

-UCH-FC  
DOC-EABE  
G.643i  
c.2

**IMPLICANCIA ECOLOGICA DE LA COALESCENCIA EN EL  
SUBGENERO *TYLECODIUM*, CLOROPHYTA**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctor En Ciencias

Con Mención Ecología Y Biología Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

**Alejandra Paola González Vásquez**

2007



Director De Tesis: Dr. Bernabé Santelices G.

Fac. Ciencias Biológicas P. Universidad Católica De Chile

Co-Director.: Dr. Mary Kalin Arroyo

Fac. Ciencias Universidad De Chile

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN**

**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de  
Doctorado presentada por la candidata:

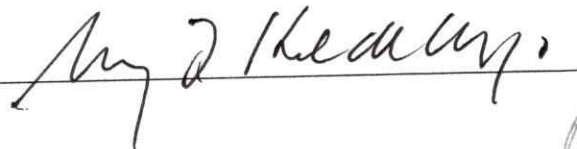
**ALEJANDRA PAOLA GONZÁLEZ VÁSQUEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para  
optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva,  
en el examen de Defensa de Tesis rendida el 24 de Abril del 2007

**Director : Dr. Bernabé Santelices González**



**Co-Director.: Dr. Mary Kalin Arroyo**

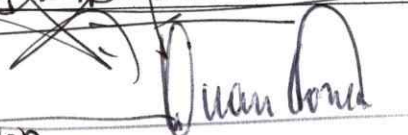


**Comisión Evaluadora De La Tesis**

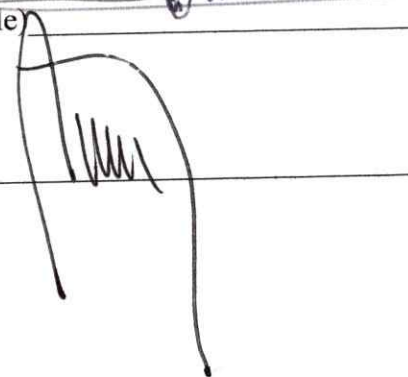
**Dr. Ramiro Bustamante (Universidad De Chile)**



**Dr. Juan Correa M. (P. Universidad Católica De Chile)**



**Dr. Rodrigo Medel (Universidad De Chile)**



*“Después de un fallido intento anterior, en diciembre del 2001 el Comité Calificador de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile me anunció que estaba seleccionada para formar parte del programa de Doctorado en Ciencias, Mención Ecología y Biología Evolutiva. Este desafío personal y familiar, cuyo objetivo fue y será el desarrollo del Conocimiento Científico en Chile, especialmente de las algas marinas, ha marcado y perfilado la mujer, esposa, madre y profesional que soy. Reforzada siempre por el carisma entusiasta de mi tutor, quien me acogió en su Universidad y laboratorio, en esta tesis de doctorado he logrado entender algunas de las preguntas e hipótesis que nos propusimos inicialmente. Tengo clara conciencia que mi trabajo no contiene todas las respuestas sobre las algas y específicamente sobre Codium y la coalescencia. Sin embargo, espero que sirva como fuente de inspiración para nuevas investigaciones y proyecciones en las algas marinas, que han conformado una notable fuente de recursos alimenticios y económicos a través de la historia, desde antiguas culturas hasta tiempos actuales.”*

---

Esta tesis fue patrocinada por el Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Chile (<http://www.bio.puc.cl/>). Y auspiciada por mi tutor Dr. Bernabé Santelices y el Gobierno de Chile, a través CONICYT (Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica), con sus Becas de Postgrado, Beca de Apoyo para realización de Tesis Doctoral y Beca para Pasantías en el Extranjero (<http://www.conicyt.cl/>).

---



**A Arthur....**



***“Para las personas creyentes,  
Dios esta al principio.  
Para los científicos,  
está al final de todas sus reflexiones.***

***Max Planck (1858-1947) Físico alemán.***



Nací el 1° de Septiembre de 1974 en Valparaíso. A mis 32 años mis pasatiempos favoritos son practicar fotografía, yoga, ciclismo, danza árabe y cocinar junto a mi esposo Arthur y nuestro hijo Maximiliano. Mis gustos musicales son variados. Sin embargo, recorro a Beethoven, Chopin, y Strauss para concentrarme. Mi lectura liviana, de vacaciones junto al mar, son aquellos libros en que las mujeres son las heroínas como las policiales de Aghata Christie o las románticas de Bárbara Wood.

Académicamente, mis estudios primarios se llevaron a cabo en escuelas municipalizadas de Viña del Mar (Escuela E-360, Inmaculada de Lourdes, y Liceo José Cortés Brown). En 1993 ingresé a estudiar Biología Marina en el entonces Instituto de Oceanología de la Universidad de Valparaíso. En octubre de 1998 me titulé de Biólogo Marino y de Diplomada en Gestión y Administración de Empresas (Escuela de Ingeniería Comercial, UV.). Durante 1999- 2000 fui parte del Diplomado en Conservación y Manejo de Recursos Marinos Bentónicos (Pontificia Universidad Católica de Chile en Cooperación con el Gobierno Italiano). El 2001 ingresé al Magíster en Ciencias, Mención Ecología y Biología Evolutiva (Universidad de Chile). Sin embargo, durante el 2002, apoyada por CONICYT y los profesores Dr. Ramiro Bustamantes y Dr. Rodrigo Medel, ingresé al Doctorado en Ciencias, del mismo plantel, homologando mis primeros ramos de Magíster. En el 2004 comencé mi tesis doctoral apoyada por mis tutores Dr. Bernabé Santelices y Dr. Mary Kalin Arroyo, y financiada por la Beca CONICYT de Apoyo a Tesis doctoral, y por el Depto. de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile, dirigido en ese periodo por el Dr. Juan Correa. En el 2005 realicé una pasantía en la Universidad de Pierre & Marie Curie, Station Biologique de Roscoff, France, a cargo de la Dr. Myriam Valero y Dr. Christophe Destombe. Finalmente, en diciembre de 2006 entregué mi tesis a la escuela de Post-grado de la Universidad de Chile.

## AGRADECIMIENTOS

Como en toda investigación, debo agradecer a las Instituciones y Organizaciones que patrocinaron y auspiciaron la realización de mi doctorado, ellos fueron los Programa de Doctorado en Ciencias, Mención Ecología y Biología Evolutiva, Universidad de Chile; Laboratorio de Algas del Depto. de Ecología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Chile. Y a la Comisión Nacional de Investigación, Ciencia y Tecnología (CONICYT), por sus becas de mantención doctoral, apoyo a realización de tesis de doctorado (AT-4040047), asistencia a congresos nacionales e internacionales y pasantías en el extranjero.

Agradezco enormemente a quienes participaron en mi formación académica como mi tutor el Dr Bernabé Santelices, Dr. Juan Correa, Dr. Rodrigo Medel, Dr. Ramiro Bustamante, Dr. Mary Kalin Arroyo, Dr. Marco Méndez, Dr. Cristián Hernández, Dr. Elie Poulin, Dr. Sylvain Faugeron, Dr. Myriam Valero, Dr. Christophe Destombe.

A mis amigos, compañeros y colegas quienes día a día pusieron la nota humana a estos años de doctorado, Wilfredo Gonzáles, Carlos Olavarría, Nélida Pohl, Carezza Botto, Ernesto Gianoli, Jorge Alvarado, Leyla Cárdenas, Carmen Gloria Ossa, Paula Caballero, Soledad Cortéz, Jessica Beltrán, Carolina Camus, Cecilia Figueroa, Verónica Flores, M<sup>a</sup> Teresa González, Martha Hengst, Marcela Hormazábal, Liliana Llanos, Marie Laure Guillemin, Franco Maraboli, Mónica Mendoza, Paula Neill, Damaris Nuñez, Luis Prado, Gioconda Peralta, Iván Salinas, Andrea Silva, Roberto Nespolo, Giselle Saavedra, Jenny Santibañez, Florence Tellier, Patricio Zabala, Matías Medina, Santiago Andrade, Constanza Chianale, Araceli la Rosa, Gloria Collantes y Andrés Mansilla.



Finalmente y de manera muy personal, quiero agradecer al “padre”, comenzando por mi padre celestial, al que espero no defraudar utilizando y multiplicando los dones que me ha dado. Al padre que dio a luz a mi hermosa madre, al padre de mi primo Joaquín quien me crió como su hija, a mi padre natural el que me conoció a través de salidas a terreno, tuercas y jaulas. A mi padre profesional quien me adoptó sin condiciones desde mi pre-grado y a los padres de mis amigos por haberlos criado para ser los mejores del mundo.

En último lugar quiero darle gracias de todo corazón al padre de mi hijo Arthur, quien es la mitad de mi vida sin la cual no quiero vivirla, y que me ha regalado una nueva familia donde he dejado de ser la única nieta, sobrina e hija. Además, ha sido uno de los financistas más importantes de esta tesis “mi beca Conley”, apoyando mis viajes y locuras aún en los momentos más difíciles de su propia vida. Por último, quiero agradecer al padre de mis nietos. *“Maxi Conley”*, quien me ha entregado un amor inconmesurable, paciente, y resignado, debiendo compartir a su mamá con la esposa, la estudiante y esta pasión por investigar.



## TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	xiv
Abstract	xviii
Capítulo I. Introducción	1
Capítulo II.	
2.1. Introducción.....	18
2.2 Materiales y Métodos.....	23
2.3 Resultados.....	28
2.4 Discusiones y Conclusiones.....	37
2.5 Referencias.....	44
Capítulo III.	
3.1. Introducción.....	77
3.2 Materiales y Métodos.....	82
3.3 Resultados.....	86
3.4 Discusiones y Conclusiones.....	89
3.5 Referencias .....	93
3.6 Anexo A.....	112
Capítulo IV	
4.1. Introducción.....	121
4.2 Materiales y Métodos.....	127
4.3 Resultados.....	131
4.4 Discusiones y Conclusiones.....	135
4.5 Referencias.....	142
4.6 Anexo B.....	164





Capítulo V

5.1. Introducción.....	190
5.2 Materiales y Métodos.....	194
5.3 Resultados.....	197
5.4 Discusiones y Conclusiones.....	200
5.5 Referencias.....	203
Capítulo VI. Conclusiones Generales.....	217



## INDICE DE TABLAS

### Capítulo II

Tabla 1.....	52
Tabla 2.....	53
Tabla 3.....	55-56
Tabla 4.....	57

### Capítulo III

Tabla 5.....	100
Tabla 6.....	102
Tabla 7.....	106
Tabla 8.....	106
Tabla 9.....	108
Tabla 10.....	108

### Capítulo V

Tabla 11.....	210
---------------	-----



## INDICE DE FIGURAS

### Capítulo II

Figura 1.....	54
Figura 2.....	58
Figura 3.....	59
Figura 4.....	60
Figura 5.....	61
Figura 6.....	62
Figura 7.....	63
Figura 8.....	64
Figura 9.....	65
Figura 10.....	66
Figura 11.....	67
Figura 12.....	68
Figura 13.....	69
Figura 14.....	70
Figura 15.....	71
Figura 16.....	72
Figura 17.....	73-74
Figura 18.....	75

### Capítulo III

Figura 19.....	101
Figura 20.....	103
Figura 21.....	104



Figura 22.....	105
Figura 23.....	107
Figura 24.....	109
Figura 25.....	110
Figura 26.....	111
Figura 27.....	111

Capítulo IV

Figura 28.....	149
Figura 29.....	149
Figura 30.....	150
Figura 31.....	151
Figura 32.....	152
Figura 33.....	153
Figura 34.....	154
Figura 35.....	155
Figura 36.....	156
Figura 37.....	157
Figura 38.....	158
Figura 39.....	159
Figura 40.....	160
Figura 41.....	161
Figura 42.....	162
Figura 43.....	163



Anexo B

Figura 44.....	180
Figura 45.....	181
Figura 46.....	182
Figura 47.....	183
Figura 48.....	184
Figura 49.....	185
Figura 50.....	186
Figura 51.....	187
Figura 52.....	188

Capítulo V

Figura 53.....	208
Figura 54.....	209
Figura 55.....	211
Figura 56.....	212
Figura 57.....	213
Figura 58.....	214
Figura 59.....	215
Figura 60.....	216



## RESUMEN

Basados en características morfológicas y ecológicas, se ha propuesto que la especie *Codium dimorphum* (subgénero *Tylecodium*) es un alga verde capaz de coalescer, proceso que hasta el momento permanece como exclusivo de las algas rojas. En este contexto, el objetivo general de esta tesis fue poner a prueba las hipótesis generales: (1) Las especies del subgénero *Tylecodium* presentes en Chile, cuyos talos son capaces de fusionarse en condiciones naturales, presentan patrones similares al proceso de coalescencia descrito en algas rojas. (2) Si el proceso de fusión de talos en *C. dimorphum* ocurre en condiciones naturales, estas fusiones tienen implicancias ecológicas (beneficios y/o costos) similares a aquellos descritos en la fusión (coalescencia) de algas rojas. Basado en lo anterior, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- (a) Evaluar si la fusión de talos ocurre a nivel inter-específico.
- (b) Evaluar si la fusión de talos ocurre a nivel intra-específico entre genotipos distintos.
- (c) Evaluar en condiciones naturales la fusión de talos en *C. dimorphum* y describirla a nivel macroscópico (visual) y microscópico (celular).
- (d) Estimar la frecuencia de fusión de talos en *C. dimorphum*, en condiciones naturales, a través de la cuantificación de talos compuestos por más de un genotipo (quimeras).
- (e) Evaluar la existencia de costos asociados a la heterogeneidad genética (quimerismo), tal como competencia intra-organismal de genotipos. Estimado y correlacionando dentro de cada talo su tamaño (crecimiento diferencial) con el número de genotipos y sus distancias genéticas.

(f) Evaluar si existen beneficios talla-dependiente en la fusión de talos (crecimiento y número de estructuras reproductivas), que desaparecerían al estandarizar las tallas entre talos fusionados versus no fusionados.

La combinación de estudios ecológicos, morfológicos, ultraestructurales, moleculares y de cultivo en condiciones controladas, permitieron concluir que:

(a) La fusión de talos a nivel inter-específico no ocurriría naturalmente, ya que la combinación de caracteres morfológicos, moleculares y filogenéticos identificaron tres especies del subgénero *Tylecodium*, distribuidas discontinuamente a lo largo de Chile continental. En un contexto taxonómico, dos especies representarían nuevas especies para la Ciencia. Mientras que *C. dimorphum*, sugerida como especie coalescente en Chile central, correspondería a lo que momentáneamente se designó como *Codium sp.*

(b) La fusión de talos a nivel intra-específico entre genotipos distintos, podría ocurrir naturalmente en aquellas localidades que presentan variabilidad genética. En un contexto genético poblacional, *Codium sp.* se compuso por 17 haplotipos en un amplio rango de distribución (aprox. 2000 km). Estos haplotipos se encontraron estrechamente relacionados entre sí, evidenciando una gran conectividad entre las poblaciones a través de la dinámica de las poblaciones, estructuración genética, patrón filogeográfico, y filogenias de haplotipos y poblaciones. Las poblaciones periféricas al norte (Paposos) y sur (Loncoyén) de su distribución, se caracterizaron por presentar mayor diversidad genética intra-poblacional, con genotipos distintos coexistiendo.

(c) En Chile central, la fusión de talos en *Codium sp.* ocurre a nivel macroscópico, entre talos distintos (inter-genet) y dentro del mismo talo (intra-genet). En ambos casos, observaciones microscópicas, mostraron la fusión como un entrecruzamiento y contacto celular, sin evidencia de formación de una matriz o pared externa común, y menos aún, la presencia de conexión secundaria entre células, como ha sido descrito en la coalescencia de algunas algas rojas. Esta fusión se llevó a cabo gracias a cambios morfológicos y/o funcionales, de los utrículos y filamentos medulares, que le permitieron la adherencia al sustrato, contacto entre talos y mantención de la fusión. Esta variabilidad morfológica y funcional fue un patrón común observado en talos no manipulados, permitiéndoles no sólo el crecimiento meristemático del talo, sino que le confirió a los talos programación vegetativa, ocupando el sustrato disponible y eliminando competidores por sobrecrecimiento celular. El cultivo de células, identificó que el cambio morfo-funcional se debió a una multiplicación y movilización activa del protoplasma hacia las zonas de crecimiento, inicialmente observada como evaginación que dio origen a numerosos utrículos y filamentos medulares. Adicionalmente, el cultivo de células en condiciones controladas, evidenció cierta competencia celular en condiciones ambientales adecuadas, expresadas en un mayor crecimiento de células cultivadas aisladamente. Sin embargo, frente a variaciones ambientales sub-óptimas, esta competencia se transformó en cooperación, sobreviviendo las células cultivadas en grupos.

(d) Poblaciones naturales de *Codium sp.*, con alta variabilidad genética intrapoblacional, presentan una gran frecuencia (70-90%) de talos compuestos por más de un genotipo (quimeras).



(e) Esta heterogeneidad genética pareciera tener un costo asociado en cuanto a competencia intraorganismal, observándose como una reducción del tamaño del talo, al encontrarse una mayor cantidad de genotipos distintos y bajo parentesco genético, en el mismo talo. No obstante, estos datos no fueron concluyentes, constituyendo la base de estudios posteriores que pongan a prueba dicha hipótesis.

(f) El beneficio talla-dependiente no desapareció al estandarizar las dimensiones de talos fusionados versus no fusionados. Sugiriendo beneficios intrínsecos de la fusión, observado como un aumento significativo del éxito reproductivo (abundancia de gametangios) pero no en la tasa crecimiento. Esta respuesta “paradojal” sugiere que existirían mecanismos aún desconocidos que estimulan la maduración de los talos (producción de gametangios), dentro de los cuales se puede sugerir una cooperación celular (sinergismo celular) y/o competencia celular (consecuencia de la variación morfológica y funcional de las células observadas en el proceso de fusión de talos).

En consecuencia, esta tesis constituye la primera evidencia experimental de que la fusión de talos en el alga verde *Codium sp.* es frecuente. Este tipo de fusión, podría corresponder a coalescencia en un amplio sentido, aún cuando a nivel celular esta fusión no presente en patrón descrito en la coalescencia de algas rojas. Finalmente, la implicancia ecológica de proceso de fusión, traducida en costos y beneficios del quimerismo, permanece aún incierta, sugiriendo beneficios intrínsecos de la fusión de talos y formación de una entidad quimérica cuyo origen es desconocido.

## ABSTRACT

Based on both morphological and ecological characteristics, the green seaweed *Codium dimorphum* (*Tylecodium*), has been suggested as coalescing seaweed, process described for red algae only. In this study, we evaluated two hypotheses: (1) Species of the *Tylecodium* subgenus, distributed along Chile, which have the capacity to fuse in natural condition, show similar patterns of coalescence to those described for red algae (2) If thallus fusion in *C. dimorphum* occurs in natural condition, confer ecological effects (costs and benefits) similar to those described for coalescing red algae. In order to test these hypotheses, this study evaluates:

- (a) The alga's ability to fuse at inter-specific level
- (b) The alga's ability to fuse at intra-specific level, between different genotypes.
- (c) The fusion of *C. dimorphum* thallus in natural conditions, observed at macroscopic (visual) and microscopic (cellular) levels.
- (d) The frequency of thallus fusion in *C. dimorphum* natural populations, based on chimeric thallus formed by different genotypes.
- (e) The costs of genetic heterogeneity (chimerism), which is predicted to reduce thallus size by intra-organismal competition, between different genotypes increased by they genetic differences.
- (f) Disappearance benefits of thallus fusion size-dependence (growth and number of reproductive structure) in fused thallus versus non-fused thallus of the same size.

The combination of ecological, morphological, ultrastructural, molecular and laboratory culture obtained in this study suggests:

- (a) No evidence of natural thallus fusion at inter-specific level, because the combination of morphological, molecular and phylogenetic characters distinguished

three species in the subgenus *Tylecodium*, all of them discontinuously distributed along continental Chile. Two of these species constitute new species. While, the occurrence of *C. dimorphum* at central Chile corresponds to *Codium sp.*, which had been suggested to raise from a coalescence seaweed.

(b) High probability of thallus fusion between different genotypes in population characterized by a high genetic diversity. The genetic variability of *Codium sp.* was composed by 17 haplotypes along their range of distribution (2000 km). These haplotypes were closely related, with high connectivity among populations, based on their population dynamics, genetic structure, phylogeography patterns, and haplotype and population phylogeny. At intrapopulation level, haplotype diversity was higher in peripheral populations, north (Paposo) and south (Loncoyén).

(c) In central Chile, thallus fusion of *Codium sp.* occurs between different thallus (inter-genet), and within the same thallus (intra- genet). In both cases, the fusion occurs at macroscopic and microscopic levels, by morphological and functional changes of utricles and medullary filaments, which confer the capacity to adhere to substrate, contact between thallus and maintenance of fusion. However, we were not able to distinguish an external common matrix or wall in contacting zone, and the presence of secondary connection between cells as described in coalescence of some red algae neither. The cellular transformation was possible by an active multiplication and mobilization of protoplasm towards the growth area. Initially, this was observed as outpouching, which later originates numerous utricles and medullary filaments. The morphological and functional variability is a common pattern in wild populations, allowing them not only meristematic growth of thallus, but also vegetative propagation with substrate occupancy, and competitor's exclusion

by cellular overgrowth. In culture experiments, we observed a cellular competition in optimal conditions by increased individual cell growth. In contrast, sub-optimal conditions transformed competition into cooperative interaction increasing grouped cells survival.

(d) The frequency of chimeric thallus (formed by more than one genotype) was high (70-90%) in natural populations with high intrapopulation genetic variability.

(e) Genetically heterogeneous thallus suggested a cost of their condition, associated to thallus size reduction as a function of number of different genotypes and their genetic differences. However, our results were not conclusive, constituted the base of future works only.

(f) The benefits size-dependence predicted by thallus fusion, did not disappear when standardization of thallus size was performed (fused and non-fused thallus). This suggested intrinsic benefits of fusion, due to unknown mechanisms, which stimulate thallus maturation (gametangia formation), such as cooperation (cellular synergisms) or competition (morphological and functional variability) as a consequence of the fusion process.

Consequently, this thesis constitutes the first experimental evidence of the fusion of thallus in the green seaweed *Codium sp.*. This kind of fusion can correspond to coalescence in a wide sense, even though it did not show the same cellular pattern observed in coalescence of red seaweed. The ecological effects of the process, translated in costs and benefits of the chimera, remain still uncertain, but suggest intrinsic benefits of thallus fusion and chimera formation whose origins are unknown.

**CAPITULO I**

**EL PROBLEMA DE ESTUDIO**

## INTRODUCCION GENERAL

Basados en características morfológicas y ecológicas se ha sugerido que la especie de alga verde *Codium dimorphum* (subgénero *Tylecodium*) podría ser un alga del tipo coalescente (Maggs & Cheney 1990), proceso que hasta el momento permanece circunscrita exclusivamente en las algas rojas (Santelices *et al.* 1999).

El talo de *C. dimorphum* (orden Bryopsidales,) está compuesto por células cenocíticas o sifonales de gran dimensión (1000-1500  $\mu\text{m}$  de largo). En general, estas células se caracterizan por carecer de tabicaciones citoplasmáticas, encontrándose en su interior numerosos organelos y núcleos distribuidos libremente. En el género las células se diferencian en una porción apical o utrículo y una porción basal llamada filamento medular. Numerosas células entremezcladas constituyen el talo, cuya corteza la componen los utrículos, y la médula los filamentos medulares, que en esta especie se adhiere completamente al sustrato (Silva 1951, 1955, 1957, Borden & Stein 1969). Esta organización celular del género (incluyendo el subgénero *Tylecodium*) lo caracteriza como organismo clonal (Collado-Vides 2002). Similar a lo descrito en plantas terrestres clonales (Harper 1985, Jackson *et al.* 1985), las algas clonales se propagan mayoritariamente mediante autoreplicación de unidades genéticamente iguales que al ser separadas de la unidad parental pueden funcionar, sobrevivir y propagarse como una entidad independiente (Santelices 2004).

En ambientes intermareales de Chile central, los talos crustosos de *C. dimorphum* pueden alcanzar dimensiones de hasta 18 m<sup>2</sup>. La población forma un cinturón intermareal permanente, el que crece rápidamente durante estaciones de otoño e invierno, excluyendo por sobre crecimiento otras algas e invertebrados

sésiles. En dicho ambiente, la dominancia del sustrato le confiere un importante rol en la estructuración comunitaria y en la sucesión de organismos intermareales (Santelices *et al.* 1981).

Aunque *C. dimorphum* pertenece a la División Chlorophyta, las características morfológicas y ecológicas anteriormente descritas han sido relacionadas a los beneficios observados en algas coalescentes (Maggs & Cheney 1990). Esta hipótesis se ha visto reforzada por la observación de fusión de talos de *C. dimorphum* en condiciones naturales de Chile central (González, pers. observ.). Similar a lo anterior, estudios poblacionales en la especie congénérica *C. setchellii* (*Tylecodium*) (Oregon, USA), indican que talos en estadios tempranos del desarrollo ubicados inicialmente en cercanía, se fusionan formando un talo continuo (Trowbridge 1996).

La coalescencia en algas rojas ha sido descrita como la fusión de dos o más organismos distintos formando una entidad genéticamente heterogénea, denominada quimera (Santelices *et al.* 1999). La palabra coalescencia proviene del latín “*coalesce*”, donde *Co-* significa juntos y *-alescere* se traduce como crecer. Por lo tanto, en un sentido amplio, coalescencia significa crecer juntos (Merriam- Webster Dictionary 2006). Sin embargo, debido a que el concepto ha sido utilizado en diferentes disciplinas de las ciencias biológicas como microbiología, zoología, botánica, ficología, entre otros, la aplicación del concepto y el tipo de fusión varía respecto al organismo en estudio y el nivel de resolución analítica que se realice (visual o macroscópico, celular y genético). En dichas disciplinas, la mayor parte de los trabajos realizados para identificar coalescencia entre organismos ha sido del tipo experimental. Esto se debe a que en condiciones naturales siempre existe incertidumbre de una identificación correcta del proceso por ausencia de evidencia

pertinente (Scofield *et al.* 1982, Ilan & Loya 1990, Hidaka *et al.* 1997, Maldonado 1998, Sommerfeldt & Bishop 1999). Pese a esto, la formación de quimeras ha sido descrita en la mayoría de los taxa, tales como protistas (incluyendo macroalgas), hongos, plantas, animales invertebrados y vertebrados (ver revisión Pineda-Krch & Lehtila 2004). En general el proceso de coalescencia se relaciona a una diferente clase de interacciones entre linajes genéticamente heterogéneos, resultando en la manifestación de costos y/o beneficios de esta condición (Grosberg & Strathmman 1998). En este sentido, Pineda-Krch & Lehtila (2004) sugieren que los costos y beneficios de una condición quimérica, tendrían implicancias ecológicas y evolutivas de significancia.

De manera general, se han descrito cinco tipos de beneficios asociados al quimerismo generado por la coalescencia: incremento de la variabilidad genética (Buss 1982, Rinkevich & Weissman 1992), interacciones sinérgicas entre las variantes (división de labores y complementación de funciones) (Buss 1982), localización del compañero (Buss 1982), atributos tamaño- específicos (mayor tasa de crecimiento, éxito reproductivo y sobrevivencia) (Buss 1982, Rinkevich & Weissman 1992, Pineda-Krch & Lehtila 2004) y selección a través de la heterosis (Rinkevich & Weissman 1992). Similar a lo anterior, la mantención de un organismo genéticamente heterogéneo ha sido asociado a costos en cuanto a un efecto deletéreo sobre el fitness individual, debido a una competencia intraorganismal (ver revisión Pineda-Krch & Lehtila 2004), cuya relación funcional pueden sobrevenir en dos escenarios: el primero, llamado parasitismo celular, donde al menos un linaje depende del otro para existir (Buss 1982, Rinkevich & Shapira 1999, Stoner *et al.* 1999, Strassmann *et al.* 2000, Velicer *et al.* 2000), y el segundo denominado



competencia intraorganismal, en que los linajes son independientes (Rinkevich & Weissman 1992, Pineda-Krch & Fagerström 1999).

No obstante lo anterior, la mayor parte de las evidencias experimentales indican que en el quimerismo, el crecimiento en tamaño causado por la fusión de individuos, es el beneficio más importante, cuyo costo intrínseco es compensado por las ventajas del tamaño, sobretodo en organismos tamaño-dependiente en los que un mayor tamaño se ve reflejado en un mayor crecimiento, reproducción y sobrevivencia. Sin embargo, este beneficio del quimerismo se pierde cuando las densidades celulares entre organismos quiméricos y no quiméricos se igualan (Foster *et al.* 2002).

En macroalgas, la coalescencia es un proceso que ha sido descrito exclusivamente en el grupo de las algas rojas (Rhodophyta), caracterizadas en su mayoría por ser clonales y presentar germinación del tipo discoïdal (Santelices 2004). Los trabajos desarrollados para identificar la coalescencia en este grupo de algas se remontan a los años 30', cuando Rosenvinge (1931) observa la fusión entre esporas de *Gigartina*. La incorporación de técnicas microscópicas con mayor poder de resolución, permitió describir el proceso en distintas especies de algas rojas, que en conjunto corresponden a la mitad de los órdenes de la subclase Florideophyceae, no necesariamente relacionados filogenéticamente (ver revisión en Santelices *et al.* 1999). Estas técnicas permitieron demostrar que el proceso ocurre mayoritariamente entre organismos de la misma especie, observándose necrosis celular en las zonas de contacto entre individuos de distintas especies (Santelices *et al.* 1999). A nivel intraespecífico, la coalescencia involucra histocompatibilidad de tejidos entre los organismos involucrados, con formación de pared externa común e incluso

formación de conexiones celulares secundarias (Santelices *et al.* 1999). Esta fusión de tejidos, ha sido descrita entre individuos en distintos estadios de desarrollo (esporas versus plántulas), y entre esporas de diferente ploidía (n-gametofitos versus 2n-esporofitos) (Santelices *et al.* 2003a, 2003b, 2004). Recientemente, monitoreos en terreno de las fusiones y el desarrollo de técnicas moleculares, con marcadores genéticos específicos, han permitido confirmar la ocurrencia de coalescencia en condiciones naturales a nivel intraespecífico, distinguiendo al interior de un individuo celularmente homogéneo porciones de tejidos genéticamente distintas (Santelices 2004).

En las algas rojas, la formación de una entidad quimérica ha sido mayoritariamente asociada a beneficios para el organismo (Santelices 2004), cuyos costos y restricciones permanecen aún en estudio (Santelices 2007, datos no publicados). Dentro de los beneficios, la mayoría de los estudios han evidenciado respuestas relacionadas al tamaño de los organismos coalescentes. De esta manera, se ha descrito que el aumento significativo en tamaño de las plántulas coalescentes versus no coalescentes, se traduce en un aumento en el crecimiento, éxito reproductivo y sobrevivencia (ver revisión Santelices 2004). En cuanto al crecimiento, los beneficios adjudicados a esta variable, se refieren a que las plántulas formadas a partir de un mayor número de esporas coalescentes generan un disco basal de mayor tamaño y mayor cantidad de estructuras (ejes erectos y ramificaciones) que aquellas originadas a partir de una o pocas esporas (Santelices *et al.* 1996, 1999). En este mismo contexto, los estudios de laboratorios indican que las algas coalescentes se reproducen más temprano que los individuos no coalescentes, sugiriendo una reproducción tamaño-dependiente más que edad-dependiente

(Santelices *et al.* 1999). Finalmente, evidencias de laboratorio indican que esporas que reclutan en grupo, coalesciendo al asentarse, muestran mayor sobrevivencia que esporas asentadas en forma solitaria (Santelices *et al.* 1996, 1999, Santelices & Aedo 2005, Santelices & Alvarado 2005). Estas ventajas le conferirían a los organismos coalescentes, probabilidades mayores de sobrevivir al pastoreo, desecación y competir por el espacio, factores claves en ambientes marinos intermareales y submareales (Santelices 2004).

Aún cuando las desventajas o costos de la formación de un organismo coalescente, permanecen en estudio en algas rojas (Santelices 2007, datos no publicados), se ha planteado que éstos podrían estar asociados a una reducción en la capacidad de dispersión de las esporas, disminución de la velocidad de crecimiento, competencia celular intraorganismal con crecimiento y formación de estructuras reproductivas de manera diferencial, y cierto grado de incompatibilidad genética entre plántulas genéticamente muy distintas (Santelices 2004).

Debido a los numerosos beneficios asociados a la coalescencia en algas rojas, su ocurrencia y frecuencia en otros grupos taxonómicos tiene gran implicancia biológica y mucho interés científico (Santelices *et al.* 2004). En este contexto, basados en los atributos ecológicos, descritos en la especie *C. dimorphum* (Chlorophyta) en Chile Central por Santelices *et al.* (1981), el supuesto de coalescencia sugerido inicialmente por Maggs & Cheney (1990), y observaciones visuales de fusión de talos en *C. dimorphum* de Chile central (González pers. observ.) y *C. setchellii* en Oregon (Trowbridge 1996), generan la necesidad de poner a prueba la ocurrencia de fusión en este grupo de algas verde, por lo cual esta tesis pretende evaluar dos hipótesis principales:

**Hipótesis 1**

Las especies del subgénero *Tylecodium* presentes en Chile, cuyos talos son capaces de fusionarse en condiciones naturales, presentan patrones similares al proceso de coalescencia descrito en algas rojas.

**Hipótesis 1a:** La fusión de talos observada en Chile central en el subgénero *Tylecodium* ocurre a nivel inter-específico.

**Hipótesis 1b:** La fusión de talos observada en *C. dimorphum* de Chile central ocurre entre individuos genéticamente distintos.

**Hipótesis 1c:** La fusión natural de talos observada en *C. dimorphum* de Chile central, es similar a la coalescencia, observándose a nivel macroscópico (visual) y microscópico (celular).

**Hipótesis 2:**

Si el proceso de fusión de talos en *C. dimorphum* ocurre en condiciones naturales, ésta tiene implicancias ecológicas (beneficios y/o costos) similares a aquellas descritas en organismos coalescentes como las algas rojas.

**Hipótesis 2a:** Si la fusión de talos ocurre en condiciones naturales, las poblaciones de *C. dimorphum* con variabilidad genética presentan un gran número de talos compuestos por más de un genotipo.

**Hipótesis 2b:** Talos compuestos por más de un genotipo, conllevan a competencia intra-organismal, interfiriendo en su respectivo crecimiento. Por lo que a un mayor número de genotipos y distancia genética entre ellos, los talos no alcanzan grandes dimensiones.

**Hipótesis 2c:** Si existe competencia intra-organismal, entonces el beneficio de la fusión de talos talla-dependiente (crecimiento y producción de estructuras reproductivas), desaparece cuando se estandarizan las dimensiones de talos fusionados versus talos no fusionados.

Basado en lo anterior, el primer objetivo general de esta tesis fue caracterizar la fusión de talos en la especie *C. dimorphum* del subgénero *Tylecodium* presente en Chile. Cuyos objetivos específicos fueron:

**Objetivo 1a:** Determinar la diversidad específica del subgénero *Tylecodium* presente en Chile, para evaluar la fusión de talos a nivel inter-específica.

**Objetivo 1b:** Determinar la diversidad genética de distintas poblaciones de *C. dimorphum*, para evaluar la fusión de talos entre individuos genéticamente distintos.

**Objetivo 1c:** Evaluar en condiciones naturales la fusión de talos en *C. dimorphum* y describirla a nivel macroscópico (visual), y microscópico (celular).

El segundo objetivo general de esta tesis fue evaluar, en condiciones naturales, la frecuencia de fusión de talos y determinar las implicancias ecológicas del proceso, expresadas como costos y/o beneficios de talos fusionados versus no fusionados. Cuyos objetivos específicos fueron:

**Objetivo 2a:** Estimar la frecuencia de fusión de talos en *C. dimorphum*, a través de la cuantificación de talos compuestos por más de un genotipo (quimeras), en poblaciones naturales caracterizadas por presentar alta diversidad genética,.

**Objetivo 2b:** Evaluar si los talos quiméricos de menor tamaño presentan un mayor número de genotipos y distancias genéticas entre ellos.

**Objetivo 3b:** Evaluar si existen beneficios (crecimiento y éxito reproductivo) en talos fusionados versus no fusionados de similares dimensiones.

Estos objetivos generales y específicos fueron desarrollados en extenso en cada capítulo. Sin embargo, basado en el contexto específico en que cada capítulo fue analizado, se hizo necesario evaluar hipótesis ad-hoc en cada uno, poniendo a prueba indirectamente las hipótesis generales y específicas anteriormente planteadas.

De esta manera, en el segundo Capítulo se determinó la diversidad de especies morfológicas, moleculares y filogenéticas del subgénero *Tylecodium* presentes en Chile (hip.1a, obj.1a). Basado en un contexto taxonómico, el propósito de este capítulo fue poner a prueba la hipótesis que el subgénero *Tylecodium* en Chile continental, se encontraría representado por al menos dos especies morfológicas, moleculares y filogenéticas.

En el Capítulo III se determinó la diversidad genética de distintas poblaciones de *Codium sp.* (ex *C. dimorphum*) (hip. 1b, obj.1b), en un contexto filogeográfico. Aún cuando el muestreo no fue elaborado con este fin, se analizaron las muestras en un contexto poblacional, cuya finalidad fue poner a prueba la hipótesis que en un amplio rango geográfico, caracterizado por una variabilidad de ambientes, la especie *Codium sp.* presentaría estructuración de poblaciones con alta divergencia genética entre las poblaciones debido a posibles barreras ecológicas, geográficas o históricas.

En el Capítulo IV, se puso a prueba la hipótesis que la fusión entre talos de *Codium sp.* (ex *C. dimorphum*) en condiciones naturales, sería similar a la coalescencia, describiéndola a nivel visual, celular y genético (hip. 1c, obj. 1c). Basado en lo anterior, este capítulo evaluó el proceso en dos escenarios: fusión al interior de un mismo talo rastrero “intra-genet” y fusión entre talos rastros diferentes “inter-genet” a través del monitoreo del crecimiento, recolonización y fusión de las células del borde. Sin embargo, debido a la carencia de conocimientos

biológicos básicos en la especie, se hizo necesario evaluar el crecimiento meristemático de los talos y células del borde en condiciones naturales, para entender si los procesos observados en la fusión (zona de contacto) son habituales. Adicionalmente, debido al desconocimiento de los eventos celulares que permiten el crecimiento celular observado en la zona de contacto, fue necesario evaluar y describir los eventos previos que permiten el cambio morfológico y funcional de las células que componen los talos, para lo cual se realizaron cultivos celulares evaluando distintas condiciones controladas (Anexo B).

Basados en los antecedentes obtenidos en los capítulos anteriores, el propósito del capítulo V fue evaluar la frecuencia y la implicancia de las fusiones en condiciones naturales. Para ello se puso a prueba experimentalmente las hipótesis y objetivos específicos 2a, 2b y 2c, estimando cuantitativa y cualitativamente las fusiones (quimerismo) en las poblaciones con mayor diversidad genética, evaluando los posibles costos asociados a su condición heterogénea, y los beneficios de la fusión entre talos de dimensiones similares.

En el Capítulo VI se discutieron las características generales de la fusión de talos y su implicancia en la ecología de *Codium*.



**REFERENCIAS**

- BORDEN CA & STEIN JR. 1969. Reproduction and early development in *Codium fragile* (Suringar) Hariot. Chlorophyceae. Phycologia 8: 91-99.
- BUSS LW. 1982. Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 5337-5341.
- COLLADO-VIDES L. 2002. Clonal architecture in marine macroalgae: ecological and evolutionary perspectives. Evol. Ecol. 15: 531-545.
- FOSTER KR, FORTUNATO A, STRASSMANN JE & QUELLER DV. 2002. The cost and benefits of being a chimera. Proc. Roy. Soc. B 269: 2357-2362.
- GROSBERG RK & STRATHMANN RR. 1998. One cell, two cell, red cell, blue cell: the persistence of a unicellular stage in multicellular life histories. Trends. Ecol. Evol. 13: 112-116.
- HARPER JL. 1985. Modules, branches and the capture of resource In Jackson JBC, Buss LW & Cook RC (eds) Population Biology and Evolution of Clonal organisms. Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut: 1-33.
- HYDAKA M, YURUGI K, SUNAGAWA S & KINZIE RA. 1997. III. Contact reactions between young colonies of the coral *Pocillopora damicornis*. Coral Reefs 16: 13-20.
- ILAN M & LOYA Y. 1990. Ontogenetic variation in sponge histocompatibility response. Biol. Bull. Marine biological laboratory woods hole. 179:279-286.
- JACKSON JBC, BUSS LW & COOK RE. 1985. Clonality: a preface. In Jackson JBC, Buss LW & Cook RC (eds) Population Biology and Evolution of Clonal organisms. Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut: IX-XI
- MAGGS CA & CHENEY DP. 1990. Competition studies of marine macroalgae in

- laboratory culture. *J. Phycol.* 26: 18-24.
- MALDONADO M. 1998. Do chimeric sponges have improved chances of survival? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 164:301-306.
- MERRIAM -WEBSTER DICTIONARY. 2006. <http://www.m-w.com>
- PINEDA-KRCH M & LEHTILA K. 2004. Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. *J. Evol. Biol.* 17: 1167-1177.
- PINEDA-KRCH, M & FAGERSTROM T. 1999. On the potential for evolutionary change in meristematic cell lineages through intraorganismal selection. *J. Evol. Biol.* 12(4): 681 – 688.
- RINKEVICH B & SHAPIRA M. 1999. Multi-partner urochordate chimeras outperform two-partner chimerical entities. *Oikos* 87: 315 -320.
- RINKEVICH B & WEISSMAN IL. 1992. Chimeras versus genetically homogeneous individuals: potential fitness cost and benefits. *Oikos* 63: 119-124.
- ROSENVINGE LK. 1931. The marine algae of Denmark, contribution to their natural history. Part IV. Rhodophyceae, IV Gigartinales, Rhodymeniales, Nemastomatales. *K Danske Vidensk. Selsk* 7 7: 499-599.
- SANTELICES B. 2004. A comparisons of ecological responses among aclonal (unitary), clonal and coalescing macroalgae *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300: 31-64.
- SANTELICES B & AEDO D. 2005. Group recruitment and early survival in *Mazzaella laminarioides*. *Hidrobiología* (en prensa)
- SANTELICES B & ALVARADO JL. 2005. Dynamic of early recruitment in the coalescing seaweed *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). Proceedings, 8<sup>th</sup> International Phycological Congress. Durban, South Africa, August 2005: 44 (4):90.

- SANTELICES B, S MONTALVA & OLIGER P. 1981. Competitive algal community organization in exposed intertidal habitats from central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6: 267-276.
- SANTELICES B, M HORMAZABAL, J CORREA & FLORES V. 2004. The fate of overgrown sporeling in coalescing Rhodophyta. *Phycologia* 43 (4): 346-352.
- SANTELICES B, D AEDO, M HORMAZABAL & FLORES V. 2003 a. Field testing of Inter- and intraspecific coalescence among mid- intertidal red algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 250: 91-103.
- SANTELICES B, J CORREA, M HORMAZABAL & FLORES V. 2003 b. Contact responses between spores and sporelings of different species, karyological phases and cystocarps of coalescing Rhodophyta. *Mar. Biol.* 143: 381-392.
- SANTELICES B, J CORREA, D AEDO, M HORMAZABAL, V FLORES & SANCHEZ P. 1999. Convergent biological processes among coalescing Rhodophyta. *J. Phycol.* 35:1127-1149.
- SANTELICES B, J CORREA, I MENESES, D AEDO & VARELA D. 1996. Sporeling coalescence and intracloonal variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 32: 313-322.
- SCOFIELD VL, JM SCHLUMPBERGER, LA WEST & WEISSMAN IL. 1982. Protochordate allorecognition in controlled by an MHC-like gene system. *Nature* 245:499-502.
- SILVA P. 1957. *Codium* in Scandinavian waters. *Svensk Botanisk Tidskrift* 51: 117-134
- SILVA P. 1955. The dichotomous species of *Codium* in Britain. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 34: 565-577

- SILVA P. 1951. The genus *Codium* in California with observations on the structure of the walls of the utricles. Univ. Calif. Pub. Bot. 25(2): 79-114
- SOMMERFELDT AD & BISHOP JD. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPDS) analysis reveals extensive natural chimerism in a marine protochordate. Mol. Ecol. 8: 885-890.
- STONER DS, RINKEVICH B & WEISSMANN IL. 1999. Heritable germ and somatic cell lineage competitions in chimeric colonial protochordates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9148-9153.
- STRASSMANN JE, ZHU Y & QUELLER DC. 2000. Altruism and social cheating in the social amoeba *Dyctiostelium discoideum*. Nature 408: 967-967.
- TROWBRIDGE C. 1996. Demography and phenology of the intertidal green alga *Codium setchellii*: the enigma of local scarcity on sand-influenced rocky shores. Mar. Biol. 127: 341-351.
- VELICER GJ, KROSS L & LENSKI RE. 2000. Developmental cheating in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. Nature 404: 598-601.

**CAPITULO II**

**DIVERSIDAD ESPECÍFICA DEL SUBGÉNERO**

***TYLECODIUM* EN CHILE**

## 2.1 INTRODUCCION

La historia de clasificación del género *Codium* comienza a fines del siglo XVIII con la identificación de caracteres morfológicos tales como apariencia del talo y ornamentaciones de los utrículos. De esta manera, Abbot Gioni de la Universidad de Papua en Italia, descubre entre muestras de animales del mar Adriático dos morfologías macroscópicas de algas, diferenciándolas en esponjosa (talo costroso) y erecta (talo erecto). El análisis de Gioni en 1792, demostró que a nivel microscópico, ambas morfologías estaban compuestas por una masa de filamentos medulares cenocíticos rodeados por una corteza de utrículos o sifones. Basado en esta estructura, Gioni describe un nuevo género, denominado *Lamarckia* en honor al botánico francés J.B. de Monet de Lamarck. Sin embargo, este hallazgo fue escasamente reconocido, ya que la publicación del nuevo género se realizó en una revista de poco interés botánico, siendo paralelamente utilizado el nombre *Lamarckia* para identificar un género de monocotiledóneas. No obstante, este nombre se mantuvo provisoriamente hasta el Congreso de Botánica de 1900 cuando se reconoce el trabajo de John Stackhouse de 1797 (*Nereis britannica*. Fasc. 2. pp. ix-xxiv + 31-70, Plates IX, 10, 11, XII. Bath: Hazard) quien, basado en la morfología de los utrículos, propone para el género el nombre de *Codium*, palabra de origen Griego (*Codeia*) que significa cabeza o pelota pequeña (Silva 2002).

Actualmente, las diferencias macroscópicas dividen al género en dos subgéneros *Schizocodium* y *Tylecodium*, cada uno con varias agrupaciones o secciones. El subgénero *Schizocodium* agrupa a los individuos erectos con ramificaciones cilíndricas, dicotómicas o politómicas, adheridos al sustrato por un disco de adhesión. Mientras que el subgénero *Tylecodium* incluye aquellas especies

esponjosas rastreras (Lucas 1935). Ambos subgéneros han sido considerados organismos clonales (Collado- Vides 2002), con un ciclo de vida monofásico diploide (Lobban & Harrison 1997). Similar a lo descrito en plantas terrestres clonales (Harper 1985, Jackson *et al.* 1985), la clonalidad en *Codium* le conferiría la capacidad de crecer y propagarse por autorreplicación de unidades genéticamente iguales, donde las unidades que son separadas desde la unidad parental (genet), pueden funcionar y sobrevivir por sí solas como una entidad independiente (ramet).

A nivel microscópico, los talos del género *Codium* están compuestos por células sifonadas multinucleadas, sin tabicaciones, que se diferencian en una porción apical o utrículo y una porción basal denominada filamento medular (Silva 1951, 1955, 1957). El utrículo, de morfología clavada a ovalada, y que dependiendo de la especie mide entre 500 a 2000  $\mu\text{m}$  de largo, es altamente pigmentado, con gran cantidad de cloroplastos (Fletcher *et al.* 1989). Contrario a lo anterior, el filamento medular es mayoritariamente despigmentado y alargado, unido al utrículo sin tabicación entre ambos, encontrándose entre uno a tres filamentos medulares por utrículo (Silva 1951, 1955, 1957, Silva & Womersley 1956, Hubbard & Garbary 2002, Chang *et al.* 2002).

En el subgénero *Tylecodium*, el talo crustoso se constituye por una capa de utrículos o corteza de los cuales se desprenden numerosos filamentos medulares que conforman una médula (Nanba *et al.* 2002) adheriéndose al sustrato (Silva 1951, 1955, 1957). Las estructuras reproductivas o gametangios emergen lateralmente desde la zona media del utrículo. Aunque de menor dimensión, la morfología es similar a la del utrículo careciendo completamente de tabicaciones internas. Esta estructura reproductiva se caracteriza por una intensa pigmentación, que

dependiendo de la tonalidad ha sido considerada como femenina o masculina (Chang *et al.* 2002). La reproducción y el ciclo de vida del subgénero se ha basado mayoritariamente en los estudios realizados en la especie *C. fragile* que pertenece al subgénero *Shizocodium*, caracterizado por un ciclo de vida sin alternancia de generación (monofásico), con la presencia de organismos díicos y en algunas oportunidades monoicos. En esta especie la reproducción puede ser sexual vía formación de gametos femeninos y masculinos de distintas dimensiones, y asexual a través de la propagación vegetativa y partenogénesis (Prince & Trowbridge 2004).

Aunque algunos caracteres morfológicos como la apariencia del talo y las ornamentaciones de los utrículos han sido adecuados para identificar entre los géneros, la determinación específica es conflictiva. Basado mayoritariamente en el concepto fenotípico de especie, se han descrito en total 162 nombres de especies, de los cuales aproximadamente un 15% pertenecen a especies del subgénero *Tylecodium* (Tabla 1). En general, las zonas geográficas que poseen mayor diversidad de especies de *Codium* son aquellas de transición localizadas entre aguas templadas y tropicales como Japón (19 especies), África del Sur (19 especies), Australia (18 especies), California y México (13 especies).

Debido a que los caracteres morfológicos cualitativos (tipos de utrículos, forma de los utrículos, forma del ápice y ornamentaciones) y cuantitativos (largo, ancho, y pared apical de utrículos, ancho del filamento medular, largo y ancho de gametangios) pueden ser extremadamente variables, incluso dentro del mismo individuo analizado (Silva 1951, 1955, 1957, 1982, Chang. *et al.* 2002, Pedroche *et al.* 2002), careciendo en muchos casos de suficiente resolución en la sistemática del género *Codium*, se han incorporado a los estudios sistemáticos del género métodos



moleculares filogenéticos, recurriendo a los conceptos moleculares y filogenético de especie.

Dentro de los estudios realizados en el género cabe destacar los trabajos relacionados con responder preguntas a nivel genérico entre *Codium* y el grupo de las clorófitas (Manhart & VonderHaar 1991). A nivel interespecífico, la primera aproximación se realizó para las especies del Pacífico Mexicano, comparando secuencias del gen mitocondrial LSUr en 19 especies erectas y 2 rastreras, logrando resolución adecuada para diferenciar las especies morfológicas a nivel molecular y filogenético (Pedroche 2001). El segundo trabajo se realizó para más de 20 especies japonesas, comparando secuencias del gen cloroplastidial rbcL, rutinariamente utilizado en plantas y algas. Los resultados del estudio permitieron distinguir las especies morfológicas del subgénero *Shizocodium*, sin embargo, en el subgénero *Tylecodium* el estudio de este gen evidenció la presencia de cinco especies moleculares y filogenéticas, morfológicamente indistinguibles (especies crípticas) (Shimada *et al.* 2004). En el tercer trabajo que intentó descifrar la taxonomía del género a nivel mundial con 72 especies (ninguna chilena), utilizando el mismo gen cloroplastidial rbcL, encontró que la diversidad morfológica de especies en el género es pobremente definida, con especies crípticas y pseudo-crípticas y que los tradicionales subgéneros erectos y rastreros (*Shizocodium* y *Tylecodium*) no son monofiléticos (Verbruggen *et al.* 2006, datos no publicados).

#### ***Diversidad del Subgénero Tylecodium en Chile***

Basado sólo en caracteres morfológicos, en el Pacífico sudamericano templado, que incluye las costas de Chile y Perú, se han descrito 6 especies pertenecientes al

subgénero *Shizocodium* y entre 7 y 8 especies del subgénero *Tylecodium* (Ramírez & Santelices 1991), presentando este último al menos 2 secciones (*Spongiosa* Setchell y *Adherentia* (J. Agardh) De Toni). La descripción de las especies y el conocimiento taxonómico del subgénero *Tylecodium* en Chile se desarrolló mayoritariamente entre 1769-1945, definido como etapa exploratoria de las primeras misiones científicas (Santelices 1980). En su mayoría estas expediciones comprendieron colectas de material desde zonas que eran consideradas detenciones claves de abastecimiento en la trayectoria de las embarcaciones, tales como el estrecho de Magallanes, y los puertos de Valparaíso y Concepción. El material colectado fue depositado en los herbarios de cada expedición, cuya identificación taxonómica fue realizada por científicos extranjeros que participaron en las expediciones o que trabajaban en los herbarios (Ramírez & Santelices 1991).

Resumiendo las características morfológicas del subgénero *Tylecodium* descritas en la literatura de la época, podríamos diferenciar dos grupos de especies para las costas de Chile continental e insular: 1) especies cuyos utrículos presentan dos morfologías (*C. dimorphum*, *C. difforme*) y 2) especies que presentan sólo una morfología de utrículos (*C. setchellii*, *C. arabicum*, *C. adhaerens*, *C. cerebriforme*, *C. spongiosum* y *C. subantarcticum*). A pesar del conocimiento de estas especies descritas, las diferencias morfológicas encontradas casi exclusivamente en las muestras tipo, y las sutiles variaciones morfométricas, tanto macroscópicas como microscópicas, han generado una dificultosa identificación taxonómica dejando en sinonimia varias especies (Guiry *et al.* 2005) o atribuyendo rutinariamente todo el material colectado a lo largo de Chile a la especie *C. dimorphum*, aún cuando las

muestras no presentan los dos tipos de utrículos sugeridos para la especie por Svedelius en 1900, característica morfológica de la cual derivó el nombre.

Basado en la literatura del grupo y en el amplio rango latitudinal que presenta Chile, el objetivo de este capítulo fue poner a prueba la hipótesis que el subgénero *Tylecodium* en Chile continental, se encontraría representado por al menos dos especies morfológicas: 1) con dos tipos de utrículos y 2) con sólo un tipo de utrículo. De ser cierta esta hipótesis, se espera además que dichas diferencias morfológicas sean concordantes con diferencias moleculares, encontrando en Chile al menos dos especies moleculares y filogenéticas.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Basados en los conceptos de especie morfológica, molecular y filogenética, el objetivo de este capítulo fue determinar la diversidad de especies del subgénero *Tylecodium* presentes en Chile, para lo cual se realizaron visitas y colectas de material en 68 localidades a lo largo de Chile continental (Tabla 2). En las localidades donde se encontraron ejemplares de *Codium* rastreros, se extrajo material comparando caracteres taxonómicos morfológicos, y moleculares con aquellos descritos en la literatura. En el caso de caracteres moleculares, se utilizaron los genes cloroplastidiales (*rbcL*) y mitocondriales (*LSUr*), utilizados para las especies de Japón y México, cuyas secuencias fueron comparadas, estimándose relaciones filogenéticas entre las especies e identificando la diversidad de especies filogenéticas en Chile.

### A) *Diversidad de especies morfológicas*

Basados en los caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados para distinguir especies (Silva 1951, 1955, 1957, 1982, Chang *et al.* 2002, Pedroche *et al.* 2002, Verbruggen *et al.* 2006), el análisis de las muestras contempló observaciones cualitativas y cuantitativas a nivel macro y microscópico. En el primer caso, en cada localidad los talos fueron fotografiados con una cámara digital Fují FinePix 5000 y examinados en el software Sigma Scan Pro Versión XX (Demo), registrando talla (largo y ancho) y morfología externa de los talos como forma del talo, textura, adherencia al sustrato y color.

A nivel microscópico, las muestras de tejidos fueron extraídas desde talos adheridos en sustratos independientes y distantes entre sí en a lo menos 50 cm., extrayendo desde el costado izquierdo de cada talo una muestra de tejido de dimensión aproximada 5 x 5 cm. Parte del material fue mantenido en fresco para su inmediato análisis morfológico, mientras que el resto del material fue secado en silica gel para su posterior análisis molecular. Un total de 13 localidades fueron utilizadas para el análisis comparativo. En el laboratorio, las muestras fueron observadas y fotografiadas bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-10A, Japan) y microscopio de campo claro (Nikon, Optiphot-2, Japan), equipados con cámara digital CoolSNAP-Procf (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), y con sistema para adquisición de imágenes digitales Image Pro® Plus 4,5. The Proven Solution™. Versión 4.1.0.0 (1993-1995 Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD, USA). Siguiendo los protocolos utilizados en *Codium* (Silva 1951, 1955, 1957, Silva & Womersley 1956, Hubbard & Garbary 2002, Chang *et al.* 2002), las observaciones incluyeron caracteres cualitativos como: tipos de utrículos, forma de los utrículos,

forma del ápice y ornamentaciones (lamelas, foveolas, etc). Las características cuantitativas incluyeron mediciones del largo, ancho, y pared apical de utrículos, ancho del filamento medular, largo y ancho de gametangios (Figura 1).

El análisis de los datos comprendió la identificación de los caracteres que mejor contribuyeron a la discriminación de morfotipos a través del análisis de componentes principales (ACP), y la comparación entre los morfotipos encontrados utilizando todos los caracteres multivariadamente en una matriz de similitud y posterior comparación en el escalamiento dimensional no métrico (NMDS) con test a posteriori (ANOSIM) para estimar la significancia estadísticas de las diferencias. Adicionalmente, con el objetivo de estimar las afinidades taxonómicas morfológicas de las variantes encontradas, éstos fueron comparados con las especies descritas para Chile a través de la similitud de los caracteres y posterior comparación en el escalamiento dimensional no métrico (NMDS) con test a posteriori (ANOSIM) para estimar la significancia estadística de las diferencias. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa *Primer E* for Windows 5.2.2.

### ***B) Diversidad de especies moleculares***

Con el objetivo de estimar la diversidad de especies moleculares del subgénero *Tylecodium* presentes en Chile, se utilizaron dos genes citoplasmáticos: cloroplastidial y mitocondrial. El gen cloroplastidial *rbcL* (~700 bp), utilizado frecuentemente en plantas, ha sido utilizado previamente para detectar variabilidad interespecífica en especies del género *Codium* en Japón (Shimada *et al.* 2004), generando una base de datos en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Mientras que el gen mitocondrial *rLSU* (~800bp) ha sido utilizado previamente para

detectar las especies de *Codium* presentes en el Pacífico Mexicano (Pedroche *et al.* 2001). Un total de 67 muestras de tejidos, secadas previamente en silica gel, fueron utilizadas para extraer el DNA genómico total como describe Wattier *et al.* (2002). Para amplificar el gen *rbcL* fueron utilizadas 67 muestras (5-6 muestras por localidad), mientras que para amplificar el gen mitocondrial se utilizaron 27 muestras (8-9 muestras por morfotipo). En ambos casos, la amplificación siguió los protocolos descritos por Shimada *et al.* (2004) y Pedroche (2001) respectivamente, en un volumen total de reacción de 15  $\mu$ l, el que contenía 0,2  $\mu$ l de cada primer (10 pmol/ $\mu$ l), 1,5  $\mu$ l de buffer 10x, 1,5  $\mu$ l de dNTP (2,5 mM), 0,9  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,35  $\mu$ l de BSA (100x), 0,15  $\mu$ l Gibco Brl Taq polimerasa (50 U) y 1  $\mu$ l DNA. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 9700. El programa de ciclos de secuenciación fue el mismo para ambos genes requiriendo de un paso inicial a 95 °C por 1 minuto, 36 ciclos de secuenciación (95 °C por 30 segundos, 52 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto), con un paso final a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue cuantificado visualmente en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidío. Finalmente el producto PCR fue purificado en QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN y secuenciado automáticamente en un secuenciador ABI PRISM® 3100 (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>), perteneciente al Laboratorio de Diversidad Molecular, Departamento de Ecología, Facultad Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Las secuencias fueron alineadas manualmente utilizando el software ProSeq v.2.91 (Filatov 2002). Para evaluar en cada morfotipo el polimorfismo de los genes amplificados y las diferencias entre ellos. Adicionalmente, estos morfotipos fueron sometidos a un análisis de similitud, obteniéndose para cada gen matrices de

similitud de pares de bases (pairwise differences) en el software Mega 2.1 (Kumar *et al.* 2001), las que se compararon en el análisis multivariado no paramétrico NMDS en el software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc. 2001, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

### **C) Diversidad de especies filogenéticas**

Basados en los principios de la Sistemática filogenética originalmente propuestos por Hennig (1968) se realizaron diversos análisis cladísticos para estimar las relaciones filogenéticas y divergencia genética de las especies y morfotipos, a través de los métodos Maximum Likelihood (ML) y Neighbor-Joining (NJ) en el programa filogenético PAUP 4.0 b10 (Swofford 2002), empleando la opción de búsqueda heurística. Para el análisis ML, se estimó previamente el mejor modelo de evolución para las secuencias estudiadas a través del programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). El nivel de confianza en cada nodo se realizó utilizando bootstrap (1000 réplicas). La polaridad de los caracteres se hipotetizó utilizando el método de comparación con el grupo externo (Maddison *et al.* 1984). Las muestras nacionales fueron contrastadas y analizadas con aquellas descritas para las costas del Pacífico Mexicano (Tabla 3a) y del Japón (Tabla 3b). Los géneros *Bryopsis* y *Chloromonas* fueron utilizados como grupos externos, sobre la base de que *Bryopsis* es considerado actualmente como grupo hermano del *Codium* (Zechman *et al.* 1990), mientras que la especie *Chloromonas sp.*, pertenece a la misma división de las Chlorophytas.

## 2.3 RESULTADOS

### A) *Diversidad de especies morfológicas*

Sólo en el 45% de las localidades visitadas a lo largo de Chile continental se encontraron representantes del subgénero *Tylecodium*. El análisis de datos morfológicos macro y microscópico reveló la presencia de tres variantes morfológicas (Tabla 4), distribuidas discontinuamente a lo largo de Chile continental (Figura 2).

La combinación de datos morfológicos (macroscópicos y microscópicos) analizados simultáneamente en el ACP sugirió que los caracteres que más contribuyeron a la identificación de tres grupos (Figura 3a) fueron los caracteres cualitativos. De esta manera, los tres primeros componentes principales (CP) que explicaron el 88,8% de la variación, estuvieron mayoritariamente influidos por la morfología del talo (CP1=0,492), los tipos de utrículos encontrados (PC2=0,438) y forma de los utrículos (PC3= 0,492). La presencia de tres agrupaciones fue corroborada por el análisis de similitud en el NMDS (Figura 3b), encontrándose diferencias significativas entre el grupo o morfotipo 1 con el morfotipo 3 ( $R= 0,534$ ).

#### i) Clave taxonómica para diferenciar morfotipos

- 1a. Talo costroso aplanado.....2
- 1b. Talo pulvinado lobulado.....morfotipo 2
- 2a. Un tipo de utrículos cilíndricos.....morfotipo 3
- 2b. Dos tipos de utrículos cilíndrico.....morfotipo 1



## ii) Descripción de Morfotipos

### *Morfotipo 1*

#### Descripción morfológica

Talo costroso aplanado, de hasta 2-6 mm de espesor, superficie lisa u ondulada, de textura firme, esponjoso, color verde oscuro (Figura 4a). La forma del talo es irregular con márgenes lisos. Las dimensiones (talla) del talo varía entre 0,2 hasta 6 m'. En este morfotipo se distinguen dos tipos de utrículos: simples (47%) y ramificados (53%), en ambos casos los utrículos presentan forma cilíndrica con ápice redondeado, sin engrosamiento en la pared apical ( $3,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ). Los utrículos simples se encuentran adheridos entre sí por filamentos medulares o septos con un largo promedio de  $617 \pm 148 \mu\text{m}$  y ancho  $120 \pm 40 \mu\text{m}$  (Figuras 4b y 4c), sin ornamentación extra como pelos, cicatrices, lamelas, entre otros (Figura 4d). Paralelamente, los utrículos ramificados (Figura 5) se caracterizan por presentar un utrículo central con dimensiones tres veces mayores que los utrículos simples ( $1188 \pm 160 \mu\text{m}$  de largo,  $160 \pm 40 \mu\text{m}$  de ancho y pared apical de  $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ) desde donde emergen hasta 4 utrículos simples (Figura 5b). La distribución de frecuencias del largo de los utrículos (Figura 6) muestra dos máximos independientes representando a los utrículos simples y ramificados.

En el 6% de los talos analizados se encontraron estructuras reproductivas con gametangios fusiformes emergiendo desde la porción media de utrículos simples, con sólo un gametangio por utrículo, de dimensiones  $290 \pm 40 \mu\text{m}$  de largo y  $70 \pm 25 \mu\text{m}$  de ancho (Figura 5d).

### Distribución Geográfica

El morfotipo fue encontrado en muestras recolectadas en las localidades de Punta Arenas (53°37'S-70°54'W), Tierra del Fuego (53°17'S-70°28'W) y Cabo de Hornos, Isla Hermite (55°50'S-67°39'W).

### Hábitat

La mayor parte del material fue encontrado buceando en el submareal somero (2-6 m) y más profundo (15-20 m), creciendo sobre rocas (saxícola) o epífito sobre grampones de *Macrocystis*.

### *Morfotipo 2*

#### Descripción morfológica

Talo postrado pulvinado de 5 a 10 mm de espesor, superficie lobulada de textura suave y esponjosa, color verde oscuro, adherido laxamente al sustrato, con bordes irregulares y muy esponjosos. Las dimensiones (talla) del talo varía entre 0,05 y 0,2 m<sup>2</sup> (Figuras 7a-7b). Dentro del morfotipo se distinguen dos tipos de utrículos simples: con el ápice engrosado (45%) y no engrosado (55%). Ambos utrículos de forma clavada con ápice truncado o recto, levemente redondeados, adheridos entre sí por filamentos medulares o septos. Los utrículos no engrosados presentan largo promedio de  $502 \pm 148 \mu\text{m}$ , ancho  $77 \pm 10 \mu\text{m}$  y pared apical de  $7,5 \pm 3,3 \mu\text{m}$  (Figura 7c), sin ornamentación extra como pelos, cicatrices, entre otros (Figura 7d). Paralelamente, los utrículos con ápice engrosado presentan dimensiones de  $632 \pm 275 \mu\text{m}$  largo,  $90 \pm 17 \mu\text{m}$  de ancho y pared apical de  $11 \pm 2,3 \mu\text{m}$  (Figura 8a-8b). Aún cuando ambos tipos de utrículos presentan similares distribuciones de frecuencia del

largo (Figura 9), los utrículos engrosados mostraron paredes apicales aproximadamente dos veces más gruesas que los utrículos no engrosados.

En el 5,8% de los talos analizados se encontraron estructuras reproductivas con gametangio fusiformes emergiendo desde la porción media de utrículos no engrosados (Figura 8c), con sólo un gametangio por utrículo de dimensiones de  $210 \pm 21 \mu\text{m}$  de largo y  $65 \pm 20 \mu\text{m}$  de ancho.

#### Distribución Geográfica

El morfotipo 2 se encontró exclusivamente en muestras provenientes de Isla Melinka, Guaitecas ( $43^{\circ}53'S$ -  $73^{\circ}44'W$ )

#### Hábitat

Los talos fueron localizados en el intermareal bajo, adheridos a rocas en zonas de grietas con baja disponibilidad luminosa.

### ***Morfotipo 3***

#### Descripción morfológica

Talo costroso aplanado de 3-5 mm de grosor, superficie lisa ondulada o ligeramente lobulada dependiendo del sustrato, brillante, de textura firme y esponjosa, color verde oscuro, adherido fuertemente al sustrato. La forma del talo es irregular con márgenes lisos a levemente lobulado (Figura 10a). Las dimensiones (talla) del talo varía desde 0,04 hasta 18 m<sup>2</sup> (Figuras 10b, 10c). Los utrículos presentan sólo una morfología (Figura 11a-11b), adheridos entre sí por el entrecruzamiento de filamentos medulares. Adicionalmente, fue posible observar utrículos en grupos, con

utrículos primarios unidos a utrículos secundarios por un pequeño septo (Figura 11b). En ambos casos la morfología de los utrículos varía desde cilíndrico a levemente clavado ( $650 \pm 56$   $\mu\text{m}$  de largo,  $100 \pm 16$   $\mu\text{m}$  de ancho), con ápices ligeramente redondeados y pared moderadamente engrosada ( $4,6 \pm 0,7$   $\mu\text{m}$ ) (Figura 11c). En el 9,2% de los casos los utrículos presentaron pelos insertos en la porción media (Figura 11d).

De 200 talos analizados provenientes de 10 localidades distribuidas equidistantemente a lo largo de Chile continental, sólo en el 7% de los casos se encontraron talos reproductivos con uno (6,5%) o dos (0,5%) gametangios por utrículo. Estos gametangios, de morfología cilíndrica o fusiforme, emergen desde aproximadamente la porción media de los utrículos, presentando dimensiones en talla de  $300 \pm 50$   $\mu\text{m}$  de largo y  $70 \pm 20$   $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 11e).

A nivel poblacional, aún cuando la variabilidad del largo de los utrículos es bastante alta, encontrándose hasta dos tallas con alta frecuencia dentro de una misma localidad, esta variabilidad no presenta un patrón latitudinal (Figura 12).

#### Distribución Geográfica

Aún cuando el análisis morfológico y molecular incluyó sólo 10 localidades de Chile continental, distribuidas equidistantemente entre Loncoyén ( $39^{\circ}48'S$ -  $73^{\circ}24'W$ ) y Paposo ( $25^{\circ}00'S$ -  $70^{\circ}27'W$ ), éste morfotipo fue encontrado en 26 de ellas, correspondiente al 38% de las localidades visitadas.

### Hábitat

La mayor parte de los talos se encontraron en el intermareal medio a submareal somero, saxícola o epífita sobre invertebrados como *Perumytilus* y *Balanus*. Ubicándose mayoritariamente en grietas, frentes sombríos, o frentes expuestos a la luz y el oleaje pero debajo de otras algas pardas como *Lessonia* y *Durvillaea*.

### **iii) Afinidad taxonómica de los Morfotipos**

Los morfotipos 1 y 2, que presentaron dos tipos de utrículos, fueron morfológicamente similares a las descripciones realizadas en la década del 1900 para muestras colectadas en la zona austral de Chile como Magallanes y Guaitecas.

En este sentido el morfotipo 1 fue morfológicamente similar a lo que Hylmö (1919, pag. 12-13) describe como *Codium difforme* (*prox.*) para muestras recolectadas en Islas Malvinas. El análisis de similitud entre los caracteres morfológicos del morfotipo 1 versus *C. difforme* (*prox.*) confirmó esta sugerencia (Figura 13), caracterizando a este grupo del resto de los morfotipos y especies, por la morfología y talla de los utrículos.

El morfotipo 2 fue morfológicamente similar a lo que Svedelius (1900 pag. 300-304) describe como *Codium dimorphum* para muestras colectadas en la Isla Melinka de las Guaitecas. En este caso, el análisis de similitud entre ambos nuevamente confirmó esta sugerencia (Figura 14), caracterizando al morfotipo 2 y *C. dimorphum* sobre la base de la morfología de los talos, morfología de los utrículos y el grosor del ápice utricular.

En el caso del morfotipo 3, caracterizado por presentar sólo un tipo de utrículos "simple" y de dimensiones variables, el análisis de similitud entre este

morfotipo con las cinco restantes especies descritas para Chile continental y una para Chile insular, no fue lo suficientemente adecuado para resolver su identificación (Figura 15). Aún cuando este análisis evidenció diferencias entre las muestras ( $R_{\text{global}} = 0,426$ ), encontrándose *C. spongiosum* ( $R=1$ ) y *C. subantarticum* ( $R=0,999$ ) espacialmente y significativamente distinto al resto de las especies y al morfotipo 3. La similitud morfológica agrupó al morfotipo 3 con las especies morfológicas *C. setchellii* recolectada en Tocopilla (Taylor 1947), *C. adhaerens* recolectada en Valparaíso (Setchell 1937), *C. arabicum* recolectada en Valparaíso (Hylmø 1938) y finalmente *C. cerebriforme* especie endémica de Isla Juan Fernández (Setchell 1937) y descrita también para las Islas San Félix y San Ambrosio (Silva & Chacana 2005)

#### ***B) Diversidad de especies moleculares***

Similar a lo anteriormente descrito a nivel morfológico, el análisis molecular del gen cloroplastidial y mitocondrial, discriminó la presencia de 3 grupos genéticamente distintos (Figura 16 a y b), correspondientes a los morfotipos 1, 2 y 3 anteriormente descritos, encontrándose en ambos genes los morfotipos disímiles, distribuidos espacial y significativamente alejados entre sí (gen cloroplastidial  $R=0,98$  y gen mitocondrial  $R=0,99$ )

El alineamiento de las 67 secuencias del gen cloroplastidial, requirió de la inserción de sólo 2 gaps. Adicionalmente, el análisis de las secuencias de los morfotipos, mostró que de 552 bp la variabilidad del gen dentro de cada morfotipo expresada como el número de sitios polimórficos osciló entre un 0,1 - 0,38%, siendo el morfotipo 3 el que presentó mayor variabilidad genética intraespecífica. De igual manera, el alineamiento de las 27 secuencias del gen mitocondrial requirió de la

inserción de gaps. Sin embargo, esta inserción osciló entre los 3 y 10 gaps, aumentando la gran variabilidad de sitios polimórficos encontradas dentro de cada morfotipo, especialmente en el morfotipo 1 con un 18,9% de sitios polimórficos.

### *C) Diversidad de especies filogenéticas*

Los análisis filogenéticos de los genes cloroplastidiales (*rbcL*) y mitocondriales (*LSUr*) mostraron el mismo patrón topológico, reconociendo los morfotipos como entidades genéticamente distintas, agrupados en clados o subclados diferentes. Dentro de cada morfotipo la divergencia genética intraespecífica osciló entre 0-0,38 en el gen cloroplastidial y 0 y 4% en el gen mitocondrial. A nivel interespecífico el morfotipo 1 versus el morfotipo 2 tuvo divergencias genéticas entre 8,6% en el gen cloroplastidial y 70 y 72% en el gen mitocondrial. El morfotipo 1 versus morfotipo 3 tuvo divergencias genéticas entre 8,23% en el gen cloroplastidial y 70 y 72% en el gen mitocondrial. Mientras que el morfotipo 2 versus morfotipo 3 tuvo divergencias genéticas entre 8,6-9% en el gen cloroplastidial y 10 y 12% en el gen mitocondrial

En el gen cloroplastidial *rbcL* (~700bp) el alineamiento de 120 secuencias provenientes de Chile, México y Japón, permitió el análisis de 522 bp con un 50% de mutaciones y 32,4% de sitios polimórficos compuesto por un 23,4% de sitios no parsimoniosos y sólo un 9% de sitios parsimoniosos. La selección del mejor modelo de evolución para las secuencias seleccionado por AIC en el software Modeltest 3.7 resultó ser (TVM+I+G) con los siguientes parámetros: frecuencia de bases A=0.31002, C=0.14109, G=0.21417, T=0.33472; proporción de sitios invariables =0.4635; parámetro de forma gamma=0.2845. El árbol Maximum Likelihood

inferido desde los parámetros anteriormente descritos (Figura 17a y 17b) y el árbol inferido con el método neighbor joining (árbol no mostrado) mostraron exactamente la misma topología. En este contexto fue posible distinguir cuatro grandes clados, dos de los cuales fueron clados mixtos compuestos por especies rastreras y erectas (Clados 2 y 3), y dos clados compuestos exclusivamente por especies rastreras (Clados 1 y 4). Las secuencias representantes del morfotipo 1, caracterizados morfológicamente por talos rastreros se localizaron dentro de un clado mixto, significativamente consistente, junto con las especies erectas *C. fragile*, *C. yezoensis*, *C. inerme* y *C. cylindricum* (Figura 17b). Paralelamente, las secuencias de los morfotipos 2 y 3 se localizaron dentro de un clado exclusivamente rastrero, pero en subclados independientes. De esta manera, el morfotipo 2 se observó filogenéticamente cercano a la especie *C. setchellii* (4,4-4,8% divergencia), proveniente de California, USA, identificada morfológicamente por Pedroche (2001) y molecularmente en este estudio. Por otra parte, el morfotipo 3 se localizó filogenéticamente cercano a las especies *C. arabicum*, *C. capitulatum*, *C. hubbsii*, *C. lucasi*, *C. spongiosum* y *C. picturarum* identificadas morfológicamente por Shimada *et al.* (2004) y Pedroche (2001). Cabe destacar que *C. dimorphum* (Jp) descrito molecularmente por Shimada *et al.* (2004) se localizó en un clado mixto y completamente distinto a todos los morfotipos encontrados en Chile, siendo significativamente distinto, con divergencia genética interespecífica entre 7,6-9,5% con el morfotipo 2, asociado morfológicamente con esta especie.

En el gen mitocondrial LSUr (~800bp) el alineamiento de 43 secuencias provenientes de Chile y México, requirió la inserción de 17 gaps permitiendo el análisis de 605 bp con un alto porcentaje de mutaciones (96,4%) y 78,8% de sitios



polimórficos compuesto por un 2,64% de sitios no parsimoniosos y un 76,2% de sitios parsimoniosos. La selección del mejor modelo de evolución para las secuencias seleccionado por AIC en el software Modeltest 3.7 resultó ser (HKY+G) con los siguientes parámetros: frecuencia de bases A=0.30967, C=0.19116, G=0.23963, T=0.25954; proporción de sitios invariables = 0.6115; parámetro de forma gamma=0. En este caso, el árbol Maximum Likelihood inferido desde los parámetros anteriormente descritos (Figura no mostrada) y el árbol inferido con el método neighbor joining (Figura 18) presentaron topologías distintas, siendo el primero un árbol tipo estrella con politomía basal. Contrariamente, en el árbol de neighbor-joining fue posible observar cuatro clados (uno erecto y tres rastreros) con robustez de nodos o bootstrap del 80%, con la especie *C. setchellii* como especie ancestral. Similar a lo descrito en el gen cloroplastidial, cada morfotipo se ubicó en clados rastreros distintos, encontrándose sólo el morfotipo 3 relacionado filogenéticamente con la especie rastrera *C. picturatum* (3-4% de divergencia). En este caso el clado erecto estuvo compuesto por las especies *C. conjunctum*, *C. macdougallii*, *C. isabellae*, *C. giraffa*, *C. fragile*, *C. amplivesciculatum*, *C. decorticatum*, y *C. longiramosum*.

#### 2.4 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

La combinación de caracteres morfológicos y moleculares confirmaría nuestra hipótesis inicial que sugiere la existencia de tres morfotipos o especies pertenecientes al subgénero *Tylecodium* y que son morfológica, molecular y filogenéticamente distintos.

A nivel morfológico, nuestros resultados indican que caracteres cualitativos como morfología del talo, tipos de utrículos y morfología de los utrículos fueron los

que contribuyeron mayoritariamente a esta diferenciación. Mientras que molecularmente, los genes cloroplastidiales y mitocondriales fueron adecuados para diferenciar molecularmente a los morfotipos no monofiléticos. Sin embargo, debido a la gran cantidad de mutaciones observadas en el gen mitocondrial éste no permitió resolución filogenética.

El morfotipo 1, distribuido en el Pacífico Austral desde Punta Arenas hasta el Cabo de Hornos e identificado como *C. difforme* (*prox.*) Kützing, presenta problemas nomenclaturales y por ello el apelativo (*prox.*).

Morfológicamente, el morfotipo 1 es similar a lo que Hariot (1889), Hylmo (1919) y Levring (1960) identificaran como *C. difforme* para muestras recolectadas en la zona chilena de Tierra del Fuego y el Estrecho de Magallanes. Sin embargo, actualmente el nombre *C. difforme* Kützing es considerado un homónimo tardío de *C. effesum* (Rafinesque) Delle Chiaje. Este cambio se debió a que las muestras identificadas como *C. difforme* provenientes de la localidad tipo en di Napoli, Italy (Kützing 1843) son similares (Silva, Basson & Moe 1996) a lo que previamente Delle Chiaje describió como *C. effesum* para muestras de Sicilia, Italia (Guiry *et al.* 2005). Esta especie vive en aguas cálidas del mediterráneo y de la costa atlántica francesa (Guiry *et al.* 2005). En este contexto, la morfología y distribución de *C. effesum* (Rafinesque) Delle Chiaje no corresponden al material encontrado en la zona pacífica y atlántica austral.

Basado en la morfología, Hylmø (1919) ya advierte que existen diferencias entre lo que Kützing (1843) bautizara con el nombre de *C. difforme* (actualmente *C. effesum*) y las muestras identificadas como *C. difforme* recolectadas en el Cabo de Hornos (Hylmø 1919) e Islas Malvinas (Hariot 1889, Cotton 1915). Posteriormente,

Borazo & Piriz (1975) revisando los *Codium* de la zona Atlántica austral, corroboraron lo que morfológicamente Hariot (1889), Reinbold (1908), Cottori (1915), Hylmø (1919, 1938), Schmidt (1923), Taylor (1939), y Skottsberg (1941), identificaran como *C. difforme* para la zona de Tierra del Fuego argentina e Islas Malvinas. Adicionalmente, Borazo & Piriz (1975) extendieron el rango de distribución de la especie en el Atlántico, indicando que el límite norte de la especie correspondería a la localidad de Santa Cruz (50°12'.37S-68°20'.30W), encontrándose hasta Isla de los Estados (54°47'.43S-64°34'.37°W) por el sureste Atlántico argentino, e incluyendo las Islas Malvinas (52°25'.56S-59°35'.22W).

Basado en lo anterior, Silva (1969) cambió el nombre a la especie conocida como *C. difforme* en la zona Austral (Islas Malvinas), nominándola *C antarcticum* Silva sp. ined. En dicho trabajo, Silva (1969) no realizó la descripción en latín, como lo requiere el código de nomenclatura, y sólo presentó una fotografía del hábito. Posteriormente, este nombre fue reemplazado por *C. subantarcticum* Silva sp. ined, al reconocer Silva la ausencia de representantes de *Codium* en el continente antártico (Silva 2005 pers. conv.). En 1987, Ricker examinó materiales de las Islas Macquarie y los identificó como *C. subantarcticum* Silva sp. ined, Sin embargo, este nombre como *nomen nudum* porque no existe una descripción de la especie acorde a los requisitos impuestos por el código de nomenclatura para su validación. Ambos nombres *C. antarcticum* y *C. subantarcticum* serían inéditos y no válidos nomenclaturalmente. Por otro lado, Ricker (1987) reconoce a la especie *C. difforme* kutzing como una especie morfológicamente distinta. En este contexto, la descripción de *C. subantarcticum* dada por Ricker (1987) no concuerda con lo que en este trabajo se identifica como morfotipo I o *C. difforme (prox.)*, ya que *C.*

*subantarcticum* presentaría morfología del talo cerebriformes y sólo una morfología de utrículos.

Alternativamente, Ardissone (1888) identifica como *C. spongiosum* Harvey las muestras de Tierra del Fuego. Sin embargo, similar a lo anterior, la morfología del talo cerebriformes, la presencia de sólo una morfología de utrículos y ornamentación de utrículos extras como lamelas en *C. spongiosum* Harvey (Silva & Womersley 1956), no concuerda con lo que se identifica como morfotipo 1 o *C. difforme* (*prox.*). Adicionalmente, nuestro estudio molecular y filogenético, basado en el gen cloroplastidial, sugiere que la especie *C. spongiosum* Harvey, identificada por Shimada (2004) en muestras japonesas, no corresponde al morfotipo 1 o *C. difforme* (*prox.*).

En este contexto, los antecedentes de este trabajo sugieren que el morfotipo 1 o *C. difforme* (*prox.*), es probablemente una especie morfológica, molecular, filogenética y geográficamente distinta a *C. effesum* (Rafinesque) Delle Chiaje, *C. subantarcticum* Silva sp. ined, y *C. spongiosum* Harvey, requiriendo de un nombre nuevo y descripción acorde con el código de nomenclatura. Su distribución se extendería por el norte desde Punta Arenas (Pacífico) y Santa Cruz (Atlántico), hasta la zona más austral donde se juntan ambos océanos y se ubican numerosas Islas como Cabo de Hornos (Isla Hermite), Isla de los Estados e Islas Malvinas.

El morfotipo 2 relacionado morfológicamente con *C. dimorphum*, especie nominada por Svedelius (1900) para muestras provenientes de la localidad Melinka, Islas Guaitecas, Chile, y encontrada en nuestro estudio solamente en dicha localidad, ha sido anteriormente descrita para Tasmania, Nueva Zelanda e Islas Chatham (Silva & Womersley 1956). Estos antecedentes sugieren que la especie *C. dimorphum*,

caracterizado por la presencia de dos tipos de utrículos (simple y engrosado), presentaría una distribución circumpolar subantártica.

Sin embargo, actualmente el nombre *C. dimorphum* se encuentra dudoso utilizado como una sinonimia de *C. setchellii* (Guiry *et al.* 2005). Según Silva (pers. conv.) este cambio se debió a que aunque las muestras tipo de *C. dimorphum* presentan los dos tipos de utrículos registrados por Svedelius (1900), de la cual derivó su nombre “*dimorphum*”, el resto de las muestras provenientes de otras localidades de Chile carecen de este carácter por lo que se consideró que *C. dimorphum* era probablemente una mala identificación, correspondiendo a *C. setchellii*, especie que presenta tallas de utrículos similares pero solo una morfología utricular. Contrariamente, nuestros resultados morfológicos y moleculares sugieren que la especie morfológica *C. dimorphum* realmente existe, restringida a las Isla Melinka de las Guaitecas. Morfológicamente, este morfotipo es concordante con la morfología utricular descrita por Svedelius con utrículos simples y engrosados. Más aún, a pesar que las relaciones filogenéticas basadas en el gen cloroplastidial la ubican cercana a la especie *C. setchellii*, los estudios con los otros genes indican que esta especie presenta una alta divergencia genética con las otras especies. La lejanía filogenética del morfotipo 2 con la especie *C. dimorphum* proveniente del Japón, sugiere que, aún cuando Shimada *et al.* (2004) identificó las muestras japonesas como *C. dimorphum*, no encontró las características morfológicas distintivas de la especie, pudiendo ser una mala identificación del material colectado. Estos resultados concuerdan con los análisis filogenéticos realizados por Verbruggen *et al.* (2006, datos no publicados), quienes demostraron que *C. dimorphum* presente en Nueva Zelanda se relaciona filogenéticamente con *C. setchellii*, mientras que *C.*

*dimorphum* presente en Japón aparece como una especie distinta localizada incluso en clados distintos.

En este contexto, siguiendo las descripciones realizadas por Svedelius (1900) el nombre *C. dimorphum* debiera mantenerse, con dos tipos de utrículos como lo indica su nombre "dimorphum" y morfológicamente distinta a lo que actualmente se reconoce como *C. setchellii*. Al mismo tiempo, debiera rectificarse el mal uso del nombre *C. dimorphum* en Chile, impuesto indiscriminadamente a todo el material de *Codium* rastrero encontrado a lo largo de Chile entre Iquique y Puerto Montt (Etcheverry 1960, Navas 1966, Alveal 1970, Romo & Alveal 1977, Santelices *et al.* 1977, Santelices & Abbot 1978, Collantes & Etcheverry 1980, Ramírez & Santelices 1981, Westermeier 1981, Santelices & Vera 1984).

Respecto al morfotipo 3, nuestros resultados morfológicos y moleculares sugieren que la identificación taxonómica del morfotipo, presente a lo largo de Chile desde Paposo a Loncoyén y caracterizado por sólo un tipo de utrículos, es aún incierta.

Morfológicamente, *C. subantarcticum*, *C. spongiosum* y *C. cerebriforme* difieren del morfotipo 3 en caracteres cualitativos y cuantitativos de importancia taxonómica, como la morfología cerebriforme del talo, las dimensiones de los utrículos (1,5 a 2 veces mayores) y las ornamentaciones o lamelas de los utrículos.

Basado en lo anterior, el morfotipo 3 podría corresponder a las especies descritas en Chile continental como *C. setchellii* Gardner, *C. arabicum* Kützing, y/o *C. adhaerens* Harvey & Bailey. Sin embargo, según Silva (pers. conv.) *C. setchellii* registrada en la zona del norte de Chile (Tocopilla, Tarapacá) por Schmitt en 1926 e identificada por Taylor (1960), *C. arabicum* Kützing, registrada en muestras de

Valparaíso por Skottsberg en la expedición Patagonia (Hylmø 1938) y *C. adhaerens* Harvey & Bailey descrita por Setchell (1937) para muestras de Valparaíso, todas parecen constituir una mala identificación de estas especies.

En un contexto global, morfológicamente la especie *Codium setchellii* fue descrita originalmente para las costas de California (USA), distribuida actualmente a lo largo del Océano Pacífico. *C. arabicum* también es una especie reconocida, descrita originalmente para la península de Sinaí, Egipto, presentando actualmente una amplia distribución (Mar Rojo, Océano Índico, África del Este, India subcontinental, Asia, Islas Pacíficas), mientras que *C. adhaerens* es reconocida como sinonimia de la especie *C. arabicum* (Guiry *et al.* 2005). Filogenéticamente, el morfotipo 3 no se relacionó con *C. setchellii*, y su relación con *C. arabicum*, *C. spongiosum*, *C. capitulatum*, *C. hubssii*, *C. lucasii* y *C. picturatum*, no fue resuelta observándose una politomía. Basado en lo anterior, nuestros resultados sugieren que el morfotipo 3 es una especie morfológica, molecular y filogenéticamente distinta al resto de los morfotipos o especies encontradas en Chile, y probablemente constituye una nueva especie para la ciencia, la que hasta el momento ha pasado desapercibida en numerosos trabajos bajo el nombre de *C. dimorphum*.

Así, este estudio es el primero en describir y caracterizar la presencia de tres especies morfológicas, moleculares y filogenéticas distribuidas discontinuamente a lo largo de Chile continental, dentro de las cuales los morfotipos 1 y 3 constituirían nuevas especies para la ciencia. Estos resultados generan las bases para estudios posteriores en dichos organismos, tales como la reevaluación de la nomenclatura del grupo a nivel mundial, describiendo adecuadamente las nuevas especies y reincorporando el nombre *C. dimorphum* como especie actualmente reconocida.

Dentro de estas modificaciones a la taxonomía del género, la primera será cambiar las hipótesis inicialmente planeadas para la especie *C. dimorphum*, las que serán desarrolladas en el morfotipo 3 o *Codium sp.*, ya que corresponde a la especie cuya respuesta ecológica estudió Santelices *et al.* (1981) y que posteriormente fue sugerida como posible especie coalescente por Maggs & Cheney (1990).

## 2.5 REFERENCIAS

- ALVEAL K 1970. Estudios Fícoecológicos en la región costera de Valparaíso. Rev. Biol. Mar. 14 (1): 7-88.
- ARDISSONE F. 1888. Le alghe della Terre del Fuoco raccolte dal prof Spegazzini. Reale Istituto Lombardo Science e Lettere Rendiconti, ser 2, 21: 208-215
- BORAZO A & PIRIZ ML. 1975. Las especies del genero *Codium* (Chlorophycophyta) en la costa argentina. Physis. 34 (89): 245-256
- COLLADO-VIDES L. 2002. Clonal architecture in marine macroalgae: ecological and evolutionary perspectives. Evol. Ecol. 15: 531-545.
- COLLANTES G & ETCHEVERRY H. 1980. Algas Bentónicas (Cyanophyta-Chlorophyta-Phaeophyta-Rhodophyta), epífitas en algas de Chile Central. Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso 13: 9-17.
- COTTON AD. 1915. Cryptogams from Falkland Island collected by Mrs. Vallentin. J. Linn. Soc. Bot. 43: 137-231.
- CHANG J, CHANG- FENG D & J CHANG. 2002. A taxonomic and karyological study of the *Codium geppiorum* complex (Chlorophyta) in southern Taiwan, including the description of *Codium nanwanense* sp. Nov. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 161-170.



- ETCHEVERRY H. 1960. Algas marinas de las Islas Oceánicas Chilenas. Rev. Biol. Mar. 10: 83-132.
- FILATOV D.A. 2002. ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. Mol. Ecol. Notes 2: 621-624. Disponible online en <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/filatov/proseq.html>.
- FLETCHER RL, BLUNDEN G, SMITH BE, ROGERS DJ & FISH BC. 1989. Occurrence of a fouling, juvenile stage of *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* (Goor) Silva (Chlorophyceae, Codiales). J. Appl. Phycol. 1: 227-237.
- GUIRY M.D., RINDI F. AND GUIRY G.M. 2005. *AlgaeBase version 4.0*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 07 November 2005.
- HARIOT P. 1889. Algues. Mission Scientifique du Cap Horn, 1882-1883, vol 5: 1-109, pls 1-9 Botanique, Paris.
- HARPER JL. 1985. Modules, branches and the capture of resource. In Jackson JBC, Buss LW & Cook RC (eds) Population Biology and Evolution of Clonal organisms. Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut: 1-33.
- HENNIG W. 1968. Elementos de una sistemática filogenética. Eudeba. Bs. As. 353 pp.
- HUBBARD CB & DJ GARBARY. 2002. Morphological variation of *Codium fragile* (Chlorophyta) in Eastern Canada. Bot. Mar. 45: 476-485.
- HYLMÖ DE. 1919. Zur Kenntnis der subartarktischen und antarktischen Meeresalgen 3. Chlorophyceae. Wiss. Erg. Schwed. Südpolarexp. 1901-1903. 4:20 pp, 33 fig. Stockholm.

- HYLMO DE. 1938. Botanische Ergebnisse der Schwedischen Expedition nach Patagonien und dem Feuerlande 1907-1909. XI Meeresalgen 3. Chlorophyceae. Kongliga Sveskabers Vetenskabs Akademiens Handlingar ser 3, 17 (1): 1-23, 5 figs.
- JACKSON JBC, BUSS LW & COOK RE. 1985. Clonality: a preface. In Jackson JBC, Buss LW & Cook RC (eds) Population Biology and Evolution of Clonal organisms. Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut: ix-xi
- KUMAR S, TAMURA K, JACOBSEN IB & NEI M. 2001. Molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona State University, Tempe, USA.
- KUTZING FT. 1843. Phycologia generalis: 459 pp, 66t. Leipzig
- LEVRING T. 1960. Contribution to the Algal Flora of Chile. Lunds Universitets Arsskrift Ny Foljd, Avd 2, 56 (10): 1-84.
- LOBBAN CS & HARRISON PJ. 1997. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- LUCAS AHS. 1935. Marine Algae of Lord Have Island. Proc. Linn Soc. NSW 60: 194-232.
- MADDISON WP, MJ DONOHUE & MADDISON DR. 1984. Outgroup analysis and parsimony. Syst. Zool. 33(1): 83-103.
- MAGGS CA & CHENEY DP. 1990. Competition studies of marine macroalgae in laboratory culture. J. Phycol 26: 18-24.
- MANHART JR & VONDERHAAR RA. 1991. Intron revealed by nucleotide sequence of large subunit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Codium fragile* (Chlorophyta): phylogenetic analysis. J. Phycol. 27: 613-617.

- NANBA N, KADO R, OGAWA H & KOMURO Y. 2002 Formation and growth of filamentous thalli from isolated utricles with medullary filaments of *Codium fragile* spongy thalli. *Aquatic Botany* 73: 255-264.
- NAVAS ME. 1966. Algas marinas de la Bahía de Quintero. *Revista Universitaria* (1965-1966): 95-120, 10 pls.
- PEDROCHE F. 2001. Estudios filogenético en el género *Codium* en el Pacífico Mexicano, uso del rDNA mitocondrial. *An. Esc. Nac. Cienc. Boil.mex.* 47 (1): 109-123.
- PEDROCHE FP, SILVA P & CHACANA M. 2002. El género *Codium* (Codiaceae, Chlorophyta) en el Pacífico de México. En Sentís & Dreckmann (eds). *Monografías Ficológicas 2002*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Mexico DF: 11-74.
- POSADA D AND CRANDALL KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818. Disponible online en <http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>
- PRINCE JS & TROWBRIDGE CD. 2004. Reproduction in the green macroalga *Codium* (Chlorophyta) characterization of gametes. *Bot. Mar*: 47(6): 451-460.
- RAMIREZ M & SANTELICES B. 1991. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. *Monografías Biológicas*, P Univer. Cat. Chile, Santiago, Chile. 437 pp.
- REINBOLD T. 1908. Die Meeresalgen der deutschen Südpolar Expedition (1901-1903). En: E. von Drygalski, *Deutsche Südpolar Exped. 1901-1903*. *Botanik* 8: 177-202.

- RICKER RW. 1987. Taxonomy and biogeography of Macquaire Islands Seaweeds: British Museum (Natural History). London. 339 pp.
- ROMO H. & ALVEAL K. 1977. Las comunidades del litoral rocoso de Punta Ventanilla, Bahía de Quintero-Chile, Gayana, Miscelánea 6: 41 pp.
- SANTELICES B. 1980. Phytogeographic characterization of the temperate coast of Pacific South America. Phycologia 19:1-12.
- SANTELICES B & VERA ME. 1984. Variación estacional de las floras marinas en Caleta Horcón, Chile Central. Phycologia Latinoamericana 2: 83-101.
- SANTELICES B & ABBOTT I. 1978. New records of marine algae from Chile and their effect of phytogeography. Phycology 17 (2): 213-222.
- SANTELICES B, S MONTALVA & OLIGER P. 1981. Competitive algal community organization in exposed intertidal habitats from central Chile. Mar. Ecol. Prog. Ser. 6: 267-276.
- SANTELICES B, J CANCINO, S MONTALVA, R. PINTO & GONZALEZ E. 1977. Estudios ecológicos de la zona costera afectada por contaminación del "Northern Breeze".II. Comunidades de playas de roca. Medio Ambiente 2 (2): 65-83. Chile.
- SCOTTBERGER C. 1941. Communities of marine algae in Subantarctic and Antarctic waters. Kungl. Svensk. Vetensk. Akad. Handl. 19 (4): 1-92. Stockholm.
- SCHMIDT OC. 1923. Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Codium* Stack. Bibl. Bot. 23 (91): 68pp, 44 fig.

- SETCHELL WA. 1937. The *Codiums* of the Juan Fernandez Island. En: C Skottsberg (ed) The Natural History of Juan Fernandez and Eastern Island 2: 587-600, pls 34-48 Uppsala
- SHIMADA S, M HIRAOKA, A SERISAWA & HORIGUCHI T. 2004. Phylogenetic studies in the genus *Codium* (Chlorophyta) from Japan. Jpn. J. Phycol. (Suppl.)137-141.
- SILVA P. 2002. A journey through *Codium* after forty years. IX<sup>th</sup> Workshop on Taxonomy of Economic Seaweeds. University of Hawaii at Hilo. Mayo 22-29.
- SILVA P. 1982. Chlorophycean. In Parker SP (ed.). Synopsis and classification of living organisms. McGraw-Hill. New York. 1: 133-161.
- SILVA P. 1969. In Zaneveld JS (ed). Iconography of Antarctic and sub-antarctic benthic marine algae. Part 1: Chlorophycophyta and Chrysophycota. pl cvii. 3301. Lehre Verlag von J. Cramer, Germany.
- SILVA P. 1957. *Codium* in Scandinavian waters. Svensk Botanisk Tidskrift 51: 117-134
- SILVA P. 1955. The dichotomous species of *Codium* in Britain. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 34: 565-577
- SILVA P. 1951. The genus *Codium* in California with observations on the structure of the walls of the utricles. Univer. Calif. Pub. Bot. 25(2): 79-114
- SILVA P & CHACANA ME. 2005. Marine algae from Islas San Félix y San Ambrosio (Chilean Oceanic Islands). Cryptogam. Algol. 26(1): 103-118.
- SILVA P & HBS WOMERSLEY. 1956. The genus *Codium* (Chlorophyta) in Southern Australia. Austr. J. Bot. 4: 261-289.

- SILVA PC, BASSON PW & MOE RL. 1996. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. Univ. Calif. Publ. Bot. 79: xiv + 1259 pp
- STACKHOUSE J. 1797. Nereis Britannica, Fascicle 2, pp. ix-xxiv +31-70 pls ix-xii. Bathonia (Bath).
- SVEDELIUS N. 1900. Algen aus den Landern der Magellansstrasse und WestPatagonien I. Chlorophyceae. En: O Nordensjold (ed) Wissenschaftliche Ergebnisse der Schwedischen Expedition nach den Magellanslandern (1895-1897) 3: 283-316. Stockholm
- SWOFFORD DL 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), 4.0 beta. Sunderland, Ma: Sinauer Associates
- TAYLOR WR. 1939. Algae collected by the "Hassler", "Albatross" Uruguay, Argentina, the Falkland Island, and the Strait of Magellan. Papers of the Michigan Academy of Science Arts and Letters 24: 127-164, pls 1-7.
- TAYLOR WR. 1947. Algae collected by the "Hassler", "Albatross" and Schmitt Expeditions. II. Marine algae from Peru and Chile. Papers of the Michigan Academy of Sciences, Arts and Letters 1: 57-90.
- TAYLOR WR. 1960. Marine algae of the Eastern Tropical and subtropical coasts of the Americas. Xi + 870 pp, 80 pls, 14 figs. Ann Arbor: University of Michigan Press.
- VERBRUGGEN H, LELIAERT F, MAGGS CA, SHIMADA S, SCHILS T, PROVAN J, BOOTH D, MURPHY S, DE CLERCK O, COPPEJANS E, LITTLER DS & LITTLER MM. 2006. Species boundaries and phylogenetic relationships within the green algal genus *Codium* (Bryopsidales) based on

plastid DNA sequences. (datos no publicados)

<http://users.ugent.be/~hvrbrugg/codium/phylogenetics/>

WATTIER RA, PRODOHOL P & MAGGS C. 2002. Dna Isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:275-281.

WESTERMEIER R. 1981. The marine seaweed of Chile's tenth region (Valdivia, Osorno, Llanquihue, and Chiloé). *Proceedings International Seaweed Symposium*. T. Levring (ed.) 10: 215-220.

ZECHMAN EW, THERIOT EC, ZIMMER EA & CHAPMAN RL. 1990. Phylogeny of the Ulvophyceae (Chlorophyta): cladistic analysis of nuclear-encoded rRNA sequence data. *J. Phycol.* 26: 700-710

<b>Sección adhaerentia (J Agardh) De Toni</b>
<i>Codium adhaerens</i> C. Agardh (S)
<i>Codium adhaerens</i> var. <i>convolutum</i> Dellow (S)
<i>Codium adhaerens</i> var. <i>incrassatum</i> Dellow (S)
<i>Codium antarcticum</i> P.C. Silva (S)
<i>Codium arabicum</i> Kützting (C)
<i>Codium capitatum</i> P.C. Silva (C)
<i>Codium capitatum</i> P.C. Silva & Womersley (C)
<i>Codium convolutum</i> (Dellow) P.C. Silva (C)
<i>Codium coralloides</i> (Kützting) P.C. Silva (C)
<i>Codium dimorphum</i> Svedelius (S)
<i>Codium difforme</i> Kützting (S)
<i>Codium effusum</i> (Rafinesque) Delle Chiaje (C)
<i>Codium hubbsii</i> E. Y. Dawson (C)
<i>Codium intertextum</i> F.S. Collins & Hervey (C)
<i>Codium lucasii</i> Setchell (C)
<i>Codium lucasii</i> subsp. <i>capense</i> P.C. Silva (C)
<i>Codium setchellii</i> N.L. Gardner (C)
<i>Codium stephensiae</i> Dickinson (C)
<i>Codium picturatum</i> F.F. Pedroche & P.C. Silva (C)
<b>Sección Spongiosa Setchell</b>
<i>Codium spongiosum</i> Harvey (C)
<i>Codium spongiosum</i> var. <i>mauritanum</i> Bergesen (S)
<b>Sección Bursae (J Agardh) De Toni</b>
<i>Codium bursa</i> (Linnaeus) C. Agardh (C)
<i>Codium bursa</i> var. <i>australis</i> Sonder (S)
<i>Codium cranwelliae</i> Setchell (C)
<i>Codium mamillosum</i> Harvey (C)
<i>Codium mamillosum</i> var. <i>capense</i> O. Schmidt (S)
<i>Codium mamillosum</i> var. <i>typicum</i> O.C. Schmidt (S)
<i>Codium megalophysum</i> P.C. Silva (C)
<i>Codium minus</i> (Schmidt) P.C. Silva (C)
<i>Codium ovale</i> Zanardini (C)
<i>Codium papenfussii</i> P.C. Silva (C)
<i>Codium perrinae</i> Lucas (C)
<i>Codium saccatum</i> Okamura (C)
<b>Incertae Cedis</b>
<i>Codium cerebriforme</i> Setchell (C)
<i>Codium subantarcticum</i> P.C. Silva, sp. ined. (C)
<i>Codium antarcticum</i> P.C. Silva (S)

Tabla 1. Listado de especies del subgénero *Tylecodium* y autorías a nivel mundial

Nombres: (C) indica nombres actuales, (S) indica sinonimia del estatus taxonómico

GUIRY M.D., RINDI F. AND GUIRY G.M. 2005. *AlgaeBase version 4.0*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [http:// www.algaebase.org](http://www.algaebase.org); searched on 07 November 2005.

RAMÍREZ M & SANTELICES B. 1991. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. Monografías Biológicas, P Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 437 pp.



N°	SITIO	Latitud	Lat	Long
1	Golf	20	20°20.31	70°09.25
2	Punta Gruesa	20	20°21.86	70°10.92
3	Palo de Buque	20	20°23.29	70°10.34
4	Seremeño	20	20°29.08	70°09.67
5	Quinteros	20	20°36.56	70°11.91
6	Chanabayta	20	20°43.06	70°11.80
7	Pta Patache	20	20°48.81	70°12.21
8	Playa La Cuchara	21	21°53.49	70°10.21
9	Tocopilla	22	22°05.04	70°11.49
10	Cobija	22	22°43.16	70°17.01
11	Caleta Buena	22	22°26.19	70°15.22
12	Los Hornitos	22	22°55.10	70°17.49
13	Playa Rinconada	23	23°05.36	70°29.10
14	Antofagasta	23	23°29.58	70°23.41
15	Juan Lopez Playa	23	23°30.59	70°31.46
16	Sta. Maria Playa	23	23°28.09	70°36.10
17	Caleta el Cobre	23	23°29.46	70°31.09
18	Roca roja	23	23°37.21	70°25.00
19	Playa Los Gringos	23	23°42.55	70°26.03
20	Paposo	24	25°00.42	70°27.54
21	Sur de Paposo	24	25°02.15	70°28.12
22	Tal Tal	25	25°24.11	70°28.58
23	Pan de Azucar	26	26°08.52	70°39.72
24	Chañaral	26	26°01.60	71°25.60
25	Caleta Zenteno	26	26°51.18	70°48.62
26	Rodillo	27	26°59.84	70°47.35
27	Ramada	27	26°59.84	70°47.35
28	Calderilla CMC	27	27°04.43	70°50.28
29	Bahia Inglesa	27	27°06.03	70°51.88
30	Caleta Angosta	28	28°15.73	71°10.35
31	Coquimbo	29	29°58.60	71°22.00
32	Pichicuy	32	32°20.00	71°27.00
33	Cachagua	32	32°34.00	71°27.00
34	Maitencillo	32	32°38.21	71° 26.01
35	Horcon	32	32°43.00	71° 30.00
36	Quintero	32	32°46.60	71° 31.60
37	Cochoa	32	32°57.20	71°32.52
38	Montemar	32	32°55.00	71°31.00
39	Torpederas	33	33°01.00	71°38.00
40	Quintay	33	33°13.00	71°40.00
41	Algarrobo	33	33°19.00	71°41.00
42	El Quisco	33	33°23.60	71°42.00
43	Las Cruces	33	33°26.35	71°40.53
44	Alto Colorado	34	34°12.00	71°58.00
45	Coliumo	37	36°32.82	72°56.87
46	Mehuín	39	39°25.70	73°12.97
47	Loncoyen	39	39°48.97	73°24.09
48	Pucatrihue	40	40°32.81	73°43.15
49	Bahia Mansa	40	40°35.15	73°43.96
50	Maicolpue	41	40°36.17	73°44.87
51	Punta Estaquilla	41	41°23.64	73°50.15
52	Mar Brava	41	41°52.07	74°01.25
53	Pirulil (en Cucao)	42	42°42.27	74°07.71
54	Quellón	43	43°08.00	73°39.00
55	Melinka	43	43°53.80	73°44.99
56	Punta Dungeness	52	52°23.69	68°25.87
57	Buque Quemado	52	52°23.63	69°30.91
58	Laredo	52	52°57.99	70°49.56
59	Methanex	53	53°00.66	70°49.51
60	Punta Arenas	53	53°10.82	70°55.32
61	Puerto Pta. Arenas	53	53°10.96	70°55.56
62	Bahia Inutil	53	53°24.76	69°59.64
63	Puerto de Hambre	53	53°36.76	70°55.78
64	Fuerte Bulnes	53	53°37.96	70°54.82
65	Pesquera Clarencia	53	53°17.79	70°22.97
66	Porvenir/Desague	53	53°17.34	70°28.01
67	Banco Gomez	53	53°18.88	70°27.43
68	Cabo de Hornos	55	55°50.26	67°39.45

Tabla 2. Lugares visitados a lo largo de Chile. En gris se indican las localidades donde se encontraron morfotipos pertenecientes al subgénero *Tylecodium*.

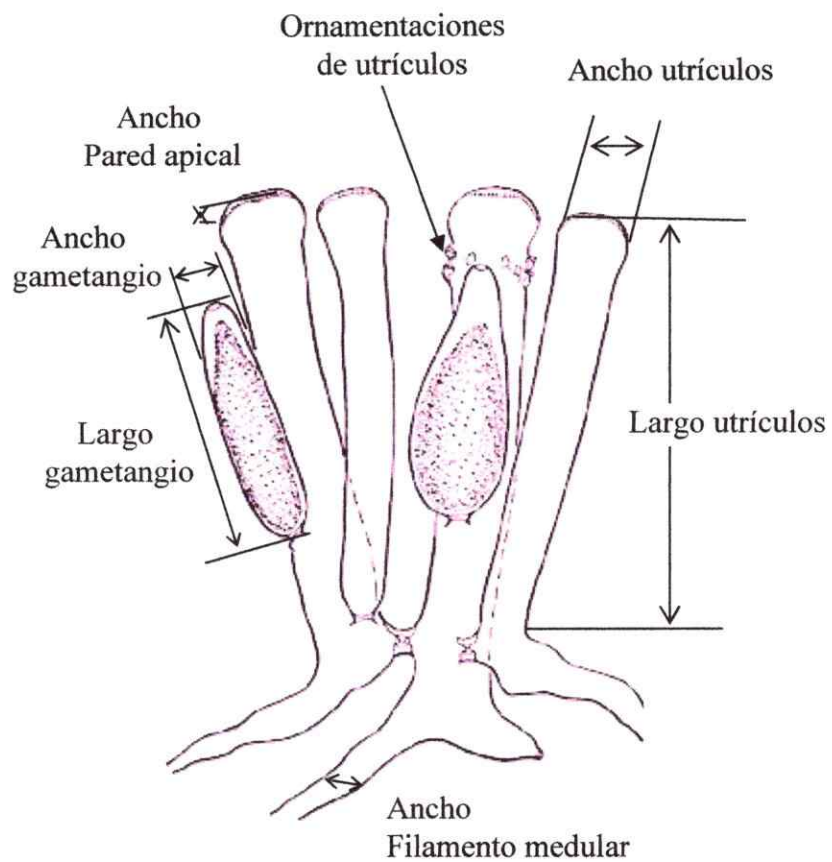


Figura 1. Caracteres morfológicos cuantitativos utilizados para la identificación taxonómica de especies morfológicas en el género *Codium*.

Nº	ESPECIE	Lugar de colecta	PAís
1	<i>Bryopsis corticulans</i>	Venados Jal	Mexico
2	<i>Bryopsis corticulans</i>	Fleming Point, CA	USA
3	<i>Codium conjuctum</i>	Calamajue, BCG	Mexico
4	<i>C. amplivesciculatum</i>	Navachiste, Sin	Mexico
5	<i>C. decorticatum</i>	Matanchen, NAY	Mexico
6	<i>C. fragile</i>	B. Todos los santos BCP	Mexico
7	<i>C. fragile</i>	Point Reyes, Ca	USA
8	<i>C. fragile</i>	Alameda, CA	USA
9	<i>C. giraffa</i>	Venados, Jal	Mexico
10	<i>C. isabelae</i>	Cerritos, Sin	Mexico
11	<i>C. isabelae</i>	Matanchen, Nay	Mexico
12	<i>C. longiramosum</i>	Isla Lobos, Sin	Mexico
13	<i>C. macdougalii</i>	Pelicanos, BCG	Mexico
14	<i>C. picturatum</i>	El Cardonal, BCG	Mexico
15	<i>C. picturatum</i>	Pescadero, BCG	Mexico
16	<i>C. picturatum</i>	La audiencia, Col	Mexico
17	<i>C. setchellii</i>	Pigeon Point, Ca	USA
18	<i>C. simulans</i>	San Juan de la costa, BCG	Mexico

Tabla 3a. Lista de especies utilizadas en el análisis molecular del gen mitocondrial, publicadas por Pedroche (2001)

Nº	ESPECIE	Lugar de colecta	Nº Acceso Genbank	Nº	ESPECIE	Lugar de colecta	Nº Acceso Genbank
1	<i>Choromonas sp.</i>		U80809	37	<i>C. intricatum</i>	Japón	AB102992
2	<i>Bryopsis maxima</i>		X55877	38	<b><i>C. intricatum</i></b>	<b>Japón</b>	AB102993
3	<i>Codium minus</i>	Japón	AB102958	39	<i>C. intricatum</i>	Japón	AB102994
4	<i>C. minu</i>	Japón	AB102959	40	<i>C. contractum</i>	Japón	AB102995
5	<i>C. minus</i>	Japón	AB102960	41	<i>C. contractum</i>	Japón	AB102996
6	<i>C. capitulatum</i>	Japón	AB102961	42	<i>C. subtubulosum</i>	Japón	AB102997
7	<i>C. capitulatum</i>	Japón	AB102962	43	<i>C. subtubulosum</i>	Japón	AB102998
8	<i>C. capitulatum</i>	Japón	AB102963	44	<i>C. repens</i>	Japón	AB102999
9	<i>C. capitulatum</i>	Japón	AB102964	45	<i>C. repens</i>	Japón	AB103000
10	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102965	46	<i>C. pseudolatum</i>	Japón	AB103006
11	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102966	47	<i>C. barbatum</i>	Japón	AB103007
12	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102967	48	<i>C. barbatum</i>	Japón	AB103008
13	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102968	49	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103009
14	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102969	50	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103010
15	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102970	51	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103011
16	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102971	52	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103012
17	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102972	53	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103013
18	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102973	54	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103014
19	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102974	55	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103015
20	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102975	56	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103016
21	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102976	57	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103017
22	<i>C. hubssii</i>	Japón	AB102977	58	<i>C. dimorphum</i>	Japón	AB103018
23	<i>C. spongiosum</i>	Japón	AB102978	59	<i>C. fragile</i>	Japón	AB103019
24	<i>C. spongiosum</i>	Japón	AB102979	60	<i>C. fragile</i>	Japón	AB103020
25	<i>C. lucasii</i>	Japón	AB102980	61	<i>C. fragile</i>	Japón	AB103021
26	<i>C. lucasii</i>	Japón	AB102981	62	<i>C. inerme</i>	Japón	AB103022
27	<i>C. lucasii</i>	Japón	AB102982	63	<i>C. inerme</i>	Japón	AB103023
28	<i>C. lucasii</i>	Japón	AB102983	64	<i>C. yezoense</i>	Japón	AB103024
29	<i>C. arabicum</i>	Japón	AB102984	65	<i>C. cylindricum</i>	Japón	AB103025
30	<i>C. arabicum</i>	Japón	AB102985	66	<i>C. cylindricum</i>	Japón	AB103026
31	<i>C. arabicum</i>	Japón	AB102986	67	<i>C. cylindricum</i>	Japón	AB103027
32	<i>C. arabicum</i>	Japón	AB102987	68	<i>C. cylindricum</i>	Japón	AB103028
33	<i>C. arabicum</i>	Japón	AB102988	69	<i>C. cylindricum</i>	Japón	AB103029
34	<i>C. arabicum</i>	Japón	AB102989	70	<i>C. setchellii</i>	California, USA	
35	<i>C. intricatum</i>	Japón	AB102990	71	<i>C. picturatum</i>	La Audiencia, Mexico	
36	<b><i>C. intricatum</i></b>	<b>Japón</b>	AB102991				

Tabla 3b. Lista de especies utilizadas en el análisis molecular del gen cloroplastidial y su número de acceso al Genbank.

	<i>Morfotipo 1</i>	<i>Morfotipo 2</i>	<i>Morfotipo 3</i>
<b>Forma</b>	Postrado aplanado	Postrado pulvinado	Postrado, crustoso aplanado
<b>Márgenes</b>	lisos	lobulados	lisos
<b>Area</b>	0,2- 6 m <sup>2</sup>	0,05- 0,2 m <sup>2</sup>	0,04- 18 m <sup>2</sup>
<b>Grosor</b>	2-6 mm	5-12 mm	3-5 mm
<b>Textura</b>	Esponjosa laxa	Esponjosa firme	Esponjosa laxa
<b>Color</b>	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde oscuro
<b>Adherencia al sustrato</b>	Firme	Laxa	Firme
<b>Hábitat</b>	Submareal somero	Intermareal bajo	Intermareal medio a submareal somero
<b>Distribución geográfica</b>	Cabo de Hornos, Magallanes, Pta. arenas	Isla Melinka de las Guaitecas	Loncoyén a Paposó
<b>Tipos de utrículos</b>	2: Simple (S) y Ramificado (R)	2: Simple (S) y engrosado (E)	1
<b>Forma</b>	Cilíndricos	Clavado	Cilíndricos a levemente clavado
<b>Apice</b>	redondeado	truncado	redondeado
<b>Largo <math>\mu\text{m}</math></b>	(S) 212-850 ( $\bar{y}$ =617) (R) 850-1870 ( $\bar{y}$ =1188)	(S) 170-1020 ( $\bar{y}$ =502) (E) 200-1700 ( $\bar{y}$ =634)	( $\bar{y}$ =650 $\pm$ 56)
<b>Ancho <math>\mu\text{m}</math></b>	(S) 68-212 ( $\bar{y}$ =120) (R) 85-225 ( $\bar{y}$ =160)	(S) 38-110 ( $\bar{y}$ =77) (E) 45-133 ( $\bar{y}$ =90)	( $\bar{y}$ =100 $\pm$ 16)
<b>Pared <math>\mu\text{m}</math></b>	(S) 1,0-7,6 ( $\bar{y}$ =3,5) (R) 1,0-4,8 ( $\bar{y}$ =3,6)	(S) 3,8-11,4 ( $\bar{y}$ =7,1) (E) 8,5-28,5 ( $\bar{y}$ =11,5)	( $\bar{y}$ =4,6 $\pm$ 0,7)
<b>Pelos</b>	ausente	ausente	Presente (9,2%)
<b>Forma gametangios</b>	Fusiforme	Fusiforme	Fusiforme
<b>Nº gametangios por utrículo</b>	1	1	1 ó 2
<b>Largo gametangios</b>	290 $\pm$ 40 $\mu\text{m}$	210 $\pm$ 21 $\mu\text{m}$	300 $\pm$ 50 $\mu\text{m}$
<b>Ancho gametangios</b>	70 $\pm$ 25 $\mu\text{m}$	65 $\pm$ 20 $\mu\text{m}$	70 $\pm$ 20 $\mu\text{m}$

Tabla 4. Comparación de los caracteres morfológicos entre los morfotipos pertenecientes al subgénero *Tylecodium* encontrados en Chile continental.

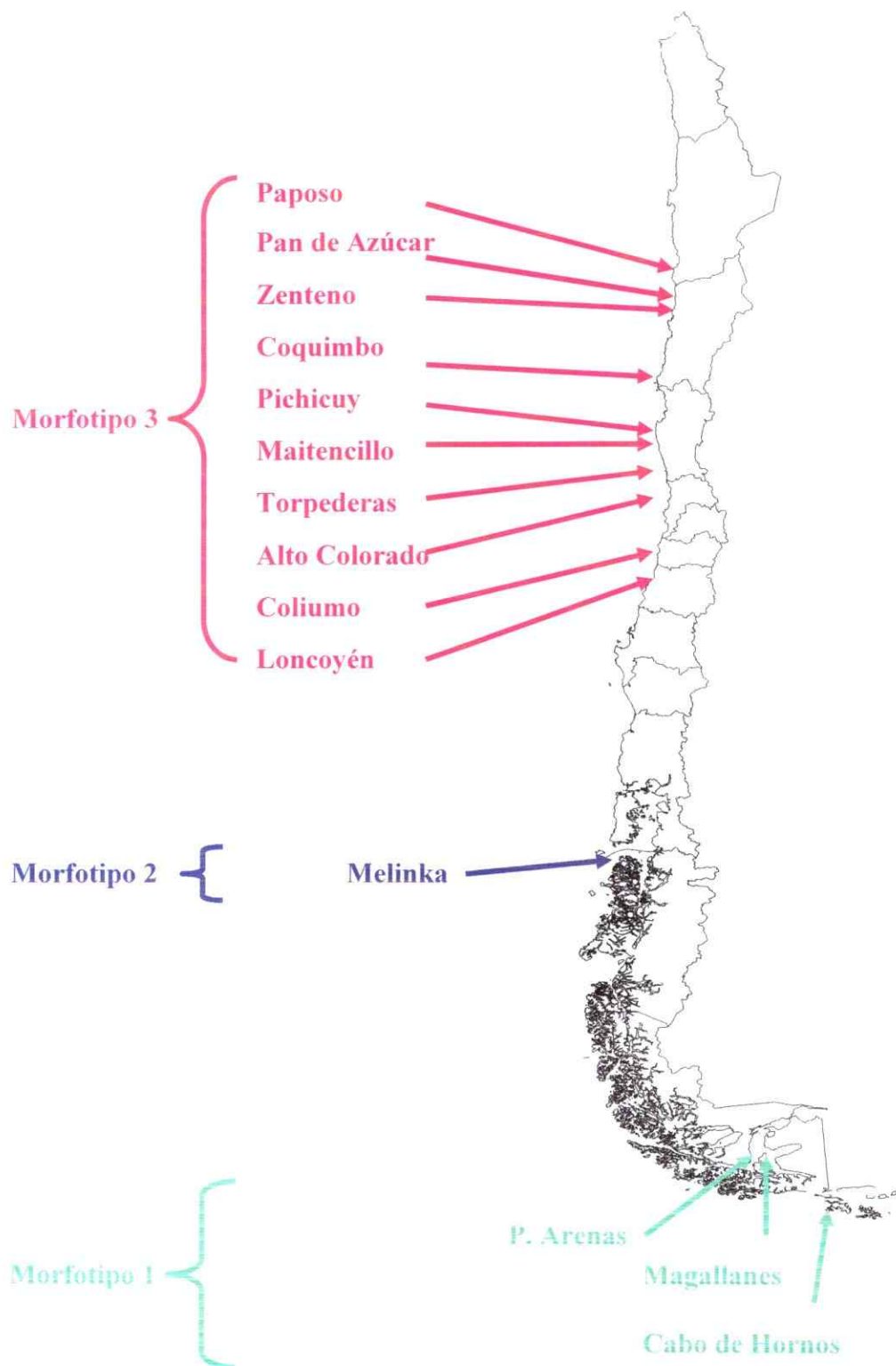


Figura 2. Distribución de los morfotipos del subgénero *Tylecodium* encontrados a lo largo de Chile continental.

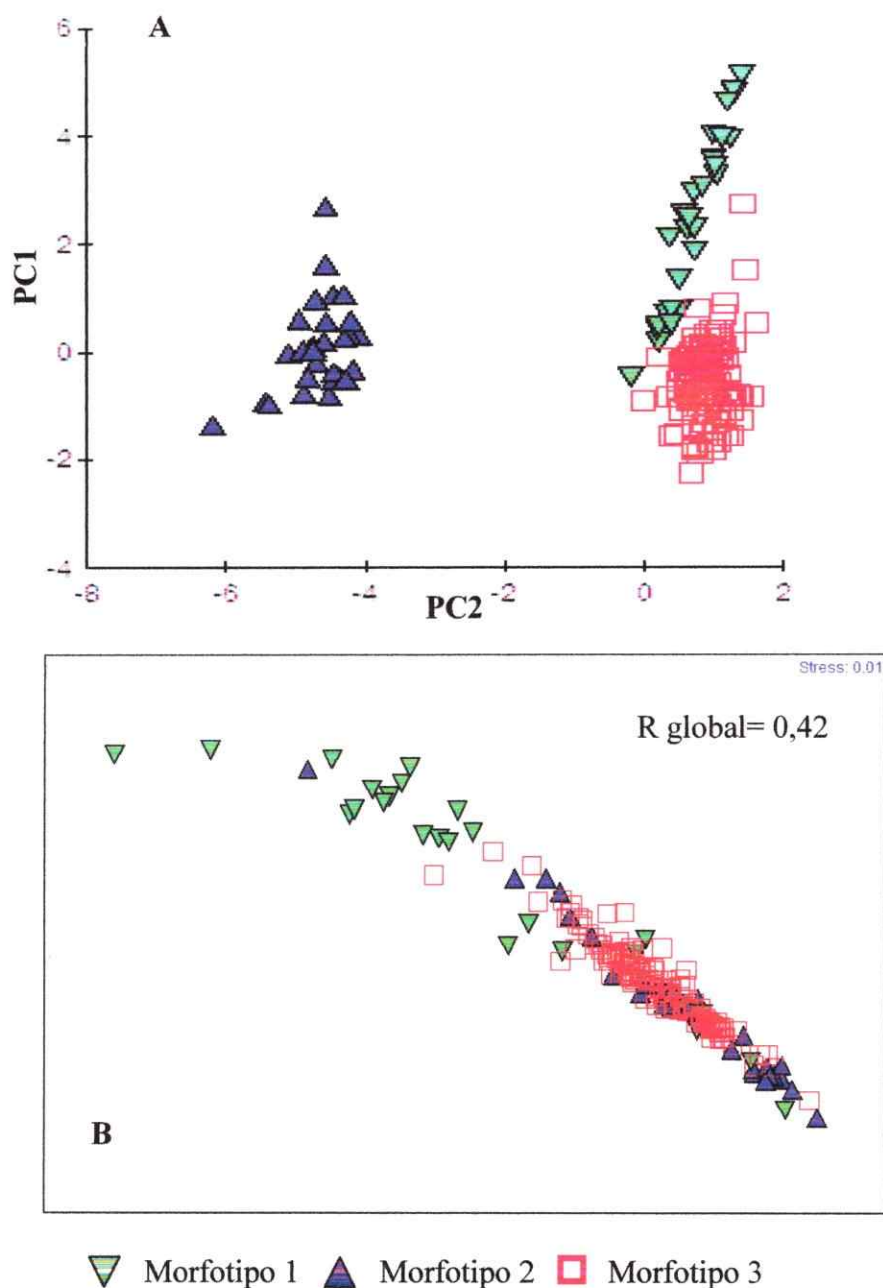


Figura 3. Comparación morfológica multivariada de las muestras colectadas a lo largo de Chile  
 (A) ACP. PC 1, 2 y 3 explican el 80% de la variabilidad. Caracteres que más aportan a cada eje  
 PC1= Forma del talo (0,492), PC2= Tipo de utrículos (0,438), PC3 = Forma de utrículos (0,492).  
 (B) NMDS  $R < 0,5$  limite de similitud entre las muestras se encuentra al límite. Diferencias  
 significativas entre morfotipo 1 y morfotipo 3 ( $R = 0,534$ )

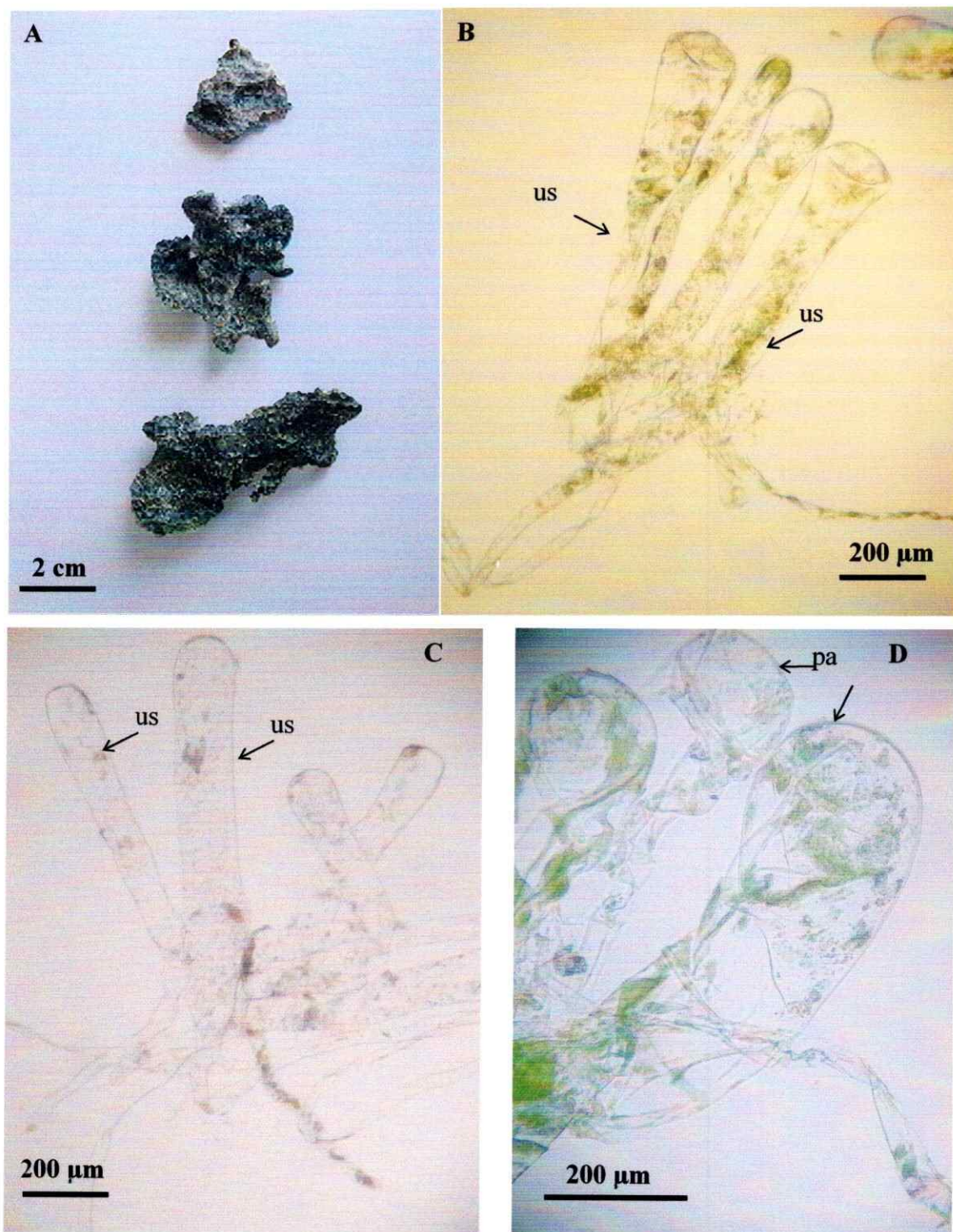


Figura 4. Características morfológicas del Morfotipo 1. (A) trozo de talo herborizado, (B-C) utrículos simples (D) detalle pared apical de utrículos. us= utrículos simples, pa= pared apical. Escala (A)= Escala (B-D)=200  $\mu\text{m}$



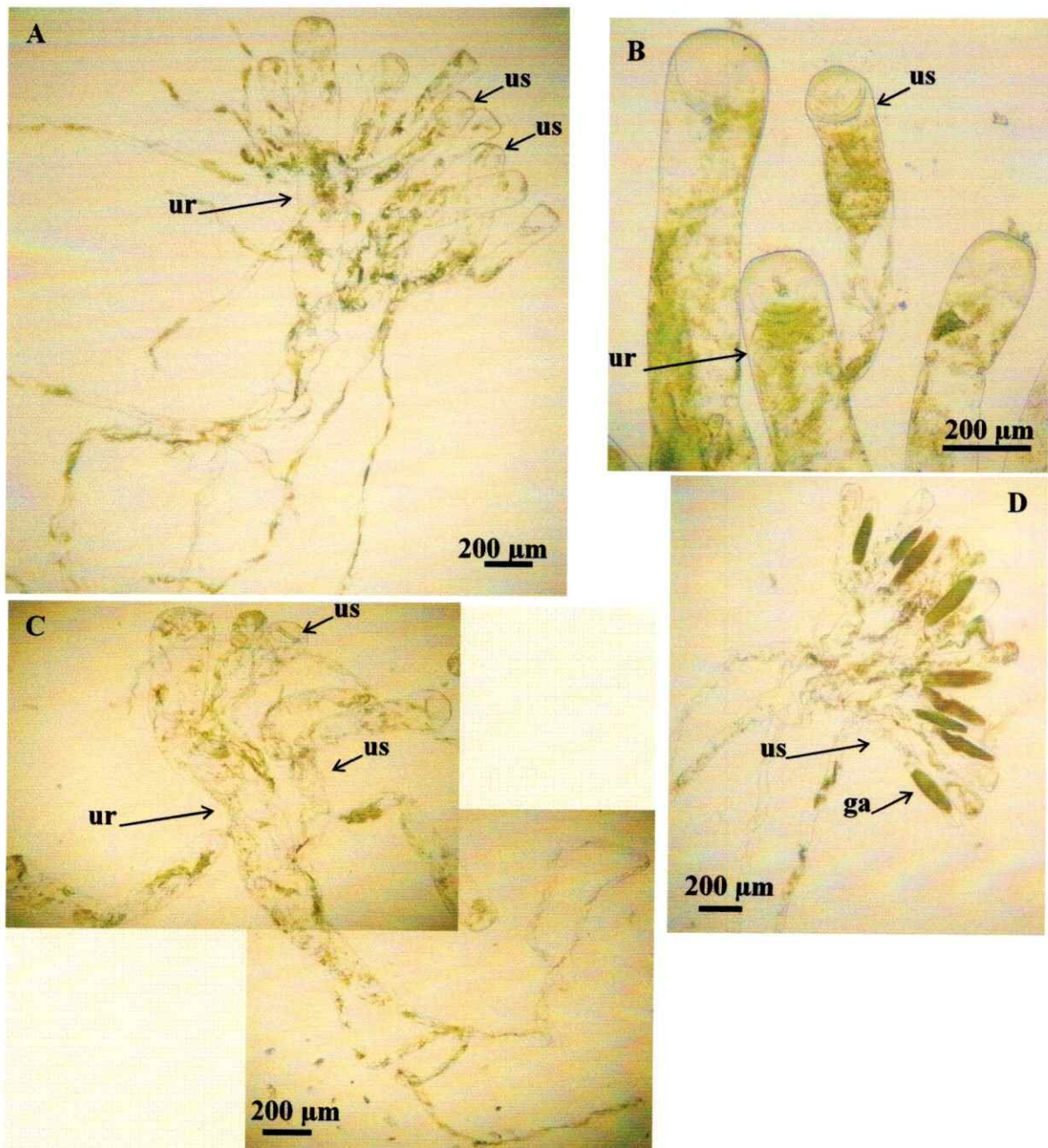


Figura 5. Características utriculares del Morfotipo 1. (E) utrículos simples y ramificados juntos, (F) detalle pared apical de utrículos (G) Detalle utrículo ramificado, (H) utrículos con gametangios. us= utrículos simples, ur=utrículos ramificados, pa= pared apical, ga= gametangios. Escala= 200 μm

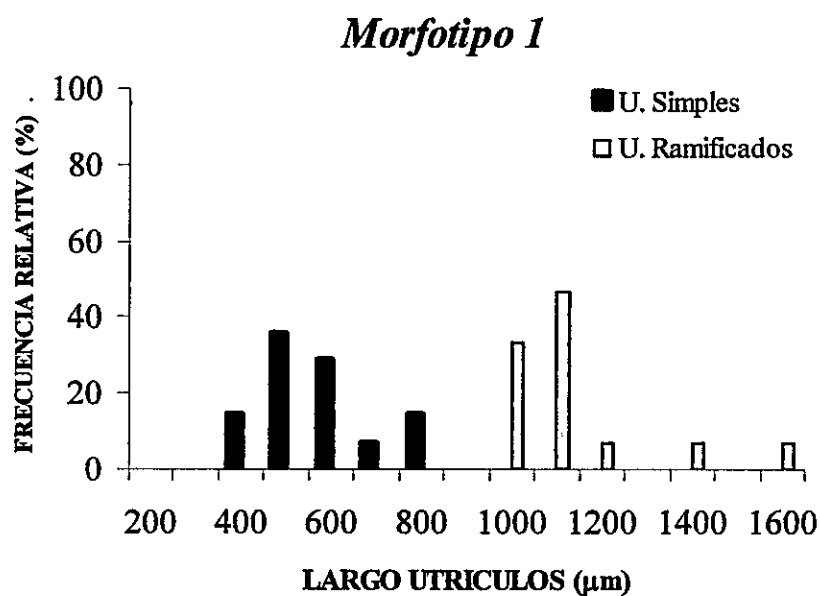


Figura 6. Distribución de frecuencia del largo de los utrículos (simples y ramificados) en el morfotipo 1 encontrado en Punta Arenas, Tierra del Fuego y Cabo de Hornos.

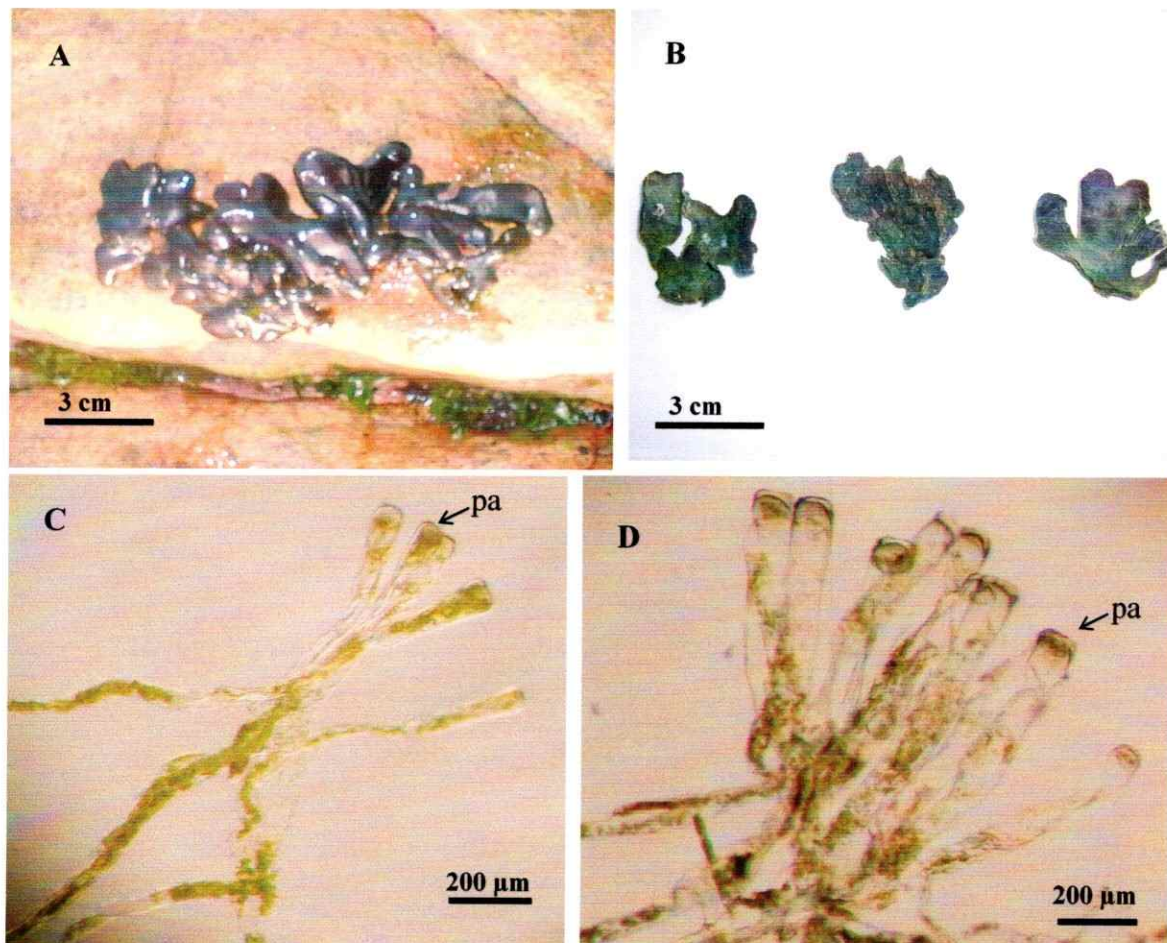


Figura 7. Características morfológicas del Morfotipo 2. (A) Morfología externa del talo (B) utrículos simples, (C) utrículos no engrosado (D) utrículos engrosados pa= pared apical, Escala (A)= 3 cm, (C-D)= 200  $\mu$ m

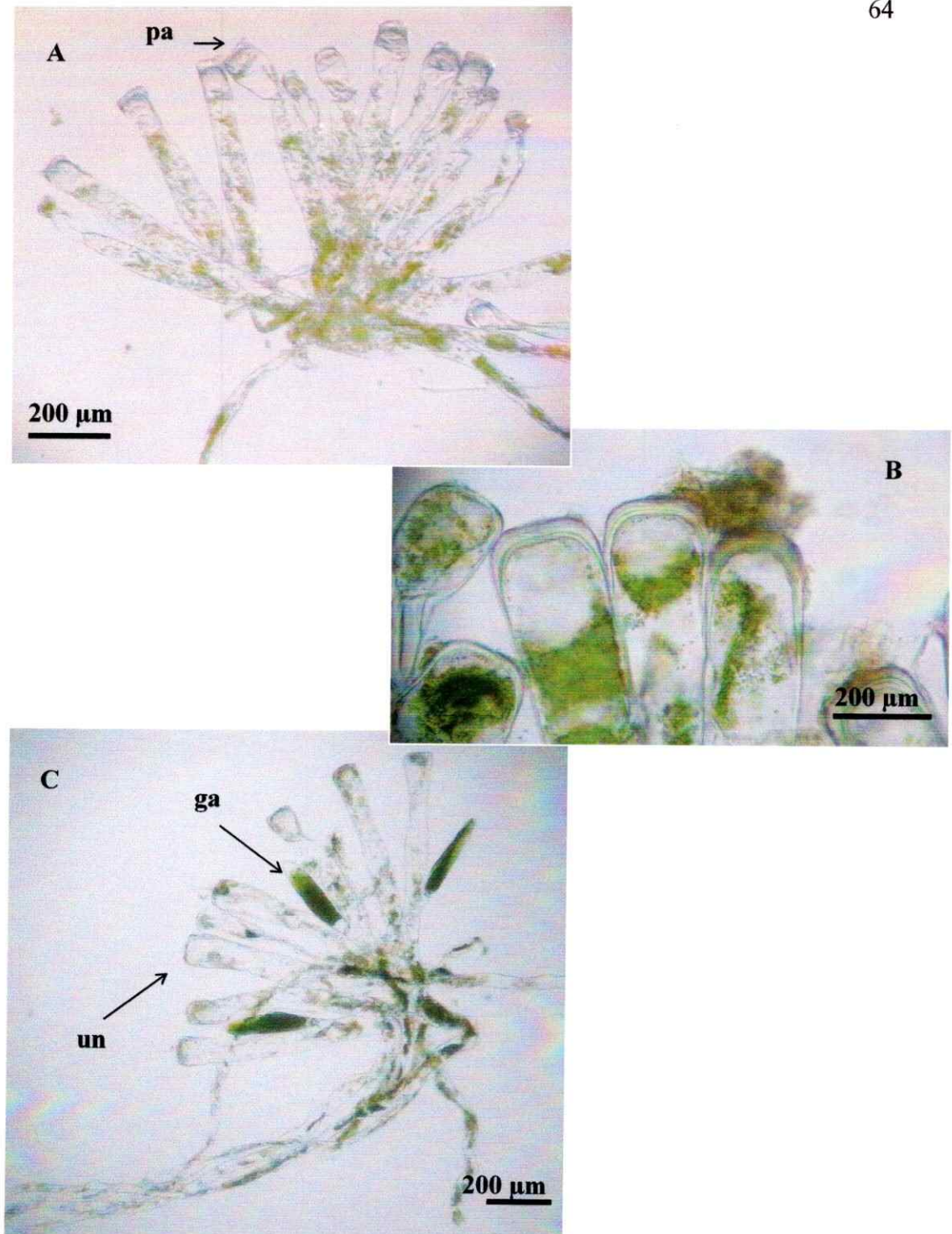


Figura 8. Características de los utrículos del Morfotipo 2. (C) utrículos engrosados. (F) Detalle de pared apical en utrículos engrosados (G) utrículos no engrosados con gametangios. un= utrículos no engrosados, ue=utrículos engrosados, pa= pared apical, ga= gametangios. Escala= 200 µm

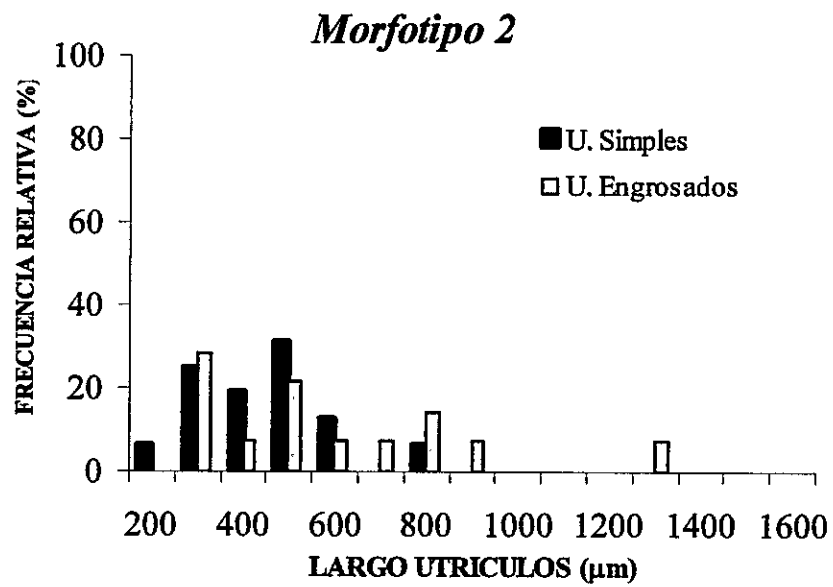


Figura 9. Distribución de frecuencia del largo de los utrículos (simples y engrosados) en el morfotipo 2 encontrado en Isla Melinka, Guaitecas.

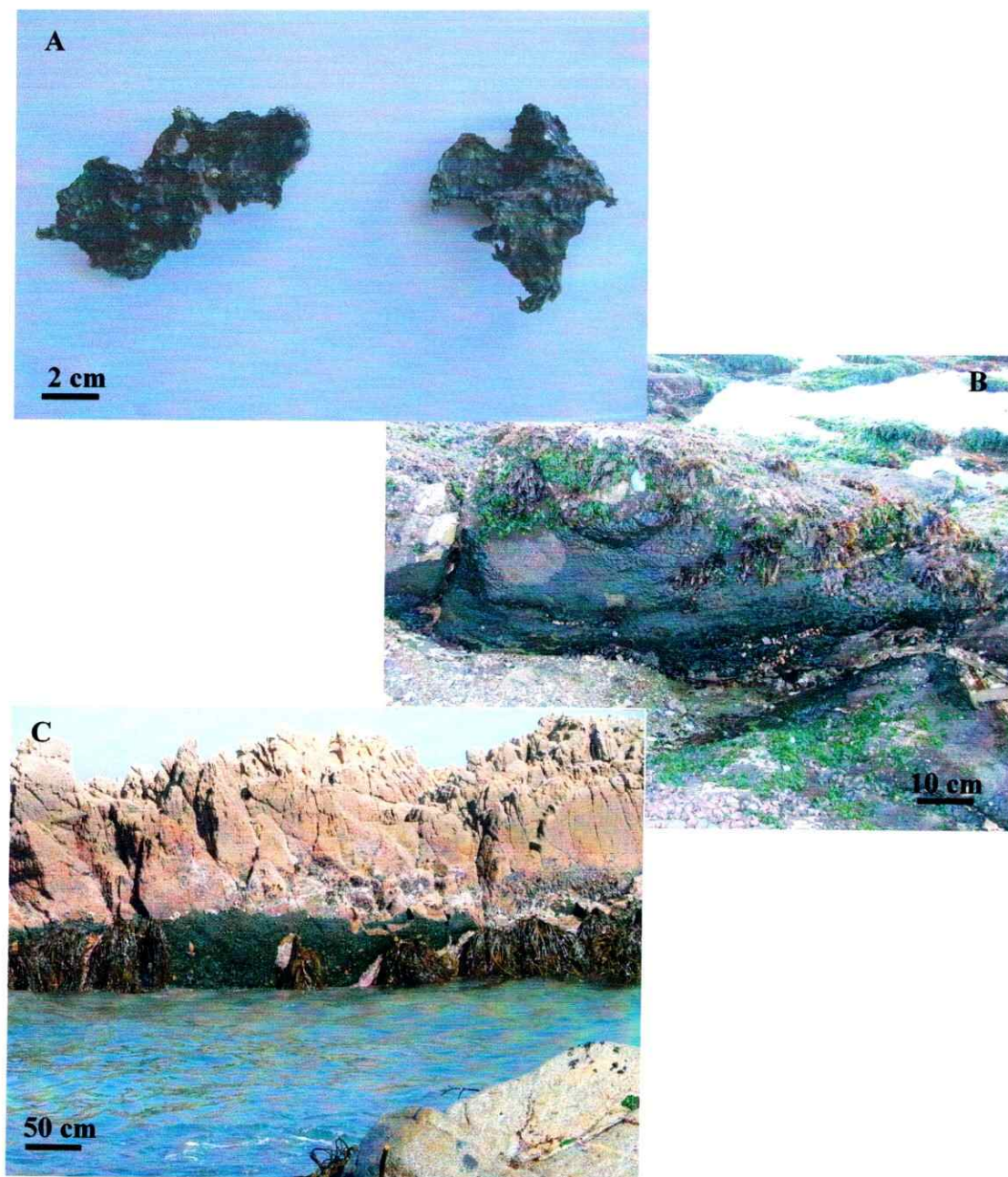


Figura 10. Características morfológicas externas del Morfotipo 3. (A) Cinturón de *Codium sp.* en Chile central, a la altura intermareal de *Lessonia* (B) Talo de *Codium sp.* en intermareal medio de Chile central, por debajo de *Mazzaella*, *Ulva*, entre otras. (C) Trozo de talo de *Codium sp.* herborizado. Escala (A)= 50 cm, (B)= 10 cm, (C)= 1cm.

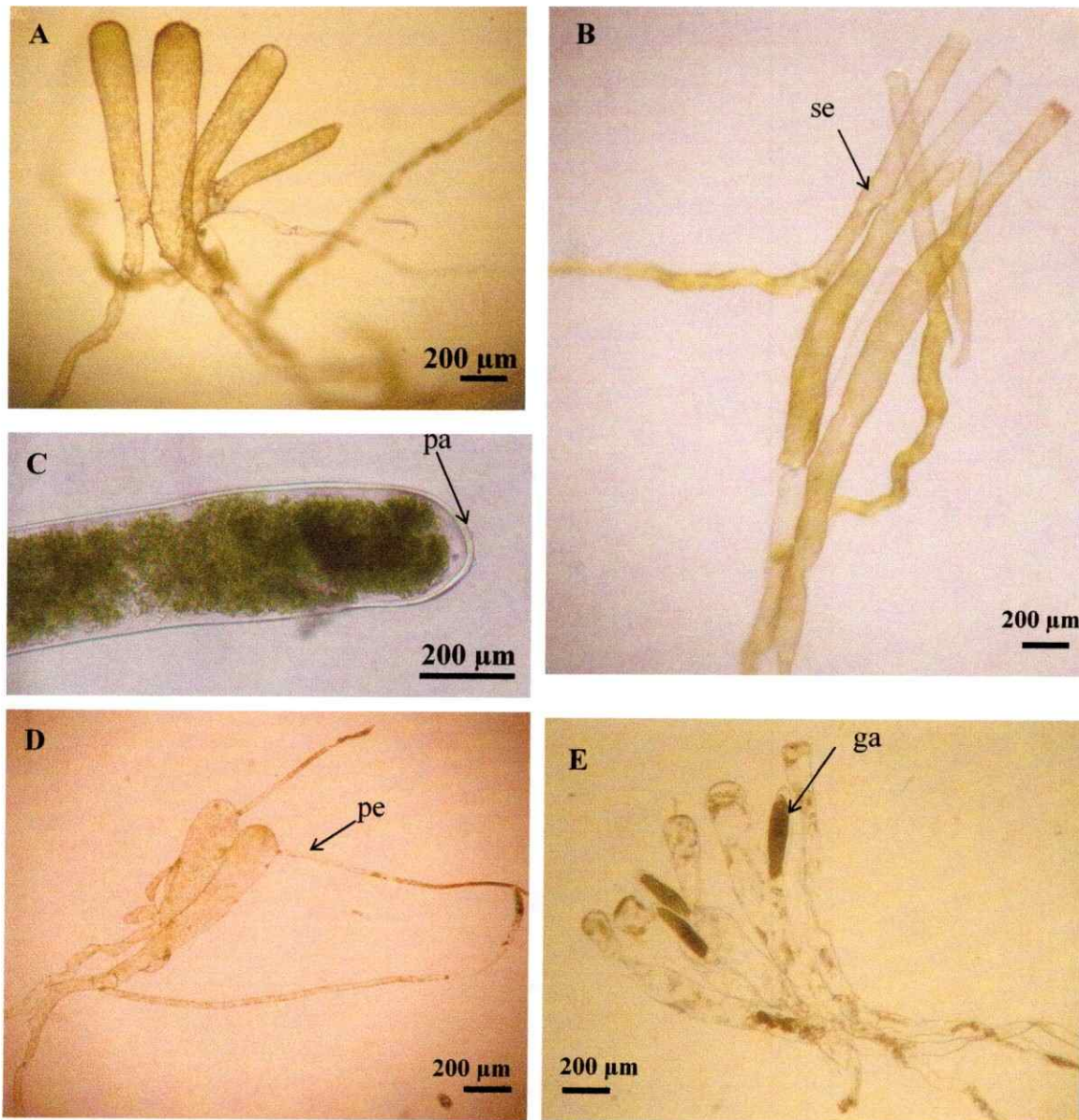


Figura 11. Características morfológicas del utrículo en el Morfotipo 3. (C-D) utrículo simple encontrado en el morfotipo, (C) utrículos en manojos con filamentos medulares (D) Detalle que muestra el septo que une a algunos utrículos (E) Detalle de la pared apical en utrículos simple, (F) utrículos con pelos que emergen desde la parte apical (G) utrículos con gametangios, en este caso sólo un gametangio por utrículo. pe= pelos, pa= pared apical, sp= septo, ga= gametangios.

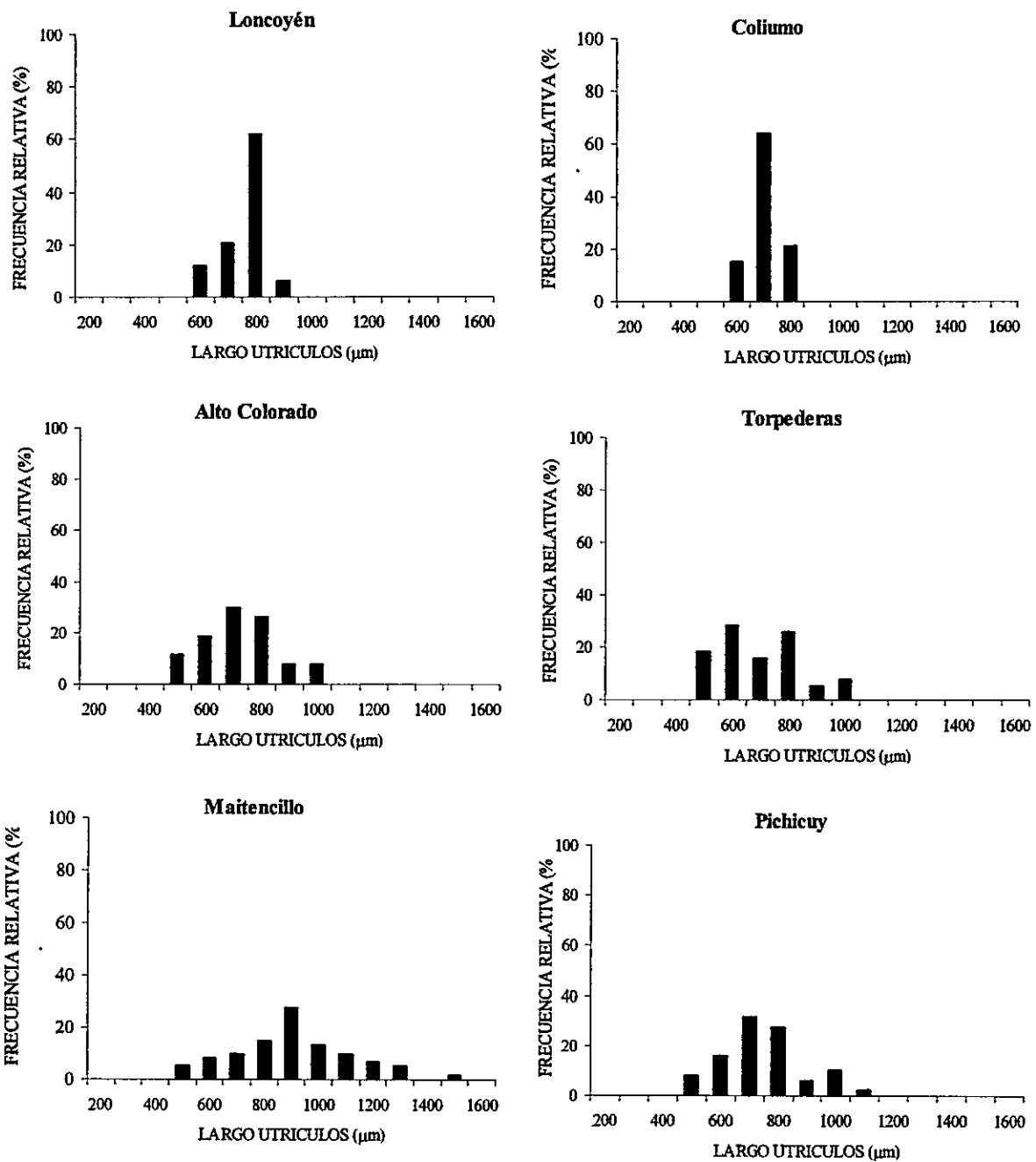


Figura 12a. Distribución de frecuencia del largo de los utrículos en el morfotipo 3 encontrado desde Loncoyén hasta Pichicuy



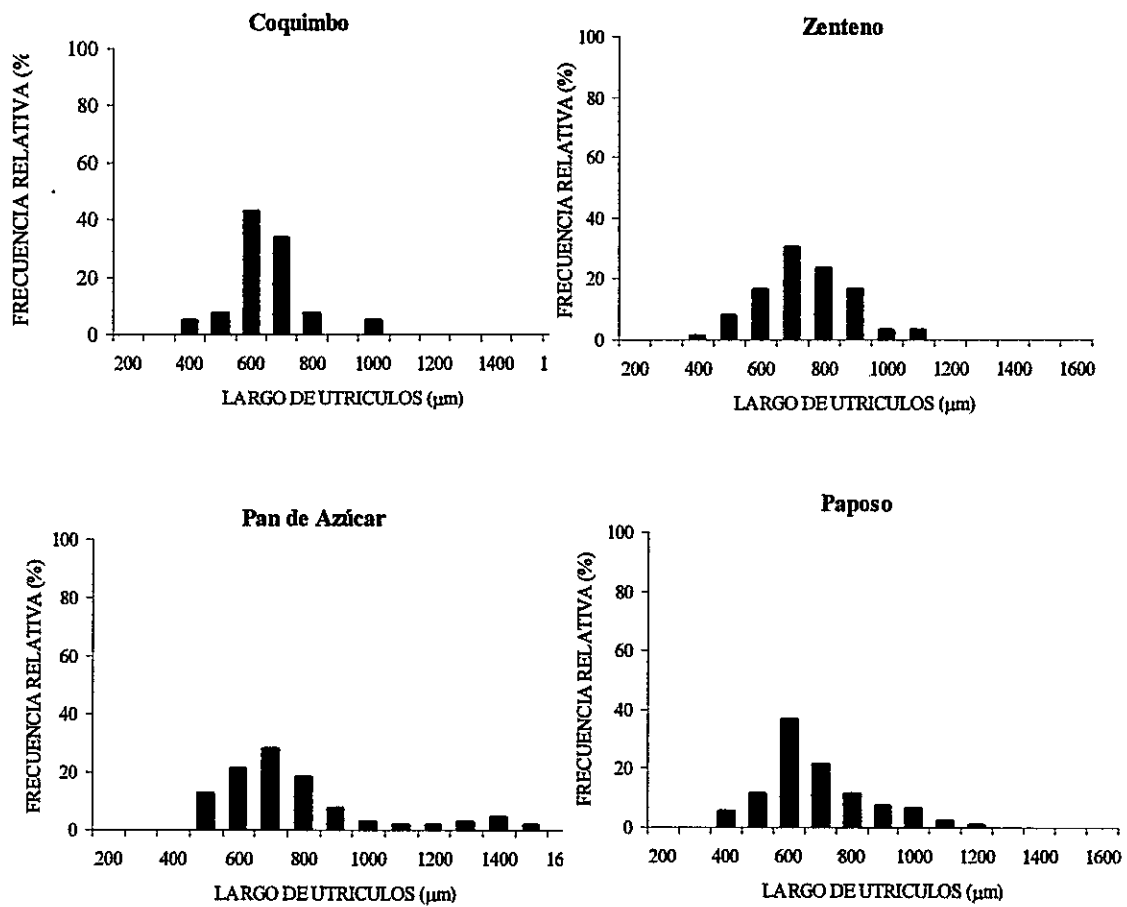


Figura 12b. Distribución de frecuencia del largo de los utrículos en el morfotipo 3 encontrado desde Coquimbo hasta Paposo.

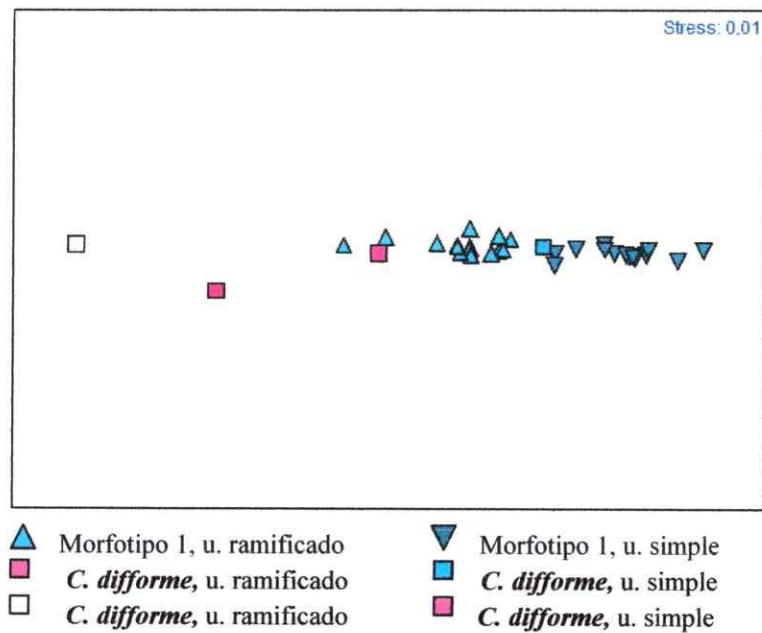


Figura 13. Análisis de similitud de datos morfológicos multivariados (NMDS) entre el morfotipo 1 y *C. difforme* descrito por Hylmö (1919). R global= 0,87, diferencias significativas encontradas sólo entre utrículos simples y ramificados (R=0,896)

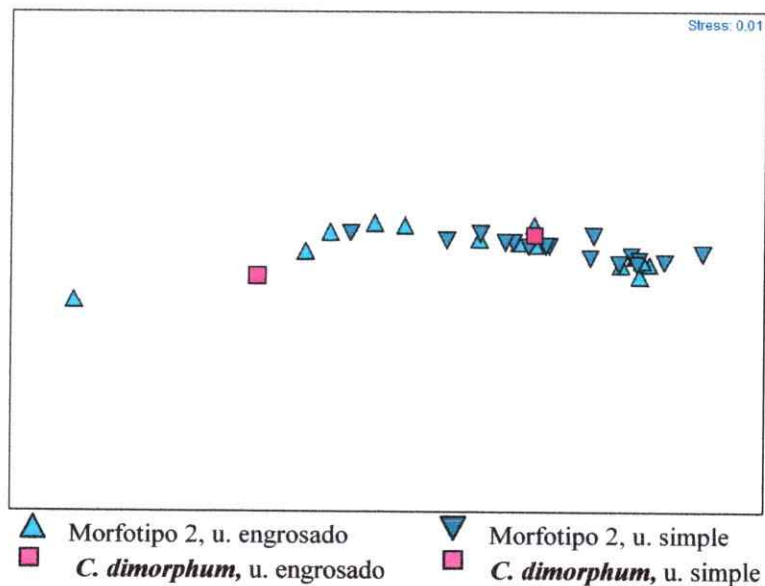


Figura 14. Análisis de similitud de datos multivariados (NMDS) entre el morfotipo 2 y *C. dimorphum* descrito por Svedelius (1900). R global= 0,67, leves diferencias significativas encontradas sólo entre utrículos simples y engrosado (R=0,54)

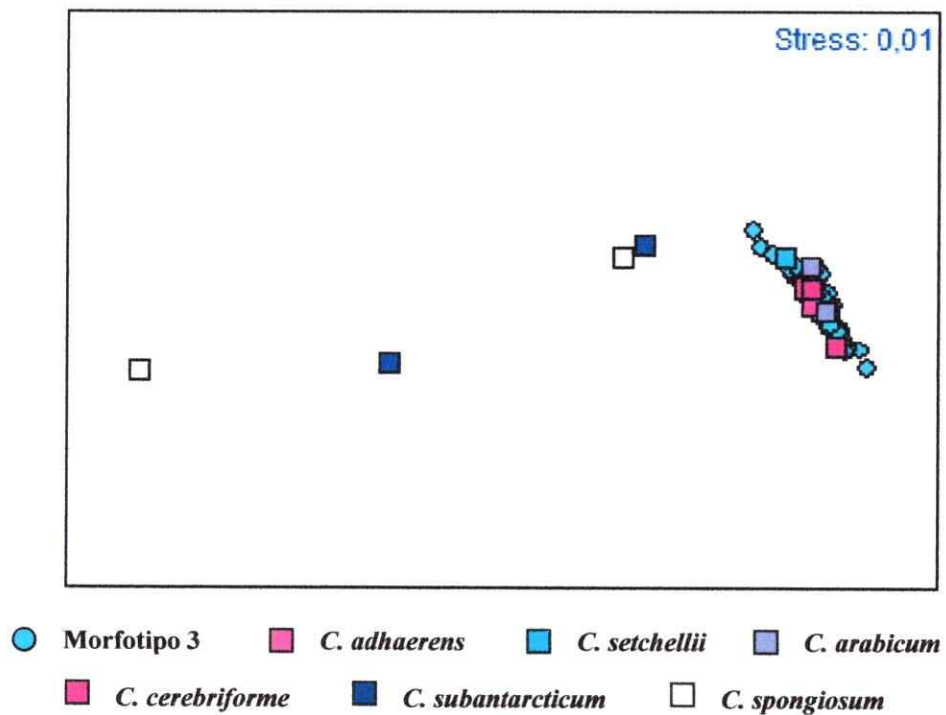


Figura 15. Análisis de similitud de datos morfológicos multivariados (NMDS) entre el morfotipo 3 y *C. adhaerens* (Setchell 1937), *C. setchellii* (Silva 1951), *C. arabicum* (Hylmö 1938), *C. cerebriforme* (Setchell 1937), *C. subantarcticum* (Ricker 1987), *C. spongioides* (Silva & Womersley 1956)  $R$  global= 0,54, diferencias significativas encontradas entre *C. spongioides* ( $R=1$ ), *C. subantarcticum* ( $R=0,999$ ) con el resto de las especies y el morfotipo 3.

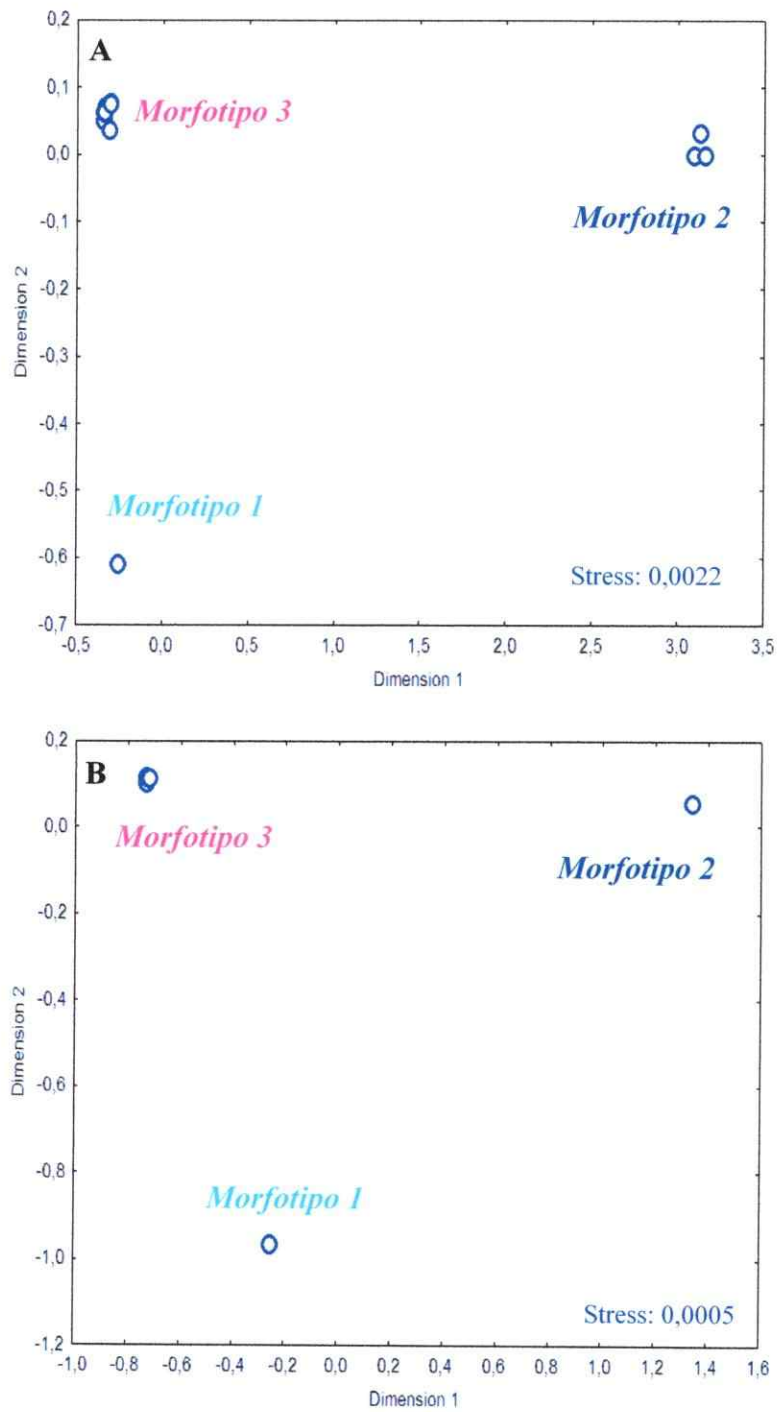


Figura 16. Análisis de similitud de datos moleculares multivariados (diferencias en pares de base) en NMDS entre los morfotipos 1, 2 y 3. (A) Gen cloroplastidial ( $R=0,98$ ). (B) Gen mitocondrial ( $R=0,97$ )



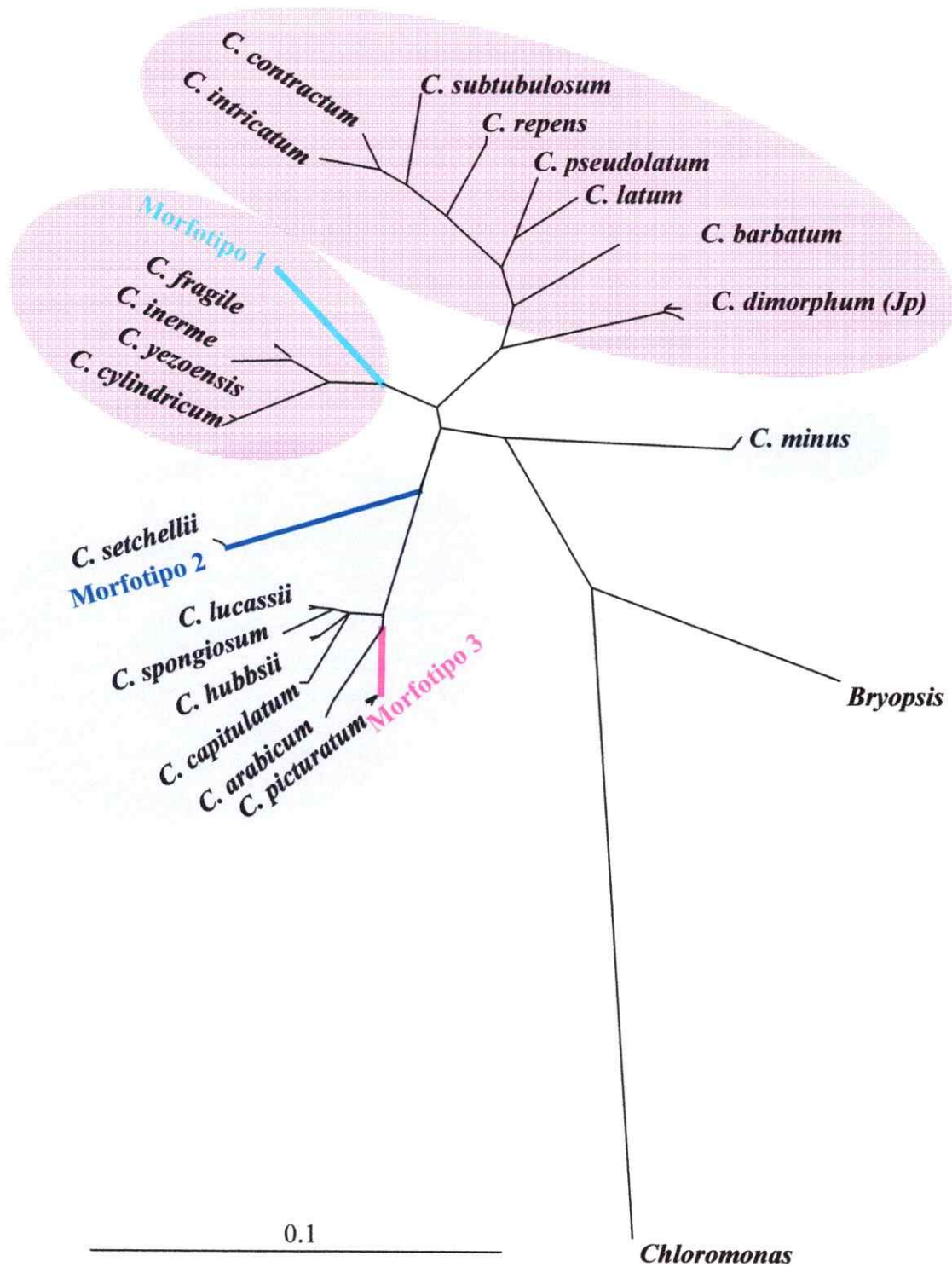


Figura 17b. Árbol no enraizado ML del gen cloroplastidial (*rbcL*) generado en PAUP, robustez de nodos con bootstrap (1000 réplicas). Clados mixtos (rosado), clados rastreros (gris)

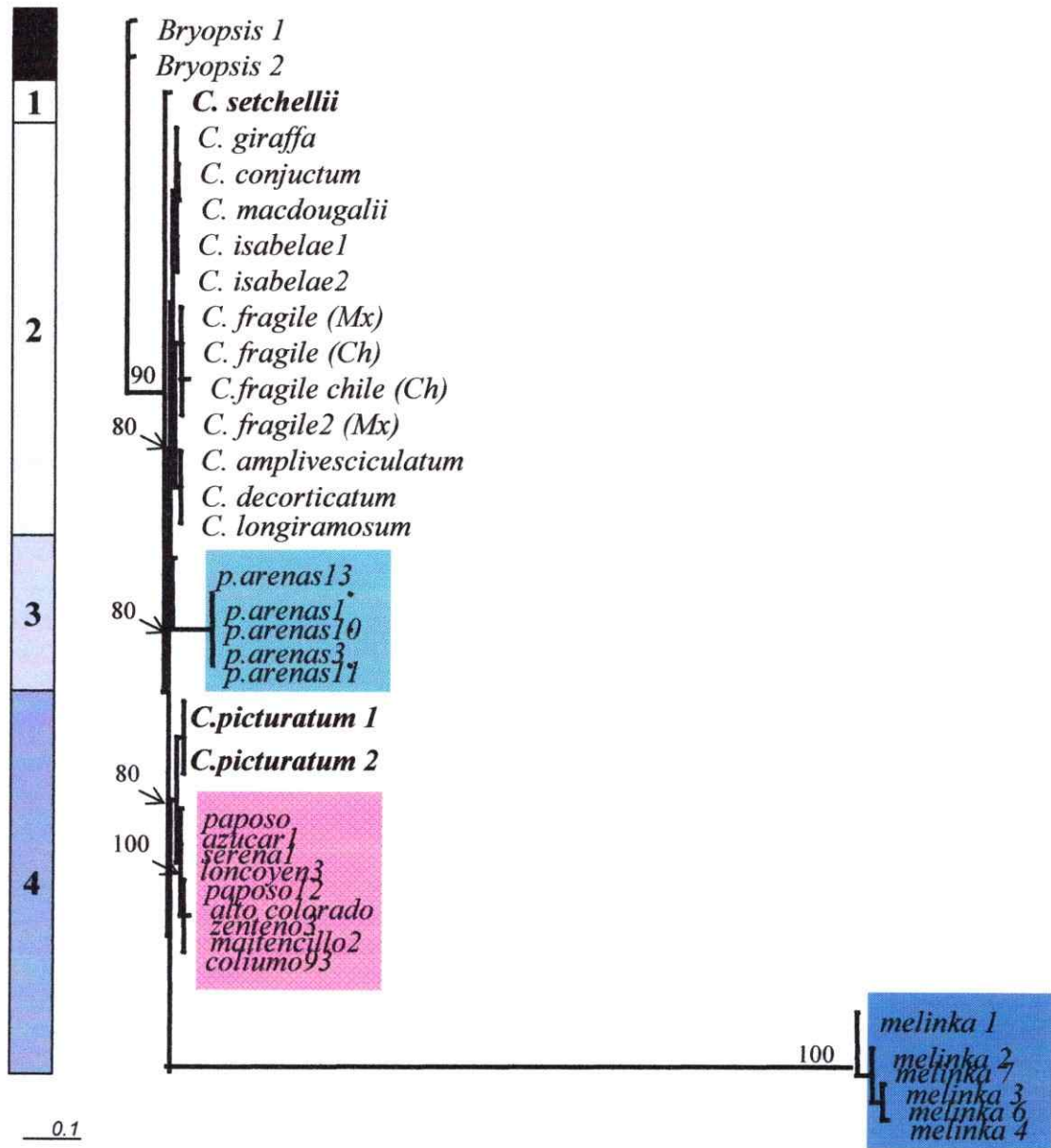


Figura 18. Árbol enraizado NJ del gen mitocondrial (LSUr) generado en PAUP, robustez de nodos con bootstrap (1000 réplicas). Clados 1- 4, grupo externo en negro. Subclados de morfotipos resumidos (menos muestras) y en colores:

Morfotipo 1= ■      Morfotipo 2= ■      Morfotipo 3= ■

**CAPITULO III**

**DIVERSIDAD INTRAESPECÍFICA DE *Codium sp.* EN CHILE**



### 3.1 INTRODUCCIÓN

La diversidad genética de una especie se entiende como la variación heredable de los genes dentro de la población y entre distintas poblaciones de organismos (BDP & West 2006). A nivel intraespecífico, es posible determinar la conectividad de las poblaciones (estructuración genética) y la relación entre genes (filogenia de haplotipos), las que se encuentran estrechamente relacionadas a características intrínsecas de los individuos y a factores externos ecológicos, bióticos y abióticos (Palumbi 1994). La combinación de estudios genéticos y ecológicos, basados en principios y procesos de estructuración geográfica en una especie se determina “filogeografía” (Avice 2000, Avice *et al.* 1997, Arbogast & Kenagy 2001). Ésta analiza la filogenia de haplotipos y su ubicación geográfica, permitiendo el reconocimiento de patrones geográficos de la variación genética, evidenciando los procesos que determinan la distribución espacial de los organismos como colonización, cuellos de botella, expansión de poblaciones, eventos de vicarianza (Arbogast & Kenagy 2001), selección natural (Slatkin & Barton 1989), y patrones de biodiversidad y riqueza genética (Avice 2000, Moritz & Faith 1998). La inferencia de filogenias de haplotipos, basada en la teoría de coalescencia (Kingman 1982a, 1982b, Donnelly & Tavaré 1995), el uso de métodos probabilísticos (Beerli & Felsenstein 1999) y de aproximaciones evolutivas (Bandelt *et al.* 1999, Templeton 1998) han permitido interpretar patrones filogeográficos dentro del contexto de modelos evolutivos y biogeográficos (Anexo A). Estos patrones, identifican las causas más importantes que afectan a las poblaciones y su estructuración, responsabilidad ecológicamente atribuida a ciclos de vida y capacidad de dispersión,

mientras que geográficamente asociada a barreras físicas y procesos históricos (Goldson *et al.* 2001).

En ambientes marinos, y específicamente en organismos que presentan limitada dispersión como invertebrados, peces de arrecifes, plantas acuáticas y algas, las poblaciones se caracterizan por presentar, a pequeña escala espacial, patrones filogeográficos con baja conectividad genética entre poblaciones que se encuentran altamente estructuradas, asociados mayoritariamente a factores oceanográficos físicos, químicos, y barreras biológicas propias del hábitat en que se distribuye cada población (Faugeron *et al.* 2001). En macroalgas bentónicas, la gran variabilidad del nivel de estructuración genética y patrones filogeográficos, caracterizados con marcadores moleculares, sugiere una respuesta especie-específica atribuida a características propias de los organismos en estudio como ciclos reproductivos (presencia o ausencia de alternancias de generación, reproducción sexual, partenogénesis y/o propagación vegetativa) y dispersión (presencia de células flageladas) (Valero *et al.* 2001).

En Chile, la gran extensión de la costa (5500 km) provee de una diversidad importante de ambientes marinos (Figueroa 2002), debido a que a lo largo de ésta, existe una gran variedad de barreras geográficas y fuerzas físicas (Camus 2001), asociada a una combinación de estacionalidad y variabilidad espacial de los vientos, flujos cálidos superficiales (El Niño), flujos profundos fríos (zonas de surgencia), e ingreso variable de agua dulce (Figueroa 2002). Basado en la diversidad de ambientes marinos, numerosos trabajos han propuesto la identificación de unidades biogeográficas dentro de la costa chilena, sugiriendo que existe cierta discontinuidad costera asociada a una

discontinuidad de los organismos que habitan la costa chilena. Esta discontinuidad ha sido observable a nivel interespecífico (Santelices 1980, Santelices 1982, Lancellotti & Vásquez 1999, Meneses & Santelices 2000, Camus 2001, Hernández *et al.* 2005) e intraespecífico (Martínez *et al.* 2003, Meynard 2005). En este contexto, la revisión de Camus (2001) sugiere que en la costa chilena se pueden distinguir y caracterizar tres zonas o provincias, limitadas por quiebres biogeográficos a los 30°S y a los 41°S. De esta manera se encontraría la Zona Norte o Provincia Peruviana (18°-30°S), influenciada por aguas subtropicales y con biota marina característica de zonas templadas a cálidas. La Zona Sur o Provincia Magallánica (41°-56°S), influenciada por aguas subantárticas con biota marina austral. Y finalmente, una Zona intermedia (30°- 41°S) la que contendría una biota marina mezclada, sin características biológicas y biogeográficas propias. Sin embargo, la generalidad de esta fragmentación de la costa chilena ha sido ampliamente discutida, encontrándose grupos de organismos en que los límites entre provincias se superponen o simplemente no existen (Hernández *et al.* 2005, Meneses & Santelices 2000).

En este contexto, en el grupo de las macroalgas bentónicas, los dos quiebres biogeográficos y por ende las tres unidades o provincias biogeográficas se han descrito sólo en las divisiones Heterokontophyta y Rhodophyta. A nivel interespecífico, se han descrito dos discontinuidades de la flora o quiebres fitogeográficos, basadas en la similitud y afinidad fitogeográfica de las especies. El primero, ubicado a la altura de los 30°S en Heterokontophyta y 33°S en Rhodophyta. Mientras que la ubicación del segundo quiebre fitogeográfico sería a los 41°S para ambas divisiones (Meneses & Santelices 2000). A nivel intraespecífico, el primer quiebre fitogeográfico se ha descrito en la

especie *Lessonia nigrescens* (Heterokontophyta), con una discontinuidad genética entre las poblaciones, aún cuando su distribución en Chile sea entre los 19°-42°S. (Martínez *et al.* 2003, Meynard 2005).

Aún cuando en estas macroalgas los estudios sugieren que el patrón de unidades biogeográficas descrito por Camus (2001) es consistente, en la división Chlorophyta la generalidad de este patrón se pone en duda debido a la ausencia de uno de los quiebres fitogeográficos ubicado a los 30°S. En este contexto, aún cuando no existen antecedentes a nivel intraespecífico, el estudio de la diversidad de especies encontradas a lo largo de la costa chilena, sugiere que este grupo presentaría una discontinuidad en cuanto a similitud y afinidad fitogeográfica sólo a los 41°S. El grupo se diferenciaría en sólo dos zonas biogeográficas entre los 12°- 41°S por el norte y desde los 41°-56°S por el sur, siendo esta última correspondiente a la provincia Magallánica (Meneses & Santelices 2000, Santelices & Meneses 2000).

Dentro de la división Chlorophyta presente en Chile, la especie rastrera *Codium sp.* presenta un amplio rango de distribución geográfica entre los 25° y 41°S. Ecológicamente, *Codium sp.* se localiza en hábitats intermareales y submareales, alcanzando la máxima densidad de individuos y dimensión de los talos en poblaciones de Chile central, ubicadas aproximadamente en la zona media de su distribución latitudinal (González, pers. observ.). En esta zona, la especie se localiza mayoritariamente en hábitats intermareales, donde puede alcanzar grandes dimensiones en talla hasta 18 m<sup>2</sup>, con consecuente dominio del sustrato e implicancias en la estructuración comunitaria y la sucesión de organismos intermareales (Santelices *et al.* 1981). Aún cuando la presencia de *Codium sp.* en el intermareal tiene gran implicancia

ecológica sobre las comunidades, se desconocen cuáles son los mecanismos reproductivos y de dispersión que le permiten mantener las poblaciones en el tiempo. Adicionalmente, el amplio rango de distribución latitudinal presentado por la especie, con diferencias poblacionales en cuanto a densidad de individuos y talla de los mismos, sugiere que *Codium sp.* es una especie capaz de habitar distintos ambientes dentro de su rango de distribución. La combinación de estos antecedentes sugiere que existe la posibilidad que la variabilidad de ambientes en que habita *Codium sp.* juegue un rol de barrera ecológica contemporánea a la dispersión, que junto con factores históricos de cada especie podría estar promoviendo la divergencia de las poblaciones y/o linajes intraespecíficos .

Basados en la importancia ecológica que presenta *Codium sp.* en hábitats intermareales y submareales de Chile central, la variabilidad poblacional en densidad y tamaño de los talos y su amplio rango de distribución geográfica dentro de una de las provincias biogeográficas chilenas más discutida, con barreras que afectan la continuidad de algunos organismos, es que el objetivo de este capítulo es poner a prueba la hipótesis que en un amplio rango geográfico, caracterizado por una variabilidad de ambientes, la especie *Codium sp.* presentaría estructuración de poblaciones con alta divergencia genética entre las poblaciones debido a posibles barreras ecológicas, geográficas y/o históricas.

En este contexto, este capítulo tiene como objetivo caracterizar los individuos y las poblaciones de *Codium sp.* presentes en Chile a través de la amplificación del gen cloroplastidial TRN-Gly, estimando la diversidad de haplotipos, riqueza genética y dinámica demográfica de diez poblaciones localizadas equidistantemente dentro de su

rango de distribución. Adicionalmente, con el objetivo de evidenciar la presencia de posibles barreras ecológicas, geográficas y/o históricas en las poblaciones de *Codium sp.* se determina la conectividad entre ellas, contrastando el patrón geográfico con el genético a través de la filogeografía de haplotipos. Finalmente, con el objetivo de evidenciar la historia de colonización de la especie a través de una relación ancestro descendiente de haplotipos y poblaciones, se estiman las filogenias de haplotipos y poblaciones de *Codium sp.*, utilizando tres especies congénicas descritas en Chile.

### **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.2.1 Área de estudio y marcador genético**

Con el objetivo de estimar en *Codium sp.* la variabilidad genética, dinámica poblacional, conectividad entre poblaciones, filogeografía y filogenia de haplotipos, y poblaciones en un gradiente de distribución latitudinal, entre Mayo del 2005 y Mayo del 2006 se realizó un muestreo poblacional en 10 localidades de Chile continental, localizadas relativamente equidistantes entre ellas, abarcando el rango de distribución de la especie en Chile (Tabla 5, Figura 19). En cada localidad, se seleccionaron entre diez a trece talos adheridos en sustratos independientes y distantes entre si en al menos 50 cm, los que fueron sometidos a un muestreo destructivo, extrayendo de cada talo una muestra de tejido. De un total de 112 muestras de tejido secadas en sílica, se extrajo el DNA genómico total como lo describe Wattier *et al.* (2002). La identificación genética de cada talo fue realizada a través de la amplificación del gen cloroplastidial TRN-Gly (~300 bp). Este marcador fue seleccionado por dos razones: 1) los marcadores cloroplastidiales *rbcL* (~700 bp) y mitocondriales *rLSU* (~800bp), previamente

utilizados en las muestras para detectar variabilidad interespecífica, no fueron lo suficientemente polimórficos en las poblaciones analizadas, 2) éste fue el único gen cloroplastidial no codificante que presentó variabilidad para trazar la historia invasiva de *Codium fragile*, donde se probaron siete microsatélites cloroplastidiales y tres genes no codificantes cloroplastidiales (Provan *et al.* 2005)

Basado en lo anterior, este gen cloroplastidial TRN-Gly (~300 bp), fue amplificado siguiendo el protocolo de Provan *et al.* (2005), en un volumen total de reacción de 15 µl, el que contenía 0,2 µl de cada primer (10 pmol/µl), 1,5 µl de buffer 10x, 1,5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,9 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,35 µl de BSA (100x), 0,15 µl Gibco Brl Taq polimerasa (50 U) y 1 µl DNA. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 9700. El programa de ciclos de secuenciación consistió en un paso inicial a 95 °C por 1 minuto, 36 ciclos de secuenciación (95 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto, y 72 °C por 1 minuto), con un paso final a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue cuantificado visualmente en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Finalmente el producto PCR fue purificado en QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN y secuenciado automáticamente en un secuenciador ABI PRISM® 3100 (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>), perteneciente al Laboratorio de Diversidad Molecular, Departamento de Ecología, Facultad Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias fueron alineadas manualmente en el software ProSeq v.2.91 (Filatov 2002).

### **3.2.2 Análisis de la variabilidad genética**

#### ***a) Diversidad genética***

Los análisis del polimorfismo del DNA se realizaron en el software DnaSP 4.10 (Rosas *et al.* 2003), el que incluyó la estimación de la frecuencia de haplotipos (Hap), diversidad de haplotipos ( $H_e$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de Nei (1987) dentro de cada población, entre poblaciones y entre especies; y riqueza genética (R) para cada localidad y especie (Anexo A). Adicionalmente, se estimó la tasa de haplotipos exclusivos ( $N^\circ$ haplotipos exclusivos/  $N^\circ$  total de haplotipos) y la tasa de haplotipos compartidos ( $N^\circ$ haplotipos compartidos/  $N^\circ$  total de haplotipos) para cada localidad en estudio.

#### ***b) Dinámica demográfica***

Los test estadísticos Fu (Fu 1997) y D (Tajima 1989) fueron analizados como un índice de salida desde una población en equilibrio. Ambos índices estadísticos, correlacionados con la teoría de evolución molecular neutral (Kimura 1980), es decir, correlación entre el número de sitios segregadores y el numero promedio de diferencias nucleotídicas, fueron estimados en el software ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 2005).

Para detectar la dinámica demográfica intrapoblación se analizaron las distribuciones mismatch (diferencias de pares de bases) en el software DnaSP 4.10 (Rosas *et al.* 2003), que compara la distribución de frecuencias de distancia entre secuencias, estimándose así el grado de expansión poblacional.



### ***c) Estructura genética y aislamiento por distancia***

Dentro de la especie se realizó un análisis de varianza entre grupos de poblaciones (AMOVA) en el software ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 1992, 2005) para explicar si la variación genética encontrada es debida a diferencias entre grupos, poblaciones o individuos. Adicionalmente, como medida de las diferencias entre poblaciones, se estimaron las diferencias en pares de bases (PD), análogo al  $F_{st}$  descrito por Wright (1951) que combinado con las distancias geográficas, fue capaz de estimar el aislamiento por distancia, siendo la ecuación de la recta y probabilidades asociadas, estimadas con el test de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995) con 1000 permutaciones aleatorias en el software Genepop versión 3.4 (Raymond & Rousset 1995, Rousset 1997).

### ***d) Filogeografía y Filogenia de haplotipos y poblaciones***

Con el objeto de graficar las relaciones y distribución geográfica de los haplotipos, se estimó la red de haplotipos (network) bajo el criterio de median joining (Bandelt *et al.* 1999), graficándolo en el software Network 4.1.1.2 copyright 2004 Fluxus Technology Ltd. Adicionalmente, para visualizar las distancias genéticas entre los haplotipos dentro de las poblaciones, se construyó el árbol de distancias genéticas entre haplotipos y entre poblaciones. En ambos casos, de manera comparativa se utilizaron secuencias de las especies rastreras *C. difforme* y *C. dimorphum* encontradas en la provincia magallánica de Chile, y una secuencia de la especie invasiva *C. fragile* (Genebank access N° X54050), utilizadas como grupo externo (outgroup) por ser las especies más cercanas taxonómicamente. La distancia genética entre haplotipos y

poblaciones se determinó mediante el método de neighbour-joining en el software Mega 2.0 (Kumar *et al.* 2001), a partir de matrices de distancias genéticas (distancia Kimura 2 parámetros).

### 3.3 RESULTADOS

#### a) *Diversidad genética*

El análisis de las secuencias en *Codium sp.* mostró que el gen cloroplastidial TRN-Gly fue lo suficientemente polimórfico para detectar un total de 17 haplotipos distintos (Tabla 6) distribuidos en un rango aproximado de 2000 km de línea costera. En este contexto, a nivel global *Codium sp.*, con un total de 112 secuencias nucleotídicas del gen TRN-Gly y un largo de 254 bp (sin gaps), presentó un 94% de los pares de base correspondientes a sitios invariables (238 bp) y sólo 6% a sitios variables. Adicionalmente, los sitios variables estuvieron compuestos en un 50% por sitios informativos parsimoniosos, de los cuales 7 posiciones presentaron variabilidad con 2 bp distintos, mientras que sólo 1 posición presentó variabilidad en 3 bp (Tabla 6).

La presencia de 17 haplotipos distintos le confirió a *Codium sp.* una diversidad genética total moderada ( $He_{total} = 0,624 \pm 0,05$ ), alcanzando una diversidad nucleotídica ( $\pi_{total} = 0,55 \times 10^{-4}$ ) y riqueza genética total ( $R_{total} = 3,4$ ) relativamente baja. El análisis comparativo entre poblaciones (Tablas 7 y 8) sugiere un patrón bimodal tanto en diversidad genética ( $He$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y riqueza genética ( $R$ ) con máximos en poblaciones extremas al norte (Paposo) y al sur (Loncoyén) del país, reduciéndose hasta el mínimo hacia poblaciones localizadas en la zona central de Chile

(Figura 20). El análisis de exclusividad haplotípica, sugiere que esta variación latitudinal de manera bimodal, podría corresponder a un aumento de haplotipos exclusivos en las poblaciones periféricas hacia el norte y sur del país. En este contexto, de los 17 haplotipos y la distribución geográfica de su frecuencia (Figura 21), se observó que el 70,6% de los haplotipos encontrados correspondieron a haplotipos exclusivos aún cuando éstos presentaron una frecuencia baja con sólo 1 o 2 individuos, y localizados mayoritariamente en las poblaciones más periféricas hacia el norte y sur del país (Figura 22). Los cinco haplotipos restantes (29,4%) fueron haplotipos encontrados en todo el rango de distribución de la especie y compartidos por todas las poblaciones. Entre éstos destacó el haplotipo "HAP 5", el cual se encontró con alta frecuencia (30-100%) en todas las poblaciones, siendo en la localidad de Maitencillo (Chile central) el único haplotipo encontrado (Figura 21).

#### ***b) Dinámica demográfica***

El aumento de la diversidad genética con haplotipos exclusivos en las poblaciones más periféricas del sur del país, fue correlacionado con las pruebas de neutralidad de poblaciones  $D$  y  $F_s$  ( $F_u$ ) reduciéndose hacia las poblaciones centrales (Tabla 7). Sin embargo, las poblaciones localizadas desde la zona centro hacia el norte no presentaron un patrón definido. A pesar de lo anterior, el análisis demográfico intrapoblacional (Figura 23), mostró que a partir de la zona centro, tanto las poblaciones ubicadas hacia el norte como las del sur del país se encuentran en expansión, sugiriendo un aumento de mutaciones o mutaciones recientes (Figura 23), hecho resaltado en los análisis anteriores. La población de Maitencillo localizada en la zona central de la

distribución de *Codium sp.*, se mostró completamente monomórfica (1 haplotipo), por lo cual el análisis de esta población completamente estática es por defecto del software no realizada.

### ***c) Estructura genética y aislamiento por distancia***

El análisis jerárquico AMOVA, mostró que el 81% de la variabilidad genética observada en *Codium sp.* se debió a diferencias encontradas a nivel intrapoblacional y sólo un 18,42% a variabilidad entre poblaciones (Tabla 9), sugiriendo una baja estructuración genética entre las poblaciones. Similares resultados son observados en el análisis de diferencias genéticas entre pares de bases (Tabla 10), encontrándose diferencias intrapoblacionales en Paposó y Loncoyén tan altas como las encontradas entre poblaciones del norte versus del sur.

En el análisis de aislamiento por distancias, nuestros resultados sugieren una correlación positiva y significativa (Test de Mantel) entre las variables distancia genética y distancia geográfica (Figura 24a). Sin embargo, al descomponer las diferencias entre pares de bases en dos zonas: norte– centro y centro-sur, se observó que el evidente aislamiento por distancia global se debió básicamente a una diferenciación genética significativa ocurrida en la zona centro-sur del país (Figura 24b).

### ***d) Filogeografía y filogenia de haplotipos y poblaciones***

El análisis de relaciones entre haplotipos o network en *Codium sp.* (Figura 25) mostró una distribución genealógica de haplotipos “tipo estrella”, patrón que ubicó al haplotipo (Hap 5) en el centro de la distribución con gran frecuencia y compartido por

todas las poblaciones analizadas, rodeado por el resto de los haplotipos encontrados en este estudio, diferenciados del HAP 5 en sólo 1 a 4 mutaciones. Esta topología tipo estrella es un patrón característico que sugiere una baja estructuración genética entre las poblaciones, con un haplotipo ancestral (HAP 5) que recién comenzaría a colonizar nuevas áreas geográficas donde ocurren rápidas mutaciones del haplotipo diversificándose genéticamente las poblaciones.

La filogenia de haplotipos y poblaciones mostró que el gen cloroplastidial TRN-Gly a nivel interespecífico muestra el mismo patrón de diferencias genéticas entre las especies a aquel observado a nivel morfológico y genético con marcadores moleculares mitocondriales (rLSU) y cloroplastidiales (rbcL) (Capítulo II). En este contexto, las diferencias entre las tres especies del subgénero *Tylecodium* presentes en Chile fueron tan grandes como la diferencia que existe entre ellas y *C. fragile*, especie que pertenece a otro subgénero (Figuras 26 y 27). El análisis de haplotipos y poblaciones en *Codium sp.* mostró que tanto los haplotipos como las poblaciones presentan una gran similitud entre ellos, reflejada como politomía basal en ambos casos (Figuras 26 y 27). Basado en lo anterior, los resultados no permiten sugerir un patrón o direccionalidad de la dispersión y colonización de *Codium sp.* en Chile a partir de un haplotipo o población ancestral.

### 3.4 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Aún cuando se espera que especies con un amplio rango geográfico de distribución, presenten poblaciones capaces de habitar distintos ambientes, generando divergencia genética entre poblaciones debido a posibles barreras ecológicas, geográficas y/o históricas, los datos obtenidos en este trabajo dan cuenta que en Chile, el

alga verde *Codium sp.* se compone por poblaciones geográficas distantes cuyos miembros presentan escasa estructuración filogeográfica, ocupando rangos geográficos en que la historia de vida conduce a dispersión y/o ausencia de barreras para el flujo genético entre las poblaciones, sin un patrón o direccionalidad.

Si bien *Codium sp.* es una especie con variabilidad genética, ésta se debe mayoritariamente a variabilidad genética del tipo intrapoblacional, observada en poblaciones más periféricas al norte y sur de su rango de distribución. Estos resultados sugieren un aislamiento genético por distancia inicial con expansión demográfica. Aún cuando estas poblaciones se distribuyen en un amplio rango geográfico, la conectividad encontrada entre las poblaciones fue alta, reflejada en una baja estructuración genética. Entre los datos más sugerentes de esta aseveración se encuentra la genealogía de haplotipos “tipo estrella”, patrón que teóricamente ha sido relacionado a una baja estructuración genética, expansión reciente de las poblaciones y ausencia de barreras geográficas (Avice *et al.* 1997).

Biogeográficamente, la ausencia de barreras ecológicas, geográficas y/o históricas entre las poblaciones de *Codium sp.* sugiere una continuidad biogeográfica intraespecífica entre los 25°S -41°S, resultado que concuerda con la evaluación de unidades biogeográficas descritas para algas verdes (Meneses & Santelices 2000, Santelices & Meneses 2000) y polichaetos bentónicos (Hernández *et al.* 2005). Contrario a lo esperado en ambientes marinos con gran correlación entre geografía, dispersión y grupos florísticos (Faugeron *et al.* 2001, Faugeron *et al.* 2004), tanto en algas verdes como en polichaetos, la similitud entre los organismos estudiados sugiere que en la costa Pacífico Sudeste que corresponde a Chile (18°20'-56°S), existe una banda biogeográfica

continua entre los 18°S a 41°S. Estos resultados cuestionarían la presencia de un quiebre biogeográfico y oceanográfico (Hormazábal *et al.* 2004), entre los 30°S y 33°S, altamente discutido y descrito para organismos marinos (Brattström & Johansen 1983, Broitman *et al.* 2001, Camus 2001, Martínez *et al.* 2003)

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las especies del subgénero *Tylecodium* presentes en Chile también pueden ser identificadas y distinguidas con el gen cloroplastidial TRN-Gly. En este contexto, se podría especular que la presencia discontinua de especies de *Codium* en Chile (*Codium sp.*, *C. dimorphum* y *C. difforme*) se explique por diversas barreras ecológicas, geográficas y/o históricas con especiación a los 41°S (Chiloé). La situación que ocurre a los 41°S ha conllevado a sugerir la existencia de un ecotono localizado en el archipiélago de Chiloé, las razones de este límite natural entre ecosistemas ha sido inferida a la gran divergencia entre sistemas de corrientes oceánicas alrededor de los 41°S (convergencia subtropical), generando gran variabilidad en la costa (Castilla *et al.* 1993, Ahumada *et al.* 2000, Camus 2001), correlacionada con una discontinuidad biológica en porifera, desmopongiae, decápodos crustáceos, briozoos, equinodermos (ver Moyano 1991) y en las tres divisiones de macroalgas Chlorophyta, Heterokontophyta y Rhodophyta (Meneses & Santelices 2000). Adicionalmente, esta zona ha sido históricamente relacionada a una combinación de procesos climáticos como actividades tectónicas y glaciales, que han provocado la formación de gran cantidad de archipiélagos, golfos, y canales (Camus 2001). Basado en lo anterior, se explican los cambios en hábitats (tipo de sustrato, amplitud de marea, temperatura del agua, salinidad, exposición al oleaje) (Santelices & Meneses 2000, Santelices & Meneses 2000, Hernández *et al.* 2005).

Aún cuando el gen cloroplastidial TRN-Gly fue polimórfico en la especie *Codium sp.* distribuida en un amplio rango geográfico a lo largo de la costa de Chile, su baja variabilidad sugiere la ausencia de barreras geográficas o ecológicas muy fuertes que determinen un aislamiento de poblaciones. Este fenómeno ha sido descrito para especies mayoritariamente clonales (Arnaud-Haond *et al.* 2005), y en especies invasivas del género *Caulerpales* (Wiedenmann *et al.* 2001, Jousson *et al.* 1998, Fama *et al.* 2002). El ejemplo más cercano taxonómicamente lo constituye la especie invasiva y congénérica *C. fragile* la que presenta sólo 4 haplotipos en su rango de distribución nativa (Japón), dos eventos de introducción a nivel mundial y sólo dos haplotipos en poblaciones Mediterráneas, Atlánticas, y Pacíficas (Provan *et al.* 2005). Esta especie se ha caracterizado por una gran capacidad de colonización, introducción e invasión a través de propagación vegetativa de los clones (Bégin & Scheibling 2003, Prince & Trowbridge 2004). En este contexto, nuestros resultados sugieren la necesidad de estudios posteriores enfocados a identificar y entender los ciclos de vida predominantes y la dispersión de *Codium sp.*, especie que en condiciones de cultivo es capaz de mantenerse y crecer vegetativamente (Capítulo IV).

Finalmente, en un contexto ecológico y dentro del objetivo mayor de la tesis, que se refiere a contacto y/o fusiones de talos entre entidades genéticamente distintas, a nivel intraespecífico, la presencia de más de un haplotipo en *Codium sp.* en la mayoría de las localidades estudiadas sugiere que de ser posible el contacto y/o fusión de talos, éste podría estar ocurriendo naturalmente entre entidades genéticamente distintas, dando como resultado la formación de una entidad quimérica, hipótesis que será desarrollada en extenso el capítulo V de esta tesis.



### 3.5 REFERENCIAS

- AHUMADA RB, PINTO LA & CAMUS PA. 2000. The Chilean coast: In Sheppard CRC (ed). Seas at the millennium: environmental evaluation. Pergamon Press 699:717.
- ARBOGAST BS & KENAGY GJ. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *J. Biogeogr* 28: 819-825.
- ARNAUD-HAOND S, ALBERTO F, TELXEIRA S, PROCACCINI G, SERRÃO EA & DUARTE CM. 2005. Assessing genetic diversity in clonal organisms: Low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *J. Heredity* 96(4): 434-440
- AVISE JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- AVISE J, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA AND SAUNDERS N. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- BANDEL T H-J, FORSTER P & RÖHL A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48
- BDP & WEST H. 2006. Biodiversidad ¿Qué es y por qué se está perdiendo? En *Biodiversidad en el Desarrollo: Biodiversidad en Breve* 19. <http://europa.eu.int/comm/development/sector/environment>.

- BEERLI P & FELSENSTEIN J. 1999. Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using coalescent approach. *Genetics* 152: 763-773.
- BEGIN C & SCHEIBLING RE. 2003. Growth and survival of the invasive green alga *Codium fragile* subsp. *tomentosoides* in tide pools on a rocky shore in Nova Scotia. *Bot. Mar.* 46: 404-412.
- BRATTSTROM H & JOHANSEN A. 1983. Ecological and regional zoogeography of the marine benthic fauna of Chile. *Sarsia* 68: 289-339.
- BROITMAN BR, NAVARRETE SA, SMITH F, GAINES SD. 2001. Geographic variation of southeastern Pacific intertidal communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224: 21-34.
- CAMUS P. 2001. Biogeografía marina de Chile continental. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74: 587-617.
- CASTILLA JC, NAVARRETE SA & LUBCHENCO J. 1993. Southern Pacific coastal environment: main future large-scale perturbations, and global climate change. In Mooney HA, Fuentes ER, and Kronberg BI (eds), *Earth system responses to global change. Contrast between North and South America*. Academic Press 167- 188.
- DONNELLY P & TAVARE S. 1995. Coalescents and genealogical structure under neutrality. *Annu. Rev. Genet.* 29: 401-421.
- EXCOFFIER L, G LAVAL & SCHNEIDER S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

- EXCOFFIER L, SMOUSE PE & QUATTRO JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FAMA P, JOUSSON O, ZANINETTI L, MEINESZ A, DINI F, GIUSEPPE GDI, MILLAR AJK, & PAWLOWSKI J. 2002. Genetic polymorphisms in *Caulerpa taxifolia* (Ulvophyceae) chloroplast DNA revealed by a PCR- based assay of the invasive Mediterranean strain. *J. Evol. Biol.* 15: 618-624.
- FAUGERON S, MARTINEZ EA, CORREA JA, CARDENAS L, DESTOMBE C & VALERO M. 2004. Reduced genetic diversity and increased population differentiation in peripheral and overharvested populations of *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales) in Southern Chile. *J. Phycol.* 40: 454-462.
- FAUGERON S, VALERO M, DESTOMBRE C, MARTINEZ EA & CORREA J. 2001. Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 37: 705-716.
- FIGUEROA D. 2002. Forcing of physical exchanges in the nearshore Chilean Ocean. In: *The Oceanography and Ecology of the nearshore and bays in Chile. International Symposium on linkages and dynamics of coastal systems: Open coast and embayments.* Castilla J & Largier J (eds). Ediciones Universidad Católica de Chile: 47-63.
- FILATOV DA. 2002. ProSeq. A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. notes* 2: 621-624.
- FU YX. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

- GOLDSON AJ, HUGHES RN & GLIDON CJ. 2001. Population genetic consequences of larval dispersal mode and hydrography: a case study with bryozoans. *Mar. Biol.* 138: 1037-1042.
- HERNANDEZ CE, MORENO R & ROZBACZYLO N. 2005. Biogeographical patterns and Rapoport's rule in Southeastern Pacific benthic polychaetes of the Chilean coast. *Ecography* 28: 363-373.
- HORMAZABAL S, SHAFFER G & LETH O. 2004. Coastal transition zone off Chile. *J. Geophysical Res.* 109; 1-13.
- JOUSSON O, PAWLOWSKI J, ZANINETTI L, MEINESZ A & BOUDOURESQUE CF. 1998. Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172: 275-280.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 116: 111-120.
- KINGMAN JFC. 1982a. The coalescent. *Stoch. Proc. Applns.* 13: 235-248.
- KINGMAN JFC. 1982b. On the genealogy of large population. *J. Appl. Probab.* 19A: 27-43.
- KUMAR S, TAMURA K, JACOBSEN IB & NEI M. 2001. Molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona State University, Tempe, USA.
- LANCELLOTTI DA & VASQUEZ JA. 1999. Biogeographical patterns of benthic macroinvertebrates in the South Pacific littoral. *J. Biogeogr.* 26: 1001-1006.

- MARTINEZ ES, CARDENAS L & PINTO R. 2003. Recovery and genetic diversity of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) 20 years after El Niño 1982/83. *J. Phycol.* 39: 504-508.
- MENESES I & SANTELICES B. 2000. Patterns and breaking points in the distribution of benthic algae along the temperate Pacific coast of South America. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73: 615-623.
- MEYNARD A. 2005. Phylogéographie de l'algue brune *Lessonia nigrescens* (Laminariales): étude d'une zone de transition biogéographique (30°S, Chili). Tesis Master 2. Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie (SDUEE), Master 2 Mention Spécialité Ecologie, Biodiversité et Evolution (EBE). Université Pierre & Marie Curie, France, Paris. 30 pp.
- MORITZ C & FAITH DP. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol. Ecol.* 7:419-429.
- MOYANO HI. 1991. Bryozoa marinos chilenos VIII. Una síntesis zoogeográfica con consideraciones sistemáticas y la descripción de diez especies y dos géneros nuevos. *Gayana Zool.* 55: 305-389.
- NEI M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- PALUMBI SR. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annu Rev. Ecol, Syst* 25: 547-572.
- PRINCE JS & TROWBRIDGE CD. 2004. Reproduction in the green macroalga *Codium* (Chlorophyta) characterization of gametes. *Bot. Mar.* 47(6): 451-460.
- PROVAN J, MURPHY S & MAGGS C. 2005. Tracking the invasive history of green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*. *Mol. Ecol.* 14: 189-194.

- RAYMOND M & ROUSSET F. 1995. GENEPOP (version 1.2). Population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J. of Heredity* 86: 248-249.
- ROSAS JJ, SANCHEZ-DELBARRIO C, MESSEGUER X & ROSAS R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- ROUSETT F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228
- SANTELICES B. 1982. Caracterización fitogeográfica de la costa temperada del Pacífico Sudamericano. Verificación de hipótesis y consecuencias ecológicas. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales Chile*. 15: 513-524.
- SANTELICES B. 1980. Phytogeographic characterization of the temperate coast of Pacific South America. *Phycologia* 19:1-12.
- SANTELICES B. & MENESES I. 2000. A reassessment of the phytogeographic characterization of Temperate Pacific South America. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73: 605-614.
- SANTELICES B, S MONTALVA & OLIGER P. 1981. Competitive algal community organization in exposed intertidal habitats from central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6: 267-276.
- SLATKIN M & BARTON NH. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- SOKAL RR & ROHLF FJ. 1995. *Biometry*, 3° edition. WH Freeman and Company (ed.), New York, USA.

- TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- TEMPLETON AR. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381: 397.
- VALERO M, ENGEL C, BILLOT C; KLOAREG B & DESTOMBE C. 2001. Concepts and issues of population genetics in seaweeds. *Cah. Biol. Mar* 42: 53-62.
- WATTIER RA, PRÖDOHOL P & MAGGS C. 2002. Dna Isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:275-281.
- WIEDENMANN J, BAUMSTARK A, PILLEN TL, MEINESZ A & VOGEL. W. 2001. DNA fingerprints of *Caulerpa taxifolia* provide evidence for the introduction of an aquarium strain into the Mediterranean sea and its close relationship to an Australian population. *Mar. Biol.* 138: 229-234.
- WRIGTH S. 1951. The genetical structure of population. *Ann. Eugen* 15: 323-354.

Localidad	Abreviación	Ubicación geográfica	N
Paposo	PAP	25°07'S-70°29'W	10
Pan de Azúcar	AZU	26°08'S-70°39'W	10
Zenteno	ZEN	26°51'S-70°48'W	10
Coquimbo	COQUIM	29°58'S-71°22'W	11
Pichicuy	PICHY	32°20'S-71°27'W	12
Maitencillo	MAT	32°39'S-71°29'W	15
Torpederas	TOR	33°01'S-71°38'W	14
Alto Colorado	ALTO	34°12'S-71°58'W	10
Coliumo	COL	36°32'S-72°57'W	10
Loncoyén	LON	38°43'S-73°24'W	10

Tabla 5. Ubicación geográfica y número de muestras extraídas en cada localidad estudiada en la especie *Codium sp.*



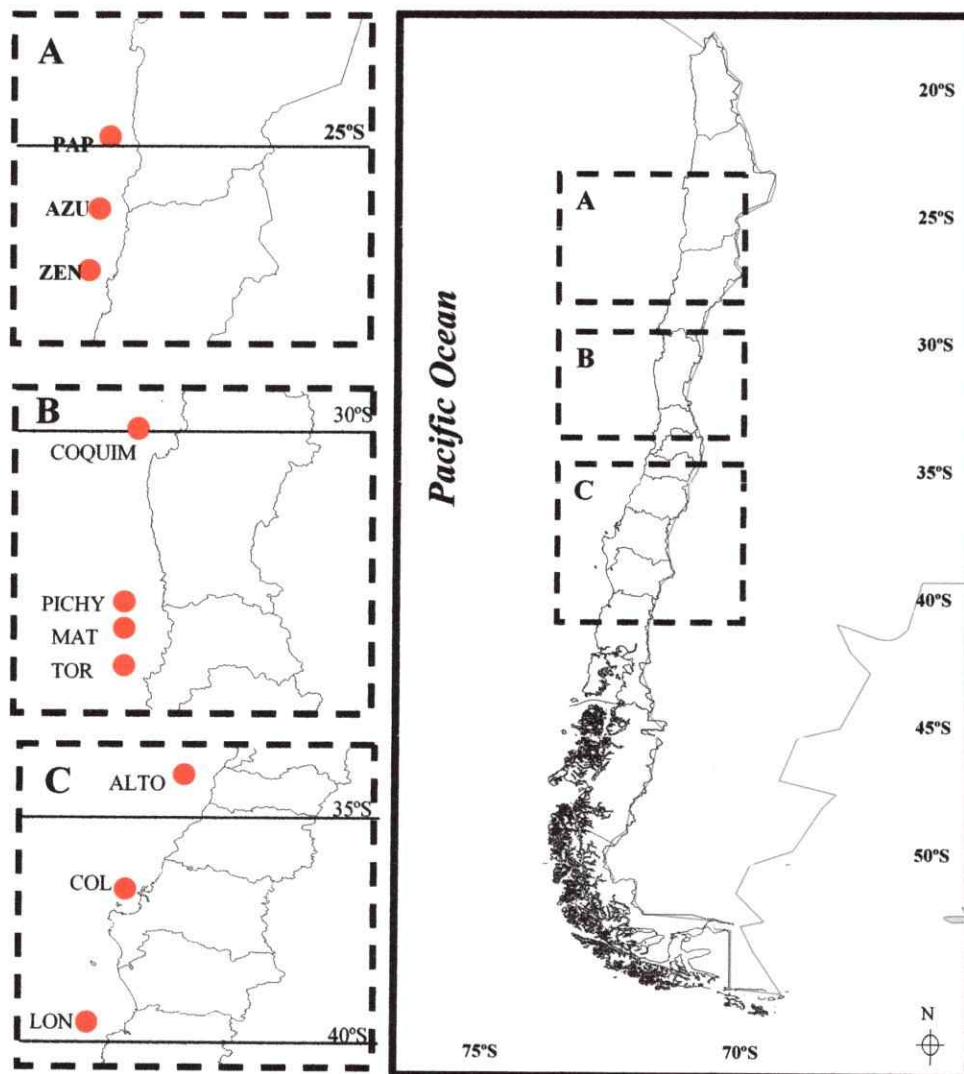


Figura 19. Distribución geográfica de las 10 localidades en que se recolectó *Codium* sp. (A) Zona norte: PAP (Paposo), AZU (Pan de azúcar), ZEN (Zenteno). (B) Zona centro: COQUIM (Coquimbo), PICHY (Pichicuy), MAT (Maitencillo), TOR (Torpederas). (C) Zona sur: ALTO (Alto Colorado), COL (Coliumo), LON (Loncoyén).

Haplotipo	Frecuencia	Posición nucleotídica															
		11	12	13	14	15	18	23	30	36	38	42	43	65	70	88	115
HAP 1	13	A	A	A	T	C	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 2	4	A	A	T	C	A	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 3	1	A	T	T	C	C	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 4	1	A	A	T	T	C	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 5	67	A	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 6	1	G	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 7	6	A	A	A	A	A	A	A	T	C	T	T	T	A	A	A	T
HAP 8	1	A	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	G
HAP 9	1	A	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 10	7	A	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T	T	A	A	A	T
HAP 11	1	A	A	A	T	C	A	A	T	T	T	T	T	A	A	G	T
HAP 12	1	A	A	A	T	C	A	A	A	T	T	T	T	A	T	A	T
HAP 13	1	A	A	A	T	C	A	A	T	T	T	T	T	A	T	A	T
HAP 14	1	A	A	A	A	A	A	A	T	T	T	T	C	A	A	A	T
HAP 15	1	A	A	A	A	A	A	A	T	T	C	T	T	A	A	A	T
HAP 16	3	A	A	A	A	A	T	A	T	C	T	T	T	A	A	A	T
HAP 17	2	A	A	A	A	A	A	A	T	C	T	T	T	G	A	A	T

Tabla 6. Posiciones nucleotídicas polimórficas en las secuencias de *Codium sp.* que dieron origen a 17 haplotipos distintos.

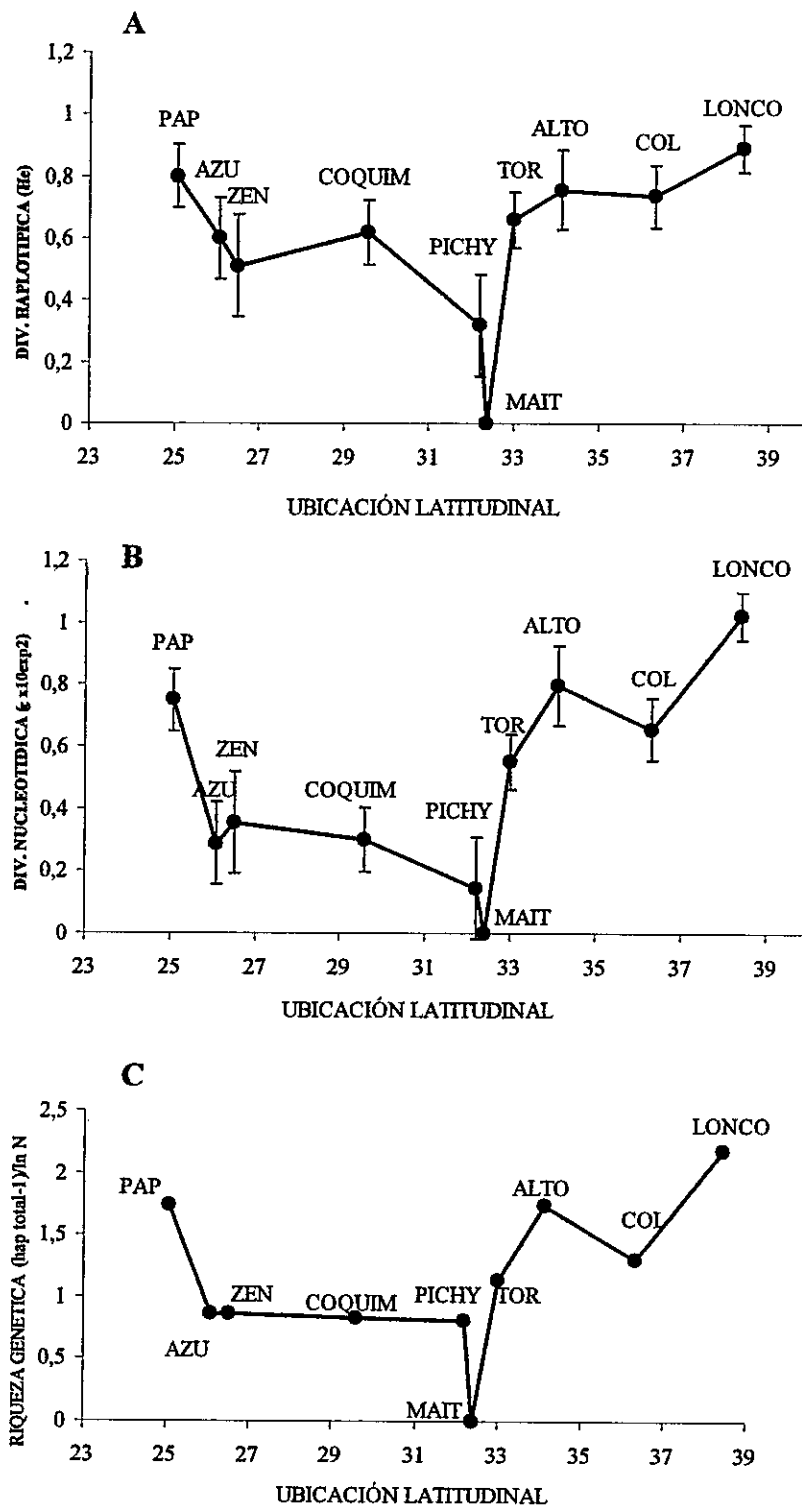


Figura 20. Comparación gráfica de la diversidad genética en la especie *Codium sp.* a lo largo de Chile (A) diversidad haplotípica ( $H_e$ ), (B) Diversidad nucleotídica  $\pi$ , (C) Riqueza genética.

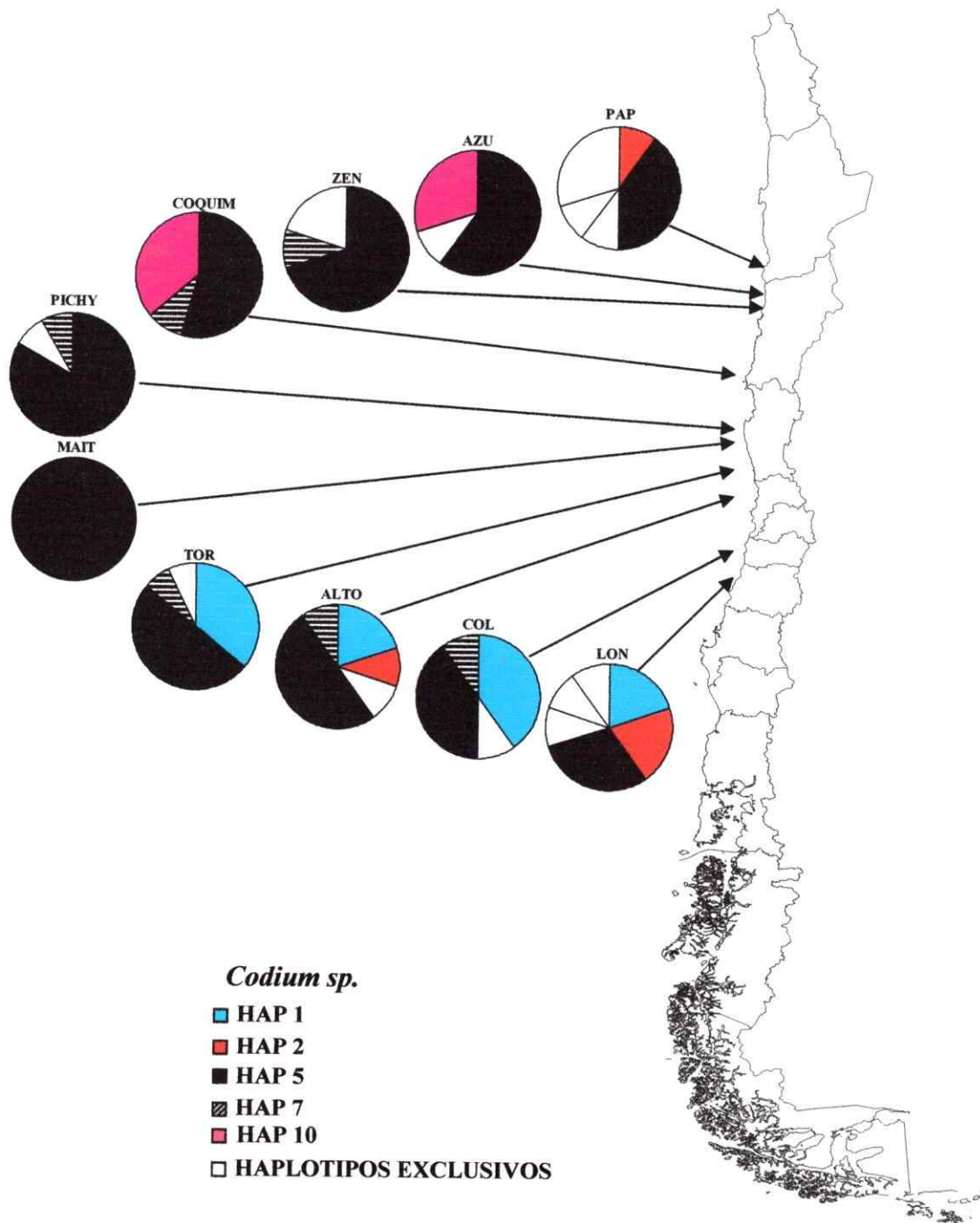


Figura 21. Distribución de los haplotipos en la especie *Codium sp.* analizadas a lo largo de Chile, haplotipos coloreados son compartidos, haplotipos en blanco son exclusivos.

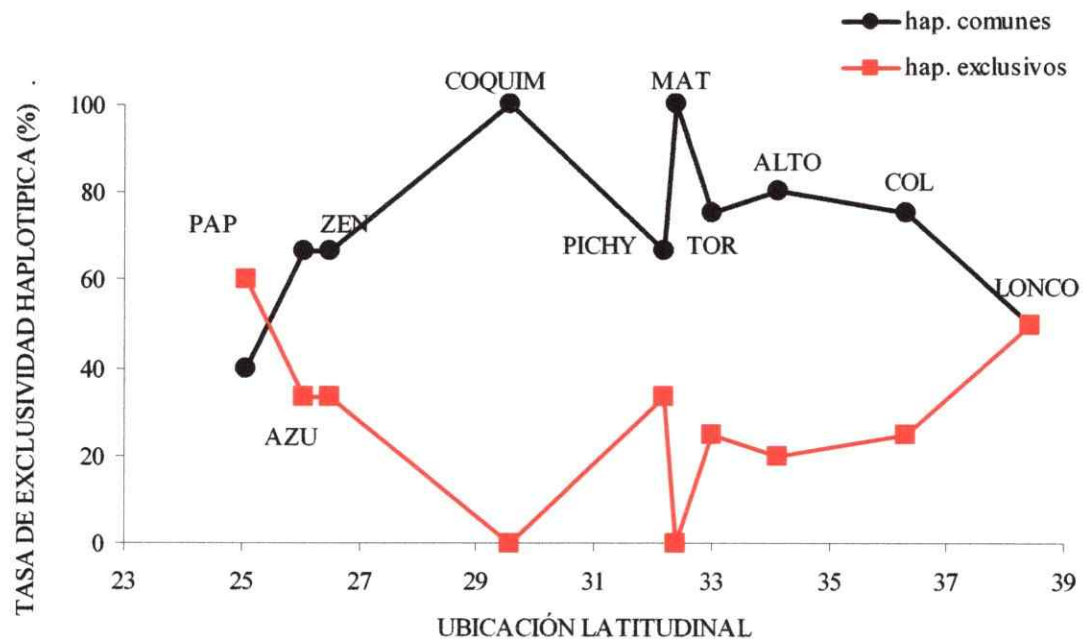


Figura 22. Comparación gráfica de la tasa de haplotipos exclusivos versus compartidos en la especie *Codium sp.* a lo largo de Chile

Localidad	He	Ds (He)	$\pi \times 10^{\text{exp}2}$	Ds ( $\pi \times 10^{\text{exp}2}$ )	D	Fs (Fu)
PAP	0,800	0,100	0,750	0,538	-0,756	-0,930
AZU	0,600	0,131	0,289	0,272	-0,184	-0,272
ZEN	0,511	0,164	0,356	0,313	0,526	0,108
COQUIM	0,618	0,104	0,299	0,276	0,036	-0,113
PICHY	0,318	0,164	0,144	0,174	-1,451	*-1,324
MAT	0	0	0	0	0	0
TOR	0,659	0,090	0,552	0,414	0,044	0,116
ALTO	0,756	0,130	0,799	0,565	0,175	-0,787
COL	0,733	0,101	0,654	0,485	0,264	*0,460
LON	0,889	0,075	1,020	0,686	0,458	0,136
<i>Global</i>	0,620	0,050	0,550	0,060		

Tabla 7. Datos de la diversidad genética en las poblaciones de *Codium sp.*

Localidad	N	hap total	hap comun	hap exclusivo	R
PAP	10	5	2	3	1,74
AZU	10	3	2	1	0,87
ZEN	10	3	2	1	0,87
COQUIM	11	3	3	0	0,83
PICHY	12	3	2	1	0,80
MAT	15	1	1	0	0
TOR	14	4	3	1	1,14
ALTO	10	5	4	1	1,74
COL	10	4	3	1	1,30
LON	10	6	3	3	2,17
<i>Global</i>	112	17	5	12	3,39

Tabla 8. Datos de la diversidad haplotípica y riqueza genética en las poblaciones de *Codium sp.*

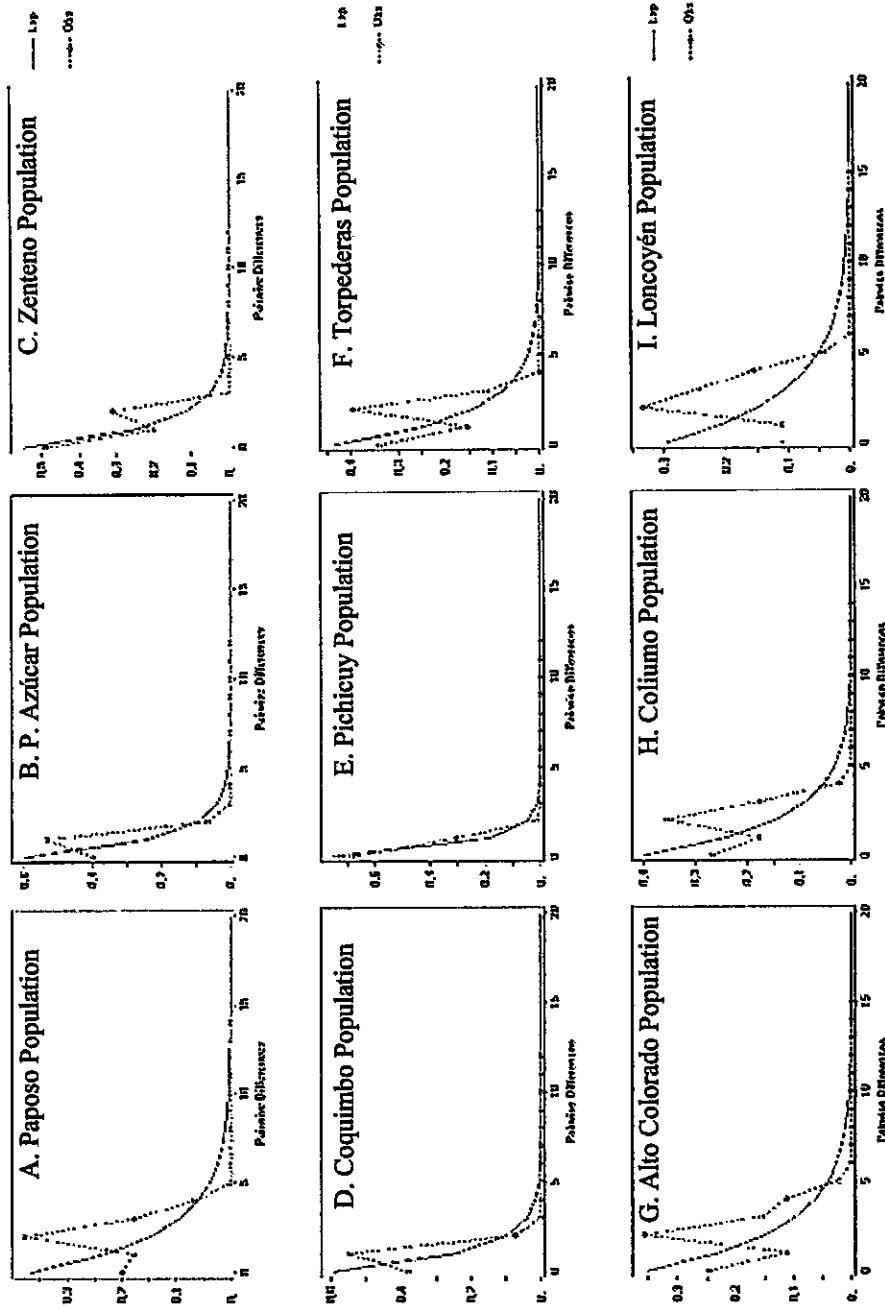


Figura 23. Distribución mismatch (diferencias en pares de bases) en la especie *Codium sp.* a lo largo de Chile (\* Localidad de Maitencillo ausente por ser monomórfica).

Fuente de variación	Df	Sum	Comp. Varianza	% Variación
Entre poblaciones	9	16	0,11902 Va	18,42
Dentro de poblaciones	102	53	0,52719 Vb	81,58
Total	111	70		
<b>Índice de fijación</b>	<b>FST</b>	<b>0,18418*</b>		

Tabla 9. Análisis jerárquico de la estructura genética (AMOVA) en la especie *Codium sp.*

	PAP	AZU	ZEN	COQUIM	PICHY	MAT	TOR	ALTO	COL	LON
PAP	1,73									
AZU	1,40	0,67								
ZEN	1,32	*0,90	0,82							
COQUIM	*1,40	0,64	0,90	0,69						
PICHY	*1,12	0,57	0,62	0,61	0,33					
MAT	*1,00	*0,40	0,50	**0,45	0,17	0,00				
TOR	*1,77	1,26	1,31	*1,29	1,01	**0,85	1,27			
ALTO	1,94	*1,50	*1,54	*1,53	*1,25	*1,10	1,51	1,84		
COL	*2,07	**1,60	*1,64	**1,63	**1,35	**1,20	1,33	1,64	1,51	
LON	*2,67	**2,20	**2,30	**2,25	**1,96	**1,80	1,87	2,10	1,86	2,36

Tabla 10. Diferencias en pares de base entre (blanco) y dentro (gris) de las poblaciones, en la especie *Codium sp.*, grado de significancia = \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,00$



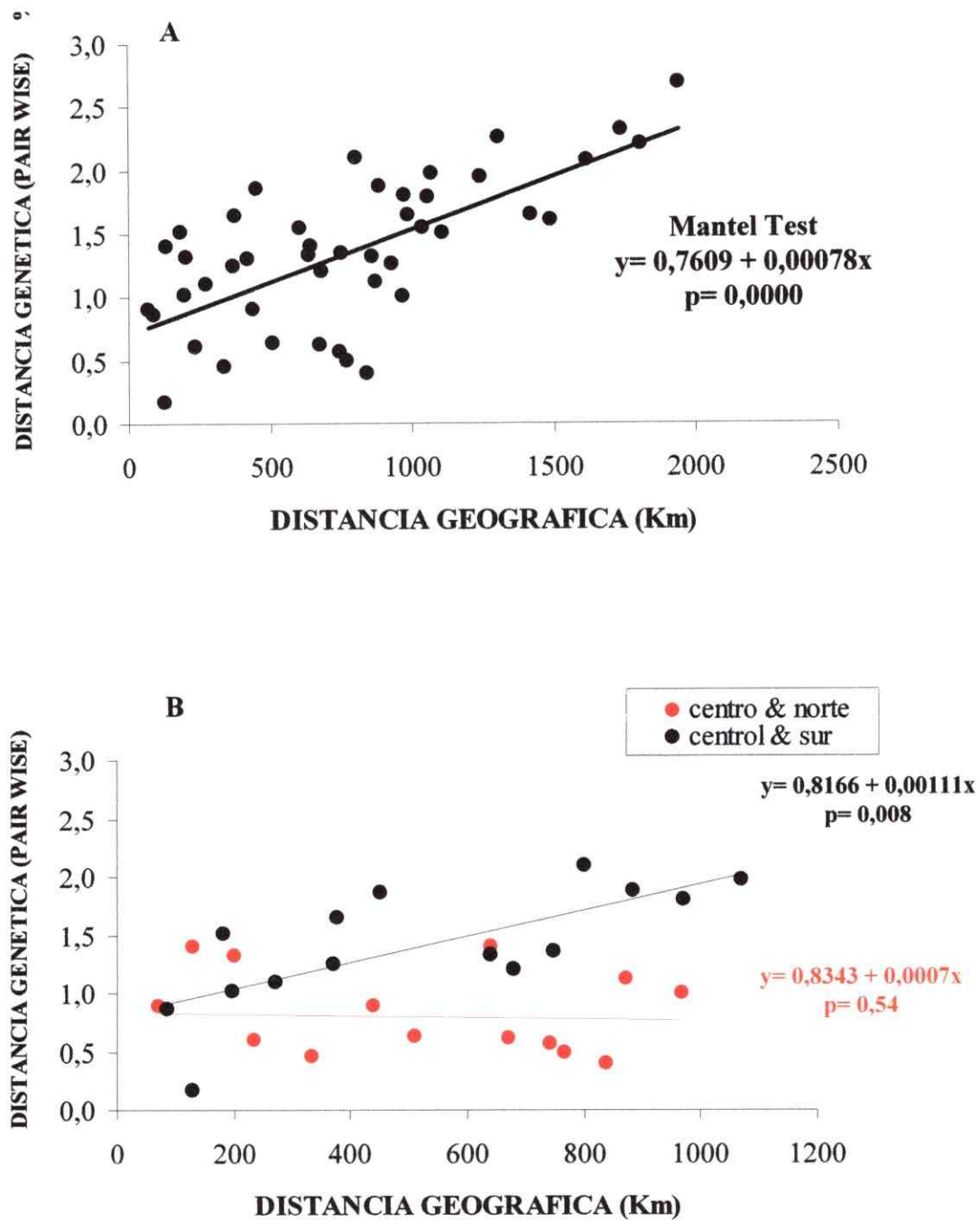


Figura 24. Representación gráfica de las diferencias genéticas versus distancia geográfica en entre las poblaciones de la especie *Codium sp.* (A) Análisis de todas las poblaciones (B) separación de los datos en poblaciones del centro-norte y centro-sur.

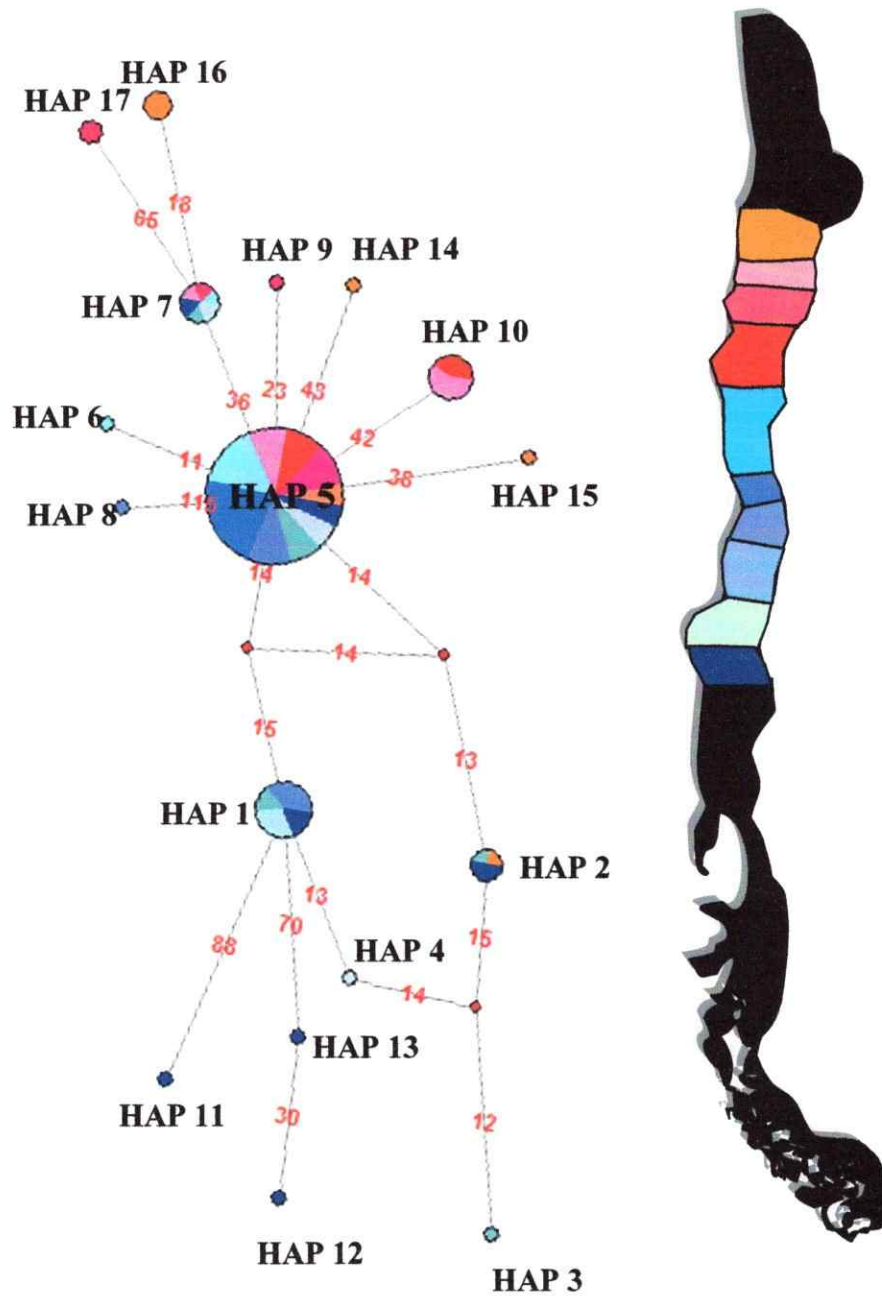


Figura 25. Red (Network) de haplotipos construido bajo el método median-joining. Los colores representan cada localidad, los círculos corresponden a los haplotipos y su tamaño a la frecuencia observada. El largo de las líneas que conectan a los haplotipos es proporcional a la distancia genética, mientras que el número en color rojo corresponde a la posición nucleotídica de la mutación que separa ambos haplotipos.

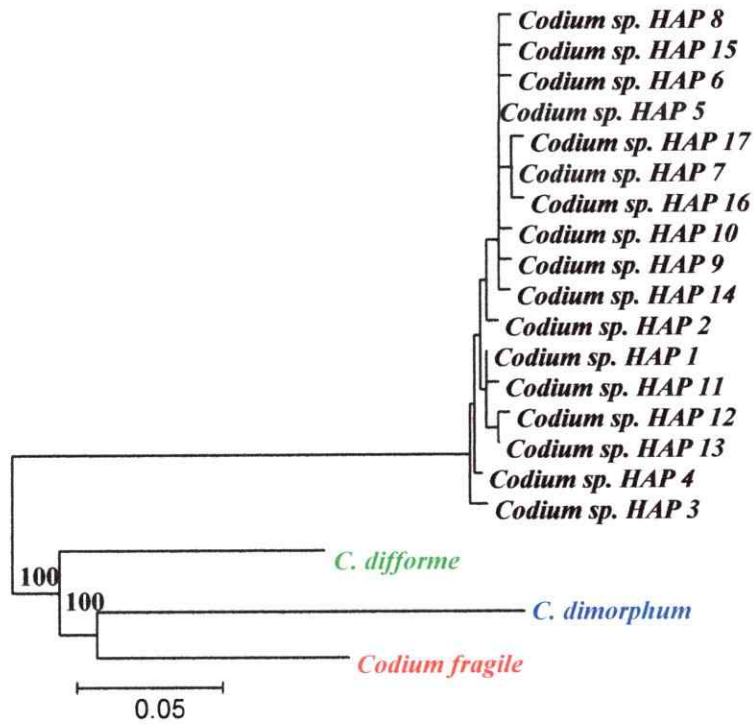


Figura 26. Filogenia de haplotipos basado en la distancia genética (Kimura 2 parámetros) construida con el método de neighbour- joining

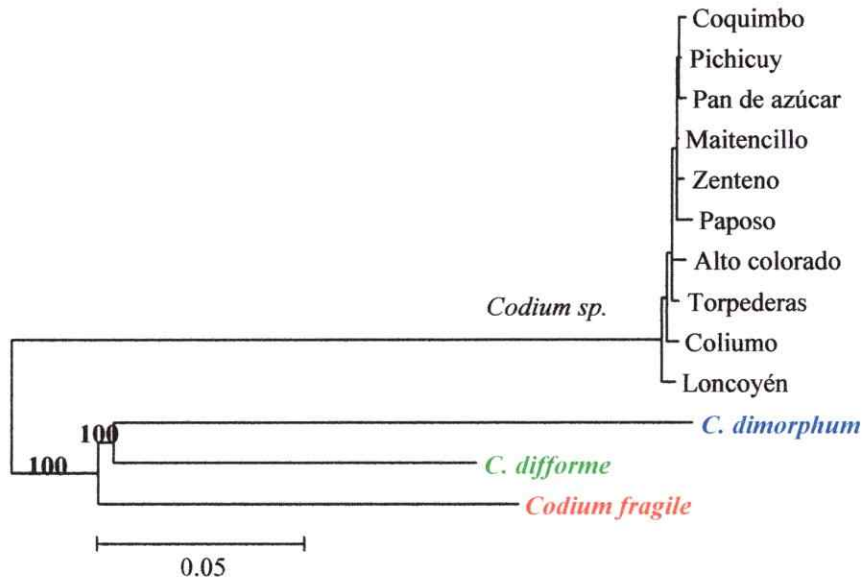


Figura 27. Filogenia de poblaciones basado en la distancia genética (Kimura 2 parámetros) construida con el método de neighbour- joining

## ANEXO A

### A.1. FILOGEOGRAFÍA Y PATRONES FILOGEOGRÁFICOS

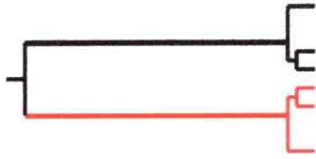
Históricamente, en 1820 el investigador suizo de Candolle fue el primer autor en proponer que la distribución geográfica de los organismos vivientes depende de parámetros tanto ecológicos como históricos. Los efectos de los parámetros históricos podrían ser analizados a través del estudio de la historia biogeográfica (unidad florística, faunística, geográfica, etc). El desarrollo de técnicas moleculares, y los conceptos de genética de poblaciones, estructura genética, dieron pie para el estudio de las estructuras geográficas. Aunque la ecología y la genética han sido disciplinas desarrolladas paralelamente, ambas se conjugan para dar origen a la Filogeografía (Nelson 1978)

León Croizat, un botánico italiano, y quien residió casi toda su vida en Venezuela, formuló en 1963, en su obra, *Space, time and form, the biological synthesis*; una síntesis sobre la distribución de los mayores grupos de plantas vasculares hasta entonces conocida. Este libro reflejaba la importancia de considerar que la historia de los seres vivos y su distribución en el espacio eran; junto con la historia geológica del planeta, un solo evento, y que ambos aspectos deberían ser tenidos en cuenta para formular hipótesis de alguna validez. Muy a pesar de la percepción de Croizat, la biogeografía seguía siendo una disciplina con un carácter narrativo y muy poco analítico. Con el advenimiento de la teoría de la tectónica de placas y la deriva continental, así como la sistemática filogenética de Hennig en 1955 y el rescate de las ideas de Croizat, la biogeografía sufrió un absoluto cambio en sus fundamentos, y para la década de los años 70-80 se daba una profunda revolución conceptual y metodológica que hasta ahora persiste.

Las distribuciones biogeografías se convirtieron en importantes fuentes de información sobre la edad de linajes, así como para complementar datos sobre paleontología, biología molecular y conservación. Paradójicamente el nuevo conocimiento ha creado una controversia sobre explicaciones de carácter evolutivo sobre la distribución geográfica de especies estrechamente relacionadas. Lo anterior ha resultado en la implementación de numerosas metodologías (la mayoría de las cuales ya han sido implementadas en programas de computador) para establecer y verificar patrones en particular y formular hipótesis sobre la historia de linajes en especial (Croizat 1974)

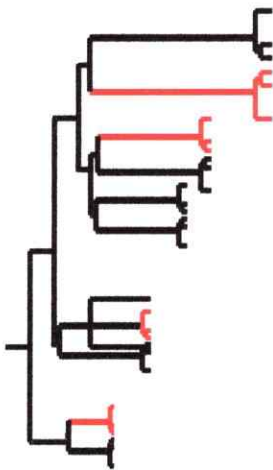
En este contexto es que *Avise et al.* en 1997 define los fundamentos de la Filogeografía como la relación del linaje de genes dentro de una especie con los principios y procesos que gobiernan la estructuración geográfica de la especie. En este contexto, el análisis filogeográfico permite el reconocimiento de patrones geográficos de la variación genética, basados en relaciones filogenéticas entre los individuos (secuencias) denominada filogenia de haplotipos. Al incorporar la ubicación geográfica de los individuos es posible revelar la historia de la población, hecho que le otorgan al investigador las herramientas adecuadas y poderosas permitiendo entender los procesos que determinan la distribución espacial de los organismos como colonización, procesos poblacionales (cuellos de botella o rango de expansión), eventos de vicarianza (Arbogast & Kenagy 2001) y selección natural (Slatkin & Barton 1989), y finalmente los patrones de biodiversidad identificando áreas de endemismo (Avise 2000, Moritz & Faith, 1998).

Los patrones filogenéticos descritos por *Avise et al.* 1997, han sido ampliamente discutidos y modificados pudiéndose encontrar 4 señales filogeográficas



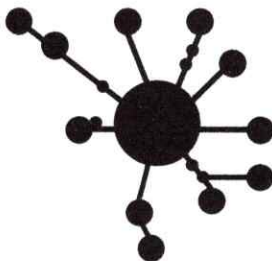
### 1. Monofilia recíproca:

Donde la historia evolutiva muestra que la evolución es distinta entre los dos linajes y/o taxones. Esta topología es típica de procesos de vicarianza, especiación alopátrica, parapátrica y simpátrica.



### 2. Parafilia y Polifilia:

Ocurre después de un evento de vicarianza con la extinción local de una población situada a un lado de la barrera geográfica, cuya área geográfica es recolonización por una o más poblaciones fuentes provenientes del otro lado de la barrera, no extintas aún.

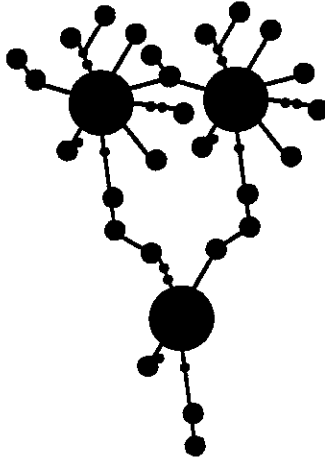


### 3. Red de haplotipos del tipo estrella

Si la recolonización del área geográfica ocurre a partir de una población fuente caracterizadas por un pequeño número de emigrantes, la recolonización puede ser seguida de un evento de expansión demográfica, el que por mutaciones rápidas genera diversificación de los haplotipos a partir de un

haplotipo ancestral. Ello se puede observar como una desviación a la neutralidad esperada.

#### 4. Red de haplotipos de manera estructurada



Si la recolonización del área geográfica ocurre por más de una población fuente, previamente aisladas por vicarianza, esta recolonización puede ser seguida de contacto secundario entre las poblaciones. La fase de hibridización de las poblaciones puede ser seguida de una expansión demográfica y geográfica con diversificación de los haplotipos. El grado de divergencia entre las poblaciones que están nuevamente en contacto, determinará el grado de desviación a la neutralidad esperada. Si los haplotipos ancestrales (centrales) corresponden a una zona geográfica especial se puede deducir zonas que han sido refugios o patrones de aislamiento por distancia con efecto fundador.

**REFERENCIAS**

- ARBOGAST B & KENAGY G. 2001 Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *J. Biogeogr.* 28:819-825.
- AVISE JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- AVISE J, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA AND SAUNDERS N. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- CROIZAT L, NELSON G & DE ROSEN. 1974. Centers of origin and related concepts. *Syst Zool.* 23: 265-287.
- NELSON G. 1978. From Candolle to Croizat: comments on the history of biogeography. *J. Hist. Biol.* 11: 269-305.
- MORITZ C, FAITH DP. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol. Ecol* 7:419-429.
- SLATKIN M & BARTON NH. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.



## A.2 ESTIMADORES DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

### 1. Diversidad haplotípica ( $H_e$ )

Este índice es equivalente a la heterocigosidad esperada para datos diploides, estimando la variabilidad genética en términos del número de haplotipos presentes en la muestra y su respectiva frecuencia. Este índice es definido como la probabilidad de que dos haplotipos de la muestra, elegidos al azar, sean diferentes, y su fórmula se expresa como:

$$H_e = \frac{n}{n-1} \times (1 - \sum_{i=1}^k p_i^2)$$

Donde  $n$  es el tamaño de la muestra,  $k$  es el número de haplotipos,  $p_i$  es la frecuencia de haplotipo  $i^m$ , de la muestra (Nei 1987).

### 2. Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )

Este índice determina la heterocigosidad o diversidad genética al nivel de nucleótidos, por medio de las diferencias entre secuencias de haplotipos, estimando la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos al azar sean diferentes (Nei & Tajima 1981). Se obtiene valorando el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias con la siguiente relación:

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

Donde  $p$ 's son las frecuencias de cada uno de los nucleótidos  $i$  y  $j$  que son comparados,  $d$  es la distancia genética entre nucleótidos y  $L$  el número de loci.

### 3. Distancia genética

Es medida por el número de sustituciones de nucleótidos entre un par de secuencias como el número de sustituciones observadas entre dos secuencias. También se puede analizar la diferencia entre un par de secuencias, dividiéndolo por  $L$  el número de loci.

### 4. Test de Tajima

Este se realiza para comparar dos estimadores de diversidad genética poblacional:  $\theta\pi$  que es el promedio de las diferencias nucleotídicas entre las secuencias y  $\theta s$  que son los sitios segregados. Bajo la hipótesis de una población en equilibrio y neutralidad del marcador, la diferencia entre ambos estimadores debiera ser nula (igual a cero). En ausencia de selección  $\theta\pi - \theta s$  positiva, sugiere reducción reciente del tamaño de la población. Por el contrario, si  $\theta\pi - \theta s$  es negativo se sugiere una expansión demográfica (Tajima 1989). Este índice es estimado como:

$$D = \frac{\theta\pi - \theta s}{\sqrt{\text{Var}(\theta\pi - \theta s)}}$$

### 5. Test de $F_s$ de $F_u$

Similar al test propuesto por Tajima (1989), este test compara el número de diferencias entre pares de  $\theta\pi$  con el número de sitios polimorfos, basados en  $\pi$  y en el número de haplotipos de la muestra  $k$ . En este contexto, si  $F_s$  ( $F_u$ ) es negativo se sugiere un exceso de mutaciones recientes (haplotipos raros). Fu (1997) demostró que este test es particularmente sensible para detectar expansiones recientes. la probabilidad asociada

al estadístico se obtiene a través de una serie de simulaciones realizadas en el proceso de coalescencia.

#### **6. Riqueza genética**

La riqueza genética fue estimada para estandarizar los datos entre localidades, adecuando la ecuación ecológica de Margalef  $[(S-1)/\ln N]$  en datos genéticos, donde S es el número total haplotipos y N el número total individuos (Viard F & Cárdenas L 2006 pers. Conv).

#### **7. Tasa de haplotipos comunes y exclusivos**

Esta tasa fue estimada para estandarizar los datos entre las localidades, estimado como el cociente entre el número de haplotipos comunes y/o exclusivos divididos por el número de individuos totales en cada población (Viard F & Cárdenas L 2006 pers. Conv).

### **REFERENCIAS**

- NEI M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- NEI M & TAJIMA F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97:145-163
- TAJIMA F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- FU YX. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

## **CAPITULO IV**

**CONTACTO Y/O FUSION DE TALOS EN *Codium sp.***

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

Cuando dos individuos que pertenecen a la misma especie, se encuentran en contacto, es esperable que se desencadenen dos tipos de respuestas alternativas: competencia o cooperación (Buss 1999). La competencia intraespecífica, ampliamente estudiada en la mayoría de los organismos, ha sido considerada como de gran importancia ecológica y evolutiva, afectando procesos microevolutivos y macroevolutivos como la especiación (Ridley 1996). Alternativamente, la cooperación es un tipo de respuesta ecológica que responde a las características propias de los organismos involucrados, tales como su condición individual o multicelular (Ridley 1996). Dentro de las respuestas del tipo cooperativas, la coalescencia, observada en cierto tipo de organismos, sugiere un mecanismo alternativo a la competencia (Stoner *et al.* 1999, Santelices & Alvarado 2005), donde producto de la fusión entre organismos, se genera una entidad quimérica, genéticamente heterogénea que es capaz de sobrevivir por un acuerdo entre costos y beneficios de su condición, con consecuencias ecológicas y evolutivas significativas (Pineda-Krch & Lehtila 2004). En un amplio sentido, la coalescencia es referida a la fusión entre individuos distintos y que produce un organismo genéticamente quimérico. Esta fusión es un proceso con representatividad en un número alto de taxa, tales como protistas (incluyendo macroalgas), hongos, plantas, animales invertebrados y vertebrados (ver revisión Pineda-Krch & Lehtila 2004).

La palabra coalescencia proviene del latín "*coalesce*", donde *Co-* significa juntos y *-alescere* se traduce como crecer. Por lo tanto, en un sentido amplio, coalescencia significa crecer juntos (Merriam- Webster Dictionary 2006). Sin embargo, debido a que el concepto ha sido utilizado en diferentes disciplinas de las ciencias biológicas como

microbiología, zoología, botánica, ficología, entre otros, la aplicación del concepto y el tipo de fusión varía respecto al organismo en estudio y el nivel de resolución analítica que se realice (visual o macroscópico, celular, genético).

La mayor parte de los trabajos realizados para identificar coalescencia han sido del tipo experimental. Esto se debe a que en condiciones naturales siempre existe incertidumbre de una identificación correcta del proceso por ausencia de evidencia pertinente (Scofield *et al.* 1982, Ilan & Loya 1990, Hidaka *et al.* 1997, Maldonado 1998, Sommerfeldt & Bishop 1999).

En algas, la coalescencia es un proceso que ha sido descrito exclusivamente en el grupo de las Rhodophyta (Santelices *et al.* 1999). Basados en el nivel de conocimiento y el avance tecnológico, los primeros trabajos realizados fueron mayoritariamente del tipo morfológico descriptivo, detallando la fusión de esporas, desarrollo embriológico y el individuo resultante en las especies *Gigartina* (Rosenvinge 1931), *Gracilaria* (Jones 1956) y *Chondrus* (Tveter & Mathieson 1976). La incorporación de técnicas microscópicas con mayor poder de resolución permitió caracterizar a nivel estructural el proceso de coalescencia, descartando fusiones aparentes entre individuos de distintas especies, caracterizadas por zonas de contacto con necrosis celular (Santelices *et al.* 1996). Con dichas herramientas, se describió a nivel intraespecífico la histocompatibilidad de tejidos entre los organismos a través de la formación de una pared externa común en las esporas y algunas conexiones secundarias entre las células involucradas (Santelices *et al.* 1999) Esta fusión de tejidos, ha sido descrita entre individuos en distintos estadios de desarrollo (esporas versus plántulas), y entre esporas de diferente ploidía (n-gametofitos versus 2n-esporofitos) (Santelices *et al.* 2003a,

2003b, 2004). Adicionalmente, monitoreos en terreno de las fusiones y el desarrollo de técnicas moleculares, con marcadores genéticos específicos, han permitido confirmar la ocurrencia de coalescencia en condiciones naturales a nivel intraespecífico, distinguiendo al interior de un individuo celularmente homogéneo porciones de tejidos genéticamente distintas (Santelices 2004).

La coalescencia o fusión en algas adquiere relevancia al demostrar las ventajas adaptativas del proceso en cuanto a sobrevivencia y germinación de las especies y/o individuos coalescentes versus no coalescentes. Adicionalmente, se han descrito a nivel intraespecífico, una correlación positiva entre la morfología (número de ramas), sobrevivencia y germinación versus el número de esporas involucradas en la fusión (Santelices *et al.* 1999).

Basados en el hecho que la coalescencia no es un artefacto experimental, y que es muy probable que ocurra en condiciones naturales, y en cualquier momento de la vida de la planta (Santelices *et al.* 2003a, 2003b), se ha especulado que la coalescencia debiera estar asociada a beneficios que alterarían aspectos ecológicos de la entidad quimérica involucrada, es decir, a nivel individual, poblacional, comunitario y evolutivo.

Individualmente, el incremento inmediato en el tamaño del organismo luego de la coalescencia, reduce los riesgos de mortalidad asociados a competencia y herbivoría, incrementando la capacidad de reclutamiento, productividad fotosintética, crecimiento y eventualmente fertilidad (Santelices *et al.* 1996, 1999, 2003a, 2003b, 2004, Santelices 2004, Santelices & Alvarado 2005). Adicionalmente, la diversidad genética dentro de la quimera formada podría incrementar la plasticidad del organismo en ambientes inestables comparado con organismos genéticamente homogéneos (Muñoz & Santelices

1994, Santelices *et al.* 1996, 1999, Meneses & Santelices 1999). Poblacionalmente, la coalescencia afectaría los modelos demográficos y genéticos que han sido propuestos para las poblaciones de algas rojas (Meneses *et al.* 1999, Santelices 2001, Santelices & Alvarado 2005). Comunitariamente, de acuerdo a Santelices *et al.* (1999), las poblaciones de algas coalescentes comparten la capacidad de dominar el hábitat que habitan, siendo capaces de modificar la estructura comunitaria. Evolutivamente, la similitud del patrón de fusión observado en un gran número de especies no relacionadas filogenéticamente, sugeriría que la coalescencia es un proceso aleatorio y no necesariamente convergente, desconociéndose un origen evolutivamente ancestral (Santelices *et al.* 1999).

Debido a los numerosos beneficios asociados a la coalescencia en algas rojas, su ocurrencia y frecuencia en otros grupos taxonómicos tiene gran implicancia biológica y mucho interés científico (Santelices *et al.* 2004). En este contexto, basados en los atributos ecológicos, descritos en la especie *C. dimorphum* (Chlorophyta) en Chile Central por Santelices *et al.* (1981), el supuesto de coalescencia sugerido inicialmente por Maggs & Cheney (1990), y observaciones visuales de fusión de talos en *C. dimorphum* de Chile central (González pers. observ.) y *C. setchellii* en Oregon (Trowbridge 1996), generan la necesidad de poner a prueba la ocurrencia de fusión en este grupo de algas verde.

El género *Codium* se divide morfológicamente en dos subgéneros *Schizodium* y *Tylecodium*. El primero agrupa a los individuos erectos con ramificaciones cilíndricas, dicotómicas o politómicas, adheridos al sustrato por un disco de adhesión. Mientras que el subgénero *Tylecodium* incluye aquellas especies en que la totalidad del talo es



crustosa o rastrera (Lucas 1935). Ambos subgéneros han sido considerados organismos clonales (Collado- Vides 2002), con un ciclo de vida monofásico diploide (Silva 2002). Similar a lo descrito en plantas clonales (Harper 1985, Jackson *et al.* 1985), la clonalidad en *Codium* le conferiría la capacidad de crecer y propagarse por autorreplicación de unidades genéticamente iguales, donde las unidades que son separadas desde la unidad parental (genet), pueden funcionar y sobrevivir por si solas como una entidad independiente (ramet).

A nivel microscópico los talos del género *Codium* están compuestos por células sifonadas multinucleadas, sin tabicaciones, que se diferencian en una porción apical o utrículo y una porción basal denominada filamento medular (Silva 2002). El utrículo, de morfología clavada a ovalada, y que dependiendo de la especie mide entre 500 a 1500  $\mu\text{m}$  de largo, es altamente pigmentado con gran cantidad de cloroplastos (Fletcher *et al.* 1989). Contrario a lo anterior, el filamento medular es mayoritariamente despigmentado y alargado unido al utrículo sin tabicación entre ambos, encontrándose entre uno a tres filamentos medulares por utrículo (Silva 1951, 1955, 1957, Silva & Womersley 1956, Hubbard & Garbary 2002, Chang *et al.* 2002). El talo crustoso se constituye por una capa de utrículos o corteza de los cuales se desprenden numerosos filamentos medulares que conforman una médula (Nanba *et al.* 2002) que en el subgénero *Tylecodium* se adhiere al sustrato (Silva 2002).

En Chile central, *Codium sp.* presenta un hábito crustoso no calcáreo de dimensión variable entre 6 a 15 mm de grosor y entre 5 a 400 cm en diámetro, la ocupación del sustrato por el talo, puede verse afectada por la desecación del borde reduciendo el área y perímetro de las costras, y por herbívoros que generan aberturas o

áreas descubiertas al interior de las costras. Ambas alteraciones pueden ser naturalmente recuperadas a través de recolonización de células sifonadas (Santelices *et al.* 1981, Santelices 1990). Esta capacidad de colonizar sustratos libre o de desplazar competidores y herbívoros le confiere la habilidad de dominar del sustrato, modificar en la estructuración comunitaria (paisaje intermareal a escala local) y la sucesión de especies (Santelices *et al.* 1981, Sierralta & Santelices 1990, datos no publicados).

Basado en las características ecológicas de *Codium sp.*, que la sugieren como posible candidata a coalescencia, el objetivo de este capítulo es poner a prueba la hipótesis que si la fusión entre talos de *C. dimorphum* es similar a la coalescencia, esta debiera ocurrir en condiciones naturales detectándose a nivel visual, celular y genético, para lo cual se evalúa experimental y naturalmente la ocurrencia de fusión entre talos de *Codium sp.* en Chile central, describiendo los procesos celulares involucrados en la fusión visual observada, contrastándolo con los patrones de coalescencia descritos en algas rojas.

Basados en lo anterior, este capítulo mide la ocurrencia de contactos y/o coalescencia de talos a nivel intraespecífico en *Codium sp.* en condiciones naturales en Chile central. El proceso fue evaluado en tres niveles: a) visual o macroscópico, b) celular y c) genético. El análisis visual y celular fue realizado para detectar la capacidad de contacto y/o fusión (histocompatibilidad) de talos crustosos, dentro de las costras (intra-genet) y entre costras (inter-genet). El análisis genético fue realizado con el objeto de reconocer la formación de quimeras genéticas, directamente relacionado al proceso de coalescencia, en fusiones visuales de los talos. Producto del desconocimiento del tipo y patrones celulares de crecimiento en *Codium sp.*, se evalúa adicionalmente la forma,

disposición y adherencia de células sifonales ubicadas en el borde de talos crustosos no manipulados, comparándolo con lo observado en la zona de contacto.

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Área de estudio**

Para evaluar experimental y naturalmente la ocurrencia de fusión entre talos de *Codium sp.* en Chile central, los experimentos se llevaron a cabo en dos localidades Caleta Horcón (32° 42'S, 71° 30'W), y Caleta Maitencillo (32° 39'S, 71° 29'W), localizados aproximadamente 36 km y 100 km al norte de Valparaíso respectivamente y caracterizadas por presentar gran densidad de talos crustosos de *Codium sp.* (Hoffman & Santelices 1997, Santelices & Vera 1984, González pers. Obs.)

### **4.2.2 Estudios experimentales**

#### **A) Fusión intra- genet**

Durante Mayo - Octubre de 2004, se realizó en la localidad de Horcón (32° 42'S, 71° 30'W) un experimento para evaluar visual y celularmente la capacidad de contacto y/o fusión de los talos a nivel intragenet. Para ello, manualmente se manipularon las costras de *Codium sp.*, interrumpiendo la continuidad del talo. A cuarenta talos crustosos se les extrajo una franja de área 1 x 10 cm., con espátula y posterior cepillado. El área removida fue replicada tres veces dentro de cada talo crustoso, monitoreando quincenalmente la restitución del sustrato libre. Con el objeto de evitar posibles perturbaciones en la ocurrencia de contacto y/o fusión de talos a nivel intra-genet, los 40 talos fueron protegidos con jaulas de exclusión, que combinaron exclusión de herbívoros

con reducción de la intensidad luminosa. De esta manera, de los 40 talos manipulados diez fueron cubiertos por jaulas completas excluyendo invertebrados mayores a 0,5 cm. y reduciendo en un 50% la intensidad luminosa. Otros diez talos fueron cubiertos por jaulas sin techo, permitiendo el ingreso de herbívoros escaladores y reduciendo entre un 10-8% la intensidad luminosa. Mientras que 10 talos fueron cubiertos por jaula con techo sin paredes, permitiendo el ingreso de herbívoros y reduciendo entre un 30-40% la intensidad luminosa. Finalmente los 10 talos restantes fueron utilizados como control sin jaulas (Figura 28).

La recolonización del área removida fue monitoreada quincenalmente a través fotografías realizadas con una cámara digital Fuji FinePix 5000. Las imágenes digitales fueron examinadas en el software Sigma Scan Pro Versión XX (Demo), estimándose la frecuencia de contactos iniciales entre los bordes y el área recolonizada. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través del análisis no paramétrico de medias repetidas Friedman –ANOVA en el software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc. 2001, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

Una vez en contacto los bordes monitoreados, se extrajeron con cincel trozos de tejido y roca provenientes de la zona de contacto, las que fueron analizadas en fresco y fijadas, fotografiadas bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-10A, Japan) y microscopio de campo claro (Nikon, Optiphot-2, Japan), equipados con cámara digital CoolSNAP-Procf (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), y con sistema para adquisición de imágenes digitales Image Pro® Plus 4,5. The Proven Solution™. Versión 4.1.0.0 (1993-1995 Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD, USA).

La fijación del tejido proveniente de la zona de contacto, siguió los protocolos

descritos por Santelices *et al.* (1996, 1999), utilizando una mezcla de Glutaraldehído (3%), Paraformaldehído (1%) y medio de cultivo SFC a 5°C, con post fijación en Osmio (2%), deshidratación ascendente en etanol e inclusión en SPURR (1969). Las muestras fueron sometidas a cortes semi finos (800 nm) realizadas en un ultramicrotomo (Leica, Ultracut R, Germany), teñidos con azul de toluidina al 0,25%, observados y fotografiados en microscopio de campo claro descrito anteriormente.

### ***B) Fusión inter- genet***

Durante Junio- Diciembre de 2004, se realizó en la localidad de Maitencillo (32° 39'S, 71° 29'W), un seguimiento de pares de costras cercanas marcadas, para evaluar visual, celular y genéticamente la capacidad natural de contacto y/o fusión de talos a nivel inter-genet. Para ello, se seleccionaron, marcaron y fotografiaron 15 pares de costras de *Codium sp.* de dimensiones similares y a distancias aproximadamente similares (entre 1, 5 a 3 cm. de separación). La distancia visual de las costras se estimó quincenalmente en puntos previamente marcados. Una vez constatada la existencia de contacto visual entre costras vecinas se extrajo tejido de la zona de contacto, el que se estudió en fresco y fijado en el laboratorio, siguiendo el protocolo descrito en el experimento anterior.

La evaluación de posible formación de quimeras naturales, por contacto entre genets, se realizó mediante la identificación genética de los talos crustosos involucrados y del tejido localizado en la zona de contacto. Para ello, se extrajeron muestras de tejido de cada talo independiente y de la zona de contacto. El DNA genómico total fue extraído de un total de 45 muestras de tejido secadas en sílica como lo describe Wattier *et al.*

(2002). La identificación genética de cada talo fue estimada amplificando el gen cloroplastidial TRN-Gly (~300 bp), que fue previamente utilizado para evaluar la diversidad genética de la especie en el capítulo III. Siguiendo el protocolo descrito por Provan *et al.* 2005 para amplificar el gen, el producto de PRC fue cuantificado manualmente en un gel de agarosa (1,5%), teñido con bromuro de etidio y purificado en el QIAquick PCR Purification Kit. Las secuenciaciones del gen se realizaron en el secuenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>), perteneciente al Laboratorio de Diversidad Molecular, Departamento de Ecología, Facultad Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias obtenidas fueron alineadas manualmente en el software ProSeq v.2.91 (Filatov 2002) y analizadas en el software DnaSP 4.10 (Rosas *et al.* 2003), identificando cada muestra de tejido a través de su haplotipo.

### ***C) Observaciones de células en el borde de los talos***

Con el objeto de comparar las células (morfología y disposición) encontradas en la zona de contacto con aquellas naturalmente localizadas en el borde de los talos, durante Mayo de 2006 se extrajeron con cincel desde la localidad de Maitencillo 15 bordes de talo con sustrato, sin previa manipulación. El análisis de los bordes de cada talo comprendió la observación del tejido en fresco con los equipos de laboratorio anteriormente descritos, caracterizando la morfología de las células, su pigmentación, adherencia al sustrato e interacciones con otros organismos.

### 4.3 RESULTADOS

#### *A) Fusión intra- genet*

A nivel intra – genet, los experimentos de interrupción de la continuidad de la costra realizados en la localidad de Horcón, se recuperaron en aproximadamente 4 meses (Figura 29), sin presentar diferencias significativa entre tratamientos ya sea en la frecuencia de contactos iniciales (Fig. 30a) y área recolonizada (Fig. 30b).

En términos generales, los tratamientos mostraron a los quince días después de la remoción (Fig.31a), que los bordes de los talos manualmente manipulados comienzan a recuperarse y recolonizar el área descubierta. Pasado 45 días, el área removida ya estaba recolonizada en aproximadamente un  $40\pm 20\%$ , encontrándose los primeros contactos y/o fusiones ( $10\pm 2\%$ ) en algunos bordes (Fig.31b). Después de 60 días, el área removida se redujo aproximadamente en un  $60\pm 20\%$ , encontrándose una frecuencia del  $30\pm 10\%$  de contactos iniciales, que dejaron una cicatriz (Fig. 31c) como evidencia de la interrupción seguida por el crecimiento de los talos. A los 75 días, la mayor parte de los talos exhibieron una cobertura continua del área removida ( $80\pm 20\%$ ), con una frecuencia de contacto del  $70\pm 10\%$ . La cicatriz entre los bordes de cada talos, observada hacia los 45 días, comenzó a desaparecer hacia los 75 días de monitoreo (Figura 31d). Aún cuando se encontró una gran frecuencia de recolonización del área removida hacia el día 75, fue necesario monitorear hasta el día 135 para completar el 100% de los contactos y/o fusiones.

### ***B) Fusión inter- genet***

A nivel inter – genet, el patrón de crecimiento, contacto y/o fusión de talos fue similar al observado a nivel intra-genet. Los talos se expandieron por la actividad meristemática del borde de las costras, manteniéndose la forma circular de los talos durante su crecimiento activo (Figura 32). En los 15 pares de costra analizados, la distancia entre ellas, disminuyó gradualmente con el tiempo (Figura 33). Similar a los descrito a nivel intra-genet, una cicatriz o superficie irregular fue la única evidencia de contacto y/o fusión inicial entre los talos (Figura 32c), la que desapareció gradualmente con el tiempo (Figura 32d). Después de 75 días de monitoreos, sólo el 67% de los pares de talos marcados lograron contactarse y/o fusionarse, 20% de los talos fueron perdidos por inundación de arena en la localidad de Maitencillo y un 13% (N=2) nunca establecieron contacto debido que el sustrato que separaba los talos fue ocupado por invertebrados y algas verdes.

El análisis de cambios celulares durante el contacto y/o fusión sugirió patrones similares a nivel intra-genet e inter-genet. Durante la recolonización del nuevo sustrato disponible o área, en el experimento de remoción o durante el crecimiento marginal, los filamentos medulares aparecen como los principales responsables de la ocupación del sustrato disponible. El crecimiento de estos fue precedido por la migración de cloroplastos desde los utrículos a los filamentos medulares, observándose dichos filamentos altamente pigmentados en la zona de contacto (Figuras 34a y 34c). Posteriormente, la zona mas pigmentada de los filamentos medulares comienza a elongarse adherida al sustrato y en dirección al borde vecino (Figura 34b). Al contactarse con el filamento vecino ambos se mezclan y entrecruzan, proporcionándole a



los filamentos medulares un aspecto altamente contorsionado. Posteriormente, numerosos utrículos, de mayor ancho, emergen desde los filamentos medulares entremezclados, retapizando el área disponible y reduciendo al mínimo la distancia entre los bordes vecinos y desplazando competidores del sustrato como bacterias epilíticas (Figura 34d). Paralelamente, algunos utrículos del borde se transformaron (38%), elongándose ya adoptando la morfología de los filamentos medulares, con gran pigmentación, extendiéndose y adhiriéndose al sustrato (Figuras 35a, 35b, 35c). De esta manera, los bordes de contacto de ambas costras gradualmente crecieron a través de la elongación de filamentos medulares y utrículos modificados, reduciendo la distancia entre ellos, hasta desaparecer eventualmente luego del contacto celular. A los 45 días, numerosos talos mostraron sólo una cicatriz post contacto (Figuras. 31c y 32c), caracterizados a nivel celular por numerosos filamentos medulares y/o utrículos modificados en contacto inicial (78%), con porciones de sustrato libre aún, pudiendo identificar el talo origen de cada célula individual. Sin embargo, a partir de los 75 días de monitoreo (Figuras 31d y 32d) las zonas previamente contactadas perdieron su cicatriz, impidiendo delimitar cada talo involucrado y menos aún reconocer el talo origen de cada célula observada. Sin embargo, aún cuando las células se encontraron en estrecho contacto, cada una mantuvo su individualidad, reconociendo la zona de contacto sólo por la presencia de numerosos filamentos medulares que emergían desordenadamente desde el talo (Figura 35d). La manipulación de las células en contacto tratando de separarlas resultó en la destrucción de las mismas (97%) a través de la explosión de los filamentos medulares y/o utrículos modificados, vertiendo su contenido celular al medio.

En cortes semi finos realizados en de la zona de contacto, se observó que en la porción superior los utrículos estaban dispuestos desordenadamente, mientras que la porción inferior se caracterizó por presentar numeroso restos de filamentos medulares con protuberancias o evaginaciones laterales conteniendo gran cantidad de mucopolisacáridos, cloroplastos y núcleos (Figura 36). Observaciones más detalladas del contacto entre filamentos medulares reveló ausencia de contacto y/o fusión de las paredes celulares (Figuras 36c, 36d, 36e), manteniendo cada célula su individualidad. Los pocos utrículos encontrados en la zona de contacto presentaron menor cantidad de pigmentos (Figura 37a) en comparación a aquellos ubicados lejos de la zona de contacto (Figuras 37b y 37c).

El análisis genético realizado en los experimentos de fusión a nivel inter-genet, cuyo objetivo era evidenciar fusión entre talos genéticamente distintos, mostró que aún cuando visual y celularmente existen evidencias del contacto y/o fusión entre talos distintos, éstos fueron genéticamente idénticos para el gen TRN-Gly. De esta manera, para la localidad de Maitencillo y el gen TRN-Gly, las 45 secuencias analizadas de 254 bp cada una, presentaron 100% de sitios monomórficos, es decir, sólo un haplotipo.

### ***C) Observaciones de células en el borde de los talos***

El análisis del borde de los talos no manipulados, provenientes de la localidad de Maitencillo, mostró un patrón de morfología celular similar a aquel encontrado en las zonas de contacto de nuestros experimentos intra e inter- genet. De esta manera, fue posible encontrar utrículos periféricos modificados, alargados y postrados que comenzaban a adherirse al sustrato (Figuras 38a-38c), y numerosos filamentos

medulares que emergen del talo (Figuras 38d-38f). Por otra parte, numerosos filamentos medulares se observaron considerablemente elongados, localizados a distancias de 1,5 a 3,5 cm. desde el talo fuente, postrados y adheridos en ciertos puntos al sustrato, y altamente pigmentados (Figuras 39, 40). Algunos filamentos medulares y/o utrículos modificados fueron encontrados creciendo sobre rocas, invertebrados, y otras algas. En el primer caso, los filamentos medulares se encontraron adheridos directamente sobre rocas distantes (Figuras 41a, y 41b), o rodeando pequeños granos de área (Figuras 41c - 41f). Los filamentos medulares que se encontraron creciendo sobre invertebrados (Figura 42) y algas calcáreas (Figura 43) mostraron un crecimiento por sobre los organismos, observándose estos últimos con aprisionados entre filamentos medulares y en el caso de las algas indicios de despigmentación. En todos lo casos, el entrecruzamiento de las células no presentó conexiones celulares, pudiendo distinguir la individualidad de cada una.

#### 4.4 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Aún cuando se espera que el encuentro entre dos individuos desencadene competencia o cooperación entre ellos, los datos obtenidos en éste trabajo dan cuenta de que en el alga verde *Codium sp.* predomina la cooperación intraespecífica como respuesta ecológica. La combinación de estudios realizados en este estudio indican que contacto y/o fusión de talos costrosos ocurre experimental y naturalmente en el alga verde *Codium sp.* Estos contactos exhiben tres características fundamentales, propias al orden taxonómico al que pertenece (*Sifonales*) y del hábitat que ocupan. Primero, debido a la carencia de tabicaciones celulares propias del grupo de los *Sifonales*, numerosos

mucopolisacáridos, cloroplastos y núcleos pueden ser transferidos desde la porción superior de las células sifonales (utrículos) hacia la porción basales, que es donde se concentra el crecimiento. Segundo, el crecimiento, adherencia al sustrato y contacto y/o fusión entre los talos se debió mayoritariamente al desarrollo y crecimiento de los utrículos y filamentos medulares, proceso observado además en las células ubicadas en los bordes de talos no manipulados. Tercero, una vez que se encuentra los filamentos medulares o utrículos modificados provenientes de talos independientes, existió compatibilidad de las células con entremezclado de las mismas, recolonizando el sustrato disponible y estableciendo continuidad morfológica en el crecimiento del talo. Sin embargo, no fue posible evidenciar intercambios celulares o conexiones entre las distintas costras a través de las células involucradas, ni la formación de entidades genéticamente heterogéneas.

El contacto y/o fusión observada en *Codium sp.* tuvo relación con la capacidad de las células que componen el talo (sifonal) en aumentar sus pigmentos (mucopolisacáridos, cloroplastos fusiformes y núcleos). Algunos estudios realizados en la especie invasiva *Codium fragile* han descrito numerosos cloroplastos fusiformes en utrículos y filamentos medulares (Fletcher *et al.* 1989, Nanba *et al.* 2002), los que son capaces de migrar desde el utrículo altamente pigmentado hasta los filamentos medulares despigmentados, elongándose en condiciones de cultivo (Nanba *et al.* 2000). Estos resultados sugieren que el protoplasma en las especies de *Codium* juega un rol importante en la propagación vegetativa de las células. Nuestro estudio en particular, ofrece nuevas ideas para investigar los procesos celulares involucrados en la morfogénesis de los talos. Hasta lo que conocemos hoy en día, éste es la primera

descripción de crecimiento de células vegetativas en el subgénero *Tylecodium* en condiciones de laboratorio, constituyendo una metodología útil para futuros estudios de crecimiento, adherencia, expansión y regeneración de utrículos y filamentos medulares en condiciones controladas.

La segunda característica relevante observada en nuestro estudio, subyace en que el crecimiento macroscópico de los talos ocurre a través del crecimiento de filamentos medulares y utrículos, por elongación o evaginación de los mismos, dando origen a nuevos filamentos medulares y/o utrículos tanto en las zonas de contacto como en bordes de talos no manipulados. En estos talos no manipulados, la gran distancia alcanzada por el filamento medular desde el talo de origen, es similar a lo descrito en *Caulerpa taxifolia*, donde los rizomas pueden formar una red con citoplasma de 0,25 cm de diámetro y varios metros de largo (Meinesz & Hesse 1991, William & Grosholz 2002). Este hecho sugiere, que la ausencia de tabicaciones durante el crecimiento vegetativo y la habilidad de cambiar la forma y función de los filamentos medulares y utrículos, podría conferirle a la especie ventajas competitivas para enfocar la energía en crecimiento y ocupación de sustrato o recuperación celular luego de eventos perturbadores como herbivoría o blanqueamiento de los bordes. Procesos similares han sido descritos solo en el género *Acetabularia*, alga unicelular y uninucleada, que ha sido caracterizada por una alta plasticidad morfológica que le confiere mayores posibilidades de sobrevivencia. La carencia de celularización en este género se relaciona positivamente con la disminución del costo energético en la formación de pared, mientras que los cambios en las funciones de las partes del cuerpo reducirían los efectos de la herbivoría (Mandoli 1996, Serikawa & Mandoli 1998, Kratz & Mandoli 1999).

La tercera característica en el contacto y/o fusión de talos en *Codium sp.*, es que aún cuando ésta es evidente visualmente en condiciones naturales, a nivel microscópico cada célula mantiene su individualidad, sin poder reconocer la existencia de conexiones celulares o pared externa común como ha sido descrito durante la coalescencia de algas rojas (Santelices *et al.* 1996, Santelices *et al.* 1999). En un contexto organizacional del grupo de las algas sifonales, aún cuando *Codium sp.* pudiera presentar intercambio celular en la zona de contacto, las conexiones secundarias que caracterizan la coalescencia son exclusivas del grupo de las algas rojas (Rhodophyta). En cuanto a la identificación de secreciones extracelulares y formación de pared externa, nuestros resultados sugieren la necesidad de futuros análisis más detallados, mejorando las técnicas de fijación apropiadas para las células en cuestión. Una de las grandes dificultades de nuestro trabajo fue mantener el tejido intacto luego de los diversos tratamientos químicos requeridos para su fijación, por lo cual técnicas rápidas como inclusión en hielo y parafina no permitieron la mantención y estabilidad de las células.

A pesar de observar sólo compatibilidad de tejidos entremezclados, adheridos entre ellos y al sustrato, no se observó necrosis celular como ha sido descrito en contacto interespecíficos, con competencia e histoincompatibilidad de tejidos a nivel ultraestructural entre *Mazzaella laminarioides* y *Nothogenia fastigiata* (Santelices *et al.* 2003a). Sin embargo, no se descarta la existencia de una matriz extracelular común donde el transporte o translocación apoplástica entre células juegue un rol importante. En *Caulerpa prolifera*, se ha evidenciado que los rizoides presentan polipéptidos adhesivos secretados en una matriz extracelular que conecta directamente los rizoides con el sustrato (Levi & Friedlander 2004). Mientras que en el alga roja *Gracilaria cornea*, se

ha evidenciado una activa translocación, aún cuando no se encontraron conexiones citoplasmáticas intercelulares, sugiriendo que el transporte o translocación ocurre mayoritariamente de manera apoplástica (Gonen *et al.* 1996).

A la luz de estos resultados, se sugiere que aún cuando existen contacto entre células de *Codium sp.*, la aplicación del término fusión como sinónimo de coalescencia según lo definido por Santelices (2004) para algas rojas, no puede ser utilizado en este grupo de organismos compuesto por células sifonales. Sin embargo, la observación de contacto celular en la especie requiere de la utilización de un término más general para definir la fusión entre talos de algas verdes como es el caso del organismo en estudio, proponiendo que el contacto entre talos y células, corresponde a una respuesta ecológica cooperativa similar a la descrita en la coalescencia de algas rojas. En este contexto, como lo sugiere Maggs & Cheney (1990) probablemente las grandes dimensiones de los talos alcanzado por *Codium sp.* en Chile central, podrían deberse a contacto y cooperación entre talos, esperando que estos contacto generen beneficios y ventajas a ecológicas, similares a aquellos descritos en el proceso de coalescencia en algas rojas (Santelices 2004).

Contacto celulares similares a lo descrito en *Codium sp.* han sido observado en algas pardas como *Ascophyllum nodosum* (Aberg 1989) y *Scytosiphon sp.* (Camus & Correa 2005, pers. conv.). En el primer caso, Aberg (1989) observó en terreno discos basales de *A. nodosum* singulares originados por más de un cigoto, distinguidos sólo en cortes histológicos. Por otra parte, talos crustosos de *Scytosiphon sp.* creciendo en condiciones de laboratorio, han mostrado contacto y/o fusión visual de talos, con continuidad aparente entre pares de costras involucradas. Similar a lo anteriormente

descrito, estudios realizados en fusión de invertebrados marinos coloniales como tunicados y ascidias, demuestran que los organismos que componen la colonia pueden ser genéticamente distintos (Sommerfeldt & Bishop 1999). Aún cuando no existen conexiones celulares entre los organismos, sólo la formación de un manto común mantiene la colonia (Bancroft 1903, Buss 1982, Maldonado 1998), siendo la formación de colonias o vida multicelular más beneficiosa que la vida independiente (Keller 1998, Strassmann *et al.* 2000).

La incapacidad de encontrar entidades genéticamente distintas en talos visualmente en contacto y/o fusionados en la localidad de Maitencillo, formando una entidad quimérica como ha sido descrita en *Mazzaella laminarioides* (Santelices 2004), es un hecho que conlleva a discutir dos factores: primero que el gen utilizado no fue el más adecuado para detectar polimorfismo entre los talos estudiados de *Codium sp.*, en organismos clonales, no descartándose que sean los talos genéticamente distintos al analizar otro gen. Este hecho ha llevado a un gran debate molecular en la identificación de los individuos, aseverándose que aunque es esperable que especies clonales con propagación vegetativa tengan bajos niveles de diversidad genética, existe incerteza de si el bajo polimorfismo encontrado en muchas especies se debe a una limitada diversidad genética poblacional o a limitados marcadores moleculares (Arnaud-Haond *et al.* 2005). Segundo, la localidad de Maitencillo presenta sólo un haplotipo (Capítulo III), desconociéndose si las causas de esta baja diversidad genética recaen en el tipo de dispersión, reproducción de la especie, y/o características locales de Maitencillo. Sin embargo, estudios a nivel intra-genet en localidades con mayor polimorfismo en *Codium sp.*, (más de un haplotipo) como es el caso de Paposos y Loncoyén, indican que es posible



encontrar talos de *Codium sp.* compuestos por más de un haplotipo, sugiriendo eventos previos de contacto y/o fusión entre talos genéticamente distintos con formación de una entidad quimérica genéticamente heterogénea (Capítulo V).

Ecológicamente, la respuesta aparentemente homogénea de contacto y/o fusiones de talos encontrada en los experimentos de exclusión con jaulas puede tener dos orígenes no evaluados: tamaño del área removida y tamaño de la costra. Trabajos experimentales en la especie (Sierralta & Santelices 1990, datos no publicados) demuestran que la capacidad de recuperación del alga frente a manipulación de talos y exclusión de herbívoros, tienen estrecha relación al tamaño del área removida. De la misma manera, ésta capacidad de recuperación del alga, pareciera tener relación con el tamaño de la costra (número de células) e intensidad luminosa. Trabajos posteriores en laboratorio (Anexo B), demuestran que la condición unicelular o multicelular (3-5 células) presenta una sobrevivencia diferencial frente a variaciones en intensidad luminosa, sugiriendo que la vida multicelular en *Codium sp.* implica cooperación de células.

Finalmente, aún cuando se desconocen los mecanismos por el cual los filamentos medulares y/o utrículos modificados logran mantenerse adheridos entre ellos y el sustrato, este estudio es el primero en describir contacto y/o fusión de talos de algas verdes, caracterizar morfológica y funcionalmente las células ubicadas en la zona de contacto y en el borde de talos.

#### 4.5 REFERENCIAS

- ABERG P. 1989. Distinguishing between genetic individuals in *Ascophyllum nodosum* populations on the Swedish west coast. Br. Phycol. J. 24: 183-190.
- ARNAUD-HAOND S, ALBERTO F, TEIXEIRA S, PROCACCINI G, SERRÃO EA & DUARTE CM. 2005. Assessing genetic diversity in clonal organisms: Low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. J. Heredity 96(4): 434-440
- BANCROFT FW. 1903. Variation and fusion of colonies in compound ascidians. Proc. Calif. Acad. Sci. (zool) 3: 131-186.
- BORDEN CA & STEIN JR 1969. Reproduction and early development in *Codium fragile* (Suringar) Hariot : Chlorophyceae. Phycologia 8: 91-99.
- BUSS LW. 1982. Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. Proc. Natl. Acad. Sci USA 79: 5337-5341.
- BUSS LW. 1999. Slime molds, ascidians, and the utility of evolutionary theory. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 8801-8803.
- CHANG J, CHANG- FENG D & J CHANG. 2002. A taxonomic and karyological study of the *Codium geppiorum* complex (Chlorophyta) in southern Taiwan, including the description of *Codium nanwanense* sp. Nov. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 161-170.
- COLLADO-VIDES L. 2002. Clonal architecture in marine macroalgae: ecological and evolutionary perspectives. Evol. Ecol. 15: 531-545.
- FILATOV DA. 2002. ProSeq. A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. Mol. Ecol. notes 2: 621-624.

- FLETCHER RL, BLUNDEN G, SMITH BE, ROGERS DJ & FISH BC. 1989. Occurrence of a fouling, juvenile stage of *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* (Goor) Silva (Chlorophyceae, Codiales). *J. Appl. Phycol.* 1: 227-237.
- GONEN Y, KIMMEL E, TEL-OR E & FRIEDLANDER M. 1996. Intercellular assimilate traslocation in *Gracilaria cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Hydrobiología* 326/327: 421-428.
- HARPER JL. 1985. Modules, branches and the capture of resource In Jackson JBC, Buss LW & Cook RC (eds) *Population Biology and Evolution of Clonal organisms*. Yale University Press, New Haven, Connecticut: 1-33.
- HOFFMAN A & SANTELICES B. 1997. *Flora Marina de Chile Central*. Ediciones Universidad Católica de Chile. 434 pp.
- HUBBARD CB & DJ GARBARY. 2002. Morphological variation of *Codium fragile* (Chlorophyta) in Eastern Canada. *Bot. Mar.* 45: 476-485.
- HYDAKA M, YURUGI K, SUNAGAWA S & KINZIE RA. 1997. III. Contact reactions between young colonies of the coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs* 16: 13-20.
- ILAN M & LOYA Y. 1990. Ontogenetic variation in sponge histocompatibility response. *Biological Bulletin. Marine biological laboratory Woods Hole.* 179:279-286.
- JACKSON JBC, BUSS LW & COOK RE. 1985. Clonality: a preface. In Jackson JBC, Buss LW & Cook RC (eds) *Population Biology and Evolution of Clonal organisms*. Yale University Press, New Haven, Connecticut: ix-xi
- JONES WF. 1956. Effect of spore coalescence on the early development of *Gracilaria*

- verrucosa* (Hudson) Papenfuss. Nature (London) 178: 426-427.
- KELLER L. 1998. Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. *Insectes Sociaux* 45:235-246.
- KRATZ RF & MANDOLI DF. 1999. The roles of light and the nucleus in the regulation of reproductive onset in *Acetabularia acetabulum*. *Planta* 209: 503-512
- LUCAS AHS. 1935. Marine Algae of Lord Howe Island. Proc. Linn Soc. NSW 60: 194-232.
- MAGGS CA & CHENEY DP. 1990. Competition studies of marine macroalgae in laboratory culture. *J. Phycol* 26: 18-24.
- MALDONADO M. 1998. Do chimeric sponges have improved chances of survival?. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 164:301-306.
- MANDOLI D. 1996. Establishing and maintaining the body plan of *Acetabularia acetabulum* in the absence of cellularization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 7: 891-901.
- MEINESZ A & HASSE B. 1991. Introduction et invasion de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanologica Acta* 14: 415-426.
- MENESES I & SANTELICES B. 1999. Strain selection and genetic variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 11: 241-246.
- MENESES I, SANTELICES B & SANCHEZ P. 1999. Growth-related intracolonial genetic changes in *Gracilaria chilensis* (Gracilaria, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 135: 391-397.
- MERRIAM -WEBSTER DICTIONARY. 2006. <http://www.m-w.com>
- MUNOZ AA & SANTELICES B. 1994. Quantification of the effects of sporeling

- coalescence on the early development of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta). J. Phycol. 30: 387-392.
- NANBA N, KADO R, OGAWA H & KOMURO Y. 2002 Formation and growth of filamentous thalli from isolated utricles with medullary filaments of *Codium fragile* spongy thalli. Aquatic Botany 73: 255-264.
- NANBA N, KADO R, OGAWA H & TOYAMA K. 2000. Assays for evaluating seaweed attachment using isolated utricles of *Codium fragile* (Codiales, Chlorophyceae). I Selection of suitable utricles for assays. Sessile Organisms 17: 23-30.
- PINEDA-KRCH M & LEHTILA K. 2004. Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. J. Evol. Biol. 17: 1167-1177.
- PROVAN J, MURPHY S & MAGGS C. 2005. Tracking the invasive history of green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*. Mol. Ecol. 14: 189-194.
- RIDLEY M. 1996. Evolution. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Science Inc. USA. 719 pp.
- ROSAS JJ, SANCHEZ-DELBARRIO C, MESSEGUER X & ROSAS R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.
- ROSENVINGE LK. 1931. The marine algae of Denmark, contribution to their natural history. Part IV. Rhodophyceae, IV Gigartinales, Rhodymeniales, Nemastomatales. K Danske Vidensk. Selsk 7 7: 499-599.
- SANTELICES B 2004. A comparison of ecological responses among aclonal (unitary), clonal and coalescing macroalgae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 300: 31-64.

- SANTELICES B 2001. Implication of clonal and chimeric- type thallus organization on seaweed farming and harvesting. *J. Appl. Phycol.* 13: 153-160.
- SANTELICES B. 1990. Patterns of organizations of intertidal and shallow subtidal vegetation in wave exposed habitats of central Chile. *Hydrobiologia* 192: 35-57.
- SANTELICES B & ALVARADO JL. 2005. Dynamic of early recruitment in the coalescing seaweed *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). Proceedings, 8<sup>th</sup> International Phycological Congress. Durban, South Africa, August 2005: 44 (4):90
- SANTELICES B & VERA ME. 1984. Variación estacional de las floras marinas en Caleta Horcón, Chile Central. *Phycologia Latinoamericana* 2: 83-101.
- SANTELICES B, S MONTALVA & OLIGER P. 1981. Competitive algal community organization in exposed intertidal habitats from central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6: 267-276.
- SANTELICES B, M HORMAZÁBAL, J CORREA & FLORES V. 2004 a. The fate of overgrown sporeling in coalescing Rhodophyta *Phycologia* 43(4): 346-352.
- SANTELICES B, D AEDO, M HORMAZABAL & FLORES V. 2003 a. Field testing of Inter- and intraspecific coalescence among mid- intertidal red algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 250: 91-103.
- SANTELICES B, J CORREA, M HORMAZABAL & FLORES V. 2003 b. Contact responses between spores and sporelings of different species, karyological phases and cystocarps of coalescing Rhodophyta. *Mar. Biol.* 143: 381-392.

- SANTELICES B, J CORREA, I MENESES, D AEDO & VARELA D. 1996. Sporeling coalescence and intracolonial variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 32: 313-322.
- SANTELICES B, J CORREA, D AEDO, M HORMAZABAL, V FLORES & SANCHEZ P. 1999. Convergent biological processes among coalescing Rhodophyta. *J. Phycol* 35:1127-1149.
- SCOFIELD VL, SCHLUMPBERGER JM, WEST LA & WEISSMAN IL. 1982. Protochordate allorecognition is controlled by a MHC- like gene system. *Nature* 295:499-502.
- SERIKAWA KA & MANDOLI D. 1998. An analysis of morphogenesis of the reproductive whorl of *Acetabularia acetabulum*. *Planta* 207: 96-104.
- SIERRALTA & SANTELICES B. 1990. Recuperación de *Codium dimorphum* a perturbaciones: el efecto del tamaño y la forma de las aperturas en dos condiciones de herbivoría. Seminario de investigación Depto Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- SILVA P. 2002. A journey through *Codium* after forty years. IX<sup>m</sup> Workshop on Taxonomy of Economic Seaweeds. University of Hawaii at Hilo. Mayo 22-29.
- SILVA P. 1957. *Codium* in Scandinavian waters. *Svensk Botanisk Tidskrift* 51: 117-134
- SILVA P. 1955. The dichotomous species of *Codium* in Britain. . *J. Mar. Biol. Assoc.* UK. 34: 565-577
- SILVA P. 1951. The genus *Codium* in California with observations on the structure of

- the walls of the utricles. Univ. Calif. Pub. Bot. 25(2): 79-114
- SILVA P & HBS WOMERSLEY. 1956. The genus *Codium* (Chlorophyta) in Southern Australia. Austr. J. Bot. 4: 261-289.
- SOMMERFELDT AD & BISHOP JDD. 1999. Random amplified DNA (RAPD) analysis reveals extensive natural chimerism in a marine protochordate. Mol. Ecol. 8: 885-890.
- SPURR AR 1969. A low- viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrast. Res. 26: 31-43.
- STONER DS, RINKEVICH B & WEISSMAN IL. 1999. Heritable germ and somatic cell lineage competitions in chimeric colonial protochordates Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9148-9153.
- STRASSMANN JE, ZHU Y & QUELLER DC. 2000. Altruism and social cheating in the social amoeba *Dyctiostelium discoideum*. Nature 408: 967-967.
- TROWBRIDGE C. 1996. Demography and phenology of the intertidal green alga *Codium setchellii*: the enigma of local scarcity on sand-influenced rocky shores. Mar. Biol. 127: 341-351.
- TVETER – GALLEGHER E & MATHIESON AC. 1976. Sporeling coalescence in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). J. Phycol.12: 110-118
- WATTIER RA, PRÖDOHOL P & MAGGS C. 2002. Dna Isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). P. Mol. Biol. Rep- 18:275-281.
- WILLIAM S & GROSHOLZ E: 2000. Preliminary report from the *Caulerpa taxifolia* invasion in southern California. Mar. Ecol. Prog. Ser. 233: 307-310.



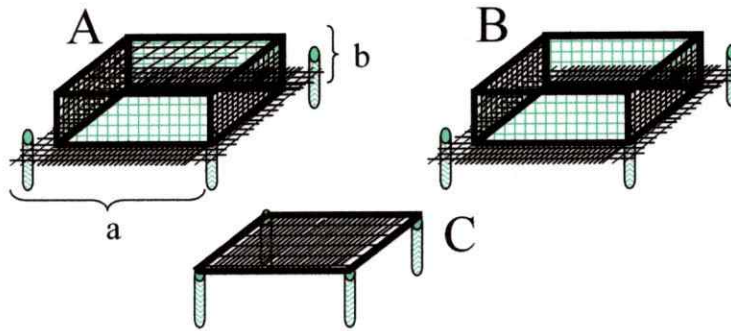


Figura 28. Jaulas de exclusión de herbívoros y reducción de luz utilizadas en el experimento intra-genet en la localidad de Horcón. (A) Jaula completamente cerrada, (B) Jaula sin techo con paredes, (C) Jaula sin paredes pero con techo. (a)=0,2 m; (b)= 0,1m; 0,5 cm diámetro del orificio de la malla.

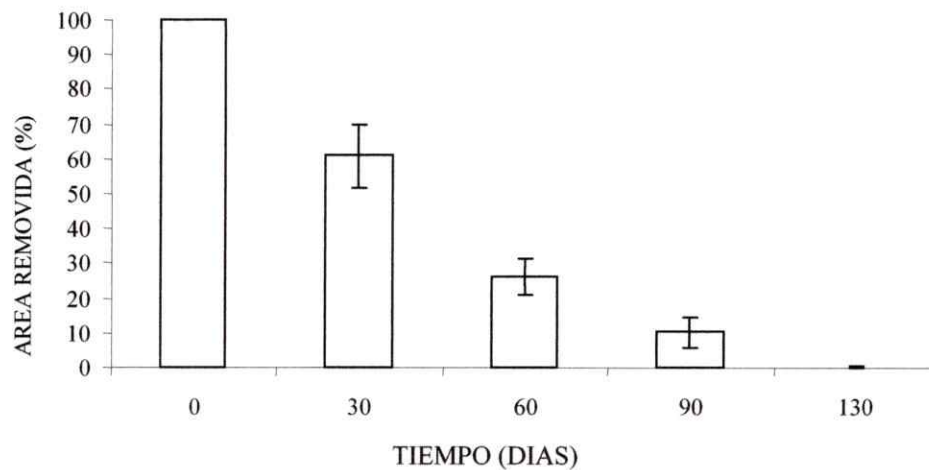


Figura 29. Reducción del área removida (promedio de tratamientos) en *Codium sp.* a nivel intra-genet después de la interrupción experimental de la continuidad del talo en Horcón, Chile central.

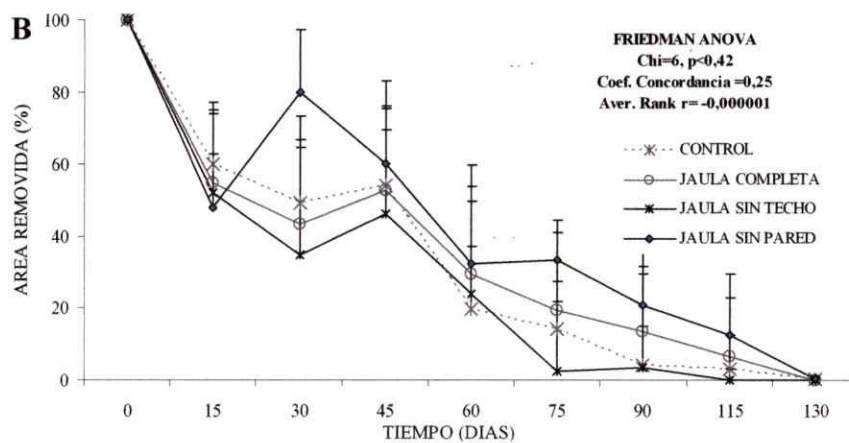
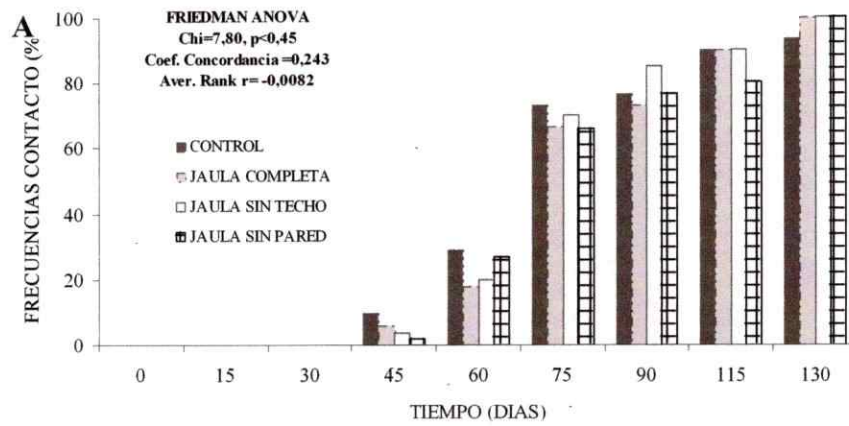


Figura 30. Contacto y/o fusión de talos en *Codium sp.* a nivel intra-genet después de la disrupción experimental de la continuidad del talo en Horcón, Chile central.

(A) Estimación de la frecuencia de contacto de los distintos tratamientos en el tiempo

(B) Reducción del área removida en cada tratamiento en el tiempo

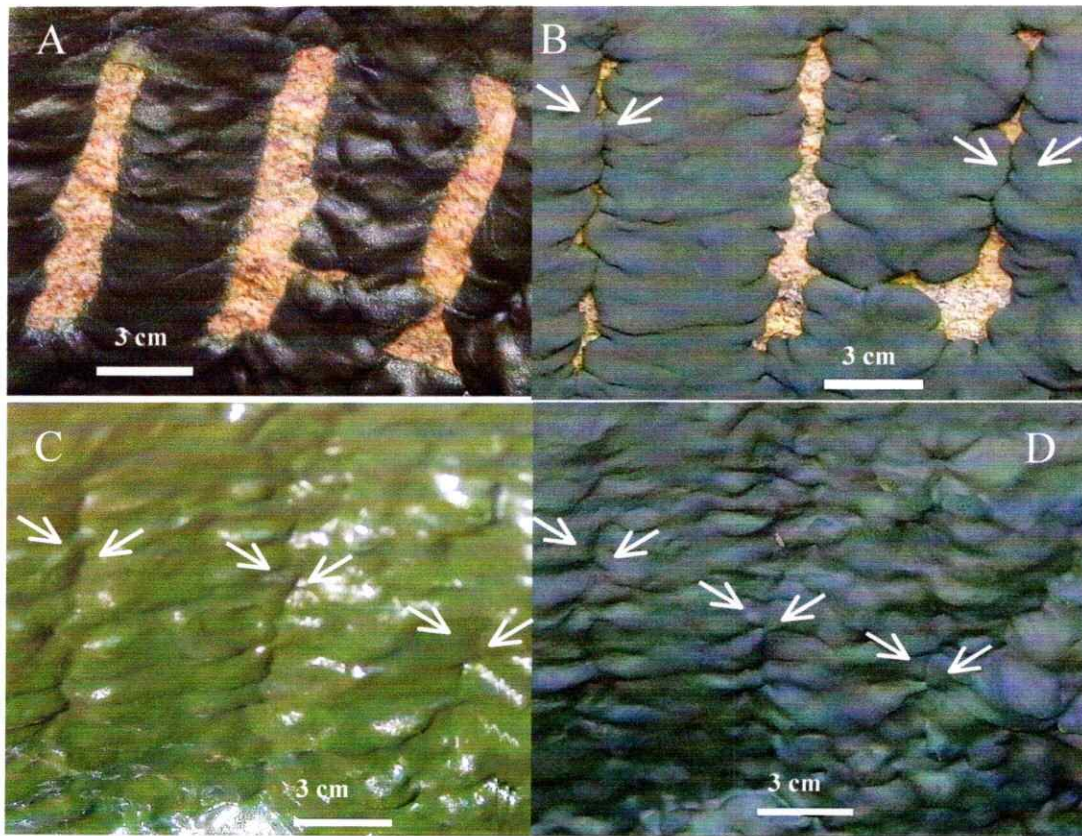


Figura 31. Patrón de recolonización y contacto y/ fusión visual a nivel intragenet en *Codium sp.*, en Horcón, Chile central. (A) día 15, (B) día 45, (C) día 60, (D) día 75. Las flechas indican la zona de contacto (cicatriz) en el tiempo

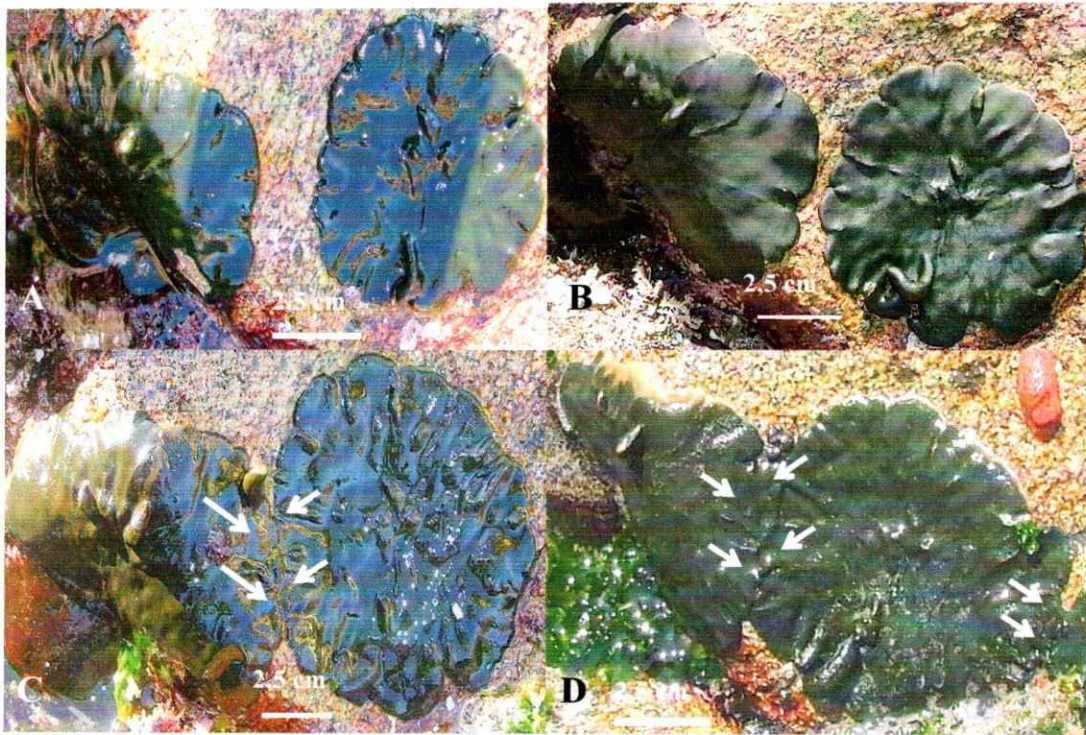


Figura 32. Contacto y/ fusión visual de talos a nivel inter-genet de *Codium sp.* en Maitencillo, Chile central. (A) día 0, (B) día 45, (C) día 60, (D) día 75. Las flechas indican la zona de contacto (cicatriz) en el tiempo

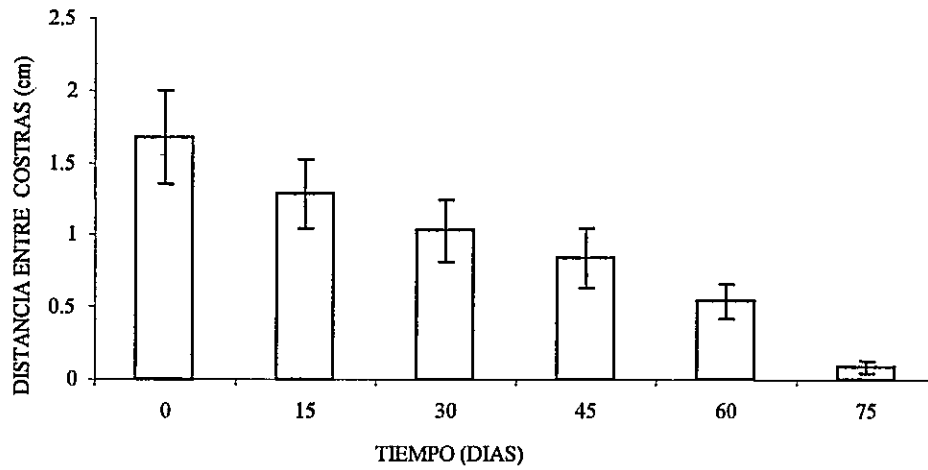


Figura 33. Reducción de la distancia por crecimiento entre pares de costras monitoreados a nivel inter-genet de *Codium sp.* en Maitencillo, Chile central.

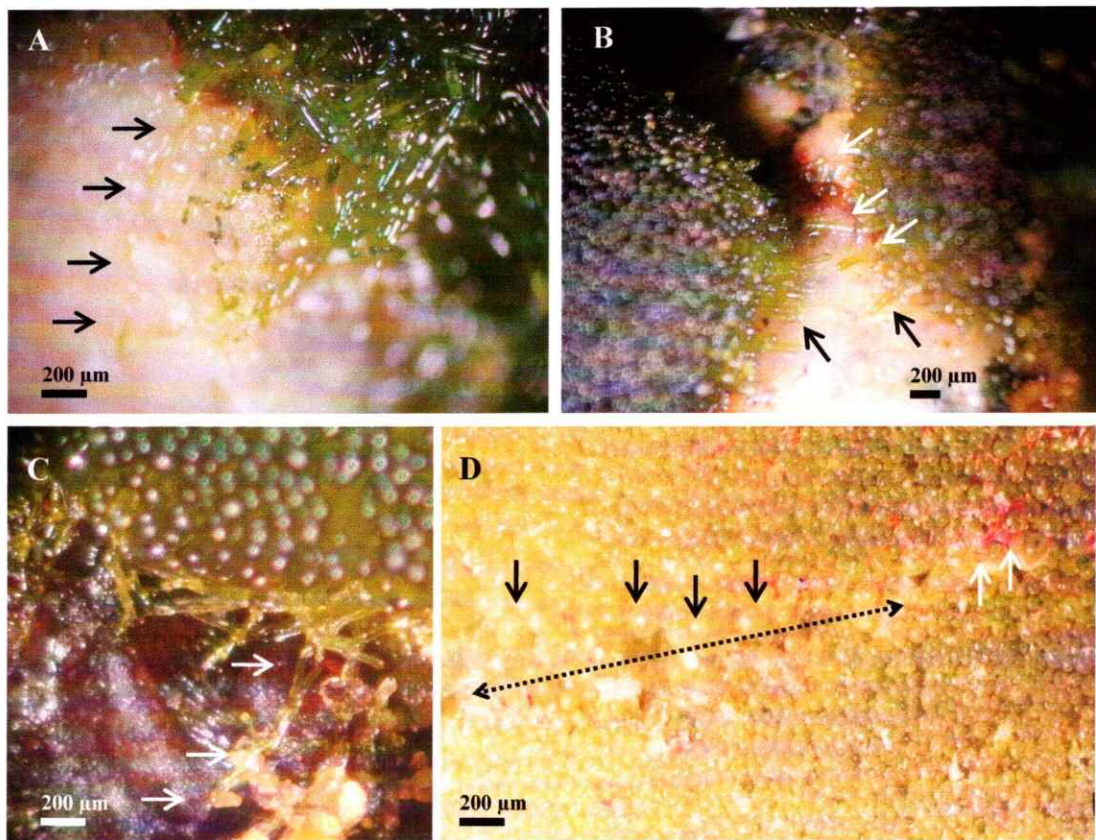


Figura 34. Patrón de recolonización del sustrato libre en *Codium sp.* (A y C) Filamentos medulares altamente pigmentados comenzando a elongarse adherido al sustrato (B) Filamentos medulares muy pigmentados adheridos al sustrato y en dirección al talo vecino, (D) Zona de contacto entre dos bordes (flechas punteda) y numerosos utrículos mas anchos (Flechas negras) recolonizando el sustrato disponible y desplazando a bacterias (Flechas blancas)

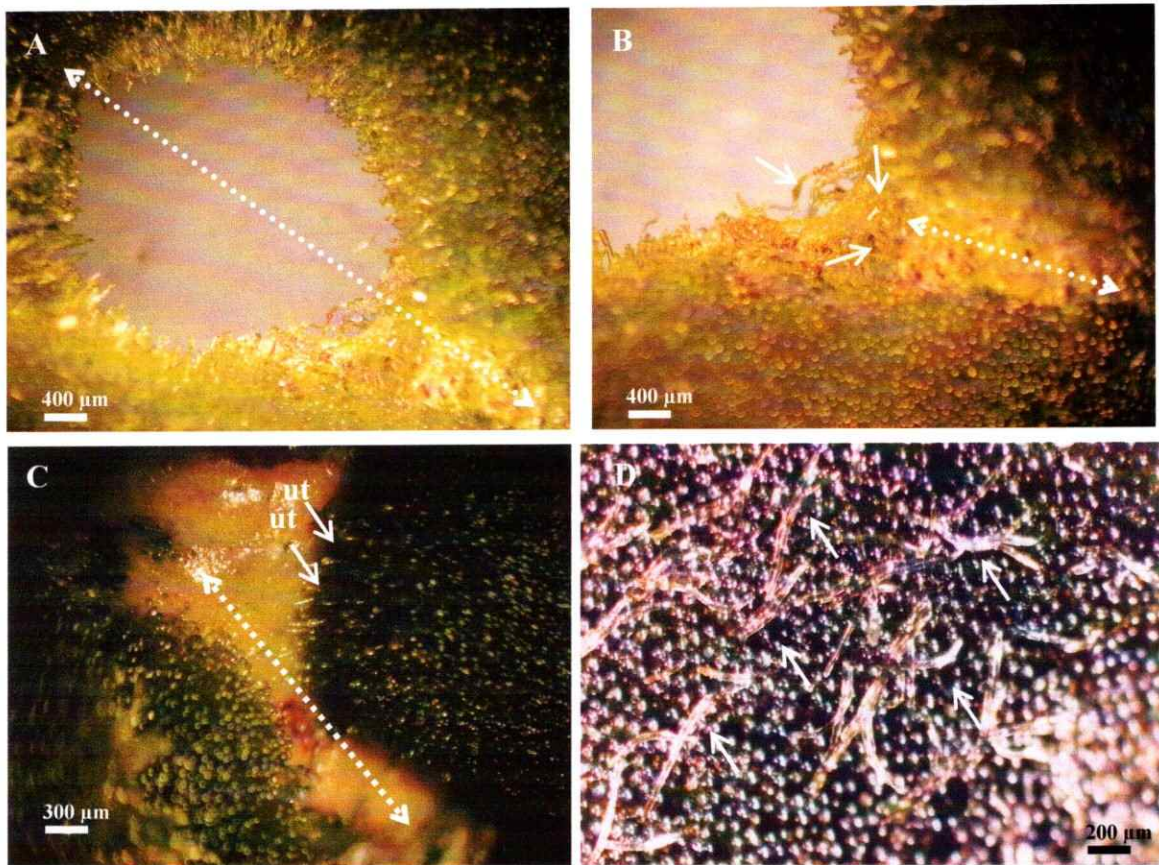


Figura 35. Patrón de recolonización del sustrato libre en *Codium sp.* (A, B y C) Utriculos modificados (ut) que altamente pigmentados comenzando a elongarse adherido al sustrato (D) Filamentos medulares que emergen desordenadamente de una zona de contacto post- cicatriz

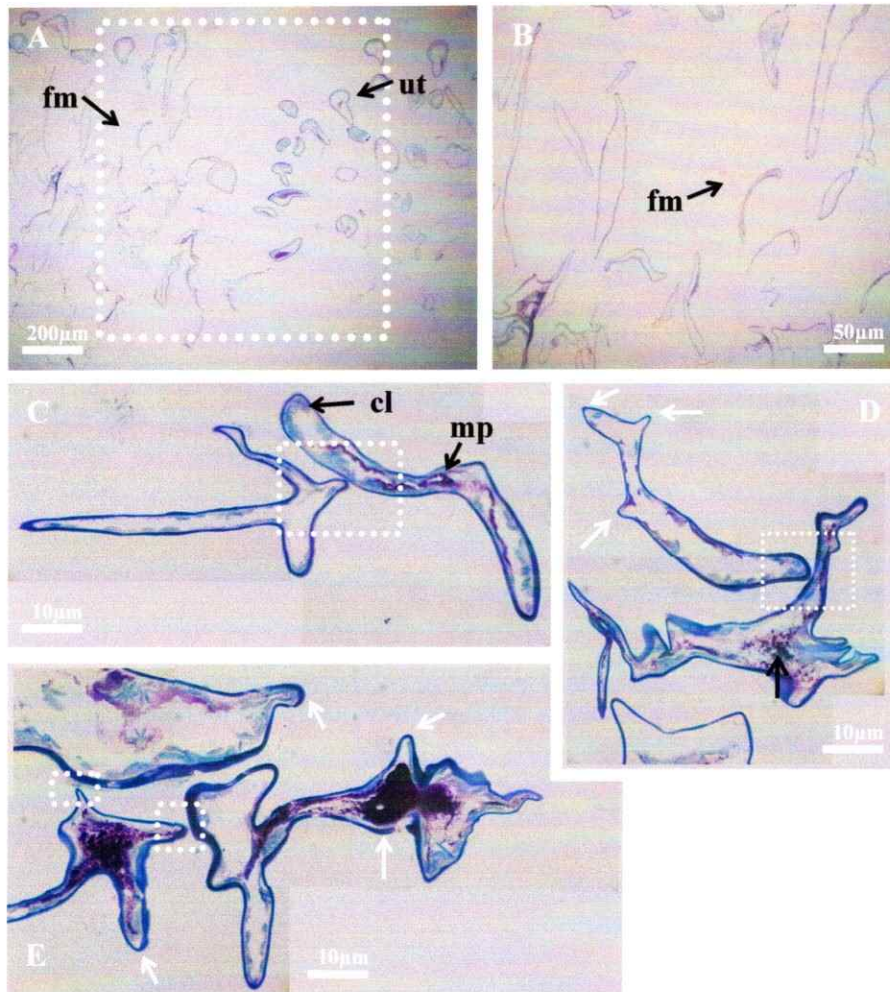


Figura 36. Cortes semi-finos (800 nm) realizados en la zona de contacto y/o fusión entre talos de *Codium sp.* (A) Zona de contacto entre dos talos, (B) zoom hacia un filamento medular, (C, D y E) Filamentos medulares y/ utrículos modificados en contacto. ut= utrículo, fm= filamento medular, cl= cloroplastos, mp= mucopolisacáridos. Flechas blancas destacan evaginaciones o protuberancias en las células. Nótese que las células se encuentran muy cercanas pero no en contacto directo.



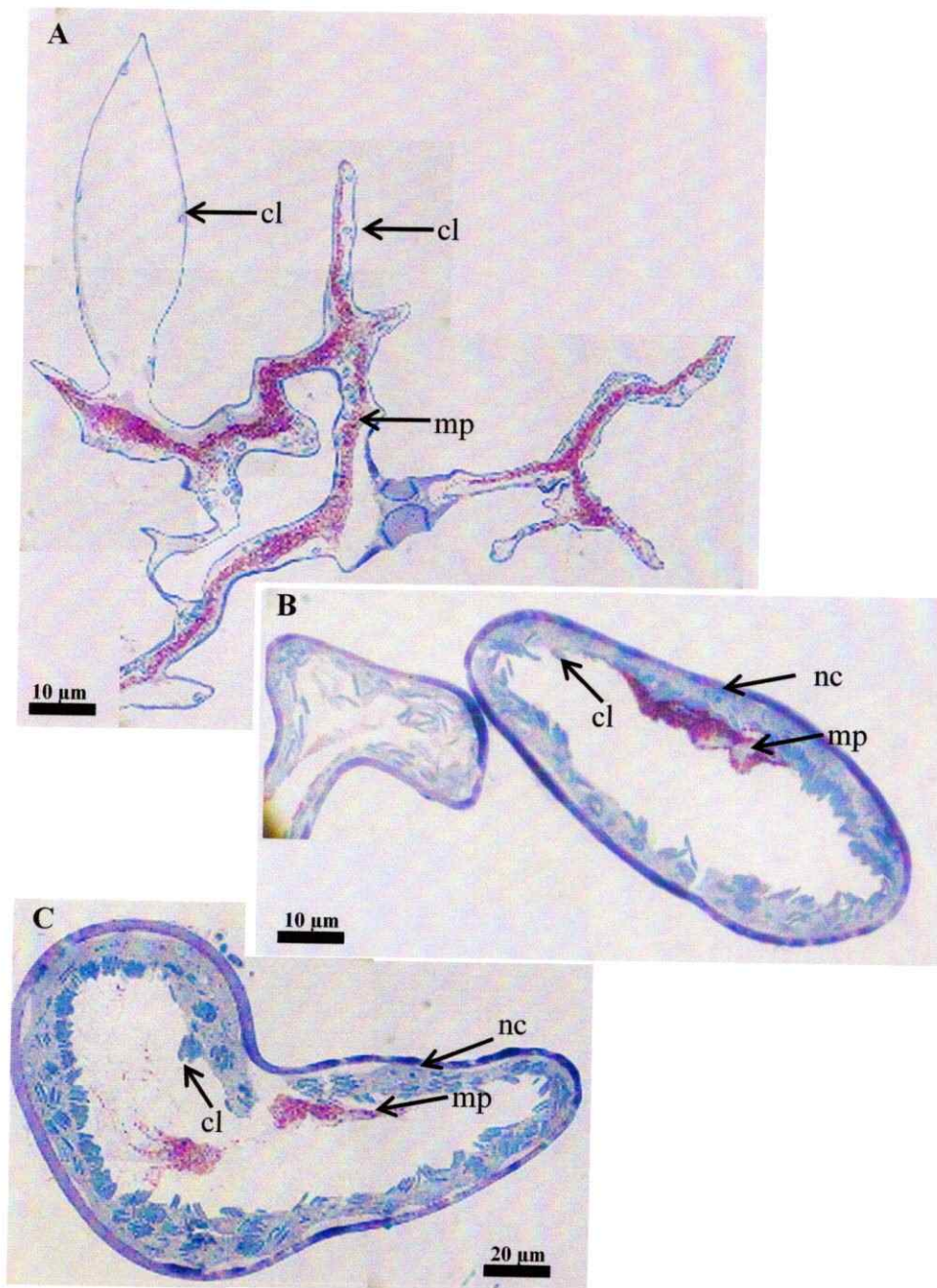


Figura 37. Cortes semi-finos (800 nm) realizados en talos de *Codium* sp. (A) Utrículo y Filamentos medulares provenientes de la zona de contacto, (B y C) Utrículos no ubicados en la zona de contacto. ut= utrículo, fm= filamento medular, cl= cloroplastos, mp= mucopolisacáridos, nc=núcleo.

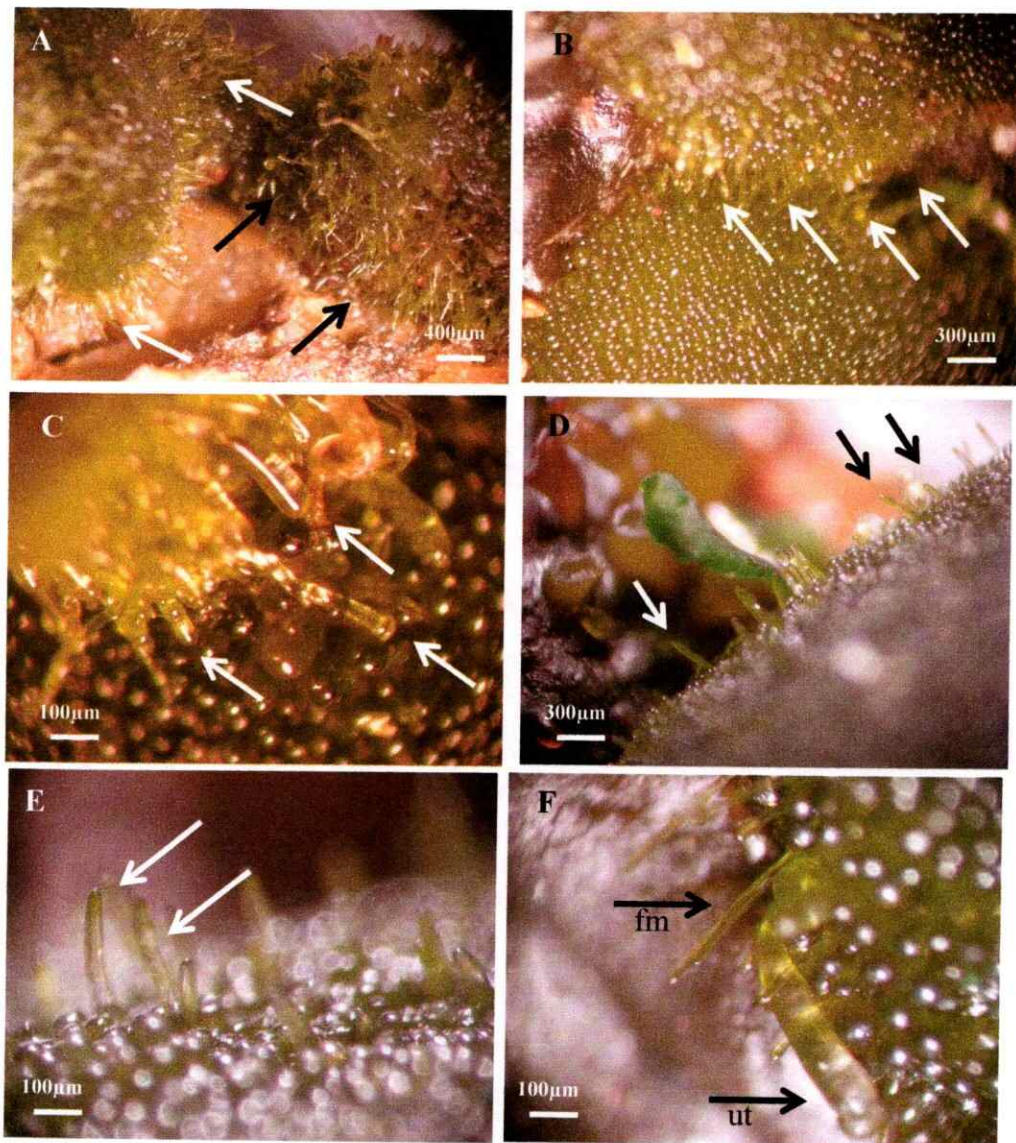


Figura 38. Morfología y disposición de células en *Codium sp.* Ubicadas en el borde de talos no manipulados. (A) filamentos medulares y utrículos modificados emergiendo del talo y adhiriéndose al sustrato. (B) utrículos modificados que protuden desde el talo (C) Acercamiento a los utrículos modificados. (D) Numerosos filamentos medulares, pigmentados y sobresaliendo del talo. (E) ampliación de (D) mostrando en detalle filamentos emergiendo. (F) Ampliación de (D) que muestra en detalle de utrículos modificados (ut) y filamentos medulares (fm) emergiendo.

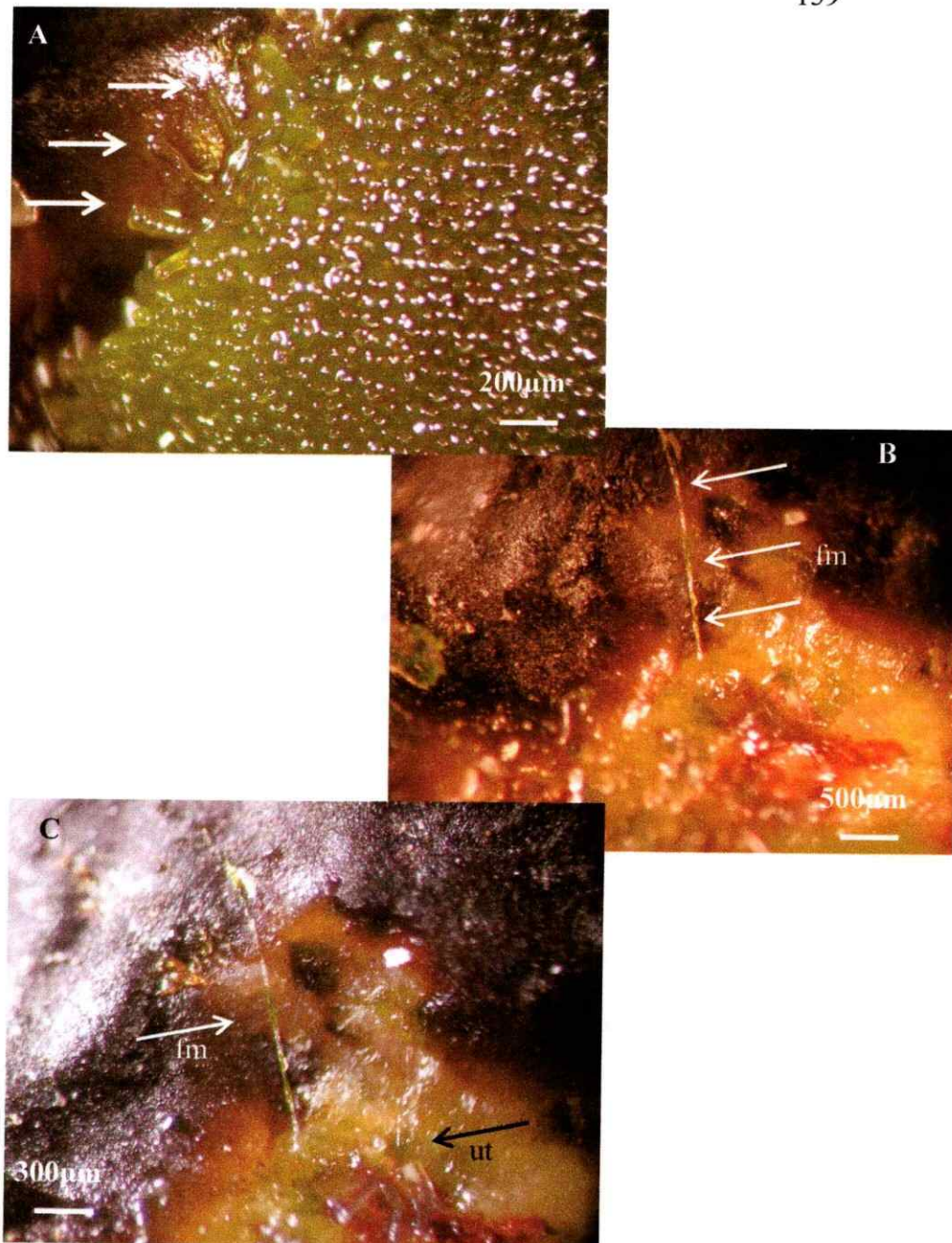


Figura 39. Morfología y disposición de células en *Codium sp.*, ubicadas en el borde de los talos no manipulados (A) Utrículos modificados adhiriéndose al sustrato y elongándose (flechas), (B) filamento medular adherido al sustrato y elongado. (C) Ampliación de (B) donde se observa el filamento medular pigmentado en zona media (flecha blanca) y algunos utrículos modificados despigmentados adheridos al sustrato y elongados (flecha negra)



Figura 40. Morfología y disposición de células en *Codium sp.*, ubicadas en el borde de los talos no manipulados. A, Filamento medular adherido al sustrato lejano al talo de origen. B, C y D distintos focos para mostrar el filamento medular pigmentado y Adherido en cientos puntos al sustrato. Nótese en D que el filamento medular se mantiene en el aire adherido al sustrato por dos puntos (flechas)

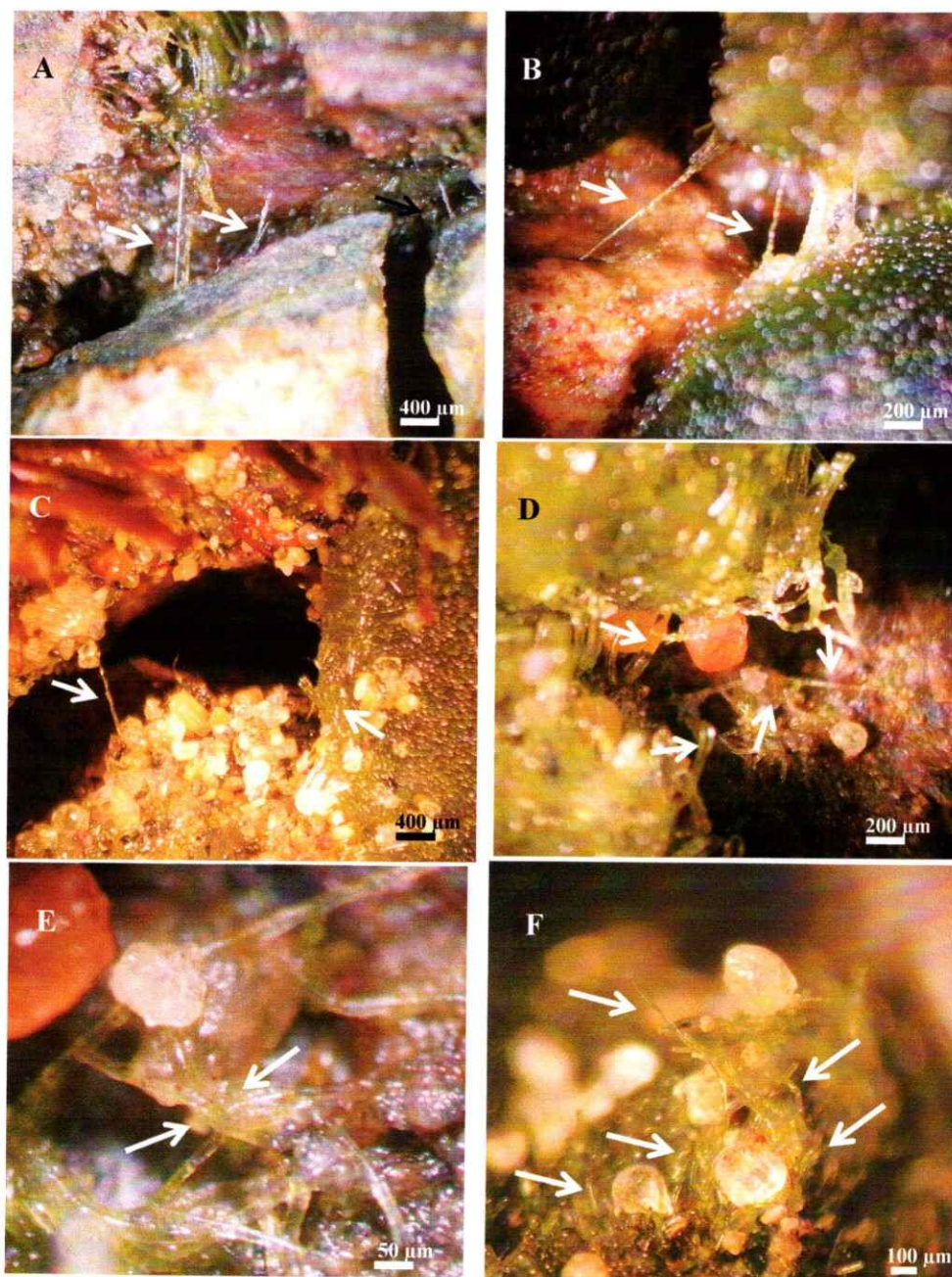


Figura 41. Morfología y disposición de células en *Codium sp.*, ubicadas en el borde de los talos no manipulados. (A y B) Filamento medular adherido a rocas (C, D, E, F) filamento medular adherido a granos de arena. Nótese en E que los filamentos medulares se entrecruzan (flechas)



Figura 42. Morfología y disposición de células en *Codium sp.*, ubicadas en el borde de los talos no manipulados. Filamento medular creciendo sobre invertebrados.

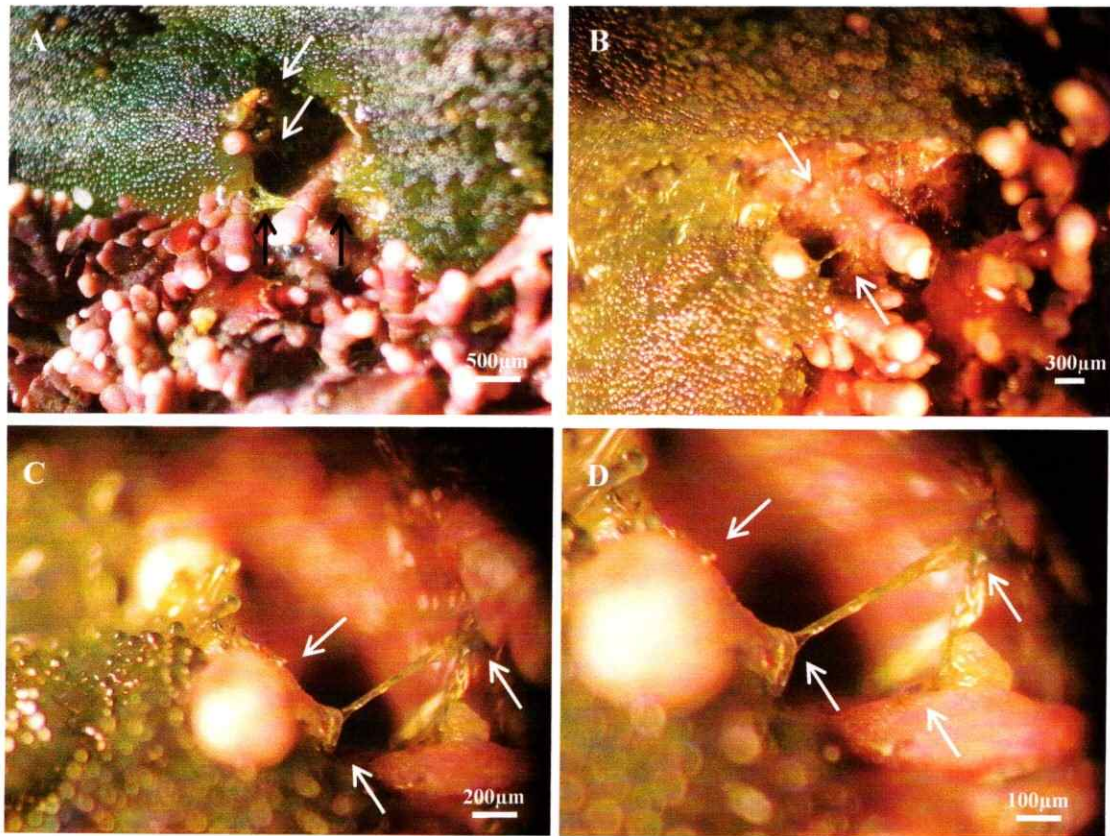


Figura 43. Morfología y disposición de células en *Codium sp.*, ubicadas en el borde de los talos no manipulados. Filamento medular creciendo sobre algas calcáreas. Nótese en A el alga comienza a perder su pigmentación (flechas)

## ANEXO B

### CRECIMIENTO CELULAR EN *Codium sp.*

#### B.1. INTRODUCCIÓN

En ambientes marinos, las especies sifonales (orden Bryopsidales) pueden alcanzar dimensiones del talo de hasta un metro de largo aún cuando éste se componga por una singular célula gigante que carece completamente de tabicaciones (Meinesz & Hesse 1991, William & Grosholz 2002). En este contexto, el talo o célula se constituye por numerosos núcleos, cloroplastos y mitocondrias que se distribuyen y movilizan libremente en el citoplasma (Lobban & Harrison 1997). Esta simple arquitectura, le confiere una gran vulnerabilidad a variaciones abióticas (luz, temperatura, salinidad o turbulencia) y lesiones causadas por agentes bióticos (pastoreadores) o mecánicos. Sin embargo, las especies han desarrollado respuestas morfológicas y fisiológicas del tipo compensatorias, que por un lado maximizan la captación de nutrientes y luz variando el tamaño del talo (Collado Vides 2002, Collado Vides & Robledo 1999), y moviliza rápidamente proteínas que actúan como tapón (plug) de heridas (Dreher *et al.* 1978, Menzel 1997).

Dentro del orden Bryopsidales, los talos del género *Codium* están compuestos por células sifonadas, que se diferencian en una porción apical o utrículo y una porción basal denominada filamento medular (Silva 2002). El utrículo, de morfología clavada a ovalada, y que dependiendo de la especie mide entre 500 a 1500  $\mu\text{m}$ , es altamente pigmentado con gran cantidad de cloroplastos (Fletcher *et al.* 1989, Nanba *et al.* 2000). Contrario a lo anterior, el filamento medular es mayoritariamente despigmentado y



alargado que emerge desde el utrículo, encontrándose entre uno a tres filamentos medulares por utrículo (Silva 1951, 1955, 1957, Silva & Womersley 1956, Hubbard & Garbary 2002, Chang *et al.* 2002). En especies crustosas, el talo se constituye por una capa de utrículos o corteza de los cuales se emergen numerosos filamentos medulares que conforman una médula (Nanba *et al.* 2002) que se adhiere al sustrato (Silva 2002).

Dentro de las especies crustosas, *Codium sp.* es una especie que habita ambientes sombríos en intermareal de Chile central, ubicándose mayoritariamente en grietas, o frentes expuestos a la luz y el oleaje, pero debajo de otras algas pardas como *Lessonia* y *Durvillaea* (pers. observ.). En dichos ambientes, el crecimiento óptimo del alga ocurre durante las estaciones de otoño e invierno, pudiendo alcanzar grandes dimensiones en talla hasta 18 m', con consecuente dominio del sustrato e implicancias en la estructuración comunitaria y la sucesión de organismos intermareales (Santelices *et al.* 1981, Sierralta & Santelices 1990, datos no publicados). Contrario a lo anterior, durante las estaciones de primavera y verano la sobrevivencia de los talos de *Codium sp.* disminuye, debido a dos factores: a) reducción de la talla de los talos por interrupción de su continuidad, generando talos más vulnerable a herbivoría y b) factores abióticos o climáticos característicos de época estival en Chile central (aumento de temperatura del agua de mar, de radiación solar y exposición con mareas bajas extremas), que provocan blanqueamiento del borde de los talos o muerte celular (Santelices *et al.* 1981).

Durante las estaciones de máximo crecimiento de *Codium sp.*, observaciones en terreno, sugieren que los talos son capaces de crecer meristemáticamente, y contactarse y/o fusionarse con el talo vecino, gracias a cambios morfológicos y funcionales de las células sifonales que se ubican en el borde del talo. Este crecimiento celular le permite a

la especie colonizar nuevos sustratos y desplazar competidores por sobrecrecimiento celular (ver Capítulo IV). Sin embargo, se desconocen las condiciones abióticas y bióticas que permiten el crecimiento de las células que componen el talo en condiciones naturales y menos aún en condiciones controladas. Basado en los factores abióticos y bióticos descritos para periodos de máximo crecimiento de Chile central en *Codium sp.*, el objetivo de este anexo es poner a prueba las siguientes hipótesis:

- a) El crecimiento celular debiera ser posible en condiciones similares a la estación invernal de Chile central, a baja temperatura e intensidad luminosa.
- b) El crecimiento celular debiera ser mayor en condiciones bióticas adecuadas como una alta densidad celular.
- c) Frente a perturbaciones intensas, la sobrevivencia celular debiera responder de manera diferencial entre células cultivadas aisladas y agrupadas en condiciones de intensidad luminosa contrastante.

En este contexto, este trabajo evalúa el crecimiento y sobrevivencia de las células de *Codium sp* en condiciones controladas de laboratorio. El crecimiento fue estimado en condiciones variables en cuanto a intensidad luminosa (factor abiótico) y densidad celular (factor biótico). Mientras que la sobrevivencia fue estimada sometiendo las células cultivada en la combinatoria de intensidad luminosa y densidad celular, a una perturbación luminosa intensa y prolongada.

## **B.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***A) Crecimiento celular en condiciones variables***

Con el objetivo de evaluar y describir la capacidad de crecimiento de las células

de *Codium sp.* en condiciones de laboratorio, se cultivaron células provenientes de 15 talos crustosos elegidos al azar en la localidad de Torpederas (33°01'S-71°38'W). Los cultivos se sometieron a condiciones constantes de temperatura (13°C), fotoperiodo (12:12LD), cambio semanal de medio de cultivo SFC (Correa & McLachlan 1991); y a una combinatoria de variables de intensidad luminosa y densidad celular. En este contexto, se implementaron dos sets de cultivos el primero expuestos a intensidad luminosa bajas de  $10 \pm 5$  ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y el segundo cultivado en oscuridad ( $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Cada set estaba compuesto por células creciendo de manera individual (N=25), células agrupadas con 2 utrículos (N=15), células agrupadas con 3 utrículos (N=15), células agrupadas con 4 utrículos (N=15) y agrupadas con 5 utrículos (N=15). De esta manera, 170 células individuales y agrupadas, cultivadas en las condiciones descritas anteriormente se mantuvieron en multiplacas cuadradas de 25 posiciones con capacidad de 4 ml cada una (Bibby Sterilin Ltd., Stone, Staffs, UK). Los cultivos fueron monitoreados y fotografiados semanalmente bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-10A, Japan) y microscopio de campo claro (Nikon, Optiphot-2, Japan), equipados con cámara digital CoolSNAP-Proef (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), y con sistema para adquisición de imágenes digitales Image Pro® Plus 4,5. The Proven Solution™. Versión 4.1.0.0 (1993-1995 Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD, USA), registrando las variaciones morfológicas que permitieron el crecimiento de las células.

Después de 30 días de cultivo, se cuantificaron cinco variables morfológicas en las células cultivadas: largo de utrículos, número de filamentos medulares, largo de filamentos medulares, número de evaginaciones/cm, y largo de evaginaciones (Figura 44a). En células agrupadas el valor de la réplica fue estimado como el valor promedio de

las células que componían la agrupación, cuantificadas independientemente (Figura 44b). El análisis comparativo entre células aisladas y agrupadas cultivadas en condiciones contrastantes de luz, se analizó estadísticamente en el software Statística 6.0 (Statsoft, Inc. 2001, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

### **B) *Sobrevivencia celular***

Con el objetivo de evaluar la sobrevivencia a una perturbación luminosa intensa y prolongada de células cultivada en la combinatoria de intensidad luminosa y densidad celular, después de 30 días de cultivo en las condiciones controladas anteriormente descritas, los cultivos fueron expuestos por siete días a un shock luminoso ( $30 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). La sobrevivencia de células individuales y agrupadas se compararon estadísticamente a través del análisis paramétrico ANOVA- one way test, realizada en el software Statística 6.0 (Statsoft, Inc. 2001, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

## **B.3 RESULTADOS**

### **A) *Crecimiento celular en condiciones variables***

#### **i) Comparación del crecimiento en condiciones variables**

Los cultivos de células realizados en condiciones contrastantes de intensidad luminosa mostraron que a intensidad luminosa de  $10 \pm 5 (\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$ , las células fueron incapaces de sobrevivir mas allá de una semana, independientemente del número de células cultivadas. En términos generales, en ésta condición luminosa, el protoplasma de las células comenzó a disgregarse (Figura 45a-45d) y perder su coloración.

Finalmente, las células perdieron su turgencia y vertieron el protoplasma translúcido al fondo de las placas de cultivo.

Contrariamente, las células cultivadas en ausencia total de la luz mostraron un protoplasma homogéneo tanto en células individuales como en células agrupadas en número variable. En ambos casos, el patrón de crecimiento fue similar con evaginaciones de la pared celular (Figura 46). En este contexto, comparando las células individuales versus agrupadas, la cuantificación del crecimiento a través de las variables morfológicas, no mostró diferencias significativas en cuanto al largo de los filamentos medulares, número de evaginaciones totales, número de evaginaciones por largo del filamento y largo alcanzado por las evaginaciones (Figuras 47a-47d). Sin embargo, se observó un patrón de crecimiento inversamente proporcional al número de células cultivadas, con un mayor crecimiento en células cultivadas individualmente en las variables largo de utrículos (Figura 47e,  $F=6,37$ ,  $p=0,0001$ ) y número de filamentos medulares (Figura 47f,  $F=23,3$ ,  $p=0,0000$ ).

## ii) Descripción del crecimiento

Como se ha descrito anteriormente, el crecimiento celular fue posible gracias a eventos previos y fundamentales que se desarrollaron en oscuridad durante las tres primeras semanas de cultivo, tales como la adherencia al sustrato, que se relacionó directamente con los filamentos medulares en cuanto a la habilidad de adherirse y la cantidad de los mismos (Figura 48a-48b). El aumento del protoplasto involucró aumento y movilización de mucopolisacáridos, cloroplastos fusiformes y núcleos durante la primera semana, observándose una matriz homogéneamente pigmentada, pero más

concentrada en las porciones donde se iniciaría el crecimiento (Figura 48c). Y finalmente el crecimiento inicial, que se observó como evaginaciones de la pared de la célula (Figura 48d, 48e).

De esta manera, las células se caracterizaron por presentar dos zonas de crecimiento: los utrículos (40%) y los filamentos medulares (100%). En los utrículos, la zona de crecimiento (lateral o apical) observada más intensa en cuanto a pigmentación que el resto, fue seguida por una evaginación de la pared del utrículo durante la tercera semana. Esta evaginación dio como resultado, la formación de un filamento delgado y largo similar a un filamento medular o "pelo" (Figura 49), y la formación de un filamento grueso y corto análogo a un utrículo pequeño o "gametangio" (Figura 50a-50b), presentándose en el 2% de los casos ambas situaciones en el mismo utrículo (Figuras 50c).

El crecimiento en la porción inferior de las células o filamentos medulares, fue también precedido por el aumento y migración del protoplasma utricular, el que se trasladó hacia el filamento medular ya sea en las porciones laterales o terminales del mismo. A partir de la segunda semana de cultivo, estos filamentos se elongaron con numerosas evaginaciones emergiendo desde el filamento (Figura 51a), llegando tanto al filamento como las evaginaciones al doble o triple de su largo hacia la tercera y cuarta semana de cultivo en oscuridad (Figura 51b).

Tanto en el crecimiento utricular como el del filamento medular, la formación de evaginaciones que dieron origen a "pelos", se relacionaron directamente a la adherencia de la célula con el sustrato.

### **B) Supervivencia celular**

Contrario a lo observado en condiciones homogéneas de crecimiento, donde las células aisladas presentan un mayor crecimiento, después de 7 días de shock luminoso, la supervivencia de estas células aisladas fue significativamente menor ( $F= 13,07$ ,  $p=0,0000$ ), observándose un patrón de supervivencia directamente proporcional al número de células cultivadas ( $r^2= 0,38$ ,  $r=0,62$ ,  $p=0,0000$ , Figura 52a), variando desde el 30% en células individuales versus 100% de supervivencia en agrupaciones de 5 utrículos (Figura 52b).

## **B.4. DISCUSIONES Y CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en este anexo dan cuenta que las células de *Codium sp.* individuales o agrupadas son capaces de crecer en condiciones de baja temperatura, fotoperiodo promedio y ausencia de luz. Este crecimiento observado en utrículos y filamentos medulares fue precedido por los eventos de adhesión al sustrato, aumento y migración de protoplasto y crecimiento por evaginaciones de la pared celular que posteriormente dieron origen a nuevos utrículos y filamentos medulares.

Dentro de las condiciones abióticas adecuadas para el crecimiento celular de *Codium sp.*, la independencia de la luz es una respuesta particular ya que la luz juega un rol fundamental en la morfogénesis, crecimiento, ciclos de vida y desarrollo de las algas marinas (Lobban & Harrison 1997). En algas del tipo sifonales, la carencia de tejido y membranas que actúan como filtro frente a altas intensidades luminosas, genera una exposición completa de los paquetes de pigmentos fotosintetizadores a la incidencia de la luz (Lobban & Harrison 1997), por lo que el crecimiento óptimo de algas sifonales

como *Codium fragile* ocurre a baja intensidad luminosa (Hanisak 1979), donde independientemente ha desarrollado fisiológicamente la capacidad de capturar luz en todas las longitudes de onda, aumentar la concentración de pigmentos fotosintetizadores y reducir los niveles de saturación fotosintética (Ramus 1972, 1978). Basado en lo anterior, la particular independencia de luz podría corresponder a lo que se ha descrito en musgos y plantas como un acondicionamiento pre-tratamiento de los cloroplastos al cultivo celular, donde la condición de oscuridad total es indispensable para genera la sensibilidad del cloroplasto que le permite la respuesta posterior de foto-movilización (Kadota *et al.* 2000, Sato *et al.* 2000). Esta sugerencia, se vería reforzada por la sobrevivencia celular a intensidad luminosas mayores en células aisladas o agrupadas, alcanzando en este último caso el 100% de sobrevivencia.

Aún cuando más del 70% de las variables de crecimiento cuantitativa no mostraron relación con la densidad celular, caracteres morfológicos como el largo de utrículos y número de filamentos medulares evidencian que las células individuales se “dan cuenta” de su condición aislada, invirtiendo la energía de crecimiento en la formación de mayor cantidad de filamentos medulares que le permitan adherirse al sustrato. En este sentido, se podría decir que en las células agrupadas existiría una cierta competencia celular en condiciones de crecimiento adecuadas. Sin embargo, esta competencia celular se transformaría en una cooperación celular con mayor sobrevivencia en condiciones ambientales perturbadoras. Similares resultados han sido descritos en la especie de coral *Agaricia tenuifolia* (Chornesky 1989, 1991) y en general organismos talla-dependientes, siendo la densodependencia o agrupación de individuos, es un estado más fructífero que vivir aislados (Keller 1998, Strassmann *et al.* 2000).



A nivel celular los eventos que preceden al crecimiento sugieren que las células de *Codium sp.* se comportan de manera similar a las células sifonales de *Caulerpa* y *Acetabularia*. En primera instancia necesidad de adherirse, es un fenómeno universal en organismos procariontes y eucariontes, resultando en la producción de un “pegamento” que permite la adhesión entre células y del organismo al sustrato (Levi & Friedlander 2004), aún cuando este último se realice en un medio acuático (Wetherbee *et al.* 1998). En *Caulerpa prolifera*, se ha evidenciado que los rizoides presentan polipéptidos adhesivos secretados en una matriz extracelular que conecta directamente los rizoides con el sustrato (Levi & Friedlander 2004).

A nivel sub-celular el aumento y migración del protoplasto con numerosos organelos en células de *Codium sp.* es un fenómeno en general recurrentes e indispensable para varias funciones celulares (Satō *et al.* 2000). En organismos sifonales, el protoplasma es altamente móvil, trasportándose libremente gracias a una red de proteínas fibrosas que actúan como “carreteras”, confiriéndole a los individuos la capacidad de responder flexiblemente (Lobban & Harrison 1997). Algunos estudios realizados en la especie invasiva *Codium fragile* han descrito numerosos cloroplastos fusiformes en utrículos y filamentos medulares (Fletcher *et al.* 1989, Yang *et al.* 1997, Nanba *et al.* 2002), los que son capaces de migrar desde el utrículo altamente pigmentado hasta los filamentos medulares despigmentados, permitiéndoles la elongación en condiciones de cultivo (Nanba *et al.* 2000). Mientras que en el género *Caulerpa*, se ha descrito que esta movilización y concentración de organelos en ciertas zonas de las no sólo tiene que ver con mayor eficiencia para capturar nutrientes y luz (Collado Vides 2002, Collado Vides & Robledo 1999), sino que también en la

recuperación del talo frente a lesiones a través de un tapón proteínico que cierra la herida (plug) (Dreher *et al.* 1978, Menzel 1997). Más aún, en *Acetabularia* se ha descrito que esta migración y concentración de proteínas (expansina) permite la diferenciación de la pared celular y el crecimiento por elongación (Gavrilova & Rudanova 2000, Mandoli *et al.* 2001).

El resultado final del crecimiento observado como la formación de nuevos utrículos y filamentos medulares en *Codium sp.*, es un fenómeno observado también, en condiciones naturales, en talos *C. edule* cuya estructura se asemeja a un gametangio que al ser cultivado da origen a nuevos utrículos (Chang *et al.* 2003). En ambos casos, es probable que el crecimiento le confiera a estas especies una gran capacidad de propagación vegetativa la que supuestamente es más efectiva en cuanto al reclutamiento que la reproducción sexual (Vidondo & Duarte 1998).

Finalmente, este estudio no sólo logra el crecimiento y desarrollo de células de *Codium sp.* en condiciones de cultivo, si no que permitió explicar los eventos celulares previos al crecimiento. Ambos resultados podrían ser extrapolados a los que ocurren en condiciones naturales con crecimiento meristemático de los talos y en la fusión de talos. En este contexto, la sobrevivencia diferencial frente a perturbaciones intensas, observadas en células cultivadas en mayor densidad, podrían ser extensibles a variaciones ambientales como pastoreo y competencia por el sustrato en condiciones naturales, explicando quizás la capacidad de crecimiento y exclusión de competidores, con implicancias sobre la estructuración comunitaria descritas para la especie en poblaciones de Chile central por Santelices *et al.* (1981).

## B.5. REFERENCIAS

- CHANG J, CHANG-FENG D & J-CHANG. 2002. A taxonomic and karyological study of the *Codium geppiorum* complex (Chlorophyta) in southern Taiwan, including the description of *Codium nanwanense* sp. Nov. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 161-170.
- CHANG J, DAI C, & CHANG J. 2003. Gametangium-like structure as propagation buds in *Codium edule* Silva (Bryopsidales, Chlorophyta). Bot. Mar. 46: 431-437.
- CHORNESKY EA. 1989. Repeated reversals during spatial competition between corals. Ecology 70:843-855.
- CHORNESKY EA. 1991. The ties that bind: Inter-clonal cooperation may help a fragile coral dominate shallow high-energy reefs. Mar. Biol. 109:41-51.
- COLLADO-VIDES & ROBLEDO D. 1999. Morphology and photosynthesis of *Caulerpa* (Chlorophyta) in relation to growth form. J. Phycol. 35 (2): 325-330
- COLLADO-VIDES E. 2002. Morphological plasticity of *Caulerpa prolifera* (Caulerpales, Chlorophyta) in relation to growth form in a coral reef lagoon. Bot. Mar 45 (2)-123-129.
- CORREA JA, MCLACHLAN JL. 1991. Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). III. Host specificity. J. Phycol. 27: 448-459.
- DREHER TW, GRANT BR & WETHERBEE R. 1978. The wound response in the siphonous alga *Caulerpa simpliciuscula* E. Ag.: Fine structure and cytology. Protoplasma 96 (1-2):189-203.
- FLETCHER RL, BLUNDEN G, SMITH BE, ROGERS DJ & FISH BC. 1989. Occurrence of a fouling, juvenile stage of *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* (Goör) Silva (Chlorophyceae, Codiales). J. Appl. Phycol. 1: 227-237.

GAVRILOVA V & RUDANOVA EE. 2000. Apical Growth in Algae. Russ. J. Plant Phys. 47(6): 789-795.

HANISAK 1979 Growth patterns of *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* in response to temperature, irradiance, salinity, and nitrogen source Mar. Biol. 50 (4): 319-332  
<http://abstracts.aspb.org/pb2002/public/P44/0397.html>

HUBBARD CB & DJ GARBARY. 2002. Morphological variation of *Codium fragile* (Chlorophyta) in Eastern Canada. Bot. Mar. 45: 476-485.

KADOTA A, SATO Y & WADA M. 2000. Intracellular chloroplast photorelocation in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by phytochrome as well as by a blue-light receptor. Planta 210: 932-937.

KELLER L. 1998. Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. Insectes Sociaux 45:235-246.

LEVI B & FRIEDLANDER M. 2004. Identification of two putative adhesive polypeptides in *Caulerpa prolifera* rhizoids using an adhesive model system. J. Appl. Phycol. 16: 1-9.

LOBBAN CS & HARRISON PJ. 1997. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge.

MANDOLI D, DUNN E, MADISON M, HUANG X, KLINE R, MACKAY A, FROISLAND R, MEHRI S, ODELL GARRETT M, TAYLOR I, CARPITA N.

2001. The dynamic cell wall of *Acetabularia acetabulum*. Plant Biology July 21-25,

2001. Providence, Rhode Island, USA.

- MEINESZ A & HASSE B. 1991. Introduction et invasion de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanologica Acta* 14: 415-426.
- MENZEL D. 1997. Fine structure of vacuolar inclusions in the siphonous green alga *Chlorodesmis fastigiata* (Udoteaceae, Caulerpales) and their contribution to plug formation. *Phycologia* 26:205-221
- NANBA N, KADO R, OGAWA H & KOMURO Y. 2002 Formation and growth of filamentous thalli from isolated utricles with medullary filaments of *Codium fragile* spongy thalli. *Aquatic Botany* 73: 255-264.
- NANBA N, KADO R, OGAWA H & TOYAMA K. 2000. Assays for evaluating seaweed attachment using isolated utricles of *Codium fragile* (Codiales, Chlorophyceae). I Selection of suitable utricles for assays. *Sessile Organisms* 17: 23-30.
- RAMUS J. 1972. Differentiation of the green alga *Codium fragile*. *Am. J. bot.* 59:478-482
- RAMUS J. 1978. Seaweed anatomy and photosynthetic performance. The ecological significance of light guides, heterogeneous absorption and multiple scatter. *J. Phycol.* 14: 352-362.
- SANFELICES B, S MONTALVA & OLIGER P. 1981. Competitive algal community organization in exposed intertidal habitats from central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6: 267-276.
- SATO Y, WADA M & KADO TA A. 2000. Choice of track, microtubules and/or actin filaments for chloroplast photo-movement is differentially controlled by photochrome and blue light receptor. *J. Cell. Sci.* 114: 269-279.

- SIERRALTA & SANTELICES B. 1990. Recuperación de *Codium dimorphum* a perturbaciones: el efecto del tamaño y la forma de las aperturas en condiciones de herbivoría. Seminario de investigación Depto Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- SILVA P. 2002. A journey through *Codium* after forty years. IX<sup>th</sup> Workshop on Taxonomy of Economic Seaweeds. University of Hawaii at Hilo. Mayo 22-29.
- SILVA P. 1957. *Codium* in Scandinavian waters. Svensk Botanisk Tidskrift 51: 117-134.
- SILVA P. 1955. The dichotomous species of *Codium* in Britain. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 34: 565-577
- SILVA P. 1951. The genus *Codium* in California with observations on the structure of the walls of the utricles. Univer. Calif. Pub. Bot. 25(2): 79-114
- SILVA P & HBS WOMERSLEY. 1956. The genus *Codium* (Chlorophyta) in Southern Australia. Austr. J. Bot. 4: 261-289.
- STRASSMANN JE, ZHU Y & QUELLER DC. 2000. Altruism and social cheating in the social amoeba *Dyctiostelium discoideum*. Nature 408: 967-967.
- VIDONDO B & DUARTE CM. 1998. Population structure, dynamics, and production of the mediterranean macroalga *Codium bursa* (Chlorophyceae). J. Phycol. 34: 918-924.
- WHETHERBEE R, LIND JL, BURKE J & QUATRANO RS. 1998. The first kiss: establishment and control of initial adhesion by rapid diatoms. J. Phycol. 32: 9-15.

- WILLIAM S & GROSHOLZ E: 2000. Preliminary report from the *Caulerpa taxifolia* - invasion in southern California. Mar. Ecol. Prog. Ser. 233: 307-310.
- YANG MH, BLUNDEN G, HUANG FL, FLETCHER RL. 1997. Growth of dissociated, filamentous stage of *Codium* species in laboratory culture. J. Appl. Phycol. 9: 1-3

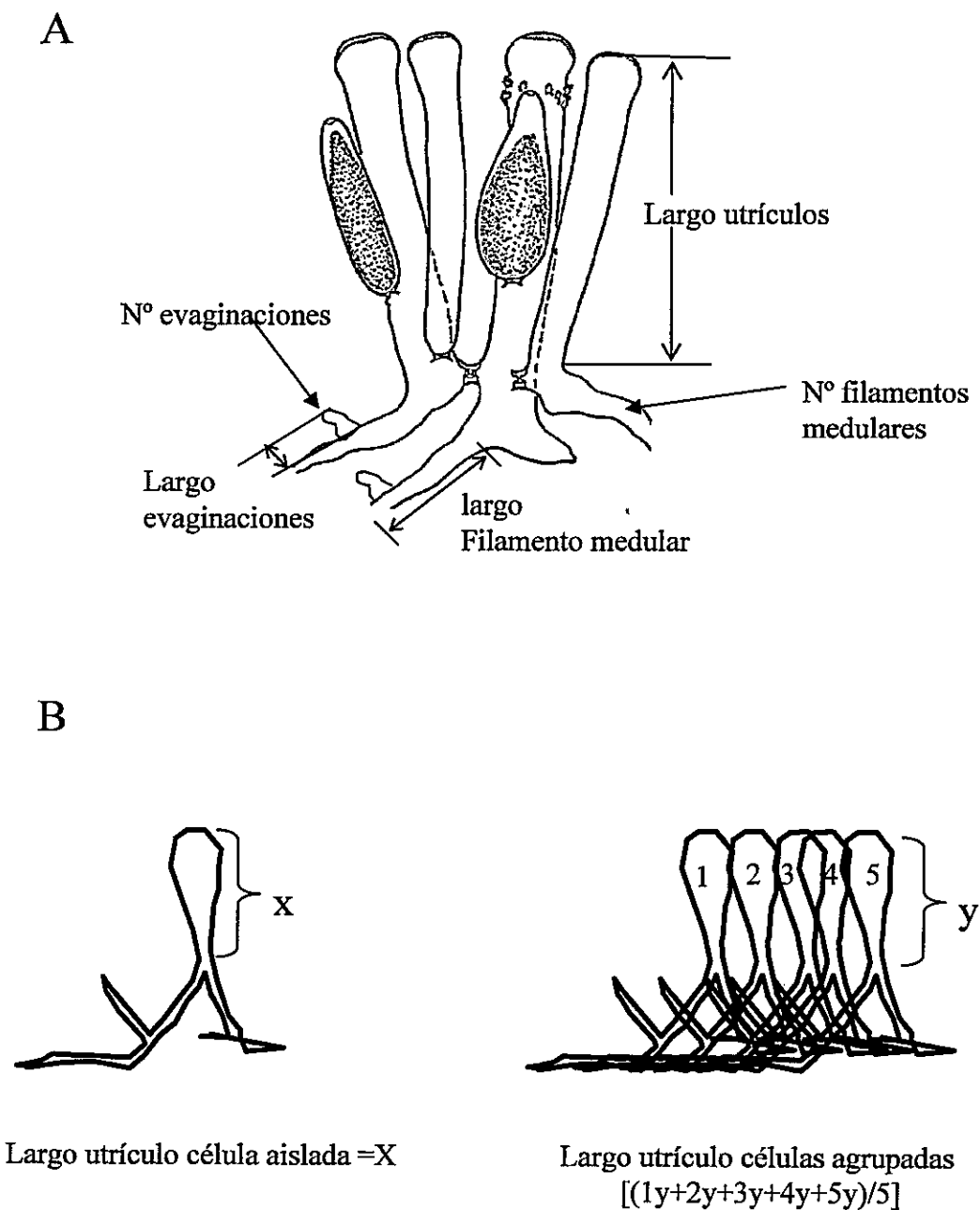


Figura 44. Variables morfológicas de las células cuantificadas después de 30 días de cultivo en condiciones de laboratorio. (A) tipo de mediciones realizadas (B) ejemplo de la estimación Del valor de la réplica (largo) en células aisladas y agrupadas con 5 utriculos.



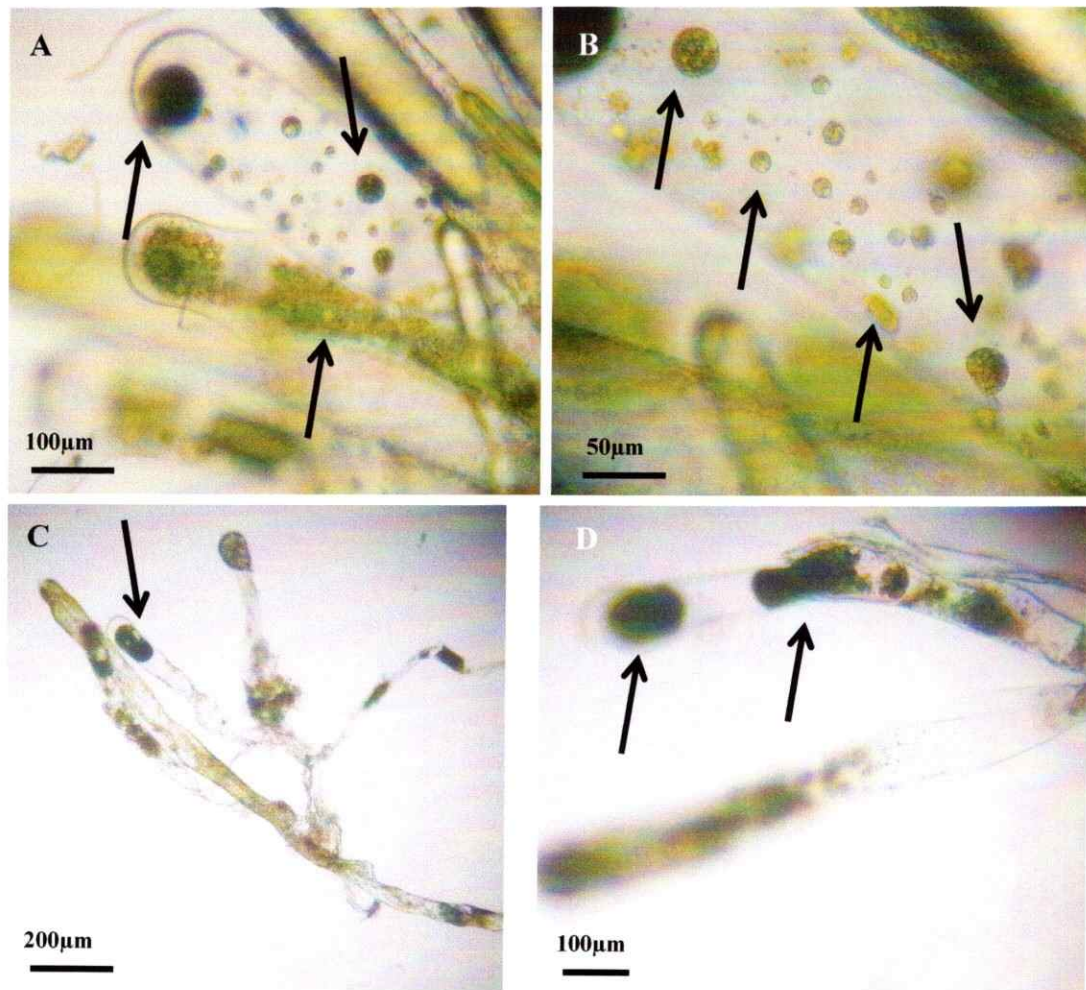


Figura 45. Morfología y disposición del protoplasma en células en *Codium sp.*, cultivada en condiciones luminosas al 2º día. Flechas indican pigmentos disgregados dentro de las células.

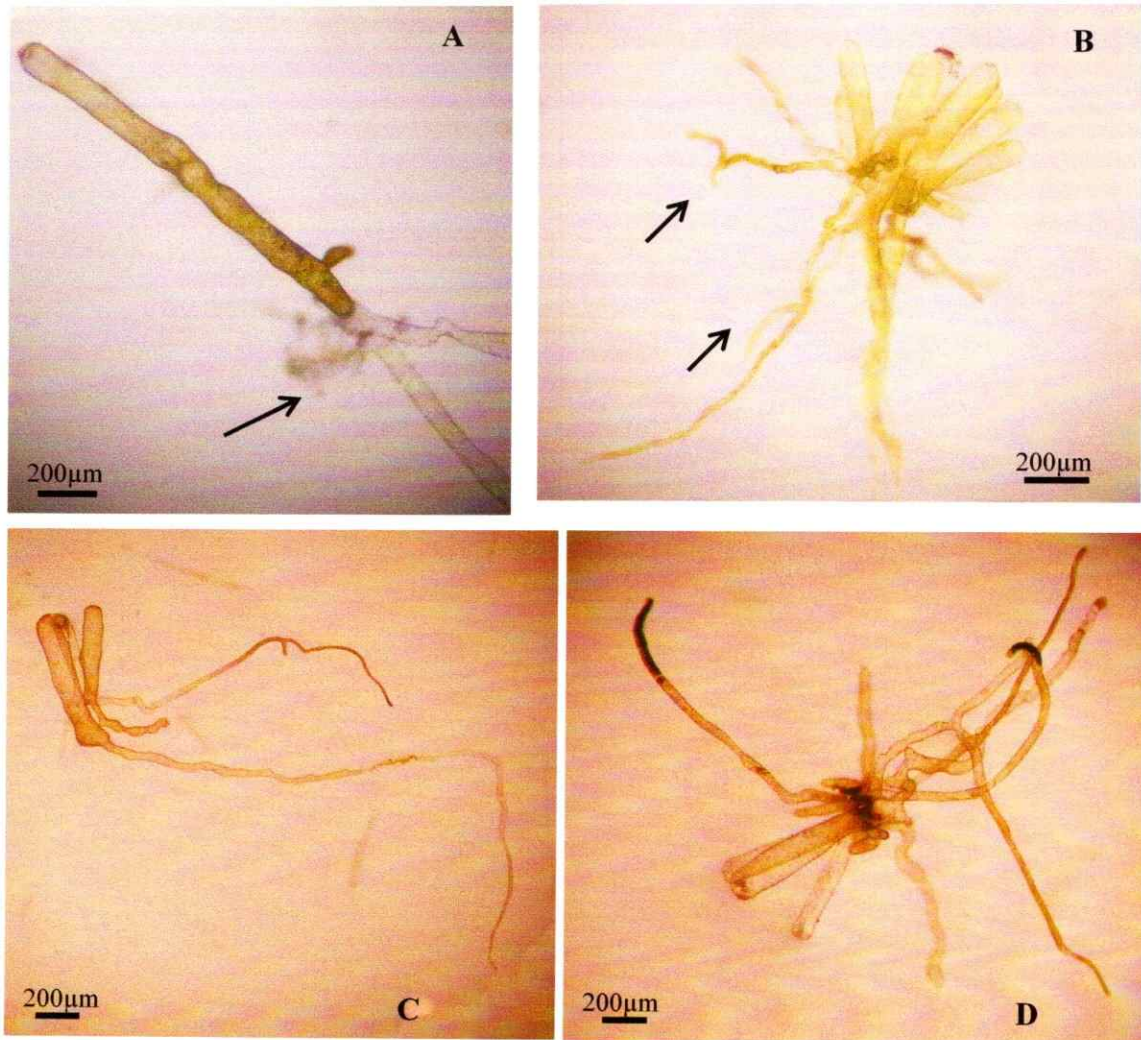


Figura 46. Morfología y disposición del protoplasma en células de *Codium sp.* cultivadas en ausencia de luz después de 3 semanas. Comparación de células individuales versus agrupadas. Nótese la homogeneidad del protoplasma, el que se encuentra más concentrado en la zona de crecimiento activo. Flechas indican evaginaciones y puntos de crecimientos de filamentos medulares y utrículos

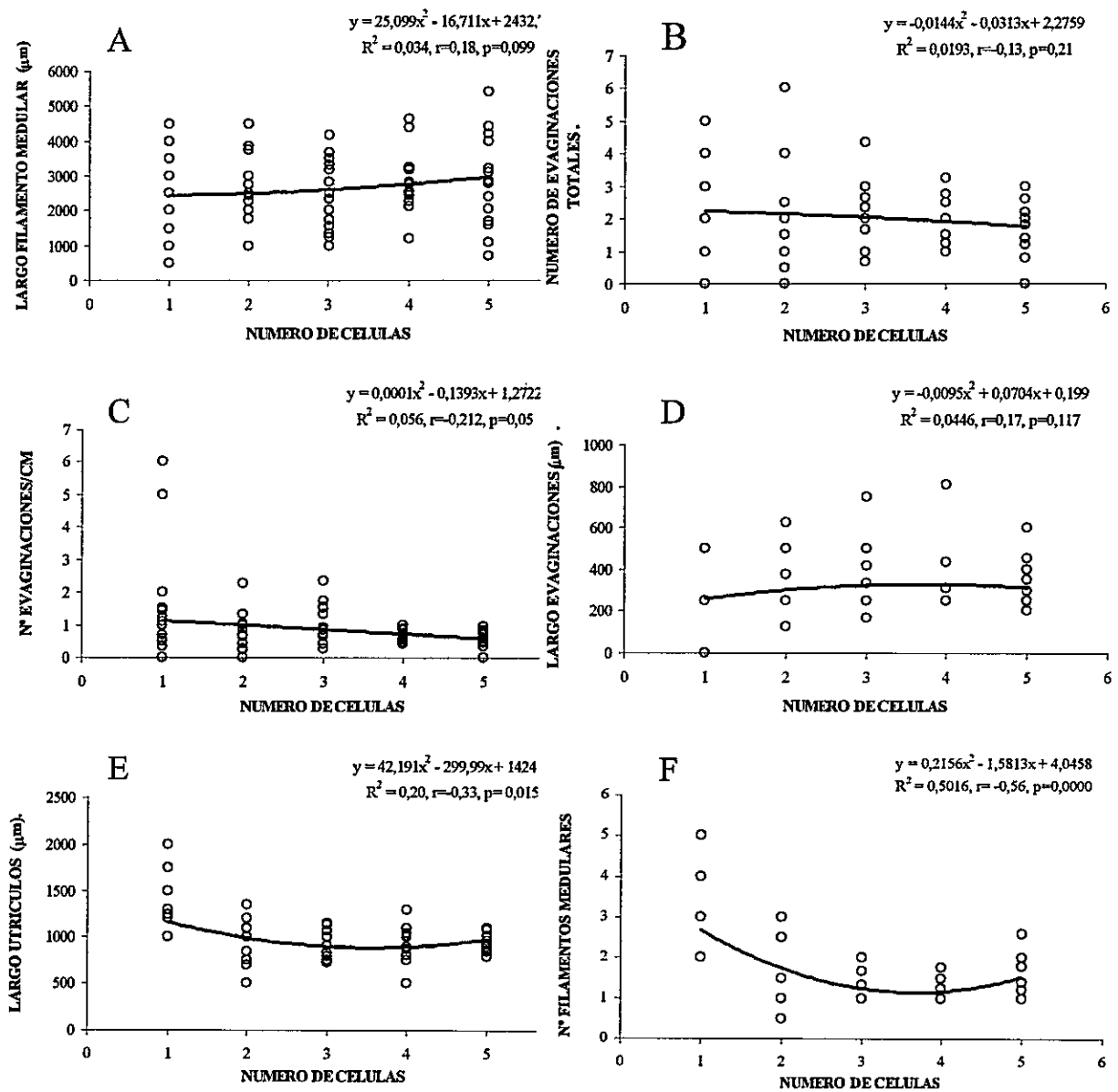


Figura 47. Comparación gráfica del crecimiento en células individuales versus agrupadas, cultivadas en laboratorio por 30 días. (A) Largo del filamento medular. (B) N° evaginaciones totales, (C) N° evaginaciones por cm de filamentos medular (D) largo evaginaciones. (E) largo utrículos. (F) N° filamentos medulares.

<b>Regresión lineal</b>	<b>SS</b>	<b>gl</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Nº células & largo utrículos	558118	1	558118	10,7844	0,0015
Nº células & Nº filamentos	20,0635	1	20,0635	39,6141	0,0000
Nº células & largo filamentos	308838	1	308838	2,78210	0,0990
Nº células & Nº evaginaciones	2,4460	1	2,4460	1,60007	0,2094
Nº células & Nº evag/cm	0,00000	1	0,00000	3,94085	0,0504
Nº células & largo evag.	0,04150	1	0,04150	2,49931	0,1177
Nº células & supervivencia	6,32719	1	6,32719	52,07694	0,0000

<b>Correlación</b>	<b>Spearman R</b>	<b>t (N-2)</b>	<b>p</b>	<b>Kendal Tau</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>
Nº células & largo utrículos	-0,284082	-2,69933	0,008417	-0,210442	-2,85146	0,004352
Nº células & Nº filamentos	-0,611556	-7,04187	0,000000	-0,486811	-6,59625	0,000000
Nº células & largo filamentos	0,149700	1,37938	0,171484	0,112315	1,52186	0,128044
Nº células & Nº evaginaciones	-0,101203	-0,92676	0,356736	-0,073582	-0,99703	0,318750
Nº células & Nº evag/cm	-0,144555	-1,33094	0,186855	-0,108146	-1,46537	0,142819
Nº células & largo evag.	0,201535	1,87453	0,064375	0,164591	2,23019	0,025735
Nº células & supervivencia	0,607061	6,95973	0,000000	0,548335	7,42989	0,000000

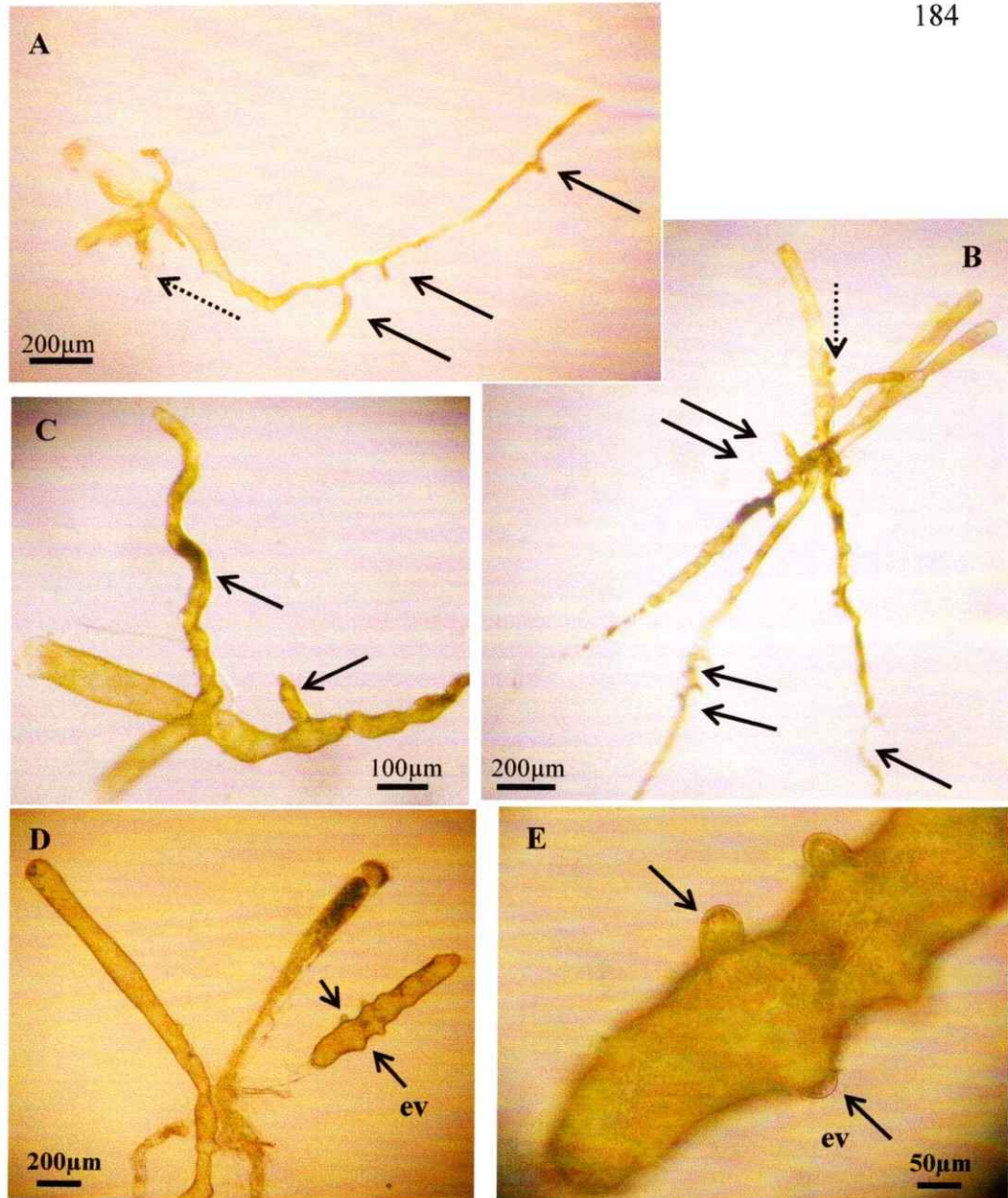


Figura 48. Morfología y disposición de células en *Codium sp.*, cultivadas en oscuridad después de 30 días. (A-B) Filamentos medulares con numerosas evaginaciones que permitieron una gran adherencia de las células al sustrato (flechas). (C) Concentración del protoplasto en la zona de crecimiento activo de filamentos medulares. (D) crecimiento activo con evaginaciones en los utrículos. (E) Ampliación de (D) mostrando en detalle las evaginaciones (flechas).

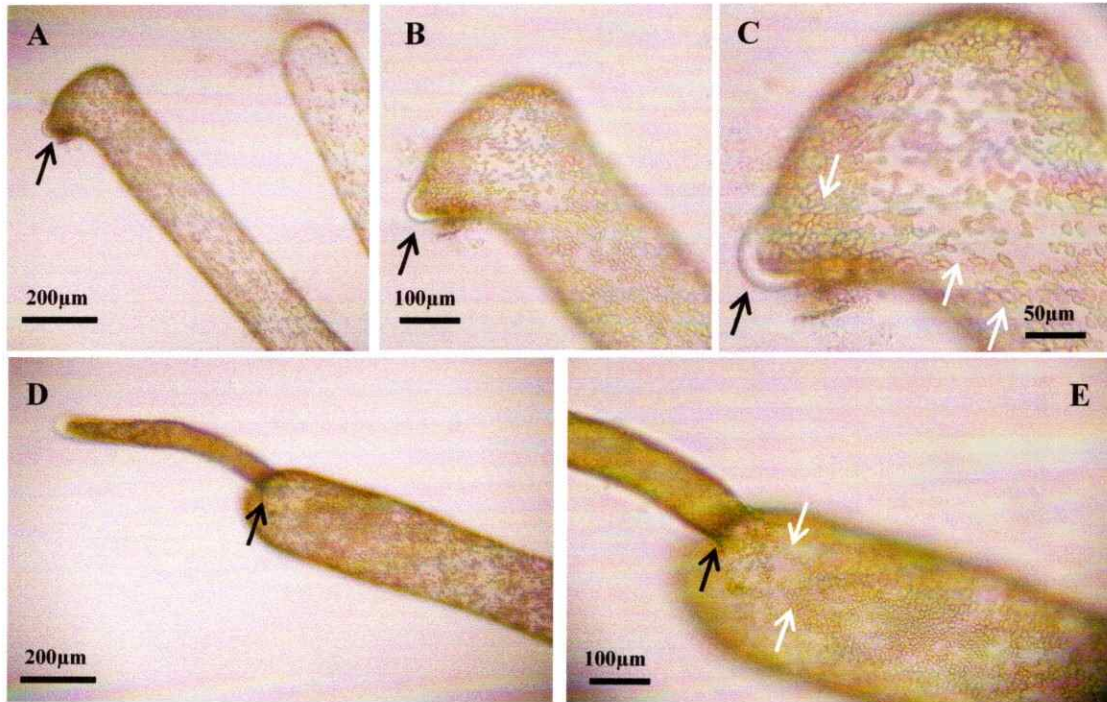


Figura 49. Morfogénesis de pelo en células en *Codium* sp., cultivada en condiciones luminosas. (A, B y C) 2<sup>a</sup> semana de cultivo, (D y E) 4<sup>a</sup> semana de cultivo. Nótese la homogeneidad del protoplasma a lo largo de la célula, y numerosos cloroplastos fusiformes (flechas blancas).

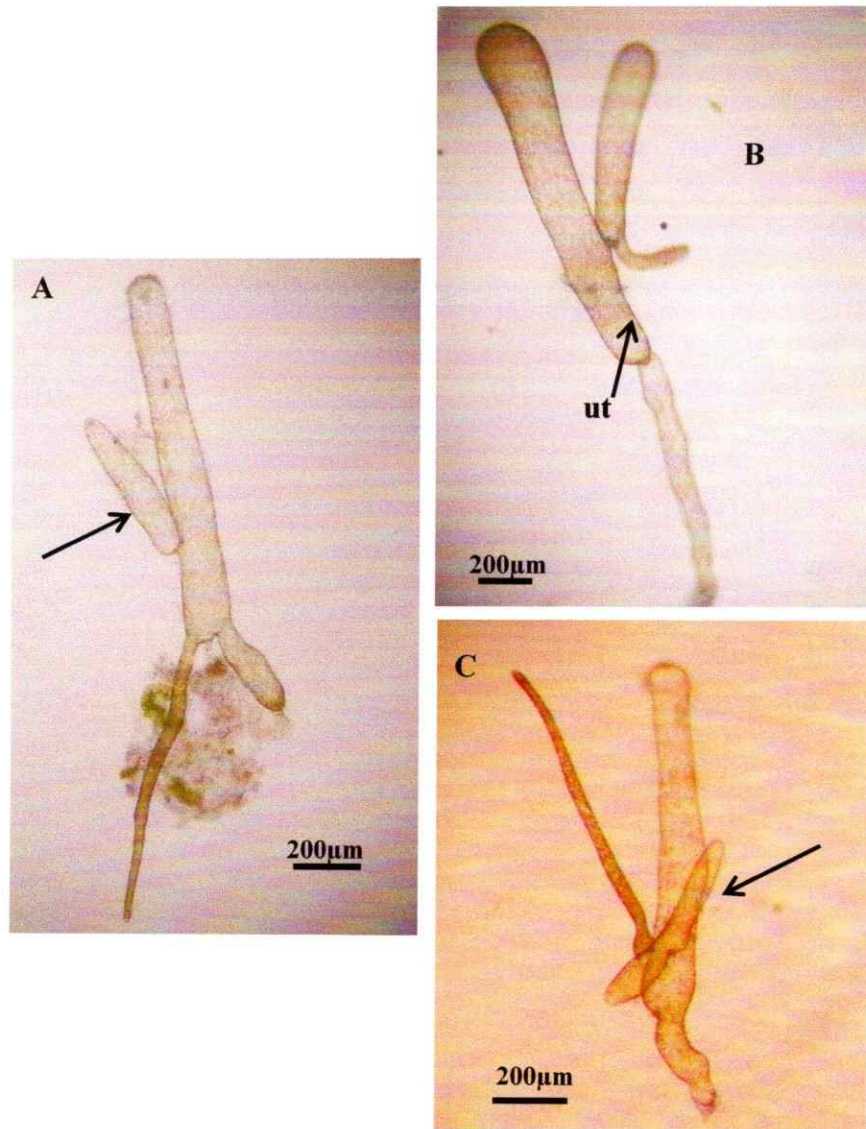


Figura 50. Morfología y disposición del protoplasma en células en *Codium* sp., cultivada en condiciones de oscuridad. Nótese la homogeneidad del protoplasma a lo largo de la célula, un poco más intensa en las zonas de activo crecimiento. Flechas indican evaginaciones en los filamentos medulares y utrículos

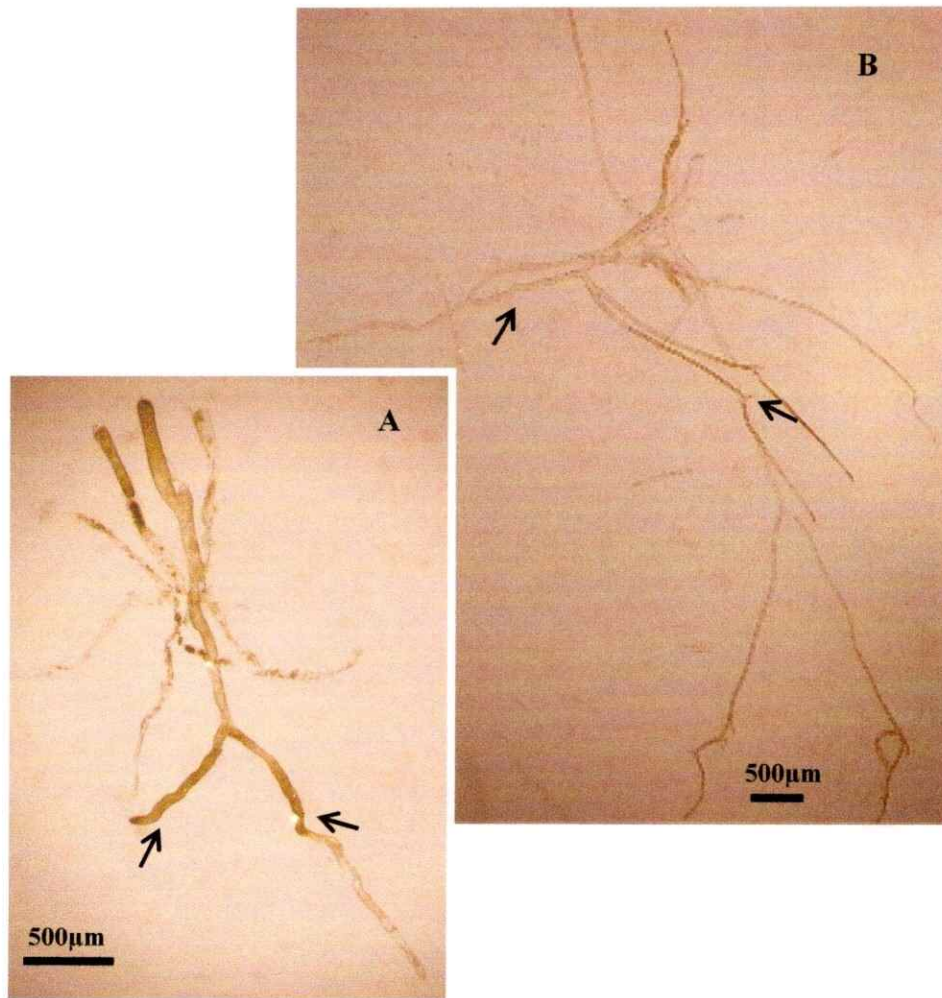


Figura 51. Crecimiento en células en *Codium sp.*, cultivada en condiciones luminosas. (A) 2<sup>a</sup> semana de cultivo, (B) 4<sup>a</sup> semana de cultivo. Flechas destacan el antes y después. Nótese la homogeneidad del protoplasma a lo largo de la célula, flechas destacan numerosas evaginaciones de las células.



**CAPITULO V.**

**IMPLICANCIA ECOLOGICA DEL CONTACTO Y/O**

**FUSION EN TALOS DE *Codium sp.***

## 5.1 INTRODUCCIÓN

La formación de entidades genéticamente heterogéneas puede deberse a dos factores: mutación somática dentro de un organismo individual (mosaicismo) o formación de una quimera como consecuencia de la fusión de individuos genéticamente distintos (coalescencia) (Rinkevich & Weissman 1992, Pineda-Krch & Lehtilä 2004, Santelices 2004a, 2004b, Strassmann & Queller 2004).

La formación natural de quimeras, ha sido descrita en un número alto de taxa, tales como protistas (incluyendo macroalgas), hongos, plantas, animales invertebrado y vertebrados (ver revisión Pineda-Krch & Lehtila 2004). En ellos, ocurre interacción entre linajes genéticamente heterogéneos resultando en la manifestación de costos o beneficios a varios niveles de organización (Grosberg & Strathmann 1998). En este sentido, Pineda-Krch & Lehtila (2004) sugieren que el organismo genéticamente heterogéneo es capaz de sobrevivir por un acuerdo entre costos y beneficios de su condición, con consecuencias significativas a nivel ecológico y evolutivo significativas.

De manera general, se han descrito cinco tipos de beneficios asociados al quimerismo: incremento de la variabilidad genética (Buss 1982, Rinkevich & Weissman 1992), interacciones sinérgicas entre las variantes (división de labores y complementación de funciones) (Buss 1982), localización del compañero (Buss 1982), atributos tamaño- específicos (tasa de crecimiento, éxito reproductivo y sobrevivencia) (Buss 1982, Rinkevich & Weissman 1992, Pineda-Krch & Lehtila 2004) y selección a través de la heterosis (Rinkevich & Weissman 1992). Similar a lo anterior, la mantención de un organismos genéticamente heterogéneo ha sido asociado a costos en cuanto a un efecto deletéreo sobre el fitness individual, debido a una competencia

intraorganismal (ver revisión Pineda-Krch & Lehtila 2004), cuya relación funcional entre los componentes de la entidad heterogénea pueden encontrarse en dos escenarios: el primero llamado parasitismo celular, donde al menos un linaje depende del otro para existir (Buss 1982, Rinkevich & Shapira 1999, Stoner *et al.* 1999, Strassmann *et al.* 2000, Velicer *et al.* 2000), y el segundo denominado competencia intraorganismal, en que los linajes son independientes (Rinkevich & Weissman 1992, Pineda-Krch & Fagerström 1999).

No obstante lo anterior, la mayor parte de las evidencias experimentales indican que en el quimerismo, el crecimiento en tamaño causado por la fusión de individuos, es el beneficio más importante, cuyo costo intrínseco es compensado con las ventajas del tamaño, que sobretodo en organismos tamaño-dependiente se ve reflejando en mayor crecimiento, reproducción y sobrevivencia. Sin embargo, este beneficio del quimerismo se perdería cuando las densidades celulares entre organismos quiméricos y no quiméricos se igualan. Debido a una competencia intra-organismal entre genotipos distintos, la que se incrementaría al aumentar la distancia genética entre los genotipos involucrados (Foster *et al.* 2002).

En el caso de las algas rojas, la formación de una entidad quimérica ha sido mayoritariamente asociada a beneficios para el organismo (Santelices 2004), cuyos costos y restricciones permanecen aún en estudio (Santelices 2006, datos no publicados). Dentro de los beneficios, la mayoría de los estudios han evidenciado respuestas relacionadas al tamaño de los organismos coalescentes. De esta manera, se ha descrito que el aumento significativo en tamaño de las plántulas coalescentes versus no coalescentes, se traduce en un aumento en el crecimiento, éxito reproductivo y

sobrevivencia (ver revisión Santelices 2004). En cuanto al crecimiento, los beneficios adjudicados a esta variable, se refieren a que las plántulas formadas a partir de un mayor número de esporas coalescentes generan un disco basal de mayor tamaño y mayor cantidad de estructuras (ejes erectos y ramificaciones) que aquellas originadas a partir de una o pocas esporas (Santelices *et al.* 1996, 1999). En este mismo contexto, los estudios de laboratorios indican que las algas coalescentes se reproducen más temprano que los individuos no coalescentes, sugiriendo de una reproducción tamaño dependiente más que edad-dependiente (Santelices *et al.* 1999). Respecto a la sobrevivencia, evidencias de laboratorio indican que esporas que reclutan en grupo, coalesciendo al asentarse, muestran mayor sobrevivencia que esporas asentadas en forma solitaria (Santelices *et al.* 1996, 1999, Santelices & Aedo 2005, Santelices & Alvarado 2005). Este hecho le conferiría a los reclutas agrupados, probabilidades mayores de sobrevivir al pastoreo y competir por el espacio, factores claves en ambientes marinos intermareales y submareales (Santelices 2004).

Aún cuando las desventajas o costos de la formación de un organismo coalescente o quimérico en algas rojas, permanecen en estudio, se ha planteado éstos podrían estar asociados a una reducción en la capacidad de dispersión de las esporas, disminución de la velocidad de crecimiento, competencia celular intraorganismal con crecimiento y formación de estructuras reproductivas de manera diferencial, y cierto grado de incompatibilidad genética entre plántulas genéticamente muy distintas (Santelices 2004).

Basado en los beneficios, hasta el momento descritos para algas coalescentes rojas, se ha sugerido que procesos similares podrían estar ocurriendo en otras algas, aún

cuando estos pertenezcan a diversos grupos taxonómicos. En este sentido, por las características morfológicas, ecológicas y comunitarias descritas por Santelices *et al.* (1981), se ha propuesto que la especie *Codium sp.*, correspondiente al grupo de las algas verdes (Chlorophyta) podría ser un organismos coalescente (Maggs & Cheney 1990).

En Chile, *Codium sp.* presenta una amplia distribución geográfica (2000 km), entre Paposo (25°07'S-70°29'W) y Loncoyén (38°43'S-73°24'W). Experimentalmente, en poblaciones centrales (Maitencillo y Horcón), se ha observado contacto y/o fusión de talos entre entidades genéticamente iguales al comparar secuencias del gen. cloroplastidial TRN-Gly (ver Capítulo III). Sin embargo, los procesos involucrados en el contacto y/o fusión de talos son similares a los descritos en la coalescencia de algas rojas a nivel macroscópico y celular (ver Capítulo IV). Estas poblaciones se caracterizan por una alta densidad y dimensión de los talos (González, pers. observ.), pero baja variabilidad genética (ver Capítulo III). Contrariamente, las poblaciones más periféricas al norte (Paposo) y sur (Loncoyén) de su distribución, presentan baja densidad y dimensión de talos (González, pers. observ.), pero alta variabilidad y diversidad genética intra-poblacional (ver Capítulo III).

Basado en estos antecedentes, las hipótesis que surge es que Si el proceso de fusión de talos en *C. dimorphum* ocurre en condiciones naturales, ésta tiene implicancias ecológicas (beneficios y/o costos) similares a aquellas descritas en organismos coalescentes como las algas rojas. Con el objetivo de poner a prueba esta hipótesis general, en este capítulo se evalúan las siguientes hipótesis específicas:

- (a) Si la fusión de talos ocurre en condiciones naturales, las poblaciones de *C. dimorphum* con variabilidad genética presentan un gran número de talos compuestos por más de un genotipo.
- (b) Talos compuestos por más de un genotipo, debieran caracterizarse por ser de menor tamaño cuando el número de genotipos y las distancias genéticas de entre ellos sean mayores. Talos compuestos por más de un genotipo, conllevan a competencia intra-organismal, interfiriendo en su respectivo crecimiento. Por lo que a un mayor número de genotipos y distancia genética entre ellos, los talos no alcanzan grandes dimensiones.
- (c) Si existe competencia intra-organismal, entonces el beneficio de la fusión de talos talla-dependiente (crecimiento y producción de estructuras reproductivas), desaparece cuando se estandarizan las dimensiones de talos fusionados versus talos no fusionados.

## **5. 2 MATERIALES Y METODOS**

### ***a) Frecuencia y costo del quimerismo en poblaciones naturales***

Con el objetivo de evaluar las hipótesis específicas relacionadas a la frecuencia (hip. a) y costo del quimerismo (hip. b), durante junio- julio de 2005 se realizó en las localidades de Papos y Loncoyén, un experimento evaluando la diversidad haplotípica dentro del talo o intra-genet. Para ello, en cada localidad se seleccionaron diez talos adheridos en sustratos independientes y distantes entre si en al menos 50 cm, los que fueron fotografiados con cámara digital Fuji FinePix 5000, y sometidos a un muestreo destructivo, extrayendo de cada talo, con espátula, 3 muestras de tejido equidistantes

horizontalmente y de dimensión aproximadas 5 x 5 cm. Cada talo fue caracterizado a través de sus dimensiones en área, para lo cual se utilizaron las fotografías digitales, examinadas en el software Sigma Scan Pro Versión XX (Demo).

De una total de 60 muestras de tejido secadas en sílica, se extrajo el DNA genómico total como lo describe Wattier *et al.* (2002). La identificación genética de cada talo fue realizada a través de la amplificación del gen cloroplastidial TRN-Gly (~300 bp), previamente utilizado para evaluar la diversidad genética de la especie (ver Capítulo 2). Siguiendo el protocolo descrito por Provan *et al.* 2005 para amplificar el gen, el producto de PRC fue cuantificado manualmente en un gel de agarosa (1,5%) teñido con bromuro de etidio y purificado en el QIAquick PCR Purification Kit. Las secuenciaciones del gen fueron realizadas en el secuenciador automático ABI-3100 (*Applied Biosystems*<sup>™</sup>), en el Laboratorio de Diversidad Molecular, Departamento de Ecología, Facultad Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias obtenidas fueron alineadas manualmente usando el software ProSeq v.2.91 (Filatov 2002) y analizadas en el software DnaSP 4.10 (Rosas *et al.* 2003), identificando cada muestra de tejido a través de su haplotipo, estimar dentro de cada talo la diversidad de haplotipos (hap) y la distancia genética de los haplotipos como las diferencias en pares de base (PD).

La frecuencia del quimerismo en *Codium sp.* fue estimada en ambas poblaciones como el número de talos compuestos por más de un genotipo (haplotipo). Similar a lo anterior, en ambas poblaciones se evaluó el costo del quimerismo a través de la comparación y correlación del tamaño de los talos y las características genéticas del mismo en cuanto a número de genotipos y distancia genética entre ellos. La significancia

estadística de las comparaciones y correlaciones fueron realizadas en el software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc. 2001, www.statsoft.com).

***b) Beneficios del quimerismo en talos fusionados versus no fusionados de dimensiones similares***

Con el objetivo de evaluar si el quimerismo pierde sus beneficios cuando el tamaño de los individuos quiméricos y no quiméricos se igualan se llevó a cabo un experimento durante Mayo - Agosto de 2005 en dos zonas rocosas (norte y sur) dentro de la localidad de Maitencillo (32° 39'S, 71° 29'W). En esta localidad, se utilizaron talos no fusionados y talos fusionados monitoreados previamente durante 1 año. Los talos fusionados fueron considerados como talos quiméricos bajo el supuesto que para un gen distinto al TRN-Gly, los talos contactados serían genéticamente distintos (ver Capítulo III). De esta manera en cada zona rocosa, se distinguieron dos set de talos: talos fusionados (N= 7-8) y talos no fusionados (N=7-8).

Con el objetivo de eliminar el efecto del tamaño, cada set fue manipulado manualmente para generar sub-unidades circulares de similares dimensiones. De esta manera dentro de cada talo, se generaron con espátula y posterior cepillado, tres sub-unidades circulares (Figura 53a), que el caso de los talos previamente contactados, éstas sub-unidades incluyeron la zona de contacto entre los talos (Figura 53b). En cada sub-unidad se estimó el crecimiento y éxito reproductivo. El crecimiento se estimó a través de monitoreo fotográfico, realizadas con una cámara digital Fuji FinePix 5000 y examinadas en el software Sigma Scan Pro Versión XX (Demo), estimándose el área,



diámetro en cada sub-unidad. Estos datos permitieron la estimación de la tasa de crecimiento diario a través de la fórmula:  $[(\text{Ln } C_f - \text{Ln } C_i)/t]$ .

El éxito reproductivo dentro de cada talo se estimó al después de tres meses de monitoreo, a través de la cuantificación de la abundancia de gametangios por unidad de área. Para ello, cada sub-unidad se sometió a un muestreo destructivo, extrayendo con cincel, 3 muestras de tejido equidistantes horizontalmente y de dimensión aproximada 1 x 1 cm (Figura 53c). El material fue transportado a 4°C al laboratorio donde se corroboró la dimensión del trozo de tejido (1 cm<sup>2</sup>) bajo lupa estereoscópica (Nikon SMZ-10A, Japan) equipados con cámara digital CoolSNAP-Procf (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), y con sistema para adquisición de imágenes digitales Image Pro® Plus 4,5. The Proven Solution™. Versión 4.1.0.0 (1993-1995 Media Cybernetics, LP, Silver Spring, MD, USA), eliminando con bisturí el tejido sobrante. De esta manera se estimó la abundancia de gametangios total por cm<sup>2</sup>, en 42-48 muestras provenientes de talos contactados y no contactados en la zona rocosa sur y norte de la localidad de Maitencillo. La significancia estadística de la comparación y correlación de las variables crecimiento y éxito reproductivo, en talos quiméricos versus no quiméricos, se realizó en el software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc. 2001, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)).

### 5.3 RESULTADOS

#### *a) Frecuencia y costo del quimerismo en poblaciones naturales*

El experimento realizado en las localidades de Papos y Loncoyén, demostró que en poblaciones naturales de *Codium sp.*, la frecuencia de talos genéticamente heterogéneos es relativamente alta, con un 90% de talos genéticamente heterogéneos en

cada localidad (Figura 54). Los talos quiméricos y no quiméricos no se diferenciaron morfológicamente (color, textura, margen, protuberancias), por lo que la heterogeneidad de los talos fue advertida sólo después del análisis de las secuencias del gen TRN-Gly.

Dentro de cada talo la diversidad de haplotipos varió entre 1 (10%), dos haplotipos (60-70%) y tres haplotipos (20-10%) (Tabla 11). Descriptivamente, ambas localidades compartieron sólo un haplotipo (hap. 4), que por lo demás, fue el más común en Paposo (80%) y Loncoyén (50%). Este haplotipo común se presentó solitario (10%), pero mayoritariamente se exhibió acompañado por uno o dos haplotipos de menor frecuencia (70% Paposo y 40% Loncoyén).

En términos generales la localidad de Paposo presentó la mayor diversidad haplotípica con 7 haplotipos distintos en todas las muestras analizadas, dentro de los cuales el 90 % estuvo compuesto por haplotipos exclusivos con baja frecuencia (3-10%). Por otra parte, la localidad de Loncoyén presentó sólo 5 haplotipos distintos dentro de las muestras analizadas. No obstante, similar a lo encontrado en Paposo, el 80% de estos haplotipos fueron exclusivos de la localidad, cuyas frecuencias como en el caso del hap. 1, alcanzaron representación en el 50% de los talos analizados (Tabla 11).

El análisis dimensional de los talos mostró que en promedio existen diferencias significativas entre las localidades de Paposo y Loncoyén (Figura 55a, MW-Utest,  $U=11$ ,  $z=-2,95$ ,  $p=0,0031$ ). Sin embargo, el análisis genético de los talos no mostró diferencias significativas entre las localidades en cuanto a número de haplotipos dentro de cada talo (Figura 55b, ANOVA  $F=1,24$ ,  $p=0,278$ ), y distancia genética (Figura 55c, ANOVA  $F=0,16$ ,  $p=0,690$ ).

La correlación de las variables genéticas con respecto al tamaño del talo, mostró tendencias inversamente proporcional, es decir, talos de menores tallas con mayor número de haplotipos (Figura 56a) y distancia genética (Figura 56b). Sin embargo, la correlaciones no fueron estadísticamente significativas en ninguna localidad.

***b) Beneficios del quimerismo en talos fusionados versus no fusionados de dimensiones similares***

Los experimentos de crecimiento y éxito reproductivo realizados en la localidad de Maitencillo mostraron que entre talos fusionados y no fusionados no existen diferencias significativas en cuanto a crecimiento (área, diámetro, tasa de crecimiento) pero si en cuanto a éxito reproductivo.

En este sentido, después de la manipulación y formación de las subunidades circulares fusionados y no fusionados mostraron una recuperación y posterior crecimiento meristemático de los bordes desde el primer monitoreo post- manipulación (30 días), manteniendo cada subunidad en la mayoría de los casos (79%), su forma circular hasta el final del experimento (Figura 57). De esta manera, los talos fusionados y no fusionados aumentaron en cuanto al área y diámetro de manera similar en ambas zonas rocosas (Figuras 58). Este patrón se mantuvo en la tasa de crecimiento, relacionándose directamente al crecimiento en diámetro (Figura 59).

Sin embargo, en la estimación del crecimiento, la varianza individual fue bastante alta, haciendo dificultosa la identificación de patrones. En este contexto, los talos de la zona sur de Maitencillo presentaron mayor crecimiento (área, diámetro, tasa

de crecimiento) que la zona sur. No obstante, los talos fusionados de la zona norte fueron significativamente similares a talos no fusionados de la zona sur (Figura 58b).

Contrario a lo anterior, el éxito reproductivo de los talos (abundancia de gametangios por unidad de área), fue significativamente mayor en talos fusionados versus no fusionados (Figura 60a). Sin embargo, los talos no fusionados de la zona sur similares en crecimiento a talos fusionados de la zona norte, mantuvieron este patrón en cuanto a la abundancia de gametangios. En este contexto, se evidenció una correlación positiva y significativa entre el diámetro del talo y la abundancia de gametangios, la que se vio incrementada en talos fusionados versus no fusionados (Figura 60b).

#### 5.4 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Aún cuando el quimerismo como consecuencia de coalescencia ha sido reportado en numerosos organismos, la estimación basada en la frecuencia de entidades quiméricas en comunidades naturales es escasa, existiendo evidencias positivas en algas rojas como *Mazzaella laminarioides* (Santelices 2004), plantas *Ficus spp.* (Thomson *et al.* 1991); hongos *Armillaria gallica* (Peabody *et al.* 2000), y ascidias *Diplosomas listerianum* (Sommerfeldt & Bishop 1999) y *Botryllus schlosseri* (Ben-Shlomo *et al.* 2001). Similar a lo anterior, los resultados de este estudio, sugieren que en poblaciones naturales en *Codium sp.* existen talos compuestos por más de un genotipo (quiméricos) alcanzando una frecuencia el 90% en poblaciones caracterizadas por una alta variabilidad genética intrapoblacional, cuyos costos y beneficios permanecen aún en discusión.

Por un lado, los talos quiméricos de *Codium sp* no evidencian costos en cuanto al tamaño del talo, asociados al número y distancia genética de los genotipos (haplotipos).

Resultados similares han sido descritos en tunicados *Botryllus schlosseri*, cuyas quimeras naturales presentan alta relatividad genética entre los genotipos que la componen, mientras que las quimeras artificiales con genotipos muy distantes se traducen en una reabsorción individual de las colonias con ausencia de beneficios (tasas de crecimiento, fecundidad o sobrevivencia) o parasitismo celular (Grosberg & Quinn 1986, Rinkevich & Weissman 1992). Estos resultados son atribuidos a que en condiciones naturales, existe una limitada dispersión de los organismos, siendo los tunicados vecinos, muy cercanos genéticamente, permitiendo la fusión natural. Mientras que en quimeras artificiales existiría un mecanismo de reconocimiento entre parientes (Buss 1982, Grosberg & Strassmann 1998). Desde este punto de vista, la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas (ver Capítulo III), muestra que los haplotipos de *Codium sp.* dentro del rango de distribución, son filogenéticamente similares con sólo 1 a 4 mutaciones entre ellos. En este contexto, se podría especular que aún cuando no se evidencian costos asociados al quimerismo en *Codium sp.*, la coexistencia de genotipos distintos dentro del mismo talo se debe a la gran relatividad genética de los mismos.

Por otra lado, los beneficios encontrados en talos quiméricos de *Codium sp.* versus talos no quiméricos, aún cuando las dimensiones de los talos hallan sido estandarizados, sugiere la existencia de beneficios intrínsecos de la fusión, observado como un aumento significativo del éxito reproductivo (abundancia de gametangios) pero no en la tasa crecimiento. Esta respuesta “paradojal” o contradictoria sugiere que existen mecanismos aún desconocidos que estimulan la maduración de los talos (producción de gametangios), dentro de los cuales se encuentra una alta sensibilidad a variaciones en la

talla de los talos, sinergismo celular (cooperación) o consecuencias de la variación morfológica y funcional de las células observadas en el proceso de fusión (competencia).

Antecedentes de alta sensibilidad a variaciones en la talla de los talos han sido demostradas en *C. setchellii* (Trowbridge 1996) y *C. bursa* (Vidondo & Duarte, 1998). Especialmente en esta última, se ha evidenciado que la madurez de los talos comenzaría en individuos con diámetros mayores a 4 cm, cuyo aumento en diámetro se relaciona directamente al incremento de gametangios e inversamente a la tasa de crecimiento. De igual manera, talos jóvenes (1-3 cm de diámetro) y talos viejos (12-31 cm de diámetro), presentan la mayor tasa de mortandad, mientras que los talos intermedios (3-12 cm de diámetro) presentan menor tasa de mortalidad y mayor tasas de gemación asexual o propagación vegetativa, la que supuestamente es más efectiva en cuanto al reclutamiento que la reproducción sexual (Vidondo & Duarte, 1998). Basado en lo anterior, podríamos sugerir que *Codium sp.* es un organismos talla-dependiente estricto, debido a: i) se observó una similitud del éxito reproductivo entre talos fusionados y no fusionados, que alcanzaron tallas similares pero que crecieron en zonas distintas. ii) Se encontró una significativa correlación entre el tamaño del talo y la abundancia de gametangios. iii) experimentos previos de trasplantes de *Codium sp* de talos de 6 cm de diámetro murieron aún cuando se combinaron talos quiméricos y no quiméricos de la misma y distinta población (observ. Pers.).

La diferencias en forma y función de las células, observados los talos contacto y/o fusionados (Capítulo IV), podrían desencadenar un sinergismo celular o un adelantamiento en las etapas de diferenciación celular con formación más temprana de estructuras reproductivas. Aún cuando se desconoce si en el género *Codium* existe

sinergismo celular, éste se ha demostrado en otros organismos como plantas y amebas, presentando un fenotipo especial con atributos del tipo bioquímicos (ph celular, fragancias) y morfológicos (mayor tamaño celular y de estructuras reproductivas) (Foster *et al.* 2002, Pineda-Krch & Lehtila 2004). Por otra parte, el adelantamiento de etapas podría relacionarse con los cambios morfológicos previos observados durante el contacto y/o fusión de talos en *Codium sp.* (ver Capítulo IV), el requerimiento de pasos previos para la diferenciación celular ha sido ampliamente descrito en el alga verde unicelular y unicleada *Acetabularia*, donde el ciclo de vida requiere necesariamente de tres etapas: diferenciación celular, diferenciación cistocárpica y diferenciación gamética. La primera etapa, es considerada un periodo crucial en el exitoso crecimiento y diferenciación celular. Este lapso le confiere un aumento de estructuras anexas como pelos y rizoides, que involucran un aumento en la absorción de luz (fotosíntesis) y nutrientes (Gibor 1973, Zeller & Mandoli 1993), necesarias e indispensables para el crecimiento vegetativo y posterior maduración. En condiciones de cultivo, se ha demostrado que esta primera etapa requiere de al menos dos semanas de incubación en condiciones óptimas de crecimiento (Dumais & Harrison 2000).

En consecuencia, aún cuando esta tesis constituye la primera evidencia experimental de que la fusión de talos en el alga verde *Codium sp.* es frecuente y similar a la coalescencia descrita en algas rojas, la implicancia del proceso traducido en costos y beneficios del quimerismo permanece aún incierta, sugiriendo que los hipotéticos costos del quimerismo natural en *Codium sp.* serían compensados por beneficios directos (aumento en talla) y beneficios intrínsecos de origen desconocido.

## 5.5 REFERENCIAS

- BEN- SHLOMO R, DOUEK J, RINKEVICH B. 2001. Heterozygote deficiency and chimerism in remote population of a colonial ascidian from New Zealand. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 209: 109-117.
- BUSS LW. 1982. Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79: 5337-5341.
- DUMAIS J & HARRISON L. 2000. Whorl morphogenesis in the dasycladalean algae: the pattern formation viewpoint. *Phil trans R. Soc. London B.* 355:281-305.
- FILATOV DA. 2002. ProSeq. A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. notes* 2: 621-624.
- FOSTER KR, FORTUNATO A, STRASSMANN JE & QUELLER DV. 2002. The cost and benefits of being a chimera. *Proc. Roy. Soc. B* 269: 2357-2362.
- GIBOR A. 1973. Observations on the sterile whorls of *Acetabularia*. *Protoplasma* 78: 195-202.
- GROSBURG RK & QUINN JF. 1986. The genetic control and consequences of kin recognition by the larvae of a colonial marine invertebrate. *Nature* 322: 456-459.
- GROSBURG RK & STRATHMANN RR. 1998. One cell, two cell, red cell, blue cell: the persistence of a unicellular stage in multicellular life histories. *Trends. Ecol. Evol.* 13: 112-116.
- MAGGS CA & CHENEY DP. 1990. Competition studies of marine macroalgae in laboratory culture. *J. Phycol* 26: 18-24.



- PEABODY RB, PEABODY DC & SICARD KM. 2000. A genetic mosaic in the fruiting stage of *Armillaria gallica*. *Fung. Gen.Biol.* 29: 72-80.
- PINEDA-KRCH M & LEHTILA K. 2004. Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. *J. Evol. Biol.* 17: 1167-1177.
- PINEDA-KRCH, M & FAGERSTROM T. 1999. On the potential for evolutionary change in meristematic cell lineages through intraorganismal selection. *J. Evol. Biol.* 12(4): 681 – 688.
- PROVAN J, MURPHY S & MAGGS C. 2005. Tracking the invasive history of green alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*. *Mol. Ecol.* 14: 189-194.
- RINKEVICH B & SHAPIRA M. 1999. Multi-partner urochordate chimeras outperform two-partner chimerical entities. *Oikos* 87: 315 -320.
- RINKEVICH B & WEISSMAN IL. 1992. Chimeras versus genetically homogeneous individuals: potential fitness cost and benefits. *Oikos* 63: 119-124.
- ROSAS JJ, SANCHEZ-DELBARRIO C, MESSEGUER X & ROSAS R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- SANTELICES B 2004a. A comparison of ecological responses among asexual (unitary), clonal and coalescing macroalgae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300: 31-64.
- SANTELICES B 2004b. Mosaicism and chimerism as component of intraorganismal genetic heterogeneity. *J. Evol. Biol.* 17: 1187-1188.
- SANTELICES B & AEDO D. 2005. Group recruitment and early survival in *Mazzaella laminarioides*. *Hidrobiología* (en prensa)

- SANTELICES B & ALVARADO JL. 2005. Dynamic of early recruitment in the coalescing seaweed *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). Proceedings, 8<sup>th</sup> International Phycological Congress. Durban, South Africa, August 2005: 44 (4):90.
- SANTELICES B, S MONTALVA & OLIGER P. 1981. Competitive algal community organization in exposed intertidal habitats from central Chile. Mar. Ecol. Prog. Ser. 6: 267-276.
- SANTELICES B, J CORREA, I MENESES, D AEDO & VARELA D. 1996. Sporeling coalescence and intracolonial variation in *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). J. Phycol. 32: 313-322.
- SANTELICES B, J CORREA, D AEDO, M HORMAZABAL, V FLORES & SANCHEZ P. 1999. Convergent biological processes among coalescing Rhodophyta. J. Phycol 35:1127-1149.
- SOMMERFELDT AD & BISHOP JDD. 1999. Random amplified DNA (RAPD) analysis reveals extensive natural chimerism in a marine protochordate. Mol. Ecol.8: 885-890.
- STONER DS, RINKEVICH B & WEISSMAN IL. 1999. Heritable germ and somatic cell lineage competitions in chimeric colonial protochordates Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9148-9153.
- STRASSMANN JE, ZHU Y & QUELLER DC. 2000. Altruism and social cheating in the social amoeba *Dyctiostelium discoideum*. Nature 408: 967-967.

- STRASSMANN JE. & QUELLER DC. 2004. Genetic conflicts and intercellular heterogeneity. *J. Evol. Biol.* 17: 1189-1191.
- THOMSON JD, HERRE EA, HAMRICK JL & STONE JL. 1991. Genetic mosaics in strangler fig trees. Implication for tropical conservation. *Science* 254: 1214-1216.
- TROWBRIDGE C. 1996. Demography and phenology of the intertidal green alga *Codium setchellii*: the enigma of local scarcity on sand-influenced rocky shores. *Mar. Biol.* 127: 341-351.
- VELICER GJ, KROSS L & LENSKI RE. 2000. Developmental cheating in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature* 404: 598-601.
- VIDONDO B & DUARTE CM. 1998. Population structure, dynamics, and production of the mediterranean macroalga *Codium bursa* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 34: 918-924.
- WATTIER RA, PRÓDOHOL P & MAGGS C. 2002. Dna Isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Mol. Biol. Reporter* 18:275-281.
- ZELLER A & MANDOLI DF. 1993. Growth of *Acetabularia acetabulum* (Dasycladales, Chlorophyta) on solid substrata at specific cell densities. *Phycologia* 32: 136-142.

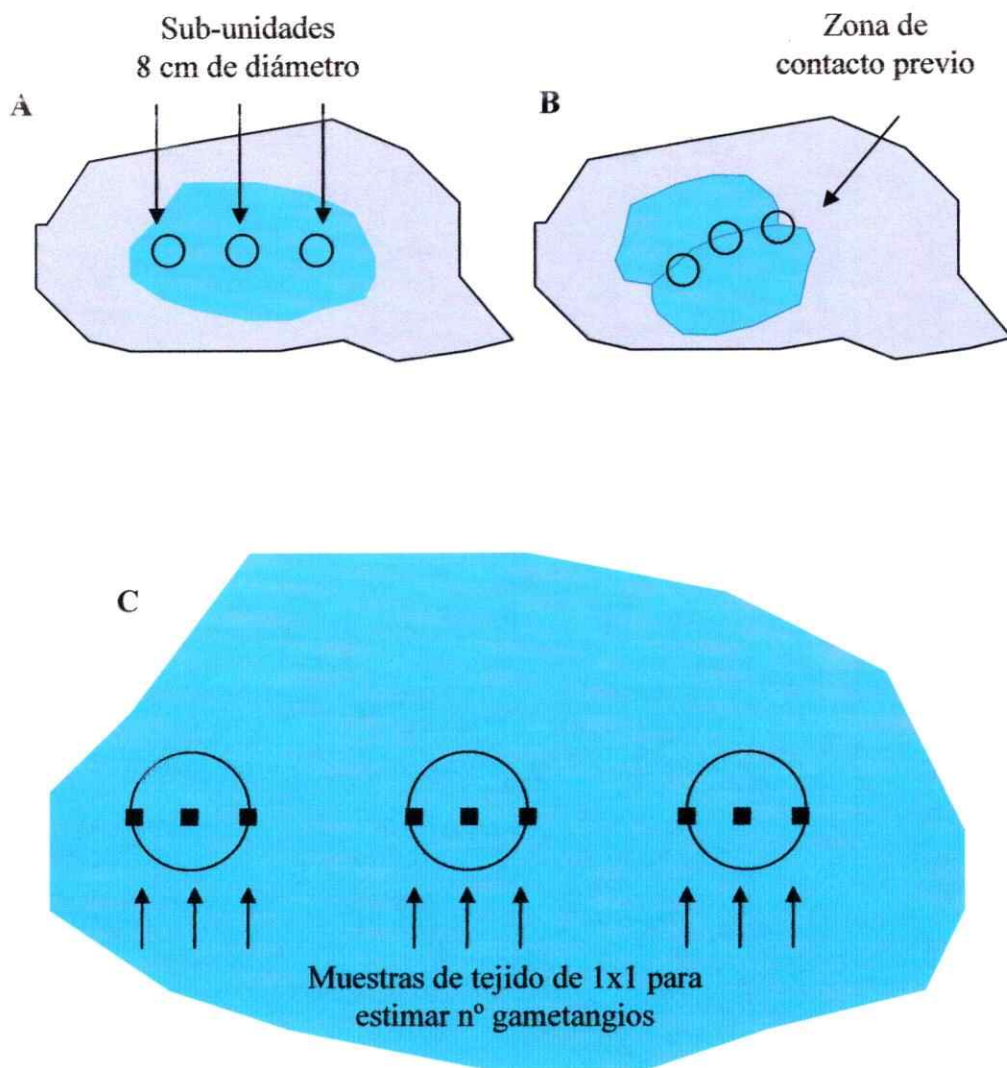


Figura 53. Esquema de la extracción de muestras de tejido de *Codium sp.* en Maitencillo para estimar el beneficio de talos fusionados versus no fusionados de dimensiones similares. Gris= roca, Verde= talos crustosos de *Codium sp.*, Círculo= sub-unidades, Cuadrados = extracción de tejido para cuantificar el nº de gametangios. (A) Talos no fusionados, (B) Talos fusionados previamente, (C) Talos no fusionados y fusionados.

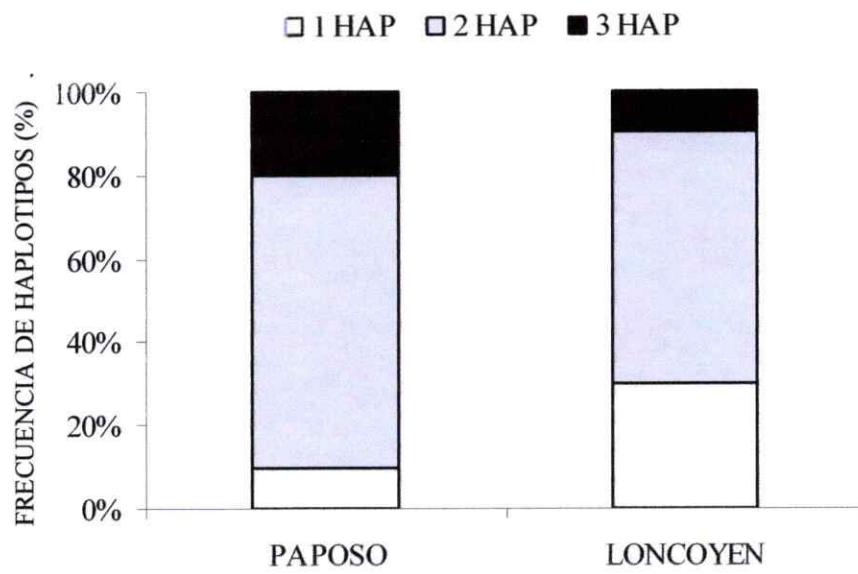


Figura 54. Frecuencia del quimerismo en *Codium sp.*, proveniente de poblaciones naturales en las localidades de Paposo y Loncoyén

MUESTRA	N° Hap	Nombre Hap
PA1	2	hap 4- hap 9
PA2	2	hap 4- hap 8
PA3	2	hap 4- hap 8
PA4	2	hap 8- hap 10
PA5	1	hap 4
PA6	3	hap 6- hap 7
PA7	2	hap 4- hap 10
PA8	3	hap 4-hap10-hap 11
PA9	2	hap 4-hap 10
PA10	2	hap 4- hap 6
LON1	2	hap 1- hap 5
LON2	2	hap 2- hap 4
LON3	2	hap 1- hap 4
LON4	3	hap 1-hap 2-hap 3
LON5	1	hap 4
LON6	1	hap 2
LON7	1	hap 1
LON8	2	hap 4- hap 5
LON9	2	hap 2- hap 4
LON10	2	hap 1-hap 5

Tabla 11. Frecuencia del quimerismo en *Codium sp.*, proveniente de poblaciones naturales en las localidades de Paposos y Loncoyén. Número y nombre de haplotipos encontrados dentro de cada muestra analizada.

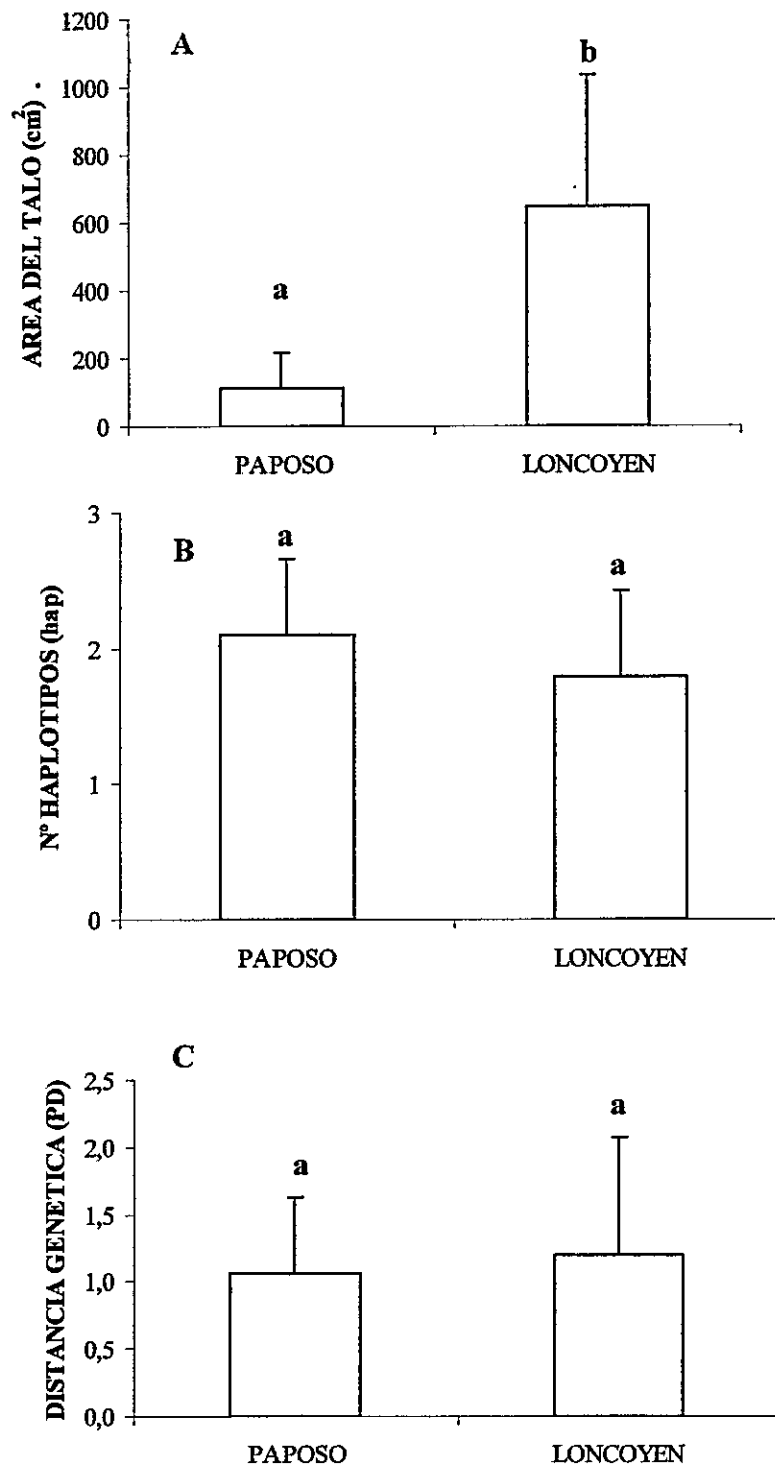


Figura 55. Comparación de los talos provenientes de poblaciones naturales de Paposo y Loncoyén. (A) Area del talo (cm), (B) N° haplotipos dentro de cada talo, (C) Distancia genética (PD) dentro de los haplotipos. Significancia estadística de las diferencias en letras a y b.

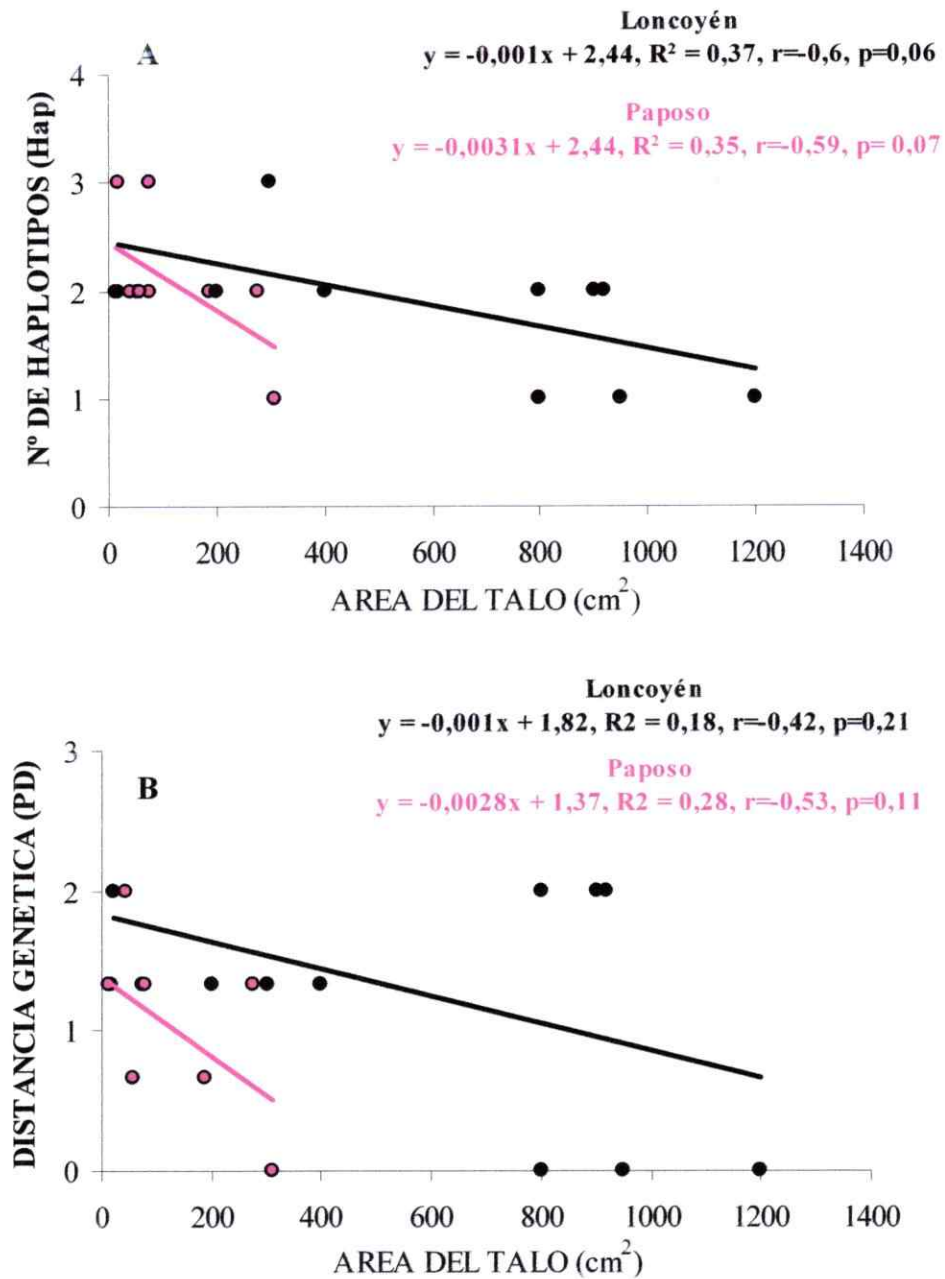


Figura 56. Correlación entre las variables Area del talo versus (A) Nº de haplotipos y (B) distancia genética (PD) de los haplotipos dentro del mismo talo, provenientes de poblaciones naturales de Paposo (rojo) y Loncoyén (negro).



<b>Regresión lineal</b>	<b>SS</b>	<b>gl</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Paposo</b>					
Area & N° halotipos	1,01791	1	1,01791	4,3267	0,071107
Area & Distancia genética (PD)	0,80142	1	0,80142	3,1371	0,114478
<b>Locoyén</b>					
Area & N° halotipos	1,01791	1	1,01791	4,3267	0,060000
Area & Distancia genética (PD)	0,80142	1	0,80142	3,1371	0,210000

<b>Correlación</b>	<b>Spearman R</b>	<b>t (N-2)</b>	<b>p</b>	<b>Kendal Tau</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>
<b>Paposo</b>						
Area & N° halotipos	-0,404520	-1,25109	0,246250	-0,341918	-1,37620	0,168761
Area & Distancia genética (PD)	-0,478598	-1,54172	0,161713	-0,368932	-1,48492	0,137564
<b>Locoyén</b>						
Area & N° halotipos	-0,62226	-2,25039	0,054500	<b>-0,522230</b>	<b>-2,10195</b>	<b>0,035558</b>
Area & Distancia genética (PD)	-0,33168	-0,99444	0,349130	-0,262432	-1,05627	0,290846

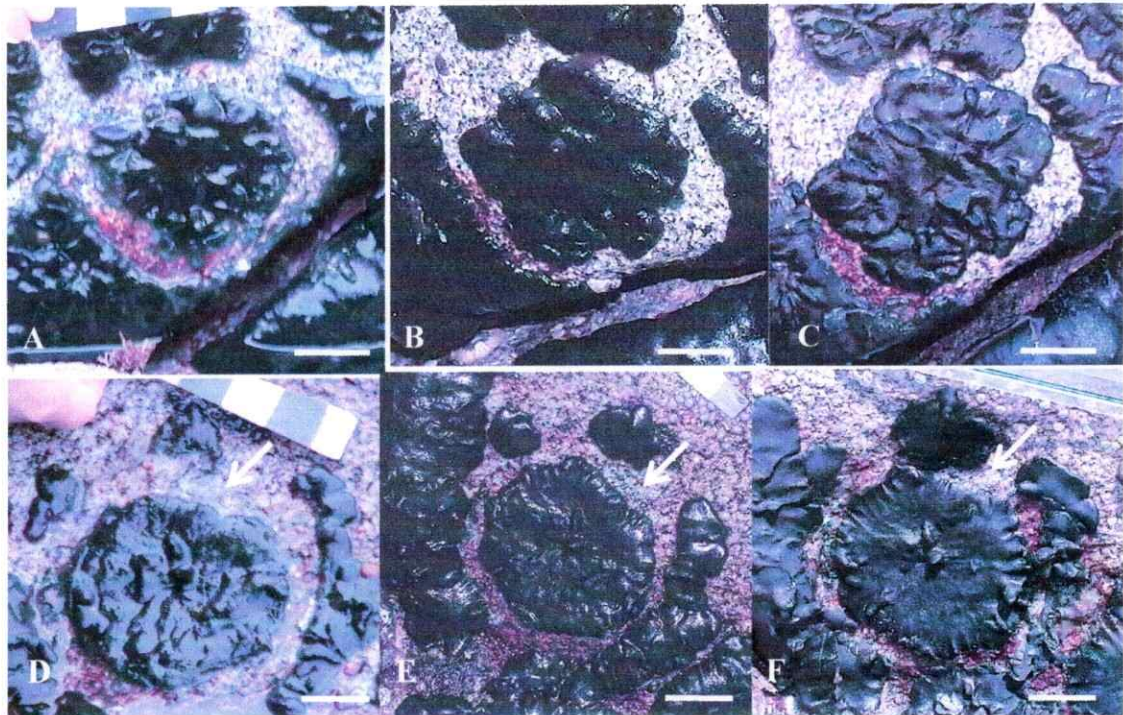


Figura 57. Crecimiento de *Codium sp.* en Maitencillo a los 30, 60 y 90 días Después de la manipulación manual y formación de subunidades. (A-C) talos no fusionados, (D-F) talos fusionados previamente. (Escala= 4 cm, flechas en D, E y F indican zona de contacto y/o fusión de talos previamente identificadas)

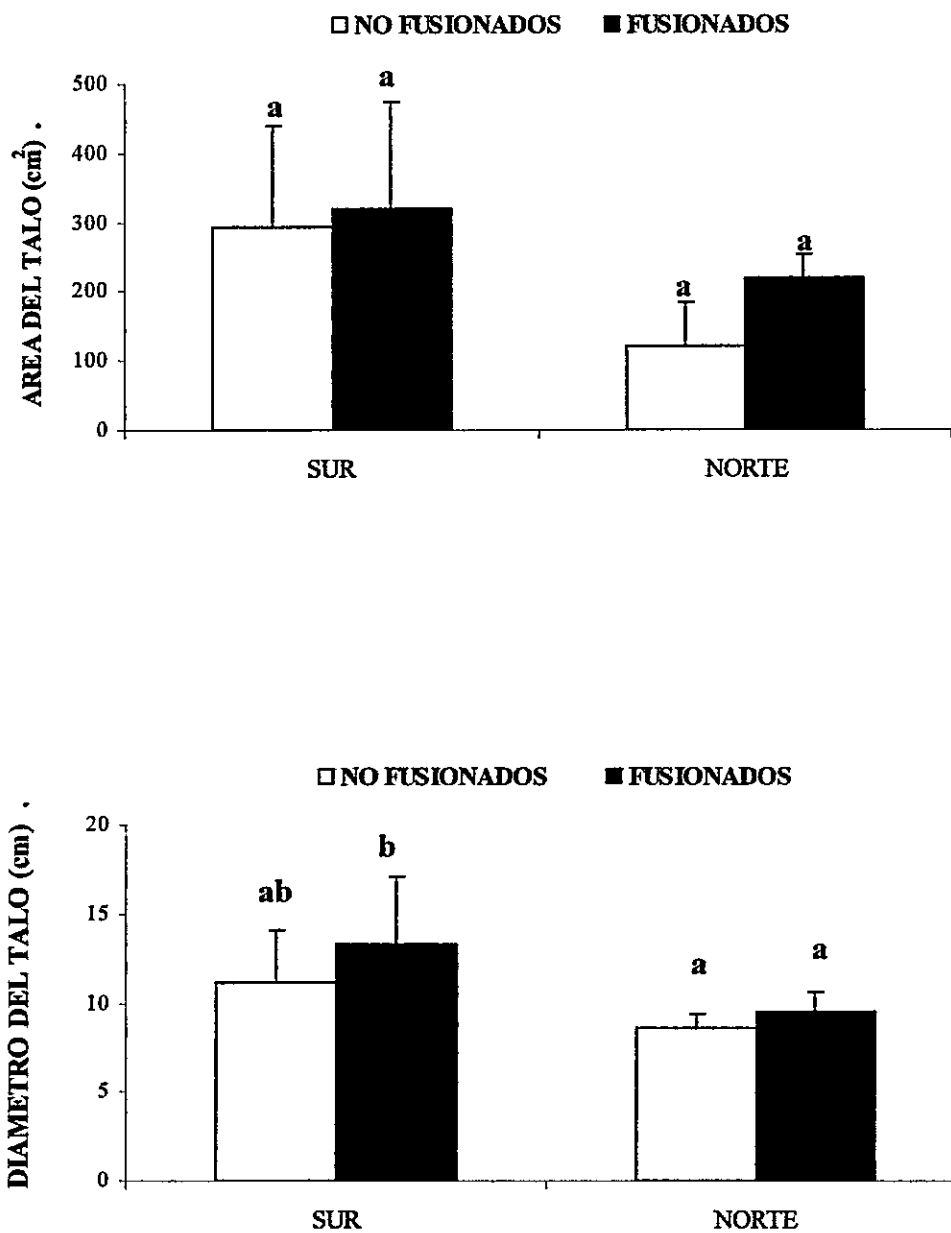


Figura 58. Comparación del crecimiento en talos fusionados y no fusionados de igual Dimensión en dos zonas (sur y norte) de la localidad de Maitencillo . (A) Area del talo, (B) Diámetro del talo. Significancia estadística de las diferencias en letras a y b.

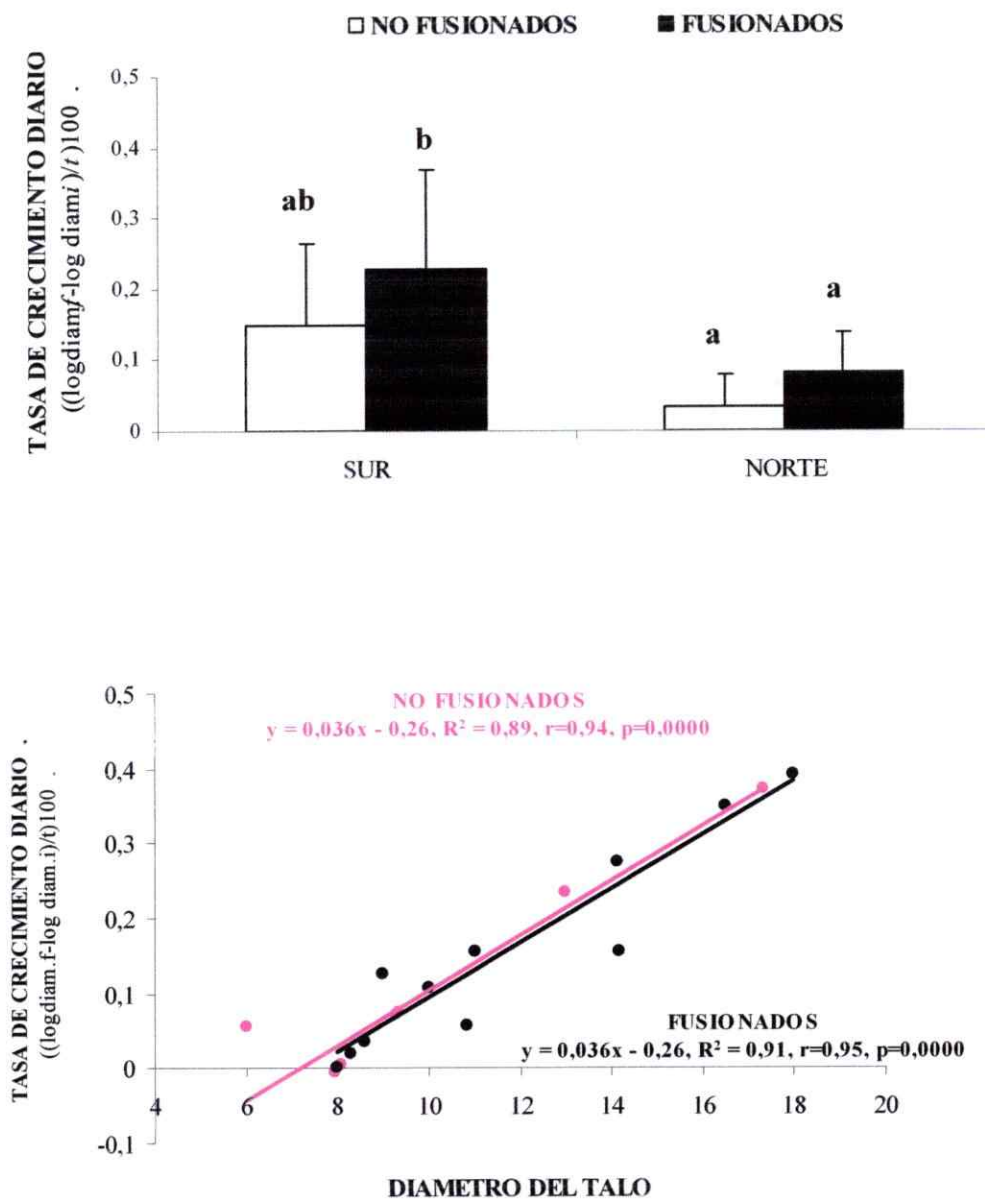


Figura 59. Comparación de la tasa de crecimiento en talos fusionados y no fusionados de igual Dimensión en dos zonas (sur y norte) de la localidad de Maitencillo . (A) Tasa crecimiento del talo, (B) Correlación entre diámetro del talo y tasa de crecimiento. Significancia estadística de las diferencias en letras a y b.

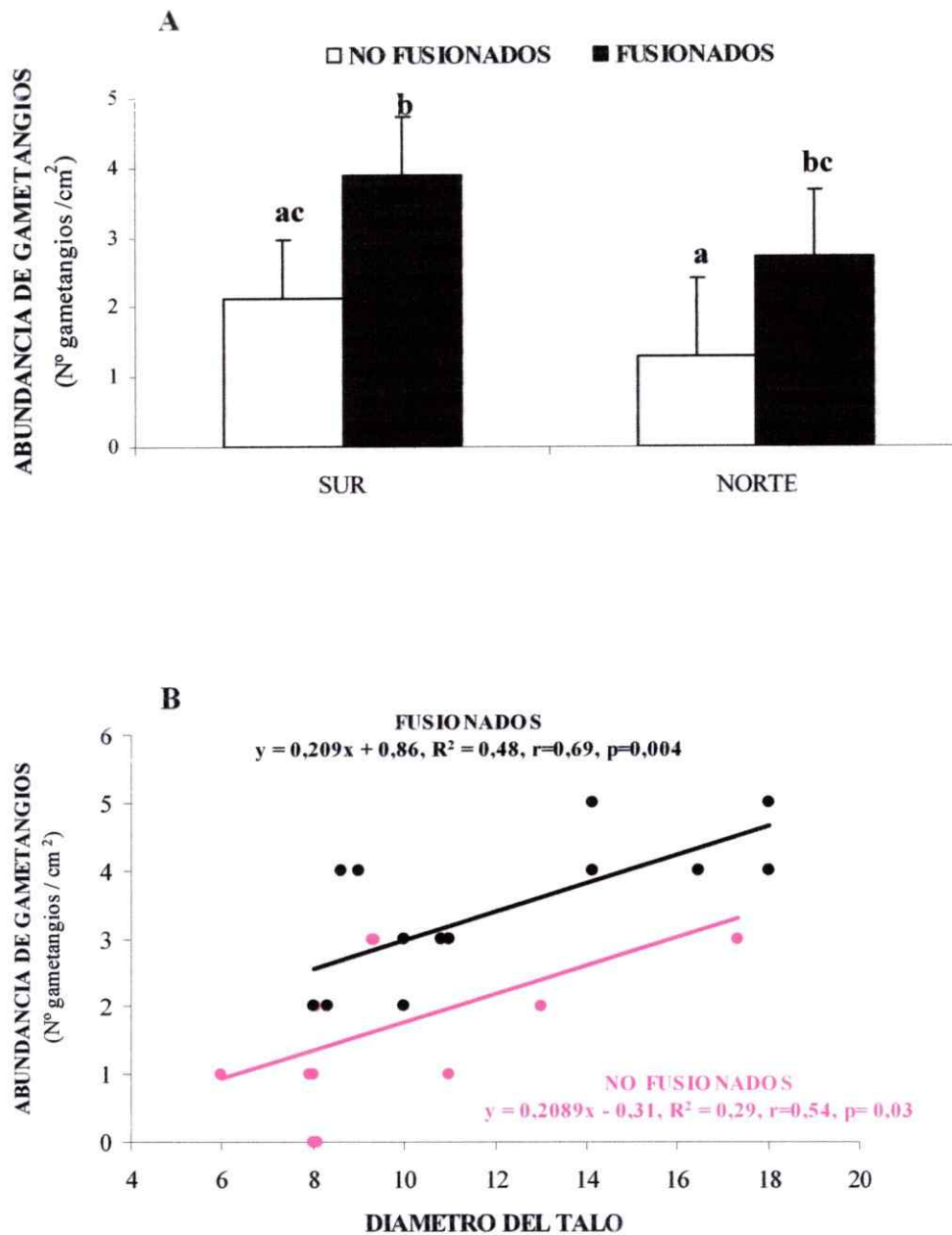


Figura 60. Comparación de la abundancia de gametangios por unidad de área en talos fusionados y no fusionados de igual dimensión en dos zonas (sur y norte) de la localidad de Maitencillo. (A) Abundancia de gametangios, (B) Correlación entre diámetro del talo y la abundancia de gametangios. Significancia estadística de las diferencias en letras a y b.

<b>ANOVA</b>	<b>gl</b>	<b>wald</b>	<b>p</b>
<b>Diámetro</b>			
Localidad (Norte & Sur)	1	4,757	0,0291
Estado (Fusionado & No-fusionado)	1	1,647	0,1994
Localidad * Estado	1	2,278	0,1312
<b>Tasa Crecimiento</b>			
Localidad (Norte & Sur)	1	3,776	0,0519
Estado (Fusionado & No-fusionado)	1	0,862	0,3530
Localidad * Estado	1	0,628	0,4280
<b>Nº gametangios</b>			
Localidad (Norte & Sur)	1	4,298	0,0381
Estado (Fusionado & No-fusionado)	1	16,32	0,0000
Localidad * Estado	1	0,048	0,8257

<b>Regresión lineal</b>	<b>SS</b>	<b>gl</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Estado & Diámetro	17,3927	1	17,3927	1,944	0,17419
Estado & Tasa de Crecimiento	0,02879	1	0,02879	2,068	0,16153
Estado & Nº gametangios	19,1999	1	19,1999	17,762	0,00023

<b>Correlación</b>	<b>Spearman R</b>	<b>t (N-2)</b>	<b>p</b>	<b>Kendal Tau</b>	<b>Z</b>	<b>p</b>
Estado & Diámetro	0,279530	1,54054	0,134650	0,239105	1,85566	0,063502
Estado & Tasa de Crecimiento	0,279530	1,54054	0,134650	0,239105	1,85566	0,063502
Estado & Nº gametangios	0,621155	4,19407	0,000249	0,557084	4,32344	0,000015

<b>Covarianza (Nº Gam &amp; T. crec)</b>	<b>gl</b>	<b>wald</b>	<b>p</b>
Intercepto	1	45,446	0,000000
Tasa Crecimiento	1	18,302	0,000019
Estado (Fusionado & No-fusionado)	1	14,833	0,000117

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSION GENERAL**

Cuando dos individuos que pertenecen a la misma especie, se encuentran en contacto, es esperable que se desencadenen dos tipos de respuestas alternativas: competencia o cooperación (Buss 1999). La competencia intraespecífica, ampliamente estudiada en la mayoría de los organismos, ha sido considerada como de gran importancia ecológica y evolutiva, afectando procesos microevolutivos y macroevolutivos como la especiación (Ridley 1996). Alternativamente, la cooperación es un tipo de respuesta ecológica que responde a las características propias de los organismos involucrados, tales como su condición individual o multicelular (Ridley 1996). En este contexto, la coalescencia y formación de un organismo quimérico, puede ser entendida como la evolución de la cooperación (Pannel & Eppley 2004), mecanismo alternativo a la competencia (Stoner *et al.* 1999, Santelices & Alvarado 2005), cuya mantención se debe a un balance entre el costo y beneficio de su condición heterogénea (Pineda-Krch & Lehtila 2004).

A través del presente estudio se ha evidenciado que en el alga verde *Codium sp.* (*Tylecodium*), ocurre una cooperación intra-específica como respuesta ecológica a través de la fusión de talos. Macroscópicamente, similar a la coalescencia descrita en algas rojas, los talos se fusionaron y formaron una entidad genéticamente heterogénea no pudiendo distinguir la independencia de los individuos inicialmente involucrados. Sin embargo, microscópicamente cada célula mantuvo su individualidad, sin poder reconocer la existencia de conexiones celulares o pared externa común como ha sido descrito durante la coalescencia de algas rojas. Los costos y beneficios de la fusión de talos y formación de quimera permanecen aún en discusión, debido a resultados no



concluyentes. De esta manera, las hipótesis generales planteadas en la introducción de esta tesis son parcialmente aceptadas.

Basado en lo anterior, podemos concluir que la fusión de talos a nivel inter-específico no ocurriría naturalmente, ya que la combinación de caracteres morfológicos, moleculares y filogenéticos identificaron tres especies del subgénero *Tylecodium*, distribuidas discontinuamente a lo largo de Chile continental. Adicionalmente, los resultados indican que la fusión de talos observada en Chile central en el subgénero *Tylecodium* NO ocurre en la especie *C. dimorphum* (hipótesis 1a). Esta conclusión se basa en que el estudio de la diversidad de especies del subgénero *Tylecodium* presente en Chile (objetivo 1a), reveló que la especie presente en Chile central que Santelices *et al.* (1981) caracterizó ecológicamente, que Maggs & Cheney (1990) sugirió como coalescente y en la que personalmente observé fusión de talos, correspondería a lo que momentáneamente en esta tesis se designó como *Codium sp.*

En un contexto taxonómico, el desarrollo de este objetivo permitió concluir que la combinación de caracteres morfológicos, moleculares y filogenéticos fueron adecuados para la identificación de tres especies distintas, dentro de las cuales dos representarían nuevas especies para la ciencia. La revisión de la literatura en el capítulo 1, permitió inferir que esta disminución en el número de especies encontradas comparadas con el número de especies descritas para la zona, no corresponde a una reducción en la diversidad biológica, sino que existen problemas taxonómicos y nomenclaturales en el grupo a nivel mundial. Finalmente, en un contexto ecológico, aún cuando la distribución geográfica discontinua de las especies sugiere que de ser posible la fusión de talos entre especies distintas, en Chile este fenómeno no ocurriría en forma

natural, no se descartan futuros estudios que pongan a prueba dicha hipótesis, a través de cultivos en laboratorio o trasplante de talos.

Por otra parte, la fusión de talos a nivel intra- específico entre genotipos distintos, podría ocurrir naturalmente en aquellas localidades que presentan variabilidad genética. En un contexto genético poblacional, la estimación de la diversidad genética de distintas poblaciones de *Codium sp.* (hip. 1b Obj. 1b) dio cuenta que la variabilidad genética de *Codium sp.* en su rango de distribución fue baja, compuesta por sólo 17 haplotipos, estrechamente relacionados entre si, evidenciando una gran conectividad entre las poblaciones a través de la dinámica de población, estructuración genética, patrón filogeográfico, y filogenias de haplotipos y de poblaciones. Sin embargo, la diversidad haplotípica intrapoblacional fue alta en poblaciones en los extremos norte (Paposos) y sur (Loncoyén) de su distribución, pudiendo encontrar genotipos distintos coexistiendo en la misma población.

La evaluación en condiciones naturales de la fusión de talos en *Codium sp.* y su descripción a nivel visual, celular y genético (obj. 1c), sustentan la idea que en Chile central, la fusión de talos en *Codium sp.* ocurre a nivel macroscópico, entre talos distintos (inter-genet) y dentro del mismo talo (intra-genet). En ambos casos, observaciones macroscópicas fueron similares al proceso de coalescencia observado en lagas rojas. Sin embargo, microscópicamente, la fusión se observó como un entrecruzamiento y contacto celular, sin evidencia de formación de una matriz o pared externa común, y menos aún, la presencia de conexión secundaria entre células, como ha sido descrito en la coalescencia de algunas algas rojas. Esta fusión se llevó a cabo gracias a cambios morfológicos y/o funcionales, de los utrículos y filamentos medulares,

que le permitieron la adherencia al sustrato, contacto entre talos y mantención de la fusión. Esta variabilidad morfológica y funcional fue un patrón común observado en talos no manipulados, permitiéndoles no sólo el crecimiento meristemático del talo, sino que le confirió a los talos programación vegetativa, ocupando el sustrato disponible y eliminando competidores por sobrecrecimiento celular. El cultivo de células, identificó que el cambio morfo-funcional se debió a una multiplicación y movilización activa del protoplasma hacia las zonas de crecimiento, inicialmente observada como evaginación que dio origen a numerosos utrículos y filamentos medulares. Adicionalmente, el cultivo de células en condiciones controladas, evidenció cierta competencia celular en condiciones ambientales adecuadas, expresadas en un mayor crecimiento de células cultivadas aisladamente. Sin embargo, frente a variaciones ambientales sub-óptimas, esta competencia se transformó en cooperación, sobreviviendo las células cultivadas en grupos.

Una vez reconocida la fusión de talos en *Codium sp.* la evaluación de su implicancia ecológica traducidas a beneficios y/o costos de organismos fusionados versus no fusionados (hip. 2) es aún incierta. Los resultados demuestran una alta frecuencia de talos compuestos por más de un genotipo (quimeras), en poblaciones naturales de *Codium sp* (obj 2a). Sin embargo, ésta heterogeneidad genética pareciera tener un costo asociado en cuanto a competencia intraorganismal, observándose como una reducción del tamaño del talo, al encontrarse una mayor cantidad de genotipos distintos y bajo parentesco genético, en el mismo talo. No obstante, estos datos no fueron concluyentes, constituyendo la base de estudios posteriores que pongan a prueba dicha hipótesis. La composición genética de las quimeras evidencia que los genotipos

involucrados son genéticamente muy similares, sugiriendo que este parentesco quizás le permite la mantención de su heterogeneidad.

Por otra parte, el beneficio talla-dependiente (hip. 2c. obj. 2c), no desapareció al estandarizar las dimensiones de talos fusionados versus no fusionados. Sugiriendo beneficios intrínsecos de la fusión, observado como un aumento significativo del éxito reproductivo (abundancia de gametangios) pero no en la tasa crecimiento. Esta respuesta “paradojal” sugiere que existirían mecanismos aún desconocidos que estimulan la maduración de los talos (producción de gametangios), dentro de los cuales se puede sugerir una cooperación celular (sinergismo celular) y/o competencia celular (variación morfológica y funcional de las células), consecuencia del proceso de fusión de talos.

En consecuencia, esta tesis constituye la primera evidencia experimental de que la fusión de talos en el algas verde *Codium sp.* es frecuente. Esta tipo de fusión, podría corresponder a coalescencia en un amplio sentido, aún cuando a nivel celular esta fusión no presente en patrón descrito en la coalescencia de algas rojas. Finalmente, la implicancia ecológica de proceso de fusión, traducida en costos y beneficios del quimerismo, permanece aún incierta, sugiriendo beneficios intrínsecos de la fusión de talos y formación de una entidad quimérica cuyo origen es desconocido.

**REFERENCIAS**

- MAGGS CA & CHENEY DP. 1990. Competition studies of marine macroalgae in laboratory culture. *J. Phycol* 26: 18-24.
- BUSS LW. 1999. Slime molds, ascidians, and the utility of evolutionary theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 8801-8803.
- PANNEL JR & EPPLEY SM. 2004. Intraorganismal genetic heterogeneity: is it a useful concept?. *J. Evol. Biol.* 17: 1180-1181.
- PINEDA-KRCH M & LEHTILA K. 2004. Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. *J. Evol. Biol.* 17: 1167-1177.
- RIDLEY M. 1996. *Evolution*. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Science Inc. USA. 719 pp.
- SANTELICES B & ALVARADO JL. 2005. Dynamic of early recruitment in the coalescing seaweed *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Proceedings, 8<sup>th</sup> International Phycological Congress*. Durban, South Africa, August 2005: 44 (4):90.
- SANTELICES B, S MONTALVA & OLIGER P. 1981. Competitive algal community organization in exposed intertidal habitats from central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 6: 267-276.
- STONER DS, RINKEVICH B & WEISSMAN IL. 1999. Heritable germ and somatic cell lineage competitions in chimeric colonial protochordates *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9148-9153.

