

Interacciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y fotoperíodo sobre el desarrollo de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales)

Interactions of temperature, photon flux density
and photoperiod on the development of microscopic stages
of *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales)

MARCELA AVILA, ALICIA J. HOFFMANN y BERNABE SANTELICES

Departamento de Biología Ambiental y de Poblaciones,
Facultad de Ciencias Biológicas,
Pontificia Universidad Católica de Chile,
Casilla 114-D, Santiago, Chile.

RESUMEN

Se estudian los efectos de distintas combinaciones de temperatura, densidades de flujo fotónico y fotoperíodos sobre el desarrollo de meiosporas de *Lessonia nigrescens* Bory (Laminariales), proveniente de Pelancura (Chile central).

Las distintas etapas de desarrollo tienen rangos de tolerancia diferentes a cambios en los factores abióticos. Las meiosporas germinan en forma relativamente independiente de las condiciones usadas. Los gametofitos presentan dos patrones de desarrollo según las condiciones utilizadas: como filamentos multicelulares que permanecen estériles durante períodos prolongados, o como gametofitos de pocas células en los que rápidamente se diferencian estructuras reproductivas. Se discuten las ventajas que podrían tener ambos patrones de desarrollo frente a distintas condiciones climáticas estacionales. El proceso de fertilización ocurre en un rango restringido de condiciones. Los esporofitos son morfológicamente normales en la mayoría de las condiciones en que se desarrollan, pero la tasa de crecimiento mayor se obtiene a 10°C, con fotoperíodo de 12 h, 50 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y concentraciones medias de nutrientes (0,1 - 0,5 $\mu\text{mol P l}^{-1}$ y 10 - 50 $\mu\text{mol N l}^{-1}$). Se incluyen recomendaciones para el cultivo de las etapas microscópicas de *L. nigrescens*.

Palabras claves: Cultivo, factores abióticos, macroalga intermareal, fase microscópica de *Lessonia*.

ABSTRACT

The effects of different combinations of temperature, photon flux densities and photoperiods on the development of meiospores of *Lessonia nigrescens* Bory (Laminariales) are compared. Samples were collected in Pelancura, central Chile.

The tolerance to changes in abiotic factors varies at different stages of development. Meiospore germination is relatively independent of the culture conditions tested. Depending on the culture conditions, gametophytes develop as multicellular filaments of delayed fertility, or as few-celled gametophytes that very soon become fertile. The possible advantages of both patterns of development are discussed in relation to the climatic conditions of different seasons. Fertilization requires more specific conditions than the previous stage. Sporophytes are morphologically normal in most conditions under which they develop, but the best growth rate is obtained at 10°C, 12:12 photoperiod, 50 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and at nutrient concentrations of 0.1 - 0.5 $\mu\text{mol P l}^{-1}$ phosphate and 10 - 50 $\mu\text{mol N l}^{-1}$ nitrate. These conditions are recommended as adequate for the culture of the microscopic phases of *L. nigrescens*.

Key words: Culture, abiotic factors, intertidal macroalga, microscopic stages of *Lessonia*.

INTRODUCCION

Lessonia nigrescens es una especie de Phaeophyta con notable importancia económica y ecológica. Ella constituye materia prima para fabricación de alginatos y, en consecuencia, es exportada en volúmenes que en 1981 alcanzaban a 6.000 toneladas de peso seco (Santelices & Lopehandía 1981). *Lessonia nigrescens* es,

además, la especie dominante en cobertura y biomasa en la zona intermareal a lo largo de la mayor parte de Chile. Es usada como refugio por invertebrados (Santelices *et al.* 1980) o como superficie colonizable por invertebrados, especialmente en lo que se refiere a su disco de adhesión (Cancino & Santelices 1981, 1984) y, además, es consumida por algunos herbívoros (Santelices & Ojeda, 1984). Por

todos estos antecedentes, es importante poder manejar racionalmente este recurso, considerando la posibilidad de cultivar la especie. Para ello es fundamental conocer las condiciones óptimas de cultivo de las etapas microscópicas de desarrollo (North 1971).

Estudios de fertilidad de poblaciones de *L. nigrescens* en Chile central indican que aunque existen plantas reproductivas durante todo el año, el reclutamiento de juveniles es un fenómeno claramente estacional ocurriendo entre agosto y noviembre (Santelices 1982, Santelices & Ojeda, 1984). A fines del verano, otoño e invierno el reclutamiento es reducido. En *L. nigrescens*, así como en otras Laminariales, es esperable que la fertilidad y el crecimiento de gametofitos sean afectados por varios factores ambientales, tales como calidad y cantidad de luz, temperatura y nutrientes (Kain 1964, Hsiao & Druehl 1971, 1973, Lüning & Dring 1975, Lüning & Neushul 1978, Lüning 1980).

Los estudios ya realizados sobre el desarrollo de fases microscópicas de *L. nigrescens* indican que mientras la germinación de meiosporas es independiente de la adición de nutrientes al medio, los distintos patrones de desarrollo de los gametofitos, la fertilidad y las primeras etapas de desarrollo de los esporofitos tienen requerimientos definidos de nutrientes, los que han sido determinados recientemente por Hoffmann & Santelices (1982) y Hoffmann *et al.* (1984). En forma análoga, las interacciones de nutrientes e intensidad luminosa pueden determinar el curso de las fases microscópicas.

En este trabajo se analizan los efectos de temperatura, densidad de flujo fotónico y fotoperíodo sobre germinación, desarrollo de gametofitos, gametogénesis y crecimiento de esporofitos de *Lessonia nigrescens*. Los resultados se integran con aquellos obtenidos anteriormente (Hoffmann *et al.* 1984) a fin de identificar los factores abióticos que confieren estacionalidad a la aparición de juveniles en terreno. Con el conocimiento adquirido se tratará, además, de establecer el conjunto óptimo de condiciones abióticas para la incubación de estas especies para prácticas de cultivo.

El trabajo se inicia con una descripción del ciclo de vida de *L. nigrescens* en el que se pone énfasis en detalles morfológicos de las etapas microscópicas del desarrollo.

MATERIALES Y METODOS

Frondas fértiles de *Lessonia nigrescens* fueron recolectadas en los roqueríos intermareales de Pelancura, 5 km al norte del puerto de San Antonio (33°32'S; 71°38'W), en noviembre de 1980. Fueron transportados al laboratorio en bolsas de polietileno con agua de mar. Las láminas que presentaban soros fueron lavadas en agua potable para eliminar epífitas.

Las zonas fértiles de las frondas fueron seccionadas finamente con hojas de afeitar, colocadas en discos Petri (100 x 80 mm) con agua de mar esterilizada y mantenidas en semioscuridad ($5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a 10°C durante 24 horas para la liberación de esporas. Luego, el agua con los trozos de algas y las esporas no adheridas fue eliminada de los discos de cultivo. A los discos se les agregó agua de mar enriquecida con NaNO_3 , NaH_2PO_4 , FeCl_3 , Na_2EDTA y TRIS, en las concentraciones indicadas para SWM_3 (Chen *et al.* 1969). Durante los experimentos este medio de cultivo fue renovado cada 10 días.

Los discos con esporas (dos discos por tratamiento, los que fueron considerados como réplicas) fueron incubados en cámaras de cultivo Lab Line, con distintas combinaciones de temperatura e iluminación (Tabla 1) y fotoperíodo e iluminación (Tabla 2). Como fuente luminosa se usaron tubos fluorescentes de 20 W Cool white; las distintas densidades de flujo fotónico fueron medidas usando un cuántmetro LI COR 185 A. Para las observaciones y mediciones de fases microscópicas en los cultivos se utilizó un microscopio invertido.

La germinación se evaluó estableciendo el número de meiosporas que habían formado tubo de germinación y se indicó como porcentaje el número total de esporas encontradas en tres campos oculares elegidos al azar en cada disco. La evaluación se hizo al sexto día de incubación, como en Hoffmann *et al.* (1984).

El crecimiento de los gametofitos femeninos se determinó midiendo su longitud total. Para ello se eligieron 10 gametofitos vecinos, usando el método del vecino más próximo según Cosson y Gayral (1977) en tres sitios distintos de cada disco. En consecuencia, se midieron 30 gametofitos por tratamiento. Las mediciones se hicieron (con un ocular micrométrico Leitz) después de 14 días de cultivo, fe-

TABLA 1

Combinaciones de temperaturas y densidad de flujo fotónico utilizadas en el cultivo de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens*.

Temperatures and photon flux densities tested for the culture of the microscopic phases of *Lessonia nigrescens*.

Temperatura* (°C)	5	10	14	18
Iluminación ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	5-10-25 50-75-100	5-10-25 50-75-100	5-10-25 50-75-100	5-10-25 50-75-100
Fotoperíodo (horas luz)	12	12	12	12

* Datos preliminares mostraron que los gametofitos no resisten temperaturas sobre 19°C ni bajo 5°C (Hoffmann & Santelices 1982).

TABLA 2

Combinaciones de fotoperíodo y densidades de flujo fotónico utilizadas en el cultivo de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens*.

Photoperiods and photon flux densities tested for the culture of microscopic phases of *Lessonia nigrescens*.

Fotoperíodo (horas luz)	8	12	16
Iluminación ($\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	5-10-25 50-75-100	5-10-25 50-75-100	5-10-25 50-75-100
Temperatura (°C)	10	10	10

cha en que estaba comenzando el desarrollo de los oogonios.

La fertilidad se evaluó estableciendo el porcentaje de gametofitos femeninos que tenían oogonios y esporofitos formados (como en Lüning 1980), en tres campos ópticos elegidos al azar en cada disco Petri. Las mediciones se realizaron a los 28 días de iniciados los cultivos.

El tamaño de los esporofitos se evaluó midiendo el largo total de la plántula sin considerar los rizoides. Las mediciones se hicieron a los 30 días después que se observaron los primeros esporofitos. La tasa de crecimiento de los esporofitos se calculó mediante un programa de interés compuesto (Hewlett Packard 67).

El estudio estadístico de los datos se hizo mediante un análisis de varianza de dos vías (Sokal & Rohlf 1969). Los datos obtenidos como porcentajes fueron sometidos a transformación angular antes del análisis estadístico correspondiente.

RESULTADOS

I. Ciclo de vida

En *Lessonia nigrescens*, tal como en otras Laminariales, la reproducción asexual involucra la formación de esporas, las que son denominadas zoosporas o meiosporas. Estas se desarrollan en esporangios uniloculares que crecen formando soros en cualquier porción de la lámina del esporofito. Las meiosporas germinan y crecen, dando origen a gametofitos masculinos y femeninos microscópicos. La reproducción sexual comprende la formación y fusión de gametos. Del cigoto resultante se desarrolla un nuevo esporofito (Fig. 1).

Las meiosporas son piriformes, biflageladas, con los flagelos insertos lateralmente (Fig. 1a). A las 12 horas de liberadas las esporas se depositan sobre el sustrato y se adhieren, adoptando una forma esférica, cuyo diámetro es de $5,15 \pm 0,25 \mu\text{m}$.

Una vez asentada la meiospora aumenta su diámetro hasta $10\ \mu\text{m}$ aproximadamente y se inicia el proceso germinativo. Dentro de las primeras 48 horas comienza a aparecer una protuberancia que se alarga para formar el tubo de germinación (Fig. 1b). El contenido citoplasmático de la espora se vacía en este tubo y se forma un septo que separa la cubierta de la espora vacía, de la célula primaria del gametofito.

Las células primarias que dan origen a gametofitos masculinos normalmente se dividen formando estructuras ramificadas de células pequeñas (Fig. 1c). La formación de gametos masculinos ocurre durante los primeros días de cultivo (10-12 días). Inicialmente se encuentran contenidos dentro de una vaina hialina y tienen una forma aproximadamente triangular (Fig. 1c). La vaina posteriormente se alarga formando

un tubo en el extremo del cual se encuentra contenido sólo un espermacio de forma casi esférica. En este estado el gameto es liberado y el gametofito luego degenera.

Los gametofitos pueden ser uni o multicelulares (Fig. 1d). En los primeros, la célula primaria se elonga y aumenta en diámetro. La formación de oogonios ocurre a los 11-12 días de cultivo y es similar a la descrita para otras Laminariales. Los oogonios se ubican lateralmente o en el extremo de la célula primaria. Inicialmente aparecen como una protuberancia que se separa de la célula primaria y se rodea de una vaina hialina. La vaina crece y se alarga conteniendo en el extremo un gameto de forma ovalada. Este, luego, se separa de la vaina por un septo. Un gametofito unicelular sólo produce una célula huevo y luego degenera. Gametofitos multicelulares producen varias células huevo.

Aproximadamente a los 11-12 días de cultivo la célula huevo es fecundada. El cigoto resultante comienza a dividirse inmediatamente y las primeras divisiones son perpendiculares al eje principal del huevo formando, así, un embrión de esporofito constituido por una fila de células uniseriadas (Fig. 1e). A los 18 días aparecen los rizoides y comienzan las divisiones longitudinales y periclinales, diferenciándose una lámina poliestromática con una morfología alargada, que corresponde a un esporofito juvenil (Fig. 1f).

II. Efectos de factores abióticos

Germinación de meiosporas

a) Interacciones de temperatura y densidad de flujo fotónico (fotoperíodo de 12 horas).

Las meiosporas germinaron en todas las condiciones experimentales, aunque el porcentaje de germinación varió según la combinación de temperaturas y densidades utilizadas (Fig. 2). A bajas temperaturas (5°C) y escasa iluminación ($5\ \text{a}\ 10\ \mu\text{E}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) sólo germinó el 50% de las esporas, pero mayores densidades de flujo fotónico produjeron un aumento de la germinación. Las diferencias de germinación en las distintas condiciones no fueron significativas.

A 10°C los valores de germinación fueron significativamente más altos ($P < 0,05$)

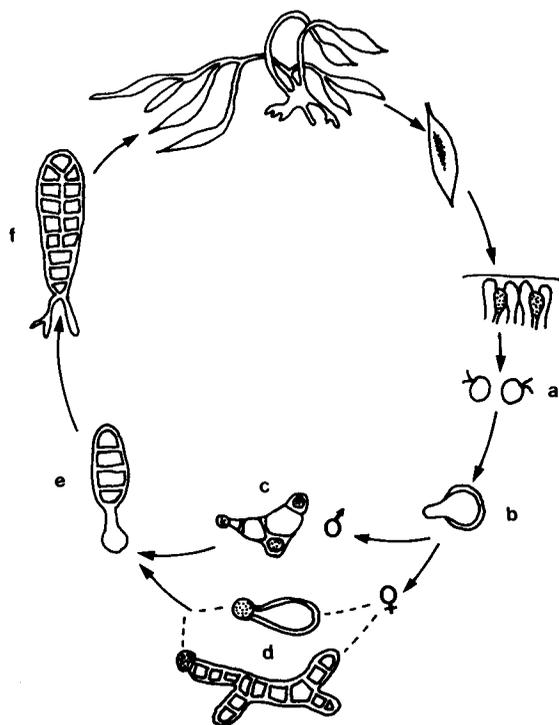


Fig. 1: Ciclo de vida de *Lessonia nigrescens*: (a) meiosporas biflageladas; (b) formación del tubo de germinación; (c) gametofito masculino con diferenciación de gametos; (d) gametofitos femeninos, unicelular (arriba) y multicelular (abajo) con gametos; (e) esporofito embrionario; (f) esporofito juvenil.

Life history of *Lessonia nigrescens* (a) biflagellate meiospores; (b) germination tube; (c) mature male gametophytes; (d) mature female gametophytes, unicellular (upper) and multicellular (lower); (e) embryonic sporophyte; (f) juvenile sporophyte.

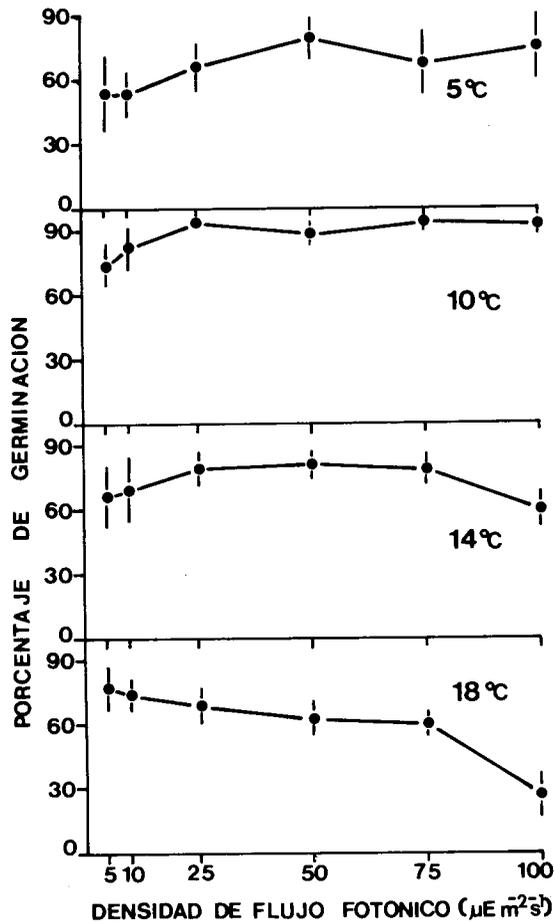


Fig. 2: Interacciones de temperatura y densidad de flujo fotónico sobre la germinación de meiosporas de *Lessonia nigrescens*, cultivadas con fotoperíodo de 12 h. Los puntos representan valores promedios de porcentajes de germinación; barras verticales ± 2 errores estándar; $P < 0,05$.

Effects of temperature and photon flux density on the germination of meiospores of *Lessonia nigrescens*, culture under 12 h light. Values given are mean of percentages of germination (± 2 S.E.; $P < 0.05$).

que a otras temperaturas cuando la iluminación fue de $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o superior. Con iluminación menor de $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores variaron entre 80 y 85 por ciento, pero con densidades de flujo fotónico sobre $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la germinación se mantuvo sobre 90% en el resto de las condiciones de iluminación utilizadas.

A 14°C se observó una tendencia similar al caso anterior. Sin embargo, los niveles alcanzados no sobrepasaron un 85 por ciento de germinación en ninguna de las densidades usadas (25 a $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A la máxima iluminación utilizada

se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) del porcentaje de germinación.

A 18°C y con baja iluminación (5 a $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el porcentaje de germinación fue más elevado que a menores temperaturas e igual iluminación. A esta temperatura, sin embargo, un aumento de la iluminación produjo una significativa inhibición de la germinación, la que llegó a un nivel mínimo con $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

b) Interacciones de fotoperíodo y densidad de flujo fotónico (a 10°C).

En condiciones de día corto ($8:16$ h), la germinación de las meiosporas alcanzó valores cercanos al 75% en todas las condiciones de iluminación utilizadas, excepto a $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 3). A esta densidad sólo germinó el 70% de las esporas. Con fotoperíodo de $12:12$ h e iluminación baja (5 y $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), el porcentaje de germinación alcanzó los mismos valores que en condiciones de día corto. Con densidades que sobrepasaban $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los valores de germinación (alrededor de 90%) son significativamente más altos que con los otros fotoperíodos utilizados ($P < 0,05$).

En condiciones de día largo ($16:8$ h) y escasa iluminación (5 y $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) germinaron entre 60 y 70% de las esporas; en cambio, densidades mayores indujeron germinación en aproximadamente 75% de las esporas.

Crecimiento de gametofitos

a) Interacciones de temperatura y densidades de flujo fotónico (con fotoperíodos de 12 horas).

Tal como lo muestra la Fig. 4, hubo desarrollo de gametofitos en todas las condiciones experimentales, aunque los tamaños que alcanzaron fueron diferentes. A 5°C los gametofitos alcanzaron los tamaños más pequeños de todas las temperaturas experimentales bajo todas las densidades de flujo fotónico y su saturación lumínica se produjo a $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A 10°C , con iluminaciones bajas (5 y $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) los gametofitos medían menos de $30 \mu\text{m}$ en promedio. La saturación lumínica se produjo a $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y los gametofitos alcanzaron a $40 \mu\text{m}$ de longitud en promedio, al igual que a mayores iluminaciones.

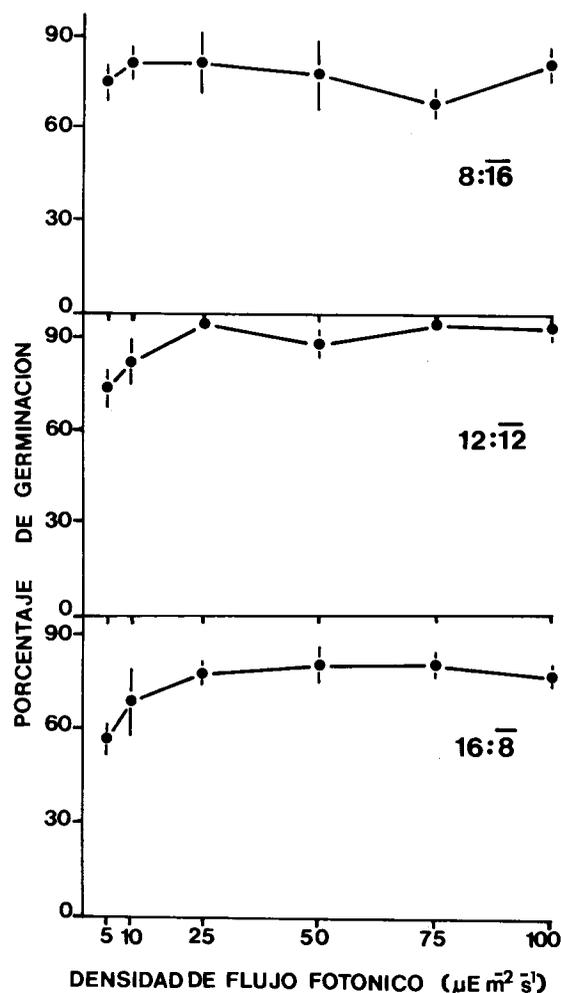


Fig. 3: Interacciones de fotoperíodo y densidad de flujo fotónico sobre la germinación de meiosporas de *Lessonia nigrescens*, cultivadas a 10°C. Los puntos corresponden a valores promedios de porcentajes de germinación; barras verticales ± 2 errores estándar; $P < 0,05$.

Effects of photoperiod and photon flux density on the germination of meiospores of *Lessonia nigrescens*, culture at 10°C. Values given are mean of percentages of germination (± 2 S.E.; $P < 0.05$).

A 14°C, con iluminaciones entre 5 y 25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ los gametofitos alcanzaron los tamaños mayores (más de 60 μm en promedio), llegando al nivel de saturación lumínica a 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A mayores iluminaciones, el tamaño de los gametofitos fluctuó entre 30 y 40 μm , tal como a 10°C.

A 18°C el nivel de saturación lumínica también se alcanzó con 10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con gametofitos de 40 μm de longitud en promedio. Los gametofitos alcanza-

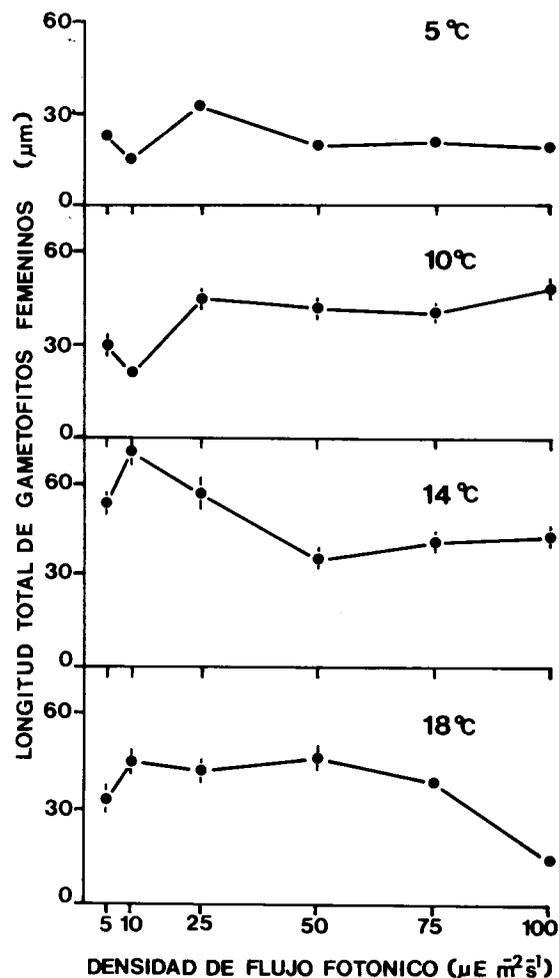


Fig. 4: Interacciones de temperatura y densidad de flujo fotónico sobre la longitud total de gametofitos femeninos de *Lessonia nigrescens*, cultivados con fotoperíodo de 12 h. Los puntos corresponden a valores promedios; barras verticales ± 2 errores estándar; $P < 0,05$.

Effects of temperature and photon flux density on the total length of female gametophytes of *Lessonia nigrescens*, culture under 12 h light. Values are mean (± 2 S.E.; $P < 0.05$).

ron tamaños similares con iluminaciones desde 25 hasta 75 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; en cambio, la iluminación máxima probada (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inhibió casi completamente el crecimiento de gametofitos a esta temperatura.

b) Interacciones de fotoperíodo y densidad de flujo fotónico (con temperaturas de 10°C),

El tamaño alcanzado por los gametofitos en las distintas condiciones experimentales

se muestra en la Figura 5. En todos los fotoperíodos probados se produjo saturación del crecimiento con flujos fotónicos de $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Con fotoperíodo de día corto (8:16 h) se desarrollaron gametofitos —en general— de gran tamaño, con una longitud máxima de $90 \mu\text{m}$. A densidades altas ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o más) el tamaño de los gametofitos disminuyó, llegando a unos $50 \mu\text{m}$ en promedio bajo la máxima iluminación probada. Con fotoperíodo de 12:12 h los gametofitos eran más pequeños en todas las condiciones de iluminación, manteniéndose

dose en alrededor de $45 \mu\text{m}$ a todas las densidades de flujo fotónico superiores a $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Con fotoperíodo de día largo (16:8 h) los gametofitos alcanzaron gran tamaño, con longitudes máximas sobre $90 \mu\text{m}$ en promedio a varios valores de densidad de flujo fotónico.

Fertilidad

a) Interacciones de temperatura y densidad de flujo fotónico (con fotoperíodos de 12 horas).

Los resultados obtenidos (Fig. 6) mostraron que la diferenciación de oogonios es rigurosamente controlada por interac-

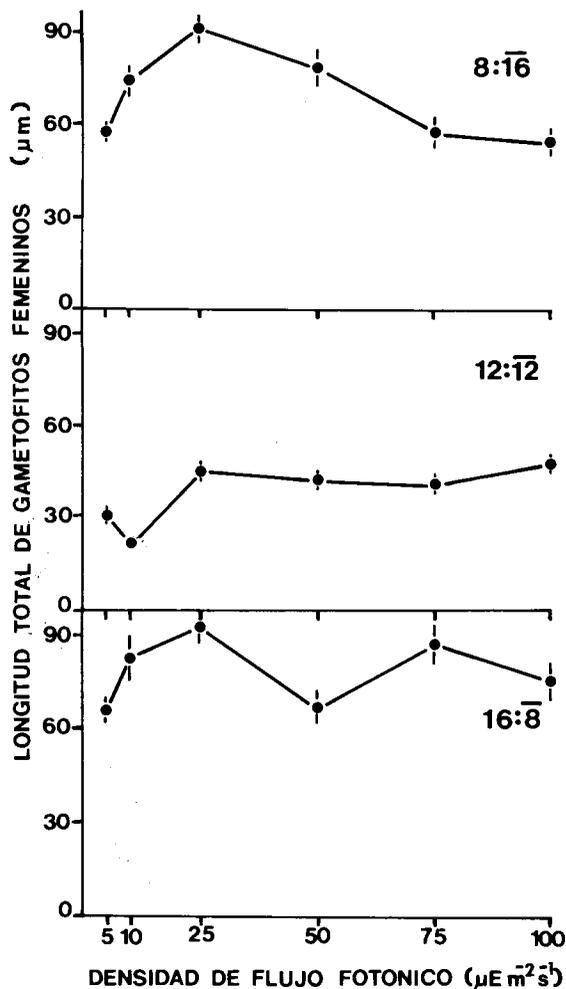


Fig. 5: Interacciones de fotoperíodos y densidad de flujo fotónico sobre la longitud total de gametofitos femeninos de *Lessonia nigrescens*, cultivados a 10°C . Los puntos corresponden a valores promedios; barras verticales ± 2 errores estándar; $P < 0,05$.

Effects of photoperiods and photon flux density on the total length of female gametophytes of *Lessonia nigrescens*, culture at 10°C . Values are mean (± 2 S.E.; $P < 0.05$).

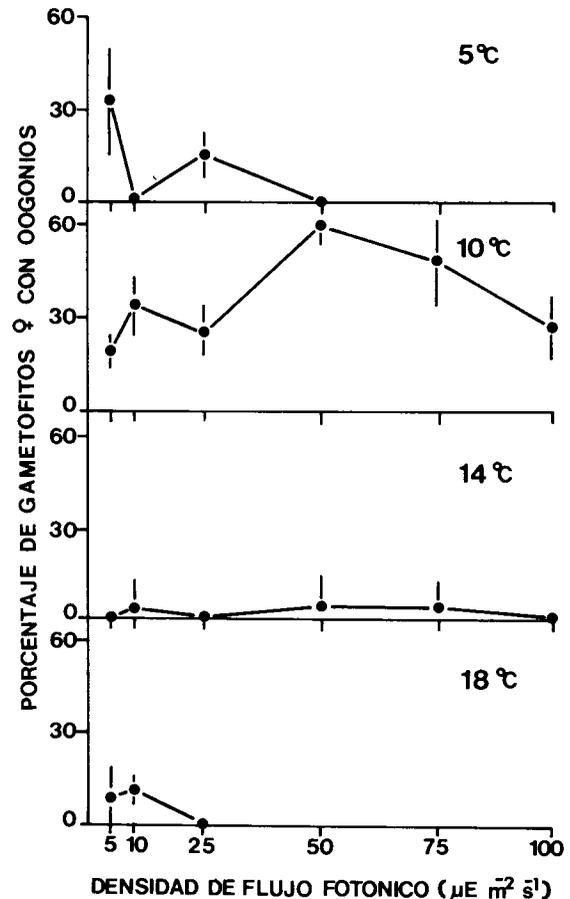


Fig. 6: Interacciones de temperatura y densidad de flujo fotónico sobre fertilidad de *Lessonia nigrescens*. Los puntos representan valores promedios de porcentajes de gametofitos femeninos en los que se han desarrollado oogonios; barras verticales ± 2 errores estándar; $P < 0,05$.

Effects of temperature and photon flux density on the fertility of *Lessonia nigrescens*. Values are mean of percentage mature female gametophytes (± 2 S.E.; $P < 0.05$).

ciones de temperatura e iluminación. A baja temperatura (5°C), el porcentaje de gametofitos fértiles fue escaso y sólo se observó diferenciación de oogonios con densidades de flujo fotónico bajas (5 a $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$); densidades mayores inhibieron completamente la fertilidad. A 10°C se obtuvieron los valores más elevados de fertilidad, alcanzando a 60% de gametofitos con desarrollo de oogonios cuando se iluminó con $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; con densidades mayores y menores los porcentajes de fertilidad alcanzaron valores más bajos. A 14°C , la fertilidad fue nula o escasa (menos de 5%), independientemente de la iluminación utilizada. Este efecto se acentuó a 18°C , cuando sólo se desarrollaron escasos oogonios a las densidades más bajas (5 y $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

b) Interacciones de fotoperíodo y densidad de flujo fotónico (a 10°C).

La Fig. 7 muestra las interacciones de distintos fotoperíodos e iluminación sobre

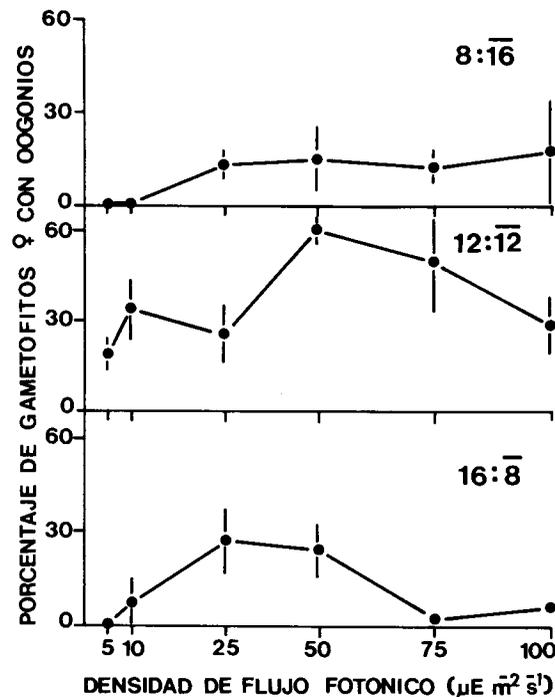


Fig. 7: Interacciones de fotoperíodo y densidad de flujo fotónico sobre fertilidad de *Lessonia nigrescens*. Los puntos representan valores promedios de porcentajes de gametofitos femeninos en los que se han desarrollado oogonios; barras verticales ± 2 errores estándar; $P < 0,05$.

Effects of photoperiod and photon flux density on the fertility of *Lessonia nigrescens*. Values are mean of percentage mature female gametophytes (± 2 S.E.; $P < 0.05$).

la fertilidad. En condiciones de día corto ($8:16$ h), bajas densidades (5 y $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inhibieron totalmente la diferenciación de oogonios. Densidades de $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o más indujeron fertilidad en aproximadamente 15% de los gametofitos.

En fotoperíodo de 12 horas se produjo diferenciación de oogonios en todas las condiciones de iluminación, siendo la más favorable $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con un 60% de gametofitos fértiles. Densidades mayores redujeron los valores de fertilidad a 30 por ciento. En fotoperíodo de $16:8$ h se produjo una curva de tendencia similar a la anterior aunque más deprimida. Con bajas densidades (5 y $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se observó nula o escasa fertilidad. Esta aumentó levemente con densidades de flujo fotónico de 25 y $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero con densidades altas la fertilidad fue casi completamente inhibida.

Crecimiento de esporofitos

a) Interacción de temperatura y densidad de flujo fotónico.

En general sólo hubo desarrollo de esporofitos en los cultivos mantenidos a 10°C (Fig. 8), con tasas de crecimiento diario que fluctuaban entre 10 y 15% en todas las

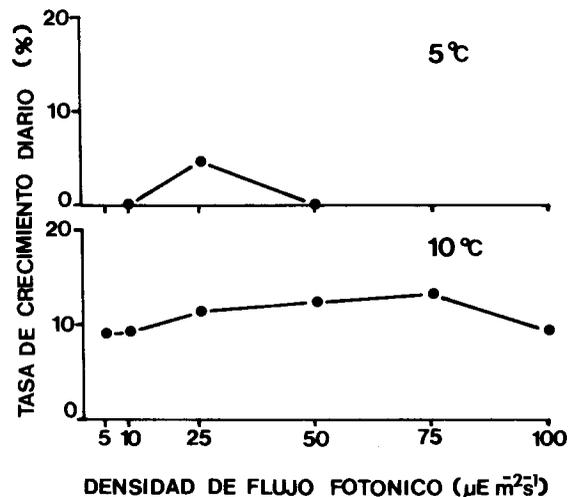


Fig. 8: Interacciones de temperatura y densidad de flujo fotónico sobre la tasa de crecimiento de esporofitos de *Lessonia nigrescens*. Los puntos representan valores promedios de tasa de crecimiento de esporofitos.

Effects of temperature and photon flux density on the growth rates of sporophytes of *Lessonia nigrescens*. Values are mean growth rates of sporophytes.

condiciones de iluminación. A 5°C sólo aparecieron esporofitos cuando la densidad de flujo fotónico era de $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A 14 y 18°C el desarrollo de esporofitos en todas las condiciones de iluminación fue tan escaso que no se pudo evaluar la tasa de crecimiento.

b) Interacción de fotoperíodo y densidad de flujo fotónico.

A 10°C prácticamente todas las combinaciones de fotoperíodo permitieron desarrollo de esporofitos. En todas las condiciones probadas la tasa de crecimiento diario fluctuó entre 10 y 15%, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Con fotoperíodo de 8:16 h no se obtuvo desarrollo de esporofitos en las condiciones de menor iluminación, a pesar de que hubo cierta diferenciación de oogonios (Fig. 9).

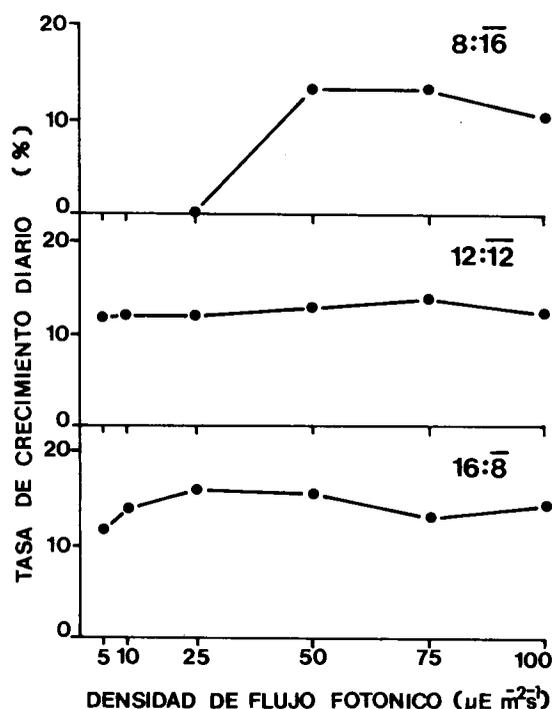


Fig. 9: Interacciones de fotoperíodo y densidad de flujo fotónico sobre el crecimiento de esporofitos de *Lessonia nigrescens*. Los puntos representan valores promedios de tasa de crecimiento de esporofitos.

Effects of photoperiod and photon flux density on the growth of sporophytes of *Lessonia nigrescens*. Values are mean growth rates of sporophytes.

DISCUSION

Las secuencias de desarrollo de las distintas etapas del ciclo de vida de *Lessonia nigrescens* son similares, en líneas generales, a las descritas para el orden Laminariales (Kain 1979). Sin embargo, y tal como también sucede en otras especies de este orden (Kain 1979, Lüning 1980), el desarrollo de *L. nigrescens* en cultivo puede seguir patrones diferentes según las condiciones ambientales. Un análisis de los requerimientos de cultivo (estudiados en el presente trabajo y en Hoffmann & Santelices 1982, Hoffmann *et al.* 1984) indican no sólo que los requerimientos y tolerancias a cambios en las condiciones de cultivo varían en las distintas etapas de desarrollo, sino, además, que en algunas etapas las condiciones ambientales pueden inducir distintos patrones de desarrollo.

Las meiosporas, en apariencia, sólo requieren de un rango determinado de temperaturas para germinar, alcanzándose entre 60 y 90% de germinación a 10 y 14°C. La germinación es relativamente independiente de la iluminación y, de hecho, en algunas Laminariales las meiosporas incluso germinan en oscuridad (Kain 1964, 1969, Lüning 1980). Sólo una combinación de alta iluminación y alta temperatura tiende a disminuir el porcentaje de germinación. La germinación también es independiente de la concentración de nutrientes del medio, lo que probablemente se debe a que utilizan nutrientes de reserva (Lüning 1980, Hoffmann *et al.* 1984).

En contraste, los gametofitos tienen patrones de desarrollo y fertilidad notoriamente diferentes, según las condiciones de cultivo. En condiciones de baja temperatura, el desarrollo se detiene muy luego después de la germinación de las meiosporas, formándose células primarias pequeñas que no se dividen y probablemente mueren poco después. Este efecto es independiente de la cantidad de luz que reciban las esporas. Efectos similares han sido descritos en *Laminaria digitata* (Cosson 1973) y en *L. hyperborea* y *L. saccharina* (Lüning 1980).

Si la temperatura es adecuada (alrededor de 10°C), pero la intensidad de iluminación es insuficiente, y si se aplica fotoperíodo excesivamente corto o largo, se desarrollan gametofitos multicelulares filamentosos, estériles. Se obtiene un patrón de desarrollo similar si la adición de nu-

trientes es inadecuada, sea por insuficiente adición de nitrato y fosfato, sea por exceso de fosfato (Hoffmann & Santelices 1982).

En contraste, si además de una temperatura adecuada se proporcionan cantidades de luz adecuadas, fotoperíodo de 12 h y concentraciones medias de nitrato y fosfato, el crecimiento se satura a $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tal como en otras Laminariales (Kain 1964, Lüning & Neushul 1978, Lüning 1980), y en estas condiciones se desarrollan gametofitos de pocas células en los que rápidamente se diferencian estructuras reproductivas. El bajo punto de saturación lumínica de los gametofitos de Laminariales ha llevado a que ellos sean considerados plantas de extrema sombra (Lüning & Neushul 1978). En esta condición de temperatura óptima, llama la atención el marcado efecto del fotoperíodo sobre el desarrollo de los gametofitos: 12 horas de luz producen gametofitos pequeños, en tanto que día corto y día largo producen gametofitos de gran tamaño. Este efecto se contrapone con la tendencia señalada para otras especies, en las que, a mayor cantidad de luz, mayor es el incremento en el tamaño de las plantas (Edwards 1971, Fortes & Lüning 1980).

El crecimiento vegetativo de los gametofitos y fertilidad aparecen como tendencias antagónicas. En efecto, los gametofitos multicelulares de gran tamaño permanecen estériles durante tiempos prolongados, en tanto que los gametofitos pequeños, de pocas células, alcanzan rápidamente la fertilidad (Kain 1979, Lüning & Neushul 1978, Hoffmann & Santelices 1982).

Los resultados obtenidos sugieren que, en *L. nigrescens*, las etapas de diferenciación de gametos y fertilización son las que requieren un equilibrio más preciso de las condiciones de cultivo. Temperaturas demasiado bajas o muy elevadas inhiben la fertilidad, y cuando la temperatura es óptima, el fotoperíodo más adecuado para la diferenciación de oogonios es el de 12 h. Condiciones de día corto y de día largo tienden a disminuir la fertilidad. En forma similar, en *L. saccharina*, fotoperíodos de día corto reducen la fertilidad (Hsiao & Druehl 1973), y también en *L. saccharina* y en *Nereocystis luetkeana* condiciones de día largo disminuyen el porcentaje de gametofitos fértiles (Hsiao & Druehl 1971, Vadas 1972).

Los esporofitos parecen ser menos exigentes en sus requerimientos que los ga-

metofitos, ya que en la mayoría de las condiciones en que llegan a desarrollarse esporofitos, éstos, aunque aparezcan en pequeño número, son morfológicamente normales, corroborando observaciones previas (Hoffmann *et al.* 1984). Sin embargo, la tasa de crecimiento es influida por la temperatura, obteniéndose los valores más elevados de crecimiento a 10°C. Bolton & Lüning (1982) indican que en otras especies de Laminariales las temperaturas óptimas de crecimiento de esporofitos también varían entre 10 y 15°C, y Kain (1969, 1979) demuestra que las temperaturas más bajas retardan el crecimiento en *Laminaria*.

Los distintos patrones de desarrollo de *Lessonia nigrescens* discutidos más arriba aparentemente también ocurren en condiciones naturales y se ha sugerido que ellos representan distintas respuestas adaptativas a variaciones ambientales (Kain 1979, Lüning 1980, Hoffmann & Santelices 1982, Hoffmann *et al.* 1984). Aunque *L. nigrescens* es fértil durante todo el año en la zona central de Chile, el destino de las esporas y los patrones de desarrollo de los gametofitos son determinados por las características climáticas estacionales, de modo que la aparición de esporofitos juveniles queda restringida a los meses de agosto y noviembre (Santelices y Ojeda, 1984). Las condiciones de temperatura e iluminación del invierno teóricamente permiten que las esporas germinen, pero en estas condiciones el crecimiento de la célula primaria es inhibido. Un ligero aumento de la temperatura hacia finales de invierno estimula el desarrollo de gametofitos multicelulares, pero éstos permanecerían estériles por falta de iluminación adecuada.

Al aumentar la longitud de los días, cuando comienza la primavera, es probable que se desarrollen gametofitos unicelulares, o de pocas células, en los que rápidamente se diferencian estructuras reproductivas. A partir de este tipo de gametofitos se desarrollarían los esporofitos que aparecen durante la primavera.

Es posible que el aumento de la temperatura, concomitante con el avance de la estación, tienda a disminuir la fertilidad de los gametofitos, y que al llegar el verano la combinación de alta temperatura e iluminación produzca una fuerte disminución de la germinación. Los escasos gametofitos

que pudieran llegar a desarrollarse serían, con seguridad, muy pequeños y estériles.

Es esencial conocer los requerimientos de las distintas fases de desarrollo de una especie para la implementación de sistemas de cultivos. Estos cambian a lo largo del

desarrollo y probablemente son diferentes en distintas especies. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten aconsejar las condiciones resumidas en la Fig. 10 como óptimas para el desarrollo de las etapas microscópicas del ciclo de vida de *Lessonia nigrescens*.

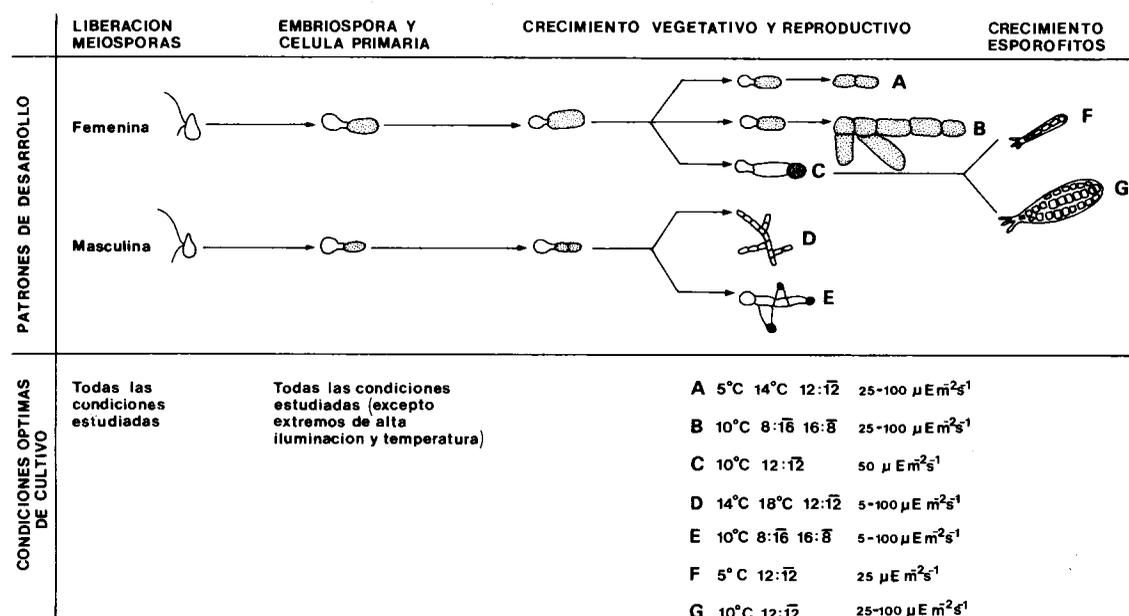


Fig. 10: Esquema resumen de las condiciones óptimas de cultivo para los distintos patrones de desarrollo microscópico del ciclo de vida de *Lessonia nigrescens*. A. Gametofito femenino poco desarrollado, vegetativo. B. Gametofito femenino muy filamentosos, y de gran tamaño, vegetativo. C. Gametofito femenino unicelular, reproductivo. D. Gametofito masculino muy filamentosos, vegetativo. E. Gametofito masculino, reproductivo. F. Esporofito poco desarrollado. G. Esporofito de tamaño normal.

Schematic outline of different culture conditions on the patterns of development of the microscopic stages of *Lessonia nigrescens*. A. Underdeveloped female gametophyte, vegetative stage; B. Large filamentous female gametophyte, vegetative stage; C. Unicellular female gametophyte, reproductive stage; D. Filamentous male gametophyte, vegetative stage; E. Male gametophyte, reproductive stage; F. Underdeveloped sporophyte; G. Normal size sporophyte.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Subsecretaría de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, a través del proyecto "Bases Biológicas para el Manejo de Praderas de *Lessonia nigrescens*".

LITERATURA CITADA

- BOLTON JJ & K LÜNING (1982) Optimal growth and maximal survival temperatures of Atlantic *Laminaria* species (Phaeophyta) in culture. *Marine Biology* 66: 89-94.
- CANCINO J & B SANTELICES (1981) The ecological importance of kelp-like holdfast as an habitat of invertebrates in central Chile. II. Factors affecting community organization. In: T. Levring (ed.): *Proceedings Xth International Seaweed Symposium*. Walter de Gruyter. New York: 241-246.
- CANCINO J & B SANTELICES (1984) Importancia ecológica de los discos adhesivos de *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta) en Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 57: 23-34.
- COSSON J (1973) Action de la température et de la lumière sur le développement du gametophyte de la *Laminaria digitata* (L). Lam. (Phéophycée, Laminariales). *Comptes Rendus Academie Sciences D*. 276: 973-975.
- COSSON J & P GAYRAL (1977) Optimal conditions for growth and fertility of *Laminaria digitata* gametophytes. In: A Jensen & JR Stein (eds.): *Proceedings IXth International Seaweed Symposium*. Science Press, Princeton: 59-66.
- CHEN LC-M, T EDELSTEIN & J McLACHLAN (1969) *Bonnemaisonia hamifera* in nature and in culture. *Journal of Phycology* 5: 211-220.
- EDWARDS P (1971) Effects of light intensity, daylength and temperature on growth and reproduction of *Callithamnion bysoides*. *Contributions in Phycology*, 163-174.

- FORTES MD & K LÜNING (1980) Growth rates of North Sea macroalgae in relation to temperature, irradiance and photoperiod. *Helgolander wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 34: 15-29.
- HOFFMANN AJ & B SANTELICES (1982) Effects of light intensity and nutrients on gametophytes and gametogenesis of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 60: 77-89.
- HOFFMANN AJ, M AVILA & B SANTELICES (1984) Interactions of nitrate and phosphate on the development of microscopic stages of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 78: 177-186.
- HSIAO SIC & LD DRUEHL (1971) Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. The effects of light and culture media. *Canadian Journal of Botany* 49: 1503-1508.
- HSIAO SIC & LD DRUEHL (1973) Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. IV. *In situ* development of gametophytes and young sporophytes. *Journal of Phycology* 9: 160-164.
- KAIN J (1964) Aspects of the biology of *Laminaria hyperborea*. III. Survival and growth of gametophytes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 44: 415-433.
- KAIN J (1969) The biology of *Laminaria hyperborea*. V. Comparison of early stages of competitors. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49: 455-473.
- KAIN J (1979) A view of the genus *Laminaria*. *Oceanography Marine Biology Annual Review* 17: 101-161.
- LÜNING K (1980) Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three *Laminaria* species (Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 16: 1-15.
- LÜNING K & MJ DRING (1975) Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* growth in blue and red light. *Marine Biology* 29: 195-200.
- LÜNING K & M NEUSHUL (1978) Light and temperature demands for growth and reproduction of laminarian gametophytes in southern and central California. *Marine Biology* 45: 297-309.
- NORTH WJ (1971) The biology of giant kelp beds (*Macrocystis*) in California. *Nova Hedwigia* 32: 17-20.
- SANTELICES B (1982) Bases biológicas para el manejo de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales) en Chile central. En: JC Castilla (ed.): Segundo Seminario-Taller, Bases Biológicas para el uso y manejo de recursos naturales renovables: Recursos Biológicos marinos. Monografías Biológicas 2: 135-150.
- SANTELICES B, JC CASTILLA, J CANCINO & P SCHMIEDE (1980) Comparative ecology of *Lessonia nigrescens* and *Durvillaea antarctica* (Phaeophyta) in central Chile. *Marine Biology* 59: 119-132.
- SANTELICES B & J LOPEHANDIA (1981) Chilean Seaweed Resources: A quantitative review of potential and present utilization. In: T. Levring (ed.): Proceedings Xth International Seaweed Symposium. Walter de Gruyter. New York: 725-730.
- SANTELICES B & P OJEDA (1984) Recruitment, growth and survival of *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta) at various tidal levels in exposed habitats of central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 14: 165-173.
- SOKAL RR & FJ ROHLF (1969) *Biometry*. Freeman and Co. San Francisco.
- VADAS RL (1972) Ecological implications of culture studies in *Nereocystis luetkeana*. *Journal of Phycology* 8: 196-202.