



Universidad Austral de Chile

Escuela de Acuicultura y Pesquerías

**PROFESOR PATROCINANTE:
DR. RENATO WESTERMEIER H.
INSTITUTO DE ACUICULTURA**

**ESTUDIO DE LOS REQUERIMIENTOS DE IRRADIANCIA Y
TEMPERATURA PARA ETAPAS MICROSCOPICAS DE *Lessonia
trabeculata* (Phaeophyceae; Laminariales) DE POBLACIONES DEL
NORTE Y SUR DE CHILE: UNA VARIACIÓN ESTACIONAL**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Acuicultura

PEDRO FRANCISCO MURÚA ANDRADE

PUERTO MONTT – CHILE

2010

*Dedicado a la memoria de mi amigo y
hermano, Juan Eduardo Olavarría
Terán (†)*

AGRADECIMIENTOS

Agradecer, en primera instancia, el amor y apoyo infinito de Dios.

Con especial énfasis quiero agradecer a cada uno de los miembros de mi familia, en especial a mis padres, por hacer cada vez más corta la brecha de nuestras distancias y apoyarme en casi lo imposible. Sin ustedes nada de mi proyecto de vida hubiese sido posible.

Al Dr. Renato Westermeier y a David Patiño por enseñarme la ciencia y arte de la biología y cultivo de algas. No conformes con ello, me instruyeron en la escuela de la vida, a como desenvolverme como mejor alumno, profesional y mejor persona. La confianza entregada, así como también cada reto y espaldarazo durante estos años se agradecerá de por vida.

Junto con ellos, el personal del laboratorio de algas, grandes compañeros e incluso amigos. Lucia, Liliana, Carlos y Ailin fueron fundamentales para concretar metas y proyectos de vida, donde charlas y largas discusiones diarias fueron sinónimo de enseñanza, buen entendimiento y retroalimentación.

También quiero agradecer a Kahtrine por su inmenso amor y estoica paciencia. Sin tu apoyo incondicional hubiese sido muy difícil terminar el camino.

Como olvidar a los amigos: los de siempre, los nuevos y los que por alguna razón dejaron de estar. Todos ellos formaron una parte de mí, dándome fuerzas para seguir haciendo lo que más me gusta. Gracias Gabriela, Miguel, Juan Edo. Félix y Nitza.

A los investigadores de la comisión evaluadora, MSc. Miriam Seguel y Dr. José Luis Iriarte por sus valiosas sugerencias en revisión de esta tesis. Además, el apoyo y enseñanza durante el desarrollo de este trabajo de los investigadores Dr. Prof. Dieter G. Müller (Konstanz Universität) y Dra. Kjersti Sjøtun (Universitetet i Bergen) es también muy agradecido.

A las familias Andrade-Murúa, Arismendi-Andrade, Andrade-Maldonado y Marambio-Jorquera que me recibieron en sus casas como un miembro más, haciéndome sentir nuevamente la calidez de un hogar.

Finalmente, agradecer el apoyo económico a FONDEF de Conicyt y CORFO, a través de los proyectos “D04I1288” y “09PDAC-6896”.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN **1**

ABSTRACT **2**

1. INTRODUCCIÓN **3**

1.1. Hipótesis 6

1.2. Objetivos 7

1.2.1. Objetivo general 7

1.2.2. Objetivos específicos 7

2. MATERIALES Y MÉTODOS **8**

2.1. Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura para
la gametogénesis de *L. trabeculata*, y su variación estacional 8

2.1.1. Germinación de embriosporas 11

2.1.2. Fertilidad 12

2.1.3. Éxito reproductivo 12

2.2. Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura óptimos
para esporofitos de *L. trabeculata*, entre poblaciones del norte y sur
de Chile, y su respuesta en el crecimiento. 12

2.3. Crecimiento de esporofitos de *L. trabeculata* procedentes de distintas
localidades de Chile. 14

2.4. Análisis estadísticos 16

3.	RESULTADOS	17
3.1.	Ciclo de vida	17
3.2.	Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura para la gametogénesis de <i>L. trabeculata</i> , y su variación estacional.	20
3.2.1.	Germinación de embriosporas.	20
3.2.2.	Fertilidad.	25
3.2.3.	Éxito reproductivo.	29
3.3.	Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura óptimos para esporofitos de <i>L. trabeculata</i> , entre poblaciones del norte y sur de Chile, y su respuesta en el crecimiento.	33
3.4.	Crecimiento de esporofitos de <i>L. trabeculata</i> procedentes de distintas localidades de Chile.	35
<hr/>		
4.	DISCUSIÓN	37
5.	CONCLUSIONES	44
6.	REFERENCIAS	47
<hr/>		

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Localidades de obtención de esporas de <i>L. trabeculata</i> a lo largo de la costa de Chile.	9
Fig. 2. Inducción de la esporulación en <i>L. trabeculata</i> y montaje de experimentos.	10
Fig. 3 Unidades de cultivo para esporofitos tempranos de <i>L. trabeculata</i>	15
Fig. 4. Morfología de estadios tempranos de <i>L. trabeculata</i>	19
Fig. 5. Germinación de embriosporas de <i>L. trabeculata</i> (30 hrs post-liberación de zoosporas).	23
Fig. 6. Germinación de embriosporas de <i>L. trabeculata</i> (4 días post-liberación de zoosporas).	24
Fig. 7. Fertilidad de gametofitos femeninos de <i>L. trabeculata</i> (24 días post-liberación de zoosporas).	27
Fig. 8. Fertilidad de gametofitos femeninos de <i>L. trabeculata</i> (35 días post-liberación de zoosporas).	28
Fig. 9. Éxito reproductivo de gametofitos femeninos de <i>L. trabeculata</i> (24 días post-liberación de zoosporas).	31
Fig. 10. Éxito reproductivo de gametofitos femeninos de <i>L. trabeculata</i> (35 días post-liberación de zoosporas).	32
Fig. 11. Tasa de crecimiento relativo de esporofitos de <i>L. trabeculata</i> en 52 días de cultivo, bajo distintos regímenes de irradiancia y temperatura.	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación estadística de los factores temperatura, irradiancia (y su interacción temperatura-irradiancia), estación del año y localidad sobre la germinación de propágulos de <i>L. trabeculata</i> a las 30 hrs post-liberación.	21
Tabla 2. Comparación estadística de los factores temperatura, irradiancia (y su interacción temperatura-irradiancia), estación del año y localidad sobre la fertilidad de gametofitos femeninos de <i>L. trabeculata</i> a los 35 días post-activación.	26
Tabla 3. Comparación estadística de los factores temperatura, irradiancia (y su interacción temperatura-irradiancia), estación del año y localidad sobre el éxito reproductivo gametofitos femeninos de <i>L. trabeculata</i> a los 35 días post-activación.	30
Tabla 4. Análisis de varianza de tres vías del crecimiento (medido como TCR) de <i>Lessonia trabeculata</i> en cultivo para evaluar diferencias entre los diferentes tratamientos de localidad, temperatura e irradiancia, y las interacciones entre ellos.	33
Tabla 5. Comparación estadística (Test de Kruskal-Wallis y Post-hoc de Tukey no paramétrico) para el crecimiento de esporofitos de <i>L. trabeculata</i> (longitud de fronda a la semana 15 post-activación)	36

RESUMEN

El desarrollo de estadios iniciales de *Lessonia trabeculata* (Phaeophyta; Laminariales) de localidades del norte y sur de Chile (Bahía Inglesa y Maicolpué) fue medido bajo condiciones controladas de laboratorio. Se evaluó el efecto interactivo de la irradiancia ($6 - 100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura ($5 - 15^\circ\text{C}$) y la estación del año de origen de los propágulos sobre la germinación, fertilidad, éxito reproductivo y crecimiento de esporofitos tempranos. Además, se estimó el crecimiento de esporofitos de diferentes latitudes de Chile (Bahía Inglesa, Bahía Salado, Los Vilos, Totoral y Maicolpué). Efectos significativos de esos factores fueron encontrados sobre etapas pre-cigóticas, donde el efecto interactivo luz-temperatura fue el factor más importante que afectaba el desarrollo inicial. El mejor desarrollo fue obtenido bajo $10-15^\circ\text{C}$ y $40-70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independiente de la localidad de origen. Cambios en la viabilidad de esporas durante el año también fueron detectados. Esporas de primavera exhibieron índices reproductivos y de crecimiento máximos, potencial el cual decreció en estaciones subsecuentes. Además, las esporas liberadas durante el otoño no fueron viables, mostrando poca vigorosidad y mostrando altas mortalidades en pocos días. Al igual que en estudios previos, fue posible detectar pequeños patrones de aclimatación: esporas de verano se desarrollaron mejor en condiciones de irradiancia y temperatura relativamente altas, en contraste con esporas de invierno, las cuales requirieron condiciones más moderadas. Al igual que las etapas gametofíticas, en los esporofitos no se reportó un desarrollo ecotípico en función de la temperatura y/o irradiancia. Las mejores condiciones para el crecimiento fueron 15°C y $40-70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, también independiente de la localidad. Sin embargo, crecimientos diferenciales entre esporofitos de distintas localidades fueron detectados, donde el material de Bahía Salado tuvo un potencial mayor.

ABSTRACT

Development of *Lessonia trabeculata* (Phaeophyta; Laminariales) early stages from northern and southern Chile (Bahía Inglesa and Maicolpué) was measured under controlled laboratory conditions. It was assessed the interactive effects of irradiance ($6 - 100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperature ($5 - 15^\circ\text{C}$) and season of propagules origin on germination, fertility, reproductive success and embryos growth. Furthermore, growth of sporophytes from different latitudes of Chile (Bahía Inglesa, Bahía Salado, Los Vilos, Totoral and Maicolpué) was estimated. Significant effects of these factors were noted on pre-cigotic stages, where light-temperature interactive effect was the most important factor affecting initial development. The best performance was obtained under $10-15^\circ\text{C}$ and $40-70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independent of locality origin. Changes in spore viability throughout the year were detected also. Spring spores exhibited maximum reproductive and growth indexes, potential which decreased in subsequent seasons. Further, zoospores released during autumn were not viable, showing low vigor and expiring in few days. Likewise to previous trials, it was possible to detect little acclimatation patterns: spores from summer grew better in relatively high conditions of irradiance and temperature, in contrast to winter spores, which required moderate conditions. Likewise gametophytic stages, sporophytes did not report ecotypical development in function to temperature and/or irradiance. The best conditions for growth were 15°C and $40-70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independent of locality. However, differential growths among sporophytes from different locations were detected, where B. Salado propagules had the best potential.

1. INTRODUCCIÓN

El efecto de la calidad y cantidad de luz y temperatura han sido variables ampliamente investigados sobre los diferentes estadios de algas pardas Laminariales, demostrándose su fuerte influencia en procesos como germinación de esporas, desarrollo, crecimiento y maduración de gametofitos y esporofitos, morfología, productividad y distribución fitogeográfica de este taxón (Kain, 1979, Lüning & Neushul, 1978; Lüning 1980; 1981; 1990; Lüning & Freshwater 1988; Westermeier *et al.* 1989; Pakker *et al.* 1995). En estos trabajos, el gametofito se muestra como un elemento de alto rango de tolerancia a estas variables, sugiriéndose como uno de los responsables de la sobrevivencia de las poblaciones frente a cambios drásticos en el medio y dispersión anfiocéánica de algunas especies (Martínez 1999; Lüning & Freshwater 1988, Peters & Breeman 1992). Por otra parte, se ha detectado que en algunos, los requerimientos de luz y temperatura se modifican dentro de la misma especie, dependiendo de las características de la localidad donde se presenten y de la época del año que se obtengan (Lüning & Freshwater, 1988; Lee & Brinkhuis 1986; 1988). Más aún, los reclutamientos de estas algas parecieran presentar un patrón similar de variación latitudinal y estacional (Santelices *et al.* 1982; Tala *et al.* 2004), siendo afectados por variables ambientales y/o por variables intrínsecas a la especie algal.

Lessonia trabeculata Villouta & Santelices se extiende desde Perú Central (12°S) hasta Puerto Montt, Chile (40°LS), siendo reconocida además en Chiloé (Westermeier 1981), Magallanes y la costa Atlántica (Westermeier, datos no publicados). El talo puede alcanzar los 2,5 m de longitud, formando extensas praderas en la zona submareal que juegan un rol protagónico en la ecología comunitaria del lugar (Vásquez & Buschmann 1997; Villegas *et al.* 2007). Por otro lado, y desde

un punto de vista económico-social, es ampliamente usada en la industria del abalón como base de la dieta de los planteles en engorda, y como materia prima en la producción de alginatos, formando parte clave de las economías costeras de la zona norte de Chile (Vásquez *et al.* 2005; Vásquez 2008).

Como intento de desarrollar su cultivo, existen reportes realizados en la zona norte y sur de Chile, donde se han caracterizados las condiciones óptimas para el crecimiento y fecundidad de gametofitos y posterior crecimiento de individuos juveniles (Edding *et al.* 1990; Edding & Tala 2003; Westermeier *et al.* 2006). En ellos, se reportaron condiciones distintas para el desarrollo de los primeros estadios, existiendo diferencias notorias en la intensidad de luz y temperatura necesarias, contrastándose valores de $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y 15°C y $8-10^\circ \text{C}$, entre Norte y Sur respectivamente.

Diferenciación ecotípica entre algas Laminariales de la misma especie pero de distintas procedencias ha sido demostrada tanto en esporofitos como en gametofitos, para los requerimientos de luz, temperatura, nutrientes, profundidad y turbidez del agua (Gerard 1988; 1990; Gerard & Du Bois 1988). De los estudios existentes la mayoría detecta diferencias entre individuos de distinta población, donde poblaciones de latitudes bajas poseen requerimientos distintos que poblaciones de latitudes altas (Kain 1969; Novaczek 1984a; 1984b). La variación de estos requerimientos a nivel espacial, y temporal ha sido poco estudiada en especies chilenas de importancia salvo en esporofitos de *Lessonia nigrescens*, donde la tolerancia termal es claramente variable en función de la localidad (Martínez 1999). El efecto sobre especies de macroalgas con potencial en la acuicultura chilena aun es desconocido, salvo en *Macrocystis*

spp., donde *M. pyrifera* crece mejor en el sur y *M. integrifolia* mejor en localidades nortinas (Westermeier *et al.* 2010b).

El objetivo del presente trabajo es, en primera instancia, caracterizar el efecto de la irradiancia y temperatura sobre etapas tempranas de *Lessonia trabeculata*, y de la mano con lo anterior, una posible diferencia ecotípica respecto a estas variables. Además, se pretende determinar diferencias estacionales en la viabilidad de estos estadios tempranos, así como también cambios en los requerimientos para el desarrollo de estas variables. Los bajos crecimientos, densidades y productividades características de la especie sugieren una mayor investigación de la ecofisiología de este recurso de importancia comercial relacionada con las condiciones de cultivo (Westermeier *et al.* 2006; Edding *et al.* 1990). Adicionalmente, los conocimientos generados en este y otros estudios podrían ser utilizados ante una situación de repoblamiento de praderas sobreexplotadas, o desaparecidas frente a eventuales fenómenos de El Niño (ENSO).

1.1 Hipótesis

Dado la amplia distribución latitudinal de la especie y la variación de los reclutamientos de forma estacional, *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices presentaría diferencias en los requerimientos de luz y temperatura para los procesos ontogénicos previos a la formación del cigoto (germinación y fertilidad) y en la formación del mismo (éxito reproductivo), entre individuos provenientes de distintas localidades y de diferentes épocas del año. Asimismo, estos requerimientos deberían mantenerse para el desarrollo del esporofito originado del material estival.

No obstante, deberían existir diferencias en el crecimiento entre material proveniente de distintas localidades, considerando que el potencial de crecimiento de *L. trabeculata* variaría entre distintas poblaciones acorde a su construcción del genotipo, al igual que como ocurre para *Macrocystis pyrifera* de distintas procedencias (Westermeyer *et al.* 2010a; 2010b).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Determinar los requerimientos ambientales de irradiancia y temperatura óptimos para la gametogénesis y posterior embriogénesis de *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Describir el ciclo de vida de *L. trabeculata* bajo las diferentes condiciones experimentales simuladas.
2. Evaluar diferencias estacionales y latitudinales en los requerimientos de irradiancia, temperatura y su efecto interactivo en estadios tempranos pre-cigóticos de *L. trabeculata*.
3. Evaluar diferencias latitudinales en los requerimientos de irradiancia, temperatura y su efecto interactivo en esporofitos iniciales de *L. trabeculata*.
4. Determinar diferencias en el crecimiento para esporofitos iniciales de *L. trabeculata*, procedentes de distintas localidades.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esporofilas de *Lessonia trabeculata* fueron colectadas entre los meses de Octubre de 2009 y Agosto de 2010 en localidades de Bahía Inglesa (27°S 07'), al norte de Chile y Maicolpué (40°S 36'), en la zona sur del país (Fig. 1), en las cuatro estaciones del año (durante los meses de Octubre, Febrero, Mayo y Agosto) por buceo con sistema Hooka. Adicionalmente en la época de verano (Febrero) se recolectó en Bahía Salado (27°S 10'), Los Vilos (31°S 54') y Totoral (33°S 24'). El material reproductivo fue conservado a bajas temperaturas según lo descrito en Westermeier *et al.* (2005; 2006) y trasladadas al laboratorio de Macroalgas de La Universidad Austral de Chile, Sede Puerto Montt. Una vez allí, las plantas fueron limpiadas con agua dulce para eliminación de epifitos, secadas con papel absorbente, y conservadas por una noche a 10°C (Fig 2a). Al día siguiente fueron inmersas en bolsas plásticas estériles con 400 ml de medio de cultivo Provasoli (McLachan, 1973; Bold & Wynne, 1978) para inducir a la esporulación (Fig. 2b). La contabilización de esporas se realizó a través de una cámara de Neubauer o hematócitosmetro, donde entre $20 - 40 \times 10^4$ células ml^{-1} se consideró apropiado para su traspaso a las distintas unidades experimentales (Tala *et al.* 2004).

2.1 Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura para la gametogénesis de L. trabeculata, y su variación estacional

La siembra de esporas fue realizada a través de una adaptación a los trabajos reportados por Lüning (1980); Izquierdo *et al.* (2002) y Sjøtun & Schoschina (2002). Cinco ml de la solución de zoosporas fueron puestos en placas Petri de 3 cm de diámetro, en las cuales había 4-6 trozos de

cubreobjetos de 0.8 cm² de área en su interior. Las placas Petri fueron selladas con parafilm para evitar evaporación del agua y cambios en la salinidad posteriores, y dispuestas sobre una cámara de gradientes con una fuente luminosa de tubos fluorescentes de 20W de luz blanca fría (Fig. 2c) para simular las respectivas condiciones experimentales (10, 40, 70, 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia y 5, 10 y 15°C de temperatura; Fig. 2d). Cada tratamiento constó 4 réplicas (n = 4). Las placas fueron marcadas y cambiadas diariamente de posición dentro de su mismo tratamiento, a modo que la cantidad de luz y temperatura a la que fueran sometidas fuera homogénea entre réplicas. Este diseño se replicó para las 4 estaciones de año: primavera 2009, verano 2010, otoño 2010 e invierno 2010.

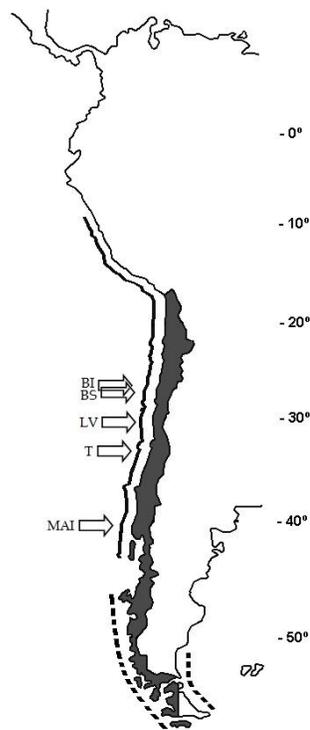


Figura 1. Localidades de obtención de esporas de *L. trabeculata* a lo largo de la costa de Chile. La línea ennegrecida representa la distribución geográfica reconocida de *L. trabeculata* y la línea punteada zonas de la distribución no reportadas para *L. trabeculata*. Las flechas muestran los lugares de procedencia del material reproductivo BI=Bahía Inglesa; BS=Bahía Salado; LV=Los Vilos; T=Totoral; MAI=Maicolpué;

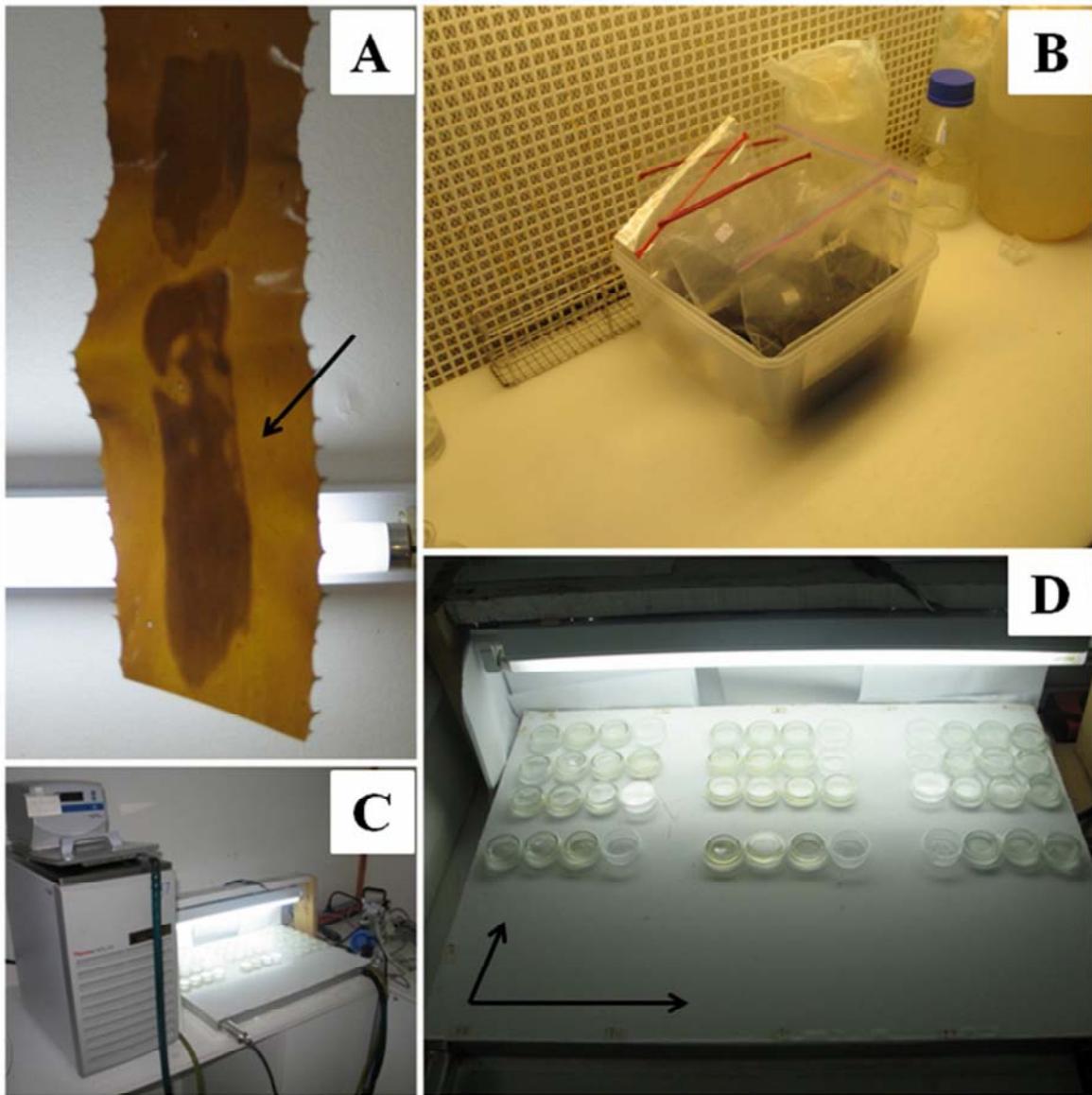


Figura 2. Inducción de la esporulación en *L. trabeculata* y montaje de experimentos. A. Esporofilas con soros esporangiales (flecha). B. inmersión de esporofilas en medio de cultivo PES, y liberación de esporas previo shock osmótico. C. cámara de gradientes con baño termostático (izquierda). El agua sale de este equipo e ingresa a la placa (de aluminio), donde la variación de temperatura ocurre de forma gradual. D. Vista frontal del diseño experimental en la placa de gradientes. La línea horizontal representa gradiente de temperatura, línea vertical el gradiente de luz.

Los recambios de medio de cultivo Provasoli se realizaron cada 7 días, extrayendo parcialmente el contenido acuoso de las placas Petri con pipetas Pasteur estériles, e insertando rápidamente medio de cultivo fresco de la misma forma, sin alterar las esporas fijadas a los trozos de cubreobjeto. Como no se observaron presencia de diatomeas no se adiciono óxido de Germanio al medio de cultivo como lo sugiere Lewin (1966) y Shea & Chopin (2007). Los muestreos se realizaron a las 30 hrs., 4 días, 24 días y 35 días post-liberación, cosechando un trozo de cubreobjeto de cada réplica con pinzas, el cual no volvió a reingresarse a las placas una vez extraído de ellas. En el seguimiento de las etapas del ciclo de vida y determinación de condiciones óptimas para la embriogénesis de *Lessonia trabeculata* se calcularon los siguientes indicadores: germinación (%), fertilidad (%) y éxito reproductivo (%) acorde a la metodología descrita en Lee & Brinkhuis (1986); Hoffmann *et al.* (1984) e Izquierdo *et al.* (2002), y a los objetivos planteados en este trabajo.

2.1.1 Germinación de embriosporas G (%)

El porcentaje de germinación de embriosporas (o esporas fijas al sustrato que perdieron los flagelos) se estableció caracterizando aleatoriamente 120 esporas consecutivas según el método del vecino más próximo (Ávila *et al.* 1985), distinguiendo entre las que no habían germinado pero ya estaban fijas al trozo de cubreobjeto (embriospóra) y las que habían formado el tubo de germinación, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$G (\%) = \frac{100 (\text{N}^\circ \text{ Total de esporas con tubo de germinación})}{(\text{N}^\circ \text{ Total de esporas})}$$

2.1.2 Fertilidad F (%)

Para determinar el grado de formación de gametofitos fértiles se determinó el porcentaje de fertilidad. La fertilidad se obtuvo calculando el porcentaje de gametofitos o células primarias (en el caso que hubiesen) que contenían oogonios fecundados (o esporofitos iniciales de pocas células) y sin fecundar respecto al total de 120 gametofitos femeninos del total de cada muestra.

$$F (\%) = \frac{100 (\text{N}^\circ \text{ Total de gametofitos con oogonio, células huevo o esporofito inicial})}{(\text{N}^\circ \text{ Total de gametofitos femeninos})}$$

2.1.3 Éxito reproductivo ER (%)

El porcentaje de formación de nuevos individuos, o éxito reproductivo, se determinó con el indicador de éxito reproductivo, calculando el total gametofitos femeninos que contenían células huevos liberadas o esporofitos pluricelulares, con respecto a un total de 120 gametofitos con oogonio fecundado, sin fecundar o estériles que contenían las muestras.

$$ER (\%) = \frac{100 (\text{N}^\circ \text{ Total de gametofitos con células huevo o esporofito inicial})}{(\text{N}^\circ \text{ Total de gametofitos femeninos})}$$

2.2 Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura óptimos para esporofitos de *L. trabeculata*, entre poblaciones del norte y sur de Chile, y su respuesta en el crecimiento.

La estimación de los requerimientos óptimos para el crecimiento de *Lessonia trabeculata* fueron determinados en bolsas plásticas como unidades experimentales, acorde a la metodología descrita

en Westermeier *et al.* (2006). Del material reproductivo proveniente de la época de verano se destinaron bolsas plásticas estériles con 80 ml de medio cultivo PES (cada bolsa fue una réplica, 3 réplicas por tratamiento), con esporas a una densidad de $20 - 40 \times 10^4$ células ml^{-1} . Dado que la intención fue determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de esporofitos, se reajustaron las condiciones de irradiancia (70, 40, 10 y $6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura (10 y 15°C) considerando algunos resultados preliminares. La irradiancia mas baja ($10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fue cambiada por una de $6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con la intención de observar algún grado de esterilidad o “hibernación”, como lo describen Ávila *et al.* (1995), Hoffmann & Santelices (1991) y Santelices *et al.* (2002) para etapas iniciales de *Lessonia nigrescens* en pozas intermareales.

Las observaciones del estado de los cultivos, así como los muestreos de esporofitos (n=30 por réplica) fueron hechos semanalmente, al igual que los recambios de medio de cultivo PES. Este último consistió en hacer decantar las muestras en botellas de 100 ml, descartando el sobrenadante de agua, rellenando con medio de cultivo fresco y devolviendo a la bolsa los gametofitos o esporofitos según corresponda. Adicionalmente se incorporó $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de óxido de germanio (GeO_2) para inhibir el crecimiento de diatomeas durante etapas previas a la formación de células huevo, y evitar con ello muerte prematura de los cultivos.

Cuando los esporofitos eran visibles al ojo desnudo, fueron puestos en unidades de cultivo más complejas, botellas de 0,5, 1, 2 y 5 l, las cuales incluían movimiento de aguas y aireación constante (Westermeier *et al.* 2006). Tanto el recambio de aguas como frecuencia de muestreos ocurrió de forma similar que en las bolsas de cultivo. Con los datos de longitud semanal se calculó una tasa de elongación o crecimiento relativo (TCR), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{TCR (\% dia}^{-1}\text{)} = \frac{100 (\text{Ln } L_{\text{final}} - \text{Ln } L_{\text{inicial}})}{\Delta t}$$

Donde $\text{Ln } L_{\text{final}}$ es el logaritmo natural de la longitud final alcanzada en la prueba experimental, $\text{Ln } L_{\text{inicial}}$ el logaritmo natural de la longitud inicial de los esporofitos o células huevos, y Δt el periodo experimental de 52 días (Evans 1992). Tanto el protocolo para recambio de agua y metodología de muestreos fue igual que en la prueba anterior.

2.3 Crecimiento de esporofitos de *L. trabeculata* procedentes de distintas localidades de Chile

Se evaluó, bajo una condición de irradiancia y temperatura ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 15°C) el tiempo de aparición de esporofitos iniciales y crecimiento de los mismos para cinco inóculos de procedencias distintas (Bahía Inglesa, B. Salado, Los Vilos, Totoral y Maicolpué). La activación de los inóculos fue de manera similar que en la prueba anterior, al igual que los recambios de agua. Los muestreos durante el primer mes fueron una vez por día, y cuando aparecieron los primeros esporofitos fueron semanales. Las unidades de cultivo, consistieron en bolsas hasta ver esporofitos desnudos y después puestos en unidades mayores (botellas con aireación y movimiento de agua), de acuerdo a Westermeier *et al.* (2006).

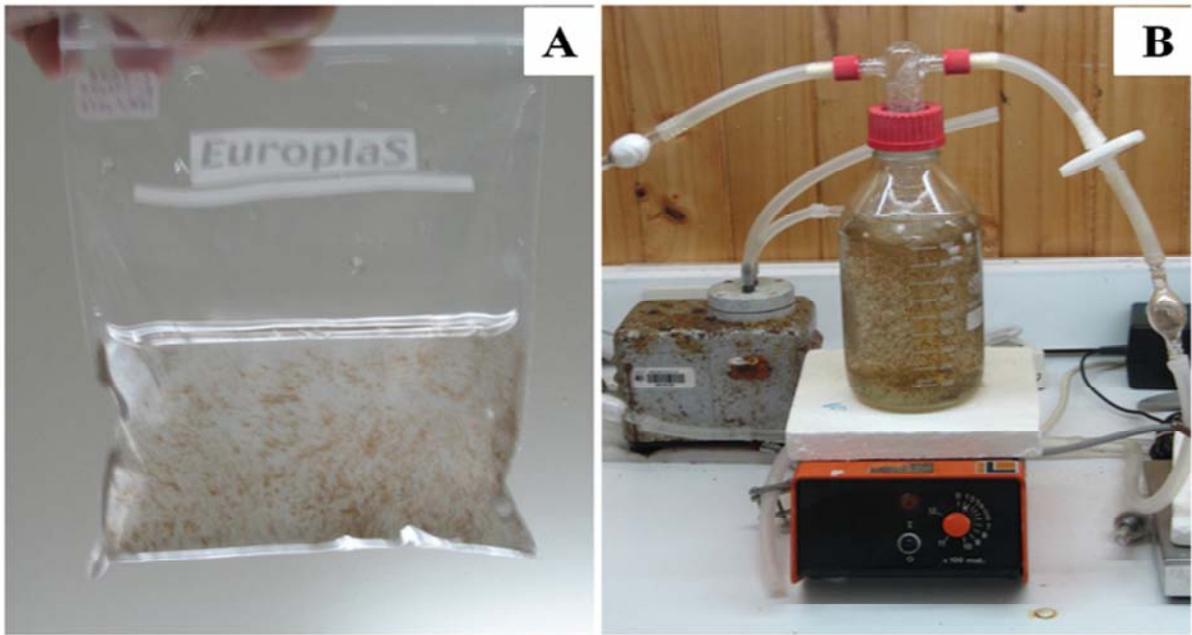


Figura 3. Unidades de cultivo para esporofitos tempranos de *L. trabeculata* (sensu Westermeier *et al.* 2006). A. bolsa estéril de 80 ml. B. botella de 1 L sobre un agitador magnético (parte inferior).

2.4 Análisis estadístico

Para el desarrollo de los análisis estadísticos se utilizaron los software STATISTICA® (versión 98) y SIGMASTAT® 3.0, con un nivel de significancia del 5%. Todos los datos fueron sometidos a una prueba de homogeneidad de varianza (Test de Bartlett).

Se realizó un análisis de varianza de dos vías con los factores de temperatura e irradiancia para los parámetros de germinación G (%), fertilidad F (%) y éxito reproductivo ER (%), los cuáles previamente fueron sometidos a una transformación angular (Zar 1999). Para los mismos índices, el factor estación se realizó un análisis de varianza no paramétrico de una vía de Kruskal Wallis y para el factor localidad un análisis de Mann – Whitney (Zar 1999) Para las pruebas de evaluación del efecto luz-temperatura sobre el crecimiento de esporofitos del norte y sur de Chile, las diferentes tasas de elongación TCR fueron comparadas a través de análisis de varianza paramétrico, mientras que las longitudes finales de los esporofitos de las 5 localidades cultivadas en este estudio fueron comparadas mediante un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y posterior prueba de Tukey.

3. RESULTADOS

3.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Lessonia trabeculata* consta de un ciclo bifásico heteromórfico. El esporofito macroscópico diploide forma esporas en los soros esporangiales, los cuales se observan como manchas en las esporofilas (Fig. 2a). Después de la inducción a la esporulación se observaron esporas con buena movilidad entre 30 y 120 min, las cuales a las 30 hrs post-liberación presentaron en la mayoría de los tratamientos un gran porcentaje de fijación al sustrato, creciendo hasta 10 μm de diámetro en los días sucesivos. Las embriosporas, una vez asentadas empiezan a germinar, proceso que ocurrió independiente de las condiciones simuladas, de la época de año y de la localidad de origen. La germinación se observa como la formación de una protuberancia llamada tubo de germinación (Fig. 4a) y el contenido citoplasmático de la espora es vaciado en una segunda célula: la célula primaria del gametofito, principal indicador de que el proceso ontogénico dio comienzo (Fig. 4b).

Como resultado se observaron dos patrones de desarrollo para las estructuras femeninas, también descrito para algas Laminariales: (1) gametofitos multicelulares filamentosos y (2) gametofitos unicelulares. La formación de gametofitos multicelulares se observó como divisiones sucesivas de la célula primaria con formación de ramificaciones (Fig. 4c; 4d), en las cuales podía haber uno o más oogonios por gametofito al momento de alcanzar la fertilidad. Por otro lado, los gametofitos unicelulares se observaron con un crecimiento de la célula primaria hasta las 20 μm de diámetro y la formación de un oogonio único. Sin embargo, se presentaron sólo en ciertas

condiciones de cultivo, y en cantidades despreciables respecto a los gametofitos multicelulares. Los gametofitos masculinos, en cambio, siempre tuvieron una estructura filamentosa, siendo en algunos casos de pocas células, o bien de más de 5 o más células antes de formar anteridios (Fig. 4e).

La aparición de oogonios varió fuertemente entre los diferentes tratamientos, pero en condiciones apropiadas de cultivo se observó fertilidad a partir de los 15 días de cultivo. Asimismo, células huevos fueron visibles a partir del día 20 en las mejores condiciones. El cigoto por lo general una vez formado es liberado del gametofito femenino, pero permanece muy cerca del oogonio que lo contuvo (Fig. 4f). El desarrollo del esporofito ocurre similar al reportado para algas del mismo orden, con sucesivas divisiones transversales (o paralelas al sustrato; Fig. 4g), siguiendo de divisiones longitudinales para dar origen finalmente a un talo monostromático del esporofito inicial (Fig. 4h).

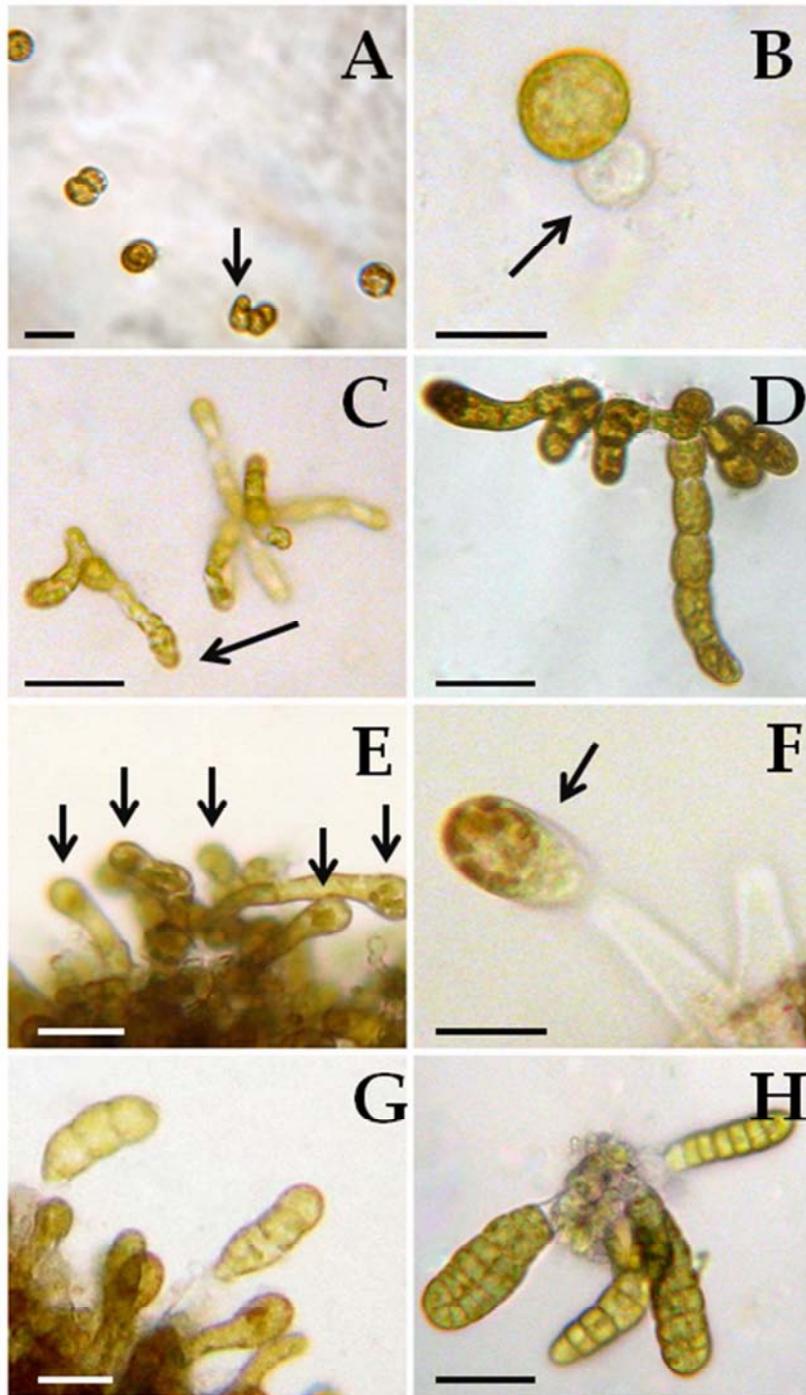


Fig. 4. Morfología de estadios tempranos de *L. trabeculata*. A) Embriosporas con tubo de germinación (flecha). Escala = 8 μ m. B) Célula primaria del gametofito femenino adherida a la espora vacía que la originó (flecha). Escala = 6 μ m. C) Gametofito masculino con anteridio en su sección apical (flecha). Escala = 16 μ m. D) Gametofito femenino estéril en fase de crecimiento. Escala = 16 μ m. E) Gametogénesis avanzada: gametofito femenino fértil de *L. trabeculata*, con oogonios en su sección apical. Escala = 15 μ m. F) - G) liberación de la célula huevo post-fecundación y esporofito inicial. Escala = 20 μ m. H) Esporofitos tempranos de *L. trabeculata* con gametofitos residuales. Escala = 40 μ m.

3.2 Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura para la gametogénesis de *L. trabeculata*, y su variación estacional

3.2.1 Germinación de embriosporas

El desarrollo de las fases microscópicas de *L. trabeculata* presentó variaciones a nivel estacional y latitudinal, además de afectadas considerablemente por el efecto irradiancia-temperatura (tabla 1). Para propágulos de Bahía Inglesa, la germinación de esporas varió fuertemente a nivel estacional, mostrando una tendencia cíclica. En la temporada primavera la germinación fue máxima (20 – 75%; Fig. 5A), potencial el cual disminuyó de forma sucesiva en verano (2 – 50%; Fig. 5B), y posteriormente en otoño, donde fue casi nulo (1 – 8%; Fig. 5C). En invierno, en cambio, vuelve a readquirir su vitalidad y potencial de desarrollo (3 – 40%; Fig. 5D). Por otro lado, embriosporas de Maicolpué mostraron una mayor vitalidad en cuanto a germinación, pero con la misma tendencia estacional que el material de B. Inglesa. Los valores de germinación alcanzados para 30 hrs. (post-liberación) fueron 35 – 90% en primavera (Fig. 5E), 30 – 80% en verano (Fig. 5F), 5 – 25% en otoño (Fig. 5G) y 40 – 60% en invierno (Fig. 5H).

El efecto interactivo de la irradiancia y la temperatura también fue significativo en la germinación de *L. trabeculata* ($p < 0,05$; tabla 1). En el material de B. Inglesa los mayores valores de germinación fueron detectados a 15°C para el material de verano y 10°C para el material del resto del año, y la irradiancia óptima varió entre 40 y 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aunque no varió significativamente su efecto dentro del gradiente estudiado (10-100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $p > 0,05$). Estas condiciones se repiten para material de Maicolpué, donde las temperaturas de 15°C fueron óptimas en primavera y verano y 10°C en otoño e invierno. Bajo el tratamiento de baja

temperatura (5°C) se observó cualitativamente una disminución considerable de esporas, además de un retraso significativo en la germinación de las mismas.

Tabla 1. Comparación estadística de los factores temperatura, irradiancia (y su interacción temperatura-irradiancia), estación del año y localidad sobre la germinación de propágulos de *L. trabeculata* a las 30 hrs post-liberación.

++ $p < 0,001$; + $p < 0,05$; - $p > 0,05$.

	B. Inglesa			Maicolpué		
	gL	F	p	gL	F	p
Temperatura*	2	3,4128	+	2	0,178	-
Irradiancia*	3	0,4671	-	3	0,381	-
Temperatura x Irradiancia*	6	7,4276	++	6	6,260	++
Error	180			180		
	gL	H	p	gL	H	p
	Estación del año**	3	121,956	++	3	116,991
	U		Z	p		
	Localidad***	8844,5		-8,8159	++	

* Análisis de varianza paramétrico de 2 vías

** Prueba de Kruskal Wallis

*** Prueba de Mann - Whitney

En general, el patrón de desarrollo de germinación de esporas a los 4 días de cultivo se mantiene para las condiciones óptimas encontradas con anterioridad (Fig. 6). En la estación de otoño la mortalidad de esporas es evidente, muriéndose gran parte del material de B. Inglesa y la totalidad de Maicolpué. Los tratamientos con temperaturas de 5°C empiezan a generar un efecto similar en el desarrollo de los propágulos de ambas localidades, mostrando en las esporas una alta mortalidad y/o un bajo desarrollo. Por otro lado, en muchos tratamientos cercanos a los “óptimos” la germinación se equipara con las máximas. Las germinaciones máximas son

cercanas al 80% en *B. Inglesa* (Fig. 6A-D) y de 100% para esporas de Maicolpué (Fig. 6E-H), bajo estas condiciones “favorables”.

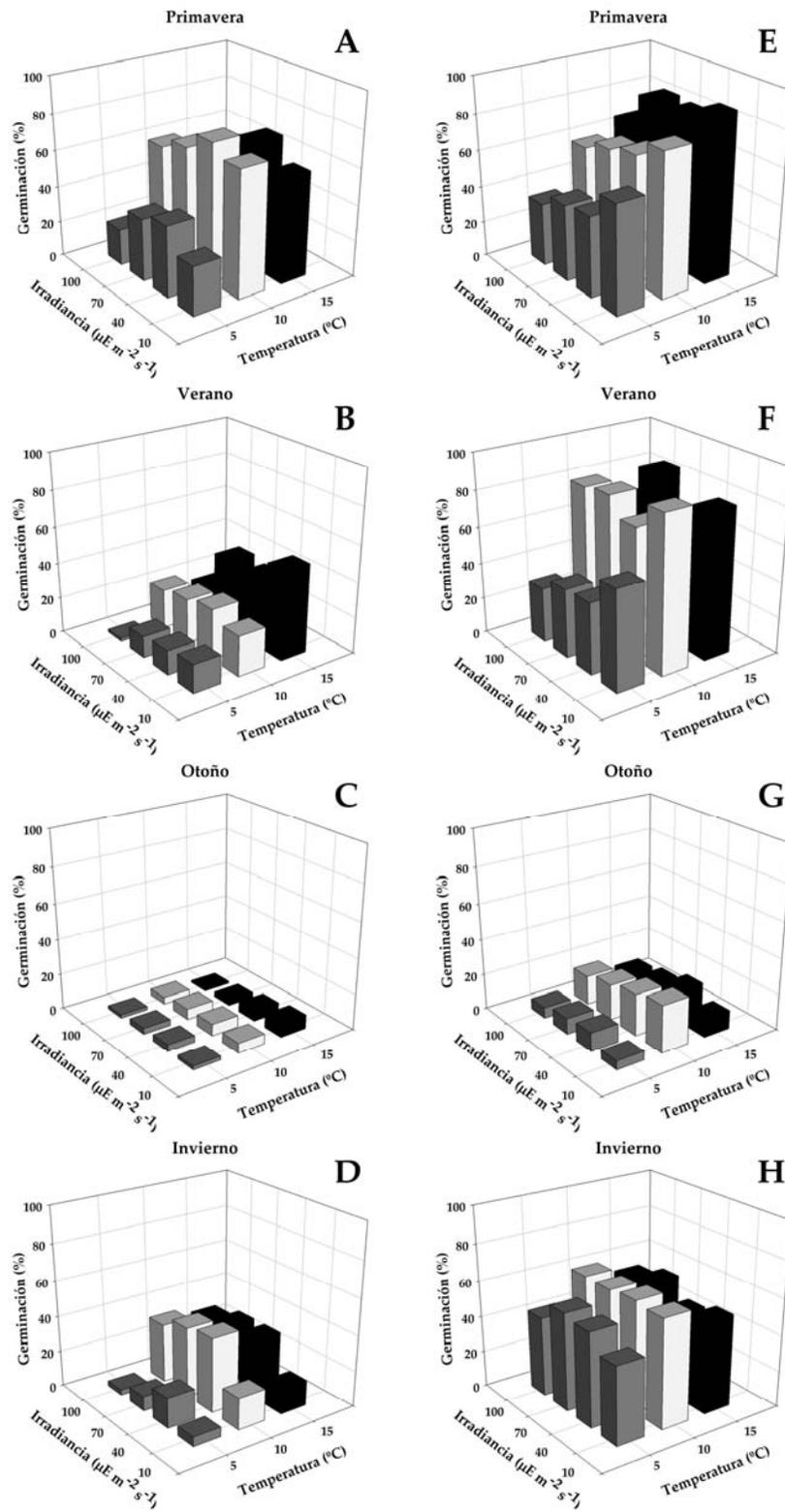


Figura 5. Germinación de embriosporas de *L. trabeculata* (30 hrs post-liberación de zoosporas) procedente de B. Inglesa (A-D) y Maicolpué (E-H), en relación a la estación del año, irradiancia y temperatura.

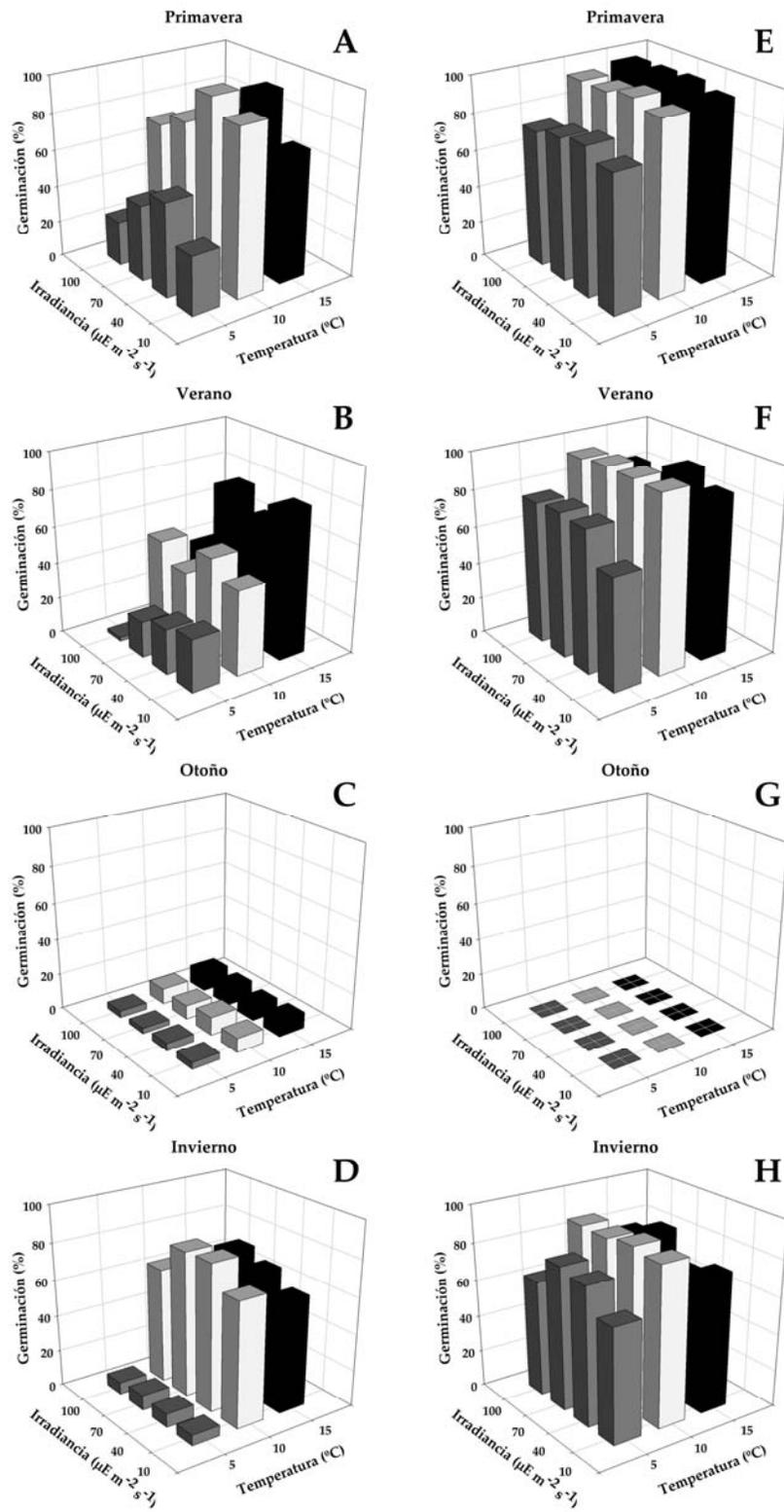


Figura 6. Germinación de embriosporas de *L. trabeculata* (4 días post-liberación de zoosporas) procedente de B. Inglesa (A-D) y Maicolpué (E-H), en relación a la estación del año, irradiancia y temperatura.

3.2.2 Fertilidad

La formación de oogonios en los gametofitos femeninos se originó en condiciones más estrechas que las de germinación, con una gran variación a nivel estacional ($p < 0,05$; tabla 2). La tendencia de “vigorosidad” exhibida por las esporas se repite de manera similar a la germinación, tanto para material proveniente de B. Inglesa como de Maicolpué. Sin embargo, la temperatura afecta significativamente el grado de fertilidad entre los distintos tratamientos. Los propágulos de la localidad norte (BI) obtenidos en primavera fueron altamente fértiles, apreciándose los primeras células huevos a los 15 días post-liberación. A los 24 días, la formación de oogonios provenientes de esta temporada fue lograda por entre 30 – 95% de los gametofitos femeninos totales de las respectivas muestras (Fig. 7A). En las otras estaciones del año la viabilidad fue decreciendo: en verano e invierno los valores oscilaron entre 10 – 50% y 13 – 60% respectivamente, mientras que en otoño las muestras no fueron viables, muriendo durante la ejecución del estudio (Fig. 7B, C, D). Los gametofitos provenientes de Maicolpué mostraron la misma viabilidad estacional, logrando las mayores fertilidades durante primavera (10 – 65%; Fig. 7E). En verano este potencial reproductivo decreció (3 – 14%; Fig. 7F) hasta alcanzar los mínimos en otoño, donde no fueron viables (Fig. 7G). La fertilidad se restableció para material proveniente de meses invernales (3 – 30% Fig. 7H).

Diferencias entre ambas poblaciones estudiadas también fueron detectadas (Tabla 2, Fig. 8). En material proveniente de Maicolpué, las condiciones fueron aun más estrechas, y en general mostró un potencial reproductivo mucho menor que los gametofitos de B. Inglesa. Esta última logró formar oogonios entre 10-15°C, y en primavera incluso a 5°C. Las condiciones de irradiancia tampoco fueron limitantes, con formación de oogonios entre 10 – 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A

los 35 días post- activación la tendencia descrita se mantiene, con B. Inglesa mostrando mayores fertilidades que Maicolpué, donde primavera es la época que manifiesta la mayor vitalidad y calidad reproductiva de los gametofitos femeninos. A pesar de ello fue posible detectar que en las estaciones de primavera e invierno las condiciones de temperatura óptimas para la gametogénesis en B. Inglesa y Maicolpué fueron 10°C (Fig. 8A, D; E; H), condiciones que cambian a 15°C durante la época de verano. La irradiancia de 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostró ser la que desencadenó mejores resultados en fertilidad, aunque no se detectaron diferencias estadísticas con los otros tratamientos de luz, salvo para material de Maicolpué, cuyo desarrollo fue influenciado por todos gran parte de los tratamientos simulados.

Tabla 2. Comparación estadístico de los factores temperatura, irradiancia (y su interacción temperatura-irradiancia), estación del año y localidad sobre la fertilidad de gametofitos femeninos de *L. trabeculata* a los 35 días post-activación. ++ $p < 0,001$; + $p < 0,05$; - $p > 0,05$.

	B. Inglesa			Maicolpué		
	gL	F	p	gL	F	p
Temperatura*	2	4,6794	+	2	4,1820	+
Irradiancia*	3	0,7343	-	3	5,3810	+
Temperatura x Irradiancia*	6	6,4129	++	6	20,1481	++
Error	154			154		
	gL	H	p	gL	H	p
Estación del año**	3	107,235	++	3	33,6297	++
	U		Z	p		
Localidad***	10592,5		3,6428	++		

* Análisis de varianza paramétrico de 2 vías

** Prueba de Kruskal Wallis

*** Prueba de Mann - Whitney

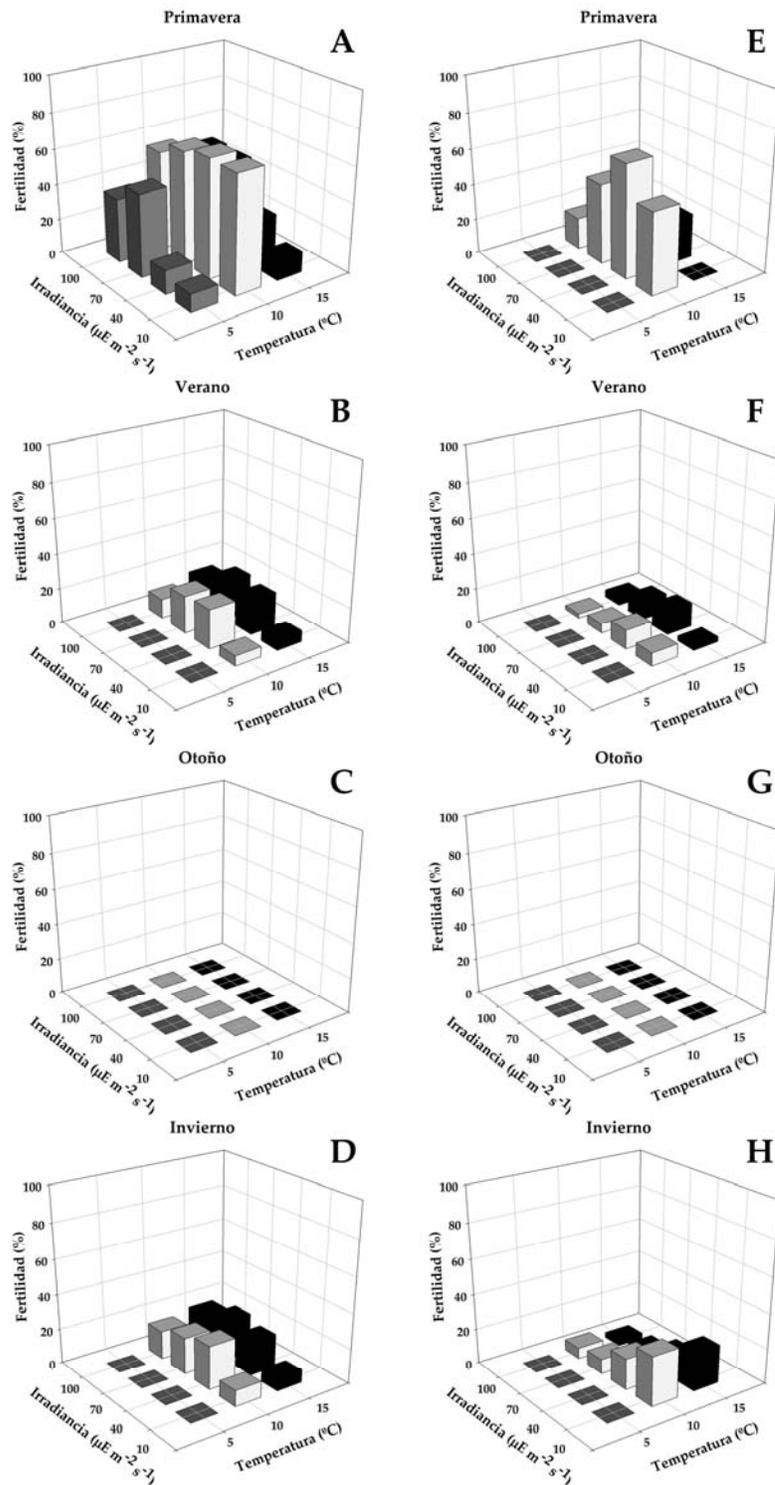


Figura 7. Fertilidad de gametofitos femeninos de *L. trabeculata* (24 días post-liberación de zoosporas) procedente de B. Inglesa (A-D) y Maicolpué (E-H), en relación a la estación del año, irradiancia y temperatura.

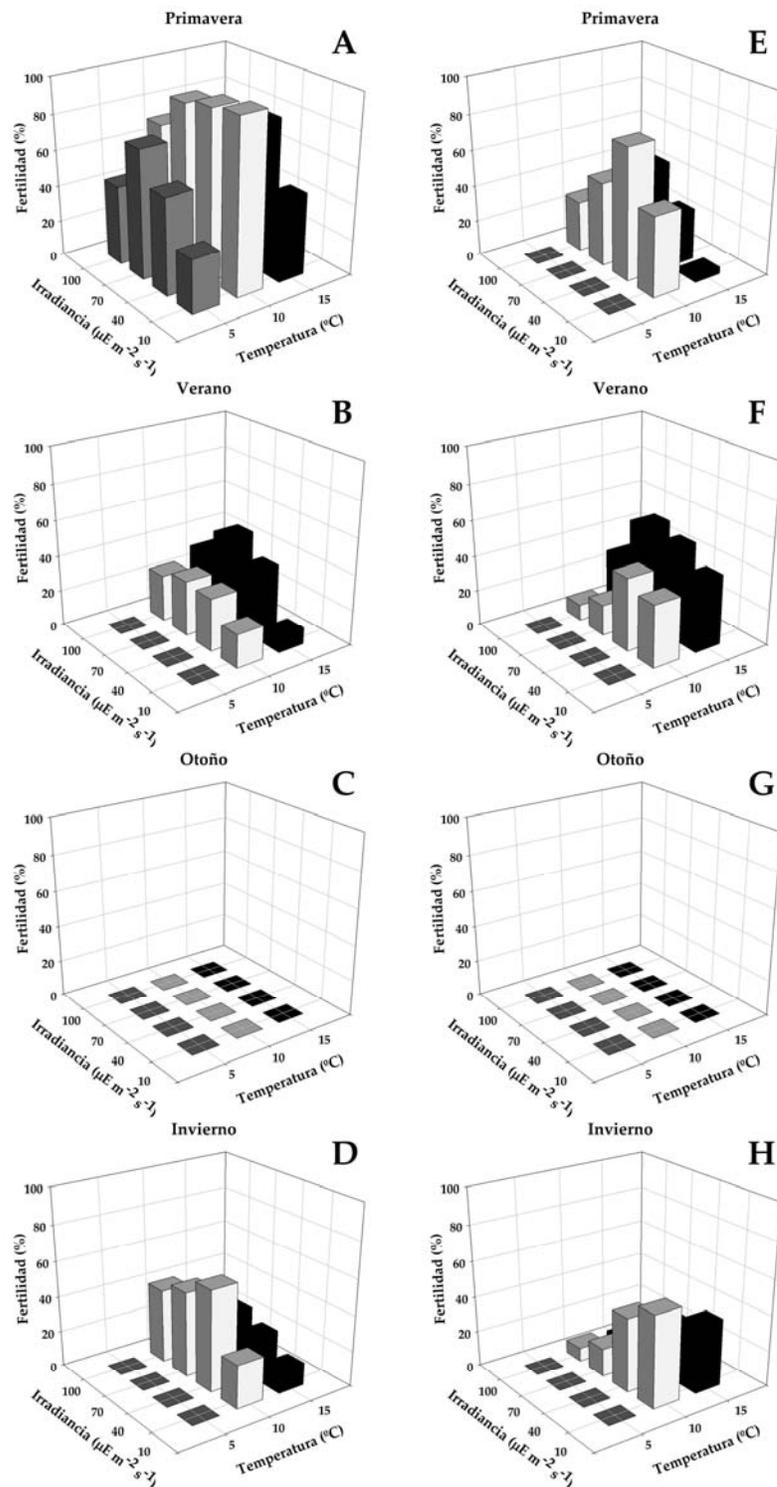


Figura 8. Fertilidad de gametofitos femeninos de *L. trabeculata* (35 días post-liberación de zoosporas) procedente de B. Inglesa (A-D) y Maicolpué (E-H), en relación a la estación del año, irradiancia y temperatura.

3.2.3 Éxito reproductivo

El grado de formación de nuevos individuos posterior a la gametogénesis, llamado éxito reproductivo, mostró diferencias significativas a nivel norte-sur y entre las distintas estaciones del año. Además, el efecto de luz, temperatura y su interacción, también fue diferencial entre los distintos tratamientos (Tabla 3). *B. Inglesa* se vio afectada básicamente por la temperatura. Así, en la época de primavera, la formación de cigotos y esporofitos iniciales de material de esta localidad fue máxima, detectándose los primeros individuos en 20 a 25 días de cultivo. Para los 24 días de cultivo, este material primaveral fue el más prolífico y el de mayor tolerancia a las condiciones de luz y temperatura simuladas, con valores de éxito reproductivo que fluctuaron entre 5 y 56% (Fig. 9A). En verano e invierno el éxito reproductivo alcanzado fue significativamente menor que en primavera con valores entre 2 – 6% y 2 – 7% respectivamente (Fig. 9B; D), mientras que en otoño no hay registros por mortalidad masiva (Fig. 9C). Los propágulos proveniente de Maicolpué se comportaron consecuentes respecto a la fertilidad mencionada previamente, generando células huevo en condiciones distintas respecto a las de *B. Inglesa* donde el efecto de la temperatura, irradiancia y la interacción entre ambos factores fue significativo ($p < 0,05$; Tabla 3). Los valores variaron de forma estacional, oscilando entre 9 – 35% en primavera, 1 – 15% en verano, una mortalidad masiva en otoño y 1 – 13% en invierno (Fig. 9E; F; G; H).

Este patrón estacional se mantiene a los 35 días de cultivo. En primavera el éxito reproductivo fue máximo (93% en *B. Inglesa* y 47% en Maicolpué; Fig. 10A; E), mientras que en otoño fue nulo (Fig. 10C; G). Tanto en invierno como en verano no superaron las 40 y 30% respectivamente, donde las condiciones que gatillaron la mayor gametogénesis y posterior

formación del cigoto fueron distintas, siendo más altas en verano y más bajas en invierno (Fig. 10 B; D; F; H). Las condiciones óptimas para el éxito reproductivo fueron 10°C en las épocas de invierno y primavera y de 15°C en la época de verano, mientras que la condiciones de irradiancia variaron de 10 – 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en invierno y entre 40 – 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en primavera y verano. La irradiancia, sin embargo, solo fue significativa en el desarrollo de material de Maicolpué (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación estadística de los factores temperatura, irradiancia (y su interacción temperatura-irradiancia), estación del año y localidad sobre el éxito reproductivo gametofitos femeninos de *L. trabeculata* a los 35 días post-activación. ++ $p < 0,001$; + $p < 0,05$; – $p > 0,05$.

	B. Inglesa			Maicolpué		
	gL	F	p	gL	F	p
Temperatura*	2	3,2783	+	2	13,5885	++
Irradiancia*	3	0,7386	⊠	3	7,3594	++
Temperatura x Irradiancia*	6	1,2163	⊠	6	22,7050	++
Error	150			150		
	gL	H	p	gL	H	p
Estación del año**	3	115,236	++	3	28,9215	++
	U		Z	p		
Localidad***	11118,5		2,29094	+		

* Análisis de varianza paramétrico de 2 vías

** Prueba de Kruskal Wallis

*** Prueba de Mann - Whitney

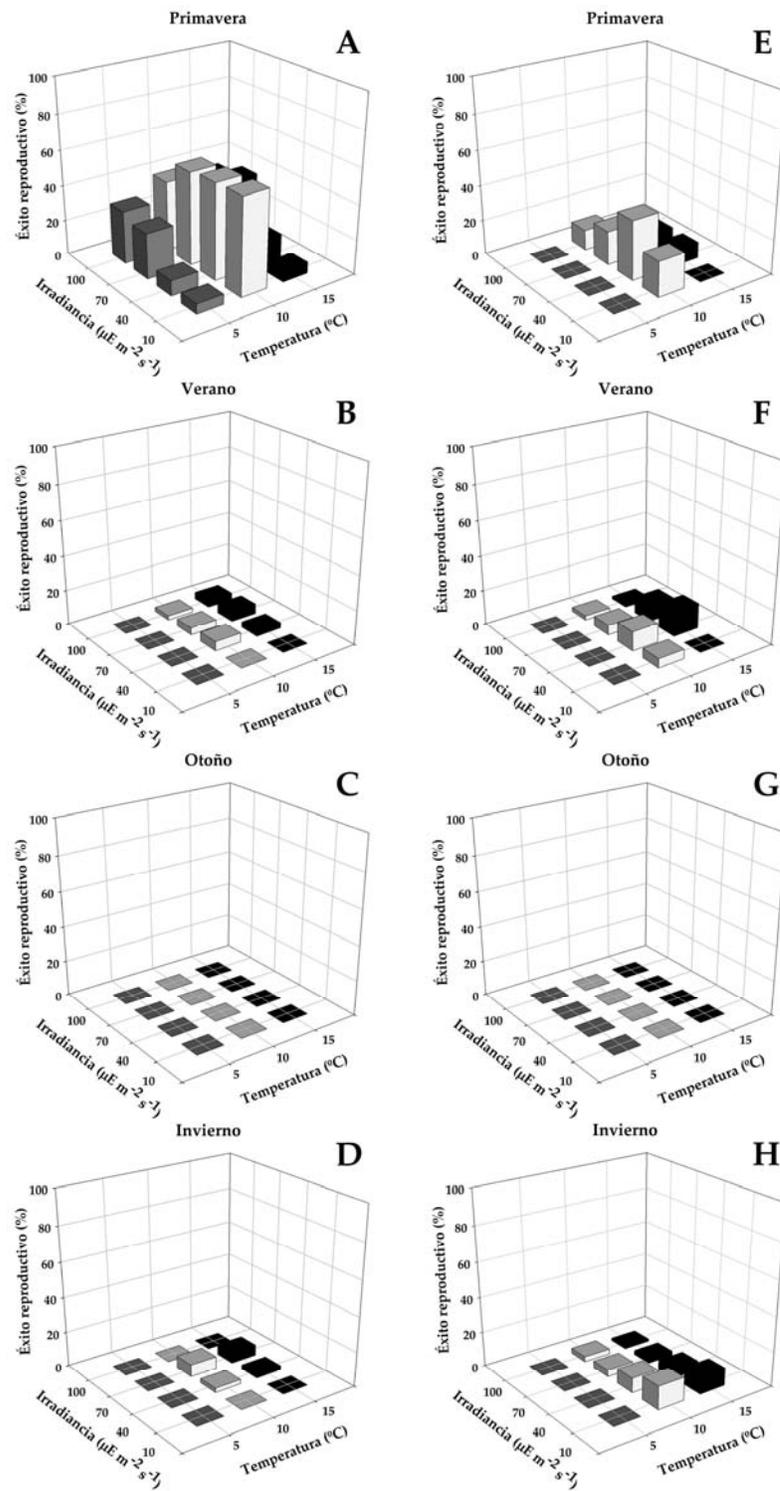


Figura 9. Éxito reproductivo de gametofitos femeninos de *L. trabeculata* (24 días post-liberación de zoosporas) procedente de B. Inglesa (A-D) y Maicolpué (E-H), en relación a la estación del año, irradiancia y temperatura.

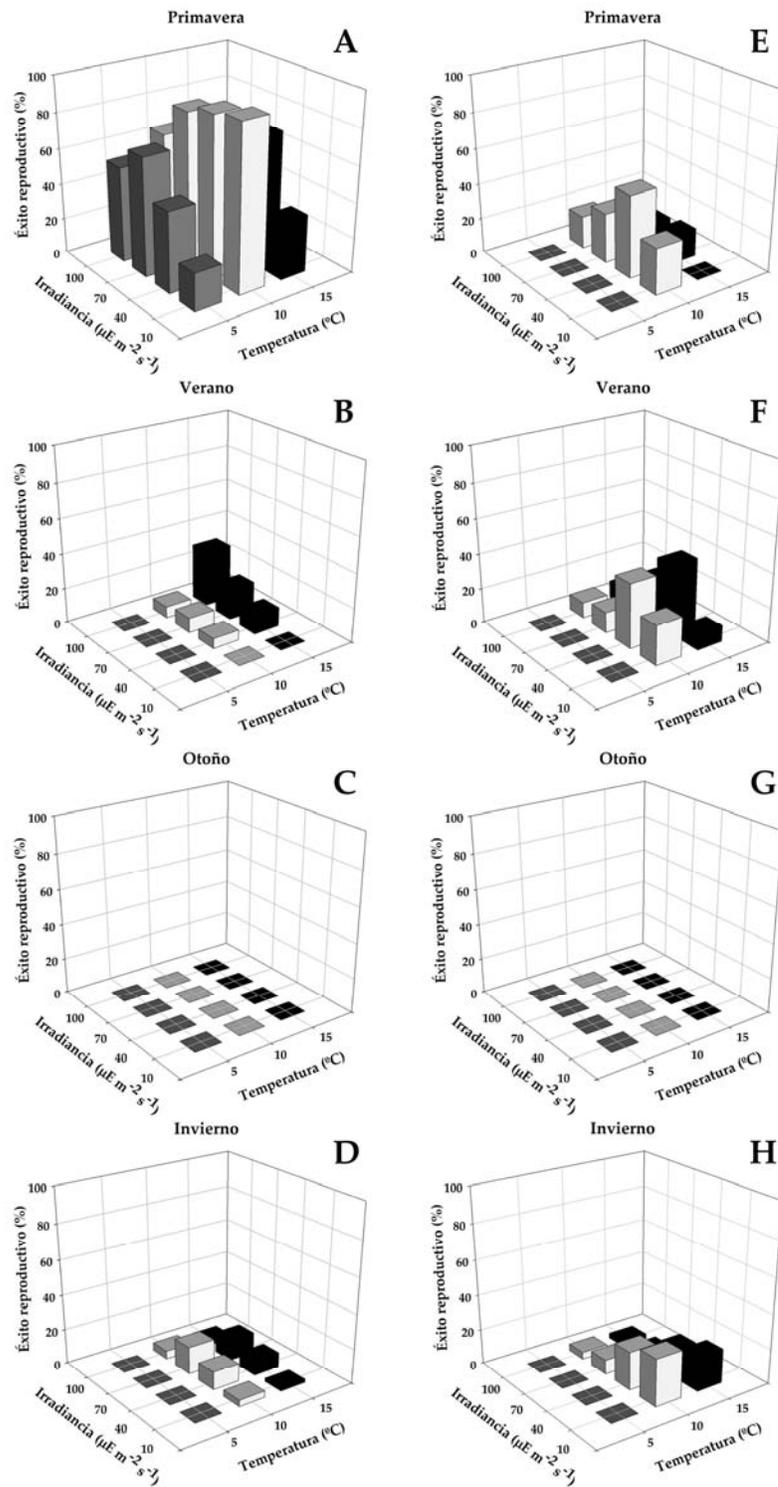


Figura 10. Éxito reproductivo de gametofitos femeninos de *L. trabeculata* (35 días post-liberación de zoosporas) procedente de B. Inglesa (A-D) y Maicolpué (E-H), en relación a la estación del año, irradiancia y temperatura.

3.3 Estudio de los requerimientos de irradiancia y temperatura óptimos para esporofitos de *L. trabeculata*, entre poblaciones del norte y sur de Chile, y su respuesta en el crecimiento.

Los esporofitos de *L. trabeculata* tuvieron un crecimiento diferencial en función de la temperatura e irradiancia, donde el crecimiento óptimo se alcanzó a 40-70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 15°C, independiente de la localidad de origen. Sin embargo, para esporofitos de Maicolpué el crecimiento fue relativamente mayor que para los de B. Inglesa. En estas condiciones las plantas crecieron entre 12 – 12,8% día^{-1} . A 10 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la aparición y crecimiento de esporofitos se ve significativamente retrasado (TCR = 7 – 9 % día^{-1}). Por otro lado, a 6 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los gametofitos no alcanzan la fertilidad. De acuerdo al ANOVA realizado, se encontraron diferencias significativas a nivel de localidad, irradiancia, temperatura, y sus interacciones, a excepción del efecto combinado entre estas tres variables, ($p = 0,47$; tabla 4).

Tabla 4. Análisis de varianza de tres vías del crecimiento (medido como TCR) de *Lessonia trabeculata* en cultivo para evaluar diferencias entre los diferentes tratamientos de localidad, temperatura e irradiancia, y las interacciones entre ellos. ++ $p < 0,001$; + $p < 0,05$; – $p > 0,05$

Factor(es)	gL	F	p
Localidad	1	53,3	++
Temperatura	1	150,4	++
Irradiancia	3	564,7	++
Localidad*Temperatura	1	4,8	+
Localidad*Irradiancia	3	5,3	++
Temperatura*Irradiancia	3	5,6	+
Localidad*Temperatura*Irradiancia	3	0,9	–
Error	32		

Cualitativamente, esporofitos cultivados a 70 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostraron una coloración más tenue respecto a los individuos de los tratamientos restantes, además de una morfología irregular. Los gametofitos cultivados a 6 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mantuvieron excelentes condiciones, además de una buena coloración.

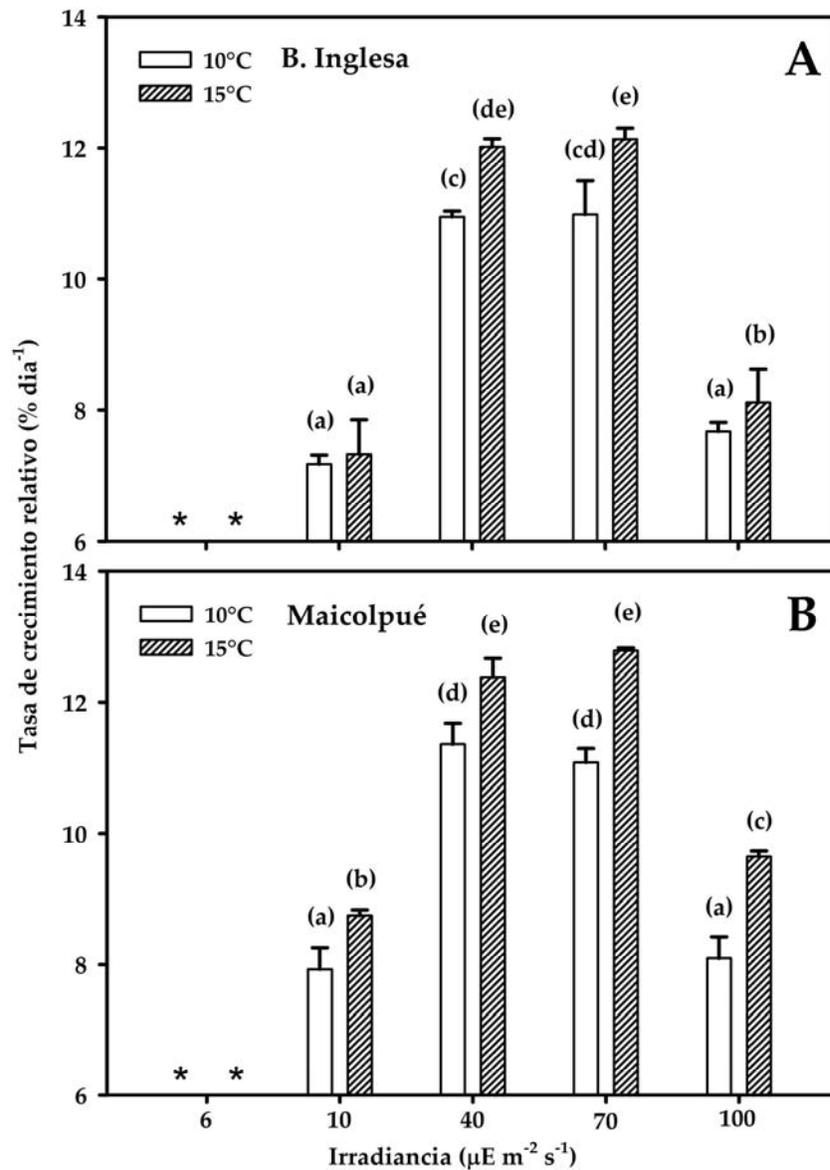


Fig.ura 11. Tasa de crecimiento relativo de esporofitos de *L. trabeculata* en 52 días de cultivo, bajo distintos regímenes de irradiancia y temperatura. * representa los gametofitos que se mantuvieron estériles.

3.4 Crecimiento de esporofitos de *L. trabeculata* procedentes de distintas localidades.

El tiempo de aparición de células huevos y esporofitos, la longitud de esporofitos a la semana 15 de cultivo y su respectiva tasa de crecimiento se muestran en la tabla 5. La aparición de esporofitos varió entre 3 y 5 semanas desde esporas, siendo Totoral y Maicolpué las que más rápido generaron nuevos individuos. Sin embargo, *Lessonia trabeculata* mostró, en general, un bajo potencial de crecimiento, independiente de la localidad de origen. Se detectaron diferencias estadísticas entre las distintas localidades, encontrándose 3 grupos con crecimientos distintivos. Bahía Salado fue la localidad que experimentó mayor crecimiento en el periodo muestral, alcanzando más de 15 mm en promedio ($3,55\% \text{ dia}^{-1}$). Esporofitos de B. Inglesa, en cambio, presentaron el menor crecimiento, con la mitad de la longitud en ese mismo periodo de tiempo (7 mm; $2,57\% \text{ dia}^{-1}$). Esporofitos provenientes de material de Los Vilos lograron un crecimiento moderado, con 12 mm en promedio. Las plántulas de localidades de Maicolpué y Totoral crecieron de manera similar, y se comportaron de forma intermedia entre el grupo de alto y medio crecimiento. Los tratamientos se caracterizaron además por presentar una alta variabilidad, con desviaciones estándares entre 25 – 50% respecto a sus longitudes promedio.

Tabla 5. Comparación estadística (Prueba de Kruskal-Wallis y Post-hoc de Tukey no paramétrico) para el crecimiento de esporofitos de *L. trabeculata* (longitud de fronda a la semana 15 post-activación).

++ $p < 0,001$; + $p < 0,05$; - $p > 0,05$.

Localidad	TCR* (% día ⁻¹)	1 ^{ros} esporofitos** (días)	Longitud (mm) (promedio ± DE)	Resultado estadístico				
				BI	BS	T	LV	M
B. Inglesa (BI)	2,57	35	7,23 ± 3,66^(a)		++	++	++	++
B. Salado (BS)	3,55	35	15,40 ± 4,10^(c)	++		-	+	-
Totoral (T)	2,82	21	13,00 ± 4,30^(bc)	++	-		-	-
Los Vilos (LV)	2,93	28	11,68 ± 4,63^(b)	++	+	-		-
Maicolpué (M)	2,93	21	14,40 ± 5,05^(bc)	++	-	-	-	

Subíndices representan grupos con diferencias estadísticas, donde (a) < (b) < (c).

* Tasa de crecimiento relativo. El periodo de crecimiento fue establecido entre la fecha de aparición de los primeros esporofitos y las 15 semanas de cultivo.

** Tiempo establecido cuando fueron detectados más de 15 individuos ($n \geq 15$) en las respectivas muestras

4. DISCUSIÓN

Lessonia trabeculata, al igual que todos los miembros de algas Laminariales, tiene un ciclo de vida complejo regulado en gran medida por variables ambientales, dentro de las cuales la irradiancia y la temperatura juegan un rol crucial. Las respectivas estrategias reproductivas que tienen estas algas para sobrevivir y desarrollarse, en consecuencia, estarán basadas en su capacidad de resistir las condiciones cambiantes del hábitat natural (Gerard 1990), aprovechando a su vez las condiciones óptimas para optimizar el crecimiento o reproducción cuando corresponda.

La irradiancia no pareciera ser un factor fundamental en la germinación. Esta situación ha sido previamente descrita para otras algas Laminariales, donde las embriosporas germinan en condiciones de luz muy bajas, e incluso en total oscuridad (Lüning 1980; tom Dieck 1993; Santelices *et al.* 2002). En nuestros estudios se detectaron evidencias significativas de este factor sobre el porcentaje de germinación a las 30 hrs. Sin embargo, al igual que los estudios previamente mencionados, ocurrió en todas las condiciones de irradiancia simuladas, y al cabo de 4 días llegó a valores altos en prácticamente todos los tratamientos. Por otro lado, los requerimientos de irradiancia para la gametogénesis son sin duda más estrechos e importantes, donde a bajas dosis la fertilidad no es alcanzada (Deysher & Dean 1986). Superando este “umbral” de luz, la fertilidad no aumenta progresivamente sobre la maduración de gametofitos y formación de nuevos individuos (Lüning 1980), siendo generalmente alta para las condiciones óptimas.

La calidad de la luz, a través del espectro de luz o dosis cuántica, ha demostrado ser mucho más determinante en procesos de gametogénesis que la cantidad de irradiación. Lüning & Dring (1975), Lüning & Neushul (1978) y Lüning (1980) reportaron que longitudes de onda de alta energía (luz azul, 400 – 520 nm) son necesarias para alcanzar la fertilidad, donde 110 – 230 $\mu\text{E cm}^{-2}$ de esta luz permiten alcanzar la fertilidad (50%) en 3 semanas de cultivo. La luz blanca usada en ese tipo de estudio trae alrededor de 18% de luz azul (Lee & Brinkhuis 1986), lo cual permitiría alcanzar esta fertilidad con algunos desfases de tiempo. Bajo este concepto, todos los gametofitos que recibiesen luz blanca, independiente de su irradiación, deberían formar oogonios en algún periodo al momento de lograr la dosis cuántica mínima. Sin embargo, en este estudio no fue posible apreciar gametofitos con oogonios a $6 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en 2 meses de cultivo. Además, algunos autores mencionan tener stocks de gametofitos que en bajas condiciones de luz han sido conservados por más de 20 años en constante crecimiento (Müller, datos no publicados), haciendo suponer del uso de estas pequeñas dosis de luz para su crecimiento vegetativo.

La temperatura es uno de los principales factores que regulan la distribución de algas marinas, afectando la totalidad de sus estadios del ciclo de vida (Lobban & Harrison 1990). No obstante, además de regular procesos reproductivos como la fecundidad y formación de cigotos, en muchos casos actúan retrasando o acelerando procesos más que desencadenándolos, básicamente por su influencia en reacciones bioquímicas de la fotosíntesis, respiración y crecimiento, a través de la actividad enzimática. Particularmente procesos de crecimiento como la germinación y desarrollo de esporofitos de *L. trabeculata* mostraron ese tipo de influencia, logrando un mayor desarrollo a $15^{\circ}\text{C} \geq 10^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C}$, en verano y $10^{\circ}\text{C} \geq 15^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C}$ en el resto del año. A su vez, a temperaturas más bajas que las óptimas se observa un menor grado de fertilidad y éxito reproductivo,

influyendo de la misma manera en parámetros reproductivos. A 5°C el desarrollo de *L. trabeculata* se vio fuertemente retrasado, presentando una evidente mortalidad antes de la gametogénesis, mortalidad la cual fue total para esporofitos iniciales. Esta tolerancia a la temperatura también es diferente respecto a Laminariales de otras latitudes. A modo de ejemplo, *Laminaria ochroleuca* obtiene los mejores resultados en tasa de germinación, fecundidad y éxito reproductivo con temperaturas entre 15°C y 18°C (Izquierdo *et al.* 2002), mientras que *Laminaria saccharina* necesita la mitad de estas condiciones para lograr resultados similares, creciendo bien inclusive a temperaturas cercanas a 0°C (Sjøtun & Schoschina 2002).

Efectos interactivo de luz-temperatura han sido reportado en varias ocasiones en algas Laminariales, con una alta influencia en procesos pre y post cigóticos (Lüning & Neushul 1978; Lüning 1980). Reportes de la variación latitudinal y sobre todo estacional de estos requerimientos, sin embargo, son escasos. Lee & Brinkhuis (1986; 1988) detectaron un efecto significativo de la estacionalidad sobre la viabilidad y vigorosidad de esporas en cuanto a potencial reproductivo o de crecimiento, pero a diferencia de los resultados en *L. trabeculata*, ellos reportaron que esporas de *Laminaria saccharina* son viables durante todo el año. Tala *et al.* (2004), también en *Lessonia trabeculata*, detecta una variación estacional para poblaciones del norte de Chile, con esporas poco viables en verano y una alta fertilidad en invierno. Sin embargo, condiciones sub-óptimas de cultivo, así como también una variación de los requerimientos de luz-temperatura de las localidades estudiadas podrían generar la gran variación del éxito reproductivo mostrado en estos estudios previos. Ciertamente, cada población podría tener eventos en su fenología reproductiva únicos dado las condiciones de su ambiente, que harían que

sus propágulos sean viables en una u otra época del año, bajo condiciones relativamente distintas de cultivo.

La viabilidad máxima, al igual que nuestros estudios, es detectada generalmente en los meses primavera (Lee & Brinkhuis 1986; 1988; Joska & Bolton 1987). Sin embargo, esporofitos iniciales que se desarrollen en dicha época difícilmente sobrevivan las condiciones de verano. Este potencial de esporas de primavera y verano sugiere que los propágulos, especialmente los del norte de Chile, pueden tolerar condiciones extremas a través de la formación de gametofitos multicelulares, creciendo vegetativamente en el ambiente natural hasta volverse fértiles en épocas favorables. En nuestro estudio, por ejemplo, esporas provenientes de verano presentaron una vitalidad considerable, por lo que el concepto de “oversummering” (o estado de latencia en verano) planteado por Lee & Brinkhuis (1986; 1988), se aplicaría en propágulos liberados en estas épocas.

De igual forma, este patrón estacional no solo se aplica en la vigorosidad de las esporas. Al igual que en trabajos previos, fue posible detectar una aclimatación a nivel estacional de las condiciones óptimas para gatillar la gametogénesis. En invierno, los requerimientos de luz y temperatura son bajos, a diferencia de verano, donde la aclimatación de las esporas permite cantidades mayores (Brinkhuis *et al.* 1984; Lee & Brinkhuis 1988).

L. trabeculata forma densas praderas perennes submareales, a partir de los 5m de profundidad, donde es posible apreciar individuos con esporofilas fértiles durante todo el año a lo largo de su rango de distribución latitudinal (Villouta & Santelices 1986; Tala *et al.* 2004; Westermeier,

observaciones no publicadas). No obstante, varios fenómenos han sido posibles apreciar con un patrón marcadamente estacional. La producción de biomasa sufre una reducción significativa entre primavera tardía e invierno temprano (Edding & Tala 2003; Tala & Edding 2005; 2007), mientras que valores de carbohidratos son mayores en primavera-verano (Flores-Negrón 2000), ambos podrían estar fuertemente ligado con la formación de estructuras sexuales de alta viabilidad.

El desarrollo de *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices con las etapas microscópicas inclusive ocurrió de manera similar como la descrita para algas Laminariales (Kain 1979). Al igual que como se reportó en cultivos de *Macrocystis pyrifera*, el desarrollo de gametofitos fue casi en su totalidad de forma multicelular (Westermeier *et al.* 1989; 2006). Esto se contrapone a lo reportado para muchas algas Laminariales, donde en condiciones optimas de nutrientes (proporcionados en esta instancia) se generan gametofitos unicelulares de rápido desarrollo (Lüning 1980; Hoffman & Santelices 1982). Por otro lado, Ávila *et al.* (1985) determina que la longitud de las horas luz influye positivamente en el desarrollo de gametofitos multicelulares, donde fotoperiodos superiores a 16 horas luz (16:8 L:O) o inferiores a 8 horas luz (8:16 L:O) producen individuos de este tipo. *Lessonia trabeculata* bajo condiciones de fotoperiodo de día largo y medio de cultivo Provasoli logró formar gametofitos de desarrollo multicelular, que crecieron de forma vegetativa pero que lograron desarrollar uno o varios oogonios por gametofito en casi todas las condiciones de irradiancia y temperatura. Este fenómeno ha sido reportado en una escala de tiempo mucho mayor que en la de este estudio, donde gametofitos vuelven a alcanzar la fertilidad en periodo de 10-20 años bajo condiciones de crecimiento vegetativo (Müller *et al.* 2008; Westermeier *et al.* 2006; 2010b), lo cual re-confirma el efecto de estas tres

variables en la conservación y multiplicación vegetativa así como también en la obtención de la fertilidad.

La diferenciación ecotípica en esporofitos de algas pardas ha sido bien descrita para las condiciones de temperatura, irradiancia y nutrientes (Espinoza & Chapman 1983; Gerard 1988; 1990; Gerard & Du Bois 1988; Martínez 1999). A diferencia de estas algas, *Lessonia trabeculata* no mostró ecotipos marcados para las condiciones de luz y temperatura características de su localidad de origen, salvo en la época de invierno. Esta similitud norte-sur de los requerimientos podría deberse a dos situaciones: a) el hábitat de procedencia de *L. trabeculata* estudiadas en estas pruebas, entre 8 - 10 m de profundidad, no haría variar significativamente las condiciones de luz y temperatura entre las localidades de origen y 2) las condiciones usadas en el presente estudio fueron las óptimas para el desarrollo, donde probablemente las condiciones que exhibirían diferencias ecotípicas estarían más cercanas a la temperatura y luz letal, alrededor de los 20°C y sobre los 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz en algas Laminariales (Lüning 1980; 1990; Lüning & Freshwater 1988).

A pesar de no ser el objetivo principal de este estudio, se detectó una aparente relación entre el potencial reproductivo de *L. trabeculata* respecto al potencial de crecimiento, teniendo un efecto antagónico. Propágulos de B. Inglesa generaron gametofitos que obtuvieron un alto número de oogonios y cigotos, pero su grado de germinación y crecimiento de esporofitos fueron bajos. A su vez, el material procedente de Maicolpué fue menos prolífico, con porcentajes de fertilidad y éxito reproductivo más bajos pero con un grado de germinación y crecimiento de esporofitos mayor. Este potencial se ha detectado en otros estadios de algas Laminariales, siendo frecuente

observar que gametofitos de gran tamaño permanecen estériles por tiempos prolongados respecto a gametofitos de pocas células, los cuales generan oogonios en bastante menor tiempo (Hoffman & Santelices 1982; Ávila *et al.* 1985; Muñoz *et al.* 2004). Parke (1948) y Dieckman (1980) en tanto, reportaron que en esporofitos adultos existe una estrecha relación entre el crecimiento meristemático de las frondas respecto a la formación de soros esporangiales, donde la inhibición de uno activa el comienzo del segundo, y viceversa. Las posibles causas de este comportamiento distintivos en muchos casos aun no es clara, suponiéndose que factores interactivos del ambiente más la construcción del genotipo de las poblaciones de origen generan estas características.

5. CONCLUSIONES

- Se rechaza parcialmente la hipótesis planteada en este estudio. *L. trabeculata* no presentó diferencias para los requerimientos de irradiancia y temperatura ni para etapas pre-cigóticas, ni para la formación de cigotos y subsecuente crecimiento de esporofitos. Sin embargo, el crecimiento varió entre las distintas localidades estudiadas. A su vez, los factores que afectaron mayoritariamente el desarrollo estadios tempranos de *L. trabeculata* fueron la localidad de origen, la estación del año y el efecto interactivo luz-temperatura.
- El desarrollo de *Lessonia trabeculata* para las etapas del ciclo de vida iniciales ocurre de manera similar que para otras algas Laminariales, pero con una tendencia marcada de formación de gametofitos multicelulares. Las razones de este patrón de desarrollo son desconocidas considerando que las condiciones de cultivo fueron las reportadas como “óptimas” para otras algas Laminariales de desarrollo gametofítico unicelular.
- Las condiciones óptimas para la germinación, fertilidad y éxito reproductivo variaron entre 10 – 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 10 – 15 °C, dependiendo de la localidad y época de origen del material reproductivo. Los máximos valores de estos índices fueron registrados en primavera, y los mínimos en otoño, con viabilidad prácticamente nula de las esporas.
- A 5°C el desarrollo de esporas y gametofitos fue escaso, muriendo a los pocos días. Salvo en primavera, fue posible observar esporofitos iniciales los cuales murieron a los pocos días. *L.*

trabeculata proveniente de entre 27°S y 40°S no toleraría eventos de bajas temperatura por mucho tiempo.

- A $6 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ se obtienen gametofitos estériles en *L. trabeculata*, dentro de los 10 – 15°C de temperatura. Condiciones similares de luz podrían ser consideradas para la creación de stock de gametofitos o producción masiva de gametofitos en biorreactores, en caso que una maricultura de estas algas se consolide.
- No fue posible en consecuencia determinar un patrón ecotípico en los requerimientos de luz y temperatura de *L. trabeculata*. Sin embargo, fue posible apreciar una aclimatación de las esporas en función de la época del año de donde eran obtenidas. En verano los requerimientos eran más altos que en invierno, dadas las altas temperaturas y luminosidad del ambiente.
- Para el crecimiento de esporofitos, la irradiancia, la temperatura y la localidad de origen fueron los factores más importantes que afectaron la tasa de crecimiento. Las condiciones óptimas de irradiancia y temperatura en este estadio fueron $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 15°C, y las jóvenes plantas que presentaron un mayor crecimiento fueron las originadas de material de Bahía Salado, con $3,55 \% \text{ día}^{-1}$. No obstante, fueron una de las que más se demoraron en formar nuevos individuos (35 días para apreciar cigotos).
- En síntesis, los resultados expuestos en este estudio muestra, por una parte, la relativamente alta tolerancia de *L. trabeculata* frente a condiciones luz-temperatura, pero por otro, una variación considerable de estos requerimientos en función de a) la latitud de origen y b) la

época de origen. Manejando estas variables para la optimización del crecimiento se podrían obtener productividades mejores que las reportadas en este estudio, y por qué no, a través de técnicas avanzadas de cultivo (como el cultivo a base de clones parentales de gametofitos) disminuir el tiempo de desarrollo como se hace con *Undaria*, *Laminaria* y *Macrocystis*, y que es el principal punto crítico de la acuicultura a gran escala de este recurso.

6. REFERENCIAS

ÁVILA M., A.J. HOFFMANN & B. SANTELICES. 1985. Interacciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y fotoperiodo sobre el desarrollo de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 58, 71–82.

BOLD, H.C. & M.J. WYNNE. 1978. Introduction to the algae structure and reproduction. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 706 p.

BRINKHUIS, B.H., E.C. MARIANI, V.A. BREDA & M.N. BRADY-CAMPBELL. 1984. Cultivation of *Laminaria saccharina* in the New York Marine Biomass Program. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 11, 266 – 271.

DEYSHER L. & T. DEAN. 1986. Interactive effect of light and temperature on sporophyte production in the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*. *Mar. Biol.* 93, 17 – 20.

DIECKMAN, G.S. 1980. Aspects of the ecology of *Laminaria pallida* (Grev.) J. Ag. off The Cape Peninsula (South Africa). *Bot. Mar.* 23, 579 – 585.

EDDING, M. & F. TALA. 2003. Development of techniques for the massive culture of *Lessonia trabeculata* Villouta and Santelices (Phaeophyceae: Laminariales) in Chile. *Aquat. Res.* 34, 507 – 515.

EDDING M., M. VENEGAS, P. ORREGO & E. FONCK. 1990. Culture and growth of *Lessonia trabeculata* (Phaeophyta, Laminariales) juvenile sporophytes in La Herradura de Guayacán Bay, northern Chile. *Hydrobiologia* 204/205, 361 – 366.

ESPINOZA, J., & A.R.O. CHAPMAN. 1983. Ecotypic differentiation of *Laminaria longicruris* in relation to seawater nitrate concentration. *Mar. Biol.* 74, 213 – 218.

EVANS, G. C. 1992. The quantitative analysis of plant growth. In: Evans, GC (Ed). *Studies in Ecology*, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 247 – 254 p.

FLORES-NEGRÓN, J. 2000. Contenidos energéticos en *Lessonia trabeculata* (Villouta & Santelices) del submareal de la costa norte de Chile. Tesis, Esc. de Acuicultura, Univ. Austral de Chile, 49 p.

GERARD, V.A. 1988. Ecotypic differentiation in light – related traits of the kelp *Laminaria saccharina*. *Mar. Biol.* 97, 25 – 36.

GERARD, V.A. & K.R. DU BOIS. 1988. Temperature ecotypes near the southern boundary of the kelp *Laminaria saccharina*. *Mar. Biol.* 97, 575 – 580.

GERARD, V.A. 1990. Ecotypic differentiation in the kelp *Laminaria saccharina*: phase-specific adaptation in a complex life cycle. *Mar. Biol.* 107, 519 – 528.

HOFFMANN, A.J. & B. SANTELICES. 1982. Effects of light intensity and nutrients on gametogenesis of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 78, 177 – 186.

HOFFMANN, A.J., M. ÁVILA & B. SANTELICES. 1984. Interactions of nitrate and phosphate on the development of microscopic stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 78, 177 – 186.

HOFFMANN, A.J. & B. SANTELICES. 1991. Banks of algal microscopic forms: hypotheses on their functioning and comparisons with seed banks. *Mar Ecol. Prog. Ser.* 78, 71 – 85.

IZQUIERDO, J.L., I.M. PEREZ-RUZAFÁ & T. GALLARDO. 2002. Effect of temperature and photon fluence rate on gametophytes and young sporophytes of *Laminaria ochroleuca* Pylae. *Helgol. Mar. Res.* 55, 285 – 292.

KAIN, J. M. 1969. The biology of *Laminaria hyperborea*. V. Comparison with early stages of competitors. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 49, 455 – 473.

KAIN, J. M. 1979. A view of the genus *Laminaria*. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 17, 101 – 161.

LEE, J.A. & B.H. BRINKHUIS. 1986. Reproductive phenology of *Laminaria saccharina* (L.) Lamour (Phaeophyta) at the southern limit of its distribution in the northwestern Atlantic Ocean. *J Phycol.* 22, 276 – 285.

LEE, J.A. & B.H. BRINKHUIS. 1988. Seasonal light and temperature interaction effects on development of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta) gametophytes and juvenile sporophytes. *J. Phycol.* 24, 181 – 191.

LEWIN, J. 1966. Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia* 6, 1–12.

LOBBAN, C.S. & P.J. HARRISON. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. 366 p.

LÜNING, K. 1980. Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three *Laminaria* species (Phaeophyceae). *J Phycol* 16, 1–15.

LÜNING, K. 1981. Light. En: The biology of Seaweeds, eds. Lobban C.S. & M.J. Wynne. University of California Press. Berkeley & Los Angeles. Blackwell Scientific Publications, 326-355 p.

LÜNING, K. 1990. Seaweeds: Their environment, biogeography and ecophysiology. John Wiley & Sons, Inc. 527 p.

LÜNING, K. & M.J. DRING. 1975. Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* grown in blue and red light. *Mar. Biol.* 29, 195 – 200.

LÜNING, K, & W. FRESHWATER. 1988. Temperature tolerance of northeast pacific marine algae. *J. Phycol.* 24, 310 – 315.

LÜNING, K, & M. NEUSHUL. 1978. Light and temperature demands for growth and reproduction of laminarian gametophytes in southern and central California. *Mar Biol.* 45, 297 – 309.

MARTINEZ, E. A. 1999. Latitudinal differences in thermal tolerance among microscopic sporophytes of the kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta: Laminariales). *Pac. Sci.* 53: 74 – 81.

MARTINEZ, E.A., L. CARDENAS & R. PINTO. 2003. Recovery and genetic diversity of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* 20 years after El Niño 1982–83. *J. Phycol.* 39, 504 – 508.

MC LACHLAN, J. 1973. Growth media-marine. En J. Stein (ed.). Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University, Cambridge, Inglaterra. 25 – 51 p.

MUÑOZ, V., M.H. GRAHAM, M.C. HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.H. BUSCHMANN & J.A. VÁSQUEZ. 2004. Variability in per capita oogonia and sporophyte production from giant kelp gametophytes (*Macrocystis pyrifera*, Phaeophyceae). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77, 639 – 647.

NOVACZEK, I. 1984a. Response of gametophytes of *Ecklonia radiata* (Laminariales) to temperature in saturating light. *Mar. Biol.* 82, 241 – 245.

NOVACZEK, I. 1984b. Responses of *Ecklonia radiata* (Laminariales) to light at 15 °C with reference to the field light budget at Goat Island Bay, New Zealand. *Mar. Biol.* 80, 263 – 272.

PAKKER, H. A, A.M. BREEMAN, W.F. PRUD'HOME VAN REINE & C. VAN DEN HOEK. 1995. A comparative study of temperature responses of Caribbean seaweeds from different biogeographical groups. *J. Phycol.* 31, 499 – 507.

PARKE, M. 1948. Studies on British Laminariaceae. I. Growth in *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 27, 651 – 709.

PETERS, A.F. & A.M. BREEMAN. 1992. Temperature responses of disjunct temperate brown algae indicate long-distance dispersal of microthalli across the tropics. *J. Phycol.* 28, 428 – 438.

SANTELICES B. 1982. Bases Biológicas para el manejo de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales) en Chile Central. *Monografías Biológicas* 2, 135 – 150.

SANTELICES B, D. AEDO & A. HOFFMANN. 2002. Banks of microscopic forms and survival to darkness of propagules and microscopic stages of macroalgae. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 75, 547 – 555.

SHEA, R. & T. CHOPIN. 2007. Effects of germanium dioxide, an inhibitor of diatom growth, on the microscopic laboratory cultivation stage of the kelp, *Laminaria saccharina*. *J. Appl. Phycol.* 19, 27 – 32.

SJØTUN, K. & E.V. SCHOSCHINA. 2002. Gametophytic development of *Laminaria spp.* (Laminariales, Phaeophyta) at low temperature. *Phycologia* 41, 147 – 152.

TALA, F. & M. EDDING. 2005. Growth and loss of distal tissue in blades of *Lessonia nigrescens* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales). *Aqua. Bot.* 82, 39 – 54.

TALA, F. & M. EDDING. 2007. First estimates of productivity in *Lessonia trabeculata* and *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae, Laminariales) from the southeast Pacific. *Phycol Res.* 55, 66 – 79.

TALA, F., M. EDDING & J. VÁSQUEZ. 2004. Aspects of the reproductive phenology of *Lessonia trabeculata* (Laminariales, Phaeophyceae) from three populations in northern Chile. *New Zeal. J. Mar. Fresh.* 38, 255 – 266.

TOM DIECK, I. 1993. Temperature tolerance and survival in darkness of kelp gametophytes (Laminariales, Phaeophyta): ecological and biogeographical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100, 253 – 254.

VÁSQUEZ, J.A. 2008. Production, use and fate of Chilean brown seaweeds: resources for sustainable fishery. *J. Appl. Phycol.* 20, 457 – 467.

VÁSQUEZ, J.A. & A.H. BUSCHMANN. 1997. Herbivore–kelp interactions in Chilean subtidal communities: a review. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 70, 41 – 52.

VÁSQUEZ, J.A., F. TALA, A. VEGA, S. ZUÑIGA, M. EDDING & N. PIAGET. 2005. Bases ecológicas y evaluación de usos alternativos para el manejo de praderas de algas pardas de la III y IV Regiones. Informe final FIP N° 2005-22. Universidad Católica del Norte. 223 p.

VILLEGAS, M.J., J. LAUDIEN, W. SIELFELD & W.E. ARNTZ. 2007. *Macrocystis integrifolia* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales; Phaeophyceae) kelp habitat structures and associated macrobenthic community off northern Chile. *Helgol. Mar. Res.* DOI 10.1007/s10152-007-0096-1

VILLOUTA, E. & B. SANTELICES. 1986. *Lessonia trabeculata* (Phaeophyta) a new kelp from Chile. *Phycologia.* 25, 81 – 88.

WESTERMEIER, R. 1981. The marine seaweeds of Chile´s tenth region (Valdivia, Osorno, Llanquihue and Chiloé). *Proc. Int. Seaweed Symp.*. En Levring, T. (ed.) 10, 215 - 220.

WESTERMEIER, R., M. CID, & P. RIVERA. 1989. Efectos de factores ambientales sobre las fases microscópicas de *Macrocystis pyrifera* (L) C. Ag. en cultivo. *Medio Ambiente* 10: 13 – 22.

WESTERMEIER, R. & P. MOLLER. 1990. Population dynamics of *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh in the rocky intertidal of southern Chile. *Bot. Mar.* 33, 363 – 368.

WESTERMEIER R, D. PATIÑO, M.I. PIEL & D.G. MÜLLER. 2005. Manual de cultivo del alga parda *Macrocystis pyrifera* (Huiro), Chile. Proyecto FONDEF D00I1144. Universidad Austral de Chile, Chile. 38 p.

WESTERMEIER, R., D. PATIÑO, M.I. PIEL, I. MAIER & D.G. MÜLLER. 2006. A new approach to kelp mariculture in Chile: production of free-floating sporophyte seedlings from gametophyte cultures of *Lessonia trabeculata* and *Macrocystis pyrifera*. *Aquac Res.* 37, 164 – 171.

WESTERMEIER, R, D. PATIÑO & D.G. MÜLLER. 2007. Sexual compatibility and hybrid formation between the giant kelp species *Macrocystis pyrifera* and *M. integrifolia* (Laminariales, Phaeophyceae) in Chile. *J Appl Phycol* 19, 215 – 221.

WESTERMEIER R., D. PATIÑO, H. MÜLLER & D.G. MÜLLER. 2010a. Towards domestication of giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) in Chile: selection of haploid parent genotypes, outbreeding, and heterosis. *J Appl Phycol.* 22, 357 – 361.

WESTERMEIER R, D. PATIÑO, P. MURÚA & D.G. MÜLLER. 2010b. *Macrocystis* mariculture in Chile: performance of heterosis genotype constructs under field conditions. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-010-9581-z

ZAR J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Fourth edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 663 p.