

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



Tolerancia a estrés térmico en plántulas con heterogeneidad genética (quiméricas) y unitarias en la macroalga parda *Lessonia spicata* (Phaeophyceae)

Seminario de título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Biólogo con mención en Medio Ambiente.

JUAN EDUARDO HERNÁNDEZ OYARZÚN

Directora: Dra. Alejandra González V.

Co-directora: Jessica Beltrán

Agosto 2018

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Juan Eduardo Hernández Oyarzún**

“Tolerancia a estrés térmico en plántulas con heterogeneidad genética (quiméricas) y unitarias en la macroalga parda *Lessonia spicata* (Phaeophyceae)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención Medio Ambiente

Directora Seminario de Título: _____
Dra. Alejandra González V.

Co-Directora Seminario de Título: _____
Profesor Jessica Beltrán

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile, Agosto de 2018.

BIOGRAFÍA

Nací el 29 de Agosto de 1993 en Puerto Montt. Realice mis estudios de enseñanza básica y media en el Colegio San Francisco Javier de la misma ciudad. El 2012, luego de haber rendido la PSU, ingrese a estudiar Biología con mención en Medio Ambiente en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. El año 2017 obtuve el grado de Licenciado en Ciencias Ambientales con mención en Biología. Actualmente trabajo en el Laboratorio Fitecoevo de la misma facultad.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en particular a mis padres y hermana, que me han apoyado en cada una de mis decisiones y a Pandora por su infinito e incondicional amor.

A mis tutoras, Alejandra y Jessica, por todo lo enseñado, por el cariño, por el apoyo, por darme la oportunidad de trabajar y aprender de ellas y por creer en mí.

A toda la gente de la Unidad de Cultivo de Algas de la PUC, en especial a Verónica por todos sus consejos, a Joaquín por su ayuda incondicional y a Amparo por las risas. No puedo dejar de mencionar a Oscar, Dani, Anita, Su y Maribel por la buena onda y todos sus comentarios.

A la gente de biodinámica, en especial a Martin y Naty, por la amistad, el carrete, el cariño y la química.

Finalmente a mis amigos y amigas de (ex) ELM, en particular a Cata y Joaquín. Muchas gracias por estos últimos 7 años, me sentí como en Skins. Les amo infinito.

CONTENIDO

Lista de figuras.....	7
Resumen.....	9
Abstract.....	11
Introducción.....	13
Objetivos.....	17
Materiales y Métodos.....	18
2.1 Organismo de Estudio.....	18
2.2 Sitio de Estudio.....	19
2.3 Desarrollo protocolo para la generación masiva de organismos genéticamente heterogéneos en condiciones de laboratorio.....	21
2.4 Cuantificación del crecimiento de individuos genéticamente homogéneos y quiméricos de una misma población, cultivados a distintas densidades y condiciones contrastantes de temperatura.....	24
2.5 Quimeras compuestos por diferentes niveles de parentesco cultivados a condiciones estresantes de temperatura.....	27
Resultados.....	29
3.1 Protocolo para la generación de individuos quiméricos con distinto parentesco en condiciones de laboratorio.....	29
3.2 Crecimiento de individuos unitarios y quiméricos de una misma población, cultivados a condiciones contrastantes de temperatura.....	32

3.3 Crecimiento de individuos quiméricos compuestos por diferentes cepas: quiméricos de una misma población, y quiméricos entre poblaciones distintas, cultivados a condiciones contrastantes de temperatura.....	35
Discusión.....	40
Conclusión.....	45
Referencias.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estadios de vida de *L. spicata*. A) Esporofito (2n) adulto. B) Esporas (n) producto de meiosis liberadas al medio. C) Gametofitos maduros (n). a: gametofito femenino, b: gametofito masculino. D) Esporofito (2n) post fecundación (con flecha se indica el esporofito juvenil).

Figura 2. Ubicación geográfica de las poblaciones estudiadas en Chile Central.

Figura 3. . Vista en detalle de los sustratos utilizados. A) Velcro. B) Criolabel. C) Cuerdas trenzadas

Figura 4. Esporofitos fusionados luego de 16 semanas de cultivo.

Figura 5. Efecto del cultivo con y sin movimiento en A: Densidad esporofitos y B: Adherencia esporofitos.

Figura 6. Efecto del sustrato en A: Densidad esporofitos y B: Adherencia esporofitos.

Figura 7. Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a) Plántulas unitarias versus quiméricas de medios hermanos a 12°C b) Plántulas unitarias versus quiméricas de medios hermanos a 18°C. Letras distintas indican diferencias significativas con $P < 0.05$.

Figura 8. Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a) Plántulas unitarias versus quiméricas de plantas distintas a 12°C b) Plántulas unitarias versus quiméricas de plantas distintas a 18°C. Letras distintas indican diferencias significativas con $P < 0.05$.

Figura 9. Comparación de la Tasa de crecimiento específico (%TC) de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a 12° y 18°C. a) Plántulas unitarias versus quiméricas de medios hermanos. b) Plántulas unitarias versus quiméricas de plantas distintas.

Figura 10: Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio. a) plántulas unitarias vs quimeras de distintas poblaciones a 12°C. b) plántulas unitarias vs quimeras de distintas poblaciones a 18°C.

Figura 11. Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio. a) Unitarias versus Quimeras entre dos poblaciones distintas a 12°C. b) Plántulas unitarias versus Quimeras entre dos poblaciones distintas a 18°C.

Figura 12. Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio. a) Unitarias versus plántulas con distinto nivel de quimerismo a 12°C. b) Unitarias versus plántulas con distinto nivel de quimerismo a 18°C.

Figura 13. Comparación de la Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a 12 y 18°C. a) Plántulas quiméricas de cada población. b) Plántulas quiméricas entre dos poblaciones. c) Plántulas unitarias versus plántulas con diferentes niveles de quimerismo.

RESUMEN

El quimerismo ocurre cuando dos individuos genéticamente distintos y conspecíficos se fusionan o coalescen generando una única entidad genéticamente heterogénea conocida como quimera. Este aumento en la variabilidad genética intraorganismo supondría un aumento en la variabilidad fenotípica del mismo, lo que conferiría a estas entidades una mayor tolerancia ante cambios ambientales en comparación a individuos genéticamente homogéneos o no quiméricos, posiblemente debido a efectos sinérgicos entre las distintas líneas celulares. El beneficio de ser quimera ha sido estudiado en distintos grupos de algas, particularmente en especies de algas rojas (*Gracilaria* y *Mazzaella*), las cuales muestran una correlación positiva entre coalescencia y tolerancia al estrés. A pesar de ello, en macroalgas pardas los estudios han sido mayoritariamente descriptivos, evidenciando los procesos de formación de entidades quiméricas, así como la frecuencia del quimerismo en poblaciones naturales de *Lessonia spicata*. Sin embargo, se desconoce aún si en esta especie los organismos con quimerismo muestran mayor tolerancia al estrés que aquellos genéticamente homogéneos y si existe un efecto en la adecuación biológica de la quimera de acuerdo al número de individuos fusionados así como el nivel de parentesco de los individuos que se fusionan para formar la quimera (e.g. fusión entre hermanos, medios hermanos, vecinos, poblaciones distintas). Basado en lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la tolerancia a estrés por temperatura de plántulas quiméricas y unitarias de *L. spicata* cultivadas en condiciones contrastantes de temperatura, distinto número de individuos fusionados y nivel de parentesco. Para ello, primero se desarrolló un protocolo para la generación masiva de plántulas con variabilidad genética intraorganismo de *L. spicata* en laboratorio. Segundo, se evaluó la tolerancia al estrés en términos de la tasa de crecimiento en condiciones contrastantes de temperatura ($12\pm 2^{\circ}\text{C}$ vs $18\pm 2^{\circ}\text{C}$) de plántulas quiméricas con distinto número de individuos fusionados versus unitarias. Tercero, se evaluó el efecto del parentesco sobre la quimera y el estrés térmico, comparando crecimiento entre unitarias, quimeras conformadas por cepas locales y quimeras conformadas por cepas de distintas poblaciones. Los resultados indicaron que plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos poseen una mayor tasa de crecimiento que las plántulas unitarias en condiciones normales de temperatura (12°C). Mientras que a estrés

térmico (18°C) plántulas quiméricas también poseen una mayor tasa de crecimiento, pero la significancia de la respuesta depende de la densidad y parentesco de las entidades que forman la quimera. En términos de parentesco, los resultados sugieren que las quimeras provenientes de la fusión de esporofitos de plantas no emparentadas poseen una tasa de crecimiento mayor que quimeras formadas con medios hermanos. A la luz de estos resultados es posible concluir que el quimerismo en la macroalga parda *Lessonia spicata* le conferiría una ventaja a dichos organismos frente a los continuos cambios ambientales. Este hecho adquiere relevancia si se sabe que la especie está constantemente expuesta a cambios de la temperatura producto del Niño, así como el aumento de la temperatura del océano causado por cambio climático.

ABSTRACT

Chimerism occurs when two genetically distinct and conspecific individuals fuse or coalesce, generating a single entity genetically heterogeneous known as chimera. This condition increase the intraorganismal genetic variability, that could increase in the phenotypic variability and provide higher tolerance to environmental changes compared to genetically homogeneous or non-chimeric individuals. These can be produced due to synergistic effects between the genetically different cell lines that coexist into the chimera. The benefit of chimeric condition has been studied in different groups of macroalgae, particularly in the red species (*Gracilaria* and *Mazzaella*). They show a positive correlation between coalescence and stress tolerance. Despite of this, in the brown macroalgae the studies have been poorly described, most of them are descriptive, evidencing the formation processes of chimeric entities, as well as the frequency of chimerism in natural *Lessonia spicata* populations. However, it is still unknown whether the chimerism in *Lessonia* species shows greater stress tolerance than those genetically homogeneous. As well as whether there the fitness is affected by to the number of individuals fused, and/or the level of kinship among the individuals that composed the chimera (e.g. fusion between siblings, half siblings, neighbors, different populations). In this context, the main objective of this study was evaluate the thermal stress tolerance of chimeric and unitary organism in the brown macroalgae *L. spicata*, which were cultivated under contrasting temperature conditions, different number of fused individuals and level of kinship. To this, firstly in this study generated a protocol for massive generation of plantlets with intraorganismal genetic variability of *L. spicata* in laboratory. Secondly, the stress tolerance was evaluated in terms of specific growth rate under contrasting temperature conditions (12 ± 2 °C vs 18 ± 2 °C) of chimeric plantlets with different numbers of individuals fused versus unitary ones. Thirdly, the effect of kinship on the chimera and thermal stress was evaluated by comparing growth rate between unitary individuals versus chimeras formed by local strains, and from different populations. The results indicate that chimeric plantlets resulting from the fusion of 5 sporophytes have a higher growth rate than the unitary plantlets under normal conditions (12°C). While under thermal stress (18°C) the chimeras have the higher growth rate. However, the significant differences depended on the density and kinship of the entities that made up the chimera and the culture temperature. In terms of

kinship, the results suggest that chimeras resulting from the fusion of sporophytes of unrelated plants have a higher growth rate than chimeras formed by half-sib brothers. Follow these results, it is possible to conclude that chimerism in the brown macroalga *Lessonia spicata* would confer an advantage to these organisms in face to continuous environmental changes. This fact acquires relevance if it is known that this species is constantly exposed to temperature changes produced by ENSO events, as well as the increase in the ocean temperature caused by climate change.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética se define como la variación en los genes dentro de una misma especie (e.g. riqueza alélica, heterocigosidad, Hughes et al., 2008). Esta ha sido ampliamente estudiada a nivel individual, poblacional y regional en organismos terrestres y marinos (Engelhardt et al., 2014; Ellers et al. 2011). En general se ha descrito que para estos tres niveles, una mayor diversidad genética incrementa la capacidad de adaptarse y evolucionar ante cambios en el ambiente (Franklin, 1980; Lacy, 1987; Frankham et al., 1999). Por lo tanto la diversidad genética es un factor fundamental para la viabilidad y sobrevivencia de las poblaciones y en consecuencia las especies (Fenster & Dudash, 1994; Coulson et al., 1998; Saccheri et al., 1998; Puurtinen et al., 2004). Sin embargo, en algunos organismos se ha descrito la existencia de otro nivel de diversidad genética, la heterogeneidad genética intraorganismo.

La heterogeneidad genética intraorganismo puede originarse de dos fuentes, por “mosaicismo” o por “quimerismo” (Pineda-Krch & Lehtilä, 2004; Santelices B, 2004). El mosaicismo es resultado de las mutaciones post-cigóticas de las células del organismo, que pueden incrementan directamente con la edad (Vijg, 2000). Mientras que el quimerismo resulta de la fusión somática (llamada coalescencia) de dos o más individuos genéticamente distintos, lo que genera en una nueva entidad biológica conocida como quimera, la que presenta un conjunto único de atributos morfológicos, anatómicos y funcionales (Santelices et al. 1999; Pineda-Krch & Lehtilä 2004).

El quimerismo ha sido descrito en variados grupos de organismos, entre los cuales encontramos hongos (Aanen et al., 2008), plantas terrestres (Thomson et al. 1991), invertebrados coloniales como esponjas, briozoos y corales (Buss, 1981), urocordados (Bishop & Sommerfeldt, 1999) y macroalgas marinas (Santelices et al., 1999). Para animales, la condición quimérica puede implicar tanto costos como beneficios, dentro de los costos, el parasitismo y la competencia de distintas líneas celulares dentro de un organismo pueden resultar en crecimiento cancerígeno (Buss, 1982; Hastings, 1989), o inestabilidad del desarrollo (Stewart, 1978). Además, puede existir incompatibilidad genética entre las distintas líneas celulares que se fusionan, lo que puede resultar en la formación de áreas necróticas o puntos de rechazo en las

zonas de contacto (Rinkevich, 2002; Bomblies & Weigel, 2007) o la no fusión de los organismos debido a la existencia sistemas de autoreconocimiento celular que evitan la fusión con las células que no son del propio organismo, excepto las de parientes o líneas celulares cercanas (Buss, 1982; Grosberg & Strathmann, 1998).

Contrariamente, para algas los beneficios descritos incluyen una mayor protección en ambientes adversos producto de un aumento directo en el tamaño (Wernberg 2005; Santelices et al. 1999), disminución en la mortalidad y aumento de la tolerancia al estrés (Medina et al., 2015). En algas el quimerismo ha sido descrito en distintos grupos de macroalgas marinas, en 7 órdenes de Rhodophyta (Santelices et al. 1999), en el género *Codium* en Chlorophyta (González & Santelices 2008), y recientemente se ha descrito en cinco especies de macroalgas pardas del grupo de las Phaeophyceae (González et al., 2014).

En algas rojas, los estudios de campo y laboratorio evidencian que organismos quiméricos de *Gracilaria* y *Mazzaella* (Rhodophyta) muestran una correlación positiva entre coalescencia y sobrevivencia (Santelices et al., 1999; Santelices & Alvarado, 2008), crecimiento (Santelices et al., 2011; 2016), reproducción (Santelices et al., 2011) y tolerancia a estrés ambiental (Medina et al., 2015). Por lo tanto, plantas quiméricas en comparación con organismos genéticamente homogéneos muestran una ventaja en sus rasgos de adecuación biológica, lo que le confiere resiliencia o capacidad de sobrevivir frente a cambios ambientales. Además para *Mazzaella* se ha descrito que existe un efecto en el número de organismos que coalescen sobre la tolerancia al estrés térmico, donde organismos provenientes de la fusión de un mayor número de esporas son más capaces de resistir estrés térmico (Medina et al., 2015), lo que cobraría gran importancia en ambientes marinos, donde todos los modelos climáticos actualmente disponibles predicen que la temperatura de los océanos aumentará (Barnett et al., 2005).

Dentro de las macroalgas pardas, *Lessonia spicata* (Suhr) Santelices (González et al., 2012) o huiro negro, es una especie quimérica que posee una especial importancia ecológica, social y económica. Ecológicamente es un productor primario que además, juega un rol como organismo bioingeniero ecosistémico, ya que proveen de refugio y alimento a numerosos invertebrado marinos (Cancino & Santelices, 1984).

A nivel social, la pesquería de *L. spicata* se realiza mediante extracción directa de poblaciones naturales para la producción de alginatos (Vásquez & Westermeier, 1993), donde más de 15.000 personas en el norte de Chile dependen directa o indirectamente de su colecta (Vega et al., 2013). Mientras que económicamente, posee gran importancia, así junto con otras algas pardas de interés comercial (*Lessonia trabeculata* y *Macrocystis pyrifera*) la demanda ha alcanzado las 300.000 toneladas peso seco al año, lo que representa la suma de US \$70 millones (Vásquez et al., 2012).

Los talos macroscópicos de *L. spicata* son diploides y están compuestos por un gran disco adhesivo, desde donde emergen numerosos estipes (equivalentes a las ramas de las plantas) con frondas terminales donde se diferencian las estructuras reproductivas (Hoffmann & Santelices, 1997). En dichos talos, se ha descrito heterogeneidad genética intraorganismo y quimerismo, lo cual sería un proceso frecuente en poblaciones naturales, con importantes repercusiones en términos de incremento en biomasa y potencial reproductivo (Casares & Faugeron, 2016; González & Santelices, 2017). El análisis en laboratorio, evidencia que el quimerismo ocurre por fusión somática de linajes distintos de los discos basales. Para ello, en el disco ocurriría una completa integración de los tejidos genéticamente distintos, producto de cambios morfológicos de las células ubicadas en las áreas de contacto. Así las células reducirían las paredes celulares, incrementan su tamaño y se desarrollan conexiones secundarias del tipo plasmodesmos, cambios que probablemente permitan comunicación celular entre los discos fusionados (González et al., 2014). En terreno, estudios en *L. berteriana* (especie hermana de *L. spicata*, González et al., 2012) ha evidenciado que después de un tiempo, discos de organismos distintos marcados se fusionan, formando un gran y único disco (Rodríguez et al., 2014).

No obstante lo anterior, se desconoce aún en macroalgas pardas y específicamente en esta especie la existencia de beneficios y costos de la condición quimérica. Emergiendo las siguientes preguntas:

- 1) ¿Es la condición quimérica beneficiosa, mostrando mayor tolerancia al estrés que aquellos organismos genéticamente homogéneos o unitarios?
- 2) ¿La densidad de individuos que conforman la quimera afecta la tolerancia al estrés?

3) ¿La condición quimérica muestran costos de su condición asociados a variación de las respuesta de acuerdo al nivel de parentesco de los linajes o cepas que conforman la quimera? (e.g. fusión entre hermanos, medios hermanos, vecinos, poblaciones distintas). En este escenario, en el presente estudio se plantearon tres hipótesis específicas para responder estas preguntas referentes a los costos y beneficios de la condición quimérica versus aquellos genéticamente homogéneos en la macroalga parda *Lessonia spicata*.

HIPÓTESIS

1. Si el quimerismo incrementa la heterogeneidad genética intraorganismo de las macroalgas rojas, generando una mayor capacidad de respuesta y consecuentemente mayor tolerancia ante cambios en el ambiente respecto a plántulas genéticamente homogéneas, se espera que en *L. spicata* plántulas quiméricas presenten una mayor tasa de crecimiento en comparación con plántulas unitarias o genéticamente homogéneas frente a un estrés térmico.
2. Si una mayor heterogeneidad genética intraorganismo incrementa la capacidad de resistir estrés térmico, se espera que en *L. spicata* plántulas quiméricas provenientes de la fusión de un mayor número de esporofitos presenten una mayor tasa de crecimiento en comparación a plántulas quiméricas provenientes de la fusión de un menor número de esporofitos y plántulas unitarias frente a un estrés térmico.
3. Si existen conflictos genéticos entre las entidades que conforman la quimera, es esperable que en *L. spicata*, las quimeras conformadas por individuos provenientes de una misma población tengan una mejor adecuación biológica (medida como tasa de crecimiento) que quimeras formadas por individuos no emparentados (individuos de diferentes poblaciones).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este estudio es evaluar la tolerancia a estrés térmico (mayor tasa de crecimiento) de plántulas genéticamente heterogéneas versus unitarias o genéticamente homogéneas de *L. spicata* cultivadas en condiciones contrastantes de temperatura, densidad inicial y con distinto nivel de parentesco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.1 Desarrollar un protocolo para la generación de organismos con heterogeneidad genética intraorganismo de manera masiva en condiciones de laboratorio.

1.2. Cuantificar la tolerancia al estrés térmico medido como una mayor tasa de crecimiento de organismos genéticamente heterogéneos con alto nivel de parentesco vs unitarios, cultivados a condiciones contrastantes de temperatura ($12\pm 2^{\circ}\text{C}$ vs $18\pm 2^{\circ}\text{C}$).

1.3 Cuantificar el efecto de la densidad inicial de esporofitos que componen la quimera sobre la tolerancia al estrés térmico utilizando quimeras provenientes de la fusión de 5 y 10 esporofitos.

1.4. Cuantificar la tolerancia al estrés en término de crecimiento de individuos unitarios versus quiméricos compuestos por igual densidad pero diferentes niveles de parentesco, es decir, usando cepas de distintas poblaciones (Los Molles, Pichicuy y Maitencillo), cultivados a condiciones contrastantes de temperatura ($12\pm 2^{\circ}\text{C}$ vs $18\pm 2^{\circ}\text{C}$).

MATERIALES Y METÓDOS

2.1 Organismo de estudio

Lessonia spicata (Suhr) Santelices (Phaeophyceae, Laminariales) es una especie endémica de Chile, distribuida entre 29°S y 41°S (González et al., 2012). El género *Lessonia* posee un ciclo de vida de alternancia de generación heteromórfica, donde el esporofito diploide corresponde a la fase macroscópica (Fig. 1.a) que por meiosis genera en los soros meiosporas que se liberan al medio (Fig. 1.b). Estas darán origen a la fase microscópica haploide, diferenciándose en gametofitos femeninos y masculinos (Fig. 1.c, Hoffman & Santelices 1982). Cuando los gametofitos maduran se produce la singamia que da origen a un cigoto, restableciendo la diploidía y generando el esporofito juvenil (Fig. 1.d, Olivari, 1974, Avila et al., 1985). Para este género el quimerismo ha sido descrito en la fase macroscópica esporofítica (2n).

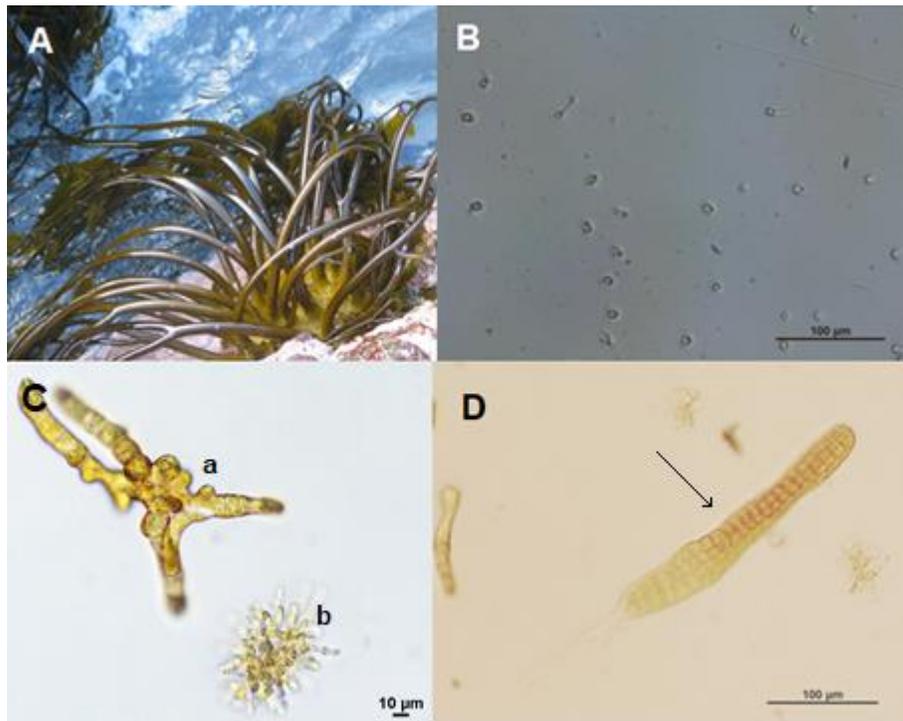


Figura 1: Estadios de vida de *L. spicata*. A) Esporofito (2n) adulto. B) Esporas (n) producto de meiosis liberadas al medio. C) Gametofitos maduros (n). a: gametofito femenino, b: gametofito masculino. D) Esporofito (2n) post fecundación (con flecha se indica el esporofito juvenil).

2.2 Sitios de estudio

Con el objetivo de tener entidades genéticas distintas para formar las quimeras, se colectó material reproductivo de tres poblaciones de Chile Central que han sido caracterizadas genéticamente (González & Santelices 2017), encontrándose aislamiento por distancia entre poblaciones (González et al. datos no publicados). De esta manera durante los meses reproductivos de agosto de 2016 y agosto de 2017 se colectó material en Los Molles ($32^{\circ}14'S$, $70^{\circ}30'O$), Pichicuy ($32^{\circ}20'S$, $71^{\circ}27'O$) y Maitencillo ($32^{\circ}37'S$, $71^{\circ}25'O$), distanciadas entre 17 - 46 km entre ellas (Tabla I). Estas poblaciones fueron seleccionadas debido a que se ha reportado una baja capacidad de dispersión a decenas de metros en la especie (Parada et al., 2016), evidenciándose un bajo flujo genético entre alguna de ellas (González & Santelices 2017)

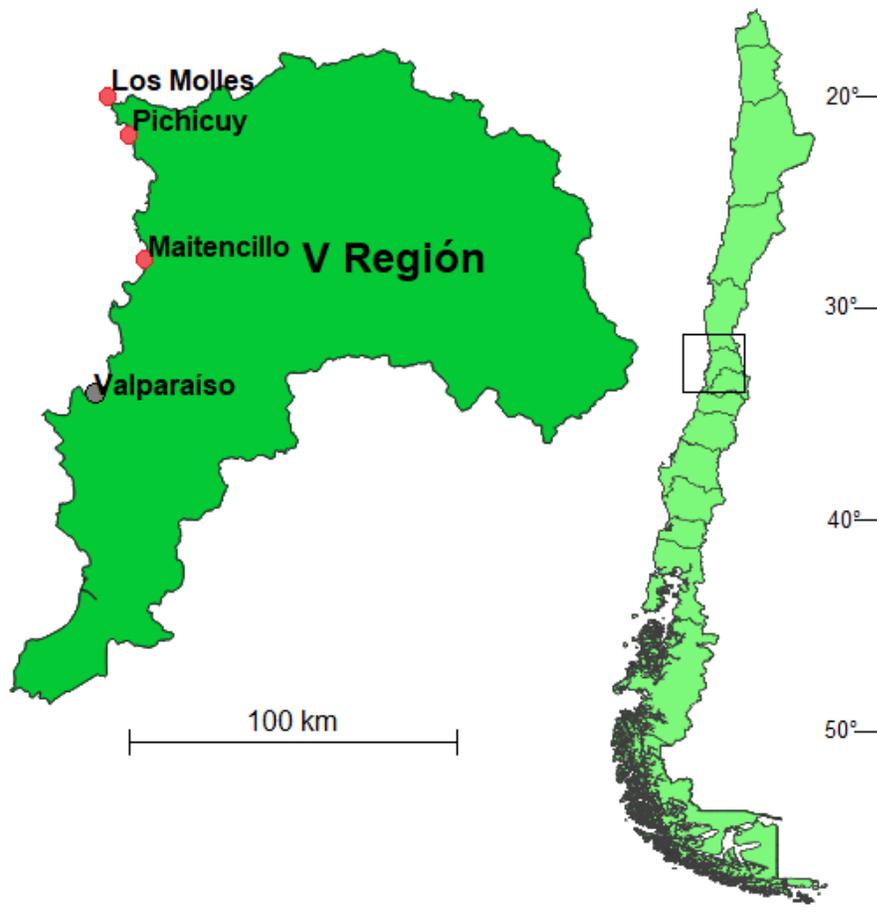


Figura 2: Ubicación geográfica de los sitios estudiados en Chile Central.

Tabla I: Matriz de distancia (km) entre poblaciones estudiadas.

Población	Los Molles	Pichicuy	Maitencillo
Los Molles	0	17.1	46
Pichicuy	17.1	0	28.9
Maitencillo	46	28.9	0

2.3 Desarrollo protocolo para la generación masiva de organismos genéticamente heterogéneos en condiciones de laboratorio.

Con el objetivo de generar un protocolo de siembra masiva de esporas en condiciones de laboratorio, se evaluaron dos variables:

- a) Movimiento agua de mar: con el objetivo de maximizar el asentamiento de esporas de *L. spicata* se evaluó el efecto de mantener sin movimiento los cultivos versus cultivos con movimiento, que sería la condición estándar. Para ello, un subset de sustratos se mantuvieron en agitación constante (shaker orbital, 100 RPM), mientras que el otro subset se mantuvo sin movimiento (Tabla II) y se evaluó el número total de esporofitos luego de 30 días de cultivo bajo condiciones estándares de crecimiento ($12\pm 2^{\circ}\text{C}$, $35\text{-}45\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12:12 L/O (Avila et al., 1985; Oppliger et al., 2011).

- b) Tipos de sustratos: con el objetivo de encontrar un sustrato que maximice la adherencia y cercanía de esporofitos, características que incrementarían la probabilidad de fusión y coalescencia en los primeros estadios del desarrollo (González obs. per.), se evaluaron tres sustratos con distintas rugosidades: velcro (Fig. 3A) que posee ganchos que pueden servir para lograr mayor adherencia del disco, criolabel (Fig. 3B) que posee un entramado que permite mayor adherencia y cuerda trenzada (Fig. 3C) usadas frecuentemente para los cultivos suspendidos de macroalgas pardas (long lines, Plá & Alveal, 2003; 2012). Los diferentes sustratos fueron montados sobre un portaobjeto para facilitar el cultivo y seguimiento de los esporofitos.

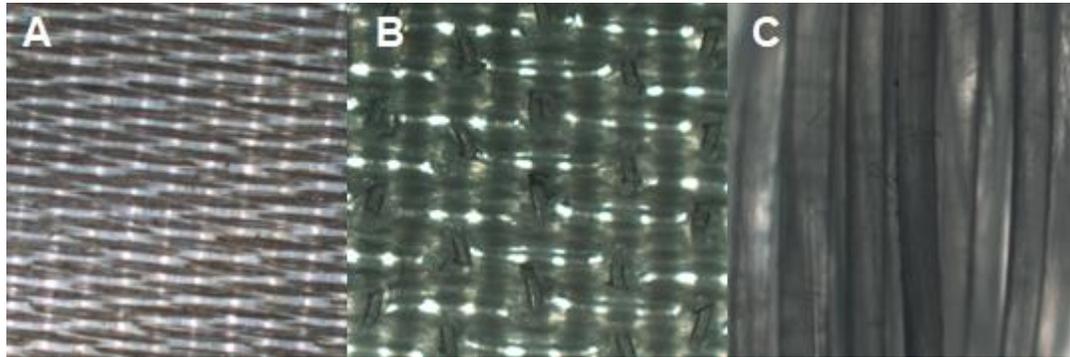


Figura 3. Vista en detalle de los sustratos utilizados. A) Velcro. B) Criolabel. C) Cuerdas trenzadas.

Tabla II: Diseño experimental utilizado para evaluar los sustratos

Sustrato	Con movimiento	Sin movimiento
Velcro	18 unidades	18 unidades
Criolabel	18 unidades	18 unidades
Cuerda	12 unidades	12 unidades

2.3.1. Obtención de esporas y siembra masiva en los sustratos

Para la obtención y siembra de esporas se siguió el método de Oppliger et al. (2011). Para ello, se colectó tejido reproductivo (soros) de 5 plantas de *L. spicata* proveniente de Maitencillo. Para liberar esporas, los soros fueron cepillados y lavados con agua de la llave, y luego con agua de mar esterilizada, se dejaron secar por un periodo de 30 minutos y se removieron 2 trozos de soro con sacabocado (1 cm diámetro) de cada estipe colectado, los cuales fueron introducidos en tubos Falcon con agua de mar esterilizada que se encontraba a baja temperatura (5-8°C) para generar un shock térmico y liberación de esporas (dentro de 2 horas aprox.). Una vez liberadas las esporas, una alícuota homogenizada de la solución fue sembrada en las placas de Petri que poseían portaobjetos con los distintos sustratos.

2.3.2 Cultivo de esporofitos y formación de quimeras en distintos sustratos

Una vez obtenidos los esporofitos, estos fueron mantenidos en cámaras de cultivo a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo tubos fluorescentes de luz blanca y fría (20'W / 54 RSS día, Philips, Sao Paulo, Brasil) con una densidad de flujo de fotones de 35-45 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo 12:12 L/O (Avila et al., 1985; Oppliger et al., 2011). Durante los 30 primeros días se incubaron en medio de cultivo SFC (Correa et al., 1988), luego de este periodo se utilizó medio de cultivo PES (Provasoli, 1968). El medio de cultivo fue cambiado periódicamente dos veces por semana hasta que los esporofitos alcanzaron discos de 1-1.2 mm de diámetro.

A los 30 días de cultivo, se midió la adherencia y la densidad de esporofitos por unidad en cada uno de los sustratos. La adherencia se midió como el número de esporofitos que siguen adheridos luego de ser expuestos a una remoción mecánica por sonicador (30 segundos, Crest, modelo 575t). De esta manera se calculó el número de esporofitos desprendidos del sustrato (E_d) y el número de esporofitos que permanecieron adheridos (E_a). Así la adherencia (A_d) se calculó como una proporción de la siguiente forma: $A_d = E_a / (E_a + E_d)$.

Para medir la densidad de esporofitos se calculó el número total de esporofitos por unidad de área sumando el número de esporofitos desprendidos del sustrato (E_d) y el número de esporofitos que permanecieron adheridos (E_a). Las diferencias estadísticas entre tratamientos se determinaron mediante ANOVA de una y dos vías, previa verificación de supuestos (Sokal & Rohlf, 1969), en el software Past3 (Hammer et al., 2001)

2.4 Cuantificación del crecimiento de individuos genéticamente homogéneos y quiméricos de una misma población, cultivados a distintas densidades y condiciones contrastantes de temperatura

Una vez seleccionado el sustrato adecuado, se formaron quimeras utilizando método descrito por González et al. (2014) con esporofitos provenientes de una única población (Los Molles), pero ocupando distintas densidades de esporofitos.

Para la confección de plántulas con baja heterogeneidad genética se fusionaron o coalescieron esporofitos provenientes de la misma planta (medios hermanos y/o hermanos completos) es procedimiento se replicó en 5 plantas que se mantuvieron independientes. Adicionalmente, para la confección de plántulas quiméricas, se fusionaron o coalescieron esporofitos provenientes de 5 plantas no emparentadas de la misma población. Como control, se cultivaron esporofitos individuales o unigenéticos de cada planta estudiada. Las plántulas fueron mantenidas en las condiciones de cultivo estándar para todo el experimento, durante 16 semanas, hasta que se corroboró fusión completa de esporofitos a nivel de discos (Fig. 4).



Figura 4: Esporofitos fusionados luego de 16 semanas de cultivo.

Del total se seleccionaron 5 tipos de plántulas o tratamientos para comparar

1. Plántulas unigenéticas provenientes de un esporofito (control, Uni)
2. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 5 esporofitos que provienen de una única plántula madre (medios hermanos/hermanos completos. 5H)

3. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 10 esporofitos que provienen de una única plántula madre (medios hermanos/hermanos completos. 10H
4. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 5 esporofitos que provienen de distintas plántulas madres (no emparentadas) pero de la misma población. 5Q
5. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 10 esporofitos que provienen de distintas plántulas madres (no emparentadas) pero de la misma población. 10Q

2.4.2 Cultivo de bajo condiciones de estrés térmico

Para evaluar efectos de la heterogeneidad genética en la tolerancia al estrés térmico, los cinco tipos de plántulas o tratamientos fueron cultivadas durante 30 días en las condiciones estándar descritas pero a temperaturas contrastantes, es decir, a $12\pm 2^{\circ}\text{C}$ condición normal (Ávila et al., 1985) y a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ condición estresante. Como proxy de tolerancia se estimó la tasa de crecimiento específico de la biomasa (TC, Hurd et al., 2014), cuantificando su peso al inicio y final del experimento.

De esta manera, la tasa de crecimiento se estimó de acuerdo a la ecuación $\% \text{TC} = 100 * (\ln(t_{30}/t_0))/30$ días, donde t_0 y t_{30} corresponden a la biomasa (mg) (TC, Hurd et al. 2014). Para evaluar diferencias significativas entre los tratamientos se realizaron ANOVA de una y dos vías, previa verificación de supuestos (Sokal & Rohlf, 1969). Las diferencias específicas entre tratamientos fueron calculadas mediante una prueba de Tukey a posteriori (Sokal & Rohlf, 1969). Todos los análisis fueron realizados usando el software Past3 (Hammer et al., 2001).

Tabla III. Número de réplicas de plántulas unitarios, quiméricas de medios hermanos (5H y 10H) y quiméricas de plantas distintas (5Q y 10Q) cultivados a distintas temperaturas.

Plántula	Temperatura	
	12°± 2°C	18°± 2°C
Uni	20	20
5MH	20	20
10MH	12	12
5Q	10	10
10Q	11	10
Total	73	72

2.5 Quimeras compuestos por diferentes niveles de parentesco cultivados a condiciones estresantes de temperatura.

Para evaluar el efecto de los niveles de parentesco sobre el quimerismo y su capacidad de tolerar estrés térmico, se confeccionaron quimeras con distintos niveles jerárquicos de parentesco. De esta manera se realizaron 8 tratamientos

1. Plántulas unigenéticas provenientes de un esporofito (control; U)
2. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 10 esporofitos que provienen de distintas plántulas madres (no emparentadas) pero de la misma población, Los Molles. (Q-LM)
3. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 10 esporofitos que provienen de distintas plántulas madres (no emparentadas) pero de la misma población, Pichicuy. (Q-PI)
4. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 10 esporofitos que provienen de distintas plántulas madres (no emparentadas) pero de la misma población, Maitencillo (Q-MT)
5. Plántulas genéticamente heterogéneas provenientes de la fusión de 10 esporofitos que provienen de poblaciones distanciadas a 17.1 km (Los Molles y Pichicuy; Q-LMPI)
6. Quimeras formadas por la fusión de esporofitos provenientes de poblaciones distantes a 28,1 km (Pichicuy vs Maitencillo; Q-PIMT)
7. Quimeras formadas por la fusión de esporofitos provenientes de poblaciones distantes a 46 km (Los Molles vs Pichicuy; Q-LMMT).
8. Quimeras formadas por la fusión de esporofitos provenientes de una población (Q-1P).
9. Quimeras formadas por la fusión de esporofitos provenientes de dos poblaciones (Q-2P).
10. Quimeras formadas por la fusión de esporofitos provenientes de las tres poblaciones estudiadas (Q-3P).

Luego de verificar que las quimeras estaban completamente fusionadas, todos los tratamientos se cultivaron por 30 días bajo las condiciones estándares de cultivo pero a temperaturas contrastantes. Para medir tolerancia a estrés térmico se usó como proxi

nuevamente la tasa de crecimiento específico en términos de biomasa (TC, Hurd et al., 2014), siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las diferencias entre los tratamientos se analizaron a través de ANOVA de una y dos vías, previa verificación de supuestos. Para estimar la variabilidad de la respuesta (TC) se calculó el coeficiente de variación (Sokal & Rohlf, 1969). Este análisis fue realizado en el software Past3 (Hammer et al., 2001).

Para determinar si existe un efecto de la distancia geográfica entre poblaciones sobre la tasa de crecimiento de quimeras provenientes de la fusión de esporofitos de distintas poblaciones (Q-LMPI, Q-PIMT y Q-MTPI) se realizó un Test de Mantel de acuerdo a las matrices de la tabla IV, utilizando el software Past3 (Hammer et al., 2001).

Tabla IV: Matrices de distancia. Sobre la diagonal, matriz de tasas de crecimiento y bajo la diagonal, matriz de distancia geográficas de quimeras provenientes de la fusión de esporofitos de: PMP (plántulas de la misma población), PLM (plántulas de los Molles), PPI (plántulas de Pichicuy) y PMA (plántulas de Maitencillo).

	PMP	PLM	PPI	PMA
PMP	0	4,799	5,053	4,869
PLM	0,01	0	6,0027	6,675
PPI	0,01	17,1	0	4,884
PMA	0,01	46	28,9	0

RESULTADOS

3.1 Siembra masiva de esporas

a) Efecto del movimiento de agua en la siembra

Los resultados no detectan un efecto del cultivo sin movimiento sobre el número de esporofitos asentados ni sobre la adherencia de estos al sustrato ($P > 0.05$), respecto al cultivo con movimiento (Fig. 5A-B).

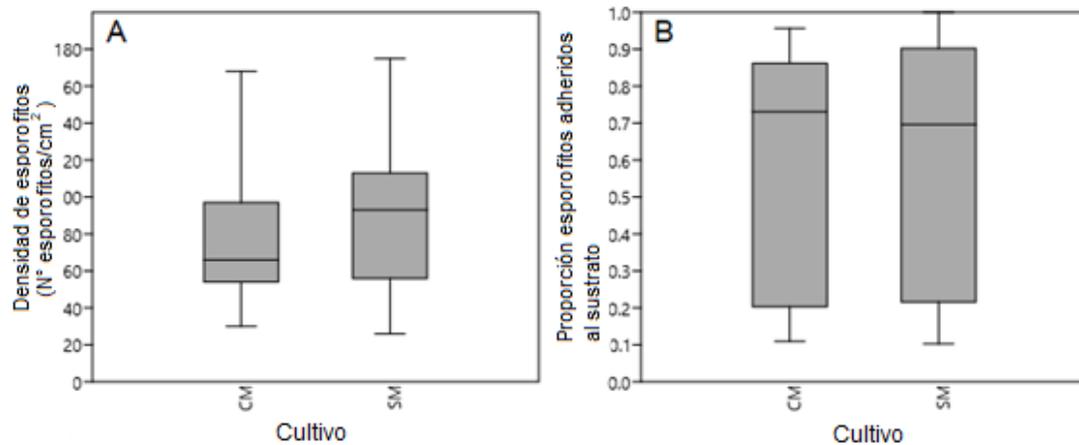


Figura 5: Efecto del cultivo con (CM) y sin movimiento (SM) en A: Densidad esporofitos y B: Adherencia esporofitos.

b) Efecto del sustrato en la siembra

Existe un efecto del sustrato sobre la densidad de esporofitos asentados ($P < 0.05$), como se observa en la Figura 6A, donde la cuerda fue el sustrato que presento mayor densidad de esporofitos (media=140), en contraste con el criolabel, que presento un valor promedio de 50 esporofitos aproximadamente. Por otro lado, los diferentes sustratos también presentaron diferentes valores de adherencia de esporofitos, siendo el criolabel el sustrato con mayor adherencia y la cuerda trenzada el de adherencia más baja (Fig. 6B).

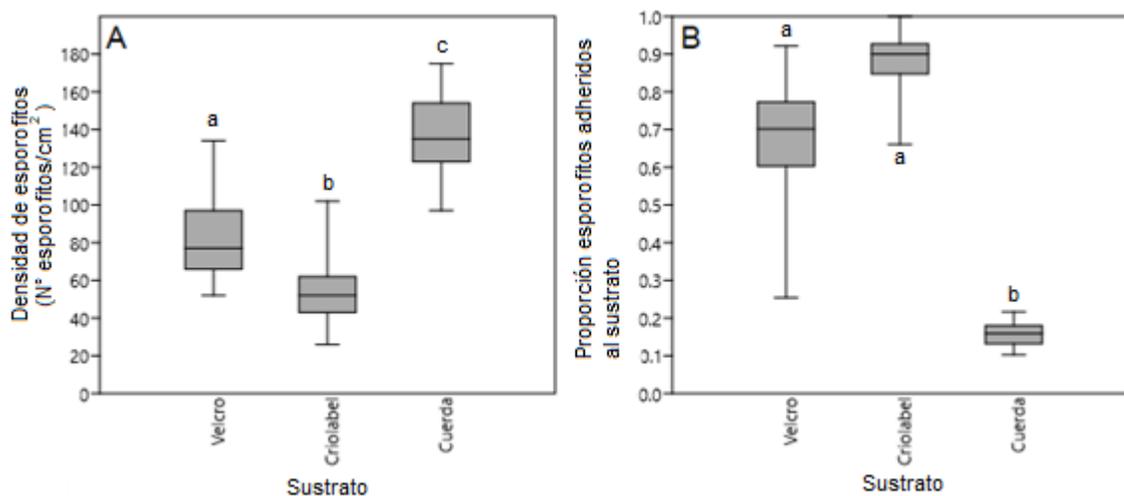


Figura 6: Efecto del sustrato en A: Densidad esporofitos y B: Proporción de esporofitos adheridos al sustrato.

c) Efecto conjunto

Se encontró un efecto significativo de la interacción entre el sustrato y el cultivo (con y sin movimiento) sobre la densidad de esporofitos asentados en cada sustrato ($P < 0.05$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el cultivo con y sin movimiento (Tabla V).

Tabla V. Prueba de Anova de 2 vías sobre diferencias en la densidad de esporofitos (N° esporofitos / cm^2) entre los sustratos, cultivados con movimiento y sin movimiento. (*) Indica un efecto significativo.

Fuente de Variación	gl	F	P
Sustrato	2	169,3	3,185E-31*
Cultivo	1	3,802	0,0543
Interacción	2	0,0006178	0,0006178*

No se encontró un efecto significativo de la interacción entre el sustrato y el cultivo (con y sin movimiento) sobre la adherencia de esporofitos asentados en cada sustrato ($P > 0.05$, Tabla VI).

Tabla VI. Prueba de Anova de 2 vías sobre diferencias en la adherencia de esporofitos entre los sustratos, cultivados con movimiento y sin movimiento. (*) Indica un efecto significativo.

Fuente de Variación	gl	F	P
Sustrato	2	446,9	1,824E-47*
Cultivo	1	0,1019	0,7503
Interacción	2	0,4209	0,6577

3.2 Crecimiento de organismos unitarios y genéticamente heterogéneos de una misma población, cultivados a condiciones contrastantes de temperatura

a) Tasa de crecimiento de individuos unitarios y genéticamente heterogéneos de medios hermanos

En general, no se observan diferencias significativas organismos unitarios y quiméricos de medios hermanos en ninguna de las temperaturas 12°C y 18°C (Fig. 7a y 7b). A pesar de esto, las plántulas quiméricas muestran en promedio una mayor tasa de crecimiento que plántulas unitarias. Sin embargo, este patrón sólo fue estadísticamente significativo en plántulas quiméricas de 5 esporofitos a 12°C (ANOVA $F_{2,44}=4.6$; $P=0.015$; Tukey posteriori test, Fig. 7), mientras que el menor crecimiento se observa en plántulas quiméricas de 10 esporofitos medios hermanos a 18°C (ANOVA $F_{2,59}=2.9$; $P=0.04$; Tukey posteriori test)

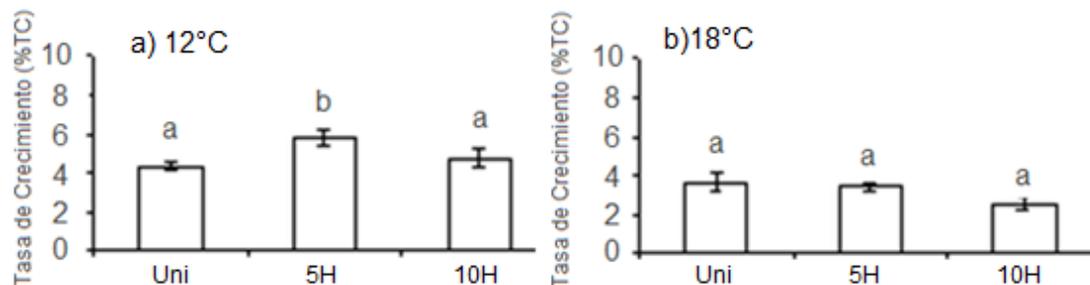


Figura 7: Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a) Plántulas unitarias versus quiméricas de medios hermanos a 12°C b) Plántulas unitarias versus quiméricas de medios hermanos a 18°C. Uni: plántulas unitarias. 5H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. 10H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. Letras distintas indican diferencias significativas con $P<0.05$.

b) Tasa de crecimiento de individuos unitarios y genéticamente heterogéneos de plantas no emparentadas

Se puede observar que quimeras provenientes de la fusión de esporofitos de plantas distintas tienen un crecimiento específico mayor y significativo (Fig.8a-8b). Independiente del número de esporofitos que conformaron la quimera (ANOVA $F_{2,44}=13.1$; $P<0.01$; Tukey posteriori test, Fig. 8) a 12 °C. Sin embargo a una

temperatura estresante como es 18°C, las plántulas quiméricas de 10 esporofitos de plantas no emparentadas muestran una tasa de crecimiento significativamente mayor que quimeras de medios hermanos, especialmente a quimeras de 10 esporofitos medios hermanos, cuyas plántulas muestran una tasa de crecimiento menor (ANOVA $F_{2,59}=9.7$; $P<0.01$; Tukey posteriori test).

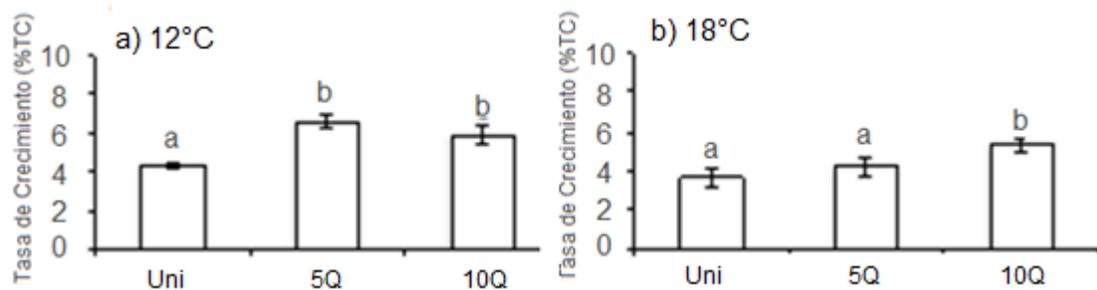


Figura 8: Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a) Plántulas unitarias versus quiméricas de plantas no emparentadas 12°C b) Plántulas unitarias versus quiméricas de plantas no emparentadas a 18°C. Uni: plántulas unitarias. 5Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos no emparentados. 10Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos no emparentados. Letras distintas indican diferencias significativas con $P<0.05$.

C) Efecto combinado (número de esporofitos y temperatura)

Existió un efecto significativo del tratamiento de plántulas unitarias, 5H, 10H, 5Q, 10Q, la temperatura 12° y 18° y la interacción de ambas variables sobre la tasa de crecimiento (Tablas VII-VIII). Así, plántulas quiméricas de medios hermanos presentan una tasa de crecimiento mayor que plántulas unitarias sólo a 12°C, mientras que a 18°C el crecimiento es similar (Fig. 9a). Contrariamente, plántulas quiméricas muestran mayor tasa de crecimiento comparada con plántulas unitarias en ambas temperaturas (Fig. 9b).

Tabla VII. Prueba de Anova de 2 vías sobre diferencias en la tasa de crecimiento específico (%TC) entre los tratamientos (unitarios, 5H y 10H) cultivadas bajo distintos niveles de temperatura por 30 días. Uni: plántulas unitarias. 5H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. 10H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. (*) Indica un efecto significativo.

Fuente de Variación	gl	F	P
Tratamiento (Uni, 5H, 10H)	1	25.1	<0.001*
Temperatura (12 ^o -18 ^o)	2	3.37	0.039*
Interacción	2	3.84	0.026*

Tabla VIII. Prueba de Anova de 2 vías sobre diferencias en la tasa de crecimiento específico (%TC) entre los tratamientos (unitarios, 5Q Y 10Q) cultivadas bajo distintos niveles de temperatura por 30 días. Uni: plántulas unitarias. 5Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos no emparentados. 10Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos no emparentados. (*) Indica un efecto significativo

Fuente de Variación	gl	F	P
Tratamiento (Uni, 5Q, 10Q)	1	9.86	0.002*
Temperatura (12 ^o -18 ^o)	2	5.68	0.005*
Interacción	2	3.73	0.030*

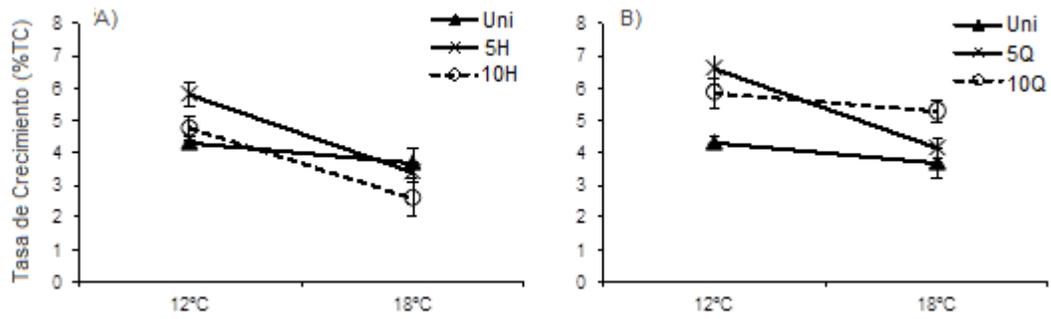


Figura 9: Comparación de la Tasa de crecimiento específico (%TC) de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a 12° y 18°C. a) Plántulas unitarias versus quiméricas de medios hermanos. b) Plántulas unitarias versus quiméricas de plantas no emparentadas. Uni: plántulas unitarias. 5H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. 10H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. 5Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos no emparentados. 10Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos no emparentados.

3.3 Crecimiento de individuos quiméricos compuestos por diferentes cepas: quiméricos de una misma población, y quiméricos entre poblaciones distintas, cultivados a condiciones contrastantes de temperatura.

a) Tasa de crecimiento plántulas unitarios y quimeras de distintas poblaciones

En general, no se detectaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento específico entre plántulas unitarias y quiméricas a 12 °C y a 18°C (Fig.10a—10B), sin embargo, a 12°C se puede observar que la tasa de crecimiento es menos variable (Coeficiente de variación = 13,933) que a 18°C (Coeficiente de variación = 19,565).

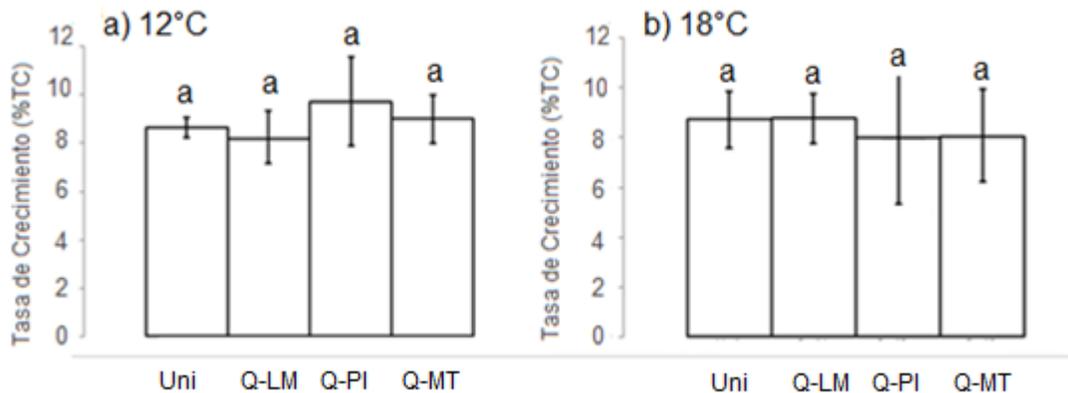


Figura 10: Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio. a) plántulas unitarias vs quimeras de distintas poblaciones a 12°C. b) plántulas unitarias vs quimeras de distintas poblaciones a 18°C. Uni: plántulas unitarias. Q-LM: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos (no emparentados) de Los Molles. Q-PI: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos (no emparentados) de Pichicuy. Q-MT: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos (no emparentados) de Maitencillo.

b) Tasa de crecimientos de plántulas unitarias y quiméricas entre dos poblaciones.

No se encontraron diferencias significativas entre organismos unitarios y quiméricos ($P < 0,05$, Fig. 11a-11b). A pesar de esto, se puede observar que a 18°C las plántulas tienen una tasa de crecimiento similar (coeficiente de variación = 12481), en contraste con la respuesta a 12°C que es más variable (coeficiente de variación = 20,792).

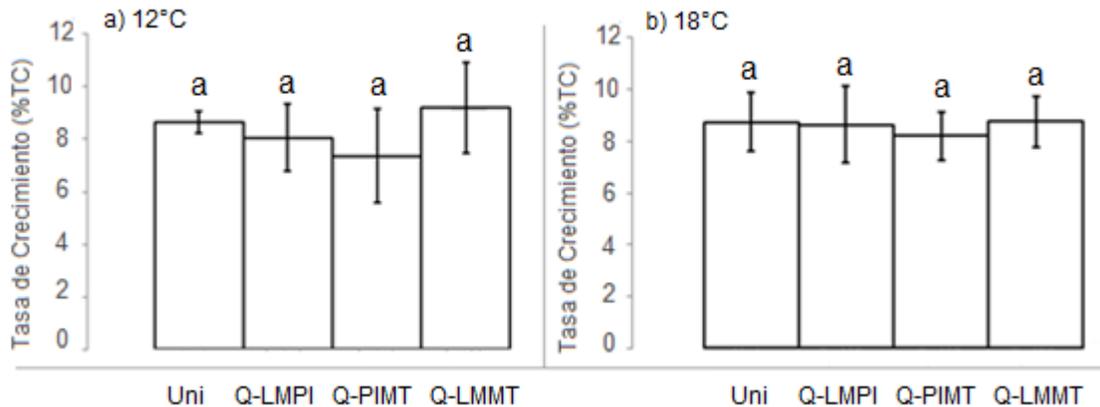


Figura 11. Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio. a) Unitarias versus Quimeras entre dos poblaciones distintas a 12°C . b) Plántulas unitarias versus Quimeras entre dos poblaciones distintas a 18°C . Uni: plántulas unitarias. Q-LMPI: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de esporofitos de Los Molles y Pichicuy. Q-PIMT: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de esporofitos de Pichicuy y Maitencillo. Q-LMMT: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de esporofitos de Los Molles y Maitencillo.

c) Tasa crecimiento Unitarias y plántulas con distinto nivel de quimerismo

Como se observa en la Fig. 12a-b, no se detectaron diferencias significativas para el efecto combinado de los distintos niveles de quimerismo y las temperaturas ($p > 0,05$)

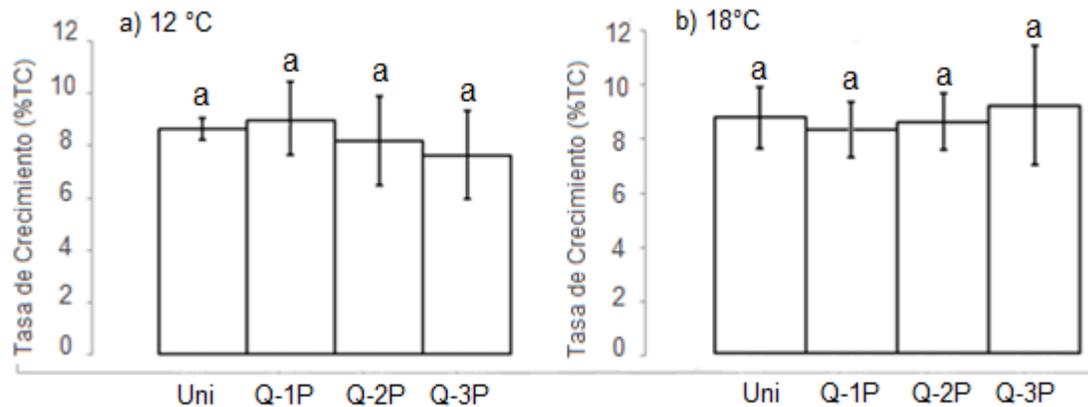


Figura 12. Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio. a) Unitarias versus plántulas con distinto nivel de quimerismo a 12°C. b) Unitarias versus plántulas con distinto nivel de quimerismo a 18°C. Uni: plántulas unitarias. Q-1P: plántulas quiméricas formadas por la fusión esporofitos de una población. Q-2P: plántulas quiméricas por la fusión esporofitos de dos poblaciones. Q-3P: plántulas quiméricas por la fusión esporofitos de tres poblaciones.

En términos de respuesta de cada tipo de quimera ante el aumento de la temperatura en la Fig. 13a se muestra que en promedio fueron las quimeras provenientes de esporofitos de Los Molles (Q-LM) las que tuvieron la mayor tasa de crecimiento a 18°C, sin embargo la menor a 12°C, contrario a lo que ocurre con las quimeras de las otras poblaciones, que disminuyen su tasa de crecimiento a 18°C. En la Fig. 13b se tiene la respuesta de quimeras formadas entre dos poblaciones, donde a 12°C se observa que cada tipo tiene una respuesta distinta, sin embargo a 18°C esta es similar. En la Fig. 13c se observa como varía la tasa de crecimiento en quimeras provenientes de la fusión de esporofitos de una, dos y tres poblaciones, donde 12°C a medida que aumenta el número de poblaciones fusionadas disminuye la tasa de crecimiento, contrario a lo que ocurre a 18°C donde la tasa de crecimiento aumenta.

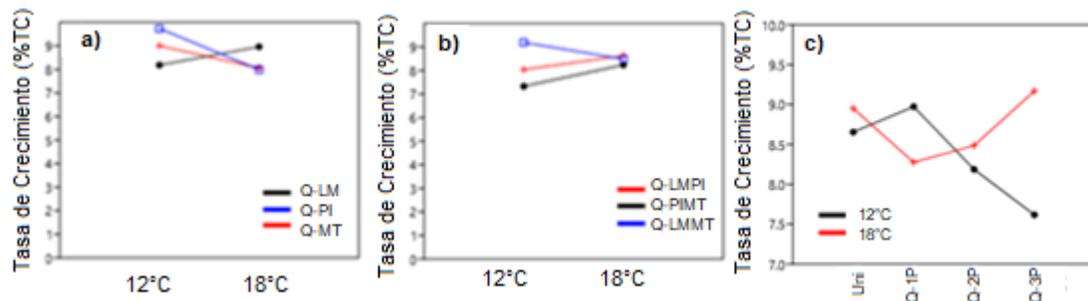


Figura 13. Comparación de la Tasa de crecimiento específico de plántulas de *L. spicata* cultivadas por 30 días en laboratorio a 12 y 18°C. a) Plántulas quiméricas de cada población. b) Plántulas quiméricas entre dos poblaciones. c) Plántulas unitarias versus plántulas con diferentes niveles de quimerismo. Uni: plántulas unitarias. 5H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. 10H: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos medios hermanos/hermanos completos. 5Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos no emparentados. 10Q: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos no emparentados. Q-LM: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos (no emparentados) de Los Molles. Q-PI: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos (no emparentados) de Pichicuy. Q-MT: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos (no emparentados) de Maitencillo. . Q-LMPI: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de esporofitos de Los Molles y Pichicuy. Q-PIMT: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de esporofitos de Pichicuy y Maitencillo. Q-LMMT: plántulas quiméricas provenientes de la fusión de esporofitos de Los Molles y Maitencillo. . Q-1P: plántulas quiméricas formadas por la fusión esporofitos de una población. Q-2P: plántulas quiméricas por la fusión esporofitos de dos poblaciones. Q-3P: plántulas quiméricas por la fusión esporofitos de tres poblaciones.

Por último, los resultados del Test de Mantel muestran una baja correlación positiva (0,33) y no significativa ($P > 0,05$) entre las matrices de distancia geográfica de cepas y tasas de crecimiento. Esto sugiere que no existiría un efecto del origen geográfico de la cepa, es decir, que la combinatoria de cepas más distantes geográficamente y en consecuencia genéticamente, no tendrían un efecto (positivo o negativo) sobre la tasa de crecimiento de las quimeras.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la existencia de una mayor tolerancia a estrés térmico (mayor tasa de crecimiento) de plántulas genéticamente heterogéneas versus unitarias o genéticamente homogéneas en la macroalga parda *L. spicata* cultivadas en condiciones contrastantes de temperatura, densidad y con distinto nivel de parentesco. Paralelamente, se evaluó la eficacia de distintos sustratos para el cultivo de esta macroalga.

De manera metodológica, y según el objetivo propuesto, los resultados indican que el velcro fue el sustrato que mostró la mayor eficacia para el cultivo de *L. spicata* en base a adherencia y densidad de esporofitos que presentó. De esta manera las plántulas presentaron una buena de adherencia y gran densidad, características que representan una ventaja frente a los sustratos actualmente utilizados como el vidrio y cuerda. Además, éstas características (densidad y adherencia) son fundamentales para la formación de plántulas quimeras en los primeros estadios de desarrollo ya que maximiza la proximidad entre esporofitos. Esto representa un gran avance en metodologías de cultivo de algas, y es una de las primeras aproximaciones a la generación de plántulas quiméricas de manera masiva en laboratorio.

En términos de tolerancia a estrés térmico versus heterogeneidad genética, densidad y parentesco, nuestros resultados mostraron que plántulas quiméricas tuvieron una mayor tasa de crecimiento versus aquellas unitarias. Sin embargo, la significancia de estas diferencias dependió de las distintas combinatorias de temperatura, densidad y parentesco. De esta manera, en condiciones de temperatura normales para estos organismos (12°C) plántulas fusionadas en densidad de 5 y 10 esporofitos presentaron significativamente una mayor tasa de crecimiento, independiente del origen de los esporofitos que las conformaron (i.e. medios hermanos, esporofitos de distintas plántulas madres). De manera general, esto sugiere que en condiciones de temperatura normales mayor diversidad genética intraorganismo es una condición beneficiosa en macroalgas reforzando los estudios previos de algas rojas, donde se ha encontrado que plántulas coalescentes presentan un mayor crecimiento en comparación a plántulas no coalescentes (Santelices et al., 1996; Muñoz & Santelices, 1994).

No obstante lo anterior, en condiciones estresantes de temperatura, es decir a 18°C (temperatura que alcanza las costas chilenas durante el Niño), diferencias significativas en crecimiento entre quimeras y unitarias se encuentra sólo en plántulas provenientes de la fusión de 10 esporofitos (mayor densidad) y confeccionado a partir de cepas de la misma población pero de diferente plántulas madres.

Esto sugiere que en condiciones estresantes existiría un efecto significativo de las variables densidad y parentesco de los esporofitos que conformaron la quimera. Este “compromiso” entre tolerancia al estrés térmico versus densidad y parentesco es un primer registro en macroalgas pardas y es esencial si se considera que este grupo de algas es uno de los pocos que resiste el incremento de temperaturas causados por el fenómeno del Niño en las costas chilenas. De esta manera, es posible sugerir que en dichas condiciones estresantes de temperatura la resiliencia y sobrevivencia de las poblaciones también pueden estar afectada por las variables como densidad, parentesco y capacidad de coalescer, formando individuos genéticamente heterogéneos.

Aún cuando no hay muchos estudios al respecto, en la especie hermana *L. berteroa*, estudios de campo han demostrado que la densidad tiene un efecto sobre coalescencia y herbívora (Oróstica et al., 2014; Rodríguez et al., 2014). De esta manera se ha descrito que la densidad de esporofitos es mayor en presencia de herbívoros bentónicos. Esto sería de vital importancia para las plántulas juveniles ya que una mayor densidad aumenta la probabilidad de coalescencia y por ende una mayor probabilidad de supervivencia (Oróstica et al., 2014; Santelices et al., 1999). Por lo anterior, densidad y parentesco aparecen como variables sensibles que deben ser consideradas en especies coalescentes y poblaciones locales que sufren de incrementos de temperatura.

En el caso de macroalgas rojas, existen varios trabajos que indican que la densidad de esporas/esporofitos/gametofitos fusionados está directamente correlacionada con la tasa de crecimiento, medido como biomasa y número de ejes generados (Santelices et al 1996, 1999, Santelices et al. 2017). Sin embargo, frente a estrés ambiental (temperatura y salinidad), Medina et al (2015) evidenció que en el alga roja *Mazzaella laminarioides* discos no coalescentes poseen una tasa de

crecimiento menor, en comparación a discos no coalescentes cultivados bajo condiciones normales. Además, encontró que en términos de densidad, discos coalescentes formados por 5 esporas toleran mejor el estrés térmico que los de 20 esporas. Sin embargo, se desconoce el parentesco de las entidades que conformaron sus quimeras. No obstante lo anterior, este trabajo refuerza la hipótesis que la coalescencia y densidad influyen en la tolerancia a estrés ambiental. Este hecho es explicado desde una perspectiva genética a través de un aumento en la plasticidad fenotípica, producto de una mayor variabilidad genética a nivel de intraorganismo (Medina et al 2015; Santelices, 2004). No obstante, el mecanismo mediante el cual las diferentes variedades genéticas interactúan en la quimera y que resultan en una mayor tolerancia al estrés térmico permanecen aún desconocidos. A pesar de esto, se ha descrito la existencia de conexiones celulares entre los individuos que se fusionan para formar la quimera (Santelices et al. 1999, González et al., 2014), por lo que el intercambio entre células provenientes de distintos linajes genéticos, podría potenciar los efectos cooperativos entre los distintos genotipos que conforman la quimera, aumentando así su tolerancia ante situaciones de estrés comparado con aquellos genéticamente homogéneos.

Respecto al efecto del parentesco de los individuos que conformaron la quimera, no existen datos previos en macroalgas que nos indiquen un patrón posible. Sin embargo, los resultados sugieren que existirían tres escalas:

- 1) Dentro de una población, la tolerancia al estrés térmico (tasa de crecimiento) es inversamente proporcional al parentesco, es decir, quimeras provenientes de la fusión de medios hermanos poseen menor crecimiento que quimeras de esporofitos de diferentes plántulas madre. Esto refuerza la teoría de que la mayor tolerancia al estrés térmico está determinada por efectos sinérgicos (i.e. división de labores y complementación de funciones, Szathmáry, 1999) entre los distintos fenotipos que conforman la quimera, donde es esperable que algunos de los fenotipos puedan tolerar mejor condiciones estresantes, proporcionando así a la quimera una mayor tolerancia (Medina et al., 2015), por lo que en quimeras provenientes de la fusión de medios hermanos, al compartir gran parte de su genotipo, no sería significativo este efecto sinérgico en comparación a quimeras de esporofitos no emparentados.

2) Entre poblaciones no se observa significativamente un efecto de los linajes que se fusionan sobre la tolerancia al estrés térmico. No obstante lo anterior, se observó que en condiciones normales de temperatura la tasa de crecimiento para quimeras entre dos poblaciones es más variable que la tasa de crecimiento de quimeras de una población, lo que podría deberse a efectos sinérgicos entre cepas o a incompatibilidad o competencia entre líneas celulares genéticamente distintas. Se ha descrito que en la especie *L. spicata* las poblaciones se encuentran bastante estructuradas y aisladas genéticamente (González et al. datos no publicados), similar a lo encontrado para *L. bertoana* (Martínez et al., 2003).

Un patrón similar ha sido observado en plantas terrestres que son utilizadas en horticultura, donde es común el uso de injertos (i.e. generación de organismos quiméricos artificialmente) para el mejoramiento de cepas (Clayberg 1975; Neilson-Jones, 1969). En este grupo de organismos, se ha reportado que la fusión de líneas genéticamente distintas puede resultar en eventos de incompatibilidad que desencadenan en inestabilidades en desarrollo de los organismos (Szymkowiak, 1993; Szymkowiak y Sussex, 1996). Esto concuerda también con lo descrito para invertebrados marinos, donde se ha reportado que la fusión de dos individuos no emparentados puede dar lugar a conflictos internos que comprometen la función y la integridad del individuo, donde normalmente son los sistemas de autoreconocimiento celular los que evitan la fusión con células que no son propias, exceptuando linajes cercanos (Buss, 1982; Grosberg & Strathmann, 1998).

3) En quimeras provenientes de la fusión de esporofitos de una, dos y tres poblaciones no se encontraron diferencias significativas. A pesar de esto los resultados de la Fig. 13 sugieren que podría existir la tendencia de que a medida que aumenta el número de poblaciones fusionadas, a 12°C, disminuye la tasa de crecimiento. Este patrón es similar al descrito para animales por Rinkevich & Weissman (1992). Sin embargo, a 18°C la tasa de crecimiento aumentaría con el número de poblaciones fusionadas lo que sugiere que en ambientes estresantes esta una mayor variabilidad genética producto de un mayor número de linajes fusionados les conferiría una ventaja frente a quimeras con menor variabilidad genética intraorganismo, por lo que la condición beneficiosa del quimerismo sería ecológicamente contexto dependiente. Debido a lo

anterior, futuros estudios deberían evaluar este patrón utilizando mayor número de réplicas.

Pese a lo anterior el hecho de que no se aprecien diferencias significativas podría deberse a que no en todos los individuos una mayor variabilidad genética intraorganismo significa una mayor adecuación biológica. Para explicar esto en animales, Rinkevich & Weissman (1992) proponen dos teorías; que todos los linajes pueden ser neutrales con respecto a fenotipo un superior o que el efecto potencialmente perjudicial o ventajoso de un linaje puede ser neutralizado o suprimido en presencia de otro linaje genético.

CONCLUSIONES

A la luz de los resultados este trabajo sugiere que:

a.- Existe un efecto del sustrato sobre el cual se cultivan los esporofitos en la densidad y adherencia que ellos presentan al sustrato, donde el velcro sería el sustrato con mayor eficacia para el cultivo de plántulas quiméricas.

b.- Existe un efecto de la densidad de esporofitos que se fusionan para formar la quimera, donde plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 5 esporofitos poseen una mayor tasa de crecimiento a 12°C, comparado con plántulas unitarias.

c.- Existe un efecto en el parentesco de los esporofitos que se fusionan, donde quimeras provenientes de la fusión de esporofitos de diferentes plántulas madre poseen una mayor tasa de crecimiento, comparado con plántulas unitarias.

d.- En condiciones estresantes de temperatura existe un efecto conjunto de densidad y parentesco, donde plántulas quiméricas provenientes de la fusión de 10 esporofitos de distintas plántulas madres crecen más que quimeras producidas por la fusión de medios hermanos y plántulas unitarias a 18°C.

e.- Plántulas quiméricas formadas por esporofitos de tres poblaciones presentaron una menor tasa de crecimiento a 12°C, comparada con quimeras formadas por esporofitos de una y dos poblaciones. Sin embargo, en condiciones de estrés térmico (18°C), estas combinatorias poseen una mayor tasa de crecimiento.

En base a los resultados obtenidos es posible aceptar nuestra 1° hipótesis, ya que plántulas quiméricas de *L. spicata* presentan un mayor crecimiento y resistencia a incrementos en temperatura, comparado con plántulas unitarias, hecho que les conferiría una ventaja frente a los continuos cambios ambientales producto del cambio climático. Por otro lado también es posible aceptar la 2° hipótesis, ya que plántulas quiméricas provenientes de la fusión de un mayor número de esporofitos (10) presentaron una mayor tasa de crecimiento en comparación a plántulas quiméricas provenientes de la fusión de un menor número de esporofitos (5) en condiciones estresantes de temperatura. Sin embargo, se rechaza parcialmente la tercera hipótesis

ya que quimeras provenientes de la fusión de individuos de distintas poblaciones solo presentaron una mayor tasa de crecimiento a 18°C y la diferencia no fue significativa.

Finalmente, este trabajo abre nuevas posibilidades en el estudio del quimerismo, utilizando esta macroalga como modelo para el desarrollo o construcción de plántulas quiméricas con potencial cultivable y repoblamiento, ya que quimeras tendrían mayor velocidad de crecimiento y resistencia al incremento de temperatura que plántulas unitarias. Para estas actividades, rutinariamente son los organismos unitarios los utilizados, pudiendo ser las quimeras quienes enfrenten de mejor manera cambios ambientales. Por último, el actual uso de cultivos genéticamente homogéneos como producto de la selección de cepas que maximizan la cantidad y calidad de producto a ser extraído en especies de importancia económica, como es el caso de las macroalgas pardas, se ve fuertemente afectados por las condiciones ambientales, por lo que el uso de organismos quiméricos para mantener la diversidad genética local y resistencia pareciera ser una buena alternativa a estos cultivos

REFERENCIAS

- Aanen, D. K., Debets, A. J., de Visser, J. A. G. M., & Hoekstra, R. F. (2008). The social evolution of somatic fusion. *Bioessays*, 30(11-12), 1193-1203.
- Amar, K. O., Chadwick, N. E., & Rinkevich, B. (2008). Coral kin aggregations exhibit mixed allogeneic reactions and enhanced fitness during early ontogeny. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 126.
- Avila, M., Hoffman, A. J. & Santelices, B. (1985). Interacciones de temperatura, densidad de flujo fotonico y fotoperiodo sobre el desarrollo de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminariales). *Revista Chilena Historia Natatural* 58:71–82.
- Bishop, J. D., & Sommerfeldt, A. D. (1999). Not like *Botryllus*: indiscriminate post-metamorphic fusion in a compound ascidian. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266(1416), 241-248.
- Bomblies, K., & Weigel, D. (2007). Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 382.
- Buss, L. W. (1981). Group living, competition, and the evolution of cooperation in a sessile invertebrate. *Science*, 213(4511), 1012-1014.
- Buss LW (1982) Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 79:5337–5341.
- Cancino, J., & Santelices, B. (1984). Importancia ecológica de los discos adhesivos de *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). *Revista Chilena de Historia Natural*, 57, 23-33.
- Casares, F. A., & Faugeron, S. (2016). Higher reproductive success for chimeras than solitary individuals in the kelp *Lessonia spicata* but no benefit for individual genotypes. *Evolutionary Ecology*, 30(5), 953-972.
- Clayberg, C. D. (1975). Insect resistance in a graft-induced periclinal chimera of tomato. *Hort Sci*, 10, 13-15.
- Correa, J.A., Nielsen, R., and Grund, D.W. (1988). Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta). II. *Acrochaete heteroclada* sp. nov., *A. operculata* sp. nov., and *Phaeophyla dendroides* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 24, 528–539.
- Coulson, T. N., Pemberton, J. M., Albon, S. D., Beaumont, M., Marshall, T. C., Slate, J., & Clutton-Brock, T. H. (1998). Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1395), 489-495.

- Ellers, J., Rog, S., Braam, C., & Berg, M. P. (2011). Genotypic richness and phenotypic dissimilarity enhance population performance. *Ecology*, 92(8), 1605-1615.
- Engelhardt, K. A., Lloyd, M. W., & Neel, M. C. (2014). Effects of genetic diversity on conservation and restoration potential at individual, population, and regional scales. *Biological Conservation*, 179, 6-16.
- Fenster, C. B., & Dudash, M. R. (1994). Genetic considerations for plant population restoration and conservation. *Restoration of endangered species: Conceptual issues, Planning and Implementation*, 34-62.
- Franklin, I. R. (1980). Evolutionary change in small populations. *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*, 135-149.
- Frankham, R., Lees, K., Montgomery, M. E., England, P. R., Lowe, E. H., & Briscoe, D. A. (1999). Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential?. *Animal Conservation*, 2(4), 255-260.
- González, A. V., & Santelices, B. (2017). Frequency of chimerism in populations of the kelp *Lessonia spicata* in central Chile. *PloS one*, 12(2), e0169182.
- González, A. V., Borrás-Chavez, R., Beltrán, J., Flores, V., Vásquez, J. A., & Santelices, B. (2014). Morphological, ultrastructural, and genetic characterization of coalescence in the intertidal and shallow subtidal kelps *Lessonia spicata* and *L. berteriana* (Laminariales, Heterokontophyta). *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 1107-1113.
- González, A. V., & Santelices, B. (2008). Coalescence and chimerism in *Codium* (Chlorophyta) from central Chile. *Phycologia*, 47(5), 468-476.
- Grosberg, R. K., & Strathmann, R. R. (1998). One cell, two cell, red cell, blue cell: the persistence of a unicellular stage in multicellular life histories. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(3), 112-116.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological statistics software: package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, (4).
- Hastings, I. M. (1989). Potential germline competition in animals and its evolutionary implications. *Genetics*, 123(1), 191-197.
- Hoffmann, A., & Santelices, B. (1997). *Flora marina de Chile central*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, 434.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), 609-623.

- Hurd CL, Harrison PJ, Bishop K, Lobban CS (2014). Seaweed ecology and physiology, 2nd edn. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. 551 pp.
- Lacy, R. C. (1987). Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*, 1(2), 143-158.
- Martínez, E. A., Cárdenas, L., & Pinto, R. (2003). Recovery and genetic diversity of the intertidal kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) 20 years after El Niño 1982/831. *Journal of Phycology*, 39(3), 504-508.
- Medina, F. J., Flores, V., González, A. V., & Santelices, B. (2015). Coalescence increases abiotic stress tolerance in sporelings of *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1593-1598.
- Muñoz, A. A., & Santelices, B. (1994). Quantification of the effects of sporeling coalescence on the early development of *Gracilaria chilensis*. 1. *Journal of Phycology*, 30(3), 387-392.
- Neilson-Jones, W. (1969). Plant chimeras. *Plant Chimeras*. Second edition. Methuen, London. 124 pp.
- Olivari, R. (1974). Nota sobre algunos aspectos del desarrollo inicial de gametofitos y ciclo reproductivo de *Lessonia nigrescens*. *Investigación Marina*. 5:85–96.
- Oppliger, L. V., Correa, J. A., Faugeron, S., Beltran, J., Tellier, F., Valero, M., & Destombe, C. (2011). Sex ratio variation in the *Lessonia nigrescens* complex (Laminariales, Phaeophyceae): effect of latitude, temperature and marginality. *Journal of Phycology*, 47(1), 5-12.
- Oróstica, M. H., Aguilera, M. A., Donoso, G. A., Vásquez, J. A., & Broitman, B. R. (2014). Effect of grazing on distribution and recovery of harvested stands of *Lessonia berteriana* kelp in northern Chile. *Marine Ecology Progress Series*, 511, 71-82.
- Parada, G. (2001). Factores inhibitorios y facilitadores en el reclutamiento de *Lessonia nigrescens*, Bory 1826. Thesis, Universidad de Valparaíso (Chile), Facultad de Ciencias del Mar, Carrera de Biología Marina, Valparaíso, Chile, 42 pp.
- Parada, G. M., Tellier, F., & Martínez, E. A. (2016). Spore dispersal in the intertidal kelp *Lessonia spicata*: macrochallenges for the harvested *Lessonia* species complex at microscales of space and time. *Botánica Marina*, 59(4), 283-289.
- Pineda-Krch, M., & Lehtilä, K. (2004). Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(6), 1167-1177.

Plá, P. C., & Alveal, K. (2003). Técnicas de cultivo sobre sustrato artificial, para el alga *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, (Phaeophyta, Laminariales). En *Anales del Instituto de la Patagonia*. pp. 67-72.

Plá, P., & Alveal, K. (2012). Desarrollo de *Macrocystis pyrifera* en sustrato artificial a partir de esporas y gametos: Producción algal en cultivo de superficie. *Latin american journal of aquatic research*, 40(2), 292-299.

Provasoli, L. (1968). Media and prospects for cultivation of marine algae. In: A. Watanabe and A. Hattori (eds). *Cultures and collections of algae*. The Japanese Society of Plant Physiologists, Tokyo. pp. 47–74.

Puurtinen, M., Knott, K. E., Suonpää, S., van Ooik, T., & Kaitala, V. (2004). Genetic variability and drift load in populations of an aquatic snail. *Evolution*, 58(4), 749-756.

Rinkevich, B., & Weissman, I. L. (1992). Chimeras vs genetically homogeneous individuals: potential fitness costs and benefits. *Oikos*, 119-124.

Rinkevich, B., & Shapira, M. (1999). Multi-partner urochordate chimeras outperform two-partner chimerical entities. *Oikos*, 315-320.

Rinkevich, B. (2002). The colonial urochordate *Botryllus schlosseri*: from stem cells and natural tissue transplantation to issues in evolutionary ecology. *BioEssays*, 24(8), 730-740.

Rinkevich B, Yankelevich I (2004) Environmental split between germ cell parasitism and somatic cell synergism in chimeras of a colonial urochordate. *Journal of Experimental Biology* 207:3531–3536.

Rodríguez, D., Oróstica, M. H., & Vásquez, J. A. (2014). Coalescence in wild organisms of the intertidal population of *Lessonia berteroa* in northern Chile: management and sustainability effects. *Journal of applied phycology*, 26(2), 1115-1122.

Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., & Vikman, P. (1998). Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature*, 392(6675), 491.

Santelices B., González AV., Beltrán J., & Flores V. (2016). Macroalgae exhibit non-invasive, reversible chimerisms. *Journal of Phycology*. 53(1), 59-69.

Santelices, B., Alvarado, J. L., Chianale, C., & Flores, V. (2011). The effects of coalescence on survival and development of *Mazzaella laminarioides* (Rhodophyta, Gigartinales). *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 395-400.

Santelices, B., Alvarado, J. L., & Flores, V. (2010). Size increments due to interindividual fusions: how much and for how long?. *Journal of Phycology*, 46(4), 685-692.

- Santelices, B., & Alvarado, J. L. (2008). Demographic consequences of coalescence in sporeling populations of *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of phycology*, 44(3), 624-636.
- Santelices, B. (2004). A comparison of ecological responses among aclonal (unitary), clonal and coalescing macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300(1), 31-64.
- Santelices, B., Correa, J. A., Hormazábal, M., & Flores, V. (2003). Contact responses between spores and sporelings of different species, karyological phases and cystocarps of coalescing Rhodophyta. *Marine Biology*, 143(2), 381-392.
- Santelices, B., Correa, J. A., Aedo, D., Flores, V., Hormazábal, M., & Sánchez, P. (1999). Convergent biological processes in coalescing Rhodophyta. *Journal of Phycology*, 35(6), 1127-1149.
- Segovia, N. I., Vásquez, J. A., Faugeron, S., & Haye, P. A. (2015). On the advantage of sharing a holdfast: effects of density and occurrence of kin aggregation in the kelp *Lessonia berteroana*. *Marine Ecology*, 36(4), 1107-1117.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1969). *The principles and practice of statistics in biological research* (pp. 399-400). San Francisco: WH Freeman and company.
- Stewart, R. N. (1978). Ontogeny of the primary body in chimeral forms of higher plants. *The clonal basis of development*, 131-160.
- Sussex, I. 1985. Graft chimeras and the analysis of positional differentiation in plants. In: *Plant Cell/Cell Interactions* (I. Sussex, A. Ellinboe, M. Crouch & R. Malmberg, eds), pp. 47–51. *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Szymkowiak, G. (1993). Arrested floral development in *Solanum nigrum-tomato* chimeras. *Flowering Newslett*, 15, 14-21.
- Szymkowiak, E. J., & Sussex, I. M. (1996). What chimeras can tell us about plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 351-376.
- Szathmáry, E. (1999) The first replicators. In: *Levels of Selection in Evolution* (L.Keller, ed.). Princeton University Press, Princeton, NJ. pp. 31–52.
- Tellier F, Meynard A.P., Correa J.A. et al (2009) Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry? *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 53:679–693

- Tellier F., Tapia J., Faugeron S. et al (2011) The *Lessonia nigrescens* species complex (Laminariales, Phaeophyceae) shows strict parapatry and complete reproductive isolation in a secondary contact zone. *J Phycol* 47:894–903
- Thomson, J. D., Herre, E. A., Hamrick, J. L., & Stone, J. L. (1991). Genetic mosaics in strangler fig trees: Implications for tropical conservation. *Science*, 254(5035), 1214-1216.
- Vásquez, J. A., & Westermeier, R. (1993). Limiting factors in optimizing seaweed yield in Chile. *Hydrobiologia*, 260(1), 313-320.
- Vásquez JA, Tala F, Vega A, Zuñiga S, Edding M & Piaget N. (2008) Bases ecológicas y evaluación de usos alternativos para el manejo de praderas de algas pardas de la III y IV regiones. Fondo de Investigación Pesquera, Informe Final N° 2005-22. 220 pp.
- Vásquez, J. A., Piaget, N., & Vega, J. A. (2012). The *Lessonia nigrescens* fishery in northern Chile: "how you harvest is more important than how much you harvest". *Journal of applied phycology*, 24(3), 417-426.
- Vega, J. A., Broitman, B. R., & Vásquez, J. A. (2014). Monitoring the sustainability of *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyceae) in northern Chile under strong harvest pressure. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 791-801.
- Vijg, J. (2000). Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 447(1), 117-135.
- Wernberg, T. (2005). Holdfast aggregation in relation to morphology, age, attachment and drag for the kelp *Ecklonia radiata*. *Aquatic Botany*, 82(3), 168-180.