

Efecto de la salinidad en la actividad sexual de *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, cepa CONC-006.

Effect of salinity on sexual activity of *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, strain CONC-006.

GINGER MARTÍNEZ¹, ANA SILVIA CIFUENTES², MARIELA A. GONZALEZ² y OSCAR O. PARRA².

¹ Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Ecológicas. Casilla 653, Santiago.

² Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Departamento de Botánica, Laboratorio de Ficología y Bioensayos. Casilla 2407, Concepción.

RESUMEN

Se evalúa el efecto de la concentración salina sobre la actividad sexual en *Dunaliella salina*, cepa CONC-006, mediante registros periódicos de la proporción de cigotos y cigosporas del total de células observadas en los cultivos. Los resultados revelan que a concentraciones salinas bajas, de 2 y 5% de NaCl, se estimula la actividad sexual de esta cepa; en cambio, a concentraciones salinas altas, de 30% de NaCl, la sexualidad se ve disminuída. Se discuten las condiciones que podrían provocar estas respuestas, así como se puntualiza la relevancia que tendrían los estudios cuantitativos de reproducción sexual en el manejo de las poblaciones de *D. salina*.

Palabras claves: *D. salina*, sexualidad, salinidad.

ABSTRACT

The effect of salt concentration on sexual activity of *Dunaliella salina*, strain CONC-006, was evaluated by periodic recording of the ratio of zygotes and zygospores to total cells observed in the cultures. Results indicate that at low salt concentrations, 2 and 5% NaCl, the sexual activity of this strain is enhanced; on the contrary, at the highest salt concentration tested, 30% NaCl, sexuality is diminished. Conditions which might trigger sexuality in this strain is discussed; also the relevance of quantitative estimates of sexual reproduction for the management of *D. salina* populations is pointed out.

Keywords: *D. salina*, sexuality, salinity.

INTRODUCCION

Dunaliella salina (1905) Teodoresco (Chlorophyta, Volvocales) es la principal fuente algal para la producción comercial de betacaroteno y glicerol en diversos países del mundo (Borowitzka et al. 1984, Borowitzka & Borowitzka 1988). Este organismo eucarionte presenta la mayor halotolerancia conocida, lo que favorece su cultivo en condiciones de laboratorio y naturales ya que a una alta salinidad se minimizan los problemas de depredación, competencia y patogenicidad (Brown & Borowitzka 1979, Borowitzka & Borowitzka 1988). Se han realizado numerosos estudios para establecer las condiciones óptimas de crecimiento y de producción de pigmentos en diferentes cepas

de *D. salina* (Massyuk 1966, 1973, Ben-Amotz & Avron 1983, Borowitzka et al. 1984, Borowitzka & Borowitzka 1988, Cifuentes et al. 1992); sin embargo, los estudios sobre biología de la reproducción y desarrollo de las especies del género son escasos.

La inducción de sexualidad en microalgas ha sido estudiada en diversas especies, y muy detalladamente en *Chlamydomonas*. Estos estudios han permitido establecer algunos factores inductores de sexualidad, relacionados con estrés ambiental, tales como la carencia de fuentes de nitrógeno y/o fósforo en el medio (Ellis & Machlis 1968, Hill 1980, Snell 1980, Trainor 1980, 1986, Tuttle 1980).

Los primeros trabajos realizados en *Dunaliella* han sido cualitativos; ellos han

permitido establecer que el crecimiento y tipo de reproducción están determinados por la concentración de sal y probablemente por otros parámetros ambientales (Lerche 1937, Massyuk 1966, Borowitzka 1981). Posteriormente, Borowitzka et al. (1984) observaron una intensa actividad sexual después de diluciones periódicas por efecto de lluvias durante el desarrollo de un proyecto piloto de cultivo masivo de esta especie. En Chile, los estudios sobre cepas nativas de *D. salina* se han orientado principalmente a una caracterización taxonómica (Parra et al. 1990a) y fisiológica de las cepas (Parra et al. 1990b, Dellarossa y Cifuentes 1991, Cifuentes et al. 1992) con el fin de optimizar su manejo en cultivos experimentales y masivos. Sólo recientemente, Carvajal (1991) estudió el efecto de la concentración salina sobre la sexualidad en la cepa chilena *D. salina*, CONC-001. Sus resultados indican estimulación de la sexualidad a concentraciones salinas cercanas a la saturación y formación de estados de resistencia a niveles bajos de salinidad.

Los objetivos de este trabajo son determinar y cuantificar el efecto de la concentración salina sobre la actividad sexual en *D. salina*, cepa CONC-006, y establecer los rangos de salinidad que estimularían su reproducción sexual.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en la cepa chilena *Dunaliella salina*, CONC-006, procedente del Salar de Atacama (Cifuentes et al. 1992) a partir de un cultivo unialgal y clonal (según Pringsheim en Venkataraman 1969) mantenido en la cámara de cultivo del laboratorio de Ficología y Bioensayos del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción. Ensayos preliminares permitieron establecer el carácter homotálico de esta cepa. La detección de células fusionadas en diversas condiciones de cultivo y su gran tamaño (Cifuentes et al. 1992) decidieron su elección para el presente estudio.

Durante la etapa experimental se mantuvo aproximadamente 150 ml de un cultivo

madre de la cepa en fase de crecimiento exponencial mediante recambios semanales con 75 ml de medio fresco. Las condiciones experimentales dadas a este cultivo y a los utilizados en los tratamientos fueron las mismas: medio de cultivo Johnson modificado por Borowitzka (J/1) (Borowitzka 1988) con 15% de NaCl, densidad de flujo fotónico de $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ aprox., medida con un cuantómetro LICOR modelo 185-A, temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperíodo de 16:8 (L:O) (Condiciones experimentales de mantención de diferentes cepas de *D. salina* en la cámara de cultivo del laboratorio). Se obtuvo la curva de crecimiento del cultivo madre bajo las condiciones dadas, determinándose una tasa de crecimiento de $0,37 \text{ div. día}^{-1}$ y una densidad celular de $7,8 \times 10^5 \text{ células ml}^{-1}$, al final de la fase de crecimiento exponencial. Los tratamientos se realizaron en tubos de ensayo con 8 ml de medio de cultivo y una densidad celular inicial de $3 \times 10^4 \text{ células ml}^{-1}$. Se ensayaron las siguientes salinidades: 2, 5, 15 y 30 % NaCl, siendo la salinidad de 15% de NaCl el tratamiento control ya que esta salinidad ha sido estimada como la óptima para el crecimiento vegetativo de diferentes cepas de *D. salina* (Loeblich 1982, Parra et al. 1990b).

Para cuantificar la sexualidad se consideró la cantidad relativa de cigotos y cigosporas del total de células observadas en cada muestra. El total de células incluyó a las células vegetativas, agrupamientos de isogametos, cigotos, cigosporas y estados de resistencia (cistos). Los cigotos y cigosporas son estados de fácil detección al microscopio fotónico con contraste de fase. Los cigotos son células tetraflageladas, de mayor tamaño que las células vegetativas y con formas irregulares. Las cigosporas carecen de flagelos, presentan forma redondeada y gran pigmentación. La diferenciación entre cigosporas y cistos a bajas salinidades se basó principalmente en el color anaranjado que estos últimos presentan en cultivo. A salinidades altas, las células vegetativas son rojizas, al igual que los cistos pero éstos son de menor tamaño y de forma esférica.

El recuento se realizó «in vivo», en un microscopio Carl Zeiss, con aumento de

400 X con contraste de fase. Cada muestra fue recorrida en franjas verticales de una reglilla micrométrica hasta registrar aproximadamente 400 células.

Se analizaron dos réplicas de cada tratamiento (tubos de cultivo) y se hizo tres recuentos (gotas) en cada réplica. Se realizaron ocho registros de cada tratamiento durante 15 días y los resultados se expresaron como porcentaje de cigotos y cigosporas del total de células contadas en cada muestra. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el test no paramétrico de Kruskal & Wallis (Gibbons

1976). Se determinó además la densidad de células totales en todas las salinidades ensayadas al comienzo y final del tiempo experimental. Esto permitió estimar la densidad de células reproductivas por volumen de cultivo a cada salinidad en el último control (348 horas).

RESULTADOS

En las observaciones realizadas durante la etapa experimental se detectaron varios estados sexuales del ciclo de vida de *D.*

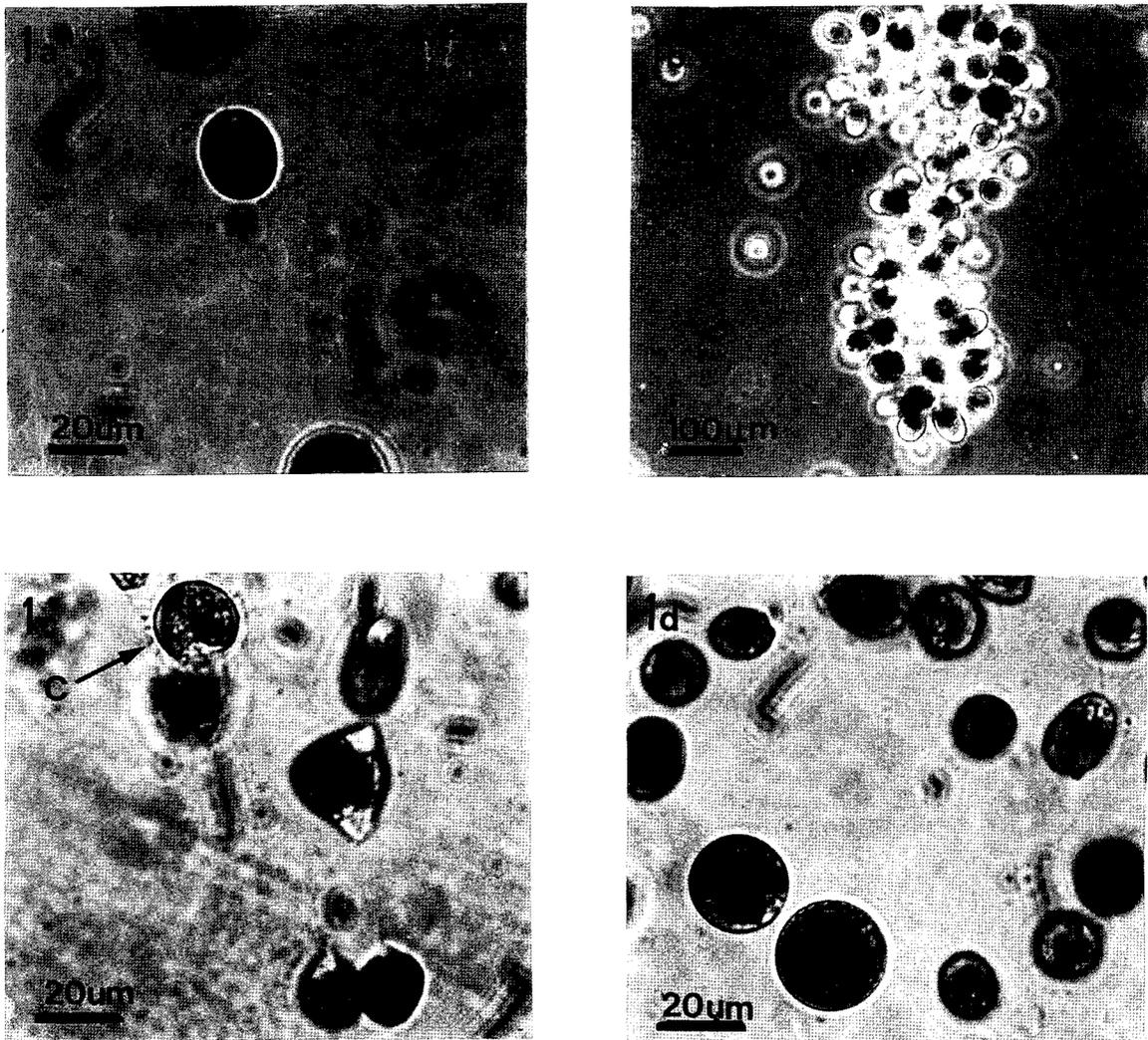


Fig. 1. Estados del ciclo sexual de *D. salina*, cepa CONC-006. 1a. Célula vegetativa, 1b. Agrupamiento de isogametos, 1c. Fusión de isogametos, (nótese la presencia de un cisto, estado de resistencia asexual, en el extremo superior izquierdo de la figura.) 1d. Cigosporas.

Stages in the sexual cycle of *D. salina*, strain CONC-006. 1a. Vegetative cell, 1b. Clump of isogametes, 1c. Isogametes fusion, (note the presence of a cyst, a resistance asexual stage, in the upper left corner of the figure) 1d. Zygospores.

salina cepa CONC-006, lo que fue evidente a bajas salinidades (2 y 5% de NaCl). Se observaron células vegetativas de aproximadamente 22 μm en todos los tratamientos ensayados (Fig. 1a), agrupamientos de isogametos («clumps») formados por un número variable de células 2-30 aproximadamente, unidas por su parte apical (Fig. 1b). Los cigotos son células tetraflageladas, fusionadas lateral y/o apicalmente, de formas irregulares con un rango de tamaño entre 20-25 μm (Fig. 1c). Las cigosporas presentan formas redondeadas e intensa coloración verde, carecen de flagelos y miden entre 22-30 μm de diámetro aproximadamente (Fig. 1d). Las cigosporas tienden a sedimentar en el fondo de los tubos de cultivo, lo que fue observado a simple vista en los tratamientos a salinidades bajas (2 y 5 % de NaCl).

El análisis cuantitativo reveló que desde el comienzo de la experiencia y antes de las 60 horas de tratamiento (2,5 días) no hubo diferencias significativas en la proporción de cigotos y cigosporas entre los diferentes tratamientos ($H = 11.95$ $P > 0,1$) (Tabla 1). En la menor salinidad ensayada (2%) hubo una gran disminución en el número de células probablemente debido a mortalidad

por shock osmótico ya que se detectaron numerosas células rotas. Esto impidió la cuantificación de los estados sexuales a 2% NaCl durante los primeros recuentos y los cultivos se consideraron no viables en esta salinidad, por lo que los esfuerzos experimentales se concentraron sobre el resto de los tratamientos. En observaciones posteriores se detectó un aumento de la densidad del cultivo y una gran actividad sexual a 2% de salinidad, por lo que las observaciones y recuentos se iniciaron tardíamente. A la salinidad de 5% la mayoría de las células se observaron de gran tamaño y de forma globosa desde el inicio de la experiencia y hasta las 36 horas de tratamiento, recuperando posteriormente su aspecto normal.

A partir de las 60 horas, los cultivos presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$) y al final de la experiencia, concentraciones salinas bajas (2 y 5 % NaCl) exhibieron un porcentaje significativamente mayor de cigotos y cigosporas que los cultivos a mayor salinidad (15 y 30% NaCl) ($P < 0,001$) (Fig. 2, Tabla 1).

Durante el transcurso del experimento hubo una relación negativa entre la proporción de cigotos y cigosporas y la concentración salina en el medio de cultivo. A

TABLA 1

Porcentaje promedio (\pm d.s.) de cigotos y cigosporas de *D. salina*, cepa CONC-006, en un rango de concentraciones salinas. Las condiciones experimentales son iguales a las señaladas en la figura 2.

Mean percentage (\pm s.d.) of zygotes and zygospores of *D. salina*, strain CONC-006, in a range of salinities.

Experimental conditions are the same as in figure 2.

Tiempo (horas)	Salinidad (% NaCl)				P
	2	5	15	30	
0	n.d.	0,3 \pm 0,65	0,1 \pm 0,39	0,1 \pm 0,44	0,5880
24	n.d.	1,0 \pm 0,71	0,6 \pm 0,67	0,4 \pm 0,52	0,0797
60	n.d.	7,3 \pm 1,18	2,2 \pm 1,14	1,4 \pm 0,88	0,0025
84	n.d.	9,4 \pm 2,66	3,9 \pm 1,22	2,8 \pm 0,93	0,0450
132	n.d.	33,1 \pm 2,04	17,1 \pm 1,78	12,6 \pm 0,93	0,0006
180	66,0 \pm 2,42	59,0 \pm 1,53	20,7 \pm 1,73	7,2 \pm 1,34	0,0001
276	92,4 \pm 1,90	61,9 \pm 1,44	23,8 \pm 1,55	6,5 \pm 0,72	0,0001
348	96,0 \pm 1,04	91,6 \pm 1,10	17,9 \pm 1,10	4,2 \pm 0,54	0,0001

n.d.= no determinado

una salinidad de 2% de NaCl hubo una mayor actividad sexual la que disminuyó progresivamente al aumentar la concentración de sal en el medio (Tabla 1). Hubo formación de cigotos y cigosporas a través del tiempo en todos los tratamientos ensayados y siendo la salinidad de 15% NaCl la óptima para el crecimiento vegetativo de esta cepa, al restar la proporción de cigotos y cigosporas presente en esta salinidad, se detecta más claramente el efecto de las salinidades extremas sobre la actividad sexual (Fig. 3). Las diferencias en la sexualidad entre los tratamientos sugiere una menor actividad sexual a concentraciones mayores que 15% y una mayor actividad a menores concentraciones.

Al final de la etapa experimental (348 h; 14,5 días), los cultivos a salinidades bajas (2 y 5% NaCl) presentaron un porcentaje de

cigotos y cigosporas superior al 90% y los sometidos a 15 y 30% de NaCl tan sólo 17,9 y 4,2%, respectivamente (Fig. 2). La máxima proporción de cigotos y cigosporas (>90%) se registró a las 348 horas (14,5 días) a 2 y 5 % de NaCl (Tabla 1).

Con los valores de densidad de células inicial y final se determinó las tasas de crecimiento promedio de la población a las diferentes salinidades ensayadas. La Tabla 2 muestra diferencias en las tasas de crecimiento promedio y en las densidades celulares finales de los cultivos entre los tratamientos. La mayor tasa se obtuvo a 15% de NaCl, lo que corrobora la salinidad óptima descrita para esta especie. La tasa de crecimiento disminuye hacia ambos extremos de las salinidades ensayadas. Entre 5 y 15% de NaCl, las tasas de crecimiento son similares ($0,3 \text{ div. día}^{-1}$) y

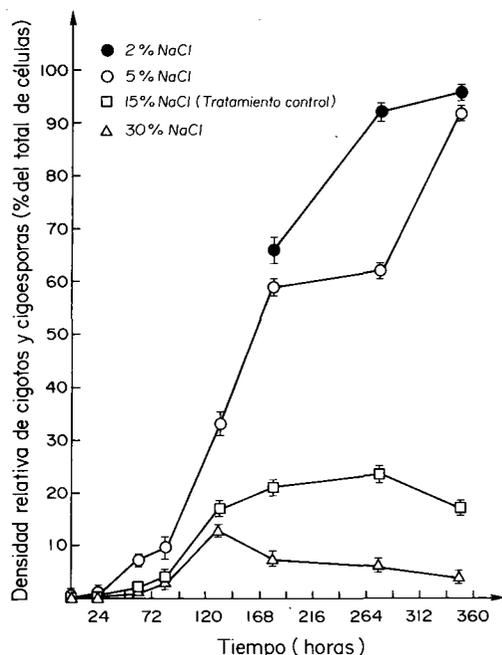


Fig. 2. Variación temporal del porcentaje de cigotos y cigosporas de *D. salina*, cepa CONC-006, en un rango de concentraciones salinas, en medio Johnson modificado por Borowitzka (J/1); densidad de flujo fotónico de ca. $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y fotoperíodo de 16:8 (L:O).

Temporal variation in the percentage of zygotes and zygospores of *D. salina*, strain CONC-006, in a range of salinities, in Johnson medium modified by Borowitzka (J/1); photon flux density of ca. $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and photoperiod of 16:8

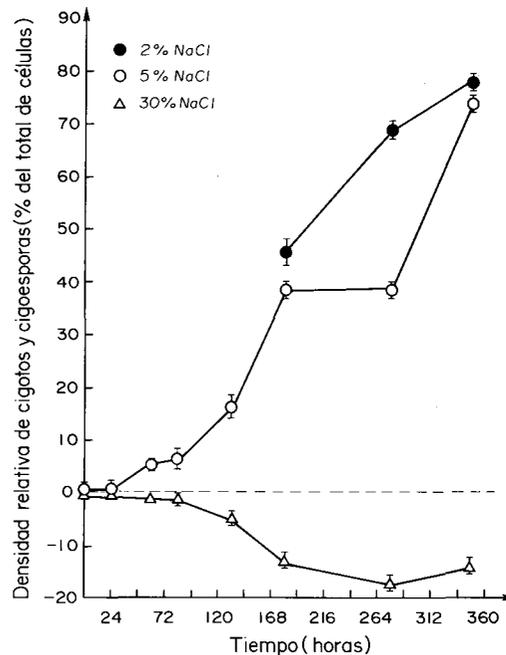


Fig. 3. Variación temporal del porcentaje de cigotos y cigosporas de *D. salina*, cepa CONC-006 restando del tratamiento control, en un rango de concentraciones salinas. Las condiciones experimentales son iguales a las señaladas en la figura 2.

Temporal variation in the percentage of zygotes and zygospores of *D. salina*, strain CONC-006, in a range of salinities, subtracted from the control treatment. Experimental conditions are the same as in figure 2.

diminuyen a valores de 0,24 y 0,17 (div.día⁻¹) a 5 y 30% de NaCl respectivamente. La relativamente alta densidad celular a 5% de NaCl, registrada al final de la experiencia explica la mayor cantidad absoluta de cigotos y cigosporas a esa salinidad comparada con la obtenida a 2 %, al final de la experiencia (Tabla 2).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La presencia de los estados del ciclo de vida de *D. salina*, cepa CONC-006, en todo el rango de concentraciones salinas ensayado, comprueba la gran halotolerancia característica de este género (Borowitzka & Borowitzka 1988). Los resultados obtenidos señalan que la estimulación del proceso sexual no fue producto de un shock salino ya que la detección de diferencias significativas de actividad sexual entre los tratamientos ($H = 11,95$; $P < 0,01$) requirió de al menos 60 horas (2,5 días). Esto concuerda con las observaciones realizadas por Lerche (1937) quien indujo sexualidad en *D. salina* a partir de las 48-96 horas (2-4 días) de experimentación.

El crecimiento de las poblaciones de microalgas en cultivo se produce principalmente debido a un proceso reproductivo asexual y, en menor grado, sexual. Las poblaciones presentan una mayor actividad reproductiva sexual en condiciones de estrés ambiental, estrategia ampliamente utilizada por los organismos para mantener una población mínima viable (Snell 1980, Trainor 1980, Tuttle 1980).

Bajo condiciones de laboratorio, la salinidad óptima para el crecimiento vegetativo de diferentes cepas de *D. salina* es de aproximadamente 12% a 15% (Loeblich 1982, Parra et al. 1990a, Avron 1992) lo que ha sido corroborado en este trabajo para la cepa CONC-006 (Tabla 2). Concentraciones salinas mayores y menores a este rango representarían condiciones de estrés salino, estrés que aumentaría progresivamente al alejarse del óptimo. De acuerdo a lo anterior, se esperaría un aumento de la actividad sexual a medida que aumentamos el estrés salino. Los resultados de este estudio muestran un aumento de la actividad sexual hacia el límite inferior (condición hiposmótica). Por el contrario, hacia el límite superior (condición

TABLA 2

Densidad celular inicial y final, tasa de crecimiento promedio y número relativo y absoluto de cigotos y cigosporas en *D. salina* cepa CONC-006 a distintas salinidades. Las condiciones experimentales son iguales a las señaladas en la figura 2.

Initial and final cellular density, mean growth rate, and relative and absolute abundance of zygotes and zygospores of *D. salina* strain CONC-006 at different salinities. Experimental conditions are the same as in figure 2.

	SALINIDAD (%)			
	2	5	15	30
D_i (céls.ml ⁻¹) x 10 ⁵	0,3	0,3	0,3	0,3
D_f (céls.ml ⁻¹) x 10 ⁵	3,20	6,00	7,80	0,98
k (div.día ⁻¹)	0,24	0,30	0,32	0,17
% final céls. reproductivas (*)	96,0	91,6	17,9	4,2
D_{fcr} (céls.ml ⁻¹) x 10 ⁵ (*)	3,1	5,5	1,4	0,041

D_i = Densidad inicial de células totales

D_f = Densidad final de células totales

k = Tasa de crecimiento promedio (Guillard 1973)

D_{fcr} = Densidad final de células reproductivas (*)

(*) = Cigotos + cigosporas

hiperosmótica) ocurre una disminución de la actividad sexual, que se podría explicar, en parte, por la menor densidad celular (9.8×10^4 células/ml) a esas salinidades. Borowitzka (1981) señala que *Dunaliella salina* existe como célula vegetativa móvil a salinidades entre 4% y saturación, lo que concuerda con nuestros resultados. En la salinidad de 2% ocurre una gran mortalidad celular inicial por shock salino; sin embargo, aunque no se detectó mortalidad diferencial entre cigosporas y células vegetativas a esta salinidad, probablemente hubo sobrevivencia de cigosporas, ya que éstas por presentar pared celular serían más resistentes a variaciones bruscas de la salinidad. Estas cigosporas podrían ser las responsables de las relativamente altas densidades celulares detectadas posteriormente en los cultivos a baja salinidad (2%) (Tabla 2).

A concentraciones salinas altas la solubilidad del CO_2 en el medio disminuye, siendo éste un factor limitante para el crecimiento de las poblaciones algales. Borowitzka & Borowitzka (1988) señalan que a concentraciones de sal mayores que 25%, la solubilidad del CO_2 disminuye en el medio en más de un 50% de la que tiene la salinidad del agua de mar (3% NaCl), y la forma de carbono inorgánico predominante en estas condiciones es el CO_3^{2-} . Por otra parte, se ha determinado que concentraciones altas de salinidad estimulan la síntesis de pigmentos carotenoides (Ben-Amotz & Avron 1983, Borowitzka et al. 1984) y la producción de glicerol intracelular como respuesta osmoregulatoria (Ben-Amotz & Avron 1973, Borowitzka & Brown 1974, Avron 1992). Una menor disponibilidad de CO_2 y una mayor asignación de recursos a síntesis de pigmentos y de glicerol a altas salinidades, disminuirían la síntesis celular y por ello la actividad reproductiva tanto asexual como sexual.

Lerche (1937) plantea que la disminución de nutrientes por agotamiento natural en un medio de cultivo envejecido estimula la actividad sexual. Esta autora ha observado un aumento de la actividad sexual en cultivos de *D. salina* en fase estacionaria de crecimiento, actividad que disminuye al diluir con medio fresco. Para separar el

efecto que tiene el envejecimiento del cultivo sobre la sexualidad del efecto de la salinidad propiamente tal se ha restado el porcentaje de actividad sexual obtenido a la salinidad de 15% de NaCl (crecimiento óptimo) a los valores de actividad sexual obtenidos en cada salinidad (Fig. 3). La tabla 2 muestra la densidad de células inicial y final y la tasa de crecimiento promedio de la cepa en estudio (*D. salina* cepa CONC-006) a diferentes salinidades. La mayor tasa de crecimiento promedio y la mayor densidad celular al final de la fase de crecimiento exponencial se obtuvo en la salinidad de 15%. Esta mayor densidad celular podría originar una mayor disminución de nutrientes en el medio lo que explicaría en parte, el aumento de la actividad sexual registrada durante el tiempo experimental a esta salinidad (0,1-17,9%). Los resultados permiten establecer un rango de salinidad entre 2 y 5% de NaCl en el que se estimula la actividad sexual de *D. salina* cepa CONC-006. A concentraciones salinas menores, la viabilidad de los cultivos se ve afectada (lisis celular) y a salinidades mayores hay predominio de células vegetativas. Sin embargo, estos resultados difieren de aquellos obtenidos por Carvajal (1991) para una cepa distinta de *D. salina*. Esta autora encuentra un predominio de estados de resistencia (cistos) a salinidades bajas y de estados sexuales a salinidades altas. Estas diferencias podrían explicarse por las características fisiológicas propias de cada cepa (Cifuentes et al. 1992).

Para la producción comercial de *D. salina* es relevante optimizar la síntesis de carotenos y de glicerol. Ya que los niveles de máxima producción de estos metabolitos ocurre en condiciones subóptimas de crecimiento, y siendo la salinidad una de las variables más utilizadas en el manejo de cultivos a escala experimental, piloto y comercial, los resultados del presente trabajo constituyen un aporte para tales fines.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por los proyectos FONDECYT 89/0823 y DIUC 91.32.24-1 asignados al Dr. O. Parra.

LITERATURA CITADA

- AVRON M (1992) Osmoregulation. In: Avron M & A Ben-Amotz (eds.) *Dunaliella*. Physiology, Biochemistry, and Biotechnology: 135-164. CRC Press Florida.
- BEN-AMOTZ A & MA AVRON (1973) The role of glicerol in the osmotic regulation in the halophilic alga, *Dunaliella parva*. *Plant Physiology* 51: 875-8.
- BEN-AMOTZ A & MA AVRON (1983) On the factors which determine the massive beta-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 72: 593-7.
- BOROWITZKA LJ (1981) The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia* 81: 33-46.
- BOROWITZKA LJ & AD BROWN (1974) The salt relations of marine and halophilic strains of the unicellular green alga, *Dunaliella*. The role of glicerol as a compatible solute. *Archives of Microbiology* 96: 37-52.
- BOROWITZKA LJ, MA BOROWITZKA & TP MOULTON (1984) The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia* 116/117: 115-121.
- BOROWITZKA MA (1988) Algal growth media and sources of algal cultures. En: Borowitzka MA & LJ Borowitzka (eds.) *Micro-algal Biotechnology*: 456-465. Cambridge University Press, Cambridge.
- BOROWITZKA MA & LJ BOROWITZKA (1988) *Dunaliella*. En: Borowitzka MA & LJ Borowitzka (eds.) *Micro-algal Biotechnology*: 27-58. Cambridge University Press, Cambridge.
- BROWN AD & LJ BOROWITZKA (1979) Halotolerance of *Dunaliella*. En: Levandowsky M & SH Hunter (eds.) *Biochemistry and Physiology of Protozoa*: 139-190. New York Academic Press, New York: 139-190.
- CARVAJAL MA (1991) Estudio del ciclo de vida de una cepa chilena de *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. Tesis de Magister, Universidad de Concepción, Concepción.
- CIFUENTES AS, M GONZALEZ, M CONEJEROS, V DELLAROSSA & O PARRA (1992) Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *Journal of Applied Phycology* 4: 111-118
- DELLAROSSA V & AS CIFUENTES (1991) Fotosíntesis-iluminación en especies de *Dunaliella* y en cepas nativas de *D. salina* (Dunal) Teodoresco. *Boletín de la Sociedad de Biología, Concepción* 62: 83-88.
- ELLIS RJ & L MACHLIS (1968) Control of sexuality in *Golenkinia*. *American Journal of Botany* 55: 600-10.
- GIBBONS JD (1976) *Nonparametrics Methods for Quantitativ Analysis*. Massey H (ed.) Maple Press, 463 pp.
- GUILLARD RRL (1973) Division rates. In: Stein JR (ed.) *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*: 289-311. Cambridge University Press, London.
- HILL GJC (1980) Mating induction in *Oedogonium*. In: Gantt E (ed.) *Handbook of Phycological Methods. Developmental & Cytological Methods*: 25-36. Cambridge University Press, New York.
- LERCHE W (1937) Untersuchungen über die Entwicklung und Fortpflanzung in der gattung *Dunaliella*. *Archiv für Protistenkunde* 88: 236-9.
- LOEBLICH LA (1982) Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 62: 493-503.
- MASSYUK NP (1966) Mass culture of the carotene-bearing alga *Dunaliella salina* Teod. *Ukrainian Journal of Botany* 23: 12 -19.
- MASSYUK NP (1973) Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus *Dunaliella* Teod. and prospects for its potential utilization. *Naukova Dumka, Kiev*, 244 (original en ruso).
- PARRA OO, GL FLOYD & LW WILCOX (1990a) Taxonomic identification and ultrastructural characterization of a chilean strain of *Dunaliella*. *Revista Chilena de Historia Natural* 63: 239-45.
- PARRA OO, MA GONZALEZ, V DELLAROSSA, AS CIFUENTES & M CONEJEROS (1990b) Caracterización biológica de una cepa chilena de *Dunaliella salina* potencialmente comerciable. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales (Chile)* 23: 141-146.
- SNELL WJ (1980) Gamete induction and flagellar adhesion in *Chlamydomonas reinhardi* En: Gantt E (ed.) *Handbook of Phycological Methods. Developmental & Cytological Methods*: 37-45. Cambridge University Press, New York.
- TRAINOR FR (1980) Control of development in *Scenedesmus*. En: Gantt E (ed.) *Handbook of Phycological Methods. Developmental & Cytological Methods*: 15-23. Cambridge University Press, New York.
- TRAINOR FR (1986) Famous algal genera I. *Chlamydomonas*. *Progress in Phycological Research* 4(3): 91-106.
- TUTTLE RC (1980) *Cryptocodinium* : sexual reproduction and mutagenesis. En: Gantt E (ed.) *Handbook of Phycological Methods. Developmental & Cytological Methods*: 143-151. Cambridge University Press, New York.