

Fitoflagelados marinos de caleta Montemar, Valparaíso. I. *Asteromonas gracilis* Artari (1913) (Dunaliellaceae, Chlorophyceae)

Marine phytoflagellates from Montemar cove, Valparaíso I. *Asteromonas gracilis*
Artari (1913) (Dunaliellaceae, Chlorophyceae)

Andrea Catalán y Gloria Collantes

Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso, Casilla 13-D, Viña del Mar, Chile.
gcollant@uv.cl

RESUMEN

Este estudio informa de la aislación, cultivo y caracterización de *Asteromonas gracilis*, fitoflagelado presente en cubetas del intermareal alto de Caleta Montemar, Chile (32° 57'S - 71° 33'W). Las células de *A. gracilis*, fueron aisladas mediante la técnica de selección por requerimientos a partir de una muestra de fitoplancton diversamente representada. Los monocultivos obtenidos, fueron mantenidos en medio Provasoli, temperatura de 20 ± 2 °C, intensidad de luz de aproximadamente 60 μmol m⁻² s⁻¹ y 24 h luz. El cultivo clonal de células fue realizado usando la técnica del pipeteo, su tasa de crecimiento se calculó mediante el método de los mínimos cuadrados, ajustando a una línea recta datos logarítmicamente transformados. La determinación taxonómica se efectuó en base de la caracterización morfológica a nivel de microscopía óptica y electrónica de células vivas y fijas respectivamente. Este estudio aporta al conocimiento de fitoflagelados marinos, ampliando la distribución geográfica de *A. gracilis* a las costas templadas del Pacífico de Sud América, taxón que en este trabajo, se cita por primera vez para Chile.

Palabras clave: biodiversidad, microalgas, aislación, cultivo, ultraestructura, nuevo registro, Chile.

ABSTRACT

This study reports about isolation, culture and characterization of *Asteromonas gracilis*, phytoflagellate from intertidal pools, of Montemar cove, Chile (32° 57'S - 71° 33'W). Cells of *A. gracilis* were isolated by requirements method. Monocultures were maintained in Provasoli medium, at 20 ± 2 °C, 60 μmol m⁻² s⁻¹ light and 24 h of light. Isolation and culture of clonal cells were obtained by capillary pipette. Growth rate was calculated by least - squares fit of a straight line to the data, logarithmically transformed. Data for taxonomic study were obtained from optic and electronic microscopic examinations of living and fixed cells. *A. gracilis* is cited for the first time for Chilean coast, improving the taxonomic knowledge of the marine microalgal flora of temperate Pacific South America.

Key words: biodiversity, microalgae, isolation, culture, ultrastructure, new record, Chile.

INTRODUCCION

Este trabajo inicia una serie de publicaciones sobre fitoflagelados marinos, grupo de microalgas pertenecientes a las Divisiones Chlorophyta y Chromophyta, cuya taxonomía ha sido confusa debido a su reducido tamaño, dificultades técnicas para su fijación y al pleomorfismo de las diferentes etapas de las respectivas historias de vida.

El género *Asteromonas* fue descrito por Artari, desde pozas salinas de Crimea en la especie tipo *A. gracilis* y ubicado inicialmente en las Poliblepharidaceae como miembro de las Chlorophyceae (Artari 1913). Constituye un taxa muy peculiar estrechamente relacionado con los géneros *Pyramimonas* y *Stephanoptera* (Pascher 1926, Hollande, et al. 1954).

A pesar del escaso conocimiento existente Printz (1927) reconoció que *Asteromonas* y *Stephanoptera* eran géneros independientes, en tanto que Wislouch (1924) y Smith (1933) no distinguieron diferencias, dando prioridad a *Stephanoptera*. Curiosamente ninguno de los autores realizó observaciones en especímenes vivos y las comparaciones sobre las cuales se sustentó ambas posiciones fueron solo las descripciones y dibujos originales de *S. fabreae* (Dangeard 1910).

Butcher (1959) reconoció que existe una estrecha relación entre *Asteromonas*, *Pyramimonas* y *Stephanoptera*, distinguibles principalmente por la amplitud de los lóbulos longitudinales y la distancia entre ellos. Sobre la base del número y torsión de los lóbulos y el número de flagelos, consideró a las siguientes especies: *A. gracilis* Artari, *A. octostriata* Pascher, *A. phacus* Pascher, *S. tremulans* Hollande, Enjumet, Lafaurie y *P. amyliifera* Conrad. Al mismo tiempo este autor, recomendó agrupar a todas estas especies en el género *Asteromonas* y propuso la creación de *A. propulsum* n. sp.

Para evitar confusiones, Peterfi & Manton (1968) señalaron la conveniencia de mantener a *Asteromonas* y *Stephanoptera* como géneros independientes mientras la especie tipo de esta última fuera nuevamente registrada y estudiada. Por otra parte, ambos autores establecieron que la especie *S. tremulans* descrita por Hollande *et al.* (1954) y posteriormente propuesta por Butcher (1959) como *A. tremulans*, no era más que una sinonimia de *A. gracilis*, en tanto que *A. phacus* y *A. octostriata* necesitaban un mayor análisis para confirmar su posición taxonómica. En estudios realizados por Moestrup & Hill (1991) se declaró inválido el nombre de *A. propulsum*, señalándose que la especie descrita corresponde a *P. propulsa*, la cual en ocasiones ha sido identificada como *A. amyliifera*, debido a la gran similitud que presentó bajo microscopía fotónica (Tomas

1993). Los estudios a nivel de ultraestructura de las escamas corporales, distinguieron a ambas especies como independientes y establecieron que *A. amyliifera* correspondía al género *Pyramimonas*, describiendo a la especie como *P. amyliifera* (Moestrup & Hill 1991).

Con el objeto de esclarecer su posición taxonómica, la mayoría de los trabajos realizados en este género, se han llevado a cabo en su especie tipo *A. gracilis*. En ella los estudios a nivel de microscopía fotónica y electrónica realizados por Peterfi & Manton (1968) mostraron rasgos morfológicos afines a las Chlorophyceae y Prasinophyceae, sin embargo, estos autores concluyeron que la especie se encontraba mas relacionada a esta última. Posteriormente Floyd (1978) estudió y comparó ultraestructuralmente los procesos mitótico y citocinético de *A. gracilis*, resultando ambos muy similares a *Dunaliella* y *Chlamydomonas*. El mismo autor sobre la base de la importancia taxonómica y filogenética de estos caracteres, reafirma la ubicación inicial de *A. gracilis* en las Chlorophyceae.

Las actuales revisiones en fitoflagelados ubican a *Asteromonas* al interior de las Chlorophyceae, distinguiéndolo como un género típicamente marino costero, constituido por tres especies *A. gracilis*, *A. phacus* y *A. octostriata*, diferentes entre sí por la forma celular (Chretiennot-Dinet 1990, Tomas 1993).

En este contexto, con el objeto de dar a conocer la flora microalgal nativa, en este trabajo se informa sobre la aislación, cultivo y caracterización celular bajo microscopía óptica y electrónica de *A. gracilis*, procedente de cubetas intermareales de la localidad de Montemar.

MATERIALES Y METODOS

La recolección de muestras se realizó en una cubeta de marea del intermareal rocoso de la

localidad de caleta Montemar (32° 57'S - 71° 33'W), en diciembre de 1994. Las muestras fueron obtenidas a mano con la ayuda de matraces de vidrio estériles sin filtros ni redes de plancton para no causar daño a los fitoflagelados desnudos. Alicuotas de aproximadamente 10 ml fueron tomadas en quintuplicado en los diez centímetros superficiales de la cubeta.

Para obtener monocultivos y posteriormente un cultivo clonal madre, las muestras fueron sometidas a protocolos de aislamiento por técnicas de requerimientos y micropipeteo (Hoshaw & Rosowski 1973). A partir de inóculos de 10 ml de este último, se iniciaron cultivos cerrados en tres matraces Erlenmeyer con 240 ml de medio nutritivo Provasoli (PES), bajo iluminación de $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con fotoperíodo continuo, a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (Guillard 1974). Durante la fase inicial, exponencial y de reposo del cultivo se efectuaron diariamente observaciones de control y conteo bajo microscopía fotónica. El restante cultivo madre, mantenido en crecimiento exponencial, se concentró por decantación para la aplicación de protocolos para microscopía electrónica. Muestras de cultivos auxiliares en quintuplicado de la especie aislada, se conservan como cepas y actualmente son mantenidas en frascos de 10 ml en medio nutritivo PES, a temperatura de 4°C - 6°C y en oscuridad.

De acuerdo al tamaño celular y densidad del cultivo, el incremento del número de células fue medido utilizando un hemocitómetro Neubauer Improved de 0,1 mm de profundidad, recomendado para organismos cuyo tamaño se encuentra en el rango de 2 a $30 \mu\text{m}$, con una densidad de 5×10^4 - 10^7 células por ml, siguiendo la metodología descrita por Guillard (1973). Los datos obtenidos, fueron utilizados para estimar gráficamente la tasa de crecimiento, mediante la representación del número de células diarias en cultivo, transformadas logarítmicamente. La tasa de crecimiento exponencial se calculó ajustando estos datos a una recta con el método de los mínimos cuadrados (Guillard 1973).

La caracterización celular se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico, equipado con contraste de fases y microfotografía. Las muestras fueron examinadas in vivo, sin fijación previa, para evitar la deformación de los fitoflagelados desnudos (Klaveness 1985). Material bibliográfico y claves comparativas permitieron la determinación de la especie.

El tratamiento de las muestras para microscopía electrónica de transmisión comprendió la fijación con una solución de glutaraldehído al 2%, formaldehído al 2%, en buffer de cacodilato de sodio 0,1 M. Posteriormente fueron lavadas durante una hora en buffer y sometidas a post-fijación, utilizando tetróxido de osmio reducido (1:1 tetróxido de osmio al 2% y ferricianuro de potasio al 3%). Considerando la concentración de los reactivos y la osmolaridad del buffer, las mezclas fueron ajustadas a la concentración del medio nutritivo de cultivo, agregando sucrosa, para asegurar la osmolaridad del preparado. Las muestras fueron deshidratadas en una batería de concentración creciente de etanol y sometidas a una deshidratación de transición utilizando acetona al 100%. (Hayat 1986). La inclusión se realizó en resina Medcast y la tinción positiva con acetato de uracilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un microscopio Zeiss modelo EM 900 a 50 kV.

RESULTADOS

Asteromonas gracilis Artari

Asteromonas gracilis Artari, 1913, l.c. 428 = *Stephanoptera gracilis* (Artari); Smith, 1933 p. 307, fig.201; Printz, 1927, 2 Auf., 3, fig. 23; Ruinen, 1938, fig. 34.

DESCRIPCIÓN BAJO MICROSCOPIA FOTÓNICA

La célula vegetativa se presentó aislada y con una forma variable, de ovoide a un huso con sus dos extremos aguzados y su parte central mas ensanchada, midiendo aproximadamente 16 a $40 \mu\text{m}$ de longitud por 10 a $15 \mu\text{m}$ de ancho (Figs. 1a, 3 a 5). Longitudinalmente

presentó seis o tres lóbulos en forma de quillas; estas estructuras nacieron del extremo anterior aunque no del mismo apex, recorriéndola helicoidal o paralelamente y terminando gradualmente en el extremo opuesto en un cuerno posterior, el que a veces alcanzó una longitud considerable (Fig. 5). En vista anterior y posterior se observó un patrón estrellado muy característico, producido por la disposición y forma de los lóbulos (Figs. 1b y 6).

En movimiento, esta microalga avanzó lentamente si se la compara con otras especies (*Tetraselmis* o *Pyramimonas*), siguiendo una línea recta, girando sobre su eje y cambiando de dirección cada cierto tiempo. El desplazamiento se debió a la presencia de dos flagelos anteriores ubicados en una papila a veces prominente, los que se caracterizaron por ser gruesos, isomórficos, de longitud igual o superior a la longitud celular (Figs. 1a y 5).

Internamente se observó un cloroplasto de color verde pálido, que ocupó la mayor parte del volumen de la célula, penetrando los lóbulos que bajo microscopía fotó-

nica se observaron translúcidos (Figs. 3 a 5). Ubicado en el tercio anterior o en la mitad de la célula se presentó un estigma de color anaranjado oscuro, de forma bacilar y tamaño regular (Figs. 1a y 3). En la porción basal y rodeado en casi su totalidad por almidón, se encontró un conspicuo pirenoide bilobulado (Figs. 1a y 4).

En las condiciones de cultivo usadas, *A. gracilis* se reprodujo asexualmente por simple división (Fig. 1c), presentando en la porción media de la célula madura un volumen mayor a lo normal. La división comenzó en el extremo anterior y paulatinamente se produjo la separación de la parte posterior, lo que se observó claramente desde una visión anterior, en la cual se pudo distinguir tres lóbulos y un flagelo en cada una de las futuras células, las que posteriormente generaron el segundo flagelo. Estas nuevas células se caracterizaron por ser más angostas y por presentar tres lóbulos bien desarrollados. Durante la reproducción no cesó el movimiento, a veces poco coordinado, debido al actuar independiente de los flagelos de cada célula hija.

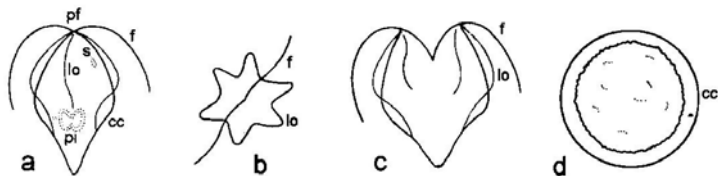


Figura 1. *Asteromonas gracilis*. Célula vegetativa, (a) vista frontal, (b) vista apical, (c) reproducción asexual, (d) ciste. (f = flagelos, pf = papila flagelar, lo = lóbulos, pi = pirenoide, s = estigma, cc = cubierta celular).

Figure 1. *Asteromonas gracilis*. Vegetative cell (a) front view, (b) apical view, (c) asexual reproduction, (d) cyst. (f = flagellum, pf = flagellate papilla, lo = lobes, pi = pyrenoid, s = eyespot, cc = cellular envelope).

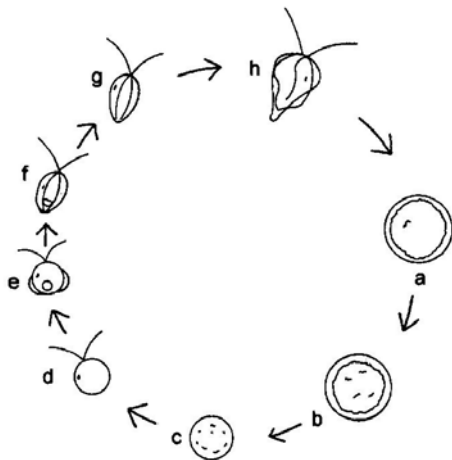


Figura 2. *Asteromonas gracilis*. Germinación del ciste (a - h).

Figure 2. *Asteromonas gracilis*. Cyst germination (a - h).

En los cultivos en fase estacionaria, se observó la formación de cistes (Fig. 8). Estos se presentaron fijos sobre el sustrato, agrupados y formando lamas verdes, que bajo el microscopio fotónico demostraron ser conglomerados de células (Fig. 7). Los cistes se caracterizaron por ser esféricos de aproximadamente $26 \mu\text{m}$ de diámetro con una pared gruesa de 2 a $3 \mu\text{m}$. Al interior se distinguió un cloroplasto granular con su superficie externa rugosa, en el cual no se observó estigma y sólo en ocasiones se logró ver el pirenoide. Una mancha difusa café-rojiza se ubicó centralmente (Fig. 2a). La adición de medio nutritivo fresco indujo la germinación de los cistes, comenzando ordenadamente desde el estrato externo de la agrupación, hasta terminar en el centro de la misma (Fig. 2). Durante este proceso, la célula esférica redujo su tamaño a aproximadamente $22 \mu\text{m}$, sin manifestar cambios a nivel de su pared celular. El cloroplasto mantuvo su aspecto

granular y no se observó pirenoide, estigma o acumulación de carotenoides (Fig. 2b). Posteriormente la talla se redujo a $20 \mu\text{m}$ de diámetro y la pared celular se limitó a una finísima capa externa (Fig. 2c). Finalmente el ciste alcanzó aproximadamente $15 \mu\text{m}$ de diámetro, el cloroplasto liso y se observó un conspicuo estigma bacilar rojo anaranjado, ubicado lateralmente en el tercio anterior de la célula (Fig. 2d). En las siguientes etapas de germinación, desde el extremo celular anterior surgieron dos flagelos de aproximadamente $22 \mu\text{m}$, no observándose estructura papilar. En esta condición flagelada, las células permanecieron juntas en el conglomerado perdiendo paulatinamente su forma esférica. En el extremo anterior comenzaron a surgir pequeños lóbulos y el posterior se fue aguzando, alcanzando una talla celular de $15 \mu\text{m}$ de longitud por $10 \mu\text{m}$ de ancho. Internamente relacionado con el cloroplasto se observó el pirenoide en posición basal

(Fig. 2e). Finalmente, la célula tomó su típico aspecto de huso, con tres o seis lóbulos. En las condiciones de cultivo utilizadas su tamaño no sobrepasó las 20 μm de longitud por 10 μm de ancho, siendo considerablemente menor respecto a la célula vegetativa normal. El cloroplasto se presentó pálido y liso, el estigma y el pirenoide con las mismas características antes descritas (Fig. 2f). En el conglomerado, estas células ubicadas en la periferia con su extremo posterior dirigido hacia afuera, fueron liberadas sucesivamente por el movimiento activo de sus flagelos (Figs. 2g-h).

DESCRIPCION BAJO MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

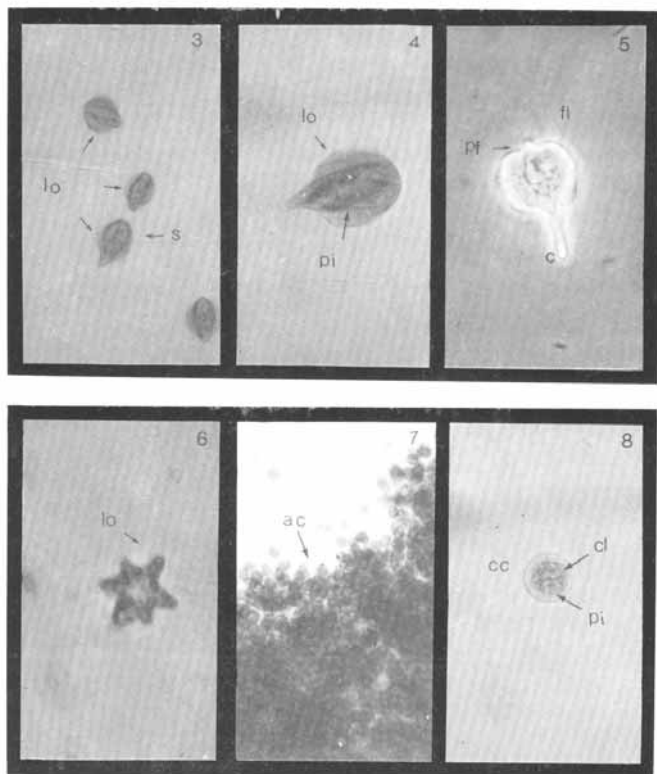
Externamente las células de *A. gracilis* no presentaron cubierta celular, observándose sólo material fibrilar depositado sobre una membrana plasmática, a veces con un patrón rugoso (Figs. 9 y 10). Internamente se encontró un cloroplasto parietal en forma de copa, rodeado por una doble membrana. Sus lamelas se estructuraron en dos a cuatro tilacoides interconectadas por tilacoides simples (Figs. 9 y 10).

El núcleo de forma esférica con doble membrana y poros nucleares se ubicó en el centro de la célula junto con un nucleolo, (Figs. 9 y 12). Evaginaciones de parte del material nuclear, denominadas haustorias, envueltas en la membrana nuclear, rodeadas por una porción hialina y más externamente por la doble membrana del cloroplasto, se introdujeron en la porción cóncava del pirenoide que en su porción convexa se encontró rodeado de gránulos de almidón (Figs. 9 y 10). En el extremo superior de la célula, sobre el núcleo y en una posición más o menos simétrica se observaron dos Golgi, con una gran cantidad de vesículas (Figs. 11 y 12). Mitocondrias alargadas y con crestas planas se ubicaron entre el núcleo y el cloroplasto (Figs. 9 y 11).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

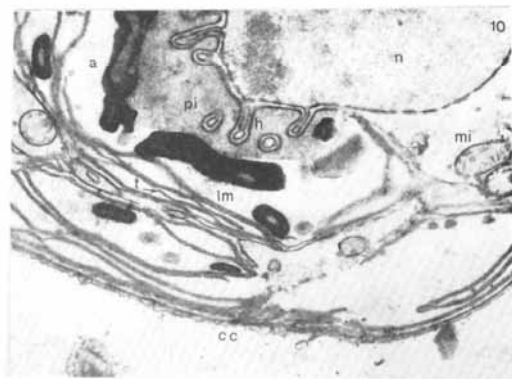
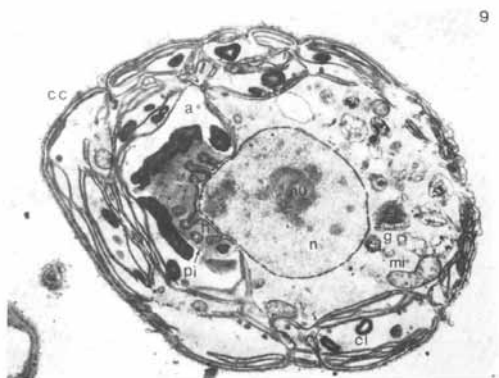
En condiciones de cultivo clonal, *A. gracilis*, presentó dos morfotipos distinguibles por su tamaño celular y el ancho y grado de torsión de sus lóbulos longitudinales (Figs. 2f - h y 3 a 5), condición también observable en muestras naturales, lo que habría inducido en el pasado a considerarlas especies independientes. Esta diferencia morfológica correspondió a diferentes estados de madurez. En las células más jóvenes, producto de una reciente división, germinación de un ciste o en aquellas presentes en cultivos en inicio de la fase exponencial, se presentaron tamaños menores, lóbulos en número de tres a seis, menos desarrollados y rectos, todas características afines a la especie descrita como *A. gracilis* (Artari 1913). En las células maduras, al término de la fase exponencial o durante la fase estacionaria, se observó un aumento del tamaño celular, extensión del extremo posterior, desarrollo y torsión de los lóbulos, todos rasgos propios de la especie *A. tremulans* descrita por Butcher (Hollande *et al.* 1954). Una confirmación más exacta de estos resultados requiere de la cuantificación de los diferentes morfotipos en todas las etapas de cultivo, así como también de la sucesión de ellos en cubetas naturales, durante el periodo de tiempo transcurrido entre una y otra renovación de agua.

Los controles de las células en cultivo, confirmaron lo señalado en la literatura en relación a la formación asexual del ciste de *A. gracilis* (Peterfi & Manton 1968), permitiendo además, caracterizar por primera vez su germinación, determinando los principales cambios morfológicos desde su formación, hasta volver la célula a su estado vegetativo móvil. En todas las observaciones de este estudio, este ciste no se encontró asociado a fusión de gametos y generación de cigospora, así como tampoco a divisiones celulares, emergiendo desde cada uno, una célula



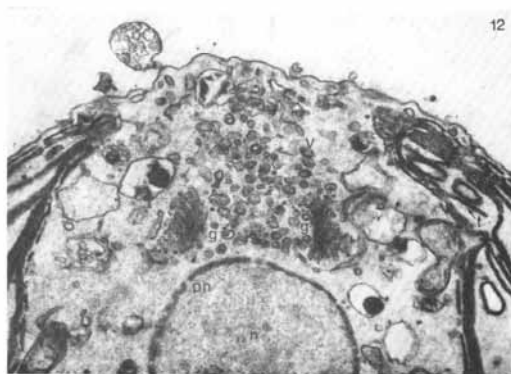
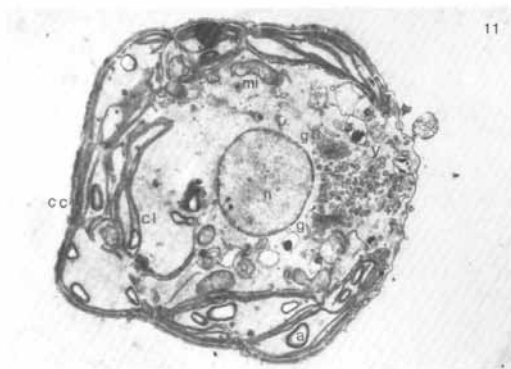
Figuras 3-8. *Asteromonas gracilis*. Célula vegetativa. Fig. 3 (lo = lóbulos, s = estigma) 200 x. Fig. 4 (lo = lóbulos, pi = pirenoide) 400 x. Fig. 5 (c = cuerno, f = flagelo, pf = papila flagelar) 400 x. Fig. 6 (lo = lóbulos) 400 x. Ciste. Fig. 7 (ac = agrupación de cistes) 100 x. Fig. 8 (cc = cubierta celular del ciste, cl = cloroplasto, pi = pirenoide) 400 x.

Figures 3-8. *Asteromonas gracilis*. Vegetative cell. Fig. 3 (lo = lobes, s = eyespot) x 200. Fig. 4 (lo = lobes, pi = pyrenoid) x 400. Fig. 5 (c = horn, f = flagellum, pf = flagellate papilla) x 400. Fig. 6 (lo = lóbulos) x 400. Cyst. Fig. 7 (ac = cluster of cyst) x 100. Fig. 8 (cc = cellular envelope of cyst, cl = chloroplast, pi = pyrenoid) x 400.



Figuras 9-10. *Asteromonas gracilis*. Ultraestructura de la célula vegetativa. Fig. 9 (n = núcleo, nu = nucleolo, cl = cloroplasto, pi = pirenoide, h = haustorias, a = almidón, mi = mitocondrias, g = Golgi, cc = cubierta celular) 7480 x. Fig. 10 (h = haustorias, lm = lamelas, t = tilacoides, cc = cubierta celular) 15400 x.

Figures 9-10. *Asteromonas gracilis*. Ultrastructure of vegetative cell. Fig. 9 (n = nucleus, nu = nucleolus, cl = chloroplast, pi = pyrenoid, h = haustorium, a = starch, mi = mitochondria, g = Golgi, cc = cellular envelope) x 7480. Fig. 10 (h = haustorium, lm = lamellae, t = thylakoids, cc = cellular envelope) x 15400.



Figuras 11-12. *Asteromonas gracilis*. Ultraestructura de la célula vegetativa. Fig. 11 (n = núcleo, cl = cloroplasto, a = almidón, mi = mitocondrias, g = Golgi, cc = cubierta celular, v = vesículas) 7480 x. Fig. 12 (g = Golgi, v = vesículas, pn = poros nucleares, t = tilacoides) 15400 x.

Figures 11-12. *Asteromonas gracilis*. Ultrastructure of vegetative cell. Fig. 11 (n = nucleus, cl = chloroplast, a = starch, mi = mitochondria, g = Golgi, cc = cellular envelope, v = vesicles) x 7480. Fig. 12 (g = Golgi, v = vesicles, pn = nuclear pores, t = thylakoids) x 15400.

vegetativa. Estos resultados indican que se trataría de una célula de resistencia ante condiciones adversas. Al agregar medio fresco, la germinación primera de los cistes del borde de la agrupación celular y posteriormente hacia el centro, se atribuyeron a cambios de los factores limitantes, principalmente nutrientes y pH, ocurriendo a diferentes velocidades de difusión (Figs. 2, 7 y 8). Las observaciones realizadas de la ultraestructura de las células vegetativas aisladas de *A. gracilis*, coinciden con las descripciones realizadas anteriormente para la especie por Peterfi & Manton (1968), ratificando su determinación taxonómica (Figs. 9-12).

En las condiciones de cultivo usadas, las células crecieron a una tasa de 0,899 divisiones por día, adecuada para cepas en una primera etapa de domesticación. En este sentido será necesario investigar los factores limitantes del crecimiento en laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por el proyecto DIUV - 06 / 93.

LITERATURA CITADA

- Artari, A. 1913: Physiologie der Chlamydomonaden versuche und Beobachtungen an *Chlamydomonas ehrenbergii* Gorosch. Und verwandten Formen. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik 52: 410- 466.
- Ben-Amotz, A. 1980. Potential use of *Dunaliella* and *Asteromonas* for the production of glicerol and carotene. 2nd International Workshop on Biosaline Research, p. 5. La Paz, Baja California Sur, Mexico.
- Ben-Amotz, A & T Grunwald. 1981. Osmoregulation in the halotolerant alga *Asteromonas gracilis*. Plant Physiology 67: 613-616.
- Ben-Amotz, A & M Avron. 1982. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). Journal of Phycology 18: 529-537.
- Butcher, RW. 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. I. Introduction and Chlorophyceae. Fisheries Investigation, London, Serie IV:1-74.
- Chretiennot-Dinet, MJ. 1990. Clases Chlororachniophycées, Chlorophycées, Crysophycées, Cryptophycées, Euglenopycées, Eustigmatophycées, Prymnesiophycées, Rhodophycées, Ribophycées. En: Billard & Sourmia, (eds), Atlas du Phytoplankton Marin. Editions du CNRS, Paris. Vol. III, 261 p.
- Dangeard, PA. 1910. Sur une algue marine du laboratoire de Concarneau. Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de Academie des Sciences, Paris 151: 991- 993.
- Floyd, GL. 1978. Mitosis and cytokinesis in *Asteromonas gracilis*, a wall less green monad. Journal of Phycology 14: 440-445.

Bajo las condiciones de cultivo utilizadas, los cistes maduros de *A. gracilis* presentaron una mancha pequeña y difusa de pigmentos anaranjados, lo que concuerda con lo citado en la literatura, que señala a la especie con capacidad para almacenar pigmentos carotenoides (Ben-Amotz 1980). Esta característica y la facultad de soportar condiciones de alta salinidad, regulando la osmolaridad mediante la concentración de grandes cantidades de glicerol (5,5 M) (Ben-Amotz & Grunwald 1981, Ben-Amotz & Avron 1982), favorecerían su utilización por la industria farmoquímica y/o alimentos.

Este primer registro de *A. gracilis* para Chile, contribuye al conocimiento de la biodiversidad de fitoflagelados del ambiente marino, ampliando la distribución conocida de la especie para las costas templadas del Pacífico de Sudamérica

- Guillard, RRL. 1973. Division rates. En: Stein JR (ed). Handbook of phycological methods: culture methods & growth measurements, Cambridge University Press, Cambridge: 289-311.
- Guillard, RRL. 1974. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, WL & MH Chanley, (eds), Culture of marine invertebrate marine animals. Plenum Publishing Co.; Nueva York 29-60.
- Hayat, MA. 1986. Basic Techniques for transmission electron microscopy, Academic Press, Nueva York. 411 p.
- Hoshaw, RW & JR Rosowski. 1973. Methods for microscopic algae. En : Stein JR. (ed). Handbook of phycological methods: culture methods & growth measurements Cambridge University Press, Cambridge: 53-68.
- Hollande, A, M Enjumet, & D Lafaurie. 1954. Contribution a l' étude des Volvocales: étude des genres *Platymonas* West et *Stephanoptera* Dangeard. Annales des Sciences Naturelles Zoologie 16: 283-292.
- Klaveness, D. 1985. Classical and modern criteria for determining species of Cryptophyceae. Bulletin of Plankton Society of Japan. 32: 111-123.
- Moestrup, Ø. & DRA Hill. 1991. Studies on the genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae) from Australian and European waters: *P. propulsa* sp nov. and *P. mitra* sp nov. Phycologia 30: 534-546.
- Pascher, A. 1926. Neue oder wenig. bekannte. Protisten XIX (Neue oder wenig bekannte Flagellaten. XVII. Archiv für Protistenkunde 53: 459 - 476.
- Peterfi, L S & I Manton. 1968. Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Artari emend (*Stephanoptera gracilis* (Artari) Wislouch, with some comparative observations on *Dunaliella* sp. British Phycological Bulletin 3: 423-440.
- Printz, H. 1927. Chlorophyceae. En: Engler, A. & K. Prantl. (eds). Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Auf. 3: 43
- Ruinen, J. 1938. Notizen über Salzflagellaten. II. Über die verbreitung der Salzflagellaten. Archiv für Protistenkunde 90: 210-258.
- Smith, GM. 1933. The freshwater algae of the United States. McGraw-Hill Book Company, Inc. Nueva York y Londres: 306-308.
- Tomas, CR (ed.) 1993. Marine phytoplankton. A guide to naked flagellates and coccolithophorids. Academic Press Inc., 263 p.
- Wislouch, S. 1924. Beiträge zur Biologie und Entstehung von Heilschlam der Salinen der Krim. Acta Societatis Botanicorum Polonial 2:99-129.