

UCH-FC
DOC-Δ
V 293
C. 1

**Plasticidad fenotípica y diferenciación genética como respuesta
a la heterogeneidad ambiental en poblaciones de *Mazzaella
laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta).**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento de los requisitos

para optar al grado de

Doctorado en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

Por

Daniel Abraham Varela Zapata

Enero, 2003



Co-Directores de Tesis:

Dra. Mary Kalin Arroyo

Fac. Ciencias Universidad de Chile

y

Dr. Bernabé Santelices

Fac. Ciencias Biológicas P. Universidad Católica 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 el candidato:

DANIEL ABRAHAM VARELA ZAPATA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 7, del mes de Octubre, del año 2002.

Co-Directores de Tesis:

Dra. Mary Kalin Arroyo

Dr. Bernabé Santelices



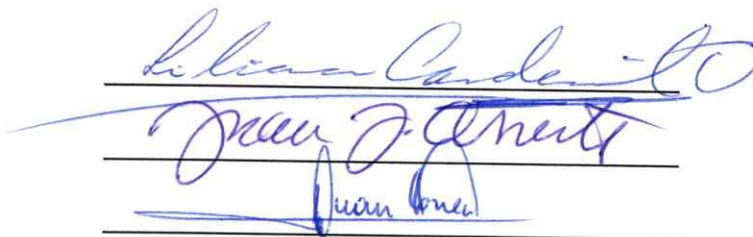
Handwritten signatures of the Co-Directors of Thesis: Mary Kalin Arroyo and Bernabé Santelices. Each signature is written in blue ink above a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Liliana Cardemil

Dr. Juan Armesto

Dr. Juan Correa



Handwritten signatures of the members of the Thesis Evaluation Commission: Liliana Cardemil, Juan Armesto, and Juan Correa. Each signature is written in blue ink above a horizontal line.

A mi Padre,
de quien recibo siempre más de lo que pido
y mucho más de lo que doy.

A mi esposa,

a mi familia

y

al profesor
Patricio Sánchez,
quien me animó a seguir en el camino
de la ciencia

AGRADECIMIENTOS

El estudio ha sido financiado a través de FONDECyT (Proyecto N° 2990118), y en parte por aportes del Centro Para Estudios Avanzados en Ecología y de Investigación en Biodiversidad (P. 99-103-FICM). El estudiante, por su parte, ha sido sostenido a través de Beca de Doctorado CONICYT y la Beca de término de tesis de CONICYT.

El estudiante agradece a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y la Facultad de Biología de la P. Universidad Católica de Chile cuyo respaldo, facilidades y colaboración posibilitaron la interacción con diferentes grupos de trabajo y el acceso a variadas herramientas metodológicas. Se extiende este agradecimiento al Departamento de Recursos Naturales y Medioambiente de la Universidad de los Lagos, el cual ha sostenido al estudiante durante la última etapa de redacción de la tesis. Por otra parte, se agradece especialmente el apoyo brindado por los doctores Mary Kalin Arroyo y Bernabé Santelices quienes, en un marco de confianza, dieron libertad en el trabajo e impusieron una alta exigencia en los resultados. Se extiende este agradecimiento a los profesores Dra. Liliana Cardemil y Dr. Juan Correa en cuya disposición involucraron su tiempo y la infraestructura de sus laboratorios.

El estudiante agradece con particular consideración a las numerosas personas que en mayor o menor medida se vieron involucradas en el desarrollo de este estudio. Entre ellos es preciso mencionar a: Pablo Sánchez, Sylvain Faugeron, Diego Aedo, Alejandra Paredes y Marcela Hormazabal, Angélica Vega, Talía del Pozo, Leyla Cárdenas, Cecilia Figueroa, y Jessica Beltrán, Ana María Humaña, Claudia Hernández, Alejandra González, Paulina Ossa, Marcelo Antileo, Jorge Antileo, Kester Bull, Loreto Contreras, Jorge Nimmsch, Rene Espinoza, Marco Ramírez, Gustavo Varela y Germán Rodríguez. Su colaboración pone de manifiesto que la ciencia es una labor que se realiza necesariamente en comunidad. A todo ellos muchas gracias.

Índice

Resumen	ix
Abstract	xiv
Capítulo I	
El problema de estudio	1
Capítulo II	
Variabilidad de la respuesta fotosintética de <i>M. laminarioides</i> en terreno	20
Capítulo III	
Plasticidad fenotípica y diferenciación genética en respuesta a la temperatura y la desecación en <i>M. laminarioides</i>	61
Capítulo IV	
Estructuración de la variabilidad genética en <i>M.</i> <i>laminarioides</i>	148
Capítulo V	
Discusión general	195
Bibliografía	210

Lista de Tablas

<u>Capítulo I</u>	<u>Capítulo II</u>	<u>Capítulo III</u>	<u>Capítulo IV</u>	<u>Capítulo V</u>
	Tabla 2-1	Tabla 3-1	Tabla 4-1	
	Tabla 2-2	Tabla 3-2	Tabla 4-2	
	Tabla 2-3	Tabla 3-3	Tabla 4-3	
	Tabla 2-4	Tabla 3-4	Tabla 4-4	
		Tabla 3-5	Tabla 4-5	
		Tabla 3-6	Tabla 4-6	
		Tabla 3-7	Tabla 4-7	
		Tabla 3-8	Tabla 4-8	
		Tabla 3-9		
		Tabla 3-10		
		Tabla 3-11		
		Tabla 3-12		
		Tabla 3-13		
		Tabla 3-14		
		Tabla 3-15		
		Tabla 3-16		
		Tabla 3-17		
		Tabla 3-18		
		Tabla 3-19		

Lista de Figuras

<u>Capítulo I</u>	<u>Capítulo II</u>	<u>Capítulo III</u>	<u>Capítulo IV</u>	<u>Capítulo V</u>
Figura 1-1	Figura 2-1	Figura 3-1	Figura 4-1	Figura 5-1
Figura 1-2	Figura 2-2	Figura 3-2	Figura 4-2	
Figura 1-3	Figura 2-3	Figura 3-3	Figura 4-3	
Figura 1-4	Figura 2-4	Figura 3-4	Figura 4-4	
Figura 1-5	Figura 2-5	Figura 3-5	Figura 4-5	
	Figura 2-6	Figura 3-6		
	Figura 2-7	Figura 3-7		
	Figura 2-8	Figura 3-8		
	Figura 2-9	Figura 3-9		
	Figura 2-10	Figura 3-10		
	Figura 2-11	Figura 3-11		
		Figura 3-12		
		Figura 3-13		
		Figura 3-14		
		Figura 3-15		
		Figura 3-16		
		Figura 3-17		
		Figura 3-18		
		Figura 3-19		

Lista de símbolos y abreviaturas

Φ_{Po}	Eficiencia fotosintética o cuántica máxima
PSII	Fotosistema II
ANOVA	Análisis de varianza
F	Criterio de prueba entre medias de tratamientos en un análisis de varianza. Corresponde a la razón de dos estimadores independientes de la varianza.
t_a°	Temperatura del ambiental
%HR _a	Humedad relativa del ambiente
t_{sr}°	Temperatura entre 2 a 5 cm sobre la roca en el intermareal
%HR _{sr}	Humedad relativa entre 2 a 5 cm sobre la roca en el intermareal
t_r°	Temperatura registrada en contacto con la roca en el intermareal
t_p°	Temperatura medida entre las frondas de las plantas de <i>M. laminarioides</i> a distintas alturas de marea
%HR _p	Humedad relativa medida en las frondas de <i>M. laminarioides</i> a distintas plantas de diferentes alturas de marea
P_{max}	Tasa de fotosíntesis bajo luz saturante
I_k	Intensidad luminosa de saturación
α	Eficiencia de cosecha de energía radiante fotosintética

Resp	Tasa de respiración
I_c	Intensidad luminosa de compensación
F₀	Fluorescencia basal
φ_p	Eficiencia fotosintética cuántica efectiva
QNP	Proporción de energía absorbida que es disipada por medios no fotoquímicos
DNA	Ácido desoxiribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ("Polimerasa Chain Reaction")
RAPD	Fragmentos polimórficos de DNA amplificados en forma aleatoria ("Random Amplified Polimorphic DNA")
AMOVA	Análisis de varianza molecular
Φ_{st}	Diferenciación entre subunidades, análogo a F _{st}
Φ_{ct}	Diferenciación entre unidades, análogo a F _{ct}
Φ_{sc}	Diferenciación entre subunidades dentro de unidades, análogo a F _{sc}
H_{nb}	Heterocigocidad promedio esperada

Resumen

Mazzaella laminarioides es un alga roja que se distribuye en una amplia banda intermareal, desde la región subantártica hasta la región templada de Chile. A lo largo de su distribución esta especie está expuesta a un gran gradiente ambiental. En este contexto, el objetivo principal de este estudio fue comprender la estrategia adaptativa involucrada en la respuesta de *Mazzaella laminarioides* a la heterogeneidad ambiental. En esta dirección se abordaron los siguientes objetivos (1) Caracterizar } algunas variables ecofisiológicas en terreno, relacionando su comportamiento con la heterogeneidad ambiental, (2) describir la curva de respuesta a factores abióticos relevantes (temperatura y desecación), evidenciando la presencia de diferenciación genética entre individuos de distinto rigen espacial, y (3) evaluar la variabilidad genética a diferentes escalas espaciales.

- (1) En terreno, la evaluación de variables ecofisiológicas (tasa de fotosíntesis y eficiencia fotosintética) permitió describir la variabilidad de la respuesta de *M. laminarioides* ante gradientes ambientales a escala local y regional. El gradiente ambiental al nivel local (intermareal) fue más determinante que el regional para definir diferencias en las respuestas fisiológicas entre las plantas. En la franja intermareal, las plantas del extremo superior fueron significativamente más afectadas que las del extremo inferior por las condiciones ambientales. A lo largo

del día, las plantas de la parte alta reducen su eficiencia fotosintética debido particularmente a la irradiación y la desecación. Estacionalmente la eficiencia fotosintética evidencia una significativa reducción durante la primavera y el verano, pero durante el otoño e invierno alcanza valores altos, semejantes a los de las plantas del margen inferior. Estas diferencias estacionales reflejan diferentes niveles de aclimatación a las condiciones ambientales en plantas de diferente altura intermareal. A escala regional, las diferencias entre localidades en el comportamiento estacional de las variables fisiológicas parecen evidenciar diferencias locales en los factores ambientales que afectan la fisiología fotosintética.

- (2) En el laboratorio, la evaluación fisiológica indica que las plantas de *M. laminarioides*, independiente de su origen, tiene una amplia curva de tolerancia a factores ambientales (temperatura y desecación). Estas plantas mantienen una tasa de fotosíntesis positiva en un amplio rango térmico (5 – 25° C) y pueden mantener una gran estabilidad cuando son sometidas transitoriamente a altas temperaturas (30° C). A niveles moderados de desecación las plantas pueden incrementar su eficiencia fotosintética, aunque esta es deprimida significativamente a mayor pérdida de agua. Sin embargo, las plantas son capaces de recuperar completamente dicha eficiencia aún después de perder hasta el 60% de contenido hídrico. No obstante, las diferencias observadas en el óptimo fotosintético, entre plantas de diferentes localidades, evidencia algún

grado de diferenciación genética en respuesta a los factores ambientales.

Por otra parte, juveniles de *M. laminarioides* pueden crecer en un amplio rango térmico (5 – 25° C), y a distintos grados de desecación (0 – 4 h de emersión). No obstante, el crecimiento en juveniles de diferentes localidades mostró diferencias significativas a través del gradiente térmico (a los 10° y 25° C). En este contexto, no se observaron diferencias significativas entre juveniles de distintas fases reproductivas, pero sí se observaron entre juveniles provenientes de plantas colectadas a distintas alturas del intermareal. Por otra parte, la respuesta de crecimiento a diferentes niveles de desecación evidenció diferencias significativas entre juveniles provenientes de plantas de distinta localidad, fases reproductiva y altura intermareal.

- (3) El estudio de la diversidad genética molecular permitió evidenciar que la estructuración de la variabilidad genética varía con la escala espacial. La distancia genética permitió ordenar las poblaciones en dos grandes regiones. En cada región la relación entre el grado de diferenciación y la escala espacial mostró diferentes patrones. En la región centro – norte la diferenciación genética exhibió una clara relación con la escala espacial, aumentando progresivamente desde el nivel de parcelas hasta el regional. En la región centro – sur, en cambio, la diferenciación entre

poblaciones muestra una pobre relación con la distancia, indicando en algunos casos una mayor diferenciación entre parcelas de la misma localidad que entre aquellas separadas por varios kilómetros. Por otra parte, el análisis jerárquico de la variabilidad evidenció que el alcance del flujo génico en esta especie no es superior a 25-30 m, indicando que a mayor distancia el flujo génico es insuficiente para contrarrestar la diferenciación genética producida por la deriva génica o la adaptación local. Sin embargo, aún a menor escala espacial (entre 5 y 30 m), se observaron diferencias en el grado de la diferenciación entre individuos. Esto revela que, a este nivel, la estructuración de la variabilidad genética en *M. laminarioides* es afectada por factores distintos a los referidos a la distancia. En este contexto, la reducida pero significativa diferenciación entre individuos de diferente altura de marea puede estar relacionada con el gradiente intermareal. Los factores ambientales que definen este gradiente podrían afectar de manera selectiva la sobrevivencia y/o el crecimiento de los individuos, y con ello la estructuración de la diversidad genética.

En consecuencia, en *M. laminarioides* tanto la amplia curva de tolerancia como la diferenciación genética permiten responder al amplio gradiente ambiental en el que se distribuye. La plasticidad fisiológica de esta especie puede dar cuenta de gran parte de la heterogeneidad ambiental. No obstante, donde las condiciones ambientales ejercen una fuerte presión selectiva la

diversidad genética será reducida, los individuos con diferente respuesta son seleccionados en distintas partes del gradiente ambiental.

Abstract

Mazzaella laminarioides is a red alga that occurs in a wide intertidal band from subantarctic to temperate areas of Chile. Along its distribution this species is exposed to a great environmental gradient. The main objective of this study was to understand the adaptive strategy of *Mazzaella laminarioides* to local and latitudinal environmental heterogeneity, through (1) the contrasting of various ecophysiological parameters measured in the field, with environmental heterogeneity, (2) determination of the species physiological response and genetic differentiation under laboratory conditions, and (3) evaluation of genetic differentiation at different spatial scales.

- (1) The evaluation of physiological parameters in the field (e.g. rate of photosynthesis, photosynthetic efficiency) allowed the description of *M. laminarioides* response to environmental variability. Local environmental gradients (tidal height) were more important than regional variability in explaining physiological differences among plants. *Mazzaella laminarioides* from the upper intertidal were more affected by environmental conditions than those from the lower zone. Plants higher up the intertidal band reduced their photosynthetic efficiency throughout the day in response to higher irradiation and desiccation rates. Furthermore, photosynthetic efficiency also varied seasonally, so that values were reduced in spring and summer. On the other hand, high efficiency rates were observed in autumn and winter, similar to values displayed by plants from the lower intertidal. Seasonal differences

observed between plants evidenced their contrasting acclimation capacity to fluctuating environmental conditions. Contrasting local patterns of physiological seasonality suggest that environmental conditions affect the photosynthetic physiology at a regional scale.

- (2) Adult plants showed a wide curve of physiological response to controlled environmental variables (temperature and desiccation), independent of their geographic origin. Plants sustained a positive photosynthetic rate throughout a wide thermal range (from 5 to 25 °C), and additionally showed great thermal stability when shortly exposed to high temperature (30 °C). Photosynthetic efficiency improved at moderate levels of desiccation, although this variable decreased with increased water loss. However, photosynthetic efficiency recovered its initial level in rehydrated plants, even when water loss had reached 60%. However, in spite of the wide range of physiological response in *M. laminarioides*, the regional differences in optimal photosynthesis and photosynthetic efficiency at high temperature, evidenced some genetic differentiation in response to environmental variables.

Furthermore, juvenile plants also grew within a wide thermal range (from 5 to 25 °C) and at different degrees of desiccation (0,1,2,3 and 4 h of emersion). Nevertheless, the juvenile growth showed differences in plants from different localities throughout the thermal gradient (at 10° and 25° C). In this context, juvenile from different reproductive phase was no different but significant differences were detected in juveniles originating from

plants collected at different tidal level. Furthermore, the degree of desiccation in juvenile plants affected their growth, but also depended on their reproductive phase, geographic origin and location within the intertidal zone.

- (3) Results on the species genetic diversity showed two spatially divided groups. The first group, conformed into a north-central region, showed that genetic differentiation increased progressively from plot to a regional level. In contrast, differentiation in plants from the south-central region was poorly related to spatial scale. In some cases, higher differentiation was shown between plots from the same localities, than those separated by several kilometers. On the other hand, hierarchical analysis of genetic variability indicated that gene flow does not go beyond 25-30 m. The latter implies that gene flow cannot explain differentiation produced by genetic drift at greater distance. However, different levels of genetic differentiation were observed within a 5 to 30 m scale. Thus, results suggested that genetic structure in *M. laminarioides* was affected by alternative variables. In this context, significant differentiation observed in plots from different tidal elevation suggested the effect of an intertidal gradient. The environmental factors acting within this gradient could selectively affect the survival and/or growth of plants, thus resulting in contrasting genetic structures.

In consequence, the wide curve of tolerance and the genetic differentiation of *M. laminarioides* allows to response to the environmental gradient within its distribution. Thus, the physiological plasticity allows it to cope with a great part of the environmental heterogeneity. However, high environmental selective pressure will tend to reduce genetic diversity through selection of individuals with contrasting responses to particular conditions throughout environmental gradient.

CAPÍTULO I

El problema de estudio

Introducción

Factores como temperatura, intensidad luminosa, fotoperíodo, salinidad, desecación y disponibilidad de nutrientes, pueden variar considerablemente a lo largo de la costa tanto temporal como espacialmente, y con ello afectar la distribución de macroalgas, especialmente intermareales (Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994). En este contexto, la temperatura juega un rol preponderante en los patrones de distribución de macroalgas a escala latitudinal (para revisiones ver Breeman 1988, Lüning 1990, Wiencke & tom Dieck 1990, Peter & Breeman 1993, Lobban & Harrison 1994). En el intermareal, los cambios de marea exponen a las macroalgas a un ambiente físico cambiante. Durante la emersión, estos organismos quedan expuestos a una variedad de condiciones ambientales potencialmente adversas que incluye altas temperaturas, mayor radiación solar, desecación y reducción en la disponibilidad de nutrientes (Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994). Ante este gradiente ambiental, la tolerancia a la desecación sería determinante en la estructuración vertical de las algas intermareales (Brown 1987, Thomas et al. 1987a,b, Madsen & Maberly 1990, Beer & Kautsky 1992, Chapman 1995, Davison & Pearson 1996)

Ante la heterogeneidad ambiental, ¿cuál es la capacidad o rango de respuesta de las macroalgas intermareales? ¿Es suficiente la capacidad que tiene cada individuo para responder a todo el gradiente ambiental en que vive la

especie? ¿Existe una capacidad diferencial entre los individuos para responder al ambiente que varía espacial y temporalmente?

Para entender como responde una especie a la heterogeneidad ambiental es necesario conocer su rango de respuesta en un contexto poblacional. Por una parte, el rango de respuesta de una especie puede ser definido por la amplia capacidad de un individuo, suponiendo que en la población todos los individuos tienen un rango de respuesta similar, es decir, cada uno es capaz de asentarse, crecer y reproducirse en todo el gradiente ambiental en el que se distribuye la especie. En el otro extremo teórico, cada individuo en la población puede estar especializado para responder a una cierta fracción del gradiente ambiental, de tal forma que el rango de respuesta de la especie es definido por el conjunto de variantes que componen la población (Lynch & Gabriel 1987, Sultan 1987, 1992, Parsons 1991, 1992, Stearn 1992, Hoffmann & Blows 1994, Bazzaz 1996). En el primer caso, la plasticidad fenotípica de cada individuo le permite generar un apropiado fenotipo en un amplio rango de condiciones ambientales (Fig. 1-1a). En el segundo, en tanto, la variación genética permite que diferentes genotipos, relativamente menos plásticos, puedan dar cuenta de la heterogeneidad ambiental (Fig. 1-1b).

Plasticidad fenotípica

En general, ambientes heterogéneos donde los individuos experimentan períodos frecuentes de estrés relativamente previsibles y de magnitudes no

excesivas, pueden ser determinantes en la selección de individuos que describen una amplia curva de tolerancia a dichas condiciones (Lynch & Gabriel 1987, Parsons 1991). Una amplia curva de tolerancia a las condiciones ambientales contribuye a que, a pesar del gradiente ambiental, la adecuación biológica sea significativamente afectada sólo hacia los extremos de distribución, donde las condiciones para la sobrevivencia, el crecimiento y/o la reproducción se acercan a los límites de tolerancia (Fig. 1-1a).

Esta relación entre la heterogeneidad ambiental y la selección de individuos con amplia curva de respuesta es coincidente con el hábitat que ocupan las macroalgas intermareales y el rango de tolerancia que exhiben estas especies ante la variabilidad ambiental (Russell 1986, Chapman 1986). Ante la variabilidad térmica de su ambiente, estudios ecofisiológicos han evidenciado que las macroalgas intermareales presentan amplios rangos de tolerancia, particularmente aquellas especies de regiones templado-frías (Breeman 1988, Lünning 1990, Peters & Breeman 1993, Pakker et al. 1995). Más aún, estudios ecofisiológicos han evidenciado que el rango de temperatura en el que vive una especie pareciera ser un rasgo que varía muy poco a lo largo del rango de distribución (Breeman 1988, Lünning 1990, Peters & Breeman 1992). En este sentido, diferencias en los requerimientos térmicos entre individuos colectados en distintos sitios a lo largo del rango de distribución podría indicar que las muestras corresponden a diferentes especies. Consecuentemente, rasgos como extremos de tolerancia y amplitud del rango

de tolerancia térmica han sido considerados en el estudio de problemáticas históricas y biogeográficas (Peters & Breeman 1992, Pakker et al 1994, 1995, Bischoff & Wiencke 1996).

Por otra parte, en el ámbito local, el rango de tolerancia a la desecación ha sido estrechamente correlacionado con la altura intermareal ocupada por las distintas especies (Smith & Berry 1986, Smith et al. 1986, Brown 1987, Madsen & Maberly 1990, Beer & Kautsky 1992, Davison & Pearson 1996). Especies con una capacidad de tolerar mayores niveles o tiempos de exposición a la desecación ocupan posiciones más altas en la zona intermareal. Una relación semejante ha sido observada respecto a la tolerancia a la temperatura (Smith & Berry 1986) y a la tasa de incorporación de nutrientes (Hurd & Dring 1990).

Un amplio rango de tolerancia a las condiciones ambientales implica que los individuos son capaces de adecuar su fenotipo (bioquímica, fisiológica o morfológicamente), respondiendo con relativa eficiencia a los requerimientos del ambiente. En este contexto, la curva de respuesta que describe la adecuación biológica de un genotipo a través de un gradiente ambiental podría ser considerada como una expresión especial de la norma de reacción (Fig. 1-1a; Lynch & Gabriel 1987). Esta particular norma de reacción, que describe un óptimo y un rango de tolerancia a través de un gradiente ambiental, puede ser entendida, dependiendo de su amplitud, como la relativa insensibilidad de la adecuación biológica de un genotipo a través de un determinado rango

ambiental (Lynch & Gabriel 1987, Stearns 1992). En consecuencia, la curva de tolerancia observada en una especie de macroalga intermareal, ante factores ambientales como la temperatura o la desecación, puede ser concebida como un caso particular de plasticidad fenotípica.

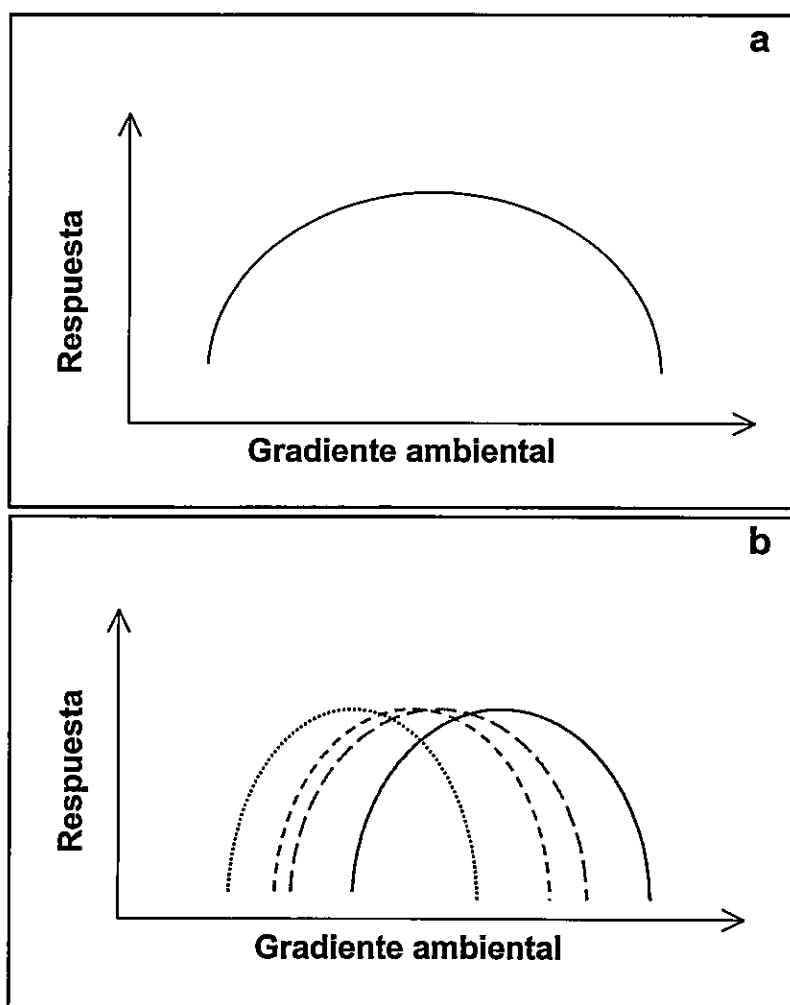


Figura 1-1: Modelos de respuestas de una especie a la heterogeneidad ambiental en un contexto poblacional. a) Amplia curva de respuesta fenotípica (norma de reacción) de un genotipo representando a todos los individuos de la población, los cuales tienen una curva de respuesta similar; b) Curvas de respuestas fenotípicas de distintos genotipos en una población, respondiendo cada uno a una fracción diferente del gradiente ambiental.

Variación genotípica

Complementariamente, la sensibilidad de una especie a ambientes variables debe ser considerada como una función tanto de la amplitud adaptativa (o plasticidad) de cada genotipo, como de la variación (o diferenciación) de los distintos individuos en torno a un óptimo (Fig. 1-1b; Lynch & Gabriel 1987, Parsons 1991, 1992, Stearn 1992, Hoffmann & Blows 1994, Hoffmann et al. 1995). Por consiguiente, la amplitud de tolerancia individual y la variación genética poblacional de la respuesta pueden constituir mecanismos de adaptación complementarios, que desarrollan especies expuestas a ambientes variables (Parsons 1991, 1992, Sultan 1992, Pigliucci 1996).

En este sentido, la gran extensión latitudinal de muchas especies de macroalgas, y su relativa estabilidad a lo largo del gradiente climático, permite esperar una respuesta de diferenciación clinal o ecotípica a lo largo de su distribución geográfica. Diferentes ejemplos de diferenciación ecotípica han sido reportados para muchas especies de algas a través de experimentos de trasplante y cultivos en laboratorio bajo condiciones semejantes ("jardín común") (Breeman 1988, Gerard 1990, Wiencke & tom Dieck 1990, Pakker et al. 1994, Molenaar & Breeman 1994, Molenaar et al. 1996). Así, por ejemplo, a escala geográfica se han identificado diferencias fisiológicas y ecológicas con eventual base genética, gatilladas por gradientes de temperatura, salinidad y cambios en fotoperíodo. A escala micro-geográfica, la información de diferenciación genética es más reducida (Chapman 1986, Innes 1988, Coyer et

al. 1997, Lu & Williams 1994, Williams & Di Fiori 1996), aunque, se destacan los trabajos de Innes (1988) y los de Williams y Di Fiori (1996) que, estudiando sistemas enzimáticos, evidenciaron la diferenciación de fenotipos electroforéticos a muy pocos metros de distancia tanto en *Enteromorpha linza* (Chlorophyta) como en *Silvetia compressa* (Phaeophyta) respectivamente. Ambos trabajos discuten el posible efecto del fuerte gradiente intermareal en la diferenciación local encontrada.

De acuerdo a estos antecedentes, cabe la pregunta ¿en qué medida la plasticidad fenotípica o curva de tolerancia, y la variabilidad genética en la expresión de esta curva, forman parte de las adaptaciones con que las macroalgas intermareales pueden responder al gradiente ambiental en que se distribuyen?

Especie de estudio

Mazzaella laminarioides (Bory) Frederiq (Gigartinales, Rhodophyta) reúne atributos biológicos que son relevantes para el estudio del problema descrito. Esta especie presenta un ciclo de vida trifásico característico de algas rojas (Fig. 1-2), donde dos de sus fases reproductivas son isomórficas de vida libre: la fase gametofítica (haploides) y la tetrasporofítica (diploide). Dado que su sistema reproductivo es dioico, la especie presenta dos tipos de individuos gametofíticos: machos y hembras. Los individuos de ambas fases reproductivas están formados por un disco basal y un variado número de frondas lanceoladas

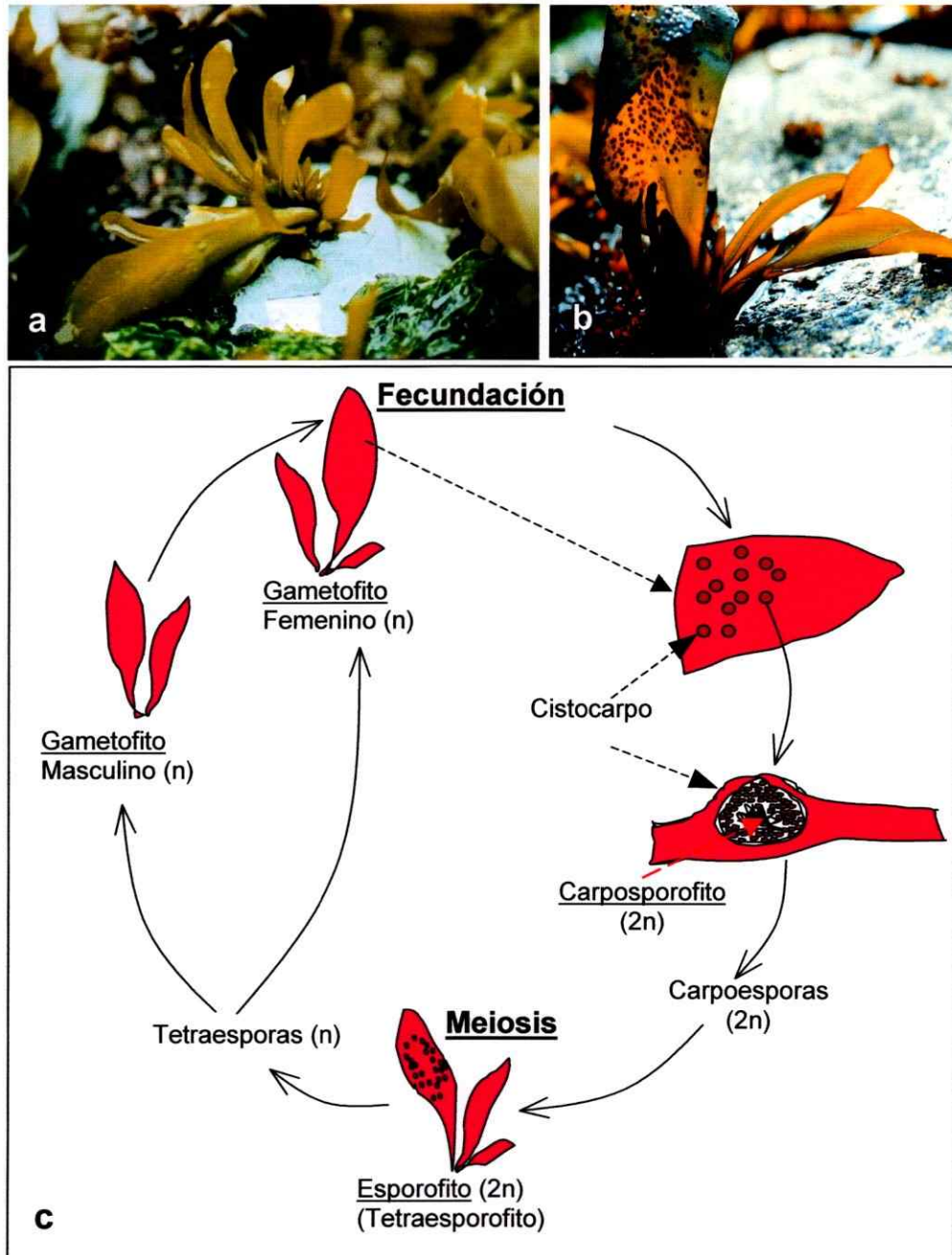


Fig. 1-2: *Mazzaella laminarioides*. a) Planta sin estructuras reproductivas visibles, b) Planta gametofítica femenina con cistocarpos (carposporofito y tejido gametofítico envolvente) insertos en la fronda, c) Ciclo de vida trifásico, mostrando las tres fases reproductivas (gametofito, esporofito y carposporofito). La fecundación ocurre en la fronda del gametofito y la meiosis en la fronda del esporofito.

que pueden alcanzar hasta 30 cm de largo y 5 cm de ancho (Fig. 1-2a y b). Su distribución se extiende desde algunas islas subantárticas por el sur hasta Coquimbo por el norte (30° S) (Fig. 1-3; Hoffmann & Santelices 1998). La zona intermareal, particularmente en la zona central de Chile, llega a presentar poblaciones extensas que forman un amplio cinturón permanente (Fig. 1-4; Hannach & Santelices 1985, Hannach & Waaland 1986, Santelices 1989, Hoffmann & Santelices 1998).

Latitudinalmente, la temperatura pareciera ser determinante en la distribución de esta especie. La evaluación de los requerimientos de temperatura para crecimiento y supervivencia, hecha por Wiencke y tom Dieck (1990) para varias especies, estableció para gametofitos de *M. laminarioides* un rango entre 0 y 15° C, lo cual coincidió con el límite sur, pero fue inconsistente con su extremo norte de distribución, que se extiende aproximadamente hasta la isoterma de verano de 18° C. Los autores de este estudio sugieren la existencia de ecotipos entre las poblaciones de las islas del extremos sur donde fueron tomadas las muestras y las del límite norte de distribución. Estos resultados experimentales también contrastan con aquellos obtenidos en una población de Chile central (Luxoro & Santelices 1989) donde se observó una alta tasa de crecimiento a 20° C en individuos juveniles de ambas fases reproductivas.

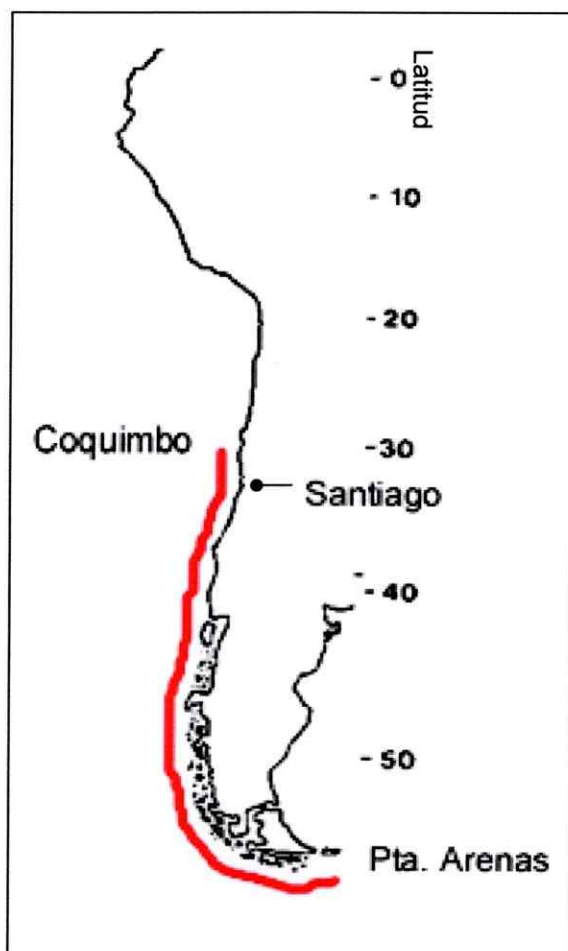


Fig. 1-3: Distribución geográfica de *M. laminarioides*. Esta especie también crece en las Islas subantárticas de Kerguelen y Crozet (no indicadas en el mapa).

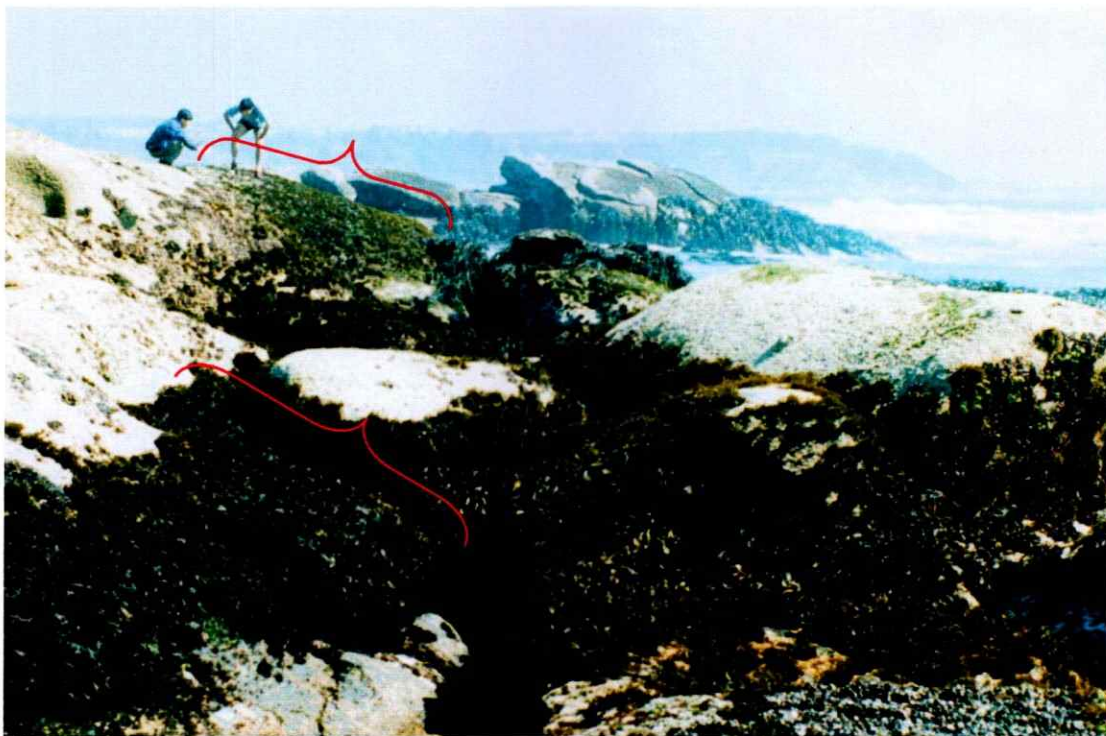


Figura 1-4: Distribución intermareal de *M. laminarioides*. Las llaves (en rojo) indican el ancho del cinturón intermareal ocupado por la especie.

Localmente, los factores abióticos parecen ser determinantes en la distribución de esta especie en la zona intermareal. Su límite superior, por ejemplo, parece estar determinado por factores ambientales adversos, incluyendo alta intensidad luminosa, altas temperaturas y desecación, pues las plantas ubicadas a mayor altura en el intermareal se decoloran y pierden trozos de fronda durante el verano (Santelices 1989). Los estados juveniles parecen ser muy sensibles a los factores abióticos como la desecación, requiriendo de sistemas frondosos de otras especies (Santelices 1989), o conespecíficos, para su crecimiento. Consecuentemente, mucho del reclutamiento se realiza bajo el dosel de plantas de la misma especie. Diferencias en la sobrevivencia a la desecación y en la tasa de crecimiento a distintas temperaturas entre individuos juveniles de distinta fase reproductiva han sido sugeridas como responsables de la dominancia diferencial de ambas fases en distintos niveles del intermareal (Luxoro & Santelices 1989). En las zonas más altas del intermareal se observa que la fase gametofítica es relativamente más abundante que la esporofítica. En tanto que la abundancia de la fase esporofítica parece ser más dominante hacia niveles más bajos del intermareal (Hannach & Santelices 1985, Santelices 1989, Hoffmann & Santelices 1998). Estas diferencias pueden ser consideradas como una respuesta adaptativa o divergencia ecológica en un ambiente fluctuante (Littler & Littler 1983, Luxoro & Santelices 1989, Destombe et al. 1993). Si bien la información disponible indica que ambas fases parecen responder de manera diferencial a las condiciones ambientales, no existe

información ecofisiológica que compare individuos provenientes de distintos niveles en la zona intermareal.

Así, en virtud de estos antecedentes es posible reformular las preguntas planteadas anteriormente en el contexto de la especie en estudio: ¿En qué medida la curva de tolerancia de un individuo puede responder a la variabilidad ambiental a la que está expuesta *M. laminarioides* a lo largo de su distribución latitudinal? Ó ¿existen diferencias en la curva de tolerancia a las condiciones ambientales entre individuos de distinto origen geográfico? Del mismo modo, ¿puede la curva de tolerancia de un individuo responder a la heterogeneidad ambiental en que vive esta especie en el intermareal? Por último, y de manera complementaria, ¿existen diferencias en la curva de tolerancia entre individuos de distinta fase reproductiva?

Hipótesis

Como ha sido descrito para otras macroalgas intermareales, el ambiente en que se distribuye *M. laminarioides* puede ser altamente heterogéneo. En este contexto, la respuesta adaptativa de una especie puede estar definida por una amplia curva de tolerancia al gradiente ambiental (Lynch & Gabriel 1987, Parsons 1991). Los antecedentes indican que *M. laminarioides* presenta un amplio rango de tolerancia a la temperatura en individuos juveniles (Luxoro & Santelices 1989, Wiencke y Dieck 1990). Sin embargo, las discrepancias entre observaciones realizadas con individuos de diferente latitud parecen indicar la presencia de diferenciación clinal o ecotípica en respuesta al gradiente térmico. Esta diferenciación podría estar favorecida por la limitada capacidad de dispersión evidenciada en esta especie (Camus & Hoffmann 1989), la que dependiendo de la distancia puede promover diferentes grado de diferenciación genética (Faugeron 2002). En consecuencia, a nivel latitudinal, es posible predecir que:

1. Junto a una amplia curva de tolerancia individual, debieran observarse diferencias en la curva de tolerancia (i.e a la temperatura) entre individuos de distinto origen geográfico (Fig. 1-5).

A nivel local no existen antecedentes que permitan advertir la existencia de diferencias en la curva de tolerancia a la temperatura o la desecación entre individuos que ocupan alturas diferentes en la zona intermareal. Aunque en

algunas pocas especies de algas existen evidencias de diferenciación a pequeña escala (Innes 1988, Williams & Di Fiori 1996, Wright et al. 2000), en *M. laminarioides* los antecedentes indican que la diferenciación genética aparece a partir de 25-30 m (Faugeron et al. 2001), por lo cual no debiera esperarse la ocurrencia de diferenciación genética en la reducida escala espacial en la que se establece gradiente intermareal. Por consiguiente, es posible predecir:

2. Ausencia de diferencias en la curva de tolerancia entre individuos que ocupan diferente altura en el intermareal (Fig. 1-1a).

Sin embargo, las diferencias en sobrevivencia a la desecación y en la tasa de crecimiento a distintas temperaturas entre individuos juveniles de distintas fases reproductivas (Luxoro & Santelices 1989) y la dominancia diferencial de cada fase en distintos niveles del intermareal (Hannach & Santelices 1985), permite distinguir diferencias en la respuesta al gradiente intermareal entre individuos de distinta fase. Por lo cual es posible predecir:

3. La existencia de diferencias en la curva de tolerancia entre individuos de distinta fase reproductiva (gametofítica y esporofítica).

A modo de hipótesis general, se plantea que la respuesta adaptativa de *M. laminarioides* está determinada principalmente por una amplia curva de tolerancia individual con el que responde al gradiente ambiental en el que vive,

aunque también presenta diferencias en la amplitud de respuesta entre individuos de distinto origen geográfico y diferente fase reproductiva.

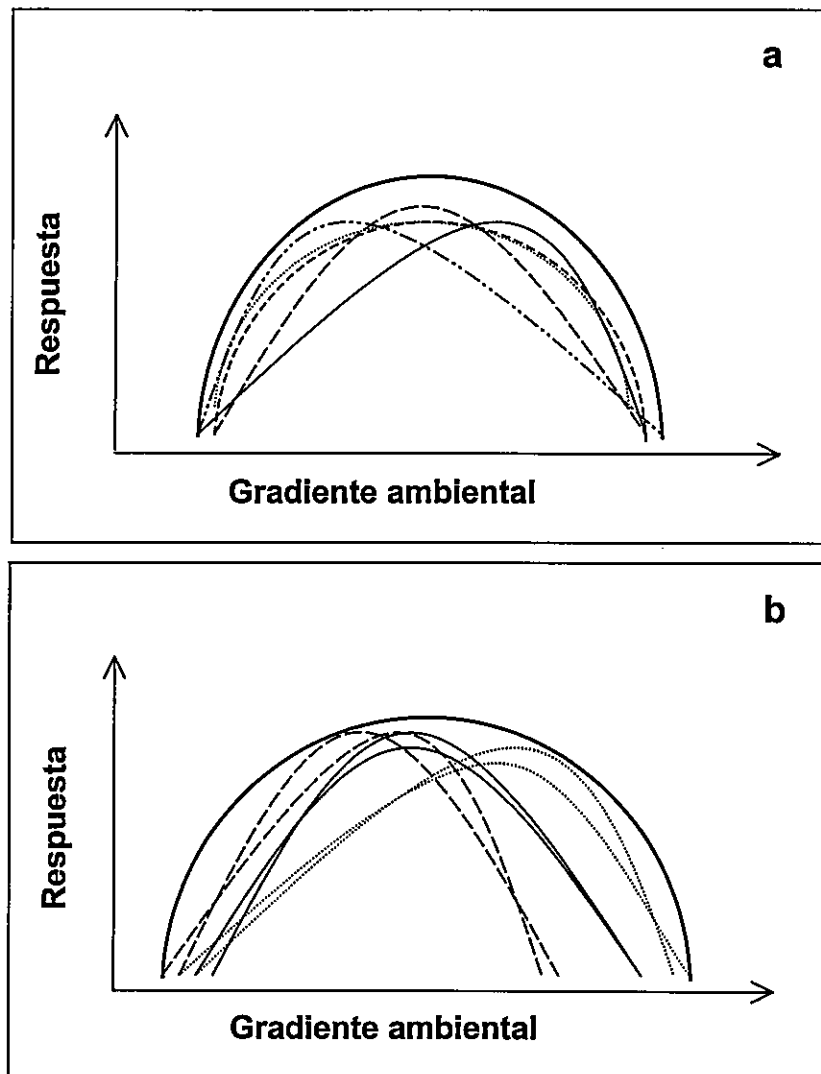


Fig. 1-5: Modelos de respuestas de una especie a la heterogeneidad ambiental en un contexto poblacional. a) Curvas de tolerancia de distintos genotipos que difieren en la magnitud (óptimo) de respuesta ante el gradiente ambiental; b) Curvas de tolerancia de distintos genotipos que difieren en la magnitud y/o la amplitud (límites) de tolerancia ante el gradiente ambiental.

Objetivos

En orden a comprender la estrategia adaptativa involucrada en la respuesta de *M. laminarioides* a la heterogeneidad ambiental en que se distribuye, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterizar algunos parámetros fotosintéticos en terreno, relacionando su comportamiento con la heterogeneidad ambiental en que se distribuye *M. laminarioides* en la zona intermareal (Capítulo II).
2. Describir la curva de respuesta de *M. laminarioides* a factores abióticos relevantes como la temperatura y desecación y, eventualmente, evidenciar la presencia de variabilidad en la capacidad de respuesta entre individuos de distinto origen espacial (geográfico e intermareal) y diferente fase reproductiva (Capítulo III).
3. Caracterizar la variabilidad genética y su patrón de estructuración en *M. laminarioides*, evaluando el grado de diferenciación genética entre poblaciones a nivel regional y local, la escala a la cual ocurre la extensión del flujo génico, y la distribución de la variabilidad genética en la zona intermareal (Capítulo IV).

CAPÍTULO II

Variabilidad de la respuesta fotosintética de

***M. laminarioides* en terreno**

INTRODUCCIÓN

A lo largo de su distribución, las macroalgas que habitan la zona intermareal están expuestas a fuertes gradientes ambientales locales y regionales (Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994). Allí, tanto el gradiente climático latitudinal como la variabilidad estacional y las fluctuaciones de marea, generan un ambiente altamente heterogéneo.

Numerosos trabajos han procurado dilucidar el efecto de estas condiciones estresantes sobre las algas intermareales, enfatizando los efectos de la temperatura (i.e. Davison 1991, Küber & Davison 1993, Peter & Breemam 1993, Bruhn & Gerard 1996), de la intensidad luminosa (Harbert & Waaland 1988, Franklin et al. 1992, Henley 1993), de la incorporación de nutrientes (Hurd & Dring 1990, Madsen & Maberly 1990, Einav et al. 1995), o de la desecación (Smith & Berry 1986, Smith et al. 1986, Brown 1987, Beer & Kautsky 1992).

A pesar de que estos estudios han contribuido con una detallada información sobre los efectos fisiológicos de algunos factores ambientales específicos, muchos de ellos han sido desarrollados en laboratorio, prestando escasa atención a la heterogeneidad ambiental y sus efectos fisiológicos sobre las algas a lo largo de su distribución (vertical y latitudinal).

Un cierto número de estudios de parámetros fisiológicos en terreno ha entregado información relevante con respecto a los efectos de la variabilidad ambiental sobre las plantas en la zona intermareal. En este contexto, la susceptibilidad de la fotosíntesis a diferentes factores ambientales (Davison 1991, Havaux 1992, Hanelt et al. 1993, Matta & Chapman 1995, Davison & Pearson 1996), hace que la evaluación de parámetros fotosintéticos constituya una aproximación especialmente pertinente para analizar los efectos que la variabilidad de las condiciones ambientales impone sobre las algas en terreno. La productividad de una planta está directamente relacionada con la tasa fotosintética, la cual a su vez está determinada por una compleja interacción entre el aparato fotosintético y el ambiente. Si bien las características del aparato fotosintético determinan la capacidad máxima de la fotosíntesis, la medida en que esta capacidad es alcanzada depende de los parámetros ambientales. Así por ejemplo, la variabilidad temporal y espacial de las condiciones de luminosidad demanda, en las macroalgas, un ajuste constante del proceso fotosintético, con el objeto de alcanzar una mayor capacidad y prevenir la fotoinhibición (reducción de la eficiencia fotosintética debida a alta intensidad luminosa; Herbert & Waaland 1988, Hanelt et al. 1993, Bruhn & Gerard 1996, Ensminger et al. 2000). Adicionalmente, otros factores como la temperatura pueden, dentro de un cierto rango, favorecer la eficiencia de la fotosíntesis, y en otros exacerbar los efectos fotoinhibitorios de la luz (Havaux 1992, Kübler & Davison 1993). Por otra parte, la desecación puede conferir cierta protección contra la fotoinhibición (Havaux 1992, Lu & Zhang 1999).

La tasa de fotosíntesis, evaluada a través de la producción de oxígeno, y la eficiencia fotosintética o cuántica máxima (ϕ_{Po}), estimada a través de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a*, son dos de los parámetros usados en estudios sobre los efectos de las condiciones ambientales sobre macroalgas (Herbert & et al. 1988, Hanelt et al. 1993, Ensminger et al. 2000 y 2001). La vulnerabilidad del sistema fotosintético frente a los distintos factores de estrés depende de la estabilidad del fotosistema II (PSII), y de los mecanismos de protección o reparación de este fotosistema (Havaux 1992, Strasser et al. 1995, Lu & Zhang 1999). En este contexto, el análisis de la señal de fluorescencia constituye una técnica de estudio poderosa y no invasiva, ya que provee información acerca de la estructura, conformación y función del aparato fotosintético y, especialmente, del PSII (Havaux 1992, Strasser et al. 1995, Cunningham et al. 1996, Lázár 1999).

En consecuencia, el objetivo del presente capítulo es evaluar la tasa de fotosíntesis y eficiencia fotosintética máxima en terreno y, con ello, relacionar su comportamiento con la variabilidad ambiental en que viven las algas en la zona intermareal.

En el contexto de este objetivo, *Mazzaella laminarioides* (Bory) Frederiq (Gigartinales, Rhodophyta), una especie intermareal, reúne atributos especialmente relevantes para la evaluación propuesta. Su extensa distribución

a lo largo de la costa de Chile (desde las islas subantárticas hasta Coquimbo) permite comparar los parámetros fisiológicos entre localidades. Por otra parte, en la zona intermareal, particularmente en la zona central de Chile, esta especie presenta extensas poblaciones que forman un cinturón permanente y monoespecífico a una altura media (Fig. 1-4; Hannach & Santelices 1985, Hannach & Waaland 1986, Santelices 1989, Hoffmann & Santelices 1998), lo que permite hacer comparaciones fisiológicas entre individuos ubicados a diferentes alturas en la zona intermareal.

Adicionalmente, las diferencias fisiológicas y ecológicas observadas en esta especie entre las fases reproductivas de vida libre (Hannach & Santelices 1985, Luxoro & Santelices 1989) permiten predecir un comportamiento diferencial de los parámetros fotosintéticos entre ambas fases reproductivas, por lo cual también resulta de interés distinguir entre ambas fases al comparar la fisiología fotosintética en terreno (Cap. 1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material y sitios de estudio

Fronadas de *M. laminarioides* fueron recolectadas en tres localidades: Parque Nacional Fray Jorge (30° 40' S); Maitencillo (32° 38' S); y Pucatrihue (40° 28' S) (Fig. 2-1). En el Parque Nacional Fray Jorge, localidad cercana al extremo norte de su distribución, *M. laminarioides* conforma una franja en el intermareal medio, muy semejante a lo descrito para la zona central (Santelices 1989). No obstante, la irregularidad del roquerío no permite observar plataformas muy extensas (Fig. 2-2a). El sitio de estudio en esta localidad estuvo conformado por un conjunto rocoso irregular con amplia franja intermareal de 1,5 a 2,5 m de ancho ocupada *M. laminarioides*, con sitios expuestos y semiexpuestos al oleaje. El límite superior de esta franja alcanzó a los 2,8 - 3,2 m de altura, en tanto que el límite inferior estuvo entre 1 y 1,5 m de altura sobre el nivel más bajo de mareas (0 m).

En la localidad de Maitencillo, ubicada al centro – norte de distribución de la especie, las poblaciones de *M. laminarioides* forman un amplio cinturón que ocupa el nivel medio de la zona intermareal (Fig. 2-2b). El sitio de estudio lo constituyó un conjunto rocoso continuo de 10 a 20 m de extensión lineal, y de exposición variable al oleaje. Dependiendo del grado de inclinación de las rocas las plantas se distribuyen en una franja intermareal de 1,5 a 3,6 m de extensión vertical, cuyo límite superior se situó entre 2,3 y 2,5 m de altura, en tanto que el

borde inferior se ubicó alrededor de 1 m de altura sobre el nivel más bajo de marea (0 m).

En Pucatrihue, situada en el centro – sur de la distribución de *M. laminarioides*, la especie cubre extensas superficies (Fig. 2-2c). Como sitio de estudio fue seleccionado un conjunto de formaciones rocosas donde se distinguió una franja variable, dependiendo de la pendiente, de 1 – 2,5 m de extensión vertical. Su límite superior se ubicó entre 1,8 y 3,4 m de altura sobre el nivel más bajo de mareas (0 m), en tanto que el inferior se situó entre 1,0 y 1,3 m sobre el nivel cero.

En cada localidad, y para los diferentes experimentos, se recolectaron dos grupos de plantas. El primero, constituido por plantas del intermareal alto, es decir, provenientes de una franja de 30 a 40 cm de ancho ubicada en el borde superior del cinturón intermareal de *M. laminarioides*; y el segundo, por plantas ubicadas en el nivel intermareal más bajo, definido por los últimos 30 a 40 cm de la franja (Fig. 2-3).

El procedimiento experimental seguido en este estudio evalúa la variabilidad de la tasa de fotosíntesis y la eficiencia fotosintética (a) en distintos momentos del día (seguimiento diario) y (b) en distintos períodos del año (seguimiento estacional) en distintas localidades.

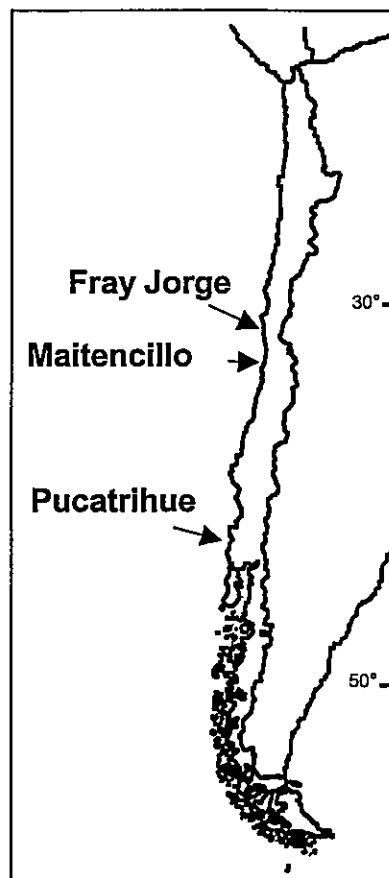


Figura 2-1: Ubicación geográfica de las localidades usadas para realizar el estudio.

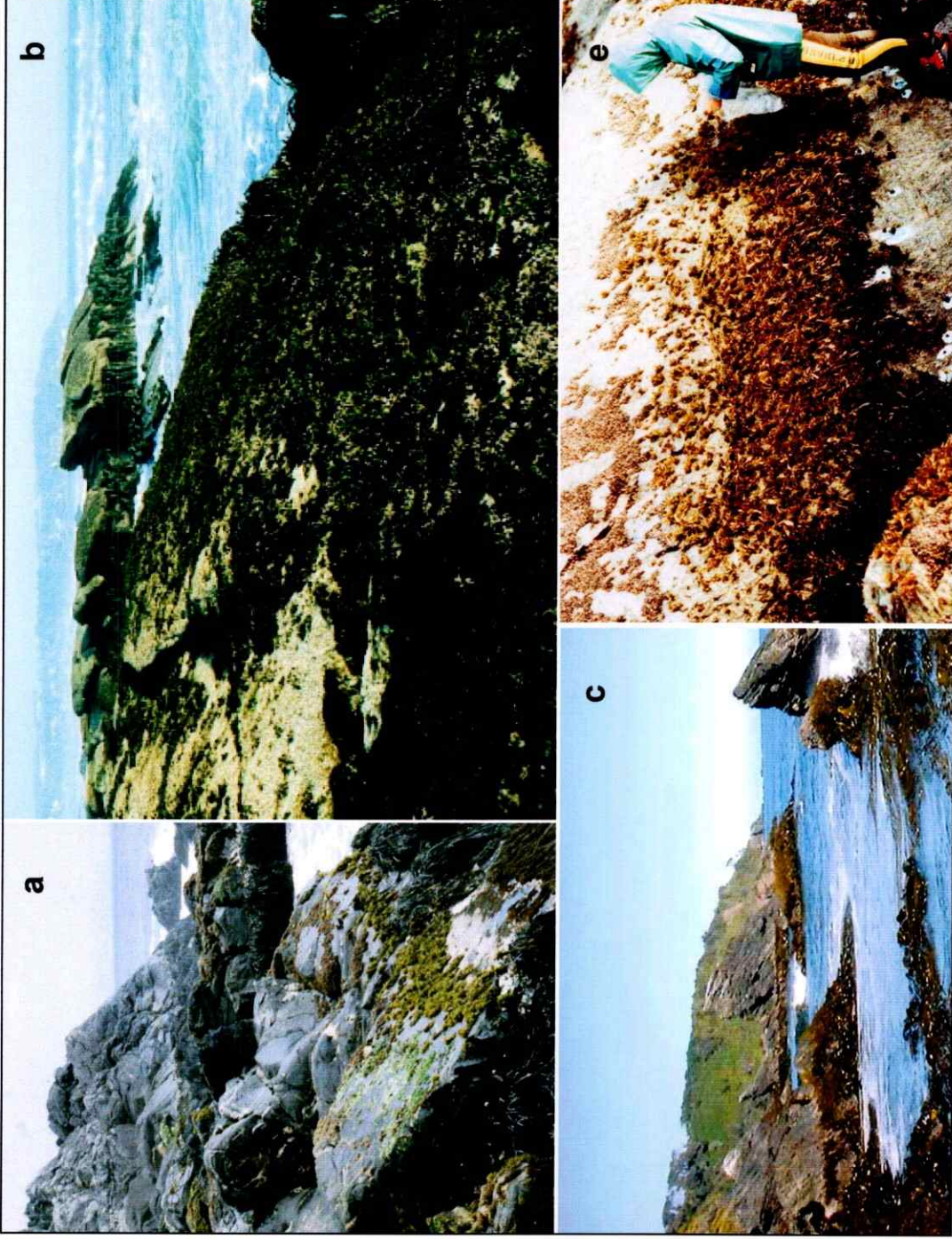


Fig. 2-2: Hábitat intermareal de *M. laminarioides* en las diferentes localidades. a) Fray Jorge; b) Maitencillo; c) Pucatrihue; e) Detalle parcial del sitio de estudio en Pucatrihue.



Figura 2-3: Cinturón intermareal de *M. laminarioides*. Las líneas blancas demarcan los límites de la distribución de esta especie en el intermareal. Las llaves (en rojo) indican la franja en el borde superior y la del borde inferior del cinturón de donde fueron colectadas, respectivamente, las plantas de la parte alta y baja del intermareal.

a) Seguimiento diario

Fotosíntesis. La evaluación de la tasa de fotosíntesis en distintas horas del día se llevó a cabo en Maitencillo durante la primavera (noviembre del 2000). En esta localidad se tomaron muestras de plantas de ambas alturas del intermareal y de ambas fases reproductivas (cistocárpicas (gametofitos femeninos) y tetrasporofíticas), identificando cada fase por la presencia de estructuras reproductivas. De cada planta se seleccionaron frondas libres de endófitos y estructuras reproductivas, las que fueron cepilladas y enjuagadas con agua de mar filtrada. Con la ayuda de un cilindro metálico se obtuvo, de la zona media distal de cada fronda, uno o más discos de tejido de aproximadamente 1 cm de diámetro. Estos discos fueron colocados en frascos de vidrio (25 mL) y mantenidos en agua de mar filtrada durante toda la noche, a temperatura ambiente.

Al amanecer del día siguiente, los frascos con discos fueron expuestos a las condiciones ambientales, a 3 – 5 m de donde fueron colectadas las plantas. Para ello, los frascos destapados fueron colocados en bandejas, de aproximadamente 8 cm de profundidad, conteniendo agua de mar. El agua en la bandeja fue cambiada cada 10 o 15 min (o con mayor frecuencia cuando fue necesario) a fin de mantener la temperatura relativamente constante ($15 \pm 2^\circ \text{C}$).

A partir de las 9:00 y hasta las 19:00 h se evaluó la tasa de fotosíntesis de los discos a intervalos de 2 h. En cada oportunidad, se tomaron dos discos

de 5 plantas de ambas alturas en el intermareal, transfiriendo cada par a un nuevo frasco. Cada uno de éstos fue llenado con agua de mar microfiltrada (0,2 μm) y herméticamente cerrado, cuidando de no dejar burbujas en su interior. Para tres frascos controles, sin muestras en su interior, se siguió el mismo procedimiento de llenado. Luego, cada frasco fue expuesto al ambiente en una nueva bandeja con agua de mar fresca por 30 - 35 min. La concentración de O_2 disuelta en el agua al inicio y al final de este período de exposición fue registrada mediante un oxigenómetro (Oxical-S WTW EO-196). La tasa de fotosíntesis fue determinada a través de la diferencia en la concentración de O_2 entre el inicio y final de la exposición a las condiciones ambientales.

Fluorescencia. La emisión de fluorescencia fue evaluada en la localidad de Maitencillo y procuró evidenciar el efecto de los cambios de marea sobre el aparato fotosintético en plantas ubicadas a distinta altura en la zona intermareal. Por consiguiente, el registro de la fluorescencia se realizó en muestras recolectadas en al menos tres momentos diferentes del día: durante marea alta, en marea baja y cuando la marea se encuentra subiendo. En cada ocasión se recolectaron 10 plantas de ambas alturas del intermareal, sin distinguir entre fases reproductivas. Inmediatamente después, se tomaron muestras de tejido de aproximadamente 1 cm de diámetro, de la zona media – distal de frondas estériles y libres de epífitos. Estas muestras fueron dispuestas individualmente en pequeñas bolsas plásticas (de 10x15 cm) sin agua, a modo

de conservar el nivel de desecación alcanzado al momento de ser colectadas. Las bolsas con muestras de tejido fueron mantenidas en oscuridad y a una temperatura de $8 \pm 2^\circ \text{C}$ por 30 a 40 min. Luego de este período se midió la emisión de fluorescencia de cada muestra usando un fluorímetro portátil (Plant Efficiency Analyser PEA, Hansatech Ltda., King's Lynn, Norfolk, Inglaterra). Este monitoreo de la emisión de fluorescencia de distintas horas del día se realizó en la misma localidad en tres épocas del año: en abril y noviembre del 2000, y en enero del 2001. En esta última evaluación las muestras de plantas del nivel alto del intermareal fueron colocadas en bolsas plásticas vacías y en bolsas con agua de mar filtrada, con el objeto de registrar la fluorescencia en plantas tanto con el nivel de desecación alcanzado al momento de la colecta como en muestras rehidratadas.

Durante las observaciones realizadas en verano (enero del 2001) se evaluaron distintas variables que son resumidas en la Tabla 2-1. A lo largo del día se registró la densidad de flujo fotónico (usando un fotómetro Li-cor Mod. Li-189), la temperatura y la humedad relativa del aire (usando un higrómetro Delta OHM HB8501H). La temperatura en la franja del intermareal ocupado por *M. laminarioides* también fue registrada: a una altura de 3 - 5 cm de la superficie de la roca descubierta, directamente en contacto con ella, y entre las plantas de ambas alturas en el intermareal. El nivel de desecación alcanzado por las plantas de

Tabla 2-1: Variables ambientales medidas en la localidad de Maitencillo. Los valores registrados corresponden a los de un día despejado en el mes de Enero, donde la altura de la marea más baja alcanzó a los 0,42 m sobre el nivel 0 m de marea, a las 14:40 hr. Las variables t_a° y $\%HR_a$ corresponden a la temperatura ($^\circ\text{C}$) y la humedad relativa del aire (%), medidas en el sitio de estudio; t_{sr}° , $\%HR_{sr}$ la temperatura y la humedad relativa obtenida entre 2 a 5 cm sobre la roca en zonas más altas (A) y más bajas (B) de la franja intermareal ocupado por *M. laminarioides*, en áreas carentes de plantas; t_r° temperatura registrada en contacto con la roca; t_p° corresponde a la temperatura medida entre las frondas de las plantas de distintas alturas en el intermareal; $\%HR_p$ humedad relativa medida de las frondas de distintas plantas de diferentes alturas en el intermareal.

<u>Hora</u>	Ambiental			Sobre Roca		Roca	En plantas	
	t_a°	$\%HR_a$	Altura	t_{sr}°	$\%HR_{sr}$	t_r°	t_p°	$\%HR_p$
12:30	18,5	83	A	20 – 23	-	-	20 – 22	69,5 ± 2,8
			B	18 – 19	-	-	18 – 18	73,7 ± 0,6
13:30	19,5	83	A	20 – 21	72 – 74	27 – 28	21 – 25	74,4 ± 2,0
			B	19 – 23	85 – 86	21 – 23	19 – 23	74,3 ± 1,0
15:30	20,5	88	A	25 – 27	55 – 72	31 – 33	31 – 33	44,5 ± 17
			B	24 – 29	55 – 77	26 – 28	23 – 27	73,8 ± 4,3
17:30	20,0	80	A	26 – 30	45 – 48	33 – 34	27 – 30	32,7 ± 11
			B	21 – 23	75 – 77	20 – 22	21 – 21	74,9 ± 1,8

ambos extremos del intermareal fue estimado a través de un protímetro (Protimeter plc, Digital Mini). Este instrumento registra la humedad relativa del tejido, entregando valores de entre el 70% y 75% para frondas completamente hidratadas y de 30 y 35% para frondas que han perdido entre 70% y 75% de su contenido de agua. En este rango, bajo condiciones de laboratorio, la pérdida de agua desde las frondas es una función lineal del tiempo ($y = 0,46x + 91,9$; $r^2 = 0,94$).

b) Seguimiento estacional

Fotosíntesis. La evaluación de la tasa de fotosíntesis procuró comparar el comportamiento fotosintético entre dos localidades y en distintas épocas del año. En Maitencillo y Pucatrihue se realizó durante el invierno (agosto de 1999), el verano y el otoño (enero y abril - mayo del 2000). En Fray Jorge y Pucatrihue la evaluación se llevó a cabo durante el invierno y la primavera (julio y noviembre del 2000). En cada localidad, para cada evaluación, se colectaron 10 plantas de ambas alturas en la zona intermareal y fases reproductivas. La selección de frondas y obtención de muestras de tejido se realizó de la forma ya indicada en la sección anterior. Sin embargo, la exposición a condiciones ambientales y la evaluación de la tasa de fotosíntesis se realizó sólo en un momento del día, procurando evitar exposiciones a densidades de flujo fotónico por sobre los $1500 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$; radiaciones en las que las plantas se podrían evidenciar síntomas de fotoinhibición.

Fluorescencia. El monitoreo de la emisión de fluorescencia en este caso, procuró evaluar de manera comparativa el comportamiento del aparato fotosintético entre distintas localidades y períodos del año. Este monitoreo se realizó en forma paralela a la evaluación anterior, incluyendo observaciones adicionales en primavera (octubre – noviembre de 1999) en Maitencillo y Pucatrihue. Como en la sección anterior para cada evaluación se colectaron 10 plantas de ambas alturas en el intermareal, y fases reproductivas. Las muestras

de tejido obtenidas de la forma ya indicada fueron transportadas al laboratorio, debidamente individualizadas en bolsas plásticas con agua de mar micro filtrada, manteniéndolas a $8 \pm 2^{\circ}$ C. Veinticuatro horas después de la colecta, y luego de un previo período de oscuridad de 30 a 40 min en el laboratorio, se registró la emisión de fluorescencia.

El análisis estadístico de los resultados incluyó un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas (ANOVA, Statistica, StatSoft, Inc. 1998), para evaluar las observaciones de la eficiencia fotosintética a lo largo del tiempo. Dado que las condiciones de determinación de la tasa fotosintética difieren entre localidades y épocas del año la evaluación estadística se realizó para cada determinación por separado. Para evaluar la significancia de variables en cada observación independientemente se utilizó un Análisis de Varianza de Dos Vías (ANOVA, Statistica, StatSoft, Inc. 1998), considerando la fase reproductiva y la altura en la zona intermareal como variables fijas. La detección de diferencias *a posteriori* se realizó a través del test de Tuckey HSD.

RESULTADOS

a) Seguimiento diario

La tasa fotosintética a lo largo del día, evaluada en el mes de noviembre (Fig. 2-1), mostró un incremento progresivo desde las primeras horas de la mañana, hasta alcanzar un máximo de alrededor de $25 \mu\text{moles O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ cerca del medio día. Esta tasa de fotosíntesis promedio más alta se mantuvo constante por alrededor de 5 horas, coincidiendo con la densidad de flujo fotónico en torno a los $2000 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para luego declinar a partir de las 17 horas. La tasa de respiración promedio, evaluada en las mismas muestras, alcanzó valores de $14,8 \pm 3,3 \mu\text{moles O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, indicando que las plantas exhiben una alta productividad neta ya desde muy temprano, a intensidades de luz de alrededor de $400 - 500 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

La comparación de la tasa fotosintética entre plantas de distinta fase no indicó diferencias significativas a lo largo del día (Fig. 2-5a). Por el contrario, la comparación entre las plantas de distintos niveles en la zona intermareal mostró diferencias significativas ($F= 11,42$; $p= 0,005$; $g.l.= 1$), principalmente durante la mañana. En este caso, las plantas de la parte baja del intermareal mostraron una tasa de fotosíntesis mayor durante las primeras horas del día, incrementando progresivamente hasta alcanzar un máximo hacia fines de la tarde. La tasa de fotosíntesis de las plantas del intermareal alto, en cambio,

muestra valores más bajos durante la mañana y alcanzan el máximo alrededor del medio día (Fig. 2-5b).

Los valores de eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{po}), estimada a partir de la emisión de fluorescencia, mostraron un comportamiento diferencial entre las plantas situadas a ambos extremos del gradiente intermareal al ser evaluadas a lo largo del día, y en distintos momentos del año. (Fig. 2-6). Las mediciones hechas en otoño (Abril en la Fig. 2-6) exhibieron, a lo largo del día, altos valores de ϕ_{po} para ambos grupos de plantas, sin diferencias significativas entre ellas ($F= 2,5$; $p= 0,16$; g.l.= 1). En ambos casos la ϕ_{po} exhibió su menor valor al mediodía, experimentando un significativo ($F= 18,1$; $p< 0,001$; g.l.= 2) incremento hacia la tarde. Durante la primavera (Noviembre en la Fig. 2-6) las diferencias entre ambos grupos de plantas son claras y significativas ($F= 20,2$; $p= 0,01$; g.l.= 1); sólo las plantas del intermareal bajo alcanzan valores altos de eficiencia fotosintética. A pesar de que las plantas de ambos grupos alcanzan valores mínimos hacia mediados de la tarde no se observaron diferencias significativas a lo largo del día ($F= 1,3$; $p= 0,33$; g.l.= 5). Durante el verano (Enero en la Fig. 2-6) los resultados indican que, si bien la ϕ_{po} es reducida en ambos grupos de plantas, las diferencias entre ellas siguen siendo significativas ($F= 135,5$; $p< 0,001$; g.l.= 1). En esta estación, los valores de la ϕ_{po} son reducidos significativamente ($F= 4,5$; $p= 0,014$; g.l.= 3), hacia mediados de la tarde (15 h) en plantas del intermareal bajo y hacia finales de la tarde en plantas

del intermareal alto. Sólo las plantas del intermareal bajo recuperan los valores de la ϕ_{po} durante la tarde.

En verano (Enero), la relación entre las variables ambientales y la ϕ_{po} depende de la altura en que se encuentran las plantas en el intermareal (Fig. 2-7). La ϕ_{po} en plantas del intermareal alto se reduce progresivamente desde el medio día, coincidiendo con el aumento de los niveles de desecación. Sus valores más bajos los alcanza hacia finales de la tarde cuando la humedad relativa del tejido es cercana al 30% (Fig. 2-7a). Estas mismas muestras rehidratadas exhiben un comportamiento semejante, reduciendo también la ϕ_{po} desde el mediodía, pero alcanzando su menor valor a mediados de la tarde, recuperándose hacia el final de ésta. Este comportamiento muestra una relación inversa con la intensidad luminosa y la temperatura, que aumentan desde el medio día y declinan hacia finales de la tarde (Fig. 2-7c y e). En las plantas procedentes del intermareal bajo la ϕ_{po} no es afectada por la desecación (Fig. 2-7b). Sin embargo, la ϕ_{po} se reduce progresivamente a partir del medio día, alcanza un mínimo hacia mediados de la tarde, recuperándose hacia el final de ésta. También en este caso la variación de la ϕ_{po} a lo largo del día se relaciona de manera inversa con la intensidad luminosa y la temperatura (Fig. 2-7d y f).

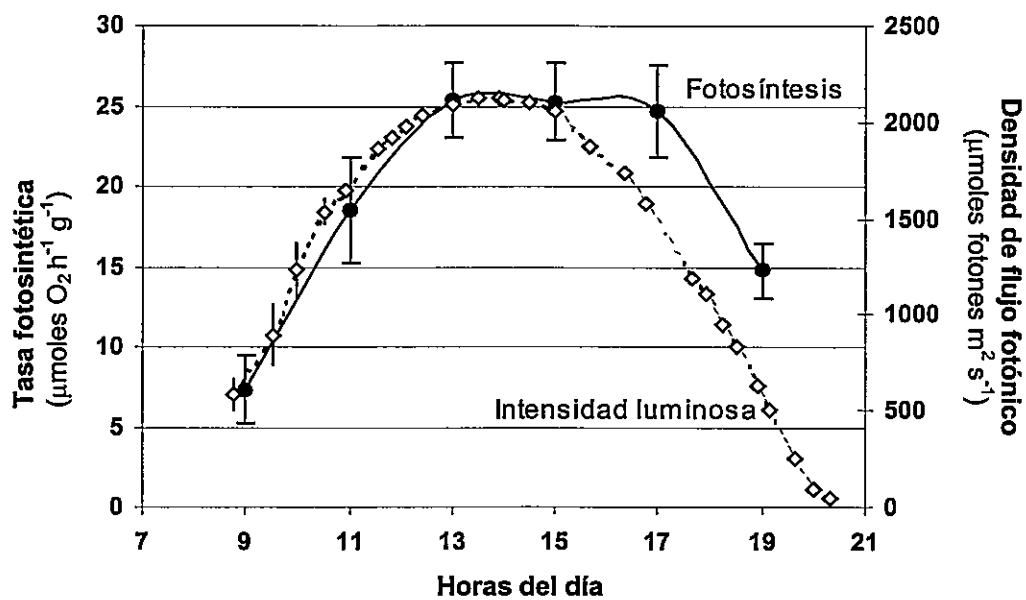


Figura 2-4: Tasa fotosintética en muestras de *M. laminarioides* e intensidad luminosa medidas en primavera (noviembre), en Maitencillo. (Promedio ± 2 EE).

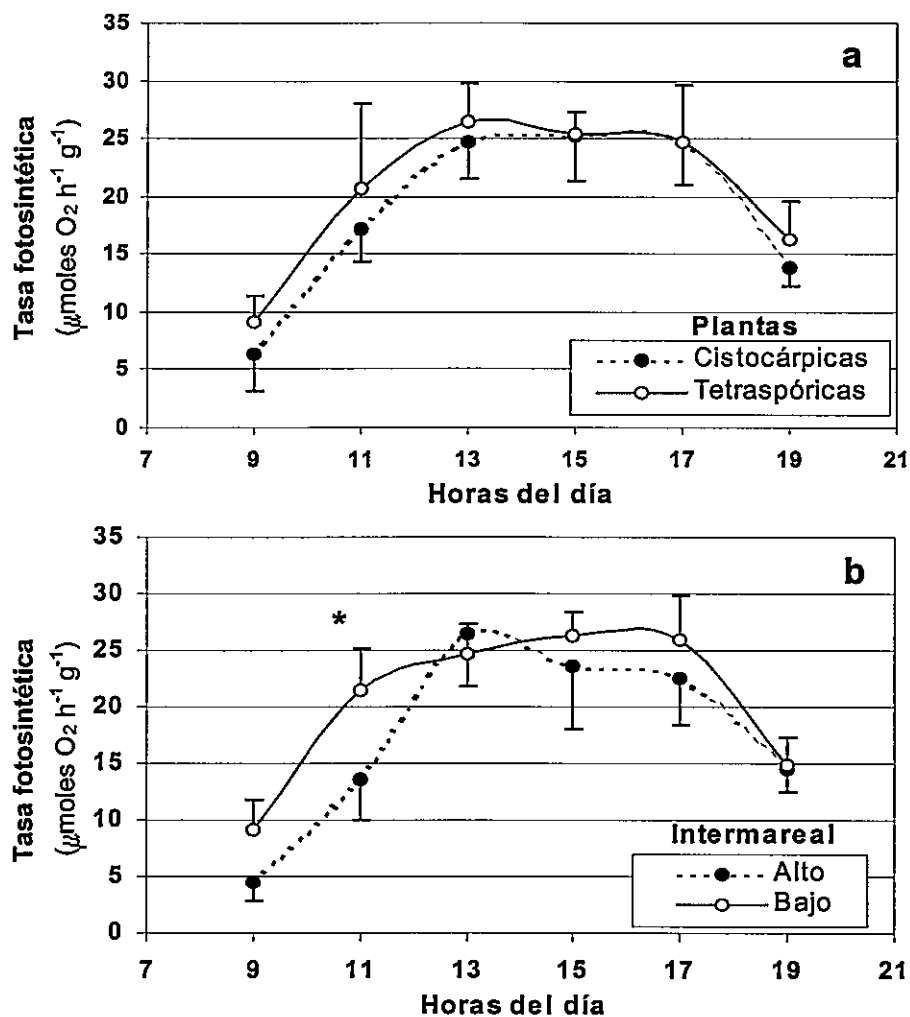


Figura 2-5: Tasa fotosintética en plantas de distintas fase reproductiva (a) y en plantas de distinta altura en el intermareal (b) medidas en primavera (noviembre), en Maitencillo. El asterisco (*) indica diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

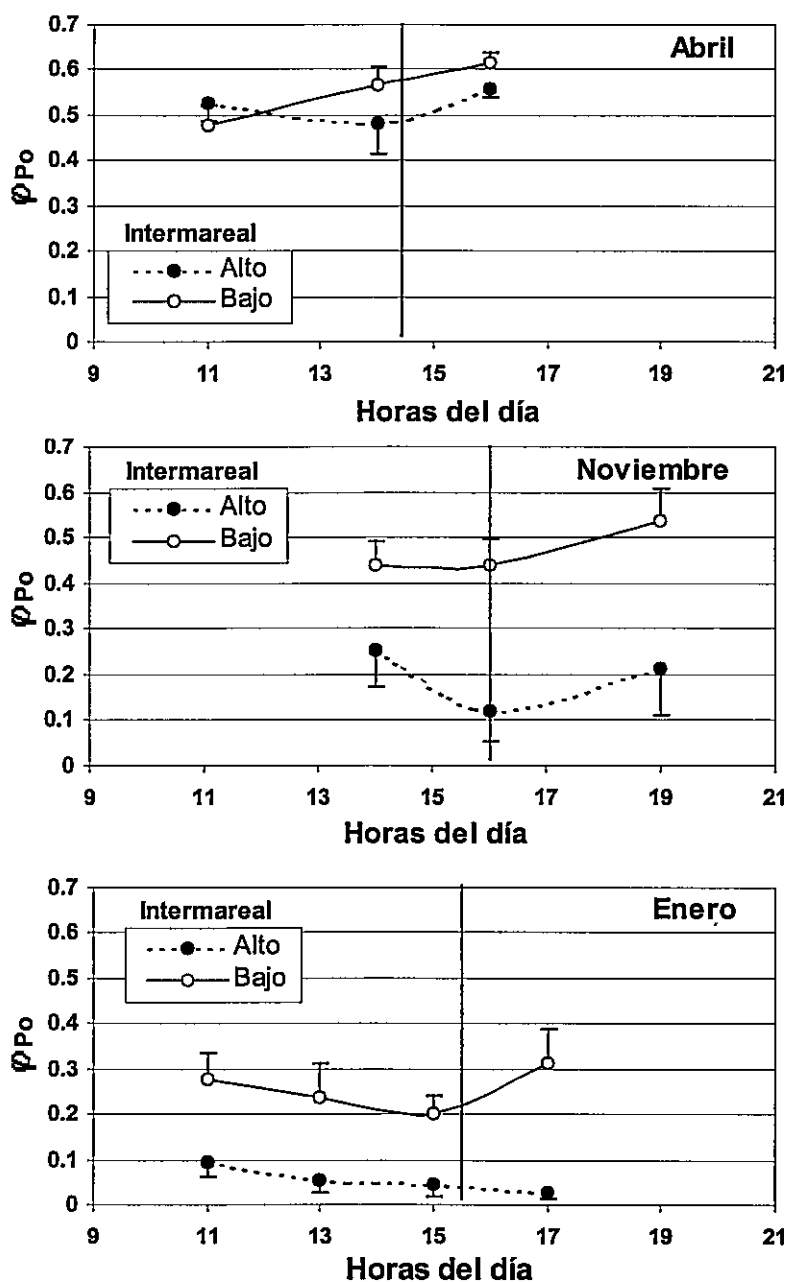


Figura 2-6: Eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{Po}) medida en plantas de diferente altura en el intermareal en abril, noviembre y enero, en la localidad de Maitencillo. La línea vertical punteada corresponde el momento de más baja marea durante el día de evaluación. (Promedio ± 2 EE).

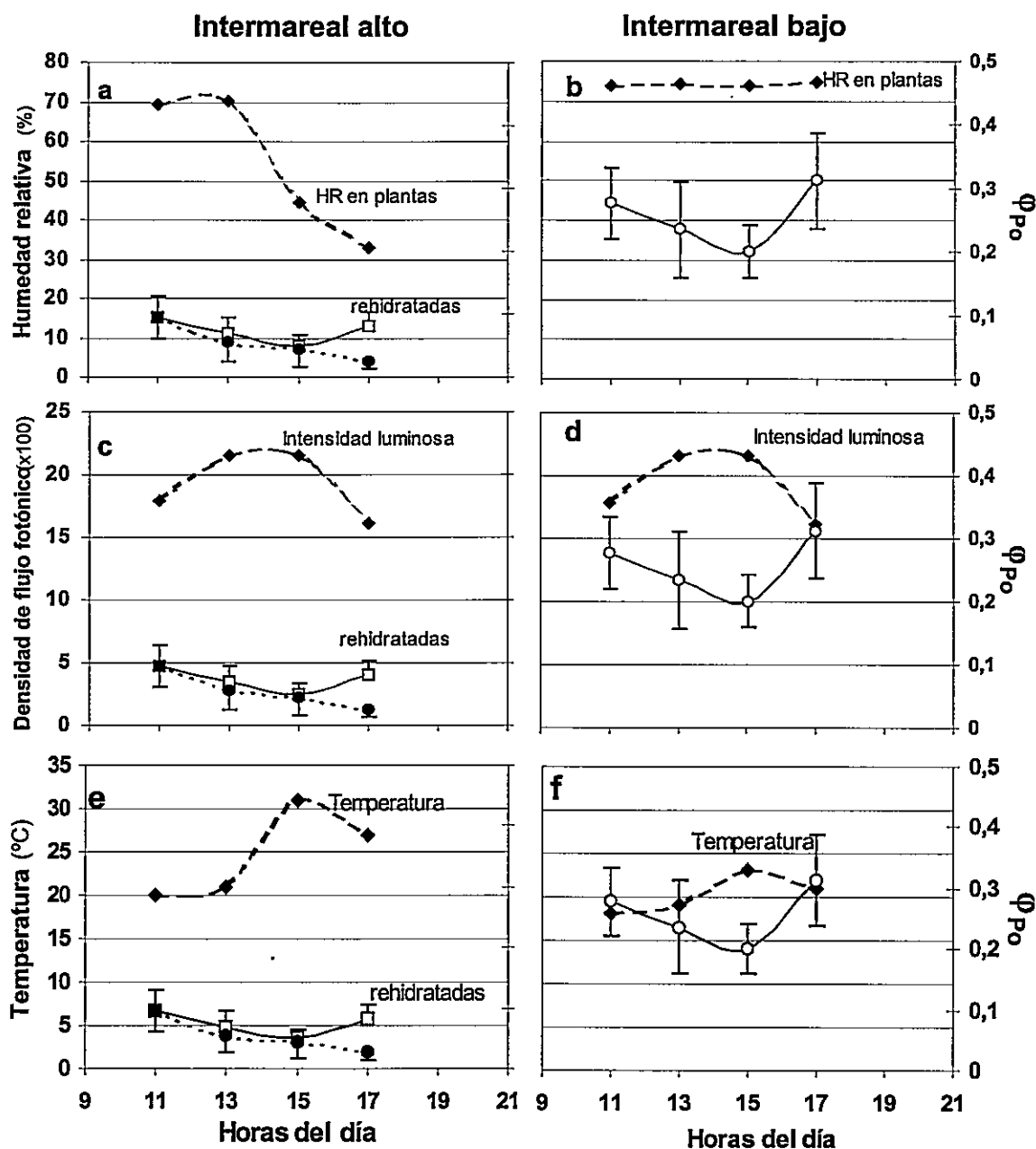


Figura 2-7: Comparación del comportamiento de la eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{po}) de plantas de la parte alta y baja del intermareal en primavera (noviembre), y la humedad relativa del tejido de las plantas, la intensidad luminosa y la temperatura medida entre las plantas a ambas alturas del intermareal. Para plantas del intermareal alto se grafica la ϕ_{po} obtenida con muestras rehidratadas (cuadrados vacíos) y no rehidratadas (círculos llenos) después de la colecta. (Promedio \pm 2 EE).

b) Seguimiento estacional

El comportamiento de la tasa de fotosíntesis y la eficiencia fotosintética en cada localidad y en distintas épocas del año evidenciaron diferencias significativas tanto entre plantas de ambas fases reproductivas como entre plantas de diferentes alturas en el intermareal (Fig. 2-8; Tabla 2-2). En la localidad de Maitencillo la comparación de la tasa fotosintética entre plantas de distinta fase reproductiva mostró diferencias significativas en los meses evaluados (Tabla 2-2). En cada caso la tasa de fotosíntesis de las plantas cistocárpicas fue menor que en las tetrasporofíticas (Fig. 2-8). La comparación hecha entre plantas de diferente origen intermareal también exhibió diferencias significativas, aunque sólo en dos de los tres meses evaluados (Tabla 2-2); en los meses de enero (verano) y abril (otoño) la tasa fotosintética de las plantas del intermareal alto fue menor que la exhibida por plantas del nivel intermareal bajo (Fig. 2-8). En esta misma localidad, la ϕ_{po} no mostró diferencias entre las plantas de diferentes fases reproductivas, pero sí evidenció diferencias significativas entre plantas de diferentes alturas en el intermareal. En este caso, en todos los meses evaluados la ϕ_{po} fue menor en plantas de la parte alta del intermareal (Fig. 2-8; Tabla 2-2).

En Pucatrihue la tasa fotosintética también evidenció diferencias significativas entre plantas de diferentes fases reproductivas (Fig. 2-8; Tabla 2-2), aunque el sentido de estas diferencias no fue siempre el mismo. En el mes

de agosto las plantas cistocárpicas presentaron una tasa fotosintética significativamente mayor que las tetrasporóica, en tanto que en los meses de enero y mayo estas últimas mostraron una tasa significativamente mayor (Fig. 2-8; Tabla 2-2). Entre las plantas de distinta altura en el Intermareal, la tasa de fotosíntesis mostró diferencias significativas sólo en el mes de enero, siendo menor en plantas procedentes de la parte alta del intermareal (Fig. 2-8; Tabla 2-2). Por su parte, a través de la ϕ_{po} se evidenciaron diferencias significativas entre plantas de distintas fases reproductivas en tres de los cinco meses evaluados (Tabla 2-2). En cada uno de estos meses (agosto, mayo y julio) las plantas cistocárpicas exhibieron una menor eficiencia fotosintética que en las plantas tetraspóricas (Fig. 2-8). Entre las plantas de diferente altura en la zona intermareal la ϕ_{po} exhibió diferencias significativas en tres de los cinco meses evaluados (agosto, noviembre y enero, en Fig. 2-8; Tabla 2-2), y en todos estos casos la ϕ_{po} en plantas de la parte alta del cinturón intermareal fue más baja que las del extremo inferior.

Las observaciones realizadas en Fray Jorge evidenciaron sólo diferencias significativas en la tasa fotosintética entre plantas de diferente fase reproductiva durante el invierno (agosto en la Fig. 2-9; Tabla 2-3), donde las plantas cistocárpicas mostraron una mayor productividad que las tetrasporofíticas. La evaluación de la ϕ_{po} no evidenció diferencias entre plantas de diferente fase ni altura en el intermareal. En este mismo período, en

Pucatrihue la tasa de fotosíntesis mostró diferencias significativas entre plantas de distinta fase y de distinto origen intermareal en los meses de julio y noviembre respectivamente; en cada caso las plantas cistocárpicas y del intermareal alto presentaron los menores valores (Fig. 2-9; Tabla 2-3). Este mismo patrón fue evidenciado a través de las observaciones de la ϕ_{po} ; también en este caso las plantas cistocárpicas y las del intermareal alto exhibieron valores significativamente menores (Fig. 2-9; Tabla 2-3).

El análisis comparativo de los valores de ϕ_{po} entre Maitencillo y Pucatrihue, considerando las diferentes mediciones temporales como evaluaciones estacionales (Fig. 2-10), mostró diferencias significativas entre ambas poblaciones ($F= 35,3$; $p= 0,027$; g.l.= 1). El análisis también indicó diferencias significativas al nivel de la interacción entre localidad y tiempo (estación) de la observación ($F= 4,2$; $p= 0,041$; g.l.= 5). En este contexto, el análisis a posteriori indicó que las diferencia entre localidades se debe principalmente a los resultados de invierno (julio del 2000), donde los valores de Pucatrihue son significativamente mayores que los de Maitencillo (Fig. 2-10). Un análisis semejante realizado entre Fray Jorge y Pucatrihue, para los dos meses evaluados, también reveló diferencias significativas entre ambas localidades ($F= 150,5$; $p< 0,001$; g.l.= 1); en este caso los valores de junio en Pucatrihue fueron mayores que los observados en agosto en Fray Jorge, y menores que los de esta localidad en noviembre (Fig. 2-9).

El análisis del comportamiento de la ϕ_{po} a lo largo de un curso anual mostró diferencias significativas entre las observaciones estacionales en Maitencillo y Pucatrihue (Tabla 2-4). En ambas localidades los valores más bajos se observaron en los meses de primavera – verano (noviembre – enero), en tanto que los valores más altos ocurren en Maitencillo durante el otoño (abril) y en Pucatrihue durante invierno (Julio) (Fig. 2-10). Entre las fases reproductivas no se evidenciaron diferencias significativas en ninguna de las dos localidades (Fig. 2-11a y c, Tabla 2-4), salvo en su interacción con el tiempo o estación, indicando diferencias puntuales como las indicadas anteriormente (Tabla 2-2). Por el contrario, en ambas localidades se observaron diferencias significativas entre plantas de distinta altura en el intermareal (Fig. 2-11b y d, Tabla 2-4). En Maitencillo la ϕ_{po} de las plantas de ambos extremos del intermareal varía estacionalmente a lo largo de todo el período estudiado, observándose siempre los valores más bajos entre las plantas del intermareal alto (Fig. 2-11b). En Pucatrihue sólo las plantas de la parte alta del intermareal mostraron cambios estacionales; en esta variación los valores de ϕ_{po} son iguales (en mayo y julio) o menores (en agosto, octubre, enero y noviembre) que los observados en plantas del intermareal bajo, excepto en otoño e invierno (Fig. 2-11d).

Tabla 2-2: Valores de *F* obtenidos del análisis de varianza de dos vías realizado para la tasa de fotosíntesis y la eficiencia fotosintética (ϕ_{po}) evaluadas en diferentes momentos del año en Maitencillo y Pucatrihue. El análisis evalúa los efectos de la fase reproductiva (*F*) y la altura en el intermareal (*A*). *: $p < 0,5$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$.

Maitencillo	(g.l.)	Tasa de fotosíntesis						Eficiencia fotosintética (ϕ_{po})							
		Agosto '99		Enero '00		Abril / Mayo '00		Agosto '99		Nov./Oct. '99		Abril/Mayo '00		Julio '00	
		<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>F</i>
Fase (F)	(1)	7,2 *	20,1 ***	12,1 **	0,4	0,8	1,4	0,3	0,9						
Altura (A)	(1)	0,1	31,4 ***	14,4 **	9,4 **	24,7 ***	5,0 *	18,0 ***	20,9 ***						
F * A	(1)	2,7	0,2	6,7 *	0,8	3,8	1,4	0,1	0,4						
Pucatrihue															
Fase (F)	(1)	22,3 ***	78,5 ***	5,9 *	20,4 ***	0,2	1,0	9,1 **	13,6 ***						
Altura (A)	(1)	2,8	72,4 ***	0,2	12,8 ***	20,8 ***	83,9 ***	0,3	0,7						
F * A	(1)	6,6 *	1,6	3,8	0,1	0,1	1,3	0,9	7,1 *						

Tabla 2-3: Valores de F obtenidos del análisis de varianza de dos vías realizado para la tasa de fotosíntesis y la eficiencia fotosintética (ϕ_{po}) evaluadas en diferentes momentos del año, en Fray Jorge y Pucatrihue. . El análisis evalúa los efectos de la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,5$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$.

		Tasa de fotosíntesis		Eficiencia fotosintética (ϕ_{po})	
		Agosto/Julio '00	Nov. '00	Agosto/Julio '00	Nov. '00
Fracción	(g.l.)	F	F	F	F
Fray Jorge					
Fase (F)	(1)	1,2 **	0,7	0,1	1,1
Altura (A)	(1)	0,4	0,8	1,7	2,8
F * A	(1)	3,2	0,2	0,5	2,1
Pucatrihue					
Fase (F)	(1)	30,3 ***	0,7	13,6 ***	0,1
Altura (A)	(1)	2,8	78,2 ***	0,7	59,0 ***
F * A	(1)	8,9 **	25,1 ***	7,1 *	0,1

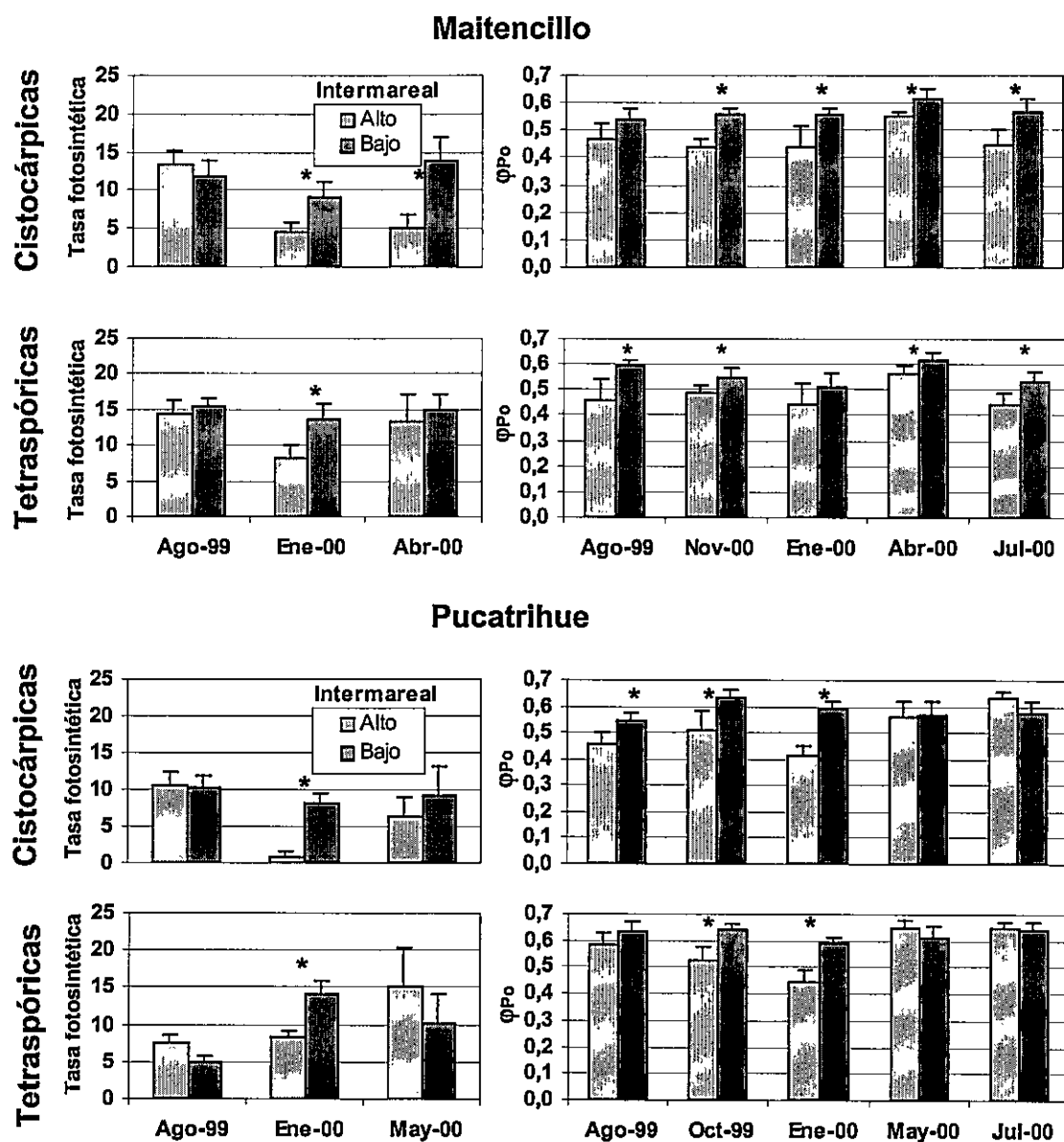


Figura 2-8: Tasa fotosintética ($\mu\text{moles O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) y eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{Po}) evaluada en plantas de diferente altura en el intermareal y fases reproductiva, en diferentes momentos del año. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

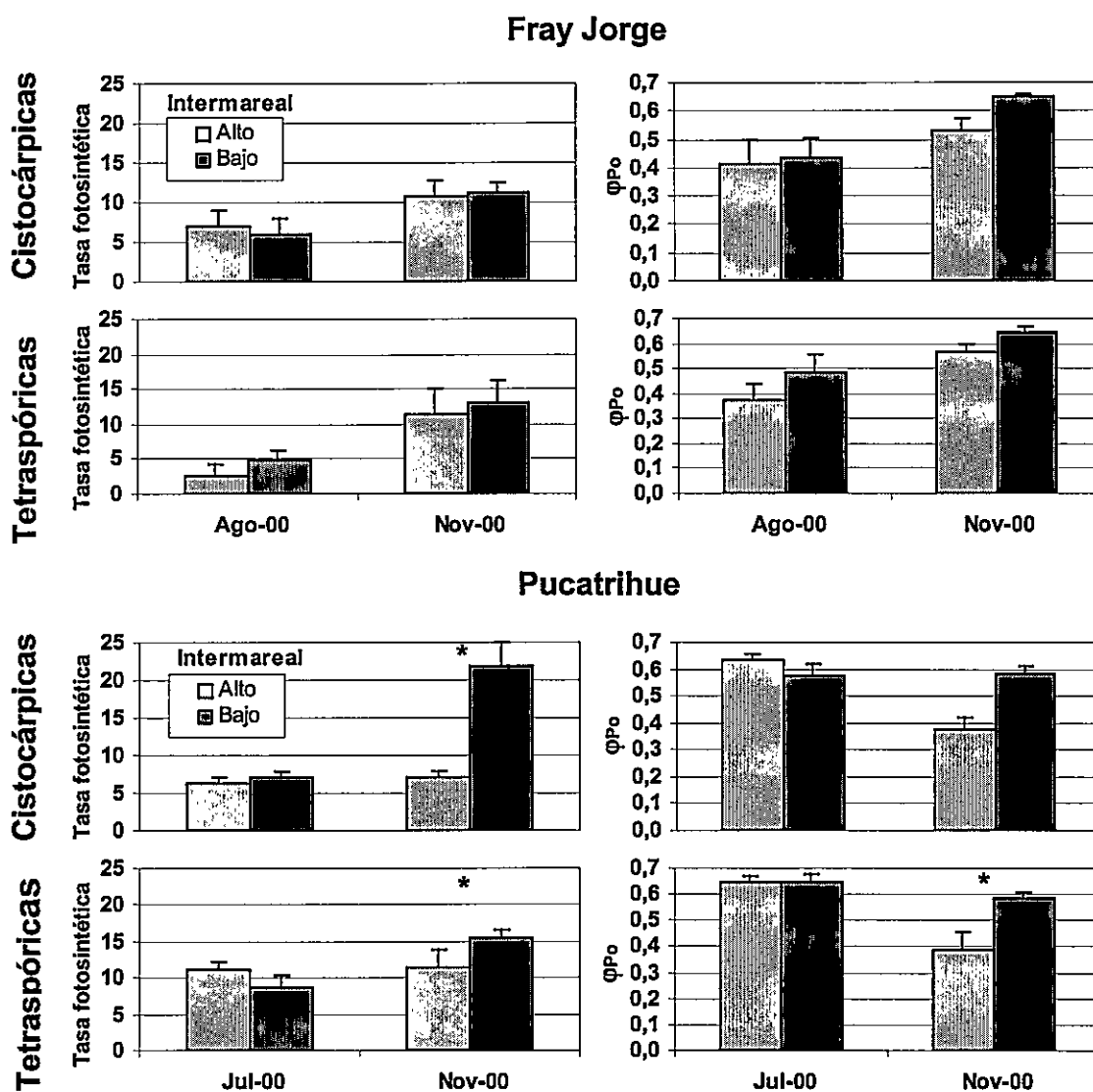


Figura 2-9: Tasa fotosintética ($\mu\text{moles O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) y eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{Po}) evaluada en plantas de diferentes fases reproductiva y altura en el intermareal, en diferentes momentos del año. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

Tabla 2-4: Valores de F obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) realizado para la eficiencia fotosintética (ϕ_{po}) evaluada estacionalmente en Maitencillo y Pucatríhue. El análisis evalúa los efectos de las diferencias a lo largo del tiempo (T), la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,5$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$.

Factores	(g.l.)	Eficiencia fotosintética (ϕ_{po})	
		Maitencillo	Pucatríhue
		F	F
Tiempo (T)	(5)	9,9 ***	8,0 **
Fase (F)	(1)	0,0	3,7
Altura (A)	(1)	20,1 *	375,6 **
T x F	(5)	3,5 *	4,5 *
T x A	(5)	0,5	4,3 *
F x A	(1)	0,6	0,0
T x F x A	(5)	1,0	1,2

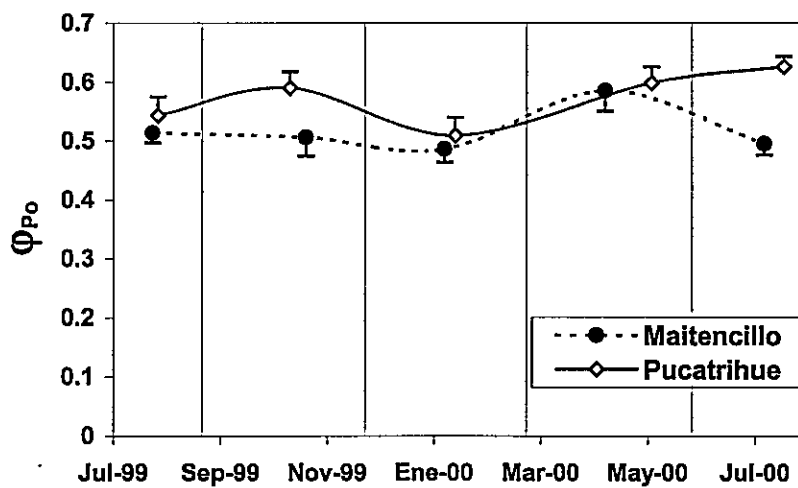


Figura 2-10: Eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{Po}) evaluada durante el año.
(Promedio ± 2 EE)

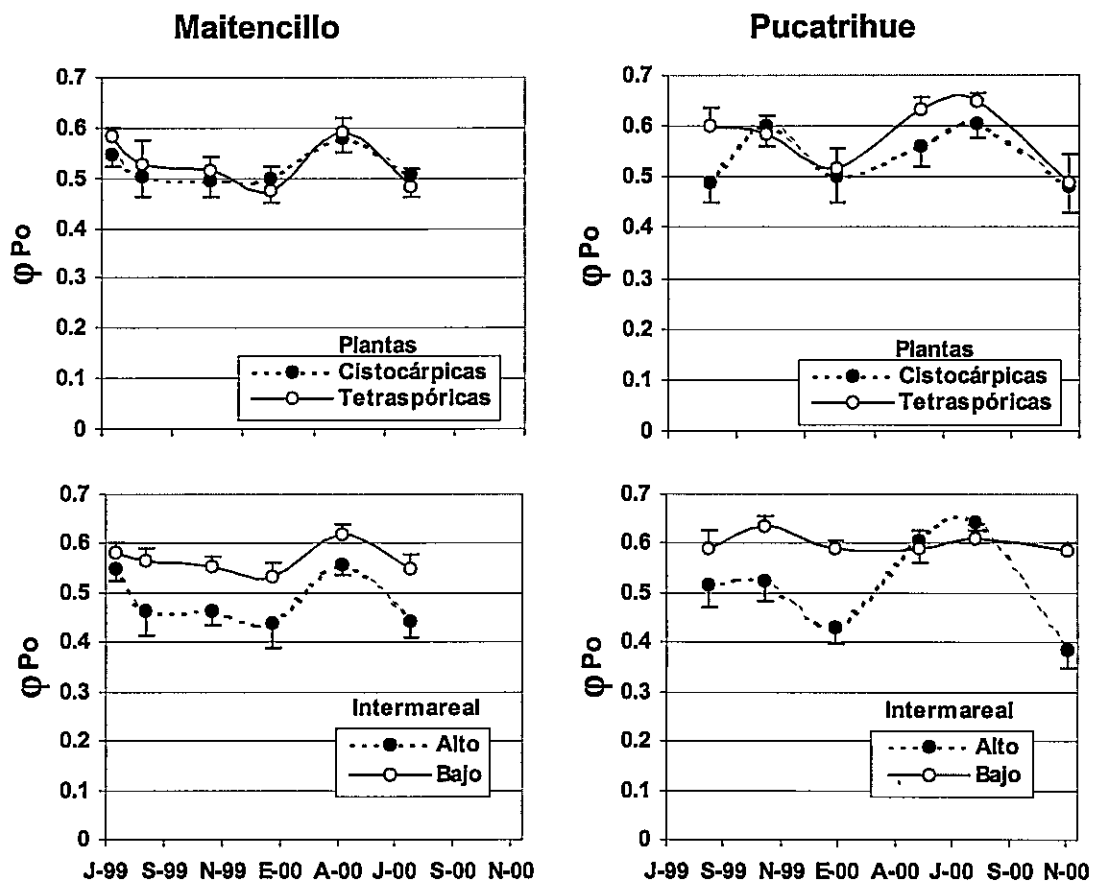


Figura 2-11: Eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{Po}) evaluada en plantas de diferente fase reproductiva y altura en el intermareal, en diferentes momentos del año. (Promedio ± 2 EE)

DISCUSIÓN

Variación a lo largo del día

Los resultados indican que en *M. laminarioides* el comportamiento de la tasa de fotosíntesis a lo largo del día está determinado principalmente por los cambios en la densidad de flujo fotónico. La tasa de fotosíntesis aumenta o disminuye con la intensidad de la luz, alcanzando un máximo precisamente durante el mediodía. Este comportamiento, estrechamente asociado a los cambios en la intensidad luminosa, sugiere que el máximo fotosintético logrado durante el día corresponde a la tasa fotosintética máxima, donde la fotosíntesis alcanza su nivel de saturación limitada principalmente por la fijación de carbono (Henley 1993, Falkowski & Raven 1997). La intensidad luminosa a la que se logra esta tasa de fotosíntesis, cercanas a los $2000 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, es para muchas especies de algas, incluso intermareales, una intensidad fotoinhibitoria (Herbert & Waaland 1988, Hanelt et al. 1993, Gantt 1990). Aún así, los resultados obtenidos en *M. laminarioides* son consistentes con observaciones con otras especies intermareales como *Porphyra yezoensis* (Gantt 1990), en la que no se apreció una inhibición evidente aún a radiaciones luminosas de $1600 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o *Porphyridium pupureum*, que no mostró fotoinhibición a intensidades tan altas como $2300 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Por su parte, las diferencias observadas entre las plantas de diferentes alturas en el intermareal son entendidas como una respuesta diferencial ante

los cambios de irradiación. Las plantas de la parte alta del cinturón intermareal, con una tasa fotosintética menor durante la mañana, son menos eficientes en el uso de la energía que las plantas de la parte baja, por lo cual requieren una mayor irradiación para alcanzar los niveles de saturación de la fotosíntesis. Estos resultados muestran que ambos grupos de plantas presentan un estatus fisiológico diferente ante las condiciones ambientales. Una menor eficiencia en el uso de la energía radiante o la necesidad de una mayor intensidad luminosa para alcanzar la fotosíntesis máxima, como se observa en plantas del intermareal alto, sugiere que las plantas están aclimatadas a regímenes de alta irradiación (Lobban & Harrison 1994, Falkowski & Raven 1997).

Las diferencias observadas en la ϕ_{Po} , durante la primavera, entre las plantas de ambos extremos del intermareal corroboran la inferencia anterior respecto de la diferencia en el estatus fisiológico de estas plantas. Los menores valores de ϕ_{Po} mostrados por las plantas de la parte alta del intermareal coinciden con un modelo de aclimatación a alta irradiación a través de cambios en el tamaño de los fotosistemas o tamaño de la "antena" (Lobban & Harrison 1994, Strasser et al. 1995).

Las diferencias fisiológicas entre las plantas de ambos extremos del intermareal también podrían estar asociados a las distintas temperaturas a las que son expuestas durante el día. Sin embargo, los antecedentes indican que,

en general, el ajuste fotosintético a altas temperaturas (aclimatación) implica un aumento de la eficiencia fotosintética con la temperatura (Davison 1993) y no una reducción de los valores de ϕ_{P_0} , como fue exhibido por las plantas del intermareal alto. No obstante, un aumento episódico de la temperatura, al igual que desecación, puede reducir temporalmente la eficiencia fotosintética (Davison 1993, Falkowski & Raven 1997).

Variación estacional

Las observaciones de la ϕ_{P_0} realizadas en Maitencillo, en distintos momentos del día y diferentes épocas del año, sugieren que las plantas de diferentes alturas en el intermareal modifican estacionalmente su estado de aclimatación y, con ello, la forma de responder a los cambios de las condiciones ambientales que ocurren durante el día. En otoño ambos grupos de plantas no evidencian diferencias de aclimatación, siendo afectados por igual por los cambios en los niveles de irradiación del día. Las plantas de ambos extremos son fotoinhibidas temporalmente durante el medio día, probablemente debido a la alta intensidad luminosa, recuperando la ϕ_{P_0} hacia finales de la tarde. En primavera, en cambio, sí se evidencian estas diferencias en el estatus de aclimatación entre ambos grupos de plantas. Los reducidos valores de la ϕ_{P_0} observados sólo en plantas de la parte alta del intermareal indican que éstas están respondiendo a niveles más altos de irradiación. A pesar de estas diferencias, ambos grupos de plantas se comportaron de manera similar ante

los cambios de irradiación del día, evidenciando cierta reducción en la eficiencia fotosintética durante el mediodía, aunque esta inhibición no resulto ser significativa. Durante el verano, las plantas de ambos niveles intermareales parecen estar expuestas a altos niveles de irradiación, dado que ambas ven reducida su ϕ_{P_0} . Sin embargo, las diferencias entre ambas indican que las de la parte alta están expuestas a mayores niveles de radiación. En ambos grupos de plantas se observó una inhibición de la eficiencia fotosintética durante la tarde, ya sea por la desecación y la intensidad luminosa en plantas de la parte alta del intermareal, o sólo por la irradiación en las plantas de la parte baja.

Diferencias entre localidades

La estacionalidad evidenciada en Maitencillo a través de los parámetros fotosintéticos, especialmente por la ϕ_{P_0} , es también advertida en Pucatrihue, aunque las diferencias observadas entre ambas localidades sugieren cierta disparidad en la respuesta de aclimatación entre ellas. La comparación general entre ambas localidades, que indica diferencias significativas particularmente en invierno (julio del 2000), sugiere que las plantas de Maitencillo debieron aclimatarse a condiciones de irradiación más intensas que las plantas en Pucatrihue en esta época del año. Las diferencias observadas entre las localidades de Fray Jorge y Pucatrihue pueden ser entendidas de un modo semejante. Por otra parte, la variación de la ϕ_{P_0} a lo largo del curso anual en Maitencillo ocurre en las plantas de ambos extremos del intermareal, en tanto

que en Pucatrihue sólo las plantas de la parte alta del intermareal evidenciaron cambios estacionales en los valores de ϕ_{PO} . Esto sugiere que los cambios en las condiciones de irradiación en Maitencillo afectaron de manera proporcional a las plantas de ambos extremos del intermareal, en tanto que en Pucatrihue dichos cambios estacionales sólo afectaron a la parte alta del intermareal. Esta diferencia podría ser consecuencia de niveles distintos de irradiación entre ambas localidades; o también debidas a distintos regímenes de marea, los cuales determinen tiempos distintos de emersión de las plantas de la parte baja del cinturón de *M. laminarioides* en el intermareal.

Diferencias entre fases reproductivas

Las diferencias entre fases reproductivas pueden constituir una evidencia adicional respecto a la distinción fisiológica entre las fases gametofíticas y tetrasporofíticas reportadas para esta especie (Hannach & Santelices 1985, Luxoro & Santelices 1989). Los resultados obtenidos a través de la tasa de fotosíntesis podrían ser atribuidos a diferencias anatómicas (i.e. grosor del talo), dado que la tasa fotosintética es estandarizada por el peso. Sin embargo, la ausencia de diferencia durante noviembre y el cambio de sentido de las diferencias durante el mes de agosto en Fray Jorge y Pucatrihue, no son consistentes con esta explicación. Por el contrario, estas observaciones indican cambios estacionales en el comportamiento fotosintético de estas fases reproductivas. Por otra parte, las diferencias entre estas fases observadas a

través de ϕ_{P_0} son evidentes sólo cuando las diferencias entre plantas de distinta altura en el intermareal son débiles o están ausentes. Un patrón como este podría indicar que las bases fisiológicas que sustentan las diferencias a ambas fases reproductivas son equivalentes a las diferencias fisiológicas debidas a la aclimatación de las plantas a distintos niveles de irradiación. De acuerdo a esto, las diferencias entre fases pueden estar siendo enmascaradas cuando las diferencias entre las plantas de ambos extremos del intermareal son más marcadas.

En síntesis, el estudio de parámetros fotosintéticos en terreno, como la tasa de fotosíntesis y la eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{P_0}), en *M. laminarioides* permite evidenciar cómo varía temporal y espacialmente el comportamiento fotosintético y relacionar estas variaciones con las condiciones ambientales. A nivel local, el gradiente de condiciones ambientales es determinante en las diferencias fotosintéticas observadas entre plantas de distinta altura en la zona intermareal. Diferencias en los niveles de irradiación, temperatura y/o desecación parecen determinar que estacionalmente las plantas del intermareal alto deban aclimatarse o ajustar su aparato fotosintético a niveles más altos de energía de excitación que las del intermareal bajo. Por otra parte, las discrepancias observadas entre localidades sugieren que las condiciones ambientales son también diferentes en el ámbito regional, tanto en

estacionalidad como en extensión de sus efectos en el intermareal. No obstante, de acuerdo a las diferencias observadas entre las plantas, los cambios ambientales al nivel local (intermareal) parecen más determinantes que los regionales (entre localidades), para imprimir diferencias en la fisiología fotosintética entre las plantas de *M. laminarioides*.

CAPÍTULO III

**Plasticidad fenotípica y diferenciación genética en respuesta a
la temperatura y la desecación en**

M. laminarioides

INTRODUCCIÓN

La variación de factores como la temperatura y la desecación constituyen parte importante de la heterogeneidad ambiental en la que las macroalgas viven (Lobban & Harrison 1994). Por ejemplo, el gradiente térmico que experimentan las macroalgas en el intermareal pueden incluir desde rápidas fluctuaciones asociadas a cambios durante las mareas o a lo largo del día, hasta fluctuaciones de largo plazo asociados a cambios estacionales e incluso variaciones interanuales relacionados con ciclos climáticos. A nivel local, el grado de desecación al que están expuestas las algas depende de la frecuencia y amplitud del ciclo de marea, la altura a la que se ubican en el intermareal, las condiciones atmosféricas y la severidad del oleaje. La combinación de estos factores puede resultar en una pronunciada variación en la temperatura, el contenido de agua en los tejidos, fuente de carbono y otros nutrientes requeridos para la fotosíntesis y el crecimiento.

En macroalgas, se ha descrito un amplio rango de tolerancia como respuesta adaptativa a la heterogeneidad ambiental (Chapman 1986, Russell 1986), particularmente en relación a la temperatura y la desecación (Lünnig 1990, Lobban & Harrison 1994). La curva o comportamiento fenotípico descrito a lo largo del amplio rango de tolerancia de un organismo (genotipo) implica que este tiene la habilidad de modificar su fenotipo ante diferentes condiciones ambientales (plasticidad fenotípica) (Lynch & Gabriel 1987, Sultan 1987,

Parsons 1991, 1992, Bazzaz 1996). Una respuesta plástica como ésta puede involucrar cambios en atributos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos que permiten rápidos ajustes en relación a la variación ambiental, o la adecuación fisiológica (aclimatación) o morfológica ante nuevas condiciones ambientales.

Por otra parte, la respuesta de una especie a la heterogeneidad ambiental está determinada por la variabilidad en las respuestas entre individuos de la población, de tal forma que diferentes organismos respondan mejor a distintas fracciones del gradiente ambiental (Lynch & Gabriel 1987, Sultan 1987, Parson 1991, 1992, Bazzaz 1996). En este sentido, individuos de provenientes de distinto origen pueden diferir en su respuesta, cuando son expuestos al rango de las variables ambientales que caracteriza al gradiente, implicando una base genética en sus diferencias en la respuesta de tolerancia a las condiciones ambientales.

De acuerdo a lo anterior es posible preguntarse: 1) ¿En qué medida la curva de tolerancia de un individuo puede responder al espectro de variabilidad ambiental a la que está expuesta la especie en su hábitat natural?, 2) ¿Existen diferencias en la curva de tolerancia a la temperatura y la desecación entre individuos de distinto origen geográfico e intermareal?

Respuesta a la temperatura

El rango térmico en el que las algas crecen está definido por las temperaturas que determinan el límite de sobrevivencia y/o el de la reproducción (Breeman 1988). En este rango, la fisiología de cada especie debe responder adecuadamente ante los cambios de temperatura. En este sentido, la habilidad de las macroalgas de adecuar su proceso fotosintético para responder de manera transitoria a cambios térmicos repentinos y a diferentes temperaturas de crecimiento (temperatura de aclimatarse) ha sido ampliamente documentada (Davison 1991, Lobban & Harrison 1994, Falkowski & Raven 1997). Así, por ejemplo, la respuesta de la fotosíntesis a un incremento repentino de la temperatura puede implicar rápidos ajuste de la tasa fotosintética, la respiración y la intensidad luminosa de compensación; aunque la plasticidad de esta respuesta depende de la temperatura de aclimatación en que las algas están creciendo (Davison 1991). Por otra parte, la capacidad de aclimatación a distintas temperaturas permite a las macroalgas ajustar el proceso fotosintético de tal forma que, ante un gradiente de temperatura, la tasa fotosintética describe una función caracterizada por un óptimo y un rango de tolerancia térmico. Una función muy semejante a la respuesta de crecimiento en relación a la temperatura (Davison 1991, Lobban & Harrison 1994).

Por otra parte, a pesar que las macroalgas muestran una gran uniformidad en el rango de tolerancia a la temperatura entre individuos de la misma especie (Breeman 1988, Peter & Breeman 1993), se han observado

algunos casos de diferenciación ecotípica. Ejemplos de este tipo se han observado principalmente en especies con una amplia distribución latitudinal y pueden ser evidenciados a través de la diferenciación en la respuesta fotosintética (Gerard & De Bois 1988, Davison 1991), en el óptimo de crecimiento (Innes 1988, Gerard & De Bois 1988) o entre las fases reproductivas (Gerard 1990, Luxoro & Santelices 1989). En general, esta diferenciación ecotípica puede involucrar cambios en la amplitud del rango o en la magnitud (óptimo) de la curva de respuesta (Lynch & Gabriel 1987, Breeman 1988, Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994)

Respuesta a la desecación

La tolerancia de una especie a la desecación es descrita en función de pérdida de agua que es posible tolerar sin perder la capacidad de recuperar completamente la actividad fotosintética después de la reinmersión. Este punto crítico de desecación ha sido estrechamente correlacionado con la altura que ocupan las especies en el intermareal (Dring & Brown 1982, Smith & Berry 1986, Brown 1987, Beer & Kautsky 1992, Lobban & Harrison 1994, Abe et al. 2001). Las especies que son capaces de perder un mayor porcentaje de agua durante la desecación, y luego recuperar su capacidad fotosintética, se distribuyen más alto en el intermareal, que aquellas que pueden hacerlo a porcentajes menores de pérdida de agua.

Dado que durante la emersión ocurre una reducción pronunciada en la disponibilidad de carbono inorgánico y otros nutrientes, se estima que la tasa de crecimiento es significativamente reducida con la desecación (Davison & Pearson 1996). No obstante, a niveles moderados de desecación algunas especies incrementan la tasa fotosintética (Oates & Murray 1983, Madsen & Maberly, 1990) y la tasa de absorción de nutrientes durante la rehidratación (Hurd & Dring 1990), por lo cual ciertos niveles de desecación temporal pueden tener efectos positivos en el crecimiento. Por otra parte, algunas evidencias indican que, en algunas especies, la tolerancia a la desecación puede variar estacionalmente y entre individuos de diferentes alturas en el intermareal; lo cual indica que estos pueden aclimatarse a diferentes regímenes de emersión (Lünning 1990). No obstante, no existe información de diferenciación ecotípica con relación a la tolerancia a la desecación.

Especie de estudio

M. laminarioides presenta una extensa distribución latitudinal y sus poblaciones forman un amplio cinturón en la zona intermareal (ver capítulo introductorio para descripción). Esta distribución permite comparar la respuesta a la temperatura y a la desecación entre individuos de diferentes orígenes geográficos y alturas en la zona intermareal. Antecedentes ecofisiológicos han permitido evidenciar la existencia de diferencias en el rango de tolerancia a la temperatura entre individuos de distinto origen geográfico. Estas diferencias fueron observadas entre plantas gametofíticas colectadas en el extremo sur de

distribución, las cuales exhibieron un rango de tolerancia a la temperatura entre 0 y 15° C (Wiencke y tom Dieck 1990), y gametofitos juveniles provenientes de muestras del centro norte de distribución, los que alcanzaron una alta tasa de crecimiento entre los 10° y 20° C (Hannach & Santelices 1985, Luxoro & Santelices 1989). Esta discrepancia podría indicar que, junto a un amplio rango de tolerancia individual, existen diferencias ecotípicas en el rango de tolerancia a la temperatura entre individuos de distinto origen geográfico. Respecto a la fotosíntesis, en esta especie no existe información que permita predecir su comportamiento ante un rango de temperatura.

La tolerancia a la desecación en esta especie ha sido descrita a través del porcentaje de sobrevivencia de juveniles ante diferentes tiempos de emersión (Luxoro & Santelices 1989). En este estudio se estableció que los gametófitos presentan una mayor tolerancia (sobrevivencia) a la desecación que los esporofitos. Sin embargo, no existe información que compare la respuesta de individuos de diferente origen o evidencie el comportamiento de la fotosíntesis ante la desecación.

Objetivos

En general, se procuró evidenciar en qué medida la plasticidad fenotípica y la diferenciación genética forman parte de la respuesta adaptativa a la temperatura y la desecación en macroalgas. Para ello se evaluó la respuesta de *M. laminarioides* ante un rango de variación de ambos factores ambientales. A

través de esta evaluación se procuró describir la curva de tolerancia y evidenciar la presencia de variabilidad en la expresión de esta curva de tolerancia entre individuos de distinto origen geográfico y niveles intermareales y diferente fase reproductiva.

En este contexto, se evaluó (en adultos) el comportamiento de la fotosíntesis a diferentes temperaturas de aclimatación y se procuró describir el metabolismo fotosintético ante cambios térmicos de corta duración (estrés a alta temperatura). Cambios de esta naturaleza pueden ocurrir transitoriamente a lo largo del día en el intermareal, particularmente durante días despejados. Los efectos de este tipo de estrés, sobre el comportamiento fotosintético, dependerán de las condiciones de crecimiento de las plantas (Davison 1991, Klüber & Davison 1993, Falkowski & Raven 1997). Por esta razón la evaluación se realizó en plantas mantenidas (aclimatadas) a distintas temperaturas (10° y 20° C), equivalentes al comportamiento que tendrían las plantas durante el invierno y el verano. Por otra parte, se evaluó entre individuos (en adultos) de diferentes alturas intermareales la respuesta de la fotosíntesis a la desecación. Con el propósito de distinguir la capacidad de respuesta a distintas historias de emersión se comparó el efecto de la desecación entre individuos mantenidos en condiciones de laboratorio (aclimatadas) con individuos colectados poco antes de la evaluación.

De manera complementaria, se evaluó el crecimiento de individuos juveniles provenientes de distinto origen geográfico y niveles intermareales y de diferentes fases reproductivas. Esta evaluación se realizó cultivando los juveniles a diferentes temperaturas y niveles de desecación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material y sitios de estudio

Para el presente estudio, plantas de *M. laminarioides* fueron recolectadas en la zona costera del Parque Nacional Fray Jorge (30° 40' S), Maitencillo (32° 38' S) y Pucatrihue (40° 28' S). Las características representativas de estas localidades y el sitio de estudio en cada una de ellas son descritas detalladamente en el capítulo 2.

Con relación al presente capítulo, es conveniente señalar nuevamente que dos grupos de plantas de ambas fases reproductivas fueron colectados en cada sitio de estudio y para los diferentes experimentos. El primero lo constituyeron plantas del nivel más alto en la zona intermareal, provenientes de una franja de 30 a 40 cm por debajo del borde superior de la banda de *M. laminarioides*. El segundo lo formaron plantas provenientes del nivel intermareal más bajo, definido por los últimos 30 a 40 cm de la franja dominada por esta especie (Fig. 2-3).

Procedimiento experimental con plantas adultas

En el presente estudio se evaluó y comparó, en plantas de distinto origen, el comportamiento de algunos parámetros fotosintéticos bajo tres condiciones fisiológicas distintas. Las condiciones fueron: a) aclimatación a diferentes temperaturas, b) estrés por alta temperatura, c) estrés por desecación.

a) *Aclimatación a diferentes temperaturas*

Plantas adultas de ambas fases reproductivas (Cistocárpicas y Tetraspórofitas) y provenientes de diferentes alturas del intermareal (alto y bajo) fueron colectadas de tres localidades diferentes (Fray Jorge, Maitencillo y Pucatrihue), en épocas de otoño e invierno.

En laboratorio, las plantas fueron procesadas para obtener muestras de tejido en cultivo. Para ello, frondas libres de estructuras reproductivas y endófitos fueron cepilladas y enjuagadas con agua de mar filtrada. Desde la zona media distal de cada una de estas frondas, y con la ayuda de un cilindro metálico, se obtuvieron discos de tejido de aproximadamente 1 cm de diámetro. Estos fragmentos debidamente individualizados, fueron lavados con agua corriente, sonicados, enjuagados con agua de mar filtrada y puestos en cultivo. La fase reproductiva de cada fronda fue identificada mediante el test de resorcinol (Craigie & Leigh 1978).

Los fragmentos de tejido fueron cultivados de manera preliminar en agua de mar microfiltrada por una a dos semanas, sin movimiento de agua y a baja intensidad luminosa. Bajo estas condiciones gran parte del tejido alcanza una efectiva cicatrización, mostrando, algunos de ellos, signos claros de regeneración.

Luego de esta etapa inicial, los fragmentos fueron mantenidos en cultivo por un período de uno a dos meses en aclimatación a las condiciones de laboratorio ($12^{\circ} - 15^{\circ} \text{ C}$, $50 - 80 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas de luz, y cambio de medio de cultivo SFC 1 o 2 veces por semana).

En estas muestras aclimatadas se caracterizó, en forma preliminar, la respuesta fotosintética a diferentes intensidades luminosas (curva P-I). Para ello, se evaluó la tasa de evolución de oxígeno en discos de tejido de diferentes plantas, usando un electrodo tipo Clarck (Hansatech, modelo OXYG1) en una cubeta de reacción de 20 mL. El incremento progresivo de la intensidad luminosa fue provisto y regulado por un equipo de fluorescencia de pulso modulado (Hansatech, modelo FMS1). Este equipo está integrado por un sistema de iluminación conformado por una lámpara halógena (OSRAM 64255, 8V, 25W), una fibra óptica que conduce el haz de luz hasta la cubeta de reacción, y un programa computacional (Modfluor, FMS software) que controla la intensidad luminosa de la lámpara en un rango determinado (0 a $3000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, medido al final de fibra óptica). La temperatura de evaluación (15° C) fue controlada a través de un baño termoregulado de flujo recirculante conectado a una 'camisa' de refrigeración de la cubeta de reacción.

La caracterización preliminar de la curva P-I permitió estimar algunos parámetros fotosintéticos básicos y definir un protocolo abreviado para las

evaluaciones posteriores. Esta curva fue descrita usando 15 intensidades luminosas, que aumentaron en forma progresiva desde 0 hasta 970 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Así, la tasa de fotosíntesis bajo luz saturante (P_{max}) fue alcanzada con las últimas cuatro intensidades (340, 450, 680, 970 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), en tanto que la región ascendente de la curva fue caracterizada por intensidades menores a la intensidad de saturación (I_k). De esta manera, en las subsecuentes mediciones experimentales se definió la evaluación de la P_{max} a una intensidad luminosa próxima al promedio de las tasas obtenidas bajo cuatro intensidades saturantes, alrededor de 450 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Además se estimó la eficiencia de cosecha de energía fotosintética (parámetro α , pendiente inicial de la curva P-I) a partir de la pendiente de la regresión lineal derivada de la curva descrita por la tasas fotosintéticas evaluadas a intensidades de luz sub saturantes (0, 10, 30 y 60 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Luego del período de aclimatación se seleccionaron fragmentos de tejido de los diferentes grupos de plantas para dos procedimientos experimentales secuenciales. En el primero, al menos 5 plantas de ambas fases reproductivas (cistocárpicas y tetrasporofíticas), colectadas de la parte baja del intermareal en las localidades de Fray Jorge y Pucatrihue, fueron aclimatadas por dos a cuatro semanas a cinco temperaturas diferentes (5°, 10°, 15°, 20° y 25° C; ver Fig. 3-1a). En el segundo procedimiento experimental, al menos 5 plantas de ambas

fases reproductivas, colectadas en el intermareal alto y en el intermareal bajo, en tres localidades diferentes (Fray Jorge, Maitencillo y Pucatrihue) fueron aclimatadas por el mismo tiempo a sólo tres temperaturas (10°, 15°, 20° C; ver Fig. 3-1b). Estas condiciones fueron implementadas haciendo uso de cámaras de cultivo Forma Científica ajustadas a la temperatura requerida ($\pm 2^\circ$ C) y manteniendo las restantes condiciones como en el período de aclimatación anterior. La temperatura de 5°, 10° y 15° C fueron constantes a lo largo del ciclo diario, en tanto que las plantas a 20° y 25° C se aclimataron a un régimen de 20° o 25° C durante el día y 15° C durante el período de oscuridad.

Después de al menos dos semanas de aclimatación a distintos regímenes de temperatura, se evaluaron los diferentes parámetros fotosintéticos. En muestras de tejido de 3 – 6 plantas de cada origen y fase reproductiva se evaluó la tasa de evolución de oxígeno en obscuridad, a intensidades sub saturantes (en orden progresivo de 10, 30, 60 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a intensidad saturante (450 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cada evaluación fue realizada a la temperatura de aclimatación. A partir de estas evaluaciones se calculó la tasa de respiración (**Resp**), la tasa fotosintética máxima (**P_{max}**) y la eficiencia de cosecha de energía radiante (α). Complementariamente se estimaron otros parámetros que permiten caracterizar la curva P-I, tales como la intensidad luminosa de saturación ($I_k = P_{\text{max}} / \alpha$), y la intensidad de compensación ($I_c = \text{Resp} / \alpha$).

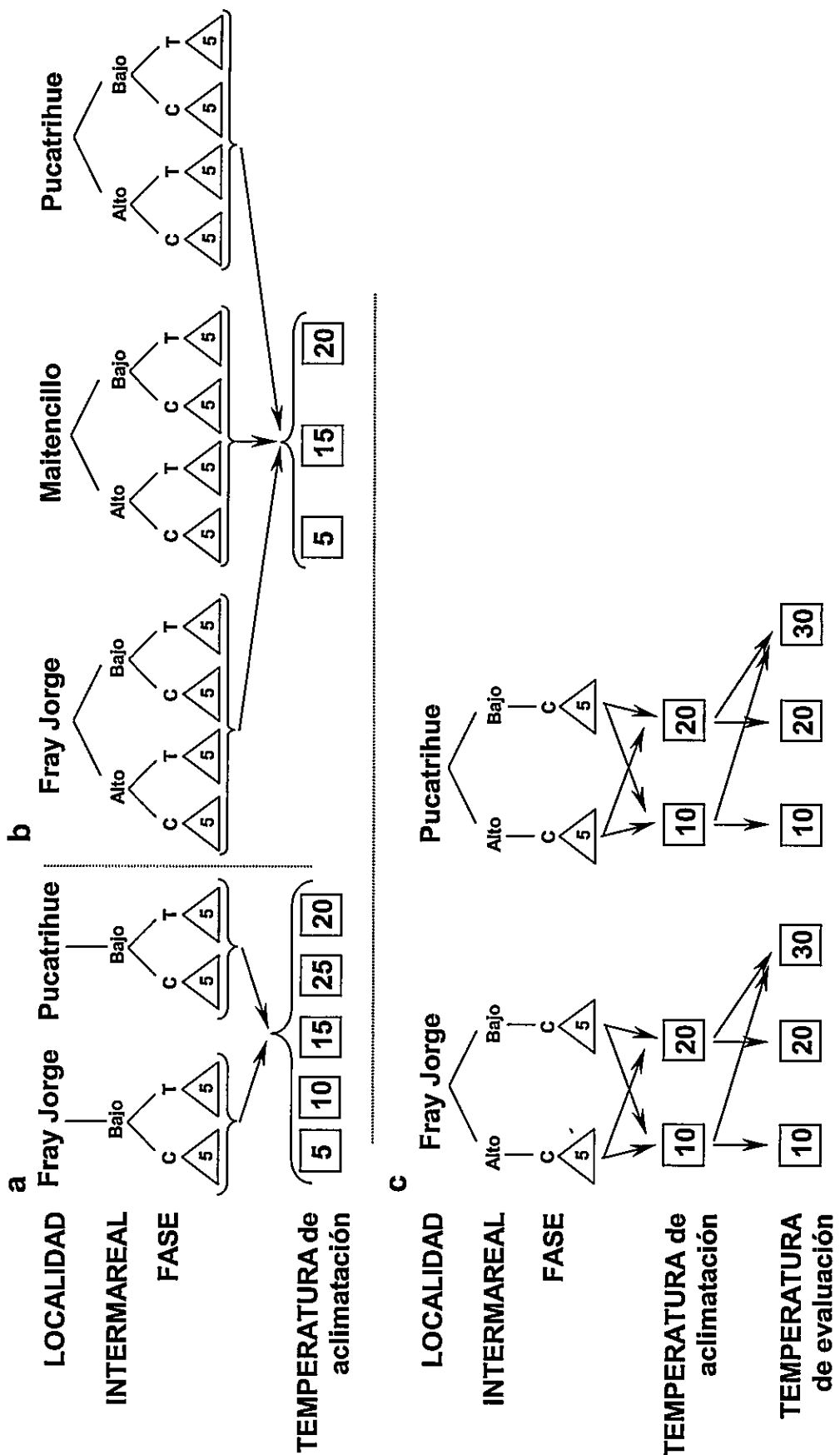


Figura 3-1: Diseño experimental para la evaluación de parámetros fotosintéticos de *M. laminarioides* a diferentes temperaturas (a y b) y durante la exposición a estrés por alta temperatura (c). En cada caso se incluyen las localidades, nivel intermareal (alto y bajo) de las muestras y la fase reproductiva (cistocárpicas (C) o tetrasporóicas (T)) a la que ellas corresponden.

La significancia de las diferencias entre plantas de diferentes origen, a lo largo del rango de temperatura, fue evaluada a través de un análisis de varianza (ANOVA multivariado de medidas repetidas, Statistica, StatSoft, Inc. 1998), considerando las diferentes temperatura como medidas repetidas. El modelo lineal general construido consideró la variable localidad como aleatoria, en tanto que la fase reproductiva y la altura en el intermareal como variables fijas. Un análisis semejante fue utilizado para observar diferencias al interior de cada localidad. La detección de diferencias *a posteriori* se realizó a través del test de Tukey HSD.

b) Estrés por alta temperatura

Para este experimento plantas gametofíticas (cistocárpicas) fueron colectadas desde ambas alturas del intermareal en las localidades de Fray Jorge y Pucatrihue. Como en la sección anterior, estas muestras fueron colectadas durante otoño e invierno. Aunque en Fray Jorge unas pocas fueron también colectadas en primavera.

Siguiendo el procedimiento indicado en la sección anterior, las muestras colectadas pasaron por un período de cicatrización y aclimatación a las condiciones de laboratorio. Luego de lo cual al menos cinco plantas gametofíticas, de diferentes alturas en el intermareal y provenientes de las dos localidades fueron cultivados por un período de dos a cuatro semanas a 10° y 20° C (Fig. 3-1c), manteniendo constantes las restantes condiciones de

aclimatación. Como en la sección anterior, el régimen a 20° C consistió de un ciclo diario de 20° C, durante el período de iluminación y 15° C en oscuridad.

Los diferentes parámetros fotosintéticos mencionados (**Resp**, **P_{max}**, α) y otros derivados de la emisión de fluorescencia (i.e. **F₀**, ϕ_{P_0} , $\phi_{P'}$, **qNP**) fueron evaluados luego de al menos dos semanas de aclimatación a las condiciones experimentales. Siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior, se evaluó la tasa de evolución de oxígeno primero en oscuridad, y luego a diferentes intensidades luminosas (en orden progresivo de 10, 30, 60, y 450 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en muestras de tejido de 3 – 6 plantas de cada origen. La evaluación en oscuridad fue extendida por 10 min, tiempo necesario para evaluar en forma paralela la eficiencia fotosintética cuántica máxima (ϕ_{P_0}) a través de un equipo de fluorescencia de pulso modulado (Hansatech, modelo FMS1). Luego de lo anterior, se registró la tasa de fotosíntesis, aumentando progresivamente la intensidad luminosa. Cada intensidad fue mantenida por 3 min, con la excepción de la última (450 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Esta fue mantenida por al menos 5 min, tiempo necesario para lograr una respuesta de fluorescencia estable (**F_s**) a esa intensidad luminosa. Bajo esta condición fue registrado la eficiencia fotosintética cuántica efectiva ($\phi_{P'}$), y otros parámetros derivados de la emisión de fluorescencia, como **qNP** (proporción de energía absorbida que es disipada por medios no fotoquímicos). Las muestras fueron

primero evaluadas a la temperatura de aclimatación (10° y 20° C) y posteriormente a temperatura de estrés (30° C).

En este experimento, como en anterior, el análisis estadístico consideró un ANOVA multivariado de medidas repetidas. La temperatura experimental usada fue seleccionada por ser extremos probables de aclimatación (invierno y verano) y de estrés (ver Tabla 2-1). Este modelo de análisis fue aplicado a cada set experimental, es decir, cada temperatura de aclimatación y su correspondiente estrés. El análisis de varianza y el test de Tukey HSD fueron realizados, como en la sección anterior, haciendo uso del programa Statistica (StatSoft, Inc. 1998).

c) *Estrés por desecación*

En este experimento plantas de ambas fases reproductivas (cistocárpicas y tetrasporofíticas) fueron colectadas a ambas alturas del intermareal en la localidad de Maitencillo, primero durante el invierno y luego a principios de primavera.

Con el objetivo de evidenciar si las diferencias fisiológicas observadas en terreno afectan la respuesta de *M. laminarioides* al estrés por desecación el procedimiento experimental se desarrolló con dos sets de plantas. El primero fue constituido por plantas colectadas en invierno las que, luego del período de cicatrización, fueron aclimatadas a las condiciones de laboratorio por casi dos

meses. El segundo, fue formado por plantas colectadas en primavera, las que fueron usadas en el experimento luego de sólo de 4 – 5 días de cicatrización, sin un período de aclimatación previo.

Previo al proceso de desecación se registró el peso de cada fragmento de tejido y evaluó, además, la eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{P_0}). Luego, varias muestras de al menos cinco plantas de cada grupo fueron expuestas al aire en una cámara de cultivo mantenida a $12^\circ - 15^\circ \text{C}$, $40 - 50 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y $40 - 50 \% \text{HR}$. Después de 30 minutos, muestras de cinco plantas fueron retiradas de esta cámara, interrumpiendo el proceso de desecación. En cada una de estas muestras volvió a registrarse el peso y la ϕ_{P_0} . Este procedimiento se repitió a los 60, 90, 120 y 150 minutos, permitiendo describir el proceso de desecación a lo largo de dos horas y media, bajo las condiciones descritas. La ϕ_{P_0} fue estimada a partir de la emisión de fluorescencia, medida después de un período de obscuridad de 40 minutos para cada muestra. La emisión de fluorescencia fue monitoreada por fluorímetro de excitación continua portátil (Handy - PEA, Hansatech Ltda., King's Lynn, Norfolk, Inglaterra). El registro del peso, antes y durante la desecación, permitió estimar el porcentaje de pérdida de agua a lo largo del proceso, en tanto que la ϕ_{P_0} permitió evaluar su efecto sobre el aparato fotosintético.

La etapa de recuperación fue evaluada en las muestras que alcanzaron mayor porcentaje de desecación. Los fragmentos desecados fueron reinsertos en placas de cultivo para su rehidratación, bajo las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior. Luego de 1 y 4 h de rehidratación, la ϕ_{P_0} volvió a ser medida, pero sólo en aquellos fragmentos de tejido que fueron expuestos por 90, 120 y 150 minutos. A estos tiempos alcanzaron niveles de desecación que redujeron significativamente la eficiencia fotosintética máxima. Esta evaluación permitió observar la capacidad de recuperación del aparato fotosintético bajo distintos niveles de desecación.

El estudio estadístico de los resultados de esta sección contempló dos tipos de análisis. El primero, aplicado al proceso de desecación, correspondió a un análisis de varianza multivariado, considerando en este caso los tiempos de exposición o porcentajes de desecación como medidas repetidas. La fase reproductiva y la altura en la zona intermareal fueron consideradas como variables fijas. El segundo modelo, un análisis de varianza de tres vías, fue aplicado por separado a cada tiempo de recuperación (a 1ª y a la 4ª hora). Para este modelo la variable tiempo de exposición (porcentaje de desecación) fue considerada fija, dado los resultados de la experiencia anterior que definieron estos tiempos como de efecto leve, moderado y alto. Como en la sección anterior el análisis de varianza y el test de Tukey HSD fue realizado con el programa Statistica (StatSoft, Inc. 1998).



Fronas reproductivas
De diferente origen, fase reproductiva y altura en el intermareal

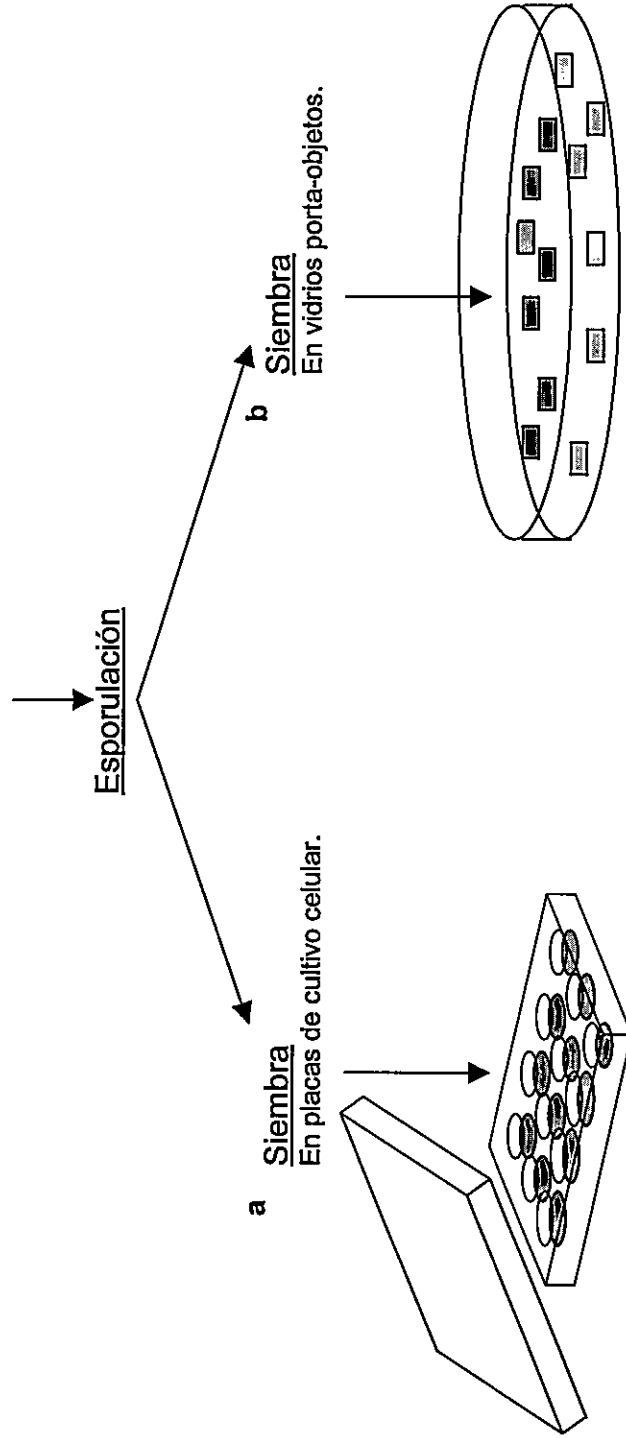


Figura 3-2: Esquema de siembra de esporas de *M. laminarioides* sobre distintas superficies para diferentes sets experimentales. a) Siembra de esporas en placas de cultivo celular de 12 pocillos. b) Siembra sobre vidrios porta-objetos de 1 cm².

Procedimiento experimental con juveniles

Para esta sección del presente estudio frondas reproductivas de 10 a 20 plantas de *M. laminarioides*, de ambas fases reproductivas (gametofíticas y esporofíticas) y diferente altura en el intermareal (alto y bajo), fueron colectadas en Fray Jorge y en Pucatrihue. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en condiciones refrigeradas (4 – 8° C), donde fueron lavadas con agua de mar microfiltrada y luego expuestas a moderada desecación para inducir la esporulación. Las esporas de diferente localidad, fase reproductiva y altura en la zona intermareal fueron sembradas en placas de cultivo celular mutipocillos (de 12 pocillos de 2,3 cm de diámetro y 1,75 cm de profundidad) y en vidrios porta-objetos de 1 cm² (Fig. 3-2). Cada placa fue sembrada por esporas de una misma localidad, pero de diferente fase y altura en el intermareal, considerando tres de los doce pocillos como réplicas de cada categoría. En tanto que al menos 25 vidrios por cada categoría (localidad, fase y altura) debidamente individualizados fueron sembrados con esporas. Las placas y los vidrios sembrados fueron cultivados por un período de dos semanas bajo condiciones de laboratorio de 12 – 15° C, 50 – 80 μ moles fotones m⁻² s⁻¹ y fotoperíodo de 12 horas de luz, con cambio de medio de cultivo SFC 2 veces por semana. Luego de este cultivo preliminar se procedió a ralea el exceso de individuos juveniles de tal forma de evitar la coalescencia de discos durante el crecimiento. Los individuos que presentaron alguna evidencia de coalescencia fueron eliminados. El tamaño inicial y final de los individuos juveniles fue registrado

fotográficamente antes y después de desarrollado cada set experimental. Cada pocillo y vidrio cultivado fue fotografiado bajo un microscopio binocular a un aumento de 10x.

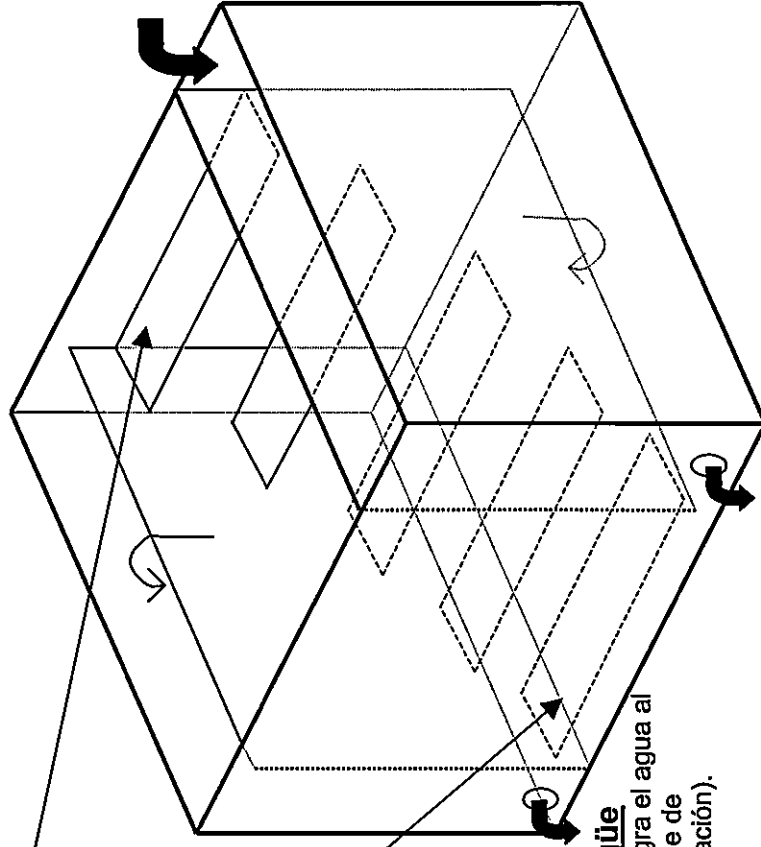
a) *Cultivo a diferentes temperatura*

Luego del período de cultivo preliminar las placas fueron dispuestas a diferentes temperaturas. Dos placas de cada localidad (Fray Jorge y Pucatrihue) fueron dispuestas por poco más un mes (38 días) en cada una de las cinco temperaturas experimentales (5°, 10°, 15°, 20° y 25° C). La temperatura constante fue mantenida por cámaras de cultivo (Forma Scientifica) ajustadas a la temperatura requerida ($\pm 2^\circ$ C). Las condiciones de cada cámara, salvo la temperatura, fueron semejantes a las del cultivo preliminar. La temperatura de 5°, 10° y 15° C fueron constantes a lo largo del ciclo diario; en tanto las cámaras que alcanzaban los 20° y 25° C, mantuvieron un régimen de 20° o 25° C durante el día y 15° C durante el período de obscuridad. Para evitar la proliferación de otras algas al menos una vez por semana, previo al cambio de medio de cultivo, las placas fueron cuidadosamente revisadas bajo lupa y limpiadas con la ayuda de pinceles finos.

b) *Cultivo a diferentes niveles de la desecación*

Después de la etapa preliminar, las plantas juveniles cultivadas en vidrios fueron expuestas a diferentes tiempos de desecación. Por un período de poco más de una mes (35 días) cinco vidrios con juveniles de cada una de las

diferentes categorías (localidad, fase reproductiva y altura en el intermareal) fueron distribuidos y cultivados en cada uno de los 5 niveles del acuario diseñado para simular mareas (Fig. 3-3). En este acuario, de aproximadamente 50 L de capacidad, se dispusieron a modo de escalones 5 superficies de vidrio ubicadas horizontalmente a distintas alturas. Con un sistema cíclico de desagua y llenado, el nivel del agua del acuario fue reducido sistemáticamente dos veces al día. El desagüe fue controlado por dos válvulas automáticas (Rain Matic, Programador Nelson 52). Cada una programada para evacuar el agua en cuatro pasos sucesivos de manera de simular un período de marea baja. Con ambas válvulas se reprodujo dos ciclos de marea baja en un período de 24 h. En cada ciclo de marea simulada la reducción progresiva del agua en el acuario expuso al aire, por 4, 3, 2, 1 y 0 h respectivamente, las cinco superficies de vidrios horizontales en las que fueron colocados los vidrios con juveniles. Las condiciones en el acuario fueron semejantes a las del cultivo preliminar (12 – 15° C, 50 – 60% HR durante marea baja, 50 – 80 $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperíodo de 12 horas de luz). Los 45 L de agua usados en el sistema de acuario fueron parcialmente enriquecido (equivalente a la mitad de la concentración usada en el medio SFC) y recambiada una vez a la semana. Para evitar la proliferación de otras algas los vidrios fueron revisadas bajo lupa y limpiadas con la ayuda de pinceles finos.



Nivel 5

Superficie donde son ubicadas las plantas juveniles. Este nivel es expuesto al aire por 4 h en cada "maree baja".

Nivel 1

Superficie donde son ubicadas las plantas juveniles. Este nivel no es expuesto al aire durante "maree baja".

Desagüe

(Reintegra el agua al estanque de recirculación).

Llenado de acuario

El agua es bombeada desde el estanque de recirculación cada 30 min, excepto durante el período de "maree baja". Antes del llenado el agua atraviesa un sistema de filtros (porosidad de hasta 0,02 mm nominal).

Desagüe de control automático

Dos válvulas (reguladas por timer) controlan la salida de agua del sistema. Una vez al día, cada válvula reduce en cuatro pasos el nivel del agua, simulando dos períodos de maree baja. (El agua es reintegrada al estanque de recirculación).

Figura 3Figura 3-3: Sistema de acuario diseñado para simular el efecto de distintos niveles de mareas en plantas juveniles de *M. laminaroides*. Desde el nivel más alto(nivel 5), los diferentes niveles son expuestos al aire por 4, 3, 2, 1 y 0 h respectivamente en cada episodio de "maree baja", que ocurren dos veces en el día.

Los resultados de cada set experimental registrados fotográficamente fueron evaluados a partir de las imágenes digitalizadas y con la ayuda de software de análisis de imágenes Image-Pro Plus versión 4.1. En cada imagen se evaluó el largo del talo y el área del disco. El crecimiento fue estimado a través de la diferencia entre los valores del inicio y final de cada experimento y para cada categoría evaluada. Las diferencias estadísticas entre las diferentes categorías evaluadas (localidad, fase y altura en el intermareal) fueron evaluadas a través de un análisis de varianza multivariado (ANOVA de medidas repetidas, Statistica StatSoft, Inc. 1998) que considera a las diferentes temperatura y tiempos de exposición a la desecación como medidas repetidas. Un análisis semejante fue utilizado para observar diferencias al interior de cada localidad. La detección de diferencias *a posteriori* se realizó a través del test de Tukey HSD.

RESULTADOS

Resultados con plantas adultas

a) *Aclimatación a diferentes temperaturas*

Los parámetros fotosintéticos evaluados en Fray Jorge y Pucatrihue, describen el patrón de comportamiento de la fotosíntesis de *M. laminarioides* ante un amplio rango de temperatura (Fig. 3-4; Tabla 3-1). En ambas poblaciones, la fotosíntesis máxima (P_{max}) evidenció cambios significativos a lo largo del rango de temperatura (Fig. 3-4; Tabla 3-4), alcanzando valores máximos a los 15° C, valores intermedios a los 20° y 25° C y los más bajos a los 10° y 5° C. De manera similar, la **Resp** mostró diferencias significativas a lo largo de la temperatura (Fig. 3-4; Tabla 3-4), evidenciando una menor tasa de respiración a los 15° C, la que incrementa a mayor o menor temperatura. En este contexto, cabe destacar que las tasas de respiración alcanzadas a 5° C son equivalentes a la tasas fotosintéticas obtenidas a la misma temperatura (Tabla 3-1). Por su parte, los parámetros α , I_k e I_c , también mostraron diferencias significativas entre las distintas temperaturas (Tabla 3-4); sin embargo, estas se deben a los bajos valores alcanzados por estos parámetros a 5° C. A pesar de lo anterior, en forma consistente, ninguno de los parámetros evaluados mostró diferencias significativas entre Fray Jorge y Pucatrihue, o entre plantas de diferente fase reproductiva.

Tabla 3-1: Parámetros fotosintéticos (relativos a la curva P-I) derivados de la evolución de oxígeno en plantas de *M. laminarioides* (colectadas de la parte baja del intermareal, de ambas fases reproductivas, y dos poblaciones), bajo cinco diferentes temperaturas de aclimatación. P_{max} , tasa de fotosíntesis máxima ($\mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$); α , eficiencia en la cosecha de energía radiante ($\mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)⁻¹); **Resp**, tasa de respiración ($\mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$); I_k , intensidad luminosa de saturación ($\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); I_c , intensidad luminosa de compensación ($\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Los valores corresponden al promedio, la desviación estándar se incluye entre paréntesis.

tº	Poblaciones	P_{max}	sd	α	sd	Resp	sd	I_k	sd	I_c	sd
5	Fray Jorge	4,6	(2,3)	0,10	(0,06)	4,0	(2,2)	47,1	(17,8)	43,6	(16,0)
	Pucatrhue	4,8	(2,2)	0,10	(0,03)	3,7	(1,4)	40,6	(20,5)	35,7	(9,1)
10	Fray Jorge	10,6	(5,8)	0,21	(0,08)	2,3	(1,1)	76,9	(12,0)	12,7	(4,3)
	Pucatrhue	9,5	(4,8)	0,17	(0,08)	1,7	(1,1)	73,6	(8,1)	4,6	(1,1)
15	Fray Jorge	24,8	(8,7)	0,29	(0,10)	1,5	(1,0)	88,0	(17,2)	5,5	(3,6)
	Pucatrhue	22,0	(8,6)	0,24	(0,09)	1,4	(0,8)	92,0	(13,2)	5,7	(2,6)
20	Fray Jorge	19,4	(5,8)	0,30	(0,11)	2,4	(1,7)	73,1	(14,4)	6,2	(2,4)
	Pucatrhue	15,5	(6,0)	0,25	(0,07)	2,4	(0,5)	77,1	(13,7)	9,7	(3,0)
25	Fray Jorge	15,9	(3,8)	0,20	(0,13)	2,9	(1,1)	89,3	(28,5)	16,9	(10,0)
	Pucatrhue	16,3	(2,6)	0,18	(0,03)	3,1	(1,3)	92,8	(10,1)	17,5	(6,6)

Tabla 3-2: Parámetros fotosintéticos derivados de la evaluación de oxígeno en plantas de *M. laminarioides* (colectadas de ambos extremos en el intermareal, dos fases reproductivas y tres poblaciones) bajo tres diferentes temperaturas de aclimatación. Ver Tabla 3-1 para especificación de los parámetros. Los valores corresponden al promedio, la desviación estándar se incluye entre paréntesis.

t°	Poblaciones	P _{max}	sd	α	sd	Resp	sd	I _k	sd	I _c	sd
10°	Fray Jorge	10,8	(5,4)	0,19	(0,08)	2,3	(1,1)	82,1	(19,6)	11,7	(5,1)
	Maitencillo	14,7	(7,1)	0,23	(0,07)	2,8	(1,1)	73,1	(12,6)	13,2	(6,4)
	Pucatrihue	9,4	(5,5)	0,17	(0,06)	2,1	(1,7)	76,4	(13,7)	5,2	(1,3)
15°	Fray Jorge	25,3	(9,2)	0,20	(0,10)	1,7	(0,9)	86,2	(18,3)	5,8	(3,1)
	Maitencillo	22,9	(5,0)	0,25	(0,06)	1,4	(0,7)	93,9	(11,0)	5,9	(2,2)
	Pucatrihue	21,4	(6,9)	0,23	(0,07)	1,6	(0,7)	92,0	(12,7)	6,7	(2,8)
20°	Fray Jorge	19,2	(6,1)	0,29	(0,14)	2,3	(1,5)	71,8	(15,6)	6,3	(2,3)
	Maitencillo	26,1	(6,7)	0,31	(0,10)	3,0	(1,7)	84,5	(11,0)	10,2	(3,4)
	Pucatrihue	15,9	(7,8)	0,24	(0,05)	3,0	(1,2)	93,8	(13,0)	9,3	(4,5)

Tabla 3-3: Valores de *F* obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) para distintos parámetros fotosintéticos derivados de la evolución de oxígeno en plantas aclimatadas a diferente temperatura. El análisis evalúa los efectos de la temperatura (T) de aclimatación, la localidad de origen (L), la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). Ver Tabla 3-1 para especificación de los parámetros. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Factores	Fray Jorge – Pucatrihue						Fray Jorge – Maitencillo – Pucatrihue					
	(g.l.)	P_{max}	α	Resp	I_k	I_c	P_{max}	α	Resp	I_k	I_c	
Temperatura (T)	(4)(2)	41,5 ***	11,3 *	15,7 **	27,6 **	16,0 **	101,5 ***	130,1 **	116,4 ***	5,9	40,4 *	
Localidad (L)	(1)(2)	0,1	1,4	0,7	0,0	0,1	12,0 *	4,6	3,4	7,0	0,5	
Fase (F)	(1)	0,1	46,3	0,6	0,1	122	0,0	61,3	0,3	7,1	3,2	
Altura (A)	(1)	-	-	-	-	-	7,4	32,1	2,7	2,6	17,1	
T x L	(4)(2)	0,7	0,4	0,7	0,3	2,5	14,0 **	2,7	0,7	1,3	7,1 *	
T x F	(4)(2)	3,1	0,6	0,6	0,7	5,7	7,9 *	0,2	1,0	1,6	0,2	
L x F	(4)(2)	2,4	5,7	1,8	5,9	9,8	14,4 *	14,1	4,2	2,0	0,4	
T x L x F	(4)(2)	0,8	1,0	0,1	1,1	21,1	18,3 ***	3,1	0,8	2,0	0,3	
T x A	(4)(2)	-	-	-	-	-	0,2	0,7	8,3 *	3,8	2,5	
L x A	(1)(2)	-	-	-	-	-	1,2	0,1	1,2	9,3	5,1	
F x A	(1)	-	-	-	-	-	0,0	15,7	0,2	0,0	2,3	
T x L x A	(4)(2)	-	-	-	-	-	0,2	0,6	1,4	1,7	7,1 *	
T x F x A	(4)(2)	-	-	-	-	-	0,3	1,3	0,4	0,9	0,3	
L x F x A	(1)(2)	-	-	-	-	-	0,7	0,0	0,1	0,2	0,0	
T x L x F x A	(4)(2)	-	-	-	-	-	0,4	0,5	0,3	0,2	0,1	

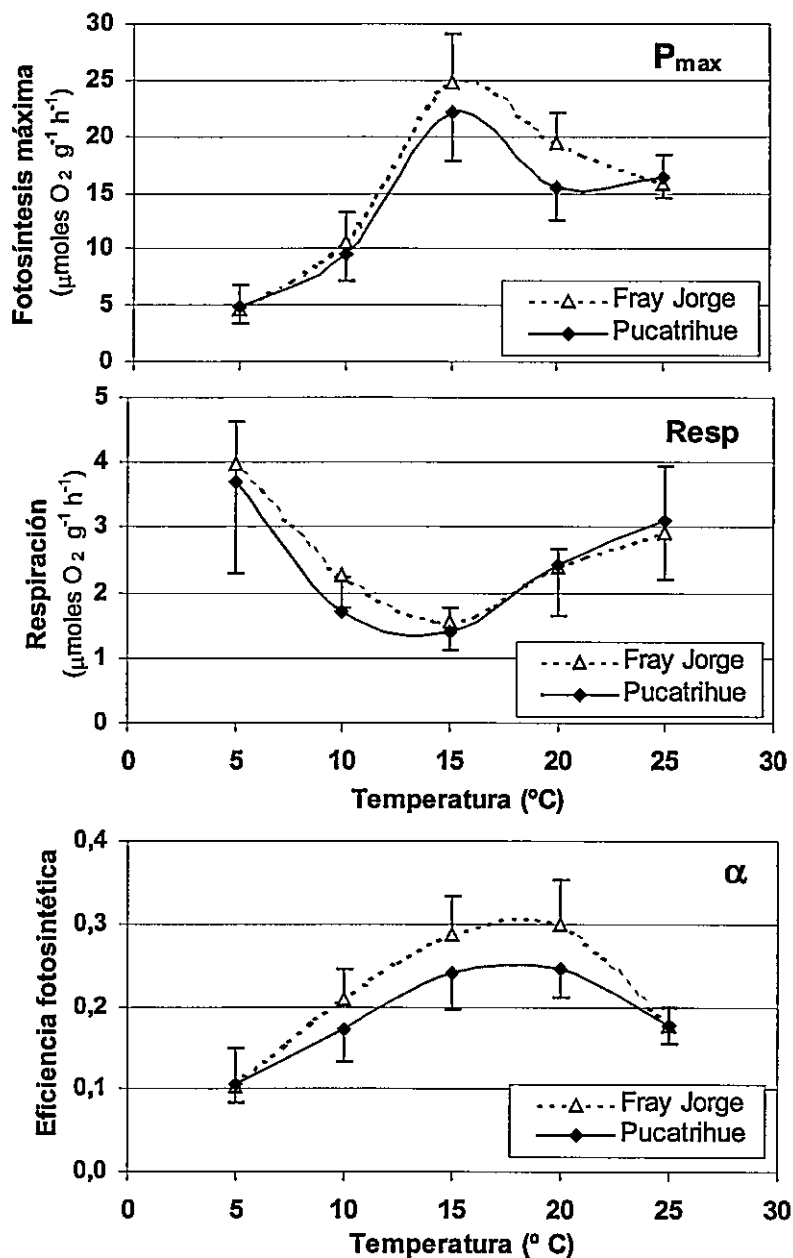


Figura 3-4: Tasa de fotosíntesis máxima (P_{max}), tasa de respiración (Resp) y eficiencia fotosintética (α , $\mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} [\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}]^{-1}$) de plantas de *M. laminarioides* provenientes de dos poblaciones evaluadas a las temperaturas de aclimatación respectivas. (Promedio \pm 2 EE).

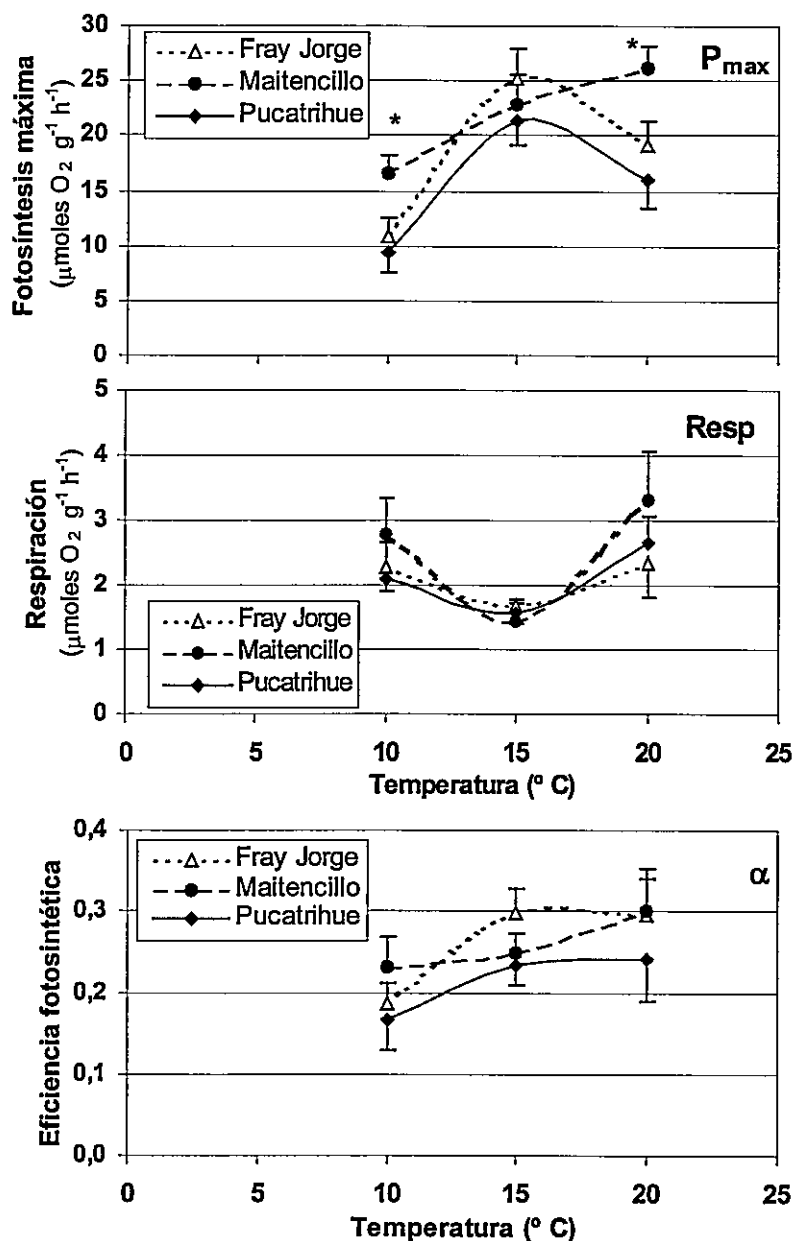


Figura 3-5: Tasa de fotosíntesis máxima (P_{max}), tasa de respiración (**Resp**) y eficiencia fotosintética (α , $\mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} [\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}]^{-1}$) de plantas de *M. laminarioides* provenientes de tres poblaciones evaluadas a las temperaturas de aclimatación respectivas. Asteriscos (*) indica diferencias significativas (Promedio \pm 2 EE).

Los resultados obtenidos con los distintos grupos de plantas (incluyendo la localidad de Maitencillo y muestras provenientes de ambas alturas del intermareal) y evaluadas a tres temperaturas de aclimatación (10°, 15° y 20° C), describieron un patrón fotosintético semejante al anterior (Fig. 3-5; Tabla 3-2). El análisis estadístico evidenció diferencias significativas a lo largo del rango de temperatura para P_{\max} , R_{esp} , α , e I_c (Tabla 3-4). Estas variables indican un óptimo fotosintético a 15° C, marcado por una tasa de fotosíntesis significativamente mayor y una reducida tasa de respiración (Fig. 3-5), aunque los valores de α fueron significativamente mayores tanto a 15° como 20° C. En cuanto al parámetro I_k no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas (Tabla 3-4).

A diferencia de lo observado en la evaluación experimental anterior, en P_{\max} se observaron diferencias significativas entre localidades y al nivel de la interacción entre temperatura y localidad (Tabla 3-3). El análisis *a posteriori* (Tabla 3-4) reveló que a una misma temperatura las diferencias entre localidades se observan a los 10° y 20° C. En ambos casos las plantas de Maitencillo alcanzan una mayor tasa fotosintética que las de las otras dos poblaciones (Fig. 3-5, Tabla 3-4). Paralelamente, la variable I_c también mostró diferencias significativas al nivel de la interacción entre temperatura y localidad (Tabla 3-3). El análisis *a posteriori* (Tabla 3-4) indicó que a 10° C las plantas de Maitencillo requieren de una intensidad luminosa significativamente más altas,

que las otras dos poblaciones, para alcanzar los niveles de fotosíntesis que compensen la respiración. A 15° y 20° C no se observan dichas diferencias entre poblaciones.

Adicionalmente, el análisis de P_{max} evidenció diferencias significativas al nivel de la interacción entre temperatura de aclimatación, localidad y fases reproductivas (Tabla 3-3). Sin embargo, de acuerdo al análisis a posteriori no se observaron diferencias entre fases de la misma localidad a una temperatura. Esto implica que el comportamiento de las variables evaluadas no difiere significativamente entre las plantas de distinta fase reproductiva, ni entre las alturas en el intermareal que estas ocupan en el intermareal (Tabla 3-3).

b) Estrés por alta temperatura

Las plantas aclimatadas a 10° C al ser expuestas a 30° C mostraron valores de P_{max} , **Resp**, I_k , e I_c significativamente mayores que los obtenidos a temperatura de aclimatación (Fig. 3-6; Tabla 3-5). El parámetro α , en cambio, no mostró diferencias significativas entre las evaluaciones realizadas a 10° y 30° C. Las plantas aclimatadas a 20° C, en cambio, mostraron diferencias significativas sólo en la **Resp** (Fig. 3-6; Tabla 3-5), siendo mayor a 30° C que a 20° C. En los restante parámetros estas plantas no exhibieron diferencias significativas entre ambas temperaturas de evaluación (Tabla 3-5).

Paralelamente, en plantas aclimatadas a 10° C la emisión de fluorescencia, evaluada a temperatura de aclimatación y de estrés, evidenció diferencias significativas en los parámetros de F_0 , ϕ_{P_0} , $\phi_{P'}$, q_{NP} entre ambas temperaturas de evaluación, alcanzando siempre los mayores valores a 30° C (Fig. 3-7). En plantas aclimatadas a 20° C, en cambio, sólo en los parámetros ϕ_{P_0} y q_{NP} se observaron diferencias significativas, logrando también los mayores valores a 30° C. Por otra parte, el análisis estadístico indicó que en plantas aclimatadas a 10° C los dos parámetros de eficiencia fotosintética (ϕ_{P_0} , $\phi_{P'}$) exhibieron diferencias significativas entre localidades (Tabla 3-6). En ambos casos, el análisis *a posteriori* evidenció que a 30° C las plantas de Pucatrihue muestran valores de ϕ_{P_0} y $\phi_{P'}$ significativamente mayores que las de Fray Jorge (Fig. 3-7).

Adicionalmente, en plantas de Fray Jorge aclimatadas a 10°, el parámetro q_{NP} evidenció diferencias significativas entre plantas provenientes de distinta altura en la zona intermareal (Tabla 3-6). El análisis *a posteriori* indicó que a los 10° C las plantas provenientes de la parte alta del intermareal muestran valores de q_{NP} mayores que en plantas de la parte baja. Esta diferencia no se observó a los 30° C.

Tabla 3-5: Valores de **F** obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) para distintos parámetros fotosintéticos derivados de la evolución de oxígeno en plantas aclimatadas a diferentes temperaturas. El análisis evalúa los efectos de la temperatura (T) de evaluación (de aclimatación y de estrés), la localidad de origen (L) y la altura en el intermareal (A). Ver Tabla 3-1 para especificación de los parámetros. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Factores	Aclimatación a 10° C						Aclimatación a 20° C					
	(g,l)	P _{max}	α	Resp	I _k	I _c	P _{max}	α	Resp	I _k	I _c	
Temperatura (T)	(1)	7,8 *	2,7	70,5 ***	32,3 **	55,3 **	0,3	0,6	47,0 **	0,8	8,7	
Localidad (L)	(1)	11,5 *	1,2	2,7	1,1	2,3	1,2	0,3	6,8	1,4	3,6	
Altura (A)	(1)	0,5	0,1	1,0	0,7	1,3	1,2	0,4	0,0	3,7	0,3	
T x L	(1)	0,0	0,0	1,8	0,0	3,5	0,9	0,4	0,2	7,3	0,9	
T x A	(1)	0,0	0,0	0,7	0,0	0,7	1,5	7,3	1,0	0,4	0,6	
L x A	(1)	0,4	0,0	2,4	0,6	3,2	0,4	0,0	2,5	0,6	0,1	
T x L x A	(1)	0,3	0,0	0,7	0,1	1,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	

Tabla 3-6: Valores de F obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) para distintos parámetros fotosintéticos derivados de la fluorescencia en plantas aclimatadas a diferentes temperaturas. El análisis evalúa los efectos de la temperatura (T) de evaluación (de aclimatación y de estrés), la localidad de origen (L) y la altura en el intermareal (A). F_0 , fluorescencia basal; ϕ_{Po} , eficiencia fotosintética (cuántica) máxima; $\phi_{P'}$, eficiencia fotosintética (cuántica) efectiva; qNP , proporción de energía absorbida que es disipada por medios no fotoquímicos. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Factores	(g.l.)	Aclimatación a 10° C						Aclimatación a 20° C					
		F_0	ϕ_{Po}	$\phi_{P'}$	qNP	F_0	ϕ_{Po}	$\phi_{P'}$	qNP				
Temperatura (T)	(1)	13,4 *	201,9 ***	69,7 ***	385,6 ***	0,2	36,9 **	4,0	115,1 **				
Localidad (L)	(1)	4,0	13,4 *	15,8 *	0,7	0,4	1,7	0,1	0,1				
Altura (A)	(1)	1,0	0,2	0,0	8,6 *	3,8	0,4	5,4	6,1				
$T \times L$	(1)	0,4	20,4 **	4,3	1,7	0,2	0,6	0,2	2,7				
$T \times A$	(1)	1,7	3,4	0,1	34,4 **	0,1	0,3	0,0	1,6				
$L \times A$	(1)	0,2	0,0	0,1	0,3	0,3	0,5	2,9	0,1				
$T \times L \times A$	(1)	1,1	0,5	0,8	0,0	9,3	0,0	2,6	0,7				

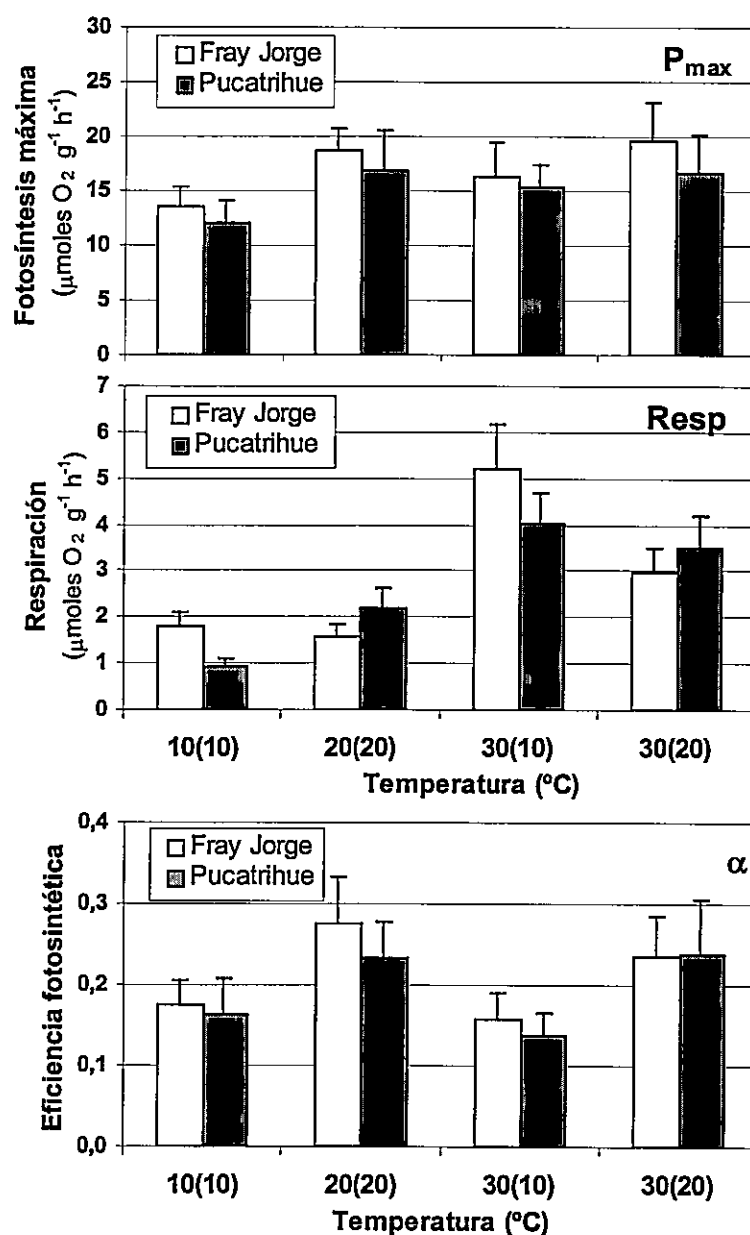


Figura 3-6: Tasa de fotosíntesis máxima (P_{max}), tasa de respiración ($Resp$) y eficiencia fotosintética (α , $\mu\text{moles O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} [\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}]^{-1}$) de plantas de *M. laminarioides* provenientes de dos poblaciones evaluadas a temperaturas de aclimatación (10° y 20° C) y a alta temperatura (30°C) . Entre paréntesis se indica la temperatura de aclimatación de las plantas. (Promedio \pm 2 EE).

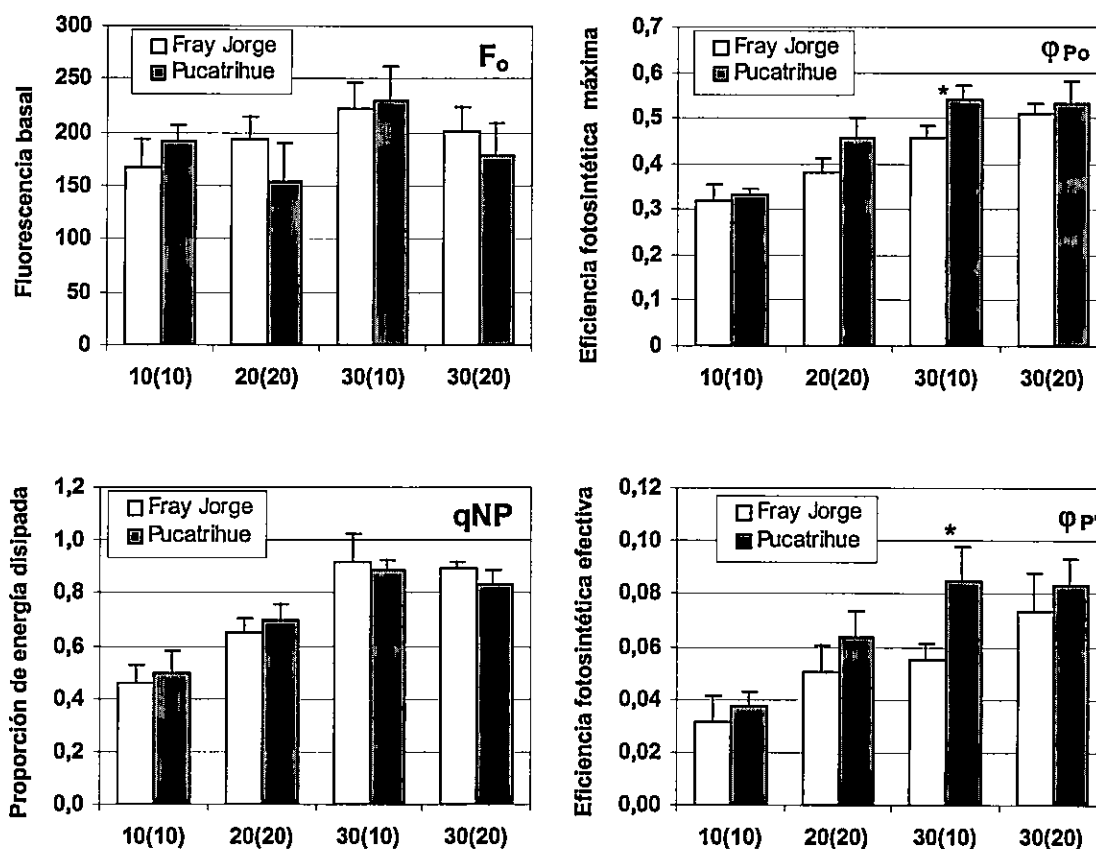


Figura 3-7: Fluorescencias basal (F_o), eficiencia fotosintética máxima (Φ_{Po}), proporción de energía absorbida que es disipada por medios no fotoquímicos (q_{NP}) y eficiencia fotosintética efectiva ($\Phi_{P'}$). Parámetros fotosintéticos derivados de la emisión de fluorescencia son obtenidos de plantas de *M. laminarioides* provenientes de dos poblaciones evaluadas a temperaturas de aclimatación (10° y 20° C) y a alta temperatura (30°C). Entre paréntesis se indica la temperatura de aclimatación de las plantas. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

Estrés por desecación

Los efectos del estrés por desecación sobre la eficiencia cuántica máxima (ϕ_{Po}) de la fotosíntesis en *M. laminarioides* son ordenados en dos partes: la etapa de desecación y la etapa de recuperación.

Etapa de desecación

Durante el proceso de desecación las plantas aclimatadas y no aclimatadas a las condiciones de laboratorio alcanzaron porcentajes semejantes de pérdida de agua a los mismo tiempos de exposición al aire. A los 30 min ambos grupos de plantas perdieron aproximadamente el 30% de agua, a los 60 min el 40%, a los 90 min el 50%, a los 120 min el 60% y a los 150 min perdieron alrededor del 70% de su contenido hídrico. En este proceso la eficiencia fotosintética fue afectada significativamente (Fig. 3-8 y 3-9; Tabla 3-7). En general, pérdidas moderadas del contenido hídrico de los tejidos (40% o menos) no afectan significativamente la ϕ_{Po} . Por el contrario, en algunas plantas provocan un aumento leve pero significativo de la eficiencia fotosintética (Fig. 3-9; Tabla 3-8). Porcentajes mayores al 50% de pérdida de agua pueden reducir significativamente la ϕ_{Po} , alcanzando los valores más bajos (alrededor de 0,1) al perder el 70% del agua contenida en el tejidos (Fig. 3-8 y 3-9).

Los resultados indican, además, que los efectos de la desecación dependen de a las condiciones de cultivo. En plantas aclimatadas la eficiencia

fotosintética es reducida significativamente cuando la pérdida de agua alcanza alrededor del 50% (Fig. 3-8; Tabla 3-8). En cambio, plantas no aclimatadas muestran una reducción progresiva de la $\phi_{P_{O_2}}$, que sólo llega a ser significativa cuando la pérdida de agua es de alrededor del 70% (Fig. 3-9; Tabla 3-8).

En plantas aclimatadas, la desecación afecta de modo diferente a individuos de distinta fase reproductiva. En estas plantas, la fase reproductiva como factor de análisis es significativa al nivel de la interacción con el tiempo de exposición a la desecación (D x F en Tabla 3-7). Esto revela que cuando la pérdida de agua es de alrededor del 50% la eficiencia fotosintética de ambas fases es significativamente diferente, observándose los mayores valores en plantas cistocárpicas (Fig. 3-8). Esta diferencia, sin embargo, sólo evidencia un comportamiento diferencial más general entre ambas fases reproductivas. En las muestras aclimatadas, la $\phi_{P_{O_2}}$ de las plantas tetrasporofíticas es afectada primero, o a menores porcentaje de pérdida de agua, que en las frondas cistocárpicas (Fig. 3-8a). El significativo efecto de la progresiva desecación sobre la $\phi_{P_{O_2}}$ se evidencia en cada fase reproductiva tanto en plantas aclimatadas ($F= 42,6$; $p<0,001$; g.l.= 5 para cistocarpicas y $F= 87,0$; $p< 0,001$; g.l.= 5 para tetrasporofíticas) como no aclimatadas ($F= 45,6$; $p<0,001$; g.l.= 5 para cistocarpicas y $F= 21,2$; $p= 0,002$; g.l.= 5 para tetrasporofíticas). El análisis a posteriori realizado separadamente para cada fase (Tabla 3-9) evidencia que, en plantas cistocárpicas, niveles moderados de desecación (30% y 40% de

pérdida de agua respectivamente) incrementan levemente la ϕ_{P_0} , reduciéndose de manera significativa a niveles de desecación del 60 %. En plantas esporofíticas, en cambio, la reducción de la ϕ_{P_0} comienza antes (al 40% de pérdida de agua) y se hace significativa alrededor del 50% de desecación (Fig. 3-8a; Tabla 3-9). Un comportamiento semejante al de las plantas cistocárpicas es observado entre las plantas no aclimatadas, pero no hay diferencias significativas entre ambas fases reproductivas (Fig. 3-9a; Tabla 3-9).

La altura que las plantas ocupan en el intermareal no parece ser un factor que afecte de manera diferencial el comportamiento de la eficiencia fotosintética durante el proceso de desecación (Fig. 3-8b y 3-9b). En las muestras aclimatadas, la ϕ_{P_0} de las plantas provenientes de la parte alta del intermareal parece ser reducida primero, o a menores porcentaje de pérdida de agua, que en las plantas de la parte baja (Fig. 3-8b). Sin embargo, el análisis estadístico no evidencia diferencias significativas entre ambos grupos de plantas. En plantas no aclimatadas, por su parte, se observa un efecto marginal en la interacción entre tiempo de exposición y la altura en el intermareal ($T \times A$, $F = 4,4$; $p = 0,064$; g.l. = 5 en Tabla 3-7). Esto puede ser explicado por las diferencias con que provienen de terreno y que mantienen ambos grupos de plantas desde inicio del proceso de desecación, las que dejan de observarse a partir del 60% de pérdida de agua.

Tabla 3-7: Valores de F obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) realizado para los valores de la ϕ_{p_0} (eficiencia fotosintética máxima) evaluada en plantas aclimatadas (mantenidas en laboratorio) y no aclimatadas (traídas de terreno) durante el proceso de desecación. El análisis evalúa los efectos del porcentaje de pérdida de agua durante la desecación (D), la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Factores	(g.l)	Aclimatadas	No - aclimatadas
		F	F
Desecación (D)	(5)	106,2 ***	19,0 **
Fase (F)	(1)	5,3	2,4
Altura (A)	(1)	5,1	16,8
D x F	(5)	3,3 *	1,2
D x A	(5)	1,6	4,4
F x A	(1)	7,2	9,9
D x F x A	(5)	2,4	3,7

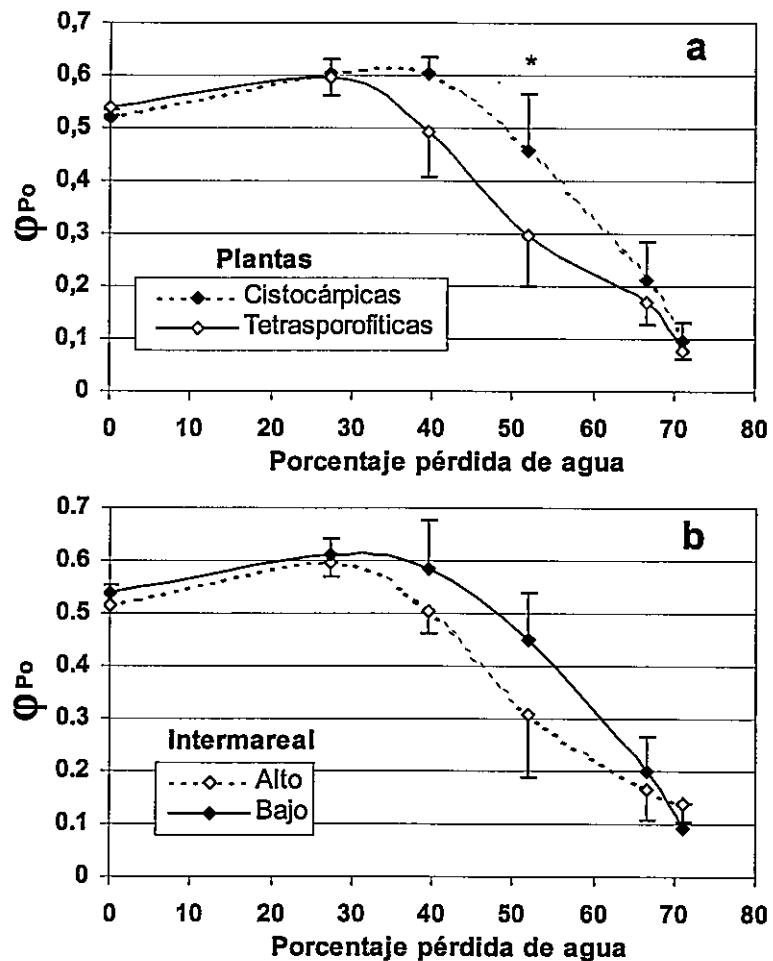


Figura 3-8: Comportamiento de la eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{Po}), registrada durante el proceso de desecación, en plantas de *M. laminarioides* colectadas en la localidad de Maitencillo y aclimatadas a las condiciones de laboratorio. a) Plantas de ambas fases reproductivas, b) plantas colectadas en la parte alta y baja del intermareal. Asterisco (*) indica diferencias significativas (Promedio \pm 2 EE).

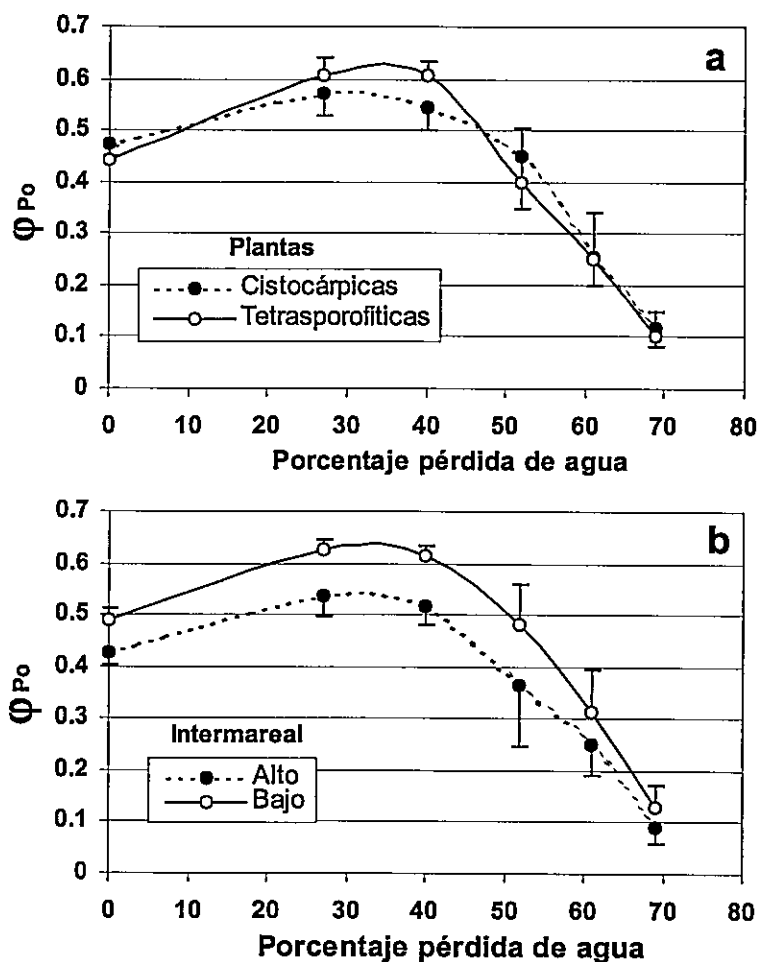


Figura 3-9: Comportamiento de la eficiencia fotosintética máxima (ϕ_{Po}), registrada durante el proceso de desecación, en plantas de *M. laminarioides* colectadas en la localidad de Maitencillo y no aclimatadas a las condiciones de laboratorio. a) Plantas de ambas fases reproductivas y b) plantas colectadas en la parte alta y baja del intermareal. (Promedio \pm 2 EE).

Etapas de recuperación

Luego de que el tejido es rehidratado las plantas aclimatadas y no aclimatadas muestran diferentes patrones de recuperación de la ϕ_{P_0} . En general, después de la rehidratación, las plantas aclimatadas y no aclimatadas, sometidas previamente a distinto nivel de desecación, mostraron una eficiencia fotosintética significativamente menor que estas mismas plantas no expuestas a desecación (Tabla 3-10). El análisis *a posteriori* evidenció que las plantas aclimatadas, después de una hora de rehidratación, muestran niveles de ϕ_{P_0} significativamente menores que los observados al inicio del experimento (Fig. 3-10; Tabla 3-11). En las plantas no aclimatadas, en cambio, la ϕ_{P_0} alcanzó valores significativamente inferiores después de la primera hora de rehidratación sólo en las muestras expuestas a mayor desecación (70% de pérdida de agua) (Fig. 3-10; Tabla 3-11). Luego de cuatro horas de rehidratación los valores de ϕ_{P_0} incrementan en todas las plantas, sin embargo, no modifican significativamente el patrón descrito.

La comparación de la ϕ_{P_0} durante la rehidratación muestra también diferencias entre plantas de distinta fase reproductiva (Tabla 3-10). En plantas aclimatadas y no aclimatadas, la fase cistocárpica alcanzó siempre valores de ϕ_{P_0} más altos que las plantas tetrasporofíticas (Fig. 3-11). Esta diferencia se observó en ambos períodos de evaluación (después de 1 y 4 h de rehidratación), pero sólo se hace significativa en plantas aclimatadas luego de 4

h de rehidratación. Así, por ejemplo, entre plantas expuestas a un mismo nivel de desecación (60% y 70% de pérdida de agua), las plantas cistocárpicas alcanzan valores de ϕ_{P_0} significativamente más altos que las tetrasporofíticas (Fig. 3-11; Tabla 3-12).

La altura del intermareal de donde provienen las muestras no parece ser un factor que afecte significativamente la eficiencia fotosintética observada en las plantas rehidratadas (Tabla 3-10). Las diferencias indicadas por el análisis, al nivel de la altura en el intermareal en plantas no aclimatadas, corresponden a las diferencias iniciales, donde la ϕ_{P_0} en plantas de la parte baja del intermareal fue mayor que en plantas de la parte alta (Fig. 3-12). Esta diferencias, sin embargo, no se observaron en plantas que alcanzaron un 70% de pérdida de agua.

Tabla 3-10: Valores de F obtenido del análisis de varianza de tres vías realizado para los valores de la ϕ_{P_0} (eficiencia fotosintética máxima) evaluada en plantas aclimatadas y no aclimatadas, después de 1 y 4 horas de rehidratación. El análisis evalúa los efectos del porcentaje de pérdida de agua durante la desecación (D), la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Tiempo de Recuperación	Factores	(g.l)	Aclimatadas	No - aclimatadas
			F	F
1 hora	Desecación (D)	(3)	166,4 ***	34,3 ***
	Fase (F)	(1)	6,7 *	12,6 ***
	Altura (A)	(1)	2,9	9,0 **
	D x F	(3)	4,3 **	2,1
	D x A	(3)	0,2	2,0
	F x A	(1)	0,9	0,0
	D x F x A	(3)	1,6	0,8
4 horas	Desecación (D)	(3)	84,4 ***	15,6 ***
	Fase (F)	(1)	19,3 ***	10,6 **
	Altura (A)	(1)	2,9	2,0
	D x F	(3)	10,5 ***	1,8
	D x A	(3)	0,2	2,9 *
	F x A	(1)	0,0	0,0
	D x F x A	(3)	0,1	0,1

Tabla 3-11: Análisis *a posteriori* (Test de Tukey HSD) sobre el efecto significativo del porcentaje de pérdida de agua durante la desecación (D) en plantas aclimatadas y no aclimatadas. Resultados derivados del ANOVA de tres vías para el parámetro ϕ_{Po} , evaluado después de 1 y 4 horas de rehidratación. *: $p < 0,05$. ns: $p > 0,05$.

Tiempo de Recuperación	Pérdida de agua (%)	Aclimatadas			No - aclimatadas		
		(50)	(60)	(70)	(50)	(60)	(70)
1 hora	0	*	*	*	ns	ns	*
	50		ns	*		ns	*
	60			*			*
	70						
4 horas	0	*	*	*	ns	ns	*
	50		ns	*		ns	ns
	60			*			*
	70						

Tabla 3-12: Análisis *a posteriori* (Test de Tukey HSD) sobre el efecto de la interacción entre el porcentaje de pérdida de agua durante la desecación y la fase reproductiva (D x F), en plantas aclimatadas. Resultados derivados del ANOVA de tres vías para el parámetro ϕ_{Po} , evaluado después 4 horas de rehidratación. C: plantas cistocárpicas. T: plantas tetretraspóricas. *: $p < 0,05$. ns: $p > 0,05$.

Pérdida de agua (%)	Fase reproductiva	Aclimatadas							
		(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	
0	C (1)	*	*	*	ns	*	*	*	
	T (2)		*	*	ns	*	*	*	
50	C (3)			ns	ns	ns	ns	*	
	T (4)				*	ns	ns	*	
60	C (5)					*	*	*	
	T (6)						ns	*	
70	C (7)							*	
	T (8)								

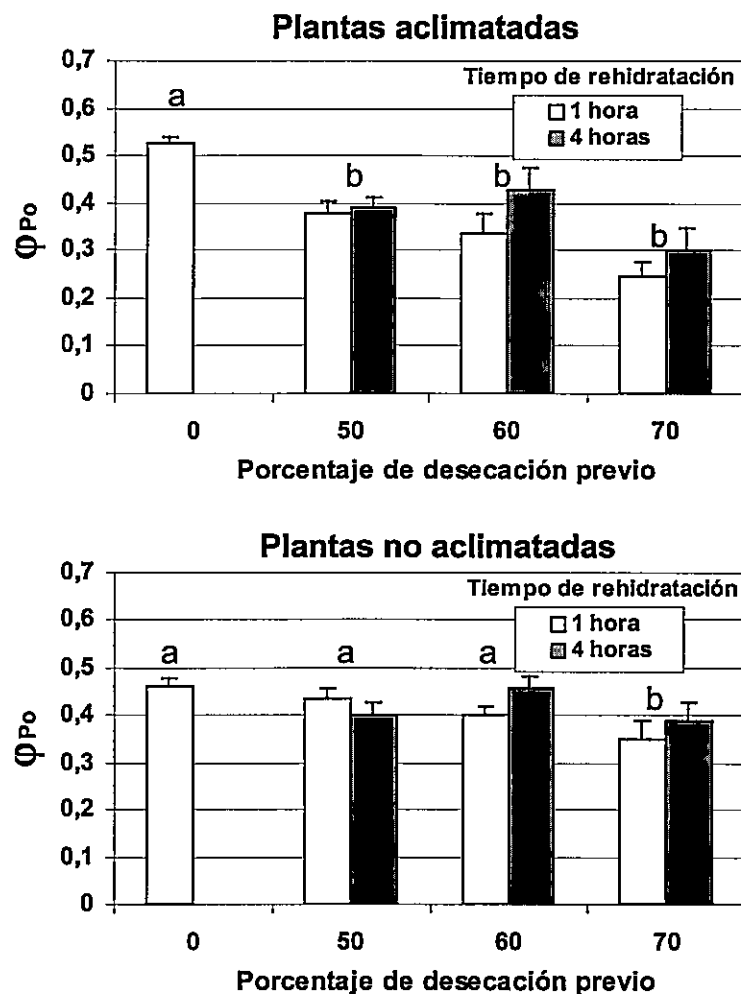
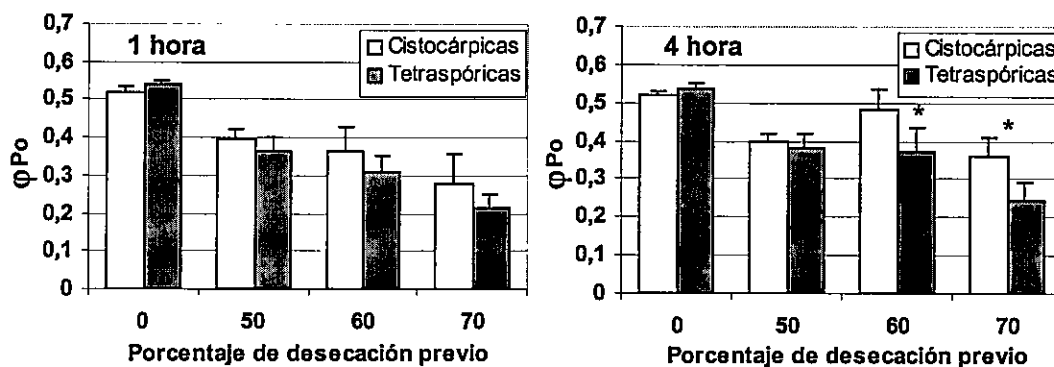


Figura 3-10: Comparación de la eficiencia fotosintética máxima (Φ_{Po}) evaluada antes de la pérdida de diferentes porcentajes de agua y después de 1 y 4 horas de rehidratación. La evaluación se realizó en plantas (aclimatadas y no aclimatadas) de *M. laminarioides* colectadas en Maitencillo. Letras distintas (a o b) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

Plantas aclimatadas



Plantas no aclimatadas

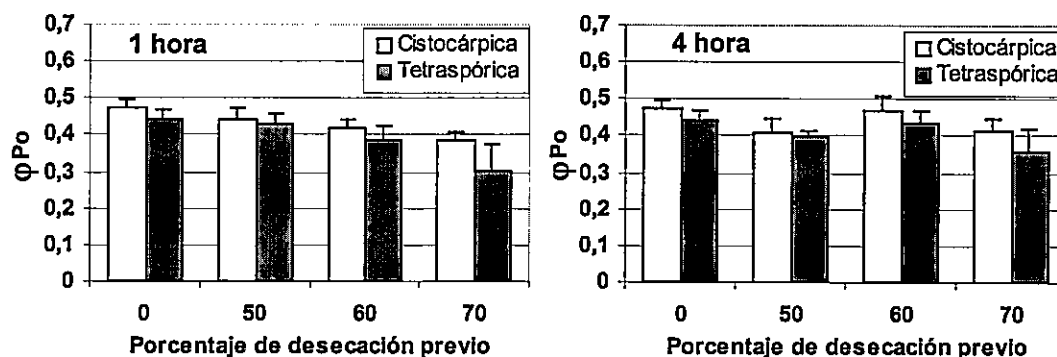


Figura 3-11: Comparación de la eficiencia fotosintética máxima (Φ_{Po}) evaluada antes de la pérdida de diferentes porcentajes de agua y después de 1 y 4 horas de rehidratación. La evaluación se realizó en plantas de *M. laminarioides* (aclimatadas y no aclimatadas) de ambas fases reproductivas (cistocárpicas y tetraspóricas) colectadas en Maitencillo. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

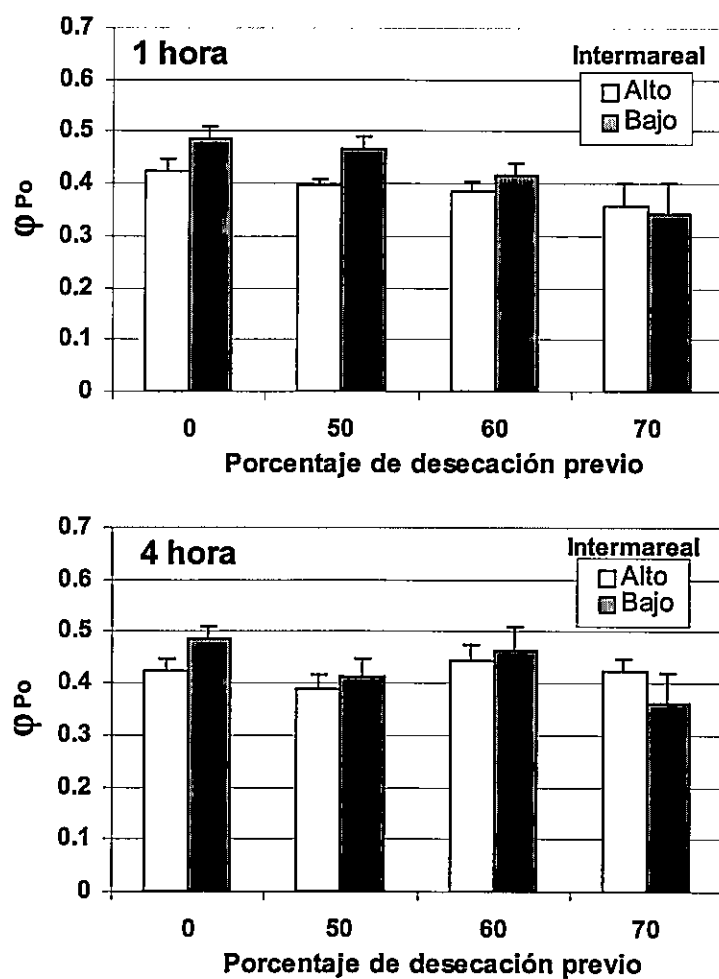


Figura 3-12: Comparación de la eficiencia fotosintética máxima (Φ_{Po}) evaluada antes de la pérdida de diferentes porcentajes de agua y después de 1 y 4 horas de rehidratación. La evaluación se realizó en plantas de *M. laminarioides* (aclimatadas y no aclimatadas) colectadas de ambos extremos en el intermareal (intermareal alto y bajo) en Maitencillo. (Promedio \pm 2 EE).

Resultados con juveniles

a) *Cultivo a diferentes temperaturas*

Los resultados evidencian que las plantas juveniles de *M. laminarioides* crecen (en el largo del talo) en un amplio rango de temperatura (entre los 5° y los 25° C; Fig. 3-13). El análisis general indicó diferencias significativas entre las temperaturas de cultivo (Tabla 3-13), revelando *a posteriori* que el crecimiento es significativamente más alto a los 10° y 15° C que en las restantes temperaturas (Fig. 3-13). No se observaron diferencias significativas entre localidades salvo al nivel de interacción entre temperatura y localidad (T x L en Tabla 3-13). En este caso el análisis *a posteriori* indicó que estas diferencias significativas se presentan a los 10° C, donde los juveniles de Fray Jorge crecen más que los de Pucatrihue y a los 25° C, en donde son los de esta última localidad los que muestran un mayor crecimiento (Fig. 3-13). En el mismo análisis general (Tabla 3-13) se observaron diferencias significativas entre plantas provienen de diferente altura en el intermareal y también diferencias entre fases reproductivas, aunque sólo a nivel de la interacción con el origen intermareal de los juveniles (F x A en Tabla 3-13).

El análisis de cada localidad evidencia con mayor claridad las diferencias entre los grupos de plantas evaluados. Tanto en Fray Jorge como en Pucatrihue las fases reproductivas muestran un comportamiento ligeramente distinto a lo largo del rango de temperatura, alcanzando un máximo de crecimiento a diferentes temperaturas: a 10° C en las plantas juveniles esporofíticas y a 15° C

en plantas gametofíticas (Fig. 3-14a y b). Sin embargo, en ningún las dos localidades estas diferencias entre fases fueron estadísticamente significativas (Tabla 3-14).

Por su parte, la altura intermareal de la que provienen los parentales determinó diferencias significativas en el crecimiento de plantas juveniles (Fig. 3-15). En Fray Jorge estas diferencias en el crecimiento fueron significativas sólo en interacción con la temperatura o la fase reproductiva (T x A, F x A o T x F x A en Tabla 3-14). El análisis *a posteriori* reveló que estas diferencia se advierten a 10° y 15° C, aunque su sentido es diametralmente opuesto entre juveniles de distinta fase reproductiva. A ambas temperaturas, los esporofíticas juveniles provenientes del intermareal alto muestran un mayor crecimiento que aquellos que vienen del intermareal bajo (Fig. 3-15a). Entre los gametofitos, en cambio, los de mayor crecimiento son los juveniles del intermareal bajo (Fig. 3-15b). En Pucatrihue, en tanto, las diferencias entre juveniles provenientes de parentales de distintas alturas en el intermareal son significativas a lo largo de todo el rango de temperaturas (Fig. 3-15, Tabla 3-14). En este caso, en ambas fases reproductivas las plantas juveniles que provienen de la parte baja del intermareal crecen más que aquellos que vienen de la parte alta (Fig. 3-15c y d).

Tabla 3-13: Valores de F obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) realizado para el crecimiento en el largo del talo en individuos juveniles. El análisis evalúa los efectos de la temperatura de cultivo (T), la localidad de origen (L), la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Factores	(g.l)	F
Temperatura (T)	(4)	34,1 ***
Localidades (L)	(1)	0,8
Fase (F)	(1)	1,3
Altura (A)	(1)	8,8 *
T x L	(4)	12,1 ***
T x F	(4)	1,1
L x F	(1)	4,2
T x A	(4)	2,1
L x A	(1)	40,5 ***
F x A	(1)	27,8 **
T x L x F	(4)	0,3
T x L x A	(4)	1,4
T x F x A	(4)	1,0
L x F x A	(1)	0,3
T x L x F x A	(4)	4,3 ***

Tabla 3-14: Valores de F obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) realizado para el crecimiento en el largo del talo en individuos juveniles provenientes de distinto origen geográfico. El análisis evalúa los efectos de la temperatura de cultivo (T), la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Factores	(g.l)	Fray Jorge	Pucatrihue
		F	F
Temperatura (T)	(4)	27,6 ***	23,2 ***
Fase (F)	(1)	0,1	3,6
Altura (A)	(1)	3,5	87,6 ***
T x F	(4)	0,2	1,4
T x A	(4)	2,9 **	1,2 **
F x A	(1)	20,0 **	17,5
T x F x A	(4)	3,8 **	0,6

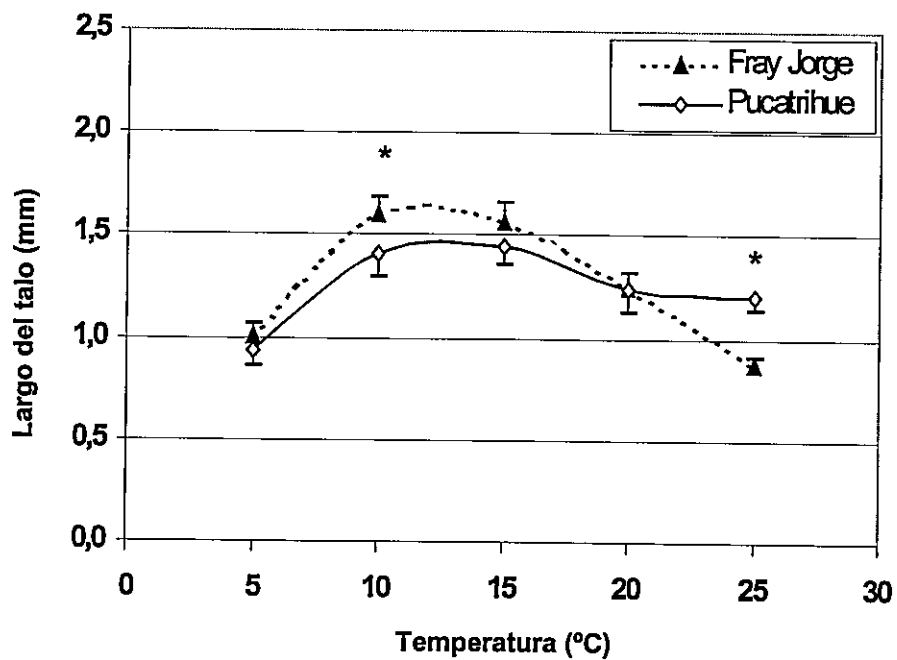


Figura 3-13: Incremento en el largo del talo en juveniles de *M. laminarioides* crecidos por un mes a diferentes temperaturas. Estos juveniles provienen de plantas colectadas en Fray Jorge y Pucatrihue. (Promedio \pm 2 EE).

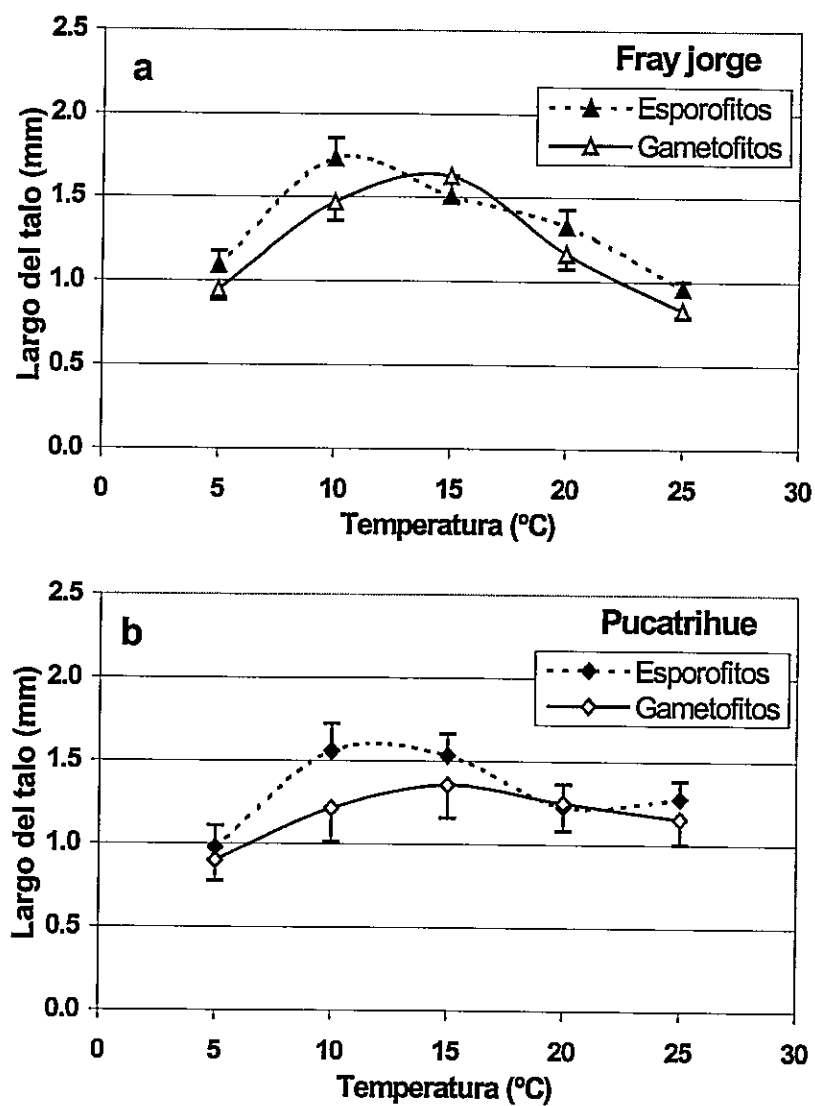


Figura 3-14: Incremento en el largo del talo en juveniles de *M. laminarioides* de ambas fases reproductivas (esporofitos y gametofitos) crecidos por un mes a diferentes temperaturas. Estos juveniles provienen plantas colectadas en Fray Jorge y Pucatrihue. (Promedio \pm 2 EE).

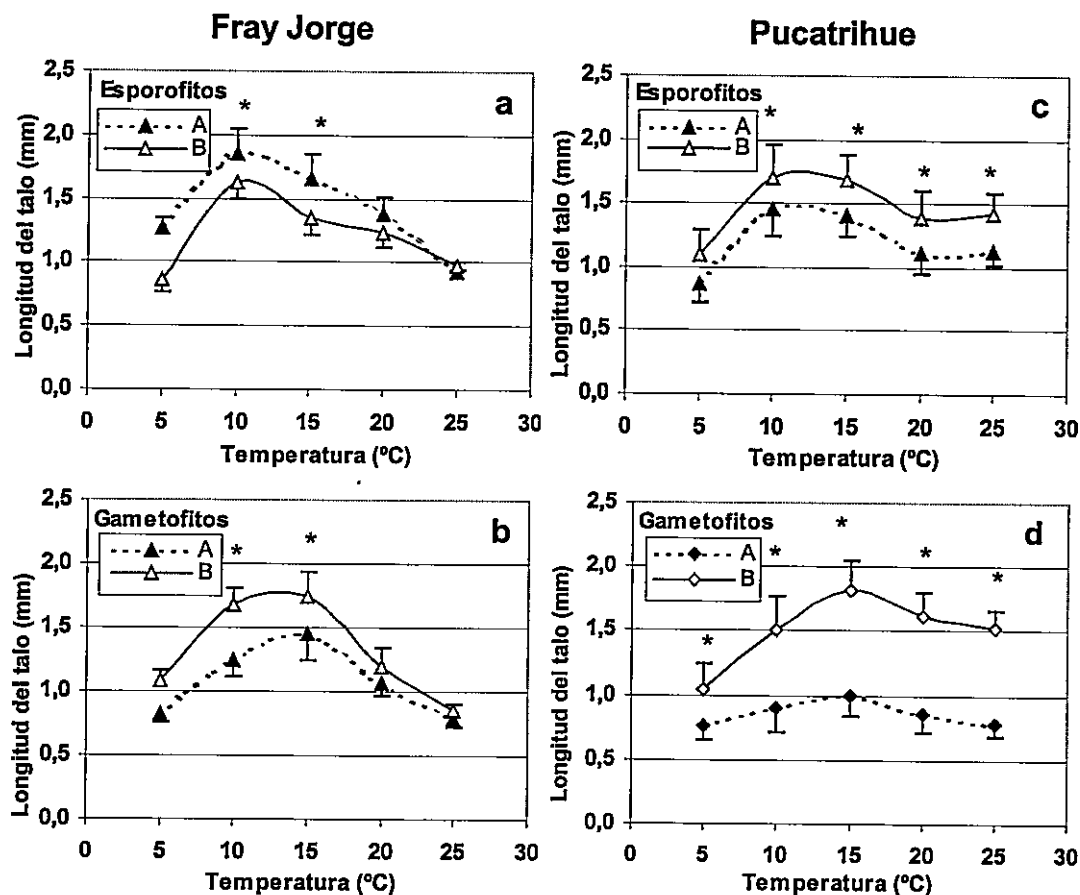


Figura 3-15: Incremento en el largo del talo en juveniles de *M. laminarioides*, de ambas fases reproductivas (esporofitos y gametofitos) crecidos por un mes a diferentes temperaturas. Estos juveniles provienen de plantas colectadas a distinta altura en el intermareal (intermareal alto (A) y bajo (B)) en Fray Jorge y Pucatrihue. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

b) Cultivo a diferentes niveles de desecación

El crecimiento en plantas juveniles expuestas a distintos tiempos de desecación difiere significativamente entre plantas de distinta localidad y fase reproductiva, aunque la magnitud y sentido de estas diferencias depende de la variable observada (Fig. 3-16; Tabla 3-15). El crecimiento estimado a través del incremento en el largo del talo muestra que los juveniles de Fray Jorge crecieron significativamente más que los de Pucatrihue en todos los tiempos de exposición (Fig. 3-16a). En los juveniles de Fray Jorge este tipo de crecimiento muestra un máximo significativamente mayor cuando las plantas son expuestas al aire por 1 y 2 h, para luego declinar a mayores tiempos de exposición alcanzando una significativa reducción a 4 h de exposición. En los juveniles de Pucatrihue el incremento del talo es significativamente mayor a 0 y 2 h de exposición, reduciéndose significativamente con 4 h de desecación. Por el contrario, el incremento en el área del disco indica que las plantas de Pucatrihue crecen significativamente más que las de Fray Jorge (Fig. 3-16b). En este caso, los juveniles de ambas localidades redujeron significativamente su crecimiento cuando fueron expuestos a 3 y 4 h de exposición a la desecación.

Al considerar separadamente cada localidad se evidencia con más claridad las diferencias entre las fases reproductivas y el diferente origen intermareal en el crecimiento de las plantas juveniles (Fig. 3-17; Tabla 3-16). En Fray Jorge, los esporofitos juveniles muestran que el crecimiento en largo del talo varió significativamente con distintos tiempos de exposición a desecación,

incrementando levemente con una hora de exposición, y reduciéndose de manera significativa cuando son expuesto por 4 h (Fig. 3-17a). En gametofitos juveniles, en cambio, la desecación afecta positivamente la elongación del talo. En este caso, las plantas expuestas por 2 y 3 h a la desecación muestran un crecimiento significativamente mayor que los esporofitos, alcanzando un máximo de crecimiento cuando son expuestos por 2 h. Este crecimiento decae rápidamente a mayor nivel de exposiciones, hasta alcanzar valores semejantes a los esporofitos expuestos por 4 h (Fig. 3-17a). Por otra parte, considerando el área del disco, también se observan diferencias significativas entre juveniles de diferente fase reproductiva (Tabla 3-16). En este caso los gametofitos juveniles muestran un crecimiento significativamente mayor en todos los niveles de desecación, salvo a exposiciones de 4h. No obstante, los juveniles de ambas fases muestran una reducción progresiva del crecimiento al aumentar el tiempo de exposición a la desecación, reducción que se hace significativa cuando son expuestas por 4 h (Fig. 3-17b).

A diferencia de lo anterior, en Pucatrihue sólo el incremento del talo, como estimador del crecimiento, muestra diferencias significativas entre juveniles de distinta fase reproductiva (Tabla 3-16). El análisis *a posteriori*, sin embargo, reveló que estas diferencias se observan sólo cuando la plantas son expuestas por 0 y 2 h a la desecación, siendo en cada caso mayor en esporofitos juveniles. En esta fase, el crecimiento sigue el mismo patrón descrito antes para la localidad, con dos máximos a los 0 y 2 h de exposición y

una reducción significativa cuando los juveniles son expuestos por 4h (Fig. 3-17c). El incremento del talo en gametófitos juveniles es reducido significativamente a 4 h de exposición. El incremento en el área del disco no mostró diferencias significativas entre juveniles de distinta fase reproductiva a ningún tiempo de exposición a la desecación (Fig. 3-17d). En ambas fases el incremento en área decrece significativamente a 3 y 4 horas de desecación.

En plantas de Fray Jorge, el origen intermareal de los juveniles mostró diferencias significativas sólo en incremento en el largo del talo (Tabla 3-17), para la altura en el intermareal en esporofitos y al nivel de la interacción con el tiempo de exposición en gametofitos (TxA en Tabla 3-17). En este contexto, los esporofitos juveniles de diferente altura muestran un máximo a diferentes tiempos de desecación: a 1 h para plantas del intermareal bajo y a 2 h para del alto (Fig. 3-18). Entre los gametofitos, en cambio, los juveniles de la parte alta muestran un mayor crecimiento que los de la parte baja a partir de las 2 h de exposición a la desecación. Sin embargo, el análisis a posteriori indicó que estas diferencias son significativas sólo a 4 h de exposición, cuando ambos grupos de plantas reducen significativamente su crecimiento. El incremento en el área del disco no mostró diferencias significativas entre juveniles de distinto origen intermareal a ningún nivel (Fig. 3-18; Tabla 3-17).

A diferencia de lo anterior, en juveniles de Pucatrihue se observaron diferencias significativas entre las plantas de distinto origen intermareal, tanto

en la longitud del talo como en el área del disco (Tabla 3-17). En relación a la longitud del talo, los esporofitos juveniles mostraron diferencias para la altura en el intermareal y en la interacción con el tiempo de exposición (TxA en Tabla 3-17). En este caso, las plantas provenientes de la parte baja del intermareal mostraron un crecimiento significativamente mayor que los de la parte alta (Fig. 3-19). Esto ocurre para los diferentes tiempos de exposición a la desecación, excepto cuando los juveniles son expuestos por 4 h. En los gametofitos las diferencias significativas se observaron sólo en la interacción (TxA en Tabla 3-17). El análisis a posteriori indicó que estas diferencias se observaron a las 2 y 4 h de exposición. En el primer caso los juveniles del intermareal alto muestran un mayor crecimiento que los de la parte baja y en el segundo caso estos últimos son los que crecen más que los del intermareal alto. En cuanto al área del disco, los esporofitos mostraron diferencias significativas para la altura en el intermareal y al nivel de la interacción. En este caso, el crecimiento de juveniles provenientes de la parte baja del intermareal es mayor que los de la parte alta en todos los tiempos de exposición, pero estas diferencias se hacen significativas cuando los juveniles son expuestos por 1 y 2 h a la desecación (Fig. 3-19). Entre los gametofitos los juveniles de ambos extremos en el intermareal sólo mostraron diferencias significativas al nivel de la interacción, diferencias que se evidencian a 1 h de exposición cuando los individuos de la parte baja crecen más que los del intermareal alto (Fig. 3-19).

Tabla 3-16: Valores de F obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) realizado para el crecimiento en el largo del talo en individuos juveniles de distinto origen geográfico. El análisis evalúa los efectos del tiempo de exposición a la desecación (T), la fase reproductiva (F) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Factores	(g.l)	Fray Jorge		Pucatrihue	
		Largo del talo	Área del disco	Largo del talo	Área del disco
		F	F	F	F
Tiempo de exp. (T)	(4)	21,5 ***	36,1 ***	11,8 ***	125,4 ***
Fase (F)	(1)	49,9 *	530,8 ***	46,5 ***	3,3
Altura (A)	(1)	2,6	0,1	27,9 ***	9,6 **
T x F	(4)	3,0	5,6 **	5,3 **	1,1
T x A	(4)	10,8 **	1,1	2,2	4,1 **
F x A	(1)	33,7 *	2,6	64,7 ***	7,1 *
T x F x A	(4)	7,7 **	2,8	5,9 ***	1,6

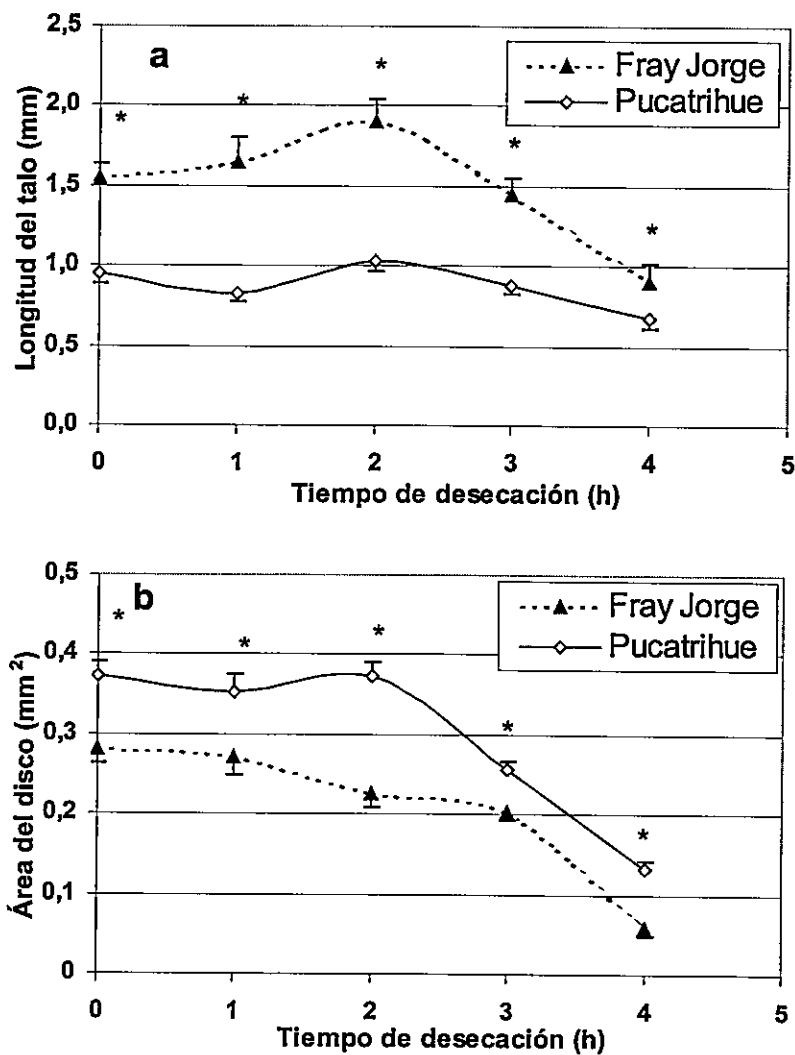


Figura 3-16: Incremento en el largo del talo (a), y área del disco (b) en juveniles de *M. laminarioides* expuestos por un mes a diferentes tiempos de desecación. Estos juveniles provienen de plantas colectadas en Fray Jorge y Pucatrihue. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

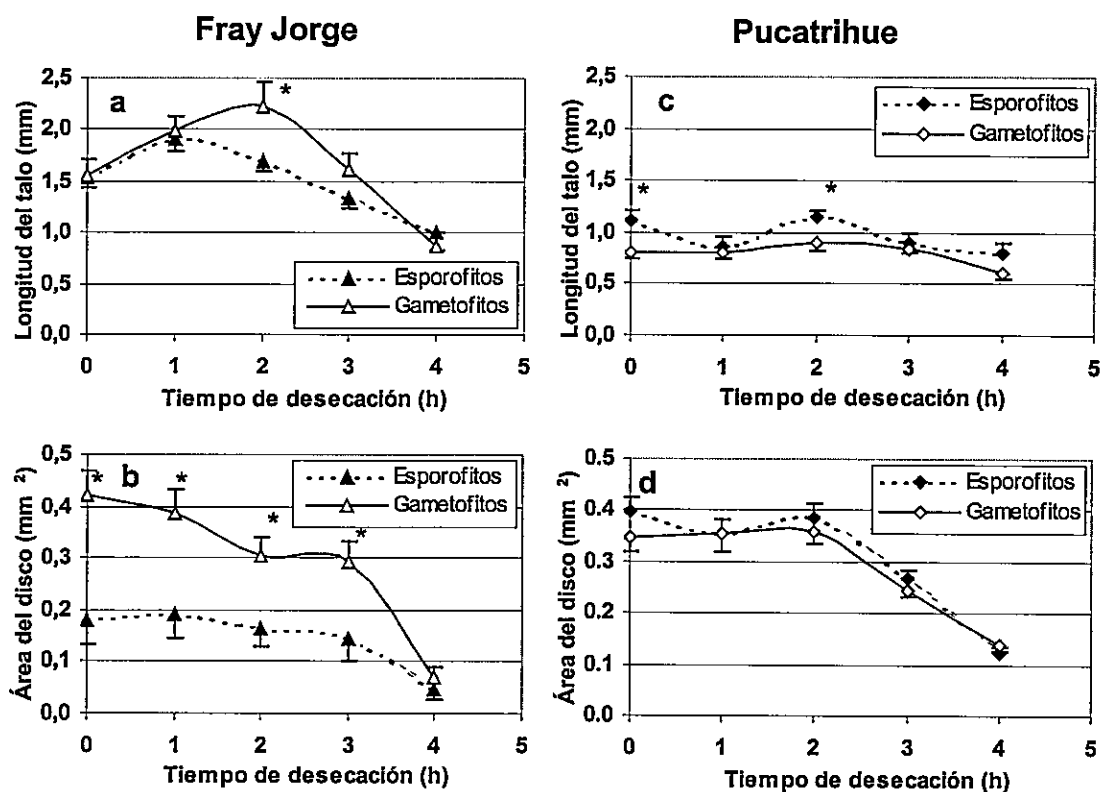


Figura 3-17: Incremento en el largo del talo (a y c) y área del disco (b y d) en juveniles de *M. laminarioides*, de ambas fases reproductivas (esporofitos, gametofitos), expuestos por un mes a diferentes tiempos de desecación. Esto juveniles provienen de plantas colectadas en Fray Jorge y Pucatrihue. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

Tabla 3-17: Valores de F obtenidos del análisis de varianza multivariado (de medidas repetidas) realizado para el crecimiento en el largo del talo y el área de disco en individuos juveniles de ambas fases reproductivas provenientes de distinto origen geográfico. El análisis evalúa los efectos del tiempos de exposición a la desecación (T) y la altura en el intermareal (A). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

		Fray Jorge		Pucatrihue	
		Largo del talo	Área del disco	Largo del talo	Área del disco
Esporofitos	(g.l.)	F	F	F	F
Tiempo de exp. (T)	(4)	11,7 ***	9,3 ***	14,3 ***	99,3 ***
Altura (A)	(1)	8,3 *	2,2	77,2 ***	23,3 ***
T x A	(4)	1,7	2,2	3,7 **	2,6 *
Gametofitos					
Tiempo de exp. (T)	(4)	11,7 **	28,5 ***	12,9 ***	65,2 ***
Altura (A)	(1)	6,9	0,5	0,5	1,0
T x A	(4)	7,3 **	2,1	8,6 ***	5,4 **

Fray Jorge

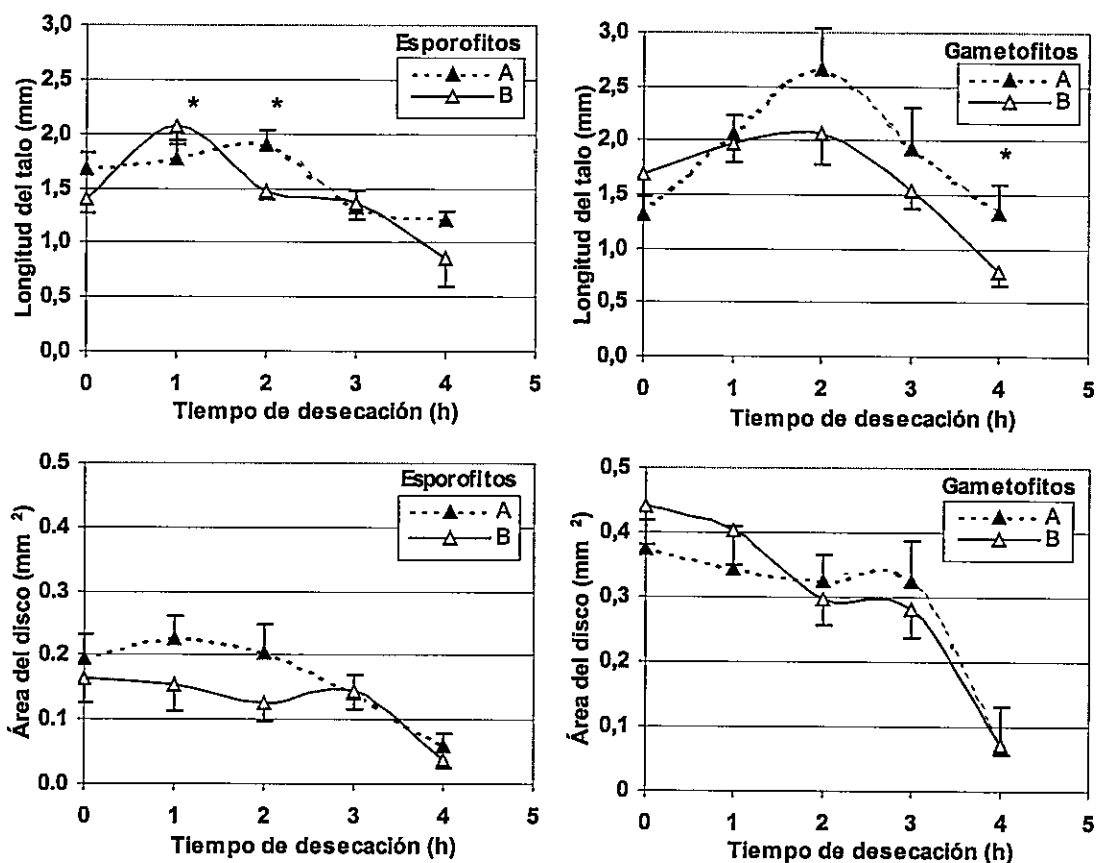


Figura 3-18: Incremento en el largo del talo y área del disco en plantas juveniles de *M. laminarioides*, de ambas fases reproductivas (esporofitos, gametofitos), expuestas por un mes a diferentes tiempos de desecación. Estos juveniles provienen de plantas colectadas a distinta altura en el intermareal (intermareal alto (A) y bajo (B)) en Fray Jorge. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

Pucatrihue

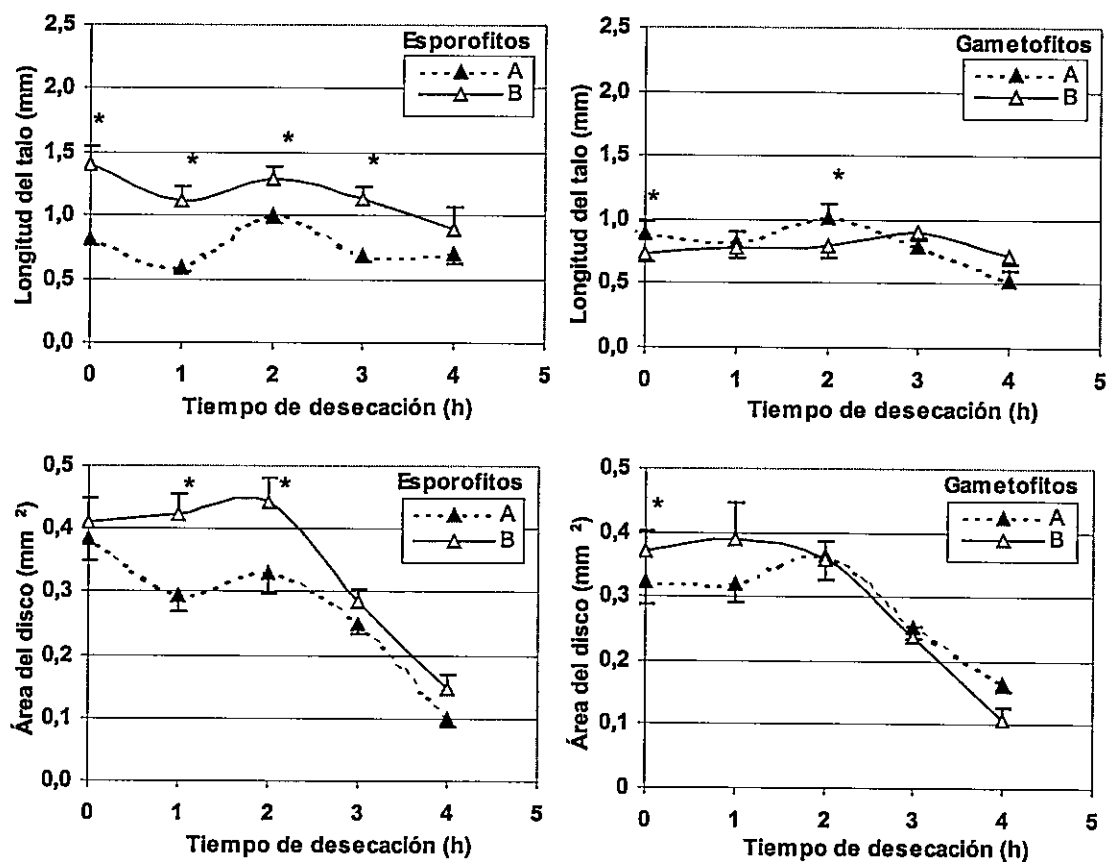


Figura 3-19: Incremento en el largo del talo y área del disco en plantas juveniles de *M. laminarioides*, de ambas fases reproductivas (esporofitos, gametofitos), expuestas por un mes a diferentes tiempos de desecación. Estos juveniles provienen de plantas colectadas a distintas alturas en el intermareal (intermareal alto (A) y bajo (B)) en Pucatrihue. Asteriscos (*) indican diferencias significativas. (Promedio \pm 2 EE).

DISCUSIÓN

Rango de tolerancia

En general, la curva de tolerancia térmica descrita en *M. laminarioides*, con un máximo común a los 15° C, es consistente con otros trabajos referidos a la misma especie donde el crecimiento de juveniles describe un comportamiento muy semejante, aunque evaluado solo entre 10° y 20° C (Hannach & Santelices 1985, Luxoro & Santelices 1989). Con relación a otras especies, el rango de tolerancia térmica descrito por *M. laminarioides* es comparable al amplio rango observado entre especies intermareales de clima temperado frío (Lüning 1990, Wiencke & Dieck 1990, Peter & Breemam 1993; Tabla 3-18). Entre estas especies, un amplio rango de tolerancia a la temperatura también está asociado a una extensa distribución geográfica.

En cuanto a la desecación, la completa recuperación de la eficiencia fotosintética, aún después de perder el 60% del contenido hídrico, revela un amplio rango de tolerancia en *M. laminarioides*. No obstante, este rango es sólo de nivel intermedio cuando se le compara a especies que recuperan completamente su actividad fotosintética luego de perder entre el 90 – 95% de agua y aquellas que no pueden hacerlo cuando pierden más del 10% de su contenido hídrico (Tabla 3-19).

La comparación de la curva de tolerancia a la temperatura y la desecación descrita por individuos de distinto origen no reveló diferencias en la

amplitud del rango, sino en la magnitud (óptimo) de la respuesta. Esto quiere decir que, al interior de este rango, la plasticidad fisiológica de *M. laminarioides* permite a cada individuo responder en el amplio espectro variación evaluado. Sin embargo, no todos los individuos responde de la misma forma, es decir, no todos muestran la misma magnitud de respuesta. En este contexto, el metabolismo fotosintético revela una gran flexibilidad ante los factores evaluados.

La marcada similitud de la fotosíntesis, medida bajo diferentes temperaturas de aclimatación y bajo estrés térmico, entre individuos de la misma población y de localidades distantes, evidencia una gran plasticidad de este mecanismo fisiológico ante el espectro térmico evaluado. El mecanismo fotosintético es reconocidamente flexible ante factores ambientales como la luz y la temperatura (Falkowski & Raven 1997). La acción de una compleja batería de cambios le permite responder tanto a la frecuencia como a la intensidad de factores ambientales (Davison 1991, Falkowski & Raven 1997, Lazar 1999), optimizando así el uso de la energía radiante. Por ejemplo, el estrés por alta temperatura genera inestabilidad en la actividad celular, particularmente en el sistema fotosintético (Davison 1991). Sus efectos son evidenciados por un aumento en la fluorescencia basal (F_o), como ocurrió en las plantas aclimatadas a 10° cuando fueron expuestas a 30°. Este incremento de F_o tiene como consecuencia una desactivación del PSII (Krause 1988, Krüger et al. 1997, Lazar 1999) como resultado de la desconexión del centro de reacción del

complejo cosechador de energía. Esto ocurre, normalmente, bajo condiciones de estrés y, dependiendo de la intensidad de este, puede alcanzar una desconexión irreversible y daño de los fotosistemas (Krause 1988, Srivastava & Strasser 1996, Lazar 1999). Complementariamente, las plantas aclimatadas a 10° muestran un incremento significativo de la ϕ_{P_0} y en ϕ_{P_0}' cuando son expuestas a 30°. Probablemente, este aumento en la eficiencia fotosintética se deba a un mejoramiento del flujo a través la cadena transportadora de electrones como ocurre a temperaturas altas (Falkowski & Raven 1997, Ensminger et al. 2001), compensando en parte la desactivación de los fotosistemas. Por otra parte, los mecanismos de aclimatación del aparato fotosintético le permiten responder con flexibilidad a cambios más permanentes del medio. Así, por ejemplo, el efecto neto de la variación en los valores de α , la **Resp** y **P_{max}**, observada a distintas temperaturas de aclimatación, permite mantener con relativa independencia térmica parámetros como la intensidad luminosa de compensación (I_c) y de saturación (I_k) fotosintética (Davison 1991). Los ajustes metabólicos que permite esta aclimatación a diferentes temperaturas de crecimiento incluyen cambios en la composición de pigmentos fotosintéticos, en el nivel de saturación de los lípidos de las membranas y en la actividad enzimática (Davison 1991, Klüber & Davison 1993, Falkowski & Raven 1997).

Aunque existe poca información respecto del mecanismo que permite a la fotosíntesis responder con flexibilidad a un amplio espectro de desecación, los antecedentes muestran cierta relación con las propiedades biofísicas del aparato fotosintético. Niveles moderados de desecación no afectan negativamente el mecanismo fotosintético (Wiltens et al. 1978, Havaux 1992, Lu & Zhang 1999). Por el contrario, sus efectos parecen favorecer la estabilidad de los PSII, mejorar el flujo a través de la cadena transportadora de electrones y activar transitoriamente los fotosistemas inactivos. Todo lo cual puede ser parte del incremento de la eficiencia fotosintética observada durante el proceso de desecación. En algunas especies de macroalgas, niveles moderados de desecación pueden mejorar la tasa fotosintética debido a que son capaces de usar CO₂ atmosférico (Madsen & Maberly 1991, Einav et al. 1995). La eventual ocurrencia de esto en *M. laminarioides* podría explicar el efecto positivo de la desecación sobre la elongación del talo en juveniles observado a niveles intermedios de pérdida agua. No obstante, niveles extremos de desecación afectan directamente la cadena transportadora de electrones y la estabilidad de los fotosistemas. Aparentemente, el aumento en la concentración intracelular de electrolitos provoca cambios conformacionales en las proteínas de membrana, interrumpiendo el flujo de electrones y desacoplando los fotosistemas del sistema de transporte de electrones (Wiltens et al. 1978). En este contexto, la capacidad de desconectar los fotosistemas para evitar un daño irreversible puede ser parte del mecanismo que permite tolerar niveles altos de desecación.

Adicionalmente, las diferencias observadas entre las plantas aclimatadas y no aclimatadas claramente demuestran que en *M. laminarioides* la plasticidad del mecanismo fotosintético ante la desecación puede ser modulada por procesos de aclimatación. La amplitud del rango de tolerancia puede ser reducido, como se observó con plantas aclimatadas al laboratorio, o llegar a ser más extenso de lo que se evidenció en plantas no aclimatadas. En terreno, por ejemplo, las plantas de la parte alta del intermareal pueden llegar a perder, en un día asoleado de verano, alrededor del 70 – 75 % de su contenido hídrico y aún ser capaces de recuperar completamente su eficiencia fotosintética (Cap. 2).

Diferencias en la curva de tolerancia a nivel geográfico

A pesar de la plasticidad en la fotosíntesis, las diferencias observadas entre localidades, tanto en metabolismo fotosintético como en crecimiento, constituyen evidencias de diferenciación entre poblaciones. En relación con la temperatura, ambos tipos de respuestas (fotosíntesis y crecimiento) sugieren que la variabilidad térmica a lo largo del rango geográfico promueve una diferenciación ecotípica, particularmente en relación con la magnitud (óptimo) de la curva de respuesta a la temperatura. Los estudios de la tolerancia térmica en algas se han concentrado en la búsqueda de diferenciación en las temperaturas límites de tolerancia (Breeman 1988, Peter & Breeman 1993), revelando gran estabilidad en el rango de tolerancia en muchas especies (Tabla 3-18). Sin embargo, la ocurrencia de diferenciación (ecoclinal o ecotípica) en

respuesta a la temperatura ha sido reportada en distintos trabajos, tanto en relación con la amplitud como con el óptimo de tolerancia térmica (Tabla 3-18). En general, en la mayoría de estos trabajos la evaluación fue realizada entre poblaciones disjuntas anfiocéánicas (Breeman 1988, Cambridge et al. 1990, Peters & Breeman 1992) y/o anfiecuatoriales (Peters & Breeman 1992, Bischoff & Wiencke 1995), o entre poblaciones presentes en distintas regiones biogeográficas (Pakker et al. 1995), donde la historia de aislamiento, las diferencias en la fluctuación térmica y la incidencia de eventos históricos (i.e. ciclos glaciales – interglaciales) son determinantes en la ocurrencia de diferenciación genética. Factores como éstos no parecen ser relevantes en la diferenciación evidenciada en *M. laminarioides*. En este contexto, la diferencia entre la amplitud del rango de tolerancia descrita en este estudio y el observado en plantas gametofíticas de *M. laminarioides*, recolectadas en las islas subantárticas (56° 32' S; Wiencke & Dieck 1990), sugiere que la evaluación de un área geográfica más extensa podría haber evidenciado una diferenciación geográfica mayor, no sólo en relación a cambios en la magnitud (óptimo) de la curva, sino que también en la amplitud del rango de tolerancia térmico.

Tabla 3-18: Rango (temperatura inferior y superior) y óptimo térmico para el crecimiento de macroalgas de diferente origen geográfico. (a) Indica diferencias ecotípicas en los límites u óptimo térmico.

Especie	Origen geográfico	Temperatura inferior	Temperatura superior	Temperatura óptima	Referencias
<u>Dictyopteris justii</u>					
<i>Coelothrix irregularis</i>	Tropical	18	31	25-28	Pakker et al. 1995
<i>Lophocladia trichocladus</i>	Templado-cálido	18	33	28	Pakker et al. 1995
<i>Cladophoropsis membranacea</i>	Templado-cálido	18	33	25	Pakker et al. 1995
<i>Microdictyon boergesenii</i>	Templado-cálido	15	35	30-32	Pakker et al. 1994
<i>Wurdemannia miniata</i>	Templado-cálido	18	33	25-30	Pakker et al. 1995
<i>Digenea simplex</i>	Templado-cálido	15	33	25	Pakker et al. 1995
<i>Champia parvula</i>	Templado-cálido	13-15 ^a	33-35 ^a	20-30 ^a	Orfanidis & Breeman 1996
<i>Cladophora coelothrix</i>	Templado-cálido	5-18 ^a	30-33 ^a	20-30 ^a	Orfanidis & Breeman 1996
<i>Cladophora vagavunda</i>	Templado	15-20 ^a	30	25-30	Cambridge et al 1984
<i>Cladophora aldidia</i>	Templado	15	30-35 ^a	25-30	Cambridge et al 1984
<i>Cladophora laetevirens</i>	Templado	15	35	25-30	Cambridge et al 1984
<i>Gracilaria tikvahiae</i>	Templado	15	30	25-30 ^a	Cambridge et al 1987
<i>Laminaria digitata</i>	Templado	10-15 ^a	34	20	McLachlan & Bird 1984
<i>Laminaria sacarina</i>	Templado	0	20	10	Bolton & Lüning 1982
<i>Phycodrys rubens</i>	Templado	0	20	10	Bolton & Lüning 1982
<i>Desmarestia sp.</i>	Templado-frío	-1,5-0 ^a	18-20 ^a	5-15 ^a	Voskoboinikov et al. 1996
<i>Chordaria magellanica</i>	Templado-frío	0	20	15	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Enteromorpha clathrata</i>	Templado-frío	0	20	5-10	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	Templado-frío	0	20	5-15	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Desmarestia menziesii</i>	Templado-frío	0	25	5-20	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Adenocystis utricularis</i>	Antártico	0	10	5	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Urospora penicilliformis</i>	Antártico	0	15	10	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Prasiola crispa</i>	Antártico	0	15	5	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Acrosiphonia arcta</i>	Antártico	0	20	05-10	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Ullothrix implexa</i>	Antártico	0	15	5	Wiencke & tom Dieck 1990
<i>Geminocarpus geminatus</i>	Antártico	0	20	0-10	Wiencke & tom Dieck 1990
	Antártico	0	10	5-10	Wiencke & tom Dieck 1990

Tabla 3- 19: Rango de tolerancia a la desecación en macrolagas distribuidas a diferentes alturas en el intermareal (submareal). (ª) Porcentaje máximo de agua tisular que las plantas pueden perder y aún recupera casi completamente la tasa fotosintética inicial (previo a la desecación). (º) Tiempo, luego de la reinmersión, requerido para o en el que fue evaluada (+) la recuperación completa de la tasa fotosintética inicial.

Especies	Origen intermareal	Pérdida máxima de aguaª (%)	Tiempo de recuperaciónº (h)	Referencias
<i>Fucus spiralis</i>	intermareal alto	80-85	2	Beer & Kautsky 1992
<i>Botrychia arbuscula</i>	intermareal alto	70	2	Brown 1987
<i>Apophoela lyalli</i>	intermareal alto	70	2	Brown 1987
<i>Pelevia canaliculata</i>	intermareal alto	95	2	Dring 1982
<i>Porphyr dentata</i>	intermareal alto	98	24 +	Abe et al. 2001
<i>Monostroma nitidum</i>	intermareal alto	90	24 +	Abe et al. 2001
<i>Gloiopeltis complanata</i>	intermareal alto	97	24 +	Abe et al. 2001
<i>Enteromorpha linza</i>	intermareal alto	60	24 +	Abe et al. 2001
<i>Fucus vesiculosus</i>	intermareal medio	80	1	Beer & Kautsky 1992
<i>Ulva pertusa</i>	intermareal medio	60	24 +	Abe et al. 2001
<i>Myelophycus simplex</i>	intermareal medio	93	24 +	Abe et al. 2001
<i>Gracilaria asiatica</i>	intermareal medio	90	24 +	Abe et al. 2001
<i>Ishige akamuræ</i>	intermareal medio	90	24 +	Abe et al. 2001
<i>Gloiopeltis furcata</i>	intermareal medio	97	24 +	Abe et al. 2001
<i>Petalonia fascia</i>	intermareal medio	0	24 +	Abe et al. 2001
<i>Sargassum thumbergii</i>	intermareal medio	0	24 +	Abe et al. 2001
<i>Hizikia fusiformis</i>	intermaeal bajo	0	24 +	Abe et al. 2001
<i>Padina aborescens</i>	intermaeal bajo	0	24 +	Abe et al. 2001
<i>Boodlea coacta</i>	intermaeal bajo	0	24 +	Abe et al. 2001
<i>Fucus serratus</i>	intermaeal bajo	60-70	24 +	Abe et al. 2001
<i>Hormosira banksii</i>	intermaeal bajo	25	2	Beer & Kautsky 1992
<i>Xiphophora chondrophylla</i>	intermaeal bajo	25	2	Brown 1987
<i>Gracilaria tikvahiae</i>	submareal	20-30	18-20	Hodgson 1984
<i>Durvillaea willana</i>	submareal	10	2	Brown 1987
<i>Laminaria digitata</i>	submareal	25	2	Dring 1982
<i>Ahnfeltopsis flabelliformis</i>	submareal	0	24 +	Abe et al. 2001
<i>Gelidium elegans</i>	submareal	0	24 +	Abe et al. 2001

En la respuesta a la desecación, la diferenciación entre localidades no parece responder al gradiente de emersión. Aunque la desecación afecta el crecimiento de los individuos de ambas poblaciones, sus diferencias son relativamente independientes del gradiente de desecación intermareal. Las diferencias entre localidades muestran claramente una estrategia de crecimiento diferencial entre los juveniles, donde se enfatiza principalmente el crecimiento vertical (talo) u horizontal (disco). Una diferenciación como ésta, entre localidades geográficamente tan distantes, puede ser el resultado de la adaptación a condiciones ambientales locales, favorecida por el aislamiento relativo entre ambas poblaciones, y/o los efectos de la deriva génica.

Diferencias en la curva de tolerancia a nivel local

Las diferencias observadas a nivel local evidencian con mayor claridad una diferenciación en la magnitud de respuesta ante un gradiente térmico y de desecación. Los juveniles provenientes de la parte alta y baja del cinturón intermareal, cultivados desde esporas bajo condiciones similares, mostraron diferencias significativas en crecimiento. Estas diferencias podrían ser, en parte, atribuidas a un efecto materno (i.e. efecto sobre el fenotípicos de la progenie asociado con el ambiente de la planta materna). En plantas superiores, por ejemplo, el tamaño de la semilla puede ser afectado por los recursos disponibles para la planta madre, lo cual puede afectar considerablemente la emergencia, la sobrevivencia y aún el crecimiento de las plántulas (Bazzaz 1996). Sin embargo, en macroalgas no existen antecedentes que permitan

inferir algún efecto de esta naturaleza. En consecuencia, estos resultados sugieren fuertemente una diferenciación genética entre las plantas juveniles de ambos extremos en el intermareal. En este contexto, son pocos los trabajos que evidencian una diferenciación genética a tan corta distancia en la zona intermareal (Innes 1988, Williams & Di Fiori 1996, Wright et al. 2000, Zuccarello et al. 2001). En todos ellos la diferenciación ha sido descrita a través de marcadores genéticos y, de acuerdo a sus resultados, han insinuado los efectos del gradiente intermareal.

Los antecedentes indican que en *M. laminarioides* la diferenciación genética neutra puede ocurrir a partir de 25-30 m (Faugeron et al. 2001), con lo cual la diferenciación a reducida escala espacial, como la evidenciada en este estudio, no es inducida o mantenida por restricciones del flujo génico. Probablemente, en el intermareal las esporas se asientan en una área mucho más extensa que la ocupada por los adultos y son las condiciones ambientales las que restringen tanto la distribución de la población, como la variabilidad genética. En este sentido, la diferenciación entre juveniles de diferentes alturas en el intermareal podría ser explicado por selección diferencial a lo largo del gradiente intermareal. Esto implica que en el acervo genético de la población existen individuos con atributos diferenciales que permiten que algunos juveniles crezcan mejor que otros a ciertos niveles de mareas. En este contexto, la diferenciación local observada puede ser el resultado de la selección sobre tasa de crecimiento o sobre otro carácter ligado a ésta. Por ejemplo, una mayor

tasa de crecimiento en la elongación de talo puede ser ventajosa en la parte baja del intermareal, donde la competencia intraespecífica puede ser alta. Una tasa de crecimiento reducida, en cambio, podría involucrar una inversión diferencial de la energía hacia la formación de estructuras fisiológicas o morfológicas más ventajosas en condiciones ambientales extremas. Esto último sugiere que la reducción del tamaño de las plantas de *M. laminarioides* que normalmente se observa hacia la parte alta del intermareal podría tener en parte una base genética.

La variabilidad del patrón de diferenciación local observado evidencia la importancia relativa de la temperatura y la desecación en la respuesta diferencial de crecimiento de juveniles. En Fray Jorge las diferencias entre individuos de diferentes alturas en el intermareal son evidenciadas a través del gradiente térmico y de desecación, y en este sentido ambos factores son determinantes en el patrón de diferenciación. En Pucatrihue, en tanto, la temperatura y la desecación son sólo parcialmente responsables de la respuesta diferencial que se observa entre plantas de ambas alturas en el intermareal. Las diferencias en la tasa de crecimiento entre juveniles de ambas alturas en el intermareal, particularmente entre esporofitos, ocurren independientemente de la temperatura y la desecación. Aunque estos factores afectan el crecimiento de los juveniles, las diferencias observadas pueden responder a otros factores ambientales que varíen verticalmente en el intermareal. Estos resultados sugieren que el patrón de diferenciación local

depende de las condiciones particulares de cada localidad en relación a los factores ambientales que participan en el gradiente intermareal y de la variabilidad genética presente en la población local. Así, el sentido y la magnitud de la diferenciación de cada población local pueden diferir una de otra.

Las condiciones particulares de cada localidad también parecen afectar las diferencias entre fases reproductivas. En el experimento de desecación, por ejemplo, tanto en Fray Jorge como en Pucatrihue, los juveniles de ambas fases reproductivas muestran diferencias en cuanto al incremento en longitud del talo, pero estas diferencias varían en magnitud y sentido de una localidad a otra. En Fray Jorge los gametofitos crecen significativamente más que los esporofitos cuando son expuestos a la desecación por 2 h, en tanto que en Pucatrihue son los juveniles de esta última fase los que muestran un mayor crecimiento bajo el mismo tratamiento. Estos resultados sugieren una compleja relación entre la variabilidad genética de los rasgos que afectan el crecimiento y las condiciones ambientales locales, determinando diferentes resultados en localidades distintas. En este contexto, la discrepancia entre la falta de diferencias entre fases reproductivas con respecto a la temperatura y las diferencias reportadas entre gametofitos y esporofitos juveniles de otras localidades (Hannach & Santelices 1986, Luxoro & Santelices 1988), puede ser atribuida a las características propias de cada localidad.

CONCLUSIONES

Los resultados de este capítulo indican que las plantas de *M. laminarioides*, independiente de su origen geográfico, tienen una amplia curva de respuesta a factores ambientales tales como la temperatura y la desecación, manteniendo una tasa de fotosíntesis positiva en un amplio rango térmico (entre 5 y 25° C), y una gran estabilidad fotosintética cuando los individuos son expuestos transitoriamente a altas temperaturas (30° C). Las poblaciones estudiadas pueden, además, incrementar su eficiencia fotosintética a niveles moderados de desecación. La eficiencia fotosintética se reduce significativamente a mayor pérdida de agua de las frondas, pero se recupera completamente aún después de perder hasta el 60% de su contenido hídrico. Además, las plantas adultas de esta especie son capaces de aclimatarse a diferentes historias de estrés por desecación. Todo lo anterior caracteriza a *M. laminarioides* como una especie con una amplia curva de tolerancia fisiológica que le permite sobrevivir en el amplio rango de variabilidad ambiental que existe en su hábitat natural. En este contexto, la plasticidad fisiológica de la fotosíntesis cumple un rol determinante en la adecuación de los individuos ante la heterogeneidad ambiental.

Paralelamente, el presente estudio también detectó diferencias en la respuesta a la temperatura y la desecación entre individuos de distinto origen geográfico, distintos niveles en el intermareal y diferentes fases reproductivas. Estas diferencias no involucraron cambios en la amplitud de rango de

tolerancia, sino en la magnitud (óptimo) de la curva respuesta a los factores ambientales evaluados. Consideradas como ejemplos de diferenciación genética, estas diferencias fueron observadas en relación tanto con el metabolismo fotosintético como al crecimiento.

En consecuencia, en *M. laminarioides* tanto la plasticidad fisiológica como la diferenciación genética permiten responder al gradiente ambiental en el que la especie vive. Ello implica que ante la variabilidad ambiental de su hábitat los individuos de esta especie pueden responder con una amplia plasticidad fisiológica, pero donde las condiciones ambientales ejercen una fuerte presión selectiva, la diversidad genética será reducida, seleccionando a los individuos con diferentes óptimos de respuesta en distintas partes del gradiente ambiental.

CAPÍTULO IV

Variación genética en *M. laminarioides*

INTRODUCCIÓN

En general, la estructuración de la variación genética es influenciada fuertemente por los atributos propios de las especies que determinen o afecten su capacidad de dispersión, y por los factores ambientales que condicionen la distribución de la diversidad genética (Loveless & Hamrick 1984, Eperson 1993, Linhart & Grant 1996). En macroalgas, por ejemplo, las diferencias en capacidad de dispersión podrían explicar la amplia variación en el grado de diferenciación entre poblaciones (Sosa & Lindstrom 1999). En algunos casos, la dispersión de los gametos se extiende sólo a unos pocos metros, como ocurre en *Silvetia compressa* o *Postelsia palmaeformis*, y en consecuencia la variabilidad genética muestra una estructuración a muy pequeña escala espacial (Williams & Di Fiori 1996, Coyer et al 1997). En otras especies, en cambio, que presentan estructuras (frondas reproductivas flotantes) que le capacitan para dispersión a larga distancia, como en *Halidrys dioica*, la estructuración genética sólo es evidente a una gran escala geográfica, del orden de kilómetros (Lu & Williams 1994).

Sin embargo, a escala geográfica, la diferenciación entre poblaciones puede ser el resultado tanto de la capacidad de dispersión como de procesos históricos de la especie o el ambiente (Slatkin 1993). A distintas escalas, los factores ambientales, como disponibilidad de hábitat, barreras geográficas o corrientes marinas, pueden afectar la extensión y/o dirección de la dispersión y,

en consecuencia, la distribución de la variabilidad (Palumbi 1994). En este contexto, la escasa evidencia existente sugiere que en macroalgas también se observan factores como los mencionados. En algunos casos la diferenciación genética a diferentes escalas espaciales ha sido relacionada a los efectos de las glaciaciones (van Oppen et al. 1995), las barreras geográficas como playas de arena o desembocaduras de ríos (Faugeron 2001), y corrientes marinas (Billot 1999).

Por su parte, la variación de los factores ambientales también puede actuar sobre las poblaciones y generar diferenciación genética (Linhart & Grant 1996). Esta respuesta ha sido reconocida en algas marinas, indicando diferencias ecotípicas particularmente en caracteres morfológicos y fisiológicos (Russell 1986, Gerard & DuBois 1988). Esta diferenciación genética relacionada con selección ha sido identificada en una escala espacial amplia. Sin embargo, la selección natural a pequeña escala (del orden de metros) también puede ser responsable de diferenciación genética a escala reducida (Linhart & Grant 1996). Si bien el flujo génico puede anular la diferenciación a esta escala, una fuerza selectiva lo suficientemente intensa podría contrarrestar los efectos del flujo génico (Linhart & Grant 1996). En macroalgas, la información relacionada con el efecto de la selección a pequeña escala es escasa. Algunos trabajos han evidenciado una alta estructuración de alelos o haplotipos correlacionada espacialmente (en unos pocos metros) con la altura en el intermareal (Innes 1988, Williams & Di Fiori 1996, Zuccarello et al. 1999). Los marcadores

utilizados en estos estudios son considerados normalmente neutros. No obstante, éstos pueden evidenciar los efectos selectivos del ambiente debido a que algunos de ellos pueden estar sujetos a selección, como en el caso de ciertas aloenzimas (Power et al. 1991), o por estar ligados a caracteres selectivos (Godelle et al. 1998). Estos resultados sugieren que en poblaciones de macroalgas la acción de la selección natural puede ser importante en la estructuración de la variabilidad genética a escala micro-geográfica.

En este contexto, ¿cómo se relaciona la diferenciación ecofisiológicas, evidenciadas en *M. laminarioides* entre plantas de distinto origen geográfico e intermareal, con la estructuración de la variabilidad genética en esta especie? ¿Es esta adaptación local favorecida por las restricciones al flujo génico o una limitada capacidad de dispersión? o ¿Es la diferenciación en la respuesta ecofisiológica el resultado de la fuerte presión selectiva ejercida por el gradiente ambiental en que vive esta especie?

A lo largo de su distribución *M. laminarioides* crece sobre plataformas rocosas expuestas al oleaje (Fig. 2-1; Hannach & Waaland 1986). Estos sistemas rocosos se distribuyen de manera fragmentada a lo largo de la costa, interrumpidos por estuarios y playas de arena de variada extensión. En estas circunstancias, el flujo génico debe ocurrir de manera progresiva entre parches o poblaciones próximas y, por consiguiente, el grado de diferenciación entre poblaciones está estrechamente relacionado con la escala espacial. Los

estudios de Faugeron (2002) han revelado en *M. laminarioides* una estrecha relación entre la diferenciación genética y la escala espacial. Aunque también se ha señalado que playas de arena y desembocaduras de ríos pueden constituir importantes barreras para el flujo génico entre localidades (Faugeron et al 2001).

Al nivel local, en una extensión rocosa donde *M. laminarioides* se distribuye en forma relativamente continua, la extensión del flujo génico debe ser determinante en la estructuración de la variabilidad genética de esta especie. Como en otras algas rojas, se estima que la dispersión de esporas y gametos de *M. laminarioides* es muy restringida (Camus & Hoffmann 1989, Santelices 1990). Es probable que por esta razón los estudios realizados en esta especie (Faugeron et al 2001, Faugeron 2002) revelan una significativa y consistente diferenciación genética a partir de los 25-30 m, indicando cierta homogeneidad genética al interior de esta área, probablemente mantenida por el flujo génico. Sin embargo, a esta escala micro-geográfica *M. laminarioides* se distribuye en un ambiente altamente heterogéneo, definido por irregularidades topográficas y un gradiente de condiciones ambientales generado por los cambios de marea. Es probable que también esta heterogeneidad afecte la estructuración de la variabilidad genética a pequeña escala. Las diferencias ecofisiológicas observadas en esta especie entre plantas de diferentes alturas en el intermareal sugieren la acción de una intensa fuerza selectiva en el

intermareal. Por lo cual es probable que la estructuración de la variabilidad genética esté relacionada con el gradiente vertical de la zona intermareal.

De acuerdo a estos antecedentes, el estudio de la variabilidad genética en *M. laminarioides* tiene por objeto evidenciar el grado de diferenciación genética entre poblaciones al nivel regional, distinguir la extensión del flujo génico, o la escala de diferenciación a nivel local, y verificar si la distribución de la variabilidad genética local se relaciona con el gradiente intermareal.

La mayoría de los estudios sobre la variabilidad genética en algas han hecho uso de marcadores aloenzimáticos (para revisión ver Sosa & Lindstrom 1999), sistemas que en estos organismos han mostrado ausencia o reducido polimorfismo (Valero et al. 2001). Dado que la utilidad de un marcador genético depende principalmente del grado de polimorfismo de los loci estudiados, el uso de aloenzimas en macroalgas sólo permite en la mayoría de los casos interpretaciones tentativas. El desarrollo reciente de técnicas moleculares (basadas en fragmentos de DNA) ha permitido el uso de diferentes marcadores en el estudio de la variabilidad genética en macroalgas (i.e. Coyer et al. 1995, 1997, van Oppen et al 1996, Billot 1999, Zuccarello 1999). El alto polimorfismo que evidencian estos marcadores ha posibilitado la investigación especialmente a nivel poblacional. Entre estos, los marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA), usados en este estudio, son considerados marcadores útiles para examinar los patrones de estructuración de la variabilidad genética (Parker

et al. 1998). La técnica que permite su implementación es económica y de fácil desarrollo, y sus resultados permiten obtener un gran número de loci polimórficos. Su principal inconveniente es la alta sensibilidad de los resultados a las condiciones de amplificación de los fragmentos de DNA, debido al uso de partidores inespecíficos y relativamente pequeños. No obstante, el desarrollo de un protocolo riguroso en la extracción del DNA y la estandarización de las condiciones de PCR y electroforesis permite minimizar los inconvenientes de esta técnica (Harris 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia de muestreo

Para detectar la diferenciación genética en el ámbito regional las muestras fueron colectadas en diferentes localidades a lo largo de la distribución de *M. laminarioides* (Fig. 4-1). Las localidades incluidas en este estudio corresponden a Fray Jorge (30° 40' S), Maitencillo (32° 38' S), Pucatrihue (40° 28' S), Mar Brava en la costa oeste de Chiloé (41° 48' S), y San Juan cercana a la ciudad de Punta Arenas (53° 48'). La distancia entre estas localidades fluctuó entre 130 Km (entre Chiloé y Pucatrihue) y 2300 Km (entre Punta Arenas y Fray Jorge) (Fig. 4-2a). Las regiones fueron definidas latitudinalmente agrupando las localidades más cercanas. De este modo, se consideraron las regiones centro-norte, constituida por Fray Jorge y Maitencillo (separadas por 250 Km), centro-sur, conformada por Pucatrihue y Chiloé (separadas por 130 Km), y sur que incluye sólo a Punta Arenas (Fig. 4-2c). La distancia entre estas regiones varió entre 750 Km (entre la región centro-norte y centro-sur) y 1170 Km (entre la región centro-sur y sur)

Complementariamente, para evidenciar la estructuración espacial de la variabilidad genética al nivel local los individuos fueron colectados siguiendo un esquema espacialmente jerárquico. En cada localidad fue definido uno o dos sitios (distantes por 150 o 200 m) de muestreo, y en cada uno de ellos fueron muestreados cuatro cuadrantes (de 1 m² cada uno) ordenados en dos parcelas

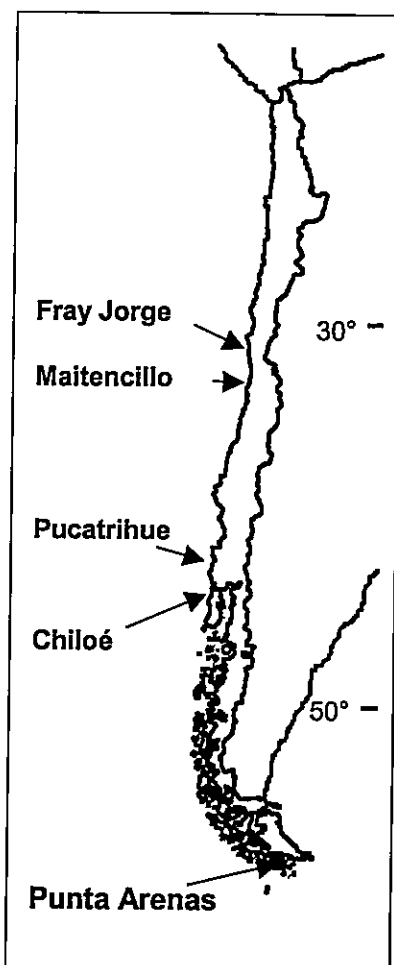


Figura 4-1: Ubicación geográfica de las localidades usadas en el estudio de diversidad genética en *M. laminarioides*.

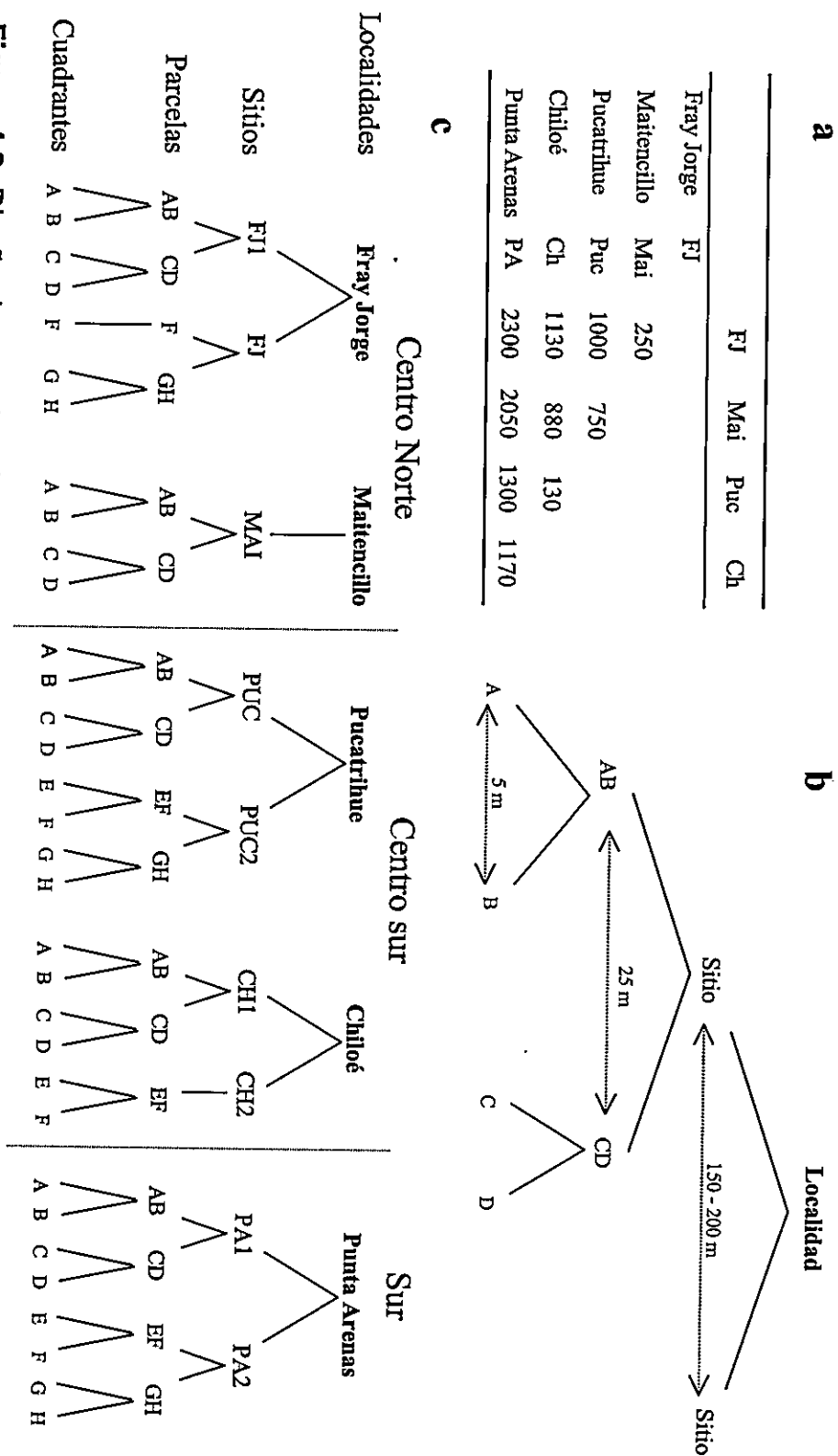


Figura 4-2: Diseño de muestreo jerárquico a nivel local y regional. a) Distancia geográfica (en Km) entre localidades estudiadas. b) Esquema que indica la distancia a la que fueron tomadas las muestras en una localidad. c) Esquema de muestreo en diferentes localidades. La línea vertical punteada indica la separación entre regiones.

(distantes por aproximadamente 25-30 m) (Fig. 4-2b). En cada parcela los cuadrantes fueron dispuestos a 5 m de distancia. De acuerdo a este esquema la variabilidad genética observada en cada localidad podrá ser distribuida entre sitios al interior de cada localidad, entre parcelas dentro de cada sitio y entre cuadrantes al interior de cada parcela (Fig. 4-2b y c).

De cada uno de los cuadrantes 35 a 40 frondas juveniles fueron colectadas desde diferentes discos. Para reducir la probabilidad de que las frondas pudieran corresponder a un mismo individuo, las muestras fueron colectadas aproximadamente a 10 cm de distancia unas de otras al interior del cuadrante. Las muestras colectadas fueron separadas en bolsas plásticas y mantenidas en refrigeración (entre 4 y 8° C) hasta arribar al laboratorio.

En un muestreo adicional, para evaluar la variabilidad genética a nivel intermareal, se colectaron plantas de diferentes alturas en la zona intermareal. Siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior, 30 a 40 frondas juveniles fueron colectadas en la parte alta y baja del intermareal. La muestras de la parte alta fueron tomadas desde una franja de 30 cm por debajo del margen superior del cinturón ocupado por *M. laminarioides*, en tanto que las de la parte baja desde los últimos 30 cm del cinturón. Ambas franjas se extendieron horizontalmente por 25 – 30 m, en tres localidades diferentes: Fray Jorge, Maitencillo y Pucatrihue.

Una vez en el laboratorio, el nivel de ploidia fue evaluado para cada fronda a través del test de resorcinol (Craigie & Leigh 1978), de tal forma de seleccionar sólo las frondas haploides (gametofíticas). Así, los individuos haploides fueron debidamente registrados, alcanzando un número variable de 10 a 22 individuos por cuadrante o altura en el intermarea. Las frondas seleccionadas fueron lavadas en agua dulce, cepilladas, sonicadas y enjuagadas en agua destilada. Cada fronda fue cuidadosamente examinada de manera de eliminar cualquier sección de tejido que presentara alguna evidencia de una potencial infección o contaminación por otro organismo, lo mismo que necrosis o decoloración. El tejido resultante de cada individuo fue secado en una estufa a 40° C durante la noche y posteriormente congelado a -20° C hasta la extracción del DNA.

La selección de frondas gametofíticas para evaluar la variabilidad se debe a la naturaleza dominante del marcador genético utilizado (RAPD). El uso de individuos haploides facilita el análisis de la variabilidad genética, puesto que permite identificar/conocer exactamente el genotipo correspondiente en cada locus. De esta manera, una banda polimórfica elegida del patrón de bandeo puede ser considerada como un locus con dos alelos (presente y ausente). Por consiguiente la frecuencia alélica puede ser estimada directamente de los conteos de bandas.

Extracción del DNA

El tejido seco de cada individuo fue finamente molido en un mortero con nitrógeno líquido, para luego ser usado en la extracción del DNA siguiendo el procedimiento descrito por Saunders (1993). De acuerdo a esto aproximadamente 10 a 20 mg de tejido, fue incubado por 1 h, a temperatura ambiente, en buffer de extracción (0,1 M Tris - base, pH 8,0; 0,05 M EDTA; 0,2 NaCl; 2,5 M Kac), 100 μ L de Tween-20 y 8 μ L de proteinasa K (20 mg L⁻¹). Para la purificación del DNA, 700 mL de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) fue agregada al buffer de extracción. Esta mezcla fue homogeneizada al menos durante 3 min antes de ser centrifugada por 20 min a 22000 g, a -5° C. La fase acuosa recuperada de la etapa anterior fue procesada nuevamente por un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y luego centrifugada por 3 min. El DNA presente en la fase acuosa recuperada fue precipitado por 0,6 volúmenes de Iso-propanol y 20 min de centrifugación a 15000 g a -5° C. El pellet obtenido fue lavado con alcohol al 70%, luego secado al vacío y resuspendido en 200 μ L de buffer TE (Tris HCl 10 mM, 2 mM EDTA, pH 8,0). La cantidad y calidad del DNA fueron estimadas a través de electroforesis en gel de agarosa y en un espectrofótopmetro (SmartSpec, Bio-Rad, Hercules, CA) a 260 y 280 nm.

Amplificación del DNA con partidores RAPD

La reacción PCR para el DNA de cada individuo y los diferentes partidores RAPDs fue realizada en un termociclador Perkin Elmer GenAmp 9700. En cada reacción se usaron 2 a 3 ng de DNA, en 25 μ L de mezcla de reacción conteniendo 1 unidad de Taq polimerasa (GIBCO Brl), 2 μ L de buffer 10x, 2,2 μ L de $MgCl_2$ (50 mM) 30 μ mol de partidor (Genset Oligos, San Diego, CA) y 1,6 μ L de dNTP (2,5 mM, conteniendo los cuatro nucleótidos). Los partidores usados fueron seleccionados, desde un set de partidores estándares, de acuerdo al polimorfismo y la reproductibilidad del patrón de bandeo observado en evaluaciones preliminares, usando algunas muestras provenientes de diferentes localidades. Los cuatro partidores usados en este estudio son: A-2 (5'-TGCCGAGCTG-3'), A-3 (AGTCAGCCAC), X-12 (5'-TCGCCAGCCA-3'), y X-17 (5'-GACACGGAAC-3').

Los fragmentos de DNA amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa preparada al 1,5% con buffer TAE teñido con B.Et. Para asegurar la homología en el tamaño de las bandas evaluadas, muestras de diferentes localidades fueron corridas en un mismo gel. Las bandas usadas en el análisis fueron identificadas y registradas manualmente a partir de las fotografías de cada gel. De acuerdo con las recomendaciones de Harris (1999) sólo las bandas observadas en un limitado rango de tamaños (500 a 2500 pares

de bases) fueron consideradas, y solo aquellas que mostraron mayor intensidad y un claro patrón de presencia ausencia fueron incluidas en el análisis

Análisis de los resultados

El análisis de los resultados es ordenado en tres partes: a) Análisis de la diversidad y diferenciación genética regional (entre localidades), b) Análisis de la diferenciación genética local (dentro de cada localidad), y c) Análisis de la estructuración genética en el intermareal.

a) Diversidad y diferenciación genética regional

Diversidad genética: Para describir la frecuencia alélica obtenida de los patrones de bandeo se calcularon dos índices de diversidad genética (alélica): la heterocigocidad promedio esperada (H) y el número medio de alelos por locus. La heterocigocidad ($H = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i corresponde a la frecuencia alélica) para un locus con dos alelos varía entre 0 (cuando uno de los alelos se ha fijado en la población) y 0,5 (cuando ambos alelos tienen igual frecuencia en la población). Para evitar sesgos, el cálculo de la heterocigocidad es corregido por el tamaño de la muestra (H_{nb} , heterocigocidad no sesgada, Nei 1978). El número medio de alelos puede variar entre 1 (cuando uno de los alelos es fijo en la población) y 2 (cuando ambos alelos se encuentran con la misma frecuencia en la población). Los dos índices descritos fueron calculados usando el software GENETIX versión 4.0 (Belkir et al. 1996).

Complementariamente, además de la diversidad alélica se estudió la diversidad de genotipos multilocus (haplotipos) en las distintas poblaciones. Para ello se estimó el número de individuos con haplotipos únicos y el número de individuos que comparten dos o más haplotipos. La evaluación de genotipos compartidos permite reconocer algunas características de la reproducción de la especie y de las implicancias de la diferenciación genética. En una especie con reproducción sexual, como *M. laminarioides*, la probabilidad de que dos o más individuos compartan un mismo genotipo depende del número de loci considerados en el genotipo, el número alelos presentes en cada locus y la frecuencia alélica en cada caso. Para el análisis de pocos loci RAPD, con dos alelos por locus, la probabilidad de haplotipos compartidos en una población puede ser considerable, particularmente si la frecuencia alélica es alta. Más aún, si poblaciones vecinas presentan frecuencias alélicas semejantes la probabilidad de que compartan individuos con el mismo haplotipos es también alta.

Diferenciación genética: La evaluación de la estructuración de la variabilidad de la genética y, por consiguiente, la diferenciación entre poblaciones fue realizada a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier et al 1992). De manera semejante al análisis de varianza anidado, el AMOVA calcula los componentes de la varianza de la frecuencia alélica, y a través de ellos estima los índices clásicos de diferenciación o estadísticos de F (Wright 1951).

Considerando un grupo de individuos estructurados en unidades y subunidades dentro de cada unidad, el AMOVA distribuye la varianza molecular total (σ_T^2) en los diferentes componentes en que están ordenados los individuos, esto es, "entre unidades" (σ_a^2), entre "subunidades" (σ_b^2) y en las subunidades (σ_c^2). De esta manera, los índices de diferenciación (análogos a los clásicos F) son calculados: $\Phi_{st} = (\sigma_a^2 + \sigma_b^2) / \sigma_T^2$ (análogo a F_{st} , diferenciación entre subunidades); $\Phi_{ct} = \sigma_a^2 / \sigma_T^2$ (análogo a F_{ct} , diferenciación entre unidades); $\Phi_{sc} = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + \sigma_c^2)$ (análogo a F_{sc} , diferenciación entre subunidades dentro de unidades). La significancia de cada uno de estos índices de fijación es evaluada a través de una aproximación no paramétrica de permutaciones (1000). Dependiendo del estimador (Φ_{st} , Φ_{ct} y Φ_{sc}) y el nivel jerárquico evaluado el análisis realiza diferentes tipos de permutaciones.

Con este tipo de análisis se realizó, en el contexto regional, dos diferentes aproximaciones de estudio. Procurando evidenciar como se estructura latitudinalmente la variabilidad genética se evaluó, primero, la distribución de la variabilidad genética y el grado de diferenciación entre localidades. Para ello, el AMOVA consideró como unidades a cada localidad y los sitios como subunidades. En una segunda aproximación se procuró evidenciar en que medida la diversidad genética se distribuye entre unidades geográficas más amplias. En este caso, para el AMOVA se consideró como unidades las tres regiones definidas *a priori* y como subunidades los sitios de cada localidad que compone de las regiones (Fig. 4-2a). Para cada uno de los

análisis descriptos fue realizado usando el software ARLEQUIN (Schneider et al. 2000).

Diferenciación y distancia geográfica: Para evidenciar gráficamente la diferenciación genética entre poblaciones fue construido el diagrama "Neighbour-Joining". Este diagrama fue elaborado sobre la base de la frecuencia alélica y usando como unidad poblacional las parcelas, dado que este nivel jerárquico es la escala más pequeña en la que se puede observar diferenciación (Faugeron et al 2001). El diagrama fue construido a partir de la distancia de Reynolds ($d = -\text{Log}(1-F_{st})$, Reynolds *et al.* 1983) y haciendo uso del software PHYLIP versión 3.5. La consistencia de los nodos del diagrama fue evaluada usando el procedimiento de "bootstrap".

Para evaluar la relación entre la distancia geográfica y la estructuración de la variabilidad genética, se construyó una matriz con la distancia genética (calculada a partir de la relación $F_{st}/(1-F_{st})$, Slatkin 1993) entre pares de cuadrantes. Esta matriz fue comparada con su respectiva matriz de distancia geográfica, a través del test de Mantel (Mantel 1966), usando el software GENETIX v.4.0.

b) Diferenciación genética local

El sistema jerárquico de muestreo desarrollado en cada localidad permitió realizar el análisis de varianza molecular a diferentes escalas

especiales. El primero, a nivel de cada localidad (excepto en Maitencillo), consideró los sitios como unidades y las parcelas de cada uno de ellos como subunidades. En el segundo tipo de análisis se evaluó la forma en que se distribuye la variabilidad al nivel de cada sitio, considerando las parcelas como unidades y los cuadrantes como subunidades.

c) Estructuración genética en el intermareal

Diversidad genética: Para el muestreo realizado a diferentes alturas en el intermareal también se describió la diversidad genética alélica y genotípica. Como en el caso anterior, se calculó la heterocigocidad promedio esperada (H_{nb}), el número promedio de alelos por locus y número de haplotipos compartidos.

Diferenciación genética: La distribución de la variabilidad y diferenciación genética en el intermareal fue evaluada a través un AMOVA considerando las localidades como unidades y las diferentes alturas en el intermareal como subunidades en cada localidad.

RESULTADOS

a) Diversidad y diferenciación genética regional

Diversidad genética: En este estudio se evaluó un total de 565 individuos provenientes de diferentes localidades, sitios, parcelas y cuadrantes. El número de muestras analizadas por cuadrante varió entre 10 y 22 individuos. En estas muestras el uso de cuatro diferentes partidores RAPDs permitió evidenciar un total de 21 bandas polimórficas útiles para los diferentes análisis, cuyo peso molecular fluctuó entre 500 y 1700 pares de bases. El nivel de polimorfismo fue altamente variable entre locus y entre las diferentes poblaciones. Algunos loci mostraron uno de sus alelos fijos en ciertas poblaciones y en otras una frecuencia variable entre ellos. Otros loci, en cambio, no evidenciaron alelos fijos. En las diferentes localidades al menos uno de los loci exhibieron alelos fijos, siendo Maitencillo donde se observó el mayor número de casos de loci con alelos fijos (10 loci).

Se evidenció diferentes niveles de heterocigocidad a distintas escalas espaciales. Al nivel de cuadrantes, los valores más bajos de H_{nb} ($< 0,1$) se observaron entre los de Maitencillo (0,057), Pucatrihue (0,068) y de Punta Arenas (0,068). Los valores más altos ($> 0,2$) se encuentran entre los de Fray Jorge (0,241) y Chiloé (0,233). En general, al nivel de las parcelas que componen un mismo sitio los valores de heterocigocidad fueron relativamente semejantes entre sí, excepto entre las parcelas correspondientes a uno de los sitios de Pucatrihue, Chiloé, y Punta Arenas.

Tabla 4-1: Índice de diversidad alélica H_{nb} (Heterocigocidad de Nei, 1978), número promedio de alelos por locus y número haplotipos en cada uno de los sitios muestreados de cada localidad. n: número de muestras usadas en el estudio; sd : desviación estándar para cada valor de heterocigocidad.

<u>Sitios</u>	n	H_{nb}	sd	Nº medio de alelos	Nº de haplotipos
FJ1	85	0,166	0,197	1,57	34
FJ2	50	0,230	0,210	1,79	33
MAI	72	0,076	0,153	1,29	10
PUC1	52	0,146	0,171	1,64	16
PUC2	65	0,110	0,165	1,57	14
CH1	70	0,203	0,211	1,64	39
CH2	36	0,252	0,204	1,79	27
PA1	62	0,149	0,152	1,71	30
PA2	73	0,151	0,210	1,43	25

Entre sitios, la heterocigocidad promedio (H_{nb}) fluctuó entre 0,110 (Pucatrihue, PUC2) y 0,253 (Chiloé, CH2), con la excepción de lo observado en Maitencillo donde alcanzó un valor de 0,076 (Tabla 4-1). Los sitios de una misma localidad mostraron valores semejantes, salvo en Fray Jorge donde uno de los sitios exhibió valores más bajos (0,166) que el otro (0,230). En cuanto al número de alelos medios los valores más bajos fueron observados también en Maitencillo (1,29) y los más altos entre los sitios de Fray Jorge (179) y Chiloé (1,79) (Tabla 4-1). En este caso, sin embargo, el promedio de alelos fue más heterogéneo entre los sitios de una misma localidad (Tabla 4-1).

El estudio de la diversidad de genotipos evidenció, en el total de la muestra, 151 haplotipos diferentes. Entre ellos 75 haplotipos fueron únicos y 76 haplotipos fueron compartidos por dos o más individuos (Fig. 4-3). El número de haplotipos fue relativamente semejante entre los sitios de una misma localidad, a pesar del variable número de muestras colectadas en cada caso. El menor número de haplotipos fue observado en Maitencillo (10) y Pucatrihue (14 y 16), en tanto que el mayor fue observado en Fray Jorge (33 y 34) y Chiloé (27 y 39) (Tabla 4-1). Los haplotipos compartidos por 2, 3, 4 y 5 individuos fueron los más frecuentes, aunque en algunos casos se observó a numerosos individuos (hasta 42) compartiendo el mismo haplotipo (Fig. 4-3).

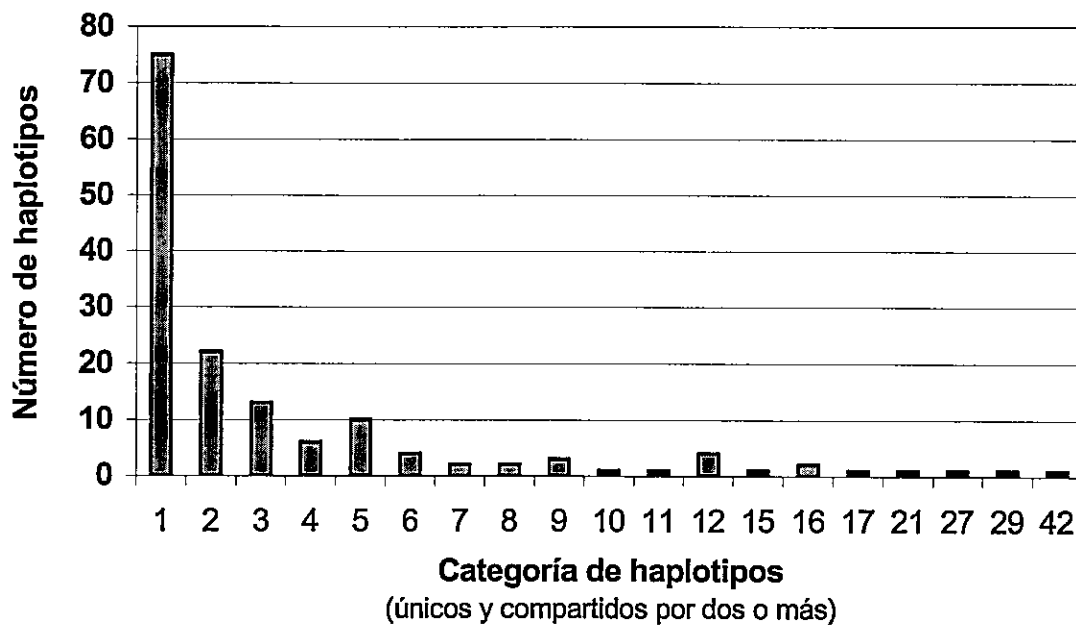


Figura 4-3: Número de haplotipos únicos y compartidos por dos o más individuos.

Los haplotipos compartidos ocurrieron principalmente al interior de cada sitio, exhibiéndose los mayores porcentajes en Maitencillo (60%) y en Pucatrihue (50 y 57%), en tanto que los menores porcentajes se observaron en Chiloé (25,9 y 26,3%) y en uno de los sitios de Fray Jorge (24,2%) (Tabla 4-2). Entre sitios de una misma localidad se observaron porcentajes menores de haplotipos compartidos. El porcentaje más alto ocurrió entre los sitios de Pucatrihue (26,6%) y el más bajo al interior de Punta Arenas (5,5%). Porcentaje aún menor se evidenciaron entre sitios de localidades cercanas, como se observó entre los sitios de Fray Jorge y Maitencillo (con 2,2 y 4,7%) y entre los sitios de Pucatrihue y Chiloé (entre 4,9 y 9,3%). A diferencia de lo anterior, se

evidenció que localidades distantes como Chiloé y Punta Arenas compartieron haplotipos en porcentajes relativamente altos (entre 4,8 y 19,1%) (Tabla 4-2).

Diferenciación genética: El AMOVA realizado entre localidades mostró que alrededor de un 50% de la varianza genética está explicada por la distancia geográfica entre localidades que varía entre 130 a 2300 Km y un 13% entre los sitios al interior de las localidades (separada por 150 a 200 m) (Tabla 4-3). Resultados semejantes son obtenidos al reordenar los sitios de cada localidad en diferentes regiones. En este caso las unidades (regiones) explican cerca del 50% de la variabilidad, en tanto que alrededor del 20% fue atribuido a las diferencias entre las subunidades (los sitios agrupados al interior de las regiones). Los valores de diferenciación genética, por su parte, fueron altos (entre 0,272 y 0,512) y significativos ($p < 0,004$) tanto entre regiones, localidades y sitios al interior de las localidades (Tabla 4-3).

Diferenciación y distancia geográfica: La distancia genética entre las parcelas permitió, a través del diagrama de "Neighbour – Joining" (Fig. 4-4), describir claramente dos grandes grupos: uno conformado por las localidades del centro Norte (Fray Jorge y Maitencillo) y el otro por las del centro sur (Pucatrihue, Chiloé y Punta Arenas). En el primer grupo, las localidades son claramente separadas con altos valores de bootstrap, discriminando además entre las parcelas de cada localidad. Se destaca, en este contexto, el largo internodo y los altos valores de bootstrap que discriminan la localidad de Maitencillo desde

el nodo que la separa de Fray Jorge (Fig. 4-4). En el grupo centro sur, no se observa una separación muy clara entre las parcelas de diferentes localidades. Sólo las parcelas de Pucatrihue son segregadas en una sola rama, aunque la separación entre ellas es muy reducida o inexistente. Las otras dos ramas de este grupo son heterogéneas, incluyendo tanto parcelas de Chiloé como de Punta Arenas (Fig. 4-4).

La comparación entre las matrices de la distancia genética y la geográfica, basadas ambas por las distancias entre pares de cuadrantes, reveló una correlación baja pero significativa entre ambas distancias ($z = 1057654,5$; $r = 0,687$; $p < 0,001$; test de Mantel). La distancia genética muestra una directa relación con la distancia geográfica entre pares de cuadrantes separados por no más de 1000 Km (Fig. 4-5). A mayores distancias (>1000 Km) la diferenciación genética no muestra relación con la distancia geográfica, observándose valores bajos a pesar de la gran distancia (Fig. 4-5).

Tabla 4-3: (a) Resultados del análisis AMOVA realizado entre localidades y regiones, y (b) índices de diferenciación estimados

a. Jerarquía de análisis	g.l.	% de variación explicado
Localidades		
Entre localidades	4	51,2
Entre sitios dentro de localidades	4	13,3
Global entre sitios	554	35,5
Regiones		
Entre regiones	2	47,3
Entre sitios dentro de localidades	6	19,8
Global entre sitios	554	32,9

b. Diferenciación Genética	Índices de Fijación	P
Localidades		
Entre localidades (Φ_{ct})	0,512	0,005
Entre sitios dentro de localidades (Φ_{sc})	0,272	< 0,001
Global entre sitios (Φ_{st})	0,645	< 0,001
Regiones		
Entre regiones (Φ_{ct})	0,473	0,004
Entre sitios dentro de localidades (Φ_{sc})	0,376	< 0,001
Global entre sitios (Φ_{st})	0,671	< 0,001

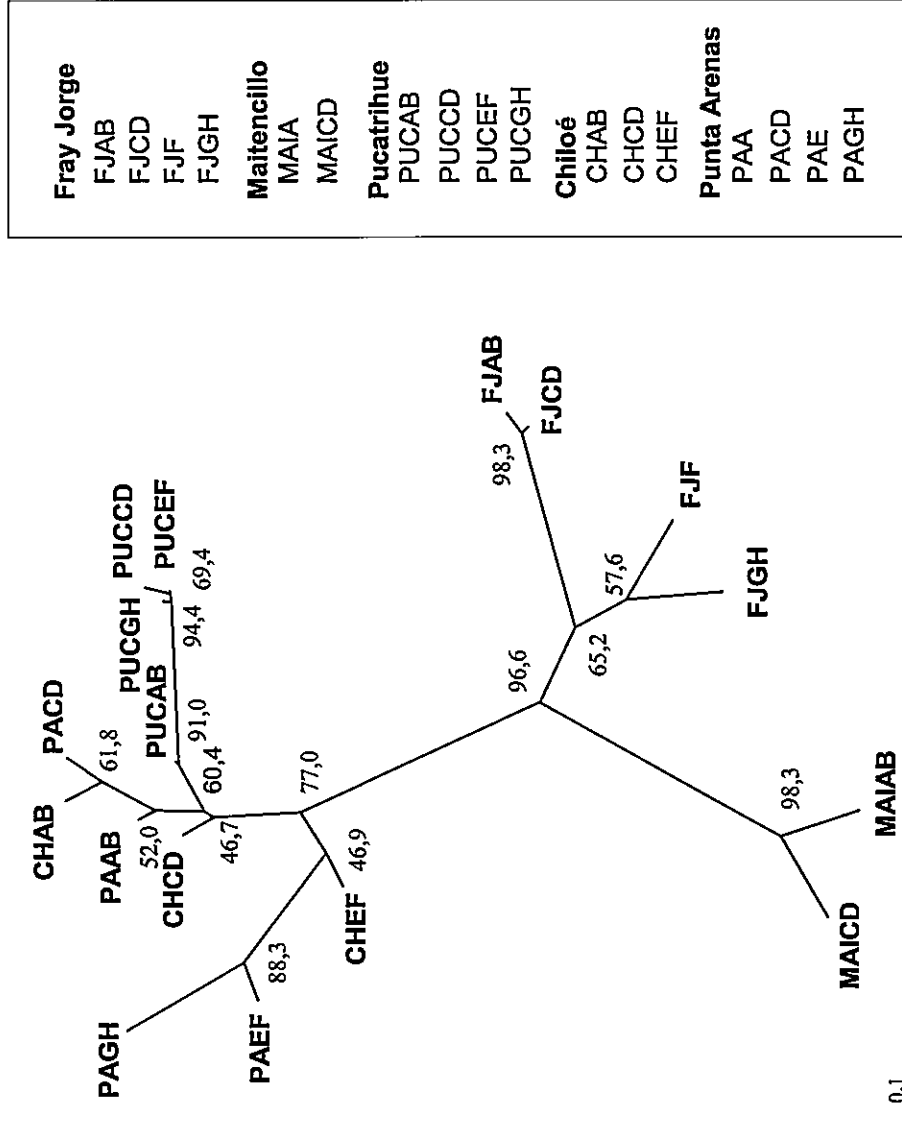


Figura 4-4: Diagrama "Neighbour - Joining" agrupando las diferentes parcelas de acuerdo a la distancia genética entre poblaciones (Reynolds et al. 1983). Los valores corresponden al resultado de Bootstrap.

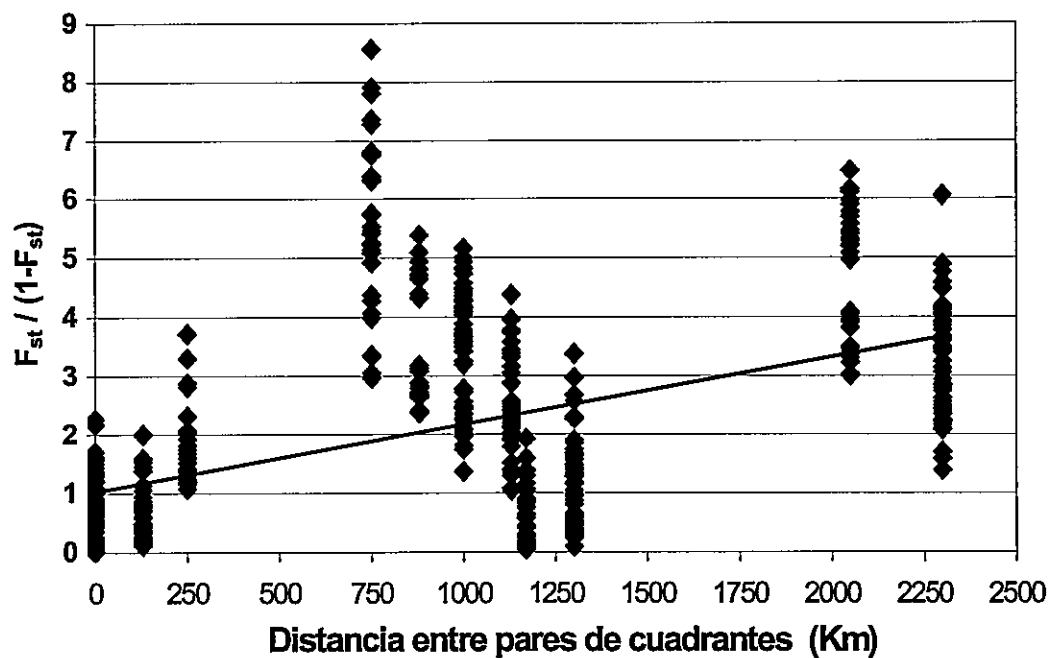


Figura 4-5: Correlación entre la distancia genética (Slatkin 1993) y la distancia geográfica entre pares de cuadrantes ($z = 1057654,5$; $r = 0.687$, $p < 0,001$) evaluada a través de Test de Mantel.

b) Diferenciación genética local

En el ámbito local, el AMOVA reveló que la variabilidad genética se descompone de diferente manera dependiendo de la localidad. En Pucatrihue y Chiloé la variabilidad atribuida a las diferencias entre las parcelas (subunidades separadas por 25 m) al interior de cada sitio fue alrededor del 17 y 28% respectivamente (Tabla 4-4a). En estas localidades el sitio (unidades separadas por 150-200 m), como componente de la varianza, no tiene ninguna participación en la explicación de la varianza genética. De manera semejante, en ambas localidades la diferenciación genética entre parcelas dentro de sitios mostró valores altos (entre 0,176 y 0,283) y significativos ($p < 0,001$) (Tabla 4-4b). Entre los sitios, en tanto, en ninguno de las dos localidades la diferenciación resultó significativa (Tabla 4-4b).

En Fray Jorge, en cambio, el 30,9% de la variabilidad genética es atribuida a las diferencias entre los sitios, en tanto que entre parcelas dentro de los sitios la variabilidad explicada es de casi el 10% (Tabla 4-4a). Un patrón semejante es observado en Punta Arenas, aunque en este caso la variabilidad se encuentra más compartida entre sitios con un 43% y entre las parcelas al interior de los sitios (23%). En estas dos localidades la diferenciación entre sitios fue alta (0,309 y 0,433), lo mismo entre parcelas dentro de sitios (0,137 y 0,409). En ambos casos la diferenciación fue significativa ($p < 0,032$) (Tabla 4-4b).

Tabla 4-4: (a) Resultados del análisis AMOVA realizado entre sitios en cada localidad y (b) índice de diferenciación estimados.

a. Jerarquía de análisis	g.l.	% de variación explicado
Fray Jorge		
Entre sitios	1	30,9
Entre parcelas dentro de sitios	5	9,5
Global entre parcelas	136	59,6
Pucatrihue		
Entre sitios	1	-1,0
Entre parcelas dentro de sitios	6	17,8
Global entre parcelas	109	83,2
Chiloé		
Entre sitios	1	-1,2
Entre parcelas dentro de sitios	4	28,7
Global entre parcelas	94	72,6
Punta Arenas		
Entre sitios	1	43,3
Entre parcelas dentro de sitios	6	23,2
Global entre parcelas	127	33,5

b. Diferenciación Genética	Indices de Fijación	P
Fray Jorge		
Entre sitios (Φ_{st})	0,309	0,033
Entre parcelas dentro de sitios (Φ_{sc})	0,137	< 0,001
Global entre parcelas (Φ_{st})	0,404	< 0,001
Pucatrihue		
Entre sitios (Φ_{st})	- 0,010	0,266
Entre parcelas dentro de sitios (Φ_{sc})	0,176	< 0,001
Global entre parcelas (Φ_{st})	0,168	< 0,001
Chiloé		
Entre sitios (Φ_{st})	- 0,012	0,539
Entre parcelas dentro de sitios (Φ_{sc})	0,283	< 0,001
Global entre parcelas (Φ_{st})	0,274	< 0,001
Punta Arenas		
Entre sitios (Φ_{st})	0,433	0,029
Entre parcelas dentro de sitios (Φ_{sc})	0,409	< 0,001
Global entre parcelas (Φ_{st})	0,665	< 0,001

Tabla 4-5: Resultados derivados del análisis AMOVA realizado entre parcelas en cada sitio de estudio. (a) Porcentaje de la varianza genética explicado y (b) Índices de diferenciación estimados. ns: no significativo, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

a. Nivel Jerárquico		FJ1	FJ2	MAI	PUC1	PUC2	CH1	PA1	PA2
Entre parcelas		1,67	-15,05	10,4	1,4	-2,5	7,9	-0,7	-21,7
Entre cuadrantes dentro de las parcelas		-1,33	22,58	1,7	33,0	0,4	12,1	9,7	83,0
Global entre cuadrantes		99,66	92,47	87,9	65,6	102,1	80,1	91,0	38,6
b. Diferenciación genética									
Entre parcelas (Φ_{st})		0,017 ns	-0,151 ns	0,104 ns	0,014 ns	-0,025 ns	0,079 ns	-0,007 ns	-0,217 ns
Entre cuadrantes dentro de las parcelas (Φ_{sc})		-0,014 ns	0,196 ***	0,019 ns	0,335 ***	0,004 ns	0,131 ***	0,097 **	0,682 ***
Global entre cuadrantes (Φ_{st}^t)		0,003 ns	0,075 **	0,121 **	0,344 ***	-0,021 ns	0,199 ***	0,090 ***	0,616 ***

El AMOVA realizado al nivel de los sitios, considerando las parcelas como la unidad jerárquica, evidenció que en casi todos los casos la varianza genética global entre cuadrantes fue alta (>80% en MAI y CH, o >90% en FJ1, FJ2, PUC2 y PA1, Tabla 4-5a). En cinco de los ocho sitios analizados parte de la varianza fue atribuida a los cuadrantes dentro de las parcelas. En algunos casos, este nivel jerárquico explicó un bajo porcentaje de la varianza, como en Chiloé (12,1%) o en Punta Arenas (9,7% en PA1), y en otros explicó mayores porcentajes, como en Pucatrihue (33% en PUC1) y en el segundo sitios de Punta Arenas (83% en PA2) (Tabla 4-5a). En todos estos sitios el índice de fijación para cuadrantes dentro de parcelas (Φ_{sc}) fue relativamente alto (entre 0,097 y 0,682) y significativo ($p < 0,01$) (Tabla 4-5b). Por su parte, las parcelas como unidad jerárquica no contribuyen como componente explicativo de la varianza, salvo en los casos de Maitencillo (con el 10%) y Chiloé (con casi el 8%). Más aún, el índice de fijación asociado a la diferenciación entre (Φ_{ct}) no resultó significativo en ninguno de los sitios (Tabla 4-5b).

c) Estructuración genética en el intermareal

Diversidad genética: En este estudio se evaluó un total de 60 individuos provenientes de dos alturas en el intermareal (Alta y baja) y tres localidades diferentes (Fray Jorge, Maitencillo y Pucatrihue). De cada altura en el intermareal se analizaron 10 individuos. En esta evaluación los mismos loci (21 bandas de RAPD) usados en el análisis anterior sirvieron en la descripción de la diversidad genética en el intermareal.

En general, la heterocigocidad varió entre 0,127 y 0,245 (Tabla 4-6). Al interior de cada localidad, los valores de heterocigocidad fueron relativamente similares entre ambas alturas en el intermareal de marea. Se destaca en este caso que los valores de heterocigocidad de Maitencillo (0,197 - 0,206) y Pucatrihue (0,226 - 0,245) observados en este estudio son más altos que los evidenciados en el análisis anterior (Tabla 4-6).

A pesar de la reducida escala espacial, el número de haplotipos compartidos fue bajo (Tabla 4-7). En cada nivel del intermareal se observaron haplotipos compartidos en Fray Jorge (2 en la parte alta y 1 en la baja) y en Maitencillo (1 en cada nivel). Sin embargo, en Pucatrihue los 10 individuos muestreados en cada nivel del intermareal correspondieron a haplotipos únicos. En cada localidad se evidenciaron, además, haplotipos compartidos entre ambos niveles del intermareal; en Fray Jorge (1), Maitencillo (3), y Pucatrihue (1) (Tabla 4-7).

Diferenciación genética: El AMOVA a escala del intermareal, considerando la localidad como unidad de análisis y las alturas en el intermareal como subunidades, evidenció que esta subunidad sólo explica un 2,5% de la variabilidad, en tanto que entre localidades se explica casi el 65% de la varianza genética (Tabla 4-8a). Consecuente con los resultados anteriores, el índice de fijación entre localidades es alto (0,649) y significativo ($p < 0,001$) (Tabla 4-8b).

No obstante, entre alturas en el intermareal dentro de localidades se observó una diferenciación genética relativamente leve (0,072), pero significativa ($p=0,015$) (Tabla 4-8b).

Tabla 4-6: Índice de diversidad alélica H_{nb} (Heterocigocidad de Nei, 1978), número promedio de alelos por locus para y número de haplotipos compartidos en muestras de la parte alta (A) y baja (B) del intermareal, de diferentes localidades. n: número de muestras usadas en el estudio; sd: desviación estándar para cada valor de heterocigocidad.

Sítios	n	H_{nb}	sd	Nº medio de alelos	Nº de haplotipos
FJ (A)	10	0,134	0,191	1,38	8
FJ (B)	10	0,127	0,180	1,38	9
MAI (A)	10	0,206	0,226	1,48	9
MAI (B)	10	0,197	0,219	1,52	9
PUC (A)	10	0,245	0,223	1,62	10
PUC (B)	10	0,226	0,199	1,66	10

Tabla 4-7: Número y porcentaje de haplotipos compartidos a cada altura en el intermareal y entre diferentes alturas en el intermareal.

	FJ (A)	FJ (B)	MAI (A)	MAI (B)	PUC (A)	PUC (B)
FJ (A)	2 (25,0%)	1 (5,7%)	0	0	0	0
FJ (B)		1 (11,1%)	0	0	0	0
MAI (A)			1 (11,1%)	3 (16,7%)	0	0
MAI (B)				1 (11,1%)	0	0
PUC (A)					0	1 (2,4%)
PUC (B)						0

Tabla 4-8: (a) Resultados del análisis AMOVA realizado entre diferentes alturas en el intermareal en cada localidad e (b) índice de diferenciación estimados.

a. Jerarquía de análisis	g.l.	% de variación explicado
Entre localidades	2	64,9
Entre alturas dentro de localidades	3	2,5
Global entre altura	54	32,5

b. Diferenciación Genética	Indices de Fijación	p
Entre localidades (Φ_{ct})	0,649	< 0,001
Entre alturas dentro de localidades (Φ_{sc})	0,072	0,015
Global entre alturas (Φ_{st})	0,675	0,067

DISCUSIÓN

La diversidad genética de loci RAPD en *M. laminarioides* es equivalente, aunque con un rango más amplio (con H_{nb} entre 0,011 y 0,25), a la observada por Faugeron et al. (2001) en esta misma especie (con H_{nb} entre 0,21 – 0,25). Sin embargo, esta diversidad sigue siendo tanto o más alta que la heterocigocidad observada en otras algas rojas evaluadas a través de isoenzimas (Sosa & Lindstrom 1999), pero bastante más baja que la diversidad evidenciada con otro marcado molecular como microsatélites (Valero et al. 2001). En comparación con la diversidad genética de algunas plantas terrestres, evaluadas con marcadores RAPD, los valores de heterocigocidad observados en este estudio son semejantes o levemente inferiores a especies con fertilización cruzada obligada, como en *Asimina triloba* (H_{nb} entre 0,22 y 0,29; Huang et al. 2000) o *Pinus radiata* (H_{nb} entre 0,34 y 0,48, Thomas et al. 1999), son coincidente o levemente superior a especies con autofecundación como *Hordeum spontaneum* (con H_{nb} entre 0,16 y 0,19, Owuor et al 1997) y *Goodyera procera* (con H_{nb} entre 0,11 y 0,25; Wong & Sun 1999), y muy superiores a la extremadamente baja variabilidad en loci RAPD en poblaciones de algas aisladas o con reproducción asexual tales como *Phycodrys rubens* (con $H_{nb} < 0,01$; van Oppen et al. 1995). Así, a pesar de las características dioicas de *M. laminarioides*, la heterocigocidad observada es coincidente con los valores de especies con fecundación cruzada obligada y aquellas que se reproducen por autofecundación. Aún cuando los gametofitos sean dioicos, los resultados del

cruzamiento entre machos y hembras provenientes del mismo esporofito parental pueden ser análogos a la autofecundación (Valero 2001). En este sentido, la reducida capacidad de dispersión estimada en *M. laminarioides* (Camus & Hoffmann 1989) podría ser la causa de la menor heterocigocidad que la esperada para una especie de fecundación cruzada obligada. Del mismo modo, podría explicar el alto número de haplotipos compartidos, particularmente al interior de cada sitio. La recurrencia de haplotipos compartidos, sin embargo, puede también ser una consecuencia de la alta frecuencia de los alelos en los loci que componen el genotipo. En Maitencillo, por ejemplo, el mayor número de alelos fijos aumenta la probabilidad de genotipos compartidos. Por otra parte, considerando un mayor número de loci en el estudio reducía la posibilidad de que varios individuos compartan el mismo genotipo. Con un mayor número de loci analizados Faugeron (2002) observó una muy baja ocurrencia de haplotipos compartidos en *M. laminarioides*; más del 84% de los individuos estudiados presentaron genotipos únicos. Aunque también evidenció que el mayor número de haplotipos compartido ocurrió al interior de cada sitio.

El análisis de la estructuración de la variabilidad genética en *M. laminarioides* mostró una gran diferenciación entre poblaciones de diferentes localidades. La diferenciación entre poblaciones muy distantes, sin embargo, no parece ser sorprendente en algas, particularmente cuando se estima que su dispersión es restringida (Santelices 1990). Aún en especies en las cuales se presumen mecanismos de dispersión a larga distancia (fragmentos de fronda

reproductivas) se ha evidenciado distintos grados de diferenciación a larga distancia, del orden de decenas y centenas de kilómetros (Lu & Williams 1994, van Oppen et al. 1995, Coyer et al. 1997, Sosa & Lindstrom 1999). Sin embargo, la fuerte diferenciación observada en *M. laminarioides*, incluso entre los sitios dentro de localidades ($> 0,27$), revela una muy limitada capacidad de dispersión, aún dentro de una misma localidad (entre sitios a 150-200 m).

El grado de diferenciación, sin embargo, no es el mismo entre localidades de diferentes regiones. Las dos grandes regiones evidenciadas por el diagrama de "neighbour-joining", más que las tres definidas *a priori*, revelan diferentes patrones de diferenciación al nivel regional. En la región centro norte, que incluye a Fray Jorge y Maitencillo, la distancia genética entre las poblaciones muestra una estrecha relación con la distancia. El nivel de diferenciación aumenta desde parcelas hasta el observado entre localidades y es aún más alto entre regiones. Esta relación de la diferenciación con la distancia implica que el intercambio o flujo génico ocurre principalmente entre poblaciones cercanas. Por el contrario, en la región centro-sur, que incluye las localidades de Pucatrihue, Chiloé y Punta Arenas, la diferenciación genética tiene una pobre relación con la distancia. La débil diferenciación entre las poblaciones de Pucatrihue y Chiloé, y la imposibilidad del análisis en discriminar entre parcelas de Chiloé y Punta Arenas, evidencia que otros factores puede estar involucrados en la estructuración de la variabilidad genética en esta región. Ante la falta de linealidad en la relación entre la distancia genética y la

geográfica, particularmente a distancias superiores a 900 Km, Faugeron (2002) arguyó la probable presencia de dos modalidades de dispersión en *M. laminarioides*. Una, al nivel local-regional (<200 Km), en la que la dispersión es dominada por el movimiento de esporas y gametos. Y la otra, a mayor escala (>200 Km), en la que mecanismos de dispersión a larga distancia (fragmentos de frondas) son responsables del flujo génico. Aunque esta explicación puede responder en parte a la débil relación lineal a grandes distancias, no aclara el patrón diferencial entre ambas regiones observado en este estudio. Si bien entre estas regiones existen diferencias topográficas, hidrodinámicas e históricas, no es claro como estas puedan afectar la estructuración de la variabilidad genética. No obstante, también cabe considerar que problemas metodológicos afecten el patrón observado. Debido a la naturaleza de los RAPDs es probable incurrir en el error de considerar como homólogas bandas que, aunque son del mismo peso molecular, no corresponden efectivamente a los mismos alelos. Los antecedentes indican que este tipo de error es más frecuente mientras mayor distancia existe entre las poblaciones estudiadas (van Oppen et al. 1996, Harris 1999).

Al nivel local, el análisis jerárquico de la variabilidad genética reveló una diferenciación alta y consistente al nivel de las parcelas dentro de los sitios. Estos resultados son coincidentes con los observados por Faugeron (2002) en otras localidades (Matanzas, Santo Domingo y Topocalma en la zona central de Chile). Esta diferenciación recurrente a una escala espacial definida permite

considerar que en *M. laminarioides* el tamaño de la unidad panmíctica no es superior a un área de 25 m de diámetro. En esta área la extensión del flujo génico puede mantener una relativa homogeneidad genética. Aunque el tamaño de esta unidad es reducido, parece ser común entre macroalgas con dispersión limitada (Williams & Di Fiori 1996, Coyer et al 1997, Wright et al. 2000).

Al interior de las parcelas la variabilidad genética varía en forma aleatoria. La diferenciación entre cuadrantes dentro de parcelas se observa en algunos sitios y no en otros. Esto ocurre aún entre sitios de una misma localidad. Esto implica que la variabilidad a escala micro-geográfica también puede ser estructurada significativamente, aunque de manera aleatoria. Diferentes mecanismos podrían explicar esta estructuración a pequeña escala. La dispersión, por ejemplo, puede ser afectada por condiciones muy locales. Como indican algunos antecedentes, las características hidrodinámicas locales (intermareales) pueden condicionar el asentamiento de las esporas (Engel-Palmiter 2000). Por otra parte, en un ambiente altamente heterogéneo como el intermareal, la estructuración de la diversidad genética puede ser el resultado de la dinámica de extinciones y recolonizaciones a pequeña escala. La reducción muy local del tamaño efectivo de la población puede conducir a fuerte deriva a muy pequeña escala, reduciendo la variabilidad genética a nivel muy local.

Adicionalmente, la estructuración de la variabilidad genética a escala micro-geográfica puede ser afectada por la presión selectiva ejercida por la variación de los factores ambientales (Linhart & Grant 1996). Algunos ejemplos de los efectos selectivos del gradiente local intermareal han sido evidenciados o sugeridos en algas intermareales (Innes 1988, Williams & Di Fiori 1996, Zuccarello et al. 1999, Wright 2000). En este contexto, la leve pero significativa diferenciación observada entre plantas de diferentes alturas en el intermareal sugiere efectos selectivos del gradiente intermareal en *M. laminarioides*. A pesar de que los marcadores RAPD son considerados neutros, estos resultados pueden ser una consecuencia indirecta de los efectos selectivos, debido al ligamiento genético que puede existir entre estos genes neutros y aquellos seccionados ("selección en segundo plano" o "background selección", Godelle et al. 1998). Esta diferenciación micro-geográfica sería coincidente con las diferencias exhibidas entre juveniles provenientes de ambos extremos del intermareal (Cap. 3).

Conclusiones

El uso de marcadores RAPD para caracterizar la variabilidad genética en *M. laminarioides*, a permitido evidenciar patrones de estructuración de la variabilidad a diferentes escalas espaciales. A lo largo del rango geográfico en el que se extiende esta especie la distribución de la variabilidad genética evidenció dos regiones fuertemente diferenciadas ($\Phi_{ct} = 0,473$). En la región centro – norte (Fray Jorge y Maitencillo) la estructuración de la variabilidad exhibió un estrecha relación con la distancia, mostrando un aumento de la diferenciación con la escala espacial, desde lo observado entre las parcelas (separadas por 25-30 m) hasta la diferenciación entre regiones (separadas por al menos 750 Km). Estos resultados indican que el flujo génico es lo suficientemente restringido como para impedir los efectos de la deriva génica, permitiendo que a partir de los 25-30 m de distancia las poblaciones puedan diferenciarse. En esta región el bajo nivel de flujo génico se establece entre parches de individuos o poblaciones vecinas, dependiendo principalmente de la dispersión de esporas y/o gametos. Por el contrario, la ausencia de una clara estructuración espacial de la variabilidad genética en la región centro sur (Pucatrihue, Chiloé y Punta Arenas) no permite generalizar las conclusiones anteriores. En esta región, la relativa semejanza genética entre poblaciones tan distantes como Chiloé y Punta Arenas no puede ser explicada sólo a través de mecanismos de dispersión, al menos no por la dispersión de esporas y gametos. Desestimando problemáticas metodológicas que pueden afectar el

patrón observado, la estructuración de la diversidad genética en esta región podría ser el resultado de factores históricos (Glaciaciones) y/o factores ambientales (condiciones hidrodinámicas) que favorezcan la dispersión a larga distancia.

A pequeña escala, el área en la cual se mantiene una relativa homogeneidad genética no es mayor a 25 m². Sin embargo, a pesar de esta extensión del flujo génico, algunas poblaciones mostraron una significativa estructuración de la diversidad genética aún a menor escala espacial. Estos resultados sugieren la existencia de factores que afectan la distribución de la variabilidad genética a escala micro-geográfica. Un patrón como este puede ser suscitado por factores que, a escala muy local, condicionan la dispersión aleatoria de esporas y gametos, afectan el tamaño poblacional y determinan la sobrevivencia diferencial de ciertos genotipos. La diferenciación genética entre plantas de diferentes alturas en el intermareal constituye una evidencia de este último caso. Las condiciones ambientales del intermareal parecen conformar un gradiente selectivo suficientemente intenso como para afectar la distribución vertical de la variabilidad genética.

Se concluye, por tanto, que a pesar de que la respuesta de *M. laminarioides* a la heterogeneidad ambiental está determinada principalmente por una amplia curva de tolerancia o plasticidad fenotípica, las poblaciones tienen el potencial de adaptarse localmente variando su composición genética.

Dependiendo de su intensidad, las condiciones ambientales pueden afectar la distribución de la variabilidad genética en esta especie, promoviendo una diferenciación aún a escala micro-geográfica.

CAPÍTULO V

Discusión general

Introducción

Uno de los objetivos centrales en biología evolutiva es entender la relación entre la variabilidad fenotípica de los organismos y la variación ambiental en la que ellos viven (Schlichting & Picliucci 1998). Dado que en la expresión fenotípica contribuye tanto el genotipo como el ambiente, la diversidad fenotípica de una población expuesta a un ambiente heterogéneo, dependerá de la variabilidad genotípica y de la plasticidad con que cada genotipo puede modificar su fenotipo bajo condiciones ambientales variables (Bazzaz 1996, Schlichting & Picliucci 1998). Un antiguo (y aparentemente aún no desechado) paradigma establece que la variabilidad genética y la respuesta plástica representan estrategias adaptativas mutuamente excluyentes en respuesta a la variabilidad ambiental (Schlichting & Picliucci 1998). Por una parte, la heterogeneidad del ambiente tiene el potencial para influir la distribución de la variabilidad genética a través de diferentes mecanismos evolutivos. Por otra, la plasticidad fenotípica, considerada como una de las principales facetas de la adaptación individual a la variación ambiental, puede obviar las diferencias genéticas entre los individuos y, ante la presión ambiental, permitir a diferentes genotipos generar una respuesta fenotípica adecuada. Sin embargo, ambos procesos no son necesariamente excluyentes, pudiendo aún ser complementarios en la respuesta de una especie ante la heterogeneidad del medio (Sultan & Bazzaz 1993b, Bazzaz 1996, Schlichting & Picliucci 1998) dependiendo de las características propias de la variabilidad ambiental (Lynch & Gabriel 1987). Esta complementaridad entre la variabilidad genética y la

plasticidad fenotípica es, precisamente, lo que muestran los resultados del presente trabajo, donde se procuró evidenciar la estrategia adaptativa de *M. laminarioides* ante la heterogeneidad ambiental.

Variación fenotípica y genética en *M. laminarioides*

En el presente estudio se evidenció que la variabilidad fenotípica (ecofisiológica) que muestra *M. laminarioides* ante la heterogeneidad ambiental (Cap. 2), puede tener bases ambientales y genéticas. Los individuos de diferentes poblaciones muestran, a lo largo de su rango de tolerancia, una amplia plasticidad ecofisiológica ante las condiciones ambientales, pero también exhiben diferencias en su patrón de respuesta fenotípica (i.e. norma de reacción) entre individuos de distinto origen geográfico y de diferentes alturas en el intermareal. Ambos componentes de la variabilidad fenotípica fueron observados tanto a nivel geográfico como local.

Los resultados obtenidos, a partir de la comparación entre individuos de distintas poblaciones, confirmaron la presunción inicial sobre la existencia de ambos componentes en la variabilidad fenotípica que pueden mostrar individuos de diferentes orígenes geográficos (Hipótesis 1, Cap. 1). En cada individuo se observó un amplio rango de tolerancia ante la variación de factores como la temperatura y la desecación, lo cual fue consecuente con la considerable variabilidad espacial y temporal de estos factores en el ambiente en vivo de la especie. En tanto que, bajo condiciones de jardín común, se evidenciaron

diferencias significativas en la curva de tolerancia entre individuos de diferente origen geográfico. Diferencias como la mayor tasa fotosintética observada en frondas de Maitencillo a los 10° y 20° C, o el mayor crecimiento en juveniles de Fray Jorge a los 10° C, o en los de Pucatrihue a los 25° C son ejemplos de esta diferenciación ecofisiológica observada en *M. laminarioides*, lo mismo que el crecimiento diferencial entre juveniles de Fray Jorge y Pucatrihue a niveles intermedios de desecación. Estas diferencias, sin embargo, entendidas como ecotípicas, parecen relativamente limitadas en relación al alto grado de diferenciación de la variabilidad genética neutra mostrada por esta especie a nivel geográfico (Cap. 4). Si bien la variabilidad ecofisiológica y la diversidad genética neutra no son necesariamente comparables, puesto que son diferentes planos de evaluación de la diversidad, el grado de diferenciación genético es un indicador del potencial de adaptación local de las poblaciones (Hartl & Clark 1989), y por consiguiente *M. laminarioides* muestra un mayor potencial que el efectivamente evaluado en términos ecofisiológicos.

Por otra parte, la comparación entre individuos de diferentes alturas en el intermareal permitió rechazar la hipótesis que establecía la ausencia de bases genéticas en la variación fenotípica (ecofisiológica) entre las plantas ubicadas a lo largo del gradiente vertical del intermareal (Hipótesis 2, Cap. 1). Junto al amplio rango de tolerancia individual, el cultivo bajo condiciones de jardín común a distintas temperaturas o niveles de desecación evidenció diferencias significativas en la curva de tolerancia entre juveniles provenientes de la parte

alta y baja del intermareal. En la mayoría de los casos los juveniles procedentes de la parte baja del intermareal crecieron significativamente más que los de la parte alta, como ocurrió en Pucatrihue a lo largo de todo el rango térmico o a niveles intermedios de desecación. A este nivel, la variabilidad ecofisiológica y la diferenciación genética neutra mostraron una consistente coincidencia (Cap. 4). Si bien los niveles de análisis y las herramientas de evaluación son completamente distintos entre ambas variables, su coincidencia –que es inusual– puede indicar que los factores ambientales que determinan la diferenciación ecofisiológica están afectando también la distribución de la variabilidad genética neutra (Godelle et al 1998).

Los resultados del presente estudio también confirman la hipótesis que plantea diferencias en el rango de tolerancia entre individuos de diferentes fases reproductivas (Hipótesis 3, Cap. 1). Especialmente ante el gradiente de desecación, los individuos de cada fase reproductiva muestran diferencias en su rango de tolerancia. Entre plantas adultas, por ejemplo, la eficiencia fotosintética de las frondas esporofíticas fue más afectada por la desecación que la de las gametofíticas, reduciéndose significativamente a niveles medios de deshidratación y alcanzando una menor recuperación cuando la pérdida de agua fue mayor. Entre los juveniles, en tanto, a niveles medios de desecación los gametofitos de Fray Jorge crecen significativamente más que los esporofitos, mientras que los juveniles provenientes de Pucatrihue muestran una tendencia inversa, en este caso los gametofitos crecen menos que los

esporofitos. Estas diferencias entre fases evidencian, sin embargo, un patrón complejo, mostrando la dominancia de una fase en una localidad y en otra la de la fase alternativa. Los resultados parecen indicar que no existe una relación estrecha entre las diferencias fenotípicas y los niveles de ploidía de cada fase reproductiva.

Gradiente ambiental y curva de tolerancia

La plasticidad fisiológica, que permite describir una curva de tolerancia ante un gradiente de temperatura y de desecación en *M. laminarioides*, parece estar estrechamente asociada al gradiente ambiental en que se distribuye esta especie. El rango de tolerancia térmico de *M. laminarioides* es similar al de otras especies de orígenes geográficos templado y templado-frío (ver tabla 3-18, Cap.3), mientras que su tolerancia a la desecación es típica de especies que habitan la zona media y media alta del intermareal (ver tabla 3-19, Cap.3).

En este sentido, el gradiente ambiental juega un rol determinante en la amplitud y la forma que presenta la curva de tolerancia en cada individuo. Las condiciones que favorecen la evolución de la plasticidad son aún materia de discusión, aunque se reconoce la importancia de la frecuencia y predictibilidad de los cambios ambientales (Lynch & Gabriel 1987, Sultan 1992, Schlichting & Pigliucci 1998). Algunos análisis han indicado que la plasticidad fenotípica responde principalmente a una variación temporal de las condiciones ambientales, particularmente cuando esta variación ocurre a una escala

temporal menor que el tiempo generacional (Lynch & Gabriel 1987). Por el contrario, la heterogeneidad espacial podría seleccionar genotipos más especializados (de menor plasticidad) si los cambios temporales ocurren con una frecuencia mayor que el tiempo generacional. Así, a nivel local, en el contexto intermareal las fluctuaciones diarias y estacionales de las condiciones ambientales parecen ser determinantes en la respuesta plástica de *M. laminarioides* y, probablemente, la de otras especies de este hábitat (Trassell et al. 2000, Appelbaum et al. 2002).

Por consiguiente, la plasticidad fisiológica observada en *M. laminarioides* es esperable, dado la heterogeneidad ambiental en que se distribuyen las algas, particularmente las intermareales. En general, la ocurrencia de plasticidad fenotípica ha sido observada en muchas especies de algas marinas, entre las que se encuentran representantes de los más diversos grupos taxonómicos (Russell 1986). Esta plasticidad ha sido observada en diferentes caracteres y asociada a distintos factores ambientales: cambios morfológicos relacionados con la variación del fotoperíodo, intensidad luminosa, nutrientes u oleaje; variación fisiológica dependiendo de temperatura, luminosidad o salinidad, cambios en la tasa de división y expansión celular asociadas a la intensidad luminosa y el fotoperíodo, etc.

Si bien esta plasticidad ecofisiológica ha sido extensamente descrita en macroalgas (Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994), relacionándola con la

variabilidad ambiental en que viven, su potencial evolutivo ha recibido muy poca atención entre estas especies. Por el contrario, la plasticidad fenotípica en macrolagas ha sido considerada como uno de los mayores problemas para circunscribir adecuadamente un taxón o distinguir los efectos de la selección natural (Russell 1986, Morales & Trainor 1997). Esta capacidad que tienen un genotipo, de adecuar su expresión fenotípica en respuesta a la variación ambiental, ha sido considerada desde hace ya algún tiempo en otros organismos, aunque su significado en los procesos ecológicos y evolutivos han sido estudiada sólo en la última década (Schlichting 1986, Sultan 1987, Tompson 1991, Sultan 1992, Scheiner 1993). En plantas superiores la plasticidad fenotípica, y su implicancia ecológica-evolutiva, ha sido evidenciada para diversos rasgos: morfológicos (Sultan & Bazzaz 1993a, b y c, Pedrol et al. 2000), ecofisiológicos (Sultan & Bazzaz 1993a, Eckerly 2000, Pedrol et al. 2000), defensas químicas (Han & Lincoln 1997).

Variabilidad en el rango de tolerancia

Por su parte, la variabilidad en la curva de tolerancia, que forma parte de la respuesta adaptativa a la heterogeneidad ambiental en *M. laminarioides*, puede tener implicancias tanto ecológicas como evolutivas. La variación en la curva de tolerancia sugiere, por una parte, que *M. laminarioides* está respondiendo a diferentes condiciones ambientales y, por otra, que existe un potencial genético en la plasticidad que permitiría la evolución de la respuesta adaptativa ante la heterogeneidad ambiental.

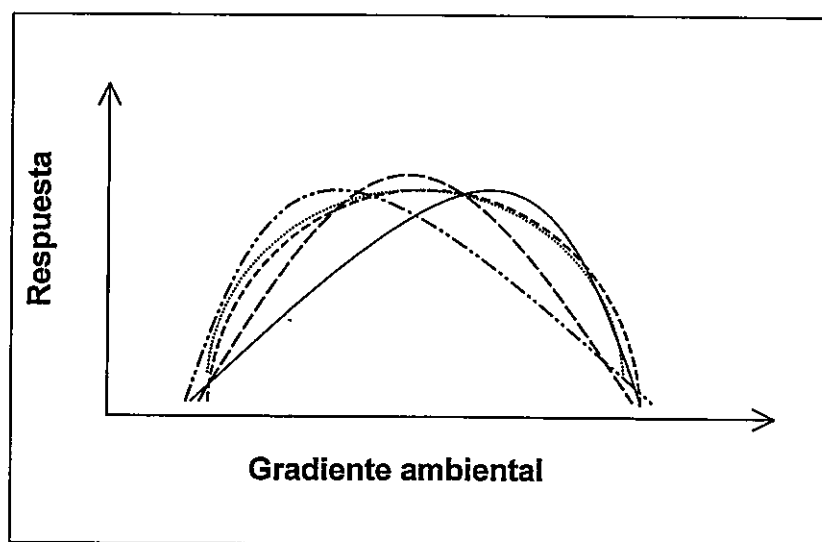


Fig. 5-1: Modelos de respuestas a la heterogeneidad ambiental, en un contexto poblacional, observado en *M. laminarioides*. Curvas de tolerancia de distintos genotipos que difieren en la magnitud (óptimo) de respuesta ante el gradiente ambiental.

La variación en la curva de tolerancia muestra un patrón definido de variación, observándose principalmente en relación a los niveles intermedios (óptimos) de la curva (Fig. 5-1). A nivel geográfico, la norma de reacción (i.e. el patrón de expresión fenotípica) de la tasa fotosintética en función de la temperatura mostró diferencias entre individuos de distintas poblaciones en la magnitud (óptimo) y no en la amplitud o límites de tolerancia. Lo mismo ocurrió

con el patrón de expresión fenotípica exhibido por el crecimiento de los juveniles, que mostraron diferencias en torno al óptimo térmico o niveles medios de desecación. Aún a nivel local, los juveniles procedentes de diferentes alturas en el intermareal mostraron normas de reacción para el crecimiento que difirieron en los óptimos térmicos o a niveles intermedios de desecación.

Este patrón de variación puede estar estrechamente relacionado a las características de la variabilidad ambiental en que vive esta especie. Si la plasticidad responde a la variación temporal de las condiciones ambientales, cuando esta ocurre a una escala de tiempo menor que la generacional (Lynch & Gabriel 1987), la convergencia en la amplitud o límites de tolerancia, observada en *M. laminarioides*, implica que los diferentes genotipos están expuestos a una variabilidad ambiental relativamente semejante. No obstante, la variabilidad observada a niveles intermedios (u óptimos) parece indicar que, a pesar de la variación temporal equivalente, pueden existir espacialmente diferencias en el promedio de las condiciones ambientales. Ambos tipos de varianza ambiental, temporal y espacial, parecen ser observadas a lo largo de la distribución de esta especie. La evaluación de los parámetros ecofisiológicos realizada en terreno (Cap. 2) demostró que en el intermareal las plantas están sujetas a una intensa fluctuación, diaria y estacional, de factores como la intensidad luminosa, la temperatura y la desecación. No obstante, las condiciones ambientales en el intermareal no son homogéneas. El gradiente vertical determina respuestas ecofisiológicas muy distintas entre plantas ubicadas a diferentes alturas en el

intermareal. Del mismo modo, aunque sin responder a un gradiente geográfico, se observaron diferencia entre plantas de distintas localidades.

Por otra parte, el patrón de variabilidad de la curva de tolerancia puede tener también implicancias en la respuesta de *M. laminarioides* a la selección. Si los genotipos de distintas poblaciones o de una misma población tienen una respuesta convergente bajo condiciones de estrés, el potencial de respuesta a la selección es reducido. La convergencia fenotípica de diferentes genotipos, particularmente bajo condiciones limitantes, refleja un importante compromiso del carácter evaluado con la determinación de la adecuación biológica (Sultan & Bazzaz 1993c) y, en consecuencia, la presencia de variabilidad depende de la existencia de condiciones ambientales que puedan favorecer la presencia de variantes. Por tanto, la existencia de variación en la norma de reacción puede ser mantenida por la heterogeneidad espacial, lo cual permite que diferentes fenotipos sean favorecidos en distintos ambientes (Ackerly et al. 2000). En este contexto, las diferencias en la variación de las condiciones térmicas, o su incidencia en el pasado, podrían explicar las diferencias ecotípicas evidenciadas en este estudio (a niveles intermedios de la curva) o entre este y el estudio donde la norma de reacción observada en plantas colectadas en el extremo sur de la distribución de *M. laminarioides* muestra rangos diferentes (Wiencke y Dieck 1990). De hecho, diferencias como estas han sido reconocidas en las diferencias ecotípicas observadas en otras especies de

macroalgas a nivel geográfico (Breeman 1988, Cambridge et al. 1990, Peters & Breeman 1992, Bischoff & Wiencke 1995, Pakker et al. 1995).

A nivel local, el patrón de variabilidad de la curva de tolerancia parece ser mantenido por los efectos selectivos del gradiente intermareal. A diferencia de lo que ocurre a nivel geográfico, donde la diferenciación ecotípica es favorecida por el limitado flujo génico demostrado en *M. laminarioides* (Cap. 4), la variabilidad en la norma de reacción entre genotipos de diferentes alturas en el intermareal parece ser mantenida en virtud del gradiente de selección vertical presente en el intermareal. A pesar de que, a distancias tan cortas (1 a 2 m), esta diferenciación podría ser homogenizada por la extensión del flujo génico, la variabilidad genética es mantenida debido a que diferentes genotipos son favorecidos en cada extremo del cinturón intermareal ocupado por la especie. En plantas superiores existen diferentes ejemplos de diferenciación genética mantenida por la presión selectiva ejercida por la variación de los factores ambientales (Linhart & Grant 1996). En macroalgas los efectos selectivos del gradiente intermareal sobre la diferenciación han sido sugeridos en diferentes trabajos (Innes 1988, Williams & Di Fiori 1996, Zuccarello et al. 1999, Wright 2000).

Las diferencias en la curva de tolerancia observada entre ambas fases reproductivas muestra un patrón complejo. Mientras en una localidad las plantas gametofíticas exhiben un mayor crecimiento a niveles intermedios de

desección, en otra lo hacen los esporofitos. Una mejor respuesta de gametofitos juveniles a la desecación y a la temperatura ha sido considerado como un antecedente que permitiría explicar la relativa dominancia de esta fase en la zona media alta del cinturón intermareal ocupado por *M. laminarioides* (Hannach & Santelices 1985, Luxoro & Santelices 1987). Esto sería consistente con los resultados obtenidos entre los juveniles de Fray Jorge y las plantas adultas de Maitencillo, pero no con las observaciones hechas también en juveniles en Pucatrihue. Esta discrepancia no posibilita una explicación consistente. En algunas especies de Gigartinales, como *Iridaea cordata* y *I. cornucopiae* (*sensu* Hannach & Waaland 1986), la dominancia de una u otra fase reproductiva varia entre poblaciones. Aunque diferentes mecanismos han sido propuestos para explicar el hecho de que una fase llegue a ser dominante, hasta el momento no se ha postulado un mecanismo explicativo claro. Probablemente en estas diferencias entre poblaciones, al igual que en la dominancia a distintos niveles del intermareal, están involucrados diferentes factores que, además, varían de una localidad a otra.

Conclusiones generales

A través del presente estudio se ha evidenciado que tanto la plasticidad fenotípica (ecofisiológica) como la variabilidad genética están involucradas en la respuesta de *M. laminarioides* a la heterogeneidad ambiental. La participación de ambos componentes en la variabilidad fenotípica implica, por una parte, que ante un gradiente térmico o de desecación cada individuo es capaz de ajustar su expresión fenotípica a lo largo de su rango de tolerancia, y, por otra, que existen diferencias en el patrón de respuesta fenotípica (i.e. norma de reacción) entre individuos de distinto origen geográfico y de diferentes alturas en el intermareal. Estas diferencias corresponden principalmente a una variación a niveles intermedios (óptimos) de la curva de tolerancia, en tanto que los diferentes genotipos muestran una convergencia hacia los extremos o límites del rango.

La variación en la curva de tolerancia permitió alcanzar algunas conclusiones sobre la diversidad genética en *M. laminarioides* y sobre la relación de esta con la heterogeneidad ambiental. Esta variación sugiere que en *M. laminarioides* existe el potencial genético, en cuanto los rasgos ecofisiológicos, que pueden permitir la evolución en la respuesta adaptativa ante la heterogeneidad ambiental. Heterogeneidad que puede estar definida por diferencias espaciales en el promedio de las condiciones ambientales. En tanto que la convergencia en la amplitud o límites de tolerancia sugiere, por su parte,

que los diferentes genotipos están expuestos a un rango variabilidad temporal relativamente semejante, al menos en el rango geográfico evaluado.

En consecuencia, en *M. laminarioides* tanto la plasticidad fenotípica (ecofisiológica) como la variabilidad genética forman parte de la diversidad fenotípica de una población expuesta a un ambiente heterogéneo. Así, aunque espacialmente pueden existir diferencias ecofisiológicas entre genotipos de diferente origen geográfico o intermareal, la plasticidad permite a cada genotipo modificar adecuadamente su fenotipo ante la heterogeneidad del ambiente y, al mismo tiempo, permite que diferentes genotipos converjan fenotípicamente en determinadas condiciones ambientales, particularmente bajo circunstancias extremas.

Bibliografia

Ackerly D., Dudley S., Sultan S., Schmitt J., Coleman J., Linder C., Sandquist D., Geber M., Evans A., Dawson T. & Lechowicz M. (2000) The evolution of plant ecophysiological traits: Recent advances and future directions. *BioScience* 50(11): 979 – 995.

Abe S., Kurashima A., Yokohama Y. & Tanaka J. (2001) The cellular ability of desiccation tolerance in Japanese intertidal seaweeds. *Bot. Mar.* 44: 125 – 131.

Appelbaum L., Achituv Y. & Mokady O. (2002). Speciation and the establishment of zonation in an intertidal barnacle: specific settlement vs. Selection. *Molecular Ecology* 11: 1731 – 1737.

Bazzaz F. A. (1996) Plants in changing environmental. Linking physiology, population, and community ecology. Cambridge University Press.

Beer S. & Kautsky L. (1992) The recovery of net photosynthesis during rehydration of three *Fucus* species from the Swedish West Coast Following exposure to air. *Bot. Mar.* 35: 487 – 491.

Billot C. (1999) Structuration génétique des populations de *Laminaria digitata* (Phaeophycées) en Manche: utilisation de marqueurs hypervariables. Doctorat d'Université, I.N.A.P.G.:Paris.

Bischoff B. & Wiencke (1996) Temperature requirements for growth and survival of Antarctic Rhodophyta. *J. Phycol.* 32: 525 – 534.

Bischoff B. & Wincke C. (1996) Temperature requirements for growth and survival of Antarctic Rhodophyta. *J. Phycol.* 32: 525 – 535.

Breeman A. M. (1988) Relative importance of temperature and other factors in determining geographic boundaries of seaweeds: experimental and phenological evidence. *Helgoländer Meeresunters* 42: 199 – 241.

Brown M. (1987) Effects of desiccation on photosynthesis of intertidal algae from southern New Zealand shore. *Bot. Mar.* 30: 121 – 127.

Bruhn J. & Gerard V. (1996) Photoinhibition and recovery of the kelp *Laminaria saccharina* at optimal and super optimal temperatures. *Mar. Biol.* 125: 639 – 6248.

Canningham A., Levassasseur G., Estrada M., Hanelt D. & Wilhelm C. (1996) Technical discussion III. Fluorescence measurements. *Sci. Mar.* 60: 301 – 302.

Coyer J., Roberson D. & Alberte R. (1995) Genetic variability and parentage in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) using multi-locus DNA fingerprinting. *J. Phycol.* 31: 819 – 823.

Coyer J.A, Olsen J.L & Stam W.T (1997) Genetic variability and spatial separation in the sea palm kelp *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyceae) as assessed with M13 fingerprints and rapds. *J. Phycol* 33: 561 – 568.

Coyer J.A, Robertson D.L & Alberte R.S (1994) Genetic variability within a population and between diploid/haploid tissue of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae). *J. Phycol* 30: 545 – 552.

Craigie J. & Leigh c (1978) Carrageenans and agar. In Helle bust J. & Caigie J. (Eds.) Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods. Cambridge University Press, Lodon.

Chapman A (1995) Functional ecology of furoid algae. twenty-three year of progress. *Phycologia* 34. 1 – 32.

Davison I. (1991) Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27: 2 – 8.

Davison I.R. & Pearson G. (1996) Stress tolerance in intertidal seaweed. *J. Phycol.* 32: 197 – 211.

Dudley S. & Schmitt J, (1996) Testing the adaptative plasticity hypothesis: density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. *Am. Nat.* 147: 145 – 165.

Edwards M. (2000) The rol of alternative life-history stages of a marine macroalga: a seed bank analogue? *Ecology* 81(9): 2404 – 2415.

Einav R., Breckle S. & Beer S. (1995) Ecophysiological adaptation strategies of some intertidal marine macroalgae of the Israeli Mediterranean coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 125: 219 – 228.

Ensminger I., Hagen C. & Braune W. (2000) Strategies providing success in variable habitat: II. Ecophysiology of photosynthesis of *Cladophora glomerata*. *Plant, cell and environmental* 23: 1129 – 1136.

Ensminger I., Xyländer M., Hagen C & Barune W. (2001) Strategies providing success in variable habitat: III. Dynamic control of photosynthesis in *Cladophora glomerata*. *Plant, cell and Environment* 24: 769 – 779.

Epperson B.K. (1993) Recent Advances in Correlation Studies of Spatial Patterns of Genetic Variation. *Evolutionary Biology* 27, Max K. Hecht et al. (eds.) Plenum press, New York.

Excoffier I., Smouse P. & Quattro J. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among restriction data. *Genetics* 131: 479 – 491.

Faugeron S. (2002) Epidémiologie, biologie et génétique des populations de *Mazzaella laminarioides* (Rhodophyta) infectée par *Endophyton* sp (Chlorophyta) et *Pleurocapsa* sp. (Cyanobacteria). Thèse de doctorat, Université Lille I.

Faugeron S., Valero M., Destombe C., Martinez E. & Correa J. (2001) Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycology* 37: 1 – 12.

Flakowski P.G. & Raven J.A (1997) Aquatic photosynthesis. Blackwell Science, Inc.

Franklin L.A., Levavasseur G. Osmond BC., Henley W. & Ramus J. (1992) Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotunda*. *Planta* 186: 399 – 408.

Gerard V. & Du Bois K. (1988) temperature ecotype near the southern boundary of kelp *Laminaria saccharina*. *Mar. Biol.* 97: 575 – 580.

Gerard V. (1990) Ecotypic differentiation in the Kelp *Laminaria saccharina*: phase-specific adaptation in the complex life cycle. *Marine Biology* 107: 519 – 528.

Godelle B., Austerlitz F., Brachet S., Colas B., Cuguen J., Dandon S., Gouyon P., Lefranc M., Olivieri I., Reboud X. & Vitalis R. (1998) Système génétique, polymorphisme neutre et sélectionne: implications en biologie de la conservation. *Genet. Sel. Evol.* 30 (Suppl.): s15 - s28.

Hanelt D., Huppertz K. & Nultsch W. (1993) Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated on laboratory and field. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97: 31 – 37.

Han K. & Lincoln D. (1997) The impact of plasticity and maternal effect on the evolution of leaf resin production in *Diplacus aurantiacus*. *Evolutionary ecology* 11: 471 – 484.

- Hannach G. & Santelices B. (1985) Ecological differences between the isomorphic reproductive phases of two species of *Iridaea* (Rhodophyta: Gigartinales). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 22: 291 – 303.
- Hannach G. & Waaland J.R. (1986) Environment, Distribution and production of *Iridaea*. *Aquatic Botany* 26: 51 – 78.
- Harris, S. A. (1999) RAPDs in systematics - a usefull methodology?" in "Molecular systematics and plant evolution. éd. P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman & R. J. Gornall. Taylor & Francis, London. 211 – 228.
- Hartl D. & Clark A. (1989) Principles of popupaltion genetics. Sinauer, Sunderland Massachusetts.
- Havaux M. (1992) Stress tolerance of photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat, and Photoinhibition stresses. *Plant Physiol.* 100: 242 – 432.
- Henley W. (1993) Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J. Phycol.* 29: 729 – 739.
- Herbert S. & Waaland J. (1988) Photoinhibition of photosynthesis in san and shade species of the red algal genus *Phorphyra*. *Mar. Biol.* 97: 1 – 7.
- Hoffman A. & Santelices B. (1991) Bank of microscopic forms: hypothesis on their functioning and comparisons with seed bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 185 – 194.
- Hoffmann A. & Camus P. (1989) Sinking rates and viability of spores from benthic algae in central Chile. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 126: 281 – 291.
- Hoffmann A. & Santelices B. (1998) Flora marina de Chile central. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Hoffmann A.A. & Blows M.W. (1994) Species borders: Ecological and evolutionary perspectives. *TREE* 9(6): 223 – 227.
- Hoffmann A.A., Sgró M. & Lawler S.H. (1995) Ecological population genetics: the interfase between genes and the environment. *Ann. Rev. Genetics* 29: 349 – 370.
- Hurd C. & Dring M. (1990) Phosphate uptake by intertidal algae in relation to zonation and season. *Mar. Bot.* 107: 281 – 289.

- Innes D.J. (1988) Genetic differentiation in the intertidal zone in population of the alga *Enteromorpha linza* (Ulvales: Chlorophyta). *Marine Biology* 97: 9 – 16.
- Kirkpatrick M. & Barton N.H. (1997) Evolution of species' range. *Am. Nat.* 150(1): 1 – 23.
- Krause G. (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanism. *Physiol. Plant.* 74: 566 – 574.
- Krüger G., Tsimilli-Michael M. & Strasser R. (1997) Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in *Camellia* leaves. *Physiol. Plant.* 101: 265 – 277.
- Kübler J.E. & Davison I. (1993) High temperature tolerance of photosynthesis in red algae *Chondrus crispus*. *Mar. Biol.* 117: 327 – 335.
- Lazár D. (1999) Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412: 1 – 28.
- Linhart Y. B. & Grant M. C. (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27: 237 – 277.
- Lobban C.S. & Harrison P. (1994) *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press.
- Loveless M.D. & Hamrick J. L. (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65 – 96.
- Lu C. & Zhang J. (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J. Exp. Bot.* 50(336): 1199 – 1206.
- Lu T.T. & Williams S. L. (1994) Genetic diversity and genetic in the brown alga *Halidrys dioica* (Fucales: Cystoseiraceae) in Southern California. *Marine Biology* 121: 363 – 371.
- Lüning K. (1990) *Seaweeds. Their environment, biogeography, and ecophysiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Luxoro C. & Satelices B. (1989) Additional evidence for ecological differences among isomorphic reproductive phases of *Iridaea laminarioides* (Rhodophyta:Gigartinales) *J. Phycol* 25: 206 – 212.
- Lynch M. & Gabriel W. (1987) Environmental tolerance. *The American Naturalist* 129(2): 283 – 303.

- Madsen T. & Maberly S. (1990) A comparison of air and water as environments for photosynthesis by the intertidal alga *Fucus spiralis* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 26: 24 – 30.
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209 – 220.
- Matta J. & Chapman D. (1995) Effects of light, temperature, and desiccation on the net emersed productivity of the intertidal macroalga *Capomenia peregrina* Sauv. (Hamel). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 189: 13 –27.
- Molenaar F.J. & Breeman A.M. (1997) Latitudinal trends in the growth and reproductive seasonality of *Delesseria sanguinea*, *Membranoptera alata*, and *Phycodrys rubens* (Rhodophyta) *J. Phycol* 33: 330 – 343.
- Molenaar F.J. & Breeman A.M. (1994) Ecotypic variation in *Phyllophora pseudoceraoides* (Rhodophyta) ensures winter reproduction throughout geographic range. *J. Phycol* 30: 392 – 402.
- Morales E. & Trainor F. (1997) Algal phenotypic plasticity: Its importance in developing new concepts The case for *Scenedesmus*. *Korean. J. Phycol.* 12(3): 147 – 157.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from an small number of individuals. *Genetics* 89: 583 – 590.
- Niklas K. (1997) *The evolutionary biology of plants*. The university of Chicago Press, Ltd., London. 449 pp.
- Owuor E. Fahima T. Beiles A., Karol A. & Nevo F. (1997) Population genetic respond to microsite ecological stress in wild barley, *Hordeum sponianum*. *Mol. Ecol.* 6: 1177 – 1187.
- Pakker H., Breeman A. M., Prud'homme van Riene W. & Van den Hoek C. (1995) A comparative study of temperature responses of caribbean seaweeds from different biogeographic groups. *J. Phycol* 31: 499 – 507.
- Palumbi S. R. (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 25: 547 – 572.
- Parker P.G., Snow A.A., Schug M.D., Booton G.C. & Fuerst P.A. (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79(2): 361 - 382.

Parsons P.A. (1991) Evolutionary rates: stress and species boundaries. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22: 1 – 18.

Parsons P.A. (1992) Evolutionary adaptation and stress. *Evolutionary Biology*. Vol. 26, Hecht et al. (eds.), Plenum Press, New York.

Pedrol N., Ramos P. & Reigosa M. (2000) Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvet-grass: a long term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. *J. Plant Physiol.* 157: 383 – 393.

Peters A. F. & Breeman A.M. (1993) Temperature tolerance and latitudinal range of brown algae from temperate Pacific South America. *Marine Biology* 115: 143 – 150.

Pigliucci M. (1996) How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and *viceversa*). *TREE* 11(4): 168 – 173.

Reynolds J., Weir B., and Cockerham C. (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105:767 – 779.

Russell G. (1986) Variation and natural selection in marine macroalgae. *Oceanogr. Mar. Ann. Rev.* 24: 309 – 377.

Santelices B. (1989) *Algas Marinas de Chile. Distribución, Ecología, Utilización, Diversidad.* Ediciones Universidad Católica de Chile.

Santelices B. (1990) Patterns of reproduction dispersal and recruitment in seaweed. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 28: 177 – 276.

Saunders G. (1993) Gel purification of red algae genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction- friendly DNA. *J. Phycol.* 29:251 – 254.

Schlichting C. & Pigliucci M. (1998) *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective.* Sinauer Associates, Inc., Publishers.

Schmitt J., Dudley S. & Pigliucci M. (1999) Manipulative approaches to testing adaptive plasticity: Phytochrome-mediated shade-avoidance responses in plants. *Am. Nat.* 154 (Suppl.): s43 - s54.

Schneider S. Roessli S. & Excoffier L. (2000) Arlequin. A software for population genetic data analysis. Version 2000. Genetics and biometry laboratory of Geneva. Switzerland.

- Slatkin M. (1987) Gene flow and geographic structure of natural population. *Science* 236: 787 – 236.
- Smith C. & Berry J. (1986) Recovery of photosynthesis after exposure of intertidal algae to osmotic and temperature stress: comparative studies of species with differing distributional limits. *Oecologia* 70: 6 – 12.
- Sosa P. & Lindstrom S. (1999) Isozymes in macroalgae (seaweed): genetic differentiation, genetic variability and systematic applications. *Eur. J. Phycol.* 34: 427 – 42.
- Srivastava A. & Strasser R. (1996) Stress and stress management of land plants during a regular day. *J. Plant Physiol.* 148: 445 – 455.
- Stearns S.C. (1992) *The evolution of life histories*. Oxford University Press. New York.
- Strasser R., Srivastava A. & Govindjee (1995) Poliphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plant and cyanobacteria. *Phytochem. Phytobiol.* 61: 32 – 42.
- Sultan S. (1987) Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. *Evol. Biol.* 21: 127 – 178.
- Sultan S. E. (1992) What has survived of Darwin's theory? Phenotypic plasticity and the Neo-darwinian legacy. *Evolutionary Trends in Plants* 6(2): 61 – 71.
- Sultan S. & Bazzaz A. (1993a) Phenotypic plasticity in *Poligonum persicaria* I. Diversity and uniformity in genotypic norms of reaction to light. *Evolution* 47: 1009 – 1031.
- Sultan S. & Bazzaz A. (1993b) Phenotypic plasticity in *Poligonum persicaria*. II. Norms of reaction to soil moisture and the maintenance of genetic diversity. *Evolution* 47: 1032 – 1049.
- Sultan S. & Bazzaz A. (1993c) Phenotypic plasticity in *Poligonum persicaria*. III. The evolution of of ecological breadth for nutrient environment. *Evolution* 47: 1050 – 1071.
- Thomas B., Macdonald S., Hicks M. Adams D. & Hodgerris R. (1999) Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet* 98: 793 – 801.

- Thomas T., Turpin D. & Hurrison P. (1987a) Desiccation enhanced nitrogen uptake rates in intertidal seaweeds. *Mar. Bot.* 94: 293 – 298.
- Thomas T., Turpin D. & Hurrison P. (1987b) Adaptations of *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) to nitrogen procurement at different intertidal location. *Mar. Biol.* 93: 569 – 580.
- Trussell G. (2000) Phenotypic clines, plasticity, and morphological trade-off in an intertidal snail. *Evolution* 54(1): 151 – 166.
- Valero M., Engel C., Billot C., Kloareg B. & Destombe C. (2001) Concepts and issues of population genetics in seaweed. *Cah. Biol. Mar.* 42: 53 – 62.
- van Oppen M., Klerk H., Olsen J. & Stam W. (1996) Hidden diversity in marine algae: Some examples of genetic variation below the species level. *J. Mar. Biol:Ass. U.K.* 76: 239 – 242.
- West-Eberhard M. (1989) phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20: 249 – 278.
- Wiencke C. & tom Dieck I. (1990) Temperature requirements for growth and survival of macroalgae from Antarctica and southern Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 59: 157-170.
- Wiltens J., Schreimber U. & Vidaver W. (1978) Chlorophyll fluorescence induction: and indicator of photosyntetic activity in marine algae undergoing desiccation. *Can. J. Bot* 56: 2787 – 2794.
- Williams S.L. & Di Fiori R.E (1996) Genetic diversity and structure in *Pelvetia fastigiata* (Phaeophyta:Fucales): does a small effective neighborhood size explain fine-scale genetic structure? *Marine Biology* 126: 371 – 382.
- Wong K & Sun M. (1999) Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Ochidaceae) *Am J. Bot.* 86:1406 – 1413.
- Wright J, Zuccarello G. Steinberg P. (2000) Genetic struture of the subtidal red algae *Delesia pulchra*. *Mar. Biol.* 136: 439 – 448.
- Wright J., Zuccarillo G. & Steinberg P. (2000) Genetic structure of the subtidal red alga *Delisea pulchra*. *Marine biology* 136: 439 – 448.
- Wright S. (1951) The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323 – 354.

Zuccarello G., Yeates P. & Wright J. (2001) Population structure and physiological differentiation of haplotypes of *Caloglossa leprieurii* (Rhodophyta) in mangrove intertidal zone. *J. Phycol.* 37: 235 – 244.