

# Juveniles generados a partir de esporas no asentadas de *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) presentan capacidad de adhesión al sustrato

Juveniles produced from unattached spores of *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) can become attached to substratum

Edna Barrientos<sup>1</sup> y Ricardo D. Otaíza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Av. Alonso de Ribera 2850, Concepción, Chile. ebarrien@ucsc.cl

**Abstract.-** Spores of some Gigartinaceae can germinate while drifting, and develop into unattached, multicellular, spherical juveniles (JNA). In the lab, growth of JNA of *Chondracanthus chamissoi* was positively affected by light intensity. Also, when 4-month old JNA were placed on artificial substrata, over 60% developed secondary attachment discs. Calcium addition stimulated early attachment of JNA, but life-cycle phase and developmental stage had no significant effect. Thus, JNA can be kept in the laboratory retaining their attachment capacities. Given these features, JNA could be used in propagation technologies, and may also have important effects in dispersion and colonization in natural populations.

**Key words:** Biotechnology, carrageenophyte, cultivation, propagation

## INTRODUCCIÓN

Para la mayor parte de las macroalgas rojas, las esporas son el mecanismo común de dispersión, sin embargo su corta viabilidad limita la distancia a la que pueden dispersarse (Hoffmann & Ugarte 1985, Santelices 1990, Clayton 1992, Amsler *et al.* 1992, Bobadilla & Santelices 2005). Frecuentemente, la viabilidad de las esporas ha sido evaluada como la mantención de su capacidad de adhesión, considerándose que aquellas que no se adhieren ya no serían viables (Hoffmann & Camus 1989, González & Meneses 1996). Sin embargo, esporas de algunas especies de Gigartinaceae presentan la capacidad de germinar y comenzar su desarrollo estando a la deriva (R. Otaíza, datos no publicados<sup>1</sup>; ver también Doty 1987, Saunders & McLachlan 1991, Polifrone *et al.* 2006), formando juveniles no adheridos (JNA). En estas esporas, luego que se forma la pared celular, comienza el clivaje, formándose un juvenil esférico de numerosas células. Los juveniles no adheridos (JNA) de Gigartinaceae pueden ser mantenidos en condiciones de laboratorio por 2-4 semanas (R. Otaíza, datos no publicados)<sup>1</sup>.

*Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützing (Rhodophyta, Gigartinales) se distribuye desde Paita, Perú hasta Ancud, Chile (Hoffmann & Santelices 1997). Presenta un ciclo de vida trifásico tipo *Polysiphonia*, con alternancia de generaciones isomórficas (Ávila *et al.* 2010). Al igual que otras algas rojas, su dispersión ocurre vía tetrásporas y carpósporas, aunque también presenta dispersión por fragmentos, que muestran la capacidad de adherirse en forma secundaria (Bulboa *et al.* 2005, Otaíza & Fonseca 2011). Dado que este recurso tiene importancia económica, exportándose para el consumo humano y para la extracción de carragenanos, es relevante el estudio de factores que favorezcan su cultivo o manejo.

Hasta la fecha existen diversos estudios biológicos y sobre aspectos ecológicos de *Chondracanthus chamissoi*, tanto en laboratorio como en terreno (González & Meneses 1996, González *et al.* 1997, Vásquez & Vega 2001, Bulboa & Macchiavello 2001, Macchiavello *et al.* 2003, Bulboa *et al.* 2007, 2008, 2010; Fonck *et al.* 2008,

<sup>1</sup>Otaíza RD & E Barrientos. 1998. Germinación sin asentamiento y posterior adhesión en *Sarcothalia crispata* (Rhodophyta, Gigartinales). XVIII Congreso de Ciencias del Mar, Iquique.  
Baquedano M & R Otaíza. 2002. Capacidad de fijación de juveniles no adheridos en dos especies de Gigartinales (Rhodophyta) en condiciones de laboratorio. XXII Congreso de Ciencias del Mar, Valdivia.  
Otaíza RD & L Carrasco. 2002. Juveniles no adheridos como propágulos de Gigartinales (Rhodophyta). XXII Congreso de Ciencias del Mar, Valdivia.

Sáez *et al.* 2008, Ávila *et al.* 2010, Otaíza & Fonseca 2011), junto con descripciones de técnicas de cultivo masivo a partir de talos (Bulboa *et al.* 2005, Bulboa & Macchiavello 2006). Además en estudios preliminares (R. Otaíza, datos no publicados)<sup>1</sup> se determinó que *C. chamissoi* presenta la capacidad de formar JNA y que estos juveniles multicelulares pueden adherirse en forma secundaria a través de rizoides, formando un disco basal. Por otra parte, también se ha descrito que la adhesión secundaria de ramas laterales y pínulas de *C. chamissoi* puede ser favorecida con calcio (Otaíza & Fonseca 2011), como se ha descrito para fragmentos del talo de otras especies (*e.g.*, Juanes & Puente 1993). En el presente estudio, se determinó la capacidad de adhesión de JNA (4 meses de edad) de *C. chamissoi*. Esta capacidad podría ser relevante en el ciclo de vida del alga en ambiente natural, e integrar este conocimiento en prácticas de cultivo o repoblamiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Frondas tetraspóricas y cistocárpicas de *Chondracanthus chamissoi* fueron recolectadas en Penco (36°44'203S, 72°59'203O), Región del Biobío, en febrero 2012 y transportadas a la Estación de Biología Marina (Universidad Católica de la Santísima Concepción), ubicada en la localidad de Lengua, Chile.

Las frondas (900-1000 g de peso húmedo) fueron puestas a esporular por separado según la fase del ciclo de vida. A partir de estas suspensiones de esporas se prepararon los JNA, incubándolos entre febrero y mayo de 2012, en condiciones semicontroladas (invernadero) con regulación de temperatura por flujo de agua de mar fresca (13-15°C). El medio de cultivo fue agua de mar microfiltrada (0,45 µm) enriquecida con medio de cultivo SWM-3 (McLachlan 1973) cambiado semanalmente, y con aireación suave pero constante. El fotoperiodo correspondió a las condiciones naturales. Para evaluar el efecto de la cantidad de luz en el crecimiento y desarrollo de los JNA, se instaló una condición de luz baja (10-30 µmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) por sombreado parcial, y una condición de luz más alta (50-200 µmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) sin sombreado. Para cada tipo de esporas, se instalaron 2 botellas (1,5 L) en cada condición de luz.

A los 4 meses de incubación se tomaron 2 alícuotas de 5 mL de cada botella, se dejaron decantar y se hicieron preparaciones permanentes, las que fueron observadas usando un microscopio óptico (Leica DM/LS, Alemania).

Se evaluó el estado del desarrollo (esfera o esfera con primordio) de todos los individuos en las preparaciones, y su abundancia relativa fue expresada como porcentaje del total de individuos en cada condición de crecimiento y fase. También se midieron todos los individuos, evaluándose el diámetro de los individuos formados sólo por esferas y la longitud mayor de los individuos formados por esferas con primordio.

Para evaluar la capacidad de adhesión de juveniles de 4 meses de edad, se montó un experimento que incluyó 3 factores: fase de JNA (juveniles originados de tetrásporas o de carpósporas), estado del desarrollo (esfera simple o esfera con primordio) e incubación con o sin adición de ion Ca<sup>+2</sup> en el medio de cultivo. Los JNA fueron montados en unidades experimentales que consistieron en cerámicos de 2 × 2,5 cm, los que fueron quebrados en la mitad generando grietas en el lado rugoso. Los juveniles fueron tomados con una pipeta Pasteur y colocados en las grietas. En cada grieta se instalaron 20 juveniles de una misma fase y estado del desarrollo. Para cada tratamiento se prepararon 5 unidades experimentales, haciendo un total de 40 unidades en el experimento.

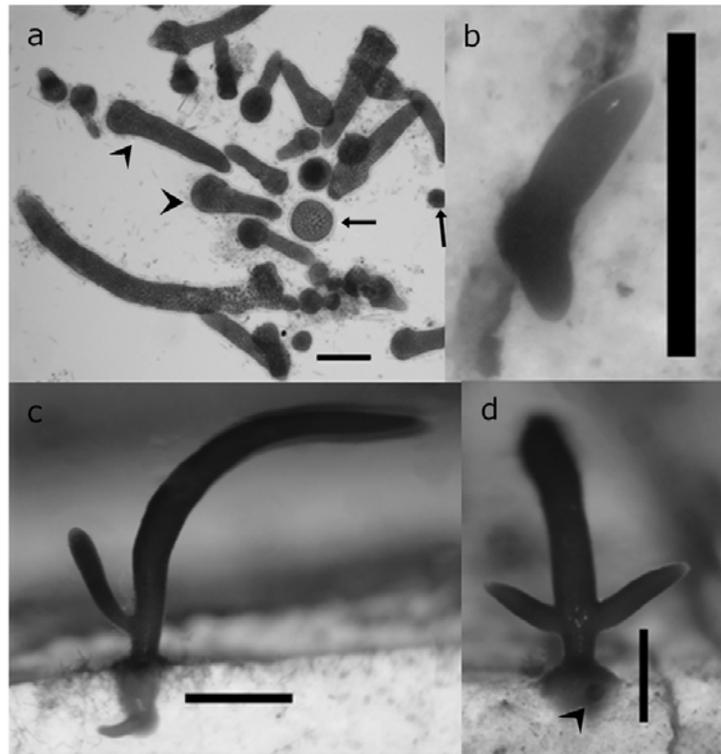
Los cerámicos fueron incubados por separado en 2 acuarios de 10 L con agua de mar microfiltrada (0,45 µm) enriquecida con medio de cultivo SWM-3 (McLachlan 1973) cambiada cada 7 días, y con aireación suave pero constante. A uno de estos acuarios se le agregó Ca<sup>+2</sup> (0,3%). Estos acuarios fueron instalados en una cámara de cultivo a 25 µmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, con un fotoperiodo 12:12, y temperatura de 13 ± 1°C. La posición de las unidades experimentales fue aleatorizada dentro de cada acuario 2 veces por semana.

La adhesión de cada JNA fue evaluada luego de 14, 21 y 28 días de incubación, en un muestreo no destructivo. En cada ocasión, se determinó que el juvenil estaba adherido si presentaba el desarrollo de un disco basal, o al menos no se movía al ser tocado con un pincel monofilamento. La adhesión fue expresada como el porcentaje de individuos adheridos en relación al número inicial en cada unidad experimental y analizada con un ANDEVA de tres vías por separado, para cada fecha de evaluación (ver Underwood 1997), previa comprobación de los supuestos de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk, y de homocedasticidad con la prueba de Cochran. Los resultados que fueron significativos fueron analizados con la prueba HSD de Tukey (Zar 1999).

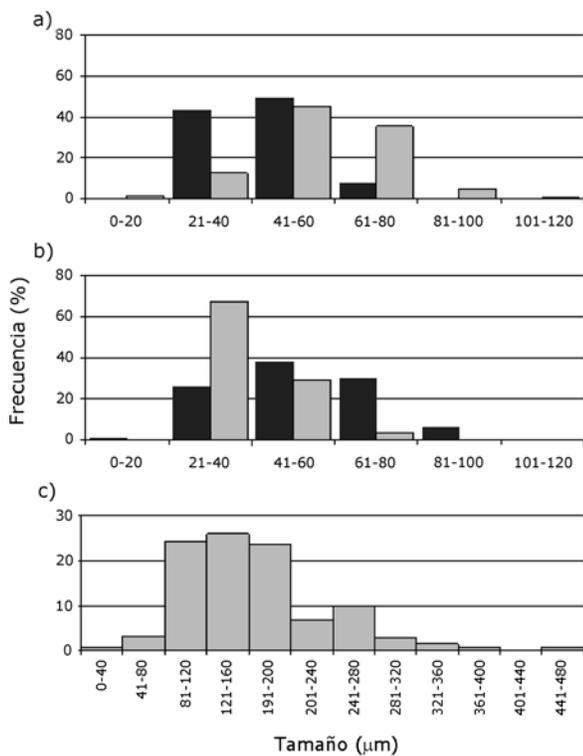
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de los tratamientos con diferente intensidad de luz fue muy evidente tanto en el estado de desarrollo como en el tamaño de los juveniles. A pesar de que todos los juveniles tenían la misma edad, se alcanzaron 2 estados de desarrollo (Fig. 1a). En condiciones de mayor luz, el 57,5 % de los juveniles originados de tetrásporas y sólo el 0,8% de los originados desde carpósporas correspondían a esferas que habían producido un primordio alargado y cilíndrico de longitud variable (entre 60 y 480  $\mu\text{m}$ ). El resto de los juveniles, tanto en la condición de mayor luz como todos los que crecieron con menos luz, sólo formaron esferas multicelulares con diámetro entre 30 y 120  $\mu\text{m}$  (Fig. 2). Estos resultados indican que el

tamaño y desarrollo alcanzado por los JNA es afectado principalmente por la cantidad de luz durante el periodo de incubación, ya que las demás condiciones de incubación fueron las mismas para todos los tratamientos. Por tanto, en condiciones de cultivo, el grado de desarrollo alcanzado por los JNA en un determinado tiempo podría ser controlado por los niveles de luz en que se incuban. Por otra parte, la diferencia entre fases podría corresponder a capacidades fisiológicas diferentes entre los 2 tipos de espora o diferencias en crecimiento entre los primeros estados del desarrollo de esporofitos y gametofitos (González & Meneses 1996, Bulboa *et al.* 2010).



**Figura 1.** Juveniles de *Chondracanthus chamissoi* en diferentes estados de crecimiento. a) Juveniles no adheridos (JNA) como esferas simples (flechas) y esferas con primordio (cabeza de flecha). b) Juvenil dentro de una grieta comenzando a producir primordios. c-d) Juveniles en grietas que fueron abiertas para mostrar el disco de adhesión secundario comenzando a brotar (indica cabeza de flecha); también se observan las primeras ramificaciones desde el primordio principal. Barra de escala: a) 100  $\mu\text{m}$  y b-d) 1 mm / Juveniles of *Chondracanthus chamissoi* in different growth stages. a) Unattached juveniles (JNA) as simple spheres (arrows) and spheres with primordium (arrowhead). b) Juvenile growing from a crevice at the early stages of producing primordia. c-d) Juveniles in opened crevices showing secondary attachment discs which their first buds (indicated by arrowhead); the first branches from the main axis can also be seen. Scale bars: a) 100  $\mu\text{m}$  and b-d) 1 mm

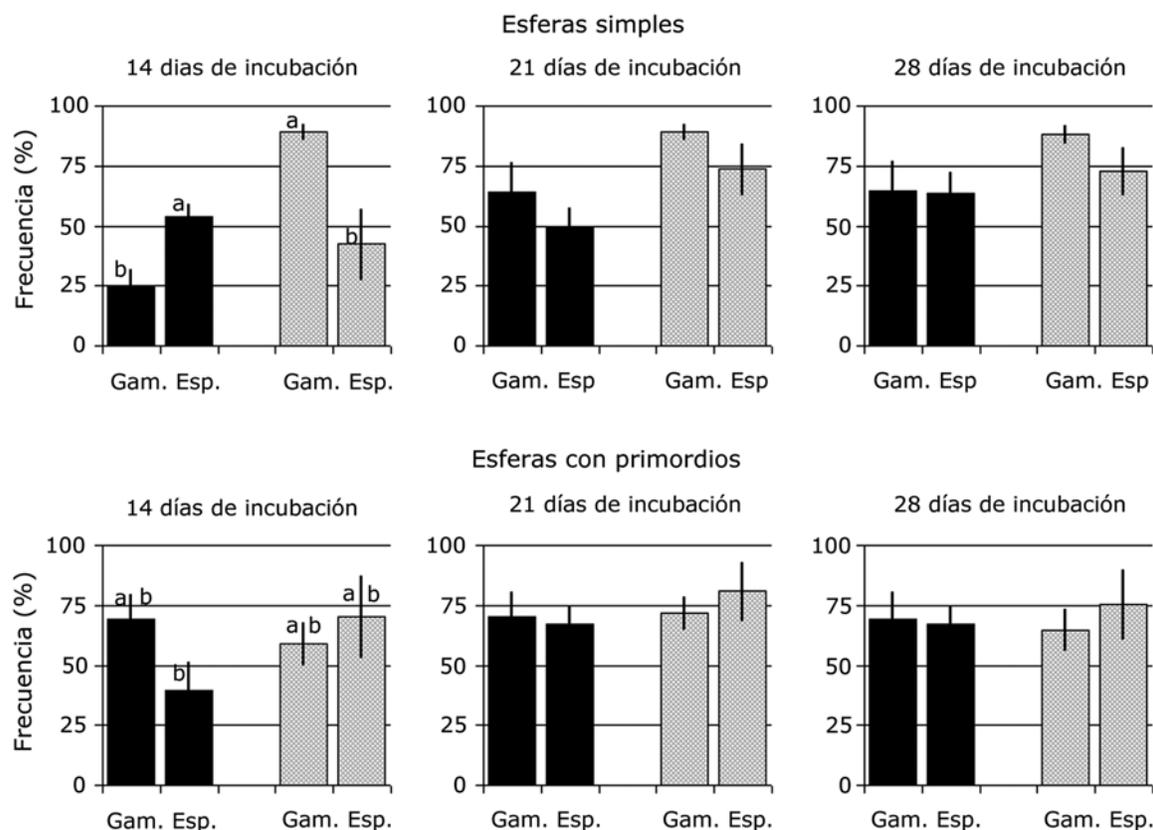


**Figura 2.** Distribución de frecuencia del tamaño de juveniles no adheridos de *Chondracanthus chamissoi* luego de 4 meses de incubación en laboratorio en 2 condiciones de luz: baja intensidad (10-30  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , columnas negras) y alta intensidad (50-200  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , columnas grises). a) diámetro de individuos esféricos originados desde tetrásporas (n= 372); b) diámetro de individuos esféricos originados desde carpósporas (n= 165); c) longitud máxima de individuos esféricos con primordios originados desde tetrásporas (n= 214) / Size distribution of unattached juveniles of *Chondracanthus chamissoi* after 4 months of incubation in laboratory under 2 light conditions: low intensity (10-30  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , black bars) and high intensity (50-200  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , gray bars). a) diameter of spherical individuals originated from tetraspores (n= 372); b) diameter of spherical individuals originated from carpospores (n= 165); c) maximum length of spherical individuals with a primordium originated from tetraspores (n= 214)

Los juveniles que se adherieron a los cerámicos desarrollaron discos basales claramente distinguibles (Fig. 1b-d). Además, aquellos juveniles esféricos lograron desarrollar un primordio, mientras que los juveniles que tenían un primordio, crecieron y comenzaron a diferenciar la lámina. La mayor parte de los juveniles (entre 63,6 y 88,1%) en los diferentes tratamientos estaban adheridos al terminar el experimento (Fig. 3). El porcentaje de adhesión fue aumentando gradualmente entre la segunda y cuarta semana (Fig. 3).

Los factores experimentales mostraron efectos significativos sólo a los 14 y 21 días de incubación. A los 14 días, la triple interacción fue significativa (ANDEVA Ion calcio  $\times$  Estado del desarrollo  $\times$  Fase:  $F_{(1,32)} = 16,015$ ,  $P < 0,001$ ), y la prueba de Tukey indicó que el mayor valor de adhesión fue en los tratamientos de esferas simples de gametofitos con calcio, y los menores valores fueron en los tratamientos de esferas simples de gametofitos sin calcio, esferas simples de esporofitos con calcio, y esferas con primordios de esporofitos sin calcio. Los restantes tratamientos tuvieron valores intermedios que no difirieron de los demás (Fig. 3). A las 3 semanas de incubación sólo fue significativo el factor Ion calcio (ANDEVA  $F_{(1,32)}: 5,903$ ,  $P < 0,022$ ).

La viabilidad de las esporas es restringida, usualmente no supera algunos días (Hoffmann & Camus 1989, González & Meneses 1996). Sin embargo, esporas que no se adhieren inicialmente tienen la capacidad de germinar estando a la deriva, generando juveniles multicelulares no adheridos. Antecedentes de este tipo de juveniles son muy escasos y han recibido diversas interpretaciones. Doty (1987) describe la ocurrencia de embriones tipo mórula en *Kappaphycus alvarezii* (citado como *Eucheuma alvarezii*), y propone que podrían representar una forma de persistir en temporadas desfavorables. Saunders & McLachlan (1991) indican la ocurrencia de juveniles de este tipo en *Meiodiscus spetsbergensis*, pero descartan su relevancia por considerarlos un artefacto del cultivo. Más recientemente, Polifrone *et al.* (2006) describen que discos basales multicelulares de *Gracilaria gracilis* son capaces de liberar estructuras multicelulares esféricas que pueden tener un impacto en la población. Trabajos preliminares de laboratorio con especies de Gigartinales (R. Otaíza, datos no publicados)<sup>1</sup> indicaron que JNA de 2-4 semanas eran frecuentes y lograban adherirse. Los resultados de este estudio indican que esta capacidad se mantiene en JNA de mayor edad (4 meses). Además, estudios anteriores indican que fragmentos del talo de *C. chamissoi* presentan la capacidad de adhesión secundaria (González *et al.* 1997, Macchiavello *et al.* 2003, Bulboa *et al.* 2005, Fonck *et al.* 2008, Sáez *et al.* 2008, Otaíza & Fonseca 2011). Nuestros resultados indican que los JNA también presentan esta capacidad. El estado de desarrollo (esfera simple o con primordio) y la fase del ciclo de vida no fueron relevantes pero, al igual que en otros estudios, la adición de calcio favoreció la adhesión (Juanes & Puente 1993, Otaíza & Fonseca 2011).



**Figura 3.** Promedio ( $\pm$  error estándar,  $n = 5$ ) de la frecuencia de adhesión de JNA de *Chondracanthus chamissoi* a los 14, 21 y 28 días de incubación. Los JNA fueron preparados a partir de tetrásporas, generando gametofitos juveniles (Gam.) y de carpósporas, generando esporofitos juveniles (Esp.). Además, se usaron JNA de 2 estados de desarrollo (esferas simples y esferas con primordios). La incubación se realizó sin adición de  $Ca^{2+}$  (columnas negras) y con adición de  $Ca^{2+}$  (columnas grises). Sólo después de 14 días de incubación hubo interacciones significativas (ver texto). Para estos resultados, los promedios significativamente diferentes (prueba de Tukey) están indicados con diferentes letras / Average ( $\pm$  standard error,  $n = 5$ ) frequency of attachment juveniles of *Chondracanthus chamissoi* after 12, 21 and 28 days of incubation. Unattached juveniles were prepared from tetraspores, generating juvenile gametophytes (Gam.) and from carpospores, generating juvenile sporophytes (Esp.). Juveniles of 2 development stages were used (simple spheres and spheres with primordia). Incubation was done without addition of  $Ca^{2+}$  (black columns) and with addition of  $Ca^{2+}$  (gray columns). Significant interactions were obtained only after 14 days of incubation (see text). For these results, significantly different means (Tukey's test) are indicated with different letters

Dados los resultados obtenidos, los JNA podrían considerarse como propágulos alternativos a las esporas. Además, por estas características, los JNA podrían ser usados en técnicas de cultivo y manejo de este recurso como alternativos a las esporas.

#### LITERATURA CITADA

Amsler C, D Reed & M Neushul. 1992. The microclimate inhabited by macroalgal propagules. *British Phycological Journal* 27: 253-270.

Ávila M, MI Piel, JH Cáceres & K Alveal. 2010. Cultivation of the red alga *Chondracanthus chamissoi*: sexual reproduction and seedling production in culture under controlled conditions. *Journal of Applied Phycology* 23: 529-536.

Bobadilla M & B Santelices. 2005. Variations in the dispersal curves of macroalgal propagules from a source. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 327: 47-57.

Bulboa CR & JE Macchiavello. 2001. The effects of light and temperature on different phases of the life cycle in the carrageenan producing alga *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 44: 371-374.

- Bulboa CR & JE Macchiavello. 2006.** Cultivation of cystocarpic, tetrasporic and vegetative fronds of *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) on ropes at two localities in northern Chile. *Investigaciones Marinas* 34: 109-112.
- Bulboa CR, JE Macchiavello, EC Oliveira & E Fonck. 2005.** First attempt to cultivate the carrageenan-producing seaweed *Chondracanthus chamissoi* (C.Agardh) Kützing (Rhodophyta; Gigartinales) in Northern Chile. *Aquaculture Research* 36: 1069-1074.
- Bulboa C, J Macchiavello, K Véliz, EC Macaya & EC Oliveira. 2007.** *In vitro* recruitment of *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. on gametophytic and tetrasporophytic thalli of four populations of *Chondracanthus chamissoi* from Chile. *Journal of Applied Phycology* 19: 247-254.
- Bulboa C, J Macchiavello, E Oliveira & K Véliz. 2008.** Growth rate differences between four Chilean populations of the edible seaweed *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Aquaculture Research* 38: 1550-1555.
- Bulboa C, J Macchiavello, K Véliz & EC Oliveira. 2010.** Germination rate and sporeling development of *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) varies along a latitudinal gradient on the coast of Chile. *Aquatic Botany* 92: 137-141.
- Clayton MN. 1992.** Propagules of marine macroalgae: structure and development. *British Phycological Journal* 27: 219-232.
- Doty MS. 1987.** The production and use of *Eucheuma*. In: Doty MS, JF Caddy & B Santelices (eds). Case studies of seven commercial seaweed resources. FAO Fisheries Technical Paper 281: 123-164.
- Fonck E, R Martínez, J Vásquez & C Bulboa. 2008.** Factors that affect the re-attachment of *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) thalli. *Journal of Applied Phycology* 20: 311-314.
- González J & I Meneses. 1996.** Differences in the early stages of development of gametophytes and tetrasporophytes of *Chondracanthus chamissoi* (C Agardh) Kützing from Puerto Aldea, Northern Chile. *Aquaculture* 143: 91-107.
- González J, I Meneses & J Vásquez. 1997.** Estudio de *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) en terreno: variaciones estacionales y espaciales en fases del ciclo de vida. *Biología Pesquera* 26: 3-12.
- Hoffmann AJ & R Ugarte. 1985.** The arrival of propagules of marine macroalgae in the intertidal zone. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 92: 83-95.
- Hoffmann AJ & P Camus. 1989.** Sinking rates and viability of spores from benthic algae in central Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 126: 281-291.
- Hoffmann AJ & B Santelices. 1997.** Flora marina de Chile central, 424 pp. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Juanes P & A Puente. 1993.** Differential reattachment capacity of isomorphic life history phases of *Gelidium sesquipedale*. *Hydrobiologia* 260/261: 139-114.
- Macchiavello J, C Bulboa & M Edding. 2003.** Vegetative propagation and spore-based recruitment in the carrageenophyte *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta: Gigartinales) in Northern Chile. *Phycological Research* 51: 45-50.
- McLachlan J. 1973.** Growth media-marine. In: Stein JR (ed). Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements, pp. 25-52. Cambridge University Press, Cambridge.
- Otaíza RD & FG Fonseca. 2011.** Effect of dissolved calcium on the formation of secondary attachment structures in different types of branches of *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 46: 263-268.
- Polifrone M, F De Masi & G Gaetano. 2006.** Alternative pathways in the life history of *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) from north-eastern Sicily (Italy). *Aquaculture* 261: 1003-1013.
- Sáez F, J Macchiavello, E Fonck & C Bulboa. 2008.** The role of the secondary attachment discs in the vegetative propagation of *Chondracanthus chamissoi* (Gigartinales: Rhodophyta). *Aquatic Botany* 89: 63-65.
- Santelices B. 1990.** Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 28: 177-276.
- Saunders GW & JL McLachlan. 1991.** Morphology and reproduction of *Meiodiscus spetsbergensis* (Kjellman) gen et comb-nov, a new genus of Rhodophysemataceae (Rhodophyta). *Phycologia* 30: 272-286.
- Underwood AJ. 1997.** Experiments in ecology: Their logical design and interpretation using analysis of variance, 504 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vásquez J & A Vega. 2001.** *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) in northern Chile: ecological aspect for management of wild populations. *Journal of Applied Phycology* 13: 267-277.
- Zar JH. 1999.** Biostatistical analysis, 663 pp. Prentice Hall, Englewood Cliffs.

---

Recibido el 20 de agosto de 2013 y aceptado el 20 de enero de 2014

Editor Asociado: Pilar Muñoz M.