> sp.	30	100	muy abundante
<i>Fragilaria</i> sp.	2	6,7	ocasional
<i>Grammatophora marina</i>	30	100	muy abundante
<i>Licmophora</i> sp.	1	3,3	ocasional
<i>Navicula</i> sp.	24	80	muy abundante
<i>Nitzschia</i> sp.	2	6,7	ocasional
<i>Pinnularia</i> sp.	3	10	ocasional
<i>Rhabdonema</i> sp.	18	60	abundante
<i>Synedra</i> sp.	8	26,7	raro
<i>GDCI</i>	22	73,3	muy abundante
<b>Florideophyceae</b>			
<i>Antithamnion</i> sp.	2	6,7	ocasional
<i>Antithamnionella</i> sp.	16	53,3	abundante
<i>Audouinella</i> sp.	30	100	muy abundante
<i>Ceramium</i> sp.	4	13,3	ocasional
<i>Polysiphonia</i> sp.	10	33,3	raro
<b>Stylonematophyceae</b>			
<i>Stylonema alsidii</i>	25	83,3	muy abundante
<b>Phaeophyceae</b>			
<i>Ectocarpus</i> sp.	24	80	muy abundante
<b>Ulvophyceae</b>			
<i>Acrochaete heteroclada</i>	5	16,7	ocasional
<i>Chaetomorpha</i> sp.	2	6,7	ocasional
<i>Ulothrix</i> sp.	27	90	muy abundante
<i>Ulvella</i> sp.	8	26,7	raro
<b>Cyanophyceae (GC)</b>	15	50	abundante

**Tabla 22. Incidencia de epífitos sobre *M. obtusangula* en la región intermareal.** En la tabla se reporta el número de talos de *M. obtusangula* epífitados (n=20 para cada huésped en cada estación) y la incidencia (muy abundante: > 70%, abundante: 70-35%, rara: 35-20% y ocasional: <20%). GDCI: grupo diatomeas centrales indeterminadas

Región Intermareal			
Taxones de epífitos	N° talos epífitados	%° talos epífitados	Incidencia
<b>Bacillariophyceae</b>			
<i>Achnanthes</i> sp.	6	10,00	ocasional
<i>Cocconeis</i> sp.	60	100	muy abundante
<i>Fragilaria</i> sp.	4	6,67	ocasional
<i>Grammatophora marina</i>	60	100	muy abundante
<i>Licmophora</i> sp.	9	15	ocasional
<i>Navicula</i> sp.	50	83,33	muy abundante
<i>Nitzschia</i> sp.	20	33,33	raro
<i>Pinnularia</i> sp.	29	48,33	abundante
<i>Rhabdonema</i> sp.	31	51,67	abundante
<i>Synedra</i> sp.	45	75	muy abundante
GDCI	44	73,33	muy abundante
<b>Florideophyceae</b>			
<i>Antithamnion</i> sp.	19	31,67	raro
<i>Antithamnionella</i> sp.	15	25	raro
<i>Audouinella</i> sp.	60	100	muy abundante
<i>Ceramium</i> sp.	26	43,33	abundante
<i>Griffithsia</i> sp.	2	3,33	ocasional
<i>Polysiphonia</i> sp.	28	46,67	abundante
<b>Stylonematophyceae</b>			
<i>Stylonema alsidii</i>	47	78,33	muy abundante
<b>Phaeophyceae</b>			
<i>Ectocarpus</i> sp.	47	78,33	muy abundante
<i>Pylaiella</i> sp.	3	5	ocasional
<b>Ulvophyceae</b>			
<i>Acrochaete heteroclada</i>	28	46,67	abundante
<i>Ulothrix</i> sp.	45	75	muy abundante
<i>Chaetomorpha</i> sp.	4	6,67	ocasional
<i>Ulvella</i> sp.	25	41,67	abundante
<b>Cyanophyceae (GC)</b>	29	48,33	abundante

#### 4.3.4. Dinámica espacio-temporal de la riqueza, diversidad, equitatividad y dominancia de la comunidad de epífitos

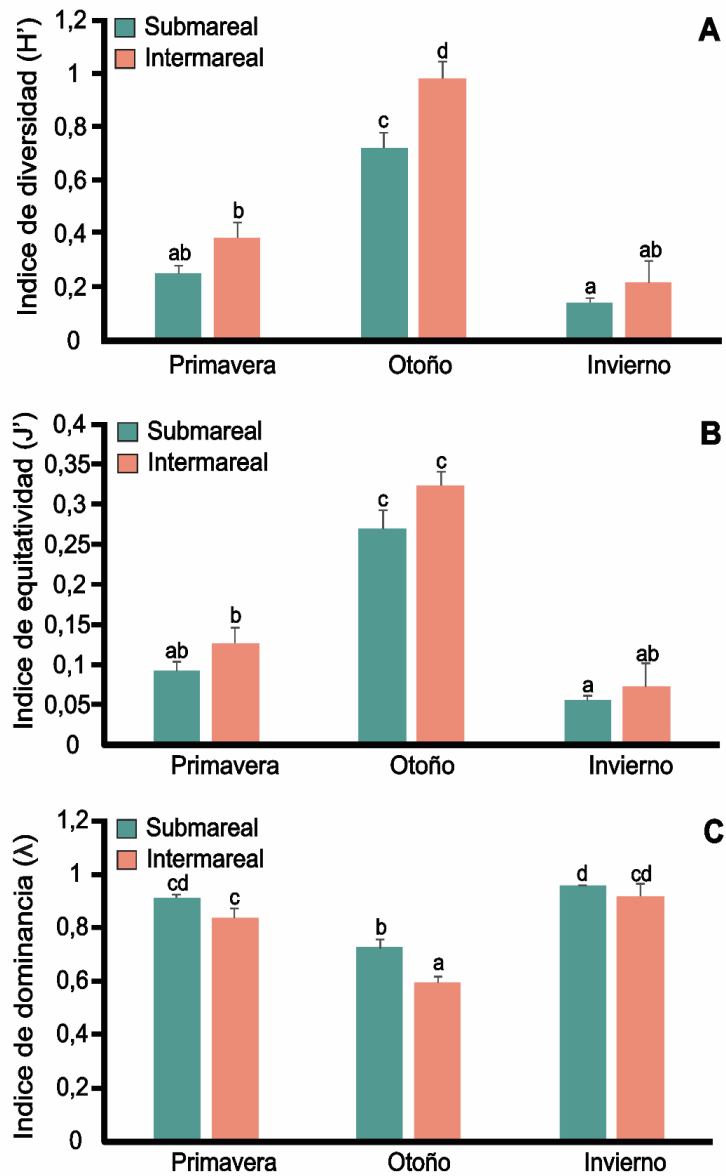
La riqueza específica de organismos epífitos fue significativamente diferente para ambas zonas de muestreo (ANOVA,  $F_{(1; 16)} = 103,7$ ;  $p < 0,0001$ ). Como ya se mencionó, se registraron 24 taxones de epífitos en el submareal y 26 en el intermareal. Sin embargo, el número de epífitos fue homogéneo para las diferentes estaciones (ANOVA,  $F_{(2; 15)} = 0,017$ ;  $p = 0,984$ ), indicando que la comunidad de organismos epífitos y endófitos no varió significativamente entre las tres estaciones del año (Tabla 23).

Los índices de Shannon-Wiener ( $H'$ ) y de Pielou ( $J'$ ) mostraron diferencias significativas entre las diferentes estaciones (ANOVA,  $F_{(2; 15)} = 44,9$ ;  $p < 0,001$ , ANOVA,  $F_{(2; 15)} = 67,03$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente) (Fig. 69 A y B). A nivel general, presentaron valores de diversidad y equitatividad muy bajos para las estaciones de otoño, invierno y primavera en las dos zonas de muestreo, evidenciando que las especies no fueron igualmente abundantes (Tabla 23).

Por otra parte, el índice de Simpson también evidenció diferencias significativas entre las estaciones (ANOVA,  $F_{(2; 15)} = 28,07$ ,  $p < 0,001$ ) (Fig. 69 C). Los valores registrados fueron cercanos a 1 (Tabla 23), correspondiéndose con la dominancia de *Cocconeis sp.*, *Grammatophora marina* y *Audouinella sp.* sobre las otras especies.

**Tabla 23.** Diversos índices ecológicos calculados para las estaciones y ambas zonas de muestreo.

	Otoño	Invierno	Primavera
<i>Riqueza específica</i>			
Submareal	15	14	16
Intermareal	21	22	20
<i>Índice de Diversidad de Shannon-Wiener (H')</i>			
Submareal	0,71 ± 0,05	0,13± 0,01	0,37 ± 0,05
Intermareal	0,97 ± 0,06	0,21 ± 0,08	0,24 ± 0,03
<i>Equitatividad de Pielou (J')</i>			
Submareal	0,26 ± 0,018	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Intermareal	0,32 ± 0,02	0,07± 0,01	0,12 ± 0,01
<i>Dominancia de Simpson (λ)</i>			
Submareal	0,72 ± 0,0	0,90 ± 0,02	0,90 ± 0,01
Intermareal	0,59 ± 0,02	0,91 ± 0,04	0,83 ± 0,03

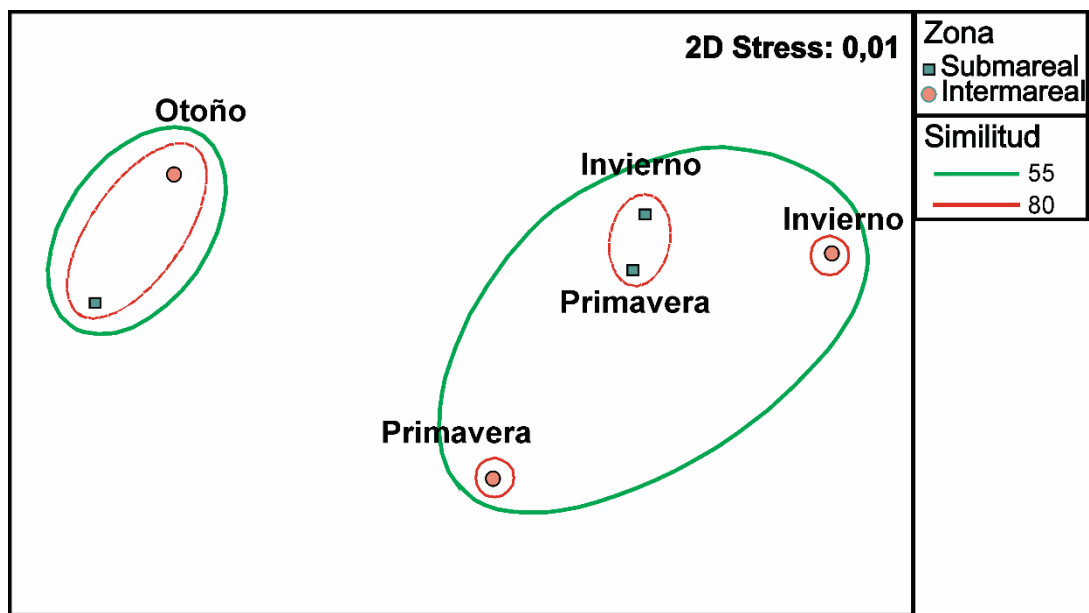


**Figura 69.** Índices ecológicos en la comunidad de epífitos *M. obtusangula*. **A.** Índice de diversidad de Shannon-Wiener ( $H'$ ). **B.** Índice de equitatividad ecológica de Pielou ( $J'$ ). **C.** Índice de dominancia de Simpson ( $\lambda$ ). Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) están indicadas por diferentes letras determinadas por el test HSD Tukey. Los valores representan la **media  $\pm$  error estándar**.

#### 4.3.5. Estacionalidad de la comunidad epifítica en las zonas intermareal y submareal

Los resultados obtenidos de los análisis de nMDS y SIMPER con el índice de Bray-Curtis, para determinar la contribución de las especies durante las estaciones y zonas muestreadas se muestran en la Figura 70 y Tabla 24. Los mismos señalaron una clara diferenciación en la composición epifítica y la abundancia a lo largo de las estaciones en ambas zonas muestreadas.

Los resultados indicaron una diferenciación entre otoño con respecto a primavera e invierno (Fig. 70). No obstante, con respecto a los resultados del análisis de Simper sólo se observó una disimilitud con respecto a otoño e invierno. Los taxones que contribuyeron a esta diferenciación fueron principalmente *Cocconeis* sp., y en menor medida de *Grammatophora marina*, *Navicula* sp., *Synedra* sp., *Audouinella* sp., *Antithamnionella* sp., *Ulothrix* sp., *Ectocarpus* sp. y el GC (Tabla 24).



**Figura 70. Diagrama de escalonamiento multidimensional no métrico (nMDS)** mostrando la variabilidad entre grupos de epífitos respecto a la abundancia y composición en *M. obtusangula* para las distintas zonas y estaciones muestreadas. Niveles de similitud de 50-60%.

**Tabla 24.** Resultado del análisis SIMPER. En la tabla se consideraron las especies con mayor contribución en las estaciones con más del 50% de disimilitud. GCDI: grupo diatomeas centrales indeterminadas

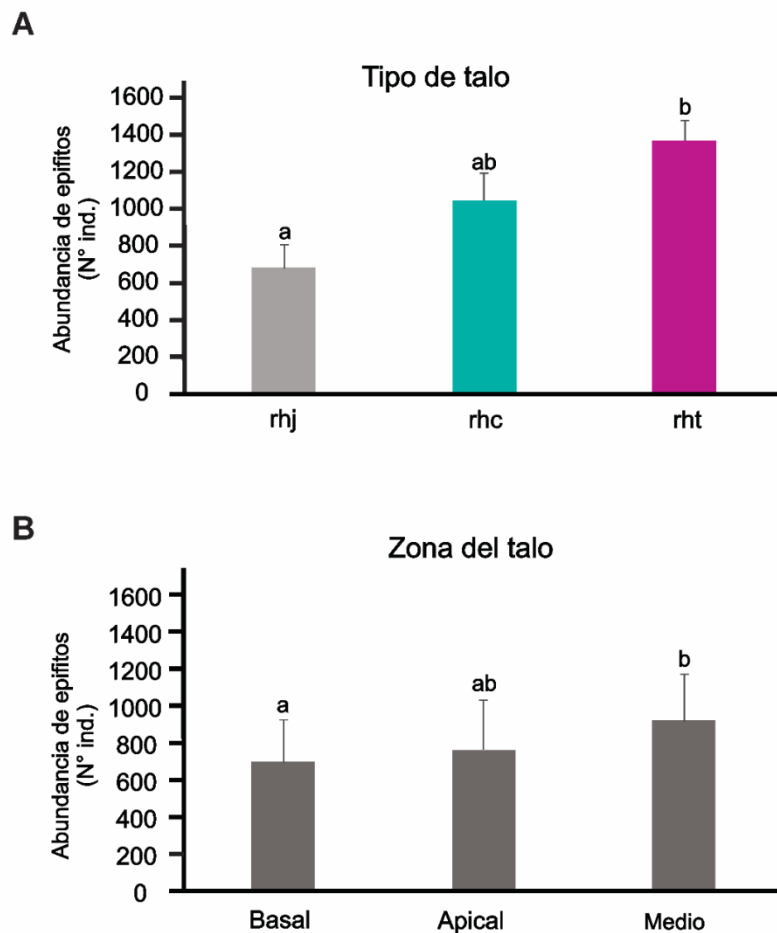
Grupos	Especies	Contribución %	Disimilitud %
Otoño- Submareal & Invierno-Submareal	<i>Cocconeis</i> sp.	74,63	51,87
	<i>Grammatophora marina</i>	8,44	
	<i>Navicula</i> sp.	2,59	
	<i>Acrochaete heteroclada</i>	1,59	
	<i>Antithamnionella</i> sp.	1,59	
	GCDI	1,50	
	Total	90,44	
Otoño-Submareal & Invierno-Intermareal	<i>Cocconeis</i> sp.	67,11	58,50
	<i>Audouinella</i> sp.	11,53	
	<i>Grammatophora marina</i>	5,10	
	<i>Synedra</i> sp.	2,71	
	<i>Navicula</i> sp.	2,12	
	GCDI	1,30	
	GC	1,14	
	Total	91,01	
Otoño-Intermareal & Invierno-Intermareal	<i>Cocconeis</i> sp.	68,33	56,51
	<i>Audouinella</i> sp.	12,08	
	<i>Synedra</i> sp.	2,29	
	<i>Grammatophora marina</i>	1,73	
	GC.	1,53	
	<i>Ectocarpus</i> sp.	1,30	
	<i>Navicula</i> sp.	1,26	
	<i>Ulothrix</i> sp.	1,25	
GCDI	1,04		
	Total	90,81	



#### 4.4. Epifitismo asociado a los talos reproductivos de *M. obtusangula*

Cuando se analiza la abundancia de epífitos sobre tetrasporofitos, carposporofitos y juveniles, se pudieron evidenciar diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(2; 268)} = 7,91$ ;  $p < 0,001$ ). La abundancia de los epífitos fue mayor en los talos tetrasporofíticos y menor en los juveniles (Fig. 71 A). La abundancia media de epífitos registrada sobre los tetrasporofitos fue de 1365,93 ( $\pm 112,92$ ) ind., en los carposporofitos de 1044,05 ( $\pm 146,41$ ) ind. y en los juveniles 678,23 ( $\pm 131, 14$ ) ind/ talo.

Con respecto a la abundancia de epífitos en las regiones apical, medio y basal, se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{(2;41)} = 3,2577$ ;  $p = 0,04004$ ), registrándose 915,10 ( $\pm 532,37$ ) ind. en la zona media, 756,96 ( $\pm 458,55$ ) ind. en la zona apical y 693,43 ( $\pm 458,86$ ) ind. en la zona basal (Fig. 71 B).



**Figura 71. *M. obtusangula*. Abundancia media de epífitos. A.** En talos juveniles, cistocarpicos y tetrasporicos (n° individuos/135 mm<sup>2</sup>, **media ± error estándar**). **B.** En cada sección del talo (n° individuos/45 mm<sup>2</sup>, **media ± error estándar**). Las diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) están indicadas por diferentes letras según las comparaciones múltiples mediante el test de HSD-Tukey.

La incidencia de los taxones epífitos registrados sobre tetrasporofitos, carposporofitos y juveniles se muestran en la Tabla 25 y la incidencia sobre las regiones apical, media y basal en la Tabla 26. De los 26 taxa registrados, 25 estuvieron presentes en los tres estadios reproductivos del hospedador, excepto *Fragillaria* sp. que estuvo ausente en los talos juveniles.

Las diatomeas *Cocconeis* sp., *Grammatophora marina* y *Navicula* sp. así como las algas rojas *S. alsidii*, *Audouinella* sp. y el alga verde *Ulothrix* sp. fueron las que presentaron una mayor incidencia en todos los tipos de talos del hospedador. Estos taxones fueron categorizados como epífitos **muy abundantes** y sus porcentajes de incidencia variaron entre 73,68 y 100%.

En general los taxones epífitos categorizados como **abundantes** fueron 9 para los talos cistocárpicos, 10 para los talos juveniles y 5 para los talos tetraspóricos. Compartiendo entre ellos a las especies *Rhabdonema* sp. y *Polysiphonia* sp., con una incidencia entre el 60,86 y 36,84 % de los talos hospedadores. Para el caso de los talos cistocárpicos los taxones registrados como abundantes fueron mayormente diatomeas a diferencia de lo observado en los talos juveniles y tetraspóricos que correspondieron a organismos filamentosos (Tabla 25).

El número de epífitos considerados como **raros** fue similar en los tres tipos de frondes. Los tetrasporofitos presentaron 4 taxones como constituyentes de este grupo. Los talos juveniles 3 taxones, al igual que los cistocárpicos. Solo la especie *Nitzschia* sp. fue el epífito clasificado como raro compartido entre los tres tipos de frondes hospedadores (Tabla 25).

Con una frecuencia de incidencia **ocasional**, en los talos cistocárpicos se presentaron 9 taxones mientras que en los tetraspóricos 6 y sólo 3 en los juveniles, siendo común a todos los talos *Licmophora* sp., *Griffithsia* sp. y *Pylaiella* sp. (Tabla 25).

Cuando analizamos la distribución de los epífitos a lo largo del talo hospedador discriminado en zonas basales, medias y apicales se observa un patrón muy particular. Los taxones epífitos categorizados como **muy abundantes** que fueron comunes en las tres zonas analizadas correspondieron a *Cocconeis* sp., *G. marina* y *Audouinella* sp., mientras que *Navicula* sp. sólo estuvo clasificado en esta categoría para las zonas apicales de *M. obtusangula*.

Los epífitos categorizados como **abundantes** fueron variables según la región del talo a consideración. Solo *S. alsidii*, *Ulothrix* sp. y GDCl fueron comunes a las regiones apical, media y basal. Las regiones basales y medias del hospedador tuvieron la mayor cantidad de taxones epífitos con una frecuencia de incidencia expresada como abundantes. En estas regiones fueron registrados además de las especies mencionadas anteriormente 4 taxones más: *Navicula* sp., *Antithamnion* sp., *Ectocarpus* sp. y GC, mientras que en las regiones apicales solo se registró además de los mencionados anteriormente a *Rhabdonema* sp.

Los epífitos categorizados como **raros** fueron más comunes en las zonas apicales. En estas regiones se identificaron 7 taxones dentro de esta categoría, mientras que en las zonas medias se observaron 5 taxones y en las zonas basales solo a *A. heteroclada* y *Polysiphonia* sp.

Los epífitos categorizados como **ocasionales** fueron muy frecuentes en regiones medias y basales de los talos del hospedador. Esta categoría fue la que presentó más taxones comunes compartidos en las tres regiones. Conjuntamente y a lo largo del fronde de *M. obtusangula* fue posible identificar los siguientes epífitos ocasionales: *Achnanthes* sp., *Fragilaria* sp., *Synedra* sp., *Nitzschia* sp., *Polysiphonia* sp., *Ceramium* sp., *Griffithsia* sp., *Pylaiella* sp., *Chaetomorpha* sp. y el GDCI (Tabla 26).

**Tabla 25. *M. obtusangula*. Incidencia de algas epífitas sobre los distintos talos** Número de talos del hospedador epífitados según su estado reproductivo (tetrasporofitos n=38, juveniles n= 29, carposporofito n= 23) y la incidencia de epífitos (muy abundante: >70 %, abundante: 70-35%, rara: 35-20% y ocasional: <20%). GCDI: grupo diatomeas Centrales indeterminadas.

Talos de <i>M. obtusangula</i>						
Taxones de epífitos	Tetrasporofito		Juvenil		Carposporofito	
	% talos epífitados	Incidencia	% talos epífitados	Incidencia	% talos epífitados	Incidencia
<b>Bacillariophyceae</b>						
<i>Achnanthes</i> sp.	2,63	ocasional	37,93	abundante	13,04	ocasional
<i>Cocconeis</i> sp.	100	muy abundante	100	muy abundante	100	muy abundante
<i>Fragilaria</i> sp.	2,63	ocasional	-	-	13,04	ocasional
<i>Grammatophora marina</i>	100	muy abundante	100	muy abundante	100	muy abundante
<i>Licmophora</i> sp.	18,42	ocasional	17,24	ocasional	8,69	ocasional
<i>Navicula</i> sp.	86,84	muy abundante	86,2	muy abundante	69,56	muy abundante
<i>Nitzschia</i> sp.	21,5	raro	27,58	raro	26,08	raro
<i>Pinnularia</i> sp.	34,21	raro	24,13	raro	52,17	abundante
<i>Synedra</i> sp.	84,21	muy abundante	41,3	abundante	39,13	abundante
<i>Rhabdonema</i> sp.	50	abundante	55,17	abundante	60,86	abundante
<i>GCDI</i>	73,68	muy abundante	82,75	muy abundante	60,86	abundante
<b>Florideophyceae</b>						
<i>Antithamnion</i> sp.	7,89	ocasional	48,27	abundante	17,39	ocasional
<i>Antithamnionella</i> sp.	36,84	abundante	48,27	abundante	17,39	ocasional
<i>Audouinella</i> sp.	100	muy abundante	100	muy abundante	100	muy abundante
<i>Ceramium</i> sp.	21,05	raro	68,96	abundante	8,69	ocasional
<i>Griffithsia</i> sp.	5,2	ocasional	6,89	ocasional	8,69	ocasional
<i>Polysiphonia</i> sp.	36,84	abundante	51,72	abundante	39,13	abundante
<b>Stylonematophyceae</b>						
<i>Stylonema alsidii</i>	73,68	muy abundante	79,31	muy abundante	91,3	muy abundante
<b>Phaeophyceae</b>						
<i>Ectocarpus</i> sp.	94,73	muy abundante	51,72	abundante	86,95	muy abundante
<i>Pylaiella</i> sp.	7,89	ocasional	1,1	ocasional	1,2	ocasional
<b>Ulvophyceae</b>						
<i>Acrochaete heteroclada</i>	42,1	abundante	41,37	abundante	21,73	raro
<i>Chaetomorpha</i> sp.	5,26	ocasional	6,89	raro	8,69	ocasional
<i>Ulothrix</i> sp.	78,94	muy abundante	82,75	muy abundante	78,26	muy abundante
<i>Ulvella</i> sp.	42,1	abundante	41,37	abundante	21,73	raro
<b>Cyanophyceae (GC)</b>	34,21	raro	72,41	muy abundante	43,47	abundante

**Tabla 26. *M. obtusangula*. Incidencia de algas epífitas sobre las distintas secciones de los talos.** Porcentaje de zonas de los talos de *M. obtusangula* epífitados (N=90) y la incidencia de los epífitos (muy abundante: >70 %, abundante: 70-35%, rara: 35-20% y ocasional: <20%). **GCDI:** grupo diatomeas Centrales indeterminadas.

Secciones del talo de <i>M. obtusangula</i>						
Taxones de epífitos	Apical		Media		Basal	
	% zonas epífitados	Incidencia	% zonas epífitados	Incidencia	% zonas epífitados	Incidencia
<b>Bacillariophyceae</b>						
<i>Achnanthes</i> sp.	17,77	ocasional	11,11	ocasional	14,44	ocasional
<i>Cocconeis</i> sp.	98,88	muy abundante	100	muy abundante	98,88	muy abundante
<i>Fragilaria</i> sp.	1,11	ocasional	3,33	ocasional	1,11	ocasional
<i>Grammatophora marina</i>	97,77	muy abundante	93,33	muy abundante	90	muy abundante
<i>Licmophora</i> sp.	16,66	raro	11,11	raro	7,77	ocasional
<i>Navicula</i> sp.	71,11	muy abundante	48,88	abundante	46,66	abundante
<i>Nitzschia</i> sp.	11,11	ocasional	12,22	ocasional	6,66	ocasional
<i>Pinnularia</i> sp.	27,77	raro	8,88	ocasional	11,11	ocasional
<i>Rhabdonema</i> sp.	41,11	abundante	22,22	raro	14,44	ocasional
<i>Synedra</i> sp.	30	raro	26,66	raro	14,4	ocasional
<i>GDCI</i>	55,5	abundante	45,5	abundante	40	abundante
<b>Florideophyceae</b>						
<i>Antithamnion</i> sp.	8,8	ocasional	11,1	ocasional	19,8	ocasional
<i>Antithamnionella</i> sp.	31,4	raro	34,44	abundante	36,5	abundante
<i>Audouinella</i> sp.	82,22	muy abundante	82,22	muy abundante	98,88	muy abundante
<i>Ceramium</i> sp.	18,8	ocasional	14,4	ocasional	12,22	ocasional
<i>Griffithsia</i> sp.	1,11	ocasional	1,11	ocasional	1,11	ocasional
<i>Polysiphonia</i> sp.	8,88	ocasional	3,33	ocasional	23,33	raro
<b>Stylonematophyceae</b>						
<i>Stylonema alsidii</i>	51,11	abundante	47,78	abundante	60	abundante
<b>Phaeophyceae</b>						
<i>Ectocarpus</i> sp.	32,22	raro	37,77	abundante	43,33	abundante
<i>Pylaiella</i> sp.	4,44	ocasional	4,44	ocasional	5,55	ocasional
<b>Ulvophyceae</b>						
<i>Acrochaete heteroclada</i>	11,11	ocasional	27,77	raro	31,11	raro
<i>Chaetomorpha</i> sp.	4,44	ocasional	5,55	ocasional	1,11	ocasional
<i>Ulothrix</i> sp.	52,22	abundante	51,11	abundante	64,44	abundante
<i>Ulvea</i> sp.	21,11	raro	27,77	raro	17,77	ocasional
<b>Cyanophyceae (GC)</b>	25,55	raro	36,66	abundante	41,11	abundante

#### **4.5. Relación entre parámetros ambientales - abundancia de epífitos - población hospedadora.**

En el análisis realizado, solo se incluyeron los datos ambientales que correspondieron a las estaciones muestreadas en concordancia con la presencia de *M. obtusangula* en la naturaleza, por lo tanto, en los análisis no se incluyeron datos ambientales estivales. En el período estudiado, la temperatura del agua de mar varió registrando valores máximos durante el otoño 16,87 ( $\pm 0,15$ ) °C, y valores más bajos en la primavera 13,17 ( $\pm 0,16$ ) °C y la mínima en el invierno 12,09 ( $\pm 0,10$ ) °C. Con respecto a la duración del día varió, la estación de primavera registró el mayor valor 14:10 ( $\pm 0:02$ ) h, mientras que tanto el otoño como el invierno los valores registrados fueron de 10:00 ( $\pm 0:02$ ) h. Con respecto a la intensidad del viento promedio e indirectamente al movimiento superficial del agua osciló entre 59,60 ( $\pm 3,20$ ) Km/h para el invierno, 53,58 ( $\pm 0,41$ ) Km/h para la primavera y 51,44 ( $\pm 2,57$ ) Km/h para el otoño.

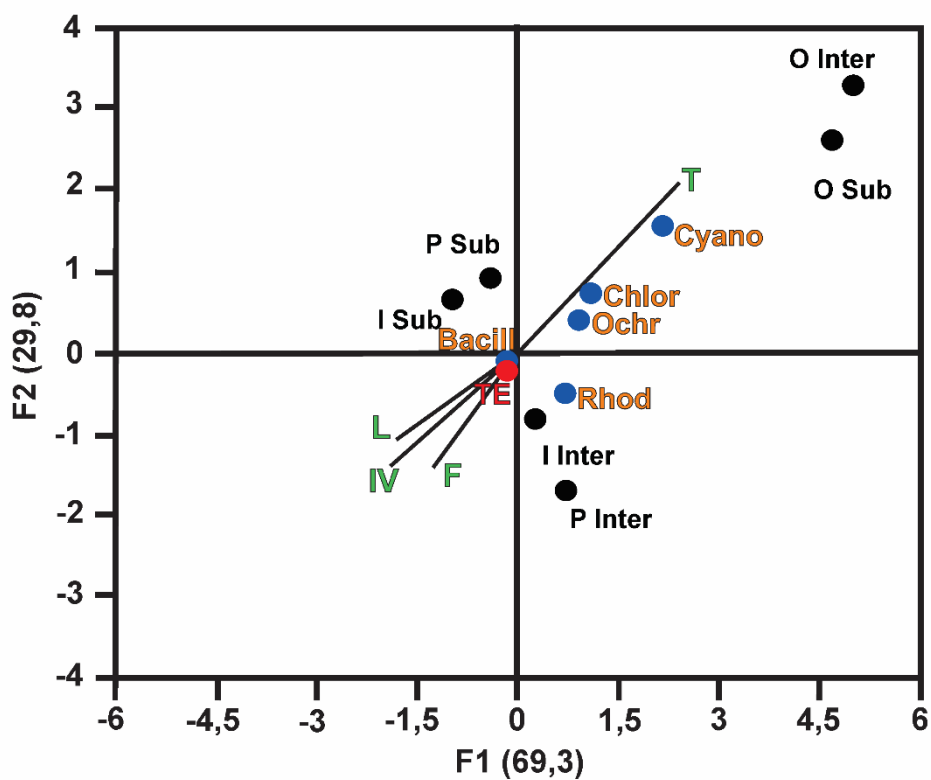
En el análisis de correspondencia canónica (CCA) los dos primeros ejes explicaron el 99,1% de la variación conjunta de los datos ambientales, la longitud de los talos hospedadores, la abundancia total de epífitos y la abundancia de las distintas clases de epífitos identificadas (Fig. 72). Los parámetros ambientales como biológicos considerados en este estudio, fueron suficientes para explicar la distribución del total de las clases epifíticas con los dos primeros ejes.

La abundancia total de epífitos, así como con la abundancia de las diatomeas tuvieron mayor correlación con primavera e invierno, las cuales se caracterizaron por intensidades mayores de vientos y en el caso de la primavera por



fotoperiodos más largo. Asimismo, la abundancia epifítica se relacionó con talos de *M. obtusangula* que evidenciaron mayores longitudes, indicando que la carga epifitaria aumentó a medida que los talos fueron más grandes. Por otra parte, la abundancia de las algas epifitas rojas se encontró en la zona del intermareal, sobre todo en la estación invernal.

Por último, los grupos de algas verdes, pardas y de cianobacterias se relacionaron con temperaturas del agua de mar más elevadas que se registraron en otoño en el submareal e intermareal.



**Figura 72. Análisis de correspondencia canónica (CCA).** Relación espacio temporal entre la abundancia total de epífitos (**TE**), clases de epífitos: Bacillariophyta (**Bacill**), Rodophyta (**Rhod**), Chlorophyta (**Chlor**), Ochrophyta (**Ochr**) y Cyanobacteria (**Cyano**) y parámetros ambientales: temperatura del agua de mar (**T**), fotoperiodo (**F**), intensidad del viento (**IV**), longitud de talos hospedadores: **L**.

## 5. Discusión

### 5.1. Comunidad de epífitos

Los talos de *M. obtusangula* colectados en la costa norpatagónica presentaron, en el periodo estudiado, una alta carga epifitaria, sirviendo como sustrato de colonización para 26 taxa diferentes de epífitos. Resultados similares fueron registrados para *Gracilaria gracilis* (Martin 2010), aunque sobre esta macroalga no se registraron taxones pertenecientes a las Bacillariophyceae, sino, que en este sistema basifito-epífito la mayor ocurrencia de organismos estuvo determinada por la división Rhodophyta. En cambio, en *M. obtusangula* la Clase Bacillariophyceae estuvo representada por 10 taxones de diatomeas pennadas y el (GDCl).

Las especies de *Cocconeis* sp. y *G. marina* son bien conocidas como componentes de la comunidad de diatomeas marinas adheridas, que aparecen sobre rocas (comunidades epilíticas), plantas (epífitas), animales (epizoicas) u otros sustratos, y pueden constituir comunidades con abundancias muy elevadas y contribuir a la riqueza de especies (Suzuki *et al.* 2001, Totti *et al.* 2007, Sato *et al.* 2009). Su gran ocurrencia en diferentes hospedadores es debida a sus características morfológicas y sus formas de crecimiento. En el caso las diatomeas adnatas como *Cocconeis*, logran colonizar exitosamente el sustrato hospedador debido a su morfo plana y a su escasa movilidad. En cambio, las diatomeas erectas unicelulares o coloniales como *G. marina*, se adhieren al sustrato por medio de pedúnculos. Estas características han permitido su coexistencia en la estructura y dinámica de las comunidades epifitas de diatomeas sobre diversos huéspedes (Majewska *et al.* 2014). Asimismo, otros

taxones registrados en este estudio como; *Navicula* sp., *Synedra* sp., *Fragilaria* sp., *Achnanthes* sp., *Licmophora* sp., *Nitzschia* sp., *Rhabdonema* sp., *Pinnularia* sp., *Synedra* sp. y el GDCl, han sido objeto de estudio como epífitos sobre otras macroalgas debido a la diferente fuerza adhesiva sobre el hospedador (Tanaka 1986).

*M. obtusangula* presentó sobre sus talos una alta carga epifitaria sobre todo de dos taxones de diatomeas; *Cocconeis* sp. y *G. marina*. La presencia de *Cocconeis* ha sido registrada en especies de Gelidiales, Bryopsidales, así como de pastos marinos como *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile y *Zostera marina* L., entre otros (Mazzella & Alberte *et al.* 1986, Car *et al.* 2012, Majewska *et al.* 2013, Polifrone *et al.* 2020). Por otra parte, individuos pertenecientes al género *Grammatophora* Ehrenberg han sido registrados sobre talos de diferentes Rhodophyta como *Jania rubens* (Linnaeus) J.V. Lamouroux, *Hypnea cervicornis* J. Agardh, *Centroceras clavulatum* (C. Agardh) Montagne, *Alsidium triquetrum* (SG. Gmelin) Trevisan, *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh, *Laurencia microcladia* Kützing y *Padina gymnospora* (Kützing) Sonder, entre otras (Siqueiros Beltrones & Martínez 2017, Kulkarni & Jagdale 2019).

Si bien las diatomeas fueron los principales taxones que aportaron a la gran abundancia de epífitos sobre *M. obtusangula*, Harlin (1980) establece que la mayoría de las macroalgas de hábito del tipo epífito pertenecen especialmente a las formas filamentosas. En este estudio, esto se respalda en la alta incidencia de colonización de *Audouinella* sp, *Stylonema alsidii*, *Ectocarpus* sp. y *Ulothrix* sp., algas cosmopolitas del grupo morfo-funcional filamentosas epífitas también de una vasta diversidad de algas (Ducker *et al.* 1977, Kiirikki & Blomster 1996,

Trautman & Borowitzka 1999, Won et al. 2010, Cho et al. 2002, Araújo et al. 2014, Adam et al. 2017).

Por otra parte, epífitos filamentosos del ensamble registrado para *M. obtusangula* entre los que se pueden mencionar a *Polysiphonia*, *Ceramium*, *Antithamnionella*, *Pylaiella* entre otros, han sido citados para especies de algas pardas, verdes y rojas registradas en la costa patagónica tales como *Dictyota dichotoma* (Hudson) JVLamouroux (Gauna et al. 2015), *Leathesia marina* (Lyngbye) Decaisne, *Colpomenia sinuosa* (Mertens ex Roth) Derbès & Solier (Poza et al. 2018b), *Ulva* sp. (Gauna et al. 2016) y *G. gracilis* (Casas & Piriz 1998, Martin 2010).

Los resultados de diversidad y equitatividad de las algas epífitas en *M. obtusangula* evaluados en este capítulo fueron considerablemente bajos, indicando que la representación de los diferentes taxa a lo largo del estudio no fue homogénea, sino que se evidenció la dominancia de ciertas especies por sobre otras a lo largo del tiempo de estudio. Estos se explican dada la gran abundancia registrada para las diatomeas *Cocconeis* sp. y *G. marina*, por sobre la presencia de cualquier otro taxa identificado sobre *M. obtusangula*.

Es ampliamente conocido, que las diatomeas juegan un papel crucial en las estructuras de las comunidades de epífitos algales por ser pioneras en la colonización de los sustratos, brindando una primera estructura para el asentamiento de posteriores huéspedes, lo que puede explicar que sean las primeras en encontrarse en los talos para el posterior asentamiento de macroalgas filamentosas epífitas (Hernández-Almeida & Siqueiros-Beltrones 2008, Kumar et al. 2011, Poza 2018). Coincidentemente con esta apreciación, se podría explicar la abundancia del alga roja *Audouinella* sp. relacionada con la

abundancia de las diatomeas mencionadas anteriormente y de otras algas filamentosas registradas sobre *M. obtusangula*.

## **5.2. Distribución de epífitos en tipos de talos reproductivos y zonas del hospedador**

Las frondes de *M. obtusangula* de mayor longitud, posiblemente con mayor tiempo de ocurrencia en el ambiente natural, favorecen al desarrollo de un ensamble epífita más diverso y abundante y de sistemas endófitos por aquellas especies capaces de penetrar en los talos, aseveración probada por la correlación entre abundancia de epífitos y la longitud de los talos.

La condición isomórfica de los diferentes talos presentes en el ciclo de vida de *M. obtusangula*, tetraspóricos, juveniles y cistocárpicos, pudo ser el factor determinante para que el grado de incidencia de los taxa de distintos ensambles epifíticos fuera similar y que a pesar de la alternancia de fases alternantes haploides y diploides de la especie hospedadora ofrecen una misma condición de colonización para los diversos taxones de epífitos.

Por otra parte, como se mencionó, *M. obtusangula* forma talos filamentosos con crecimiento apical. Muchos autores aseguran que las porciones apicales de crecimiento activo y de reciente formación y, por lo tanto, de menor permanencia en el ambiente natural, son las regiones con menor cantidad de organismos epífitos. Con el mismo criterio, aseguran que las secciones medias y basales deberían presentar una mayor abundancia de epífitos ya que presentan mayor posibilidad de colonización en la naturaleza. En concordancia con esta hipótesis, los resultados obtenidos en este estudio, arrojaron que, en las secciones basales

y medias, la mayoría de los taxones epífitos se presentaron como muy abundantes, mientras que en la región apical la mayoría de las especies evaluadas evidenció una frecuencia de incidencia rara u ocasional. En estudios similares, donde se evaluó la carga epifítica discriminando sectores del hospedador como en el caso de *Codium fragile* (Suringar) Hariot se ha observado que el ensamble de epífitos de las regiones basales y medias son similares, mientras que los taxones registrados en las regiones apicales presentaron una incidencia más bien ocasional (Villaseñor-Parada & Neill 2011). Esta similitud entre las regiones basales y medias pudo deberse a que ambas regiones presentan mayor tiempo para su colonización a diferencia de los sectores más jóvenes donde se evidencia que presenta una mayor superficie disponible para ser colonizada. Estas claras diferencias en la distribución a lo largo del talo hospedador permiten sugerir que las características morfológicas y fisiológicas de los hospedadores algales son influyentes en el asentamiento y reclutamiento de diversos epífitos. Varios autores afirman este mismo postulado y recalcan la idea de que estos factores son determinantes en la estructuración de la comunidad epifítica sobre un basífito (Rindi & Guiry 2004).

La abundancia diferencial de epífitos en diferentes secciones apical, media y basal ha sido extensamente estudiada en otras especies de macroalgas como *Fucus vesiculosus* L., *Padina concrescens* Thivy, *D. dichotoma*, *Codium fragile* y *G. gracilis* (Rindi & Guiry 2004, Ortuño-Aguirre & Riosmena-Rodríguez 2007, Martín 2010, Villaseñor-Parada & Neill 2011, Gauna *et al.* 2015). Estos autores concluyeron que el patrón de distribución a lo largo del talo hospedador puede responder a diversos factores, entre ellos, microclimas que se originan en el huésped. Estos microclimas son creados por diferentes gradientes

principalmente dado por el movimiento del agua, la intensidad lumínica alcanzada sobre la superficie del hospedador, efectos de sombreado, entre otros (Dayton 1975). Estos factores están íntimamente determinados por la morfología de los talos hospedadores, que determina una distribución desigual de los epífitos. En los casos, donde se favorece la distribución y colonización a una determinada zona restringida del fronde hospedador, se pueden observar severas consecuencias y efectos adversos al reducir la condición fisiológica de sus huéspedes (Arrontes 1990). En cambio, muchas especies de macroalgas exhiben una distribución continua y homogénea de epífitos a lo largo de en los talos hospedadores. Esto último refuerza la idea que el epifitismo es una condición que se genera en los sistemas bentónicos consecuencia de la competencia por el espacio y es generada al azar en los talos hospedadores. Sin embargo, en este estudio, se observó un claro patrón de zonación en cuanto a la abundancia de los epífitos sobre el talo de *M. obtusangula*.

Con respecto a la distribución de los grupos de epífitos a lo largo de los talos, si bien se sabe que muestran patrones claros de zonación sobre el huésped, y el número de especies disminuye generalmente hacia las partes más jóvenes (Ballantine 1979). En el caso de las diatomeas observadas, se puede mencionar que *Cocconeis* sp. y *G. marina* presentaron una distribución uniforme a lo largo del talo. Esto mismo fue evidenciado en estudios similares en *D. dichotoma* (Gauna *et al.* 2015). Esta distribución homogénea puede ser atribuida a su capacidad de resistencia adhesiva y éxito en colonización a muchos tipos diferentes de sustratos (Tanaka 1986, Majewska *et al.* 2014).

Otros taxones que se presentaron como **muy abundante** sobre los talos de *M. obtusangula*, fueron *Audouinella* sp. y *S. alsidii*. Las mismas evidenciaron un



patrón de distribución bastante homogéneo a lo largo del talo, aunque ejemplares de otra alga roja *Antithamnionella* sp., fue localizada con una distribución diferencial, hallándose sobre todo en la zona basal y media. Estos géneros de alga roja han sido reportados en diferentes macroalgas por su comportamiento del tipo epífita, encontrándose sobre talos de *D. dichotoma* (Gauna *et al.* 2015), *Sargassum* C. Agardh (Woelkerling 1973), *Porphyra* (Tam *et al.* 1987), *Pterosiphonia* Falkenberg (Rojas-González & Afonso-Carrillo 2001), *Chondracanthus squarulosus* (Setchell & N.L.Gardner) Hughey, P.C. Silva & Hommersand (Pacheco-Ruíz *et al.* 1997), *K. alvarezii* (Araújo *et al.* 2014), *Gracilaria* (González *et al.* 1993) y sobre tallos y hojas de *Thalassia testudinum* Banks ex König (Albis-Salas & Gavio 2011), entre otras.

En el caso de las algas pardas registradas en este estudio, si bien los taxones identificados como *Ectocarpus* estuvieron presentes en el submareal e intermareal, en esta última zona se registró un segundo taxón pardo pertenecientes al género *Pylaiella*. Ambos géneros han sido reportados como epífitos sobre otras algas rojas como *Gracilaria* y *Gigartina* (Fletcher 1995, Pacheco-Ruíz *et al.* 1997).

Otra clase algal que ha sido registrada como **abundante** en los talos de *M. obtusangula* fue Ulvophyceae, especies que además de presentar hábito epífita se encontraron de manera endófito dentro de los talos. Registros similares de macroalgas infectadas en Argentina por taxones de esta clase han sido reportados por Gauna *et al.* (2008), Gauna *et al.* (2009 a,b), Gauna *et al.* (2015) y Poza *et al.* (2018a). Para el caso particular de la especie de *A. heteroclada*, la misma ha sido reportada como endófito para el alga roja *C. crispus* por Correa *et al.* (1988) quienes señalaron que *A. heteroclada* estuvo

restringido a la zona cortical. Sin embargo, en *M. obtusangula*, el endófito no sólo se encontró penetrando las capas de células corticales, sino que sus filamentos alcanzaron las células que conformaron la médula.

En cuanto a Cyanophyceae y su distribución a lo largo del talo, se ha observado una mayor abundancia sobre todo en las regiones medias y basales estando prácticamente ausentes en la zona apical, estudios similares sobre *D. dichotoma* de la misma localidad evidenciaron que este grupo presentó mayor abundancia en secciones basales y medias del hospedador (Gauna *et al.* 2015).

Finalmente, en cuanto a los taxones encontrados como epífitos **ocasionales** o **raros** sobre los talos de *M. obtusangula*, muchos de ellos han sido citados en diversos estudios de macroalgas, donde se han encontrado taxa pertenecientes tanto a la clase Pheophyceae (Rindi & Guiry 2004, Gauna *et al.* 2015, Poza *et al.* 2018a), Chlorophyceae (Kumar *et al.* 2011, Luna *et al.* 2012) como Rhodophyceae (Correa *et al.* 1988, Sangil *et al.* 2003, Aguilar-Rosas *et al.* 2006), lo que evidencia que las especies registradas en esta tesis se presentan como típicos representantes de hábito epifítico.

### **5.3. Estacionalidad de epífitos**

*M. obtusangula* estuvo presente en el ambiente natural durante otoño, invierno y primavera, coexistiendo talos en estado reproductivo con talos inmaduros o juveniles. Desde el punto de vista ecológico, esta especie ofrece como hospedador una relación superficie/volumen alta, dada su morfología filamentosa ramificada y también una alta biomasa ya que sus talos pueden alcanzar los 15 centímetros de longitud. Sumado a esto, el hospedador presenta talos tetrasporofitos y cistocápicos isomórficos, proporcionando biomasa

adicional para la colonización de epífitos. Lo contrario ocurre en especies macroalgales con ciclos de vida heteromórfico, en los cuales solo la fase de macrotalo es considerada como un facilitador del desarrollo de las comunidades epifíticas, mientras que el microtalo en muchas ocasiones forma parte de las comunidades epifíticas de macrotalos de especies diferentes.

En invierno y primavera se registraron talos reproductivos de mayor porte y se asociaron con una alta carga epifitaria en correlación con la gran abundancia de diatomeas, sugiriendo que una mayor superficie disponible facilita la posibilidad del asentamiento de estos organismos oportunistas. Estas estaciones estuvieron caracterizadas por temperaturas del agua del mar mucho más bajas e intensidades del viento un poco mayores, que por consecuencia implican un mayor movimiento en el oleaje (Lizano 2007). Bien se sabe, que la exposición a las olas se considera un factor importante que influye en la estructura de las comunidades de algas y la composición de las comunidades epifíticas (Ballantine 1961, Rindi & Guiry 2004). En el caso de las diatomeas, como ya se mencionó anteriormente su abundancia estuvo representada sobre todo por dos especies, donde la persistencia de los individuos de *Cocconeis* podría deberse a que sus células tienen una forma ampliamente ovalada y por el otro lado *G. marina* presenta una disposición en cadenas unidas por espinas apicales, lo que les confieren una gran tolerancia a la acción de las olas, predominantemente cerca de la superficie (Sato *et al.* 2009, Majewska *et al.* 2014 Gauna *et al.* 2015). Por otra parte, los taxones epífitos del tipo filamentoso de algas rojas se encontraron asociados, en el invierno. Esto es coincidente con lo señalado en otros estudios de la costa patagónica realizados en los meses más fríos, donde las especies epifitas *Audouinella* sp. *Antithamnionella* sp. y *S. aldisii* fueron las más

abundantes (Boraso de Zaixso 1996, Miravalles 2008, Gauna 2010, Poza 2018). Por el contrario, las algas epífitas de las clases Phaeophyceae, Cyanophyta y Ulvophyceae estuvieron presentes en estaciones con mayor temperatura del agua (De Halperin 1967, Gauna 2010). Esto último puede justificar la mayor carga epifitaria en otoño cuando las temperaturas del agua del mar fueron más elevadas que en invierno y primavera, y las intensidades del viento fueron menores.

#### **5.4. Distribución de epífitos en intermareal vs. submareal**

La densidad de organismos epífitos sobre los talos de *M. obtusangula* recolectados en la región del intermareal fue significativamente diferente de aquellos colectados de la zona submareal, evidenciándose sobre estos últimos una menor carga epifitaria. La distribución de los organismos en los hábitats intermareales rocosos está influenciada por los factores abióticos como desecación, la irradiación y exceso de la temperatura debido a la dinámica de las mareas, las cuales determinan periodos de emersión y ambientes como las pozas de marea que aún permanecen cubiertas de agua (Davison & Pearson 1996, Garbary *et al.* 2007, Longtin *et al.* 2009). No obstante, si bien las pozas de marea son ambientes estresantes y afectados por los mismos factores que las zonas intermareales expuestas al aire, lo son en menor medida ya que siempre están cubiertas por agua. Sobre los talos hospedadores esta influencia de los factores abióticos o fisicoquímicos genera microclimas determinantes para el asentamiento y colonización de los organismos epífitos (Bruno *et al.* 2003, Longtin *et al.* 2009). Lo anterior permite sugerir porque, en este estudio, la zona infralitoral presentó mayor abundancia que la región del submareal. Por otra parte, entre los factores abióticos que influyen el establecimiento de los

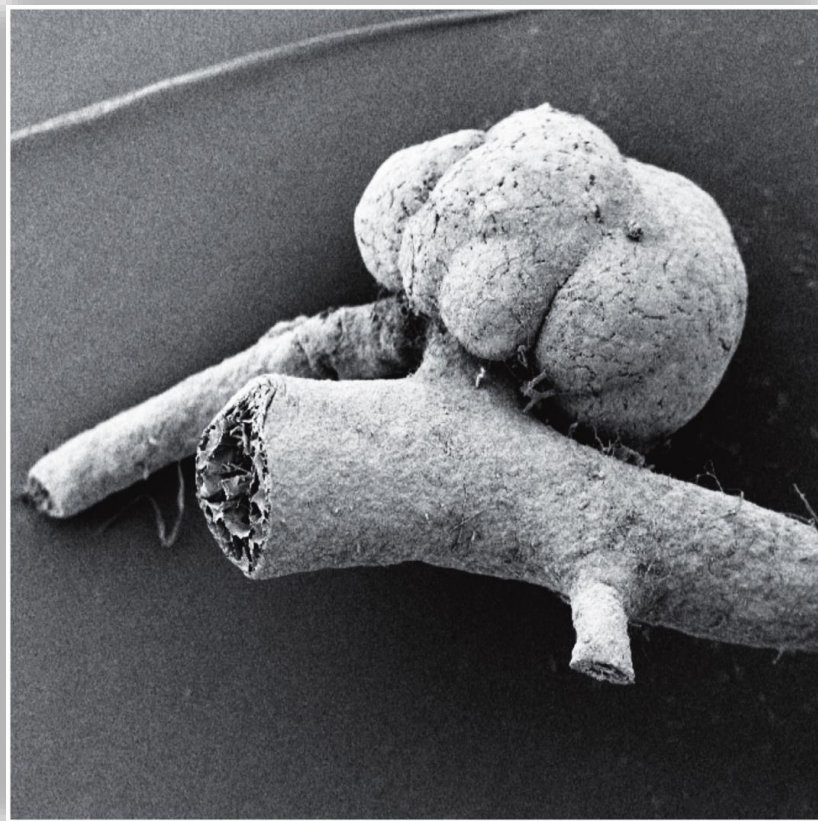
organismos epífitos se puede mencionar no sólo las características propias del hospedador sino la presión por pastoreo de los herbívoros (Mabrouk *et al.* 2011). Justamente esta presión de herbivoría es la que de alguna manera estructura las comunidades de macroalgas y de pastos marinos (Steneck *et al.* 2002, Valentine & Duffy 2006). Varios autores afirman que los epífitos contribuyen significativamente a la producción primaria de las praderas de pastos marinos y de macroalgas desempeñando un rol importante en las comunidades bentónicas someras (Cattaneo & Kalff 1980, Walker *et al.* 2013, Tarkowska-Kukuryk 2013, Westlake 2020). No obstante, para el caso de las comunidades intermareales la presión de herbívoros es considerablemente menor que en las macroalgas submareales (Poore *et al.* 2012). Sumado a ello, para el caso de las pozas de marea si bien se encuentran sumergidas, se encuentra un factor físico estructurante de la comunidad que es el efecto del oleaje, el cual produce el arrastre de organismos herbívoros disminuyendo la presión de pastoreo en las algas (Fueyo Sanchez 2008) permitiendo el desarrollo de una comunidad de epífitos mas abundante.

La dinámica de la comunidad de algas epífitas sobre *M. obtusangula* tanto a nivel estacional, zonal o a lo largo del talo hospedador, no sólo responde a condiciones relacionadas con los parámetros físico-químicos del ambiente, sino que la relación huésped-hospedador se basa en los ofrecimientos tanto en nutrientes, espacio, como refugio que este último puede brindarle a los epífitos (González & Goff 1989, Michael *et al.* 2008, Jones & Thornber 2010, Poza *et al.* 2018b).

Este capítulo de tesis representa el primer análisis de la comunidad algal epifítica sobre los talos de *M. obtusangula* el cual brinda bases para la comprensión de

las interacciones entre la dinámica de la comunidad de epífitos con la de la población del hospedador y los parámetros medioambientales.

**CAPÍTULO VI**  
**AGALLAS SOBRE TALOS DE *MERIDIONELLA***  
***OBTUSANGULA***



## 1. Introducción

Existen varios agentes patógenos de macroalgas marinas que poseen la capacidad de penetrar los talos de sus hospedadores y producir diferentes alteraciones y enfermedades.

Generalmente, los síntomas comunes dados por la presencia de un patógeno y el posterior desarrollo de la enfermedad se observan como decoloración o despigmentación de células superficiales, necrosis de tejidos, perforaciones o malformaciones en láminas y estípites del talo y presencia de agallas o tumores (Largo 2002, Neill *et al.* 2008). En las macroalgas marinas estos agentes pueden provocar además de estos efectos morfológicos, una disminución de la población del hospedador por pérdida o muerte de sus individuos (Largo 2002). En especies de importancia económica, cuya acuicultura está afianzada, pueden provocar disminución de las tasas de crecimiento con importantes pérdidas de biomasa o calidad del producto en los sistemas de cultivo (Schoenrock *et al.* 2013).

Malformaciones como agallas o tumores han sido asociados con la presencia de agentes infecciosos tales como virus, bacterias, hongos, plasmodios e inclusive organismos endófitos algales (McBride *et al.* 1974, Tsekos 1982, Apt 1988, Apt & Gibor 1991, Pueschel 1995, Ashen & Goff 1996, 1998, Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer 2003, Zuccarello 2008, Goecke *et al.* 2012, West *et al.* 2013, Ogandaga *et al.* 2017).

Si bien, en la última década la mayoría de los estudios de agallas se han realizado en géneros de algas pardas como *Macrocystis*, *Ecklonia cava* Kjellman y *Undaria* (McKeown *et al.* 2017), *Durvillaea* (Murúa *et al.* 2017, Blake *et al.*



2017), *Lessonia berteroana* Montagne (Murúa *et al.* 2019), no se puede dejar de reconocer la importancia de los realizados en algas rojas. Estos estudios permitieron esclarecer la formación de agallas por bacterias y por otras algas rojas, llegando en este último caso a dilucidar la relación evolutiva del parasitismo en Rhodophyta (Goff & Zuccarello 1994, Goff *et al.* 1996, Ashen & Goff 1996, 1998).

Las agallas, formaciones celulares desorganizadas, se encuentran confinadas a ciertas partes de los talos, mientras que el resto del organismo presenta un aspecto normal (West *et al.* 2013). Suelen estar asociadas a patrones anormales de división y/o agrandamiento celular. La presencia de estas deformaciones podría tener consecuencias para el bienestar del hospedador (Apt 1988, Scheffer 1997, Ashen & Goff 1996, Ashen *et al.* 1999, West *et al.* 2013). Estas malformaciones caracterizadas por hipertrofia e hiperplasia tisular, presentan morfología similar a las agallas y tumores observados en algunas plantas superiores (Apt 1988, Apt & Gibor 1991).

Agallas han sido reportadas en *Mazzaella laminarioides* (Bory) Fredericq, causadas por cianobacterias, en *Chondracanthus teedei* (Mertens ex Roth) Kützing, en *Grateloupia americana* S. Kawaguchi & H. W. Wang y *Polyneuropsis stolonifera* M. J. Wynne, D. L. McBride & J. A. West, producidas por bacterias (McBride *et al.* 1974, Tsekos 1982, Correa *et al.* 1993, Ashen & Goff 1996, Ashen *et al.* 1999). Asimismo, partículas virales fueron observados en agallas de *Gracilaria epihippisor*a Hoyle, *Acrochaetium savianum* (Meneghini) Nägeli y en especies de *Bostrychia* (Apt & Gibor 1991, Pueschel 1995, West *et al.* 2013).

En otros casos, la presencia de estas estructuras ha sido adjudicadas a la presencia de hongos como es el caso de *Catenella nipae* Zanardini (Zuccarello

2008), o de endófitos algales como se registraron para especies del género *Chondrus* (Correa *et al.* 1988, Ogandaga *et al.* 2017). Hasta el momento sólo se encuentra un registro realizado por Chemin (1937) en la familia Cystocloniaceae donde se menciona la presencia de agallas en *C. purpureum*, generadas por la presencia de bacterias no encontrándose investigaciones posteriores para otros miembros de esa familia.

Múltiples técnicas han sido utilizadas para el estudio de estas malformaciones en las macroalgas marinas, donde se han destacado el uso de microscopías óptica, con fluorescencia y electrónica con el objetivo de detectar las alteraciones ocasionadas a nivel celular por los diferentes agentes patógenos (McBride *et al.* 1974, Apt & Gibor 1991, Ashen & Goff 1996, 1998, West *et al.* 2013). También se han aplicado técnicas de cultivo y aislamiento de los patógenos siguiendo los postulados de Koch para una correcta identificación. Aunque ya desde hace décadas se han manifestado las dificultades generalmente reconocidas que se encuentran al intentar cultivar los organismos simbióticos y aislarlos en cultivo puro, lo que demuestra la poca evidencia directa de los roles causales de cualquier microorganismo en la formación de agallas (Breznak 1984, Smith & Douglas 1987, Bermudes *et al.* 1988, Apt & Gibor 1991, Vetter 1991, Ashen & Goff 1998).

## 2. Objetivos

- Caracterizar las agallas observadas en individuos de distintos estados reproductivos de *M. obtusangula* presentes en la naturaleza y en cultivos *in vitro* mediante el uso de diferentes técnicas de microscopía.
- Analizar la prevalencia temporal de agallas en talos de *M. obtusangula* y su relación con parámetros ambientales.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Recolección y toma de muestras**

Se realizó un muestreo aleatorizado en el submareal de la localidad de Piedras Coloradas (ver *Cap. I*). Se utilizó un total de 20 cuadrantes (de 0,25 m<sup>2</sup>) distribuidos al azar por cada estación: otoño, invierno y primavera, en un periodo de dos años. Se colectó el total de talos de *M. obtusangula* arraigados dentro de cada cuadrante.

#### **3.2. Procesamiento de muestras**

##### **3.2.1. Estudios de prevalencia y su relación con parámetros ambientales a lo largo de las estaciones**

Para analizar la prevalencia poblacional de talos con agallas y su relación con la distribución a lo largo del otoño, invierno y primavera, en cada muestra, los talos recolectados se discriminaron según su desarrollo reproductivo en: cistocárpicos, tetraspóricos y juveniles (sin estructuras reproductivas evidentes). Asimismo, dentro de cada una de esas categorías, a los talos se los clasificó en talos con presencia de agallas y talos carentes de las mismas. Además, se registraron los parámetros ambientales: temperatura del agua de mar (°C), fotoperiodo (horas luz-oscuridad) e intensidad del viento (km/h). Por otro lado, por individuo y estado reproductivo se seleccionaron 40 talos con agallas clasificándolos para evaluar el número de agallas presentes sobre los talos.

### **3.2.2. Observaciones morfológicas de las agallas**

Se seleccionaron talos de *M. obtusangula* con agallas y fueron observados bajo microscopio estereoscópico. Luego se tomaron porciones de los mismos para estudios de microscopía óptica, electrónica de transmisión y de barrido.

Para estudios de microscopía óptica se realizaron preparados permanentes (ver *Cap. I*). Los preparados fueron coloreados con Safranina (1%) + azul de toluidina (1%) modificada de Pérez-Cortéz *et al.* (2003) y Azul de metileno (0,1%) en agua, modificada de Fragoso *et al.* (1994). Por otra parte, se observaron al MO preparados semi-finos fijados siguiendo protocolo para MET.

Por último, fracciones de talos con agallas fueron estudiados bajo microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) (ver *Cap. I*).

### **3.2.3. Mantenimiento de talos producto de esporocultivos con presencia de agallas**

Para comparar morfológicamente las agallas presentes en talos recolectados en la naturaleza y las formadas en condiciones de cultivo en laboratorio, se les hizo un seguimiento a talos generados a partir de esporocultivos (*Cap. III*) que evidenciaron el desarrollo de agallas. Para ello los talos fueron mantenidos bajo condiciones de temperatura de 16 °C y un fotoperiodo 12:12, con renovación semanal del medio PES (20 ml.l<sup>-1</sup>).

### 3.2.4. Estudio de núcleos de células de agallas mediante microscopía de fluorescencia

Diversos estudios de agallas en macroalgas han utilizado la microscopía de fluorescencia para evidenciar diferencias entre los núcleos de células de los talos con y sin agallas, así como una puesta en evidencia de partículas virales en el caso de que se encuentren implicadas en la formación de estas estructuras. Es por ello que diferentes agallas obtenidas desde la naturaleza y de cultivo fueron marcadas con el fluorocromo DAPI (4',6 diamino-2-fenilindol) utilizando un método de fijación bajo calor y observadas en microscopio de fluorescencia, siguiendo el protocolo de West *et al.* (2013):

- a) Las muestras se fijaron en una solución de Carnoy, por un periodo de al menos 4 horas.
- b) Posteriormente se transfirieron a tubos Eppendorfs con alcohol 70% y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su observación.
- c) Los fragmentos de algas con agallas se sumergieron en una solución de 5 µg mL<sup>-1</sup> DAPI en agua de mar durante 5 minutos.
- d) Luego, parte del material se colocó sobre un porta y cubre objetos y se realiz un *squash*.
- e) Los portaobjetos se calentaron ligeramente sobre un mechero durante unos segundos.
- f) Los preparados fueron observados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E- 400 (Tokio, Japón) equipado con una cámara Nikon FDX 35.

### 3.2.5. Análisis estadísticos

Se emplearon los test de Shapiro-Wilk y Barlett para determinar la normalidad y la homocedasticidad de la varianza en todo el conjunto de datos. Se evaluó la prevalencia de talos con y sin agallas a lo largo del otoño, invierno y primavera y se expresó cómo % sobre el total de talos muestreados por cada estación. Así mismo, se determinó la prevalencia de talos con y sin agallas discriminando según su estado reproductivo en: talos cistocárpicos, talos tetraspóricos y talos juveniles. Para evaluar la diferencia en la abundancia de talos con agallas a lo largo de las estaciones en los dos años de muestreo se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de comparaciones múltiples utilizando el test de Tukey (HSD). Asimismo, se realizó un test de ANOVA para evaluar la diferencia en el número de agallas presentes en talos reproductivos como no reproductivos, expresando los resultados como la media  $\pm$  error estándar.

Para la evaluación de la distribución temporal de las diferentes poblaciones de talos con y sin agallas tanto cistocárpicos, tetraspóricos como juveniles a lo largo del otoño, invierno y primavera, en base a las abundancias y variables ambientales, como la temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidad del viento, se seleccionó un análisis de Correspondencia Canónica (CCA) (Ter Braak 1994), recomendado para datos con una respuesta unimodal (Espinosa 2016). Los datos fueron estandarizados y analizados con el software R 4.0.3 (Team 2020), con el uso del paquete "Vegan", la función "cca" (Oksanen *et al.* 2013).

## **4. Resultados**

### **4.1. Morfología de las agallas**

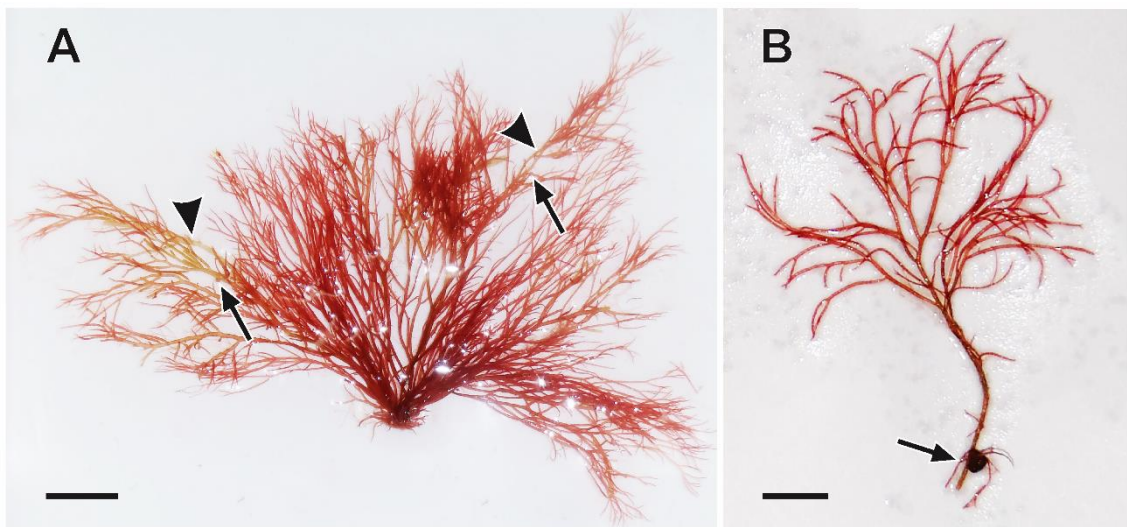
#### **4.1.1. Agallas en talos recolectados en el ambiente natural**

Talos de *M. obtusangula* recolectados en la naturaleza presentaron sobre sus ramas, protuberancias esféricas bien compactas u otras masas amorfas, debido a un crecimiento celular, identificadas como agallas (Fig. 73). Estas estructuras de color rojizo oscuro (Fig. 74), presentaron una distribución homogénea a lo largo del talo, encontrándose tanto en las zonas basal, media y apical (Fig. 73 A y B). Una particularidad observada, fue la coloración de las porciones del talo circundantes a la localización de las agallas, las cuales evidenciaron una tonalidad considerablemente mas pálida virando a una coloración amarronada en contraste con el color rojizo de resto del talo sin agallas (Fig. 73 A).

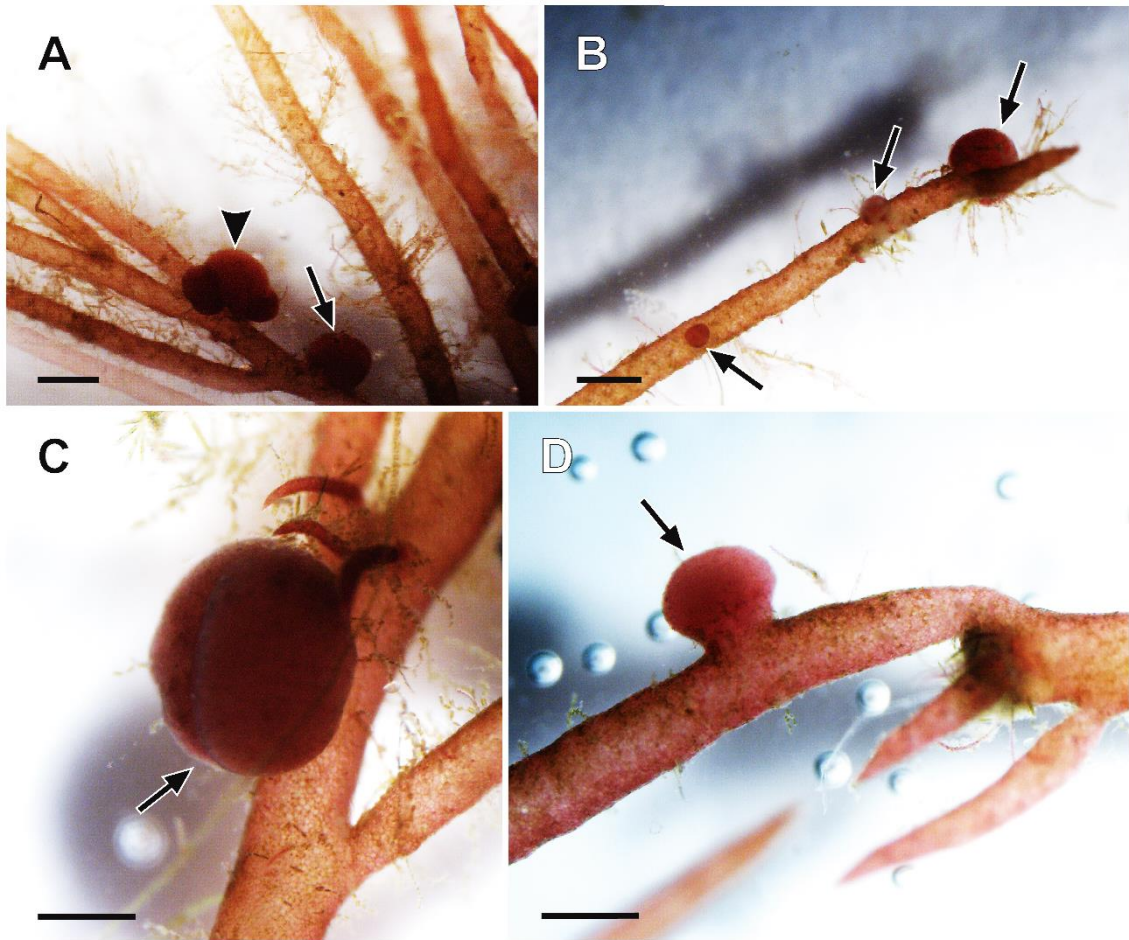
Las agallas presentaron formas y tamaños diversos, cuyo diámetro promedio fue de 2 ( $\pm 0,2$ ) mm. La amplia diversidad de las agallas (Figs. 74 y 75) se extendió desde glóbulos grandes acompañados por glóbulos más pequeños (Figs. 74 A y 75 E), otras se manifestaron como bolas individuales totalmente lisas en sus superficies (Figs. 74 B y 75 A-D), algunas si bien se encontraron como una masa individual, presentaron un surco central (Fig. 74 C) o con un aspecto granular constituido por la aglomeración de muchos glóbulos más pequeños (Fig. 75 F) y otras se presentaron como glóbulos sostenidos por un pedúnculo en su base por el cual se unió al talo como se observa en la figura 74 D.



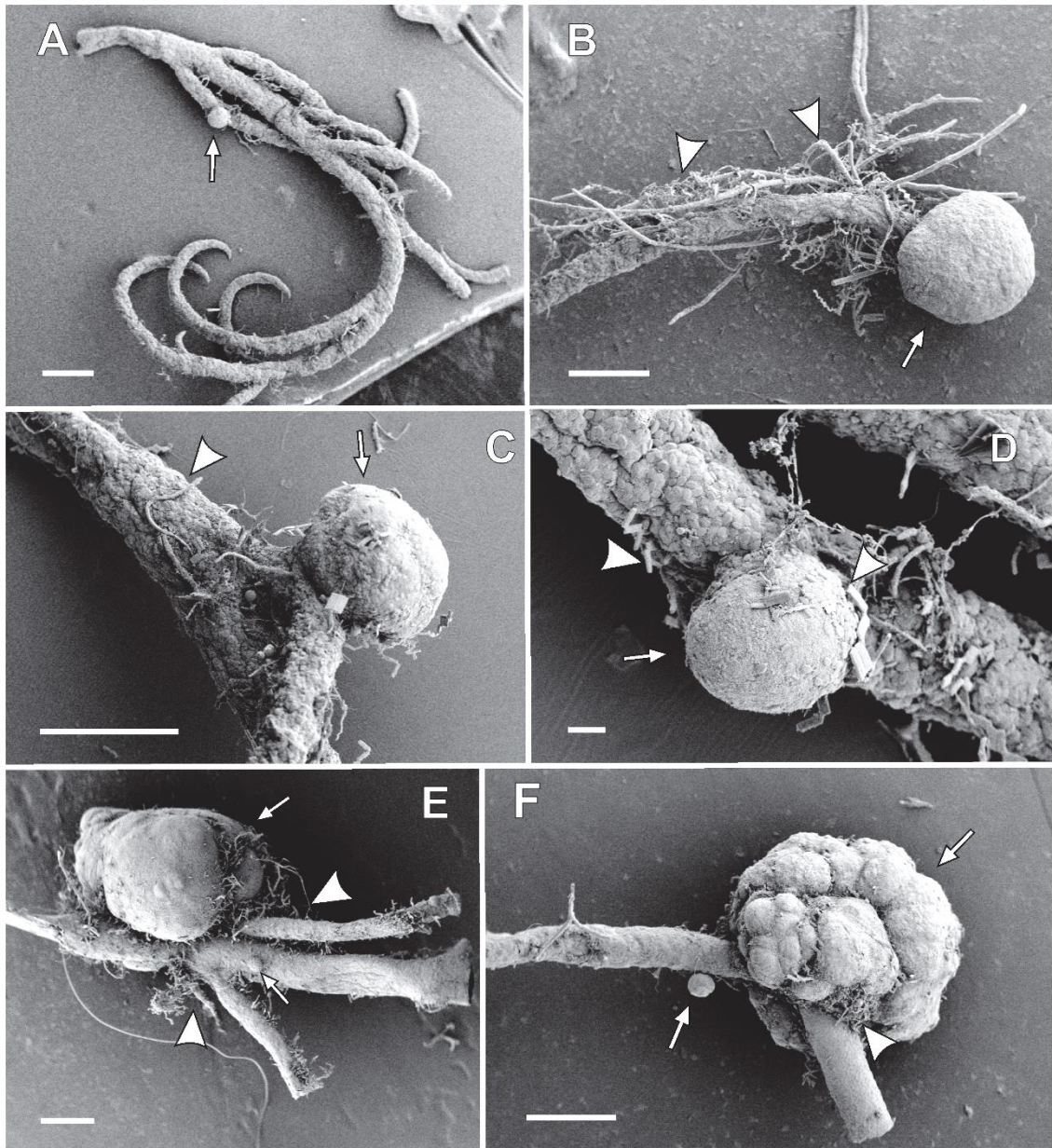
La localización de las agallas se vio relacionada a una alta carga epifitaria tanto de algas filamentosas (Fig. 74) como de una gran abundancia de diatomeas (Fig. 75).



**Figura 73. Talos de *Meridionella obtusangula* con presencia de agallas. A.** Talo tetrasporofítico con presencia de agallas en ramas medias y apicales (flechas), nótese una coloración más pálida del talo en el sector donde se encuentran las agallas (cabezas de flechas). **B.** Talo no reproductivo con presencia de agalla en la base del fronde (flecha). *Barras escalas: A = 1 cm; B = 0,5 cm*



**Figura 74. Agallas sobre talos de *Meridionella obtusangula* recolectados de la naturaleza (lupa). Diferentes morfologías (flechas), nótese la alta carga epifitaria (cabeza de flecha). **A.** Agallas formadas por un lóbulo grande unido a dos lóbulos más pequeños. **B.** Agallas con lóbulos individuales de superficie lisa. **C.** Agalla con un único lóbulo presentando un surco central. **D.** Agalla con un único lóbulo unida mediante un pedúnculo al talo. *Barras escalas:* **C** y **D** = 0,5 mm; **A** y **B** = 1mm.**



**Figura 75. Agallas sobre talos de *Meridionella obtusangula* recolectados de la naturaleza (MEB). Se evidencian las diferentes morfologías de agallas encontradas (flechas), nótese la alta carga epifitaria (cabeza de flecha). A-D. Agallas con un único lóbulo sin surcos evidentes en su superficie. E. Agalla con surcos en su superficie dando un aspecto de presenta más de un lóbulo. F. Agalla formada por una aglomeración de glóbulos más pequeños. Barras escalas: A, B, C, D, E y F = 400  $\mu$ m.**



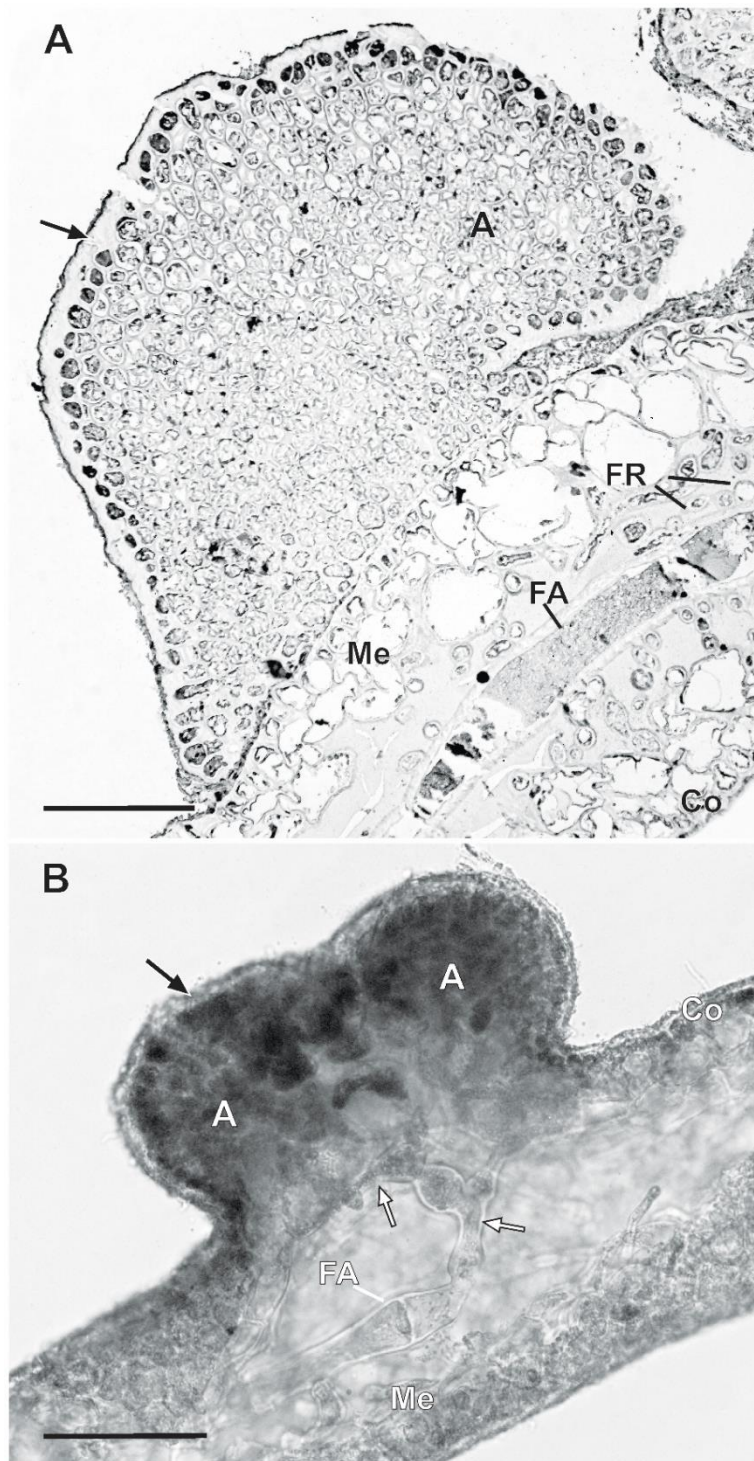
#### 4.1.1.1. Estructura interna de agallas en talos recolectados en la naturaleza

En cortes semifinos y a mano alzada de las agallas en talos de *M. obtusangula* pudo observarse externamente, a modo de envoltura, una capa hialina de mucílago, rodeando a la primera capa de células corticales (Fig. 76 A). Describiendo la estructura hacia el interior, se identificaron 1 a 2 capas de células corticales con un diámetro de  $5,9 (\pm 0,4) \mu\text{m}$  seguida de un gran número de capas internas dispuestas de manera irregular conformadas por células medulares en estado normal que presentaron un diámetro de  $28,6 (\pm 1,36) \mu\text{m}$  y otras que presentaron cierto grado de hipertrofia alcanzando  $9,8 (\pm 0,4) \mu\text{m}$ . Se evidenciaron *pit-connections* entre células periaxiales con las células implicadas en la formación de las agallas (Fig. 76 B).

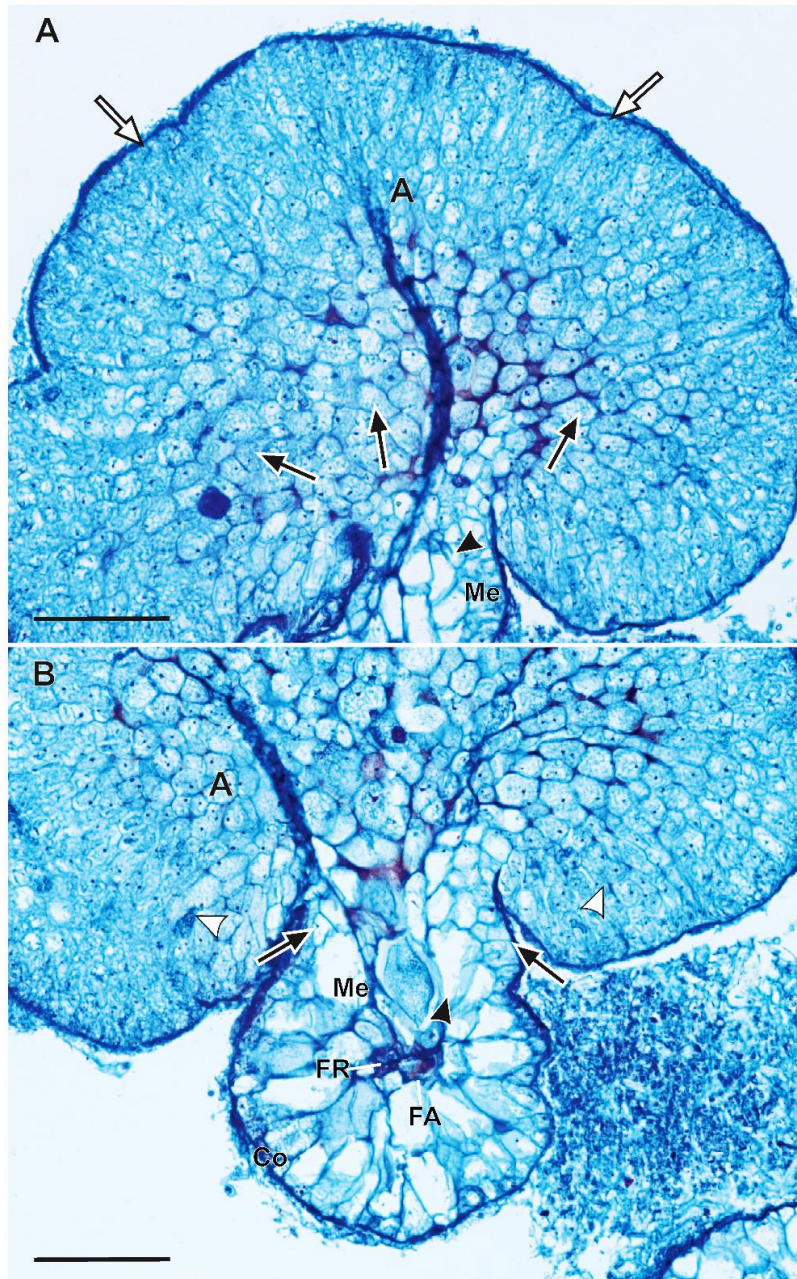
En la figura 77 se puede observar una agalla formada por varios lóbulos donde se evidencia clara hipertrofia e hiperplasia celular. En el corte transversal se puede notar la estructura típica del talo de *M. obtusangula* donde se destaca una zona desde la cual, las células medulares comienzan a proliferar dando origen a la gran masa que conforma la agalla (Fig. 77 B). Como se observa en la Figura 77 A, células medulares de gran tamaño generan células de tamaños más pequeños a medida que nos alejamos del centro del talo, hasta llegar a células totalmente comprimidas sobre la superficie externa de la agalla. También se pudo observar que la capa hialina de mucílago que rodea a la agalla presentó un grosor considerable y sirvió de albergue a diferentes organismos epífitos (Figs. 78 y 79).

La formación de las agallas evidenció un patrón de desarrollo similar en talos gametofíticos y tetrasporofíticos. Pero, en cuanto a la afinidad de los núcleos

frente a las tinciones específicas hubo diferencias notorias. En las agallas encontradas en los gametofitos, los núcleos se revelaron con las tinciones safranina y azul de toluidina (Fig. 79), mientras que, en talos tetrasporofíticos, los núcleos de las células de las agallas sólo fueron teñidos con azul de toluidina. Como se puede observar en los cortes transversales (Figs. 77, 78 y 79), la estructura interna de los talos muestra como a partir de las células medulares se desarrolla la formación de las agallas y como las células corticales continúan bordeando toda la estructura de la agalla confiriéndole una forma lobulada.

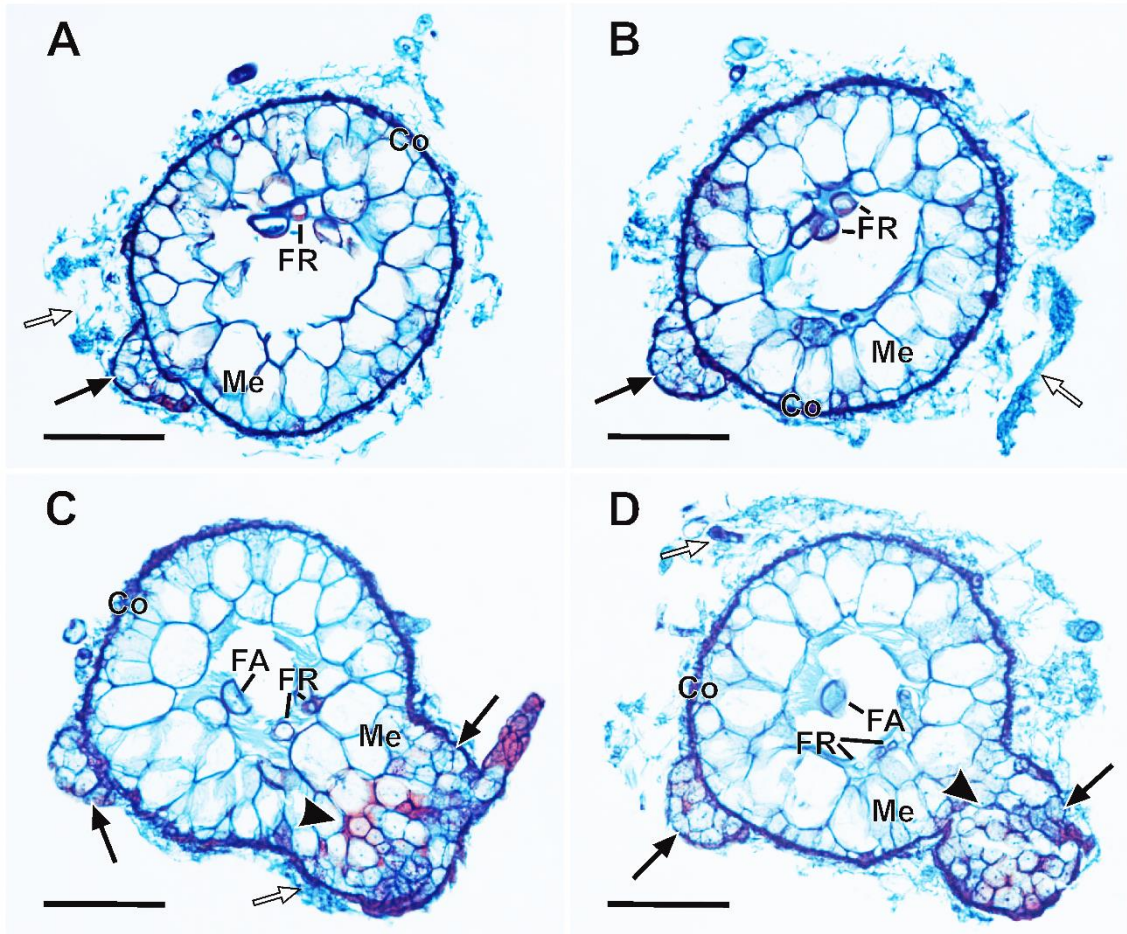


**Figura 76. Agallas en *Meridionella obtusangula*. Estructura interna. A.** Corte semi-fino. Se observa la masa de células medulares constituyentes de las agallas rodeada de una capa hialina de mucílago (flecha). **B.** Corte a mano alzada, donde también se observa una capa de mucílago rodeando la agalla (flecha negra), así como dentro de su estructura interna la conexión del filamento axial (FA) con las células de las agallas (flechas blancas). A: agalla. Me: capa medular; Co: capa cortical; FA: filamento axial; FR: filamento rizoidal. *Barras escalas: A = 50 µm, B = 100 µm.*

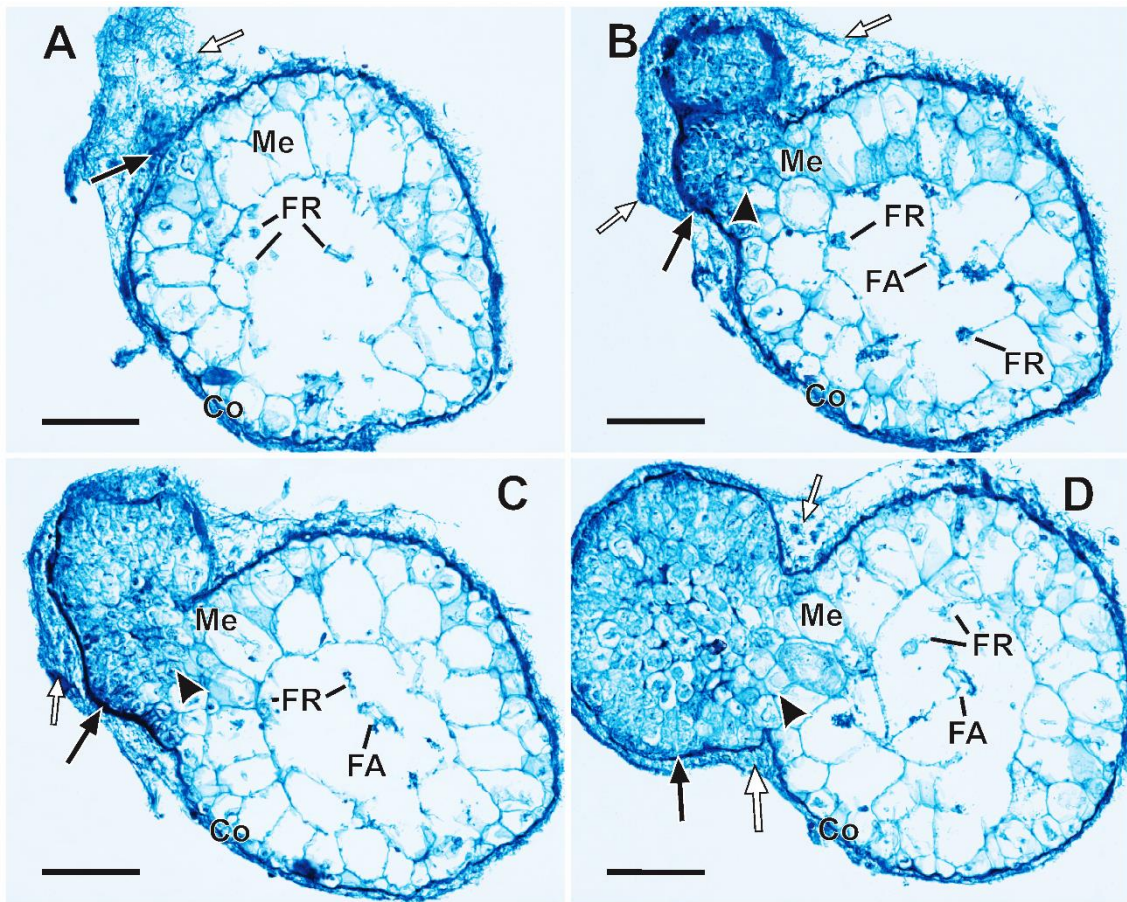


**Figura 77. Agallas de *Meridionella obtusangula*. Cortes histológicos transversales de talos.** **A.** Detalle de la estructura interna de la agalla, nótese el grado de hipertrofia (cabeza de flecha) e hiperplasia celular (flechas negras), rodeada de una capa de células corticales común al talo y agalla (flechas blancas). **B.** Detalle de la estructura interna de la agalla y su relación con el eje del talo (flechas negras), donde se observa en la capa medular (Me) el inicio de células hipertrofiadas (cabeza de flecha negra) y la hiperplasia del tejido (cabezas de flechas blancas). A: agalla; Me: capa medular. FA: filamento axial; FR: filamento rizoidal. Barras escalas: **A** y **B**= 100  $\mu$ m. Tinción Safranina + Azul de toluidina.





**Figura 78. Agallas en talo gametofítico de *Meridionella obtusangula*.** Secuencia de cortes histológicos transversales a lo largo del talo con presencia de agallas (flechas negras), nótese el comienzo de la hiperplasia (cabeza de flecha) en **C** y **D**. Externamente, envolviendo tanto el talo como la agalla se puede observar una capa laxa e irregular de mucílago (flechas blancas). Co: capa cortical; Me: capa medular; FA: filamento axial; FR: filamentos rizoidales. Barras escalas: **A, B, C** y **D** = 100  $\mu$ m. Tinción Safranina + azul de toluidina.



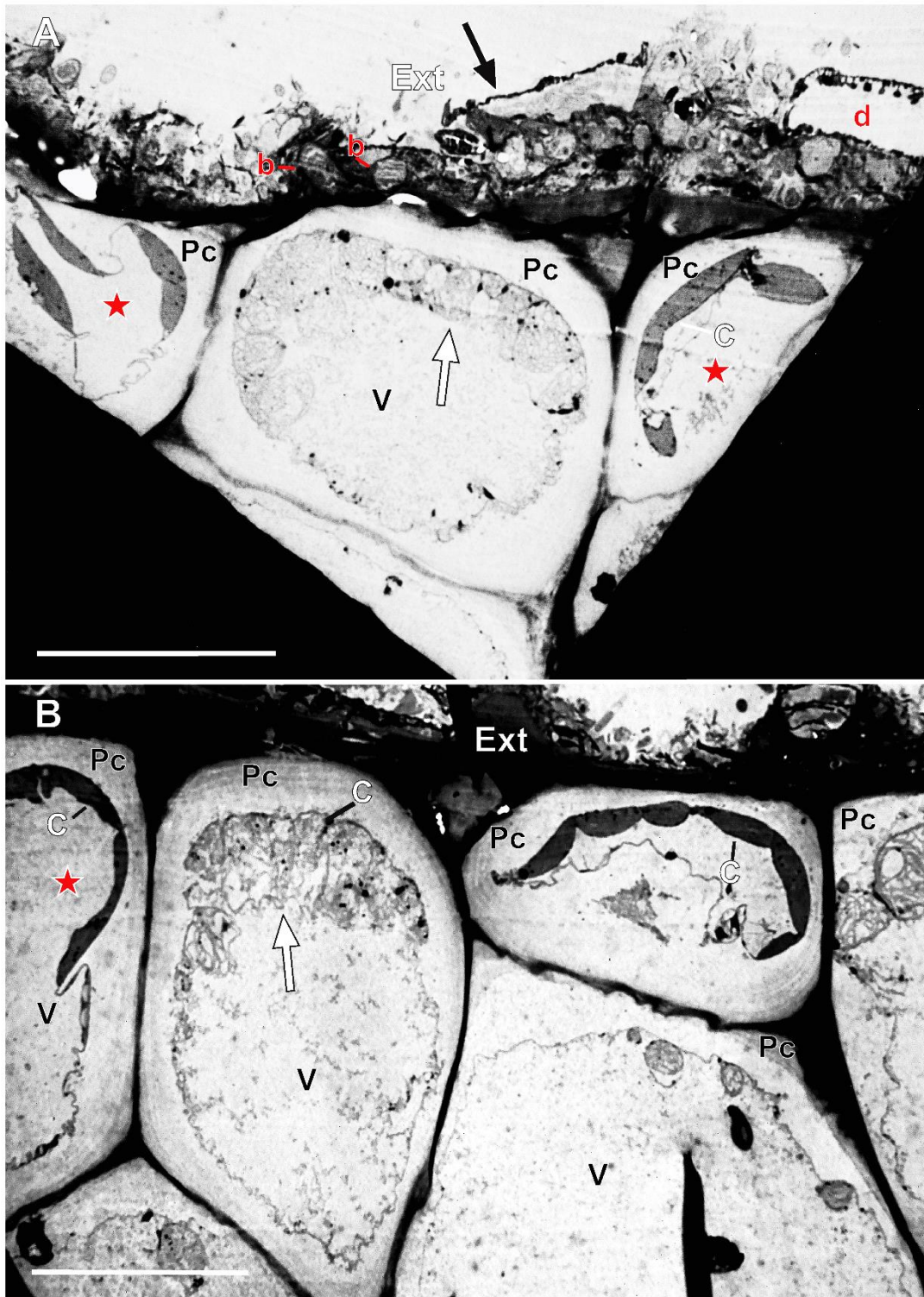
**Figura 79. Agallas en talo tetraspórico de *Meridionella obtusangula*.** Secuencia de cortes histológicos transversales a lo largo del talo (flechas negras), nótese el comienzo de la hiperplasia (cabeza de flecha) en **B**, **C** y **D**. Externamente, envolviendo tanto el talo como la agalla se puede observar una capa laxa e irregular de mucilago (flechas blancas). Co: capa cortical; Me: capa medular; FA: filamento axial; FR: filamentos rizoidales. Barras escalas: **A**, **B**, **C** y **D** = 100  $\mu$ m. Tinción azul de toluidina.

A nivel ultraestructural, sobre la superficie externa de las células corticales del talo y la agalla se observaron, inmersos en la gruesa capa laxa de mucílago, vestigios de diferentes organismos epífitos (Fig. 80 A). En la corteza, las capas más externas de células de aspecto normal alternaron con otras células que mostraron el plasmalema desprendido de la pared celular, el citoplasma muy vacuolizado y desorganización de las estructuras internas como es el caso de las lamelas tilacoidales (Fig. 80). En las capas de células más internas de la agalla la desorganización de las membranas afectó no sólo a las tilacoidales sino a mitocondrias y retículo endoplásmico (Fig. 81 A). Observaciones más en detalle mostraron numerosas vesículas dispuestas parietalmente formadas por membranas tubulares (Fig. 81 B) y al citoplasma totalmente vacuolado generando un estado apoptótico celular (Fig. 80 B). Asimismo, otras células que conforman parte de las agallas se las ha observado con vestigios de lo que en algún momento formó parte de organelas como se observa en la Figura 81 C, donde sólo se pueden identificar restos de membranas tilacoidales, indicando una instancia final en la vida de la célula.

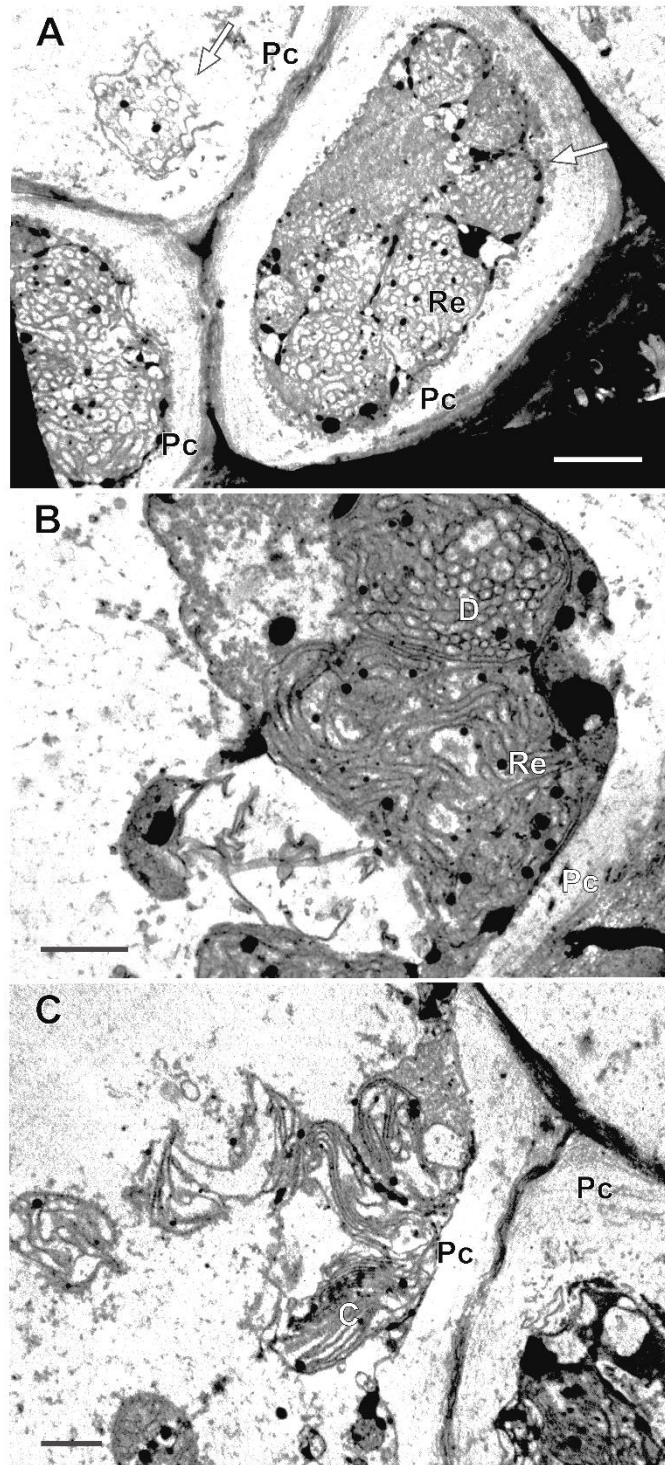
La conformación y estructura de la pared celular se mantuvo sin alteraciones en células con apariencia normal y en aquellas donde su contenido comenzó a desorganizarse (Fig. 81 C).

Si bien en este estudio, en el interior de las agallas no se han observado agentes patógenos inter o intracelulares como partículas virales, bacterias, hongos u otras algas, externamente se evidenció inmersa en la matriz de mucílago una alta carga epifitaria formada predominantemente por bacterias acompañando a otras algas.





**Figura 80. Células de agallas de *Meridionella obtusangula* (TEM). A y B.** Sección de capa cortical donde se evidencian células sanas (★) alternando con células enfermas con desorganización de las membranas tilacoidales (flechas blancas). En el exterior de la agalla (Ex) se puede observar la vaina de mucílago que incluye organismos epífitos como bacterias (b) y diatomeas (d) (flecha negra). Pc: pared celular; V: vacuolas, C: cloroplasto. *Barras escalas: A y B = 10 μm.*



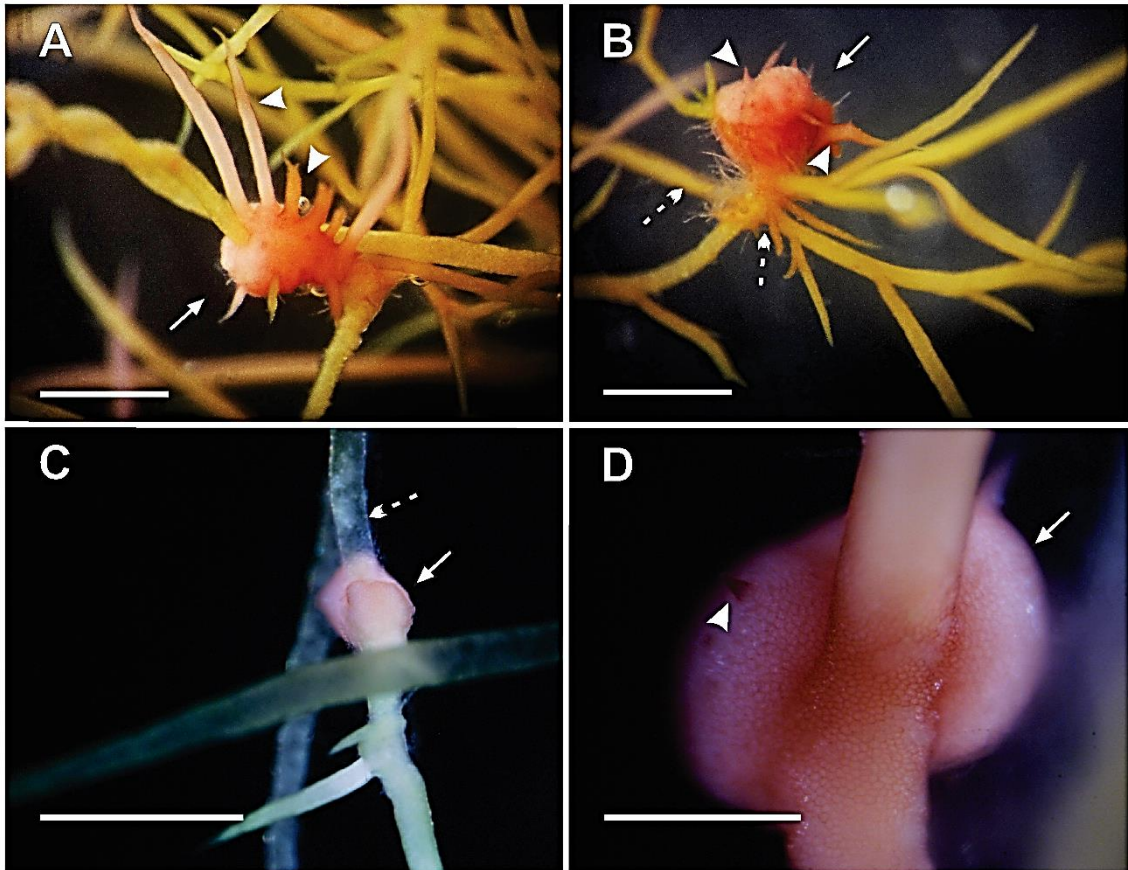
**Figura 81. Células de agallas de *Meridionella obtusangula* (TEM). A y B.** Detalle del interior de una célula, donde se observa la desorganización de las membranas del retículo endoplasmático (Re) (flecha), y un alto grado de vacuolización (D) en **B**. Pc: pared celular. **C.** Aumento del interior de una célula enferma donde se evidencia la desorganización de las membranas tilacoidales de los cloroplastos (C). Pc: pared celular. *Barras escalas: B y C = 1 µm; A = 2 µm.*

#### 4.1.2. Agallas de cultivo

Un fenómeno observado en los cultivos, ha sido la presencia de masas a modo de agallas en ciertas secciones de las ramificaciones de jóvenes talos tetrasporofíticos de un tamaño no superior a 2 cm de largo, originados a partir de carpósporas de talos con agallas (Fig. 82) pudiéndolas reconocer como estructuras análogas a las agallas encontradas en la naturaleza. Estas formaciones se evidenciaron como proliferaciones de células agrandadas con divisiones algo desordenadas en sus etapas iniciales.

Estas formaciones se presentaron como lóbulos con un diámetro promedio de 2,13 ( $\pm$  0,08) mm. La coloración de las agallas fue más rojiza que el resto de las ramas de *M. obtusangula* que presentaron tonalidades más pálidas virando a un pardo amarillento (Fig. 82 A y B). Una particularidad observada en estas estructuras fue que la rama portadora de la agalla entró en senescencia mientras que desde la propia agalla se generaron nuevas ramas vigorosas (Fig. 82 C). De cada masa de células, se pudo observar la formación de hasta 8 nuevas ramas. Asimismo, se pudo notar la continuidad de las células corticales del talo sobre la masa amorfa en conjunto con el inicio de nuevas ramificaciones originadas a partir de la agalla (Fig. 82 D).





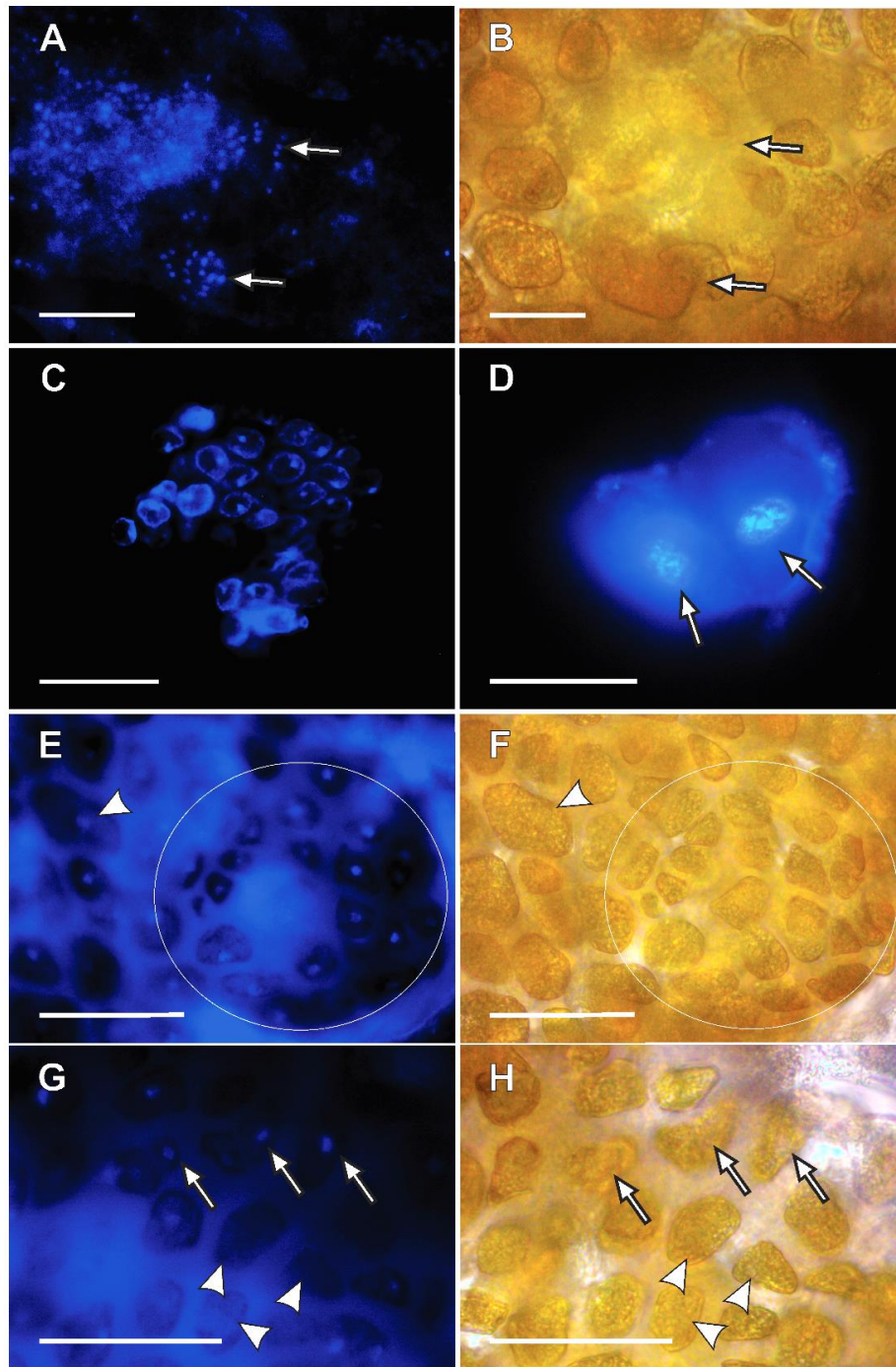
**Figura 82. Talos de *Meridionella obtusangula* en cultivo. A-B.** Se observa la presencia de nuevas ramificaciones (cabeza de flecha) naciendo de las agallas (flechas), nótese las fracciones enfermas de los talos (flecha punteada) al otro lado de la agalla. **C.** Fracción del talo con agalla (flecha), nótese a un lado de la misma la senescencia del talo (flecha punteada). **D.** Detalle de una agalla (flecha) sobre una rama, donde se observa la continuidad de las células corticales del talo sobre la masa amorfa. Se observa la presencia de nuevas ramificaciones originadas a partir de la agalla (cabeza de flecha). *Barras escalas:* **A, B** y **C** = 1 mm; **D** = 0,5 mm.

## 4.2. Estudios de fluorescencia

Por fuera de las agallas, los estudios con fluorescencia permitieron observar que la capa de mucílago favoreció la formación de un conspicuo biofilm de bacterias (Fig. 83 A). Las células vivas de agallas recolectadas en el ambiente natural o formadas en cultivo presentaron una intensa actividad nuclear indicando la duplicación del contenido de ADN y que las células se encontraban en activa división (Fig. 83 C y D), teniendo concordancia con la hiperplasia celular observada en las agallas durante los estudios morfológicos.

Asimismo, la fluorescencia de los núcleos evidenció la vitalidad celular, pudieron observar células muertas entremezcladas con células vivas (Fig. 83 G y H), correlacionándose con los estudios de ultraestructura donde muchas células presentaron su contenido celular desorganizado, indicando instancia de células muertas.





**Figura 83. Núcleos de células enfermas de *Meridionella obtusangula* teñidos con DAPI. A. y B. Tejido de agalla donde se evidencia una alta carga bacteriana en el exterior (flechas) C y D. Squash de células de agallas de talos provenientes de la naturaleza teñidos con DAPI, nótese los núcleos con cromatina densa en D. E- H. Tejido de agallas provenientes de cultivo. Nótese el núcleo de una célula con un grado de hipertrofia (ver cabeza de flecha en E y F), en cercanía de donde comienza a gestarse la formación de la agalla (círculo en F). G y H. Tejido de agalla en estadio más avanzado de maduración, nótese células con contenido activo (flechas) y células que parecen estar muertas (cabeza de flecha). Barras escalas: A, B y C = 25  $\mu$ m; E, F, G y H = 50  $\mu$ m; D = 100  $\mu$ m.**

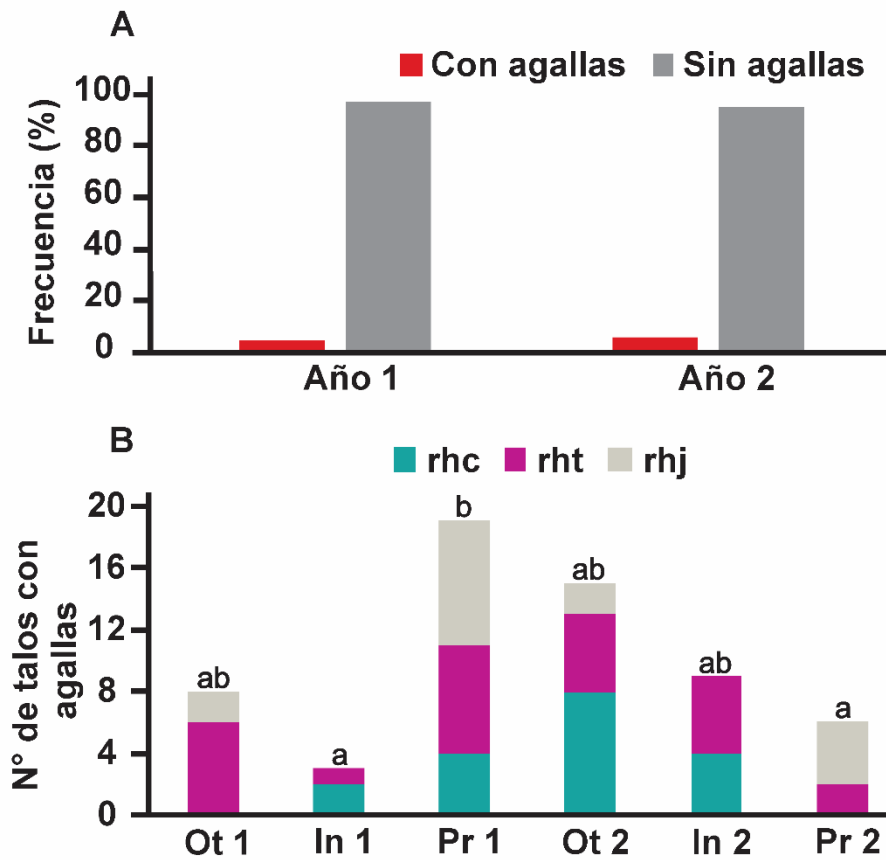
### **4.3. Estudios de prevalencia de agallas sobre los talos de *Meridionella obtusangula***

Del total de talos estudiados al final de los dos años sólo el 4,19% presentaron agallas, mientras que el 95,80% se encontró sin la presencia de ellas. La proporción de talos con agallas encontrados para ambos años fue similar, mientras que para el caso de los talos carentes de estas estructuras fue levemente diferente (Fig. 84 A). Del porcentaje de talos con agallas, el 43,33% correspondió a talos tetrasporofitos, el 30 % a talos cistocárpicos y el 26,66 % a talos juveniles (Fig. 85).

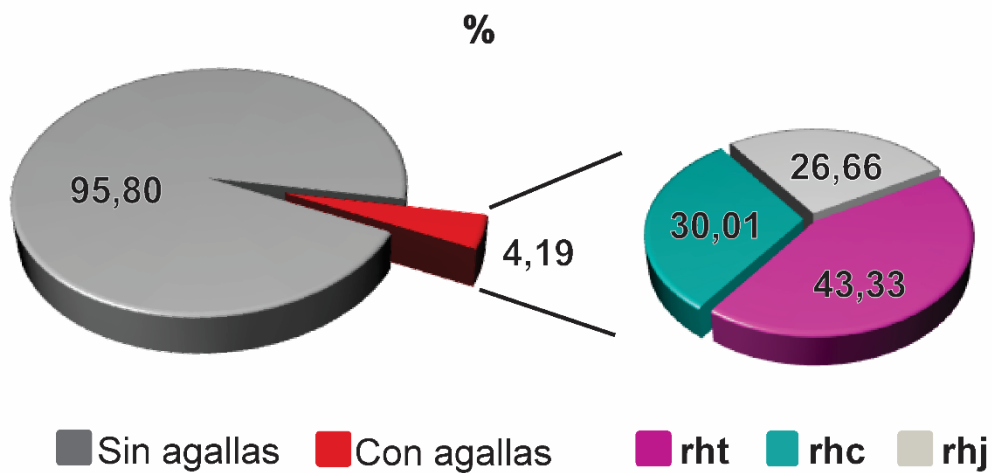
Con respecto a la estacionalidad de los talos con agallas, se encontraron diferencias significativas en cuanto al n° de talos con dichas estructuras a lo largo de las estaciones en los dos años de muestreo ( $F_{(2;12)} = 3,66, p = 0,049$ ). El valor más bajo fue registrado para la estación de invierno con un promedio de  $1 \pm 1,39$  talos, mientras que el valor más alto fue registrado para la estación de primavera, con  $6,33 \pm 1,30$  talos (Fig. 84 B). No se encontraron diferencias significativas en el número de agallas entre los talos reproductivos y no reproductivos ( $p = 0,54$ ). No obstante, el número de agallas en cada talo varió desde unas pocas docenas hasta más de 590.

En cuanto a la relación temporal entre los parámetros ambientales y las abundancias de las diferentes poblaciones de talos con agallas como talos sin agallas de *M. obtusangula* se puede observar la Figura 86. La población de talos reproductivos con agallas como aquellos que no evidenciaron las mismas estuvo asociada a las estaciones de invierno, así como a la estación de otoño del segundo año. Por otra parte, las poblaciones sin agallas de talos vegetativos se asociaron con la estación de otoño, mientras que la población vegetativa de talos

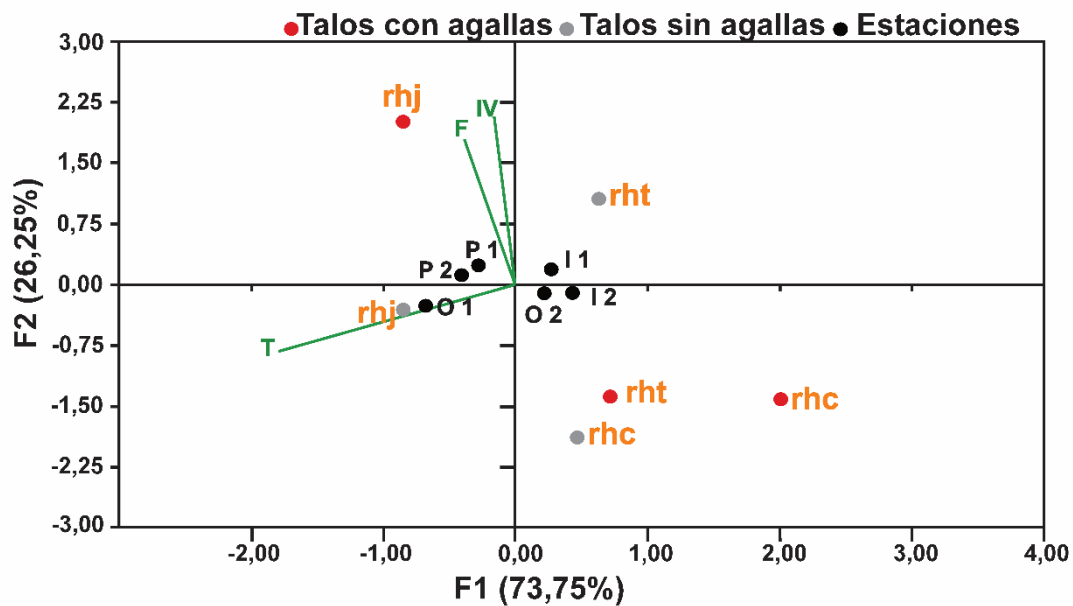
con agallas lo hizo con la estación de primavera. Los talos reproductivos con agallas, se asociaron con estaciones donde se caracterizaron fotoperiodos más cortos, así como bajas intensidades del viento, pero temperaturas del agua más altas, mientras que, por el contrario, para el caso de las poblaciones de talos vegetativos con estas estructuras, su abundancia se asoció con estaciones caracterizadas por intensidades del viento más altas, así como fotoperiodos más largos y temperaturas del agua de mar más bajas.



**Figura 84. Prevalencia de agallas en la población de *Meridionella obtusangula*. A.** Frecuencia anual de talos de *M. obtusangula* con agallas y sin agallas. **B.** Número de talos (expresados como media  $\pm$  estándar) de *M. obtusangula* con presencia de agallas a lo largo de las estaciones durante los dos años de muestreo.



**Figura 85. *M. obtusangula*. Prevalencia de agallas en la población.** rhc: talos cistocárpicos, rhj: talos juveniles; rht: talos tetraspóricos.



**Figura 86. Relación temporal entre la abundancia de las diferentes poblaciones de talos de *Meridionella obtusangula* y los parámetros ambientales (CCA).** temperatura del agua de mar (T), fotoperiodo (F), intensidad del viento (IV), talos cistocárpicos (rch), talos tetraspóricos (rht), talos juveniles (rhj), otoño del primer año (O 1), otoño del segundo año (O 2), invierno del primer año (I 1), invierno del segundo año (I 2), primavera del primer año (P 1), primavera del segundo año (P 2).

## 5. Discusión

La formación de agallas relacionada con diversos organismos patógenos ha sido reportada en diversas algas rojas como las pertenecientes a los géneros *Bostrychia*, *Chondrus*, *Iridaea* y *Prionitis* (McBride *et al.* 1974, Apt & Gibor 1991, Correa *et al.* 1993, Goecke *et al.* 2012, West *et al.* 2013, Ogandaga *et al.* 2017).

En la Familia Cystocloniaceae sólo se había registrado la presencia de agallas en *C. purpureum*, presumiblemente causado por bacterias (Chemin 1937). Este crecimiento anormal en talos de *M. obtusangula* resultó en severas alteraciones morfológicas que afectaron tanto a fases vegetativas como reproductivas. Así mismo, la distribución de las poblaciones con agallas mostró una distribución agregada a lo largo del otoño, invierno y primavera, presentando un máximo en primavera y un mínimo hacia el invierno. Estudios similares han sido observados sobre el alga roja *Iridaea laminarioides* Bory documentada para el Pacífico sudoriental (Correa *et al.* 1993), aunque presentando valores de incidencia estas estructuras más bajas que los registrados sobre los talos de *M. obtusangula*. Muchos informes sobre las agallas en las algas han figurado en la literatura ficológica durante décadas, los estudios se han centrado principalmente en la descripción de la anatomía y no su impacto sobre su prevalencia sobre poblaciones naturales, dificultando la comparación de los resultados de este estudio con otras investigaciones.

Presumiblemente, la estacionalidad de los talos con agallas de *M. obtusangula* puede ser explicada por la implicancia de la variabilidad de los factores abióticos presentes en la localidad de estudio. Aquí se evaluaron principalmente la implicancia de la temperatura del agua, el fotoperiodo, así como la intensidad de

los vientos, que si bien, según los análisis de correspondencia canónica parecen estar relacionados con la abundancia de los talos con agallas reproductivos y vegetativos, así como con las poblaciones de talos sin agallas evaluadas, se requieren mayores estudios para infundir algún tipo de conclusión.

La morfología externa de las agallas de *M. obtusangula* fue similar a otras agallas asociadas por infección de bacterias. La morfología a modo de verrugas es compartida por agallas desarrolladas en *Prionitis lanceolata* (Harvey) Harvey, *Gigartina teedii* (Mertens & Roth) J. V. Lamouroux, *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin) Bornet, *Polyneuropsis stolonifera* y *C. purpureum* (Gardner 1918, Chemin 1937, Felicini & Perrone 1972, McBride *et al.* 1974, Tsekos 1982, Apt & Gilbor 1991).

El aspecto interno de las agallas encontradas en *Meridionella obtusangula*, responde a una proliferación del tejido producto de un crecimiento anormal de las células (hiperplasia), como de una hipertrofia por parte de las mismas, rasgos característicos encontrados en otras agallas presentes en frondes de algas rojas como *P. lanceolata* y *G. epihippisorica* (Apt & Gibor 1991, 1991). En *M. obtusangula*, las células implicadas en la formación de estas agallas derivan de las capas de células medulares, hecho que se ha observado en las agallas presentes en *Saccorhiza bulbosa* J. Agardh, *C. crispus*, *C. purpureum* y *P. lanceolata* (Cantacuzene 1930, Chemin 1937, McBride *et al.* 1974, Tsekos *et al.* 1982, Apt & Gilbor 1991).

Las células externas de las agallas de *M. obtusangula* presentaron una pigmentación rojiza oscura, más fuerte, en comparación con otras secciones del talo a diferencia de las agallas observadas para ejemplares del género *Bostrychia* sp. (West *et al.* 2013), no obstante, al igual que las células

mencionadas en dicho estudio, los resultados de fluorescencia evidenciaron que en apariencia las células de las agallas de *M. obtusangula* parecen tener núcleos viables a menudo más grandes que los núcleos de las células del nivel de ploidia. Ultraestructuralmente, las células de las agallas de *M. obtusangula* exhibieron varias diferencias con respecto a las células de las secciones del talo sin presencia de estas estructuras, entre lo que se puede mencionar una marcada desorganización tilacoidal a diferencia de otros reportes donde los cloroplastos aparentemente solo se revierten a un estado proplastidio, pero de una manera organizada (McBride *et al.* 1974, Apt & Gibor 1991). Asimismo, ha observado un aumento en el número de cuerpos multivesiculares, así como en la actividad y cantidad de dictiosomas, hechos también observados en células de agallas de otras algas rojas (McBride *et al.* 1974, Apt 1988, Apt & Gibor 1991).

Las agallas encontradas en los cultivos de *M. obtusangula*, se asemejaron a las masas producto de la coalescencia de los discos basales entre varios talos, a partir de las cuales se evidenció crecimiento de nuevas ramificaciones. Particularmente, estas nuevas ramas mostraron la típica coloración rojiza que presentan los talos de *M. obtusangula*, distinguiéndose del color blanquecino que presentaron aquellas fracciones del talo desde donde se sostenían las agallas. Este fenómeno de fragilidad y envejecimiento por parte de las fracciones del talo portadores de las agallas, permiten pensar un posible desprendimiento en el futuro. Estas observaciones hacen sugerir que, de esta manera, se daría origen a una nueva plántula. Estudios similares en *G. epihippisoria*, han manifestado un crecimiento autónomo de nuevas plántulas a partir de agallas, luego de ser extraídas del talo parental (Apt & Gilbor 1991). El crecimiento de agallas demuestra que las macroalgas marinas presentan el potencial de desarrollarse



como una masa tisular indiferenciada características deseables para el cultivo de tejidos. Este fenómeno se ha demostrado en *Bostrychia* sp. donde brotes sanos y ramificados se han regenerado a partir del tejido de sus agallas (West *et al.* 2013).

La información sobre el desarrollo y prevalencia de las agallas en las poblaciones de *M. obtusangula* descrita en esta tesis representa un aporte de importancia para la evaluación de esta especie como un posible recurso de importancia económica.

**CAPÍTULO VII**  
***MERIDIONELLA OBTUSANGULA* COMO UN  
POTENCIAL RECURSO**



## 1. Introducción

Las algas rojas (Rhodophyta) producen una variedad de galactanos sulfatados en la matriz de su pared celular y los espacios intercelulares, contribuyendo hasta el 50-60% de su peso seco total (Lim *et al.* 2018). Especialmente las algas del orden Gigartinales y Gelidiales son una fuente importante de galactanos sulfatados. Actualmente se explotan al menos 70-80 especies de ambos ordenes industrialmente para la producción de galactanos (Delattre *et al.* 2011). Estos galactanos sulfatados se caracterizan en unos pocos grupos basados en su estereoquímica, que incluyen los agares, los carragenatos y los híbridos D/L, también conocidos como galactanos sulfatados no ideales o complejos (Delattre *et al.* 2011, Jiao *et al.* 2011).

Los compuestos identificados como carragenanos son polisacáridos sulfatados, componentes naturales de la matriz de la pared celular, con excelentes propiedades físicas como espesantes y estabilizantes, que se utilizan en la industria alimentaria, química y farmacéutica (Campo *et al.* 2009, Chojnacka *et al.* 2012). Los mismos consisten en unidades alternantes de  $\beta$ -D-galactopiranosas unidas en la posición 3 y de  $\alpha$ -D-galactopiranosas unidas en la posición 4, pudiendo estar esta última como tal o como 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactopiranosas y los grupos hidroxilo sustituidos por diferentes grupos, principalmente sulfatos (Usov 2011). Según la presencia o ausencia de 3,6-anhidrogalactosa y la cantidad y posición de los grupos sulfato, los carragenanos se clasifican en seis familias: iota ( $\iota$ -), kappa ( $\kappa$ -), lambda ( $\lambda$ -), mu ( $\mu$ -), nu ( $\nu$ -) y theta ( $\theta$ -) (Campo *et al.* 2009).

En los últimos años estos polisacáridos sulfatados han sido utilizados por sus propiedades espesantes, gelificantes y estabilizantes en la industria alimentaria química y farmacéutica (Campo *et al.* 2009, Usov 2011, Chojnacka *et al.* 2012), principalmente las carrageninas utilizadas pertenecen al grupo de  $\kappa$ -,  $\iota$ - y  $\lambda$ -carragenanos.

Actualmente el suministro de biomasa para la producción a nivel industrial de la carragenina se basa en la recolección de lechos naturales de algas rojas de especies de *Euclima*, *Sarcopeltis skottsbergii*, *Sarcothalia*, *Mazzaella* (Bory Fredericq, *Chondrus*, *Kappaphycus*, entre otros (Buschmann *et al.* 2001, Marin *et al.* 2002, Mansilla *et al.* 2006, Avila *et al.* 2012). Por ello, en la última década la obtención de polisacáridos algales no solo se ha orientado a la búsqueda de alternativas a la extracción mediante el uso de técnicas de cultivo, sino a la búsqueda de nuevas especies de algas rojas que puedan ser utilizadas por la presencia de sus carragenanos (FAO 2020, Torres *et al.* 2019).

En las costas norpatagónicas de Argentina existen extensas poblaciones de macroalgas con un importante potencial para la industria (Piriz & Casas 1996 a,b, Boraso de Zaixso *et al.* 2015). Muchas de estas macroalgas como *Gracilaria gracilis*, *S. skottsbergii*, *Sarcothalia spp.*, *G. crinale* y *Nemalion elminthoides* (Vellay) Batters, presentan polisacáridos sulfatados (como el agar y los carragenanos), que han sido objeto de estudio por grupos de investigación de marcada trayectoria (Matulewicz & Cerezo 1980, Stortz & Cerezo 1986, 1993, 2000, Matulewicz *et al.* 1989, Piriz & Cerezo 1991, Ciancia *et al.* 1993, 1997, Carlucci *et al.* 1997, Stortz *et al.* 1994; Flores *et al.* 1997, 2000a, b), entre otros. El interés por la explotación de especies de algas rojas para la obtención de agar o carragenina, provino de las especies de *G. gracilis* y *S. skottsbergii* a

comienzos de la década del '50 por una empresa local en la provincia de Chubut (Piriz & Casas 1996). No obstante, la obtención de polisacáridos se realizó a partir de lechos naturales sin una correcta planificación de manejo de sus poblaciones, desencadenando en las últimas décadas una disminución de su explotación, debido al decrecimiento de la materia prima local lo cual obligó realizar la producción a partir de la importación de especies no autóctonas (Marinho-Soriano *et al.* 2006, Boraso de Zaixso *et al.* 2015). Afortunadamente, en los últimos años se han realizado varios estudios cuyo principal objetivo fue encontrar especies alternativas para la extracción de estos polisacáridos sulfatados presentes en las algas rojas de nuestras costas (Carlucci *et al.* 1997, Rodríguez *et al.* 2009, Croce *et al.* 2015, Hughes *et al.* 2018).

La familia Cystocloniaceae ha sido estudiada por la presencia de carragenina en especies de los géneros *Cystoclonium*, *Hypnea* y *Calliblepharis*, representadas en todo el mundo y caracterizadas por la presencia de iota-carragenina (Deslandes *et al.* 1985, Reani *et al.* 1998, Bast *et al.* 2014, Vázquez-Delfín *et al.* 2014, Pereira *et al.* 2015, Nauer *et al.* 2016, Rafiquzzaman *et al.* 2016).

## **2. Objetivos**

- Determinar la composición externa e interna de la pared celular, mediante análisis de la composición elemental y estudios ultraestructurales.
- Caracterizar los polisacáridos sulfatados de la pared celular de *M. obtusangula*.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Caracterización de la pared celular**

Para analizar la conformación estructural de la pared celular, se realizaron estudios de su ultraestructura a partir de porciones de talos de *M. obtusangula*. Las mismas fueron preparadas para su observación al microscopio electrónico de transmisión (Cap. I). Asimismo, para estudiar la composición elemental de la pared celular, otros fragmentos de talos fueron preparados para su observación bajo microscopía electrónica de barrido equipado con el sistema de microanálisis por dispersión de energía de rayos X (EDX). Una ventaja particular del análisis EDX es que es posible correlacionar la composición elemental con la estructura biológica vista a través del microscopio electrónico, en el cual, su extrema sensibilidad permite detectar elementos presentes en concentraciones tan bajas como 10<sup>-17</sup> a 10<sup>-18</sup> pg. y complementar la caracterización de la pared celular (Läuchli 1972, Russ & Panessa 1972).

#### **3.2. Extracción de los polisacáridos**

La extracción de los carragenanos de los talos de *M. obtusangula* se llevaron a cabo siguiendo los protocolos propuestos por Craigie & Leigh (1978), Matsuhiro (1995) y FAO (2013) incorporando algunas modificaciones en este estudio.

##### **3.2.1. Procedimiento**

Se registró el peso fresco de los talos de *M. obtusangula* seleccionados para este estudio y posteriormente fueron liofilizados en la Planta Piloto de Química (PLAPIQUI), Bahía Blanca.

### **3.2.1.1. Pretratamiento**

Se pesaron 18 g de alga liofilizada, se molieron con ayuda de un molinillo eléctrico y se distribuyeron en tres frascos de precipitado (6 g por frasco). Luego se procedió a realizar una

- a. Hidratación: en agua destilada, a razón de 20 ml.g<sup>-1</sup> de material durante 1 hora. (Fig. 88 A- D).
- b. Filtrado utilizando una malla de nylon de 200 µm.

Posteriormente, cada tratamiento fue filtrado para eliminar el agua. A uno de los frascos se le colocó nuevamente agua destilada a razón de 20 ml.g<sup>-1</sup> de material siendo éste el tratamiento Control (Co). A los otros dos recipientes con material, se les añadió NaOH al 2,5 y 5% respectivamente, en una proporción de 20 ml.g<sup>-1</sup> de alga, dejando reposar durante 1 hora a 16 - 20°C (Roleda *et al.* 1997).

### **3.2.1.2. Primera extracción**

Luego del pre-tratamiento, cada recipiente se colocó en un baño térmico a 85°C durante 2 horas (Fig.88 E). Pasado ese tiempo, las extracciones fueron filtradas con una malla 200 µm y una segunda filtración se realizó por 30 µm (Fig. 88 F).

### **3.2.1.3. Segunda extracción**

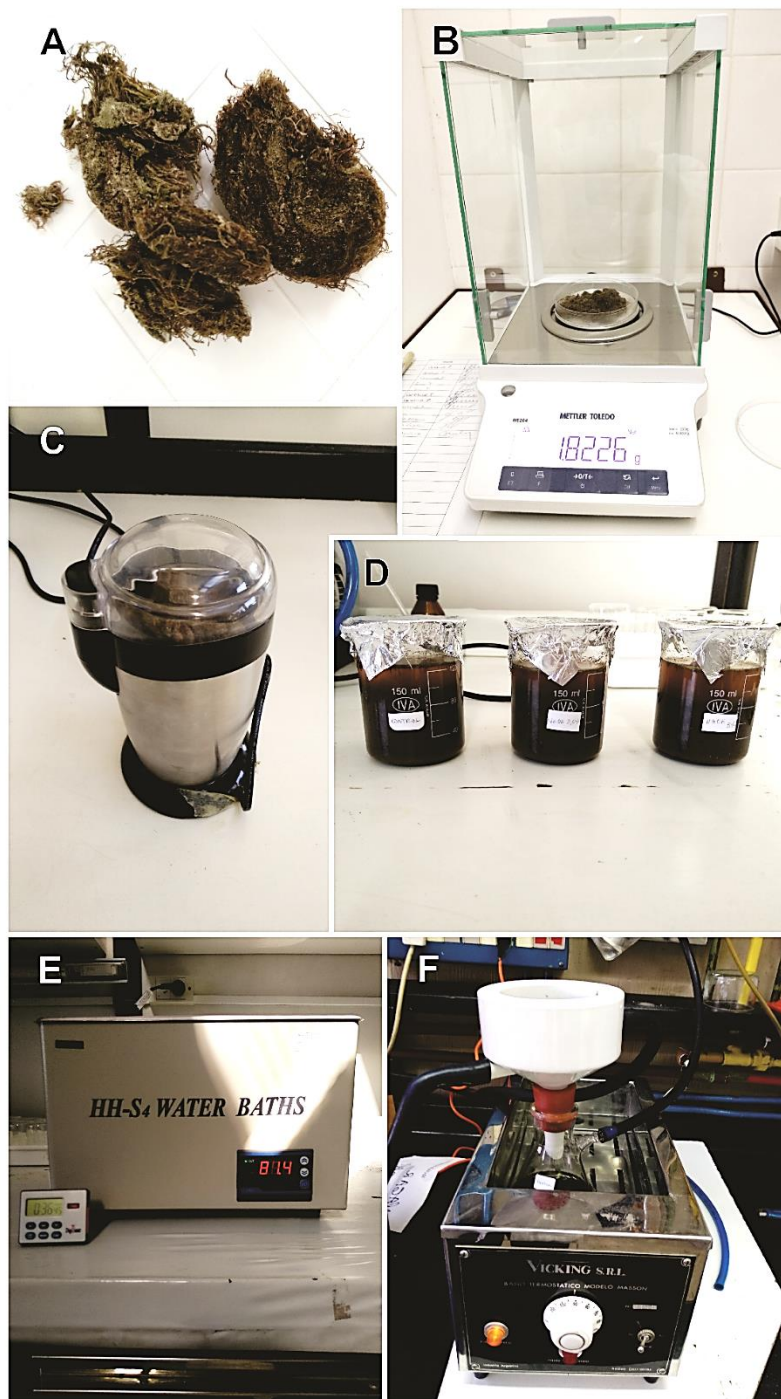
El material algal de la primera extracción fue colocado en agua destilada a razón de 20 ml.g<sup>-1</sup> de material, se calentó nuevamente durante una hora a 85°C y posteriormente se filtró con una malla 200 µm y una segunda filtración con una malla de 30 µm.

### **3.2.1.4. Obtención de polisacáridos**

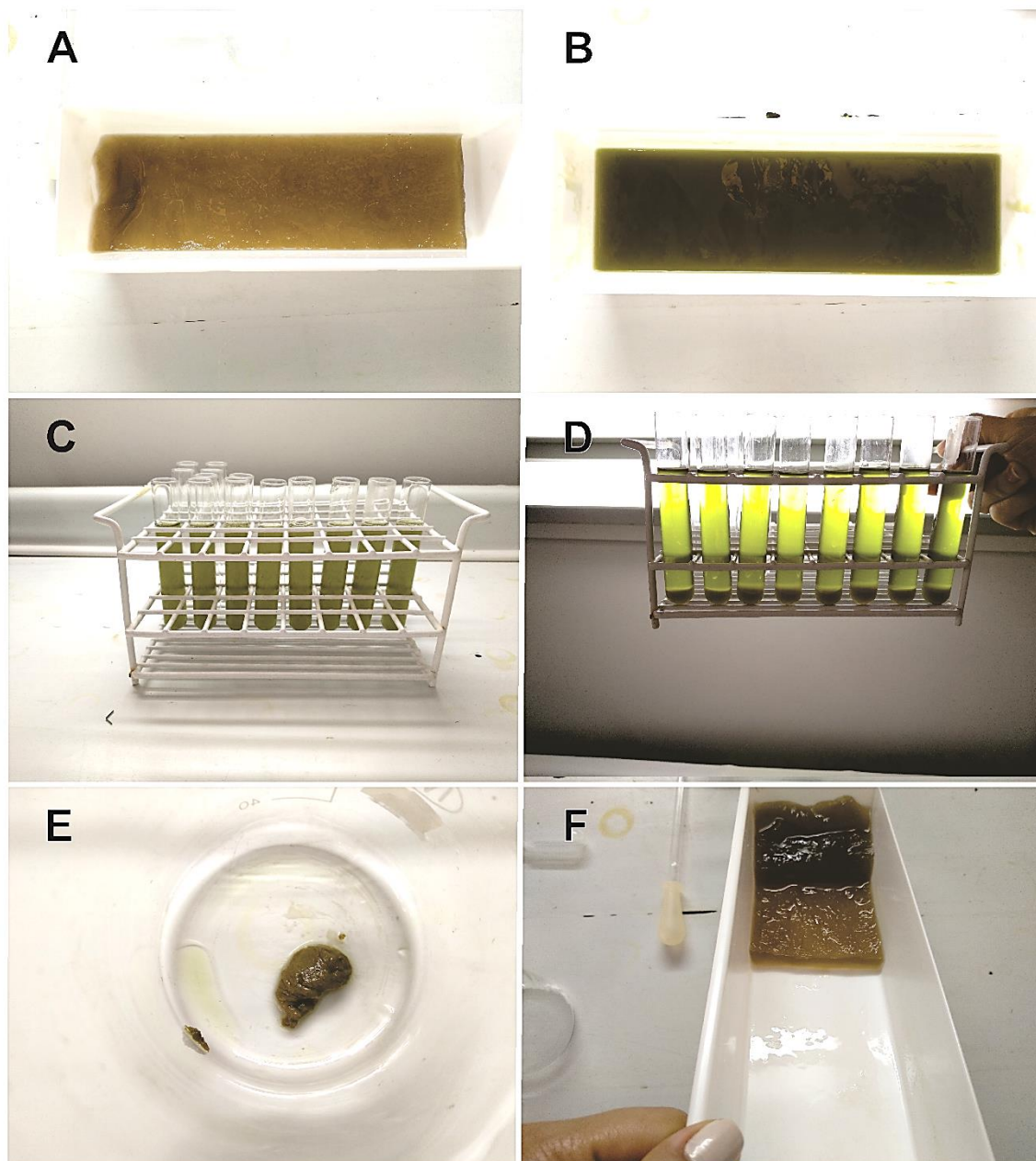
El extracto filtrado de la primera extracción se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos y los sobrenadantes se volcaron en bandejas para su enfriamiento. Los ficocoloides se obtuvieron mediante congelamiento-descongelamiento y se dejaron secar a temperatura ambiente (Fig. 89 A y B).

Los extractos de la segunda extracción se vertieron en tubos de ensayo con contenido de isopropanol y se sometieron a centrifugación (2000 rpm) durante 5 minutos, procedimiento con el cual se logró la precipitación de las fibras de carragenano (Fig. 89 C-E). Los extractos se colocaron en bandejas para su gelificación a -20°C durante 24 horas. De esta manera se logró extraer por el método de congelamiento/descongelamiento el agua de sinéresis retenida por el polímero (Fig. 89 F). Los extractos se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se pesaron para registrar su rendimiento final. Complementariamente, se utilizó un polisacárido del tipo carragenina de origen industrial para la caracterización de los extractos.





**Figura 88. Elementos implicados en la extracción de los carragenanos. A.** Material algal liofilizado. **B y C.** Pesaje y molienda del material algal liofilizado. **D.** Frascos de precipitados con el material algal bajo el pretratamiento con agua destilada. **E y F.** Baños térmicos utilizados conjunto con el embudo Büchner y Kitasato con bomba de filtrado al vacío.



**Figura 89. Extracción de carragenanos.** A y B. Sobrenadante vertido en cubas para su enfriamiento, extracto control (A) y extracto con NaOH (B). C y D. Extracción de carragenano con alcohol isopropanol, evidenciando la precipitación del polímero en los tubos de ensayo luego del proceso de centrifugación (D). E. Carragenano extraído mediante el uso de alcohol. F. Carragenano extraído mediante el proceso de congelamiento-descongelamiento.

### **3.3. Caracterización de los polisacáridos**

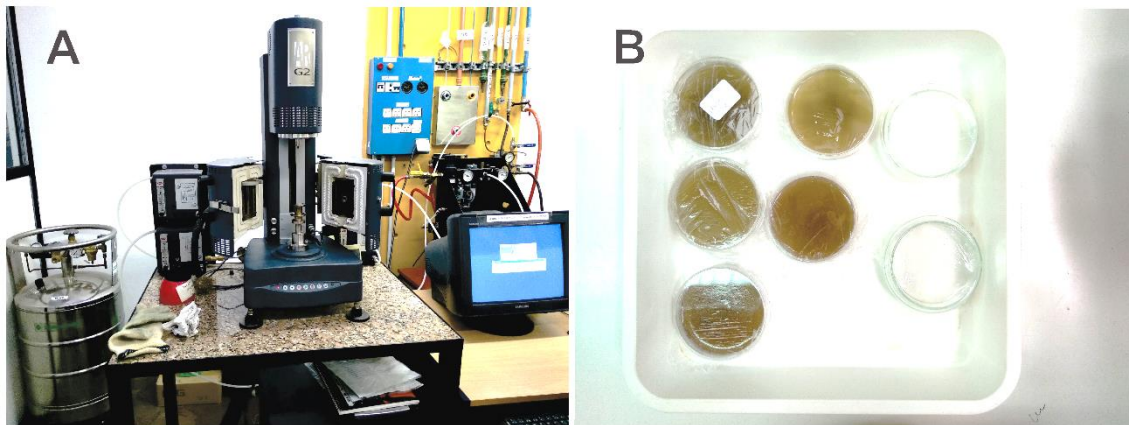
#### **3.3.1. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)**

La composición y los grupos funcionales de los polisacáridos extraídos se evaluaron mediante la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR). Las señales se asignaron según los criterios Matsuhira (1996) y Pereira *et al.* (2011).

Previamente se prepararon pastillas disolviendo 1 mg de extracto en 99 mg de KBr y se analizaron en un espectrofotómetro FT-IR (Nicolet Nexus, USA). En total se realizó el análisis de 6 pastillas diferentes: blanco (conteniendo solo KBr), control (con el polisacárido extraído sólo con agua destilada) (C), NaOH 2,5%, NaOH 5%, carragenina comercial (CC) y una última compuesta por material algal liofilizado (DA).

#### **3.3.2. Reología**

Las propiedades viscoelásticas de los ficocoloides fueron evaluadas usando un reómetro dinámico TA ARG2 (USA). Para ello se prepararon geles de 25 mm de diámetro disolviendo cada extracto liofilizado en agua destilada a 80°C, en una proporción del 1,5 % y dejándolo gelificar en cápsulas de plástico a temperatura ambiente durante 24 horas (Fig. 90). Para cada gel, se hicieron barridos de frecuencia en la región viscoelástica lineal, a una temperatura constante de 25 °C y utilizando una placa de geometría paralela de 25 mm de diámetro. Los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) se determinaron de acuerdo con la frecuencia angular ( $\omega$ ). Para fines comparativos, el análisis reológico también se realizó en un gel de carragenina de calidad alimenticia (CA).



**Figura 90. Elementos para el estudio reológico de los hidrocoloides de *M. obtusangula*. A. Equipo de reometría TA ARG2 (USA). B. Geles de los extractos de polisacáridos para ser estudiados.**

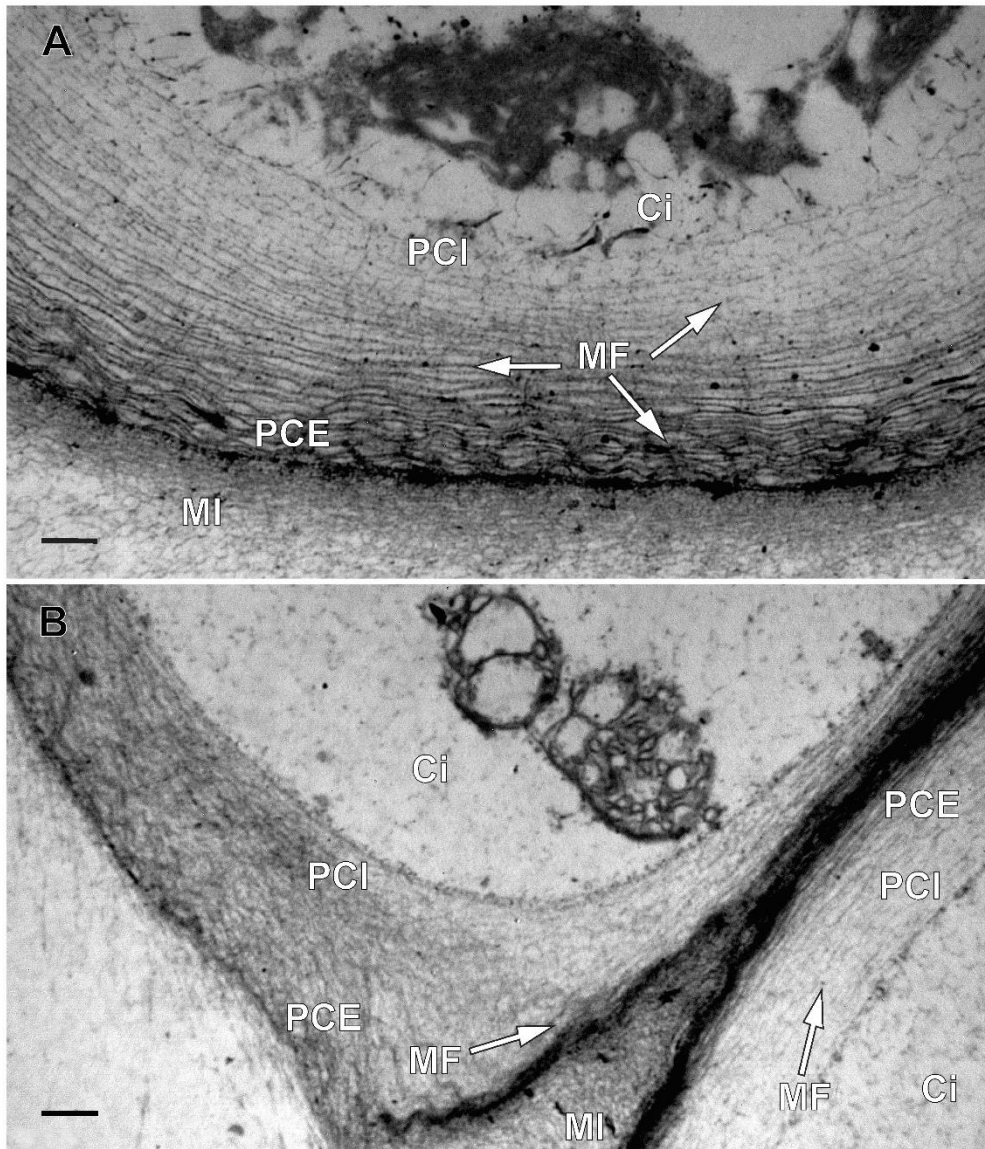
## 4. Resultados

### 4.1. Caracterización de la pared celular

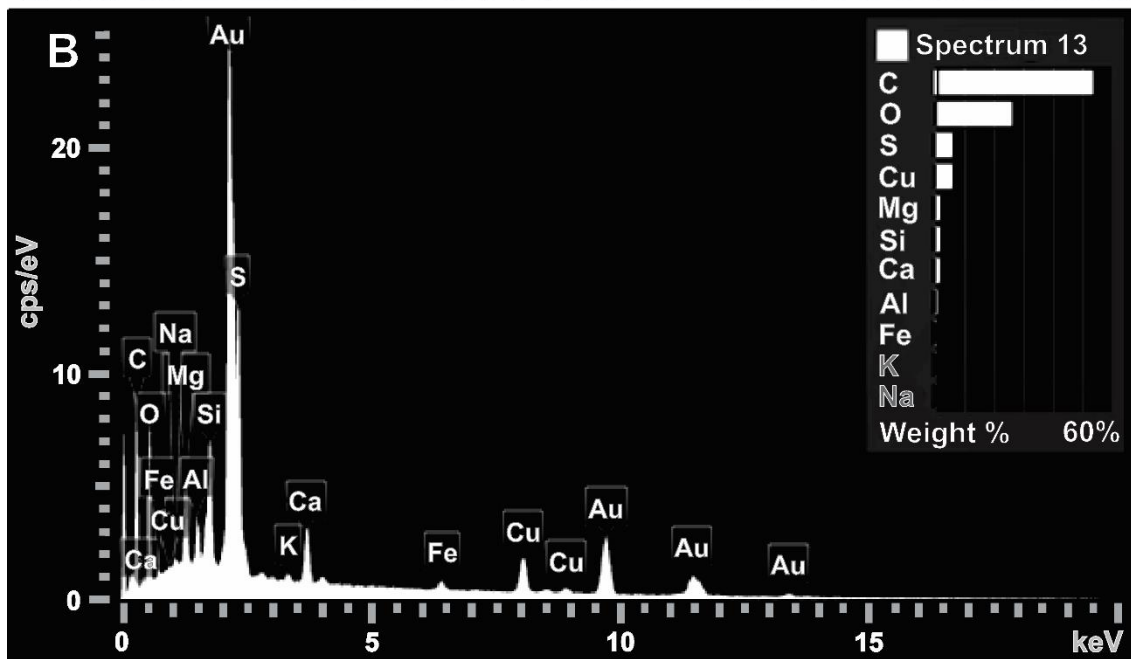
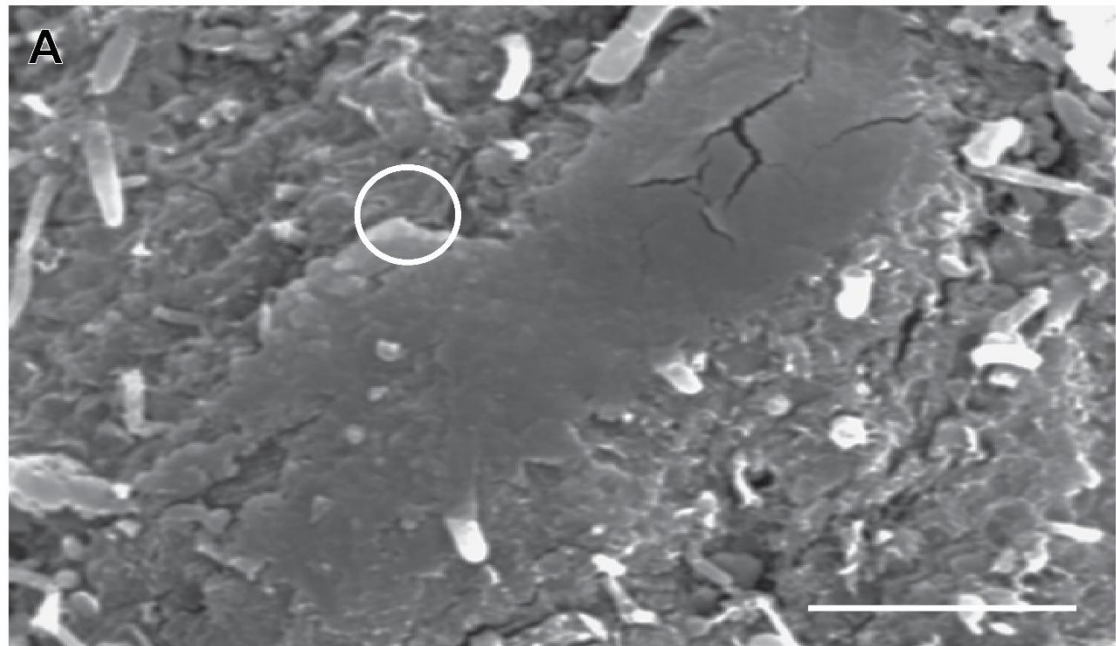
La pared celular de *M. obtusangula* presentó aproximadamente 31 capas de microfibrillas de celulosa incrustada en un material amorfo, las cuales se dispusieron de manera concéntrica alrededor de la célula y evidenciando algunas conexiones cruzadas entre ellas. El espesor de la pared celular fue de 2,46 ( $\pm$  0,35)  $\mu\text{m}$ , evidenciando una densidad variable de microfibrillas de celulosa entre las células (Fig. 91). Asimismo, las paredes celulares de los talos cistocápicos y tetraspóricos contuvieron las típicas microfibrillas que aumentaron su concentración desde la región interior a la exterior de la pared. La matriz intercelular pareció más granular que las paredes celulares (Fig. 91).

El análisis de los espectros EDX de la pared celular de *M. obtusangula* evidenció diferentes elementos en distintas proporciones. El elemento S fue el más representativo, lo que se relaciona con la presencia de grupos sulfatados característicos de los hidrocoloides y en menor medida se evidenciaron los elementos Cu, Mg, Si y Ca, mientras que el Al y el Fe se encontraron en muy bajas proporciones. La presencia de oro correspondió al recubrimiento realizado sobre este metal, necesario para la observación en el SEM (Fig. 92).





**Figura 91. *M. obtusangula*. Pared celular (MRT) A.** Pared celular de una célula apical de un talo cistocárpico. **B.** Pared celular de células corticales internas de talos tetraspóricos. Las microfibrillas (MF) de la pared celular estuvieron dispuestas de forma concéntrica y tuvieron una mayor densidad en la capa externa (PCE) que en la capa interna (PCI). La matriz intercelular (MI) tuvieron un aspecto granular. Citoplasma (Ci). *Barras escalas: A = 0.05  $\mu$ m; B = 1  $\mu$ m.*



**Figura 92. Caracterización de la pared celular de *M. obtusangula* mediante análisis MEB-EDX. A.** Vista superficial del talo de *M. obtusangula* al MEB, el círculo blanco señala el área analizada. **B.** Espectro de los diferentes elementos detectados sobre la superficie. *Barra de escala: B = 100 µm.*

## 4.2. Caracterización de los polisacáridos

La gelificación de los polisacáridos se produjo de dos maneras: rápidamente después de verter el extracto en las bandejas y precipitándolas con alcohol. Los extractos con tratamiento con NaOH tuvieron un color verdoso, que precipitándolos con alcohol resultaron en un polisacárido más claro. El rendimiento de extracción para los polisacáridos de *M. obtusangula* fue mayor para el tratamiento con NaOH 5% (20,7 %), mientras que se encontraron valores similares entre el control y el tratamiento con NaOH 2,5%, obteniendo valores de rendimiento de 16,18% y 15,04%, respectivamente.

El efecto del tiempo en la rigidez del gel se determinó midiendo el módulo  $G'$  de las tres soluciones de carragenina a 25 °C. Los geles mostraron valores de  $G'$  más altos que  $G''$  e independientes de la frecuencia en el rango de 0,1 a 100 rad  $\text{sec}^{-1}$ , y se compararon con las carrageninas comerciales (Fig. 93). Por otra parte, los extractos preparados con NaOH dieron geles en los que los valores del módulo elástico ( $G'$ ) fueron superiores a 100 Pa, aunque muy inferiores a los valores del gel de grado comercial (siendo éstos <10000 Pa). Sin embargo, las propiedades viscoelásticas de los geles mostraron similitudes con las de la carragenina de grado alimenticio comercial (Fig 93).

Las bandas características de cada espectro se detallan en la Tabla 27. El espectro IR para la muestra de alga seca de *M. obtusangula* reveló la presencia de enlaces de tipo éster con grupos sulfato a la frecuencia de 1236  $\text{cm}^{-1}$ . Asimismo, se observó la banda a 580  $\text{cm}^{-1}$  típica de la carragenina que se encuentra en los extractos de ficocoloides (Figs. 94 y 95 Banda 1). Por otra parte,

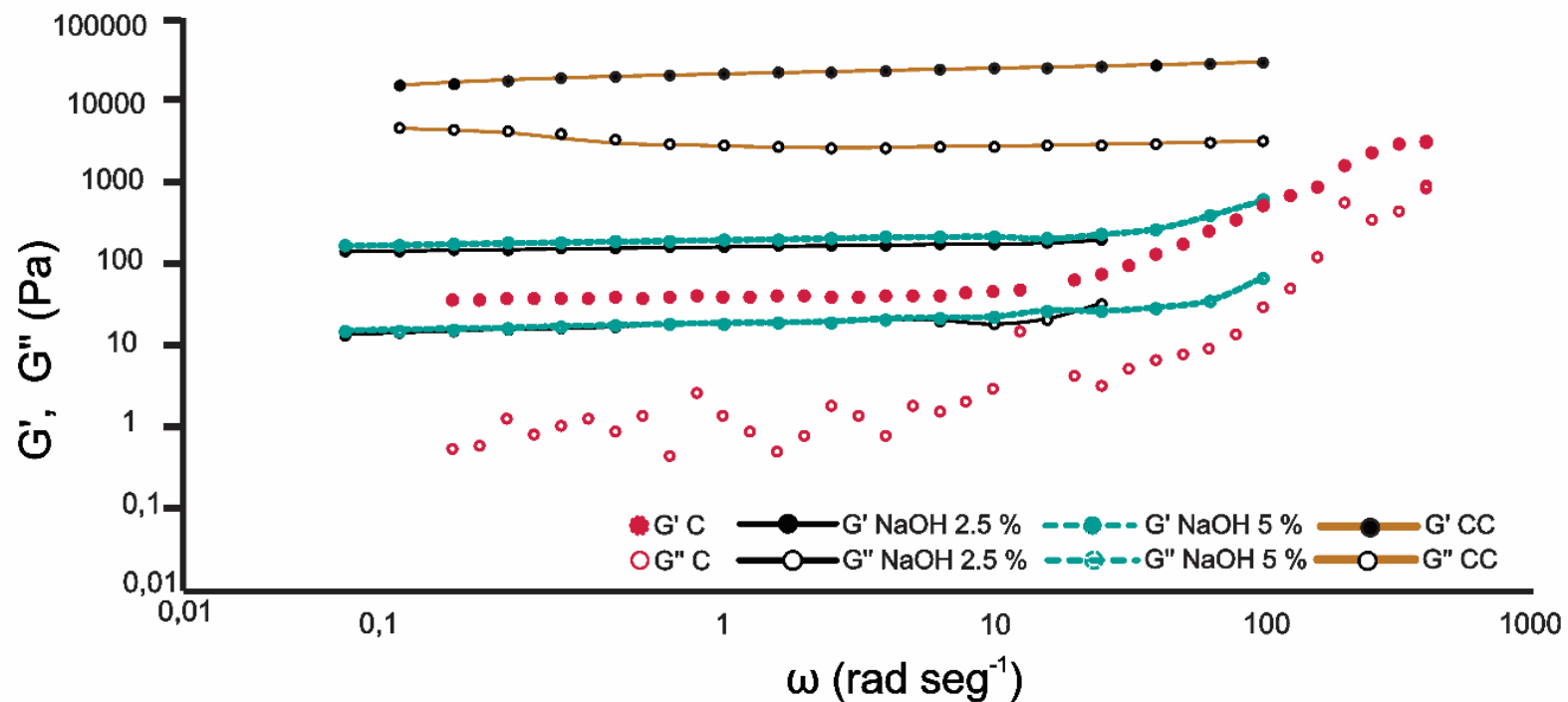


en la banda de  $1542\text{ cm}^{-1}$  se evidenciaron grupos amidas, lo que podría indicar la presencia de contenido proteínico (Fig. 94 Banda 8).

Además, todas las muestras extraídas, así como la carragenina comercial, mostraron algún grado de sustitución con grupos  $\text{SO}_4^-$  según la banda a  $1150\text{ cm}^{-1}$  (Figs. 94 y 95 Banda 6). Por otra parte, las bandas a  $1230\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$  del espectro IR demostraron la presencia de uniones de tipo éster con grupos sulfato (Fig. 94 Banda 7).

Los espectros de polisacáridos extraídos tanto el control, así como los tratamientos, se identificaron como i-carragenanos con alto grado de sulfatación. El análisis de la región del espectro entre  $950\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  permitió determinar la posición de los grupos sulfato para identificar el tipo de polisacárido (Figs. 94 y 95). El espectro IR mostró la presencia de grupos  $\text{SO}_4^-$  en el C4 de la subunidad D-galactosa, reflejada en las señales  $930\text{-}934\text{ cm}^{-1}$  (Figs. 94 y 95 Banda 4) y en el C2 de las subunidades 3,6-anhidrogalactosa reveladas en las señales  $850\text{ cm}^{-1}$  y en  $805\text{ cm}^{-1}$  (Figs. 94 y 95, Bandas 2 y 3).

Además, se identificó la presencia de vibraciones OH, CH<sub>2</sub> y C=O en tres bandas agudas a  $3400$ ,  $2900$  y  $1640\text{ cm}^{-1}$  respectivamente (Fig. 94 Bandas 9, 10 y 11).



**Figura 93. Caracterización reológica de los ficocoloides de *M. obtusangula* extraídos bajo diferentes tratamientos, así como de una muestra de carragenina del tipo comercial.** Espectro mecánico de los módulos de almacenamiento  $G'$  (símbolos sólidos) y pérdida  $G''$  (símbolos vacíos) de los ficocoloides. Tratamientos realizados para extracción de Carragenanos: Control (C), NaOH 2,5 %, NaOH 5 %, carragenano del tipo comercial (CC).

**Tabla 27. Bandas características de los espectros FT-IR de polisacáridos de *M. obtusangula* extraídos en diferentes condiciones, muestras de agar comercial y algas secas.** Tratamientos realizados para extracción de carragenanos: Control (C), NaOH 2,5 %, NaOH 5 %, carragenano del tipo comercial (CC), DA, alga seca.

Longitud de onda  $\text{cm}^{-1}$

Bandas	Control (C)	Tratamiento NaOH 2.5%	Tratamiento NaOH 5 %	Carragenano Comercial (CC)	Alga seca DA
1	580	581	582	578	580
2	805	805	806	801	802
3	849	853	854	847	855
4	932	934	934	930	933
5	1073	1072	1072	1073	1079
6	1156	1157	1157	1145	1156
7	1261	1258	1260	1262	-
8	-	-	-	-	1542
9	1650	1646	1647	1648	-
10	2930	2927	2924	2920	2925
11	3439	3454	3447	-	3417

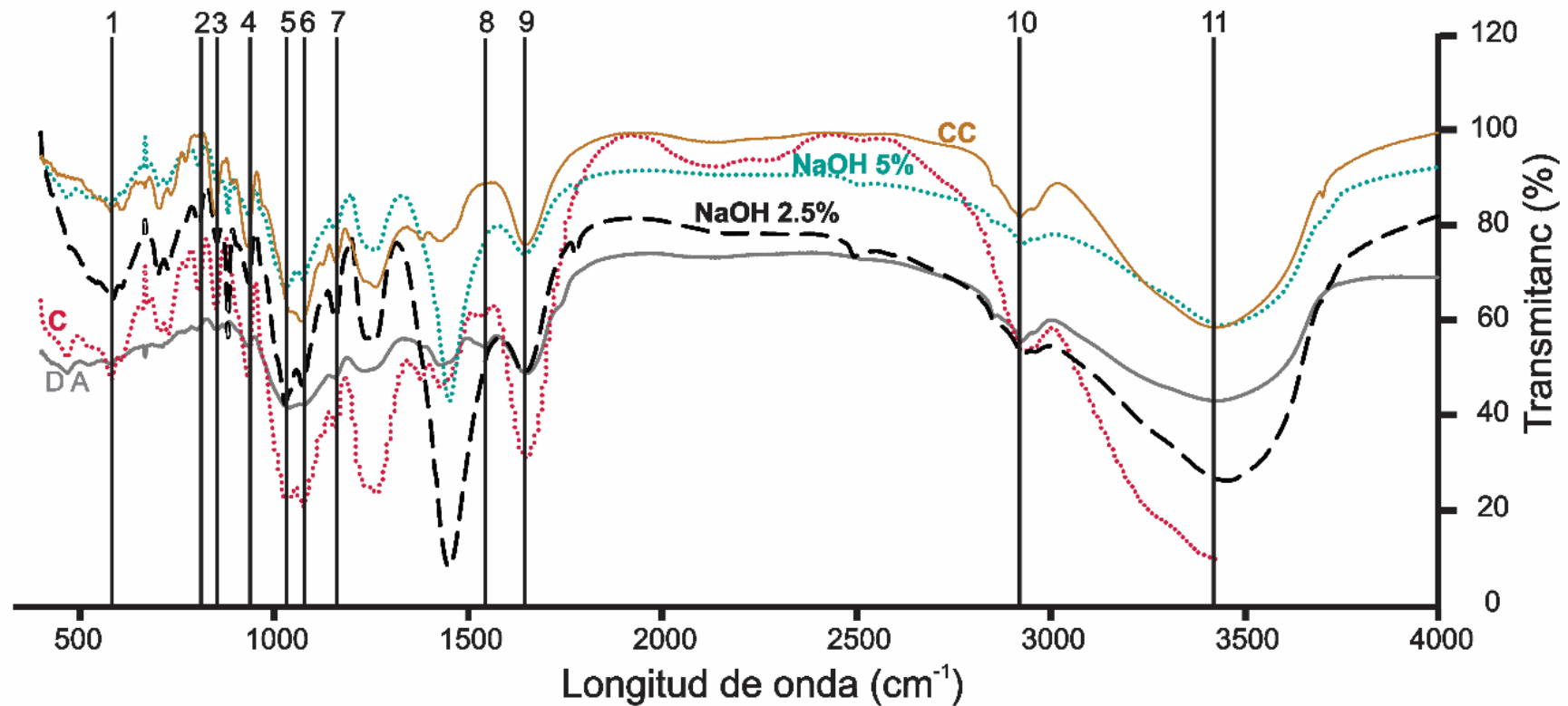
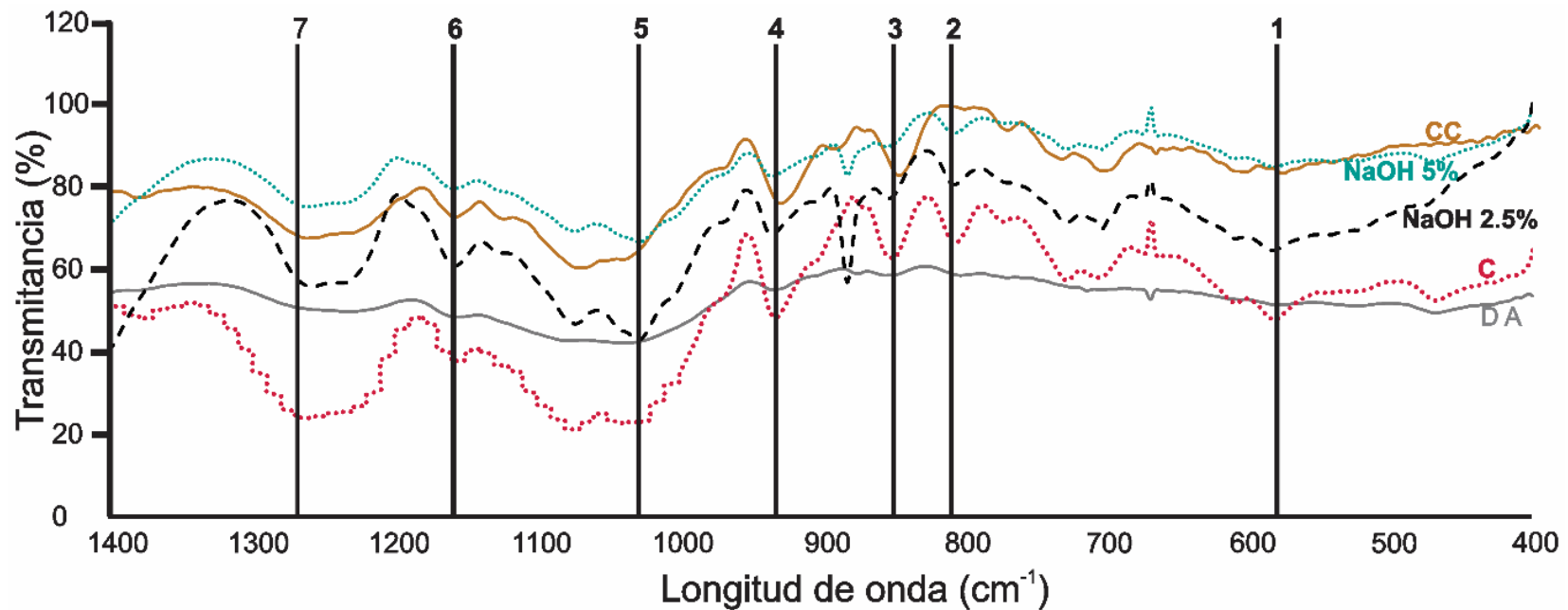


Figura 94. Espectros completos FT-IR de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  de algas secas y polisacáridos extraídos de *M. obtusangula*, en diferentes condiciones de extracción, muestra comercial de carragenina y alga seca. Las líneas verticales denotan bandas características (Tabla 7.6 Tratamientos realizados para extracción de Carragenanos: Control (C), NaOH 2,5 %, NaOH 5 %, carragenano del tipo comercial (CC), DA: alga seca.



**Figura 95. Espectro FT-IR en detalle (400-1400 cm<sup>-1</sup>) denotando picos característicos de los carragenanos de *M. obtusangula* como de la muestra del tipo comercial.** Las líneas verticales denotan bandas características (Tabla 7.6). C: carragenano extraído en tratamiento control. NaOH 2, 5 %: carragenano extraído en el tratamiento con hidróxido de sodio al 2, 5 %. NaOH 5 %: carragenano extraído en el tratamiento con hidróxido de sodio al 5 %. CC: carragenano del tipo comercial. DA: alga seca.

## 5. Discusión

La pared de las algas rojas tiene una capa interna compuesta por microfibrillas de celulosa y una externa formada por una matriz de incrustación amorfa que, en el caso de estas algas, muestra la presencia de xilanos y varios galactanos sulfatados, incluidos el agar y el carragenina (Rodríguez *et al.* 2009, Murphy *et al.* 2009, Pereira *et al.* 2015, Hughes *et al.* 2018). La presencia de este tipo de compuestos puede ser responsable de la flexibilidad de los talos, dándoles un aspecto generalmente gomoso y plegable (Lee 2008).

En el caso de *M. obtusangula*, se observó la presencia de una capa de celulosa, así como la presencia de enlaces de tipo éster con grupos sulfato especialmente en la pared externa de las células de la zona cortical. Además, el análisis elemental (EDX) de la pared celular mostró una mayor concentración de azufre en relación con el carbono y el oxígeno. Como se ha señalado, los porcentajes de azufre pueden interpretarse como correlativos a la presencia de carragenina en el talo (Pereira *et al.* 2007), y corroborar la presencia de este polisacárido sulfatado de los extractos de *M. obtusangula*. Además, la concentración de carbono y oxígeno pueden estar relacionados con los enlaces glucosídicos observados en los resultados que mostraron el IR en las algas secas. Estudios realizados en otras carragenófitas han mostrado similitudes en la composición de sus paredes celulares (McCandless *et al.* 1977, Pereira *et al.* 2007, Hughes *et al.* 2018).

La caracterización de los ficocoloides presentes en la pared celular de *M. obtusangula*, evidenciaron pertenecer al grupo de polisacáridos sulfatados del tipo i-carragenanos similar al producto comercial analizado, lo que permite

señalar a esta alga como un potencial recurso. Los valores de los rendimientos obtenidos para *M. obtusangula* para todos los tratamientos fueron similares a los reportados por Vázquez-Delfín *et al.* (2014) para otras especies de la familia de las Cystocloniaceae. Sin embargo, en contraste con dichos autores, el extracto realizado con el tratamiento alcalino mostró un rendimiento mayor que el control. Asimismo, en otros estudios se ha informado la presencia de polisacáridos sulfatados del tipo de las carrageninas para esta familia (Chiovitti *et al.* 1998, Reani *et al.* 1998, Vázquez-Delfín *et al.* 2014).

El uso de la espectroscopía infrarroja en estudios previos ha demostrado ser una herramienta no destructiva, que permite identificar grupos funcionales para el análisis de polisacáridos sulfatados de algas rojas, así como la comparación de biopolímeros obtenidos por diferentes métodos de extracción (Azevedo *et al.* 2015, Croce *et al.* 2015, Kravchenko *et al.* 2018, 2020, Hughes 2018). Todos los extractos realizados mostraron bandas características del tipo carragenina, indicando similitud con la carragenina del tipo comercial analizada en este estudio. Sumado a ello, presento grupos  $\text{SO}_4$  en el C4 de la subunidad D-galactosa (banda  $850\text{ cm}^{-1}$ ) y en C2 de la subunidad 3,6-anhidrogalactosa (banda  $805\text{ cm}^{-1}$ ), característico de los  $\kappa$ -carragenina (Mshigeni *et al.* 1979, Deslandes *et al.* 1985, Vázquez-Delfín *et al.* 2014, Kravchenko *et al.* 2018, 2020). La presencia de residuos de 3,6-anhidrogalactosa fue evidenciada a través de las bandas de  $932\text{-}934\text{ cm}^{-1}$  registradas en todas las muestras, coincidiendo al mismo tiempo con la banda de  $930\text{ cm}^{-1}$ , de la muestra de la carragenina comercial. Igualmente, se sugiere un contenido muy alto de sulfatos debido a la presencia de bandas a  $1260\text{ cm}^{-1}$  y en la región  $800\text{-}930\text{ cm}^{-1}$  que fueron observadas en todos los espectros coincidentemente con lo señalado para otras

especies de algas rojas (Villaseñor-Parada & Neill 2011, Hughes *et al.* 2018, Lim *et al.* 2018).

Por otra parte, las propiedades viscoelásticas de los geles mostraron valores similares a los analizados en otras especies de algas rojas (Lai & Lii 1998, Şen & Erboz 2010). Los valores  $G'$  más altos que  $G''$  de los geles denotan un comportamiento típico viscoelástico, como se ha observado en otros tipos de carragenina analizadas (Brenner *et al.* 2014, Qiao *et al.* 2016). A lo largo de los años se han realizado estudios reológicos en especies como *K. alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* (N. L. Burman) Collins & Hervey, *S. crispata*, *M. laminarioides* y otras (Van de Velde 2008, Hughes *et al.* 2018, Bui *et al.* 2019), para contrastar la calidad de los extractos al compararlos con productos de calidad comercial. En *M. obtusangula*, el comportamiento reológico del polisacárido sulfatado se comparó con el de carrageninas comerciales, un polisacárido gelificante muy utilizado por la industria alimenticia.

Este es el primer aporte de la caracterización de los polisacáridos sulfatados presentes en las paredes celulares de *M. obtusangula* los cuales presentaron similitudes favorables con los productos comerciales, potenciándola como un recurso natural de gran valor.



## Conclusiones

Esta tesis es el primer estudio integral de una población de *Meridionella obtusangula*, localizada en el Golfo San Matías, Argentina. Contempla aspectos taxonómicos, biológicos y ecológicos de la especie, ciclo de vida, fenología, dinámica poblacional y de la comunidad macroalgal acompañante, así como sus interacciones bióticas con organismos epífitos y endófitos y su potencial como especie generadora de polisacáridos sulfatados.

- Los estudios a nivel filogenético y morfológico permitieron confirmar la identidad de esta macroalga perteneciente a la División Rhodophyta, género *Meridionella* Tonicelli, M.E. Croce & Hommersand *nov. gen.* y especie *Meridionella obtusangula* (J.D. Hooker & Harvey) Tonicelli, M.E. Croce & Hommersand *nov. comb.*

Se confirma la distribución de *M. obtusangula* desde Cabo de Hornos, Patagonia Atlántica (Argentina), Magallanes (Chile) hasta las Islas Malvinas, sobre la base de las comparaciones moleculares entre diferentes ejemplares.

Asimismo, los análisis filogenéticos realizados con los marcadores *rbcL* y *18S* conjunto con los análisis de divergencia de secuencias sugieren que los ejemplares pertenecientes a *M. obtusangula* y *M. antártica* Hommersand, geográficamente separados, representan dos especies crípticas.

- El ciclo de vida de *M. obtusangula* es triplobionte-haplodiplonte con gametofitos y tetrasporofitos isomórficos, con reproducción sexual y vegetativa.

Vegetativamente se generaron nuevos individuos a partir de estolones en talos gametofíticos y tetrasporofíticos. En estos últimos se observó también la presencia de polisporangios indicando reproducción por apomeiosis.

La liberación de esporas y el crecimiento de los talos fueron óptimos en medio de enriquecimiento Von Stosch en concentraciones entre 32-40 ml.l<sup>-1</sup>.

Se evidenció una mejor supervivencia de los talos a 8°C mientras que el crecimiento fue favorecido por temperaturas más elevadas (16-24°C), indicando que es un factor a tener en cuenta en los cultivos a la hora de mantener cepas en *stock* o propiciar un crecimiento rápido.

- La fenología y ecología de la población natural de *M. obtusangula* determinó que la misma presenta una dinámica estacional con la particularidad de la coexistencia de las diferentes fases en estado reproductivo y vegetativo, a lo largo de las estaciones de otoño, invierno y primavera. La abundancia y el tamaño de los talos se vio asociado a los factores abióticos temperatura del agua de mar, fotoperiodo e intensidades del viento, indicando que la dinámica poblacional está sujeta a cambios en el ambiente.
- Un ensamble de macroalgas rojas, verdes y pardas estuvo asociado en otoño, invierno y primavera a la población de *M. obtusangula* formado por *Ahnfeltia* sp., *Antithamnion* sp., *Ceramium* sp., *Corallina* sp., *Gelidium* sp., *Heterosiphonia* sp., *Polysiphonia* sp., *Dictyota* sp., *Lomentaria* sp., *Scytosiphon* sp., *Codium* sp., *Ulva* sp., *Punctaria* sp., *Antithamnionella* sp., *Ectocarpus* sp. y *Undaria pinnatifida*.
- La comunidad de epífitos sobre los talos de *M. obtusangula*, estuvo representada por 26 taxones pertenecientes a Bacillariophyta, Rhodophyta, Ochrophyta Chlorophyta y Cyanobacteria. La abundancia total de epífitos fue aportada en más del 95% por Bacillariophyta. Los epífitos evidenciaron una estacionalidad en asociación a los parámetros ambientales, indicando que la dinámica de los mismos está sujeta a los disturbios ambientales del momento.

La carga epifitaria estuvo asociada al tamaño de los talos, a mayor tamaño, mayor cantidad de epífitos. También se registró en la carga una marcada diferencia entre talos reproductivos y vegetativos, datos de interés a la hora de contemplar su posible uso directo o su cultivo.

Asimismo, ésta presentó una distribución desigual a lo largo del talo, mientras que en la región apical de los mismos hubo gran abundancia de diatomeas, en las regiones media y basal se registraron macroalgas filamentosas pertenecientes a Rhodophyta, Chlorophyta y Ochrophyta.

- Talos de *M. obtusangula* colectados en la naturaleza, así como obtenidos en cultivo presentaron agallas producto de alteraciones del tejido medular por hipertrofia e hiperplasia.

La prevalencia de talos con agallas en el ambiente natural evidenció una marcada diferencia estacional, presentando un mínimo hacia el invierno y un máximo en primavera.

Se evidenció una posible estrategia de supervivencia en talos con agallas en cultivo, donde las ramas portadoras de las mismas se observaron senescentes, mientras que desde la propia agalla se generaron nuevas ramas vigorosas.

- Las paredes celulares de *M. obtusangula* presentaron un polisacárido sulfatado del grupo de los ι-carragenanos como componente. El rendimiento de extracción del mismo fue elevado, así como su calidad, la que alcanzó características comerciales, pudiéndose considerar a esta especie un recurso algal promisorio para nuestro país.

## Bibliografía

- Adam MS, Hifney AF & Al-Badaani AA (2017) Seasonal biodiversity and ecological studies on the epiphytic microalgae communities in polluted and unpolluted aquatic ecosystem at Assiut, Egypt. *Eur. J. Ecol.* 3: 92-106.
- Adharini RI & Kim HG (2016) Growth of gametophytes and sporophytes of *Grateloupia subpectinata* (Rhodophyta) in culture. *Ocean. Sci.* 51: 477-483.
- Aguilar-Rosas R, Aguilar-Rosas LE & Ávila-Serrano G (2006) Nuevos registros de *Stylonema alsidii* (Zanardini) Drew y *S. cornu-cervi* Reinsch (Porphyridiales, Rhodophyta) para la costa del Pacífico Mexicano. *Polibotánica*, 22: 51-62.
- Aguilar-Rosas R & Aguilar-Rosas LE (2010) Presencia simultánea de las fases tetrasporangial y carposporangial sobre el mismo talo en *Polysiphonia scopulorum* var. *villum* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Rev. Mex. Biodivers.* 81: 187-189.
- Aguilar-Rosas R & Galindo AM (1990) Ecological aspects of *Sargassum muticum* (Fucales, Phaeophyta) in Baja California, Mexico: reproductive phenology and epiphytes. *Hydrobiologia*, 204: 185-190.
- Ajjabi LC, Abaab M & Segni R (2018) The red macroalga *Gracilaria verrucosa* in co-culture with the Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis*: productivity and nutrient removal performance. *Aquac. Int.* 26: 253-266.
- Akatsuka I (1990) *Introduction to applied phycology*. SPB Academic Publishing, The Netherlands. pp. 683.
- Albis-Salas MR & Gavio B (2011) Notes on marine algae in the International Biosphere Reserve Seaflower, Caribbean Colombian I: new records of macroalgal epiphytes on the seagrass *Thalassia testudinum*. *Bot. Mar.* 54: 537-543.
- Alveal K, Romo H & Werlinger C (1995) Cultivo de *Gracilaria* a partir de esporas. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC & Sar E (Eds.) *Manual de Métodos Ficológicos*, Universidad de Concepción, Concepción, pp 599-609.
- Amsler C.D. *Algal Chemical Ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg. Pp 313.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral. Ecol.* 26: 32-46.
- Andersen RA (2005) *Algal culturing technics*. Elsevier Academic Press, Burlington. pp. 578.
- Apt KE (1988) Galls and tumor-like growths on marine macroalgae. *Dis. Aquat. Org.* 4: 211-217.
- Apt KE & Gibor A (1991) The ultrastructure of galls on the red alga *Gracilaria epihippisor*a. *J. Phycol.* 27: 409-413.

- Arata PX, Quintana I, Raffo MP & Ciancia M (2016) Novel sulfated xylogalactoarabinans from green seaweed *Cladophora falklandica*: Chemical structure and action on the fibrin network. *Carbohydr. Polym.* 154: 139-150.
- Araújo PG, Schmidt EC, Kreusch MG, Kano CH, Guimarães SM, Bouzon ZL & Yokoya NS (2014) Ultrastructural, morphological, and molecular characterization of *Colaconema infestans* (Colaconematales, Rhodophyta) and its host *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) cultivated in the Brazilian tropical region. *J. Appl. Phycol.* 26: 1953-1961.
- Arbaiza S, Gil-Kodaka P, Arakaki N & Alveal K (2019) Primeros estadios de cultivo a partir de carpósporas de *Chondracanthus chamissoi* de tres localidades de la costa peruana. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 54: 204-213.
- Ardito S & Gómez S (2005) Patrón fenológico de una población de *Gelidium serrulatum* J. Agardh (Rhodophyta, Gelidiales) en la localidad de Taguao, Estado Vargas, Venezuela. *Acta. Bot. Venez.* 28: 101-112.
- Armiñana JR & Breijo FG (2006) Técnicas de histología vegetal. Valencia, España, Jardín Botánico de Valencia 16.
- Arrontes J (1990) Composition, distribution on host and seasonality of epiphytes on three intertidal algae. *Bot. Mar.* 33: 205-211.
- Asensi AO (1966) *Guía para reconocer los géneros de algas pardas de la Argentina*. Instituto Antártico Argentino. Pp 51.
- Asensi AO (1971) Un orden de algas pardas nuevo para la Argentina (Cutleriales). *Darwiniana*, 435-442.
- Asensi A (1981) Programas de investigación sobre el recurso de las algas marinas bentónicas del litoral patagónico. Unesco, Paris, 20 pp.
- Ashen JB, Cohen JD & Goff LJ (1999) GC-SIM-MS detection and quantification of free indole-3-acetic acid in bacterial galls on the marine alga *Prionitis lanceolata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 35: 493-500.
- Ashen JB & Goff LJ (1996) Molecular identification of a bacterium associated with gall formation in the marine red alga *Prionitis lanceolata*. *J. Phycol.* 32: 286-297.
- Ashen JB & Goff LJ (1998) Galls on the marine red alga *Prionitis lanceolata* (Halymeniaceae): specific induction and subsequent development of an algal-bacterial symbiosis. *Am. J. Bot.* 85: 1710-1721.
- Avila M, Ask E, Rudolph B, Nuñez M & Norambuena R (1999a) Economic feasibility of *Sarcothalia* (Gigartinales, Rhodophyta) cultivation. *Hydrobiologia*, 398/399: 435-442.
- Avila M, Candía A, Núñez M & Romo H (1999b) Reproductive biology of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodophyta) from Chile. *Hydrobiologia*, 398/399: 149-157.
- Avila M, Godoy C & Rodríguez D (2012) Manual para la repoblación de algas: desde la extracción hacia la agronomía marina. Resultados y lecciones. Serie Programa

Educativo Participativo para la Pesca Artesanal. I La repoblación de lugas. Universidad Arturo Prat. pp 70.

- Avila M, Núñez M, Candia A & Norambuena R (1997) Patrones fenológicos reproductivos de una población de *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodophyta), en Ancud, Chile. *Gayana. Oceanol.* 5: 21-32.
- Avila M, Piel MI, Caceres JH, Alveal K (2011) Cultivation of the red alga *Chondracanthus chamissoi*: sexual reproduction and seedling production in culture under controlled conditions. *J. Appl. Phycol.* 23: 529-536.
- Azevedo G, Domingues B, Abreu H, Sousa-Pinto I, Feio G & Hilliou L (2015). Impact of cultivation of *Mastocarpus stellatus* in IMTA on the seaweeds chemistry and hybrid carrageenan properties. *Carbohydr. Polym.* 116: 140-148.
- Ballantine WJ (1961) *A biologically-defined exposure scale for the comparative description of rocky shores*. London: Field Studies Council, pp. 1-19.
- Ballantine DL (1979) The distribution of algal epiphytes on macrophyte hosts offshore from La Parguera, Puerto Rico. *Bot. Mar.* 22: 107-111.
- Barner AK, Coblenz KE, Hacker SD & Menge BA (2018) Fundamental contradictions among observational and experimental estimates of non-trophic species interactions. *Ecology*, 99: 557-566.
- Barsanti L & Gualtieri P (2006) *Algae. anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 251-291.
- Barufi JB, Figueroa FL & Plastino EM (2015) Effects of light quality on reproduction, growth and pigment content of *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta: Gracilariales). *Sci. Mar.* 79: 15-24.
- Bast F, Bhushan S & John AA (2014) Morphological and molecular assessment of native carrageenophyte *Hypnea valentiae* (Cystocloniaceae, Gigartinales) in Indian Subcontinent. *Phykos.* 44: 52-58.
- Bates D, Maechler M, Bolker B & Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4, *J. Stat. Softw.* 67 1–48, <http://dx.doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Baweja P, Kumar S & Kumar G (2019) Organic fertilizer from algae: a novel approach towards sustainable agriculture. En: Giri B, Prasad R, Wu QS & Varma A (Eds.), *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment*. Springer Nature, pp. 353-370.
- Becerra TMB (2016) Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge. *Naturalia*, 98.
- Becherucci ME & Benavides H (2016) Composición florística de arribazones de algas marinas en playas del sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Iheringia Ser Bot.* 71: 1-5.
- Begon M, Harper JL & Townsend CR (1999) *Ecología: individuos, poblaciones y comunidades* (Nº. 04; QH541, B43y 1999.). Barcelona: Omega.

- Bellgrove A, Van Rooyen A, Weeks AR, Clark JS, Doblin MA & Miller AD (2017) New resource for population genetics studies on the Australasian intertidal brown alga, *Hormosira banksii*: isolation and characterization of 15 polymorphic microsatellite loci through next generation DNA sequencing. *J. Appl. Phycol.* 29: 1721-1727.
- Bermudes D, Chase D & Margulis L (1988) Morphology as a basis for taxonomy of large spirochetes symbiotic in wood-eating cockroaches and termites. *Int. J. Syst. Bot.* 38: 291-302.
- Berkowitz LR, Fiorello O & Maxwell DS (1968). Selective staining of nervous tissue for light microscopy preparation for electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 16: 808.
- Beutlich A, Borstelmann B, Reddemann R, Speckenbach K & Chnetter SR (1990) Notes on the life histories of *Boergesenia* and *Valonia* (Siphonocladales, Chlorophyta). *Hydrobiologia*, 2041205: 425-434.
- Billard E, Reyes J, Mansilla A, Faugeron S & Guillemin ML (2015) Deep genetic divergence between austral populations of the red alga *Gigartina skottsbergii* reveals a cryptic species endemic to the Antarctic continent. *Polar. Biol.* 38: 2021-2034.
- Bixler HJ, Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J. Appl. Phycol.* 23: 321-335.
- Bjærke MR & Rueness J (2004) Effects of temperature and salinity on growth, reproduction and survival in the introduced red alga *Heterosiphonia japonica* (Ceramiales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 47: 373–380
- Blake C, Thiel M, López BA & Fraser CI (2017) Gall-forming protistan parasites infect southern bull kelp across the Southern Ocean, with prevalence increasing to the south. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 583: 95-106.
- Bobadilla M & Santelices B (2005) Variations in the dispersal curves of macroalgal propagules from a source. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 327: 47-57.
- Bodenbender S & Schnetter R (1990) Nuclear behaviour during the life cycles of *Chaetomorpha*, *Ernodesmis* and *Struvea* (Ulvophyceae, Chlorophyta) under culture conditions. *Cryptogam. Bot.* 340-154.
- 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.
- Boraso AL (2013) *Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina*. Comodoro Rivadavia: Universidad de la Patagonia. Pp. 214.
- Boraso de Zaixso AL, Ciancia M, Cerezo AS, Piriz ML, Casas GN, Eyra MC (2015) Utilización de las macroalgas marinas de la costa argentina y sus hidrocoloides. En: Zaixso HE, Boraso A (eds). La zona costera patagónica argentina, volumen 1: Recursos biológicos bentónicos. Pp 3-60.
- Boraso de Zaixso AL (1996) Asociaciones de macroalgas intermareales en el Golfo San José (Provincia del Chubut, Argentina). *Nat. Patagón. Ser. Cienc. Biol.* 4: 47-64.

- Boraso de Zaixso A, Ciancia M & Cerezo AS (1998) The seaweed resources of Argentina. En: Critchley AT, Ohno M (Eds.) *Seaweed resources of the world*. JICA, Yokosuka, pp 372-384.
- Boraso de Zaixso AL, Ciancia M Cerezo AS, Piriz ML, Casas GN & Eyra MC (2015) Utilización de las macroalgas marinas de la costa argentina y sus hidrocoloides. En: Zaixso HE, Boraso A (Eds.). *La zona costera patagónica argentina, volumen 1: Recursos biológicos bentónicos*, EDUPA. Pp 3-60
- Borowitzka MA & Lethbridge RC (1989) Seagrasses epiphytes. En: Larkum AWD, Mc Comb AJ, Shepherd SA (Eds.) *Biology of Seagrasses*. *Aquatic Plant Studies* 2, Elsevier, Amsterdam. pp. 458-499.
- Bray JR & Curtis JT. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27: 325-349.
- Brenner T, Tuvikene R, Parker A, Matsukawa S & Nishinari K. (2014) Rheology and structure of mixed kappa-carrageenan/iota-carrageenan gels. *Food. Hydrocoll.* 39: 272-279.
- Breznak JA (1984) Biochemical aspects of symbiosis between termites and their intestinal microbiota. En Andersen JM (Ed.) *Invertebrate-Microbial Interactions*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 173-204.
- Bruno JF, Petes LE, Drew Harvell C & Hettinger A (2003) Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecol. Lett.* 6: 1056-1061.
- Bui VT, Nguyen BT, Renou F & Nicolai T (2019) Structure and rheological properties of carrageenans extracted from different red algae species cultivated in Cam Ranh Bay, Vietnam. *J. Appl. Phycol.* 31: 1947-1953.
- Bulboa CR & Macchiavello JE (2001) The effects of light and temperature on different phases of the life cycle in the carrageenan producing alga *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot. Mar.* 44: 371-4
- Buschmann AH, Correa JA, Westermeier R, Paredes MA, Aedo D, Potin P, Aroca G & HernándezGonzález MC (2001) Cultivation of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta): recent advances and challenges for the future. *J. Appl. Phycol.* 13: 255-266.
- Buschmann AH, Stead RA, Hernández-González MC, Pereda SV, Paredes JE & Maldonado MA (2013) Un análisis crítico sobre el uso de macroalgas como base para una acuicultura sustentable. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 86: 251-264.
- Buschmann AH, Camus C, Infante J, Neori A, Israel A, Hernández-González MC, Pereda SV, Gomez-Pinchetti JL, Golberg A, Tadmor-Shalev N & Critchley AT (2017) Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. *Eur. J. Phycol.* 52: 391-406.
- Bustamante RH & Branch GM (1996) The dependence of intertidal consumers on kelp-derived organic matter on the west coast of South Africa. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 196: 1-28.
- 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.

- Caires TA, Costa IO, De Matos MRB, De Matos Lyra G & De Castro Nunes JM (2013) Phenological studies in populations of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta: Gigartinales) in a tropical region of Brazil. *Rev. Bras. Bot.* 36: 135-140.
- Campo VL, Kawano DF, da Silva DB Jr & Carvalho I (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydr. Polym.* 77: 167-180
- Cantacuzène A (1930) Contribution à l'étude des tumeurs bactériennes chez les algues marines par Alexandre Cantacuzène Masson.
- Cappelatti L, Mauffrey AR & Griffin JN (2019) Applying continuous functional traits to large brown macroalgae: variation across tidal emersion and wave exposure gradients. *Mar. Biol.* 166: 1-12.
- Car A, Witkowski A, Dobosz S, Burfeind DD, Meinesz A, Jasprica N & Płociński T (2012) Description of a new marine diatom, *Cocconeis caulerpacola* sp. nov. (Bacillariophyceae), epiphytic on invasive *Caulerpa* species. *Eur. J. Phycol.* 47: 433-448.
- Cardoso SM, Carvalho LG, Silva PJ, Rodrigues MS, Pereira OR & Pereira L (2014) Bioproducts from seaweeds: A review with special focus on the Iberian Peninsula. *Curr. Org. Chem* 18: 896-917.
- 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.
- Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, Nosedá MD, Matulewicz MC, Damonte EB & Cerezo AS (1997) Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 20: 97-105.
- Carrington E, Grace, SP & Chopin T (2001) Life history phases and the biomechanical properties of the red alga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 37: 699-704.
- Casas GN & Piriz ML (1993) Cultivo de *Gracilaria verrucosa* en Golfo Nuevo (Argentina). Experiencias preliminares. III Congreso Latinoamericano, 1ra Reunión Iberoamericana y I Congreso Mexicano de Ficología. México DF, pp 107.
- Casas GN & Piriz ML (1998) *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) en Golfo Nuevo, Argentina. *Naturalia*, 6: 51-69.
- Castro JPLD, Costa LEC, Pinheiro MP, Francisco TDS, Vasconcelos PHMD, Funari LM & Freitas ALP (2018) Polysaccharides of red alga *Gracilaria intermedia*: structure, antioxidant activity and rheological behavior. *Polímeros*, 28: 178-186.
- Cattaneo A & Kalff J (1980) The relative contribution of aquatic macrophytes and their epiphytes to the production of macrophyte beds. *Limnol. Oceanogr.* 25: 280-289.
- Chapman ARO (1980) Methods for macroscopic marine algae. En: Stein JR (Ed.) *Handbook of phycological methods, culture methods y growth measurements*, Cambridge University Press, Cambridge. pp. 472.

- Charrier B, Abreu MH, Araujo R, Bruhn A, Coates JC, De Clerck O & Wichard T (2017) Furthering knowledge of seaweed growth and development to facilitate sustainable aquaculture. *New. Phytol.* 216: 967-975.
- Chen LC & McLachlan J (1972) The life history of *Chondrus crispus* in culture. *Can. J. Bot.* 50: 1055-1060.
- Chemin E (1937) Le développement des spores chez les Rhodophycées. *Rev. Gen. Bot.* 49: 424-4.
- Chiovitti A, Kraft GT, Bacic A, Craik DJ, Munro SL & Liao ML (1998) Carrageenans from Australian representatives of the family Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta), with description of *Calliblepharis celatospora* sp. nov., and transfer of *Austroclonium* to the family Areschougiaceae. *J. Phycol.* 34: 515-535.
- Cho TO, Fredericq S & Yates KK (2002) Characterization of macroalgal epiphytes on *Thalassia testudinum* in Tampa Bay, Florida. *J. Phycol.* 38: 4-4.
- Chojnacka K, Saeid A, Witkowska Z & Tuhy L (2012) Biologically active compounds in seaweed extracts-the prospects for the application. En The Open Conference Proceedings Journal, 3: 20-28.
- Church AH (1919) Historical review of the Floridae. *J. Bot. Lond.* 57: 297-304; 329-334.
- Ciancia M, Matulewicz MC, Finch P & Cerezo AS (1993) Determination of the structures of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 238: 241-248.
- Ciancia M, Matulewicz MC & Cerezo AS (1997) A L-galactose-containing carrageenan from cystocarpic *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry*, 45: 1009-1013.
- Clarke KR & Warwick RM (2001) A further biodiversity index applicable to species lists: variation in taxonomic distinctness. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216: 265-278.
- Correa JA, Nielsen R & Grund DW (1988) Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). II. *Acrochaete heteroclada* sp. nov., *A. operculata* sp. nov., and *Phaeophila dendroides* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 24: 528-539.
- Correa JA, Flores V & Sánchez P (1993) Deformative disease in *Iridaea laminarioides* (Rhodophyta): gall development associated with an endophytic cyanobacterium. *J. Phycol.* 29: 853-860.
- Craigie J S & Leigh C (1978) Carrageenans and agars. En Hellebust JA & Craigie JS (Eds.) *Handbook of Phycological Methods, Physiological and Biochemical Methods*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 109-131.
- Croce ME (2013) Bioecología de la comunidad de macroalgas bentónicas de los arrecifes de ostras en bahía Anegada (Buenos Aires): potencialidades de explotación y cultivo algal. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 268.
- Croce ME, Villar MA & Parodi ER (2015) Assessment of alternative sources of seaweed polysaccharides in Argentina: potentials of the agarophyte *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Gaillon (Rhodophyta, Gelidiales). *J. Appl. Phycol.* 27: 2099-2110.

(<https://cvalues.science.kew.org/>)

- D'Ambrogio de Argueso (1986) *Manual de técnicas en histología vegetal*. Buenos Aires, Hemisferio Sur, pp. 43-57.
- D'Antonio C (1985) Epiphytes on the rocky intertidal red alga *Rhodomela Larix* (Turner) C. Agardh: negative effects on the host and food for herbivores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 86: 197-218.
- D'Archino R, Nelson W, Yang MY & Kim MS (2015) New record of *Hypnea flexicaulis* in New Zealand & description of *Calliblepharis psammophilus* sp. nov. *Bot. Mar.* 58: 485-97.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D (2012) jmodelTest 2: more models, new heuristic and parallel computing. *Nat. Methods.* 9: 772.
- Davison IR & Pearson GA (1996) Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J. Phycol.* 32: 197-211.
- Dayton PK (1975) Experimental evaluation of ecological dominance in a rocky intertidal algal community. *Ecol. Monogr.* 45: 137-159.
- De Halperin DR (1967) Cianofíceas marinas de Puerto Deseado (Provincia de Santa Cruz, Argentina) II. *Darwiniana*, 273-354.
- Delaney A, Frangoudes K & Li SA (2016) Society and seaweed: Understanding the past and present. En: Fleurence J & Levine I (Eds.) *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier Academic Press, London. pp 7-40.
- Delattre C, Fenoradosa TA & Michaud P (2011) Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54: 1075-1092.
- Dellarossa V, Romo H & Alveal K (1980) Avances en el conocimiento ecologico de *Gracilaria verrucosa* en el area de Concepcion, Chile. *B. Inst. Ocean. São Paulo*, 29: 149-155.
- Deslandes E, Floc'h JY, Bodeau-Bellion C, Brault D & Braud JP (1985) Evidence for i-carrageenans in *Solieria chordalis* (Solieriaceae) and *Calliblepharis jubata*, *Calliblepharis ciliata*, *Cystoclonium purpureum* (Rhodophyllidaceae). *Bot. Mar.* 28: 317-318.
- Destombe C, Godin J, Nocher M, Richerd S & Valero M (1993) Differences in response between haploid and diploid isomorphic phases of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta: Gigartinales) exposed to artificial environmental conditions. *Hydrobiologia*, 260: 131-137.
- Díaz-Tapia P, Boo SM, Geraldino P, Maneiro I, Bárbara I & Hommersand MH (2013) Morphology and systematics of *Calliblepharis hypneoides*, sp. nov. (Cystocloniaceae, Rhodophyta) from the Atlantic Iberian Peninsula. *Eur. J. Phycol.* 48: 380-397.
- Díaz P, Gappa JL & Piriz ML (2002) Symptoms of eutrophication in intertidal macroalgal assemblages of Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Bot. Mar.* 45: 267-273.
- Díaz-Tapia P, Maggs CA, Macaya EC & Verbruggen H (2018) Widely distributed red algae often represent hidden introductions, complexes of cryptic species or species with strong phylogeographic structure. *J. Phycol.*, 54:829–39.

- Díaz-Tapia P, Pasella MM, Verbruggen H & Maggs CA (2019) Morphological evolution and classification of the red algal order Ceramiales inferred using plastid phylogenomics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 137: 76-85.
- Dillehay TD, Ramirez C, Pino M, Collins MB, Rossen J & Pino-Navarro JD (2008) Monte Verde: Seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. *Science*, 320: 784-786.
- Dixon PS (1977) *Biology of the Rhodophyta*. Otto Koeltz Science Publishers, Germany. pp. 284.
- Dixon J, Schroeter SC & Kastendiek J (1981) Effects of the encrusting bryozoan, *Membranipora membranacea*, on the loss of blades and fronds by the giant kelp, *Macrocystis pyrifera* (Laminariales). *J. Phycol.* 17: 341-345.
- Dougherty PM, Whitehead D & Vose JM (1994). Environmental influences on the phenology of pines. *Ecol. Bull.* 43: 64-75.
- Ducker SC, Foord NJ & Knox RB (1977) Biology of Australian seagrasses: the genus *Amphibolis* C. Agardh (Cymodoceaceae). *Aust. J. Bot.* 25: 67-95.
- Duggins DO & Eckman JE (1994) The role of kelp detritus in the growth of benthic suspension feeders in an understory kelp forest. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 176: 53-68.
- Dyck LJ & De Wreede RE (1995) Patterns of seasonal demographic change in the alternate isomorphic stages of *Mazzaella splendens* (Gigartinales, Rhodophyta). *Phycologia*, 34: 390-395.
- Edding M, Macchiavello J & Black H (1987) Culture of *Gracilaria* sp. in outdoor tanks: productivity. En *Twelfth International Seaweed Symposium. Developments in Hydrobiology*, vol 41. Springer, Dordrecht. pp. 369-373.
- Elatouani S, Belattmania Z, Kaidi S, Engelen A, Serrao E, Chaouti A & Sabour B (2021) Spatio temporal patterns of phenology of the alien Phaeophyceae *Sargassum muticum* on the Atlantic coast of Morocco. *Sci. Mar.* 85: 103-111.
- Espinoza-Avalos J (2005) Fenología de macroalgas marinas. *Hidrobiológica*, 15:109-122.
- Espinosa CI (2016) Análisis multivariado de la composición de la comunidad. <https://ciespinosa.github.io/AnalisisMultivariante/analisis-multivariado-de-la-composicion-de-la-comunidad.html>.
- Falkowski P & Raven JA (1997) **Aquatic photosynthesis**. Blackwell, Oxford. pp. 375.
- FAO (2013) *Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming*. Roma. pp 204.
- FAO (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Roma. pp 190.
- Farahpour M, Abkenar AM & Notash GR (2010) Alga cultural survey on three species: *Sargassum ilicifolium*, *Hypnea musciformis* and *Cystoseira indica* in Chabahar seashore, Iran. *Iranian J. Medicinal. Aromat. Plants*, 26.

- Felicini GP & Perrone C (1972) Sulla formazione di galle nella rigenerazione di *Pterocladia capillacea* (Gmel.) Born. et Thur. in coltura. *Plant. Biosyst.* 106: 351-358.
- Ferreira LB, Barufi JB & Plastino EM (2006) Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory. *Rev. Bras. Bot.* 29: 187-192.
- Fletcher RL (1995) Epiphytism and fouling in *Gracilaria* cultivation: an overview. *J. Appl. Phycol.* 7: 325-333.
- Flores ML, Cerezo AS & Stortz CA (2000a) Alkali treatment of the polysaccharides from the cystocarpic stage from *Iridaea undulosa*. *Molecules*, 5: 541-542-
- Flores ML, Stortz CA & Cerezo AS (2000b) Studies on the skeletal cell wall of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* B. Part I. Fractionation of the cell wall and methylation analysis of the inner core-fibrillar polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 27: 21-27.
- Flores ML, Stortz CA, Rodríguez MC & Cerezo AS (1997) Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* Bory. *Bot. Mar.* 40: 411-419.
- Fragoso-Tejas D, Guzmán JM & Novelo E (1994) Técnicas de tincion modificadas para el estudio de algas coralinas no geniculadas (Rhodophyta). *Cienc. Mar.* 20: 487-510.
- Franklin LA & Forster RM (1997) The changing irradiance environment: consequences for marine macroalgal physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32: 207-32.
- Fraschetti S, Terlizzi A & Benedetti-Cecchi L (2005) Patterns of distribution of marine assemblages from rocky shores: evidence of relevant scales of variation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 296: 13-29.
- Fredericq S, Hommersand MH & Leister GL (1992) Morphology and systematics of *Acanthococcus antarcticus* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *Phycologia*, 31: 101-108.
- Fredericq S, Freshwater DW & Hommersand MH (1999) Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the Solieriaceae (Rhodophyta, Gigartinales) inferred from rbcL sequences and morphological evidence. *Hydrobiologia*, 389: 25-38.
- Freshwater DW & Rueness J (1994) Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on rbcL nucleotide sequence analysis. *Phycologia*, 33: 187-194.
- Fucks E, Schnack EJ & Charó M (2012) Aspectos geológicos y geomorfológicos del sector N del golfo San Matías, Río Negro, Argentina. *Rev. Soc. Geol. Esp.* 25.
- Fueyo Sanchez L (2008) *Redes tróficas y flujos de energía en comunidades de pozas de marea de Mar del Plata*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Luján, pp. 100.

- Garbary DJ, Bourque G, Herman TB & McNeil JA (2007) Epizoic algae from freshwater turtles in Nova Scotia. *J. Freshw. Ecol.* 22: 677-685.
- Garbary DJ, Deckert RJ & Hubbard CB (2005) *Ascophyllum* and its symbionts. VII. Three-way interactions among *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae), *Mycophycias ascophylli* (Ascomycetes) and *Vertebrata lanosa* (Rhodophyta). *Algae*, 20: 353-361.
- Gardner MW (1918) *Anthracoise of cucurbits* (No. 727). US Department of Agriculture.
- Gauna MC (2010) Bioecología y relaciones interespecíficas en poblaciones de dos algas pardas del Atlántico Occidental Sur y Norte: *Dictyota dichotoma* y *Ascophyllum nodosum*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 337.
- 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.
- 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 freecultures. *Algae*, 24: 249-256.
- Gauna MC, Parodi ER & Cáceres EJ (2009 b) Epiphytic relationships of *Pseudoclonium 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 acidioides* (Ectocarpales, Phaeophyceae) and *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) growing on Argentinian coasts. *J. Appl. Phycol.*, 21: 11-18.
- Geraldino PJL, Yang EC & Boo SM (2006) Morphology and molecular phylogeny of *Hypnea flexicaulis* (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, 21: 417.
- Geraldino PJL, Yang EC, Kim MS & Boo SM (2009) Systematics of *Hypnea asiatica* sp. nov. (Hypneaceae, Rhodophyta) based on morphology and nrDNA SSU, plastid rbcL, and mitochondrial cox1. *Taxon*, 58: 606-616.
- Gheda S, El-Sheekh M & Abou-Zeid A (2018) In vitro anticancer activity of polysaccharide extracted from red alga *Jania rubens* against breast and colon cancer cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 11: 583.

- Giacosa R (1997). Geología y petrología de las rocas precretácicas de la región de Sierra Pailemán, provincia de Río Negro. *Rev. Asoc. Geol. Arg.* 52: 65-80.
- Glenn M, Mathieson A, Grizzle R & Burdick D (2020) Seaweed communities in four subtidal habitats within the Great Bay estuary, New Hampshire: Oyster farm gear, oyster reef, eelgrass bed, and mudflat. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 524: 151-307.
- Glenn EP, Moore D, Fitzsimmons K & Azevedo C (1996) Spore culture of the edible red seaweed, *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta). *Aquaculture*, 142: 59-74.
- Goecke F, Wiese J, Nunez A, Labes A, Imhoff JF & Neuhauser S (2012) A novel phytomyxean parasite associated with galls on the bull-kelp *Durvillaea antarctica* (Chamisso) Hariot. *PLoS One*, 7(9): e45358.
- 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.
- Goff LJ, Moon DA, Nyvall P, Stache B, Mangin K & Zuccarello G (1996) The evolution of parasitism in the red algae: molecular comparisons of adelphoparasites and their hosts. *J. Phycol.* 32: 297-312.
- Goff LJ & Zuccarello G (1994) The evolution of parasitism in red algae: cellular interactions of adelphoparasites and their hosts. *J. Phycol.* 30: 695-720.
- González MA, Barrales HL, Candia A & Cid L (1993) Spatial and temporal distribution of dominant epiphytes on *Gracilaria* from a natural subtidal bed in central-southern Chile. *Aquaculture*, 116: 135-148.
- Gonzalez MA & Goff LJ (1989) The red algal epiphytes *Microcladia coulteri* and *M. californica* (Rhodophyceae, Ceramiaceae). II. Basiphyte specificity. *J. Phycol.* 25: 558-567.
- González J, Meneses I & Vasquez J (1997) Field studies in *Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützinger: seasonal and spatial variations in life-cycle phases. *Biol. Pesq.* 26:3-12.
- Gonzalez DJ, Smyth AR, Piehler MF & McGlathery KJ (2013) Mats of the nonnative macroalga, *Gracilaria vermiculophylla*, alter net denitrification rates and nutrient fluxes on intertidal mudflats. *Limnol. Oceanogr.* 58: 2101-2108.
- Guillemin ML, Dubrasquet H, Reyes J & Valero M (2018) Comparative phylogeography of six red algae along the Antarctic Peninsula: extreme genetic depletion linked to historical bottlenecks and recent expansion. *Polar. Biol.* 41: 827-37.
- Guillemin ML, Faugeron S, Destombe C, Viard F, Correa JA & Valero M (2008) Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid-diploid red alga *Gracilaria chilensis*: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 62: 1500-1519.
- Guiry M & Cunningham E (1984) Photoperiodic and temperature responses in the reproduction of the northeastern Atlantic *Gigartina acicularis* (Rhodophyta: Gigartinales). *Phycologia*, 23: 357-67.

- Guiry MD & Guiry GM (2021) *AlgaeBase*. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>, ultimo acceso 4 de marzo 2021.
- Gupta V, Baghel RS, Kumar M, Kumari P, Mantri VA, Reddy CRK & Jha B (2011) Growth and agarose characteristics of isomorphic gametophyte (male and female) and sporophyte of *Gracilaria dura* and their marker assisted selection. *Aquaculture*, 318: 389-396.
- Guzmán-Urióstegui A & Robledo D (1999) Factors affecting sporulation of *Gracilaria cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) carposporophytes from Yucatan, Mexico. *Hydrobiologia* 398/399: 285-290.
- Hafting JT, Craigie JS, Stengel DB, Loureiro RR, Buschmann AH, Yarish C, Edwards MD & Critchley AT (2015) Prospects and challenges for industrial production of seaweed bioactives. *J. Phycol.* 51: 821-837.
- Hamilton R.D (1980) Sterilization. En: Stein J.R. (ed.), *Handbook of phycological methods. Culture methods y growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 460.
- Hansen GI (1980) A morphological study of *Fimbrifolium*, a new genus in the Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 16: 207-17.
- Harada A & Yamagishi T (1971) A review of the recent studies on the Zygnemataceae. *Rev. Coll. Agric.* 8: 75-98.
- Hardesty DM & Freshwater DW (2018) Studies of North Carolina marine algae XIV: increased diversity of flattened offshore *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) species revealed by DNA sequences of contemporary specimens and the *G. mammillaris* holotype. *Bot. Mar.* 61: 407-13.
- Harley CD, Anderson KM, Demes KW, Jorve JP, Kordas RL, Coyle TA & Graham MH (2012) Effects of climate change on global seaweed communities. *J. Phycol.* 48: 1064-1078.
- 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.
- Hayakawa Y, Kawata K, Machida K, Yamano S, Akita S & Fujita D (2017) Phenology of *Chondracanthus tenellus* (Rhodophyta) in the central Pacific coast of Honshu, Japan. *J. Appl. Phycol.* 29: 2547-2556.
- Hayashi L, José de Paula E & Chow F (2007) Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *J. Appl. Phycol.* 19: 393-399.
- Hayat MA (1986) *Basic techniques for transmission electron microscopy*. Academic Press Inc. London. pp. 411.
- Hawkes MW (1990) Reproductive strategies. En: *Biology of the Red Algae*, KM Cole & RG Sheath (Eds.), Cambridge University Press, pp 455-476.



- Hemmi A, Mäkinen A, Jormalainen V & Honkanen T (2005) Responses of growth and phlorotannins in *Fucus vesiculosus* to nutrient enrichment and herbivory. *Aquat. Ecol.* 39: 201-211.
- Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, Pierre G, Delattre C, Ursu AV & Michaud P (2020) Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules*, 25: 3152.
- Hernández-Almeida OU, Siqueiros-Beltrones DA (2008) Variaciones en la estructura de asociaciones de diatomeas epífitas de una zona subtropical. *Hidrobiologica*, 18: 51-61.
- 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.
- Hommersand MH & Fredericq S (1990) Sexual reproduction and cystocarp development. En Cole KM & Sheath RG (Eds.) *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 305-345.
- Hommersand MH, Fredericq S, Freshwater WD & Hughey J (1999) Recent developments in the systematics of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on rbcL sequence analysis and morphological evidence. *Phycol. Res.* 47: 139-51.
- Hommersand MH, Moe RL, Amsler CD & Fredericq S (2009) Notes on the systematics and biogeographical relationships of Antarctic and sub-Antarctic Rhodophyta with descriptions of four new genera and five new species. *Bot. Mar.* 52: 509-34.
- Hooker JD (1847) *The Botany of the Antarctic Voyage of HM Discovery Ships Erebus and Terror in the Years 1839–1843*. I. Flora antarctica. Part II. Algae. Reeve, London.
- Hooker JD & Harvey WH (1845) Algae antarcticae. *London J. Bot.*, 4: 249-76.
- Hothorn T., Bretz F. & Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *J Math Biosci*, 50: 346-363.
- Huérffano A (1998) Aspectos sobre la biología poblacional, citogenética experimental y cultivo bajo condiciones controladas de la agarofita *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) presente en la zona litoral central de Venezuela. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Huelsenbeck JP & Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Hughes MH (2018) Reproducción a partir de esporas de *Gigartina skottsbergii* y *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta) de la Patagonia argentina y aplicación farmacéutica de sus carragenanos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 154.
- Hughes MH, Michetti KM & Leonardi PI (2019) Spore release and germling development on different substrates in the carrageenophyte *Sarcothalia crispata* from the southwestern Atlantic coast. *J. Appl. Phycol.* 31: 1285-1295.

- Hughes MH, Michetti KM & Leonardi PI (2020) Reproductive potential and early spore settlement on different substrates in *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae, Rhodophyta) from the South American Atlantic coast. *J. Appl. Phycol.* 32: 3495-3507.
- Hughes JS & Otto SP (1999) Ecology and the evolution of biphasic life cycles. *Am. Nat.* 154: 306-320.
- Hughes MH, Prado HJ, Rodríguez MC, Michetti K, Leonardi PI & Matulewicz MC (2018) Carrageenans from *Sarcothalia crispata* and *Gigartina skottsbergii*: structural analysis and interpolyelectrolyte complex formation for drug controlled release. *Mar. Biotechnol.* 20: 706-717.
- Hurtado AQ, Neish IC & Critchley AT (2019) Phyoeconomy: the extensive cultivation of seaweeds, their sustainability and economic value, with particular reference to important lessons to be learned and transferred from the practice of euचेumatoid farming. *Phycologia*, 58: 472-483.
- Istock CA (1967) The evolution of complex life cycle phenomena: an ecological perspective. *Evolution*, 21: 592-605.
- Jensen WA (1962) *Botanical histochemistry*. WH Freeman and Company, San Francisco, 408 pp.
- Jiang Z, Yu G, Liang Y, Song T, Zhu Y, Ni H & Oda T (2019) Inhibitory effects of a sulfated polysaccharide isolated from edible red alga *Bangia fusco-purpurea* on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83: 2065-2074.
- Jiao G, Yu G, Zhang J & Ewart HS (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs*. 9: 196-223.
- Jones E & Thornber CS (2010) Effects of habitat-modifying invasive macroalgae on epiphytic algal communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 400: 87-100.
- Jormalainen V & Honkanen T (2008). Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring temperate marine communities. En *Algal chemical ecology*, Amsler CD (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp 57-89.
- Juanes JA & Puente A (1993) Differential reattachment capacity of isomorphic life history phases of *Gelidium sesquipedale*. *Hydrobiologia*, 260: 139-144.
- Kain JM & Destombe C (1995) A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7: 269-281.
- Kamiya M & Kawai H (2002) Dependence of the carposporophyte on the maternal gametophyte in three ceramiacean algae (Rhodophyta), with respect to carpospore development, spore production, and germination success. *Phycologia* 41: 107-15.
- Kapraun DF & Dunwoody JT (2002) Relationship of nuclear genome size to some reproductive cell parameters in the Florideophycidae (Rhodophyta). *Phycologia*, 41: 507-516.
- Kapraun DF, Dutcher JA & Lopez-Bautista J (1992) Nuclear genome characterization of the carrageenophyte *Agardhiella subulata* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 4: 129-137.

- Kapraun DF & Nguyen MN (1994) Karyology, nuclear DNA quantification and nucleus-cytoplasmic domain variations in some multinucleate green algae (Siphonocladales, Chlorophyta). *Phycologia*, 33: 42-52.
- Kew Royal Botanic Garden (<https://cvalues.science.kew.org/>)
- Kiirikki M & Blomster J (1996) Wind induced upwelling as a possible explanation for mass occurrences of epiphytic *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyta) in the northern Baltic Proper. *Mar. Biol.* 127: 353-358.
- Kim KY & Garbary DJ (2006) Fluorescence responses of photosynthesis to extremes of hyposalinity, freezing and desiccation in the intertidal crust *Hildenbrandia rubra* (Hildenbrandiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 45: 680-686.
- Kinlan BP, Graham MH, Sala E & Dayton PK (2003) Arrested development of giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Phaeophyceae) embryonic sporophytes: a mechanism for delayed recruitment in perennial kelps? *J. Phycol.* 39: 47-57.
- Kohlmeyer J & Volkmann-Kohlmeyer B (2003) Marine ascomycetes from algae and animal hosts. *Bot. Mar.* 31: 1-35.
- 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.
- Kozlov AM, Darriba D, Flouri T, Morel B & Stamatakis A (2019) RAxML-NG: a fast, scalable, and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35: 4453-4455.
- Kraft GT & Saunders GW (2014) *Crebradomus* and *Dissimularia*, new genera in the family Chondrymeniaceae (Gigartinales, Rhodophyta) from the central, southern and western Pacific. *Phycologia*, 53: 146-66.
- Kraft GT & Saunders GW (2017) *Mychodea* and the Mychodeaceae (Gigartinales, Rhodophyta) revisited molecular analyses shed light on interspecies relationships in Australia's largest endemic algal genus and family. *Aust. Syst. Bot.* 30: 230-58.
- Kravchenko AO, Anastuyk SD, Glazunov VP, Sokolova EV, Isakov VV & Yermak IM (2020) Structural characteristics of carrageenans of red alga *Mastocarpus pacificus* from Sea of Japan. *Carbohydr. Polym.* 229: 115-518.
- Kravchenko AO, Barabanova AB, Glazunov VP, Yakovleva IM & Yermak IM (2018) Seasonal variations in a polysaccharide composition of Far Eastern red seaweed *Ahnfeltiopsis flabelliformis* (Phylloporaceae). *J. Appl. Phycol.* 30: 535-545.
- Krebs CJ (1999) Ecological methodology 2nd Edition, Benjamin Cummings, Menlo Park, 620 p.
- Kulkarni VA & Jagdale SP (2019) Characteristics of diatom communities epiphytic on brown algae *Padina gymnospora* (Kützting) Sonder, from Central West Coast of India. *Int. J. Sci. Res.* 8 (12): 1886-1892.
- 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. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1543-1549.

- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Kützing FT (1849) *Species Algarum*. F. A. Brockhaus, Leipzig, Germany, 922 pp.
- Kützing FT (1843) Ueber die Systematische Eintheilung der Algen. *Linnaea*, 18: 75-107.
- Kützing FT (1868). *Tabulae phycologicae; oder, Abbildungen der Tange*. Gedruckt auf kosten des Verfassers (in commission bei W. Kohne), Nordhausen, Vol. 17. pp 30.
- Kylin H (1923) Studien über die Entwicklungsgeschichte der Florideen. *Bihang till K. Svenska vet. akad. Handlingar*, 63: 1-139.
- Kylin H (1932) Die Florideenordnung Gigartinales. *Acta Univ. Lund.* 28:1-88.
- Lai MF & Lii CY (1998) Effects of extraction conditions on structural and rheological characteristics of agar from *Pterocladia capillacea* and carrageenan from *Grateloupia filicina*. *Bot. Mar.* 41: 223-234.
- Largo DB (2002) Recent developments in seaweed diseases. En: Hurtado AQ, Guanzon Jr. NG, de Castro-Mallare TR, Luhan Ma RJ (Eds.) Proceedings of the National Seaweed Planning Workshop. Southeast Asian Fisheries Development Centre Aquaculture Department, Tigbauan, Iloilo, pp. 35-42.
- Läuchli A (1972) Electron probe analysis. En Lüttge U. (Ed.) *Microautoradiography and electron probe analysis*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 191-236.
- Lee RE (2008) *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 547.
- Lee HW & Kim MS (2014) Cryptic species diversity of the red algal genus *Callophyllis* (Kallymeniaceae, Gigartinales) from Korea. *J. Ecol. Environ.* 37: 395-410.
- Lee J, Yang EC, Graf L, Yang JH, Qiu H, Zelzion U & Yoon HS (2018) Analysis of the draft genome of the red seaweed *Gracilariopsis chorda* provides insights into genome size evolution in Rhodophyta. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1869-1886.
- Lefcheck JS (2016) piecewiseSEM: piecewise structural equation modelling in R for ecology, evolution, and systematics, *Methods Ecol. Evol.* 7 573–579, <http://dx.doi.org/10.1111/2041-210X.12512>.
- Legrand E, Riera P, Pouliquen L, Bohner O, Cariou T & Martin S (2018) Ecological characterization of intertidal rockpools: Seasonal and diurnal monitoring of physico-chemical parameters. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 17: 1-10.
- Leonardi PI, Miravalles AB, Faugeron S, Flores V, Beltran J & Correa JA (2006) Diversity, phenomenology and epidemiology of epiphytism in farmed *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) in northern Chile. *Eur. J. Phycol.* 41: 247-257.
- Levy I & Gantt E (1990) Development of photosynthetic activity in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) following nitrogen starvation. *J. Phycol.* 26: 62-68.
- Lewin J (1966) Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia*, 6: 1-12.

- Licursi M & Gómez N (2003) Aplicación de índices bióticos en la evaluación de la calidad del agua en sistemas lóticos de la Llanura Pampeana Argentina a partir del empleo de diatomeas. *Biol. Acuát.* 21: 31-49.
- Lim YY, Lee WK, Leow ATC, Namasivayam P, Abdullah JO & Ho CL (2018) Sulfated galactans from red seaweeds and their potential applications. *Pertanika J. Sci. Technol.* 4: 2.
- 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.
- Linares C, Cebrian E & Coma R (2012) Effects of turf algae on recruitment and juvenile survival of gorgonian corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 452: 81-88.
- 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.
- Lizano OG (2007) Climatología del viento y oleaje frente a las costas de Costa Rica. *Cienc. Tecnol.* 25: 43-56.
- Lobban CS & Harrison PJ (1994) *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 384.
- Longtin CM, Scrosati RA, Whalen GB & Garbary DJ (2009) Distribution of algal epiphytes across environmental gradients at different scales: intertidal elevation, host canopies, and host fronds. *J. Phycol.* 45: 820-827.
- Lubchenco J & Cubitt J (1980) Heteromorphic life histories of certain marine algae as adaptations to variations in herbivory. *Ecology*, 61: 676-687.
- Luna LG, Fernández R, Capote AJ & Cobas LD (2012) Variación espacial de la composición de microalgas epífitas de *Ulva* spp. (Chlorophyta: Ulvaceae) en la Bahía de Santiago de Cuba. *CICIMAR Oceanides*, 27: 1-9.
- Mabrouk L, Ben Brahim M, Hamza A, Mahfoudhi M & Bradai MN (2014) A comparison of abundance and diversity of epiphytic microalgal assemblages on the leaves of the seagrasses *Posidonia oceanica* (L.) and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Asch in Eastern Tunisia. *J. Mar. Biol.* ID:275305: 1-10.
- Mabrouk L, Hamza A, Brahim MB & Bradai MN (2011) Temporal and depth distribution of microepiphytes on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves in a meadow off Tunisia. *Mar. Ecol.* 32: 148-161.
- Machado LP, Stefanello E, Andregretti DX, Zambotti-Villela L, Colepicolo P, De Carvalho LR & Yokoya NS (2019) Effects of bromide-enriched natural seawater culture medium on protein and monoterpenes output of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Appl. Phycol.* 31: 3831-3839.
- Maggs CA & Rico JM (1991) A karyological demonstration of meiosis in *Gelidium latifolium* (Gelidiaceae, Rhodophyta) from Ireland. *Phycologia*, 30: 487-494.
- Magurran AE (1988) Ecological diversity and its measurement. C. Helm (Ed.). New Jersey, EE.UU.: Princeton University Press. Pp. 179.

- Majewska R, D'Alelio D & De Stefano M (2014) *Cocconeis* Ehrenberg (Bacillariophyta), a genus dominating diatom communities associated with *Posidonia oceanica* Delile (monocotyledons) in the Mediterranean Sea. *Aquat. Bot.* 112: 48-56.
- Majewska R, Gambi MC, Totti CM, Pennesi C & De Stefano M (2013) Growth form analysis of epiphytic diatom communities of Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Polar Biol.* 36: 73-86.
- Mansilla A, Werlinger C, Palacios M, Navarro NP, Cuadra P (2006) Effects of UVB radiation on the initial stages of growth of *Gigartina skottsbergii*, *Sarcothalia crispata* and *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 18: 451-459.
- Marambio J, Rosenfeld S, Ojeda J & Mansilla A (2016) Variación estacional en la composición de ensamblajes sublitorales de macroalgas asociadas al alga roja *Gigartina skottsbergii* Setchell & Gardner, en el estrecho de Magallanes, Chile. En *Anales del Instituto de la Patagonia*, 44 (2): 5-22.
- Marin SL, Westermeier R & Melipillán J (2002) Simulation of alternative management strategies for red algae, luga roja, (*Gigartina skottsbergii* Setchell and Gardner) in southern Chile. *Ecol. Model.* 154: 121-133.
- Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA & Moreira WSC (2006) Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour. Technol.* 97: 2402-2406.
- Martín LA (2010) El alga roja agarófita *Gracilaria gracilis* en Bahía Bustamante (Chubut, Argentina): evaluación del estado reproductivo, epifitismo y caracterización del agar. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 140.
- Martin LA, Boraso de Zaixso AL & Leonardi PI (2011) Biomass variation and reproductive phenology of *Gracilaria gracilis* in a Patagonian natural bed (Chubut, Argentina). *J. Appl. Phycol.* 23: 643-654.
- Martin RP (2014) *Identificación y cuantificación de ADN nuclear de algas antárticas*. Tesis de Master. Directores: A. Gomez Carreta & Rull Lluch J. Universidad de Barcelona, 51 pp.
- Martínez B, Radford B, Thomsen MS, Connell SD, Carreño F, Bradshaw CJ & Wernberg T (2018) Distribution models predict large contractions of habitat-forming seaweeds in response to ocean warming. *Divers. Distrib.* 24: 1350-1366.
- Massad IP, Ávila M, Contreras-Porcía L & Contador CB (2020) Spores re-suspending technology, a new system improving spore seeding for culture of commercial red seaweeds. *Aquaculture*, 526: 735-744.
- Matsuhiro B (1995) Aislamiento y caracterización de ficocoloides. En: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E (Eds.) *Manual de Métodos Ficológicos*. Universidad de Concepción, Chile Concepción pp. 658-74.
- Matsuhiro B (1996) Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. *Hydrobiologia*, 326: 481-489.

- Matulewicz MC & Cerezo AS (1980) The carrageenan from *Iridaea undulosa* B.; analysis, fractionation and alkaline treatment. *J. Sci. Food. Agric.* 31: 203-213.
- Matulewicz MC, Ciancia M, Noseda MD & Cerezo AS (1989) Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. *Phytochemistry*, 28: 2937-2941.
- Mazzella L & Alberte RS (1986) Light adaptation and the role of autotrophic epiphytes in primary production of the temperate seagrass, *Zostera marina* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 100: 165-180.
- McBride DL, Kugrens P & West JA (1974) Light and electron microscopic observations on red algal galls. *Protoplasma*, 79: 249-264.
- McHugh DJ (2003) *A guide to the seaweed industry*. FAO Fisheries Technical Paper N° 441. Roma, Italia.
- McKeown DA, Stevens K, Peters AF, Bond P, Harper GM, Brownlee C, Brown MT, Schroeder DC (2017) Phaeoviruses discovered in kelp (Laminariales). *ISME J.* 11: 2869-2873.
- Mc Candless EL, Okada WT, Lott JNA, Vollmer CM & Gordon-Mills EM (1977) Structural studies of *Chondrus crispus*: the effect of extraction of carrageenan. *Can. J. Bot.* 55: 2053-2064.
- Melo RA & Neushul M (1993) Life history and reproductive potential of the agarophyte *Gelidium robustum* in California. *Hydrobiologia*, 260: 223-229.
- Mendoza ML (1969) Estudio sistemático y ecológico de las Ceramiaceae (Algae-Rhodophyta) de Puerto Deseado Provincia de Santa Cruz (Argentina). *Darwiniana*, 287-362.
- Mendoza ML (1999) Las macroalgas marinas bentónicas de la Argentina. *Ciencia Hoy*, 9: 40-49.
- 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.
- Min-Thein U & Womersley HBS (1976) Studies on southern Australian taxa of Solieriaceae, Rhabdoniaceae and Rhodophyllidaceae (Rhodophyta). *Aust. J. Bot.* 24: 1-166.
- Miravalles AB (2009) Biología y ultraestructura de *Codium spp.* (Bryopsidophyceae, Chlorophyta): morfologías vegetativa y reproductiva, ciclos de vida y epifitismo. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. Pp 213.
- Montalva S & Santelices B (1981) Interspecific interference among species of *Gelidium* from Central Chile. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 53: 77-88.
- Morais T, Cotas J, Pacheco D & Pereira L (2021) Seaweeds Compounds: an ecosustainable source of cosmetic ingredients? *Cosmetics*, 8: 8.
- Mouzo FH (2014) Edad del golfo San Matías, Plataforma Continental Argentina y la Estratigrafía Geología Submarina, Golfo San Matías 569 en el Gran Bajo de San Antonio, Provincia de Río Negro. *Rev. Asoc. Geol. Arg.* 71: 129-142.

- Mouzo FH (2017) Geología submarina del Golfo norpatagónico San Satías. *Rev. Asoc. Geol. Arg.* 74: 553-569.
- Mshigeni KE, Semesi AK & Ngonyani TM (1979) Studies on the phycocolloid from the red seaweed *Rhabdonia africana* Jaasund (Gigartinales, Rhabdoniaceae). *Bot. Mar.* 22: 447-450.
- Müller H & Salazar Orquera M (1996) Algas marinas de Ecuador. Guayaquil: Instituto Nacional de Pesca. pp. 187.
- Muñoz-Gómez SA, Mejía-Franco FG, Durnin K, Colp M, Grisdale CJ, Archibald JM & Slamovits CH (2017) The new red algal subphylum *Proteorhodophytina* comprises the largest and most divergent plastid genomes known. *Curr. Biol.* 27: 1677-1684.
- Murphy V, Tofail SA, Hughes H & McLoughlin P (2009) A novel study of hexavalent chromium detoxification by selected seaweed species using SEM-EDX and XPS analysis. *Chem. Eng. Sci.* 148: 425-433.
- Murúa P, Goecke F, Westermeier R, Van West P, Küpper FC, Neuhauser S (2017) *Maullinia braseltonii* sp. nov. (Rhizaria, Phytomyxea, Phagomyxida): a cyst-forming parasite of the bull kelp *Durvillaea* spp. (Stramenopila, Phaeophyceae, Fucales). *Protist*, 168: 468-480.
- Murúa P, Patiño DJ, Leiva FP, Muñoz L, Müller DG, Küpper FC & Peters AF (2019) Gall disease in the alginophyte *Lessonia berteriana*: A pathogenic interaction linked with host adulthood in a seasonal-dependant manner. *Algal Res.* 39: 101435.
- Nagle V, Gaikwad M, Pawar Y & Dasgupta S (2020) Marine red alga *Porphyridium* sp. as a source of sulfated polysaccharides (SPs) for combating against COVID-19. Preprints, 2020040168.
- Nauer F, Ayres-Ostrock L, Amorim AM, Santos JP, Chow F, Plastino EM & Oliveira MC (2019a) Life history, growth, and pigment content of two morphological variants of *Hypnea pseudomusciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 31: 1271-1284.
- Nauer F, Cassano V & Oliveira MC (2016) *Hypnea wynnei* and *Hypnea yokoyana* (Cystocloniaceae, Rhodophyta), two new species revealed by a DNA barcoding survey on the Brazilian coast. *Phytotaxa*, 268: 123-134.
- Nauer F, Cassano V & Oliveira MC (2019b) Description of two new Caribbean species from the *Hypnea musciformis* complex (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *Phytotaxa*, 408: 85-98.
- Neill K, Heesch S & Nelson WA (2008) Diseases, pathogens and parasites of *Undaria pinnatifida*. *MAF Biosecur. New Zealand.* p. 104.
- Nejrup LB & Pedersen MF (2012) The effect of temporal variability in salinity on the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *Eur. J. Phycol.* 47: 254-263.
- Nelson SG & Glenn EP (2000) Spore and sporeling production in the development of aquaculture systems for species of *Gracilaria* and related seaweeds. Recent advances in marine biotechnology. *Aquaculture*, 4: 1-21.
- Nielsen KJ (2007) *Algae, Overview*. En: Denny MW y SD Gaines (Eds.), *Encyclopedia of tidepools and rocky shores*. University of California Press, Berkeley. pp.705.



- Norouzi O, Tavasoli A, Jafarian S & Esmailpour S (2017) Catalytic upgrading of bio-products derived from pyrolysis of red macroalgae *Gracilaria gracilis* with a promising novel micro/mesoporous catalyst. *Bioresour. Technol.* 243: 1-8.
- Nylund GM, Weinberger F, Rempt M & Pohnert G (2011) Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *PLoS One*, 6: e29359.
- Ogandaga CAM, Na YJ, Lee SR, Kim YS, Choi HG & Nam KW (2017) Wart-like spot formation on the fronds of *Chondrus ocellatus* (Gigartinales) by a brown alga, *Mikrosyphar zosterae* (Ectocarpales) in Korea. *J. Appl. Phycol.*, 29: 2539-2546.
- Okolie CL, Mason B & Critchley AT (2018) Seaweeds as a source of proteins for use in pharmaceuticals and high-value applications. En: M. Hayes (Ed.), *Novel proteins for food, pharmaceuticals and agriculture: sources, applications and advances*, Hoboken: Wiley. 217 pp.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara RB & Wagner H (2013) Community ecology package. Package Vegan. R package version, 2-0.
- Oliveira EC, Alveal K & Anderson RJ (2000) Mariculture of the agar-producing Gracilarioid red algae. *Rev. Fish. Sci. Aquat.* 8: 345-377.
- Orduña-Rojas J & Robledo D (2002) Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, México. II. Biomass assessment and reproductive phenology. *Bot. Mar.* 45: 459-464.
- Ortuño-Aguirre C & Riosmena-Rodríguez R (2007) Dinámica del epifitismo en *Padina concrescens* (Dictyotales: Phaeophyta) en el suroeste de la Península de Baja California, México. *Cienc. Mar.* 33: 311-317.
- Oyarzún ORH (2011) Dinámica poblacional de un alga roja haploide-diploide isomórfica, *Gracilaria chilensis*. Tesis de grado, Director: ML Guillemin, Universidad Austral de Chile, 62 pp.
- Pacheco-Ruíz I, Gálvez-Telles A, Zertuche-González JA & Pech-Pacheco JL (1997) Efecto del uso del cloro comercial sobre el crecimiento de algas epífitas y su hospedante *Gigartina pectinata* Daw. (Gigartinales, Rhodophyta). *Cienc. Mar.* 23: 3.
- Palacios Giraldo DC (2009) Identificación y uso de *Gracilaria blodgettii* (Harvey) para ensayos de esporulación en condiciones de laboratorio. Tesis de grado. Universidad Jorge Tadeo Lozano Facultad de Ciencias Naturales Programa de Biología Marina Santa Marta, Colombia. Pp 77.
- Paula E, Pereira RTL & Ohno M (2006) Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. *Phycol. Res.* 50: 1-9.
- Payo DA, Leliaert F, Verbruggen H, D'hondt S, Calumpong HP & De Clerck O (2013) Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 280: 2012-2660.

- Pérez-Cortez S, Vera B & Sánchez C (2003) Técnica de coloración útil en la interpretación anatómica de *Gracilariopsis tenuifrons* y *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta). *Acta Bot. Venez.* 26: 237-44.
- Pérez-Recalde M, Canelón DJ, Compagnone RS, Matulewicz MC, Cerezo AS & Ciancia M (2016) Carrageenan and agaran structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. *Carbohydr. Polym.* 136: 1370-1378.
- Pereira L, Amado AM, Critchley AT, van de Velde F & Ribeiro-Claro PJA (2011) Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FTRaman). *Food. Hydrocoll.* 23: 1903-1909.
- Pereira L, Meireles F, Abreu HT & Ribeiro-Claro PJ (2015) A comparative analysis of carrageenans produced by underutilized versus industrially utilized macroalgae (Gigartinales, Rhodophyta). En Kim K & Chojnacka K (Eds.) *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp.277-294.
- Pereira L, Van de Velde F & Mesquita JF (2007) Cytochemical studies on underutilized carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta). *Int. J. Biol. Biomed. Eng.* 1: 1-5.
- Peters AF & Schaffelke B (1996) *Streblonema* (Ectocarpales, Phaeophyceae) infection in the kelp *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae) in the western Baltic. *Hydrobiologia*, 326/327: 111-16.
- Phillips B (1994) Ecological differences between the isomorphic phases of *Mazzaella lilacina* (Rhodophyta, Gigartinaceae). Doctoral dissertation, University of British Columbia, Canada. pp. 127.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S & Sarkar DRC (2016) Team, nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3, pp. 1–128, URL <http://CRAN.Rproject.org/package=nlme>.
- Piriz ML & Casas GN (1996a) Panorama de estudio de los recursos algales en Argentina. En: Ferrario M, Sar E (Eds.) *Macroalgas de interés económico*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, pp 267-296
- Piriz ML & Casas G (1996b) Informe Técnico 26. Macroalgas de interés comercial en las costas del sur de Chubut y norte de Santa Cruz. Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica. Fundación Patagónica Natural y Wildlife Conservation Internacional. ISSN N° 0328 - 462X.
- Piriz ML & Cerezo AS (1991) Seasonal variation of carrageenan in tetrasporic, cystocarpic and "sterile" stages of *Gigartina skottsbergii* S. et G. (Rhodophyta, Gigartinales). *Hydrobiologia*, 225: 65-69.
- Polifrone M, Viera-Rodríguez MA, Pennesi C, Conte MT, Santana Del Pino A, Stroobant M & De Stefano M (2020) Epiphytic diatoms on Gelidiales (Rhodophyta) from Gran Canaria (Spain). *Eur. J. Phycol.* 55: 400-411.
- Poore AG, Campbell AH, Coleman RA, Edgar GJ, Jormalainen V, Reynolds PL & Emmett Duffy J (2012) Global patterns in the impact of marine herbivores on benthic primary producers. *Ecol. Lett.* 15: 912-922.

- Poza AM (2018) Valorización de poblaciones naturales del alga parda *Leathesia marina* de las costas patagónicas para emprendimientos de maricultura con fines biotecnológicos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur. Pp. 197.
- Poza AM, Fernández C, Gauna MC & Parodi ER (2018a) Biochemical properties and culture optimization of *Leathesia marina* (Phaeophyceae). *Algal Res.* 33: 379-388.
- Poza AM, Gauna MC, Escobar JF & Parodi ER (2018b) Temporal dynamics of algal epiphytes on *Leathesia marina* and *Colpomenia sinuosa* macrothalli (Phaeophyceae). *Mar. Biol. Res.* 14: 65-75.
- Prajapati SK, Kumar P, Malik A & Vijay VK (2014) Bioconversion of algae to methane and subsequent utilization of digestate for algae cultivation: a closed loop bioenergy generation process. *Bioresour. Technol.* 158: 174-180.
- 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. Japanese Society for Plant Physiology, Tokyo. pp. 63-75.
- Pueschel CM (1995) Rod-shaped virus-like particles in the endoplasmic reticulum of *Audouinella saviana* (Acrochaetiales, Rhodophyta). *Can. J. Bot.* 73: 1974-1980.
- Qiao L, Li Y, Chi Y, Ji Y, Gao Y, Hwang H & Wang P (2016) Rheological properties, gelling behavior and texture characteristics of polysaccharide from *Enteromorpha prolifera*. *Carbohydr. Polym.* 136: 1307-1314.
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/index.html>.
- Rafiquzzaman SM, Ahmed R, Lee JM, Noh G, Jo GA & Kong IS (2016) Improved methods for isolation of carrageenan from *Hypnea musciformis* and its antioxidant activity. *J. Appl. Phycol.* 28: 1265-1274.
- Reani A, Cosson J, Parker A & Zaoui D (1998) Seasonal variation of growth, carrageenan content and rheological properties of *Cystoclonium purpureum* (Huds.) Batters (Rhodophyta, Cystocloniaceae) from the Calvados Coast (France). *Bot. Mar.* 41: 383-388.
- Redmond AM, Hollingsworth EK & Vis ML (2019) Survey of freshwater red algae from the Batrachospermales (Rhodophyta) in South Carolina. *Southeast. Nat.* 18: 451-468.
- Reis RP & Yoneshigue-Valentin Y (2000) Phenology of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Rhodophyta, Gigartinales) in three populations from Rio de Janeiro State, Brazil. *Bot. Mar.* 43: 299-304
- Reymond OL & Pickett-Heaps JD (1983) A routine flat embedding method forelectron microscopy of microorganisms allowing selection and precisely orientated sectioning of single cells by light microscopy. *J. Microsc.* 130: 79-84.
- Rico JM & Guiry MD (1997) Life history and reproduction of *Gelidium maggsiae* sp. nov. (Rhodophyta, Gelidiales) from Ireland. *Eur. J. Phycol.* 32: 267-277.

- Rindi F & Guiry MD (2004) Composition and spatio temporal variability of the epiphytic macroalgal assemblage of *Fucus vesiculosus* Linnaeus at Clare Island, Mayo, western Ireland. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311: 233-252.
- Robaina Romero R, García Jimenez P & Batista de Vega G (2008) *Cultivo ecosostenible de algas marinas = (Seaweed ecofriendly aquaculture. SEA Panamá)*: memoria PCI C5054/06: Manuales de laboratorio. Informe Tecnico, Unisersidad de Las Palmas de Gran Canarias, 291 pp.
- Rodríguez MC, Matulewicz MC, Nosedá MD, Ducatti DRB & Leonardi PI (2009) Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina-content, structure and physical properties. *Bioresour. Technol.* 100: 1435-1441.
- Rojas-González B & Afonso-Carrillo J (2001) Morfología y distribución de *Pterosiphonia pennata* en las islas Canarias (Rhodophyta, Rhodomelaceae). *Vieraea*, 29: 71-78.
- Roleda MY, Montano NE, Ganzon-Fortes ET & Villanueva RD (1997) Acetic acid pretreatment in agar extraction of Philippine *Gelidiella acerosa* (Forsskaal) Feldmann et Hamel (Rhodophyta, Gelidiales). *Bot. Mar.* 40, 63–69.
- Roleda MY, Morris JN, McGraw CM & Hurd CL (2012) Ocean acidification and seaweed reproduction: increased CO<sub>2</sub> ameliorates the negative effect of lowered pH on meiospore germination in the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae). *Glob. Change Biol. Bioenergy*, 18: 854-864.
- Romagnoli T, Bavestrello G, Cucchiari EM, De Stefano M, Di Camillo CG, Pennesi C & Totti C (2007) Microalgal communities epibiotic on the marine hydroid *Eudendrium racemosum* in the Ligurian Sea during an annual cycle. *Mar. Biol.* 151: 537-552.
- Round FE (1984) *The ecology of algae*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 664.
- Royer CJ, Redmond S, Lai CS & Brawley SH (2019) *Porphyra umbilicalis* in applied and basic research: reproductive phenology, development, seed stock culture, and a field trial for aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 31: 547-560.
- Russ JC & Panessa BJ (1972) (Eds.) Proceedings of the Thin-section microanalysis. Symposium, St. Louis, EDAX Laboratories, Raleigh, N.C.
- Sahoo D & Yarish C (2005) Mariculture of seaweeds. En: Andersen RA (Ed.) *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, New York. pp 219-237.
- Salinas JM (1991) Spray system for re-attachment of *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thur. (Gelidiales: Rhodophyta). En Juanes JA, Santelices B, McLachlan JL (Eds.) *International Workshop on Gelidium*. Developments in Hydrobiology, 68, Springer, Dordrecht. pp. 107-117.
- Sánchez RAR, Canelón DJ, Cosenza VA, Fissore EN, Gerschenson LN, Matulewicz MC & Ciancia M (2019) *Gracilariopsis hommersandii*, a red seaweed, source of agar and sulfated polysaccharides with unusual structures. *Carbohydr. Polym.* 213: 138-146.

- Sangil C, Sansón M & Afonso-Carrillo J (2003) Algas marinas de La Palma (Islas Canarias): novedades florísticas y catálogo insular. *Vieraea*, 31: 83-119.
- Santelices B (1990) Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanogr. Mar. Biol.* 28: 177-276.
- Santelices B, Correa JA, Hormazábal M, Flores V (2003) Contact responses between spores and sporelings of different species, karyological phases and cystocarps of coalescing Rhodophyta. *Mar Biol* 143: 381-392
- Santos R & Duarte P (1996) Fecundity, spore recruitment and size in *Gelidium sesquipedale* (Gelidiales, Rhodophyta). *Hidrobiologia*, 326-327 (1): 223-228.
- Sato S, Nagumo T & Tanaka J (2009) Chain colony formation of marine araphid diatom *Grammatophora marina* (Lyngbye) Kützinger: relationship between chain shape and apical spine. *J. Jpn. Bot.* 84: 106-112.
- Saunders GW & Hommersand MH (2004) Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *Am. J. Bot.* 91: 1494-507.
- Saunders GW & Kraft GT (1994) Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 1. Evidence for the Plocamiales ord. nov. *Can. J. Bot.* 72: 1250-1263.
- Saunders GW & Kraft GT (1996) Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 2. Recognition of the Halymeniales ord. nov. *Can. J. Bot.* 74: 694-707.
- Scagel RF, Bandoni RJ, Maze JR, Rouse GE, Schofield WB & Stein JR (1991) Rodófitos (Algas rojas). En: Scagel RF, Bandoni RJ, Maze JR, Rouse GE, Schofield WB, Stein JR (Eds.) *Plantas no vasculares*. Ediciones Omega S A, Barcelona. pp 387-429.
- Schanz A, Polte P & Asmus H (2002) Cascading effects of hydrodynamics on an epiphyte-grazer system in intertidal seagrass beds of the Wadden Sea. *Mar. Biol.* 141: 287-297.
- Scheffer RP (1997) *The nature of disease in plants*. Cambridge University Press. 336pp.
- Schneider CW (1988) *Craspedocarpus humilis* sp. nov. (Cystocloniaceae, Gigartinales) from North Carolina, and a reappraisal of the genus. *Phycologia*, 27: 1-9.
- Schnetter R, Ruckelshausen U & Seibold G (1984) Mikrospectralphotometrische Untersuchungen über den Entwicklungszyklus von *Ernodesmis verticillata* (Kützinger) Borgesen (Siphonocladales, Chlorophyceae). *Cryptogam. Algol.* 5: 73-78.
- Schoenrock KM, Amsler CD, McClintock JB & Baker BJ (2013) Endophyte presence as a potential stressor on growth and survival in Antarctic macroalgal hosts. *Phycologia*, 52: 595-599.

- 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.
- Scrosati R & Mudge B (2004) Persistence of gametophyte predominance in *Chondrus crispus* (Rhodophyta, Gigartinaceae) from Nova Scotia after 12 years. *Hydrobiologia*, 519: 215-218.
- Şen M & Erboz EN (2010) Determination of critical gelation conditions of κ-carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses. *Food. Res. Int.* 43: 1361-1364.
- Serrao E A, Pearson G, Kautsky L & Brawley SH (1996) Successful external fertilization in turbulent environments. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5286-5290.
- Shannon CE & Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University Illinois Press, Urbana, IL. pp 132.
- Shameel M, Afaq-Husain S & Zarina A (2012) Structure, growth and reproduction of red alga, *Hypnea pannosa*, from the Karachi coast of Pakistan. *Int. J. Algae* 14:4.
- Simpson SJ, Raubenheimer D, Charleston MA & Clissold FJ (2010) Modelling nutritional interactions: from individuals to communities. *Trends Ecol. Evol.* 25: 53-60.
- Siqueiros Beltrones DA & Martínez YJ (2017) Prospective floristics of epiphytic diatoms on Rhodophyta from the Southern Gulf of Mexico. *CICIMAR Oceanide*, 32: 35-49.
- Smith DC & Douglas AE (1987) *The Biology of Symbiosis*. 1<sup>st</sup> ed. Edward Arnold, London, 304 pp.
- Soares LP, Toyota Fujii M, Diaz-Tapia P & Hommersand MH (2019) A molecular and morphological reinvestigation of topotype specimens of *Calliblepharis occidentalis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *Phycologia*, 58:169-79.
- Sorrivas de Lozano V, Morales A & Yañez MJ (2014) Principios y práctica de la microscopía electrónica. UAT-CONICET, Bahía Blanca. Pp 449.
- Souza JM, Castro JZ, Critchley AT & Yokoya NS (2019) Physiological responses of the red algae *Gracilaria caudata* (Gracilariales) and *Laurencia catarinensis* (Ceramilales) following treatment with a commercial extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum* (AMPEP). *J. Appl Phycol.* 31: 1883-1888.
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.
- Steneck RS, Graham MH, Borque BJ, Corbett D, Erlandson JM, Estes JA & Tegner MJ (2002) Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environ. Conserv.* 29: 436-459.
- Stortz CA, Bacon BE, Cherniak R & Cerezo AS (1994) High-field NMR spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*. *Carbohydr. Res.* 261: 317-326.
- Stortz CA & Cerezo AS (1986) The potassium chloride-soluble carrageenans of the red seaweed *Iridaea undulosa* *Carbohydr. Res.* 145: 219-235.

- Stortz CA & Cerezo AS (1993) The systems of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions. *Carbohydr. Res.* 242: 217-227.
- Stortz CA & Cerezo AS (2000) Novel findings in carrageenans, agaroids and Bhybrid red seaweed galactans. *Curr. Top. Phytochem*, 4: 121-134.
- Subba Rangaiah G, Sudhakar S & Vanilla Kumari E. (2003) Seasonal growth, phenology and spore shedding in *Polysiphonia platycarpa* Børgesen (Ceramiales, Rhodophyta) of Visakhapatnam Coast, India. *Algae*, 18: 177-181.
- Surget G, Le Lann K, Delebecq G, Kervarec N, Donval A, Poullaouec MA & Stiger-Pouvreau V (2017) Seasonal phenology and metabolomics of the introduced red macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, monitored in the Bay of Brest (France). *J. Appl. Phycol.* 29: 2651-2666.
- Suzuki H, Nagumo T & Tanaka J (2001) Morphology of the marine epiphytic diatom *Cocconeis convexa* Giffen (Bacillariophyceae). *Diatom*, 17: 59-68.
- 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.
- Swift H (1950) The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. Proceedings of the National Academic of Science of the USA 36: 643-654
- Tala F & Chow F (2014) Phenology and photosynthetic performance of *Porphyra* spp. (Bangiophyceae, Rhodophyta): Seasonal and latitudinal variation in Chile. *Aquat. Bot.* 113: 107-116.
- Tanaka N (1986) Adhesive strength of epiphytic diatoms on various seaweeds. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52: 817-821.
- Tam CE, Cole KM & Garbary DJ (1987) In situ and in vitro studies on the endophytic red algae *Audouinella porphyrae* and *A. vaga* (Acrochaetiales). *Can. J. Bot.* 65: 532-538.
- Tarkowska-Kukuryk M (2013) Periphytic algae as food source for grazing chironomids in a shallow phytoplankton-dominated lake. *Limnologica*, 43: 254-264.
- Ter Braak CJF (1994) Canonical community ordination. Part I: Basic theory and linear methods. *Ecoscience*, 1: 127-140.
- Thrainsson SA & Hommersand MH (2012) New features in the vegetative and reproductive morphology of *Cystoclonium purpureum* (Cystocloniaceae, Rhodophyta) from the North Atlantic Ocean. *Eur. J. Phycol.* 47: 384-392.
- Thomsen MS & Mc Glathery KJ (2007) Stress tolerance of the invasive macroalgae *Codium fragile* and *Gracilaria vermiculophylla* in a soft-bottom turbid lagoon. *Biol. Invasions* 9: 499-513.
- Thorner CS (2006) Functional properties of the isomorphic biphasic algal life cycle. *Biol. Invasions*, 46: 605-614.

- Thornber C, Jones E & Thomsen M (2016) Epibiont-marine macrophyte assemblages. En *Marine macrophytes as foundation species*, E. olafsson (Ed.). CRC Press, 43-75.
- Titlyanov EA & Titlyanova TV (2006) New methods of obtaining plantlets and tetraspores from fragments and cell aggregates of meristematic and submeristematic tissue of the red alga *Palmaria palmata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 339: 55-64.
- Tonicelli GA, Croce ME, Díaz-Tapia P, Fredericq S, Freshwater DW, Gauna MC & Hommersand MH (2021) *Meridionella gen. nov.*, a new genus of Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta) from the Southern Hemisphere, including *M. obtusangula comb. nov.* and *M. antarctica sp. nov.* *J. Phycol.* 57: 797-816.
- Totti C, Poulin M, Romagnoli T, Perrone C, Pennesi C & De Stefano M (2009) Epiphytic diatom communities on intertidal seaweeds from Iceland. *Polar Biol.* 32: 1681-1691.
- Torres MD, Flórez-Fernández N & Domínguez H (2019) Integral utilization of red seaweed for bioactive production. *Mar. Drugs*, 17: 314.
- Trautman DA & Borowitzka MA (1999) Distribution of the epiphytic organisms on *Posidonia australis* and *P. sinuosa*, two seagrasses with differing leaf morphology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 179: 215-229.
- Tsekos I (1982) Tumour-like growths induced by bacteria in the thallus of a red alga, *Gigartina teedii* (Roth) Lamour. *Ann. Bot.* 49:123-126.
- Uhrich AV, L Córdoba O & Flores LM (2016) Especies de *Ulva* del Golfo San Jorge, Patagonia Argentina: variaciones bioquímicas estacionales-espaciales y su relación con la producción de metabolitos bioactivos. *Ars Pharm.* 57: 67-75.
- Usov AI (2011) Polysaccharides of the Red Algae. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 65: 115-217.
- Vadas Sr RL, Johnson S & Norton TA (1992) Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae. *Br. Phycol. Bull.* 27: 331-351.
- Vairappan CS, Chung CS, Hurtado AQ, Soya FE, Lhonneur GB & Critchley A (2007) Distribution and symptoms of epiphyte infection in major carrageenophyte-producing farms. *J. Appl. Phycol.* 20: 477-483.
- Valentine JF & Duffy JE (2006) The central role of grazing in seagrass ecology. En: Larkum AWD, Orth RJ & Duarte CM (Eds.) *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 463-501.
- Valero M, Richerd S, Perrot V & Destombe C (1992) Evolution of alternation of haploid and diploid phases in life cycles. *Trends Ecol. Evol.* 7: 25-29.
- Van de Peer Y & De Wachter R (1997) Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *J. Mol. Evol.* 45: 619-630.
- Van de Velde F (2008) Structure and function of hybrid carrageenans. *Food. Hydrocoll.* 22: 727-734.



- Vázquez-Delfín E, Boo GH, Rodríguez D, Boo SM & Robledo D (2016) *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae) from the Yucatan Peninsula: morphological variability in relation to life-cycle phase. *Phycologia*, 55: 230-242.
- Vázquez-Delfín E, Robledo D & Freile-Pelegrín Y (2014) Microwave-assisted extraction of the carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 26: 901-907.
- Verbruggen H (2014) Morphological complexity, plasticity, and species diagnosability in the application of old species names in DNA-based taxonomies. *J. Phycol.* 50: 26-31.
- Vermeij MJ, Van Moorselaar I, Engelhard S, Hörnlein C, Vonk SM & Visser PM (2010) The effects of nutrient enrichment and herbivore abundance on the ability of turf algae to overgrow coral in the Caribbean. *PLoS One*, 5: e14312.
- Vetter RD (1991) Symbiosis and the evolution of novel trophic strategies: thiotrophic organisms at hydrothermal vents. En Margulis L & Fester R (Eds.) *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: Speciation and Morphogenesis*. Massachusetts Institute of Technology Press, Boston. pp. 219-248.
- Viejo RM & Åberg P (2003) Temporal and spatial variation in the density of mobile epifauna and grazing damage on the seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Mar Biol.* 142: 1229-1241.
- Villaseñor-Parada C & Neill PE (2011) Distribución espacial de epifitos en el talo de la macroalga introducida *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* en el submareal de Caldera. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 46: 257-262.
- Von Stosch H (1963) Wirkungen von jod un arsenit auf meeresalgen in kultur. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 4: 142-50.
- Wahl M & Mark O (1999) The predominantly facultative nature of epibiosis: experimental and observational evidence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187: 59-66.
- Walker PD, Wijnhoven S & Van der Velde G (2013) Macrophyte presence and growth form influence macroinvertebrate community structure. *Aquat. Bot.* 104: 80-87.
- Weinberger F, Buchholz B, Karez R & Wahl M (2008) The invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla* in the Baltic Sea: adaptation to brackish water may compensate for light limitation. *Aquat. Bot.* 3: 251-264.
- West JA, Pueschel CM, Klochkova TA, Kim GH, De Goer S & Zuccarello GC (2013) Gall structure and specificity in *Bostrychia* culture isolates (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae*, 28: 83-92.
- West JA, Zuccarello GC & Kamiya M (2001) Reproductive patterns of *Caloglossa* species (Delesseriaceae, Rhodophyta) from Australia and New Zealand: multiple origins of asexuality in *C. lepriurii*. Literature review on apomixes, mixed-phase, bisexuality and sexual compatibility. *Phycol. Res.* 49: 183-200.
- Westermeier R, Patiño DJ, Murúa P, Quintanilla JC, Correa J, Buschmann AH & Barros I (2012) A pilot-scale study of the vegetative propagation and suspended cultivation of the carrageenophyte alga *Gigartina skottsbergii* in southern Chile. *J. Appl. Phycol.* 24: 11-20

- Westlake D (2020) Some basic data for investigations of the productivity of aquatic macrophytes. En Goldman CR (Ed.) *Primary Productivity in Aquatic Environments*, University of California Press. pp. 229-248.
- Williams GN (2017) Caracterización ambiental del golfo San Matías mediante sensores remotos y parámetros oceanográficos: relación con la distribución y abundancia de los recursos biológicos de interés pesqueros. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Comahue Centro Regional Universitario Bariloche. 290 pp.
- Whittick A (1986) Observations of the relation between cell volume, nuclear volume, and DNA level in two species of the Ceramiaceae (Rhodophyta). *Br. Phycol. Bull.* 21: 314.
- Whittmann W (1965) Aceto-iron-haematoxylin-chloral hydrate for chromosome staining. *Stain Technol.* 40: 161-64.
- Woelkerling WJ (1973) The *Audouinella* complex (Rhodophyta) in the western Sargasso Sea. *Rhodora*, 75: 78-101.
- Womersley HBS (1994) *The Marine Benthic Flora of Southern Australia. Rhodophyta. Part IIIA. Bangiophyceae and Florideophyceae (Acrochaetiales, Nemaliales, Gelidiales, Hildenbrandiales and Gigartinales sensu lato)*. Australian Biological Resources Study, Canberra. pp 508.
- Won BY, Jeong SY & Cho TO (2016) Morphology and phylogeny of *Craspedocarpus jindoensis* sp. nov. (Cystocloniaceae, Rhodophyta) from Korea. *Phycologia*, 55: 611-618.
- Won BY, Yates KK, Fredericq S & Cho TO (2010) Characterization of macroalgal epiphytes on *Thalassia testudinum* and *Syringodium filiforme* seagrass in Tampa Bay, Florida. *Algae*, 25: 141-153.
- Wood RL & Luft JH (1965) The influence of buffer systems on fixation with osmium tetroxide. *J. Ultrastruc. Res.* 12: 22.
- Yang EC, Boo SM, Bhattacharya D, Saunders GW, Knoll AH, Fredericq S & Yoon HS (2016) Divergence time estimates and the evolution of major lineages in the florideophyte red algae. *Sci. Rep.* 6: 1-11.
- Yang MY & Kim MS (2017) Molecular analyses and reproductive structure to verify the generic relationships of *Hypnea* and *Calliblepharis* (Cystocloniaceae, Gigartinales), with proposal of *C. saidana* comb. nov. *Algae*, 32: 87-100.
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G & Bhattacharya D (2004) A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 809-818.
- Yoon HS, Hackett JD, Pinto G & Bhattacharya D (2002) The single, ancient origin of chromist plastids. *J. Phycol.* 38: 40-40.
- Zemke-White WL & Ohno M (1999) World seaweed utilisation: An end-of-century summary. *J. Appl. Phycol.* 11: 369-376.
- Zuccarello GC (2008) A fungal gall of *Catenella nipae* (Caulacanthaceae, Rhodophyta) and a review of *Catenellocolax leeuwenii*. *Bot. Mar.* 51(5): 436-440.

