

## SOBRE EL CICLO BIOLÓGICO DE *GIFFORDIA MITCHELLAE* (HARVEY) HAMEL (PHAEOPHYTA, ECTOCARPACEAE)\*

Por SUSANA M. CABRERA \*\*

### ABSTRACT

The behaviour of *Giffordia mitchellae* from Miramar (Buenos Aires Province) was studied in culture using natural seawater media and Erdschreiber's media. The plants from the natural habit carried meiospores which germinated out of the meiosporangia after swarming for some time. The plants from culture were smaller and they also formed meiosporangia, but the meiospores germinated outside and inside the sporangia in the same plants. No fusion was observed in any case.

### INTRODUCCIÓN

*Giffordia mitchelleae* (Harvey) Hamel (11, p. XIV) es una especie de amplia distribución en los mares cálidos y templados de ambos hemisferios. Ha sido hallada en el mar Mediterráneo (11), en el Atlántico Oriental desde Gran Bretaña (2, 4, 19) hasta las Islas Canarias (3); en el Océano Pacífico al sur de California (23, 26) y en la Isla Juan Fernández (16), siendo la ectocarpacea más común en la costa sur de Australia (31). En el litoral atlántico americano ha sido encontrada desde Massachusetts (7, 9) e Islas Bermudas (8), hasta Brasil (13, 14, 28). No ha sido, hasta el momento, citada para la República Argentina.

\* Trabajo realizado en la División Plantas Celulares de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, de la Universidad Nacional de La Plata.

\*\* Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Plantas Celulares; becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

El género *Giffordia* fue establecido por Batters (1) en el año 1893 basándose exclusivamente en la heterogamia de *Ectocarpus secundus* Kütz. y otras especies allegadas. Sauvageau (24, p. 265) en 1896 niega la validez del nuevo género considerando que su separación de *Ectocarpus* es prematura, pero más tarde Hamel (12, p. 66), en 1939, restablece el género *Giffordia* separándolo de *Ectocarpus* en base a la forma de sus cromatóforos, por el aspecto y la distribución de sus órganos de reproducción que son sésiles, por la variedad morfológica de los esporangios puriloculares, y por su heterogamia. Incluye en este género (11, 12) los *Ectocarpi granulosi* (*Giffordia secunda*, *Giffordia granulosa*, *Giffordia hincksiae*); los *Ectocarpi virescentes* (*Giffordia mitchellae* = *Ectocarpus virescens*) y los *Ectocarpi elegantes* (*Giffordia sandriana* = *Ectocarpus elegans*).

*Giffordia mitchellae* fue descripta como *Ectocarpus mitchellae* Harvey (= *Ectocarpus virescens* Thuret) (1)) y Sauvageau (25) estudió detalladamente la biología de esta especie, dando una minuciosa descripción de la planta y en particular de sus dos tipos de esporangios pluriloculares, denominándolos *meiosporangios* y *megasporangios*.

Según Sauvageau, los meiosporangios, más frecuentes, son sésiles, cilíndricos, de color amarillento pálido, con el extremo a veces algo obtuso, de 90-155  $\mu$  de largo (los más comunes de 100-115  $\mu$ ) y 20-24  $\mu$  de diámetro. Poseen lóculos de 6-7  $\mu$  de altura por 6-15  $\mu$  de ancho. Las meiosporas son alargadas, con dos flagelos casi iguales insertos cerca del extremo apical, estigma rojizo poco visible, y pequeños feoplastos discoides situados en la parte posterior. Sus dimensiones son de 16-23  $\mu$  de largo por 6-8  $\mu$  de diámetro. Se mueven rápidamente y germinan sin copulación.

Los megasporangios menos frecuentes, también son sésiles, de igual forma que los meiosporangios, y su color es más intenso. Tienen de 100-150  $\mu$  de largo y 25-30  $\mu$  de diámetro. Poseen menor número de lóculos que los anteriores, y su altura es de 10-17  $\mu$ . Producen megasporas de 26  $\times$  13  $\mu$ , con numerosos feoplastos discoides, dos flagelos cortos y sin estigma. Se mueven muy lentamente o permanecen inmóviles, germinando cerca del esporangio sin copulación.

Las plántulas que nacen de meio- o megasporas son idénticas y semejantes a las que crecen en el medio natural, pero la planta originada de una megaspora llevará únicamente megasporangios, y la originada de una meiospora llevará únicamente meiosporangios.

Tiempo después Sauvageau (11) describió los esporangios uniloculares encontrados en una planta epífita sobre *Codium tomentosum*. Los mismos son sésiles, oblongos, de 60-80  $\mu$  de largo por 25-45  $\mu$  de ancho. Producen zoosporas de 16-35  $\mu$  de largo, con numerosos feoplastos, y germinan originando plantas que llevarán simultáneamente meios- y megasporangios (1).

Svedelius (27) estudió cariológicamente los dos tipos de esporangios pluriloculares observando que no hay reducción cromática en los meiosporangios ni en los megasporangios, y que su número de cromosomas es el mismo. Este hecho demuestra la pérdida total de sexualidad de la especie (6, 11, 27), quedando su reproducción restringida a la apogamia (2).

#### MATERIAL Y MÉTODO

El material estudiado durante el desarrollo de este trabajo fue coleccionado en la localidad de Miramar, Provincia de Buenos Aires, Argentina [LP(C) N° 1079], en el mes de junio de 1969. Se encontraron pocos ejemplares en el borde de una poza de marea, en la zona mesolitoral sobre toska.

Son plantas de aproximadamente 2 cm. de altura, color pardo-verdoso, arraigadas al sustrato por medio de rizoides. Los filamentos erectos se encuentran laxamente entrelazados entre sí, y poseen abundantes ramificaciones alternas y unilaterales en la parte superior del talo (Lám. III, fig. 1), las cuales se afinan hacia el ápice en forma de pelos incoloros o apenas pigmentados, y con el extremo romo o algo puntiagudo. El crecimiento es predominantemente intercalar (Lám. I, fig. 2). Los ejes principales poseen células de 34-46  $\mu$  de diámetro y con un largo de 2-3 veces su diámetro. Los feoplastos son abundantes, parietales, discoides o en forma de cortas banditas irregulares, de aproximadamente 3,5  $\mu$  de diámetro, siendo su largo de hasta 2 veces su diámetro. Los mismos llevan 1-2 pirenoides (5, 15, 22) los cuales poseen una cabeza vesicular subesférica y refringente, y un pie mediante el cual se adhieren al plástido determinando en la zona de adhesión un área incolora. El citoplasma es perinuclear y parietal, encontrándose enormes vacuolas entre los filamentos citoplasmáticos (Lám. I, fig. 1). Las estructuras citológicas se evidenciaron mediante coloraciones vitales con azul de metileno y rojo neutro.

- (1) SAUVAGEAU, C. 1933. Sur quelques Algues phéosporées de Guéthary. *Bull. St. Biol. d'Arcachon*, 30. Bordeaux.
- (2) Poco tiempo después que este trabajo fuera entregado a la imprenta la autora recibió una reciente publicación de D. G. Müller (*Anisogamy in Giffordia (Ectocarpales)*). *Die Naturwissenschaften*, Heft. 4, S. 220. 1969). Dicho autor cultivó esta especie en laboratorio obteniendo plantas que llevaban simultáneamente gametangios masculinos y femeninos, diferentes por el tamaño de sus lóculos. De acuerdo a estos caracteres afirma categóricamente que se trata de una especie monoica y anisogámica. Pudo observar claramente la copulación entre gametas de diferente sexo, resultando de la misma una cigota, la cual origina una planta que lleva exclusivamente órganos de reproducción pluriloculares, con grandes lóculos. Realizó además recuentos cromosómicos los cuales demostraron que el gametofito es haploide, y la planta originada de la cigota es diploide.

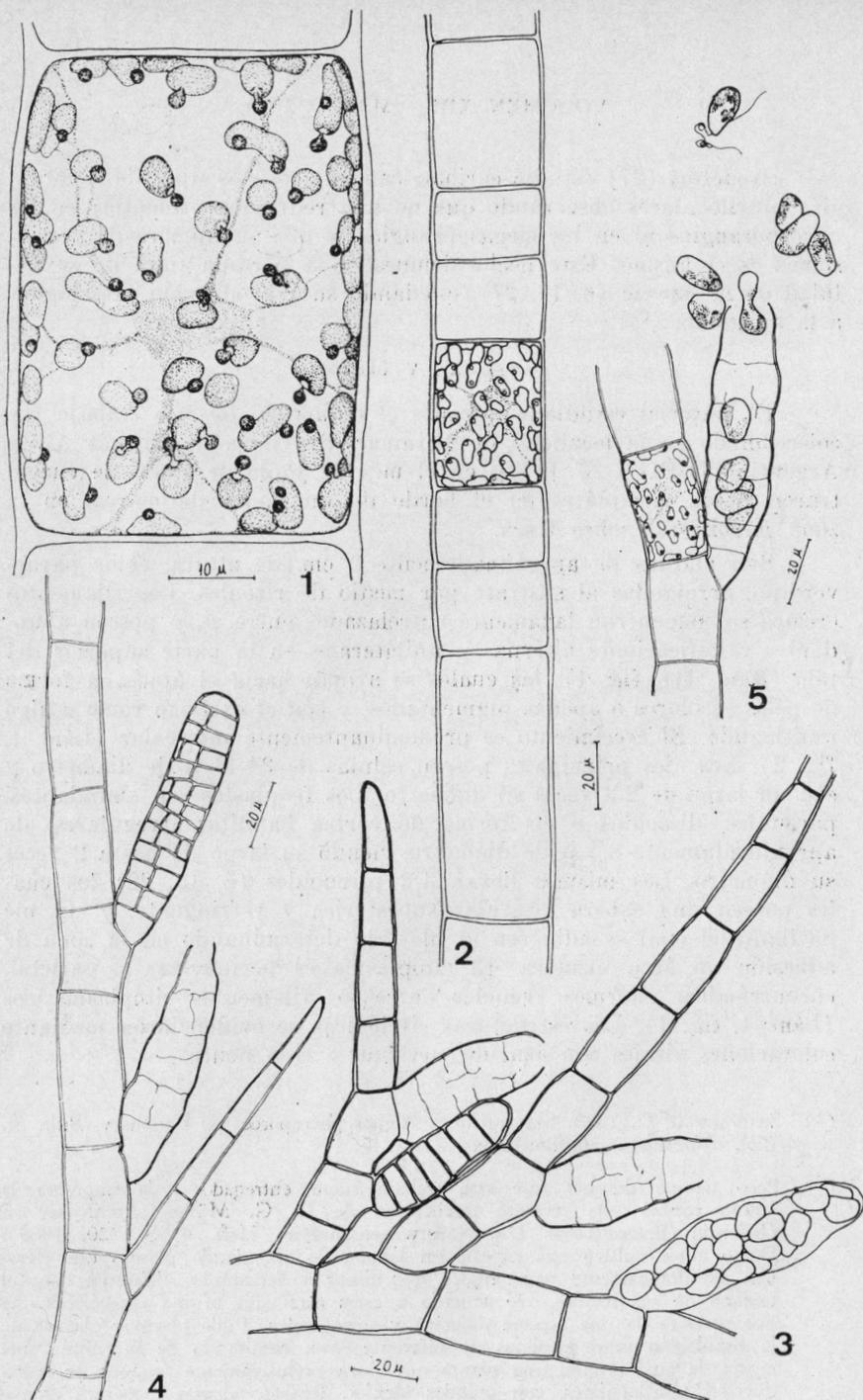


LÁMINA I: Fig. 1. Detalle de célula de eje principal, con feoplastos discoides que llevan pirenoides, y citoplasma perinuclear y parietal, en planta proveniente del medio natural. Fig. 2: Detalle de crecimiento intercalar, en planta proveniente del medio natural. Fig. 3: Aspecto y situación de diferentes ramificaciones y esporangios en planta proveniente del medio natural. Fig. 4: Aspecto y situación de esporangios y ramificación en planta proveniente de cultivo. Fig. 5: Aspecto de un esporangio en eclosión y de esporas de una planta proveniente de cultivos.

No se encontraron órganos de reproducción uniloculares, pero sí esporangios pluriloculares abundantes, sésiles, laterales y predominantemente seriados en las ramificaciones superiores (Lám. I, fig. 3; Lám. II, fig. 1; Lám. III, fig. 2), más o menos cilíndricos con el extremo obtuso, o ligeramente ovalados, de 80-100  $\mu$  de largo por 22-6  $\mu$  de diámetro, divididos en lóculos de aproximadamente 4,5-7  $\mu$  de altura. Los esporangios maduros llevan numerosas zoosporas, se encuentran algo deformados por la presión de las mismas, y los tabiques internos son difícilmente observables. Sin embargo en los esporangios vacíos se observan claramente, sobre todo los restos de septos transversales (Lám. I, fig. 3; Lám. II, figs. 2 y 5; Lám. III, fig. 2). Las zoosporas son liberadas al romperse la pared del extremo distal del esporangio por donde salen en masa aproximadamente la mitad de ellas. El resto se desliza con mayor lentitud hacia el exterior desplazándose por medio de movimientos de tipo ameboidal (Lám. II, fig. 3). Una vez fuera del esporangio, las esporas permanecen inmóviles por unos segundos, siendo bien visible el estigma de color anaranjado fuerte, el cual a veces se evidencia antes de que las esporas salgan del esporangio. Inmediatamente se observan los flagelos, en número de dos, insertos lateralmente en posición anterior y próximos al estigma. Durante la emisión de los flagelos las esporas vibran lentamente, luego comienzan a agitarse y por último se desplazan rápidamente en todas direcciones. No se observó en ellas fototropismo. El período de movilidad dura de 10-20 minutos, luego se inmovilizan, pierden los flagelos y poco después comienzan a germinar.

Las zoosporas en movimiento son más o menos piriformes, algo alargadas, y poseen varios feoplastos discoides o en cortas bandas, sin pirenoides, situados en las dos terceras partes posteriores de la célula, siendo la parte anterior incolora. Miden de 6-9  $\mu$  de diámetro y 14-23  $\mu$  de largo (Lám. II, fig. 3).

Una planta fértil, repleta de esporangios maduros a punto de eclosión fue repetidamente lavada y colocada en una cápsula de petri, con agua de mar filtrada y esterilizada, durante cuatro horas. Luego se pipeteó una alícuota del líquido de la cápsula observándose al microscopio que la misma estaba saturada de zoosporas en movimiento.

Se preparó una serie de doce tubos de ensayo conteniendo cada uno 10 ml. de agua de mar proveniente del lugar de origen de la planta, filtrada y esterilizada en autoclave a 1 atm. de presión durante 20 minutos, con un pH inicial = 6.5-7. A cada tubo se le agregaron 0,5 ml. del agua de la cápsula saturada de zoosporas en movimiento, se colocó un tapón de algodón y se situaron en una gradilla junto a una ventana orientada al SE. a la temperatura ambiente del laboratorio (15-20°C). El medio se renovó cada 7 días, realizándose observaciones con los mismos intervalos.

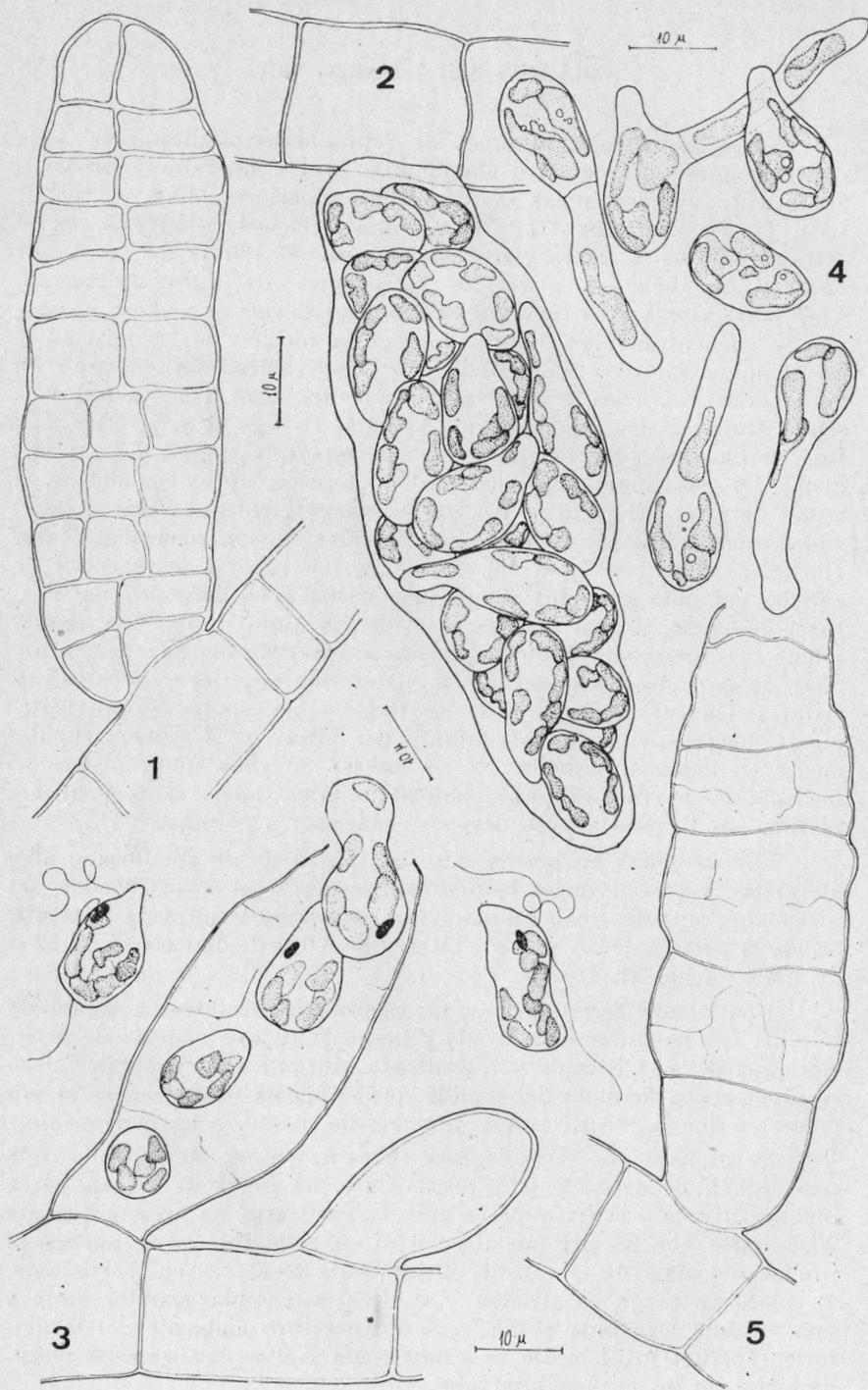


LÁMINA II (Planta proveniente del medio natural): Fig. 1: Esporangio con numerosos lóculos. Fig. 2: Esporangio maduro con esporas. Fig. 3: Esporangio en eclosión y detalle de zoosporas. Fig. 4: Esporas germinando. Fig. 5: Esporangio vacío con restos de septos internos.

A los 28 días había desarrollo bien evidente y las nuevas plantas alcanzaban aproximadamente 1-2 mm. de altura.

Por otra parte, se realizó el aislamiento clásico de las zoosporas, colocando una porción fértil del talo en una gota de agua de mar estéril sobre portaobjeto en cámara húmeda durante 2 horas, para permitir que las zoosporas se fijaran a la superficie del vidrio. Luego de retirar el talo adulto se lavó el portaobjetos dejando correr agua de mar estéril sobre ambas superficies del mismo a fin de eliminar todas las impurezas. Se preparó de esta manera una serie de 20 porta-objetos la cual se colocó en una bandeja conteniendo medio de Erdschreiber con pH inicial = 7,5. El medio de cultivo consistía en (21):

agua de mar .....	1000	ml.
extracto de suelo .....	50	ml.
NO <sub>3</sub> Na. ....	0,1	g.
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .....	0,02	g.

A la bandeja se conectaron dos bocas de un aereador de uso común en acuarios, y la misma se colocó también junto a una ventana orientada al SE., a temperatura ambiente del laboratorio.

Mediante este procedimiento sólo pudieron observarse los estadios iniciales de la germinación de las esporas (Lám. II, fig. 4) pues pocos días más tarde un desarrollo excesivo de bacterios frenó por completo el crecimiento de las plántulas.

Las esporas comienzan a germinar 2-3 horas después de haberse fijado, pudiendo observarse 24 horas más tarde la formación de uno o más tabiques en el filamento inicial, el cual originará el sistema rastrero de la planta.

Las plántulas obtenidas en los tubos de ensayo fueron a los 40 días cuidadosamente lavadas y trasladadas a un erlenmeyer de 125 ml. conteniendo agua de mar estéril proveniente del lugar de origen de la planta, con un pH. inicial = 6,5-7. Se conectó al mismo una boca de un aereador, se cerró con tapón de algodón y se colocó junto a una ventana orientada al SE. a temperatura ambiente del laboratorio (15-20°C). En este momento las nuevas plantas desarrolladas poseían un filamento rastrero bien evidente, del que surgían filamentos de tipo rizoidal mediante los cuales se adherían al vidrio, y filamentos erectos poco o nada ramificados, con crecimiento intercalar bien evidente.

Quince días más tarde, completando un total de 55 días desde la siembra de zoosporas, las nuevas plantas habían alcanzado una altura de 0,5-0.7 cm. y estaban fértiles.

## RESULTADOS

Las plantas obtenidas en cultivo son muy semejantes a las que se encontraron en el medio natural, diferenciándose de las mismas por su tamaño menor y por ser menos ramificadas. Su aspecto puede atribuirse en gran parte a la pobreza del medio en que se desarrollaron (agua de mar estéril) y a los factores ambientales tan variables a que estuvieron sometidas debido a la precariedad de los elementos de trabajo.

En general se repiten en ellas las mismas estructuras de las plantas originales (Lám. I, figs. 4 y 5). Los ejes principales están apenas entrelazados entre sí, y poseen células de 20-30  $\mu$  de diámetro por 65-90  $\mu$  de largo. Las mismas llevan feoplastos discoides o en cortas bandas, con 1-2 pirenoides cada uno, en los cuales se repite la misma estructura que en los de los feoplastos de las plantas originales. Las ramificaciones son escasas, alternas, volviéndose unilaterales en los ápices de la planta, y adelgazándose hacia los extremos en forma de pelos incoloros o poco pigmentados.

Llevan esporangios pluriloculares abundantes, sésiles, principalmente seriados, pero también aislados, de forma cilíndrica con el extremo obtuso, o algo ovalados, de 90-155  $\mu$  de largo, por 20-30  $\mu$  de diámetro, con lóculos pequeños de aproximadamente 4.5-7.4  $\mu$  de altura (Lám. I, fig. 4).

En los esporangios pudieron observarse dos procesos simultáneos: a- Las esporas son liberadas por rotura del extremo apical de la pared del esporangio, de igual forma que en la planta original (Lám. I, fig. 5) Las mismas poseen varios feoplastos discoides en la zona posterior de la célula, dos flagelos con inserción lateral, estigma color anaranjado fuerte próximo al punto de inserción de los flagelos, y contorno piriforme, algo alargado, de aproximadamente 13-16  $\mu$  de largo por 8-9  $\mu$  de diámetro. Una vez liberadas del esporangio se desplazan rápidamente en todas direcciones, fijándose luego y germinando como en la planta original (Lám. III, fig. 5).

b- Las esporas permanecen dentro del esporangio y comienzan a germinar en él, separándose luego toda la masa de plántulas de la ramificación que había originado al esporangio y continuando su desarrollo conjuntamente (Lám. III, figs. 3 y 4).

La germinación de esporas dentro del esporangio había sido observada para esta especie (27, 6 p. 134), tratándose siempre de megasporas.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a las características de las zoosporas: *forma alargada, dimensiones pequeñas, presencia de estigma, feoplastos discoides posteriores, extremo anterior incoloro, movimiento activo de desplaza-*

miento; y de los lóculos del esporangio: *número elevado, tamaño pequeño*, puede deducirse que los ejemplares provenientes de Miramar son plantas masculinas, las cuales llevan meiosporangios con meospo-

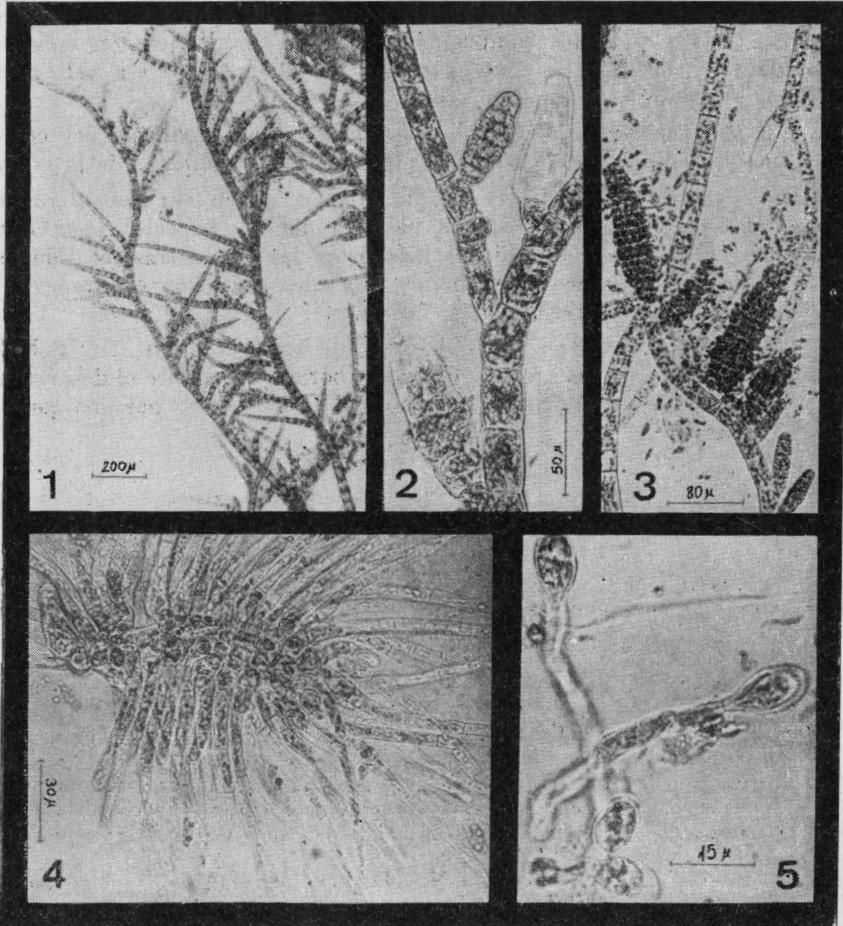


LÁMINA III: Fig. 1: Aspecto general de una planta proveniente del medio natural. Fig. 2: Detalle de esporangios en tres estadios diferentes de la misma planta. Fig. 3: Aspecto de diferentes estadios en los esporangios de una planta proveniente de cultivo. Nótese esporangio vacío, esporangios jóvenes y esporangios maduros con esporas germinando en su interior. Fig. 4: Masa de plántulas desarrollándose desde adentro de un esporangio formado en planta proveniente de cultivo. Fig. 5: Esporas de una planta proveniente de cultivo germinando normalmente.

ras que germinan sin copulación. Estas últimas originan nuevas plantas masculinas, que llevan a su vez meiosporangios con meioisporas.

Las meiosporas provenientes de las plantas de cultivo pueden comportarse como las de las plantas del medio natural, o bien germinar directamente dentro del esporangio, como ya ha sido observado para las megasporas. Los dos comportamientos son simultáneos en la misma planta y los factores que provocan los mismos no han sido aún investigados. En ningún caso existe copulación.

Estas son las primeras observaciones que se realizan del comportamiento en cultivo de *Giffordia mitchellae* proveniente de la costa Atlántica de América del Sur. Las mismas deben ser consideradas como un aporte al estudio de la biología de esta especie, hasta que cultivos realizados en condiciones más propicias y en otras localidades a lo largo del Atlántico puedan dar una idea más completa sobre el ciclo de vida de la misma.

La autora agradece a su director de trabajo, Prof. Dr. Sebastián A. Guarrera, su constante guía y colaboración durante el desarrollo de estos estudios, y al Prof. Dr. George F. Papenfuss, por sus consejos y atención.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. BATTERS, E. A. L., 1893. On the necessity for removing *Ectocarpus secundus* Kütz. to a new genus. *Grevillea*, 21:85-86.
2. —, 1902. A catalogue of the British marine algae. *Jour. Bot.*, London, 4 (supl.): 1-107.
3. BÖRGENSEN, F., 1926. Marine Algae from the Canary Islands. II. Phaeophyceae. *Det. Kgl. Danske Vidensk. Selskab. Biol. Med.*, 6(2): 1-112.
4. BORNET, M. E., 1892. Les Algues de P. K. A. Schousboe. *Mém. Soc. Nat. Sc. Nat. et Math. de Cherbourg*, 28: 165-376.
5. CHADEFAUD, M., 1960. Les Végétaux non Vasculaires en CHADEFAUD, M. y L. EMBERGER, *Traité de Botanique Systematique. I. Masson y Cie. Ed., Paris.*
6. CHAPMAN, V. J., 1941. An Introduction to the Study of the Algae. *The Macmillan Company. New York.*
7. COLLINS, F. S., 1891. Notes on New England Marine Algae. V. *Bull. Torrey Bot. Club*, 18: 335-341.
8. COLLINS, F. S. y A. B. HERVEY, 1917. The Algae of Bermuda. *Proc. American Acad. Arts and Sc.*, 53(1): 1-195.
9. DE TONI, J. B., 1895. *Sylloge Algarum. III. Fucoideae.*
10. FRITSCH, F. E., 1965. The Structure and Reproduction of the Algae. II. *Cambridge University Press.*
11. HAMEL, G., 1931-39. *Phéophycées de France. Paris.*
12. —, 1939. Sur la classification des Ectocarpales. *Botaniska Notiser*, 1: 65-70.
13. JOLY, A. B., 1957. Contribuição ao Conhecimento da Flora Ficologica Marinha da Baía de Santos e Arredores. *Bol. Univ. Sao Paulo, Fac. Fil., Cs. e Letras, Bot.* 14.

14. —, 1965. Flora Marinha do Litoral Norte do Estado de Sao Paulo e Regioes Circunvizinhas. *Bol. Univ. Sao Paulo, Fac. Fil., Cs. e Letras, Bot.* 21.
15. KLEIN, R. M. y A. CRONQUIST, 1967. A consideration of the evolutionary and taxonomic significance of some biochemical, micromorphological, and physiological characters in the Thallophytes. *The Quarterly Review of Biology*, 42 (2): 105-296.
16. LEVRING, T., 1960. Contributions to the Marine Algal Flora of Chile. *Lunds Univ. Arsskr. N. F. Avd. 2*, 56(10): 1-83.
17. MÜLLER, D. G., 1966. Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* aus Neapel. *Planta*, 68(1): 57-68.
18. MÜLLER, D. G., 1967. Generationswechsel, Kernphasenwechsel und Sexualität der Braunalge *Ectocarpus siliculosus* im Kulturversuch. *Planta*, 75(1): 39-54.
19. NEWTON, L., 1931. A Handbook of the British Seaweeds. *London*.
20. OLTAMANN, F., 1923. Morphologie und Biologie der Algen. III. *Jena-Verlag von Gustav Fischer*.
21. PAPPENFUSS, G. F., 1950. Culturing of Marine Algae in Relation to Problems in Morphologie, en *The Culturing of Algae, A Symposium*, p. 77-95. Published by The Charles F. Ketterin Foundation.
22. —, 1951. Phaeophyta, en G. M. SMITH Edit. *Manual of Phycology. A New Series of Plant Science Books*, 28.
23. SAUNDERS, D. A., 1898. Phycological Memoirs. *Proc. Calif. Acad. Sc., Eer.* 3, *Bot.*, 1(4): 147-168. *San Francisco*.
24. SAUVAGEAU, C., 1896. Remarques sur la Reproduction des Phéosporées et en Particulier des *Ectocarpus*. *Ann. Sc. Nat. Bot. Ser.* 8, 2: 223-274.
25. —, 1896. Sur l'*Ectocarpus virescens* Thuret, et ses deux sortes de sporanges pluriloculaires. *Jour de Bot.*, 10: 98-107 y 113-126.
26. SETCHELL, W. A. y N. L. GARDNER, 1925. The marine algae of the Pacific Coast of North America. III. Melanophyceae. *Univ. Calif. Publ. Bot.*, 8(3): 383-898.
27. SVEDELIUS, N., 1928. On the number of chromosomes in the two different kinds of plurilocular sporangia of *E. virescens*. *Svensk. Bot. Tidskrift*, 22: 289-304.
28. TAYLOR, W. R., 1960. Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coast of the Americas. *Univ. Michigan Studies, Sc. Ser.*, 21. 870 págs.
29. —, 1962. Marine Algae from the Tropical Atlantic Ocean. V. Algae from the Lesser Antilles. *Contr. U. S. Nat. Herb.*, 36(2): 43-62.
30. WEST, J. A., 1967. *Pylaiella littoralis* f. *rupicola* from Washington: the life history in Culture. *Jour. Phycology*, 3(3): 150-153.
31. WOMERSLEY, H. B. S., 1967. A critical survey of the marine algae of Southern Australia. II. Phaeophyta. *Aust. Jour. Bot.*, 15(2): 189-270.
32. WYNNE, M. J., 1969. Life History and Systematic Studies of some Pacific North American Phaeophyceae (Brown Algae). *Univ. Calif. Publ. Bot.*, 50: 1-62.