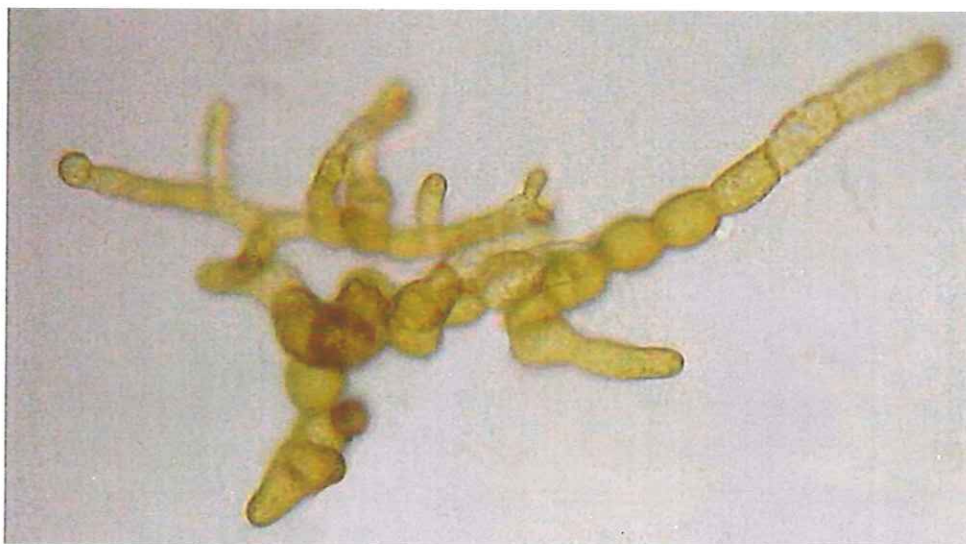




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

“DESCRIPCIÓN DE LA HISTORIA DE VIDA Y DESARROLLO DE *Eisenia arborea* Areschoug (Phaeophyceae, Laminariales) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA
RIGOBERTO SÁNCHEZ MEDINA

ENSENADA, B.C. JUNIO DE 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

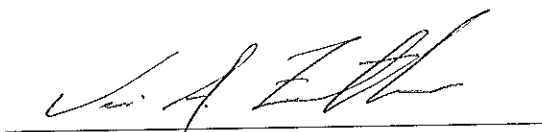
DESCRIPCIÓN DE LA HISTORIA DE VIDA Y DESARROLLO DE
Eisenia arborea Areschoug (Phaeophyceae, Laminariales) BAJO
CONDICIONES DE LABORATORIO

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

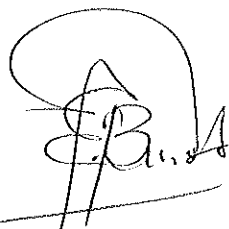
RIGOBERTO SÁNCHEZ MEDINA

APROBADO POR:



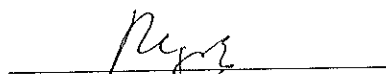
DR. JOSÉ ANTONIO ZERTUCHE GONZÁLEZ

PRESIDENTE DEL JURADO



M.C. EUSEBIO BARRETO
ESTRADA

SECRETARIO



DRA. MA. DEL REFUGIO
GONZÁLEZ ESPARZA

1RA VOCAL



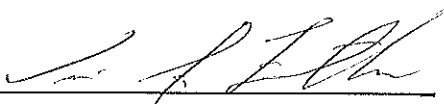
RESUMEN DE LA TESIS DE RIGOBERTO SÁNCHEZ MEDINA PRESENTADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DE LA LICENCIATURA EN
BIOLOGÍA. ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

JUNIO DE 2008

**DESCRIPCIÓN DE LA HISTORIA DE VIDA Y DESARROLLO DE *Eisenia
arborea* Areschoug (Phaeophyceae, Laminariales) BAJO CONDICIONES DE
LABORATORIO**

Eisenia arborea Areschoug (Laminariales, Phaeophyta) es una alga parda de interés comercial presente en las costas de Baja California. Su historia de vida fue descrita desde el siglo pasado por George Hollenberg (1939), Clare Shults y Charles C. Herbst (1938) a partir de plantas colectadas al sur de California, ellos coinciden en describir la historia de vida de *E. arborea* como típica de las Laminariales, sin embargo se desconocen los efectos de los factores ambientales sobre el desarrollo de las fases reproductivas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los factores de temperatura, irradiancia y fotoperiodo, con el fin de determinar las mejores condiciones en laboratorio, que permitan promover el desarrollo de su cultivo. Para esto, láminas fértiles de *E. arborea* fueron colectadas en Bahía Falsa, San Quintín y traídas al laboratorio donde se enjuagaron con agua de mar estéril (pasada por UV) y filtrada (0.2 μm). Se cortaron círculos con un horador (1 cm de diámetro), de las áreas del tejido fértil en los esporofilos. Se realizó la inoculación sobre portaobjetos contenidos en cajas Petri (60 x 15 mm) con 150 ml de agua de mar filtrada (0.2 μm) y enriquecida con medio Provasoli. Posteriormente se trabajó con tres temperaturas: 10 °C, 16 °C y 20 °C; tres fotoperiodos: uno corto 8:16, neutro 12:12 y largo 16:8 (L:O), y dos irradiancias (36 unidades experimentales). Durante el primer mes las irradiancias fueron de 32 y $47 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Al mes se aumentaron a 47 ± 5 y $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se hicieron observaciones semanales para evaluar el desarrollo de los organismos. En todos los cultivos se observó desarrollo de gametofitos. Sin embargo, solo en los cultivos bajo condiciones de 16°C, una irradiancia de $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16:8(L: O), se observó la fertilización de los oogonios y formación de esporofitos. Estos estudios demuestran que la historia de vida de *E. arborea* puede ser influenciada por parámetros ambientales. El estudio, además, permite establecer las bases para el desarrollo de protocolos de cultivo.

RESUMEN APROBADO:



Dr. José Antonio Zertuche González



AGRADECIMIENTOS

A mis **Padres**, por su incalculable sacrificio que me ha permitido llegar hasta donde me encuentro ahora y por su apoyo, sabiduría, paciencia y buenos ejemplos que me han llevado a crecer no solamente académicamente pero también como persona.

Al **Dr. José A. Zertuche González**, por dedicarme su tiempo (muy valioso), experiencia y darme la oportunidad de trabajar con personas tan maravillosas, sin olvidar su sencillez y su entrega completa al trabajo que lo hace ser un maestro extraordinario.

A los **Maestros Lupita y Guillermo Ballesteros**, por ser el pilar que hizo posible realizar este trabajo, por todas sus observaciones, comentarios y platicas tan amenas que facilitaron este proceso, y por enseñarme que nunca es tarde para fascinarte con los pequeños detalles que trae la ciencia.

Al **Oc. José Guzmán**, por brindarme su amistad, ayudarme en todas las salidas de campo y por hacer que las salidas al campo fueran divertidas.

A los del laboratorio de Macroalgas, **Biol. Alberto Gálvez, Dr. Isaí Pacheco, M.C. Enrique Hernández, M.C. Juan Manuel Vivas y M.C. Victor Macias**, por asesorarme en todo momento y brindarme su ayuda incondicional.

A mis sinodales, **M.C. Eusebio Barreto Estrada y Dra. María del Refugio González Esparza**, por aceptar la dura tarea de asesorarme en este último paso de mi licenciatura.

A todos mis maestros de la Licenciatura tanto Biólogos como Oceanólogos, que sin lugar a duda dejaron buenos y malos ejemplos, que me sirven de base para el futuro.

Y los últimos serán los primeros, a todos mis amigos y compañeros de ambas generaciones, que fue un orgullo y placer conocer personas que hicieron que 4 años y medio pasaran tan rápido haciéndome sonreír todos los días, por mencionar algunos (sin ningún orden en particular): **Anahí, Ana Laura, Aurelio (Taka), Alex (Jando), Bere, Cesar, Luis (Tj), Martin, Duarte, Mitkel, Gustavo, Paola, Andrea, Fernando, Daniel (Danny), Lilian, Omar, Carolina, Jeannete, Lizz, Patty, Violeta, Raul, etc.**



DEDICATORIA

A mis padres que siempre serán mi fuente de apoyo y ejemplo a seguir.

A mis familiares por su interés en mi trabajo.

A mis maestros por brindarme su amistad y ansias de superación.

A mis amigos y compañeros por permitirme crecer con ellos y formar parte de mi vida.

Al gato Mambo por darle ritmo a mi vida.

A Fernando Ortiz y Tribi que se nos adelantaron pero su calidez como persona nunca será olvidada.



ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	8
ÁREA DE ESTUDIO.....	9
METODOLOGÍA.....	12
RESULTADOS.....	15



DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1.....	10
FIGURA 2.....	15
FIGURA 3.....	16
FIGURA 4.....	17
FIGURA 5.....	17
FIGURA 6.....	17
FIGURA 7.....	17
FIGURA 8.....	17
FIGURA 9.....	17
FIGURA 10.....	17
FIGURA 11.....	17
FIGURA 12.....	19



FIGURA 13.....	19
FIGURA 14.....	19
FIGURA 15.....	21
FIGURA 16.....	21
FIGURA 17.....	23
FIGURA 18.....	23
FIGURA 19.....	23
FIGURA 20.....	23



INTRODUCCIÓN

Eisenia arborea (J. E. Areschoug en 1876) es un alga parda de interés comercial que se encuentra en el Pacífico Oriental desde la Isla de Vancouver, Columbia Británica, Canadá hasta Bahía Magdalena, Baja California Sur, México (Abbott y Hollenberg, 1976). Es utilizada en Oriente como complemento alimenticio en humanos, y como alimento para abulón y erizo (www.algaebase.org).

En las costas de Baja California, México existen mantos de *E. arborea* sobre los que se ha iniciado su explotación de forma artesanal, mediante buceo autónomo o recolecta en bajamar. Este material es utilizado para la elaboración de harinas y fertilizantes (INP, 2006), a partir de frondas las cuales tienen una capacidad de regeneración muy limitada o nula (Callejas, 2007) lo que ha creado un interés de promover el desarrollo del cultivo. Para ello es necesario conocer su historia de vida y los factores que la controlan.

Shults y Herbst (1938) y Hollenberg (1939) describieron la historia de vida de *E. arborea* ha mediados del siglo pasado. Los autores mencionados coinciden en describir la historia de vida de *E. arborea* como típica de las Laminariales, pero se desconocen los efectos de los factores ambientales sobre el desarrollo de las fases reproductivas. No existen trabajos posteriores que indiquen las variantes que pueda presentar la historia de vida de esta especie a lo largo de su distribución geográfica. Estudios de *E. arborea* en



México se restringen a su distribución geográfica y descripción (Shults y Herbst, 1938; Hollenberg, 1939; Abbott y Hollenberg, 1976 y Matson y Edwards, 2006).

Ya que los únicos reportes acerca de la historia de vida de la especie datan de los años 1938 y 1939 (Shults y Herbst, 1938 y Hollenberg, 1939) este trabajo se enfocó la descripción sobre el crecimiento de los gametofitos y esporofitos de *E. arborea* a partir de esporas obtenidas de organismos de bahía Falsa, San Quintín en condiciones de laboratorio.



ANTECEDENTES

El género *Eisenia* es endémico de aguas templadas y pertenece al Orden de las Laminariales. Se conocen siete especies. *E. arborea* Areschoug, se encuentra distribuida a lo largo de las costas al sur de California y Baja California, y *E. bicyclis* Kjellm que se ha reportado en aguas japonesas (Matson y Edwards, 2006). Además a lo largo de la costa peruana se ha reportado el crecimiento de *E. gracilis* E.Y. Dawson, Acleto y Foldvik y *E. cokeri* M.A. Howe. También este género presenta especies de aguas profundas como: *E. desmarestioides* Setchell y N.L. Gardner y *E. masonii* Setchell y N.L. Gardner en Isla Guadalupe en Baja California y *E. galapagensis* W.R. Taylor en el archipiélago de las Galápagos (www.algaebase.org).

Los mantos de algas pardas presentan una amplia distribución geográfica en la costa noroccidental de Baja California y aunque es discontinua, se presentan en zonas rocosas y en la zona intermareal hasta los 40 m de profundidad; proporcionan un hábitat, sustrato y alimento a una diversa fauna marina. De los principales intereses desde el punto de vista industrial son sus contenidos de alginato utilizados como agentes gelificantes (Arvizu, 2007) y por las concentraciones de yodo, potasio, vitaminas, minerales y carbohidratos que han sido usados por años como complemento alimentario (Corona, 1985).



Eisenia arborea pertenece al Orden Laminariales que incluye a los organismos más grandes y estructuralmente complejas (Bold y Wynne, 1985), la mayoría de los géneros representativos tienen una alternancia de generaciones heteromórfica, con una fase gametofita sexual dioica con individuos microscópicos heteromórficos y una fase conspicua caracterizada por un macro - esporofito diploide asexual con meiosporangios uniloculares con parafasias (Shults y Herbst, 1938; Hollenberg, 1939; Lewis et al., 1993).

Se ha demostrado que ciertos factores ambientales pueden generar efectos diferenciales a las especies con múltiples fases en su historia de vida (Matson y Edwards, 2007). La fase gametofita presenta evidencias que indica que puede ser afectada por variables como irradiancia, temperatura y nutrientes. Los gametofitos femeninos en algunas especies, se vuelven fértiles cuando la temperatura, cantidad y calidad de luz resultan apropiadas para su desarrollo, mientras que en otras situaciones los gametofitos se mantienen infértiles en condiciones adversas (Nelson, 2005; Lee, 1984).

También se ha observado que en Laminariales, la luz y temperatura actúan de manera directa en el crecimiento vegetativo y la reproducción de los gametofitos; en algunos casos la célula primaria (primera célula del gametofito) puede sobrevivir en ambientes sin luz hasta por cinco meses a 10°C, aunque temperaturas muy bajas genera una lisis en la membrana celular por la formación de cristales en hielo (Lüning, 1990). En otras fases de desarrollo las temperaturas cercanas a la dosis letal (20°C en Laminariales) mitigan la tasa de crecimiento (Lüning, 1980), porque cerca de esta

temperatura se puede generar un proceso de desnaturalización de algunas proteínas y enzimas de la membrana (Lüning, 1990).

La obtención de conocimientos más precisos de este tipo de estudios, sobre los efectos que generan, la temperatura e irradiancia en la demanda de crecimiento y fertilización de los gametofitos para algas pardas, ha hecho posible realizar experimentos entre poblaciones y estos nos brindan una forma de comprender los procesos de especiación en el mar y el conocimiento individual de cada taxón (Lobban and Wynne, 1981). Se ha observado cómo la producción de soros se debe a los ritmos de los fotoperiodos en el ambiente natural. Dichos fotoperiodos, los cuales varían con las estaciones reproductivas puede que sean una pieza clave en la anticipación de estos organismos a las condiciones ambientales, que facilitan el éxito de la propagación, fertilización y reclutamiento (Graham, 2000).

Estudios acerca de los límites de distribución de *E. arborea* (Paul y Matthew, 2007), sugieren que los esporofitos son más flexibles a temperaturas altas y a una baja concentración de nutrientes, mientras que la fase gametofita es incapaz de ello. La habilidad de ambas generaciones para soportar variación en la temperatura les permite habitar en aguas cálidas al sur de Baja California, como también al norte en las costas de California.

Aunque *E. arborea* ha sido cosechada de mantos naturales para ser utilizada como alimento humano, en dietas de organismos marinos (Serviere, *et al.*, 2002) y que sus frondas presentan un alginato de buena calidad (Arvizu, 2007), aún se desconocen los aspectos de su historia de vida y reproducción de esta especie en Baja California, información que constituye la base del conocimiento que permitirá poder realizar el desarrollo del cultivo de esta especie.

Los esporofitos maduros de *E. arborea* se caracterizan por un estipe rígido de color pardo que puede alcanzar de 1 a 2 m de altura, con una bifurcación en la parte apical que se extiende en dos lóbulos aplanados en donde crecen las frondas laterales. Los soros se desarrollan en los esporofilos como parches irregulares a lo largo de toda la fronda y es posible encontrar frondas fértiles todo el año. La estructura de fijación es profusa, compacta y las hapteras están ramificadas dicotómicamente (Shults y Herbst, 1938; George Hollenberg, 1939). La estructura que compone la histología de los esporofitos maduros al igual que en todas las Laminariales es un meristodermo fotosintético, una corteza parenquimatosa y una médula central (www.algaebase.org).

Shults y Herbst en 1938 y George Hollenberg en 1939 describieron la historia de vida de esta especie como típica del Orden Laminariales, donde los esporofitos jóvenes son polimórficos. Primero asumen el aspecto de una *Laminaria* y después el de una *Ecklonia* antes de desarrollar la morfología típica de *Eisenia*, sin embargo no se sabe con



certeza los efectos de los factores ambientales sobre el desarrollo de sus fases reproductivas.

En cuanto a la plasticidad de las diferentes fases de desarrollo se ha obtenido información alrededor de que las condiciones ambientales juegan un papel más importante de lo que se creía en influenciar las expresiones morfológicas en algas marinas. Para varias especies de macroalgas se han mejorado las técnicas de cultivo y diseñado infraestructuras adecuadas para estudiar el efecto de la combinación de factores ambientales sobre la morfología y desarrollo de la planta bajo condiciones artificiales (Lobban and Wynne 1981).

La temperatura en el medio natural puede sustituir el fotoperiodo como una señal de cambio de estación. Los límites de temperatura ambiental pueden influir en el proceso reproductivo, como en la formación de esporas y gametos; en Laminariales se ha observado la inhibición de la formación de gametofitos cuando las condiciones del medio son 5 - 7° C mayores, para miembros que están adaptados a aguas cálidas (Lüning, 1990).

El propósito de este trabajo es evaluar el efecto de los factores: temperatura, irradiancia y fotoperíodo, con el fin de determinar las mejores condiciones en laboratorio que permitirán aportar las bases para elaborar los protocolos de cultivo en condiciones de laboratorio y promover su desarrollo.



HIPÓTESIS

Por presentar una Historia de Vida heteromórfica compleja la fase haploide reducida y los esporofitos juveniles de *E. arborea* pueden variar en su crecimiento, maduración, desarrollo bajo la influencia de diferentes condiciones de temperatura, irradiancia y fotoperiodo en condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS

- Describir la Historia de Vida para esta especie, haciendo observaciones de las fases gametofíticas, la fertilización del oogonio, formación del cigoto y posteriormente el desarrollo de la fase esporofítica.
- Determinar bajo que tratamiento (temperatura, irradiancia y fotoperíodo) se obtiene los mejores resultados para el desarrollo de la historia de vida.
- Obtener organismos, de la fase conspicua (esporofítica).

ÁREA DE ESTUDIO

Bahía San Quintín (BSQ), es uno de los cuerpos costeros más productivos y estudiados de la costa noroccidental (García-Esquivel, 2004; Ortiz et al, 2004), localizada entre los 30° 24' y 30° 30' latitud norte y 115° 57' y 116° 01' latitud Oeste (**Figura 1**). BSQ es una depresión de origen tectónico, que se formó durante el Pleistoceno (Angulo, 2006). La bahía presenta extensas llanuras intermareales, bajos submareales someros y estrechos canales de marea. Las mareas son semidiurnas mixtas y tienen un rango máximo de 2.0 m (Ward, 2004).

Este sistema es una laguna en forma de “Y” con dos brazos: el brazo este conocido como Bahía de San Quintín y el brazo oeste, Bahía Falsa. Bahía Falsa es una zona muy somera, cuyo canal principal tiene un promedio de 4 m de profundidad (Angulo, 2006), tiene una longitud aproximada de 15 km. Existe una conexión con el océano adyacente a través de una boca relativamente estrecha (más de un kilómetro) cuya profundidad máxima es de aproximadamente 16 m.

Gran parte del sustrato de la boca del brazo oeste y la base de la “Y” está conformada por sedimentos arenosos, mientras que las partes restantes de la laguna, el brazo este y la parte interna del brazo oeste, tiene una clase de sedimento predominantemente limo arcilloso. La elevada turbidez se genera por efecto del oleaje forzado sobre la batimetría somera. (Montes *et al*, 2005).





Figura 1. Bahía San Quintín, Baja California, México. Mapa del sitio de muestreo y colecta (+) para los organismos de *E. arborea*, en Bahía Falsa.

BSQ consiste en una laguna restringida con una sola entrada al mar y presenta mareas que oscilan con las mareas del océano costero, pero disminuyen ligeramente su amplitud dentro de la laguna. El efecto de la circulación oceánica se suma al de los vientos para producir un intenso fenómeno de surgencias (Álvarez-Borrego, 2004). Esta bahía tiene una alta productividad gracias a los eventos de surgencias costeras del sistema de la corriente de California (SCC), lo que favorece una fertilización permanente, con aguas ricas de nutrientes que penetran a la bahía por medio de las corrientes de marea (Callejas, 2007).

Las surgencias con mayor intensidad ocurren en primavera y a principios de verano, sin embargo, persisten durante todo el año y hacen que el agua sea más fría y

presente altas concentraciones de nutrientes (Rodríguez, 2007). La temperatura y salinidad aumenta de la boca a los extremos internos de la bahía (McCarthy, 1988).

Además es un sistema hipersalino que puede ser clasificado como un estuario inverso debido a que la salinidad incrementa de la boca al interior gracias a la elevada tasa de evaporación y a la mínima presencia de precipitación pluvial (Angulo, 2006).

El clima de la zona es clasificado como semiárido con lluvias escasas en invierno con un promedio anual de precipitación de 5 – 10 cm (Angulo, 2006) con mayor frecuencia e intensidad en invierno y una evaporación anual promedio de 140 cm (Rodríguez, 2007).

Debido a lo somero de algunas zonas, estas se encuentran afectadas directamente por un intenso calentamiento que genera gradientes de temperatura causante de cambios en la densidad y corrientes (Angulo, 2006), las temperaturas medias anuales diarias del aire y agua se encuentran entre 11° y 22° C y 15° y 22° C respectivamente (Ward, 2004).

Las corrientes de mareas en la boca llegan a alcanzar velocidades de 100 cm/s y hacia el interior de la laguna hasta 60 cm/s ocasionadas por la continuidad del volumen (Angulo, 2006). El aporte de agua dulce a la bahía no es significativo y proviene en gran parte del Arroyo San Simón en la época de lluvias de noviembre a marzo (Montes *et al*, 2005).

METODOLOGÍA

La siguiente metodología es una adaptación del cultivo *in vitro* descrito por Shoji Kawashima *et al.* (1993) para *Laminaria japonica* (Kombu), *Lessonia variegata* y *Macrocystis pyrifera* (Nelson, 2005; Ladah, 2000) con la aplicación de algunas técnicas y recomendaciones utilizadas en el cultivo de estas especies (Lee, 1984, Anderson, 2005) para el alga *E. arborea*.

El 26 de junio del 2007 (10:00 hrs) se realizó la colecta de frondas fértiles (esporofilos) de *E. arborea* en una población submareal que se localiza sobre unas estructuras artificiales para el cultivo de ostión de la empresa Agromarinos en Bahía Falsa, San Quintín, Baja California. La obtención de material biológico se facilitó con la utilización de una pequeña embarcación proporcionada por la empresa y el apoyo de un equipo de buceo autónomo.

Las frondas recibieron un tratamiento en el campo para eliminar agentes contaminantes y organismos epibiontes, esto se hizo cepillando y enjuagando varias veces el tejido con agua de mar estéril (pasada por UV) y filtrada (0.2µm). Se cortaron círculos con un horador, con un diámetro de 1 cm, en las áreas del tejido fértil en los esporofilos, los cuales se colocaron en recipientes de plástico herméticos (Falcon) previamente esterilizados y se les agregó con agua de mar filtrada (0.2 µm). Se utilizaron cuatro recipientes con diez círculos c/u, y se colocaron en una base de poliuretano para

evitar contacto directo con el hielo y después fueron colocados en una hielera, posteriormente se llevaron al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Al momento que llegó el material biológico al laboratorio se hizo un raspado con una pipeta Pasteur estéril sobre los soros y se colocó sobre un portaobjetos para observar los esporangios uniloculares de los esporofilos. Las observaciones se hicieron a 40X en un microscopio compuesto (Zeiss, AXIOSKOP40) con adaptador para cámara fotográfica (Sony, VAD-S70). También se analizó muestra del medio donde venían con los cortes de esporofilos para determinar si se había realizado la liberación de esporas.

Para normalizar la variabilidad entre organismos, se mezclaron los medios de los cuatro recipientes en un vaso de precipitado de 100 ml, se homogenizó la solución y se realizó la inoculación (no se determinó la concentración de esporas) sobre portaobjetos contenidos en cajas Petri (60 x15 mm) con 150 ml de agua de mar filtrada (0.2 μ m) y enriquecida con medio Provasoli, la fijación de las esporas en las cajas de Petri se hizo en dos portaobjetos por caja.

Después de la inoculación, se pusieron dos cajas de Petri en cada condición de cultivo, se trabajó con tres temperaturas: 10 °C, 16 °C y 20 °C; tres fotoperiodos: uno corto 8:16, neutro 12:12 y largo 16:8 (L:O), y dos irradiancias (36 unidades experimentales). Durante el primer mes las irradiancias fueron de 32 y $47 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Al mes se aumentaron a 47 ± 5 y $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para favorecer el proceso de fecundación. Los recambios del medio se hicieron semanalmente con un medio enriquecido (PROVASOLI).

Las observaciones al microscopio fueron semanales y las fases que se consideraron en este estudio fueron: el desarrollo de los organismos desde gametofitos hasta esporofitos, el tiempo de formación de los gametofitos (la formación de gametofitos inicia con la germinación de las esporas), la aparición de características de cada sexo en gametofitos, la maduración de los gametofitos, la fertilización del oogonio, la formación de los cigotos y la aparición de los esporofitos. Se utilizó un Estereoscopio (Zeiss, STEAMI SV11) con una lámpara (Zeiss, KL1500LCT) independiente para observar el crecimiento de los esporofitos juveniles.

Se tomaron fotografías utilizando una cámara digital (Sony, MPEGMOVIE EX DSC-S75) con lente Carl Zeiss, del material biológico en todas las condiciones, durante un periodo de aproximadamente 60 días (2 meses) hasta completar todas las fases de la historia de vida.

RESULTADOS

Liberación de esporas. En cuanto se colocaron los cortes de los soros de *E. arborea* en los recipientes de plástico herméticos, se notó un cambio en la coloración inicial (hialino) del medio de manera inmediata a un color amarillento, al momento que se llegó al laboratorio del IIO el mismo día de la colecta (a las 19:00 hrs) se realizaron las primeras observaciones del tejido fértil de los esporofilos traídos del campo, y se observaron los esporangios uniloculares, (estructuras reproductivas típicas de las Laminariales) con parafasias en la zona apical de la célula, con una alta concentración de esporas (**Figura 2**).

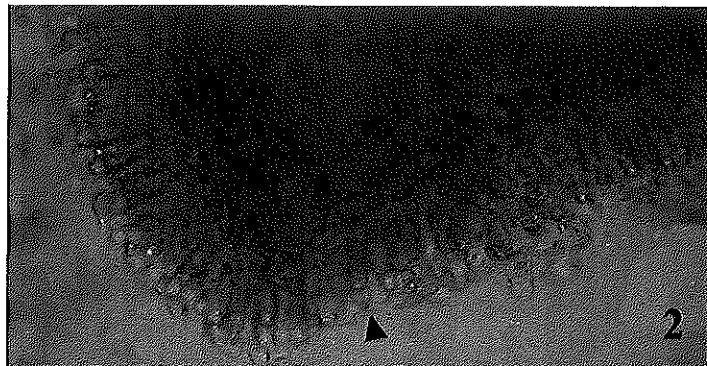


Figura 2. Corte longitudinal de los esporangios uniloculares de los soros fértiles de la fronda de *E. arborea* (20X).

Después de la liberación, se determinaron las características típicas de las esporas presentes en el medio, de forma periforme, biflageladas con un flagelo heteroconte, ambos implantados lateralmente de un mismo lado cerca del extremo atenuado y la

presencia de un solo cromatóforo en el extremo no atenuado (**Figura 3**). El tamaño de las esporas varió de entre 7 a 9 μm de largo y 4 a 5 μm de ancho.

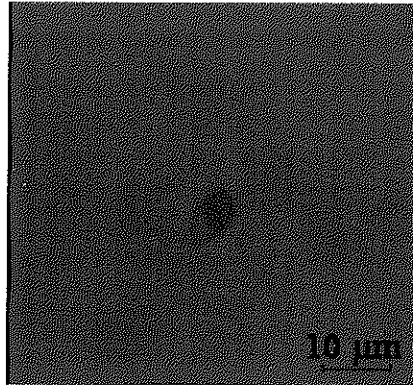


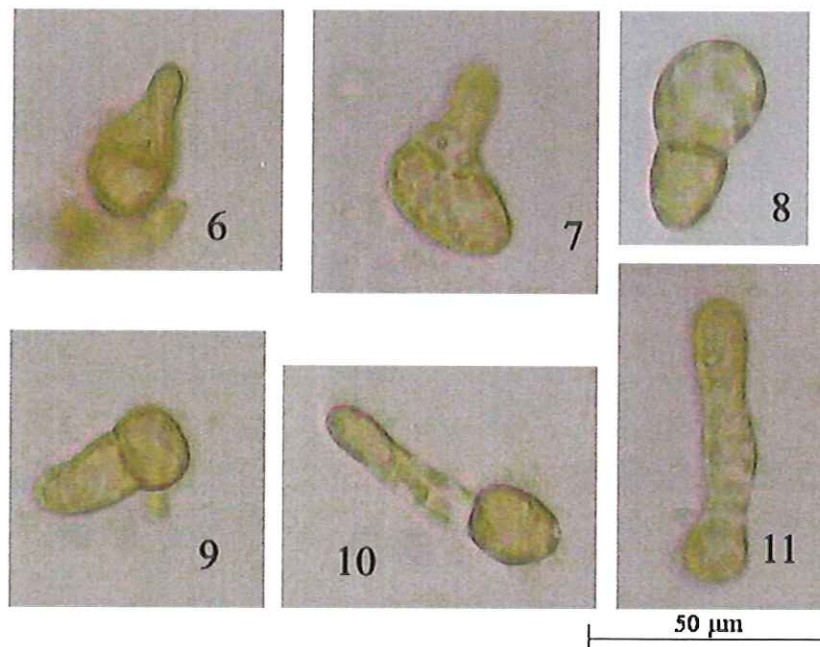
Figura 3. Espora móvil de *E. arborea* después de la liberación de los esporangios uniloculares (40X).

Los recipientes inoculados se colocaron bajo las condiciones de temperatura, fotoperiodo e irradiancia mencionadas anteriormente. A partir de entonces, se hicieron observaciones semanalmente. Durante la primera semana, todos los tratamientos mostraron un comportamiento similar que consistió en lo siguiente: la movilidad de las esporas se fue reduciendo hasta volverse totalmente nula debido a la pérdida de los flagelos para dar inicio a la fase de fijación. Las células que estaban sésiles presentaban una forma esférica con un tamaño mayor al de las esporas móviles (entre 10 a 13 μm) y un cromatóforo bien definido concentrado en un extremo (**Figura 4**). Las esporas después de 2 a 4 días comenzaron a hincharse hasta alcanzar 21 a 25 μm y el número de cromatóforos aumento considerablemente (**Figura 5**).



Figuras 4 y 5. Espora sésil de *E. arborea* después de 1 día de comenzar el cultivo (40X).

Germinación. Después de la fijación siguió la germinación de las esporas. Esto sucedió entre 1 a 5 días después de la liberación. Las esporas sésiles expulsaron una parte de su citoplasma en un tubo de germinación el cual comenzó a hincharse hasta tener un tamaño mayor al de la espora inicial (Nelson, 2005).



Figuras 6 – 11. Germinación y formación del tubo de germinación hasta llegar a un gametofito juvenil después de 11 días en 20 °C, $47 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16:8(L: O) (40X).

A los 11 días de cultivo se observó un desarrollo similar en las 18 condiciones, presentándose diversas etapas de crecimiento (**Figuras 6 -11**).

Por el tubo de germinación pasó gran parte del contenido de citoplasma y comenzó a dilatarse la punta del tubo para formar la primera célula del prótalo. El tamaño que alcanzó la célula varió de 30 a 40 μm (**Figura 6 y 7**). La primera célula creció hasta formar un filamento uniseriado que llegó alcanzar hasta 60 μm (**Figuras 8, 9 y 10**) y la espora inicial mantuvo un color café oscuro durante esta fase. Durante este periodo es muy difícil reconocer el sexo de los gametofitos (**Figura 11**).

Crecimiento y Desarrollo. A los 18 días de cultivo ambos presentaban características similares en todas las condiciones, como ser pluricelulares, un número de células variable en cada gametofito, una alta pigmentación y la aparición de ramificaciones (**Figura 12**). Sin embargo también comenzaron a distinguir características de cada sexo; los gametofitos femeninos son poco ramificados, de células grandes, redondas y ovaladas con tallas mayores de 200 μm (**Figura 13**) y los gametofitos masculinos son conspicuamente más pequeños; sus tallas no pasan de las 200 μm , las células son estrechas, filamentosas y considerablemente más ramificadas que las células femeninas (**Figura 14**).

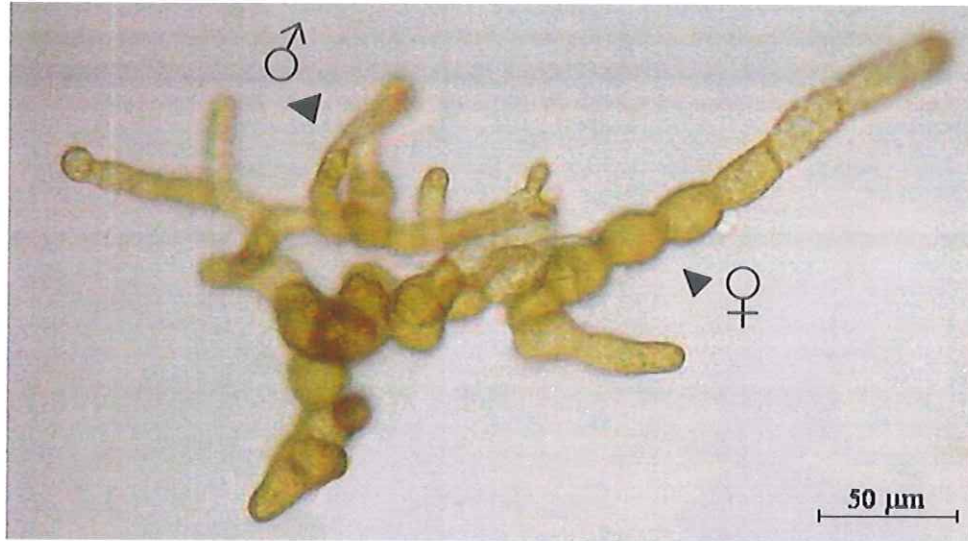
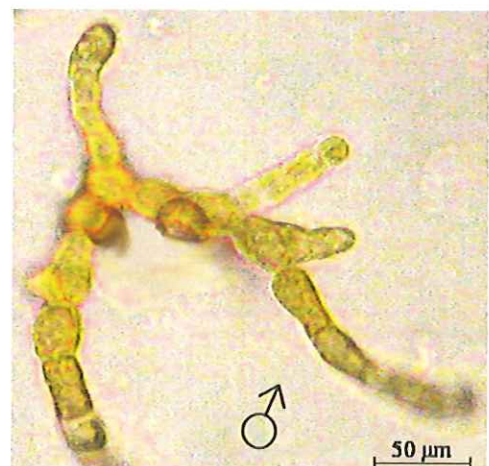
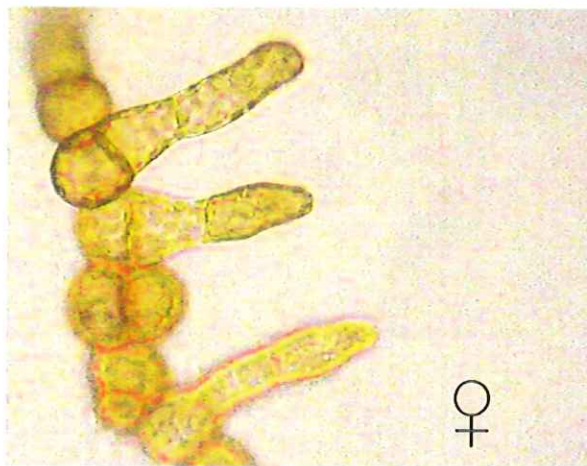


Figura 12. Gametofitos masculinos y femeninos después de 18 días en 16 °C, $47 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16:8(L: O) (20X).

En condiciones escasas de luz los gametofitos presentan formas atípicas (Nelson, 2005), en condiciones donde el fotoperiodo era corto (8:16) y la irradiancia baja, se observaron formas filamentosas y de células estrechas.



Figuras 13 y 14. Gametofitos femeninos y masculinos después de 18 días en 16 °C, $47 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16:8(L: O) (40X).

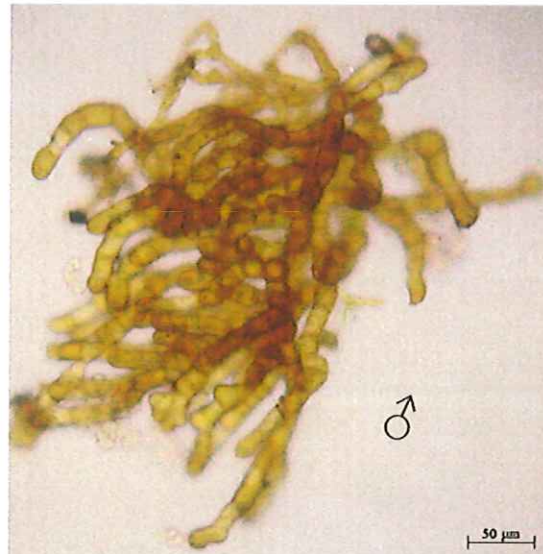
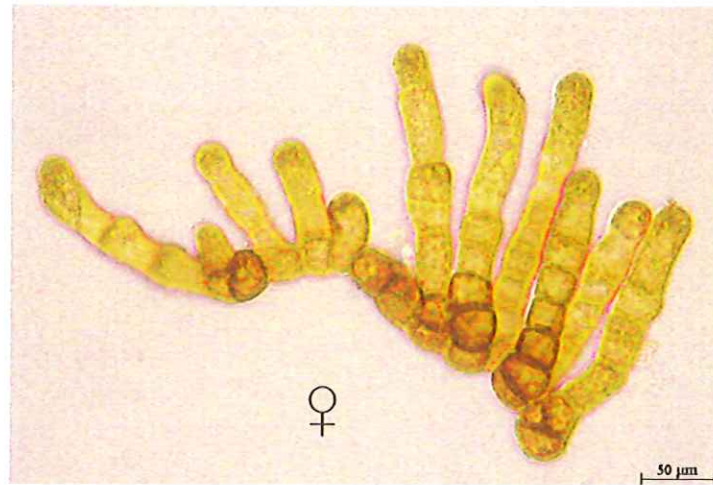
A partir de los 18 días de cultivo se observó la aparición de materia orgánica de color café, agrupada en grumos, sin consistencia y de formas variables en todas las condiciones pero en mayor cantidad a los 16 °C.

A los 33 días los gametofitos femeninos presentan una pigmentación fuerte en la zona apical generada por el incremento del número de cromatóforos en la periferia. Estas células pueden ser esféricas, ovoides o periformes (**Figura 15**), y dieron origen a los oogonios cuando llegaron a su madurez.

La organización celular de los prótalos femeninos estuvo conformada por filamentos uniseriados con un número de células variable (2 a 8 células), y de dimensiones notablemente mayores.

La formación del oogonio comenzó al debilitarse la punta del gametofito, se generó una prolongación hasta formar una película delgada y por medio de una ruptura transversal apareció en el ápice una célula esférica, con una fuerte pigmentación conocida también como huevo. Otra característica que se originó en esta fase fue la aparición de papilas en la zona apical, la cual forma una capa conspicua en la punta del oogonio. Estas papilas pueden llegar a ser numerosas (Hollenberg, 1939) generalmente son puntos donde hay gelatinización de las paredes celulares.

Los gametofitos masculinos en cambio presentaron una pigmentación tenue con células de dimensiones pequeñas y compactas, con numerosas ramificaciones que fueron más reducidas y elongadas (**Figura 16**). Los microgametofitos están conformados por prótalos ligeramente curvos e irregulares, con filamentos más ramificados, pluricelulares (más de 10 células), células angostas, cortas y de formas no tan redondas.



Figuras 15 y 16. Gametofitos femeninos y masculinos con 33 días en 16 °C, $47 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16:8(L: O) (20X).

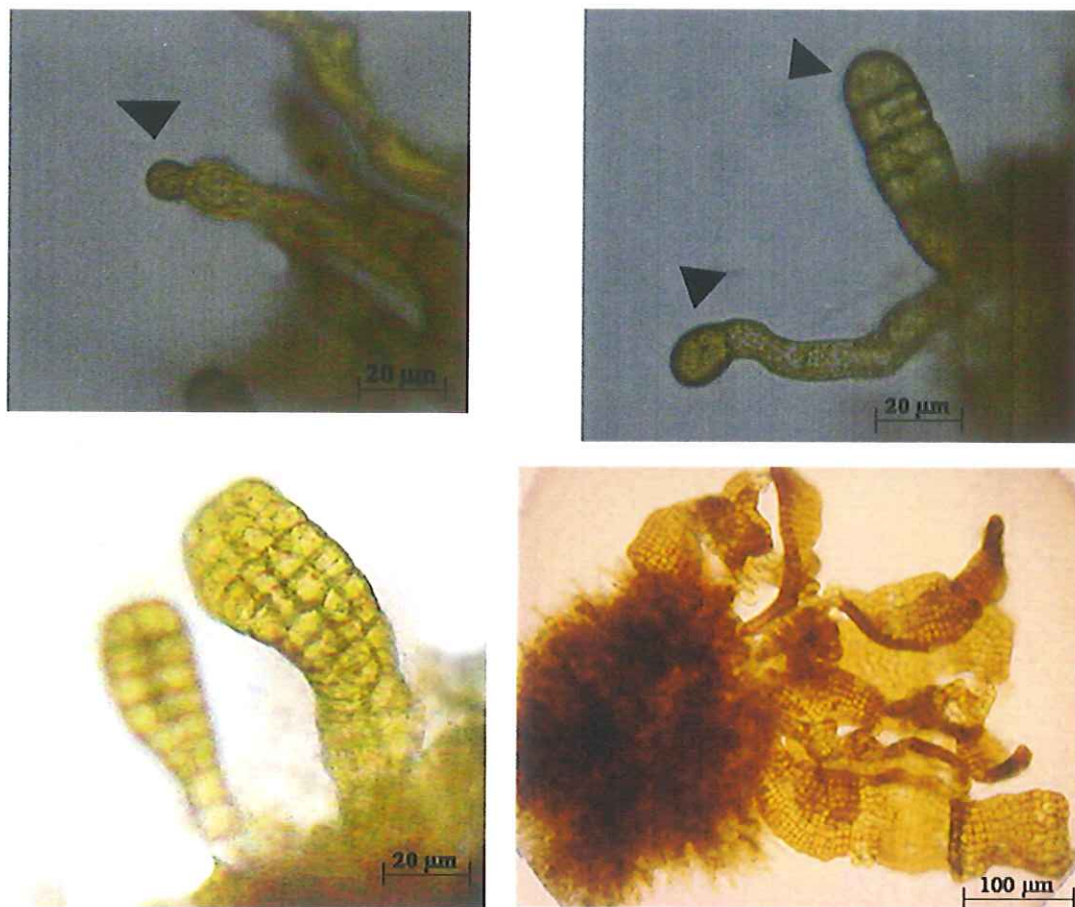
Maduración. Después del mes se elevaron las irradiancias a 47 ± 5 y $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la maduración de los gametofitos (entre el día 33 y 45) comenzó con la aparición de estructuras cónicas a lo largo de todo el filamento que forman a los anteridios.

Los anteridios son estructuras celulares que a medida que llega a la maduración, va formando un engrosamiento en la pared celular hasta crear un glóbulo esférico gelatinizado, cuando se encuentra completamente maduro se genera una rotura transversal en la punta y se liberan los anterozoides, posteriormente ocurre a la degradación de los anteridios.

Después de 45 días en los cultivos sometidos a 16°C , $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16:8(L: O), se obtuvieron oogonios fecundados (no se observó la fusión de gametos). Se observa claramente que la fertilización se lleva a cabo en la punta del oogonio que presenta una forma esférica con un alto número de cromatóforos.

Fertilización. Durante la fertilización, los anterozoides hacen contacto con el oogonio por medio de la fusión de ambas membranas celulares donde se forma un pequeño puente por el cual se llevará a cabo la plasmogamia y a medida que el puente se va desarrollando se nota un incremento de tamaño en el oogonio y la formación de una prominencia (**Figura 17**). Después de los 45 días el núcleo masculino migra hacia el oogonio y comienza un proceso gradual de absorción hasta desaparecer completamente una prominencia, que es aproximadamente el tiempo que tarda en completarse la fusión

entre ambos pronúcleos, (cariogamia). Con esto el cigoto presenta una serie de cambios: incremento en tamaño (entre 13 y 15 μm); la pigmentación se torna más fuerte; se puede distinguir un engrosamiento en la pared celular y la aparición de un punto en el centro que corresponde al núcleo del cigoto (Figura 18).



Figuras 17 - 20. (17 y 18) Fecundación del oogonio y desarrollo del cigoto a los 45 días en 16 °C, $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16:8(L: O) (40X); (19 y 20) desarrollo y crecimiento de los esporofitos después de 60 días de cultivo (40X) (10X).

Se observó el alargamiento del cigoto para producir la primera división celular que forma un tabique transversal en un sólo plano para dar lugar a las dos

primeras células del talo esporofito. Esto continuó hasta formar un filamento cilíndrico y uniseriado de 6 a 8 células (**Figura 18**) y posteriormente se notaron divisiones longitudinales continuas en el extremo apical hasta llegar a las 50 μm .

A los 60 días de cultivo las células basales se prolongaron para dar lugar a los primeros rizoides del esporofito. Las células de la parte central del esporofito presentaron divisiones celulares que le dan un aspecto biseriado (**Figura 19**), en la parte más distal comenzó a formarse una pequeña lámina monostromática que puede pasar de las 80 μm .

Después de 60 días el esporofito juvenil ya presentó una lámina pluricelular bien definida que rebasó las 300 μm ; con una fuerte pigmentación, una parte central en forma de pedúnculo y cilíndrico, y una zona basal bulbosa con los rizoides que ahora son más abundantes (**Figura 20**). El desarrollo del talo esporofito joven sobre el filamento materno se mantuvo gracias a una matriz gelatinosa que presenta. Posteriormente las células de la lámina comenzaron a hincharse y a generarse más divisiones celulares hasta convertirse en una fronda.

DISCUSIÓN

En este trabajo se completaron las diferentes secuencias fenológicas de la Historia de Vida de *Eisenia arborea* Areschoug colectada en Bahía Falsa, San Quintín bajo condiciones de laboratorio.

El desarrollo de las fases de la Historia de Vida en *Eisenia arborea* desde el momento de la liberación de las esporas hasta el desarrollo de los esporofitos juveniles fue similar al de todos los géneros en el Orden Laminariales estudiados hasta la fecha (Shults y Herbst, 1938; Hollenberg, 1939; Asensi, 1973; Lewis, 1993); ya que presentó una alternancia de generaciones heteromórfica donde el esporofito macroscópico diploide dio origen a gametofitos haploides microscópicos.

La estación de colecta de los esporofilos maduros utilizados para este experimento fue a finales de junio, siendo esta el inicio de verano, donde en BSQ la temperatura incrementa de la boca hacia el interior de la bahía, la temperatura del agua para bahía Falsa oscila entre 15°C a 22°C (Ward, 2004), los días con luz son largos y los eventos de surgencias se intensifican en esta época generando así aguas frías (Rodríguez, 2007). Bajo estas condiciones se observaron varios esporofilos maduros con soros desde la base de la fronda hasta la zona central en parches irregulares en casi todos los especímenes colectados, lo cual nos sugiere que las condiciones ambientales que presenta

el periodo primavera-verano en BSQ la hace época idónea para la colecta de material biológico.

Las esporas liberadas de los esporangios uniloculares germinaron en las 18 condiciones como gametofitos filamentosos que de manera profusa comenzaron a ramificarse. Durante esta fase no fue posible distinguir el sexo de cada gametofito pero después de 18 días los caracteres morfológicos de cada sexo fueron surgiendo en todas las condiciones; aunque el tiempo de desarrollo para cada fase fue distinto en cada tratamiento.

A partir de esta fase las condiciones del medio de cultivo influyen directamente en el desarrollo de los gametofitos, los cuales pueden presentar en formas reducidas fértiles o crecer de manera profusa generando mechones (Asensi, 1973). La forma de los gametofitos femeninos puede presentar formas unicelulares tuberosas, multicelulares y filamentosas ramificadas (Nelson, 2005).

En aquellas donde la temperatura fue de 10°C y la irradiancia $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el crecimiento y aparición de gametofitos maduros estuvo más retrasado; la aparición de gametofitos filamentosos delgados se obtuvieron cuando la irradianza fue baja. Este es un comportamiento típico del orden Laminariales (Nelson, 2005; Lüning, 1980) donde los organismos adoptan una respiración oscura de intensidad baja para disminuir la producción de tejido no fotosintético, enzimas fotosintéticas y componentes del

transporte de electrones fotosintéticos (Lüning, 1990); pudiendo extender el crecimiento vegetativo de los gametofitos para permitir que cuando las condiciones sean favorables para la fertilización, cualquier célula vegetativa pueda diferenciarse como un gamentagio.

La aparición de materia orgánica que inicio desde los 18 días de cultivo, se debió en gran parte a la degradación de gametofitos masculinos que hicieron la liberación de anterozoides de manera precoz, en situaciones donde la irradiancia fue mayor y el fotoperiodo largo sin importar la temperatura. Fueron más visibles como grumos dentro de un cultivo estas agrupaciones de material orgánico que pueden dañar el cultivo ya que pueden servir como un medio apropiado para el desarrollo de bacterias saprofíticas, bacterias descomponedoras de ácido algínico, protozoarios e incluso agentes micóticos.

Los cultivos en 20°C fueron los que tuvieron un crecimiento más acelerado durante las primeras fases, presentando gametofitos con las diferencias morfológicas típicas de cada sexo, pero nunca llegaron a su maduración y por lo tanto no se completo la historia de vida. Esto se debió a que la temperatura es uno de los factores más importantes para la regulación del crecimiento en macroalgas (Lee, 1984) donde cerca de los 20°C se considera una condición desfavorable para el desarrollo de Laminariales (Lüning, 1980), ya que estas son consideradas como organismos de aguas templadas aunque hay evidencia que la fase microscópica es más tolerante que la macroscópica con respecto a los límites de sobrevivencia a la temperatura (Nelson, 2005).

El Orden Laminariales tiene límites máximos y mínimos de temperatura para su crecimiento y desarrollo donde el límite oscila entre los 12°C y 18°C (Matson and Edwards, 2006; Nelson, 2005; Lüning, 1990). Los cultivos de 16°C fue donde se observaron un crecimiento y desarrollo uniforme, con organismos que desde los 18 días se podía distinguir claramente entre masculinos y femeninos (**Figura 12**) y desde los 33 días se obtuvieron organismo potencialmente maduros, algunos autores le dan el nombre de macrogametofitos a los organismos femeninos y microgametofitos a los organismos masculinos (Hollenberg, 1939, Shults y Herbst, 1939) por su apariencia que concuerda con sus tamaños respectivos (**Figura 15 y 16**). Estos lapsos de tiempos concuerdan a lo descrito por Shults y Herbst, (1938) y Hollenberg (1939).

La temperatura juega un papel importante en el crecimiento; este es independiente de la calidad de luz (Lüning, 1980). La irradiancia y fotoperiodo son factores que influyen en la maduración y fertilidad en algas pardas (Lüning, 1990) en el experimento solamente a 16°C, $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 16:8 (L: O) se observaron oogonios fertilizados (**Figura 17**), la aparición de cigotos a los 45 días de cultivo (**Figura 18**) y la formación de esporofitos juveniles después de 60 días (**Figura 19 y 20**) completando la Historia de Vida en un medio artificial en laboratorio.

Los fotoperiodos largos en algas pardas favorece a la formación de gametangios principalmente en ciclos de vida heteromorficos (Lüning, 1990). No se puede indicar que

factor de los tres estudiados es el que influyó de manera determinante al crecimiento y desarrollo fenológico de *E. arborea*, más bien la combinación de los tres factores abióticos como una sola unidad hicieron posible cerrar la Historia de Vida. Existe un factor que también influye de manera directa en el desarrollo y maduración de organismos, la cantidad de nutrientes disponibles en el medio, aunque no se midió, este siempre se mantuvo en niveles adecuados por los recambios semanales.

Los esporofitos que se obtuvieron presentaron una fuerte pigmentación en su capa monostromática y estaban fuertemente adheridos al oogonio, lo cual nos indica que los organismos se encontraban sanos. Aunque este método de utilizar portaobjetos para la fijación de los organismos no permite llevar los esporofitos a un cultivo de mayor escala, debido a que la manipulación sería muy complicada y provocaría que mucho material se perdiera, esto se puede solucionar utilizando cuerdas de nailon para la fijación y realizar limpiezas para evitar una saturación, se requeriría evaluar la viabilidad de este método.

Con esta información se puede hacer las bases para el protocolo de cultivos bajo condiciones artificiales. Aunque se haya obtenido esporofitos microscópicos, los requerimientos que necesitaran los esporofitos macroscópicos pueden ser diferentes, ya que como se ha mencionado antes la fase microscópica es más tolerante a factores ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

- **Abbot, IA y Hollenberg, GJ.** (1976). "Marine Algae of California". Stamford University Press, Stanford. 827 pp.
- **Anderson, RA.** (2005). "Algal Culturing Techniques". Elsevier Academic Press, 239 – 251.
- **Angulo Larios, NT.** (2006). "Hidrodinámica de la Bahía de San Quintín, B. C.". Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, México. 128 pp.
- **Álvarez Borrego, S.** (2004). "Dinámica de nutrientes y fitoplancton en una laguna costera fuertemente afectada por surgencias costeras". Ciencias Marinas, 30: 1–19.
- **Arvizu, DL.** (2007). "Chemical constituents of *Eisenia arborea* Areschoug from Baja California Sur, México". Invest. Mar., Valparaíso, 35(2): 63-69.
- **Asensi, AO.** (1973). "El ciclo de vida del alga marina *Lessonia fuscescens* Bory (Phaeophyta, Laminariales)". Darwiniana. 18: 162-172.
- **Bold, HC. y Wynne MJ.** (1985). "Introduction to the Algae". Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, Second Edition, USA, 720 pp.

- **Callejas Jiménez, ME.** (2007). “Caracterización de *Eisenia arborea* Areschoug, 1876 (Laminariales, Phaeophyta) en tres diferentes sustratos dentro de la Bahía San Quintín, Baja California, México”. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, México, 46 pp.
- **Corona Grajales, R.** (1985). “Estudio de la producción de *Macrocystis pyrifera* en la costa noroccidental de Baja California”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, México, 57 pp.
- **Shults, TC. y Herbst, CC.** (1938). “The life history of *Eisenia arborea*”. American Journal of Botany. 25: 494 – 498.
- **García Esquivel Z.** (2004). “Potencial ostrícola del brazo oeste de Bahía San Quintín: Biomasa actual y estimación preliminar de la capacidad de carga”. Ciencias Marinas, 30(1A): 71–84.
- **Graham, MH.** (2000). “Planktonic patterns and processes in the giant kelp *Macrocystis pyrifera*”. Dissertation degree Doctor of philosophy in Oceanography. 160 pp.
- **Hollenberg, GJ.** (1939). “Culture studies of marine algae. I. *Eisenia arborea*”. American Journal of Botany. 26: 34-41.
- **INP.** (2006) “Sustentabilidad y Pesca Responsable en México, Evaluación y Manejo”. Instituto Nacional de la Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México, 219-241 pp.

- **Ladah, LB.** (2000). "Historia de vida de *Macrocystis pyrifera* en su límite sur de distribución en el Hemisferio Norte: estrategias de supervivencia". Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, México, 139 pp.
- **Lee JA.** (1984). "Growth and Reproductive Phenology of *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Phaeophyta) at the Southern Limit of its Distribution in the Northwestern Atlantic Ocean". Master of Science Thesis, State University of New York, Stony Brook, 72 pp.
- **Lewis RJ, Jiang BY, Neushul M. y Fei XG.** (1993). "Haploid parthenogenetic sporophytes of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae)". Journal of Phycology 29 (3): 363–369.
- **Lobban CS. y Wynne MJ.** (1981). "Botanical Monographs: The Biology of Seaweeds". Blackwell Scientific Publications. University of California, 786 pp.
- **Lüning K.** (1980). "Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three laminaria species (Phaeophyceae)". Journal of Phycology 16: 1-15.
- **Lüning K.** (1990). "Seaweeds Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology" Wiley Interscience publication. USA, 527 pp.
- **McCarthy Ramírez RG.** (1988). "Crecimiento de *Gigartina canaliculata* Harv. en dos artes de cultivo, en la región de San Quintín. B. C.". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, México. 33 pp.

- **Matson PG. y Edwards MS.** (2007). "Effects of ocean temperature on the southern range limits of two understory kelps, *Pterygophora californica* and *Eisenia arborea*, at multiple life-stages". *Marine Biology*, 45: 297-309.
- **Matson PG y Edwards MS.** (2006). "Latitudinal variation in stipe hollowing in *Eisenia arborea* (Phaeophyceae, Laminariales)". *Phycologia* Volume 45 (3): 343–348.
- **Montes Hugo MA y Álvarez Borrego S.** (2005). "Relaciones empíricas para estimar la atenuación subacuática de PAR en Bahía San Quintín utilizando la profundidad de Secchi y la distancia horizontal de desaparición de objetos". *Ciencias Marinas*, 31(4): 685–695.
- **Nelson WA.** (2005). "Life history and growth in culture of the endemic New Zealand kelp *Lessonia variegata* J. Agardh in response to differing regimes of temperature, photoperiod and light". *Journal of Applied Phycology* 17: 23-28.
- **Ortiz Hernández, Camacho Ibar VF., Carriquiry JD., Ibarra Obando SE y Daesslé LW.** (2004). "Contribución de la resuspensión de sedimentos a los flujos no conservativos de fósforo inorgánico disuelto en Bahía San Quintín, Baja California: Una estimación experimental". *Ciencias Marinas*, 30(1A): 85–98.

- **Serviere Zaragoza, E., Gómez López, D y Ponce Díaz, G. (2002).** “Gross chemical composition of three common macroalgae and a sea grass on the Pacific coast of Baja California, Mexico”. *Hidrobiológica* 12 (2): 113-118.
- **Shoji Kawashima. (1993).** “Cultivation of the Brown Alga, *Laminaria* “Kombu”. *Seaweed cultivation and Marine Ranching*. First Edition. Yokusoku, Japan, 25-40 pp.
- **Rodríguez Cardoso, L. (2007).** “Valoración económica de las surgencias en bahía San Quintín, Baja California”. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, México, 74 pp.
- **Ward DH. et al. (2004).** “Uso de videografía multiespectral digital para evaluar la distribución del pasto marino en Bahía San Quintín, Baja California, México”. *Ciencias Marinas*, 30(1A): 57–70 pp.
- <http://www.algaebase.org>