

**Cristian Rubén Bulboa Contador**

**Biotechnological bases to cultivate  
*Chondracanthus chamissoi*, an economically  
important seaweed of the Chilean coast**

**Bases bio-tecnológicas para o cultivo de  
*Chondracanthus chamissoi*, uma alga vermelha de  
importância econômica da costa chilena**

**São Paulo  
2006**

**Orientador: Dr. Eurico de Oliveira  
Co-orientador: Dr. Juan Machiavello  
Financiamiento: RLB (Red Latinoamericana de Botánica)**

**ABSTRACT**

*Chondracanthus chamissoi* is a red algae of economic importance along the Chilean coast. Historically it has been collected for the extraction of carraghen, although in the last few years there has been a demand for direct consumption from the Asian markets. This second option represents the possibility to diversify the uses of this species and to enter into a market that offers better prices, but has strict quality measurements. With respect to this issue, simply collecting plants from the ocean does not guarantee the obtention of a product that meets the requirements established by the human food market. The cultivation of *C. chamissoi* presents itself as a tool that would facilitate better production control, in quality and quantity, as well as reducing the risk of overexploitation of the natural populations, which are starting to be intensely pressured because of the high demand.

The objective of this work is to establish the scientific and technological basis for the cultivation of *Chondracanthus chamissoi* in the northern region of Chile. To this end, the study was divided into two parts. In the first (Cap. 2, 3, 4) comparisons, *in vitro*, of four populations of *C. chamissoi* from different localities on the Chilean coast (Calderilla, Herradura, Puerto Aldea and Lechagua) were carried out. Physiological and reproductive characteristics of the gametophytes and sporophytes of *C. chamissoi* were evaluated in each of the populations included in the study.

The growth responses of different stocks were studied in function of different treatments of temperature, photon flux density and photoperiod (Cap. 2). The resistance of both life cycle phases to epiphytism by *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. was compared in the third chapter (Cap. 3). Finally, the germination of carpospores and tetraspores, and the growth of germlings were seasonally evaluated in chapter four (Cap. 4).

The results of chapter two showed that growth was similar in specimens from different localities, presenting a seasonal pattern in relation to the variations of light and temperature. Based on the treatments used, the results do not allow the recognition of physiological ecotypes indicating their genetic adaptation to local environmental conditions; this, however, does not mean that genetic adaptation were not developed for other physiological parameters.

In the third chapter it was possible to recognize differential resistances to epiphytism, especially in sporophytes from two of the populations studied (Calderilla y Lechagua). These results open up the possibility for the obtention of selected stocks that would be less susceptible to epiphyte contamination. The validation of these results, including the study of other populations, with tests made in the ocean and the study of the possibility that these characteristics are transmitted to descendents, are necessary.

Although in chapter four, the germination of spores showed seasonal behavior in all of the populations, this was not as pronounced as that described for other red algae from temperate and cold waters. Spores production and germination were registered throughout the entire year in *C. chamissoi*, although the highest values were observed in the spring. The growth of the germlings, which arised from spores, also showed seasonal behavior, with fast development registered in the germlings that grew in the spring.

In the second part of this thesis the first formal intents to cultivate *C. chamissoi* were realized. In these experiments both strategies of propagation: vegetative (chapter 5) and by means of spores (Chapter 6), were considered.

The cultivation by means of fragments of *C. chamissoi* involves only one phase, where as the cultivation by means of spores necessarily involves various stages which begin in the laboratory and culminate with their transfer to the sea. Both strategies produced good quality plants for the food market and could be utilized together, throughout the year, in a production plan. The technical and practical details that could be improved, in order to optimize production in each of the systems tested, are also discussed.

## **RESUMO**

*Chondracanthus chamissoi* é uma carragenófita de importância econômica ao longo do litoral do Chile. Historicamente tem sido coletada para a produção de carragenana; porem, nos últimos anos, tem sido muito requerida para consumo direto pelos mercados asiáticos. Esta utilização mais recente representa uma oportunidade para diversificar os usos desta espécie, e ingressar em um mercado com melhores preços, mas com estritos requisitos de qualidade. Neste sentido, o simples extrativismo a partir das populações naturais não garante a obtenção de um produto que cumpra com os requisitos de um exigente mercado consumidor, particularmente do Japão. Cria-se, portanto, a necessidade de se produzir a

matéria prima desejada através da maricultura, que teria ainda a vantagem de evitar a sobre-exploração das populações nativas já ameaçadas pela demanda causada por preços atraentes. Entretanto, a produção via maricultura esbarra na dificuldade da inexistência de técnicas de cultivo estabelecidas para esta espécie em particular.

Este trabalho visa estabelecer as bases científicas e tecnológicas para o cultivo de *Chondracanthus chamissoi* na região norte do Chile. Para alcançar esta meta o estudo foi dividido em duas partes. Na primeira seção (Cap. 2, 3 e 4) foram realizadas comparações *in vitro*, de quatro populações provenientes de diferentes localidades da costa chilena (Calderilla, Herradura, Puerto Aldea e Lechagua). Para estas populações foram avaliadas características fisiológicas e reprodutivas de gametófitos e esporófitos de *C. chamissoi* de cada uma das populações em estudo.

No capítulo 2 foi estudada a resposta do crescimento das diferentes linhagens em função de diferentes tratamentos de temperatura, densidade de fluxo fotônico e fotoperíodo; no capítulo 3 foi comparada a resistência ao epifitismo por *Ulva* sp e *Enteromorpha* sp para talos vegetativos de ambas as fases de vida. Finalmente, no capítulo 4, foi avaliada sazonalmente a germinação de carpósporos e tetrásporos e o crescimento de plântulas produzidas a partir de esporos.

Os resultados do capítulo 2 mostram que o crescimento, nas condições de cultivo no mar, foi semelhante para as linhagens das quatro localidades estudadas, evidenciando um claro padrão sazonal, em relação à variação de fatores como a luz e principalmente a temperatura. Sob os tratamentos utilizados, os resultados obtidos não permitem estabelecer a presença de ecótipos fisiológicos que demonstrem uma adaptação diferencial a condições ambientais locais nos locais estudados, o que não significa que estes venham a ser encontrados quando um maior número de populações seja estudado. Por outro lado, embora a germinação de esporos de *C. chamissoi* tenha mostrado um padrão sazonal para todas as populações, este não seria tão marcado como o descrito para outras algas vermelhas de águas temperadas e frias.

Os dados obtidos no capítulo 3 demonstram uma resistência diferencial ao epifitismo entre as linhagens testadas, o que abre a perspectiva de se utilizar linhagens mais resistentes ao epifitismo, fator crucial ao sucesso de um empreendimento de cultivo de algas.

Na segunda parte da tese (Cap. 5 e 6), foram realizados testes para cultivar *C. chamissoi* no mar. Nestes experimentos foram utilizadas duas estratégias de propagação: vegetativa (Capítulo 5) e por esporos (Capítulo 6). O cultivo por meio de fragmentos do talo, ou mudas, compreende uma única etapa, ao passo que o cultivo por esporos deve necessariamente ser realizado em varias etapas que começam em laboratório até seu traslado ao mar. Estas estratégias apresentam vantagens e desvantagens, mas ambas produziram plantas de boa qualidade para o mercado alimentar, e poderiam ser utilizadas em um plano de produção conjunto ao longo do ano.

A tese discute ainda alguns fatores técnicos e práticos que poderiam otimizar a produção em cada um dos sistemas utilizados.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO GERAL

---

### OBSERVAÇÕES SOBRE A OCORRÊNCIA DE *Chondracanthus chamissoi* NO CHILE

*Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützing, é uma espécie endêmica do litoral do Pacífico Sul americano, e ocorre ao longo do Chile e sul do Perú. No Chile têm sido coletada desde Iquique no norte, até Chiloé, seu limite sul (RAMÍREZ & SANTELICES, 1991). Encontra-se principalmente em baías protegidas na região litoral e infralitoral com substrato de pedras e conchas até os 15 metros de profundidade (SANTELICES, 1989; HOFFMANN & SANTELICES, 1997). As plantas possuem um talo multiaxial pseudoparenquimatoso, com uma morfologia frondosa, densamente ramificada com eixos eretos que se desenvolvem desde um pequeno disco basal, atingindo os 50 cm de comprimento; apresenta ramificação irregular, dística, subdicotômica ou dicotômica (Fig. 1) sendo morfológicamente muito variável (ACLETO, 1986)

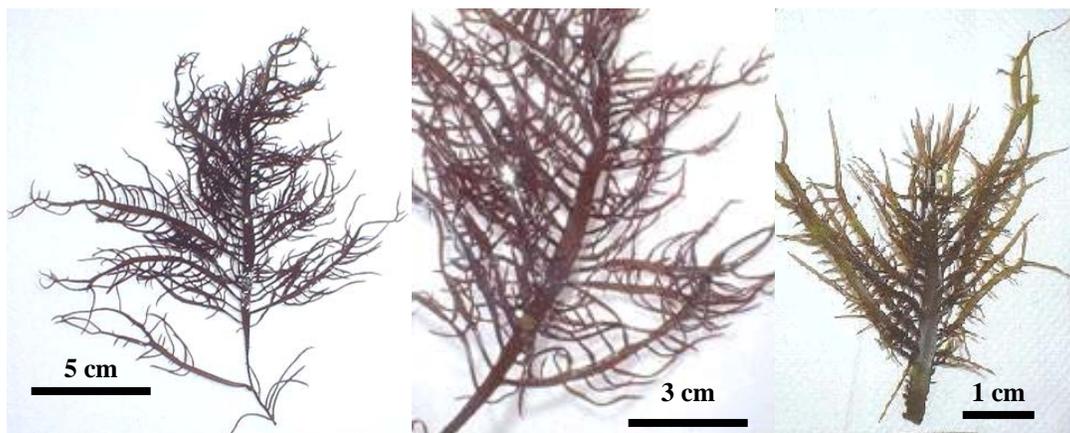


Figura 1. Hábito de plantas de *C. chamissoi*.

*Chondracanthus chamissoi* apresenta um ciclo de vida trifásico, “tipo *Polysiphonia*” com gerações gametofítica e esporofítica isomórficas e carposporófito parasita do gametófito feminino. DAWSON *et al.* (1964), assinalam que para *C. chamissoi* (como

*Gigartina chamissoi*), podem ser observados dois tipos morfológicos, um de formas estreitas denominado como “*Lessonii*” (1 a 2 mm de largura) e outro grupo de frondes mais largas (25 – 40 mm de largura) conhecido como “*Chauvinii*”(Fig. 2).

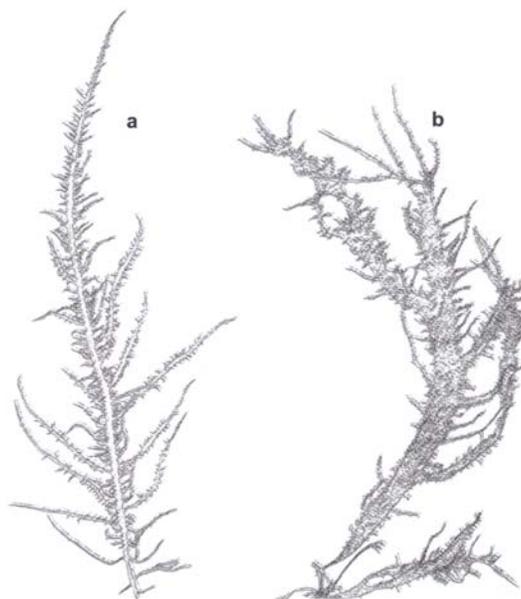


Figura 2. Diferenças morfológicas em *C. chamissoi*: (a) tipo *Lessonii* e (b) tipo *Chauvinii*. (Modificado de DAWSON *et al.*, 1964).

#### SITUAÇÃO ATUAL DA EXPLOTAÇÃO E CONHECIMENTO SOBRE *C. chamissoi* NO CHILE

Em geral a produção de algas marinhas no Chile baseia-se principalmente na exploração de bancos naturais. O cultivo comercial está restrito a uma única espécie, *Gracilaria chilensis* (BUSCHMANN *et al.*, 2001; 1996; NORAMBUENA, 1996). Durante a década de 1970 e meados de 1980, uma forte pressão extrativa sobre os bancos naturais de *G. chilensis* levou à sobreexploração, resultando em uma drástica queda na produção (SANTELICES & DOTY, 1989; NORAMBUENA, 1996). Isto motivou o desenvolvimento de um esforço coordenado de pesquisa objetivando estabelecer as bases tecnológicas para se implantar a maricultura da espécie, o que foi sendo gradualmente bem sucedido e culminou com uma estratégia eficiente de substituição da exploração dos bancos naturais por fazendas marinhas (PIZARRO, 1986; PIZARRO & BARRALES, 1986; PIZARRO & SANTELICES, 1993; BUSCHMANN *et al.*, 1996; NORAMBUENA, 1996; ALVEAL *et al.*, 1997). Esta situação

não é diferente para outras espécies de algas comercializadas no país, e embora atualmente não existam cultivos comerciais, estudos preliminares começam a ser desenvolvidos para repetir a história de sucesso que foi alcançada com o cultivo de *Gracilaria* (ROJAS *et al.*, 1996; BUSCHMANN *et al.*, 1999; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2000; BULBOA & MACCHIAVELLO, 2001; ROMO *et al.*, 2001; MACCHIAVELLO *et al.*, 2003; BULBOA *et al.*, 2005).

No Chile a demanda por macroalgas tem-se diversificado nos últimos 10 anos, aumentando o número de espécies que são comercializadas e processadas (ÁVILA *et al.*, 1999; BUSCHMANN *et al.*, 2001). Isto está relacionado ao desenvolvimento da indústria das carragenanas e ao interesse do mercado pelas algas para consumo direto, como é o caso de *Callophyllis variegata* e *C. chamissoi*, entre outras.

No caso de *C. chamissoi*, vários fatores sugerem que a demanda será incrementada nos próximos anos (BUSCHMANN *et al.*, 2001). Esta espécie tem sido comercializada para a extração de carragenanas, porém na atualidade existe um aumento no interesse do mercado asiático para seu consumo como alimento humano (GONZÁLEZ *et al.*, 1997; ANÔNIMO, 2000). Isto pressupõe que se exercerá uma maior pressão sobre as áreas de coleta desta espécie no Chile, como aconteceu anteriormente com *G. chilensis*. De fato, alguns problemas relacionados à atividades de exploração já começam a aparecer. Por exemplo, no caso de Puerto Aldea na IV região do país, os registros de produção mostram uma notável diminuição, passando de um volume histórico de 500 toneladas úmidas por ano para 60 toneladas atuais (ANÔNIMO, 2000).

Com o objetivo de estabelecer as bases para o manejo de *C. chamissoi*, assim como para seu cultivo, atualmente estão disponíveis uma série de antecedentes sobre aspectos ecológicos e fisiológicos desta espécie. Estes estudos têm demonstrado o carácter sazonal de *C. chamissoi*, com máxima acumulação de biomassa durante os meses de primavera e verão (GONZÁLEZ & MENESES, 1996; GONZÁLEZ *et al.*, 1997; VÁSQUEZ & VEGA, 2001). Resultados obtidos em laboratório mostram a relação do crescimento em função da variação de fatores ambientais, principalmente da temperatura (BULBOA & MACCHIAVELLO, 2001). A sazonalidade também tem sido demonstrada em aspectos relacionados com a reprodução, verificando-se uma maior produção de tecido reprodutivo e de esporos liberados durante o mesmo período de máxima acumulação de biomassa (VÁSQUEZ &

VEGA, 2001). Além disto, uma série de mecanismos têm sido propostos como responsáveis pela manutenção e recuperação sazonal da biomassa em *C. chamissoi*. Estudos realizados na Baía La Herradura (IV Região) têm demonstrado a relevância da reprodução sexual (VÁSQUEZ & VEGA, 2001). Por outro lado, GONZÁLEZ *et al.* (1997), sugerem que a permanência de discos e a re-adesão de frondes à deriva também seriam importantes mecanismos na regeneração de biomassa e no estabelecimento de novas plantas em Puerto Aldea. Recentemente estes mecanismos têm sido estudados quantitativamente nesta espécie, sendo possível verificar a existência de re-adesão de frondes à deriva. Porém, conclui-se que a propagação por esporos, seria o principal mecanismo de regeneração sazonal da biomassa para *C. chamissoi* em Puerto Aldea (MACCHIAVELLO *et al.*, 2003). Neste sentido, estes resultados demonstraram o uso potencial de esporos para a realização de cultivos massivos ou estratégias de manejo desta espécie.

#### SELEÇÃO DE LINHAGENS

O controle e a previsão são considerados uma das principais metas da maricultura. Portanto, o desenvolvimento de técnicas de seleção de linhagens é imperativo (HANSEN, 1984), transformando-se em uma necessidade lógica nos cultivos de algas marinhas, buscando melhorar e manter níveis de produção economicamente adequados (LEVY *et al.*, 1990 a, 1990 b). A seleção de linhagens pode ser definida como uma prática que busca incrementar a qualidade de algum caráter, onde se espera que a variante selecionada possua uma pronunciada vantagem sobre a população parental na expressão desse caráter (SANTELICES, 1992).

Na maior parte dos estudos de seleção de linhagens em algas, o crescimento tem sido uma das características mais usadas como critério de seleção (DOTY & ALVAREZ, 1975; LEVY *et al.*, 1990 a, 1990 b; MOLLION & BRAUD, 1993; PAULA *et al.*, 1999), devido à sua grande importância na maricultura. Porém, existem outras características de importância que têm sido consideradas para a seleção, podendo ser destacados: i. a produção de polissacarídeos em *Gracilaria sjoestedii* (HANSEN, 1984); ii. a resistência a epifitas e soterramento na areia em *Gracilaria* spp. (SANTELICES & UGARTE, 1990); iii. tetrasporófitos estéreis em *Chondrus crispus* (CHEN *et al.*, 1982); iv. o peso e comprimento de frondes de esporófitos de *Laminaria japonica* (LI *et al.*, 1999) e v. a longevidade e

resistência ao rompimento dos talos de *Eucheuma denticulatum* (MOLLION & BRAUD, 1993).

Os estudos relativos à seleção de linhagens têm sido desenvolvidos com diferentes técnicas, níveis taxonômicos e objetivos distintos. Têm sido desenvolvidas técnicas para a obtenção de plantas a partir de esporos (CHEN *et al.*, 1982; LEVY *et al.*, 1990 a, 1990 b; PAULA *et al.*, 1999) e, ultimamente, o melhoramento de linhagens tem sido possível por meio de modernas técnicas que incluem sofisticados métodos de transferência de genes (CRAIGIE & SHACKLOCK, 1995). Porém, tradicionalmente, o método de seleção mais utilizado em algas marinhas consiste na coleta de indivíduos de uma ou várias populações, e seu estudo em condições naturais ou em laboratório (SANTELICES, 1992).

A seleção de linhagens a partir de populações naturais tem sido a mais simples e comum aproximação para o melhoramento na produção de cultivos de algas. Tais esforços têm sido de grande êxito, e o isolamento de clones superiores tem sido reportado em várias espécies de algas vermelhas, destacando-se o realizado para *Chondrus crispus* no Canadá (NEISH *et al.*, 1977; CRAIGIE & SHACKLOCK, 1995), onde a seleção da linhagem T 4 foi um importante passo para a maricultura desta espécie. Outro exemplo com notáveis consequências, foi o isolamento da variante "Tambalang" de *Kappaphycus alvarezii*, caracterizada como uma linhagem de rápido crescimento e resistente à doença ice-ice (DOTY & ALVAREZ, 1975; DOTY & NORRIS, 1985). Outros programas destacados têm sido realizados por LEVY *et al.*, (1990 a; 1990 b) em *Gracilaria verrucosa* e *G. conferta*, BIRD & RHYTER, (1990), isolando a linhagem G-16 em *G. verrucosa* e PAULA *et al.*, (1999) em *Kappaphycus alvarezii*.

No Chile os principais esforços para isolar linhagens têm sido realizados no gênero *Gracilaria*. Destaca-se o estudo realizado por (SANTELICES & UGARTE, 1990) para selecionar linhagens a partir de populações de *Gracilaria* spp. de distintas localidades ao longo do país. Os referidos autores registraram diferenças entre populações quanto à suas respostas de crescimento, produção em relação a distintos fatores ecológicos, baseadas em ecótipos fisiológicos, e resistência ao epifitismo, assinalando a importância de se conhecer a origem das plantas. Diferenças fisiológicas entre populações também têm sido demonstradas para *Chondrus canaliculatus*, ao comparar o crescimento de esporos provenientes de quatro localidades na costa chilena (ACUÑA, 2000).

Outros estudos em *Gracilaria* mostraram a importância da origem dos inóculos que serão utilizados para o cultivo, indicando que algumas diferenças existem quando algas de diferentes origens são cultivadas nas mesmas condições (BUSCHMANN *et al.*, 1992).

Respostas fisiológicas diferentes em algas provenientes de populações ou ambientes diferentes podem estar relacionadas à adaptações a seu ambiente de origem em resposta a fatores como temperatura, irradiância e fotoperíodo, entre outros (BREEMAN, 1988; SANTELICES & UGARTE, 1990; YOKOYA & OLIVEIRA, 1992 a, b). Neste sentido, o efeito dos fatores abióticos, antes mencionados, tem sido verificado em numerosos estudos, tendo uma ampla influência em respostas estruturais e funcionais, reprodutivas e de distribuição nas populações de algas marinhas (GESSNER, 1970; HELLEBUST, 1970; LAPOINTE *et al.*, 1984; LÜNING, 1990; DAWES, 1991; CRAIGIE, 1999).

#### TRANSLADOS DE ALGAS

No Chile, dada a importância do cultivo de *Gracilaria*, desenvolveram-se vários centros de cultivo ao longo de boa parte da costa tendo ocorrido um livre transporte de algas de uma região para outra do país (SANTELICES & UGARTE, 1990).

A introdução de espécies exóticas com finalidade de estabelecer fazendas marinhas tem ocorrido com frequência em muitos países, sendo notório o caso de espécies de *Kappaphycus* e *Euclima* trasladadas dentro e fora de seus limites de distribuição natural (ARECES, 1995; OLIVEIRA & PAULA, 2003)

Em muitos casos estes transplantes têm sido realizados sem o menor conhecimento do efeito que os fatores ambientais locais possam ter sobre aspectos importantes para o cultivo, desconhecendo a possibilidade de que existam diferenças entre populações com respeito a suas características ecológicas ou produtivas, tais como crescimento, resistência ao epifitismo, produção e qualidade do gel, entre outros. Em consequência disto, transplantes podem gerar efeitos indesejados nas populações naturais e se transformar num risco para a própria maricultura (SANTELICES & UGARTE, 1990; PAULA *et al.*, 1998).

As áreas de coleta de *C. chamissoi* encontram-se nas III, IV, VI, VIII e X regiões, sendo esta última a que concentra os maiores volumes de produção com aproximadamente 58% da produção nacional (SERNAPECA, 1999). As coletas comerciais no norte do país estão restritas a três localidades: Caldera (27° 4' S), La Herradura (27° 58' S) e Puerto Aldea

(30° 15' S) (GONZÁLEZ *et al.*, 1997; VÁSQUEZ & VEGA, 2001). Atualmente não existem registros de transplantes entre as localidades mencionadas. Esta situação é vantajosa para realizar estudos comparativos entre populações em *C. chamissoi*, já que é possível ter absoluta segurança sobre a origem de cada população, ao contrário do que aconteceu com *Gracilaria*, onde os frequentes translaços tornam difícil estabelecer a procedência das algas. Porém, esta situação poderia mudar no futuro, devido ao interesse do mercado e o desenvolvimento de técnicas de cultivo e manejo, fatores que incentivariam o traslado de plantas de uma localidade a outra com fins produtivos.

#### **PROPOSTA PARA *C. chamissoi***

A distribuição das áreas de coleta de *C. chamissoi* ao longo do Chile considera separações geográficas importantes que vão desde os 27° S até os 41° S. Isto torna evidente a existência de diferenças climáticas através deste gradiente latitudinal, supondo, por sua vez, a existência de adaptações próprias das populações às condições ambientais locais, como foi anteriormente demonstrado para *Gracilaria* (SANTELICES & UGARTE, 1990). O conhecimento sobre quais características biológicas de *C. chamissoi*, relevantes para sua maricultura, são diferentes entre as distintas populações seria de grande ajuda para otimizar a implementação de técnicas de cultivo para esta espécie.

Considerando os antecedentes antes descritos, o presente trabalho pretende descobrir se as plantas de *C. chamissoi* obtidas de diferentes populações da costa chilena apresentam diferenças persistentes em aspectos fisiológicos, reprodutivos e produtivos evidenciando uma adaptação genotípica aos seus locais de origem. Caso isto se configure, as adaptações selecionadas naturalmente poderiam ser aproveitadas para otimizar a implementação de técnicas de cultivo na região norte do país.

Para desenvolver este estudo foram comparadas em laboratório quatro populações naturais de *C. chamissoi* do litoral norte e sul do Chile a partir da avaliação de suas características fisiológicas (taxa de crescimento e resistência a epifitismo) e reprodutivas (germinação e crescimento de carpósporos e tetrásporos). Paralelamente estudamos também o cultivo a partir de propagação vegetativa e por esporos.

Além de contribuir para o desenvolvimento da maricultura de *C. chamissoi* pretendemos fornecer dados sobre as características fisiológicas e ecológicas de cada

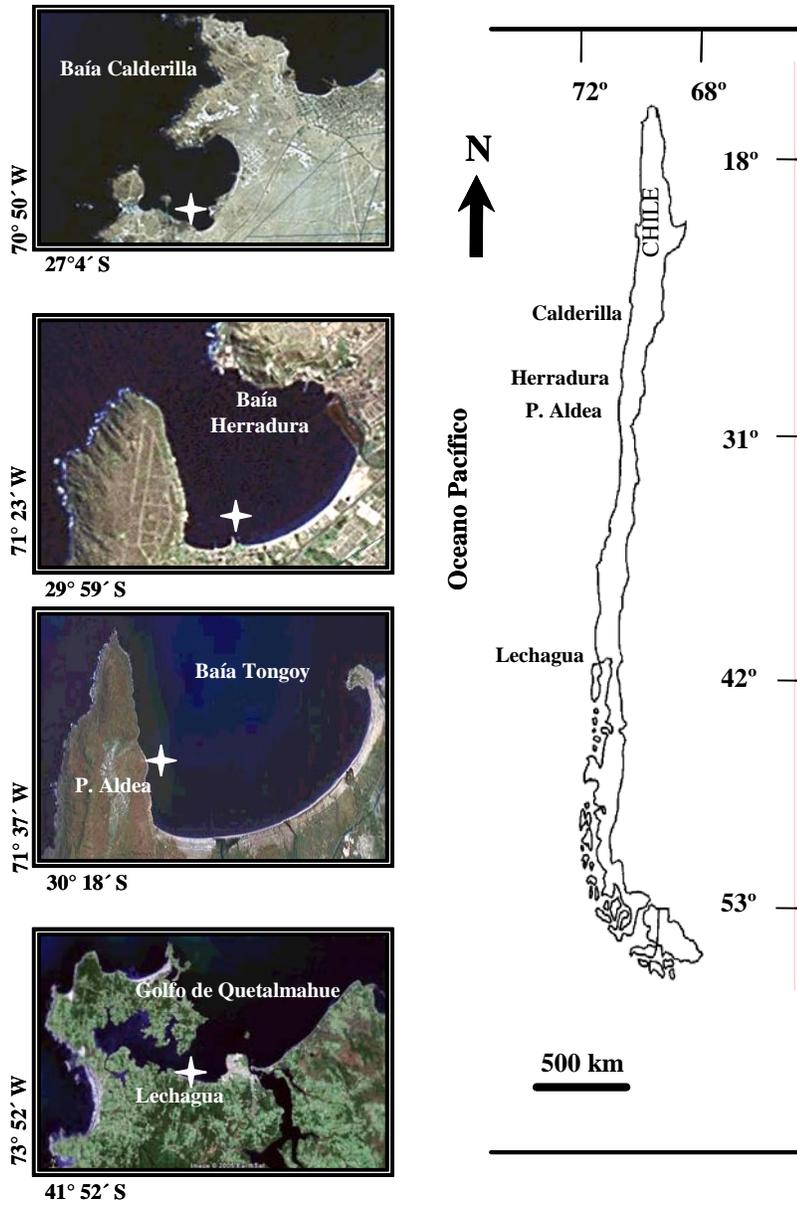
população, contribuindo assim para o manejo da espécie e para entender as variações que existem em uma mesma espécie ao longo de um gradiente latitudinal.

### **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho foi selecionar linhagens de *C. chamissoi*, a partir de populações naturais estabelecidas ao longo do litoral chileno, que apresentem características mais vantajosas para seu cultivo na região norte do país e estabelecer as bases bio-tecnológicas para viabilizar a produção da espécie em sistemas de cultivo no mar.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Comparar o crescimento vegetativo de gametófitos e esporófitos de *C. chamissoi* provenientes de quatro populações naturais do Chile, em condições controladas de laboratório, sob diferentes tratamentos de temperatura, densidade de fluxo fotônico e fotoperíodo.
- 2.- Avaliar a resistência ao epifitismo em gametófitos e esporófitos de *C. chamissoi*, provenientes de quatro populações naturais do Chile, em condições controladas de laboratório.
- 3.- Comparar em forma sazonal a germinação e crescimento de carpósporos e tetrásporos de *C. chamissoi*, provenientes de quatro populações naturais do Chile, em condições controladas de laboratório.
- 4.- Avaliar as variações de crescimento e biomassa num sistema de cultivo vegetativo, em três diferentes profundidades, para gametófitos e esporófitos de *C. chamissoi*.
- 5.- Desenvolver um cultivo a partir de carpósporos e tetrásporos de *C. chamissoi*.



Localização geográfica das 4 populações naturais de *C. chamissoi* estudadas.

## CAPÍTULO 2

### Effects of temperature, photon flux density and photoperiod on growth of gametophytic and tetrasporophytic fronds of *Chondracanthus chamissoi* from four Chilean populations

---

Efeito da temperatura, Densidade de fluxo fotônico e fotoperíodo no crescimento *in vitro* de gametófitos e esporófitos de *Chondracanthus chamissoi* provenientes de quatro populações do Chile

#### ABSTRACT

The effects of temperature, photon flux density and photoperiod on growth rate of the gametophytic and sporophytic thalli of *C. chamissoi* were studied *in vitro*. Both reproductive phases survived and grew in all conditions tested, with growth rate varying between 0.1 and 7.5 % day<sup>-1</sup>. The results showed higher growth rates with the increase of temperature and photon flux density levels. It was observed that in almost all treatment the growth rate was higher in gametophytic thalli. The photoperiod did not show significant differences in the growth rate for both reproductive phases in any of the populations studied. The results show that temperature was the principal factor affecting the growth rate of *C. chamissoi*.

#### RESUMO

Gametófitos e esporófitos de *C. chamissoi* provenientes de quatro populações naturais do litoral chileno cresceram em todos os tratamentos estudados com taxas de crescimento que variaram entre 0,1 até 7,5 % día<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram um paulatino incremento das taxas de crescimento com o aumento nos níveis de temperatura e densidade de fluxo fotônico. Na maioria dos tratamentos as taxas de crescimento dos gametófitos foram maiores que as dos esporófitos. Por outro lado os fotoperíodos estudados não apresentaram variações significativas nas taxas de crescimento. A análise separada do crescimento para cada localidade mostrou que a temperatura é o fator mais determinante no crescimento

## CAPÍTULO 3

### *In vitro* recruitment of *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. on gametophytic and tetrasporophytic thalli of four populations of *Chondracanthus chamissoi* from Chile

---

Recrutamento *In vitro* de *Ulva* sp. E *Enteromorpha* sp. sobre talos gametofíticos y tetrasporofíticos de *Chondracanthus chamissoi* provenientes de quatro populações naturais do Chile

#### ABSTRACT

The recruitment of *Ulva* sp. and *Enteromorpha* sp. on gametophytic and tetrasporophytic thalli of *C. chamissoi* were tested *in vitro*. To *Ulva* sp. the results showed that density, cover as well as length of the recruits were different between reproductive phases and among populations of *C. chamissoi*. In most experiments a greater number of epiphytic thalli were observed on gametophytic plants of *C. chamissoi*, with Calderilla and Lechagua populations offering a higher resistance to epiphytism. To *Enteromorpha* sp. there was a greater variability, however the recruitment in this species was lower than that of *Ulva* sp. The results showed a differential resistance to epiphytism for both reproductive phases and plants origin, indicating the possibility to obtain selected strains with higher susceptibility against epiphytism.

#### RESUMO

O recrutamento de *Ulva* sp. e *Enteromorpha* sp. sobre talos de *C. chamissoi* foi estudado *in vitro*. Foram utilizados talos gametofíticos e esporofíticos de *C. chamissoi* provenientes de quatro populações do litoral do Chile. Os resultados mostraram que para *Ulva* sp. tanto a densidade de talos recrutados quanto sua cobertura e comprimento variaram em função da fase do ciclo de vida e das populações de *C. chamissoi*. Na maioria dos experimentos um maior número de epífitas foi registrado sobre talos gametofíticos sendo as populações de Calderilla no norte e Lechagua no sul, as que apresentaram uma maior resistência ao epifitismo. Para *Enteromorpha* sp. os valores foram mais variáveis, porem o recrutamento destas espécies foi menor que o registrado para *Ulva* sp. Os resultados mostraram que existe uma resistência diferencial quanto ao epifitismo entre as duas fases de *C. chamissoi* e as populações estudadas, evidenciando a possibilidade de se obter linhagens com diferentes susceptibilidades ao epifitismo para serem utilizadas em maricultura.

## CAPÍTULO 4

### Seasonal germination of carpospores and tetraspores and growth rates of sporelings of *Chondracanthus chamissoi* from four natural beds in Chile

---

Germinação de Carpósporos e tetrásporos, e crescimento de plântulas de *Chondracanthus chamissoi* provenientes de quatro populações naturais do Chile

#### ABSTRACT

*In vitro* carpospore and tetraspore germination and growth of sporelings were evaluated seasonally for four natural bed of *C. chamissoi*. Germination was observed throughout the year for both types of spores. However, for northern populations (Calderilla, Herradura and P. Aldea) the germination reached the maximum value in spring at the conditions utilized in the laboratory. To Lechagua (southern population), germination was higher in summer. Germination did not show significant differences among carpospores and tetraspores. The growth rate of carposporelings and tetrasporelings varied seasonally in all populations studied, with higher growth in spring. Plantlets derived from both kinds of spores grew at different rates for P. Aldea and Lechagua populations. Carposporelings from Lechagua specimens showed the highest growth rates ( $9.3 \pm 0.2 \text{ \% day}^{-1}$ ) while the lowest rates were found for tetrasporelings from P. Aldea ( $5.0 \pm 0.4 \text{ \% day}^{-1}$ ).

#### RESUMO

A germinação *in vitro* de carpósporos e tetrásporos e o crescimento das plântulas deles derivadas foi avaliada nas quatro estações do ano para quatro populações de *C. chamissoi*. A germinação ocorreu durante todo o ano, para ambos os tipos de esporos, porém, nas populações do norte do país (Calderilla, Herradura, P. Aldea) a germinação atingiu valores máximos na primavera nas condições de laboratório utilizadas. Para Lechagua (população do sul) a germinação foi maior no verão. Não houve diferenças nas taxas de germinação entre carpósporos e tetrásporos. O crescimento de plântulas derivadas dos dois tipos de esporos apresentou variação ao longo do ano nas quatro populações estudadas, com um maior crescimento na primavera. As taxas de crescimento foram diferentes entre as plântulas oriundas de carpósporos e tetrásporos nas populações de P. Aldea e Lechagua. A maior taxa de crescimento foi atingida para plantas derivadas de carpósporos na localidade de Lechagua  $9.3 \pm 0.2 \text{ (\% día}^{-1}\text{)}$  e a menor taxa foi registrada para plântulas originadas de tetrásporos em P. Aldea com  $5.0 \pm 0.4 \text{ (\% día}^{-1}\text{)}$ .

## CAPÍTULO 5

### Experimental cultivation of *Chondracanthus chamissoi* on two localities of the Chilean coast

---

#### Cultivo experimental de talos de gametófitos e tetrasporófitos de *Chondracanthus chamissoi* em dois locais da costa chilena

##### ABSTRACT

Here we report the first attempt to cultivate *C. chamissoi* in Chile. A first experiment, conducted with branches bearing cystocarps or tetrasporangia were inserted among the braids of a rope and hang from a floating system at 1, 3 and 5m depths in two sheltered bays in northern Chile (Herradura and Calderilla). The fronds adapted well to cultivation and grew at all the depths tested, although the greatest increase in biomass was observed at 1m depth. On a yearly cycle, higher biomass increases were observed in autumn and winter months compared with the spring and summer. In a second experiment we compared thallus bearing cystocarps and tetrasporangia with infertile ones, on ropes extended between poles at one meter from the bottom and 2-4 m deep. Best results were obtained with infertile fronds. In both experiments the results showed that biomass accumulation was greater at Calderilla bay.

##### RESUMO

Este capítulo descreve a primeira tentativa para cultivar *C. chamissoi* na costa chilena. Os experimentos foram conduzidos em duas localidades do norte do Chile: Baía Herradura e Baía Calderilla. Num primeiro experimento plantas cistocárpicas e tetrasporangiais foram presas a cordas pendentes de um sistema flutuante e cultivadas a 1, 3 e 5 m de profundidade durante um ano. Os resultados mostraram que as frondes se adaptaram bem à metodologia empregada, com melhor desempenho a 1 m de profundidade e durante os meses de outono e inverno. Em um segundo experimento as cordas com as mudas, incluindo plantas férteis e inférteis, foram cultivadas e ficaram presas a um metro do sedimento por estacas, numa profundidade de 2-4 m. Os resultados deste experimento mostraram notáveis diferenças no crescimento de frondes sem estruturas reprodutoras. Para ambos os experimentos Baía Calderilla resultou ser o local mais apropriado para a maricultura desta espécie.

## CAPÍTULO 6

### **Cultivation of *Chondracanthus chamissoi* from carpospores and tetraspores**

---

Cultivo de *Chondracanthus chamissoi* a partir de carpósporos e tetrásporos

#### **ABSTRACT**

Here we discuss the cultivation of *C. chamissoi* from carpospores and tetraspores seeded on ropes. The experiments were performed in three systems: laboratory, tank and in the sea. Evaluations of the density and the growth of the plants were made in each system and compared. Tetraspores showed a greater germination rate (40%) than carpospores (28%). Plantlet density were  $196 \pm 24$  and  $68 \pm 12$  microthalli  $\text{cm}^{-1}$  for gametophytic and sporophytic thalli at the beginning of the experiments. However, density decreased to  $15 \pm 7$  and  $6 \pm 4$  microthalli  $\text{cm}^{-1}$  respectively to gametophytic and sporophytic thalli towards the end of the experiments. Plants cultivated in the sea showed good commercial characteristics, remaining free from epiphytes and abundantly branched. Modifications in the methodology to reduce the time of cultivation and to avoid loss of plants is discussed.

#### **RESUMO**

Este capítulo descreve a metodologia e os resultados obtidos com o cultivo de *C. chamissoi* a partir de esporos semeados sobre cordas. O experimento foi realizado em três sistemas: cultivo controlado em laboratório, semicontrolado em tanques de 1000 L e no mar, registrando-se a densidade e o crescimento das plantas. Os tetrásporos apresentaram maior taxa de germinação (40%) em relação aos carpósporos (28%). A densidade foi de  $196 \pm 24$  e  $68 \pm 12$  microtalos  $\text{cm}^{-1}$  para gametófitos e esporófitos, respectivamente, no início dos experimentos, diminuindo paulatinamente até  $15 \pm 7$  para o gametófito e  $6 \pm 4$  plantas  $\text{cm}^{-1}$  para o esporófito quando as cordas foram cultivadas no mar. As plantas produzidas no mar apresentaram interessantes características comerciais, permanecendo livre de epífitas e com talos abundantemente ramificados. Discute-se a incorporação de modificações na metodologia para otimizar e diminuir o tempo de cultivo e evitar a perda das plantas.

## CAPÍTULO 7

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

No futuro próximo, a exploração de *Chondracanthus chamissoi* no Chile deve considerar, competitivamente, dois mercados para sua comercialização. O primeiro está relacionado à produção de carragenanas e deverá ser feito com base na exploração responsável de populações naturais; o segundo visará o mercado de alimento humano e deverá ser suprido por fazendas marinhas. De um lado, a sustentabilidade da exploração das populações naturais só poderá ser atingida se forem estabelecidas e respeitadas medidas de manejo e conservação desta espécie. Por outro lado a comercialização de *C. chamissoi* como alimento humano requer um produto de alta qualidade que não é possível se obter a partir da coleta de populações naturais, de modo que o cultivo da espécie passará a ser uma ferramenta imprescindível no desenvolvimento deste novo mercado.

Esta tese teve como motivação nuclear desenvolver as bases biológicas e tecnológicas no sentido de viabilizar o cultivo deste valioso e ainda sub-explotado recurso marinho, visando produzir de maneira competitiva um produto com as qualidades e especificações necessárias para atender a um mercado promissor e exigente. Esperamos que ela sirva como base para novos estudos que efetivamente desenvolvam a criação de um parque de aquíicultura na região estudada e promovam uma nova alternativa de renda para as comunidades caiçaras do norte do Chile.

O estudo foi dividido em dois grandes temas: os capítulos 2, 3 e 4, tiveram como objetivo comparar características de linhagens provenientes de diferentes localidades do litoral chileno. É importante assinalar que este é o primeiro estudo que inclui populações de diferentes latitudes do litoral do Chile, objetivando a obtenção de linhagens selecionadas para o cultivo.

No capítulo 2 foi possível conhecer a resposta do crescimento de *C. chamissoi* frente a fatores ambientais que são de grande importância na implementação de cultivos. Em geral as respostas das diferentes linhagens foi similar nos diferentes tratamentos, não

existindo claras evidências da existência de ecótipos fisiológicos que se manifestassem sob as condições de nossos experimentos. Porém, não se pode descartar a existência de ecótipos, ou seja adaptações genéticas às condições locais em aspectos como reprodução e sobretudo na tolerância fisiológica a fatores não estudados os quais deverão ser testados em experimentos futuros.

Por outro lado, ainda no capítulo 2, foi possível observar que em todas as linhagens estudadas as taxas de crescimento são suficientemente boas para se esperar um ótimo desempenho em condições de cultivo desta espécie no norte do país. Acreditamos que a sensibilidade de *C. chamissoi* à baixas temperaturas indica que ela dificilmente poderá ser cultivada em escala comercial no sul do Chile.

No capítulo 3 foi registrado, em nossa opinião, um dos resultados mais auspiciosos desta tese. A partir do conjunto de dados obtidos foi possível comprovar a existência de adaptações diferenciais ao epifitismo, mostrando que plantas tetraesporofíticas de Calderilla e Lechagua são mais resistentes a este problema. Estes resultados são muito interessantes ante os sérios efeitos negativos do epifitismo, e devem ser estudados em futuro próximo para esclarecer se se tratam realmente de ecótipos. Para isto se recomenda validar estes resultados em cultivos no mar e no laboratório, abordando outras espécies de epífitas, e verificando a capacidade de transmitir esta característica à prole.

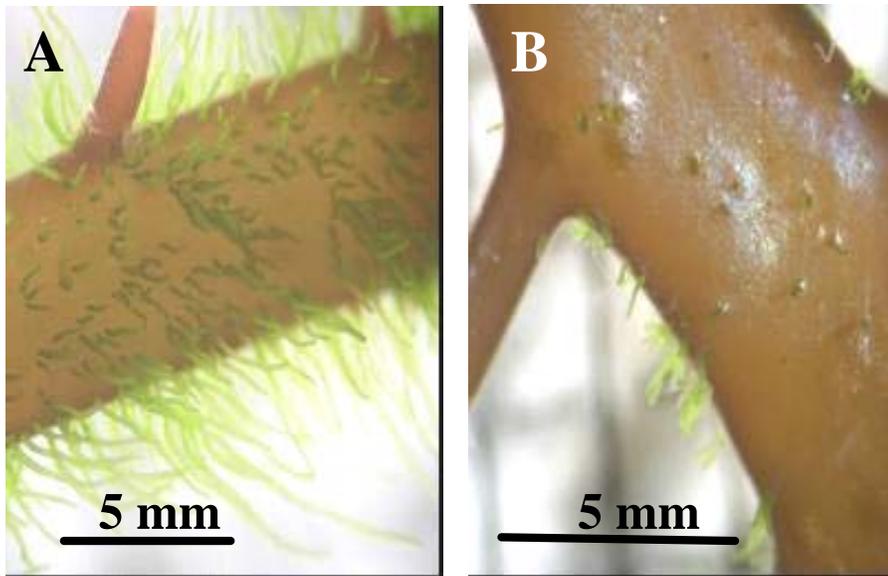
No capítulo 4 foi interessante observar também que embora as diferentes linhagens de *C. chamissoi* apresentem um padrão sazonal quanto à germinação, este seria moderado, permitindo a germinação de esporos e o crescimento de plântulas durante todo o ano. Estes resultados permitiriam realizar cultivos a partir de esporos de forma contínua o que é altamente positivo para um cultivo comercial.

Com os resultados obtidos dos capítulos 2, 3 e 4 foi possível destacar que as linhagens estudadas têm um bom crescimento vegetativo, que os esporos, tanto carpósporos como tetrásporos, têm um bom potencial de germinação, e que o crescimento de microtalos se processa de forma adequada para sua maricultura. Em vista disto destaca-se a importância de se dar continuidade a estudos comparativos entre populações em aspectos como a morfologia, que é um caráter muito importante para sua comercialização como alimento, e resolver os problemas relacionados ao epifitismo, que continua sendo uma das maiores dificuldades na maricultura de algas.

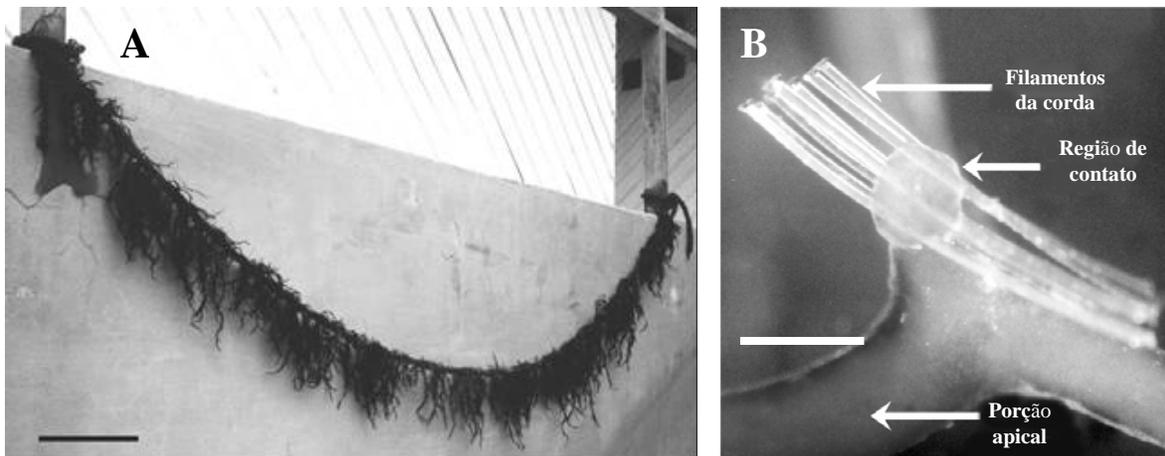
Nos capítulos 5 e 6 foram realizadas as primeiras tentativas para desenvolver o cultivo de *C. chamissoi* a partir de esporos e por meio de propagação vegetativa.

O cultivo vegetativo em corda mostrou-se tecnicamente possível, obtendo-se plantas de tamanho comercial em 1 ou 2 meses, segundo a época do ano. Assim também foi possível destacar a produção nos meses frios. Por outro lado, o principal problema desta metodologia é a grande quantidade de biomassa necessária para iniciar um cultivo comercial. Não obstante, este tipo de cultivo pode se tornar uma ferramenta importante e complementar o cultivo a partir de esporos, o qual é mais demorado, ajudando na manutenção da produção em épocas de menor crescimento.

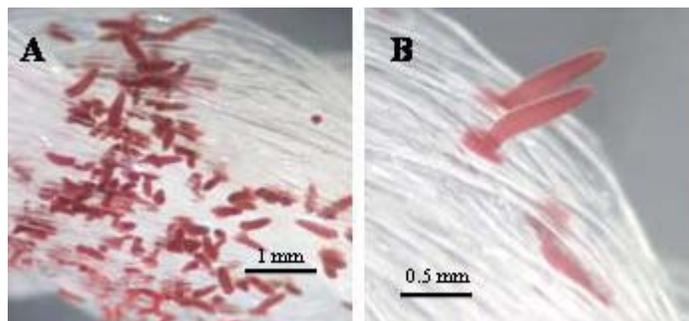
Por sua vez, o cultivo a partir de esporos que demanda um período de 8 meses, até atingir um tamanho comercial de frondes (10 a 15 cm) tem a vantagem de incorporar maior variabilidade genética ao cultivo especialmente quando se utiliza tetrásporos, os quais são precedidos por um processo de meiose. No entanto, acredita-se que este tempo possa diminuir, otimizando-se a etapa de cultivo semi-controlado em tanques. É justamente nesta etapa onde são observadas as principais necessidades de pesquisa no futuro, ajustando os requerimentos da espécie em seus primeiros estádios de desenvolvimento para se obter um rápido crescimento e traslado ao mar.



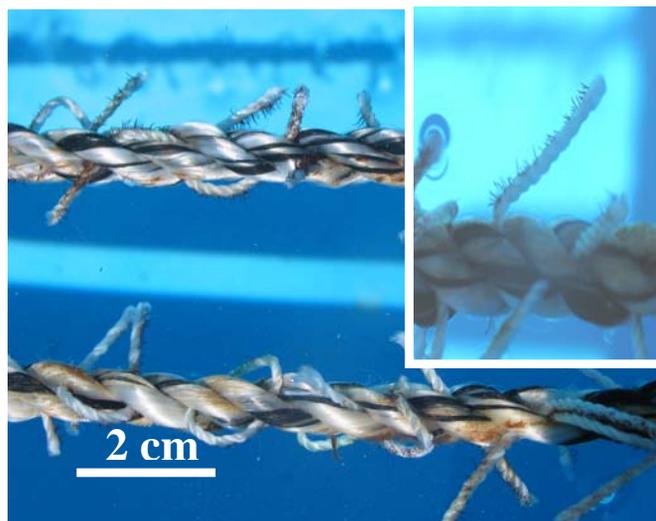
Talos de *C. chamissoi* epifitados em diferentes intensidades por *Ulva* sp. A: Talo do gametófito de P. Aldea. B: Esporófito de Lechagua.



**A:** Corda de cultivo de gametófito feminino de *C. chamissoi* com cistocarpos após 3 meses de cultivo em Calderilla a 3m de profundidade. Barra = 10 cm. **B:** Detalhe da região de contato entre as frondes de *C. chamissoi* e os filamentos da corda de cultivo. Barra = 2 mm.



Microtalos de gametófitos de *C. chamissoi* crescendo sobre corda após 30 (A) e 45 (B) días de cultivo no laboratório.



Detalhe das cordas de cultivo dispostas em cordas de polipropileno de 7 mm Ø.