

## Tesis de Licenciatura

# Influencia del KNO<sub>3</sub>, el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y el Cl<sub>2</sub>Ca sobre el crecimiento y la regulación nutricional de la reproducción sexual en *Oedogonium stellatum* Wittr : (Oedogoniales, Chlorophyta)

Pereira, Susana

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pereira, Susana. (). Influencia del KNO<sub>3</sub>, el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y el Cl<sub>2</sub>Ca sobre el crecimiento y la regulación nutricional de la reproducción sexual en *Oedogonium stellatum* Wittr : (Oedogoniales, Chlorophyta). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000684\\_Pereira](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000684_Pereira)

Cita tipo Chicago:

Pereira, Susana. "Influencia del KNO<sub>3</sub>, el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y el Cl<sub>2</sub>Ca sobre el crecimiento y la regulación nutricional de la reproducción sexual en *Oedogonium stellatum* Wittr : (Oedogoniales, Chlorophyta)". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000684\\_Pereira](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000684_Pereira)

**EXACTAS**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesis de Licenciatura



Autora: Susana Pereira

Director: Dr. Carlos Guillermo Vélez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ficología y  
Cultivo Experimental de Microalgas.

Nº 0684

Diciembre de 1998

A mis papás, Edith y Luis,  
por su compañía y su apoyo  
constante; a mi futuro esposo  
Jose, por la paz que me  
inspira en los momentos más  
difíciles...

## ÍNDICE

### RESUMEN

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

OBJETIVOS.....	5
----------------	---

### GENERALIDADES ACERCA DE LAS OEDOGONIALES

Ubicación sistemática.....	7
Porción vegetativa y división celular.....	7
Reproducción.....	9
Regulación hormonal.....	10
Carácteres utilizados en la determinación taxonómica.....	12

### MATERIALES Y MÉTODOS

Elección y tratamiento de la cepa seleccionada.....	13
Método de cuantificación del crecimiento y la inducción de la reproducción sexual.....	14
Obtención del inóculo y preparación de los medios de cultivo definidos.....	15
Influencia del nitrógeno, el fósforo y el cloruro de calcio sobre el crecimiento y inducción de la reproducción sexual.....	17

### RESULTADOS

Validación del método de recuento celular.....	20
Crecimiento y reproducción sexual.....	20
Influencia del $KNO_3$ .....	20
Influencia del $KH_2PO_4$ .....	21
Influencia del $Cl_2Ca$ .....	22
Otros aspectos morfológicos.....	23

### DISCUSIÓN

Método de recuento celular.....	25
Estudios nutricionales.....	26
Influencia del $KNO_3$ .....	26
Influencia de $KH_2PO_4$ .....	29
Influencia del $Cl_2Ca$ .....	32
Aspectos morfológicos y regulatorios.....	35

CONCLUSIONES.....	38
-------------------	----

AGRADECIMIENTOS.....	40
----------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
---------------------------------	----

### FIGURAS

### TABLAS

## RESUMEN

A partir del estudio en cultivo del efecto de distintas concentraciones del  $\text{KNO}_3$ , el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  sobre procesos vegetativos y reproductivos, se analizó la influencia de estos nutrientes sobre aspectos funcionales y morfológicos del alga filamentosa *Oedogonium stellatum*. Como variable de respuesta se contó el número de células vegetativas y reproductivas producidas en cada cultivo. Para ello, se diseñó y validó un método de recuento *ad hoc* que permite evaluar el número total de células vegetativas y reproductivas producidas en cada cultivo, lo cual no resulta sencillo en algas filamentosas.

Los resultados mostraron que el modelo tradicional de crecimiento en cultivo de microalgas que proliferan en suspensión, no puede ser aplicado en forma directa a la especie estudiada, por tratarse de organismos estructural y funcionalmente multicelulares. Esto se vio reflejado en la relación existente entre la eficiencia en la formación de oogonios (mediada por un proceso de translocación de metabolitos desde las células vegetativas) y el estado fisiológico de los filamentos, el cual se definiría en una fase inicial de crecimiento vegetativo, de acuerdo con la composición del medio. Según ésto, se propone que algunas especies de *Oedogonium* podrían resultar organismos modelo sencillos, para la comprensión de la regulación de mecanismos de translocación en las plantas verdes. Las dinámicas de utilización y los efectos fisiológicos de los nutrientes estudiados (análogos a los de las plantas superiores), refuerzan esta propuesta.

También se evaluó la regulación nutricional de distintos aspectos de la integración hormonal de la reproducción sexual, concluyéndose que el complejo esquema surgido de estudios previos podría presentar variantes, en concordancia con la gran diversidad de formas que presenta el género.

El adelgazamiento y decoloración apical de los filamentos en bajos niveles de N, sugiere que dicha modificación podría constituir una especialización morfológico-funcional para aumentar la eficiencia en la captación de este nutriente, como ha sido registrado para otras algas.

Finalmente, se observó una influencia de las condiciones nutricionales sobre caracteres morfológicos con valor taxonómico, principalmente el tamaño de los oogonios y el número de estructuras sexuales en serie. En el presente trabajo se pone en duda la validez diagnóstica de dichos caracteres.

## INTRODUCCION

El estudio de las algas en condiciones controladas de cultivo, es una herramienta fundamental para el conocimiento de diversos aspectos de su biología. Las técnicas de cultivo han permitido establecer variabilidad morfológica, fisiológica y bioquímica de muchas especies algales. También son importantes en estudios taxonómicos, haciendo posible dilucidar complejos ciclos de vida, obtener materiales para estudios de ultraestructura, de caracterización a nivel bioquímico (quimiotaxonomía), y se han vuelto de vital importancia para la realización de análisis filogenéticos basados en el estudio de la evolución de las moléculas mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (Alveal, *et al.*, 1995; Battacharya, 1997).

Desde el punto de vista aplicado, el cultivo de algunas especies de algas se ha constituido en empresas florecientes en distintas regiones del planeta, tanto en lo que respecta a las macroalgas como a las microalgas (Alveal, *et al.*, 1995; Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Esta posibilidad que brindan los estudios en cultivo de manejar a voluntad el ciclo de vida de algunas algas, no sólo es útil para el estudio de su biología, sino que también es una herramienta interesante para estudios de tipo aplicado. Así, la obtención de cantidades manejables de un determinado tipo celular (zoosporas, esporas de resistencia, gametas, cigotas, etc.) permite analizar su composición en busca, por ejemplo, de sustancias de interés económico propias de cada estadio (pigmentos, ácidos grasos, sustancias biológicamente activas, etc.) (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Otro aspecto de interés del estudio de las algas en cultivo, particularmente las Chlorophyta, es su utilidad como organismos modelo en biología molecular, genética, bioquímica, biología celular y del desarrollo, etc., debido principalmente a sus requerimientos simples para el crecimiento, sus altas tasas de crecimiento, la posibilidad de sincronizar sus ciclos celulares, y su similitud fisiológica con las plantas terrestres

arquegoniadas. Algunos ejemplos destacables son las unicelulares *Chlamydomonas* (genética, biología celular y molecular, e investigaciones sobre fotosíntesis), *Dunaliella* (osmorregulación, producción comercial de glicerol y carotenos) y *Chlorella* (fisiología y productividad en plantas, alimentos de salud), la colonial *Volvox* (biología celular y del desarrollo, bioquímica); la Prasinophyceae *Tetraselmis* (alimento para invertebrados marinos y biología celular); las Charophyceae *Chara* y *Nitella* (estudios biofísicos de membranas y de corrientes citoplasmáticas); las Zygnemetales *Mougeotia* (movimientos del cloroplasto) y *Micrasterias* (morfogénesis y biología del desarrollo); y las Ulvophyceae *Ulva* (ciclos de vida, genética) y *Acetabularia* (biología molecular y del desarrollo, genética) (Melkonian, 1990).

Un aspecto central del trabajo en condiciones de cultivo es el diseño de los medios adecuados para el desarrollo de las distintas especies. Dicho medio deberá poseer diferente composición (o al menos diferente proporción de sus componentes) según el estadio del ciclo de vida que se desee obtener. Así, para lograr altas biomassas o estudiar la citocinesis, deberán optimizarse los niveles de nutrientes de modo que la tasa de división celular sea alta. Otro deberá ser el proceder si el objetivo es la inducción de estadios reproductivos, ya sea asexuales o sexuales (Venkataraman, 1969).

En lo que respecta a las Oedogoniales, los primeros estudios en laboratorio se realizaron en muestras tomadas de ambientes naturales o artificiales y mantenidas vivas, o bien utilizando medios no definidos, principalmente extracto de suelo, con el objetivo principal de estudiar aspectos generales de su biología reproductiva (Le Clerc, 1817; Cleve, 1863; Juranyi, 1873; Strasburguer, 1880; Klebs, 1896; Scherffel, 1901; Fritsch, 1902a y b, 1904, 1942; Wisselingh, 1908; Tuttle, 1910; Steinecke, 1929; Kretschmer, 1930; Ohashi, 1930; Güssewa, 1931; Mainx, 1931; Tschermak, 1943; Conard, 1947). El desarrollo de medios de cultivo definidos, constituyó un paso fundamental para poder encarar estudios de tipo fisiológico, ya que éstos requieren que se trabaje bajo condiciones controladas. Machlis (1962) fue quien llevó a cabo el primer intento de desarrollar medios definidos que pudieran sustentar el desarrollo de estas algas en condiciones axénicas. En el citado trabajo,

dicho autor concluye que las especies del género *Oedogonium* requieren para crecer normalmente, la adición al medio de cultivo de una cierta dosis de extracto de suelo. Una de las sustancias presentes en dicho extracto y que agregada a los medios definidos mejoraba considerablemente el crecimiento de los cultivos, resultó ser la vitamina B<sub>12</sub>. Sin embargo, la sola adición de esta vitamina no permitía lograr cultivos saludables tal como se obtenían en extracto de suelo puro. A partir del fraccionamiento del extracto de suelo mediante técnicas cromatográficas, y del ensayo del efecto de las distintas fracciones obtenidas, el autor concluye que las especies de *Oedogonium* requieren además, otro factor de crecimiento el cual se libera del suelo cuando éste es autoclavado. La caracterización que hace el autor de dicha sustancia no es completa, pero dadas sus propiedades concluye que se trataría de un ácido orgánico de cadena corta, que en la naturaleza sería producido por actividad bacteriana.

El primer medio definido para el crecimiento y la inducción de la reproducción sexual en una especie de *Oedogonium* (*O. cardiacum*) en condiciones supuestamente axénicas, fue finalmente desarrollado por Hill y Machlis (1970). Este medio estaba basado en los resultados previamente obtenidos por Machlis (1962) y difiere de los medios por él ensayados en la sustitución del EDTA por NTA (ácido nitrilotriacético) como quelante. Sin embargo, estudios posteriores de dicha cepa, mostraron que presentaba una pequeña cantidad de bacterias, que al ser incrementada favorecía el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual (Machlis, 1973). Más tarde, Hill (1980) estudió variaciones de este medio original, trabajando además, con otras dos especies del género (*O. borisianum* y *O. donnelli*). Todos estos trabajos apuntaban no sólo al desarrollo de medios de crecimiento, sino también que permitieran la inducción de la reproducción sexual, con el objetivo final de estudiar los mecanismos regulatorios en ella involucrados. En cuanto a las condiciones necesarias para la inducción de la reproducción sexual, señalan como principal desencadenante (al menos para las tres especies hasta aquí mencionadas) la deficiencia de fuente de nitrógeno.

Posteriormente, Singh y Chaudhary (1988 y 1990), llevan a cabo estudios nutricionales

en *O. hatei*, arribando a la misma conclusión en cuanto a la importancia de la deficiencia de nitrógeno para el desencadenamiento de la reproducción sexual.

Es importante destacar que en el estudio taxonómico de las Oedogoniales, las técnicas de cultivo prácticamente no han sido aplicadas. Recientemente Vélez (1998), utilizó dichas técnicas para el estudio de aspectos poco claros de la taxonomía de estas algas. Este autor, trabajando sobre treinta y dos cepas de veinticuatro taxones de Oedogoniales, logró inducir la reproducción sexual en medios definidos en veintiuna de ellas. Para ello utilizó los medios ensayados por Hill (1980), más una serie de modificaciones propias, concluyendo que el principal factor desencadenante de la reproducción sexual sería efectivamente la deficiencia de nitrógeno, aunque podría haber otros factores involucrados, como deduce a partir de que en muchos casos la sexualidad no pudo ser inducida. Su trabajo revela también un aspecto novedoso de la biología reproductiva de estas algas: en algunas especies la formación de numerosos oogonios en serie ocurre a expensas de la movilización de metabolitos desde las células vegetativas hacia las células formadoras de dichas estructuras sexuales. La similitud funcional de este proceso con la translocación de metabolitos en las plantas superiores es señalada por este autor. Además, desde el punto de vista de la sistemática, el fenómeno pone en duda el valor taxonómico tradicionalmente adjudicado al carácter “número de oogonios en serie”.

Un problema que se presenta en el estudio en cultivo de las algas filamentosas en general, es la cuantificación del crecimiento. El recuento celular, método de uso generalizado cuando se trata de microalgas que crecen en suspensión (unicelulares, organizadas en pequeños agregados, cenobios, colonias, cortos filamentos etc.) (Stein, 1973), no puede ser utilizado en el caso de las algas que, como las Oedogoniales, consisten de largos filamentos. Esto se debe a que crecen formando ovillos o manojos y no una suspensión homogénea de células a partir de la cual se puedan tomar muestras representativas para estimar el número de células por unidad de volumen (Hill y Machlis, 1970).

A partir de las consideraciones de esta introducción, es notoria la necesidad de continuar

con los estudios en cultivo de estas algas, especialmente en lo que concierne a la comprensión de la influencia de las condiciones nutricionales sobre el crecimiento y la reproducción sexual. Estos estudios deberán tener en cuenta un elemento no considerado en las investigaciones previas: la condición de multicelularidad de estos organismos, evidenciada en los procesos de translocación referidos más arriba. También es necesario ahondar en el análisis de la influencia de los nutrientes sobre la integración hormonal de la reproducción sexual, y como generadores de variabilidad morfológica, especialmente de los caracteres con valor taxonómico. La selección del organismo modelo, así como el método de cuantificación de la producción en cultivo, constituyen elementos básicos para poder llevar a cabo esta tarea. De acuerdo con esto, se proponen los objetivos del presente trabajo, según se detallan a continuación.

## OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general aportar al conocimiento de la biología reproductiva de las Oedogoniales, a partir del estudio en condiciones de cultivo de *Oedogonium stellatum* Wittr. Esta especie es nanándrica homotálica, y constituye un tipo reproductivo no estudiado previamente con esta metodología.

La investigación se dirigió específicamente hacia los siguientes tópicos:

- ✓ Desarrollar un método de cuantificación para algas filamentosas que permita valorar, como número de células, tanto el crecimiento en cultivo, como así también el éxito de la reproducción sexual.
- ✓ Analizar la influencia de la concentración de nitrógeno, nutriente cuya deficiencia induce la gametogénesis (Vélez, 1998), sobre el crecimiento y los niveles de actividad sexual.
- ✓ Estudiar la influencia de la concentración del fósforo y del calcio (por separado) sobre el crecimiento y los niveles de actividad sexual, en cultivos inducidos a reproducirse sexualmente por deficiencia de nitrógeno.

Sobre los materiales obtenidos en los medios ensayados se analizarán también:

- ✓ Las variaciones morfológicas de las células vegetativas y de los oogonios, con especial énfasis en el efecto del calcio, dada su importancia en los procesos de síntesis y morfogénesis de la pared celular (Dalessandro y Piro, 1993).
- ✓ Aspectos concernientes a la influencia de el Ca<sup>++</sup> sobre la integración hormonal de la reproducción sexual.

Finalmente se realizará un análisis de las diferencias morfológicas que presentan los materiales en cultivo con respecto a la descripción original de la especie y a la población natural a partir de la cual fue aislada la cepa bajo estudio.

## GENERALIDADES ACERCA DE LAS OEDOGONIALES

### *Ubicación sistemática*

El orden Oedogoniales ha sido ubicado generalmente dentro de la clase Chlorophyceae (Hirn, 1900; Bohlin, 1901; Smith, 1933; Fritsch, 1927, entre otros), compuesta por las más derivadas algas verdes. Algunos autores les han asignado otra posición taxonómica, como Bourrelly (1972), ubicándolas entre las Ulothricophyceae, o Mrozinska (1985) dentro de una clase propia, las Oedogoniophyceae. Sin embargo, los estudios filogenéticos basados en el análisis de su ultraestructura, (Pickett-Heaps, 1975; Mattox y Stewart, 1984) y la aplicación más reciente de técnicas moleculares (Booton *et al.*, 1998) corroboran su ubicación dentro de las Chlorophyceae.

Este orden está compuesto por una única familia, Oedogoniaceae De Bary 1854, y comprende tres géneros; *Oedogonium* Link 1820, en el caso de que se trate de filamentos simples, *Oedocladium* Stahl 1891 si los filamentos son ramificados y desprovistos de pelos, y *Bulbochaete* Agardh 1817 cuando los filamentos son ramificados y poseen lateralmente pelos con base bulbosa.

Dentro de la diversidad y complejidad de las Chlorophyta, las Oedogoniales conforman un orden bien definido y homogéneo de algas verdes dulceacuícolas. Esta inequívoca diferenciación se evidencia gracias a ciertas características peculiares de estos organismos, como son: su mecanismo de división celular, que posee exclusivos “anillos apicales” que se extienden al formar la pared de la célula hija; su reproducción sexual, mediada por células y estructuras particulares; y las células móviles estefanocontas, es decir, con una corona de flagelos dispuestos alrededor de una papila hialina anterior (van den Hoek *et al.*, 1995). La hipótesis de que este grupo es monofilético ha sido recientemente corroborada analizando las secuencias de bases de la subunidad pequeña ribosómica (Booton *et al.*, 1998).

### *Porción vegetativa y división celular*

Las Oedogoniales conforman un grupo de organismos filamentosos, que pueden ser

simples o ramificados. En el género *Oedogonium* los filamentos son simples. La pared celular esta formada por dos capas: una externa, la “pared primaria”, de naturaleza péctica, y una interna, la “pared secundaria” (Pickett-Heaps y Fowke, 1970 y Pickett-Heaps 1975) constituida por microfibrillas de celulosa embebidas en gran cantidad de sustancia amorfa (Dodge, 1973). Cada célula presenta un cloroplasto cilíndrico, parietal (fig. 1-A). Este cloroplasto es reticulado, formado por cintas anastomosadas, y posee pirenoides ubicados, generalmente, en dichas anastomosis. Los pirenoides son atravesados por canales citoplasmáticos (Dodge, 1973), y están rodeados por calotas de almidón, aunque en relación con el estado fisiológico de la célula, puede haber también gránulos de almidón dispersos en la matriz del cloroplasto.

La división celular (fig. 2) ha sido ampliamente estudiada, y se encuentra recopilada en la obra de Pickett-Heaps (1975). La pared secundaria posee, apicalmente, una línea de debilidad. Adyacente a la misma, se deposita material amorfo vía aparato de Golgi, formando el anillo apical (fig. 1-B). La presencia de gran cantidad de anillos apicales implica un estado de activo crecimiento de los filamentos. Mientras avanza este proceso, ocurre la cariocinesis, la cual es intranuclear. Una vez separados los dos núcleos hijos, se forman entre ellos, numerosos microtúbulos paralelos al plano de división (tipo ficoplasto). También se depositan allí vesículas, y el conjunto de las vesículas y los microtúbulos conforman la placa celular o septo (Pickett-Heaps, 1975). Seguidamente, la pared secundaria se rompe por la línea de debilidad y el anillo se extiende formando la futura pared primaria de la célula hija apical, produciéndose el desplazamiento del septo hacia el extremo apical de la pared celular madre. Ambos procesos están relacionados con un aumento de la presión en las vacuolas, debido a la entrada de agua (Pickett-Heaps, 1975). La célula hija apical, alcanza su tamaño final también por entrada de agua a las vacuolas, y luego sintetiza su pared secundaria. A nivel del septo se forma la pared transversal que separa ambas células. De esta forma, la célula hija basal queda dentro de la pared original, y la apical debe sintetizar su pared *de novo*. Este mecanismo de división es el responsable de la formación de las bandas o casquetes apicales (y escalones basales) típicos del orden (fig. 1-C).

## **Reproducción**

Existen cuatro formas de reproducción en este orden:

**Multiplicación vegetativa:** Por fragmentación de los filamentos, especialmente en *Oedogonium*.

**Formación de acinetas:** Células de resistencia que se desarrollan a partir de células vegetativas, en *Oedogonium* y *Oedocladium*.

**Producción de zoosporas:** Cada célula vegetativa origina una única zoospora, la cual emerge en una vesícula hialina, dentro de la que adquiere su forma ovoidal característica. La zoospora tiene un núcleo central y una corona de flagelos alrededor de la papila hialina. Una vez liberada de la vesícula, nada activamente hasta encontrar un sustrato adecuado sobre el cual fijarse. La fijación se produce por el extremo anterior, mediante la formación de un disco adhesivo a partir de la papila flagelar. Seguidamente, forma su pared celular con la línea de debilidad apical, y procede a dividirse, como ya se explicó, originándose de esta manera un nuevo filamento.

**Sexual:** Las Oedogoniales son un grupo de organismos haploides con reproducción oogámica. Según el tipo reproductivo, las especies se clasifican en:

- ✓ **macrándricas:** aquéllas que presentan oogonios y anteridios formados en filamentos normales; pueden ser monoicas o dioicas.
- ✓ **nanándricas:** aquéllas en las que a partir de los filamentos vegetativos se desarrollan oogonios y un tipo particular de células masculinas, los androsporangios. Estos androsporangios liberan un zooide con polaridad sexual, la androspora, que es atraída por los oogonios o por células cercanas a ellos, pero que no llevan a cabo la fecundación, sino que se fijan sobre o cerca de los oogonios originando un pequeño individuo, el macho enano o nanandro, el cual formará los anteridios. Las especies nanándricas pueden ser ginandrospóricas (u homotálicas), si androsporangios y oogonios se forman sobre un mismo filamento, o idioandrospóricas (heterotálicas) en caso contrario.

Luego de la fecundación, se produce la cariogamia y la cigota forma una pared gruesa, constituida por tres capas (endo, meso y exosporio). El exosporio puede presentar ornamentaciones. Estas oosporas de resistencia requieren una etapa de dormición antes de germinar.

En *Oedogonium*, los oogonios se forman a partir de una célula especializada, la célula madre de los oogonios (CMO), que en general es de mayor tamaño que las células vegetativas (fig. 3). Dicha formación consiste de una división de la CMO, según el mismo procedimiento que las células vegetativas, con la diferencia de que es asimétrica. Esta asimetría determina que la mayor parte del contenido de la CMO sea transferido al oogonio. La maduración del oogonio implica la formación de una abertura en la pared celular que permitirá la entrada del anterozoide (Hoffman, 1971, Coss & Pickett-Heaps, 1973). En algunas especies, la CMO puede volver a dividirse produciendo otro oogonio. Para que esto suceda debe recuperar su contenido, lo cual se lograría mediante un proceso de translocación de metabolitos desde las células vegetativas (Vélez, 1998). El proceso puede repetirse varias veces, de modo que se forman cadenas o series de oogonios consecutivos, donde el apical es el más viejo.

En especies macrándricas, la formación de anteridios resulta de la división asimétrica de la célula madre de los anteridios (CMAt). Dentro de cada anteridio, se produce una división gametogénica que no posee anillo, sino que sólo produce un tabique (este puede ser transversal, con los anteridios superpuestos, o longitudinal, con los anteridios ubicados uno al lado del otro), algunas veces la división no ocurre y por lo tanto se produce sólo un anterozoide. En especies nanándricas, la formación de androsporangios también resulta de divisiones asimétricas de la célula madre de los androsporangios (CMAd). De cada androsporangio se origina una única androspora que se comportará como ya se explicó previamente.

### ***Regulación hormonal***

La regulación hormonal del género *Oedogonium*, ha sido estudiada en tres especies. Una, macrándrica dioica, *O. cardiacum* (Hoffman, 1960, Machlis *et al.*, 1974, Hill, 1980), y dos nanándricas idioandroespóricas, *O. borisianum* y *O. donnellii* (Rawitscher-Kunkel y Machlis, 1962, Hill, 1980, Hill *et al.*, 1989).

Estos estudios permitieron conocer que en especies macrándricas, el oogonio produce una feromona que atrae a los anterozoides hacia el poro de fecundación, y ésta es la única hormona interviniente. Por lo tanto, los cultivos femeninos producen

oogonios y los masculinos anteridios, sin la necesidad de la presencia del sexo opuesto (Hoffman, 1960).

Por otro lado, en las especies nanándricas idioandrospóricas, en los cultivos masculinos se observaba la producción de androsporangios y liberación de androsporas, mientras que en los cultivos femeninos, se encontraban células madre de los oogonios (CMO) pero no oogonios. Se reconocen cuatro pasos: 1. Las CMO producen una feromona que es capaz de atraer a las androsporas. 2. Recién cuando las androsporas se fijaron sobre la CMO y se comienzan a formar los nanandros se dispara la división asimétrica de la misma. 3. También el desarrollo del nanandro debe estar mediado por algún tipo de control, puesto que toma una forma característica curvada hacia el oogonio. Según señalan Rawitscher-Kunkel y Machlis (1962), el desarrollo del oogonio y la curvatura de los nanandros son efectos que requieren del contacto entre la CMO y los nanandros, es decir que no se ejercerían a distancia. 4. Una vez desarrollado el oogonio, se liberan los anterozoides que nadan hacia el poro de fecundación atraídos por la oósfera.

Cabe señalar que tanto nanandros como androsporas, al ser transferidos a un medio rico en nutrientes, pueden retomar el crecimiento vegetativo.

En todos estos casos estudiados, el principal inductor de la reproducción sexual es el déficit de nitrógeno (Hill, 1980, Chaudhary y Singh, 1988, Singh y Chaudhary, 1990).

Como se puede observar en la figura 4, en el ciclo de vida particular de *Oedogonium stellatum* Wittrock (nanándrica), zoosporas que pueden provenir de células vegetativas o de la germinación de la oospora, se fijan a un sustrato formando la célula basal o célula pie. Por sucesivas divisiones intercalares se forma el filamento, que es ginandrospórico. Las androsporas nadan y se fijan sobre el filamento, aunque no siempre cerca de la CMO, y se desarrollan los nanandros. A la vez, a partir de la CMO se forma el oogonio, que contiene a la oósfera. Los anterozoides producidos por los nanandros, fecundan a la oósfera formando así la oospora. Luego de una etapa de dormición, la oospora sufre una división meiótica, de la que resultan cuatro zoosporas que iniciarán nuevamente el ciclo (Modificado de Mrozinska, 1985).

### ***Caracteres utilizados en la determinación taxonómica***

La distinción entre las diferentes especies y taxones infraespecíficos en las Oedogoniales se basa en el tipo de ciclo de vida, la morfología de las estructuras sexuales, y la ornamentación de las oosporas (Mrozinska, 1985). En algunas pocas especies también se utiliza la forma de las células vegetativas como por ejemplo en *O. undulatum*. Esto es un problema grave a la hora de tener en nuestras manos una muestra llena de Oedogoniales que no están fértiles, como sucede en determinadas épocas del año. En la taxonomía tradicional, se consideran caracteres de valor taxonómico al tipo sexual (macrándrico, monoico o dioico; nanándrico, ginandrostórico o idioandrostórico); dimensión y forma del oogonio, tipo y posición de la apertura del mismo, y número de oogonios en serie; dimensión, forma y ornamentación de la pared de la oospora, y si llena por completo o no el oogonio; dimensión, posición, y número (cuando son en serie) de anteridios y androsporangios (para los anteridios, también el número de anterozoides que forman); tipo de célula basal; apical; y de células vegetativas; y tipo y ubicación de los nanandros (Mrozinska, 1985).

## MATERIALES Y METODOS

### *Elección y tratamiento de la cepa seleccionada*

*Oedogonium stellatum* Wittrock, especie nanándrica ginandrospórica, fue aislada a partir de materiales recolectados en un cuerpo de agua semipermanente en la provincia de Entre Ríos, en el mes de junio de 1992 (Vélez, 1995). La cepa unialgal fue obtenida por dicho autor (Vélez, 1998) mediante la siembra de un filamento en medio bifásico tierra-agua (BTA, ver más abajo), y se encuentra depositada bajo su denominación específica en la Colección de Cultivos de los Laboratorios de Ficología del Departamento de Ciencias Biológicas (F.C.E. y N., UBA).

Esta especie fue seleccionada ya que presentaría un fenómeno de translocación semejante al descripto por Vélez (1998) para *O. undulatum* (Vélez, *com. pers.*). Además, por ser homotálica, permite realizar recuentos celulares sin tener que diferenciar entre filamentos femeninos y masculinos, lo cual no sería posible en el caso de células vegetativas. Otra característica apropiada para este estudio, es que si se la maneja apropiadamente en cultivo (ver más abajo), no produce zoosporas como es el caso de otras especies. De esta manera, no crece adherida a las paredes de los recipientes, lo que permite una cosecha completa del material obtenido.

Como la cepa se encontraba contaminada con hongos, se procedió a su limpieza. Para ello, se prepararon cajas de Petri con agar-agua (1,5%) estéril, y se arrastraron cortos fragmentos de filamentos por su superficie con el objeto de lograr la eliminación mecánica de hifas y esporas fúngicas. El arrastre se llevó a cabo con agujas de disección estériles, bajo lupa binocular, y cada fragmento algal así tratado fue transferido a un tubo con medio BTA (un fragmento por tubo). Una vez obtenido crecimiento detectable a ojo desnudo, se verificó al microscopio en qué tubos la eliminación de los hongos había sido efectiva, y se seleccionó uno de ellos como nueva cepa clonal de trabajo (Nečas, 1979; Lukavský, 1979). No se eliminaron las bacterias, ya que el crecimiento de las especies del género en medios definidos minerales y condiciones axénicas es difícil, necesitándose de la presencia bacteriana para un buen desarrollo y reproducción (Machlis, 1973).

La obtención de esta nueva cepa clonal, permitió también asegurar la homogeneidad genética de los materiales a estudiar, ya que los cultivos algales de larga data pierden normalmente dicha homogeneidad (Nečas, 1979; Lukavský, 1979).

#### *Método de cuantificación del crecimiento y la inducción de la reproducción sexual*

El método de cuantificación propuesto, se basa en el fragmentado de los filamentos en segmentos lo suficientemente pequeños como para poder ser submuestreados como una suspensión de partículas. De éste modo se posibilita el recuento celular en hemocitómetro. La validez de este método se puso a prueba comparando la relación entre el número de células vegetativas *vs.* el peso seco, para muestras de distinto tamaño. Se siguió el siguiente procedimiento (fig. 5):

1. Obtención de filamentos en activo crecimiento vegetativo en medio BTA (ver más abajo).
2. Cosecha con ansa y transferencia a un frasco de liofilizado.
3. Liofilizado.
4. División del material en cinco porciones de diferente tamaño (5,8; 15,5; 16,6; 31,4 y 61,0 mg, respectivamente).
5. Secado en estufa de las porciones colocadas en pesafiltros tarados.
6. Determinación del peso seco de cada una de las porciones.
7. Transferencia a recipientes con 100 ml de formol 4%.
8. Recolección de cada porción de filamentos mediante su retención en una red de plancton de 50 µm. El líquido de cada filtrado se guardó en su correspondiente recipiente, para ser utilizado posteriormente, de manera de evitar la pérdida de células o fragmentos de éstas, menores a 50 µm, y que por lo tanto hubieran evadido la red.
9. Fragmentado minucioso de las porciones de filamentos, utilizando una hoja de afeitar.
10. Resuspensión del material fragmentado en su respectivo filtrado (ver 8).
11. Submuestreo con pipeta Pasteur y recuento en hemocitómetro.

12. Análisis de regresión lineal modelo II (Sokal, 1981) entre el **peso seco** obtenido y los **datos de número de células vegetativas** correspondientes.

Durante la realización de este procedimiento, se tomaron los siguientes recaudos:

- ✓ Evitar la pérdida de material algal en cada uno de los pasos.
- ✓ Controlar periódicamente, durante la fragmentación, el tamaño general de los fragmentos al microscopio.
- ✓ Homogeneizar la suspensión de células antes de tomar cada alícuota (Izaguirre, 1994).
- ✓ Utilizar pipeta Pasteur de boca ancha, a fin de evitar la discriminación por tamaño.
- ✓ Limpiar minuciosamente la pipeta luego de cada submuestreo para eliminar fragmentos que hubiesen quedado adheridos al vidrio.
- ✓ Mantener la pipeta en agua destilada entre submuestreos, para impedir la desecación de los fragmentos adheridos y facilitar, así, su limpieza.

Para obtener la tara de los pesafiltros, se secaron los cinco recipientes destapados en estufa a 100°C durante cuarenta y ocho horas, al cabo de las cuales se taparon, se dejaron enfriar en desecador y se pesaron. Luego volvieron a secarse en estufa durante quince minutos dejando enfriar y pesando nuevamente. Esta operación se repitió hasta obtener peso constante.

Para determinar el peso seco de las algas, cada porción de material fue colocada en un pesafiltros. Luego se repitieron los mismos pasos que para los recipientes vacíos, y se determinó el peso de los pesafiltros con el material algal. El peso seco de las algas se calculó restando al valor total la tara de los recipientes.

Los recuentos se realizaron considerando como media célula a las células partidas de los extremos cortados de cada fragmento, según se ejemplifica en la fig. 6.

***Obtención del inóculo y preparación de los medios de cultivo definidos***

Como inóculo para las distintas experiencias se utilizaron filamentos creciendo

activamente en medio BTA (ver más abajo). Este estado de los cultivos es fácil de establecer en las Oedogoniales, gracias a la presencia de una alta proporción de células con anillo apical. No se utilizaron como inóculo cultivos cerca de la fase estacionaria o ya en ella, puesto que en este estado, los filamentos producen zoosporas al ser repicados a medios definidos, lo cual, como ya se dijo, dificulta la cosecha total de los materiales obtenidos.

El medio BTA (bifásico tierra-agua) (Starr y Zeikus, 1993), se preparó en frascos San Luis de 250 ml, utilizando 26 g de tierra de Castelar en 100 ml de agua deionizada. El medio así preparado se esterilizó en autoclave durante 20'.

Se utilizó medio BTA para preparar los inóculos, ya que las Oedogoniales no crecen en medios definidos si éstos no poseen una cierta dosis de extracto de suelo (Machlis, 1962). En este caso, se utilizó la propiedad observada por Vélez (1998), de que si se trabaja con pequeños volúmenes de medio definido, la cantidad de factor de suelo arrastrada en el inóculo incubado en BTA, es suficiente para obtener crecimientos y desarrollos saludables.

El método de siembra utilizado (fig. 7), consistió en acomodar el manojo de filamentos sobre la superficie de extracto de suelo (el sobrenadante del medio BTA) agarizado, de manera tal que formaran un largo haz isodiamétrico (de aproximadamente 1 mm) de filamentos paralelos. Una vez dispuesto de esta forma, se cortó el haz con una tijera de disección esterilizada a intervalos regulares de 5 mm (generando porciones de  $58333 \pm 9062$  células) utilizando como falsilla, papel milimetrado colocado debajo de la caja de Petri. Con cada una de estas porciones se inocularon los medios para los distintos ensayos. No se utilizó agar-agua para llevar a cabo este procedimiento, con el objeto de evitar la dilución del extracto de suelo acarreado por los filamentos y necesario para su posterior desarrollo en medios definidos.

Los medios de cultivo para el análisis del crecimiento y de la inducción de la reproducción sexual, se prepararon en base a lo establecido por Hill (1980) (tabla I). En todos los casos se utilizaron 25 ml de medio contenido en erlenmeyers de 50 ml.

**Influencia del nitrato de potasio, el fosfato de potasio y el cloruro de calcio sobre el crecimiento e inducción de la reproducción sexual**

Como indicador del grado de éxito de la reproducción sexual, se utilizó el número de oogonios formados. Para estimar la eficiencia de la formación de estas estructuras, se calculó su proporción respecto a las células vegetativas. Aunque parte de dichas células aportan, en realidad, a la formación de androsporangios, en las primeras observaciones se pudo establecer que dicho aporte es despreciable frente al implicado en la formación de oogonios. Así, se observó que una CMAd, puede originar hasta cinco androsporangios, mientras que en el mejor de los casos, se necesitan al menos cuatro células vegetativas para formar un oogonio.

Los efectos de los nutrientes se analizaron en forma secuencial. Primero se realizó un gradiente de N utilizando trece concentraciones crecientes (0 a 20 mM de  $\text{KNO}_3$ ) (tabla II). En base a los resultados obtenidos en esta etapa se seleccionó la concentración de N en la que se obtuvo la mayor relación  $nº\ de\ oogonios / nº\ de\ c.\ vegetativas$  (ver más adelante) y se la empleó para realizar el ensayo de la influencia del P (tabla I). Para este ensayo se utilizaron once concentraciones (0 a 20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (tabla III). Igual que en el caso anterior, se seleccionó la concentración de P en la que se obtuvo la mayor relación  $nº\ de\ oogonios / nº\ de\ c.\ vegetativas$  y se la utilizó, con la anteriormente seleccionada de N para el ensayo del  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (tabla I). De este último nutriente se ensayaron cinco concentraciones (0 a 5 mM) (tabla IV). Las siembras se realizaron en cámara de flujo laminar con la asistencia de un mechero. La incubación de los cultivos se llevó a cabo bajo luz continua provista por tubos fluorescentes de luz de día, con una densidad de flujo de  $56\ \mu\text{mol}\ \text{de}\ \text{fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y a temperatura regulada en un recinto climatizado ( $25,5 \pm 0,5\ ^\circ\text{C}$ ). Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

La determinación del comienzo de la reproducción sexual (días transcurridos entre la siembra y la aparición de los primeros oogonios), se realizó revisando periódicamente los cultivos en un microscopio invertido. Observaciones preliminares permitieron establecer que luego de los 20 días cesan las divisiones celulares (vegetativas y oogoniogénicas) por lo que se fijó un tiempo de incubación de 23 días. Luego de

oogoniogénicas) por lo que se fijó un tiempo de incubación de 23 días. Luego de transcurrido este lapso, se fijaron los cultivos agregando 2,5 ml de formol 40% en cada uno de los recipientes. La producción completa de cada cultivo fue cosechada, fragmentada y resuspendida en el líquido filtrado para su posterior recuento, según lo especificado en los ítems 8-11 de la explicación del método de recuento desarrollado.

En todos los casos se contaron el número de células vegetativas y el número de oogonios. Para el caso de los oogonios, no fue necesaria la convención mencionada más arriba, puesto que dichas estructuras no sufren fragmentación debido a la dureza de la cigota. Se trabajó con un error menor o igual al 20% según la fórmula de Venrick (1978):

$$e = \frac{s/\sqrt{n}}{\bar{x}} t_{(\alpha, n-1)}$$

donde:  $e$ - error porcentual,  $s$ - desvío estándar de la estimación,  $n$ - número de alícuotas contadas,  $\bar{x}$  - media muestral y  $t_{(\alpha, n-1)}$ - t de Student.

Para estudiar el crecimiento vegetativo, se dedujo la siguiente fórmula, a fin de calcular el nº promedio de ciclos de división:

Siendo  $V$  el número de células al final de la experiencia,  $I$  el número de células inoculadas, y  $\mathcal{X}$  el número promedio de divisiones vegetativas,

$$V = I \times 2^{\mathcal{X}}$$

entonces, realizando un pasaje de términos y aplicando logaritmos de ambos lados, obtenemos:

$$V/I = 2^{\mathcal{X}}$$

$$\log(V/I) = \mathcal{X} \times \log 2$$

y despejando:

$$\mathcal{X} = \frac{\log(V/I)}{\log 2}$$

Se analizaron los siguientes parámetros: *nº de células vegetativas vs. concentración de nutriente* para analizar el crecimiento vegetativo, *nº de oogonios vs. concentración de nutriente* para evaluar la productividad de oogonios, y para analizar el éxito relativo de la inducción de la reproducción sexual, la relación *nº de oogonios / nº de células vegetativas vs. concentración de nutriente*. En todos los casos, el tratamiento estadístico se llevó a cabo utilizando análisis de varianza (ANOVA) de un factor (Sokal, 1981), aplicándose transformación logarítmica para lograr homocedacia. Se realizaron contrastes “ortogonales” y de “Tukey para muestras de n diferente” para analizar los casos de interés. Adicionalmente, se calculó la relación *nº de células vegetativas / nº de oogonios* para cada concentración de nutriente.

En el caso del Cl<sub>2</sub>Ca se analizó además, la relación entre su concentración y las características: *largo, ancho y volumen de las células vegetativas* utilizando ANOVA de un factor, aplicando transformación logarítmica para lograr homocedacia. Luego se aplicaron contrastes *a posteriori* de “Tukey para muestras de n diferente”.

Se analizó la influencia del mismo nutriente en la fijación de los nanandros sobre la CMO. Para llevar a cabo este análisis, se contó el número de nanandros fijados sobre la CMO y el número de los fijados sobre cualquier parte del filamento, aplicando posteriormente, una prueba de independencia (Sokal, 1981).

Finalmente se estudió la influencia del Cl<sub>2</sub>Ca sobre el volumen de los oogonios (considerados como esferas) mediante una regresión lineal modelo I (Sokal, 1981), utilizando transformación logarítmica a fin de lograr homocedacia.

## RESULTADOS

### *Validación del método de recuento celular*

Los filamentos obtenidos luego del tratamiento de fragmentación, resultaron tener un tamaño medio de  $4,5 \pm 0,5$  células (aproximadamente  $219,89 \pm 24,43 \mu\text{m}$ ) con una confianza del 95%, siendo el mayor fragmento de 41 células (aproximadamente 2003,42  $\mu\text{m}$ ) (fig. 8). El análisis de regresión (tabla V y fig. 9) arrojó una pendiente significativa ( $p<0,0001$ ), al contraponer los valores de peso seco del material tratado con los datos de recuento celular de los mismos.

### *Crecimiento y reproducción sexual*

Si bien todos los cultivos se realizaron en iguales condiciones, se observó una aparición más rápida de los oogonios, así como una mayor producción absoluta de éstos en el cultivo nº 4 del ensayo de  $\text{KNO}_3$ , que en los cultivos nº 5 y nº 3 de los ensayos de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , respectivamente (tabla VI-A, B y C; figs. 10, 11 y 12). Esto llama la atención puesto que los medios de dichos cultivos poseían la misma composición.

### *Influencia del $\text{KNO}_3$*

Los datos de crecimiento (tabla VI-A; fig. 10-A) mostraron diferencias significativas en el nº final de células vegetativas ( $p<0,001$ ) entre el grupo de concentraciones menores a 0,1 mM (cultivos nº 1 a 6) y el de mayores a 0,5 mM de  $\text{KNO}_3$  (cultivos nº 7 a 13). Dentro del primer grupo, se obtuvieron diferencias significativas entre concentraciones alternas (v.g.: cultivos 3 vs. 5 y 4 vs. 6), pero no entre contiguas, excepto para los cultivos 1-3, entre los que las diferencias no fueron significativas en ningún caso. En el segundo grupo no hubo diferencias significativas entre los distintos cultivos. La mayor producción de células vegetativas en este último grupo, coincide con la inhibición de la reproducción sexual (tabla VI-A). En la tabla VII se puede observar el número de ciclos de división vegetativa sostenidos por cada concentración de  $\text{KNO}_3$ . Nótese que se produjo crecimiento vegetativo aún en el cultivo sin fuente externa de  $\text{KNO}_3$ .

Se pudo distinguir adelgazamiento apical y disminución de la pigmentación de los filamentos hasta el cultivo nº 8 ( $\text{KNO}_3$ : 1 mM) (fig. 13-A). Por otro lado, en cultivos con gran cantidad de nitrógeno ( $\text{KNO}_3$ : 20 mM) se produjo la plasmólisis del protoplasto de las células vegetativas (fig. 13-B).

En cuanto a la producción de oogonios (tabla VI-A; fig. 10-B), se encontraron tres grupos bien definidos (fig. 10-B): el primero formado por los cultivos nº 1-3, el segundo por los cultivos nº 4-6 (con la mayor producción de oogonios [ $p<0,001$ ]), y el tercer grupo formado por los cultivos 7-13, con producción nula de oogonios. No se encontraron diferencias significativas dentro de los grupos, aunque sí entre ellos.

Por otro lado, la mayor relación  $nº \text{oogonios} / nº \text{cél. vegetativas}$  (tabla VI-A; fig. 10-C) se halló en el cultivo nº 4 ( $\text{KNO}_3$ : 0,01 mM) con un  $p<0,05$ . A esta concentración, ocurrió también la aparición más temprana de los oogonios.

#### *Influencia del $\text{KH}_2\text{PO}_4$*

En cuanto al número total de células vegetativas (tabla VI-B; fig. 11-A), se pudo observar que en el cultivo nº 1, su producción resultó significativamente menor que en el resto de los cultivos. Por otro lado, se detectó un grupo formado por las concentraciones nº 2-5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,25-1 mM) donde el crecimiento resultó significativamente mayor ( $p<0,05$ ) que en el cultivo anteriormente nombrado, pero menor ( $p<0,05$ ) que el grupo formado por las concentraciones nº 6-11 (que no se diferencian significativamente entre si). El crecimiento de cada cultivo, expresado como número de ciclos celulares, se muestra en la tabla VII.

En el caso del  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , se observó adelgazamiento apical y disminución de la pigmentación en todos los casos.

La producción de oogonios (tabla VI-B; fig. 11-B), no mostró diferencias significativas entre los cultivos nº 3-5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0,5; 0,75 y 1 mM), donde se registró la aparición más temprana de los oogonios, así como la mayor producción de los mismos ( $p<0,05$ ). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los cultivos nº 1, 2 y

6, con menor producción. Por último, en los cultivos nº 7-11 no se formaron estructuras sexuales.

El análisis estadístico de la relación  $nº\ oogonios / nº\ cél. vegetativas$  (tabla VI-B; fig. 11-C), proporcionó evidencia de diferencias significativas ( $p<0,05$ ) tomando en cuenta tres grupos de concentraciones. El primero, formado por los cultivos nº 1 y 3-5 ( $KH_2PO_4$ : 0 y 0,5-1 mM) con la mayor relación; el segundo, formado por los cultivos nº 2 y 6 ( $KH_2PO_4$ : 0,25 y 2,5 mM) con una menor relación  $nº\ oogonios / nº\ cél. vegetativas$  (en ambos casos, sin diferencias significativas dentro de los grupos); y el tercer grupo compuesto por los cultivos 7-11 ( $KH_2PO_4$ : 5 a 20 mM) sin producción de oogonios (ver también fig. 11-B).

#### *Influencia del $Cl_2Ca$*

Respecto al crecimiento vegetativo (tabla VI-C; fig. 12-A), en el cultivo nº 1 ( $Cl_2Ca$ : 0 mM), la producción de células es significativamente menor que en el resto de los cultivos ( $p<0,001$ ). El crecimiento obtenido correspondió a un incremento de aproximadamente 80% en el número de células (Tabla VII), es decir que en promedio, 8 de cada 10 células del inóculo sufrieron una única división celular. El estado final de este cultivo mostró numerosas células con desarrollo de anillo apical, el cual en muchos casos había comenzado el proceso de expansión sin llegar a completarlo (fig. 15-A). También se registró plasmólisis de los protoplastos y un apreciable crecimiento bacteriano en la superficie externa de las paredes celulares. El resto de los cultivos, sufrió entre 3 y 4 divisiones vegetativas, no registrándose entre ellos diferencias significativas. Las características anómalas halladas en el cultivo nº 1 no se observaron en el resto de las concentraciones.

Por otro lado, en aquellos cultivos con mayor concentración de  $Cl_2Ca$  ( $Cl_2Ca$ : 5 mM), se registró un significativo acortamiento y ensanchamiento de las células ( $p<0,05$ ), como se puede observar en las figs. 15-C, 17-A y B. El volumen promedio (fig. 17-C) de las células vegetativas en el cultivo nº 3, resultó significativamente mayor ( $p<0,01$ ) que el encontrado en los cultivos 1, 4 y 5. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los volúmenes calculados en este cultivo y en el nº 2. El

volumen promedio en el mencionado cultivo nº 2, resultó también significativamente mayor ( $p<0,005$ ) que el cultivo nº 5. El resto de las combinaciones posibles no fueron significativas.

La producción de oogonios (tabla VI-C; fig. 12-B) resultó nula en el cultivo 1, máxima en los cultivos 2-4 (sin diferencias significativas entre ellos) para decaer significativamente en el cultivo 5. El desarrollo más temprano de los oogonios ocurrió en los cultivos 3 y 4.

La mayor relación  $nº\ oogonios / nº\ cél.\ vegetativas$  (tabla VI-C; fig. 12-C) ocurrió en el cultivo nº 2, seguido de una tendencia a disminuir dicha relación conforme aumenta la concentración de calcio. Sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas entre concentraciones alternas (v.g.: cultivos 2 vs. 4 y 3 vs. 5), pero no entre contiguas. En el cultivo nº 5 ( $\text{Cl}_2\text{Ca}: 5\text{ mM}$ ) la relación resultó significativamente menor ( $p<0,05$ ) que en el resto (tabla VI-C).

Analizando los valores promedio de los volúmenes de los oogonios (fig. 18), se puede observar que muestran una tendencia negativa respecto a la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . Estadísticamente, se verificó ( $p<0,05$ ) una relación entre el volumen oogonal y la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  presente en el medio. Los valores máximo y mínimo de longitud, diámetro y volumen de los oogonios se pueden observar en la tabla VIII.

La relación entre el número de nanandros fijados sobre las CMO y su número total (fig. 19), resultó máximo en los cultivos 3 y 4. Los datos estadísticos mostraron que la frecuencia con que los nanandros se ubican sobre las CMO depende significativamente ( $p<0,05$ ) de la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . Al confrontar los cultivos de a pares, se observó que esta dependencia de la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  era consecuencia de la existente considerando los cultivos nº 2 y 3, y los cultivos nº 2 y 4 (con  $p<0,05$ ) en ambos casos, mientras que el resto de las combinaciones mostró independencia.

### *Otros aspectos morfológicos*

En todos los cultivos en donde ocurrió la reproducción sexual, se observó la

formación de oogonios en serie (incluso en los cultivos sin fuente externa de N), así como un gradiente de contenido celular desde las células basales a las CMO, hasta dichas células (figura 14-E). También se evidenció que las células vegetativas alejadas de las CMO, mostraron un pobre contenido celular, en especial una marcada reducción de los cloroplastos (fig. 13-C y D).

Las series o cadenas de oogonios consecutivos, tendieron a desarmarse quedando oogonios solitarios o en cortas cadenas dispersos en el medio (fig. 14-A). También se observó que en algunos casos las CMO revierten a CMAd (células madre de los androsporangios), lo que favorece el desprendimiento de los oogonios. Según se pudo observar, este cambio se produce en CMO con un contenido celular muy pobre, y asociadas a células vegetativas igualmente escasas de contenido. Otro aspecto de interés es que en muchos casos se registraron oogonios formados a partir de CMO que no presentaban nanandros en su superficie (fig. 14-B). A su vez, la fijación de nanandros sobre cualquier parte del filamento fue también un fenómeno frecuente (fig. 14-D). En general, estos nanandros presentaron curvatura de la célula pie. También se observó, en algunos casos, crecimiento vegetativo de los nanandros (fig. 15-D).

En cuanto a la formación en serie de estructuras sexuales (tabla IX), se observaron oogonios en cadenas de 1-6, anteridios formando series de 2-4 y cadenas de 1-5 androsporangios.

## DISCUSIÓN

### *Método de recuento celular*

La estimación del crecimiento de algas filamentosas en cultivo mediante recuento celular, ha sido considerada impracticable (Hill y Machlis, 1970). Sin embargo, dicho método puede ser utilizado para determinar la frecuencia relativa de un cierto tipo celular, como por ejemplo n° de gametangios *vs.* número de células vegetativas (Singh y Chaudhary, 1988 y 1990). Este procedimiento no permite, sin embargo, conocer la producción absoluta de diferentes tipos celulares en cada recipiente de cultivo.

El método de fragmentado, resuspensión, submuestreo y recuento desarrollado en el presente trabajo, mostró una ajustada relación con los correspondientes valores de peso seco. Esto validó su utilización como estimador del número de células, y permitió aplicarlo para la cuantificación de la producción total de células vegetativas y oogonios, en las diferentes condiciones nutricionales ensayadas.

Es importante señalar que el método posee sus limitaciones, ya que requiere de la cosecha completa de la biomasa producida. Por esta razón no sería aplicable a algas filamentosas que presenten algún mecanismo de adhesión a sustratos sólidos y que, por lo tanto, resulten imposibles o difíciles de desprender de los recipientes de cultivo.

La siembra de inóculos de tamaño homogéneo para la obtención de resultados comparables, no es un problema de fácil solución en las algas filamentosas. En las Oedogoniales en particular, una de las formas utilizadas es la inducción de la zoosporulación masiva, y la siembra posterior de iguales volúmenes de esta suspensión de zoosporas. Sin embargo este método no resultó útil para este trabajo debido a la referida fijación de las zoosporas en las paredes de los recipientes de cultivo.

### ***Estudios nutricionales***

Una primera observación general, de importancia para el análisis de los resultados obtenidos, es que en la especie estudiada se observó la formación de oogonios en serie, tanto en ausencia total de  $\text{KNO}_3$  como de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (cultivos 1 de los respectivos ensayos). Dado que, como se explicó en las generalidades, el gasto metabólico de producción de un oogonio viable por parte de la CMO es muy alto, y que por lo tanto ésta necesita de la recuperación de su contenido para formar un segundo oogonio, dicha recuperación sólo pudo haber ocurrido a expensas del N y del P movilizables desde las células vegetativas. Esto indica que en esta especie, al igual que en *O. undulatum* (Vélez, 1998), se produce un fenómeno de translocación hacia las CMO. Otra evidencia de este fenómeno es la distribución del contenido celular a lo largo de los filamentos (fig. 14-E).

Otra observación de índole general que merece un comentario, es que la producción de oogonios fue mayor y comenzó antes en el ensayo de  $\text{KNO}_3$  que en los de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , aún en los medios de igual composición. Este comportamiento desparejo podría deberse al diferente estado fisiológico de los inóculos, lo que concuerda con el hecho de que los ensayos con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  se llevaron a cabo utilizando inóculos provenientes del mismo cultivo en BTA, pero diferente al cultivo en BTA utilizado para estudiar el comportamiento frente al  $\text{KNO}_3$ . Esto muestra que a pesar de que se tomen todos los recaudos en la preparación de este medio (utilización de la misma tierra, su homogeneización, iguales proporciones de tierra y agua, etc.) no es posible asegurar que la composición final en cada recipiente sea la misma. En el presente trabajo, por lo tanto, el análisis de los resultados debe llevarse a cabo teniendo en cuenta esta diferencia en el estado de los inóculos.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados.

#### ***Influencia del $\text{KNO}_3$***

El hecho de que el crecimiento vegetativo dependa de la concentración de  $\text{KNO}_3$  en el medio, no merece mayor discusión por tratarse de un macronutriente esencial para la

síntesis de proteínas, nucleótidos, clorofilas, etc. De cualquier manera, el análisis de los resultados permite realizar algunas observaciones interesantes.

Por un lado, el crecimiento obtenido en ausencia de fuente externa de N en los controles, mostró que las células del inóculo, habrían contado con suficientes reservas de este nutriente como para sustentar un promedio de aproximadamente tres ciclos de división vegetativa. Además, como el incremento de la concentración de este nutriente recién se tradujo en un mayor crecimiento a partir del cultivo 5, se podría afirmar que hasta dicho nivel la magnitud de la fuente externa de N es despreciable frente a lo que aportan las reservas intracelulares. A partir del cultivo 5, ocurre un aumento del crecimiento que indicaría que la fuente externa de N adquiere importancia relativa con respecto a dichas reservas. En cuanto a la naturaleza de estas reservas de N, aunque pueden ser de índole diversa, es muy probable que estén representadas mayormente por la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa / oxigenasa (Rubisco), como es el caso en la mayoría de las plantas verdes (Peñarrubia y Moreno, 1995)

Por otro lado, el incremento en la concentración externa de  $\text{KNO}_3$  sólo se tradujo en un aumento progresivo de la biomasa producida entre las concentraciones correspondientes a los cultivos 5 y 7. A partir de este último, se alcanza un “plateau”. Esto podría deberse a que, como es habitual en los cultivos en “batch” (Fogg, 1975), algún otro factor se torna limitante. En este sentido, es probable que la biomasa alcanzada en 7 ya implicara el consumo de algún otro nutriente (o varios, incluido el desconocido factor del suelo) a niveles tales que se volviera limitante, por lo que niveles más altos de N (cultivos 8-13) ya no pudieron traducirse en mayor crecimiento vegetativo. Como se verá en el análisis del ensayo de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dicho nutriente sería uno de los limitantes.

También habría que considerar (especialmente para las concentraciones mayores) el efecto tóxico del  $\text{KNO}_3$  (Chu, 1942). El estado de plasmólisis en que se encontraban las células en la concentración más alta ensayada (fig. 12-B), constituiría una evidencia de dicha toxicidad.

En cuanto al adelgazamiento y decoloración de las células hacia el ápice de los filamentos, recuerda la formación de pelos multicelulares incoloros, como los de algunas Chaetophorales (Witton, 1988). Este autor señala que en dichas algas, los pelos incoloros se forman en deficiencia de nutrientes (principalmente P y N), por lo que constituirían estructuras especializadas en la captación de dichos nutrientes. Dado que en *O. stellatum* su formación no se observó en niveles altos de KNO<sub>3</sub>, es probable que posean una función análoga. Es de notar que el mismo tipo de respuesta fue observada por Vélez (1998), en la formación de pelos apicales unicelulares de una especie no identificada de *Oedogonium*.

Como ocurre en muchas algas (Sagar & Granik, 1954; Hill & Machlis, 1970; Rayburn, 1974; John y Anderson, 1976; Singh & Chaudhary, 1990), la deficiencia de N resultó ser factor inductor de la sexualidad, y altas concentraciones inhibieron el desarrollo de estructuras reproductivas (Coleman, 1962; Dring, 1974; Singh & Chaudhary, 1990).

Respecto a la formación de oogonios, si se consideran los cultivos 1-4, la aparición más temprana y la producción mayor de oogonios en el 4, indica que las células vegetativas poseerían una mayor riqueza en metabolitos capaces de ser translocados y traducidos en oogonios. Esta mayor riqueza de metabolitos, se debería a que en la etapa de crecimiento vegetativo alcanzó un n° de células final comparable al de 1-3, pero disponiendo de mayor fuente de N externa.

Considerando ahora los cultivos 4-6, el retardo en la formación de oogonios en 5 y 6 (a diferencia del que ocurrió en 1-3), se debería a que la mayor concentración inicial de KNO<sub>3</sub> en estos medios, necesitó de una fase de crecimiento vegetativo más prolongada para que dicho nutriente fuera consumido hasta el nivel de inducción. Por su parte, la mayor producción absoluta de oogonios en 5 y 6 se debería a la mayor biomasa final de células vegetativas que alcanzaron estos cultivos con respecto a 4. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que un mayor crecimiento vegetativo implica un mayor consumo de todos los nutrientes, algunos de los cuales podrían ser fundamentales, por ejemplo, en el proceso de translocación. Estas deficiencias se traducirían en una menor

eficiencia de dicho proceso, lo que explicaría porqué se obtuvo una más alta relación  $n^o$  oogonios /  $n^o$  células vegetativas en 4 que en 5 y 6. Este punto puede resultar de interés si el objetivo es producir una gran cantidad de oosporas para su estudio en particular. Trabajando con las concentraciones de  $KNO_3$  del cultivo 4 se obtendrían dichas células en forma más rápida y se facilitaría la tarea de separarlas de las células vegetativas.

Para concentraciones mayores (cultivo 7 en adelante) es probable que, como ya se dijo, algún otro nutriente (o varios) se vuelva limitante del crecimiento. Es decir, que es probable que estas células sean lo suficientemente ricas en N para seguir dividiéndose en forma vegetativa, pero no puedan hacerlo. Esto, más el hecho de que se obtuvo crecimiento vegetativo en condiciones de ausencia de fuente externa de N, estaría indicando que no es el nivel extracelular de N el inductor de la reproducción sexual, sino el intracelular.

#### *Influencia del $KH_2PO_4$*

En relación con el ensayo anterior, se puede inferir que el  $KH_2PO_4$  resultó, efectivamente, ser un factor limitante del crecimiento vegetativo. Esto se evidencia en el hecho de que la adición de  $KH_2PO_4$  por encima del nivel utilizado en el gradiente de  $KNO_3$ , se tradujo en un incremento en el crecimiento vegetativo (comparar cultivo 9 de la tabla VI-B con cultivo 4 de la tabla VI-A).

Es importante señalar que este ensayo puede ser analizado teniendo en cuenta sólo las influencias del  $KH_2PO_4$  y el  $KNO_3$  (este último en la concentración fija del cultivo 4 del ensayo anterior, que fue la que brindó mayor relación  $n^o$  de oogonios /  $n^o$  de células vegetativas), ya que el resto de los nutrientes se encontraba en concentraciones más que suficientes. Una prueba de esto es que en el ensayo de  $KNO_3$ , el aumento de la concentración de N por encima de la del cultivo 4, rindió aproximadamente once veces más crecimiento vegetativo (ver, por ejemplo, cultivos  $n^o$  7-10 de dicho ensayo).

También pudo verificarse, que al igual que en el caso del  $KNO_3$ , las células del inóculo poseían reservas intracelulares de  $KH_2PO_4$ , dado que en ausencia de fuente externa de este nutriente (cultivo control), se obtuvieron aproximadamente dos ciclos de

división celular.

Es de notar que la cinética de utilización del fósforo por las algas está sujeta a mecanismos de regulación complejos. Según esto, la respuesta en el crecimiento de algunas especies no es proporcional a los niveles de fósforo externos (*cf.* Fogg, 1975). Así, ha sido demostrado que en algunos casos, un incremento en la concentración externa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se traduce en una acumulación de dicho nutriente en las vacuolas (especialmente como polifosfatos) sin que se advierta un incremento en la tasa de crecimiento vegetativo. Es decir que a diferencia de lo que ocurre con el nitrógeno, la cinética de captación del  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  externo suele no tener un correlato directo con la cinética de crecimiento.

No existiendo datos previos acerca del metabolismo del  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en las Oedogoniales, resulta difícil establecer en base a los resultados, si la especie estudiada presenta un mecanismo de este tipo. Sin embargo, dicho modelo podría explicar porqué el aumento en el crecimiento no resultó significativo en los cultivos 2 a 5. En los cultivos 6 a 9, probablemente se haya manifestado el mismo efecto, siendo muy probable que el aumento en el crecimiento con respecto a 2-5 se deba a algún efecto inhibidor del  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sobre la reproducción sexual (como se verá más abajo), lo que podría haber prolongado la fase vegetativa. Un efecto muy importante de limitación del crecimiento en este ensayo, es sin duda, el bajo nivel de  $\text{KNO}_3$  utilizado, que explicaría el “plateau” en 6-9. El pequeño decaimiento posterior, aunque no resultó estadísticamente significativo, puede indicar el comienzo de un efecto tóxico tanto del P (Chu, 1942) como del  $\text{K}^+$ , este último por interferir en la captación y disponibilidad fisiológica del  $\text{Mg}^{++}$  y del  $\text{Ca}^{++}$  cuando se encuentra en altas concentraciones (Marschner, 1993).

El análisis del párrafo anterior explicaría porqué en muchos casos no se detectaron diferencias significativas entre concentraciones contiguas. Sin embargo, analizando los resultados en forma global, la concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tuvo un efecto sobre el crecimiento vegetativo, que coincide con las esquemas tradicionales de “curva de acción” (Barceló Coll *et al.*, 1984). Así, se observó una primera fase de deficiencia

(cultivo 1), un posterior incremento del crecimiento hasta llegar a una fase óptima, (cultivos 2-9), y finalmente un incipiente efecto inhibidor (cultivos 10 y 11). En el caso de este ensayo, la fase óptima coincide con un “plateau”, seguramente relacionado con el efecto limitante de la concentración de  $\text{KNO}_3$  utilizada, según ya se refirió.

Un hecho que llama la atención es que una pequeña adición externa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , como en el caso del cultivo 2, estimuló el crecimiento vegetativo. Es probable que esto se deba a que sería más rápidamente incorporable para dicha función que el disponible para el caso del cultivo 1, en el cual deberán degradarse y movilizarse reservas de P no estructurales (no provenientes de ácidos nucléicos ni membranas celulares, ya que el crecimiento implica formación de estructuras, y no podría nunca basarse en su degradación). Según esto, sólo quedaría el P no estructural, disponible en forma de sustancias de reserva, muy probablemente como polifosfatos (Fogg, 1975).

Es de notar la presencia, en todos los casos, de “pelos multicelulares incoloros”, lo que indicaría que, en este caso, no es el nivel de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , sino el de  $\text{KNO}_3$ , el determinante de la formación de dichas estructuras.

Un patrón análogo al referido para el crecimiento vegetativo se obtuvo en la formación de oogonios, aunque en este caso, el efecto inhibidor de las altas concentraciones de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sobre dicho proceso fue notorio.

Una vez activada la formación de oogonios, sin embargo, la situación es completamente diferente que para el crecimiento vegetativo, ya que habría degradación de estructuras celulares ricas en P (por ejemplo membranas plasmáticas), su movilización hacia las CMO, y su aprovechamiento por parte de éstas. Una evidencia de esta degradación, es la reducción de los cloroplastos en las células vegetativas alejadas de las CMO (fig. 13-D). Tal disponibilidad de P durante la reproducción sexual, haría que éste fuera un factor mucho menos limitante para la formación de oogonios en comparación con la fase de crecimiento. De ahí que la producción absoluta de oogonios en los cultivos 1 y 2, no presente diferencias significativas, y que la proporción de oogonios sea mayor en 1 que en 2.

En cuanto al marcado efecto inhibidor de los niveles de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mayores al cultivo 7 sobre la reproducción sexual (mucho más fuerte que sobre el crecimiento vegetativo), no se poseen elementos que permitan arriesgar alguna hipótesis apropiada, más allá de su probable efecto tóxico sobre dicho proceso.

#### *Influencia del $\text{Cl}_2\text{Ca}$*

Para el análisis de los efectos del  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , sería necesario tratar por separado la influencia del  $\text{Cl}^-$  y la del  $\text{Ca}^{++}$ . Sin embargo, a pesar de que el  $\text{Cl}^-$  juega importantes roles en el metabolismo de las células vegetales, en especial en la fotosíntesis (involucrado en la escisión de la molécula de agua), en el metabolismo del  $\text{KNO}_3$  (incrementando la afinidad de la asparragina sintetasa por su sustrato [Rognes, 1980]), como uno de los más importantes solutos osmóticamente activos en la vacuola, etc., en líneas generales es necesario en concentraciones de micronutriente (Marschner, 1993). Por esta razón, es muy probable que los efectos observados en los ensayos con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  se daban principalmente al nivel de  $\text{Ca}^{++}$ , salvo, quizás, en el cultivo 1, preparado sin dicha sal (aunque aún en este caso es posible que el  $\text{Cl}^-$  provisto por el  $\text{CoCl}_2$  y el  $\text{MnCl}_2$  sea suficiente para cubrir los requerimientos del alga), y en el cultivo 5, en el que la alta concentración de  $\text{Cl}^-$  puede haber resultado tóxica.

En lo que se refiere al crecimiento vegetativo, a diferencia de lo observado para el fósforo y el nitrógeno, la siembra en medios sin  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  resultó en un bajo promedio de división celular, lo que permite inferir que los filamentos del inóculo no poseerían reservas movilizables importantes de  $\text{Ca}^{++}$ . Esto está de acuerdo con lo observado en plantas superiores, en las que la movilidad del calcio de célula a célula y a través del floema es muy baja. Esto se debe, a que los niveles citoplasmáticos de calcio deben mantenerse bajos para prevenir la precipitación del fósforo inorgánico (como fosfato de calcio, altamente insoluble) y evitar los desórdenes metabólicos que resultarían de su competencia con el  $\text{Mg}^{++}$ , ya que este último está involucrado en la activación de muchas enzimas (Marschner, 1993).

Otro efecto observado en ausencia de calcio en el material estudiado, fue un gran

desarrollo bacteriano en la pared primaria (péctica) de las células vegetativas. Esto podría estar relacionado con un aumento de la susceptibilidad de los mucílagos al ataque por microorganismos, como ha sido verificado en las plantas superiores. En ellas, el fenómeno responde a que en deficiencia de calcio la actividad degradadora de las poligalacturonas se ve favorecida, puesto que las pectinas, como pectatos de calcio, son resistentes a dicha degradación (Cassells y Barlass, 1976).

En lo que se refiere a las numerosas expansiones abortadas de los anillos apicales en el cultivo 1, se deberían a otro importante rol funcional del calcio, como es la regulación de la permeabilidad de la membrana y los procesos relacionados. Su función en la osmorregulación, tiene que ver con la liberación de calcio desde las vacuolas, y los subsecuentes cambios en la permeabilidad de la membrana, permitiendo por ejemplo, los movimientos de *Mimosa* (Drissche, 1978). En el caso de *Oedogonium*, como la expansión de los anillos apicales se debe al aumento en la presión de turgencia por entrada de agua a las vacuolas, la deficiencia extrema de calcio podría ser la causante de las expansiones fallidas. Por otra parte, este proceso también puede haberse visto afectado por la deficiencia de cloruros (ver más arriba).

Es importante tener en cuenta el estado final de los filamentos en ausencia de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , ya que indica que la limitación del crecimiento se habría dado, no por una simple interrupción de las divisiones celulares, sino porque éstas son incompletas y se traducen en teratologías que muy probablemente conduzcan a la muerte de los filamentos. Esto tiene su importancia también desde el punto de vista de la posibilidad de llevar a cabo la reproducción sexual, como se verá más abajo.

Los resultados obtenidos en las distintas concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  ensayadas (cultivos 2-5), permiten inferir que el alga bajo estudio tolera un amplio rango de variación en la concentración de esta sal, al menos en lo que se refiere al crecimiento.

En cuanto a la reproducción sexual, no se desarrolló en el cultivo 1 debido, muy probablemente, a que del 80 % de las células vegetativas producto de la división celular del inóculo, gran cantidad no resultaran viables, y que por lo tanto fueran incapaces de

producir oogonios. Por otro lado, aún si algunas de dichas células fueran viables, la imposibilidad de generar las presiones osmóticas necesarias para la división celular, sería un obstáculo aún mayor para la formación de oogonios, ya que este proceso requiere de la generación de presiones osmóticas mucho más importantes.

La reducción del volumen oogonal conforme aumentó la concentración externa de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , podría deberse a un aumento en la velocidad de endurecimiento del material extendible del anillo apical (que formará la futura pared primaria). Conforme con esto, se ha observado que el  $\text{Ca}^{++}$ , interviene en la formación de dicha pared como nexo entre las pectinas (Carpita y Gibeaut, 1993). A mayor nivel de este catión presente en el medio, más cerrada será la trama y por lo tanto más rígida la pared (Dalessandro y Piro, 1993). Es decir, que es de esperar que un aumento en los niveles de este nutriente, determine que la rigidez del material expansible se produzca más rápido, llevando a un menor volumen final de los oogonios. Algo semejante ocurriría en las células vegetativas, cuya longitud se vió disminuida también como efecto del aumento de la concentración de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . Sin embargo, en el caso del ancho de las células, se produjo el efecto contrario, lo cual podría indicar una anisotropía en las propiedades de extensibilidad de la pared, debida, tal vez, a una orientación definida de las fibrillas de polisacáridos durante la expansión (Carpita y Gibeaut, 1993).

Es importante señalar, que esta variabilidad en las dimensiones, observada como respuesta a condiciones nutricionales, tiene importantes implicancias taxonómicas, ya que dichas dimensiones suelen ser tenidas en cuenta para la definición de taxones infraespecíficos (Mrozinska, 1985). El criterio que generalmente se aplica es el siguiente: si una población de una especie ya descripta, muestra un rango de variación en las dimensiones de una cierta estructura que cae fuera (o apenas se superpone) del rango prescripto en la diagnosis original, se establece una nueva variedad o forma (el criterio varía según los autores). En el caso de *O. stellatum* la diagnosis original señala para los oogonios dimensiones de 51-64  $\mu\text{m}$  diámetro x 56-70  $\mu\text{m}$  long. En los materiales estudiados las dimensiones de dichas estructuras en la muestra original se ajustaron a estos valores. Sin embargo, en el caso de la mayor concentración de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  ensayada, estas dimensiones fueron de 35-52  $\mu\text{m}$  diámetro x 38-55  $\mu\text{m}$  long., lo cual pone en duda la

validez de este tipo de criterio.

Finalmente, queda por discutir el efecto de las concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  en la distribución de los nanandros. Según se sabe, en las células vegetales, el  $\text{Ca}^{++}$  juega un rol fundamental en la detección y transducción de señales externas (Poovaiah y Reddy, 1993). En el caso de *Oedogonium*, la orientación de las androsporas hacia las CMO supone la detección del atrayente sexual femenino, por lo que es muy posible que en este fenómeno esté involucrado el  $\text{Ca}^{++}$ . Esto se vería confirmado por la variación en la proporción de nanandros desarrollados sobre las CMO observada en los resultados, aunque una verificación más ajustada, requeriría de un diseño experimental que analice más puntos intermedios, sobre todo en los niveles más bajos de este catión.

En relación a este mismo tema, es de notar la alta proporción (en todas las concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ) de nanandros desarrollados sobre sustratos diferentes a las CMO. El mismo efecto se observó en los ensayos de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{KNO}_3$ , aunque no fue cuantificado. Lo notable de este fenómeno es que es muy raro de observar en la naturaleza. Esto podría estar indicando que la composición del medio en algún nutriente no considerado como variable en el presente trabajo, tendría algún tipo de influencia negativa sobre la orientación de las androsporas hacia las CMO, o bien sobre la eficacia en la síntesis y/o liberación del atrayente sexual por parte de éstas. Esta observación requiere de futuros estudios.

#### ***Aspectos morfológicos y regulatorios***

La ausencia de nanandros sobre algunas CMO que habían formado oogonios, llama la atención, dado que la fijación de la androspora sobre las CMO es necesaria para la oogoniogénesis, al menos en las especies previamente estudiadas (Rawitzcher-Kunkel y Machlis, 1962; Vélez, 1998). Aunque existe la posibilidad de que los nanandros se desprendan de las CMO (tanto en cultivo como en el momento de tratar el material para su observación) debido a una débil adhesión a su superficie, también es factible que en *O. stellatum* no sea necesario dicho proceso inductor. Desafortunadamente, debido a su condición homotálica, el estudio de su regulación del proceso reproductivo, es un problema de difícil solución, puesto que no es posible aislar cultivos unisexuales para

analizar su comportamiento en forma individual.

Otro resultado llamativo fue la obtención de nanandros curvados a pesar de no haberse fijado sobre una CMO. Esto no coincide con lo descripto para otras especies en las que los nanandros fijados sobre cualquier sustrato diferente a una CMO son rectos (Rawitzcher-Kunkel y Machlis, 1962; Vélez, 1998). Esto estaría indicando que el efecto inductor del crecimiento curvado de los machos enanos que se supone ejerce la CMO, no existiría en todas las especies. También indicaría que en algunas, como la estudiada, el crecimiento curvado del nanandro no está sujeto a una regulación externa, o esta regulación solo tendría influencia sobre la dirección de curvado, ya que al fijarse en las CMO siempre dirigen su ápice hacia el ápice de la CMO, por donde emergerá el oogonio (fig. 16-A y B).

Otro aspecto morfológico de interés, dado que siempre consta en las diagnosis, es el número de oogonios y androsporangios en serie, así como el número de anteridios que forman los nanandros. Como se observa en la tabla IX, los valores obtenidos en cultivo resultaron, en todos los casos, mayores que los referidos tanto en la diagnosis original de la especie, como en la descripción de la población de origen de la cepa estudiada. Esta mayor abundancia en la formación de estructuras sexuales en condiciones de cultivo, ya fue observada por Vélez (1998). Como dicho autor señala, muy probablemente se deba a que en la naturaleza las condiciones en las cuales ocurre la reproducción sexual difícilmente puedan mantenerse durante el período de tiempo necesario para llegar a los valores obtenidos en cultivo.

En cuanto al crecimiento vegetativo de los nanandros, es probable que se deba a pequeñas dosis eventuales de nutrientes (especialmente compuestos nitrogenados), resultado de la actividad bacteriana sobre distintos restos celulares.

La formación de androsporangios por parte de la CMO, indica que en determinadas condiciones ocurre un proceso de masculinización de estas células femeninas. Dado que esto se observó en segmentos muy pobres en contenido celular, es probable que guarde relación con la incapacidad de estas CMO de recuperarse (vía translocación) para seguir

formando oogonios. Sin embargo, sí podrían afrontar el menor costo que implica la generación de androsporangios. Nada puede decirse de los procesos regulatorios implicados en esta reversión.

La fragmentación de las cadenas de oogonios no era frecuente en las muestras de origen (Vélez, *com. pers.*), aunque de haber ocurrido, los oogonios sueltos seguramente se hubieran hundido hacia los sedimentos y habrían sido difíciles de detectar. Es de notar, sin embargo, que la fragmentación de células muertas en las Oedogoniales es un fenómeno común en ciertas ocasiones (Pickett-Heaps, 1975). Como una vez que se formó la pared de la oospora, la del oogonio pierde su contacto con el protoplasto, puede considerarse al oogonio una célula muerta, y explicar de esta forma la referida tendencia a la fragmentación. Un aspecto interesante de esta fragmentación es que facilitaría la separación de las oosporas de las células vegetativas, permitiendo, por ejemplo, el estudio de la composición de ambas fracciones por separado.

## CONCLUSIONES

Salvo en algunos aspectos la tesis de Vélez (1998), el presente estudio no tiene antecedentes en las Oedogoniales, tanto en lo referido a la metodología utilizada, como a muchas de las observaciones realizadas, en especial aquellas relacionadas con la interpretación funcional de la influencia de las concentraciones de nutrientes sobre procesos vegetativos y reproductivos, y la verificación experimental de la dudosa validez de algunos caracteres taxonómicos.

En cuanto al método de recuento desarrollado, debido a que no requiere de aparatos ni técnicas sofisticadas y a su buen ajuste al compararlo con el peso seco, se puede afirmar que es un método suficientemente rápido, sencillo y seguro para estimar el crecimiento en este tipo de organismos. Posee además la ventaja, de que permite discriminar cuantitativamente los diferentes tipos celulares para su posterior tratamiento en forma adecuada.

El modelo tradicional de crecimiento en cultivo de microalgas no puede ser aplicado en forma directa a la especie estudiada. La razón es, que dicho modelo se basa principalmente en los estudios realizados con algas unicelulares o en agregados de distinto tipo, en los que cada célula puede ser considerada un individuo. En el caso de *Oedogonium*, se trata de organismos verdaderamente multicelulares, no sólo desde el punto de vista estructural (dada la presencia de plasmodesmos), sino también funcional. Esto se vio reflejado principalmente en la relación existente entre la eficiencia en la formación de oogonios y el estado fisiológico de los filamentos, el cual mostró, a su vez, depender de las condiciones nutricionales en la fase de crecimiento vegetativo.

Los estudios sobre las dinámicas de utilización de nutrientes como el P y el N, la capacidad de ser acumulados como reserva y movilizados desde ciertas células de la planta hacia otras células para cumplir una función específica (en el caso de *Oedogonium* en la formación de estructuras sexuales), y las mecanismos regulatorios de todos estos procesos, constituyen uno de los temas centrales de la fisiología vegetal (Marschner, 1993). El modelo estudiado en el presente trabajo posee elementos como

para constituir una herramienta de utilidad para contribuir a la comprensión de estos procesos. El arreglo unidimensional y polarizado de las células que conforman los filamentos, constituiría una ventaja con respecto a las plantas superiores.

Sin embargo, la posibilidad de llevar a cabo este tipo de estudios en forma rigurosa, dependerá de que se determine y aisle el factor de suelo necesario para el crecimiento de estas algas. El aislamiento y la purificación de dicha vitamina, y su utilización para la preparación de medios definidos, permitiría controlar con mayor efectividad la obtención de inóculos fisiológicamente homogéneos y mejorar la fidelidad y repetibilidad de los resultados.

Las diferencias observadas con respecto al modelo de integración hormonal de la reproducción sexual de Rawitscher-Kunkel y Machlis (1962), en especial en lo que se refiere a la regulación de la curvatura de los nanandros y a la inducción de la oogoniogénesis, parecen indicar que existiría una gran variedad de modificaciones o matices con respecto a dicho modelo. Este hecho no resulta extraño, considerando la gran variedad de formas y tipos reproductivos que constituyen el género.

También es importante destacar, el adelgazamiento y la decoloración apical de los filamentos, a semejanza de los pelos multicelulares e incoloros observados por Witton (1988) en algunas Chaetophorales. Su presencia únicamente en cultivos deficientes en  $\text{KNO}_3$ , parece indicar que serían estructuras especializadas en la captación de nutrientes.

Finalmente, el valor taxonómico que tradicionalmente se adjudica a las dimensiones de los oogonios (y en menor grado al número de gametangios en serie), en especial para la caracterización de taxones infraespecíficos, queda puesto en duda a partir de su variabilidad en respuesta a las condiciones del medio observadas en este trabajo. En este sentido, vale la pena destacar, que ésta es el primera evidencia experimental de dicha variabilidad, y que deberían llevarse a cabo estudios del mismo tipo especialmente en aquellas especies que incluyen numerosas variedades y formas definidas según este carácter.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente el Dr. Carlos G. Vélez (Memo para los amigos), por haber cambiado mi destino en la biología desde los mamíferos a las Oedogoniales, dirigiendo y apoyando mi formación en todo momento, y a la Dra. María S. Vigna, que me permitió trabajar en sus laboratorios. También a las integrantes del laboratorio, Lic. Ángela Juárez, Lic. Anahí Magdaleno, Lic. Teresa Wenzel, Dra. María Squadrone y Lic. Josefina Alberghina, que me aceptaron cariñosamente y me hicieron un lugar donde ya casi no había, permitiéndome, además, compartir y aprender con ellas este nuevo universo.

Además, debo agradecer al personal de los Lab. de Limnología y Micología, por el préstamo desinteresado del microscopio invertido en el primer caso, y del microscopio Carl Zeiss Axioscop equipado con óptica DIC para las fotografías en el segundo caso.

En especial debo mencionar a la Dra. Inés O'Farrell, de los Lab. de Limnología, a la Dra. Beatriz González, de los Lab. de Biometría y al Dr. José Dadon, de los Lab. de Ecología Marina. A todos ellos mi agradecimiento por el tiempo dedicado a transmitirme los conocimientos necesarios de estadística.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVEAL, K., M. E. FERRARIO, E. C. OLIVEIRA & E. SAR, 1995.** Manual de métodos ficológicos, Publ. Univ. de Concepción, Chile. 863 pp.
- BARCELÓ COLL, J.; G. N. RODRIGO; B. S. GARCÍA & R. S. TAMÉS, 1984.** Fisiología vegetal. 3ra edición. Pirámide S. A., Madrid. 813 pp.
- BATTACHARYA, D., 1997.** Origins of algae and their plastids. Springer Wien New York. 287 pp.
- BOHLIN, K., 1901.** Utkast till de gröna Algernas och Arkegoniaternas Fylogeni. Almqvist & Wiksell, Stockholm.
- BOOTON, G. C., G. L. FLOYD & P. A. FUERST, 1998.** Origins and affinities of the filamentous green algal orders Chaetophorales and Oedogoniales based on 18S rRNA gene sequences. J. Phycol. 34, 312-318.
- BOROWITZKA, M. A. & L. J. BOROWITZKA, 1988.** Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, New York. 477 pp.
- BOURRELLY, P., 1972.** Les algues d'eau douce, initiation à la systématique. I. Les algues vertes. N. Boubée & Cie., París. 569 pp.
- CARPITA, N. C. & D. M. GIBEAUT, 1993.** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. The plant Journal 3 (1), 1-30.
- CASSELLS, A. L. & M. BARLASS, 1976.** Environmentally induced changes in the cell walls of tomato leaves in relation to cell and protoplast release. Physiol. Plant. 37, 239-246.
- CHAUDARY, B.R. & H.V. SINGH, 1988.** Nutritional control on sex differentiation in the filamentous green alga *Oedogonium hatei* Kam. Arch. Protistenk., 136(4): 389- 392.
- CHU, S.P., 1942.** The influence of mineral composition of the medium on the growth of planctonic algae. J. Ecol., 30: 284-325.
- CLEVE, P., 1863.** Iakttagelser ofver den kvilande *Oedogonium-* sporens utveckling. Ofversigt K. Vet.-Akad. Forhandlingar, 4: 247-250.
- COLEMAN, A. W. 1962.** Sexuality. En: Physiology and Biochemistry of algae (Ed. by R. A. Lewin). Academic Press, New York. pp. 711-729.

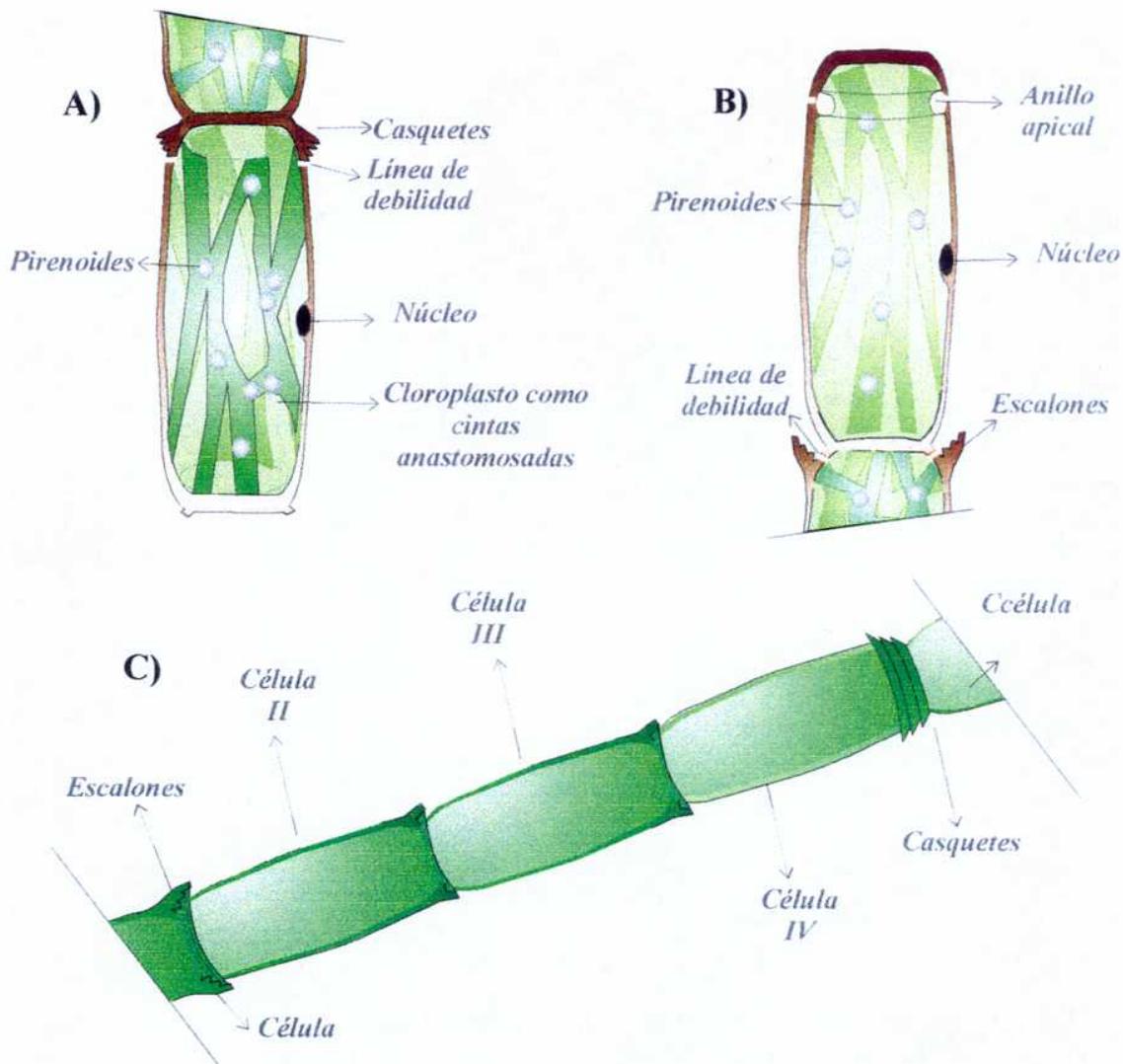
- CONARD, A., 1947.** Sur la division cellulaire chez *Oedogonium*. Acad. Roy. Belg. Classe Sci., 21: 1-87.
- COSS, R.A. & J.D. PICKETT-HEAPS, 1973.** Gametogenesis in the green alga *Oedogonium cardiacum*. I. The cell division leading to formation of spermatids and oogonia. *Protoplasma*, 78: 21-39.
- DALESSANDRO, G. & G. PIRO, 1993.** Role of calcium during biosynthesis, secretion and organization of cell wall polysaccharides. *Giornale Botanico Italiano*, 127 (3): 457-469.
- DODGE J. D., 1973.** The fine structure of algal cells. Academic Press. London, New York. 261 pp.
- DRING, M. J., 1974.** Reproduction. En: Algal Physiology and Biochemistry (W. D. P. Stewart ed.). Blackwell, Oxford. pp. 814-837.
- DRISSCHE, VAN DEN T., 1978.** The molecular mechanism of *Mimosa* leaf seismonastic movement. A re-evaluation. *Arch. Biol.* 89, 435-449.
- FRITSCH, F.E., 1902a.** The structure and development of the young plants in *Oedogonium*. *Ann. Bot.*, 16: 466-485.
- ....., 1902b. The germination of the zoospores in *Oedogonium*. *Ann. Bot.*, 16: 412-417.
- ....., 1904. Algological notes. No 5. Some points in the structure of a young *Oedogonium*. *Ann. Bot.*, 18: 648- 653.
- ....., 1927. A treatise on the British freshwater algae by the late G.S. West. New and rev. ed., Cambridge University Press, 18, 534 pp.
- ....., 1942. Studies in the comparative morphology of the algae. II. The algal life-cycle. *Ann. Bot.*, 6: 533- 563.
- FOGG, G. E., 1975.** Algal cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press. Wisconsin, London., 175 pp.
- GÜSSEWA, K. 1931.** Über geschlechtliche und ungeschlechtliche Fortpflanzung von *Oedogonium capillare* Ktz. im Lichte der sie Bestimmenden Verhältnisse. *Planta*, 12: 293-326.
- HILL, G.J.C., 1980.** Mating induction in *Oedogonium*. En: Gantt E. (ed.) *Handbook of Phycological Methods: Developmental and Cytological Methods*, Cambridge Univ. Press, pp. 25-36.

- HILL, G.J.C. & L. MACHLIS, 1970.** Defined media for growth and gamete production by the green alga *Oedogonium cardiacum*. Plant Physiol., 46: 224-226.
- HILL, G.J.C., M.R. CUNNINGHAM, M.M. BYRNE, T.P. FERRY & J.S. HALVORSON, 1989.** Chemical control of androspore morphogenesis in *Oedogonium donnellii* (Chlorophyta, Oedogoniales). J. Phycol. 25: 368-379.
- HIRN, K.E., 1900.** Monographie et Iconographie der Oedogoniaceen. Acta Soc. Sci. Fenn., 27: 1-395.
- HOFFMAN, L.R., 1960.** Chemotaxis of *Oedogonium* sperms. Southw. Naturalist, 5: 111-116.
- ....., 1971. Observations on the fine structure of *Oedogonium*. VII. The oogonium prior to fertilization. En: Contributions in Phycology (B.C. Parker and R.M. Brown, eds.), Lawrence, Kansas, Allen Press, pp. 93-106.
- IZAGUIRRE, I., 1994.** Sucesiones Fitoplanctónicas. En: Ecosistema de Aguas Continentales. Metodología para su estudio (Lopretto, M. C. & Tell, G. eds.), 1995. Ediciones Sur, La Plata, 1401 pp.
- JOHN, K. R. & R. G. ANDERSON, 1976.** The effect of nitrogen deficiency on aquinate formation in *Pithophora oedogonia*. Journal of Phycology 12 (suppl.): 32.
- JURANYI, L., 1873.** Beitrage zur Morphologie der *Oedogonium*. Jahrb. Wiss. Bot., 9: 1-35.
- LE CLERC, L., 1817.** Sur la fructification du genre prolifere de M. Vaucher. Mus. Hist. Nat. Mem. (Paris), 3: 462-478.
- LUKAVSKÝ, J., 1979.** Algal cultures from the point of view of population genetics. En: Algal assays and monitoring eutrophication (P. Marvan, S. Přibil, O. Lhotský eds.), pp. 141-152.
- KLEBS, G., 1896.** Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena, 1896.
- KRETSCHMER, H., 1930.** Beitrage zur Zytologie von *Oedogonium*. Arch. Protistenk., 71: 101.
- MACHLIS, L., 1962.** The nutrition of certain species of the green alga *Oedogonium*. Am. J. Bot., 49: 171-179.

- POOVAIAH, B. W. & A. S. N. REDDY, 1993.** Calcium and signal transduction in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 12 (3): 185-211.
- RAWITSCHER-KUNKEL, E. & MACHLIS, L., 1962.** The hormonal integration of sexual reproduction in *Oedogonium*. Am. J. Bot., 49: 177-183.
- RAYBURN, W. R. 1974.** Sexual reproduction in *Pandorina unicocca*. Journal of Phycology 10: 258-265.
- ROGNES, S. E., 1980.** Anion regulation of lupin asparagine synthetase: Chloride activation of the glutamine-utilizing reaction. Phytochemistry 19, 2287-2293.
- SAGAR, R. & S. GRANICK, 1954.** Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of General Physiology 37: 729-742.
- SCHERFFEL, A., 1901.** Einigen Beobachtungen über *Oedogonium* mit halbkugeliger Fusszelle. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 19: 557-563.
- SINGH, H. V. & B. R. CHAUDHARY, 1988.** Effects of certain environmental factors on the formation of oogonium in *Oedogonium hatei* Kam. Proc. Indian natn. Sci. Acad. B54 n° 6, pp. 425-428.
- ....., 1990. Nutrient effects on the formation of oogonia in *Oedogonium hatei* (Chlorophyta). Phycologia, 29 (3): 332-337.
- SMITH, G. M., 1933.** The Freshwater Algae of the United States. McGraw-Hill, New York and London, 716 pp.
- SOKAL R. R. && R. F. JAMES, 1981.** Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 2da edición. New York, N Y: Freeman, 859 pp.
- STARR, R.C. & J.A. ZEIKUS, 1993.** UTEX- The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. J. Phycol, 29 (2): 1-106.
- STEIN, J. R., 1973.** Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge at the University Press, 448 pp.
- STEINECKE, F., 1929.** Hemizellulosen bei *Oedogonium*. Bot. Arch., 24: 391-403.
- STRASBURGER, E., 1880.** Zellbildung und zellteilung, Jena, 392 pp.
- TSCHERMAK, E., 1943.** Vergleichende und experimentelle Cytologische untersuchungen an der Gattung *Oedogonium*. Chromosoma, 5:493-518.
- TUTTLE, A.H., 1910.** Mitosis in *Oedogonium*. J. Exp. Zool., 9: 143-157.
- VAN DEN HOEK, C., D.G. MANN & U.M. JAHNS, 1995.** Algae. An introduction to phycology. Cambridge University Press, 623 pp.

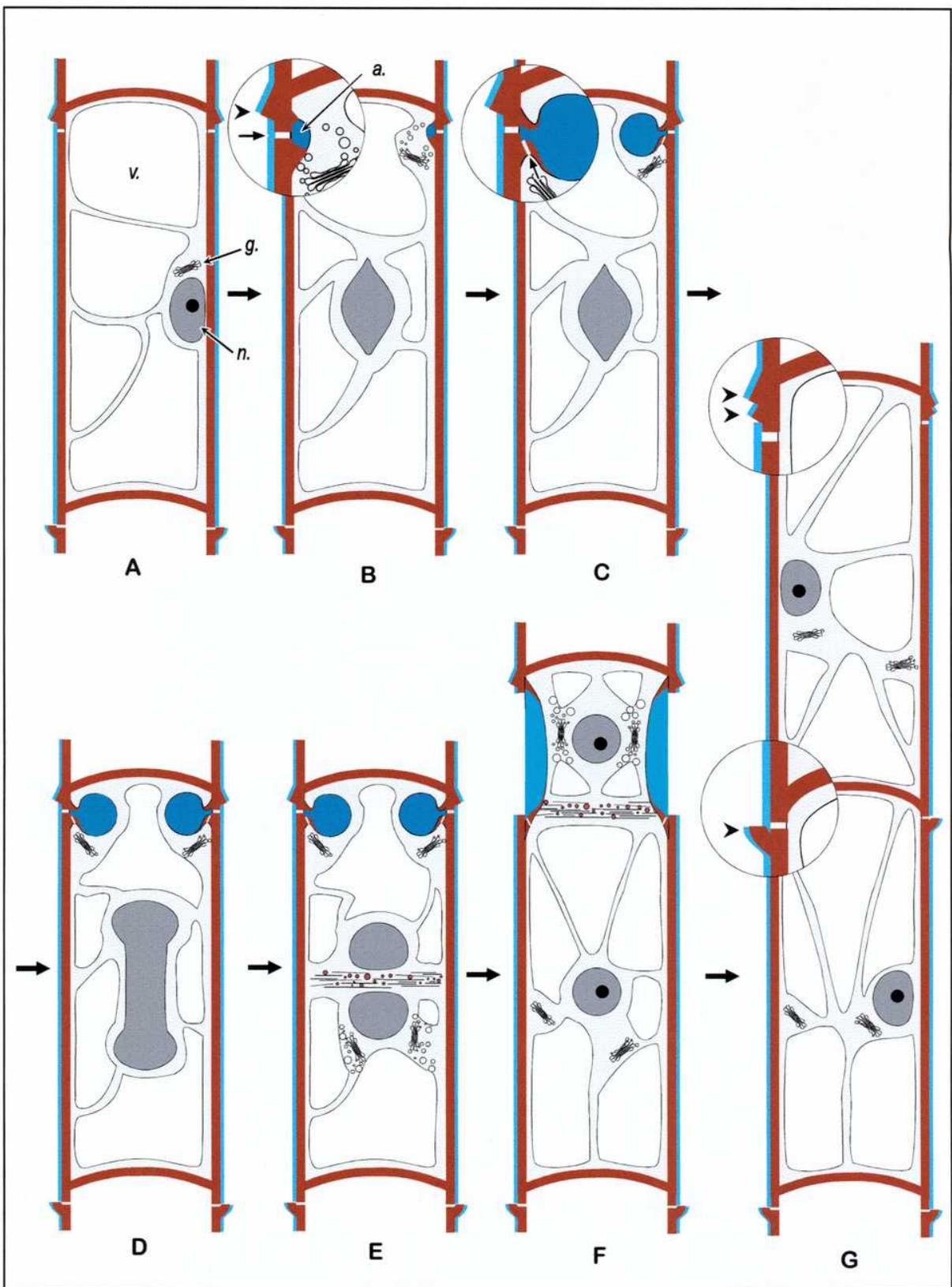
- VELEZ, C.G., 1995.** Oedogoniales (Chlorophyta) de la República Argentina. IV. Bol. Soc. Arg. Bot., 31(1-2): 113-123.
- ....., 1998. El orden Oedogoniales (Chlorophyceae): Biología y taxonomía de especies seleccionadas. Tesis doctoral, Universidad de Bs. As., Facultad de Cs. Exactas y Naturales, Dto de Cs. Biológicas, 164 pp.
- VENKATARAMAN, G. S., 1969.** The cultivation of algae. Indian Council of Agricultural Research, 319 pp.
- VENRICK, E. L., 1978.** How many cells to count?. En: Phytoplankton Manual. Ed. Unesco (A. Sournia, ed.), pp 167-180 .
- WHITTON, B. A., 1988.** Hairs in eukaryotic algae. En: Round, F. E. (ed.), Algae and aquatic environment, Biopress Ltd., Bristol, pp. 446-460.
- WISSELINGH, C. VON, 1908.** Ueber den Ring und die Zellwand bei *Oedogonium*. Beih. Bot. Centralbl., 23(1): 157-190.

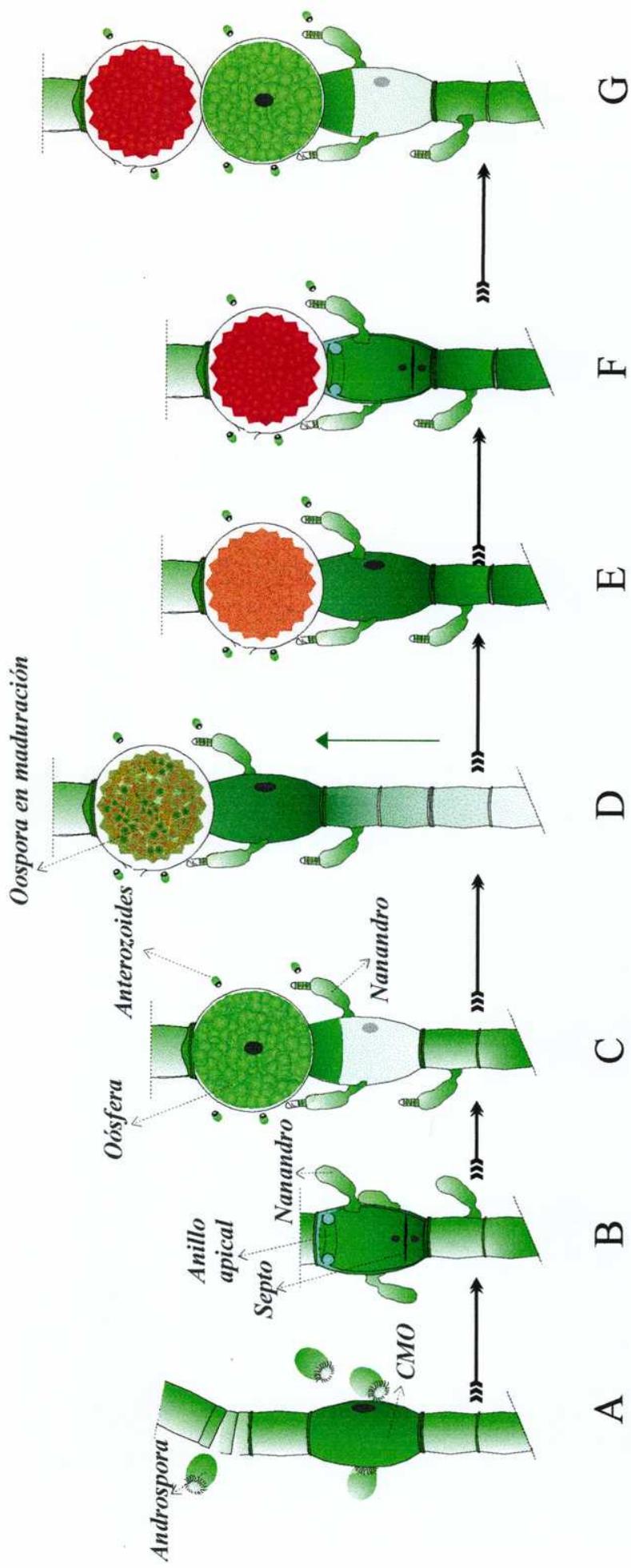
# ***FIGURAS***



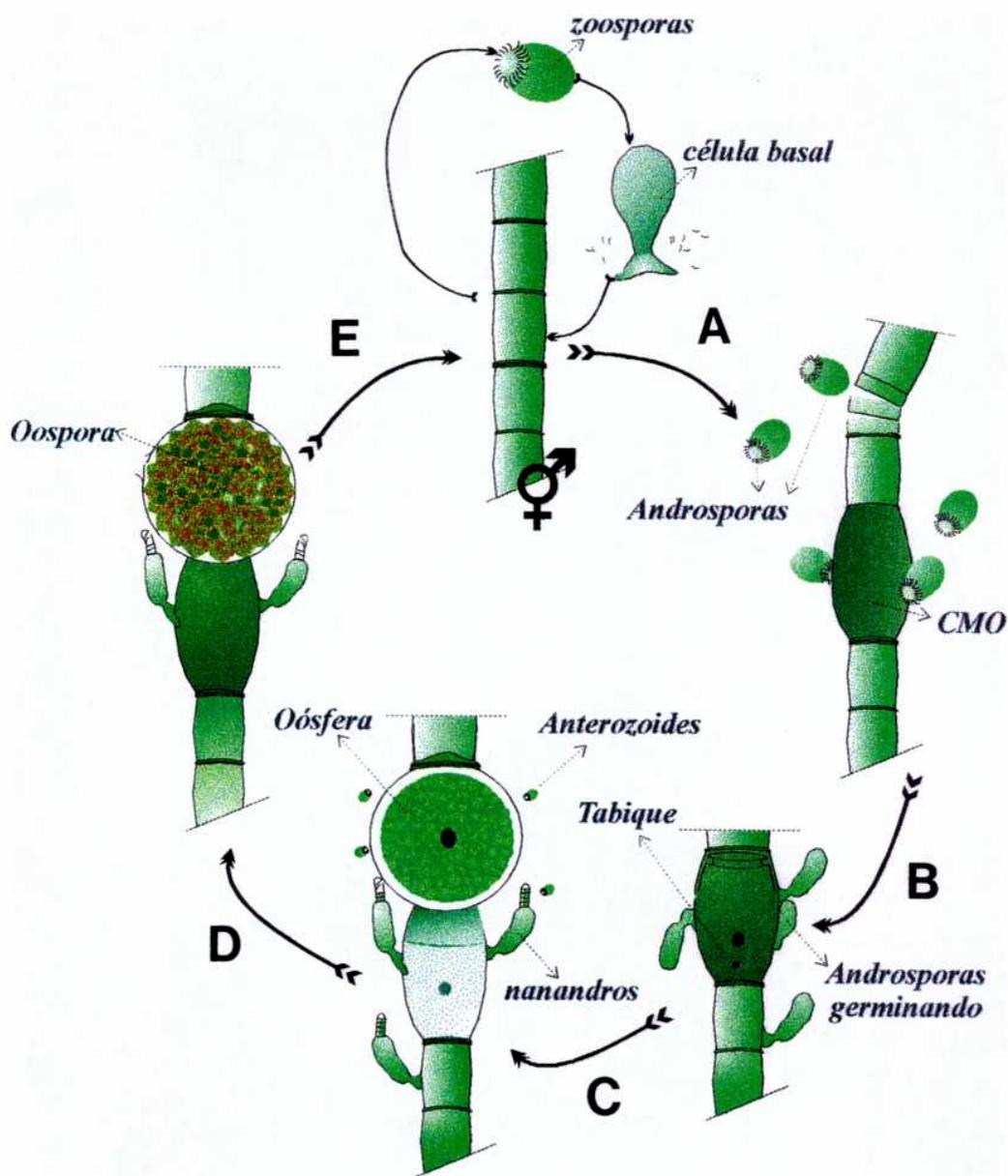
**FIGURA 1: Porción vegetativa y división celular**

- La célula posee un cloroplasto cilíndrico que ocupa casi todo el citoplasma y desplaza al núcleo lateralmente. Es reticulado, formado por cintas anastomosadas y posee pirenoides en dichas anastomosis.
- La pared secundaria tiene apicalmente una línea de debilidad, adyacente a la misma, se deposita material amorfó del golgi formando el “anillo apical”.
- La célula I se divide tres veces, determinando tres escalones. A su vez, la célula II (hija de I), se divide también generando un escalón, y la célula III (hija de II) hace lo mismo. Es así, que la célula IV posee tres casquetes, uno perteneciente a la célula II, otro de la célula III y el otro propio (para mayor información leer el texto).



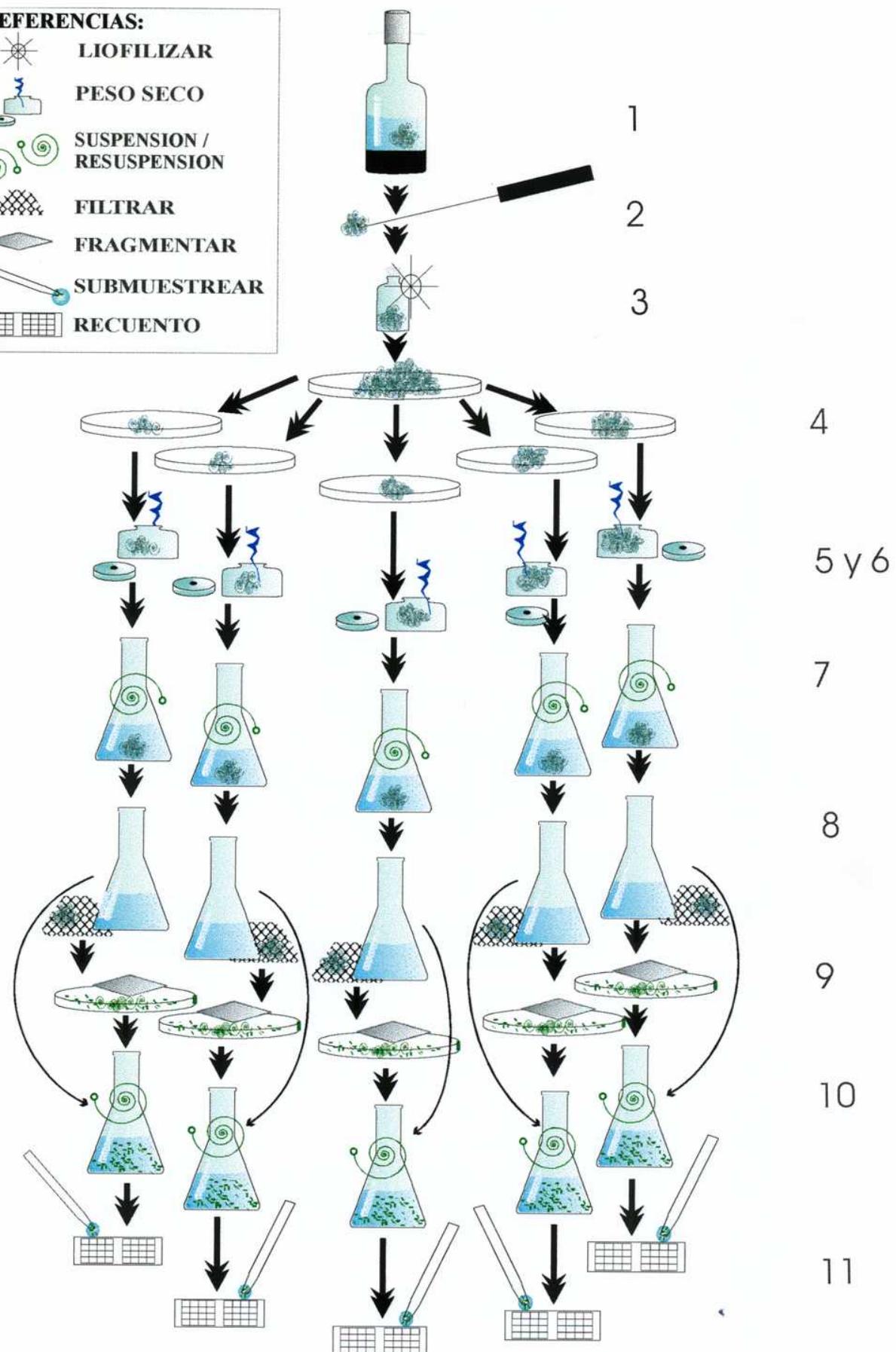


**FIGURA 3: Formación de oogonios en *Oedogonium*.** A-C. Formación del primer oogonio. A. Las androsporas se fijan cerca o sobre la CMO (célula madre de los oogonios); B. La CMO se divide en forma asimétrica, notar el septo en la parte inferior de dicha célula; C. La mayor parte del contenido de la CMO pasa al oogonio recién formado; D-G. Formación del segundo oogonio. D. La CMO recupera su contenido mediante un proceso de translocación de metabolitos desde las células vegetativas; E. CMO recuperada; F-G. iguales a B-C.

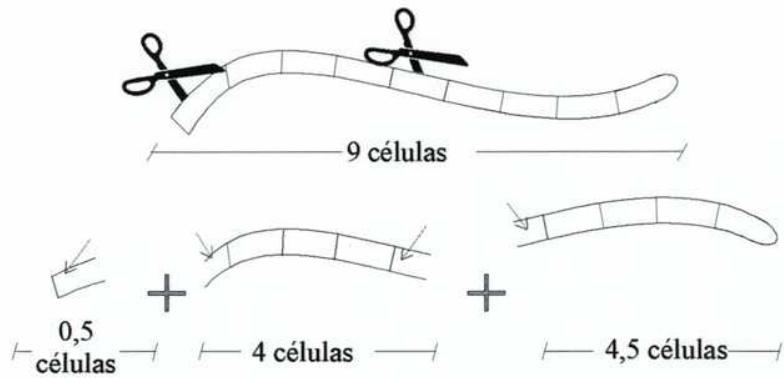


**FIGURA 4:** Ciclo de vida de *Oedogonium stellatum* Wittrock.  
(CMO) célula madre de los oogonios .

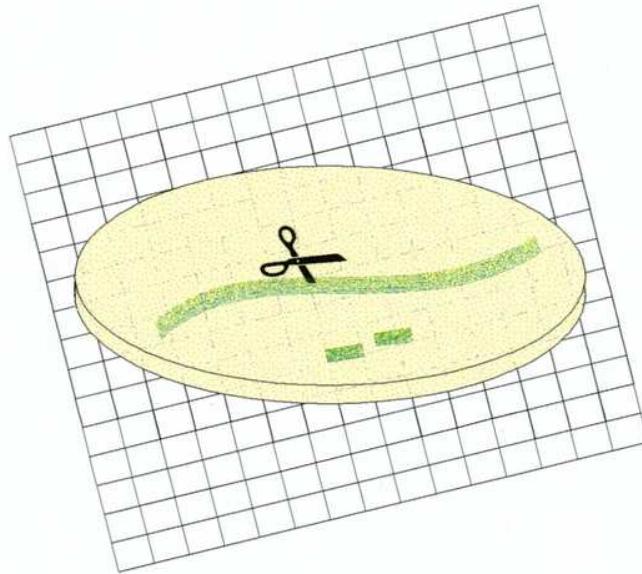
- Se desarrollan androsporangios y CMO. Las androsporas nadan hasta fijarse sobre el filamento.
- Una vez fijadas, las androsporas se desarrollan en nanandrocytes. Las CMO se dividen formando los oogonios, los nanandrocytes producen anteridios y anterozoides.
- Los anterozoides nadan hasta fecundar la oósfera, mientras la CMO se recupera como para formar un nuevo oogonio (ver fig. 3).
- Luego de un período de dormición, la oospora madurará hasta formar zoosporas de origen sexual que reiniciarán el ciclo.



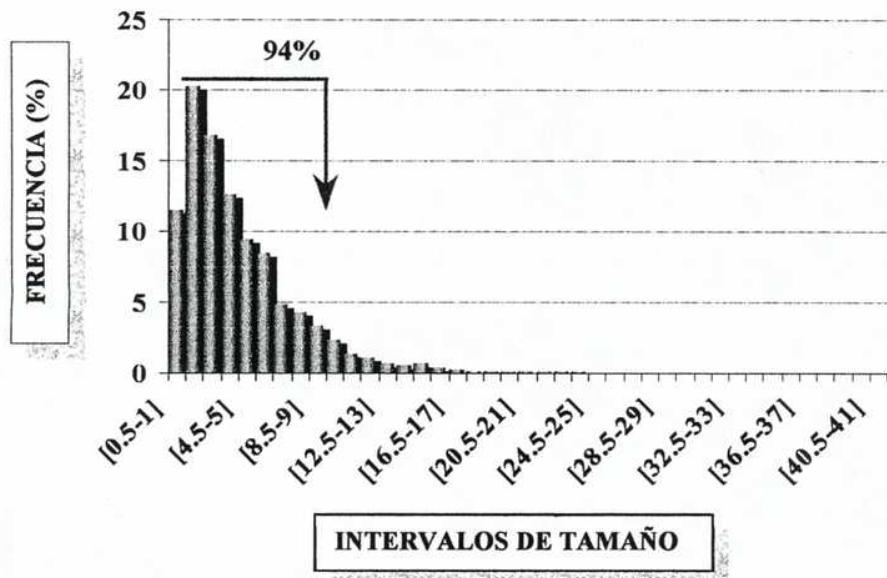
**FIGURA 5: Método de cuantificación del crecimiento e inducción de la reproducción sexual.** La numeración se correlaciona con el texto.



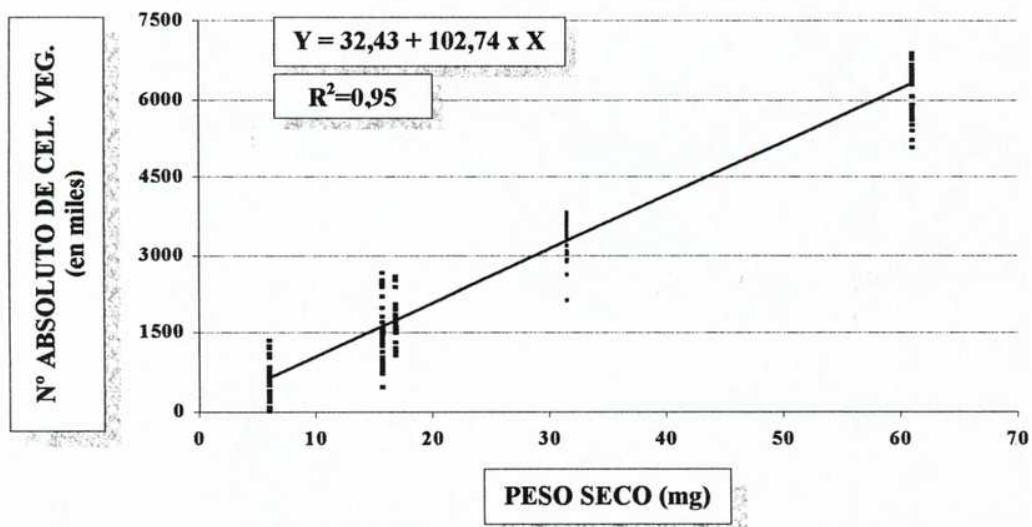
**FIGURA 6:** Método de recuento celular. Las células enteras se contabilizan como “una célula”, mientras que las partidas se toman como “media célula” .



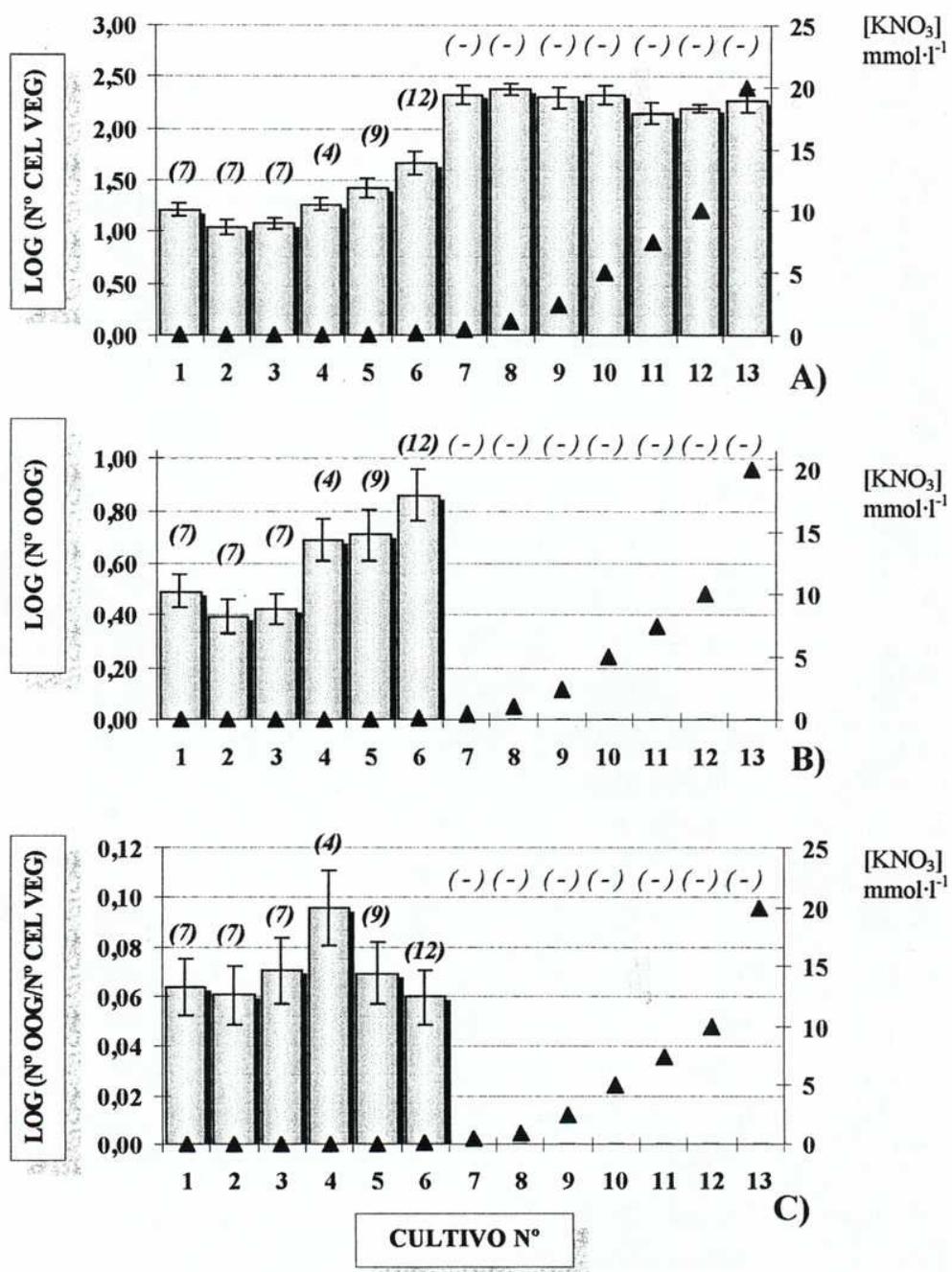
**FIGURA 7:** Corte de las porciones a inocular. Los filamentos se colocan sobre agar-extracto formando una haz isodiamétrico de 1 mm de espesor y se cortan con tijera de disección en fragmentos de 5 mm.



**FIGURA 8:** Distribución de los tamaños de los fragmentos obtenidos según el método de recuento propuesto. El 94% de los fragmentos poseen un tamaño de entre 0,5 y 10 células.



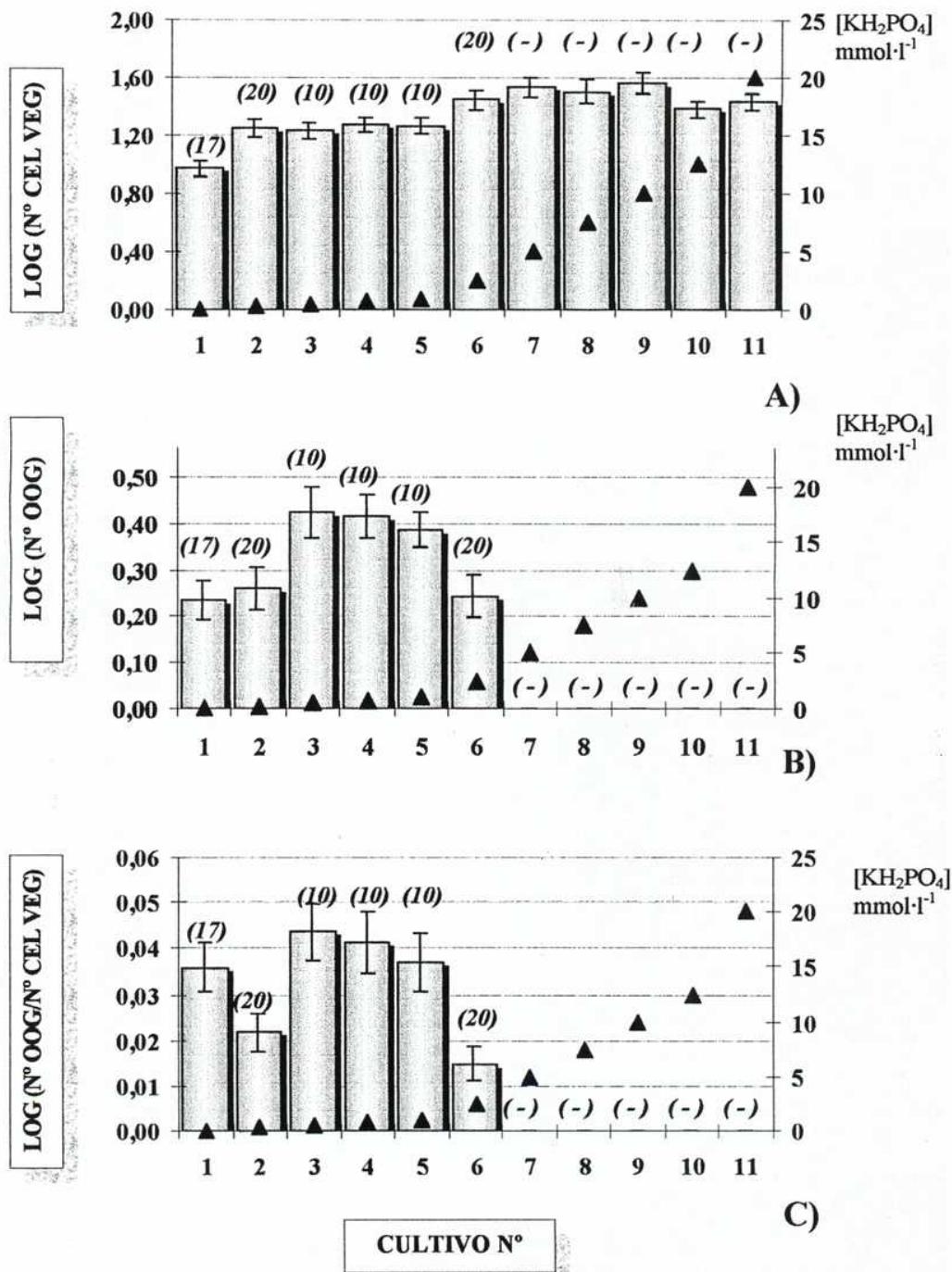
**FIGURA 9:** Relación lineal entre los valores de peso seco y nº absoluto de células. La pendiente de regresión resultó significativa ( $p<0,0001$ ).



**FIGURA 10:** Influencia de las concentraciones de nitrógeno ensayadas (tabla II) sobre:

- A) Crecimiento vegetativo.
- B) Formación de oogonios.
- C) Relación n° de oogonios por célula vegetativa.

Entre paréntesis se indican los días transcurridos hasta la formación de los primeros oogonios, - producción nula de oogonios. ▲ Concentración de KNO<sub>3</sub>.

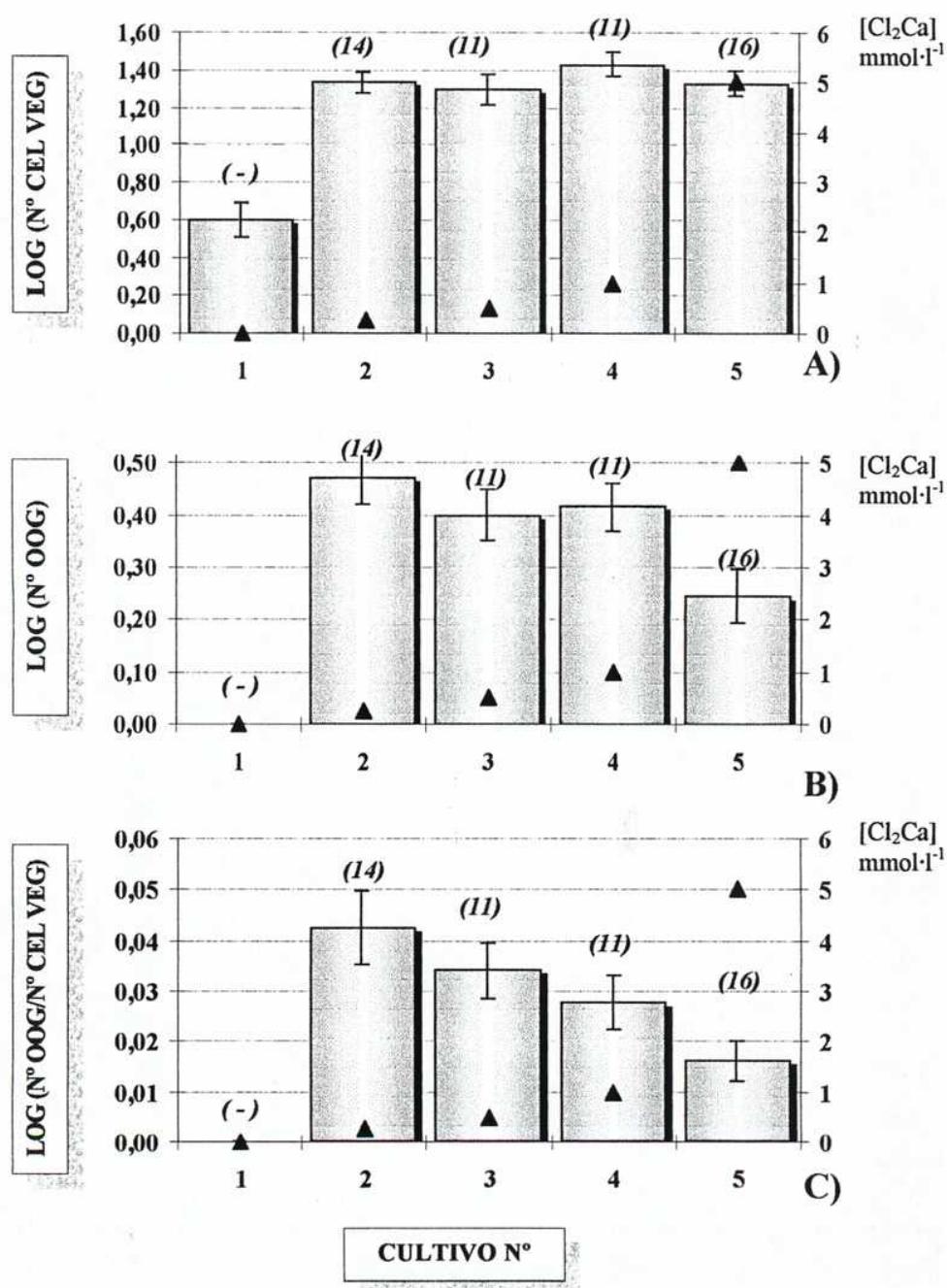


**FIGURA 11:** Influencia de las concentraciones de fósforo ensayadas (tabla III) sobre:

- A) Crecimiento vegetativo.
- B) Formación de oogonios.
- C) Relación nº de oogonios por célula vegetativa.

La concentración de KNO<sub>3</sub> es de 0,01 mM.

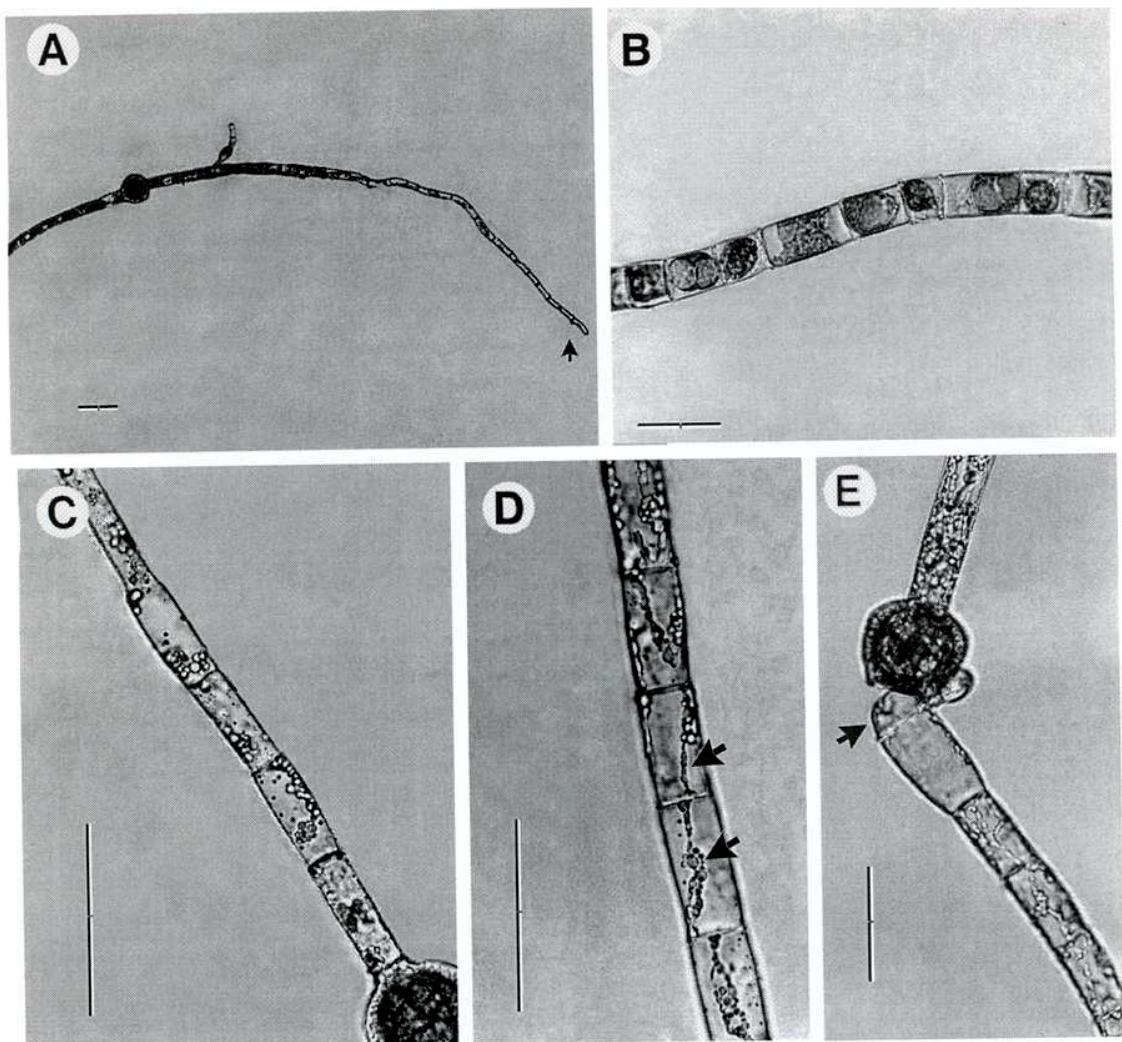
Entre paréntesis se indican los días transcurridos hasta la formación de los primros oogonios, - producción nula de oogonios. ▲ Concentración de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.



**FIGURA 12:** Influencia de las concentraciones de cloruro de calcio ensayadas (tabla IV) sobre:  
 A) Crecimiento vegetativo.  
 B) Formación de oogonios.  
 C) Relación nº de oogonios por célula vegetativa.

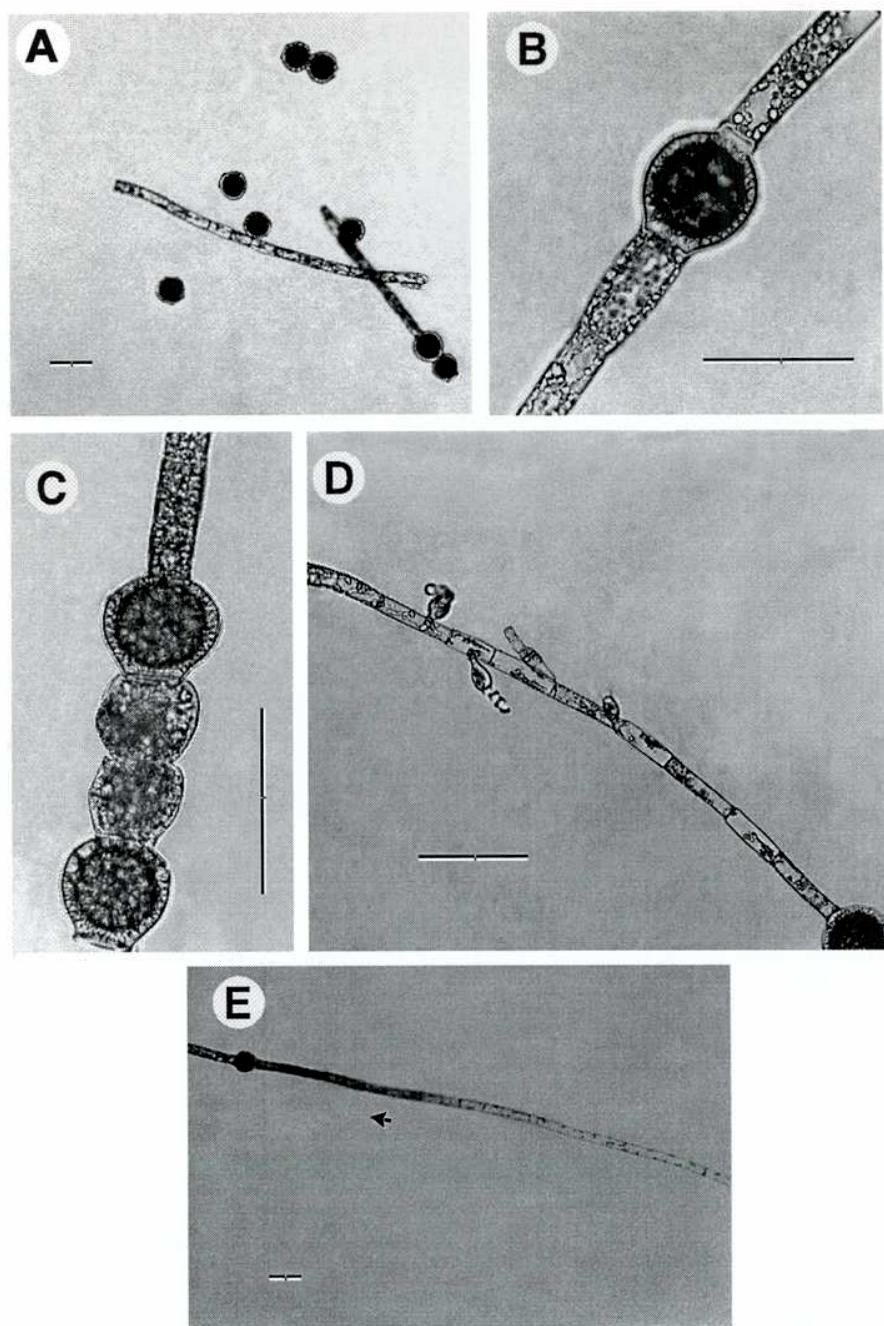
La concentración de KNO<sub>3</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> son 0,01 mM y 0,5 mM respectivamente.

Entre paréntesis se indican los días transcurridos hasta la formación de los primros oogonios, - producción nula de oogonios. ▲ Concentración de Cl<sub>2</sub>Ca.



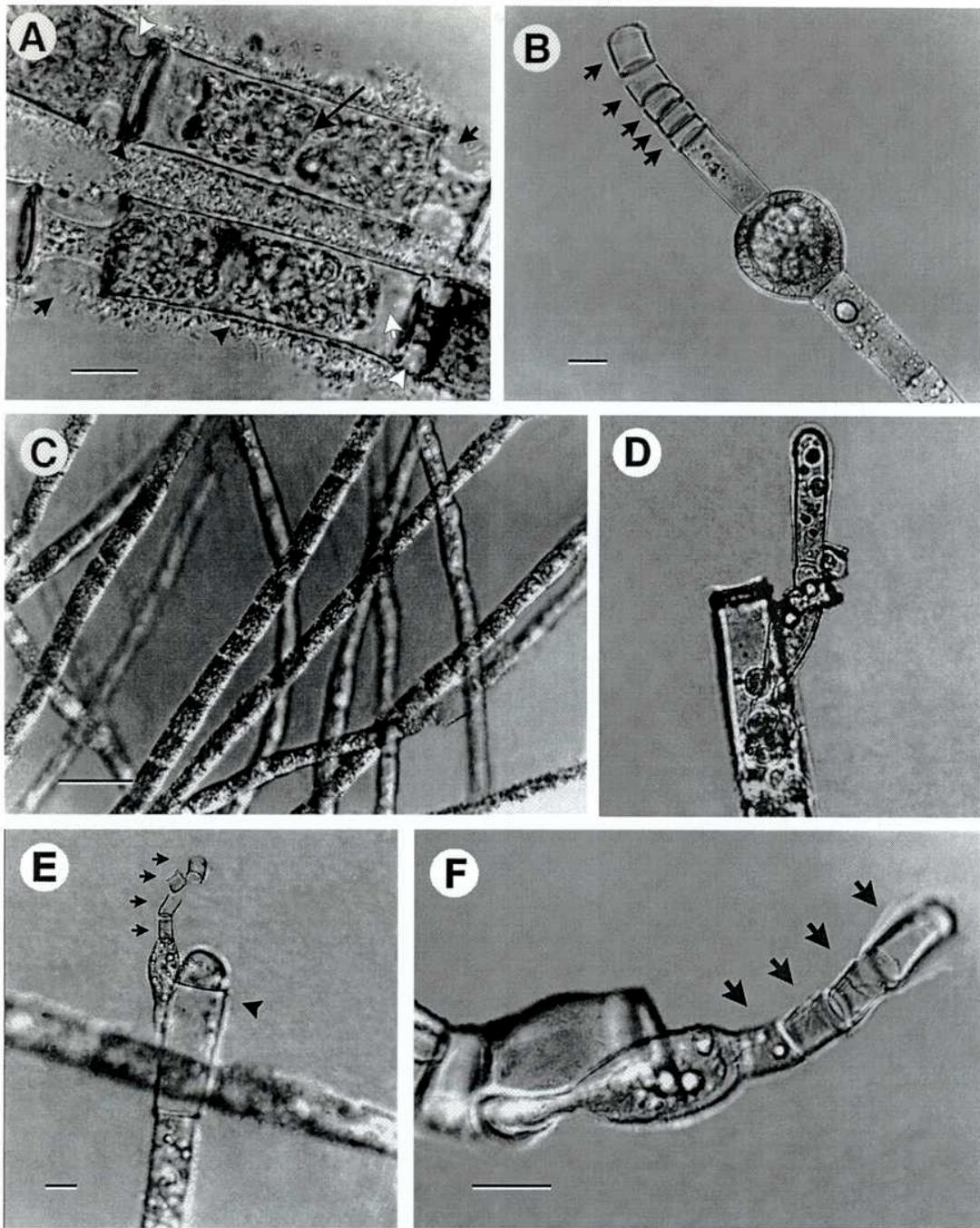
**FIGURA 13 A-E: Influencia de las concentraciones de nitrógeno sobre algunos caracteres morfológicos.**

**A.** Adelgazamiento apical de las células vegetativas y decoloración de las mismas hacia el ápice del filamento (flecha). [N]: 0,00 mM. **B.** Plasmólisis de las células vegetativas en altas concentraciones de nitrógeno. [N]: 20,00 mM. **C.** Cloroplasto cargado de gútulas de aceite en cultivos en etapa senescente. [N]: 0,01 mM. **D.** Células muy pobres en contenido celular, nótese el cloroplasto representado por pequeñas hebras (flecha). [N]: 0,01 mM. **E.** Desprendimiento del oogonio debido a la producción de androsporangios (flecha) por parte de la CMO. [N]: 0,10 mM. **Escala = 100 μm.**



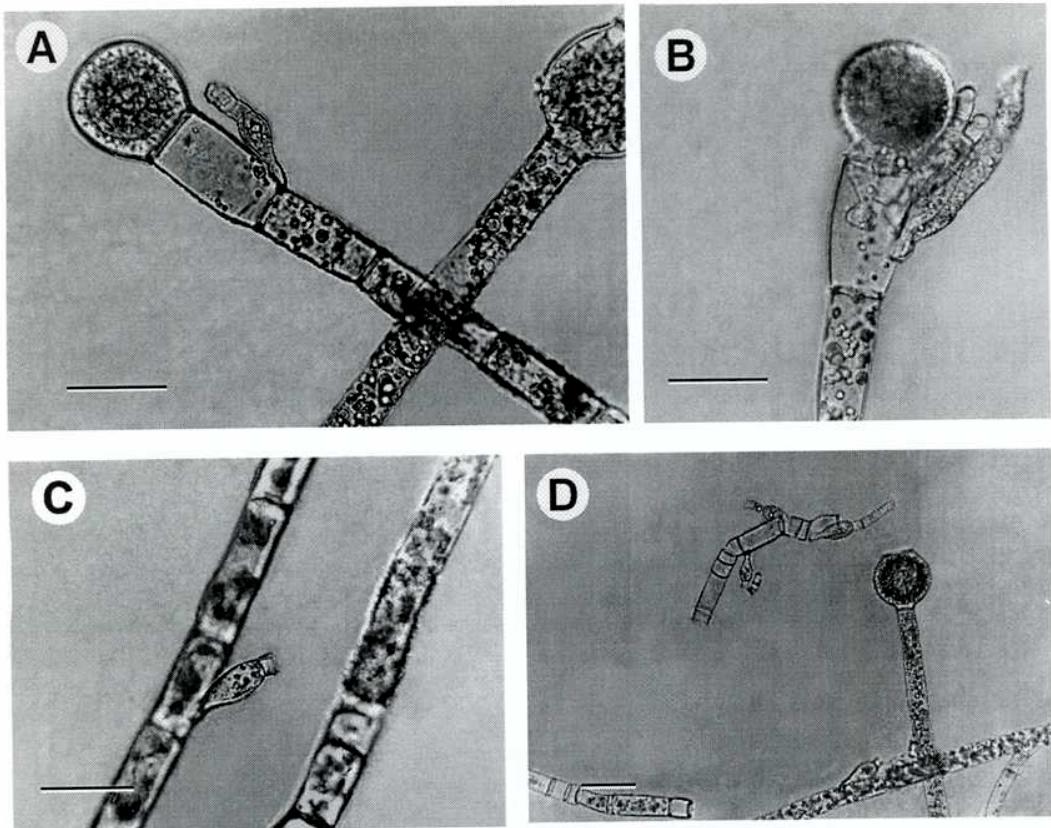
**FIGURA 14 A-E: Influencia de las concentraciones de nitrógeno sobre algunos caracteres morfológicos.**

A. Oogonios sueltos, producidos por el “empuje” de los androsporangios generados a partir de las CMO; [N]: 0,01 mM. B. Oogonios sin nanandros fijados sobre la CMO; [N]: 0,01 mM. C. Oogonios en serie, en este caso se pueden observar cuatro oogonios en serie, los dos centrales abortados; [N]: 0,01 mM. D. Nanandros fijados sobre el filamento, lejanos a cualquier oogonio o CMO; [N]: 0,05 mM. E. Evidencia de translocación hacia la CMO. Se puede observar que el contenido de las células vegetativas es mayor cuanto más cercanas están a la CMO (flecha); [N]: 0,00 mM. Escala = 100  $\mu$ m.



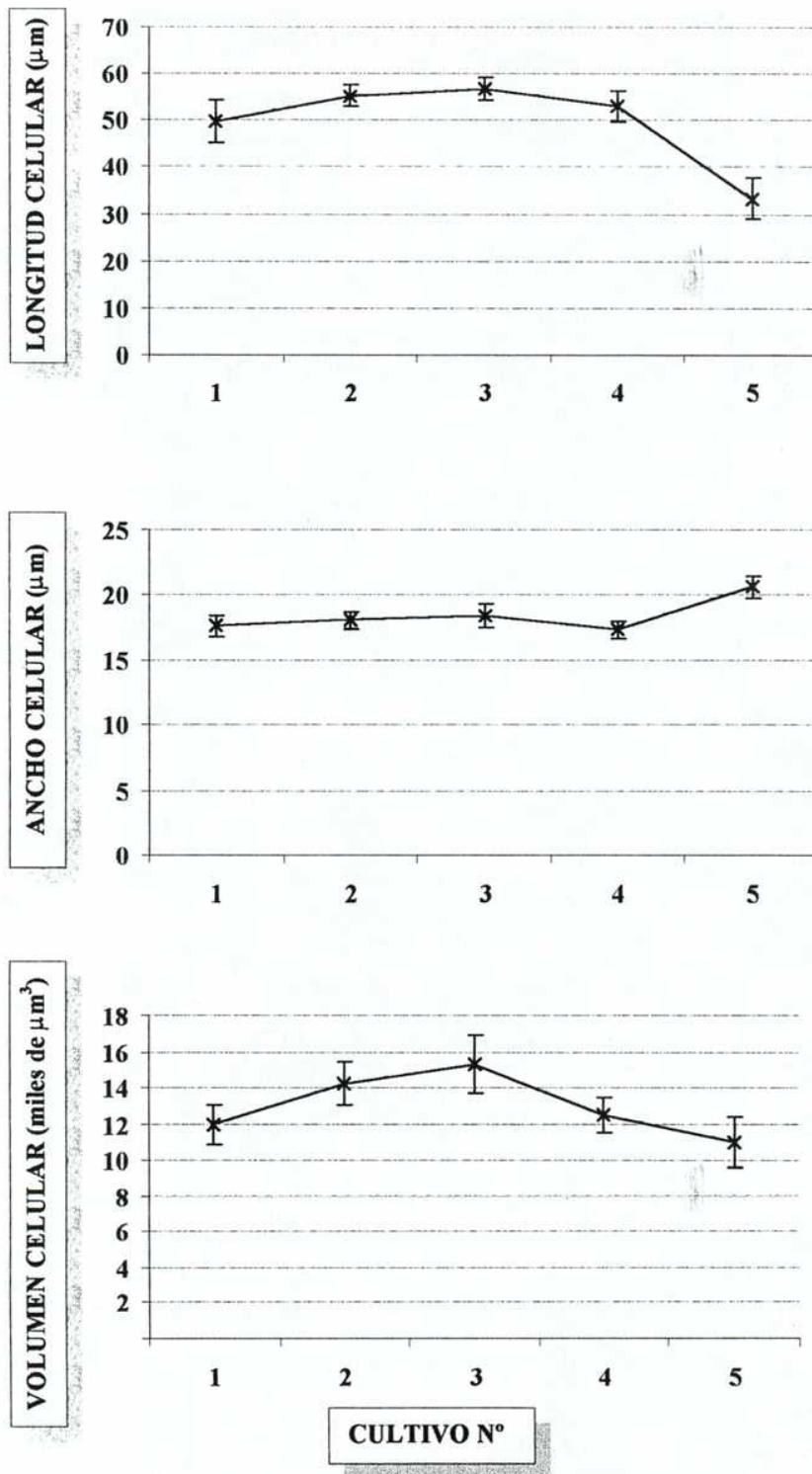
**FIGURA 15 A-F: Influencia de las concentraciones del cloruro de calcio sobre algunos caracteres morfológicos.**

A. Divisiones celulares abortadas. Se pueden observar anillos apicales sin expandir (flechas blancas) o expansiones abortadas (flechas), y desarrollo bacteriano (puntas de flecha) sobre toda la superficie del filamento. Se puede observar la falta de desplazamiento del septo (flecha larga). Notar también la plasmólisis del protoplasto (punta de flecha blanca).  $[Cl_2Ca]$ : 0,00 mM. Optica Nomarski. B. Serie de cinco androsporangios (flechas).  $[Cl_2Ca]$ : 1,00 mM. Optica Nomarski. C. Acortamiento y ensanchamiento de las células vegetativas en altas concentraciones de cloruro de calcio. Comparar con fig. 14-A.  $[Cl_2Ca]$ : 5 mM. Optica Nomarski. D. Crecimiento vegetativo del nanandro. La flecha larga indica la célula pie que se dividió para dar origen a una célula vegetativa (flecha corta). Nótense los anteridios desplazados (punta de flecha).  $[Cl_2Ca]$ : 0,25 mM  $Cl_2Ca$ . E. y F. Nanandro con 4 anteridios (flecha). Notar en la fig. 14-E la CMO transformada en CMAd (punta de flecha). Cultivo: 0,25 mM  $Cl_2Ca$ . Optica Nomarski. Escalas: figs. A, D-F = 20  $\mu m$ ; figs. B y C = 50  $\mu m$ .



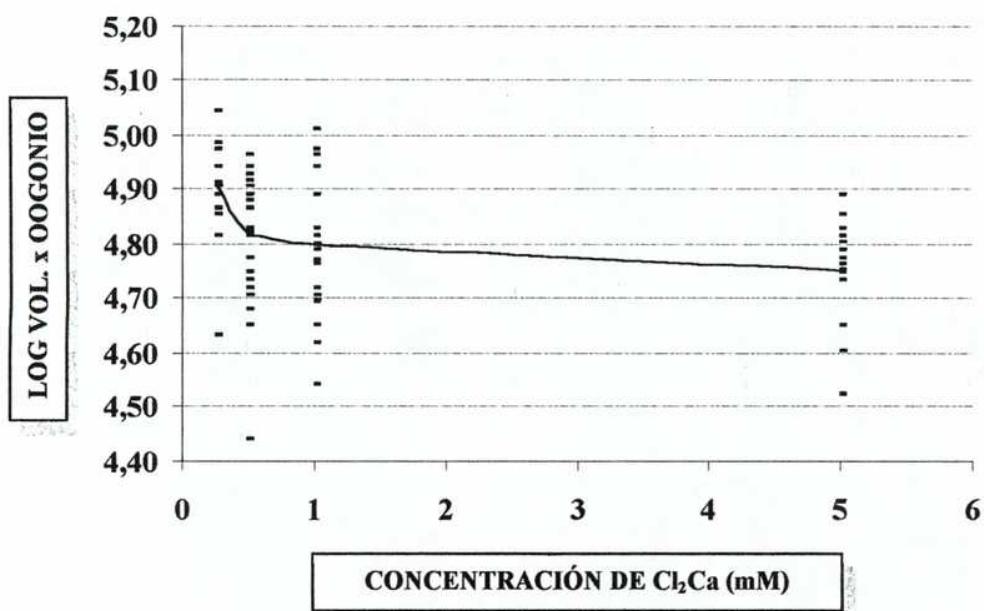
**FIGURA 16 A-D: Influencia de las concentraciones del cloruro de calcio sobre algunos caracteres morfológicos.**

**A y B.** Nanandros fijados sobre la CMO  $[Cl_2Ca]: 0,5 \text{ mM}$ . **C.** Nanandros fijados lejos de la CMO; se puede observar que los nanandros se curvan  $[Cl_2Ca]: 0,25 \text{ mM}$ . **D.** Nanandros fijados lejos de la CMO; los nanandros se fijan incluso sobre los androsporangios  $[Cl_2Ca]: 0,25 \text{ mM}$ . Escala =  $50 \mu\text{m}$ .

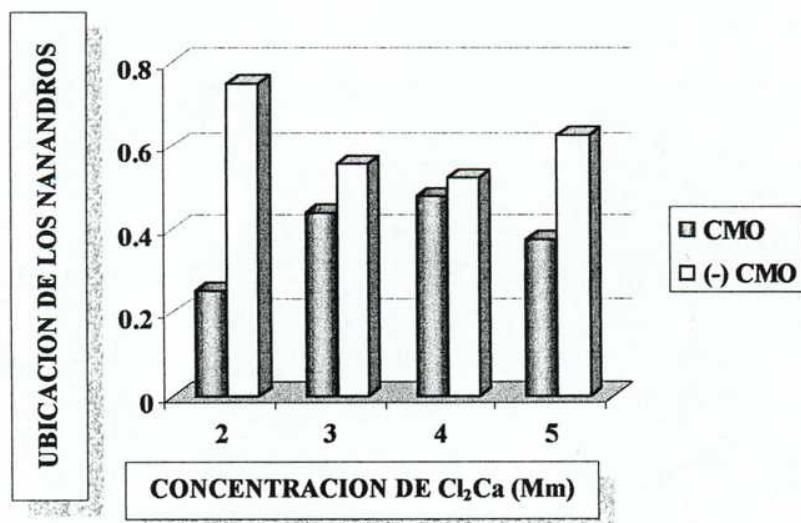


**FIGURA 17: Influencia de las concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  sobre:**

- Longitud de las células vegetativas.* La longitud en el cultivo n° 5 es significativamente menor ( $p<0,05$ ).
- Ancho de las células vegetativas.* El ancho en el cultivo n° 5 es significativamente mayor ( $p<0,05$ ).
- Volumen de las células vegetativas.*



**FIGURA 18:** Relación de dependencia entre el volumen de cada oogonio vs. la concentración de Cl<sub>2</sub>Ca ( $p<0,05$ ). Los datos de volumen de los oogonios fueron transformados en logarítmicos antes del análisis (la curva indica la media). Ver tabla VIII.



**FIGURA 19:** Ubicación de los nanandros de acuerdo a la concentración de Cl<sub>2</sub>Ca . (CMO) proporción de nanandros fijados sobre la célula madre de los oogonios; ((-) CMO) proporción de aquellos no fijados sobre la CMO.

# *TABLAS*

Soluciones stock	Diluciones ( $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$ )		
	A <sup>a</sup>	A <sup>b</sup>	A <sup>c</sup>
	(N: 0,01 mM)	(N: 0,01 mM; P: 0,5 mM)	
KNO <sub>3</sub> (1,0 M)	†	0,01	0,01
MgSO <sub>4</sub> (0,1 M)	10,00	10,00	10,00
CaCl <sub>2</sub> (0,1 M)	5,00	5,00	*
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,1 M)	10,00	*	5,00
B <sub>12</sub> (2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0,40	0,40	0,40
Micronutrientes <sup>d</sup>	20,00	20,00	20,00

Micronutriente	Solución stock	Solución
	de cada sal (g·100 ml <sup>-1</sup> )	de micronutrientes <sup>e</sup> (ml·l <sup>-1</sup> )
N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>3</sub> <sup>f</sup>	1,910	20
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	4,770	10
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,250	10
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,238	10
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,198	10
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,287	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,177	10
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,278	50

**TABLA I: A. Preparación de los medios definidos para crecimiento e inducción de la reproducción sexual.** Todos los medios se llevan a pH 6,8 con KOH antes de ser autoclavados. <sup>a</sup>Hill (1980) †(ver tabla II); los otros dos medios constituyen las variantes desarrolladas durante el presente trabajo. <sup>b</sup>Utilizado en el gradiente de fósforo \* (ver tabla III). <sup>c</sup>Utilizando en el gradiente de Ca \*(ver tabla IV). <sup>d</sup>**B. Composición y preparación de la solución de micronutrientes.** <sup>e</sup>Las sales se agregan respetando la secuencia indicada, en 750 ml de agua bidestilada; antes de la adición del FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, el pH se ajusta a 2,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y luego se lleva el volumen a 1 l. Se guarda a 4°C. <sup>f</sup>Ácido nitrilotriacético, quelante.

II)

Cultivo nº	Concentración (mM)	Cultivo nº	Concentración (mM)
1	0	8	1
2	0,001	9	2,5
3	0,005	10	5
4	0,01	11	7,5
5	0,05	12	10
6	0,1	13	20
7	0,5		

**TABLA II: Influencia del nitrógeno.**

Equivalencias entre el número de cultivo y la concentración de  $\text{KNO}_3$ .

III)

Cultivo nº	Concentración (mM)	Cultivo nº	Concentración (mM)
1	0	7	5
2	0,25	8	7,5
3	0,5	9	10
4	0,75	10	12,5
5	1	11	20
6	2,5		

**TABLA III: Influencia del fósforo.**

Equivalencias entre el número de cultivo y la concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

IV)

Cultivo nº	Concentración (mM)	Cultivo nº	Concentración (mM)
1	0	4	1
2	0,25	5	5
3	0,5		

**TABLA IV: Influencia del calcio.**

Equivalencias entre el número de cultivo y la concentración de  $\text{CaCl}_2$ .

En todos los casos el cultivo nº 1 fue considerado como control.

<b>Peso seco</b> (mg)	<b>Recuento celular</b> (en miles)
5,8	610,703 ± 61,587
15,5	1 638,889 ± 188,113
16,6	1 674,769 ± 150,135
31,4	3 312,500 ± 343,267
61,0	6 073,232 ± 387,671

**TABLA V: Valores absolutos de recuento celular para cada dato de peso seco.** La pendiente de regresión resultó significativa ( $p<0,0001$ ). Los valores se expresaron como la media de los valores ± error estándar.

NITROGENO				
Nº de cultivo	Cel. veg (en miles)	Oog (en miles)	Veg/oog	Oog/veg
1	<b>496</b> ± 84 (38)	<b>72</b> ± 17 (38)	<b>6</b> ± 1 (36)	<b>0,163</b> ± 0,033 (38)
2	<b>330</b> ± 51 (38)	<b>50</b> ± 10 (38)	<b>6</b> ± 1 (30)	<b>0,155</b> ± 0,031 (38)
3	<b>339</b> ± 46 (40)	<b>56</b> ± 11 (40)	<b>5</b> ± 1 (35)	<b>0,184</b> ± 0,037 (40)
4	<b>569</b> ± 108 (33)	<b>132</b> ± 27 (33)	<b>4</b> ± 1 (32)	<b>0,256</b> ± 0,046 (33)
5	<b>878</b> ± 168 (25)	<b>144</b> ± 35 (25)	<b>6</b> ± 1 (25)	<b>0,174</b> ± 0,036 (25)
6	<b>1430</b> ± 299 (17)	<b>203</b> ± 60 (17)	<b>7</b> ± 1 (17)	<b>0,150</b> ± 0,029 (17)
7	<b>6438</b> ± 1370 (14)	<b>0</b> ± 0 (14)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (14)
8	<b>6810</b> ± 1133 (10)	<b>0</b> ± 0 (10)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (10)
9	<b>6013</b> ± 1379 (11)	<b>0</b> ± 0 (11)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (11)
10	<b>6203</b> ± 1225 (9)	<b>0</b> ± 0 (9)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (9)
11	<b>4339</b> ± 1111 (13)	<b>0</b> ± 0 (13)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (13)
12	<b>4485</b> ± 381 (16)	<b>0</b> ± 0 (16)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (16)
13	<b>5549</b> ± 1314 (9)	<b>0</b> ± 0 (9)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (9)

**TABLA VI-A: Influencia del nitrógeno.** Valores absolutos, en miles, de nº de células vegetativas (Cél. veg), nº de oogonios (Oog), y relaciones entre nº de células vegetativas / nº de oogonios (Veg/oog), y nº de oogonios / nº de células vegetativas (Oog/veg) en los 25 ml de cultivo. Los valores están expresados como la media ± error estandar, y entre paréntesis el nº de recuentos. Las celdas sombreadas indican igual composición del medio que las sombreadas en las tablas VI-B y VI-C.

FOSFORO				
Nº de cultivo	Cel. veg (en miles)	Oog (en miles)	Veg/oog	Oog/veg
1	<b>268</b> ± 41 (34)	<b>20</b> ± 5 (34)	<b>11,6</b> ± 2 (34)	<b>0,086</b> ± 0,015 (34)
2	<b>510</b> ± 95 (32)	<b>23</b> ± 6 (32)	<b>22</b> ± 3 (25)	<b>0,045</b> ± 0,010 (32)
3	<b>500</b> ± 70 (35)	<b>53</b> ± 11 (35)	<b>9</b> ± 1 (33)	<b>0,107</b> ± 0,016 (35)
4	<b>538</b> ± 68 (33)	<b>47</b> ± 14 (33)	<b>10</b> ± 4 (32)	<b>0,096</b> ± 0,050 (35)
5	<b>521</b> ± 62 (28)	<b>43</b> ± 8 (28)	<b>11</b> ± 2 (28)	<b>0,090</b> ± 0,017 (28)
6	<b>855</b> ± 128 (35)	<b>24</b> ± 5 (35)	<b>29</b> ± 6 (26)	<b>0,035</b> ± 0,009 (35)
7	<b>999</b> ± 167 (24)	<b>0</b> ± 0 (24)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (24)
8	<b>972</b> ± 182 (22)	<b>0</b> ± 0 (22)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (22)
9	<b>1112</b> ± 177 (24)	<b>0</b> ± 0 (24)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (24)
10	<b>668</b> ± 101 (9)	<b>0</b> ± 0 (9)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (9)
11	<b>776</b> ± 114 (13)	<b>0</b> ± 0 (13)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (13)

**TABLA VI-B: Influencia del fósforo.** Valores absolutos, en miles, de nº de células vegetativas (Cél. veg), nº de oogonios (Oog), y relaciones entre nº de células vegetativas / nº de oogonios (Veg/oog), y nº de oogonios / nº de células vegetativas (Oog/veg) en los 25 ml de cultivo. Los valores están expresados como la media ± error estandar, y entre paréntesis el nº de recuentos. Las celdas sombreadas indican igual composición del medio que las sombreadas en las tablas VI-A y VI-C.

### CLORURO DE CALCIO

Nº de cultivo	Cel. veg (en miles)	Oog (en miles)	Veg/oog	Oog/veg
1	<b>102</b> ± 20 (42)	<b>0</b> ± 0 (42)	-	<b>0,000</b> ± 0,000 (42)
2	<b>621</b> ± 85 (28)	<b>60</b> ± 1 (28)	<b>10</b> ± 2 (28)	<b>0,104</b> ± 0,019 (28)
3	<b>611</b> ± 100 (29)	<b>47</b> ± 9 (29)	<b>12</b> ± 2 (28)	<b>0,082</b> ± 0,014 (29)
4	<b>781</b> ± 121 (21)	<b>48</b> ± 9 (21)	<b>15</b> ± 7 (21)	<b>0,066</b> ± 0,036 (21)
5	<b>661</b> ± 125 (32)	<b>24</b> ± 6 (32)	<b>26</b> ± 7 (32)	<b>0,039</b> ± 0,010 (32)

**TABLA VI-C: Influencia del cloruro de calcio.** Valores absolutos, en miles, de nº de células vegetativas (Cél. veg), nº de oogonios (Oog), y relaciones entre nº de células vegetativas / nº de oogonios (Veg/oog), y nº de oogonios / nº de células vegetativas (Oog/veg) en los 25 ml de cultivo. Los valores están expresados como la media ± error estandar, y entre paréntesis el nº de recuentos. Las celdas sombreadas indican igual composición del medio que las sombreadas en las tablas VI-A y VI-B.

Nº de Cultivo	Nº de ciclos celulares		
	N	P	Cl <sub>2</sub> Ca
1	3,09	3,98	1,96
2	2,50	3,62	3,41
3	2,54	3,10	3,39
4	3,29	3,21	3,74
5	3,92	3,16	3,50
6	4,62	3,87	Ø
7	6,79	4,10	Ø
8	6,86	4,06	Ø
9	6,69	4,25	Ø
10	6,73	3,56	Ø
11	6,22	3,73	Ø
12	6,26	Ø	Ø
13	6,57	Ø	Ø

**TABLA VII: Nº promedio de ciclos celulares.** Obtenidos según la fórmula Log (V/I) / Log 2 para el nitrato de potasio (N), fosfato de potasio, (P) y cloruro de calcio (Cl<sub>2</sub>Ca). Para mayor información leer el texto.

CULTIVO Nº	LONGITUD (μm)	DIÁMETRO (μm)	VOLÚMEN (miles de μm <sup>3</sup> )
2	45-60	42-60	43-113
3	41-57	39-58	34-100
4	41-59	38-56	32-100
5	35-52	36-54	23-78

**TABLA VIII: Valores absolutos máximos y mínimos de longitud, diámetro y volumen de los oogonios para diferentes concentraciones de Cl<sub>2</sub>Ca.**

		Descripción original <sup>†</sup>	Población de origen <sup>§</sup>	Datos de cultivo <sup>¶</sup>
Medida de los oogonios ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro	51-64	53-62	36-60
	Longitud	56-70	56-64	35-60
Medida de las células vegetativas ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro	15-35	16-31	14-23
	Longitud	40-225	55-80	21-64
Nº de oogonios por serie		1-3	?	1-6
Nº de anteridios exteriores por nanandro		1-2	?	2-4
Nº de androsporangios por serie		1-3	?	1-5

**TABLA IX: Comparación de algunas características utilizadas para la determinación taxonómica.** Se comparan datos de la diagnosis original <sup>†</sup>Wittrock 1870, de la población de origen <sup>§</sup>Vélez, 1995, y <sup>¶</sup>del presente trabajo, de *Oedogonium stellatum*.