

UNIVERSIDAD CATOLICA DEL NORTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO BIOLOGIA MARINA

TITULO DEL TEMA

**“ESTIMACION DEL EFECTO DE LA AUTOFERTILIZACION
SOBRE LOS PARAMETROS REPRODUCTIVOS Y DE
CRECIMIENTO EN LESSONIA NIGRESCENS BORY,
1825 (LAMINARIALES, PHAEOPHYCEAE),
EN LABORATORIO”**

Nombre del Alumno

Sebastián Andrés Godoy Báez

Profesor Guía: Fadia Beatriz Tala González

2008

TITULO DEL TEMA

**“ESTIMACION DEL EFECTO DE LA AUTOFERTILIZACION
SOBRE LOS PARAMETROS REPRODUCTIVOS Y DE
CRECIMIENTO EN LESSONIA NIGRESCENS BORY,
1825 (LAMINARIALES, PHAEOPHYCEAE),
EN LABORATORIO”**

Por: Sebastián Andrés Godoy Báez

Departamento Biología Marina

Fecha: 23/06/2008

Aprobación Comisión de Calificación

.....

Firma

Julio Vásquez

Decano Facultad Ciencias del Mar

Fadia Beatriz Tala González

**Nombre
Profesor Guía**

Erika Fonck

**Nombre
Profesor Corrector**

Federico Winckler

**Nombre
Profesor Corrector**

**Tesis entrega como requisito para obtener el titulo de
Biólogo Marino en La facultad de ciencias del Mar. Sede Coquimbo.**

2008

**UNIVERSIDAD CATOLICA DEL NORTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

Departamento de Biología Marina

Título del Trabajo

**“ESTIMACION DEL EFECTO DE LA AUTOFERTILIZACION
SOBRE LOS PARAMETROS REPRODUCTIVOS Y DE
CRECIMIENTO EN LESSONIA NIGRESCENS BORY,
1825 (LAMINARIALES, PHAEOPHYCEAE),
EN LABORATORIO”**

**Actividad de Titulación presentada
para optar al Título de: Biólogo Marino**

Nombre del Alumno

Sebastián Andrés Godoy Báez

Coquimbo, Septiembre, 2008

INDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
INDICE DE TABLAS.....	6
INDICE DE FIGURAS y ANEXOS.....	9
1 INTRODUCCION.....	11
2 METODOLOGIA.....	16
2.1. Descripción área de estudio.....	16
2.2. Muestreo de Campo.....	16
2.3. Laboratorio.....	17
2.3.1. Esporulación.....	17
2.3.2. Siembra de zoosporas y cultivo.....	19
2.3.3. Observaciones.....	20
2.4. Crecimiento y Obtención de Imágenes.....	21
2.5. Análisis estadísticos.....	21
3 RESULTADOS.....	23
3.1. Desarrollo microscópico de <i>Lessonia nigrescens</i>	20

3.2.	Efecto de la autofertilización sobre parámetros reproductivos.....	23
3.2.1.	Germinación.....	23
3.2.2.	Fecundidad.....	24
3.2.3.	Fertilidad.....	25
3.3.	Estacionalidad en <i>Lessonia nigrescens</i>	26
3.3.1.	Germinación.....	26
3.3.2.	Fecundidad.....	26
3.3.3.	Fertilidad.....	26
3.4.	Crecimiento de esporofitos.....	26
4.	DISCUSION.....	28
5.	CONCLUSION.....	36
6.	BIBLIOGRAFIA.....	39

Resumen: Las macroalgas pardas del orden Laminariales son un recurso natural de alta importancia ecológica, económica y social. El ciclo de vida presenta alternancias de estados, y su éxito reproductivo depende de factores bióticos y abióticos. En el litoral de la zona norte de Chile, se han observado descensos en las poblaciones de *Lessonia nigrescens*, por efecto de fuertes eventos naturales como el ENOS de 1982/83. Además, la sobreexplotación ha generado amplios sectores despoblados, donde por su fácil acceso la especie más afectada es *Lessonia nigrescens*. Estos bruscos descensos poblacionales generan bajas en la densidad y en casos extremos aislamiento de poblaciones, facilitando las condiciones e instancias para que ocurra una baja en la tasa de reproducción y se de lugar a procesos reproductivos alternativos como la autofertilización. La autofertilización en el tiempo afecta la variabilidad genética, presentando una reducción en el valor fenotípico, conocido como depresión por consanguinidad. Se plantea que “La autofertilización genera una baja o retraso en el desarrollo de las fases microscópicas y estados tempranos de esporofitos de *Lessonia nigrescens*, como resultado en el aumento de la consanguinidad”.

Las algas utilizadas en la investigación, fueron recolectadas desde el intermareal rocoso de la Pampilla – Coquimbo, Chile. Las láminas fueron colectadas al azar y sometidas a esporulación, con agua de mar microfiltrada y esterilizada. Los diferentes tratamientos (cruces) y sus replicas, fueron cultivados a una concentraciones promedio de $2.0 \cdot 10^4$ células/ml., y expuestos a las mismas condiciones de laboratorio y enriquecidas semanalmente.

Resultados obtenidos indican que la autofertilización genera diferencias significativas sobre la fecundidad, fertilidad y el crecimiento de *Lessonia nigrescens*. Más aun, esta podría disminuir la tasa de renovación de una pradera y limitar la capacidad para reproducirse. Sin embargo, el retardo en el desarrollo como estrategia de autoincompatibilidad contra la autofertilización, puede ser una alternativa de flujo genético al interior de una población sometida a un alto grado de consanguinidad.

Abstract: The kelp of order Laminariales are a natural resource of high ecological, economic and social importance. Its life cycle, presents alternation of states, and its reproductive success depends on biotic and abiotic factors. In the littoral of the north zone of Chile, decreases have been observed in the populations of *Lessonia nigrescens*, for effect of strong natural events as the ENOS of 1982/83. In addition the overexploitation has generated wide uninhabited sectors, where by its easy access the most affected species is *Lessonia nigrescens*. These abrupt population decreases generate falls in the density and in extreme cases population isolation, facilitating the conditions and instances in order that a fall happens in the rate of reproduction and of place to alternative reproductive processes as the self-fertilization. The self-fertilization in the time affects the genetic variability, presenting a reduction in the phenotypic value, known as depression by endogamy. One considers that "The self-fertilization generates a fall or delay in the development of the microscopic phases and early states of sporophytes of *Lessonia nigrescens*, as result in the increase of the consanguinity".

The seaweed used in the investigation, was collected from the rocky intertidal of the Pampilla-Coquimbo, Chile. The plate were collected at random and submitted to sporulation, with seawater of microfiltered and sterilized. The different treatments (cross) and his replies, were cultivated to concentrations average of $2.0 \cdot 10^4$ células/ml., and exposed to the same conditions of laboratory and enriched weekly.

Results obtained indicate that the self-fertilization generates significant differences on the fecundity, fertility and the growth of *Lessonia nigrescens*. More even, this could diminish the rate of renovation of a prairie and limit the capacity to reproduce. Nevertheless, the delay in the development like strategy of self-incompatibility against the self-fertilization can be an alternative of genetic flow to the insider of a population submitted a high degree of self-fertilization.

AGRADECIMIENTOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Anova de dos vías de germinación.....	45
Tabal 2.- Tukey de germinación de sus tratamientos.....	45
Tabla 3.- Tukey de germinación en las estaciones.....	45
Tabla 4.- Tukey de germinación estacion de verano.....	46
Tabla 5.- Tukey de germinación estacion de otoño.....	46
Tabla 6.- Tukey de germinación estacion de invierno.....	46
Tabla 7.- Tukey de germinación estacion de primavera.....	46
Tabla 8.- Anova de dos vías fecundidad.....	47
Tabla 9.- Tukey de fecundidad de sus tratamientos.....	47
Tabla 10.- Tukey de fecundidad en las estaciones.....	47
Tabla 11.- Tukey de fecundidad estacion de verano.....	48
Tabla 12.- Tukey de fecundidad estacion de otoño.....	48
Tabla 13.- Tukey de fecundidad estacion de invierno.....	48
Tabla 14.- Tukey de fecundidad estacion de primavera.....	48

Tabla 15.- Anova de dos vías fertilidad.....	50
Tabla 16.- Tukey de fertilidad de sus tratamientos.....	50
Tabla 17.- Tukey de fertilidad en las estaciones.....	50
Tabla 18.- Tukey de fecundidad estacion de verano.....	51
Tabla 19.- Tukey de fecundidad estacion de otoño.....	51
Tabla 20.- Tukey de fecundidad estacion de invierno.....	51
Tabla 21.- Tukey de fecundidad estacion de primavera.....	51
Tabla 22.- Anova de una vía germinación estacional.....	52
Tabla 23.- Tukey de germinación estacional.....	52
Tabla 24.- Anova de una vía fecundidad estacional.....	52
Tabla 25.- Tukey de fecundidad estacional.....	53
Tabla 26.- Anova de una vía fertilidad estacional.....	53
Tabla 27.- Tukey de fertilidad estacional	53
Tabla 28.- Anova de dos vías sobre valores de crecimiento.....	54
Tabla 29.- Tukey de tallas entre los tratamientos.....	54

Tabla 30.- Tukey de los tratamientos dentro del día 25.....	54
Tabla 31.- Tukey de los tratamientos dentro del día 35.....	55
Tabla 32.- Tukey de los tratamientos dentro del día 45.....	55
Tabla 33.- Tukey de tallas entre los días de cultivo.....	55
Tabla 34.- Tukey de tallas de autofertilización entre los días.....	55
Tabla 35.- Tukey de tallas de fertilización cruzada entre los días..	56
Tabla 36.- Tukey de tallas del control entre los días.....	56

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Fig. 1.	Área de estudio.....	57
Fig. 2.	<i>Lessonia nigrescens</i>	57
Fig. 3.	Cinturón de <i>L. nigrescens</i>	58
Fig. 4.	Metodología empleada en cruces.....	58
Fig. 5.	Morfología reproductiva.....	59
Fig. 6.	Fases gaméticas de <i>Lessonia nigrescens</i>	59
Fig. 7.	Esporofitos microscópicos de <i>L. nigrescens</i>	60
Fig. 8.	Morfologías microscópicas de <i>L. nigrescens</i>	60
Fig. 9.	Germinación.....	61
Fig. 10.	Fecundidad.....	61
Fig. 11.	Fertilidad	62
Fig. 12.	Parámetros reproductivos de <i>L. nigrescens</i>	62
Fig. 13.	Crecimiento.....	63

7.2. ANEXOS

**Anexo 1. Cuadro esquemático para la preparación de solución
de enriquecimiento de Provosoli (PES)..... 64**

**Anexo 2. Cuadro esquemático para la Preparación de Dióxido de
Germanio..... 66**

1. INTRODUCCION

La explotación de los recursos algales, constituyen una actividad de alta importancia económica, al ser demanda por parte de un gran número de países. Su utilización como fuente alimenticia humana, es empleada por comunidades que habitan sectores costeros de los diferentes continentes. También, son utilizadas como suplemento alimenticio para organismos de interés económico en el sector acuícola, y en mayor medida para la obtención de metabolitos secundarios y derivados. Los principales importadores de algas son Japón, China, Estados Unidos, Dinamarca y Rusia, entre otros, países que generan una gran demanda de estos recursos en Chile (www.Prochile.cl).

Las macroalgas presentan un rol de real importancia en los ambientes de fondos rocosos, en mares templados y subpolares (Dayton, 1985). Estas asociaciones de macroalgas en el hemisferio Sur de América, están constituidas y dominadas por *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis pyrifera*, las cuales, constituyen uno de los principales recursos algales a lo largo de la costa de Chile. Estas macroalgas Phaeophyceae presentan un ciclo de vida típico del orden Laminariales, caracterizado por una alternancia de fases obligatoria entre la generación diploide, constituida por el esporofito macroscópico, y la generación gametofítica microscópica haploide. La reproducción asexual en estas especies de macroalgas, involucra la formación de esporas denominadas zoosporas o meioesporas. Estas se desarrollan en esporangios uniloculares que crecen formando soros (zonas oscuras) en cualquier porción de la lámina para *Lessonia spp.*, o en láminas especializadas (esporofilas) para *Macrocystis spp.* (Ávila et al., 1985). La meioesporas de las Laminariales germinan y crecen, dando origen a gametofitos masculinos y femeninos microscópicos. La reproducción sexual comprende la formación y fusión de gametos, fusión de la cual, se genera un cigoto que se desarrolla en un nuevo esporofito, esta forma es la principal alternativa para la producción de un nuevo individuo (Ávila et al., 1985).

Según Brawley y Johnson (1992), la reproducción sexual es una parte común del ciclo de vida de muchas algas marinas, aunque no siempre un paso obligatorio. La mayor diferencia ecológica entre la reproducción sexual y asexual, es que la primera requiere el encuentro y fusión de dos células morfológicamente diferentes, que se encuentran en un medio altamente dinámico. El encuentro de las células reproductivas, depende de factores ambientales y biológicos, como el número de gametos producidos, la sincronización de su producción, de la liberación de los gametofitos de una población, de la mezcla y dilución de los gametos según el movimiento del agua, la capacidad de los gametos a la taxis, la temperatura, calidad y cantidad de luz, y sus reservas nutricionales, entre otros (Vadas, 1972; Lüning & Neulshul, 1978; Lüning, 1980; Brawley & Johnson, 1992; Brzezinski et al., 1993). No obstante, las estrategias reproductivas de algunas macroalgas, pueden presentar diferentes rutas de desarrollo de un nuevo individuo, como la reproducción asexual (apogamia, partenogénesis), fragmentación o la autofertilización (Santelices, 1990; Oppliger et al., 2007; Raimondi et al., 2004).

La autofertilización es el resultado de la unión de gametos proveniente de un mismo individuo y ha sido descrita en diversas plantas y animales (Jarne & Charlesworth, 1993). Según Charlesworth & Charlesworth (1987), el cruce de individuos estrechamente relacionados, genera usualmente una reducción del valor fenotípico, conocido como depresión por consanguinidad. La depresión por endogamia o por consanguinidad se puede considerar como el acoplamiento de material genético de individuos relacionados entre sí por sus antepasados. Y el grado de parentesco entre individuos de una población depende del tamaño y del número posible de antepasados (Falconer, 1989). Por otro lado, Charlesworth & Charlesworth (1987) proponen dos causas genéticas para la depresión por consanguinidad; la primera enfocada a los alelos deletéreos recesivos (presentes en bajas frecuencias en las poblaciones) que se expresan en una endogamia individual, que llega a ser homocigótico en loci críticos. La segunda causa, que reduce la heterocigosidad por individuo dentro de una población. En ambos, la

depresión por consanguinidad por efecto de la autofertilización, produce disminución en la supervivencia, efectos negativos en el crecimiento y baja fecundidad (Charlesworth & Charlesworth, 1987 y 1999).

En plantas superiores, sobre el 50 % de toda la reproducción ocurriría por instancias de autofertilización, aun cuando, puede ser ocasionalmente menor por estrategias de autoincompatibilidad (Barrett et al., 1996). En el tiempo, la autofertilización muestra efectos en la variabilidad genética, como resultado de la desviación de la panmixia (reproducción aleatoria en una población). El aumento en la frecuencia de homocigotos se hace evidente, con la pérdida de la heterocigosidad al transcurrir unas pocas generaciones por autofertilización (Charlesworth, 2003). Husband & Schemske (1992), sugieren que el costo de la autofertilización se manifiesta en estados tardíos de la historia de vida de las especies, que la utilizan como estrategia reproductiva. Resultados obtenidos por Raimondi et al. (2004) en la macroalga parda *Macrocystis pyrifera*, confirman que los efectos de la depresión por consanguinidad se ve mayormente en estados tardíos del esporofito, en procesos como la reproducción. Además, individuos obtenidos por autofertilización, manifiestan diferencias en la abundancia por efecto de la sobrevivencia de los esporofitos, dependiendo del grado de consanguinidad, decreciendo linealmente con el aumento del coeficiente de consanguinidad poco después de la unión de sus gametos (Raimondi et al., 2004).

Por otro lado, los niveles de demanda del mercado de las macroalgas pardas, han generado modificación en la extracción desde sus praderas naturales, ya que de ser colectadas en sitios históricos de varadero (muerte natural), pasaron a ser extraídas directamente de sus praderas naturales. Esta extracción de grandes algas pardas (Laminariales), puede tener implicancias ecológicas no dimensionadas, debido a que estas poblaciones son reconocidas como áreas de refugio, alimento, reproducción y crecimiento de etapas juveniles de invertebrados bentónicos, algunos de importancia económica (Santelices, 1989; Vásquez & Westermeier, 1993). Además, sus discos de fijación son utilizados por una gran cantidad de

invertebrados como refugio para el embate del oleaje, especialmente en costas expuestas, donde éstos disminuyen el efecto mareomotriz sobre las comunidades de invertebrados que allí habitan (Cansino & Santelices, 1984). Estas algas son un importante recurso de alimentación para un gran número de pequeños organismos, peces e invertebrados, que la utilizan como fuente alimenticia particulada, nutrientes disueltos, algas a la deriva o fijas al sustrato (Kirkman & Kendrick, 1997; Lobban & Harrison, 1994). La remoción de tales individuos puede generar cambios en los patrones de ocupación espacial, al aumentar el número de herbívoros o generarse áreas desérticas que tardan mucho tiempo en ser repobladas, y generar la ocupación permanente por parte de otras algas o especies oportunistas (Vázquez & Santelices, 1990; Santelices & Ojeda, 1984; Martínez & Cárdenas 2001). Además, por su fácil acceso la especie mas afectada es *L. nigrescens*, y en menor medida *Lessonia. trabeculata*, *Macrocystis spp.* y *Durvillaea antarctica* (González et al., 2002).

Lessonia nigrescens es el alga dominante en áreas intermareales rocosas entre el sur del Perú y a lo largo de todo Chile, y es principalmente empleada para la industria de alginatos (Santelices, 1989). Fuertes eventos naturales como el ENOS (Evento Natural Oscilación del Sur) o El Niño de 1982/83, han generado mortalidades masivas de *L. nigrescens* a lo largo de kilómetros de la costa norte del país (Martínez & Cárdenas, 2003). Más aun, en estos últimos años, la gran demanda ha generado bajas en la densidad poblacional y/o aislamiento, con efecto en la recuperación de las praderas, produciendo fragmentación en las poblaciones (González et al., 2002; Martínez & Cárdenas, 2003). El aislamiento de una población puede afectar su flujo genético, y como consecuencia de la interrupción en su distribución, es esperable una aceleración en la diferenciación genética. Como el suceso descrito, por fragmentación natural de estuarios o playa de arena, para el alga roja *Mazzaella laminaroides*, en la que se ve incrementada la diferenciación genética en una escala espacial de 5 Km. dentro del intermareal rocoso (Faugeron et al., 2001; Faugeron et. al., 2005).

El poco conocimiento del efecto del aislamiento de las poblaciones en la tasa de recuperación y la posibilidad de que ocurra autofertilización, con sus consecuencias o beneficios en poblaciones naturales de macroalgas, motivan la investigación sobre este tema. Por lo cual, se plantea que “La autofertilización genera una baja o retraso en el desarrollo de las fases microscópicas y estados tempranos de esporofitos de *L. nigrescens*, como resultado en el aumento de la consanguinidad”.

El objetivo del trabajo, es evaluar el efecto de la autofertilización sobre los parámetros reproductivos de las fase microscópica y estados tempranos de esporofitos de *Lessonia nigrescens*, en laboratorio.

Como objetivos específicos se plantean:

- Evaluar cuantitativamente el efecto estacional de la autofertilización sobre la germinación, fecundidad y en la fertilidad de las fases microscópicas de *Lessonia nigrescens*.
- Estimar la presencia de estacionalidad en parámetros reproductivos de *Lessonia nigrescens*.
- Evaluar cuantitativamente el efecto de la autofertilización sobre el crecimiento de esporofitos microscópicos de *Lessonia nigrescens* en primavera.

2. METODOLOGIA

2.1 Descripción área de estudio

Todo el material algal utilizado en la investigación, fue recolectado estacionalmente entre verano y primavera del año 2007, desde el intermareal rocoso del sector denominado La Pampilla – Coquimbo, IV región, Chile (29° 57' S - 71° 22' O). La pradera de *Lessonia nigrescens* se encuentra específicamente al lado sur del emisario urbano ubicado en esta ciudad, sector que presenta características de costa expuesta al oleaje, además, de una gran población de *Lessonia nigrescens* que se extiende en la franja intermareal bajo de las rocas presentes en el lugar (Fig. 1).

2.2. Muestreo de Campo

La obtención de plantas reproductivas desde la población natural de *L. nigrescens* (Fig. 2A, B y C), se realizó mediante el recorrido de la franja intermareal (Fig. 3A) provisto de trajes de buceo y herramientas adecuadas para cortar estipes de cada planta seleccionada (Fig. 3B). Las plantas se seleccionaron al azar, pero con una distancia mínima de 10 metros entre ellas, distancia que fue obtenida con la utilización de una soga de nylon dimensionada cada 1 metro, y abarcando una distancia aproximada de 100 m. lineales dentro de la población. El estipe seleccionado (1 por planta), fue el que presentaba tejido reproductivo adecuado en sus láminas (soros de color pardo-negrusco y de un mayor grosor que de la lámina). Estos fueron individualizados por números de obtención. La enumeración se realizó para un mejor reconocimiento en laboratorio, como también para su reconocimiento al momento de la liberación de sus esporas para la generación de los diferentes tratamientos (cruces).

Los estipes seleccionados, fueron transportados en cajas aislantes con el fin de mantener su humedad, para posteriormente realizar los procedimientos de limpieza en el laboratorio de Botánica Marina de la Universidad Católica del Norte.

2.3. Laboratorio

De cada estipe colectado se selecciono una lámina reproductiva que se utilizó en la liberación de sus zooesporas. Estas láminas se seleccionaron dependiendo del grado aparente de madurez que presentaban, así una que presentaba un soro con tejido de color pardo-oscuro con un mayor relieve, además de un marcado y abultado entorno dentro de la lámina, fue considerada como apropiada para la obtención de sus zooesporas.

El material empleado en el experimento (láminas con tejido reproductivo) se sometieron a una limpieza. Además, para mayor confiabilidad fueron mantenidas en agua dulce por un tiempo de 10 minutos, con el fin de matar todos los protozoos estenohalinos estrictos presentes en ellas.

2.3.1. Esporulación

La esporulación de zooesporas fue realizada utilizando la metodología descrita por Fonck et al. (1998), donde las láminas seleccionadas fueron sometidas a un periodo de deshidratación, en oscuridad (Fig. 3C), a temperatura ambiente de 14° C, por un período de aproximadamente 4 a 6 horas.

La liberación de las zooesporas fue realizada para cada lámina por separado, obteniendo un total de 5 caldos en las estaciones de verano, otoño e invierno y 10 caldos en primavera. Las láminas fueron inducidas a esporular en vasos precipitados de 50 ml., con agua de mar microfiltrada (0,45 μm) y esterilizada (Fig. 3D). La densidad de la zooesporas fue estimada mediante 5 conteos en una cámara de recuento Neubauer Thoma®, Kayagiki Corp, y utilizando un microscopio binocular Olympus CX-21. Todos los tratamientos y sus réplicas, fueron sembrados a una concentración promedio de $2.0 \cdot 10^4$ células/ml. Los tratamientos (cruces) generados fueron (Fig., 4):

Autofertilización (SI): Cruce entre gametos provenientes de gametofitos de zooesporas perteneciente a una misma lámina.

Fertilización cruzada (SII): Cruce entre gametos provenientes de gametofitos de zooesporas de dos láminas diferentes.

Control (SC): Cruce entre gametos provenientes de gametofitos de zooesporas de diez láminas diferentes.

Las réplicas para el cruce de autofertilización (SI) correspondieron a los caldos individuales de las láminas obtenidas desde la población. En un cruce dirigido para la fertilización cruzada (SII), donde sus réplicas correspondieron a un cruce entre dos caldos de láminas diferentes. Para el tratamiento control (SC) se realizó un homogenizado de zooesporas provenientes de todos los caldos. Así para las estaciones de verano, otoño e invierno se desarrollaron 5 réplicas de cada tratamiento, y 10 réplicas para la estación de primavera.

Utilizando la fórmula desarrollada por Wright (1931) se determinó el coeficiente de consanguinidad de la progenie ($1/2n$; donde n : número de progenitores). El coeficiente de consanguinidad o de endogamia, corresponde a la probabilidad que dos genes de un mismo locus sean idénticos dentro de una descendencia (Falcones, 1989). Para este estudio se definió como progenitor a cada una de las láminas obtenida desde la población, y cada lámina aporta una mezcla de zooesporas que se diferencian en gametofitos femeninos y masculinos, en una proporción aproximada de 1:1. Así, para el tratamiento de autofertilización (SI) se obtuvo un coeficiente de consanguinidad de 0,5, debido a que es un cruce de zooesporas hermanas (un progenitor-una lámina). La fertilización cruzada presentó un coeficiente de consanguinidad de 0,25, debido a que las zooesporas proceden de 2 láminas distintas por lo tanto de dos progenitores. El tratamiento control (SC) presentó un coeficiente de consanguinidad de 0,05, debido a que son

empleadas zooesporas de las 10 láminas (10 progenitores) utilizadas en el experimento.

2.3.2. Siembra de zooesporas y cultivo.

Los cultivos fueron realizados en cápsulas de Petri de 6 cm. de diámetro para cada tratamiento y sus replicas. Para el tratamiento de Autofertilización (SI), se adiciono el 100% de zooesporas proveniente de una lámina, y del mismo modo en sus réplicas correspondientes. Para el tratamiento de fertilización cruzada (SII), se realizó una diseminación de zooesporas correspondientes a un 50% de la concentración de una lámina y el restante 50% de otra lámina, el mismo procedimiento fue realizado en las diferentes réplicas del tratamiento. El cruce dirigido de este tratamiento (SII) fue realizado entre plantas que presentaran una distancia superior a 10 metros, entre una y la otra. Para el control (SC), se realizó una mezcla correspondiente al 10% de la concentración final proveniente de cada lámina utilizada en el experimento.

Los diferentes tratamientos y sus réplicas, fueron cultivadas en las mismas condiciones de exposición de luz e intensidad lumínica de 70 μ moles fotones/m²·seg. entregada por tubos fluorescentes de luz día de 40 W y un fotoperiodo de 12:12 (horas luz: horas oscuridad) durante las 4 estaciones.

Los cultivos fueron enriquecidos con medio Provasoli (Anexo 1), adicionado con el cambio de agua de mar microfiltrada y esterilizada cada 7 días, con el fin de mantener en condiciones adecuadas las necesidades de nutrientes para el crecimiento de las fases microscópicas de *L. nigrescens*. Además, se adicionó Dióxido de Germanio al 1% (Anexo 2), para controlar la proliferación de Diatomeas en los cultivos, cuando fue necesario.

2.3.3. Observaciones

La evaluación del desarrollo de los estados microscópicos de la especie, se realizó en cada cápsula de cultivo, con la utilización de microscopio invertido de contraste de fase Nikon. Los parámetros reproductivos a evaluar fueron la germinación, fecundidad y fertilidad.

La germinación de las zooesporas se evaluó el día 3 de cultivo, contabilizando el número de zooesporas que presentaban formación del tubo germinativo, el que se indicó como proporción del número total de esporas contabilizadas (n=100 por cápsula de cultivo).

La fecundidad fue definida como la capacidad potencial de dejar descendencia, esta fue estimada el día 15 de cultivo y expresada como proporción de gametófitos femeninos con oogonio más esporófitos formados, respecto al total de gametófito femenino contabilizado. Esta relación fue obtenida por medio de la fórmula utilizada por Lee & Brinkhuis (1986), que plantea que la Fecundidad = $(a + b)/(a + b + c)$, sobre un conteo de 100 por cápsula, donde a) n° de esporofitos; b) n° de gametofitos femeninos con oogonio y c) n° de gametofitos sin oogonios (Fig. 5).

La fertilidad expresa la descendencia viable de la progenie en un tiempo determinado, esta fue estimada a los 15 días de cultivo y expresada como proporción de esporofitos formados, respecto del total de gametofitos + oogonios + esporofitos, obtenidos hasta ese día de cultivo. Esto realizado por medio de la fórmula utilizada por Lee & Brinkhuis (1986), mencionada como éxito reproductivo (fertilidad) = $a/(a + b + c)$, sobre un conteo de 100 gametofitos + esporofitos por cápsula. Donde a) n° de esporofitos; b) n° de gametófitos con oogonio y c) n° de gametofitos sin oogonio (Fig. 5).

2.4. Crecimiento y Obtención de imagen

El crecimiento de esporofitos juveniles microscópicos (Fig. 7) desarrollados en los diferentes tratamientos (cruces), fue estimado sólo en la estación de primavera. La talla de los esporofitos fue medida a los días 25, 35 y 45 de iniciado los cultivos, mediante la utilización de imágenes obtenidas en el microscopio óptico Olympus CX 31 perteneciente al laboratorio docente de la Universidad Católica del Norte. Las muestras de esporofitos fueron obtenidas de los diferentes tratamientos, al azar sobre cubre objetos dispuestos en el fondo de las cápsulas de cultivo. Estas imágenes fueron obtenidas con una cámara Canon PowerShot A620, Olympus Optical C5050Z instaladas en sus microscopios y Samsung Techwin Digimax V50/a5.

Las imágenes fueron posteriormente procesadas con el software Image-Pro Plus, y la talla de los esporofitos expresada en micrones. Para cada réplica (cápsula), la talla fue promediada en su interior, debido a la variabilidad en el crecimiento de los esporofitos que se presenta en cada capsula.

2.5. Análisis estadísticos

Para realizar los análisis estadísticos de las diferentes proporciones, estas fueron transformadas mediante la función angular Arcoseno. Además, estos datos transformados posteriormente fueron sometidos a los supuestos requeridos para ser trabajados en ANOVA. A todos los datos (germinación, fecundidad y fertilidad) se les evaluó la normalidad y homocedasticidad de varianza, y una vez corroborados estos supuestos se aplicó un análisis de ANOVA paramétrico de dos vías. En donde como primer factor se consideró los tratamientos (cruces) y como segundo factor las estaciones.

Para la estimación del efecto de la autofertilización sobre el crecimiento de los esporofitos tempranos, se realizó un Anova de dos vías, que consideró como primer factor los tratamientos (cruces) y como segundo factor el tiempo de

medición (días). Las tallas fueron trabajadas sin ninguna modificación de sus valores reales, ya que cumplían con los supuestos requeridos.

Por otro lado, la caracterización estacional de los parámetros reproductivos de *Lessonia nigrescens*, se realizó mediante una prueba de Anova de una vía sobre el tratamiento control, considerando como factor las estaciones.

La prueba de comparación múltiple Tukey, fue utilizada para determinar diferencias entre los factores de los Anovas. Todos los análisis se realizaron mediante el software estadístico Sigma Stat 3.1.

3. RESULTADOS

3.1. Desarrollo microscópico de *Lessonia nigrescens*

Las zooesporas de *Lessonia nigrescens* presentaron motilidad al momento de su liberación, estas luego de transcurridas sus primeras 24 horas, se observaron asentadas en la superficie de las cápsulas de petri, adquiriendo una forma elongada denominada tubo germinativo (Fig. 6 B). Esta forma a medida que transcurre el tiempo de cultivo va cambiando debido al traspaso del material citoplasmático hacia la célula basal del gametofito temprano (Fig. 6 C). Luego de transcurrido estos procesos, alrededor del día 7 de cultivo, se da lugar a la diferenciación de los gametofitos en masculino y femenino (Fig. 6 D), que maduran y desarrollan sus estructuras reproductivas (anteridio en el macho y oogonio en la hembra). Tras el desarrollo y maduración de sus estructuras, se produce la fertilización de la célula huevo u oogonio (Fig. 6 E), dependiente del gametofito femenino hasta el desarrollo de su rizoides primarios que le permite fijarse al sustrato por si sólo, como esporofito temprano microscópico (Fig., 7 D). Sin embargo, se observó que su desarrollo puede tomar diferentes patrones según las condiciones y efectos de cruces reproductivos (Fig. 7).

3.2. Efecto de la autofertilización sobre parámetros reproductivos

3.2.1. Germinación

Los resultados estadísticos respecto al efecto de la autofertilización sobre la germinación, indican que se presentan diferencias significativamente entre los tratamientos ($P=0,032$) y las estaciones ($P<0,001$) del año 2007 (Tabla 1). Sin embargo, al analizar la interacción entre los factores, se aprecia que no se genera una diferencia significativa entre ellos ($P>0,05$; Tabla 1; Fig. 9). No obstante, se evidencia con la prueba de comparaciones múltiples Tukey, que las diferencias estadísticas se generan al comparar los tratamientos de autofertilización (SI) con el tratamiento control (SC) ($P=0,036$; Tabla 2). Por otro lado, resultados obtenidos a

lo largo de las estaciones del año, evidencian que las diferencias estadísticas ($P < 0,001$) se generan entre las estaciones de verano con otoño y primavera; y entre invierno con primavera (Tabla 3). Tanto en verano como en invierno se obtuvieron las menores germinaciones de esporas (Fig. 9).

Al comparar la germinación en los tratamientos de cruces dentro de cada estación, las pruebas de comparación múltiple Tukey realizadas en las estaciones de verano, invierno y primavera indican que no se presentan diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) entre ninguno de los diferentes tratamientos (Tablas 4, 6 y 7; Fig. 9). Por el contrario, resultados en la estación de otoño, evidencian diferencias significativamente ($P < 0,01$) entre el tratamiento control (SC) con el de autofertilización (SI) y de fertilización cruzada (SII) (Tabla 5; Fig. 9).

3.2.2. Fecundidad

Resultados estadísticos respecto a la autofertilización sobre la fecundidad de los gametofitos femeninos, indican que se generan diferencias significativamente ($P < 0,001$) entre los tratamientos, las estaciones y la interacción de ambos factores a lo largo del año 2007 (Tabla 8; Fig. 10). La prueba de comparaciones múltiples Tukey indica que las diferencias estadísticas se generan entre todos los tratamientos ($P < 0,001$; Tabla 9; Fig. 10), siendo el tratamiento control el de mayor fecundidad a lo largo de todas las estaciones. Por otro lado, resultados obtenidos al comparar las estaciones del año, indican que sólo se presentan diferencias estadísticas entre verano con el resto de las estaciones ($P < 0,001$; Tabla 10; Fig. 10).

Al comparar la fecundidad en los tratamientos de cruces dentro de cada estación, la prueba de comparación múltiple Tukey mostró en la estación de verano difiere estadísticas ($P < 0,001$) entre los tratamientos de autofertilización (SI) con el tratamiento control (Tabla 11; Fig. 10). Para las estaciones de otoño y

primavera, existen diferencias estadísticas entre todos los tratamientos ($P < 0,001$; Tabla 12 y 14; Fig. 10). Respecto a la estación de invierno, los resultados indican que solo se generan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre la autofertilización (SI) con la fertilización cruzada (SII) y con el control (SC) (Tabla 13; Fig. 10).

3.2.3. Fertilidad

Resultados estadísticos respecto a la autofertilización sobre la fertilidad, muestran que existen diferencias significativamente ($P < 0,001$) entre los diferentes tratamientos, las estaciones y la interacción de ambos factores a lo largo del año (Tabla 15; Fig. 11). La prueba de comparaciones múltiples Tukey, comprueba que existen diferencias estadísticas significativas ($P < 0,001$) entre todos los tratamientos (Tabla 16, siendo siempre el tratamiento control, el que presenta la mayor fertilidad a lo largo de todas las estaciones (Fig. 11)). Por otro lado, la fertilidad a lo largo de las estaciones de año, indica que existen diferencias estadísticas significativas ($P < 0,001$) entre las estaciones de verano con otoño, invierno y primavera, y además, entre la estación de otoño con invierno y primavera (Tabla 17). En todos los tratamientos se observó una disminución de la fertilidad hacia invierno-primavera (Fig. 11).

Los resultados obtenidos de la prueba de comparación múltiple Tukey en la estación de verano, indican que no se presentan diferencias estadísticas significativas en ninguna de las comparaciones entre los tratamientos (Tabla 18; Fig. 11). No obstante, en la estación de otoño se detectan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,01$) entre todas las comparaciones de los tratamientos (Tabla 19; Fig. 11). En las estaciones de invierno y primavera, se presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,001$) entre los tratamientos de autofertilización (SI) con fertilización cruzada (SII) y con el control (SC) (Tablas 20 y 21; Fig. 11).

3.3. Estacionalidad del desarrollo de *Lessonia nigrescens*

3.3.1. Germinación

Resultados obtenidos respecto a la estacionalidad de la germinación en *L. nigrescens*, muestran que existen diferencias significativas entre las estaciones del año 2007 ($P < 0,001$; Tabla 22; Fig. 12). La prueba de comparación múltiple Tukey muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0,001$) entre las estaciones de verano con otoño y primavera, además, entre las estaciones de invierno y otoño (Tabla 23. La estación de otoño mostraría la mayor germinación de zooesporas (Fig. 12)).

3.3.2. Fecundidad

La fecundidad de *L. nigrescens* a lo largo de las estaciones del año 2007, presentan diferencia significativa entre las estaciones ($P < 0,001$; Tabla 24; Fig. 12). La prueba de comparación múltiple Tukey detecta que la diferencia significativa ($P < 0,05$) se genera entre las estaciones de verano-otoño con invierno-primavera (Tabla 25. En estas últimas estaciones se encontraron los menores valores de fecundidad (Fig. 12)).

3.3.3. Fertilidad

La fertilidad de *L. nigrescens* a lo largo de las estaciones del año 2007, presentó diferencias significativas ($P < 0,001$; Tabla 26; Fig. 12). Al igual que la fecundidad, las diferencias se genera al comparar las estaciones de verano-otoño con invierno-primavera ($P < 0,01$; Tabla 27), estas últimas con los menores valores (Fig. 12).

3.4. Crecimiento de esporofitos

En los tres tratamientos realizados fue posible apreciar desarrollo de esporofitos microscópicos, pero con diferencia en su morfología y tamaño (Figs. 7,

8 y 13). El crecimiento de esporofitos en la estación de primavera del año 2007, respecto a los tratamientos y a los días de cultivo evidenciaron diferencias significativas ($P < 0,001$; Tabla 28; Fig. 13).

La prueba de comparación múltiple Tukey, indica que existen diferencias estadísticas al comparar el tratamiento control (SC) con el de autofertilización (SI) y fertilización cruzada (SII) ($P < 0,05$; Tabla 29; Fig. 13). No obstante, al comparar los tratamientos en forma separada para cada día de cultivo evaluado, se evidencia que las diferencias estadísticas significativas son solo detectadas al día 45 de cultivo (Tablas 30, 31 y 32).

Por otro lado, resultados de la prueba de comparaciones múltiples Tukey, respecto al crecimiento a lo largo de los días de cultivo, muestran que existen diferencias estadísticas significativas ($P < 0,001$; Tabla 30) entre todos los días evaluados, con un incremento de la talla en el tiempo (Fig. 13). Sin embargo, al análisis de comparaciones múltiples para cada tratamiento por separado mostró que en la situación de autofertilización, las diferencias estadísticas significativas ($P < 0,003$) de la talla solo ocurren entre el día 25 y 45 de cultivo (; Tabla 34; Fig. 13). En el tratamiento de fertilización cruzada (SII), las diferencias estadísticas ($P < 0,05$) se generan entre el día 25 con los días 35 y 45 de cultivo (Tabla 35). Por el contrario, en el tratamiento control (SC) las diferencias en la talla de los esporofitos ocurre entre todos los días de cultivo evaluados (Tabla 36), mostrando un incremento permanente a lo largo del tiempo (Fig. 13).

4. DISCUSION

El desarrollo de las distintas etapas en el ciclo de vida de *Lessonia nigrescens*, fue similar a las descritas para el orden Laminariales (Kain, 1979; Ávila et al., 1985, Lüning, 1980; Ávila et al., 1985, Tala et al., 2004). Aunque, al igual como sucede en otras especies del orden, el desarrollo de *L. nigrescens* es afectado por diferentes factores bióticos y abióticos, que a menudo en combinación, han sido propuestos como importantes mecanismos determinantes en el establecimiento y desarrollo de las especies algales en su hábitat (Davison & Pearson, 1996). Indican no solo que los requerimientos y tolerancias varían en las distintas etapas del ciclo de vida, sino también, que en algunas etapas, las condiciones ambientales pueden inducir distintos patrones de desarrollo y determinar el éxito en la regeneración de una población (Hoffmann & Santelices, 1982; Hoffmann et al., 1984; Ávila et al., 1985; Veliz et al., 2006; Tala et al., 2007). *Lessonia nigrescens* puede presentar estrategias reproductivas diferentes al interior de una población, como la reproducción sexual caracterizada por la unión de gametos (Hoffmann & Santelices, 1982; Hoffmann et al., 1984; Ávila et al., 1985) o en casos extremos la asexual como la partenogénesis (Oppliger et al., 2007), o la autofertilización (presente estudio), las cuales serian gatilladas por las condiciones ambientales y/o el aislamiento poblacional.

La germinación de las esporas estaría ligada a las características internas nutricionales y/o a la madures individual al interior de sus tejidos reproductivos (Santelices 1990). Resultados obtenidos en el presente estudio, aun cuando generan diferencias estacionales y entre los cruces, muestran una gran viabilidad de las esporas utilizadas, la cual supera el 90 % en todas las estaciones y tratamientos del año. Mas aún, la germinación de esporas hermanas asentadas cercanamente en el medio, es totalmente posible y esperable de observar. No obstante, la germinación es un proceso independiente de la autofertilización, ya que en esta etapa del ciclo de vida aún no se ha producido el encuentro entre gametos. Por lo cual, sus diferencias son atribuidas a las características internas de

las esporas y no a un efecto del aumento en la consanguinidad. Sin embargo, es posible hipotetizar la existencia de algún estímulo químico que retarda o desfasa el desarrollo de estas.

En apariencia, la germinación en *L. nigrescens* solo requiere de un rango determinado de temperatura, el que se encuentra entre los 10 y 14° C (Ávila et al., 1985). Sin embargo, y considerando que los cultivos fueron realizados bajo las mismas condiciones de temperatura, probablemente la germinación de las esporas de *L. nigrescens*, sea un proceso dependiente de la relación entre los ciclos de crecimiento y reproducción (asignación de recursos) (Hoffmann et al., 1984; Ávila et al., 1985, Santelices 1990; Tala et al., 2004; Tala & Edding, 2005). Esto podría explicar la baja en la germinación de la estación de verano, debido al aumento en la incidencia del sol y el consecuente aumento de la temperatura. Además, durante esta estación Tala & Edding (2005) registraron un aumento en la pérdida de su tejido vegetativo y reproductivo, lo que puede generar bajas en la calidad de esporas formadas, debido a la redistribución energética para recuperar tejido vegetativo y reparación de zona de pérdidas al interior de sus láminas. Por otro lado, la baja germinación en la estación de invierno podría ser atribuida al incremento del crecimiento vegetativo, en adición a un poco desarrollo de material reproductivo (Tala & Edding 2005). En esporas pertenecientes a *Macrocystis pyrifera*, Brzezinski et al. (1993), observaron la utilización de lípidos de reserva durante la germinación de las esporas asentadas. Esta utilización de tales reservas de carbono podrían ser especialmente significativa en esporas y cigotos que se establecen en condiciones ambientales desfavorables (Santelices et al., 2002). Indicando que la germinación es independiente de la concentración de nutrientes del medio (Lüning, 1980; Hoffmann et al., 1984), y que estos no afectan a las esporas en las fases de asentamiento (Amsler & Neushul, 1991).

Gametofitos de *L. nigrescens* sometidos a instancias de autofertilización, presentaron retraso en la fecundidad, lo cual podría ser considerado como una estrategia para evitar los efectos de la depresión por endogamia, y de esta forma

favorecer el aumento en la edad y talla de los gametofitos. Con lo cual, se aumenta la posibilidad de cruce con la siguiente generación de esporas asentadas en sus cercanías, que fertilicen estos huevos pertenecientes a una liberación anterior. Tal retardo en el desarrollo de uno o ambos estados (gametofitos y/o esporofitos), es apreciado en muchas algas anuales o perennes, que producen sus propágulos estacionalmente (Blanchette, 1996). Sin embargo, resultados obtenidos en *L. nigrescens* muestran que en el tratamiento de autofertilización (0,5 de coeficiente de consanguinidad), los gametofitos suspenden la gametogénesis, observando indirectamente como un aumento en el tamaño y número de células por gametófito, sin presentar desarrollo o formación de gametos hasta varias semanas de cultivo, en comparación al tratamiento de fertilización cruzada (0,25 de coeficiente de consanguinidad) y control (0,05 de coeficiente de consanguinidad). Tal retardo en el desarrollo de las fases microscópicas en el tratamiento de autofertilización (SI), podría ser una habilidad que presenta *L. nigrescens* como sistema de autoincompatibilidad, como también, para soportar periodos en condiciones ambientales desfavorables (Santelices et al., 2002; Carney & Matthew, 2006). Esta estrategia de autoincompatibilidad es ampliamente utilizada por un gran número de plantas terrestres, siendo el más importante y general mecanismo promotor de la fertilización cruzada y del flujo genético de plantas superiores (Simon & Tabah, 2003). Esta diferencia entre los tratamientos de autofertilización (SI), con la fertilización cruzada (SII) y el control (SC), demuestran una incidencia de la autofertilización sobre la fecundidad de la especie, y que la variación estacional de la fecundidad con respecto a la autofertilización, puede estar ligada a la relación del desarrollo del gametofito. Mas aun, la presencia de los diferentes estados en la historia de vida de las algas (Orden Laminariales), facilita la persistencia en condiciones ambientales variables (Klinger, 1993), las cuales, ejercen una gran influencia en la fecundidad de las especies que se reproducen durante todo el año (Reed et al., 1996). La maximización de los sucesos reproductivos para *Macrocystis sp.* es complementada con su rendimiento reproductivo, en condiciones que son mayores

los niveles de recursos. Así incrementando su tiempo de vida en la fecundidad, que incrementando la proporción de su progenie que sobrevive (Reed et al., 1996). Esta maximización en el tiempo de vida de la fecundidad por parte de *Macrocystis*, *L. nigrescens* podría utilizarla como una alternativa de autoincompatibilidad, contra los posibles efectos que pueda presentar el aumento de la consanguinidad en el tratamiento de autofertilización. Además, fue observado en algunos casos, la pérdida de un sexo completo (machos), en réplicas del tratamiento de autofertilización (SI), lo que probablemente sea realizado como una manera de limpiar los alelos deletéreos presentes en la especie, y que luego continua con esta limpieza de alelos en las fases gametofíticas posteriores (Raimondi et al., 2004).

La fertilidad de *L. nigrescens* se ve afectada por la autofertilización al generar diferencias entre los tratamientos, ya sea debido a que los gametofitos presentan alguna estrategia de autoincompatibilidad o retraso en su desarrollo, producto del aumento en la consanguinidad. No obstante, la fertilidad de *L. nigrescens*, como en la gran mayoría de las Laminariales, es usualmente afectada por altas tasas de mortalidad en sus etapas tempranas (Chapman, 1986; Santelices, 1990). La presencia de recursos gaméticos adecuados es importante en la fertilización y desarrollo de esporofitos embriónicos (Brawley & Johnson, 1992), los cuales, depende de factores ambientales y biológicos, que favorecen el encuentro de las células reproductivas. Sin embargo, la ausencia de esporofitos en la estación de invierno, perteneciente al tratamiento de autofertilización (SI), indica claramente que la especie se ve afectada por el alto grado de consanguinidad presente dentro del tratamiento. El número de gametos producidos, la sincronización de su producción, la liberación, la mezcla y dilución según el movimiento del agua, la capacidad de los gametos a la taxis (Brawley & Johnson, 1992), la temperatura, la luz (Vadas, 1972; Lüning & Neulshul, 1978; Lüning, 1980; Brawley & Johnson, 1992), y sus reservas nutricionales entre otros (Brzezinski et al., 1993), son los responsables de la unión efectiva de las células reproductivas. No obstante,

observaciones realizadas en el laboratorio, confirman que gametofitos maduros luego de transcurridos 45 días de cultivo permanecen en estado haploide y con formación de oogonio en espera de la fertilización por parte de gametos masculinos. Sin embargo, se puede mencionar la existencia de partenogénesis como la descrita por Oppliger et al., (2007) para *L. nigrescens*, como otra alternativa de persistencia dentro de una población, ya que luego de transcurridos 45 días de cultivo y sin la presencia de gametofitos machos, se observó la aparición de esporófitos microscópicos en crecimiento en algunas réplicas del tratamiento de autofertilización. Esto demuestra que dentro del ciclo de vida clásico de la especie, existen modificaciones alternativas dependiendo de la situación en la cual se desarrollan los estados tempranos.

Resultados obtenidos, indican que la consanguinidad presenta efectos deletéreos en los desarrollos de las etapas microscópicas a lo largo del año, presentando variaciones estacionales. En las estaciones de otoño e invierno se generaron proporciones cercanas a cero con respecto a la fecundidad y fertilidad de los gametofitos en el tratamiento de autofertilización. La fertilización efectiva de las especies de Laminariales depende de las concentraciones de feromonas en el medio, para el reconocimiento, encuentro y unión de sus gametos (Maier & Muller 1986). Sin embargo, no se sabe cómo se determina el reconocimiento de tales feromonas entre células hermanas, ya que, el tratamiento de autofertilización (SI), presentó incremento del crecimiento vegetativo y escasa unión de gametos entre esporas hermanas. Esta situación indica que estos gametófitos podrían reconocer señales químicas entre células hermanas y de esta forma, evitar el encuentro de sus gametos con la disminución en sus desarrollos o suspensión en la gametogénesis (Kinlan et al., 2003).

Con respecto a la estacionalidad de la especie, resultados obtenidos por Santelices et al., (1980), muestran que *L. nigrescens* en Chile central se encuentra aparentemente reproductiva desde octubre hasta fines de junio, y alcanzan su mayor frecuencia en enero y febrero. Sin embargo, los datos obtenidos para la

zona centro-norte del país, indican que *L. nigrescens* se mantiene reproductiva durante todas las estaciones del año, presentando variaciones mínimas con respecto a la germinación en las estaciones de verano e invierno. Para la fecundidad ha sido argumentada una estacionalidad estricta en la llegada de la reproducción, como una respuesta desarrollada para maximizar el tiempo de vida de la fecundidad y de la progenie (Santelices, 1990; Klinger, 1993). No obstante, la fecundidad presentó una marcada disminución hacia la estación de invierno, presentando un leve aumento en primavera. Los cambios ambientales asociados con la variación estacional, usualmente proporciona señales externas, que gatilla procesos internos asociados con la reproducción (Reed et al., 1996). Su éxito reproductivo o fertilidad, presentó las máximas producciones de esporofitos en las estaciones de verano-otoño, disminuyendo hacia invierno-primavera. Tales fluctuaciones estacionales en un ambiente típico, inducen patrones de crecimiento y reproducción en la gran mayoría de organismos perennes, que viven tiempo suficiente para sucesivos cambios estacionales (Reed et al., 1996; Tala et al. 2004; Tala & Edding, 2005). Estas variaciones de sus parámetros reproductivos entre las estaciones del año, pueden estar determinadas genéticamente o asociados a las condiciones ambientales en que se encuentran sus progenitores. Por otro lado, *L. nigrescens*, presenta diferencias estacionales atribuidas a las características nutricionales de las esporas en el momento de la liberación, ya que se apreció una disminución en la fecundidad y fertilidad de la especie en las estaciones de invierno y primavera y el máximo presentado en las estaciones de verano y otoño. Estos resultados indican que *L. nigrescens* presenta una marcada estacionalidad con respecto a su fecundidad y fertilidad, resultados que concuerda con lo documentado por Tala et al. (2004) para *Lessonia trabeculata* y Reed et al. (1996) para *Macrocystis pyrifera*.

Por otro lado, se ha observado que la ausencia de adultos de *L. nigrescens* en poblaciones naturales, genera interferencias intraespecíficas por el rápido crecimiento individual, como un factor determinante en la disminución de la

extensión de *L. nigrescens* y como una reguladora de la estructura poblacional del alga (Santelices & Ojeda, 1984). No obstante, lo estimado en praderas naturales por Martínez & Cárdenas (2003), indican que el avance promedio de reclutas de *L. nigrescens* no es mas de 3 Km. anuales, siendo mucho mas bajo a lo observado en el hemisferio norte, donde las macroalgas recuperan alrededor de 300 Km cada seis meses, después de una mortalidad por un evento ENOS (El Niño). Sin embargo, estos autores no consideraron la existencia de las etapas microscópicas, las cuales pueden jugar un papel de real importancia en el restablecimiento de la población, mas aun, conocida la resistencia de estas etapas microscópicas a condiciones de estrés ambientales. No obstante, la autofertilización como estrategia reproductiva podría ser mas común de lo esperado en poblaciones naturales, y sea tal vez, la precursora de las actuales praderas presente en las costa norte de Chile. Estas se han visto afectadas por fuertes disturbios ambientales como es el Niño y la presión extractiva por parte de pescadores, que en los últimos años han aumentado en un 50% su presión debido a su gran demanda. En la actualidad se extraen alrededor de 161.835 toneladas de *L. nigrescens* a nivel nacional entre la I a la VI región del país (www.sernapesca.cl).

Si bien, las consecuencias genéticas de una recuperación después de una mortalidad masiva no esta bien estudiado en macroalgas, esto es particularmente importante en el alga *L. nigrescens*, ya que es una especie aparentemente muy sensible a los cambios ambientales y a los producidos por el hombre (Martínez & Cárdenas, 2003). En sectores del norte de Chile, por una alta explotación de este recurso, se ha generado una baja en la abundancia y una lenta recuperación de poblaciones, además del desconocimiento genético que esto a producido (Martínez & Cárdenas, 2003). Esta explotación, puede presentar incidencia en la abundancia y el reclutamiento de otros organismos, que utilizan o habitan en *L. nigrescens*, y que no solo incluye efectos sinérgicos, sino que constituye además un refugio contra depredadores, de particular importancia para especies que alcanzan su madures sexual en este hábitat (Cansino & Santelices, 1984).

Resultados obtenidos por Reed et al. (1991), muestran que el crecimiento de algas Laminariales como *Macrocystis pyrifera* y *Pterygophora californica* son fuertemente influenciadas por la intensidad inicial de asentamiento de las esporas. Además, Dean & Jacobsen (1989), sugieren que el crecimiento de *M. pyrifera* esta controlado por la interacción existente entre la irradiancia y los nutrientes disponibles en el medio. Sin embargo, resultados obtenidos en esta investigación, indican que la autofertilización (SI) genera diferencias significativas en el crecimiento de los esporofitos microscópicos, bajo las mismas condiciones de luz y nutrientes que la fertilización cruzada (SII) y control (SC). Esta diferencia puede ser atribuida a la disminución de la variabilidad individual y/o al retardo en el desarrollo de las etapas microscópicas de *L. nigrescens*, como resultado en el aumento en la consanguinidad. La consecuencia directa del aumento de la consanguinidad, es la expresión de la depresión por endogamia. Que se traduce en una disminución del éxito y vigor de los individuos en términos de supervivencia y crecimiento. La reducción del éxito de los individuos a causa de la depresión por consanguinidad se debe básicamente al efecto de alelos deletéreos recesivos que se expresan en homocigosis (Charlesworth y Charlesworth, 1999). Por otro lado, las problemáticas que puede generar la obtención de fenotipos amorfos con respecto al crecimiento de sus células basales, y las implicancias genéticas enzimáticas que pueden verse desfavorecido el estado homocigoto en el crecimiento de esporofitos, puede generar mayor diferenciación entre los tratamientos. En general, el grado de variabilidad en el tratamiento control (SC), genera diferencias en el crecimiento respecto del tratamiento de autofertilización (SI) y fertilización cruzada (SII), los cuales, presentan un mayor grado de consanguinidad y por ende efectos genéticos en el fenotipo del esporofito de *L. nigrescens* en el tiempo, confirmando lo descrito por Raimondi et al., (2004) para *M. pyrifera*, que el efectos de la depresión por endogamia se ve mayormente en estados tardíos del desarrollo en las macroalgas.

5. 5. CONCLUSION

- La autofertilización es una alternativa a considerar al momento de mencionar las estrategias reproductivas dentro de la especie *L. nigrescens*. Aun cuando, no presenta ninguna característica similar en comparación a la fecundidad y fertilidad de la reproducción cruzada. La autofertilización puede ser una alternativa reproductiva en situaciones de riesgo de la especie ante una pérdida masiva de la población, ya sea por efectos naturales o sobreexplotación, donde la presencia de unos pocos ejemplares de *L. nigrescens* pueden reestablecer en su totalidad una población, dependiendo si, de la variabilidad de los progenitores sobrevivientes. De esta forma utilizando esta alternativa reproductiva para repoblar los sectores desocupados, hasta el encuentro cercano de poblaciones vecinas para reestablecer el flujo genético entre ellas y de esta forma aumentar la variabilidad que hasta ese momento se vería en una alta homocigosis.
- Si bien la autofertilización, esta presente y genera diferencias en el desarrollo de las etapas tempranas de las fases haploide y diploides de *L. nigrescens*, podemos mencionar que la especie presenta un comportamiento que hace presumir la existencia de estrategias de autoincompatibilidad reproductiva, al bajar sus tasas de fecundidad y fertilidad, con el fin de evitar los efectos por depresión endogámica. La autofertilización a largo plazo y repetida en el tiempo, presentara efectos deletéreos en la composición genética de la población, afectando su persistencia debido a la pérdida de la capacidad reproductiva. Sin embargo, mayores tipos de formas de reproducción, podrían ser entendidos como respuesta a ambientes fluctuantes y poco predecibles como aquellos de *Lessonia* (i.e. ENOS, surgencia, explotación, radiación UV), los cuales pueden disminuir la tasa de renovación de una pradera y

limitar la capacidad para reproducirse dentro de una población. Por lo cual, el retardo en el desarrollo como estrategia de autoincompatibilidad contra los efectos de la depresión por consanguinidad, puede ser una alternativa para favorecer el flujo genético al interior de una población. Al retardar el desarrollo y evitar la reproducción de gametos hermanos, se favorece el cruce de gametos de una posterior liberación de la población e individuos distintos, además, de esperar condiciones adecuadas ambientales para el desarrollo de un nuevo esporofito.

- ***Lessonia nigrescens*** aunque esta reproductiva todo el año presenta una estacionalidad sobre la fecundidad y fertilidad, efectos que pueden ser atribuidos a las características nutricionales y de reservas de las esporas en el momento de la liberación.
- El crecimiento en la especie, presenta una marcada disminución por parte de esporofitos obtenidos por la autofertilización, disminución atribuida a la pérdida de variabilidad genética por parte de los fenotipos obtenidos por efectos de la alta consanguinidad. La talla en el tratamiento de autofertilización, podría ser atribuida al alto grado de endogamia presente en la progenie y los fenotipos altamente homocigotos que se producen en este tipo de cruce, a diferencia de la fertilización cruzada que da una mayor probabilidad de obtener organismos heterocigotos en su progenie.
- Si bien, el poco conocimiento de la estrategia reproductiva de ***L. nigrescens***, hace aun mas complejo lograr entender y estudiar los procesos que afectan sus etapas haploides y diploides, se deben desarrollar adecuadas estrategias de

cosechas en sus praderas naturales, con amplios antecedentes biológicos para el diseño adecuado de una pesquería sustentable. El efecto de la fragmentación poblacional en el ecosistema, puede llevar a presentar pérdida de la variabilidad genética en esta población (cinturón de *L. nigrescens*) por efectos de la alta consanguinidad. Por lo cual, se hace mas necesario el estudio y conocimiento de las estrategias o alternativas reproductivas, y su efecto en poblaciones naturales de *Lessonia nigrescens*. Dado que la depresión por consanguinidad puede afectar a todos los componentes de ciclo vital, es esperable que la endogamia afecte a la dinámica de las poblaciones fragmentadas y/o reduciendo la tasa de cambio poblacional e incrementado la probabilidad de extinción. Más aun, existen muy pocos trabajos que cuantifiquen los efectos demográficos de la depresión por consanguinidad. No obstante, se deberían realizar estudios sobre el papel que juegan los niveles nutricionales de los progenitores y las esporas en el tiempo de desarrollo, de las etapas reproductivas haploides de la especie. Además, de realizar estudios que puedan responder sobre la distancia de la unión efectiva de gametos de *L. nigrescens*, ya que esta puede ser una información relevante sobre las características y estrategias reproductivas de la especie en el intermareal.

6. BIBLIOGRAFIA

Amsler C., & Neushul M., 1991. Photosynthetic physiology and Chemicals compositions of spores of the Kemp *Macrocystis pyrifera*, *Nereocystis luetkeana*, *Laminaria farvolwii*, and *Pterigophora californica* (Phaeophyceae). J. Phycol., 27: 26-34.

Ávila M., Hoffmann A. J., & Santelices B., 1985. Interacciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y fotoperíodo sobre el desarrollo de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales). Rev. Chi. Hist. Nat., 58: 71–82.

Barrett, S., Harder L, & Worley A., 1996. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. Phil. Trans. Roy. Soc. Lon. Biol. Sci., 351:1271–1280.

Blanchette, C., 1999. Seasonal patterns of disturbance influence recruitment of the sea palm, *Postelsia palmaeformis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 197, 1-14.

Brawley S. & Johnson L., 1992. Gametogenesis, Gametes and Zygotes: an Ecological Perspective on Sexual Reproduction in the algae. J. Phycol., 27: 233-252.

Brzezinski M., Reed D. & Amsler C., 1993. Neutral lipids as major storage products in zoospores of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae). J. Phycol., 29: 16-23.

Carney L., & Matthew E., 2006. Cryptic Processes in the Sea: A Review of Delayed Development in the Microscopic Life Stages of Marine Macroalgae. Alg., 21(2): 161-168.

Cansino J. & Santelices B., 1984. Importancia ecológica de los discos adhesivos de *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta) en Chile Central, Rev. Chi. Hist. Nat., 57: 23-33.

Chapman A., 1986. Population and ecology of seaweeds. Adv. Mar. Biol., 23: 1-161.

Charlesworth D., 2003. Effects of Inbreeding on the genetic diversity of populations. Phil. Tran. Biol. Sci., 358; 1051-1070.

Charlesworth, D. & Charlesworth B. 1999. The genetic basis of inbreeding depression. Gen. Res. Cam., 74: 329-340.

Charlesworth D. & Charlesworth, B., 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Ann. Rev. Ecol. Syst., 18, 237– 268.

Dayton P., 1973. Dispersion, Dispersal, and Persistence of annual y intertidal alga, *Postelsia palmaeformis* Ruprecht. Ecol., 54: 433-438.

Davison I. & Pearson G., 1996. Stress Tolerance in Intertidal Seaweeds. J. Phycol., 32: 137-211.

Dayton P., 1985. The structure and regulation of some South American kelps communities. Ecol., 55: 447–468.

Dean T. & Jacobsen F., 1989. Nutrient-limited growth of juvenile kelp, *Macrocystis pyrifera*, during the 1982-1984 “El Niño” In southern California. Mar. Biol., 90: 597-601.

Falconer D., 1989. Introduction to quantitative genetics. Editorial Longman Scientific & Technical, 3ra edition, Department of Genetic of University of Edinburgh, 438.

Faugeron S., Valero M., Destombe C., Martin E. & Correa J., 2001. Hierarchical spatial structure and discriminate analysis of genetic diversity in the red algae *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). J. Phycol., 37: 705- 716.

Faugeron S., Martínez E., Correa J., Billot C., 2005. Long-Term copper mine waste disposal in northern Chile associated with gene flow disruption of the intertidal Kelp *Lessonia nigrescens*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 288: 129-149.

Fonck E., Venegas M., Tala F. & Edding M., 1998. Artificial Induction of Sporulation in *Lessonia* (Phaeophyta, Laminariales). J. Phycol., 10: 399-403.

González J., Tapia C., Wilson A., Garrido J. & Ávila M., 2002, Estrategias de explotación sustentable algas pardas en la Zona Norte de Chile, Proyecto FIP N° 2000-19.

Husband B. & Schemske D., 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants, Evol., 50: 54–70.

Hoffmann A., Ávila M. & Santelices B., 1984. Interaction of nitrate and phosphate on the development of microscopic state of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 78: 177-186 p.

Hoffmann, A. & Santelices B., 1982. Effects of light intensity and nutrients on gametophytes and gametogenesis of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 60: 77–88.

Hoffmann A. & Santelices B., 1997. Flora marina de Chile Central, Ediciones Universidad Católica de Chile, 155.

Jarne P. & Charlesworth D., 1993. The evolution of the selfing rate in functionally hermaphroditic plants and animals. An. Rev. Ecol. Syst., 24: 441-466.

- Kain J., 1964.** Aspects of the biology of *Laminaria hyperborea*. III Survival and growth of gametophytes. Mar. Biol., 44: 415-433.
- Kain J., 1979.** A view of the genus *Laminaria*. Ocean. Mar. Biol. An. Rev., 17, 101-161.
- Kinlan B., Graham M., Sala E. & Dayton P., 2003.** Arrested development of giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Phaeophyceae) embryonic sporophytes: a mechanism for delayed recruitment in perennial kelp. J. Phycol., 39: 47-57.
- Kirkman H. & Kendrick G., 1997.** Ecological significance and commercial harvesting of drifting and beach-coast macro-algae and seagrasses in Australia: Rev. J. Appl. Phycol., 9, 311–326.
- Klinger, T. 1993,** The persistence of haplodiploidy in algae, Trends. Ecol. Evol., 8, 256-8.
- Lee J. & Brinkhuis B., 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.
- Lobban, C. & Harrison, P., 1994.** Seaweeds Ecology and Physiology. Cambridge University Press, New York, USA, 366.
- Lüning K., 1980.** Critical level of Light and Temperature Regulating the Gametogenesis of three *Laminaria* Species (Phaeophyceae). J. of Phycol., 16; 1-15.
- Lüning K. & Dring M. J., 1975.** Reproduction, growth and photosynthesis of gametophytes of *Laminaria saccharina* grown in blue and red light, Mar. Biol., 29: 195-200.

Lüning K. & Neushul M., 1978. Light and temperature regulation the gametogenesis of three laminaria species. J. Phycol., 16:1-15.

Martínez E. & Cárdenas L., 2003. Recovery and Genetic Diversity of the Intertidal Kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophytaceae) 20 years after el Niño 1982/83. J. Phycol., 39: 504-508.

Norton T., 1978. The factors influencing the distribution of *Saccorhiza polyshdes* in the region of Lough Ine. Mar. Biol., 58: 527-536.

Oppliger V. & Correa J., 2007. Parthenogenesis in the brown alga *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyceae) from central Chile. J. Phycol., 43: 1295-1301.

Raimondi P., Reed D., Gaylord B., & Washburn., 2004. Effects of Self-fertilization in the giant Kelp *Macrocystis pyrifera*. Ecol., 85(12): 3267-3274.

Reed D., Neulshul M. & Ebeling A., 1991. Role of settlement density on gametophyte growth and reproduction in the kelp *Pterygophora californica* and *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), J. Phycol., 27: 361-366.

Reed D., Ebeling A., Anderson T. & Anghera M., 1996. Differential reproductive responses to fluctuating resources in two seaweeds with different reproductive strategies. Ecol., 77: 300-316.

Santelices B., Aedo D. & Hoffmann A., 2002. Banks of microscopic form and survival to Darkness of propagules and microscopic states of macroalgae. Rev. Chi. Hist. Nat., 75: 547-555.

Santelices B., Castilla J., Cancino J. & Schmiede P., 1980. Comparative Ecology of *Lessonia nigrescens* and *Durvillaea antartica* (Phaeophyta) in Central Chile. Mar. Biol., 59: 119-132.

- Santelices B. & Ojeda F. P., 1984.** Effects of canopy removal on the understory algal community structure of coastal forest of *Macrocystis pyrifera* from Southern South America. Mar. Ecol., 14: 165–173.
- Santelices B. & Ojeda F. P., 1984.** Recruitment, growth and survival of *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta) at Variation tidal level in exposed habitat of central Chile. Mar. Ecol., 19: 73-82.
- Santelices B., 1990.** Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. Ocean. Mar. Biol. Ann. Rev., 28: 177-276.
- Santelices B., 1989.** Algas marinas de Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 399.
- Simon J. & Tabah D., 2003.** The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. Biol. Sci., 358: 1037-1045.
- Tala F., Edding M. & Vasquez J., 2004.** Aspects of the reproductive phenology of *Lessonia trabeculata* (Laminariales: Phaeophyceae) from three population in Northern Chile. Mar. Fresh. Res., 38: 255-266.
- Tala F. & Edding M., 2005.** Growth and loss of distal tissue in blades of *Lessonia nigrescens* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales) Aqua. Bot., 82: 39-54.
- Tala F. & Edding M., 2007.** First estimates of productivity in *Lessonia trabeculata* and *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae, Laminariales) from the southeast Pacific. Phycol. Res., 55: 66-79.
- Turpes S., Hunt J., Anderson B. & Pearse J., 1994.** Population structure, growth, and fecundity of the kelp mysid *Holmesimysis costata* in Monterey bay, California. J. Crust. Biol., 14(4): 657-664.

Vadas R., 1972. Ecological implication of culture studies on *Nereocystis luetkeana*. J. Phycol., 8: 196-203.

Vásquez J., & Santelices B., 1990. Ecological effects of harvesting *Lessonia* (Laminariales, Phaeophyta) in central Chile. Hyd., 204/2005: 41-47.

Vásquez J.A & Westermeier R., 1993. Limiting factors in optimizing seaweed yield in Chile. Hyd., 260/261: 313-320.

Veliz K., Edding M., Tala F., & Gómez I., 2006. Effects of radiation on different life cycle stages of the south Pacific kelp, *Lessonia nigrescens* and *Lessonia trabeculata* (Laminariales, Phaeophyceae). Mar. Biol., 149: 1015-1024.

Wiencke C. & Clayton M. N., 1990. Sexual reproduction, life history, and early development in culture of the Antarctic brown algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae). J. Phycol., 29: 9 – 18.

Wright S., 1931. Evolution in Mendelian populations. Genet., 16:97-159.

www.Prochile.cl.

www.sernapesca.cl

Tablas

Tabla 1. Anova de dos vías de germinación, obtenidos con respecto a los cruces y las estaciones del año.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	2	294,203	147,102	3,634	0,032
Estaciones	3	1718,780	572,927	14,153	<0,001
Tratamientos					
*Estaciones	6	308,537	51,423	1,270	0,284
Residuales	63	2550,212	40,480		
Total	74	4829,794	65,267		

Tabla 2. Tukey de germinación entre sus tratamientos.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,888	1,000	
Control	0,036	0,105	1,000

Tabla 3. Tukey de germinación a lo largo de las estaciones.

Cruces	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Verano	1,000			
Otoño	<0,001	1,000		
Invierno	0,323	0,098	1,000	
Primavera	<0,001	0,558	<0,001	1,000

Tabla 4. Tukey de germinación en la estación de verano.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,875	1,000	
Control	0,969	0,965	1,000

Tabla 5. Tukey de germinación en la estación de otoño.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,993	1,000	
Control	0,014	0,010	1,000

Tabla 6. Tukey de germinación en la estación de invierno.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,992	1,000	
Control	0,657	0,580	1,000

Tabla 7. Tukey de germinación en la estación de primavera.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,863	1,000	
Control	0,679	0,944	1,000

Tabla 8. Anova de dos vías de fecundidad, obtenidos con respecto de los tratamientos y las estaciones del año.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	2	11809,019	5904,510	79,194	<0,001
Estaciones	3	4733,952	1577,984	21,165	<0,001
Tratamientos					
*Estaciones	6	2299,437	383,239	5,140	<0,001
Residuales	63	4697,131	74,558		
Total	74	24884,157	336,272		

Tabla 9. Tukey de fecundidad entre sus tratamientos.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	<0,001	1,000	
Control	<0,001	<0,001	1,000

Tabla 10. Tukey de fecundidad en las estaciones del año 2007.

Cruces	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Verano	1,000			
Otoño	<0,001	1,000		
Invierno	<0,001	0,177	1,000	
Primavera	<0,001	0,273	0,944	1,000

Tabla 11. Tukey de fecundidad en la estación de verano del año 2007.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,772	1,000	
Control	<0,001	0,141	1,000

Tabla 12. Tukey de fecundidad en la estación de otoño.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	<0,001	1,000	
Control	<0,001	0,002	1,000

Tabla 13. Tukey de fecundidad en la estación de invierno.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,026	1,000	
Control	<0,001	0,084	1,000

Tabla 14. Tukey de fecundidad en la estación de primavera.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	<0,001	1,000	
Control	<0,001	<0,001	1,000

Tabla 15. Anova de dos vías de fertilidad, obtenidos con respecto a los tratamientos y las estaciones.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	2	15286,241	7643,120	70,399	<0,001
Estaciones	3	13431,009	4477,003	41,237	<0,001
Tratamientos					
*Estaciones	6	4799,711	799,952	7,368	<0,001
Residuales	63	6839,827	108,569		
Total	74	39304,735	531,145		

Tabla 16. Tukey de fertilidad en los tratamientos.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	<0,001	1,000	
Control	<0,001	0,001	1,000

Tabla 17. Tukey de fertilidad a lo largo de las estaciones del año 2007.

Cruces	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Verano	1,000			
Otoño	<0,001	1,000		
Invierno	<0,001	<0,001	1,000	
Primavera	<0,001	0,004	0,417	1,000

Tabla 18. Tukey de fertilidad en la estación de verano.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,625	1,000	
Control	0,060	0,349	1,000

Tabla 19. Tukey de fertilidad en la estación de otoño.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	<0,001	1,000	
Control	<0,001	0,003	1,000

Tabla 20. Tukey de fertilidad en la estación de invierno.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	<0,001	1,000	
Control	<0,001	0,282	1,000

Tabla 21. Tukey de fertilidad en la estación de primavera.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	<0,001	1,000	
Control	<0,001	0,703	1,000

Tabla 22. Anova de una vía de germinación estacional de *Lessonia nigrescens*. Sólo incluye el tratamiento control.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Estaciones	3	874,310	291,437	9,256	<0,001
Residuales	21	661,240	31,488		
Total	74	1535,550			

Tabla 23. Tukey de germinación estacional de *Lessonia nigrescens*. Sólo incluye el tratamiento control.

Cruces	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Verano	1,000			
Otoño	<0,001	1,000		
Invierno	0,283	0,028	1,000	
Primavera	0,004	0,329	0,301	1,000

Tabla 24. Anova de una vía de fecundidad estacional de *Lessonia nigrescens*. Sólo incluyen el tratamiento control.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Estaciones	3	1330,611	443,537	8,197	<0,001
Residuales	21	1136,365	54,113		
Total	24	2466,976			

Tabla 25. Tukey de fecundidad estacional en *Lessonia nigrescens*. Sólo incluyen el tratamiento control.

Cruces	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Verano	1,000			
Otoño	0,993	1,000		
Invierno	0,008	0,004	1,000	
Primavera	0,030	0,015	0,648	1,000

Tabla 26. Anova de una vía de fertilidad estacional de *Lessonia nigrescens*. Sólo incluyen el tratamiento control.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Estaciones	3	6051,041	2017,014	16,608	<0,001
Residuales	21	2550,369	121,446		
Total	74	8601,410			

Tabla 27. Tukey de fertilidad estacional de *Lessonia nigrescens*. Sólo incluyen el tratamiento control.

Cruces	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Verano	1,000			
Otoño	0,997	1,000		
Invierno	0,003	0,002	1,000	
Primavera	<0,001	<0,001	0,953	1,000

Tabla 28. Anova de dos vías sobre valores de crecimiento, obtenidos con respecto a los tratamientos y días de desarrollo.

Fuente	DF	SS	MS	F	P
Tratamientos	2	392726,299	196363,150	8,247	<0,001
Días	2	1694003,996	847001,998	35,573	<0,001
Tratamientos*					
Días	4	213359,679	53339,920	2,240	0,072
Residuales	81	1928621,166	23810,138		
Total	89	4228711,141	47513,608		

Tabla 29. Tukey de tallas de los esporofitos entre los tratamientos.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,250	1,000	
Control	<0,001	0,045	1,000

Tabla 30. Tukey de los tratamientos dentro del día 25 de cultivo.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,796	1,000	
Control	0,712	0,989	1,000

Tabla 31. Tukey de los tratamientos dentro del día 35 de cultivo.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,672	1,000	
Control	0,233	0,707	1,000

Tabla 32. Tukey de los tratamientos dentro del día 45 de cultivos.

Cruces	Autofertilización	Fertilización Cruzada	Control
Autofertilización	1,000		
Fertilización Cruzada	0,410	1,000	
Control	<0,001	0,005	1,000

Tabla 33. Tukey de tallas entre los días de cultivo.

Cruces	Día 25	Día 35	Día 45
Día 25	1,000		
Día 35	<0,001	1,000	
Día 45	<0,001	<0,001	1,000

Tabla 34. Tukey de las tallas de autofertilización.

Cruces	Día 25	Día 35	Día 45
Día 25	1,000		
Día 35	0,529	1,000	
Día 45	0,003	0,059	1,000

Tabla 35. Tukey de tallas de fertilización cruzada entre los días.

Cruces	Día 25	Día 35	Día 45
Día 25	1,000		
Día 35	0,036	1,000	
Día 45	<0,001	0,291	1,000

Tabla 36. Tukey de tallas del control entre los días.

Cruces	Día 25	Día 35	Día 45
Día 25	1,000		
Día 35	<0,001	1,000	
Día 45	<0,001	0,006	1,000

FIGURAS



Figura 1: Área de estudio, ubicado en los 29°57' latitud Sur – 71° 22' longitud Oeste, zona demarcada por un cuadro de color rojo. Esta área de estudio se caracteriza por presentar condiciones de costa expuesta al oleaje, Fotografía aérea obtenida de Google Earth.



Figura 2: *Lessonia nigrescens*, A) sostenida en el intermareal del sector la Pampilla, B) al ser trasladadas a el laboratorio de Botánica Marina en la Universidad Católica del Norte, Coquimbo IV región de Chile, y C) juvenil en el intermareal rocoso del sector La Pampilla (29° 57' S y 71° 22' O).



Figura 3: A) Cinturón de *Lessonia nigrescens*, sobre rocas del intermareal en el sector La Pampilla; B) actividad del muestreo realizado en el intermareal rocoso durante la estación de otoño del 2007; C) estipe con láminas de *L. nigrescens* y su disposición para el periodo de deshidratación; y D) disposición en condiciones de oscuridad para que suceda la liberación de las zoosporas desde el tejido reproductivo de *L. nigrescens*.

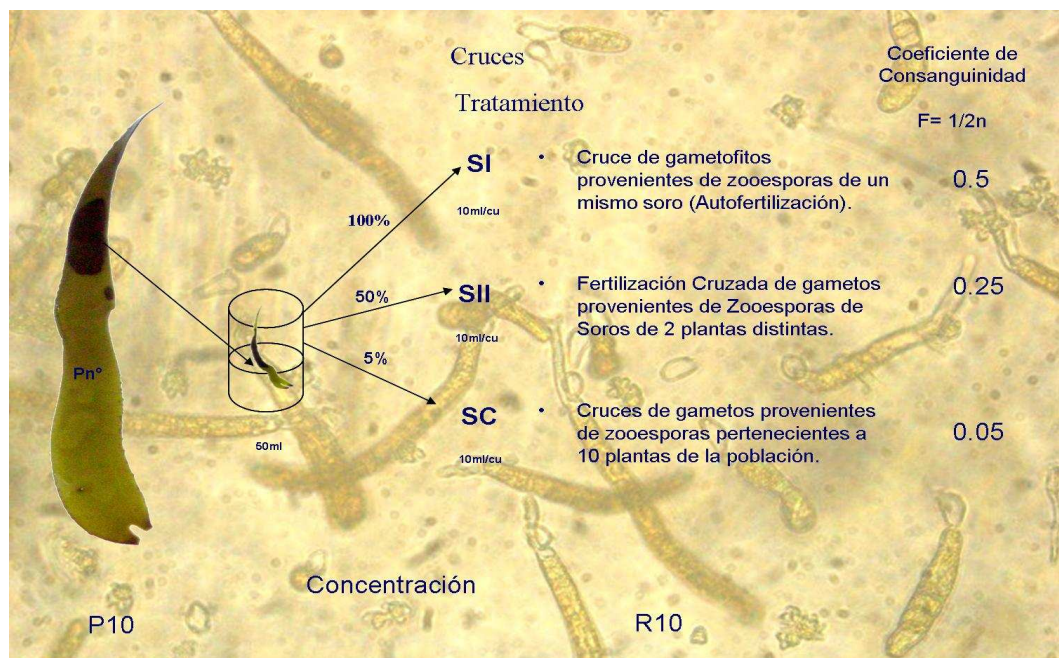


Figura 4: Metodología empleada para el desarrollo de las diferentes situaciones de cruces, desde la obtención de sus esporas en vasos pp. de 50 ml provenientes del soró de la lámina, luego su concentración en proporciones para cada una de las situaciones, los cruces, sus diferenciaciones, su coeficiente de consanguinidad, n° de Plantas (P10) y sus replicas (R10).

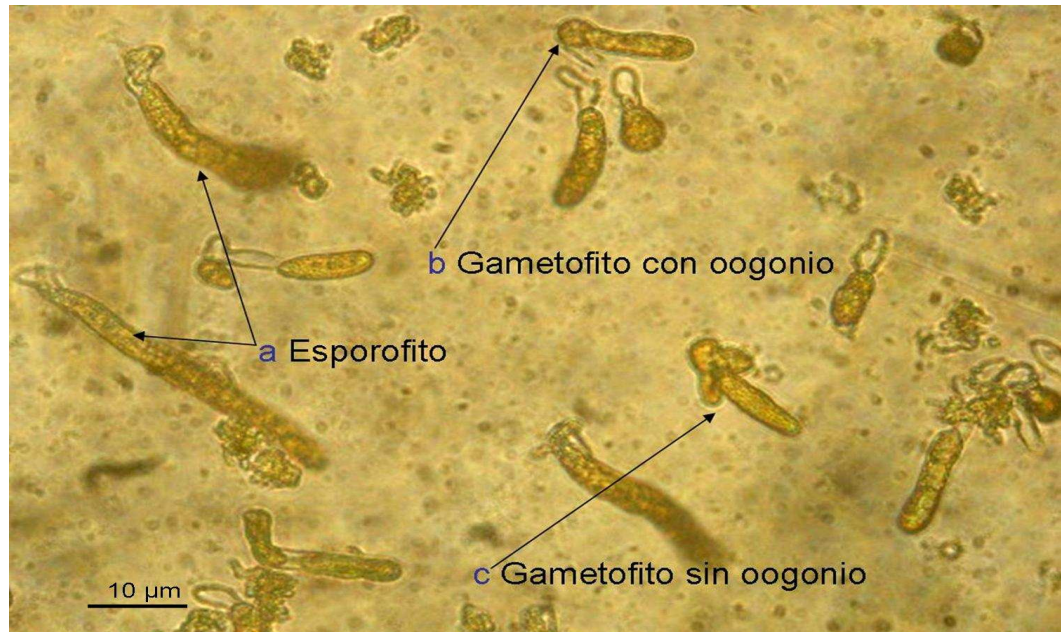


Figura 5: Morfológicas reproductivas utilizadas para la determinación de fecundidad y fertilidad en *L. nigrescens*: a) Esporofitos; b) Gametofitos con oogonios y c) Gametofitos sin oogonio.

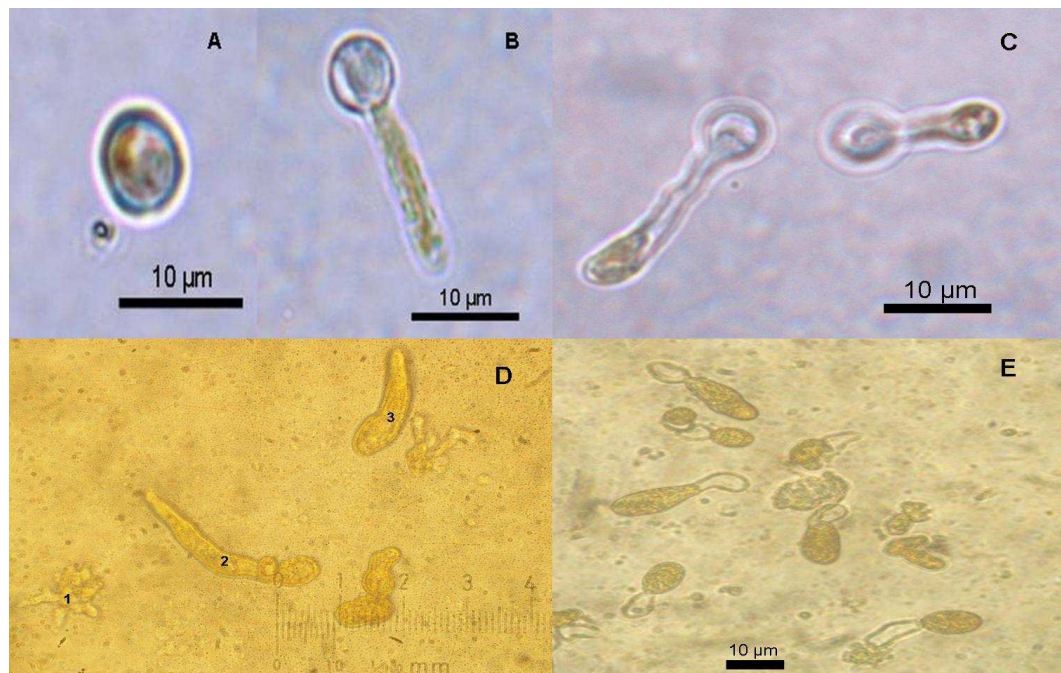


Figura 6: Fases gaméticas de *Lessonia nigrescens*: (A) espora de *L. nigrescens* después de 24 horas desde su liberación; (B) Formación del tubo germinación desde una espora; (C) Traspaso del citoplasma de la espora a la célula basal del gametófito; (D) 1 Gametófito masculino con anteridio en forma ramificada, 2 Gametófito femenino con formación de oogonio o célula huevo, 3 gametófito femenino sin formación de oogonio; (E) Formación del cigoto y esporofito tempranos de *L. nigrescens*.

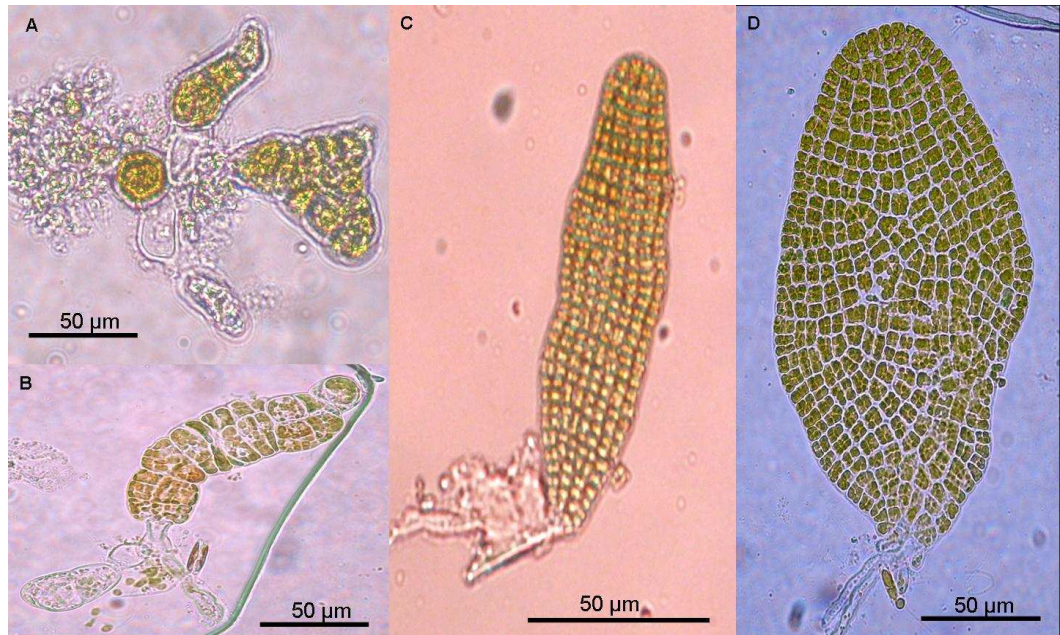


Figura 7: Esporofito microscópico de *L. nigrescens*, obtenida después de transcurrido 25 días de cultivo; A) y B) corresponden a esporofitos microscópicos obtenidos en la situación de autofertilización, C) esporofito microscópicos obtenidos por fertilización cruzada y D) esporofito microscópicos pertenecientes a la situación control.

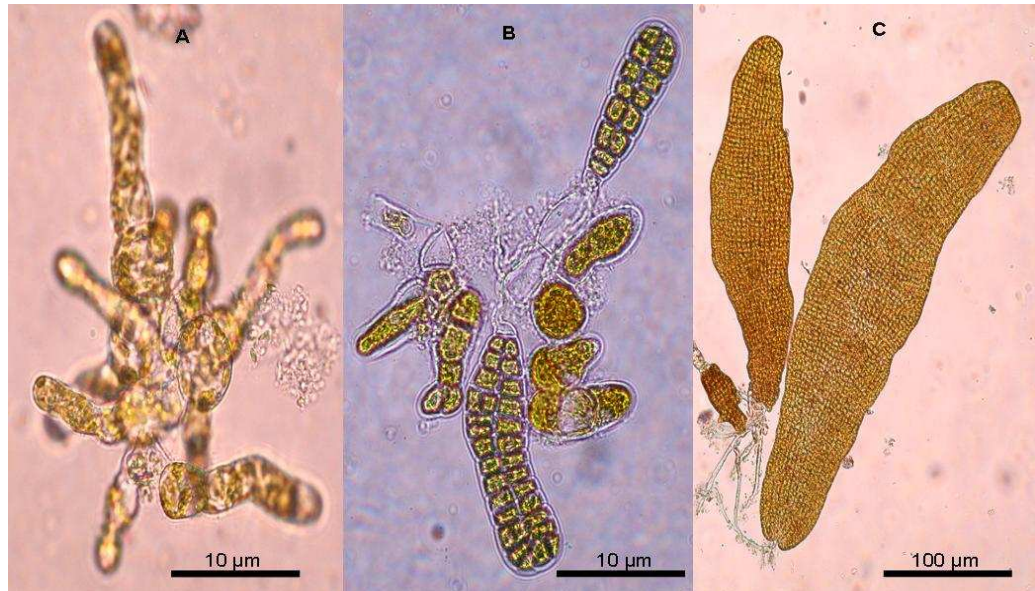


Figura 8: Morfologías microscópica de *L. nigrescens*, encontradas el día 35 de cultivo, A) Gametófito ramificado con un gran numero de células, donde se aprecian claramente los oogonios en los ápices de cada célula, gametófito encontrado en situación de autofertilización; B) Esporofito microscópico obtenido por medio de partenogénesis, desarrollado sin la presencia de gametofitos masculinos (Degeneran), esporofito obtenido de la situación de autofertilización; y C) esporofito normal obtenido en la situación control.

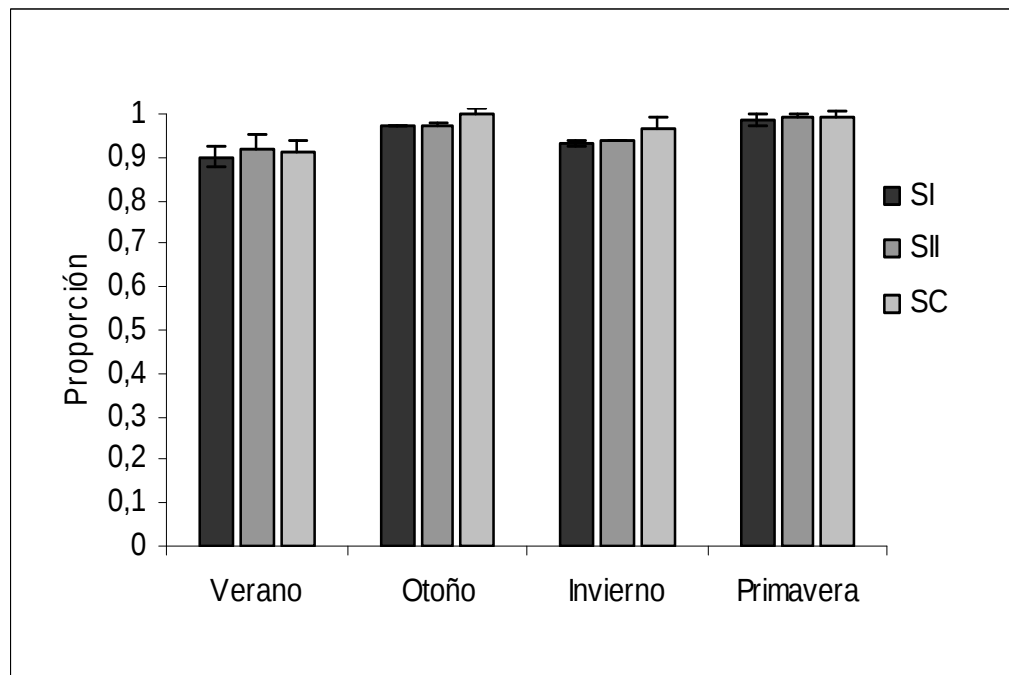


Figura 9: Germinación obtenida en los cultivos de *L. nigrescens* entre las estaciones de verano y primavera 2007.

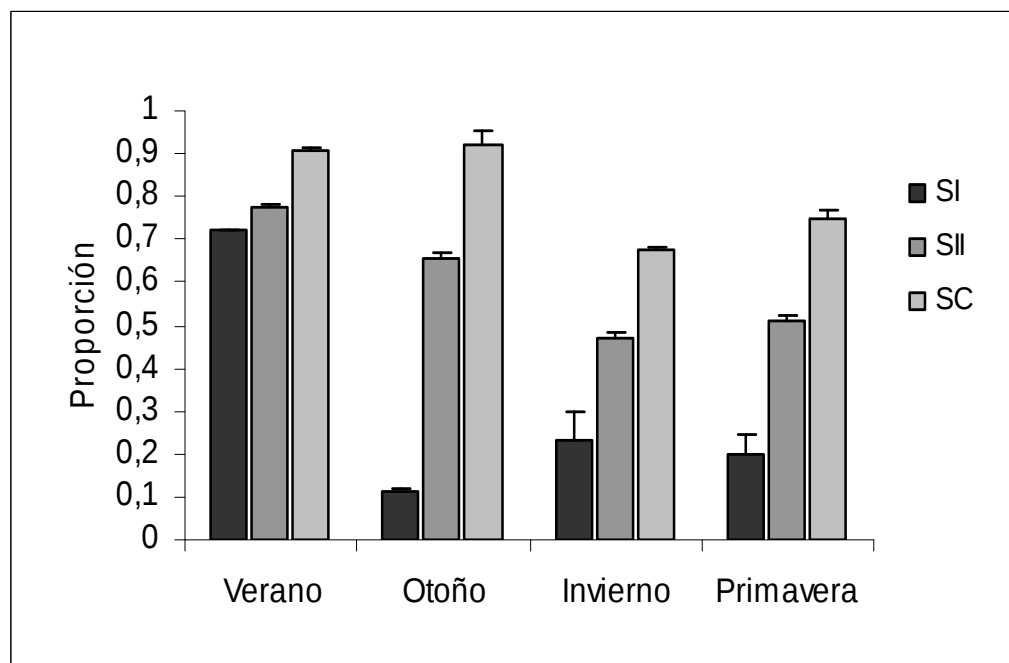


Figura 10: Fecundidad obtenida en los cultivos de *L. nigrescens* entre las estaciones de verano y primavera 2007, en los diferentes cruces.

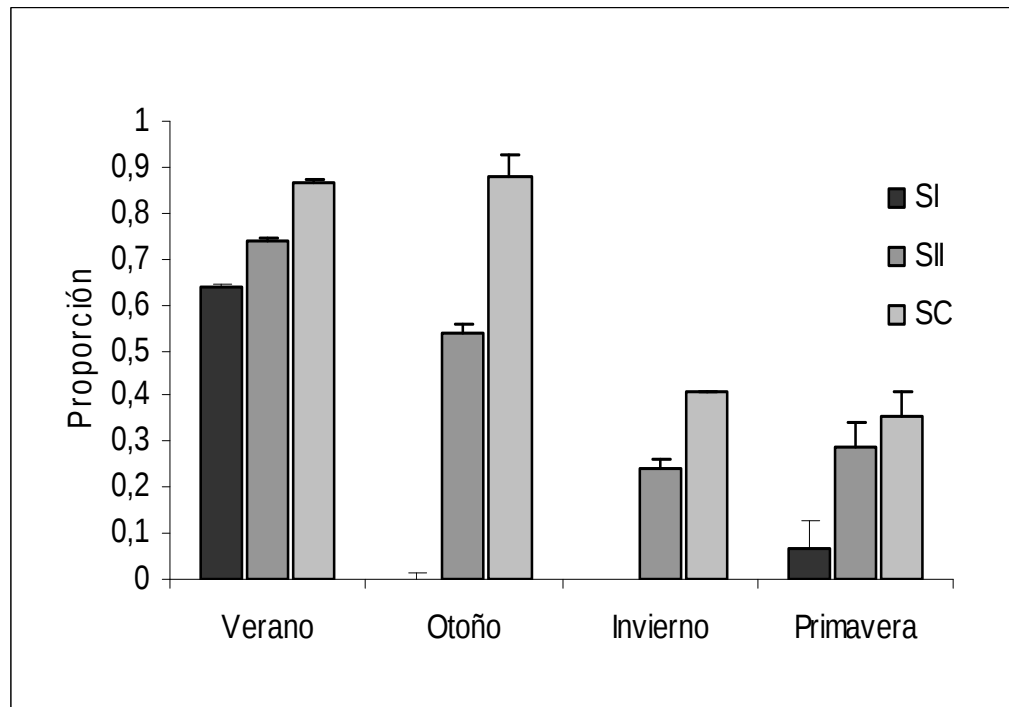


Figura 11: Fertilidad obtenida en los cultivos de *L. nigrescens* entre las estaciones de verano y primavera 2007, en los diferentes cruces.

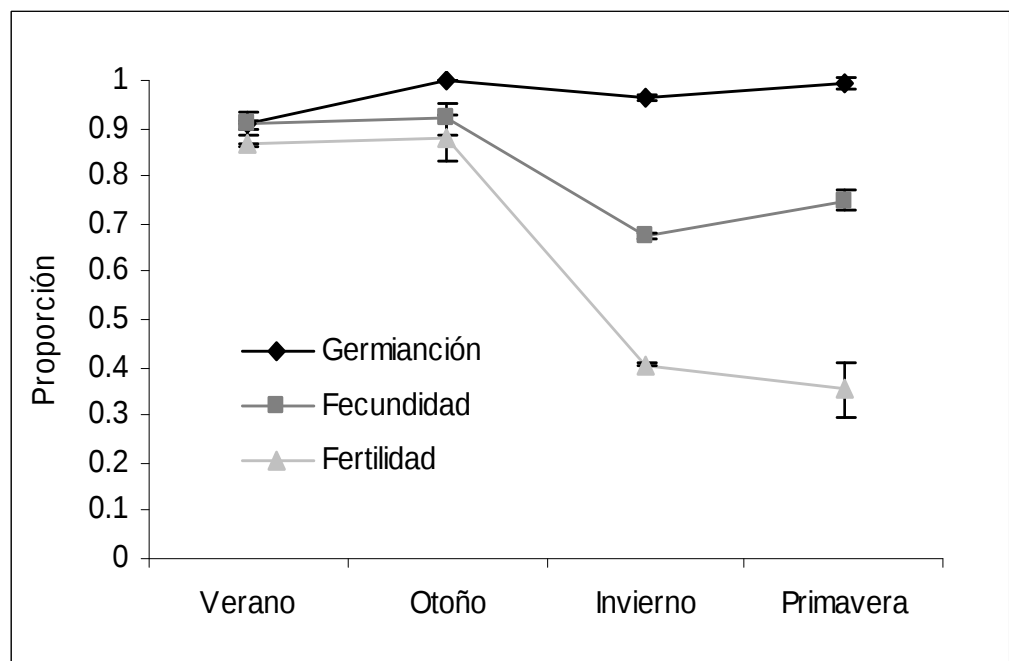


Figura 12: Parámetros reproductivos de *L. nigrescens* a lo largo de las estaciones del año 2007, desde verano a primavera.

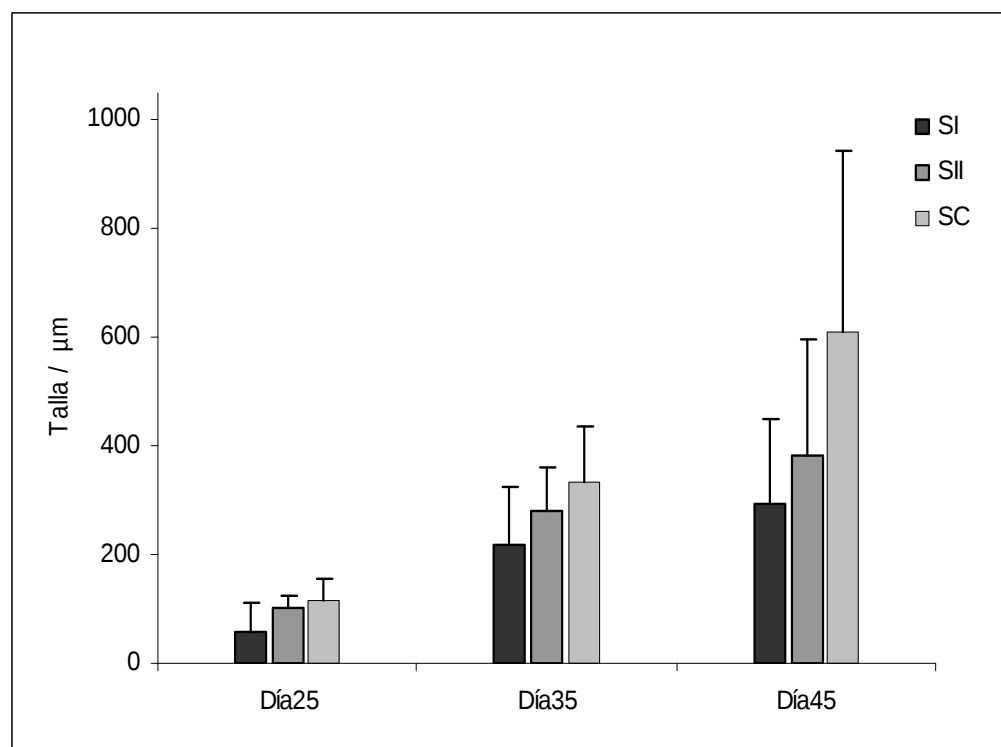


Figura 13: Crecimiento de los esporofitos microscópicos a lo largo del transcurso del cultivo, al día 25 (D25), día 35 (D35) y día 45 (D45) de cultivo.

ANEXOS

Anexo 1. Medio Provosoli (PES).

Reactivos	Solución en Agua Destilada(I)	Volúmenes Parciales Utilizados
Na ₂ -glicerofosfato. 5H ₂ O	5.000 g/100 ml	16.0 ml
NaNO ₃	5.6000 g/150 ml	150.0 ml
Cianocovalamina (Vitamina B 12)	0.0100 g/100 ml	1.6 ml
Tiamina	0.1000 g/100 ml	8.0 ml
Biotina	0.0100 g/150 ml	150.0 ml
Tampón-tris (II)	6.5440 g/150 ml	150.0 ml
Fe EDTA: Na ₂ EDTA (III) + Fe (NH ₄) ₂ .6H ₂ O	0.2640 g/500 ml 0.2808 g	500.0 ml
PII – Mezcla de metales (IV)		500.0 ml
Volumen final en agua destilada (V)		2000.0 ml

(I) Los volúmenes excedentes pueden ser almacenados en congelador.

(II) Tris-aminometano. Llevar a pH 7.8 con HCl 5 N.

(III) Etilenodiaminotetracetato de sodio.

(IV) PII – Mezcla de metales.

Na ₂ EDTA	0.4000 g
H ₃ BO ₃	0.4480 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.0192 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0.0480 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.0088 g
CoSO ₄ . 7H ₂ O	0.0019 g
Agua destilada	500.0 ml

Los metales traza pueden ser previamente diluidos, mantenidos en congelador y pipeteado conforme dilución.

(V) Subdividir en fracciones pequeñas de acuerdo con la utilización y mantener en congelador. Después del descongelamiento, mantener en el refrigerador para su uso en el intervalo de 15-30 días.

(VI) Es probablemente, el medio mas empleado en el cultivo de lagas marinas bentónicas. Nótese que este medio contiene básicamente: i) nitrógeno y fosfato en concentraciones relativamente elevadas; ii) otros macronutrientes; iii)

micronutrientes; iv) vitaminas; v) solución tampón; vi) solución quelante para iones poco solubles.

Diluyendo 20 ml de la solución madre por litro de agua de mar se obtiene en medio altamente rico.

Anexo 2.

Dióxido de Germanio.

- 1.- 0.2 g GeO_2 (Dióxido de Germanio) en 200 ml. De H_2O destilada.
- 2.- Agitar a 80-90° C hasta disolver.
- 3.- Autoclavar
- 4.- Enfriar y refrigerar.
- 5.- Ajustar pH 7.0 a 8.0 con HCl 0.1 N.
- 6.- 3 ml de solución madre por litro de agua de mar.