



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

**PROFESOR PATROCINANTE:
DR. RENATO WESTERMEIER H.
INSTITUTO DE ACUICULTURA
FACULTAD DE PESQUERIAS y
OCEANOGRAFIA.**

“ ESTUDIOS EXPERIMENTALES EN EL CULTIVO DE *Macrocystis pyrifera* (L. C. AGARDH), A PARTIR DE GAMETOFITOS PROCEDENTES DE CUATRO LOCALIDADES DEL SUR DE CHILE (X –XII REGIONES).”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Biólogo Marino.

MARIA INES PIEL WESTERMEYER

VALDIVIA – CHILE

2003

*A mis padres
María Inés y Eduardo
Junto a mis hermanos,
Por su constante apoyo,
Comprensión y cariño.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi profesor patrocinante Dr. Renato Westermeier, quien me dio la oportunidad de acceder a su laboratorio de macroalgas en el Campus Pelluco de Puerto Montt, para la realización de mi tesis, además de su guía y constantes consejos que permitieron la realización y término de este trabajo.

Al Dr. Dieter Müller por todo lo que me ha enseñado sobre el cultivo de las algas pardas, durante sus estadías en Puerto Montt.

A los profesores Alejandro Bravo e Iker Uriarte por apoyarme al aceptar ser mis profesores informante, en este trabajo.

Al profesor José Luis Iriarte por ayudarme con los análisis estadísticos en los resultados del trabajo.

A mis padres por todo su apoyo, comprensión y cariño que siempre me han entregado.

A todas aquellas personas que de una u otra forma me apoyaron y ayudaron en la realización de este trabajo.

A mis amigas Angélica, Any, Lisette, Loreto, Taty por todos estos años de estudio y amistad compartidos. A Patricia y Soledad por ser mis grandes amigas.

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento de Proyecto FONDEF D00I1144 Investigación y Desarrollo Tecnológico del cultivo de algas y su utilización por Invertebrados marinos herbívoros en Chile, cuyo director es el Dr. Renato Westermeier H. Decano de la Facultad de Pesquerías y Oceanografía de la Universidad Austral de Chile, Campus Pelluco. Puerto Montt.

A todos ellos, muchas gracias.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Agradecimientos.....	iii
Indice de contenidos	iv
Indice de figuras	v
Indice de tablas	vi
1.- RESUMEN	1
2.-SUMMARY	2
3.- INTRODUCCION	3
Hipótesis	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
4.- MATERIAL Y METODOS	7
4.1.1. Caracterización de la especie	7
4.1.2. Ciclo de vida	8
4.2. Metodología.....	9
4.2.1. Obtención de gametofitos	9
4.2.2. Inicio del inóculo	9
4.3. Diseño del experimento	11
4.4. Medición de los esporofitos	11
4.5. Determinación del número de esporofitos	12
4.6. Cálculo tasa de crecimiento	12
4.7. Análisis estadístico	13
5.- RESULTADOS	14
5.1. Gametofitos	14
5.1.1. Maullín	14
5.1.2. Mar Brava	14
5.1.3. Puyuhuapi	15
5.1.4. Fuerte Bulnes	15
5.2. Célula huevo	15
5.3. Esporofitos	15
5.4. Determinación del número de esporofitos	16
5.5. Crecimiento de los esporofitos	16
5.5.1. Maullín	16
5.5.2. Mar Brava	17
5.5.3. Puyuhuapi.....	17
5.5.4. Fuerte Bulnes	18
5.6. Tasa de crecimiento específico diario	18
5.7. Análisis estadístico	19
6.- DISCUSION	20
7.- CONCLUSIONES	26
8.- LITERATURA CITADA	27

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.-** Planta esporofítica de *Macrocystis pyrifera*.
FIGURA 2.- Ciclo de vida de *Macrocystis pyrifera*.
FIGURA 3.- Ubicación geográfica de las localidades estudiadas.
FIGURA 4.- Gametofitos femeninos y masculinos en botellas 250 ml.
FIGURA 5.- Esporofito microscópico de *Macrocystis pyrifera*.
FIGURA 6.- Gametofitos femeninos y masculinos.
FIGURA 7.- Células huevos de *Macrocystis pyrifera*.
FIGURA 8.- Esporofitos de *Macrocystis pyrifera*.
FIGURA 9.- Comparación del tiempo transcurrido por localidad hasta llegar a los 20 mm de longitud.
FIGURA 10.- Comparación entre las localidades durante las siete semanas de cultivo.
FIGURA 11.- Porcentaje de las tasa de crecimiento específico diario de las cuatro localidades.
FIGURA 12.- Comparación de los cultivo entre las cuatro localidades.
FIGURA 13.- Muestra herbario a la séptima semana de cultivo.

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.- Tasa de crecimiento específico diario.

TABLA 2.- Resultados de la prueba Kruskal – Wallis.

TABLA 3.- Prueba de Tukey no paramétrica.

TABLA 4.- Comparaciones sobre los tamaños de gametofitos entre literatura y lo encontrado en el estudio.

TABLA 5.- Comparaciones en los tamaños de esporofitos entre la literatura y lo encontrado en el estudio.

1.- RESUMEN

Macrocystis pyrifera L.C. Agardh, 1820, alga parda perteneciente al orden de las Laminariales, esta siendo intensamente explotada debido a sus múltiples usos, principalmente en la industria farmacéutica y alimenticia. En el sur de Chile, su explotación esta dirigida a la alimentación del abalón, gastrópodo que ha sido introducido al país en los últimos años. Se estima que si no se realiza un manejo del recurso podría llegar a disminuir de manera drástica, en sus poblaciones naturales. Actualmente en el norte de Chile, se pretende declarar veda a las poblaciones de las especies de *Lessonia* y *Macrocystis*, gestándose una pesca de investigación con estos recursos. Es por ello, de importancia realizar cultivos de estas macroalgas para aumentar su biomasa, realizando experimentos de repoblamiento y estudios poblacionales con el propósito de mantener sus poblaciones naturales y evitando en consecuencia una sobre extracción del recurso, lo que podría causar daños notables en las comunidades asociadas a estas macroalgas.

El presente trabajo describe el desarrollo del cultivo de *M. pyrifera* a partir de gametofitos seleccionados en cuatro localidades del sur de Chile que comprenden de la X región a la XII región. Los gametofitos fueron seleccionados a partir de esporas y se han mantenidos como cultivos puros en el desarrollo de dos proyectos FONDEF, que se orienta a la investigación y tecnología en el cultivo de *M. pyrifera* en el sur de Chile.

Los resultados de este estudio mostraron que los cultivos de algas procedentes de la X región (Maullín y Mar Brava) presentaron un crecimiento más rápido y una tasa de crecimiento específico diario superior a los gametofitos provenientes de localidades más australes como fueron Puyuhuapi (XI región) y Fuerte Bulnes (XII región).

2.-SUMMARY

Macrocystis pyrifera L.C. Agardh, 1820. A brown algae of the Laminariales order, which is being intensity exploited, due to the fact that these macroalgae are used, among other things, in the farmaceutical and food industries. The exploitation that occurs in the south of Chile, is that providing nutrition for the abalones, a gastropode that has been introduced into the country in these last years. It is thought that if no management of this resource is effected in the near future, the natural stock of these algae will diminish drastically. Actually in the north of Chile, will pretend declare a prohibition to the populations of the *Lessonia* and *Macrocystis* species. To procure fishing investigation with this resources. It is, therefore, important to cultivate these macroalgae, in order to increase and develop their biomass, making experiments and studies regarding re-stocking, so that the original stock is preserved and, therefore, avoiding the consequences of over-exploitation of the resource, which in turn could cause a great amount of damage to the communities associated to this brown algae.

This work describes the growth of *M. pyrifera* from gametophytes selected in four locations in the south of Chile, between the X and the XII regions. The gametophytes were selected from spores and have been kept as pure cultures, during the development of two FONDEF project, dedicated to the investigation and technology of the cultivation of *M. pyrifera* in the south of Chile.

The results of this study show that the cultivated algae from the X region (Maullin and Mar Brava) presented a quicker growth rate and a superior specific daily growth rate than those gametophytes coming from locations further south, like Puyuhuapi (XI region) and Fuerte Bulnes (XII region).

3.- INTRODUCCION

Macrocystis pyrifera L.C. Agardh, es una alga parda (Phaeophyta) perteneciente al orden de las Laminariales. Es un componente importante del intermareal rocoso del sur de Chile (Westermeier *et al.*, 1989), como también en zonas submareales del mar interior del Pacífico sur de Sudamérica (Westermeier, 1982; Westermeier & Möller, 1990).

El género *Macrocystis* presenta una distribución bipolar (Etcheverry, 1986; Dring, 1992) aún cuando según Etcheverry & Collantes (1978) es circum-subantártica. Es un género cuya área de dispersión se extiende a lo largo de la costa chilena y peruana desaparece en el trópico y reaparece en la costa occidental de la EEUU (Baja California) llegando por el norte hasta Canadá y Alaska. Se encuentra también en Africa del Sur, Nueva Zelanda y Australia (Etcheverry & Collantes, 1978). En Chile *M. pyrifera* se extiende desde Cabo de Hornos hasta Valparaíso, otros autores mencionan que la distribución sería hasta Concepción 36° L.S. desapareciendo en todo el norte de Chile, donde es reemplazada por *Macrocystis integrifolia* (Candia *et al.*, 1979; Etcheverry, 1986; Santelices, 1989; Westermeier & Möller, 1990).

Macrocystis pyrifera se encuentra entre los recursos algológicos chilenos de importancia industrial (Etcheverry & Collantes, 1978), puesto que de ella se extraen los alginatos, los cuales son utilizados tanto por la industria cosmética, farmacéutica así como la industria alimenticia por sus propiedades de agente emulsionante, así como gelificante, espesante, estabilizante entre otros usos.

M. pyrifera es una especie de significativo valor comercial con grandes perspectivas de expansión futura (North, 1979). Actualmente esta alga esta siendo fuertemente

sobre explotada en la X Región debido a su extracción para la elaboración de los alginatos además de su actual utilización como alimento para los abalones. De este último hecho radica la importancia de conocer sobre la biología de esta especie para realizar su posterior cultivo.

El desarrollo del cultivo del abalón hace indispensable desarrollar actividades de cultivo en algas pardas, ya que son preferentemente las de este grupo las que tienen un impacto en el crecimiento de estos invertebrados, como se ha descrito en Vergara *et al.*, (2000); Soto *et al.*, (2002). En los últimos años ha aumentado la extracción de estas algas y es así como las dinámicas de estas poblaciones han sufrido fuertes cambios. Existen poblaciones que están además disminuyendo sus biomasas y extensiones por esta necesidad de materia prima en la alimentación de abalones preferentemente en el mar interior de Chiloé (Westermeyer com. personal). En el norte del país una situación similar ocurre con dos especies *Lessonia* y *Macrocystis integrifolia*. El abalón al alcanzar una talla de 10 mm consume entre 10 a 30% de su peso diario, lo cual implica una gran demanda de las poblaciones naturales de *M. pyrifera*. (Hahn, 1989; Westermeyer *et al.*, 2001b).

Se estima que para el año 2005 entre 500 a 600 toneladas de abalones se encontrarán en proceso de engorda en el mar. Si se considera que 50 toneladas de abalón consumen anualmente entre 400 a 500 toneladas aproximadamente de algas húmedas, se hace necesario desarrollar investigación y tecnología para el cultivo de estas macroalgas pardas, que al parecer tendrían mejor palatabilidad en estos organismos herbívoros.

Existen trabajos que muestran los intentos por cultivar esta especie de diversas formas, en sus comienzos fue para manejar las praderas naturales que se encontraran

escasas o donde hallan desaparecido, así fue como North (1979) trató de realizar cultivos mediante el trasplante de plantas juveniles y adultas. El mismo autor utilizó otro sistema que consistía en la dispersión de cigotos microscópicos desarrollados en cultivos masivos. Otros investigadores (Braud *et al.*, 1974) extrajeron frondas fértiles desde la costa chilena (VIII Región) para posteriormente realizar los cultivos en Francia en un laboratorio y más tarde llevarlos al mar, obteniéndose buenos resultados.

En el manejo de poblaciones naturales destacan varios trabajos que dan cuenta de la dinámica poblacional de esta especie (Santelices, 1989; Westermeier & Möller, 1990) mientras otros han desarrollado experiencias en la mantención de las praderas a través de podas, así es como Romo *et al.*, (1984) propuso la realización de podas en los bosques de *M. pyrifera*, obteniendo recuperación del dosel si se podan plantas a un metro de la superficie. En esta misma línea Westermeier *et al.*, 2003 han realizado experiencias de podas de esta especie en cultivo en el mar demostrando que las plantas reaccionan positivamente en las secciones de la planta cuando ella comienza a ramificar su talo, Santelices (1989) encontró que para plantas podadas a un metro del fondo la mortalidad de estas aumentaba.

El cultivo de *M. pyrifera* vía esporas es conocido y se realiza comúnmente, siendo viable durante la primavera y verano aún cuando algunas veces es fértil durante todo el año. (Westermeier, 2001b).

Un cultivo que se realice a partir de gametofitos de *M. pyrifera* seleccionados posibilita realizar el cultivo en cualquier época del año, puesto que estos gametofitos se pueden mantener bajo condiciones de laboratorio, para ser utilizados en el momento que se desee obtener una nueva producción de estas algas.

HIPOTESIS:

Los esporofitos producidos en el laboratorio a partir de los gametofitos a cultivar, no presentaran diferencias en las tasas de crecimiento específico diario entre las cuatro localidades del sur de Chile (desde la X a la XII regiones), bajo condiciones controladas.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el crecimiento de los esporofitos de cuatro localidades geográficas del sur de Chile,
(X a XII Regiones) a partir de cultivos puros de gametofitos bajo condiciones controladas en el laboratorio.

Nota: Estos gametofitos fueron producidos en el laboratorio de Botánica Marina de la Universidad Austral de Chile, Pelluco, Puerto Montt.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar el número de esporofitos producidos a partir de gametofitos en el laboratorio por localidad.
- Determinar las tasas de crecimiento diarios de los esporofitos cultivados en el laboratorio procedentes de cuatro localidades.
- Comparar las tasas de crecimientos de los esporofitos cultivados en el laboratorio de las localidades estudiadas.

4.- MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Botánica Marina de la Universidad Austral de Chile, ubicado en el Campus Puerto Montt, Pelluco, distante a 4 Km de la ciudad de Puerto Montt.

4.1.1. CARACTERIZACION DE LA ESPECIE

Macrocystis pyrifera presenta un cuerpo vegetativo denominado talo, (Fig.1.), que se levanta de un disco adhesivo cónico que puede llegar a medir un metro de diámetro, denominado rizoide, el cual tiene hapterios ramificados, de hasta un centímetro de grosor, no fusionados entre sí (Etcheverry, 1986; Santelices & Hoffmann, 1997).

Estos hapterios nacen en capas superpuestas que, en ejemplares viejos, llegan a circundar la base de los primeros estipes. De este rizoide o disco basal nacen los estipes, cilíndricos, que terminan en la lámina de hasta 70 cm de largo, provisto de un aerocisto piriforme basal, el cual lleno de aire permite la flotabilidad de la planta cuando alcanzan la superficie en poblaciones submareales. Entre la porción terminal del estipe y la base de la lámina se producen las fisuras en dirección distal. Al avanzar las fisuras hasta el borde de la lámina van dando origen a nuevos estipes y láminas. (Santelices & Hoffmann, 1997). Las frondas son de un color verde aceituno con rugosidades en el sentido de su longitud, llevan dientes o pestañas bastantes largas, en sus bordes. Las frondas de la base del estipete (esporofilas) se mantienen oblicuas a la superficie, en tanto que el resto de ellas flotan suspendidas por los aerocistos. (Etcheverry, 1986). La especie forma bosques submarinos

extensos sobre sustrato rocoso y a veces sobre zona de arena gruesa. Se encuentra hasta profundidades de 20 m y excepcionalmente 80 m. En la masa del disco adhesivo de las poblaciones chilenas se alojan numerosos invertebrados. Se calcula que en zonas templadas frías las frondas viven aprox 1 año. Según North (1971) las frondas tienen una vida promedio de seis meses, sin embargo puede ser menor debido al ataque de pastoreadores, tormentas o aguas más templadas. Para la zona central de Chile no existen cálculos semejantes aunque se supone que las plantas son perennes. Las plantas son fértiles durante todo el año, al menos en California, sin embargo la mayor colonización en Chile parece ocurrir en primavera (Westermeier & Möller, 1990; Santelices & Hoffmann, 1997).

4.1.2. CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *Macrocystis pyrifera* (L.) J. Agardh (Fig.2) tiene una alternancia de generaciones heteromórficas entre un esporofito macroscópico diploide y gametofitos microscópicos haploides. Las esporas se desarrollan en esporangios uniloculares donde ocurre la división reductiva. La germinación de las esporas comienza con una protuberancia que origina el tubo de germinación, donde se vacía el contenido citoplásmico de la espora. El desarrollo se continúa con un proceso intenso de división celular que termina con la formación de los gametofitos. El gametofito masculino presenta ramificaciones cuyas células terminales poseen una coloración más intensa que acusa la formación de los espermatozoides, (Westermeier *et al.*, 1989; Westermeier *et al.*, 2003 a; 2003 b).

Los gametofitos masculinos están formados por filamentos de alrededor de unas 5 micras de diámetro, los gametofitos femeninos son filamentosos de alrededor de 10 micras de diámetro y escasamente ramificados (Candia *et al.*, 1979; Santelices & Hoffmann, 1997). El gametofito femenino puede ser unicelular produciendo una célula huevo, o bien

el mismo gametofito con varios huevos. El cigoto originado de la fusión de los gametos comienza a dividirse inmediatamente. Las primeras divisiones son perpendiculares al eje principal, formándose un esporofito inicial constituido por una fila de células uniseriadas. Luego de la parte basal se diferencia un órgano de fijación y la parte distal constituye un esporofito juvenil. (Westermeier *et al.*, 1989).

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Obtención de Gametofitos.

Durante el transcurso del proyecto FONDEF D97F1071 se logró obtener gametofitos de distintas localidades del sur de Chile entre la X región y la XII región. Maullín 41° 37' L.S. Provincia de Llanquihue y Mar Brava 42° 30' L.S. en la provincia de Chiloé ambas de la (X región) Puyuhuapi 44° 56' L.S. en la provincia de Aysen (XI región) y Fuerte Bulnes 53° 37' L.S. en la provincia de Magallanes (XII región). (Fig.3.) Durante el desarrollo de ese proyecto se logró separar por sexo a los gametofitos de las localidades antes mencionadas, las cuales se mantiene en el laboratorio creciendo y aumentando su biomasa. (Westermeier *et al.*, 2003 a; 2003 b) (Fig. 4).

4.2.2. Inicio del Inoculo.

Con ayuda de pipetas Pasteur se extraen 2 ml de gametofitos femeninos del frasco y 1 ml de gametofitos masculinos y se introducen en un recipiente con 400 ml de medio de cultivo, se agita y se lleva a una cámara de incubación (diurnal growth chamber Forma Scientific) con un fotoperiodo día largo de 16:8, luminosidad mayor a 2500 lux. Durante los primeros días se debe cubrir el recipiente con los cultivos para permitir una mejor

adaptación al cambio de luz, de reducida (120 lux) a 2500 Lux y evitar problemas en la pigmentación de los gametofitos (Müller, D com. pers.) y a 10°C, hasta que se comiencen a formar los primeros esporofitos (el tiempo varía entre 20 a 30 días desde el inicio del inoculo). El cambio de medio se realiza cada 7 días.

Una vez iniciada la formación de los esporofitos (Fig.5.) se cambia el medio y se pasan a botellas de un litro con aireación, las condiciones del laboratorio en esta fase son de una temperatura de 12 a 14°C. El cambio de medio (20 ml de Provasoli por litro de agua de mar filtrada y esterilizada) será cada 7 días luego de dos semanas se traspasarán a botellas de mayor volumen, dependiendo de la densidad o tamaño de los talos. Una vez que las frondas alcanzan longitudes superiores de 20 a 30 mm se traspasan al invernadero.(Westermeyer *et al.*, 2003 a; 2003 b).

Para la realización del cultivo es fundamental la limpieza y esterilizado de todo el material. Para un cultivo óptimo se utiliza agua de mar filtrada hasta 0,5 micras, pasada por luz ultra violeta y posteriormente autoclavada. Todo el material que se utilizó dentro del laboratorio fue igualmente autoclavado. El medio de cultivo utilizado para el cultivo fue Provasoli PES (Provasoli, 1963; Mc Lachlan, 1973) donde se utilizó una concentración de 20 ml de Provasoli por litro de agua de mar esterilizada, puesto que es el medio de cultivo más utilizado en el cultivo de algas bentónicas, (Oliveira *et al.*, 1995).

4.3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Se realizaron cultivos de *Macrocystis pyrifera* de cuatro localidades distintas del sur de Chile, con el objetivo de estudiar el crecimiento y el comportamiento de los esporofitos

de las distintas localidades dentro del laboratorio. Para ello se montó en el laboratorio, cultivos en forma paralela para lograr calcular la tasa de crecimiento específico diario por localidad.

Los cambios de medio se realizaron de igual manera para todas las localidades. La duración del experimento duró 7 semanas, hasta que se presentaron los esporofitos con una longitud superior a los 20 mm.

4.4. MEDICION DE ESPOROFITOS :

Para la medición de los esporofitos menores a 1,5 mm, se tomó una muestra con la ayuda de una pipeta Pasteur y se midió con un microscopio. En este caso, se utilizó un microscopio Zeiss con objetivo de 4x ó 10x de aumento y con un ocular micrométrico Zeiss de esta manera se obtuvieron los tamaños de los esporofitos en micras. Cuando los esporofitos alcanzaron tallas mayores a 2 mm, se realizaron las mediciones con ayuda de una regla graduada en centímetro y se procedió a tomar las longitudes de las frondas. Estas se midieron desde la base del esporofito hasta el ápice, sin tomar en cuenta el rizoide (Avila *et al.*, 1985; Westermeier *et al.*, 1989).

Para medir la longitud de los esporofitos se realizó un muestreo al azar utilizando el método del vecino más próximo descrito por (Cosson & Gayral, 1977; Avila *et al.*, 1985; Westermeier *et al.*, 1989), en cinco sitios sobre el cubreobjeto.

4.5. DETERMINACION DEL NUMERO DE ESPOROFITOS.

Para determinar el número de esporofitos producidos, durante cada cambio de medio, se tomó una muestra con una pipeta y se contabilizó el número de esporofitos en sextuplicado, con ayuda de un microscopio. Cuando los esporofitos alcanzaron un tamaño superior al milímetro, se colocaron en botellas de litro, se tomaron muestras de 10 ml donde se cuantificó el número de esporofitos existentes.

4.6. CALCULO TASA DE CRECIMIENTO

Para realizar el cálculo de la tasa de crecimiento específico (% por día) en las algas se utilizó la expresión indicada por Hansen *et al.*, (1981); Diaz & Tapia (1986) cuya fórmula es la siguiente:

$$\mu = (100 * \ln (L_f / L_i))/t$$

donde:

μ : tasa de crecimiento específico expresada como en porcentaje de incremento de longitud por día.

L_i : Longitud inicial de las algas

L_f : Longitud alcanzada en t días.

$\ln$: Logaritmo natural

t: tiempo transcurrido (días).

4.7. ANALISIS ESTADISTICO

Para responder la hipótesis planteada se realizaron cuatro réplicas para cada localidad en el laboratorio.

Al analizar los datos se intentó realizar una prueba paramétrica de análisis de varianza (ANDEVA) para responder a la hipótesis planteada. Sin embargo, los datos no cumplieron el supuesto de homogeneidad de varianzas entre las localidades (Prueba de Bartlett $\chi^2 = 9,2$;

$p = 0,025$), por lo tanto los datos fueron transformados (logaritmo 10 de X) y el análisis también arrojó una variabilidad entre varianzas (Prueba de Bartlett $\chi^2 = 14,19$; $p = 0,002$).

Por lo tanto, se decidió realizar una prueba no paramétrica de ANOVA, la Prueba Kruskal-Wallis y una prueba de comparaciones múltiples no paramétrica, prueba de Tukey.

5.- RESULTADOS

PRODUCCION DE ESPOROFITOS A PARTIR DE GAMETOFITOS.

5.1. GAMETOFITOS.

Antes de comenzar los cultivos se procedió a fragmentar los gametofitos y posteriormente medir su longitud tanto para los gametofitos femeninos como para los masculinos (Fig. 6).

5.1.1 Maullín

Para los gametofitos femeninos nos encontramos con longitudes que van desde 130 a 350 μm con un promedio de 196,8 μm y una desviación estándar de 53,5. Para los gametofitos masculinos las longitudes oscilaron entre 50 a 150 μm con un promedio de 81,0 μm .

5.1.2 Mar Brava

Los gametofitos femeninos de esta localidad presentaron longitudes que variaron de 100 a 270 μm con un promedio de 190,9 μm con una desviación estándar de 42,9. Para los gametofitos masculinos, en cambio las longitudes variaron de 40 a 130 μm con un promedio de 80,8 μm .

5.1.3 Puyuhuapi

Los gametofitos femeninos de Puyuhuapi registraron longitudes que van de 110 a 250 μm con un promedio de 177,2 μm y una desviación estándar de 36,8. Para los gametofitos masculinos las longitudes se encontraron entre 50 a 110 μm con un promedio de 72,9 μm .

5.1.4 Fuerte Bulnes

Para los gametofitos femeninos de esta localidad las longitudes oscilaron entre 130 a 270 μm con un promedio de 189,1 μm y una desviación estándar de 34,4. Para los gametofitos masculinos, en cambio las longitudes oscilaron entre 50 a 110 μm con un promedio de 71,9 μm .

5.2. CELULA HUEVO.

Antes de producirse la fecundación, en los muestreos realizados nos encontramos con las células huevos (Fig. 7) los cuales se encuentran en los gametofitos femeninos y es aquí donde posteriormente se produce la fecundación. En los muestreos realizados nos encontramos con que las células huevos medían alrededor de 30 μm de diámetro.

Las células huevos comenzaron a ser visibles entre los días 18 a 21 de iniciado el cultivo.

5.3. ESPOROFITOS.

Una vez ocurrida la fecundación (en la célula huevo) está comienza a alargarse, encontrándose luego con una división, la cual es perpendicular a la base. En los muestreos se encontró que los esporofitos (Fig. 8) iniciales poseían entre 2 a 3 células con una longitud de 40 μm , esto ocurrió entre los días 20 a 25 luego de iniciado el cultivo, observándose en todos los cultivos de cada localidad. Para los esporofitos con 4 a 5 células la longitud registrada fue de 50 μm .

5.4. DETERMINACION DEL NUMERO DE ESPOROFITOS.

Se contabilizó el número de esporofitos encontrados para cada localidad, así fue como se determinó que para las localidades de Maullín y Mar Brava el número de esporofitos encontrados varió entre 30.000 a 15.000 mientras que para las localidades de Puyuhuapi y Fuerte Bulnes en general, el número de esporofitos no superó los 10.000, oscilando entre 6.000 a 8.000 esporofitos para cada una de estas localidades.

5.5. CRECIMIENTO DE LOS ESPOROFITOS.

Se evaluó el crecimiento de los esporofitos desde que tenían una longitud de 40 μm (0,04 mm) hasta que logaran una longitud de 20 mm. Con esta talla los esporofitos fueron llevados al invernadero o Ficohatchery, los resultados encontrados por localidad fueron los siguientes:

5.5.1 Maullín

El día uno del cultivo, la longitud de los esporofitos al igual que para las demás localidades, fue de 0,04 mm. Al momento de la primera semana (día 7) las longitudes registradas variaron entre 0,15 a 0,18 mm, a la tercera semana del cultivo las tallas se encontraban entre 0,98 a 1,41 mm, a la quinta semana los crecimientos fueron más notorios llegando a longitudes que van de 7,0 a 7,5 mm y a la séptima semana de muestreo las longitudes obtenidas fueron de 19,4 a 24,54 mm. Por lo que ya se encuentran en condiciones de ser trasladados al invernadero (Fig. 9 y 10).

5.5.2 Mar Brava

La longitud inicial fue de 0,04 mm. A la primera semana de iniciado el cultivo las longitudes encontradas fueron de 0,13 a 0,25 mm, para la tercera semana de cultivo las longitudes muestreadas se encontraban entre 0,96 a 1,92 mm. A la quinta semana de experimento los crecimientos encontrados fueron de 4,96 a 5,63 mm y para la séptima semana de cultivo las longitudes encontradas fueron de 11,22 a 14,98 mm.

Esta localidad necesita de unas 10 semanas de cultivo para lograr una longitud del orden de los 20 mm (Fig. 9 y 10).

5.5.3 Puyuhuapi

Los esporofitos de la localidad de Puyuhuapi, se iniciaron con 0,04 mm de longitud, pasada una semana de cultivo el crecimiento registró un aumento 0,05 a 0,07 mm. Durante el muestreo de la tercera semana nos encontramos con esporofitos de unos 0,36 a 0,74 mm de longitud, a medida que van transcurriendo las semanas durante la quinta semana nos

encontramos con tallas de 0,82 a 2,2 mm y para la séptima semana de cultivo las longitudes se encontraban entre 3,08 a 4,6 mm.

En cultivos de esta localidad para producir esporofitos con una longitud de 20 mm se necesitan 13 semanas aproximadamente (Fig. 9 y 10).

5.5.4 Fuerte Bulnes

Para esporofitos de la localidad de Fuerte Bulnes, como fuera en las localidades antes mencionadas también se encontraron los esporofitos iniciales con 0,04 mm cuando el esporofito sólo tenían dos células. Durante la primera semana del cultivo estas algas presentaban una longitud de 0,06 a 0,14 mm, durante el muestreo de la tercera semana las longitudes se encontraban entre 0,23 a 0,54 mm, ya para la quinta semana de cultivo los esporofitos muestreados registraron longitudes de 0,95 a 2,0 mm y al llegar a la séptima semana de cultivo las longitudes registradas bordeaban los 3 mm, fluctuando entre 2,12 a 3,76 mm.

Esta localidad es la que presentó un crecimiento más lento, tardando aproximadamente unas 18 semanas en presentar longitudes de 20 mm. Para poder ser derivadas al invernadero y posteriormente al mar (Fig. 9 y 10).

5.6. TASA DE CRECIMIENTO ESPECIFICO DIARIO.

La tasa de crecimiento específico diario mostró el mayor valor para la localidad de Maullín con un promedio de 12% (vario entre 12,2% a 13,2%). Para la localidad de Mar Brava el crecimiento fue cercano al anterior alcanzando al 11% (variando de 11,4% a 12,1%). En el caso de los esporofitos producidos de gametofitos de Puyuhuapi el porcentaje

de crecimiento fue de aproximadamente 9% (variando entre 8,9 a 9,7%) y por último la localidad de Fuerte Bulnes fue la que presentó el crecimiento más lento con una tasa de crecimiento diario del orden del 8% (variando entre 6,4% a 9,4%) (Fig.11; Tabla.1).

5.7. ANALISIS ESTADISTICO.

De acuerdo a los resultados arrojados para el cultivo en el desarrollo de las primeras siete semanas, se detectaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento de *Macrocystis pyrifera* entre las cuatro localidades (Prueba Kruskal Wallis) ($H = 13,29$; $n = 16$; $p = 0,04$).

Para conocer entre que localidades existieron diferencias en la tasa de crecimiento se realizó una prueba a “posteriori” de comparaciones múltiples, no paramétrica prueba de Tukey (para tamaños iguales). El análisis arrojó la formación de dos grupos con tasa de crecimiento distintivo: Grupo 1 donde se encontrarían las localidades de Maullín y Mar Brava y el Grupo 2 al cual pertenecerían las localidades de Puyuhuapi y Fuerte Bulnes, cuyos valores promedios fluctuaron entre 0,12 a 0,11 y entre 0,09 a 0,08 respectivamente (Fig.12; Tabla 3). Aunque, en un análisis no paramétrico, el estadístico de tendencia central adecuado es la mediana, en esta tesis se utilizará el promedio con el objetivo de describir comparativamente los diferentes grupos.

6.- DISCUSION

Los gametofitos femeninos, tal como se describe en la literatura se diferencian de los gametofitos masculinos por la presencia de anteridios, órgano masculino, son filamentosos y miden alrededor de 5 micras de diámetro, son abundantemente ramificados, sus células terminales, presentan una coloración más intensa que acusa el proceso de formación del espermatozoide (Etcheverry & Collantes, 1978; Candia *et al.*, 1979; Santelices & Hoffmann, 1997). Mientras que los gametofitos femeninos se observan con oogonios, con filamentos de mayor diámetro, miden alrededor de 10 micras de diámetro, son menos ramificados e irregulares en su forma. (Etcheverry & Collantes, 1978; Candia *et al.*, 1979; Santelices & Hoffmann, 1997). En el presente trabajo se observó que los gametofitos femeninos son menos filamentosos que los masculinos y con un diámetro mayor que el de los gametofitos masculinos lo que concuerda con lo reportado en la literatura.(Fig. 6).

La fecundación de gametofitos provenientes de las cuatro localidades fue similar, en todos los casos los esporofitos aparecen entre los 20 a 25 días de cultivo. La época del año en que se realizaron los cultivos, no tuvieron ningún efecto en el número de días en que aparecen los esporofitos. Esto puede explicarse por las condiciones del laboratorio uniformes bajo las cuales se desarrollaron.

Los tamaños de los gametofitos femeninos variaron entre 100 a 270 μm para las cuatro localidades, estos valores son notablemente inferiores a los reportados por Etcheverry & Collantes (1978) con 800 μm de longitud. Sin embargo, Westermeier *et al.*, (1989) reportaron longitudes de 95 a 106 μm , los cuales son coincidentes con los descritos

de este estudio. Sobre los tamaños de los gametofitos masculinos, estos alcanzaron valores que oscilaron entre 40 a 130 μm , para las cuatro procedencias. En Etcheverry & Collantes (1978) las longitudes variaron de 100 a 120 μm (Tabla 4). Es posible que estas diferencias estén involucradas con errores de medición ya que los gametofitos forman masas irregulares que dificultan a menudo este proceso. Es posible también que en el trabajo realizado por Etcheverry & Collantes (1978) no hallan homogenizado los gametofitos antes de iniciar su cultivo, Otro factor que podría haber influido es el hecho que utilizaron algas provenientes de la VIII región y tal vez los gametofitos sean de mayor tamaño a los encontrados en otras latitudes.

La presencia de células huevos ocurrió entre dos a cuatro días previos a que se produjera la aparición de los esporofitos. Las células huevos son esféricas antes de su fecundación, cuyo diámetro es de 30 μm aproximadamente (Fig. 7). Una vez producida la fecundación este comienza a dividirse inmediatamente, (Fig. 7). Las primeras divisiones son perpendiculares al eje principal, formándose un esporofito inicial constituido por una fila de células uniseriadas. A las divisiones transversales le suceden las longitudinales. Ciertas células en la porción basal se modifican y alargan, constituyendo rizoides (Fig. 8) (Etcheverry & Collantes, 1978; Westermeier *et al.*, 1989).

En el cultivo se observaron los esporofitos iniciales de 2 a 3 células con una longitud de 40 μm , (Fig. 8) para esporofitos de 4 a 5 células se encontraron con 50 μm de longitud. Alveal *et al.*, (1982), describen esta misma formación.

Al comparar los valores de crecimiento reportados en este trabajo y aquellos de la literatura, resulta evidente que los datos de Braud *et al.*, (1974) son semejantes a los

reportados en este trabajo. Estos datos difieren absolutamente a los reportados por Etcheverry & Collantes (1978). Es posible inferir que debido a que ellos utilizaron un fotoperíodo menor (10 – 12 hrs luz) o bien por el hecho de realizar el cultivo con otro medio de cultivo, en este caso el medio de cultivo Schreiber. Resulta claro al revisar la Tabla 5 que en cultivos realizados en laboratorio se obtengan crecimientos de esporofitos con longitudes variables así, para Maullín y Mar Brava a los 30 días de cultivo presentaban tallas de 5000 μm mientras que en los resultados reportados por Etcheverry & Collantes (1978) lograron una longitud de 600 μm . Este valor es muy bajo si se compara con las procedencias con crecimiento más bajo obtenidas para este trabajo. Westermeier *et al.*, (2000; 2001a) registraron para esporofitos de Fuerte Bulnes un crecimiento de 2 cm (20 mm) en cuatro meses y para Puyuhuapi 0.7 cm (7 mm) en dos meses, valores semejantes a los reportados en este estudio.

La importancia del cultivo a base de gametofitos es la posibilidad de cultivar en cualquier época del año mientras que vía espora es viable durante la primavera tardía y verano, aún cuando se ha reportado fertilidad en meses de otoño e invierno en praderas submareales de la Isla de Chiloé (Westermeier, 2001 b). Los cultivos vía gametofito se diferencian del realizado vía esporas en que el tiempo para producir esporofitos es menor, disminuyendo en 15 días en relación al vía esporas. Este es el tiempo en que las esporas demoran en formar los gametofitos. Según Candia *et al.*, (1979) este tiempo es de 35 días de espora hasta esporofito.

Al comparar cultivos vía esporas con gametofitos de la misma procedencia (Maullín) se encontró un crecimiento más rápido en el cultivo vía gametofito. Ambos

experimentos se manejaron bajo las mismas condiciones en el laboratorio (Westermeyer *et al.*, 2002).

El análisis estadístico presenta diferencias significativas entre las localidades, así los gametofitos se encontraban en el laboratorio con un tiempo aproximado de 30 meses, tiempo que se podría decir que las cuatro localidades ya se encontraban aclimatadas a las condiciones del laboratorio, las que no son iguales a cada localidad geográfica. De los resultados encontrados tenemos que las localidades de Maullín y Mar Brava presentaron un porcentaje de tasa de crecimiento superior (11 a 12%) mientras que las localidades de Puyuhuapi y Fuerte Bulnes sus porcentajes de tasas de crecimiento se presentaron más bajas (8 a 9%). Esto señala la tendencia, de que posiblemente áreas geográficas distantes sean las responsables de estas diferencias. Tal vez estas diferencias encontradas en los resultados podría deberse a que los esporofitos difieran genéticamente, o bien que a los esporofitos provenientes de las localidades más australes se les debiera haber tratado con otros factores que se asemejen más su medio ambiente. Sin embargo, pudiesen existir otros elementos como la fertilidad de las frondas en el momento de realizar los cultivos y/o a que existan morfotipos diferentes que reaccionan de manera distinta a las condiciones investigadas en el laboratorio para este trabajo. Durante el desarrollo del experimento se encontró que los esporofitos de Maullín alcanzan una talla de 20 mm luego de 7 semanas, mientras que para la localidad de Fuerte Bulnes se necesitan 15 semanas de cultivo, para llegar a la misma talla. Esto nos indicaría que la localidad está jugando un factor importante al momento de pensar en la realización de un cultivo. Westermeyer *et al.*, (2003 a, 2003b), describen diferentes procedencias del mar interior de Chiloé, las que presentan también tasas de crecimiento diferentes en el laboratorio.

Para el desarrollo de los cultivos vía gametofítica factores como la luz, temperatura y los nutrientes deben tenerse en cuenta, ya que la germinación, el desarrollo de esporas, la fertilidad y el crecimiento de gametofitos y esporofitos es afectada. (Hoffmann & Santelices, 1982; Avila *et al.*, 1985; Westermeier *et al.*, 1989).

Así para la inducción a la gametogénesis, debe existir luz blanca $20-60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de día largo (16:8) tanto para *Macrocystis* como para Laminariales europeas (Saito, 1956; Hsiao & Druehl, 1971; Lüning & Dring, 1972; Cosson & Gayral, 1977; Lüning & Neushuel, 1978; Hoffmann & Santelices, 1982; Maier, 1986, 1999). Mientras que en esporofitos juveniles de Laminariales y *Macrocystis pyrifera* se reportó valores que oscilaban entre $150 - 220 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Maier, 1999). Por su parte Westermeier *et al.*, (1989) encontró que el crecimiento de los esporofitos dependió de las condiciones del cultivo, así se encuentra un mayor crecimiento en los esporofitos tratados con un fotoperiodo de día largo (16:8) a 12°C y con una intensidad luminica de 25 y $36 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Todos estos antecedentes de cultivo de algas pardas se realizaron mediante la liberación de esporas y formación de gametofitos posteriormente. Experiencia en el crecimiento vegetativo de gametofitos de *Macrocystis pyrifera*, *M. integrifolia* como de *Lessonia trabeculata* en el laboratorio se ha obtenido bajando la intensidad de la luz, así los gametofitos solo crecen, no llegando a ser reproductivos. (Westermeier *et al.*, 2003 a, 2003b).

Es necesario cambiar las condiciones de luz y temperatura por sobre los 12°C y $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y con luz azul o/y blanca los gametofitos formarán gametangios los cuales se harán fértiles y podrán ser fecundados y originaran en consecuencia el cigoto y por mitosis el esporofito. (Westermeier *et al.*, 2003a, 2003b). Estos resultados son semejantes a los reportados por Lüning (1981). Sin duda la gametogénesis y el cultivo vegetativo en algas pardas del orden Laminariales pueden relacionarse además de la luz, temperatura y densidad del flujo fotónico con el fotoperiodo, el medio de cultivo, nitrato, fosfato, yodo, hierro, boro y otros elementos trazas.

Este trabajo demostró que es posible producir en el laboratorio cultivos de *Macrocystis pyrifera* sin importar la localidad geográfica de donde provengan. La respuesta a la hipótesis planteada para este estudio mostró que hubo diferencias entre los porcentajes de las tasas de crecimiento. Con ello se observó la formación de dos grupos claramente diferenciados. En el grupo 1 para las localidades de Maullín y Mar Brava ambas pertenecientes a la X región donde el crecimiento fue más rápido y el grupo 2 para las localidades de Puyuhuapi (XI región) y Fuerte Bulnes (XII región).

7.- CONCLUSIONES

- 7.1** Tal como se reporta en la literatura de las Laminariales, se observó en *Macrocystis pyrifera* que los gametofitos femeninos eran de mayor tamaño y diámetro que los gametofitos masculinos.
- 7.2** Los gametofitos provenientes de diferentes localidades tuvieron el mismo comportamiento al cabo de un mes de cultivo. Así formaron células huevos y esporofitos iniciales en este período.
- 7.3** El desarrollo de los esporofitos, luego de la gametogénesis es diferente para las distintas localidades utilizadas, así el análisis estadístico determinó dos grandes grupos con tasas de crecimiento diferente. En el grupo 1 se encuentran las localidades de Maullín y Mar Brava con tasas de crecimiento de 11 a 12 % diario ambas ubicadas en la décima región. El segundo grupo las localidades de Puyuhuapi y Fuerte Bulnes, con tasas que variaban entre un 8 a 9 % las cuales se ubican en la undécima y duodécima regiones respectivamente.
- 7.4** Estos resultados hacen inferir que la procedencia puede jugar un rol importante en el crecimiento, como el estado de maduración de las frondas al momento de obtener las esporas desde las frondas.

8.- LITERATURA CITADA

Agardh, L.C. 1820. Species algarum, 1 Part 1. Lund Pp 1-168.

Alveal, K; Romo, H; Avila, M. 1982. Estudios de ciclos de vida de *Macrocystis pyrifera* de Isla Navarino, Chile. Gayana Botánica 39: 1-12.

Avila, M; Hoffmann, A; Santelices, B. 1985. Interacciones de temperatura, densidad de flujo fotónico y fotoperíodo sobre el desarrollo de etapas microscópicas de *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta, Laminarilales). *Rev. Chilena de hist. Nat.* 58: 71-82.

Braud, J.P; Etcheverry, H & Pérez, R. 1974. Development de l'algue *M. pyrifera* (L) Ag. Sur les cotes Bretonnes. *Sci. Pêche. Paris.* 233: 1-15.

Candia, A; Romo, H; Alveal, K & Dellarossa, V. 1979. Cultivo Unialgal de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh de la bahía de Concepción. Chile. *Rickia* 8: 75 – 83.

Cosson, J & Gayral, P. 1977 Optimal condition for growth and fertility of *Laminaria digitata* gametophytes. In : Jensen & J.R. Stein, (eds): proceedings. IX th. International Seaweed Symposium. Science Press. Princeton: 59-66.

Diaz, M & Tapia, L. 1986. Crecimiento de *Gracilaria* Greville (Rhodophyta, Gigartinales) en sistema de cultivo suspendido: efecto de densidad, poda y profundidad. En R, Westermeier. (Editor). Actas II Congreso de Algas mar. Chilenas. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Pág. 165-176.

Dring, M.J. 1992. The Biology of Marine Plants. Cambridge University press. 199 pp.

Etcheverry, H & Collantes, G. 1978. Cultivo artificial de *Macrocystis pyrifera* (L) C. Agardh (Phaeophyta, Laminariales). *Arch. Mus. Hist. Nat.* Valparaíso, 11: 9-17.

Etcheverry, H. 1986. Algas Marinas Bentónicas de Chile. Instituto de Oceanología. Universidad de Valparaíso. Viña del Mar. Chile. 379 pp.

Hahn, K.O. 1989. Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. University Of California Sn. Diego. 348 pp.

Hansen.N.E; Packard, I.E. and Doyle, W, T.1981. Mariculture of the red seaweeds. California Sea Grant College Program. Report N° T csgcp / 002 42 pp.

Hsiao, S & Druehl, L. 1971. Enviromental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. The effect of light and culture media. *Canadian Journal of Botany*. 49: 1503-1508.

Hoffmann, A & Santelices, B. 1982. Effects of light intensity and nutrients on gametophytes and gametogenesis of *Lessonia nigrescens* Bory (Phaeophyta). *Journal Of Experimental Marine Biology and Ecology* 60: 77-89.

Lüning, K & Dring, M. 1972. Reproduction Induced by Blue light in Female Gametophytes of *Laminaria saccharina*. *Planta (Berl.)* 104, 252 – 256.

Lüning, K. & Neushuel, M. 1978. Light and temperature demands for growth and reproduction of laminarian gametophytes in southern and central California. *Mar. Biol.* 45: 297-307.

Lüning, K. 1981. Photobiology of Seaweeds: ecophysiological aspects. *Proc. Int. Seaweeds Symp.* 10: 35-55.

Maier, I. & Müller, D. 1986. Sexualität bei braunalgen aus der Ordnung Laminariales und die Phylogenie der Ordnung. Universität Konstanz, 100 pp.

Maier, I. 1999. Faktoren für das Wachstum und die Entwicklung von Gametophyten und Sporophyten der Laminariales. Publicación ocasional. Universidad de Konstanz. Alemania. 11 pp.

Mc Lachlan, J. 1973. Growth media-marine. In Stein, J.R. (ed) *Handbook of phycological methods* Cambridge university Press. New York. 25-51.

North, W. 1971. Introduction and Background. In :The Biology of Giant Kelp Beds (*Macrocystis*) In California. Nova Hedwigia 32: 1 – 97.

North, W. 1979. Evaluación, manejo y cultivo de praderas de *Macrocystis*. En: B. Santelices (editor) Instituto de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica de Chile. Actas I symp. Algas Mar. Chilenas, Santiago de Chile. 21-24 Noviembre 1978. 75-128.

Oliveira, E; Edison, P; Plastino, E & Petti, R. 1995. Metodologías para Cultivos no axénicos de Macroalgas Marinas in Vitro. En Manual de Métodos Ficológicos. Editado por Krisler Alveal. Universidad de Concepción. 429 – 447.

Provasoli, L. 1963. Growth media marine. *Proc. 4 th. Int. Seaweeds Sym*: 9-17.

Romo, H; Alveal, K; Avila, M. 1984. El efecto de la poda en sobrevivencia, tamaño y rendimiento de *M. pyrifera* (L) AG. (Lessoniaceae) de Isla Navarino. Chile. Gayana Bot. 41 (1-2): 127 – 135.

Saito, Y. 1956. An ecological study of *Undaria pinnatifida* Sur. I. On the influence of the enviromental factors upon the development of gametophytes. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 22: 229-234.

Santelices, B. 1989. Algas marinas de Chile. Distribución, Ecología, Utilización y diversidad. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 399 pp.

Santelices, B & Hoffmann, A. 1997. Flora Marina de Chile Central. Ediciones Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. 434 pp.

Soto, V; Fuentes, C; Uriarte, I & Westermeier, R. 2002. Crecimiento de Abalón Rojo *Haliotis rufescens*, con diferentes ofertas de macroalgas. XXII Congreso Ciencias del Mar. Valdivia, Resumen pág. 93.

Vergara, D; Uriarte, I; Westermeier, R. 2000. Crecimiento del Abalón rojo (*Haliotis rufescens*) con distintas dietas macroalgales. XX Congreso Ciencias del Mar, Concepción, Resumen Pág 210.

Westermeier, R. 1982. Algas marinas y su distribución en balsas de cultivos (cuerdas y colectores) de *Mytilus chilensis* (Chiloé, Chile). Collectanea Botanica Vol 13 (2): 1009 – 1026. IV Simposi de Botánica Criptogámica, Barcelona.

Westermeier, R; Cid, M & Rivera, P.J .1989. Efecto de factores ambientales sobre fases microscópicas de *Macrocystis pyrifera* (L). C. Ag. En cultivo. *Medio ambiente* 10: 13-22.

Westermeier, R & Möller, P. 1990. Population dynamics of *Macrocystis pyrifera* (L) C.Agardh in the rocky intertidal of southern Chile. *Botanica Marina* Vol 33: 363-367.

Westermeier, R; Müller, D; Chávez, P. 2000. Cultivo de *Macrocystis pyrifera* a partir de gametofitos seleccionados. XX. Congreso Ciencias del Mar, Concepción, Resumen pág 213.

Westermeier, R; Müller, D; Chávez, P. 2001 (a). Tank culture of *Macrocystis pyrifera* from gametophytes of different origins. XVII th International Seaweed symposium Cape Town, south Africa. 28 january – 2 February 2001. Abstract 2.3.3 pág 135.

Westermeier, R. 2001(b). Investigación y Desarrollo Tecnológico del cultivo de algas y su utilización por invertebrados marinos herbívoros en Chile. Octavo Concurso Nacional de Proyectos de Investigación y Desarrollo. Universidad Austral de Chile. Puerto Montt.

Westermeier, R; Piel, M.I; Patiño, D; Müller, D. 2002. Cultivo de *Macrocystis pyrifera* a partir de gametofitos. XXII Congreso Ciencias del Mar, Valdivia, Resumen pág. 110.

Westermeier, R; Patiño, D; Piel, M.I; D.G. Müller. 2003 a. Laboratory-based Mariculture Technique for *Macrocystis pyrifera* in Chile (Submitted Aquaculture).

Westermeier, R; Piel, M.I; Patiño, D; D.G. Müller. 2003 b. Mariculture of *Lessonia trabeculata* in Chile with new Techniques: Clonal Gametophytes parents and free floating juveniles sporophytes (submitted Journal Applied of Phycology).

ANEXO I

FIGURAS

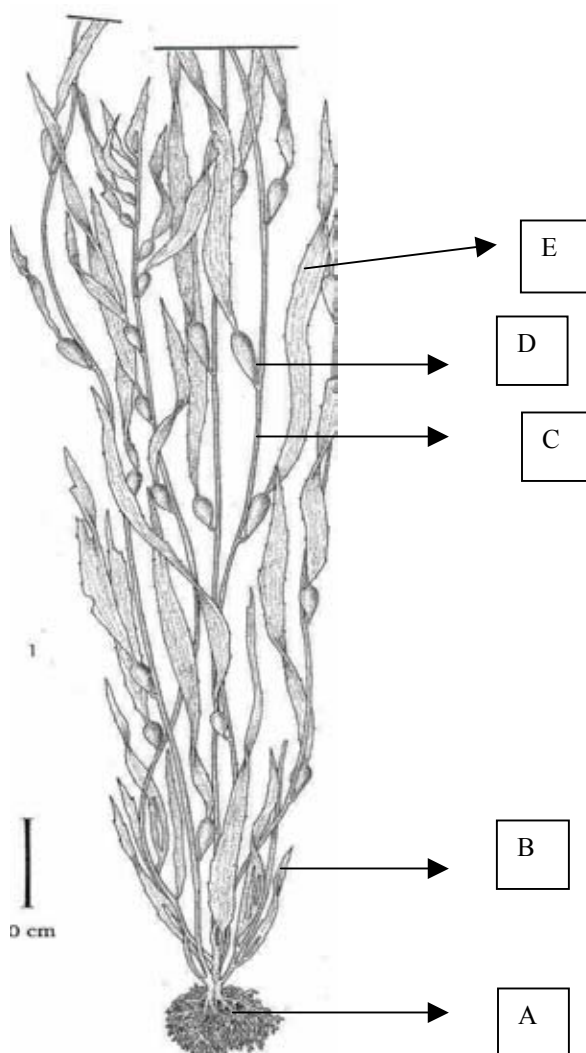


Figura 1.- planta Esporofítica de *Macrocyctis pyrifera*, (Santelices & Hoffmann, 1997)
A: Disco basal o Rizoide; B: Esporofila; C: Estipe; D: Aerocisto; E: Fronda o Lámina.

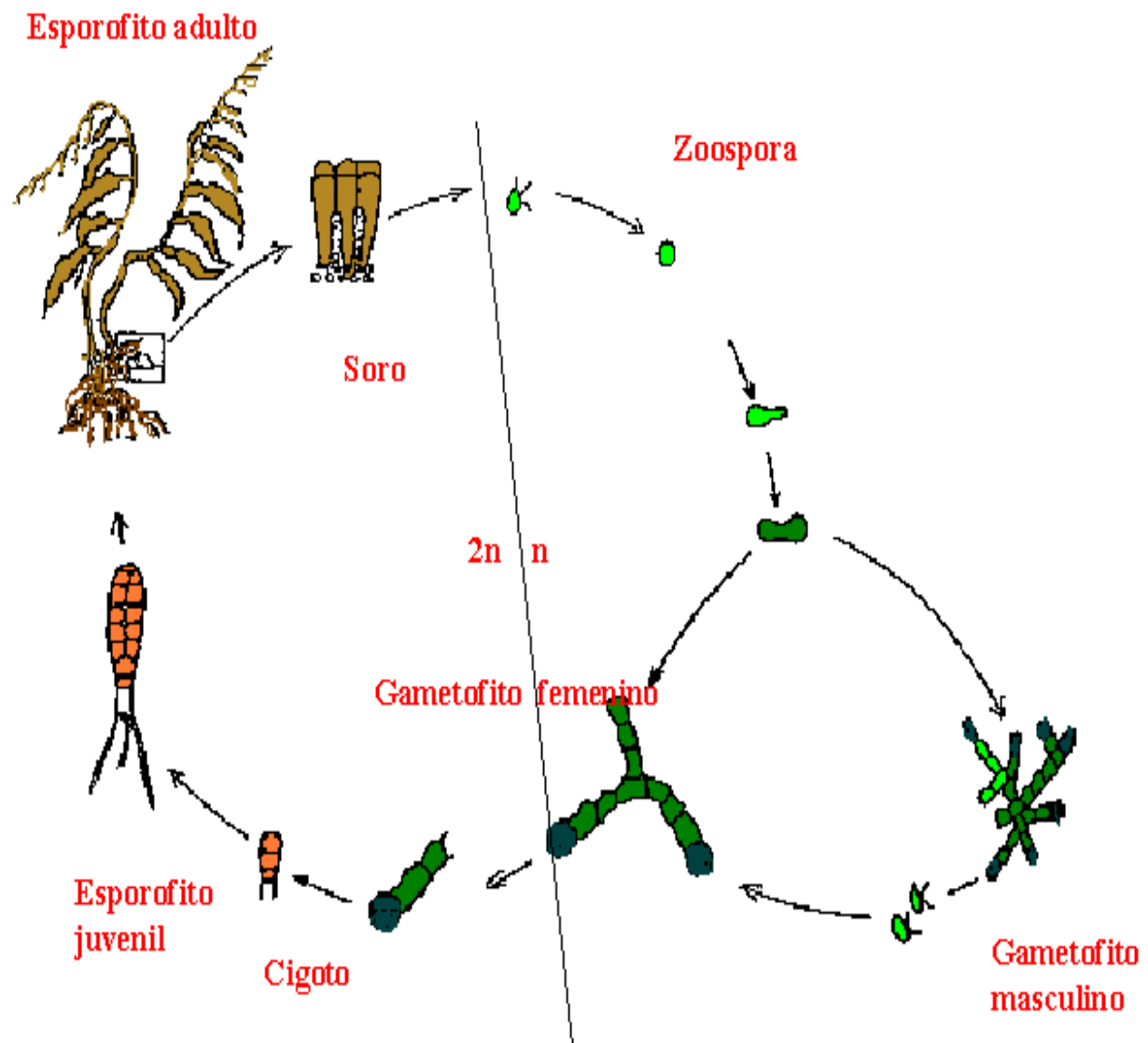


Figura 2.- Ciclo de vida *Macrocyctis pyrifera*.

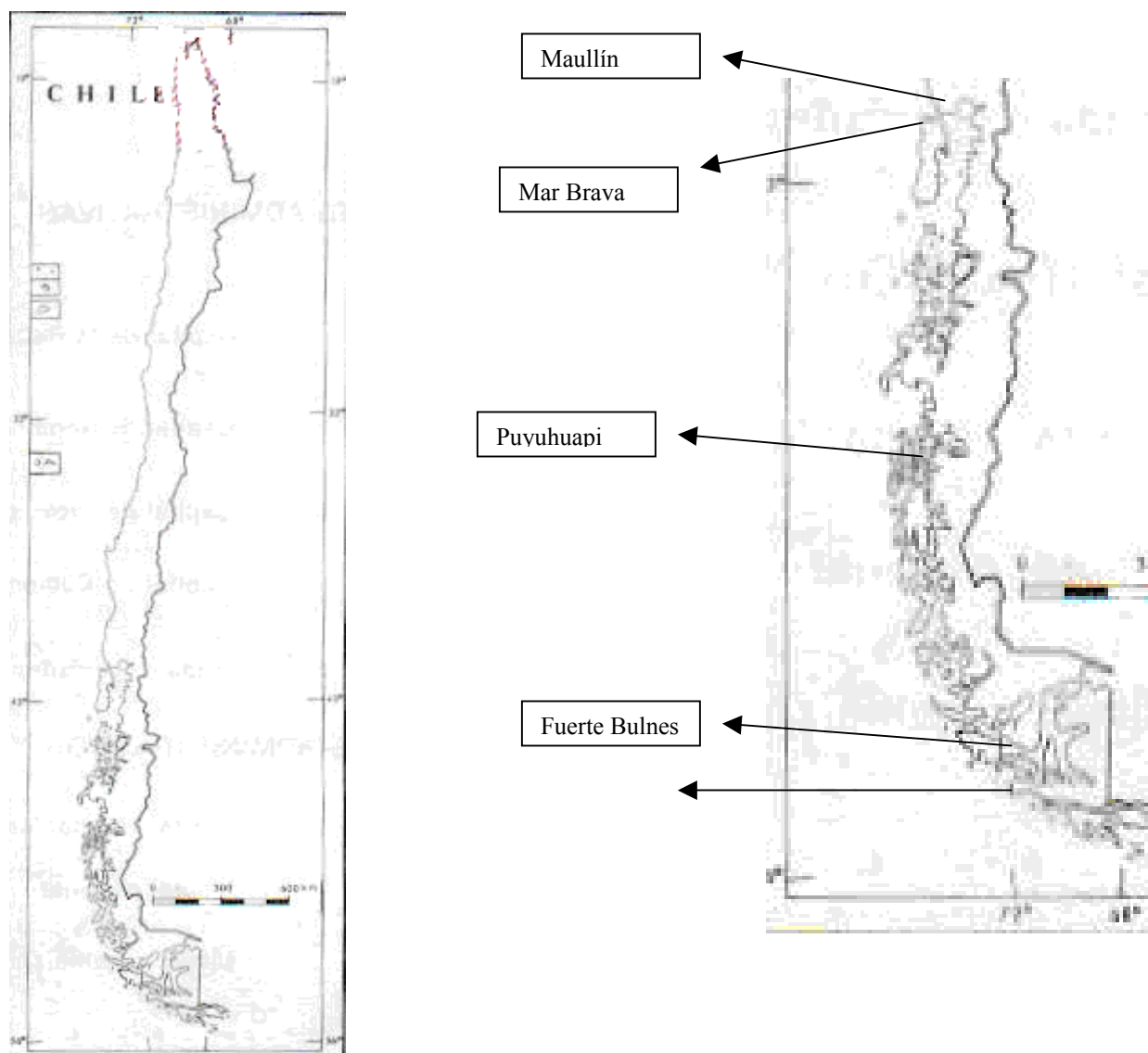


Figura 3 .- Ubicación geográfica de las localidades estudiadas



Figura 4.- Gametofitos femeninos y masculinos en botellas de 250ml.
Proyecto Fondef D97F1071

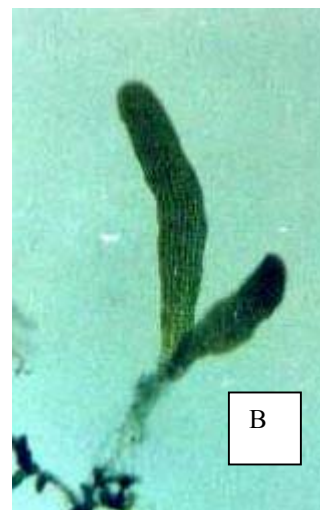


Figura 5.- Esporofito microscopico de *Macrocystis pyrifera*. En A (10 x); B (4 x).

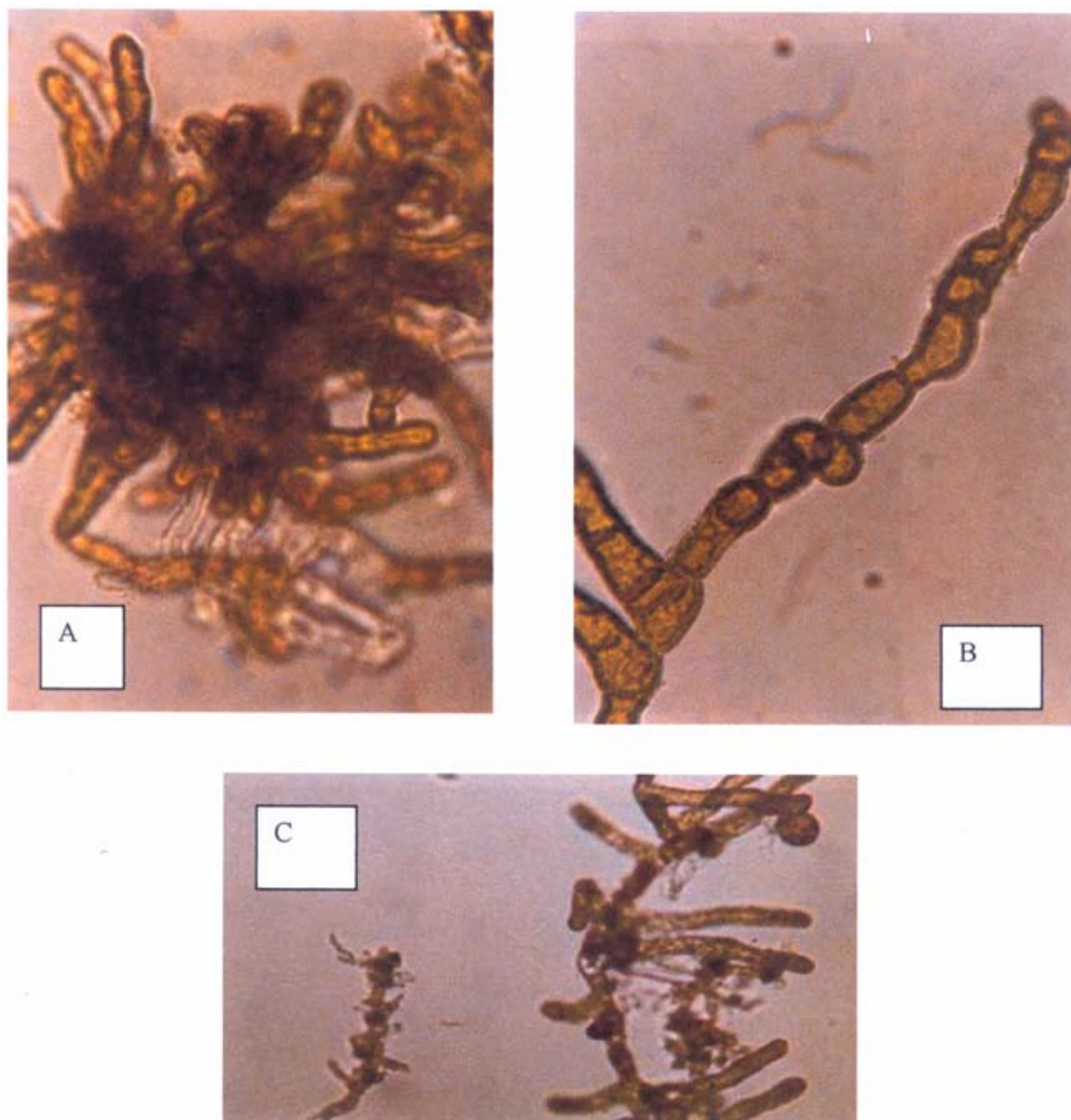


Figura 6.- Gametofitos *Macrocyctis pyrifera*. A: Gametofito masculino aumento (40 x); B: Gametofito femenino (40 x); C: Gametofito masculino y femenino (25 x).



Figura 7.- Célula huevos de *Macrocystis pyrifera*. A: Célula huevo (40 x);
B: Célula huevo junto con gametofitos femenino y masculino (25 x).

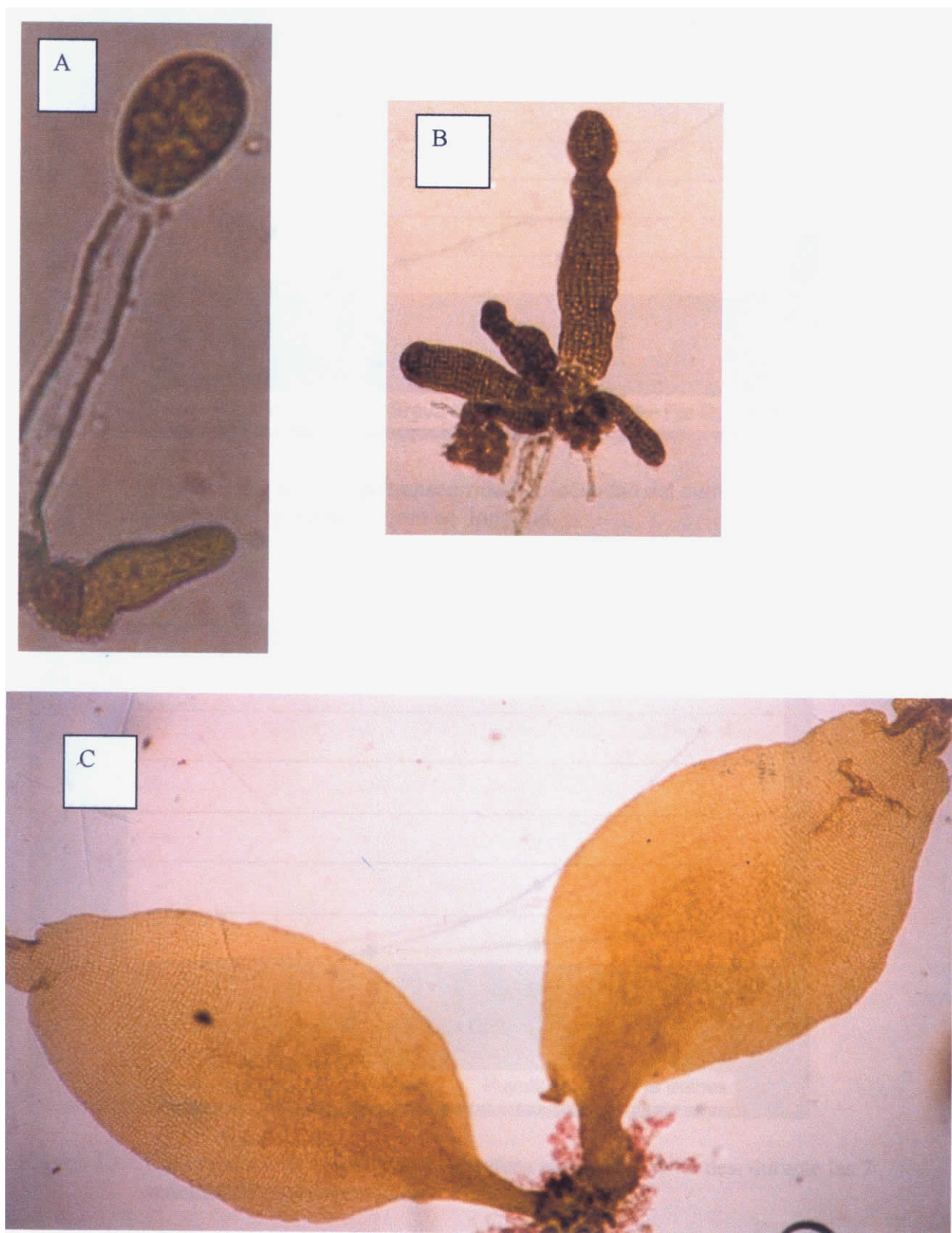


Figura 8.- Esporofitos de *Macrocyctis pyrifera*. A: Esporofito inicial de dos células (40 x); B: Esporofito (25 x) ; C: Esporofito juvenil (4 x).

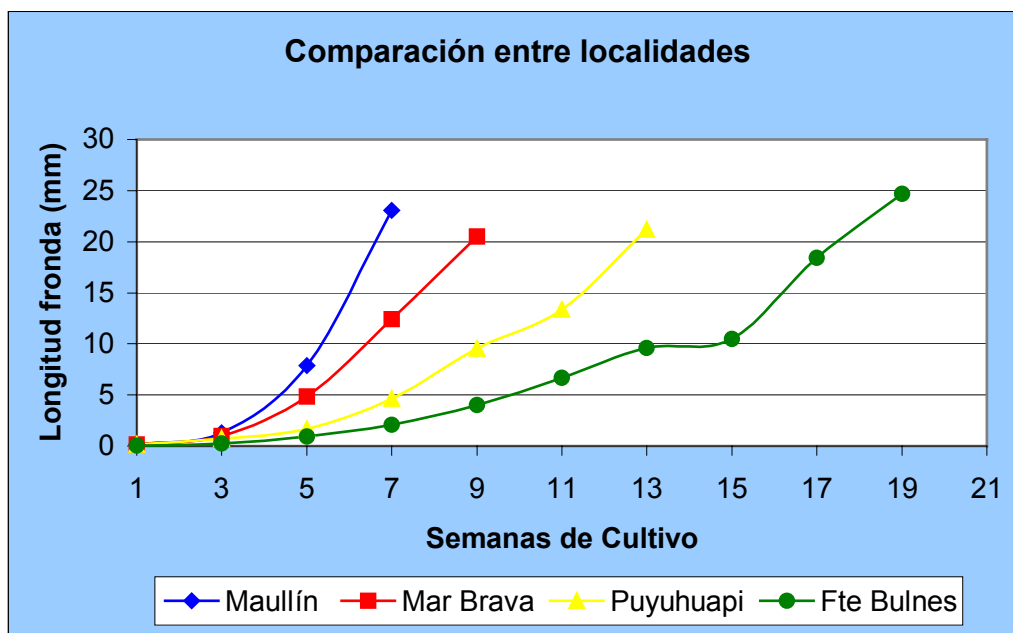


Figura 9.- Comparación del tiempo transcurrido por localidad hasta llegar a los 20 mm de longitud

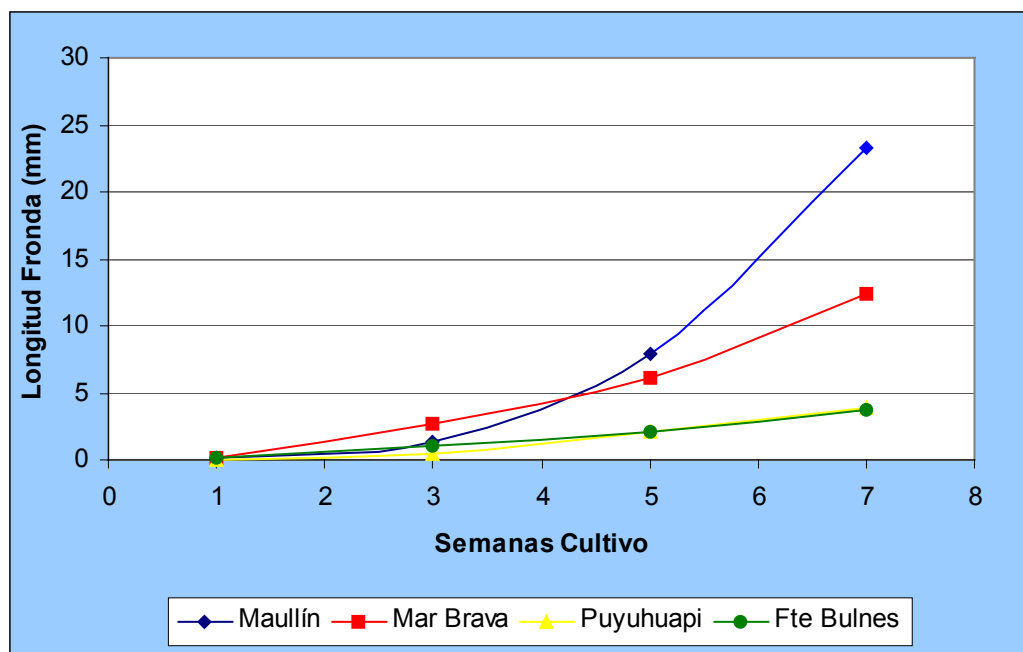


Figura 10.- Comparación de cultivos de *M. pyrifera* entre las localidades, durante las 7 semanas de experimentación.

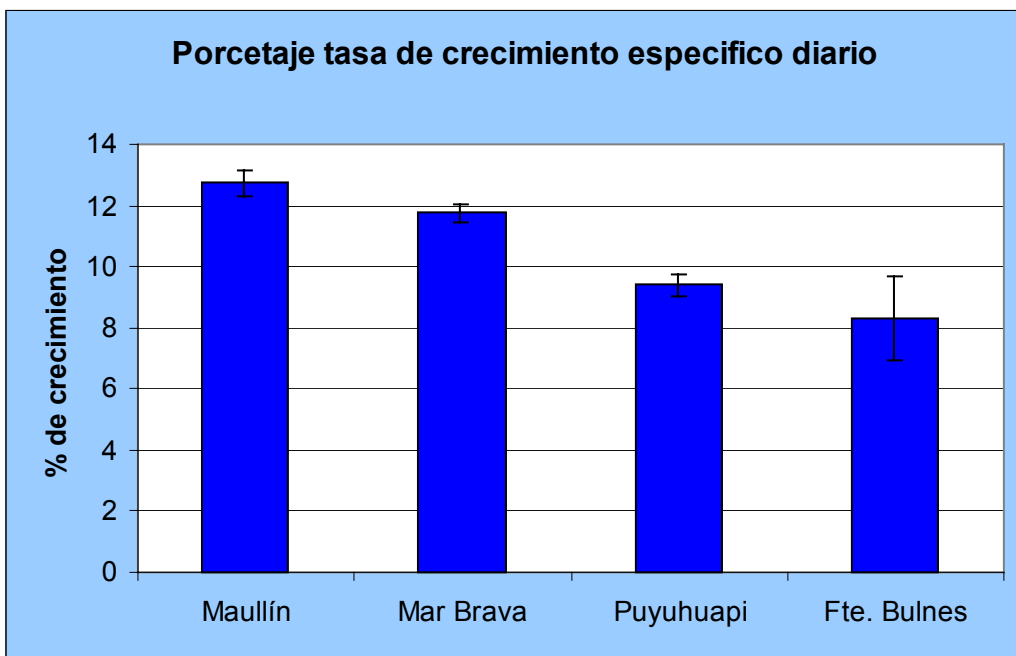


Figura 11 .- Porcentaje de crecimiento especifico diario de las cuatro localidades de *Macrocystis pyrifera*.

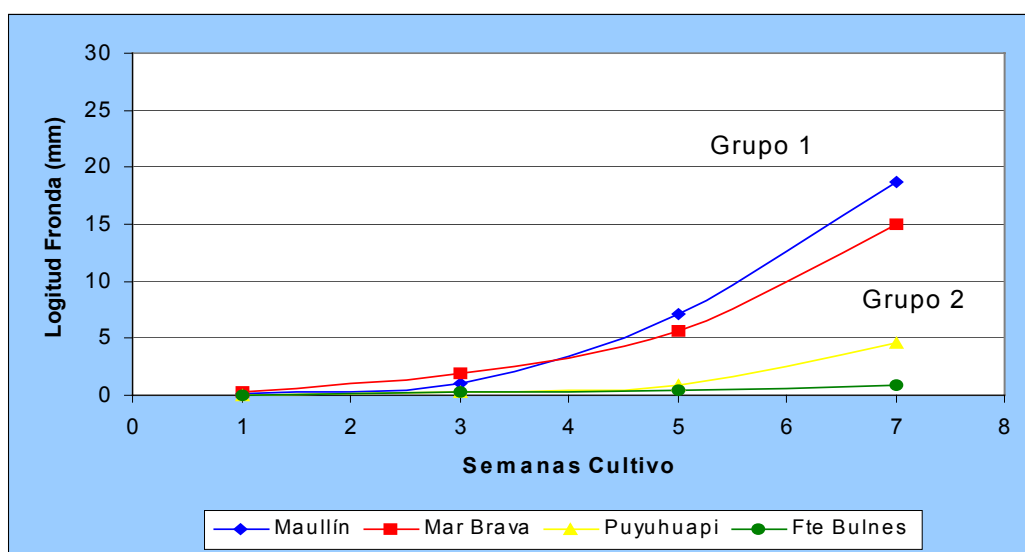


Figura 12 .- Comparación de los cultivos de *M. pyrifera* entre las cuatro localidades.



Figura 13.- Muestra herbario, experimento a la séptima semana de cultivo.
A: Maullín; B: Mar Brava; C: Puyuhuapi; D: Fuerte Bulnes.

ANEXO II

TABLAS.

Tabla 1.- Tasa de crecimiento específico diario

<u>Localidad</u>	% Promedio Longitud	Ds
Maullín	12,74	0,44
Mar Brava	11,76	0,28
Puyuhuapi	9,41	0,35
Fuerte Bulnes	8,30	1,36

Tabla 2.- Resultado de la Prueba Kruskal – Wallis
(H = 13,29 p = 0,040 n = 16)

<u>Localidad</u>	n	Suma de Rango
Maullín	4	58
Mar Brava	4	42
Puyuhuapi	4	23
Fuerte Bulnes	4	13

Tabla 3.- Prueba de Tukey (no paramétrico)

Localidad	Maullín 0,1276	Mar Brava 0,1171	Puyuhuapi 0,0949	Fte. Bulnes 0,0871
Maullín				
Mar Brava	0,317898			
Puyuhuapi	0,000401	0,004306		
Fte. Bulnes	0,000206	0,000350	0,244901	

Valores en negrita: $p < 0,05$.

Tabla 4.- Comparaciones de los tamaños de gametofitos reportados en la literatura y en el presente estudio.

<u>Autor</u>	Gametofitos femeninos Longitud en micras	Gametofitos masculinos Longitud en micras.
Etcheverry & Collantes 1978	Hasta 800	100 – 120
Westermeyer <i>et al.</i> , 1989	95 - 106	
Resultados en estudio	100 - 270	40 - 130

Tabla 5.- Comparaciones de los tamaños de esporofitos reportados en la literatura y en el presente estudio.

Autor		Días	de	Cultivo	
	15	30	48	60	120
Braud <i>et al.</i> , 1974	350	4.000	50.000*		
Etcheverry & Collantes 1978	255	500 – 600			
Maullín – Mar Brava P. Est.	1.000	5.000	20.000		
Puyuhuapi – Fte. Bulnes P. Est.	350	3.000	5.000		20.000
Westermeyer <i>et al.</i> , 2000; 2001				7.000 Puyuhuapi	20.000 Fte. Bulnes

Nota: P. Est : Presente Estudio

Valores de crecimiento en micras.

* Los esporofitos se encontraban en el mar.