



Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

# Cultivo, adaptación morfológica y fisiopatología de macroalgas marinas de interés industrial

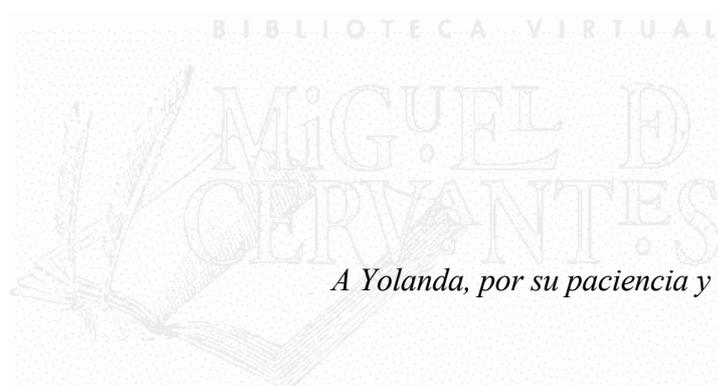
Daniel Robledo Ramírez

## Tesis de Doctorado

**Facultad:** Ciencias del Mar

**Director:** Dr. Guillermo García Reina

**1993**



*A Yolanda, por su paciencia y comprensión*

BIBLIOTECA VIRTUAL  
MIGUEL DE CERVANTES

GUILLERMO GARCIA REINA, DOCTOR EN BIOLOGIA Y PROFESOR  
TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE  
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Hace constar:

Que el Lcdo. en Oceanografía Biológica D. Daniel Robledo Ramírez ha  
realizado el presente trabajo como Memoria de Tesis Doctoral, en el Instituto de  
Algología Aplicada del Dpto. de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran  
Canaria, bajo su dirección, y se presenta con su V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>.

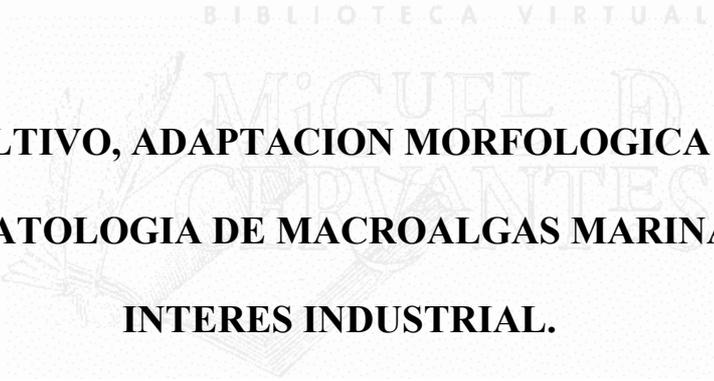
Las Palmas de Gran Canaria, Junio de 1993.

*UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA*

*DOCTORADO EN CIENCIAS DEL MAR*

*DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA*

*PROGRAMA DE BIOLOGIA VEGETAL Y BIOTECNOLOGIA*



**CULTIVO, ADAPTACION MORFOLOGICA Y  
FISIOPATOLOGIA DE MACROALGAS MARINAS DE  
INTERES INDUSTRIAL.**

Tesis Doctoral presentada por D. Daniel Robledo Ramírez

Dirigida por el Dr. D. Guillermo Garcia Reina

El Director

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, a    de Junio de 1993.

---

**CULTIVO, ADAPTACION MORFOLOGICA Y  
FISIOPATOLOGIA DE MACROALGAS MARINAS DE  
INTERES INDUSTRIAL**

---

**Memoria que presenta, el Lcdo. en Oceanografía  
Biológica, Daniel Robledo Ramírez para aspirar  
al grado de Doctor.**

**Las Palmas de Gran Canaria, Junio de 1993.**

## PREFACIO

---

Esta tesis compila los resultados de los artículos que se citan a continuación así como otros resultados no publicados:

- I. Robledo RD, García Reina G (1991) Seaweed spray cultivation technique. En: *Seaweed Cellular Biotechnology, Physiology and Intensive Cultivation*. G. Garcia Reina & M. Pedersén (Eds.), COST-48. Las Palmas de Gran Canaria, España. 233-244.
- II. Haglund K, Robledo RD, García Reina G, Pedersén M (1991) Increased metal content in spray cultivated seaweeds. En: *Seaweed Cellular Biotechnology, Physiology and Intensive Cultivation*. G. Garcia Reina & M. Pedersén (Eds.), COST-48. Las Palmas de Gran Canaria, España. 245-256.
- III. García Reina G, Gómez Pinchetti JL, Robledo DR, Sosa P (1991) Actual, potential and speculative applications of seaweed cellular biotechnology: some specific comments on *Gelidium*. *Hydrobiologia* 221: 181-194.
- IV. Robledo RD, García Reina G (1993) Apical callus formation in *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) cultured in tanks. *Hydrobiologia* (en prensa).
- V. Robledo RD, Sosa PA, García Reina G, Müller DG (1993) Photosynthetic performance of healthy and virus infected *Feldmannia simplex* and *F. irregularis* (Phaeophyceae). *Eur. J. Phycol.* (enviado).

Este trabajo ha sido llevado a cabo por Daniel Robledo Ramírez en el Instituto de Algología Aplicada del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Guillermo García Reina por el apoyo y aprovisionamiento logístico prestado durante la realización de este trabajo.

Agradezco de manera especial al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por facilitarme la beca-crédito que hizo posible ampliar mis estudios en el extranjero.

Sin ningún lugar a duda, a todos los integrantes del IAA, Pedro Sosa, Juan Luis Gómez, Antera Martel y Miguel Jiménez, con quienes he pasado momentos muy pero que muy agradables, y por hacerme sentir siempre como en casa.

To all the Algal Group at Uppsala University from which I have learnt to culture seaweeds "swedish style" and specially to the encouraging advices of Prof. Marianne Pedersén to whom I am in great debt, Tack!

A los amigos que me han acogido y servido de apoyo durante mi estancia en Las Palmas, pero muy especialmente a Fernando Castillo y María del Mar Bernal, a Pepe Collado y Eduardo Navarro, y por último pero no por ello el menos importante a Eduardo Sall.

También a Chicha y Paco Freire (Colegio Universitario de Las Palmas), a Anette Axén (Institute for Physiological Botany) y a Goodfried Roomans (Laboratory of Ultrastructure) por su inmejorable ayuda técnica.

I am also greatly in debt to Prof. Dieter Müller for the virus lessons during photosynthesis measurements, to Prof. Ivan Sêtlík from which I learn fluorescence principles, y al Dr. Juan Correa por sus lecciones sobre epi-endofitismo.

A mi querida familia que desde 9,000 Km de distancia me ha apoyado y brindado su inagotable cariño siempre, sea cual sea el objetivo.

---

<b><u>I. Introducción</u></b> .....	1
<b><u>1.- Introducción a los sistemas intensivos</u></b> .....	3
1.1.- <u>Cultivo por aspersión</u> .....	5
1.2.- <u>Acumulación de metales</u> .....	9
1.3.- <u>Cultivo en tanque</u> .....	14
<b><u>2.- Fisiopatología en cultivo de macroalgas</u></b> .....	16
2.1.- <u>Epifitos</u> .....	17
2.1.1.- <u>Métodos biológicos de control</u> .....	18
2.1.2.- <u>Métodos químicos de control</u> .....	20
2.2.- <u>Virus</u> .....	21
<b><u>3.- Objetivos</u></b> .....	22
<b><u>II. Materiales y Métodos</u></b> .....	23
<b><u>1.- Cultivo por Aspersión</u></b> .....	
1.1.- <u>Recolección y preparación del material</u> .....	25
1.2.- <u>Descripción de especies</u> .....	26
1.3.- <u>Tratamiento del agua de mar</u> .....	27
1.4.- <u>Condiciones de cultivo</u> .....	31
1.5.- <u>Medición de parámetros físicos</u> .....	35
1.6.- <u>Indíces de crecimiento y producción</u> .....	35
<b><u>2.- Contenido en metales</u></b> .....	
2.1.- <u>Cultivo por aspersión</u> .....	36
2.2.- <u>Cultivo en tanque</u> .....	36
2.3.- <u>Análisis de metales</u> .....	36

---

3.- <u>Adaptación morfológica.</u>	
3.1.- <u>Cultivo en invernadero</u> .....	38
3.2.- <u>Cultivo <i>in vitro</i> de ápices</u> .....	39
3.3.- <u>Estudio histológico.</u> ....	41
4.- <u>Tratamiento anti-epifitos.</u> .....	41
4.1.- <u>Descripción de especies</u> .....	42
4.2.- <u>Tratamiento con mesoherbívoros</u> .....	42
4.3.- <u>Tratamiento con hipoclorito de sodio.</u> ....	44
4.4.- <u>Tratamiento con sulfato de cobre</u> .....	44
4.4.1.- <u>Cultivo</u> .....	45
4.4.2.- <u>Medición de fotosíntesis.</u> ....	45
4.4.3.- <u>Medición de fluorescencia</u> .....	46
4.4.4.- <u>Análisis de pigmentos</u> .....	48
5.- <u>Fisiopatología de infecciones víricas en macroalgas.</u>	
5.1.- <u>Descripción de especies</u> .....	49
5.2.- <u>Condiciones de cultivo</u> .....	50
5.2.1.- <u>Análisis de pigmentos</u> .....	50
5.2.2.- <u>Preparación para microscopía electrónica.</u> ....	51
<b>III. <u>Resultados</u></b> .....	<b>53</b>
1.- <u>Cultivo por aspersión.</u> ....	55
1.1.- <u>Contenido en metales</u> .....	57
2.- <u>Adaptación morfológica</u> .....	60
2.1.- <u>Cultivo en invernadero</u> .....	60
2.2.- <u>Cultivo <i>in vitro</i> de ápices</u> .....	65
3.- <u>Tratamiento anti-epifitos.</u> .....	69
3.1.- <u>Tratamiento con mesohervíboros</u> .....	69

## Índice General.

---

3.2.- <a href="#">Tratamiento con hipoclorito de sodio</a> .....	73
3.3.- <a href="#">Tratamiento con sulfato de cobre</a> .....	74
3.3.1.- <a href="#">Crecimiento en cultivo</a> .....	74
3.3.2.- <a href="#">Fotosíntesis y Pigmentos</a> .....	75
3.3.3.- <a href="#">Fluorescencia</a> .....	78
4.- <a href="#">Fisiopatología de infecciones víricas en macroalgas</a> .....	83
4.1.- <a href="#">Fotosíntesis en <i>Feldmannia</i></a> .....	83
IV. <a href="#">Discusión</a> .....	89
1.- <a href="#">Cultivo por aspersión</a> .....	91
1.1.- <a href="#">Acumulación de metales</a> .....	92
2.- <a href="#">Adaptación morfológica</a> .....	93
3.- <a href="#">Control de epifitos</a> .....	97
4.- <a href="#">Fisiopatología de infecciones víricas</a> .....	101
V. <a href="#">Conclusiones</a> .....	105
<a href="#">Bibliografía</a> .....	109
<a href="#">Anexo I</a> .....	123

BIBLIOTECA VIRTUAL

MIGUEL DE  
CERVANTES

## **I. INTRODUCCIÓN.**

---

**Introducción.**

Las macroalgas han sido utilizadas durante cientos de años como alimento humano y en remedios populares, para consumo animal y como fertilizante agrícola (Chapman y Chapman 1980). La utilización de los polisacáridos matriciales de algas rojas (agar y carragenatos) y pardas (alginatos), son básicos en la industria alimenticia, química y farmacéutica (McHugh 1987).

La mayoría de las especies de macroalgas de interés industrial se obtienen por explotación de poblaciones naturales. Sin embargo, la creciente demanda de materia prima por parte de la industria, aunado a la sobreexplotación y destrucción de praderas naturales, ha potenciado el desarrollo de métodos de cultivo como alternativa al suministro de biomasa.

Las prácticas de cultivo de macroalgas tienen varios siglos de antigüedad en las culturas orientales (Tseng y Fei 1987), pero ha sido sólo en los últimos 50 años cuando se han establecido las bases científicas para su desarrollo, tanto en Oriente como en otros lugares del mundo (Santelices 1989).

El cultivo tradicional en ambientes marinos o hábitats costeros precisa el fijar las plantas a sustratos naturales y/o artificiales, implicando en la mayoría de los casos el control y cultivo del ciclo completo del alga. Esta forma de cultivo ha sido ampliamente desarrollada en países asiáticos, con tradición en el consumo directo de estos vegetales y donde la demanda para su uso alimenticio es amplia. En estos países, las condiciones ambientales, costeras y sociales permiten el desarrollo de estos sistemas, comunmente llamados "mano de obra intensivos" (Doty 1979), que muchas veces no satisfacen los costes energéticos y/o económicos. Sin embargo, en este tipo de cultivos la manipulación de factores como corrientes marinas, temperatura, luz, composición del medio (en particular nutrientes) y efectos

biológicos como el pastoreo y el epifitismo, son difíciles de controlar, lo que condiciona la calidad y cantidad de algas cosechadas (Schramm 1991).

Otra estrategia de cultivo consiste en los sistemas ubicados en tierra bajo condiciones más controlables, como estanques y canales, por cuyos mayores costes y sofisticación se les ha denominado sistemas "capital intensivos" (Chapman y Chapman 1980). El cultivo "capital-intensivo" de macroalgas presupone el uso de sistemas de crecimiento o producción a nivel comercial, o al menos a escala piloto. El cultivo en estos sistemas tiene varias ventajas sobre los sistemas de cultivo en el mar, ya que la productividad por unidad de área es mayor, a la vez que los procesos de producción pueden ser controlados y mecanizados, disminuyendo su coste. (Neish 1979, Ryther *et al.* 1978, Bidwell *et al.* 1985).

En ambos casos se puede considerar la producción cultivada como suplementaria a la producción natural y como forma alternativa para la obtención de especies no disponibles en grandes cantidades en el medio natural. En Occidente, los esfuerzos para desarrollar el cultivo han sido enfocados a los sistemas capital intensivos de producción de especies importantes como alimento humano directo y/o por su uso en la industria como estabilizantes, emulsificantes alimentarios y de uso farmacéutico.

Muchas algas pueden mantenerse en sistemas de laboratorio o en otros ambientes artificiales en tierra, donde los factores que influyen en el crecimiento y producción pueden ser controlados y manipulados. El contenido de nutrientes en el medio, parámetros físicos como la temperatura e iluminación, y variables biológicas como la densidad e interacciones con otras especies, son algunos de los muchos factores que pueden ser estudiados en cultivos de laboratorio. Sin embargo, al expandir los cultivos a mayor escala, muchos de los sistemas incorporados en laboratorio para controlar y aumentar la producción han de ser sacrificados por razones económicas, por lo que hablamos entonces de sistemas semicontrolados.

---

## 1.- Introducción a los sistemas intensivos.

El término **maricultura**, aplicado a macroalgas, define la acción de cultivar macroalgas en ambientes artificiales, principalmente en tierra y enriquecidos por la adición de nutrientes, con el objetivo de incrementar la producción de biomasa por unidad de área bajo condiciones controladas o semicontroladas (Chapman y Chapman 1980).

Los sistemas intensivos de maricultura son relativamente recientes, y fueron iniciados por diversos grupos de investigación en Canadá (Neish *et al.* 1977) y en los Estados Unidos (Ryther *et al.* 1978). Dentro de la maricultura se pueden distinguir varias aproximaciones técnicas dependiendo de las estructuras que se utilicen como unidad de producción. Los sistemas más comunmente utilizados en Occidente son tanques de diversos volúmenes y formas, además de sistemas tan particulares como el cultivo por aspersión.

En función del aporte del agua de mar a la unidad de cultivo, podemos distinguir dos tipos fundamentales de sistemas: **el tipo abierto**, que se caracteriza por la renovación constante del agua, y **el tipo semi-cerrado**, que precisa de un recambio periódico de agua, aprovechando dichos cambios para el enriquecimiento del medio.

La irradiación y la temperatura son parámetros muy importantes, aunque no críticos, en los sistemas de cultivo intensivo, ya que se trabaja bajo condiciones ambientales que de alguna manera pueden ser manipuladas, dependiendo en gran medida del diseño del sistema empleado y de las adaptaciones técnicas que se hagan en ellos. Sin embargo, la cantidad de nutrientes en el medio es uno de los factores que más pesa en la productividad de estos sistemas de cultivo.

Además del carbono inorgánico, es necesaria la adición de nitrógeno y fósforo, que son los elementos más importantes como macronutrientes esenciales para satisfacer los requerimientos fisiológicos de las algas (Lobban 1985). La

adición de micronutrientes como elementos traza, ha recibido poca atención en los sistemas de cultivo intensivos descritos hasta la fecha (Rice y Lapointe 1981), aunque su abastecimiento parece estar asegurado en sistemas de tipo abierto y semi-cerrado (Hansen *et al.* 1981).

La adición de macro y micronutrientes se ha realizado empleando diversas estrategias para enriquecer los cultivos. Por un lado, la utilización de altas tasas de renovación recirculando aguas marinas a través de los sistemas de cultivo (Lapointe y Ryther 1979). También se han utilizado aguas oceánicas de hasta 60 m de profundidad ricas en nutrientes (Indergaard *et al.* 1986), aunque los costos asociados a su bombeo hasta la superficie los hacen sumamente restrictivos. Otra alternativa es la utilización de aguas residuales (Ryther *et al.* 1978), que actualmente tienen un gran futuro en su aplicación a la maricultura algal en sistemas de biofiltración.

Para eliminar los altos costos de bombeo de los sistemas de tipo abierto, se introdujo la práctica de añadir fertilizantes químicos, en forma tanto sólida como líquida, directamente al agua del sistema para mantener los niveles de nutrientes estables, mediante pulsaciones periódicas, paulatinamente o en pulsos asociados a la rápida absorción de algunas especies.

La producción de los sistemas intensivos depende en gran medida de la cantidad de energía invertida. Las mayores producciones en sistemas intensivos, se han obtenido en tanques con agitación vigorosa y altas tasas de renovación de agua de mar enriquecida (Lapointe y Ryther 1978). No obstante, parte de la eficiencia de los sistemas intensivos bajo condiciones ambientales se basa en los aspectos técnicos de diseño y operación (Bidwell *et al.* 1985), además de la elección de especies que por sus características biológicas se adapten mejor a los sistemas y que por su importancia económica hagan rentable su producción.

---

### 1.1.- Cultivo por aspersión.

De entre los sistemas de cultivo en tierra, el cultivo por aspersión de macroalgas es el más peculiar. Parece tener su origen en el laboratorio de L.A. Hanic, de la Universidad de Dalhousie, Halifax, Nueva Escocia, y fue descrito brevemente por Chapman (1973). Diversos trabajos experimentales fueron desarrollados en los Estados Unidos (Moeller *et al.* 1982, 1984, Rheault y Ryther 1983, Williams citado por Hanisak 1987), donde fue patentado y desarrollado a escala piloto como una alternativa a la producción de biomasa algal en zonas terrestres inproductivas (Moeller *et al.* 1982). En Europa, el cultivo por aspersión se ha desarrollado bajo condiciones de invernadero en Suecia (Lignell y Pedersén 1986, Haglund y Pedersén 1988) y también en Noruega (Indergaard *et al.* 1986). Las distintas aproximaciones que se han hecho para utilizar este sistema son variadas, las características técnicas del sistema, las especies cultivadas y su producción utilizando este sistema se resumen en las Tablas 1.1 y 1.2.

El cultivo por aspersión presenta una serie de características diferenciales respecto a los otros sistemas de maricultura vegetal. Se realiza en estructuras tridimensionales, que sirven de soporte a varias bandejas de malla plástica donde se colocan las algas. El sistema puede tener varias de estas bandejas a distintos niveles dependiendo de la altura de la estructura. El suministro de agua a las algas se realiza mediante un flujo, que en forma de ducha, riega el nivel superior y análogamente a una cascada sigue regando el resto de los niveles de la estructura.

La estructura de soporte puede albergar varias bandejas cuya anchura, distancia entre ellas y diámetro de la malla, influyen directamente sobre la cantidad de luz que llega a las plantas (Moeller y Garber 1982). Otro de los factores críticos de diseño es la forma de duchar las bandejas, pues de ello depende la homogeneidad del riego de las algas y el mantenimiento de una humedad óptima y la operatividad del sistema (Haglund y Pedersén 1988).

Tabla 1.1.- Condiciones de cultivo, tasa de crecimiento y producción de algas pertenecientes a la división Clorofita y Feofita. Condiciones de cultivo: Luz (N=Iluminación ambiental, L=Iluminación artificial); Flujo del riego ( $l \cdot m^{-2} \cdot min^{-1}$ ); Adición de nutrientes para sistema abierto (FS=método fertilización foliar, DW=agua de profundidad rica en nutrientes, SW=aguas superficiales, PF=fertilización por pulsos) y para sistemas cerrados (ASW=agua de mar artificial, B=adición directa al medio); Régimen de riego (S=irrigación continua, S/D=irrigación intermitente con periodos de desecación menores de una hora, 12:12=ciclos irrigación/desecación en horas del día); Tasa de crecimiento expresada en incremento porcentual de biomasa por día.

Especies estudiadas	Densidad ( $g \cdot m^{-2}$ )	#Niveles	Luz	Flujo	Adición nutrientes	Sal. (%)	Temp. (°C)	Régimen de riego	Tasa crecimiento	Producción $g \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$	Referencia
CLOROFITAS											
<i>Ulva lactuca</i>	100-450	I	N	14-17	B	15-20	10-30	S/D	2.5	-	Haglund & Pedersen (1988)
FEOFITAS											
<i>Ascophyllum nodosum</i>	4200	II	N	2.6	FS	-	-	12:12	-	26	Moeller <i>et. al</i> (1982)
	4200	IV	N	2.6	FS	-	-	12:12	-	40-68	Moeller <i>et. al</i> (1982)
	4200	III	N	2.6	FS	-	-	S/D	-	28	Moeller <i>et. al</i> (1982)
	3000	III	N	0.5-3.5	PF	-	20	S	1.2	10-14	Rheault & Ryther (1983)
	3000	III	N	0.5-3.5	PF	-	20	16:8	1.0	8.8-12.6	Rheault & Ryther (1983)
	3000	III	N	0.5-3.5	PF	-	20	3:1	1.2	6.0-13.2	Rheault & Ryther (1983)
	1700	II	N	15.0	SW	22-29	11-12	S	0.4	3.3	Indergaard <i>et. al</i> (1986)
	1700	II	N	15.0	DW		32-33 8-9	20:4	0.3	2.7	Indergaard <i>et. al</i> (1986)
	1700	II	N	15.0	SW	22-29	11-12	20:4	0.4	1.1-2.0	Indergaard <i>et. al</i> (1986)
	3000	I	N	2.0	DW		33-34 7.0	S	8.0	-	Lignell & Pedersen (1986)
	200	I	L	1.6	ASW	33	13	S	2.4	-	Lignell & Pedersen (1986)
<i>Fucus serratus</i>	100-450	I	N	14-17	B	15-20	10-30	S/D	2.5	-	Haglund & Pedersen (1988)
	200	I	L	1.6	ASW	33	13	S	2.4	-	Lignell & Pedersen (1986)
	3000	I	N	2.0	DW		33-34 7.0	S	3.5	-	Lignell & Pedersen (1986)
<i>Fucus vesiculosus</i>	200	I	L	1.6	ASW	33	13	S	2.1	-	Lignell & Pedersen (1986)
	3000	I	N	2.0	DW		33-34 7.0	S	4.0	-	Lignell & Pedersen (1986)
	100-450	I	N	14-17	B	7-19	10-30	S/D	1.1	-	Haglund & Pedersen (1988)
<i>Laminaria saccharina</i>	200	I	L	1.6	ASW	33	13	S	0.4*	-	Lignell & Pedersen (1986)
	3000	I	N	2.0	DW		33-34 7.0	S	1.7*	-	Lignell & Pedersen (1986)
<i>Halydris siliquosa</i>	3000	I	N	2.0	DW		33-34 7.0	S	1.5	-	Lignell & Pedersen (1986)

(\*)= Tasa de crecimiento expresada e centímetros por día, debido a la morfología del alga (Lignell & Pedersen 1986), o por la técnica de medición empleada (Indergaard *et al.* 1986).

**Tabla 1.2.- Condiciones de cultivo, tasa de crecimiento y producción de algas pertenecientes a la división Rodofita. Condiciones de cultivo: Luz (N=Iluminación ambiental, L=Iluminación artificial); Flujo del riego ( $l \cdot m^{-2} \cdot min^{-1}$ ); Adición de nutrientes para sistema abierto (FS=método fertilización foliar, DW=agua de profundidad rica en nutrientes, SW=aguas superficiales, PF=fertilización por pulsos) y para sistemas cerrados (ASW=agua de mar artificial, B=adición directa al medio); Régimen de riego (S=irrigación continua, S/D=irrigación intermitente con periodos de desecación menores de una hora, 12:12=ciclos irrigación/desecación en horas del día); Tasa de crecimiento expresada en incremento porcentual de biomasa por día.**

Especies estudiadas	Densidad ( $g \cdot m^{-2}$ )	#Niveles	Luz	Flujo	Adición nutrientes	Sal. (%)	Temp. (°C)	Régimen de riego	Tasa crecimiento	Producción $g \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$	Referencia
RODOFITAS											
<i>Ahnfeltia plicata</i>	1700	II	N	15.0	DW	32-33	8-9	S	0.2	1.2	Indergaard <i>et. al</i> (1986)
	100-450	II	N	10-17	B	15-20	10-30	S/D	0.5	-	Haglund & Pedersen (1988)
<i>Furcellaria lumbricalis</i>	1700	II	N	15.0	SW	22-29	9-11	S	0.02*	-	Indergaard <i>et. al</i> (1986)
	100-450	II	N	10-14	B	15-20	10-30	S/D	0.1	-	Haglund & Pedersen (1988)
	100-450	I	N	10-14	B	7	10-30	S/D	0.6	-	Haglund & Pedersen (1988)
	200	I	L	1.6	ASW	33	13	S	1.6	-	Lignell & Pedersen (1986)
	1000	I	N	2.0	DW	33-34	7.0	S	2.3	-	Lignell & Pedersen (1986)
<i>Chondrus crispus</i>	200	I	L	1.6	ASW	33	13	S	0.7	-	Lignell & Pedersen (1986)
	1000	I	N	2.0	DW	33-34	7.0	S	1.3	-	Lignell & Pedersen (1986)
	100-450	I	N	10-14	B	15-20	10-30	S/D	0.5	-	Haglund & Pedersen (1988)
<i>Polyides rotundus</i>	1000	I	N	2.0	DW	33-34	7.0	S	1.4	-	Lignell & Pedersen (1986)
<i>Gelidium sp</i>	100-450	I	N	14-17	B	15-20	10-30	S/D	3.3	-	Haglund & Pedersen (1988)
<i>Pterocladia pinata</i>	100-450	I	N	14-17	B	15-20	10-30	S/D	0.9	-	Haglund & Pedersen (1988)
<i>Gracilaria secundata</i>	100-450	I	N	14-17	B	15-20	10-30	S/D	1.3	-	Haglund & Pedersen (1988)
<i>G. tikvahiae</i>	-	I	N	50	PF	-	-	S	-	0-35	Williams & Ryther (citado por Hanisak 1987)

(\*)= Tasa de crecimiento expresada en centímetros por día, debido a la morfología del alga (Lignell & Pedersen 1986), o por la técnica de medición empleada (Indergaard *et al.* 1986).

El cultivo intensivo en este sistema, ha sido experimentado en la mayoría de los casos con especies de algas pardas, principalmente *Ascophyllum nodosum*, con la que se han descrito altas producciones (Moeller *et al.* 1984). Sin embargo, los datos son confusos, ya que mientras Lignell y Pedersén (1986) han obtenido tasas de crecimiento hasta del 8.0% de incremento diario para *Ascophyllum nodosum*, Hanisak (1987) señala problemas de adaptación de especies, como *Gracilaria tikvahiae*, en este sistema.

En general, son pocos los grupos de investigación que han desarrollado trabajos con el sistema por aspersión, y siempre en latitudes altas, donde la temperatura e irradiación condicionan el crecimiento (Moeller *et al.* 1982, Lignell y Pedersén 1986), aunque Moeller *et al.* (1984) ha sugerido el enorme potencial productivo de este sistema en latitudes con mayor irradiación solar. No obstante, la ausencia de estudios utilizando este sistema en latitudes subtropicales, y empleando especies subtropicales de interés comercial no han permitido comprobar la potencialidad real del cultivo por aspersión.

Las ventajas del cultivo por aspersión son varias, ya que: i) no existe riesgo de limitación por carbono inorgánico, pues la proporción área/superficie del agua incrementa la difusión de dióxido de carbono del aire, ii) se aprovecha mejor la irradiación solar, al recibir la luz de forma directa y reflejada facilitando su acceso con un diseño apropiado del sistema, iii) el goteo rompe la capa limitante de difusión, favoreciendo el intercambio de gases y nutrientes, iv) es posible utilizar periodos de desecación, simulando mareas, que evitan la proliferación de epifitos.

Quizás sea este último punto la ventaja más importante frente al cultivo en tanque. Sin embargo, las ventajas asociadas a las condiciones de emersión en el sistema han sido poco estudiadas. En especies intermareales se ha descrito un aumento de la tasa fotosintética en condiciones de emersión (Quadir *et al.* 1979), así como el incremento en la asimilación de nutrientes en *Fucus distichus* sometida a emersión artificial (Thomas y Turpin 1980). En el sistema por aspersión, la

---

reducción de la capa limitante de difusión entre el alga y el medio favorece el intercambio de gases y nutrientes, aunque es de esperar que la asimilación de otros elementos del agua de mar, como metales pesados, también se vea favorecida.

### 1.2.- Acumulación de metales.

Los estudios sobre toxicidad (Tabla 1.3), asimilación y acumulación de metales en algas, han puesto de manifiesto que la tasa de acumulación varía con las especies, el tipo de metal y su concentración en el agua de mar. Generalmente, la asimilación se lleva a cabo de forma pasiva (Cd, Cu, Zn) y en algunos casos activa (As) a factores de concentración muy distintos (Morris y Bale 1975).

En *Ulva fasciata* la asimilación y acumulación de diversos elementos está condicionada por el nitrógeno en el alga (Fe y Zn), mientras que otros disminuyen (Cd y Rb) o aumentan (Mn) al aumentar la tasa específica de crecimiento durante el cultivo (Rice y LaPointe 1981).

Las algas marinas bentónicas constituyen uno de los grupos más utilizados como bioindicadores de contaminación en los ecosistemas marinos (Markham *et al.* 1980). La marcada tendencia a acumular metales pesados parece estar relacionada por la afinidad hacia los polisacáridos cargados negativamente de la pared celular, como un proceso de intercambio iónico, principalmente con alginatos y polisacáridos sulfatados (Eide *et al.* 1980, Veroy *et al.* 1980).

Mediante la técnica de microanálisis de rayos X, Lignell *et al.* (1982) han localizado metales a nivel celular en *Fucus vesiculosus*, asociados a polisacáridos y a inclusiones citoplásmicas que presumiblemente tienen un efecto detoxificante y le confieren al alga cierta resistencia frente a estos metales.

---

El estudio del contenido de los elementos químicos en algas, es de vital importancia para áreas de estudio como la fisiología algal y las posibles aplicaciones farmacéuticas y alimenticias de las algas (Yamamoto *et al.* 1979).

**Tabla 1.3.- Metales pesados no requeridos por las algas clasificados de acuerdo a su disponibilidad en el agua de mar y toxicidad en algas. † = Tóxico pero muy raro o insoluble, exceptuando Tungsteno; ‡ = Muy tóxico y relativamente disponible, exceptuando Bismuto; \* = Efecto no crítico (Lobban 1985).**

Metal	[Agua mar] $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	[Algas] $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Referencia
Titanio <sup>†</sup>	0.001	2.4-178	Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Cromo <sup>‡</sup>	5E-4	0.5-2.83	Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Níquel <sup>‡</sup>	0.007	0.23-5.64	Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Estroncio <sup>*</sup>	8	20-11,500	Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Cadmio <sup>‡</sup>	4E-4	0.3-3.30	Maeda y Sakaguchi 1990
Mercurio <sup>‡</sup>	3E-5	0.1-25	Maeda y Sakaguchi 1990
Plomo <sup>‡</sup>	3E-5	< 8-56.5	Maeda y Sakaguchi 1990

---

**Tabla 1.4.- Clasificación de los metales de acuerdo a su probable función en el metabolismo algal. 1 = Macronutrientes esenciales requeridos por todas las algas, 2 = Micronutrientes esenciales requeridos por todas las algas (DeBoer 1981); 3 = Elementos requeridos como trazas sólo por algunas especies, 4 = Elementos no esenciales presentes en algas (Lobban 1985); 5 = Elementos no esenciales muy tóxicos y relativamente accesibles en el agua de mar. Elementos ordenados de acuerdo a su aparición en la tabla periódica.**

<b>Metal</b>	<b>[Agua mar] µg·g<sup>-1</sup></b>	<b>[Algas] µg·g<sup>-1</sup></b>	<b>Función</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Referencia</b>
Boro <sup>2</sup>	4.39	15-910	Posible regulación en la utilización del carbono	No se conocen	Lobban 1985
Sodio <sup>3</sup>	11,000	200-66,600	Activación enzimática, balance hídrico	Nitrato reductasa	Lobban 1985 Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Magnesio <sup>1</sup>	1,290	1,900-66,000	Pigmentos fotosintéticos, activación enzimática, transporte iónico, estabilidad ribosomal	Clorofilas	Lobban 1985
Aluminio <sup>4</sup>	0.001	57-3,320	Elemento no esencial para el metabolismo	En forma iónica Al <sup>+3</sup>	Maeda Sakaguchi 1990 Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Fósforo <sup>1</sup>	0.068	300-12,000	Estructural, transferencia de energía	ATP, GTP, etc., ácidos nucleicos, fosfolípidos, coenzimas Co-A Fosfoenolpiruvato	Lobban 1985

**Tabla 1.4.- Continuación.**

Azufre <sup>1</sup>	905	4,500-82,000	Estructural, grupos activos en enzimas y coenzimas	Metionina, cistina, glutatión, agar, carragenatos, sulfolípidos, coenzima A	Lobban 1985
Potasio <sup>1</sup>	406	30,000-82,000	Regulación osmótica, control de pH, conformación protéica y estabilidad	Predominantemente en forma iónica K <sup>+</sup>	Lobban 1985
Calcio <sup>1</sup>	412	2,000-360,000	Estructural, activación enzimática y transporte iónico	Alginato cálcico, carbonato cálcico	Lobban 1985
Vanadio <sup>3</sup>	0.002	0.66-10.1	No se conoce	Forma orgánica e inorgánica H <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Maeda y Sakaguchi 1990 Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Manganeso <sup>2</sup>	0.001*	4-240	Transporte electrónico en el Fotosistema II, mantiene la estructura de membrana del cloroplasto	Ninguno descrito	Lobban 1985
Hierro <sup>2</sup>	0.003*	90-1,500	Grupos activos en moléculas de porfirina y enzimas	Ferredoxina, citocromos, nitrito y nitrato reductasa, catalasa	Lobban 1985

\* Concentración muy variable en el agua de mar.

**Tabla 1.4.- Continuación.**

Cobalto <sup>3</sup>	4E-4	0.24-2.51	Componente de la vitamina B <sub>12</sub>	Ciano-cobalamina	Lobban 1985 Yamamoto <i>et al.</i> 1979
Cobre <sup>2</sup>	0.002*	0.6-80	Transporte electrónico en la fotosíntesis, enzimas	Plastocianina, amino-oxidasa	Lobban 1985
Zinc <sup>2</sup>	0.004*	2-680	Enzimas, probablemente en la estructura del ribosoma	Anhidrasa carbónica	Lobban 1985
Arsénico <sup>5</sup>	0.001	1.4-95	Presente en forma orgánica e inorgánica	Arseno-azucars, arsenolipidos, fosfatidil areseno colina	Maeda y Sakaguchi 1990
Selenio <sup>5</sup>	8E-5	-	En fracciones de varios componentes bioquímicos	Aminoácidos, carbohidratos solubles y lípidos	Maeda y Sakaguchi 1990
Molibdeno <sup>2</sup>	0.01	0.06-1.16	Reducción de nitrato, absorción iónica	Nitrato reductasa	Lobban 1985 Yamamoto <i>et al.</i> 1979

\* Concentración muy variable en el agua de mar.

### 1.3.- Cultivo en tanque

El cultivo en tanque es el sistema más comunmente utilizado para la producción de macroalgas en tierra (Ugarte y Santelices 1992). Se suelen utilizar contenedores de diversos materiales y formas siendo los más comunes los tanques rectangulares o de fondo concavo. Las principales variables que afectan la producción en este tipo de sistemas son, además de las variables físico-químicas (radiación solar, temperatura ambiente, nutrientes incluido el dióxido de carbono), las características técnicas como la forma del tanque y el movimiento del agua (Chapman y Chapman 1980).

Con el cultivo en tanque de *Chondrus crispus*, se ha demostrado que uno de los factores técnicos más importantes para el crecimiento algal, es la superficie del tanque y no su volúmen, debido principalmente a la absorción de la luz por la columna de agua (Bidwell *et al.* 1985). Además los sistemas de cultivo en tanque requieren mayor gasto de energía para producir la agitación y facilitar el intercambio de gases, la distribución de nutrientes y el movimiento de las algas dentro del tanque (Guerin y Bird 1987). Con la agitación se pretende conseguir un efecto hidrodinámico que:

- Evite fenómenos de autosombreado, aumentando el tiempo de exposición a la luz, produciendo periodos de luz/oscuridad.
- Elimine la capa limitante de difusión, para favorecer el intercambio de gases y nutrientes.
- Homogenice el medio, eliminando gradientes de pH, temperatura y concentración de nutrientes.
- Genere autoraspado, dificultando la fijación de epifitos tanto sobre el talo del alga como sobre las paredes del tanque.

Comunmente, la agitación se logra utilizando aireadores, que mediante tuberías localizadas en el fondo del tanque, generan una circulación adecuada del agua y permiten la exposición periódica de las plantas a la luz en la superficie.

---

Demostrada la posibilidad de crecer macroalgas flotando libremente en tanques (Bidwell *et al.* 1985), una de las consideraciones prácticas básicas es la de utilizar algas que puedan crecer vegetativamente de pequeños fragmentos (Norton & Mathieson 1983). Al cultivar las algas flotando, además de eliminar el uso de sustratos de fijación, se evita depender de la reproducción sexual y/o asexual para obtener el inóculo, y tanto la siembra como la cosecha son más fáciles y susceptibles de mecanizar.

Las macroalgas se caracterizan por su alta plasticidad, lo que en muchas especies da lugar a cambios morfológicos importantes al mantenerlas en tanques de cultivo (Hanisak *et al.* 1990). La adaptabilidad morfológica, es un factor que influye de manera directa en el sistema de cultivo a utilizar y en la densidad de carga de cada sistema, condicionando tanto la tasa de crecimiento como la producción. Una morfología adecuada permite aumentar las densidades de carga sin disminuir significativamente la tasa de crecimiento, lo que permite una mayor producción por unidad de superficie si se mantienen niveles de radiación y nutrientes adecuados.

El crecimiento que se produce en los sistemas de cultivo en tanque, como respuesta a la hidrodinamicidad y a la irradiación, provocan en algunos casos una pérdida de orientación del talo con respecto a la luz y al sustrato, generando ramificaciones en diversos sentidos hasta formar morfologías esféricas (Buggeln 1981). Este patrón de crecimiento se ve ampliamente favorecido si la planta se mantiene en suspensión siguiendo un movimiento rotacional dentro del tanque.

Los procesos de selección convencional aplicados a especies cultivadas en tanque, han permitido identificar individuos de alto crecimiento, con características fisiológicas y morfológicas particulares, y que puedan soportar gran variedad de condiciones de cultivo, estrés y patógenos. El clon T4 de *Chondrus crispus* (Bidwell *et al.* 1985) y el clon M-11 de *Gigartina exasperata* (Waaland 1977) son los casos más conocidos de selección vegetativa de clones altamente eficaces para cultivo en tanque.

En los sistemas de cultivo intensivos, la elección de la especie a cultivar es sin duda el aspecto biológico más importante, ya que sus características morfológicas y fisiológicas, así como su capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo, determinarán los demás factores de crecimiento y producción.

## **2.- Fisiopatología en cultivo de macroalgas.**

Es ampliamente reconocido que una de las principales limitaciones del cultivo de algas, lo constituyen las enfermedades e infecciones de los cultivos (Fletcher 1989). Una gran variedad de enfermedades infecciosas y no infecciosas han sido descritas en macroalgas marinas (Andrews 1976). En las primeras (transmisibles), un agente biológico es el responsable de la enfermedad, habiéndose descrito agentes causales tales como virus, bacterias, hongos, nemátodos, y algas parásitas, mientras que las segundas (no transmisibles), están causadas por factores abióticos y abarcan todo tipo de desórdenes originados por cambios medio ambientales extremos y agentes contaminantes.

Si consideramos la enfermedad como una alteración de la estructura normal de la planta en detrimento de sus funciones (alterando su crecimiento, apariencia o importancia económica), habrá que incluir a las algas epifitas como agentes causantes de enfermedad ya que: i) disminuyen el crecimiento del huésped, ii) aumentan la probabilidad de ruptura de frondes, y iii) disminuyen su potencial reproductivo (D'Antonio 1985). Además, existen referencias de infecciones endofíticas de efectos destructivos sobre el tejido del huésped que reducen considerablemente su vitalidad (Correa y McLachlan 1991) y en algunos casos provocan la aparición de vesículas o tumoraciones en el huésped de efecto patológico incierto (Apt 1988).

---

## 2.1.- Epifitos.

Actualmente el problema más importante del cultivo intensivo de macroalgas es el crecimiento de algas epifitas, tanto en cultivos en el mar (Kuschel y Buschmann 1991) como, sobre todo, en tanques (Friedlander 1992). Los epifitos más comunes son algas microscópicas unicelulares, principalmente diatomeas (Booth 1981), aunque las especies más problemáticas son algas macroscópicas verdes del género *Ulva* y *Enteromorpha*, las pardas filamentosas del género *Ectocarpus* y *Pilayella* además de algunas algas rojas filamentosas como *Acrochaetium* y *Audouiniella*.

Entre los efectos más importantes que causan estas pestes están:

i) la reducción de la producción (p.e. en *Chondrus crispus* hasta un 50-60%, Bidwell *et al.* 1985), ii) la competencia con las algas en cultivo por la irradiación (al cubrir la superficie del alga y reducir la luz incidente) y nutrientes (al ser formas oportunistas de crecimiento más rápido) y iii) la disminución significativa de la calidad de la biomasa algal (Lapointe y Ryther 1978, Morgan *et al.* 1980).

Aunque para evitar estos problemas se recomiendan algunos métodos de prevención durante los periodos iniciales del cultivo, como inóculos unialgales y filtración del medio, una vez que se establece alguna especie epifita es difícilmente controlable. Existen sin embargo métodos físicos, como remoción manual, lavado con agua a presión y periodos de desecación, para controlar y/o eliminar dichas pestes. Aunque los primeros son poco prácticos y laboriosos (Gibor 1980), los últimos son aplicados con éxito en cultivos en el mar (p.e. *Porphyra*, Tseng y Fei 1987).

La mayoría de los métodos se relacionan de alguna forma con el control de parámetros ambientales (irradiación, temperatura, etc.) y por lo tanto son aplicables a los sistemas de cultivo (Tabla 1.5). Aproximaciones más prácticas en este sentido han sido sugeridas para los sistemas de cultivo intensivo:

- i) agitación vigorosa del agua en tanques por medio de aireación, ya que genera autoraspado y evita el establecimiento de las esporas de epifitos.
- ii) recirculación del medio a través de filtros (Lignell *et al.* 1987)
- iii) utilización de periodos de desecación esporádicos en el cultivo por aspersion que eliminan selectivamente a las especies contaminantes, al ser éstas menos resistentes (Lignell y Pedersén 1986).

Otro método lo constituye el control del enriquecimiento añadido al sistema, evitando así excedentes de nutrientes en el medio que queden disponibles para el crecimiento de otras especies (Harlin *et al.* 1977, Ryther *et al.* 1982) y aprovechando la mayor capacidad de almacenamiento que tienen algunas algas rojas (p.e. *Gracilaria*) sobre las epifitas (Ryther *et al.* 1982, DeBusk *et al.* 1986).

### **2.1.1.- Métodos biológicos de control.**

Una de las alternativas biológicas que han sido sugeridas para controlar el crecimiento de epifitos en sistemas de cultivo, es la utilización de mesoherbívoros marinos, fundamentalmente anfípodos e isópodos (Nicotri 1977). Los efectos de estos mesoherbívoros sobre las comunidades algales, así como sus preferencias alimenticias, han sido ampliamente estudiadas (Carefoot 1977, Buschmann 1990, Viejo y Arrontes 1992).

El control de epifitos en sistemas de cultivo utilizando anfípodos e isópodos, que se alimentan preferentemente de algas epifitas verdes, ha sido experimentado con éxito tanto en sistemas de cultivo en el mar (Brawley y Fei 1987), como en cultivos intensivos (Shacklock 1992). Sin embargo, se han descrito efectos negativos durante el cultivo de *Gracilaria foliifera* y *Neogardhiella baileyi* por el crecimiento incontrolado de *Idotea baltica* y

**Tabla 1.5.- Métodos de control del epifitismo empleados durante el cultivo de especies de interés comercial.**

<b>Método de control</b>	<b>Epifitos</b>	<b>Especie cultivada</b>	<b>Referencia</b>
Control de factores combinados (°C, I, pH)	<i>Acrochaetium</i> <i>Ectocarpus</i> , <i>Enteromorpha</i>	<i>Palmaria palmata</i>	Morgan <i>et al.</i> 1980
Control densidad y fertilización	<i>Ulva</i> , <i>Ectocarpus</i> <i>Enteromorpha</i>	<i>Chondrus crispus</i>	Bidwell <i>et al.</i> 1985
Periodos de desecación en cultivo spray	<i>Ulva</i> , <i>Enteromorpha</i> <i>Pilayella</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Lignell & Pedersén 1986
Control de factores combinados (°C, I, pH) y calidad de luz	<i>Ulva lactuca</i> <i>Cladophora pellucida</i> <i>Ectocarpus confervoides</i> <i>Enteromorpha compressa</i>	<i>Gracilaria conferta</i>	Friedlander 1992
Mesoherbívoros anfípodos	<i>Enteromorpha linza</i>	<i>Gracilaria asiatica</i> <i>Gracilaria lemaneiformis</i>	Brawley & Fei 1987
Mesoherbívoros isópodos	<i>Ectocarpus</i> , <i>Enteromorpha</i>	<i>Chondrus crispus</i>	Shacklock 1992
Tratamiento con cloro	<i>Enteromorpha</i> , <i>Ulva</i> <i>Ectocarpus</i>	<i>Gracilaria chilensis</i>	Ugarte & Santelices 1992
Tratamiento con cobre	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	Haglund 1992

*Amphitoe valida* (Nicotri 1977), así como cambios en las preferencias alimenticias de *Idotea baltica* en cultivos de *Chondrus*, provocando la disminución de la producción (Shacklock 1992).

### 2.1.2.- Métodos químicos de control.

Menos atención han recibido los tratamientos contra epifitos algales utilizando herbicidas específicos (Lloyd *et al.* 1981). Los herbicidas comerciales que se han experimentado en laboratorio contra el crecimiento de algunas especies de algas son:

- Amitrole 3AT (3-Amino-1,2,4-Triazole) en *Nemalion* (Boney 1963) y en *Enteromorpha intestinalis* (Moss y Woodhead 1976).
- Gramoxone (20% paraquat) en *E. intestinalis* (Moss y Woodhead 1976).
- Atrazine, Dalapon, MCPA, y 2,4-D en *Laminaria hyperborea* (Hopkin y Kain 1978).

El uso de herbicidas para el control de epifitos en cultivos intensivos de *Chondrus crispus* ha sido mencionado por Bidwell *et al.* (1985).

El uso de soluciones de cloro comercial como pretratamiento del agua de cultivo o como tratamiento directo sobre las plantas infectadas con epifitos ha sido descrito por Ugarte y Santelices (1992).

La utilización de compuestos a base de cobre como algicidas para el control de la vegetación de agua dulce es bien conocida (Hillebrand y De Vries 1986), además del uso de pinturas "anti-fouling", con óxido cuproso como sustancia activa, para prevenir el crecimiento de especies como *Enteromorpha* y *Ectocarpus* en los cascos de barcos (Evans 1990). Compuestos de cobre, añadidos en forma directa como  $\text{CuCl}_2$  ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) o de forma indirecta en rocas pintadas con pintura "anti-fouling", han sido utilizados satisfactoriamente para reducir el crecimiento de

---

*Enteromorpha intestinalis* en tanques de cultivo de *Gracilaria tenuistipitata* (Haglund 1992).

## 2.2.- Virus.

Existen evidencias de la existencia de virus en macroalgas marinas (*Chorda tomentosa*, Toth y Wilce 1972; *Gracilaria epihippisor*, Apt y Gibor 1991; *Ectocarpus*, Van Etten *et al.* 1991). Sin embargo, la caracterización de estas partículas virales y su aislamiento sólo ha sido realizado en algas del orden Ectocarpales (Müller *et al.* 1990). El mecanismo de infección de estos virus se realiza a través de las zoosporas y gametos, que durante su desarrollo transmiten el genoma viral vía mitosis a cada célula del huésped; sin embargo, los síntomas de la infección no aparecen hasta que los filamentos adultos se tornan fértiles.

Durante la reproducción de las plantas infectadas, el genoma viral se expresa al formar estructuras reproductivas similares a esporangios pluri- y uni-loculares, pero que en lugar de producir esporas producen partículas virales y cuya deformación estructural resulta evidente (Müller 1991).

Experimentalmente se ha comprobado su carácter infeccioso en *Ectocarpus siliculosus*, *Feldmannia simplex* y *Feldmannia irregularis* (Müller & Frenzer 1993), además de su especificidad sobre la especie que infectan (Müller y Stache 1992). Aunque la reducción de tasas metabólicas, incluida la fotosíntesis, durante infecciones virales en plantas superiores está bien documentada (Matthews 1991) y existen algunos reportes sobre su efecto en cianobacterias (Misra *et al.* 1982), los efectos de las infecciones virales sobre el metabolismo de macroalgas no han sido descritos, a pesar de que algunas partículas virales han sido asociadas con desarreglos celulares (Toth y Wilce 1972) y con la formación de tumores (Apt y Gibor 1991).

### **3.- Objetivos del trabajo.**

Los objetivos del presente trabajo, se centran en el estudio de los problemas asociados al cultivo intensivo de macroalgas marinas particularmente en los siguientes aspectos:

- 3.1.-** Evaluar la adaptación fisiológica y morfológica, y la producción de macroalgas de diferente morfología y hábitat al sistema de cultivo por aspersión.
- 3.2.-** Determinar la influencia del sistema de cultivo por aspersión sobre el contenido en metales de *Grateloupia doryphora* en comparación con el contenido de poblaciones naturales y de plantas cultivadas en tanque.
- 3.3.-** Estudiar los procesos que generan plasticidad morfológica en el sistema de cultivo en tanque.
- 3.4.-** Evaluar la eficacia comparativa y selectiva de tratamientos químicos y biológicos sobre el control de epifitos.
- 3.5.-** Determinar la idoneidad de la técnica de fluorescencia como indicador del estrés fisiológico en macroalgas.
- 3.6.-** Determinar el efecto fisiopatológico de infecciones víricas en macroalgas marinas.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS.**



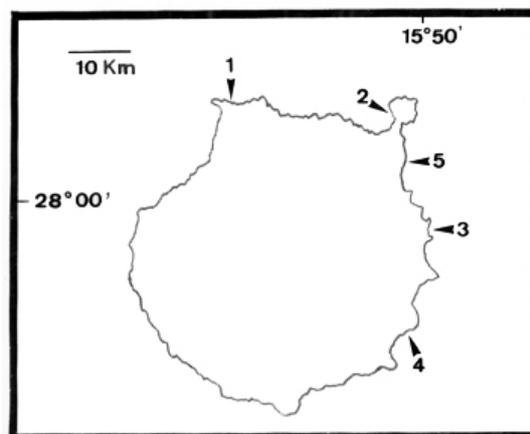
## 1.- Cultivo por Aspersión

Se cultivaron macroalgas de la División Clorofita y Rodofita de diferente morfología y hábitat en un sistema por aspersión para evaluar su adaptación fisiológica, morfológica y su producción en un sistema de cultivo por aspersión.

### 1.1.- Recolección y preparación del material.

Las especies locales se recolectaron de poblaciones naturales en distintas zonas del litoral de Gran Canaria (Fig. 2.1), seleccionando plantas de buen porte, bajo epifitismo y pigmentación adecuada.

Las recolección de especies intermareales se realizó durante la bajamar, o mediante buceo libre en el caso de especies submareales, durante las primeras horas de la mañana lo que aseguraba la implantación de los cultivos el mismo día de la recolección. Las algas se transportaron en neveras portátiles hasta el laboratorio donde se procedió a su limpieza mediante cepillado para eliminar epibiontes y otros materiales adheridos.



*Fig. 2.1.- Zonas de recolección. 1.- Bocabarranco, La Furnia; 2.- La Puntilla; 3.- Muelle de Taliarte; 4.- Muelle de Arinaga; 5.- San Cristóbal.*

## 1.2.- Descripción de especies.

Se seleccionaron las especies en base a su importancia comercial, ya sea por su contenido en ficocoloides (agar o carragenato), o por su posible utilización como alimento humano. En algunos ensayos se emplearon especies foráneas suministradas por otros laboratorios. Las especies empleadas se muestran en la Figura 2.2.

*Solieria filiformis* (Kützting) Gabrielson. Orden Gigartinales; Familia Soleriaceae. Especie que habita fondos arenosos de aguas someras, recogida del fondo del muelle de Taliarte. Especie productora de  $\iota$ -carragenato y utilizada en el Caribe como alimento humano.

*Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe. Orden Cryptonemiales; Familia Cryptonemiaceae. Fue recogida de una población intermareal rocosa en la zona de San Cristóbal. Productora de  $\lambda$  carragenato y usada como remedio antihelmítico en Oriente.

*Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane-Camba. Orden Gelidiales; Familia Gelidiaceae. Recolectada en la zona intermareal rocosa de la costa Norte de Gran Canaria, en zonas preferentemente expuestas, (Bocabarranco). Productora de agar de calidad bacteriológico.

*Gelidium arbuscula* Bory. De hábitat similar al de *G. canariensis*, pero no necesariamente en zonas expuestas, de talo más aplanado y color más rojizo que la anterior. Productora de agar de calidad bacteriológico.

*Pterocladia capillacea* (Gmelin) Bornet et Thuret. Recolectada en zonas intermareales de la costa de Agaete, sobre sustrato rocoso o dentro de pozas de marea del nivel litoral medio. Productora de agar.

*Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. Familia Hypneaceae. Recogida en el Puerto de Arinaga, donde habita zonas rocosas, enrollada a otras algas o de forma libre sobre fondos arenosos. Productora de  $\kappa$  carragenato y utilizada popularmente como vermífugo.

---

*Gracilaria ferox* (J. Agardh) sinonimia *G. cervicornis* (Turn.) J. Agardh. Orden Gracilariales; Familia Gracilariaceae. Recolectada de zonas rocosas intermareales o fondos arenosos submareales en la costa norte y sur de Gran Canaria, recogida en La Isleta. Contiene agar como polisacárido estructural.

*Gracilaria cornea* J. Agardh. Especie tropical originaria de Jamaica, muy apreciada por su uso en la preparación de bebidas y postres, y por su contenido en agar. Facilitada por el Dr. I. Levy.

*Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss. Especie cosmopolita que crece vegetativamente en fondos arenosos, utilizada alternativamente para la extracción de agar y alimentación humana. Originaria de Namibia y facilitada por Dr. A. Critchley.

*Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. Orden Ceramiales; Familia Rhodomelaceae. Alga cespitosa que habita la zona intermareal rocosa del norte de Gran Canaria, recogida en La Furnia. Interesante por poseer metabolitos con actividad antimicrobiana.

*Furcellaria lumbricalis* (Hudson) Lamouroux. Orden Gigartinales; Familia Furcellariaceae. Alga productora de agar danés (furcelarán), originaria de la costa Oeste de Suecia. Facilitada por la Prof. M. Pedersén.

*Codium taylori* Silva. Orden Caulerpales; Familia Codiaceae. Plantas recogidas del intermareal inferior en el Puerto de Arinaga, sobre sustratos rocosos y/o arenosos. Estas plantas son utilizadas en Oriente como alimento.

### 1.3.- Tratamiento del agua de mar

Se utilizó agua de mar natural prefiltrada por un filtro de arena de diatomita con retención de partículas de hasta 1 mm, filtrada a través de cartuchos de poliéster de 50, 30 y 5  $\mu\text{m}$  (Cole-Parmer), y esterilizada a su paso por un sistema de luz ultravioleta (Hanovia, 0.8 kW).

La fertilización se realizó añadiendo nitrógeno y fósforo, en proporción 10:1, respetando la concentración de nitrógeno de la formulación Provasoli (1968), utilizando diversas sales de nitrógeno y fósforo (Tabla 2.1). El medio fue renovado periódicamente en el sistema de cultivo a razón de una vez por semana. El nitrógeno se añadió tras la renovación semanal de agua, en función de la tasa específica de crecimiento, asumiendo que un 2% del peso seco del tejido está en forma de nitrógeno (Hanisak 1987), y añadiendo el 2% de la diferencia de peso entre  $N_t$  y  $N_0$  en forma de nitrógeno. La salinidad se ajustó cada tercer día (dependiendo de la evaporación) añadiendo agua dulce, y nunca supero 42‰.

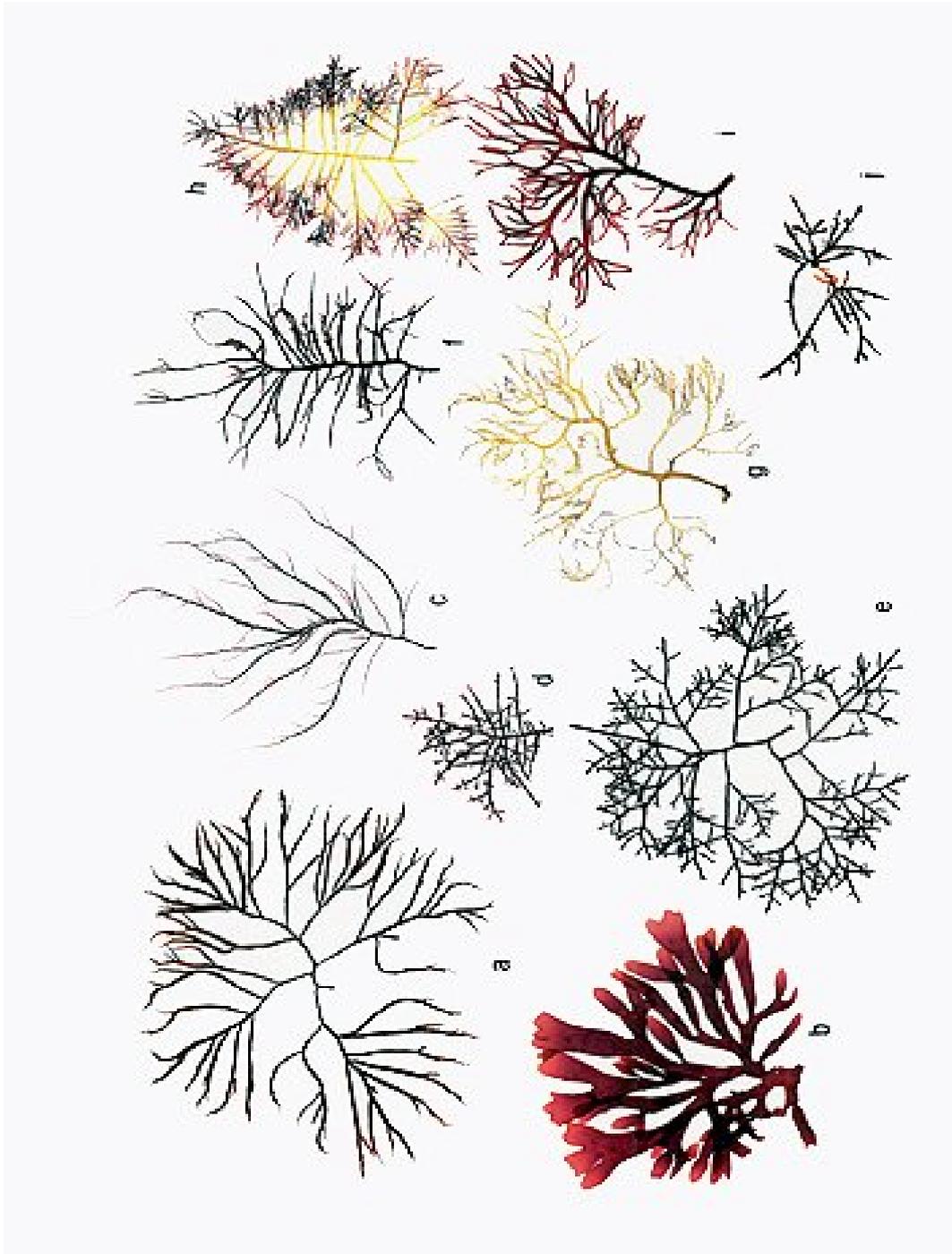
**Tabla 2.1.- Sales utilizadas como fuentes de nitrógeno y fósforo a la concentración descrita en la formulación Provasoli.**

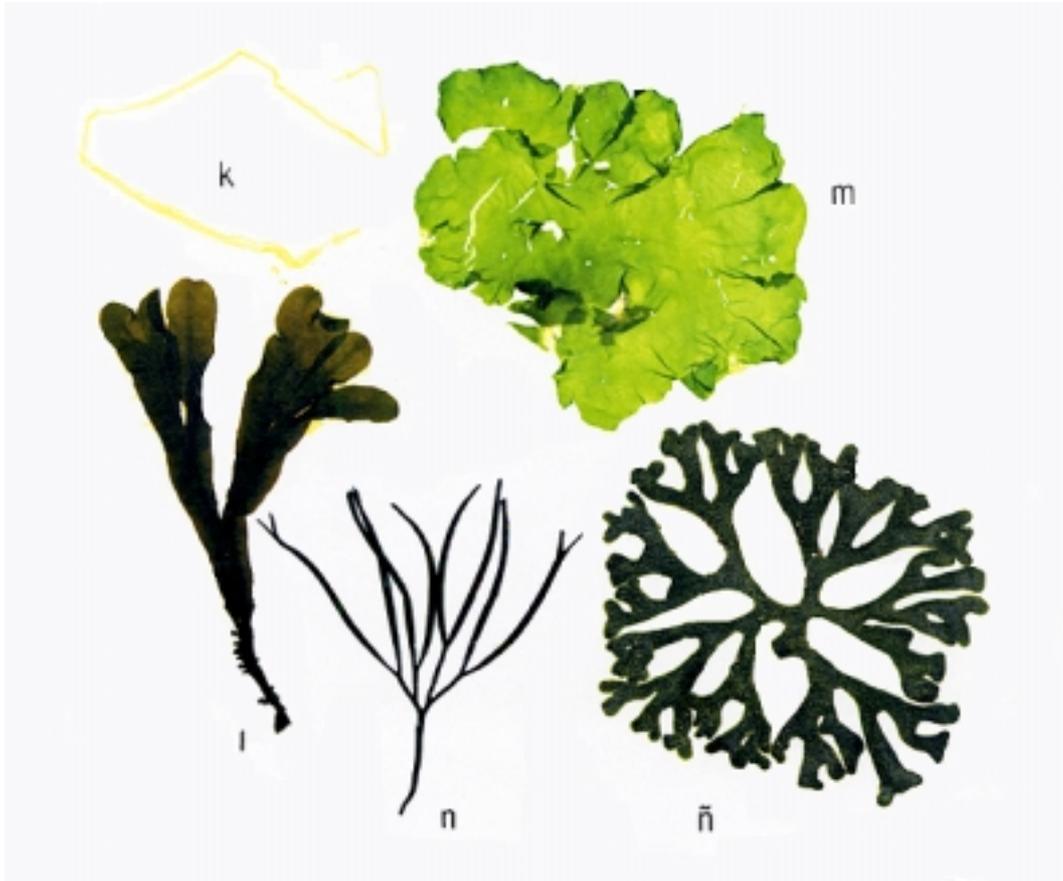
Compuesto	Peso molecular	Concentración $\mu\text{M}$	Peso mg/l
$\text{NO}_3\text{K}$	101.10	824	83
$\text{NH}_4\text{Cl}$	53.50		45
$\text{NO}_3\text{NH}_4$	80.04		32
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358.14	82	29
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	156.01		13
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136.09		11
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	174.18		14

*Fig. 2.3.- Especies estudiadas: a. Solieria filiformis, b. Grateloupia doryphora, c. Gracilaria verrucosa, d. Gelidium arbuscula, e. Gelidium canariensis, f. Gracilaria ferox, g. Hypnea musciformis, h. Pterocladia capillacea, i. Gracilaria cornea, j. Laurencia obtusa, k. Enteromorpha sp., l. Fucus spiralis, m. Ulva rigida, n. Furcellaria lumbricalis, ñ. Codium taylori.*

*Siguiente página →*

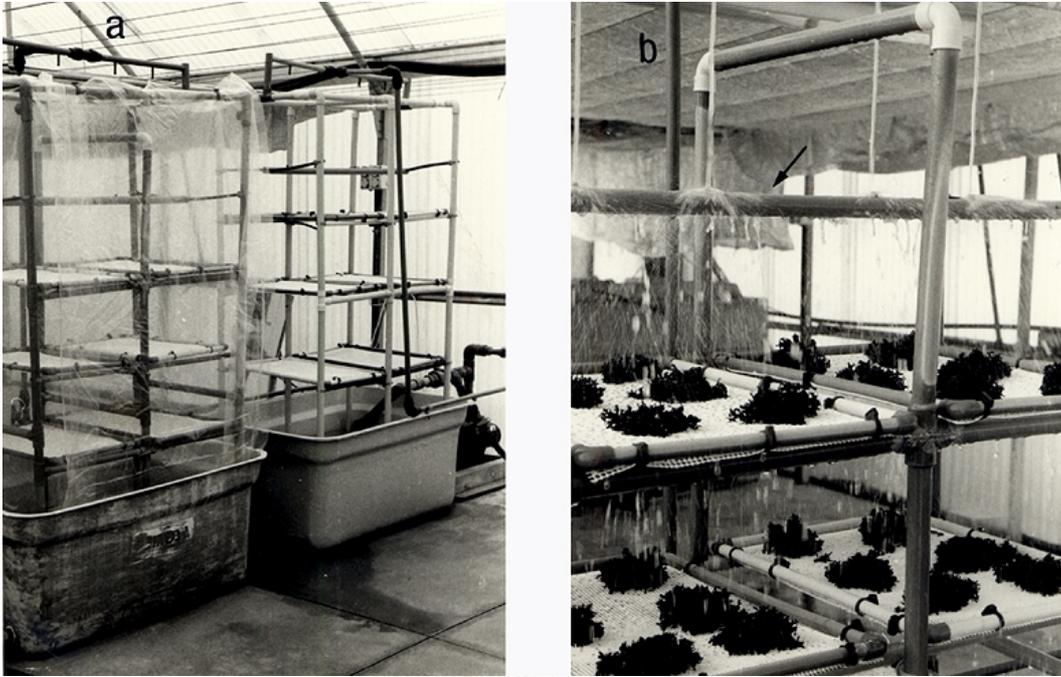






#### 1.4.- Condiciones de cultivo.

El sistema de cultivo por aspersión consistió en una estructura de PVC de 1.90 m de altura, 1.05 m de largo y 0.65 m de ancho, en la que se acoplaron dos series de tres bandejas de malla plástica (70 x 41 cm) colocadas a tres niveles (superior, medio, inferior). Esta estructura se instaló sobre un tanque de fibra de 500 l de capacidad del que, mediante una bomba (SACI, 0.6 CV), se recirculaba el agua hasta el sistema de aspersión ubicado en la parte superior de la estructura de cultivo (Fig. 2.3). El sistema de riego generó una lluvia homogénea de agua de mar a través de las bandejas hasta el tanque de reserva.



*Fig. 2.3.- Sistema de cultivo por aspersión. (a) Vista general del sistema, (b) Unidad de cultivo en funcionamiento, mostrando detalle del sistema de riego (modificado de Haglund y Pedersén 1988).*

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones ambientales de luz y temperatura dentro del invernadero durante periodos de 45 días. Se mantuvo una densidad de cultivo de  $1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-2}$ , recibiendo un flujo de agua continuo entre  $26\text{-}33 \text{ l}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Los tres niveles de la unidad recibieron distintos porcentajes de radiación solar: el nivel superior recibió el 85% de la luz incidente en el invernadero, el nivel medio el 57% y el nivel inferior un 40%.



### 1.5.- Medición de parámetros físicos.

Los parámetros de cultivo radiación solar, temperatura, salinidad y pH se determinaron diariamente. La radiación fue medida con un radiómetro portátil (Licor-Datalogger 1000A) utilizando sensores plano y esférico, para determinar la radiación directa e indirecta. La temperatura se midió con un termómetro convencional de laboratorio graduado de 0-50°C, el pH con un electródo Corning (Mod. 240) y la salinidad con un refractómetro manual (Atago) compensado para temperatura (15-40°C).

### 1.6.- Indices de crecimiento y producción.

El peso húmedo se determinó cada 15 días, después de remover el exceso de agua con una centrifuga doméstica (Miele WZ268 2,800 rpm) durante 20 segundos. El peso seco, fue obtenido después de secar las algas a 60°C durante 24 horas en estufa. Las medidas se realizaron en una balanza analítica Cobos (Mod. C300S ± 0.01g).

La tasa específica de crecimiento se determinó aplicando la fórmula N 1, expresada como el incremento porcentual diario de biomasa (Lignell *et al.* 1987):

$$\mu = [(N_t/N_0)^{1/t} - 1] \cdot 100\% \quad (1)$$

en donde  $\mu$  = tasa específica de crecimiento

$N_t$  = Biomasa alcanzada en t días

$N_0$  = Biomasa inicial

t = días de cultivo entre medición

La producción por unidad de superficie y por unidad de tiempo se obtuvo utilizando la fórmula N 2 (DeBoer y Ryther 1977):

---

$$P = \frac{[(N_t - N_0) / t] \cdot [PS/PF]}{A} \quad (2)$$

en donde P = Tasa de producción expresada en gramos

$N_t$  = Biomasa total después de t días

$N_0$  = Biomasa total inicial

PS/PF = peso seco / peso fresco

A = Area de la superficie de cultivo en  $m^2$

Los factores de conversión de peso seco a peso fresco equivalen entre el 80-90% del peso original, se utilizó un valor promedio del 0.1.

## 2.- Contenido en metales.

Se determinó la influencia del sistema de cultivo por aspersión sobre el contenido en metales de *Grateloupia doryphora*, en comparación con el contenido de poblaciones naturales y de cultivos en tanque. La recolecta del material de poblaciones naturales se realizó en San Cristóbal durante tres épocas del año: otoño (correspondiente al periodo de cultivo del 8 octubre al 24 noviembre 1990), invierno (15 diciembre al 28 enero 1991), y primavera (2 abril al 17 mayo 1991). El tratamiento del agua de mar, tasas de renovación, tipo de fertilización, medición y ajuste de parámetros físicos fueron los mismos a los descritos anteriormente.

### 2.1.- Cultivo por aspersión.

Se utilizó el sistema por aspersión descrito anteriormente, cultivando la especie *Grateloupia doryphora* a una densidad de  $1 \text{ Kg}\cdot\text{m}^{-2}$ , y un flujo de agua continuo de aproximadamente  $40 \text{ l}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ .

---

### 2.2.-Cultivo en tanque.

El cultivo se realizó en tres tanques de 300 l, rectangulares (1,170 cm x 730 cm x 490 cm) de poliéster estratificado con fibra de vidrio, recubiertos con una capa de pintura epóxica. La densidad de la especie *Grateloupia doryphora* se ajustó semanalmente a 2 g·l<sup>-1</sup>. Las algas se mantuvieron en rotación permanente por la inyección de aire a través de una tubería situada en el fondo del tanque.

### 2.3.- Análisis de metales.

Se analizaron 26 metales en muestras de los sistemas de cultivo (aspersión y tanque) y de las poblaciones naturales. Se tomaron muestras de aproximadamente 5 g de peso fresco, se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas, almacenándolas en una campana de desecación hasta su análisis.

Las análisis se realizaron en los laboratorios Lennart Mansson International, Suecia, utilizando la técnica de Espectroscopía de emisión plasma-atómica sobre muestras digeridas con ácido nítrico. La correlación entre la concentración de los metales analizados en las distintas muestras, se efectuó utilizando el programa estadístico NTSYS (Rohlf 1990).

Se realizaron microanálisis de rayos-X sobre muestras del material cultivado con un microscopio electrónico JEOL 1200 EX, equipado con un espectrómetro de energía dispersiva Kevex en combinación con un sistema scanner. Secciones de 100 nm sin el tratamiento de postfijación ni tinción, fueron montadas en rejillas de nylon cubiertas con una capa de carbono y analizadas con el modo STEM a 80 Kv. El análisis se realizó por el método del punto estacionario en la pared celular del material analizado.

### **3.- Adaptación morfológica.**

Los estudios de adaptación morfológica al cultivo se efectuaron con la especie *Solieria filiformis* (Gigartinales), mediante cultivos en laboratorio y en tanques bajo invernadero.

#### **3.1.- Cultivo en invernadero**

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones ambientales de luz y temperatura dentro del invernadero durante un periodo de tres meses. Se cultivaron plantas de *Solieria filiformis* en tres tanques rectangulares de 600 l, de fibra de vidrio (1,330 x 870 x 580 cm) a una densidad entre 2-2.5 g·l<sup>-1</sup>. Cada tanque se mantuvo con distintos tipos de turbulencia; el primer tanque se mantuvo sin agitación alguna, únicamente con una recirculación muy suave del agua mediante un filtro de acuario (Eheim 7.3 l·min<sup>-1</sup>). Los dos tanques restantes se mantuvieron con turbulencia provocada, en uno por la inyección de aire (mediante un compresor hidrorrotativo Elmo G, 2,860 rpm) y el otro por inyección de agua recirculada con un flujo de 45 l·min<sup>-1</sup> (2,600 rpm). Ambos sistemas turbulentos se generaron por la salida de agua o aire a través de una tubería de PVC ( 1/2 pulgada  $\varnothing$ ), centrada en el fondo del tanque, con agujeros de 1 mm de diámetro a intervalos de 10 cm.

Los sistemas turbulentos mantuvieron el material vegetal en flotación constante, girando a lo ancho del tanque en dos células rotativas a 3 rpm. Durante el cultivo se tomaron plantas a distintos intervalos (7, 15, 30, 45 días), en base a su desorganización para su posterior inclusión y estudio histológico. Al término del cultivo (3 meses) se analizaron treinta plantas de cada tratamiento, determinando bajo lupa el grado de desorganización producido por los distintos sistemas. Los resultados se presentaron como porcentaje de ápices desorganizados del total de ápices de cada planta. También se determinó el porcentaje de regeneración de ápices rotos accidentalmente.

---

### 3.2.- Cultivo *in vitro* de ápices.

Para determinar la persistencia del crecimiento desorganizado y el posible efecto del medio de cultivo agarizado sobre la desorganización celular, se cultivaron fragmentos apicales (< 1 cm) de dos tipos: fragmentos apicales normales en apariencia, obtenidos de plantas recogidas del medio natural (200 ápices normales), y fragmentos apicales desorganizados tras una semana de cultivo en tanque (200 ápices desorganizados). Los cultivos se realizaron en placas Petri con medio agarizado (0.8% agar) preparado con agua de mar normal y con agua de mar enriquecida. El agua de mar fue filtrada, mediante prefiltros de celulosa y filtros de membrana de 0.2 µm, y enriquecida según la Tabla 2.2, sustituyendo de la formulación Provasoli (1968) el glicerolfosfato por sales sódicas de fosfato a igual concentración y sin la adición de vitaminas. Los fragmentos apicales, normales y desorganizados, fueron sometidos al siguiente tratamiento desinfección, bajo condiciones asépticas dentro de una cabina de flujo laminar Telstar Micro-H:

- 1.- Eliminación de contaminantes superficiales (diatomeas, esporas) por baño de ultrasonido (Penta, 150 W) en agua de mar estéril por un minuto cambiando el medio cada 15 segundos.
- 2.- Tratamiento bacteriostático con Cloramfenicol C 20 ppm, Telurito potásico  $K_2TeO_3$  10 mg·l por 30' y un enjuague con Betadine 1:100 v/v.
- 3.- Tratamiento antibiótico con Cefotaxime CTX 100 µg·ml (bactericida Gram + -) y dióxido de Germanio  $GeO_2$  5 mg·l durante siete días en cultivo con agua enriquecida.
- 4.- Recultivo a medio Provasoli en placas Petri, previa incubación en agua de mar estéril en baño de ultrasonido durante 20 s.

---

**Tabla 2.2.- Composición del medio de agua de mar enriquecida siguiendo la formulación Provasoli (1968). Se añade 1 ml de la solución de micronutrientes y 0.5 ml de la solución EDTA-Fe por cada litro de agua de mar filtrada.**

---

**Solución de macronutrientes**

NO <sub>3</sub> Na	70 mg/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 mg/l

**Solución de micronutrientes**

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50.34 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1.14 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	123 mg
ZnCl <sub>2</sub>	10.5 mg
CoCl <sub>2</sub>	4 mg
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	1 g
Agua destilada	200 ml

**Solución EDTA-Fe**

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	245 mg
Na <sub>2</sub> -EDTA·2H <sub>2</sub> O	330 mg
Agua destilada	50 ml

**Tris buffer** (Sigma Co.) 100 mg/l

---

Los fragmentos apicales se cultivaron en un ambiente controlados de cultivo (20-23 °C, fotoperíodo 12:12, irradiación  $\approx 75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  por fluorescentes luz día de 36 W Mazdafluor), en placas Petri.

Se inocularon 20 explantos por placa y en total cinco placas para cada tratamiento manteniéndose en cultivo durante un mes y recultivando los explantos a medio fresco cada semana.

---

### 3.3.- Estudio histológico.

El estudio histológico de la desorganización apical de *Solieria filiformis*, se efectuó fijando muestras de  $\approx 3.5$  mm de tamaño en glutaraldehído al 2.5% en tampón de cacodilato sódico (pH 7.4) con 1% cafeína y 0.25 M de sacarosa. Se lavaron con tampón cacodilato sódico y se post-fijaron durante 2 horas a 4°C con una solución al 2% de OsO<sub>4</sub> en tampón de paladio 0.1 M. La deshidratación del material se realizó secuencialmente en una serie alcohólica del 40, 70, 96 y 100% de etanol, con baños de 10 minutos hasta la inclusión en resina Epon TAAB 812 o Araldita, mantenidas en la estufa durante 24 horas a 40°C y otras 24 horas a 60°C para su polimerización.

Los cortes semifinos (1  $\mu$ m) se efectuaron con un microtomo Jung con cuchilla de vidrio y se tiñeron con azul de toulidina al 1% en borax (solución acuosa al 1%). Para obtener secciones ultrafinas para microscopía electrónica, se realizaron cortes (400-500 Å) en un microtomo U3 Reichert con cuchilla de diamante, contrastándose con acetato de uranilo y citrato de plomo después de ser montadas en rejillas portamuestras de nylon.

### 4.- Tratamiento anti-epifitos.

La eficacia comparativa y selectiva de tratamientos químicos y biológicos sobre los epifitos de diversas especies de algas rojas (ver Fig. 2.2), se estudió con diversos tratamientos de hipoclorito sódico, sulfato de cobre y mediante cocultivo con el anfípodo *Hyale schmidtii*.

#### 4.1.- Descripción de especies.

*Ulva rigida* C. Agardh. Orden Ulvales; Familia Ulvaceae. Plantas recogidas originalmente del muelle de Taliarte, fijadas a cuerdas, o como epifitas aparecidas durante cultivo en invernadero. Independientemente de su utilización, constituye uno de los principales problemas en los cultivos intensivos.

---

*Enteromorpha sp.* Orden Ulvales; Familia Ulvaceae. Especie epífita, recogida de pozas intermareales en la punta de Taliarte. El género agrupa las especies en forma de tubo, con o sin ramificaciones, redondeada o comprimida. Planta efímera que aparece con frecuencia en sistemas de cultivo intensivo.

*Fucus spiralis* Linnaeus. Orden Fucales; Familia Fucaceae. Especie recogida en el intermareal de Taliarte, se sitúa por encima del cinturón de *Cystoseira* sobre sustratos rocosos. Se utiliza en algunos países como corrector de suelos y fertilizante.

#### **4.2.- Tratamiento con mesoherbívoros.**

Se evaluó la tasa de consumo selectiva del anfípodo *Hyale schmidtii* sobre *Gracilaria ferox*, *Solieria filiformis* y sobre sus epífitos más comunes, *Ulva rigida* y *Enteromorpha sp.*

Se seleccionaron 12 fragmentos de cada especie con pesos similares ( $\approx 100$  mg ). Un total de cuatro fragmentos, uno de cada especie, fueron incubados en un frasco de cristal transparente conteniendo 350 ml de agua de mar filtrada. Seis frascos de cultivo fueron inoculados con tres anfípodos por frasco, y otros tres sin anfípodos (control). Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, durante una semana, en una cámara de cultivo ( $20^{\circ}\text{C} \pm 1$ , irradiación  $< 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para evitar excesivo crecimiento algal).

Al final del tratamiento se determinó el porcentaje de aumento o disminución de peso mediante la fórmula (3):

$$\%P = [(t_7 - t_0)/t_0] \times 100 \quad (3)$$

en donde:

$t_0$  = peso inicial

$t_7$  = peso final.

La tasa de consumo se calculó de la diferencia de peso entre  $t_7-t_0$ , corregida con los cambios de peso en los controles, y divididas entre el periodo de tratamiento. Se compararon las tasas de consumo mediante un análisis de varianza.

Los anfipodos de la especie *Hyale schmidtii* Heller. (Amphipoda, Talitridae), se recolectaron de macroalgas de charcas intermareales (Fig. 2.3). El mismo día de la recolección se seleccionaron por tamaño (entre 0.9-1.1 cm de largo), y se mantuvieron en ayuno durante 24 h.

Se analizó el efecto del anfípodo sobre varios fragmentos (de aproximadamente 250 mg) de *Solieria filiformis*, altamente epifitados. Cada fragmento se cultivó independientemente con tres anfípodos, en las condiciones anteriormente citadas, registrando fotográficamente el efecto sobre la planta al tercer y séptimo día.

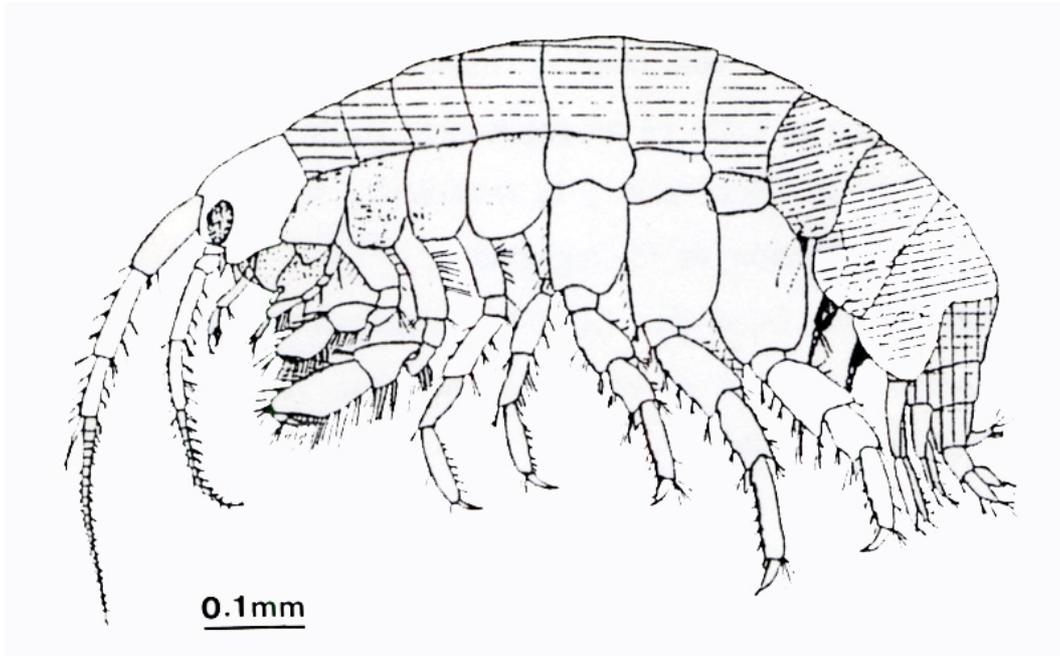


Fig. 2.3.- Anfípodo del género *Hyale*.

### **4.3.- Tratamiento con hipoclorito de sodio.**

Doce plantas de *Grateloupia doryphora* originalmente cultivadas en tanques y con un alto grado de epifitismo (hasta un 40% de la biomasa formada por *Ulva rigida*) fueron tratadas con NaClO (lejía comercial diluída, solución de 50 gramos de cloro activo por litro). El tratamiento se realizó a tres concentraciones de NaClO de 0.5, 1.0, y 3.0%, durante tres tiempos de incubación, 15, 30, y 60 segundos. En todos los tratamientos, un total de tres réplicas se utilizaron junto con tres controles sin tratamiento alguno. Se determinó visualmente el efecto del tratamiento sobre *G. doryphora* y su epifito *U. rigida*.

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la viabilidad de *G. doryphora* se midió la tasa de evolución y consumo de oxígeno, una hora después de cada tratamiento, en fragmentos de 20 mg libres de epifitos. Las mediciones se realizaron con un electrodo de oxígeno (Hansatech), a una temperatura de 20°C durante un periodo de tres minutos para cada irradiación (0 a 800  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), utilizando como fuente luminosa un proyector de diapositivas con lámpara halógena (Selecta, Alemania). La evolución de oxígeno se tomó en un registrador (Cole-Parmer) conectado al electrodo. La tasa de fotosíntesis y la respiración se calculó en base a la pendiente de la producción de O<sub>2</sub> registrada.

La significancia estadística entre la fotosíntesis máxima y respiración, se analizó mediante un test de análisis de varianza ANOVA utilizando un programa estadístico Epistat.

### **4.4.- Tratamiento con sulfato de cobre.**

Se estudió el efecto tóxico de diversas concentraciones de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O en el medio de cultivo de *U. rigida*, *F. spiralis*, *G. doryphora* y *G. cornea*, analizando el contenido en pigmentos, fotosíntesis y fluorescencia al cabo de una semana. Su efecto se analizó mediante una correlación de Pearson.

---

#### 4.4.1.- Cultivo.

Las algas se mantuvieron durante dos semanas en cultivos stock, en agua de mar filtrada y enriquecida (ver Tabla 2.2), en una cámara de cultivo (20 °C, 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y fotoperiodo 12:12).

Treinta fragmentos circulares de 1.2 cm de diámetro de *U. rigida* y *G. doryphora*, o porciones apicales de 1 cm de largo de *G. cornea* y *F. spiralis*, se inocularon en matraces Ehrlenmeyer con 100 ml de agua de mar filtrada (enriquecida con 0.8 mM  $\text{NaNO}_3$  y tamponada a pH 8.2 con 50 mM Tris-HCl) suplementada con sulfato de cobre a las siguientes concentraciones de cobre: 0, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0  $\mu\text{M}$ . La tasa de crecimiento, fotosíntesis y fluorescencia se determinó al cabo de una semana de cultivo bajo las mismas condiciones de los cultivos stock.

La medición del efecto a corto plazo del tratamiento de cobre (2.5, 5.0, 10.0  $\mu\text{M}$ ) sobre *U. rigida*, se efectuó midiendo la fluorescencia de los fragmentos cada hora durante las primeras seis horas tras el tratamiento.

#### 4.4.2.- Medición de fotosíntesis.

La tasa de evolución de oxígeno se determinó incubando las muestras (entre 5-10 mg) en una cámara DW2/2 de fase acuosa (volumen de 3 ml), diseñada para la medición de fluorescencia (Hansatech), conectada a un electrodo de oxígeno tipo Clark, termostatizada a 20°C mediante la recirculación de agua desde un termoregulador conectado a la cámara de medición (Gantt Instruments Ltd). El medio fue renovado con 2.5 ml agua de mar enriquecida cada vez que se introducía una nueva muestra. Después de 5 min de adaptación en oscuridad, las muestras fueron expuestas durante 1.5 min. a una serie ascendente de 12 irradiaciones (0 a  $\approx 800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) generadas por dos fotodiodos emisores de luz roja (LH-7 660 nm, Hansatech) insertados a cada lado de la cámara de medición, determinando la tasa de evolución durante los últimos 50 segundos.

El control de la irradiación, así como la toma de datos de evolución de oxígeno, fue realizada a través del programa Leaf-Disc (Hansatech), diseñado para confeccionar las curvas fotosíntesis *versus* irradiación directamente de los datos de evolución de oxígeno.

### **4.4.3.- Medición de fluorescencia.**

#### **4.4.3.1.- Fluorescencia continua.**

Se incubaron las muestras en una cámara de medición DW2/2 (Hansatech), completamente aislada de la luz exterior, con un volumen total de 3 ml. La señal de fluorescencia se midió con un fotodetector FDP/2, protegido con un filtro Wratten 88A ( $\lambda > 730\text{nm}$ ), conectado a la cámara en un ángulo de  $90^\circ$  con respecto a las fuentes de iluminación, dos emisores de luz roja (LH7, 660 nm) y fue registrada con un registrador digital TR1 (capacidad de almacenaje 2048 puntos) antes de reproducir la señal al registrador de papel continuo (Cole-Parmer).

Se indujo la señal de fluorescencia al encender la fuente luminosa a una intensidad entre  $150\text{-}200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  después de un periodo de adaptación de 15 min. Los valores de Fluorescencia inicial ( $F_0$ ) y fluorescencia máxima ( $F_m$ ) se determinaron de las curvas de inducción obtenidas. Para evaluar el efecto del cobre sobre las curvas de inducción obtenidas para cada tratamiento, se calculó la fluorescencia variable  $F_v$  y la relación entre fluorescencia variable y fluorescencia máxima ( $F_v/F_m$ ) de acuerdo a las fórmulas 4 y 5 descritas por Krause y Weis (1984):

$$F_v = F_m - F_0 \quad (4)$$

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m \quad (5)$$

#### 4.4.3.2.- Fluorescencia modulada.

Se incubaron las muestras en una cámara de medición de volumen ajustable, entre 1-5 mm<sup>3</sup>, provista con un sistema de flujo continuo mediante una bomba peristáltica, conectada a un depósito de 50 ml por medio de tubos de polietileno a la cámara de medición. La temperatura se mantuvo a 20 °C mediante un termostato conectado a la cámara de medición. El medio utilizado fue agua de mar filtrada, enriquecida y tamponada según se detalla en el apartado 1.3.1. Durante las mediciones se añadieron distintas concentraciones de Cu (2.5, 5.0, y 10.0 µM) directamente en el depósito y se procedió a registrar la señal de fluorescencia hasta la sexta hora después del tratamiento.

Se midió la señal de fluorescencia en *U. rigida* utilizando un sistema de fluorescencia modulada (MFMS, Hansatech, Ltd.) después de un periodo de adaptación a oscuridad de las muestras de 15 min, con un detector MFMS-2 ( $\lambda > 700$  nm). Como luz modulada de excitación se utilizó un fotodiodo de baja intensidad, ( $\leq 1.4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , longitud de onda 585 nm + filtro Schott BG-39). La fluorescencia máxima  $F_m$ , fue inducida por un pulso de saturación ( $1,500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 0.5 s duración) proveniente de una fuente halógena (Intralux 6000 + filtro Schott BG-18), 1 min después de aplicar la luz modulada. La relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima calculada a partir de estos valores, fue utilizada para medir el efecto del cobre sobre la eficacia del fotosistema 2 (ver fórmula 5).

Una segunda luz no modulada generada por una fuente halógena (Intralux 50HM + filtro Schott BG-18), fue aplicada para inducir los eventos fotoquímicos ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y producir un incremento en la señal de fluorescencia (F). Durante este período y a intervalos de 5 segundos se aplicaron pulsos de saturación ( $1,500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 0.5 segundos de duración). La aplicación de estos pulsos permite la medición del valor máximo de fluorescencia en condiciones de adaptación a la luz ( $F_m'$ ).

La medición de los pulsos se realizó aproximadamente al quinto pulso de irradiación, durante el cual el valor  $F_m'$  ya no varió. La obtención de estos valores permitieron la determinación de los coeficientes de extinción fotoquímica ( $q_p$ ) y de extinción no fotoquímica ( $q_N$ ) utilizando las ecuaciones 6 y 7, descritas por Van Kotten y Snel (1990):

$$q_p = [F_m' - F]/[F_m' - F_0'] \quad (6)$$

$$q_N = 1 - [F_m' - F_0']/[F_m - F_0] \quad (7)$$

Un juego de fibra óptica de dos vías se conectó a la parte superior de la cámara; por una vía se emitió la luz modulada y por la otra se conectó el fotodetector. Otro juego de fibra óptica de similares características se conectó a la parte inferior de la cámara; por una vía se conectó una de las fuentes de luz actínica y por otra la fuente de pulsos de saturación regulados por un disparador fotográfico (Copal-O) cada 0.5 segundos. Las curvas de inducción se registraron en papel (registrador Cole-Parmer) o fueron almacenadas en computadora mediante el programa Leaf-Disc. Todas las intensidades de luz se midieron con sensor plano (LI-193SA) conectado a un radiómetro Licor.

#### **4.4.4.- Análisis de pigmentos.**

Los pigmentos de las cuatro especies fueron extraídos, por triplicado, al cabo de una semana en las distintas concentraciones de cobre, de muestras entre 150-200 mg de peso fresco, tras su homogenización con nitrógeno líquido. Los pigmentos liposolubles fueron extraídos con acetona al 90% neutralizada con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bajo luz verde de seguridad y las concentraciones de clorofilas se calcularon espectrofotométricamente siguiendo el método descrito por Jeffrey y Humphrey (1975). Los pigmentos hidrosolubles fueron extraídos en frío con tampón de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.1 M, pH 6.8.

---

Las concentraciones de ficoeritrina y ficocianina se analizaron espectrofotométricamente de acuerdo al método descrito por Beer y Eshel (1985).

## 5.- Fisiopatología de infecciones víricas en macroalgas.

El efecto fisiopatológico de infecciones virales sobre dos especies de *Feldmannia*, se determinó analizando la tasa de fotosíntesis de clones infectados y sanos.

### 5.1.- Descripción de especies.

*Feldmannia simplex* (Crouan) Hamel. Orden Ectocarpales; Familia Ectocarpaceae. Especie cespitosa, aislada originalmente sobre *Codium fragile* en las costas de Irlanda (Müller y Stache 1992), se emplearon los siguientes clones:

**Flex 12 n**, planta sana con esporangios pluri- y uniloculares normales.

**Flex 12 n-v**, planta experimentalmente infectada con el virus de *F. simplex* mostrando síntomas evidentes de infección.

**Flex 12 n-v-n** planta sub-cultivada del clon **Flex 12 n-v** aunque infectado no presenta sintomatología.

*Feldmannia irregularis* (Kützting) Hamel. Orden Ectocarpales; Familia Ectocarpaceae. Aislada originalmente de *Cystoseira humilis* en la Isla del Hierro (Müller y Frenzer 1993), se emplearon los siguientes clones:

**Firr 28 n** planta sana con esporangios pluriloculares.

**Firr 63 v** planta experimentalmente infectada con el virus.

Ambas especies de *Feldmannia* fueron obtenidas de la colección del Prof. D. Müller (Universidad de Konstanz, Alemania).

## 5.2.- Condiciones de cultivo.

Los clones se mantuvieron en botellas de plástico, con 50 ml de agua de mar enriquecida con el medio Provasoli (Starr y Zeikus 1987), en cámara de cultivo (15 °C, luz continua,  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Los filamentos de *Feldmannia* (2-5 mg peso fresco) se colocaron en la cámara fase acuosa para la medición de fluorescencia DW2/2 (Hansatech) conectada a un electrodo de oxígeno tipo Clark. Todas las mediciones se mantuvieron a 15 °C mediante la recirculación de agua desde un termoregulador conectado a la cámara de medición (Gantt Instruments Ltd). El medio fue renovado con 2.5 ml agua de mar enriquecida cada vez que se introducía una nueva muestra. Después de 5 min de adaptación en oscuridad, las muestras fueron expuestas a una serie ascendente de 12 irradiaciones ( $0$  a  $\approx 800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) generadas por dos fotodiodos emisores de luz roja (LH-7 660 nm, Hansatech) insertados a cada lado de la cámara de medición, con tiempos de exposición de 1.5 min para cada irradiación y determinando la tasa de evolución durante los últimos 50 segundos.

El control de la irradiación, así como la toma de datos de evolución de oxígeno, fue realizada a través del programa Leaf-Disc (Hansatech), diseñado para confeccionar las curvas fotosíntesis *versus* irradiación directamente de los datos de evolución de oxígeno. La tasa de fotosíntesis máxima ( $P_m$ ) fue calculada del promedio de valores de fotosíntesis a la irradiación de saturación. La pendiente de la curva de fotosíntesis (valor  $\alpha$ ) fue determinado por regresión lineal utilizando 8 puntos de cada curva y la respiración ( $R_d$ ) se tomó del valor de intersección en el eje Y de la regresión. Se analizaron entre 4 y 7 muestras de ejemplares sanos e infectados de la misma especie.

### 5.2.1.- Análisis de pigmentos.

Se analizó el contenido de clorofila *a* y *c* de plantas sanas, infectadas y asintomáticas de ambas especies, empleando 50-100 mg peso fresco del material, siguiendo la metodología descrita por Duncan y Harrison (1982) y las ecuaciones de

---

Jeffrey y Haxo (1968). Los datos de fotosíntesis y concentración de clorofila de plantas sanas e infectadas, fueron analizados con un programa estadístico (Epistat), utilizando un test de análisis de varianza.

### **5.2.2.- Preparación para microscopía electrónica.**

La ultraestructura de las células infectadas de *F. irregularis* se estudió fijando e incluyendo las muestras empleando la metodología descrita por Müller *et al.* (1990).



BIBLIOTECA VIRTUAL

### **III. RESULTADOS.**



---

## 1.- Cultivo por aspersión.

Los resultados del cultivo por aspersión se exponen en la Tabla 3.1.

Las especies locales que mejor se adaptaron a este sistema de cultivo fueron las especies intermareales *Codium taylori* y *Grateloupia doryphora*, con tasas de crecimiento superiores al 1.0% d<sup>-1</sup>, seguidas de *Gelidium canariensis* y *Laurencia obtusa* (entre 0.7-1.0 % d<sup>-1</sup>) y en menor medida *Hypnea musciformis*, *Gelidium arbuscula*, *Pterocladia capillacea*, y *Gracilaria ferox* con una tasa de crecimiento entre 0.4-0.6 % d<sup>-1</sup>. La especie submareal *Solieria filiformis* se fragmentó rápidamente en la primera semana de cultivo, sin que en ningún ensayo se detectara una tasa de crecimiento positiva.

A pesar de las distintas irradiaciones, las diferencias de crecimiento entre los tres niveles del sistema no fueron significativas para *Codium taylori*, *Laurencia obtusa*, *Hypnea musciformis* y *Gracilaria cornea*.

Durante la primera semana en cultivo, la mayoría de las especies sufrieron una leve depigmentación apical en el primer y segundo nivel, que disminuyó con el tiempo. Las tasas de crecimiento positivas en estos niveles se deben fundamentalmente al crecimiento generado por brotaciones surgidas de zonas medias del talo. En especies como *Gelidium canariensis*, este fenómeno se presentó como fototropismo negativo.

Las especies con morfologías de consistencia más rígida (*Grateloupia doryphora*) fueron las que mejor se adaptaron al cultivo, mientras que las especies de morfología más laxa (*Gracilaria verrucosa*) se apelmazaron y fueron colonizadas rápidamente por diatomeas y epifitos.

La especie foránea que tuvo menores tasas de crecimiento fue *Furcellaria lumbricalis*. *Gracilaria cornea* exhibió las mayores tasas de crecimiento a partir del segundo nivel, mientras que *G. verrucosa* registró una tasa de crecimiento alta en el tercer nivel, principalmente debido a la colonización de epifitos.



**Tabla 3.1.- Crecimiento y producción de las especies cultivadas en el sistema por aspersión bajo condiciones ambientales en invernadero. La tasa de crecimiento para cada nivel se expresa como incremento porcentual de biomasa por día. I = Nivel superior, II = Nivel medio, III = Nivel inferior.**

Especies estudiadas	Tasa crecimiento			Producción $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$
	I	II	III	
<b>Especies locales</b>				
<i>Codium taylori</i>	2.0(0.10)	1.7(0.81)	1.9(0.63)	2.63 ± 0.26
<i>Grateloupia doryphora</i>	1.6(0.12)*	1.5(0.18)*	1.1(0.17)*	3.19 ± 0.66
<i>Grateloupia doryphora</i> <sup>1</sup>	1.6(0.28)*	1.5(0.12)*	0.9(0.16)*	1.52 ± 1.08
<i>Gelidium canariensis</i>	0.7(0.04)*	0.6(0.09)*	0.4(0.02)*	2.35 ± 1.25
<i>Gelidium arbuscula</i>	0.3(0.02)*	0.5(0.06)*	†	1.19 ± 0.95
<i>Pterocladia capillacea</i>	†	0.6(0.02)*	0.4(0.09)*	1.70 ± 0.54
<i>Laurencia obtusa</i>	0.8(0.46)	1.1(0.60)	0.6(0.36)	2.83 ± 1.09
<i>Solieria filiformis</i>	†	†	†	-----
<i>Hypnea musciformis</i>	0.3(0.10)	0.4(0.16)	†	0.50 ± 0.08
<i>Gracilaria ferox</i>	0.5(0.05)*	0.4(0.08)*	0.2(0.06)*	1.01 ± 0.39
<i>Gracilaria ferox</i> <sup>1</sup>	0.2(0.06)**	0.7(0.15)**	1.5(0.17)**	0.62 ± 0.18
<b>Especies foráneas</b>				
<i>Furcellaria lumbricalis</i> <sup>1</sup>	0.4(0.15)*	0.2(0.04)	0.1(0.04)	0.17 ± 0.03
<i>Gracilaria verrucosa</i> <sup>1</sup>	0.5(0.10)**	0.4(0.01)**	1.2(0.35)**	1.00 ± 0.48
<i>Gracilaria cornea</i> <sup>1</sup>	†	0.6(0.22)	0.5(0.07)	0.59 ± 0.07

<sup>1</sup> Especies cultivadas a una densidad de 300 g m<sup>-2</sup>.

† No hubo crecimiento

\* P < 0.01 \*\* P < 0.001

---

En todas las especies, la producción del sistema de cultivo por aspersión en los tres niveles fue bastante baja (no superando una media de  $3.2 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  en el mejor de los casos) e inferior a la obtenida por cultivo en tanque ( $9.0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

### 1.1- Contenido en metales.

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados del análisis del contenido de 26 minerales en plantas de *Grateloupia doryphora* cultivadas por aspersión, en tanque y recolectadas de poblaciones naturales durante tres periodos anuales.

La concentración de metales fue mayor en el cultivo por aspersión que en el cultivo en tanque o de poblaciones naturales, destacando los incrementos en Al, Ti, V, Cr, As, Sr. Las diferencias en el contenido de P, Na y S entre las plantas del cultivo por aspersión y las de tanque y poblaciones naturales no fueron tan marcadas. Es de destacar el elevado contenido en Co de poblaciones naturales (San Cristóbal) durante la muestra de otoño.

El tratamiento estadístico mediante análisis de componentes principales, demostró la existencia de tres grandes grupos de metales cuyas variaciones estuvieron relacionadas. Los tres grupos de metales y sus respectivos coeficientes de correlación se muestran en la Fig 3.1.

Mientras el contenido en metales de poblaciones naturales y plantas cultivadas en tanque mostraron entre sí una elevada correlación en los tres periodos experimentales, las fluctuaciones del contenido en metales de las plantas cultivadas por aspersión fue completamente distinto, en particular durante el otoño (Fig 3.2).

El microanálisis por difracción de rayos X en cortes ultrafinos de pared celular de *Grateloupia doryphora*, sólo permitió detectar un mayor contenido en S, Cl y Ca en la pared celular de plantas cultivadas por aspersión en comparación a las cultivadas en tanque.

Tabla 3.2.- Concentración de metales ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de peso seco) de *Grateloupia doryphora* de poblaciones naturales y de cultivo por aspersión y tanque durante tres periodos anuales.

Metal	Población natural			Tanque			Aspersión		
	Otoño	Invierno	Primavera	Otoño	Invierno	Primavera	Otoño	Invierno	Primavera
B	49	40	46	165	50	78	78	135	99
Na	53043	24530	31502	79925	37915	39296	39692	18168	77986
Mg	803	7415	5645	946	5692	7051	7592	11364	10208
Al	40	42	10	96	80	24	1710	33	51
P	349	3379	2779	349	3489	5409	5524	19333	5014
S	19943	35785	33928	30631	32632	38959	31981	39435	25050
K	572	24163	10987	652	19922	12045	22071	28684	7127
Ca	1678	4092	2711	3391	2692	3867	16363	16184	4894
Ti	<0.2	5.8	2.4	<0.2	16	5.1	461	3.5	8.5
V	0.4	0.9	1.4	<0.2	1.6	1.8	18	3.8	1.6
Cr	<0.3	<0.2	1.8	<0.3	<0.2	1.9	6.8	<0.3	5.2
Mn	8.4	7.6	4.9	9.9	7.9	9.2	124	6.3	6.4
Fe	316	125	33	684	194	60	3118	74	122
Co	32	<0.2	0.8	2.6	1.0	2.0	1.9	1.8	2.0
Ni	0.6	0.6	0.7	28	<0.3	1.5	27	<0.5	4.0
Cu	1.4	5.0	1.8	1.3	5.7	2.3	15	4.8	5.2
Zn	84	81	285	91	81	64	78	1451	197
As	<1.2	8	3.6	<1.2	11	4.6	25	9	<1.1
Se	<0.4	5.4	0.4	<0.4	<0.2	5.3	1.8	5.6	4.9
Sr	1.7	76	54	5.7	51	76	227	375	92
Mo	<0.3	0.4	<0.2	0.6	<0.2	<0.2	3.9	1.3	0.8
Cd	1.2	<0.2	<0.3	2.0	0.7	<0.3	4.3	<0.3	<0.3
Hg	<0.7	<0.4	0.8	1.0	<0.4	<0.6	0.7	<0.6	4.4
Pb	<3.1	<1.9	<2.8	<3.1	<1.8	<2.7	7.2	5.7	<2.8
Bi	<2.3	<1.4	<2.1	<2.3	<1.4	<2.1	<2.1	<2.2	<2.1
W	<2.2	3.1	2.4	<2.2	<1.3	3.7	<2.0	4.3	3.9

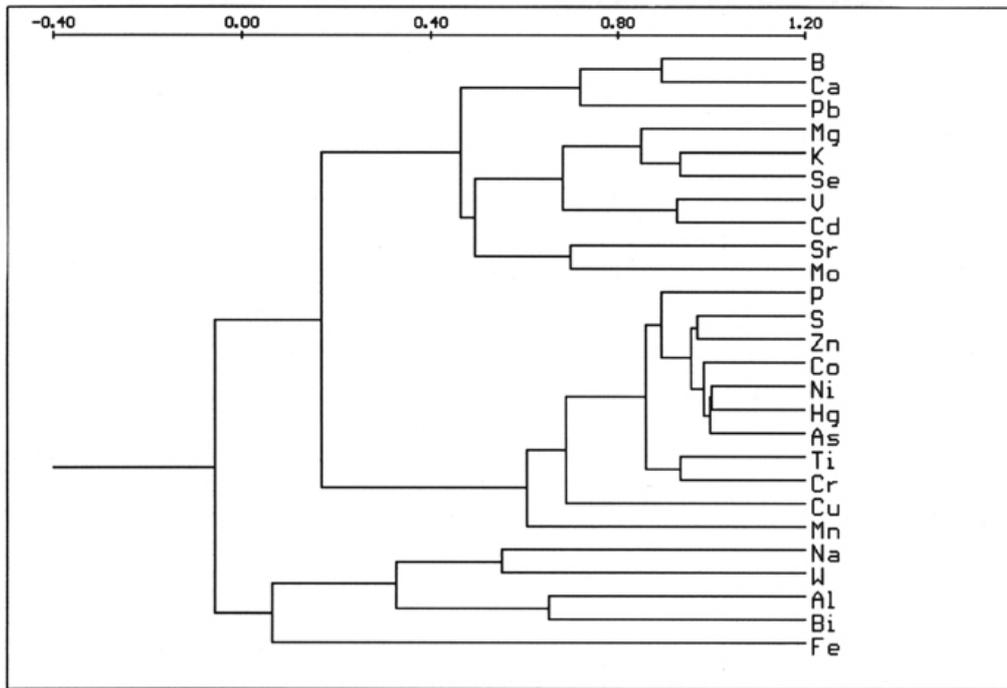


Fig. 3.1.- Dendrograma UPGMA entre las concentraciones de los 26 metales analizados en función de la procedencia del material.

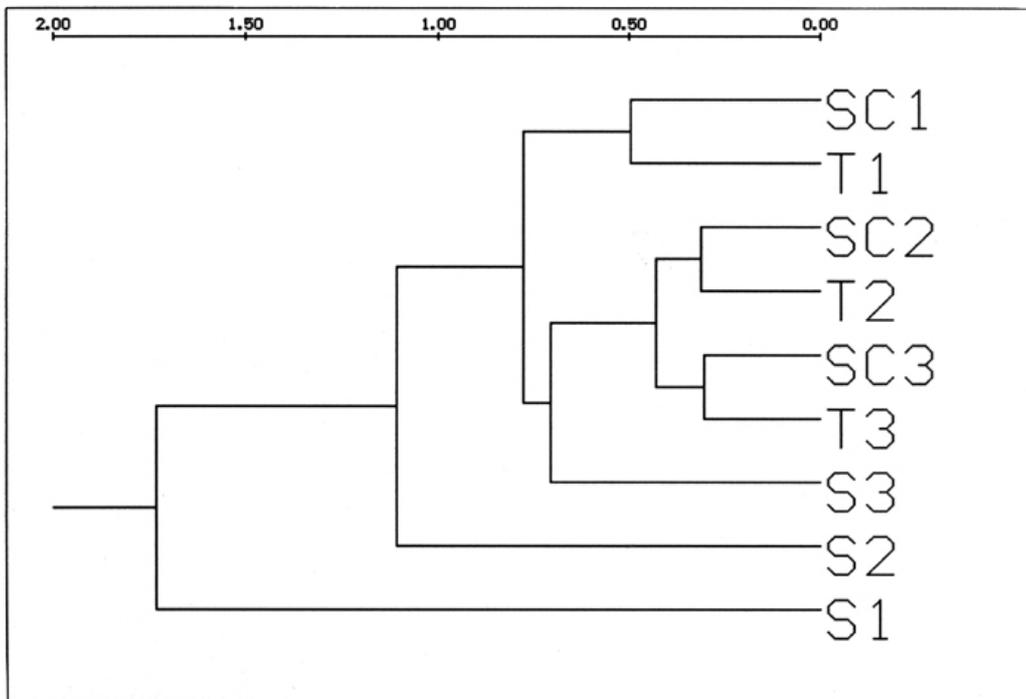


Fig. 3.2.- Análisis de componentes principales entre los distintos sistemas de cultivo empleados. SC = San Cristóbal, T = Cultivo en tanque, S = Cultivo por aspersión. Periodo de recolección y cultivo 1 = Otoño, 2 = Invierno, 3 = Primavera.

---

## 2.- Adaptación morfológica.

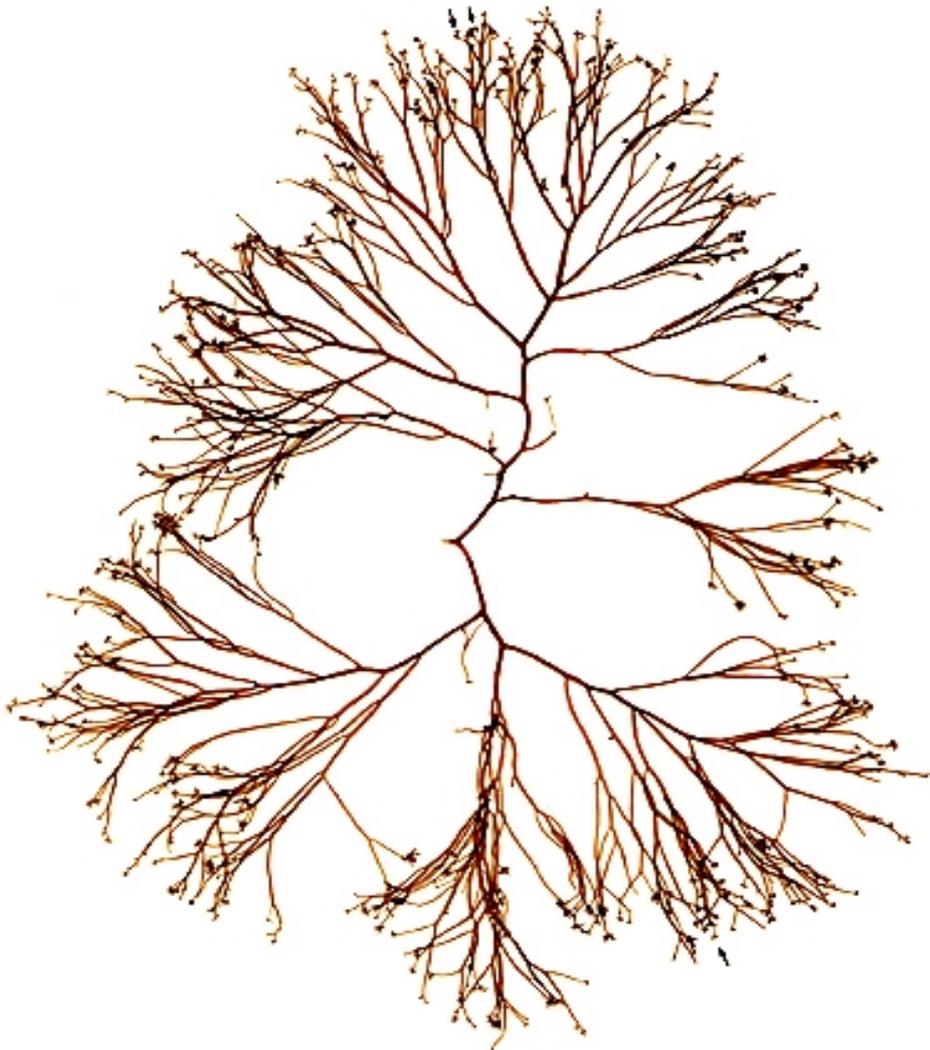
### 2.1.- Cultivo en invernadero.

Los ápices de plantas cultivadas en invernadero, en ambos sistemas turbulentos, se desorganizaron formando una masa apical desorganizada (callo), detectable a simple vista tras de una semana en cultivo (Fig 3.3). La frecuencia de formación de callo fue muy superior en el cultivo aireado que en el agitado por inyección de agua (Tabla 3.3). Únicamente la zona apical sufrió desorganización. No se observó formación de callo en el cultivo estacionario.

**Tabla 3.3.- Frecuencia de desorganización apical en *Solieria filiformis* después de una semana en cultivo en tanque bajo distintas condiciones de turbulencia. Número de plantas examinadas por tratamiento = 30.**

Tipo de Cultivo	% Apices desorganizados	Número de ápices examinados
Estacionario	0	7113
Turbulento por aire	90.3	5528
Turbulento por agua	4.0	6305

La secuencia de desorganización del ápice de *Solieria filiformis* se muestra en la figura 3.4. Al cabo de una semana, los ápices normales largos y acuminados en condiciones normales, mostraron una pigmentación más fuerte y comenzó la proliferación de una masa de células desorganizadas (a,b). Después de dos semanas en cultivo este proceso fue más evidente (c,d). A partir de la tercera



*Fig. 3.3.- Planta de Solieria filiformis después de dos semanas en cultivo turbulento, la flecha indica la desorganización apical en la casi totalidad de los ápices.*





**Fig. 3.4.-** Secuencia de desorganización apical en *Solieria filiformis*. (a) Desarrollo inicial de callo al cabo de una semana (b) Corte transversal del callo (c) Masa celular desorganizada (d) Sección transversal del callo después de dos semanas (e) Proliferación de ramificaciones a partir del callo a la tercera semana de cultivo (f) Sección transversal de la nueva ramificación surgida del callo. Escala de la barra para las figuras (a), (c), (e) = 0.5mm, y para las figuras (b), (d), (f) = 8.5  $\mu\text{m}$ .



---

semana en cultivo comenzaron a proliferar ramificaciones (neoplántulas) de los callos más gruesos (1-2 mm diámetro) (e,f). Esta proliferación tuvo lugar en toda la superficie del callo, dándole una apariencia radial.

La irradiación máxima de las plantas en cultivo ( $160 - 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) fue similar a la recibida por las plantas en poblaciones naturales. La temperatura media, durante el cultivo, se mantuvo ligeramente más baja en el sistema de cultivo aireado ( $17.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) que en el turbulento por agua y el estacionario ( $19.9$  y  $19.2 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente). Las fluctuaciones de pH fueron similares en los tres sistemas de cultivo ( $8.2 \pm 0.11$ ).

Los callos morfogenéticos comenzaron a aparecer flotando libremente en los tanques a partir de la cuarta semana en cultivo, probablemente desprendidos de la planta madre por la alta turbulencia del sistema. Las neoplántulas originadas del callo continuaron creciendo de forma radial, produciendo plantas de morfología esférica de hasta 3 cm de diámetro al cabo de 45 días de iniciado el cultivo.

La regeneración de porciones del talo fragmentadas accidentalmente se produjo sin la formación de callo, a partir de una capa de células meristemáticas.

## 2.2.- Cultivo *in vitro*.

Los ápices desorganizados en tanque que fueron cultivados *in vitro* en placas de Petri con medio agarizado, mostraron un 100% de supervivencia. La evolución de estos callos primarios varió entre cultivos enriquecidos y los de agua de mar (Tabla 3.4). En los cultivos enriquecidos, sólo el 15% de los explantos generaron callo secundario al cabo de 30 días, mientras que en medios únicamente con agua de mar este porcentaje se elevó al 59%. El 75% de los callos primarios en medio enriquecido desarrollaron filamentos hialinos, mientras que en los medios con agua de mar este porcentaje se redujo al 38%. Por el contrario, la supervivencia (explantos pigmentados, con crecimiento, no contaminados) promedio de los 200 explantos, fragmentos apicales normales, fue del 53% y

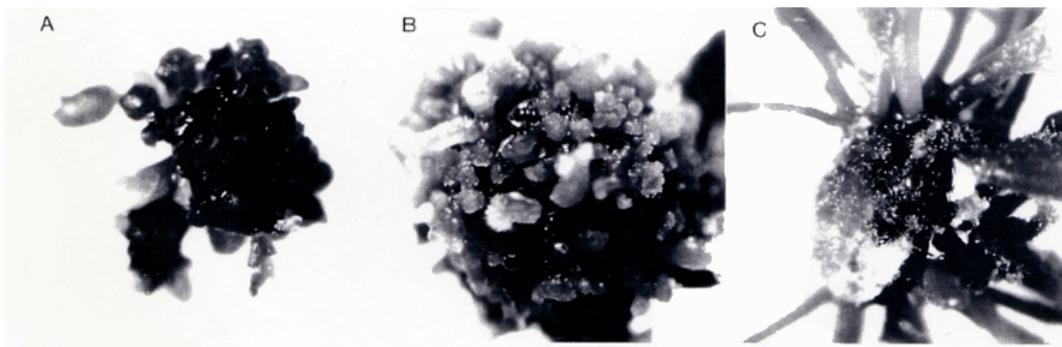


únicamente un 2% de los explantos generaron callo primario al cabo de 30 días de cultivo.

**Tabla 4.4.- Porcentaje de desorganización de ápices a partir de callo primario en medio de cultivo agarizado con agua de mar normal y medio enriquecido (Provasoli).**

Medio	Indice de callo		
	1	2	3
Agua de mar	3	59	38
Provasoli	8	15	75

- 1.- Callo primario (Foto A)
- 2.- Callo secundario esponjoso (Foto B)
- 3.- Desorganización tipo filamentosa (Foto C)





### 3.- Tratamiento anti-epifitos.

#### 3.1.- Tratamiento con mesohervíboros.

Las preferencias alimenticias de *Hyale schmidtii* en los cultivos experimentales fueron *Enteromorpha* > *Ulva* > *Solieria* > *Gracilaria*. La tasa de consumo se muestra en la Fig 3.6. El mayor consumo se registró sobre las epifitas *Enteromorpha sp.*, con una reducción de biomasa del 37.3% con respecto al valor inicial, y *U. rigida* (28.8%). En las Rodofitas la presión de consumo fue menor; *S. filiformis* redujo un 21.9% y *G. ferox* sólo redujo su biomasa en un 12.4%.

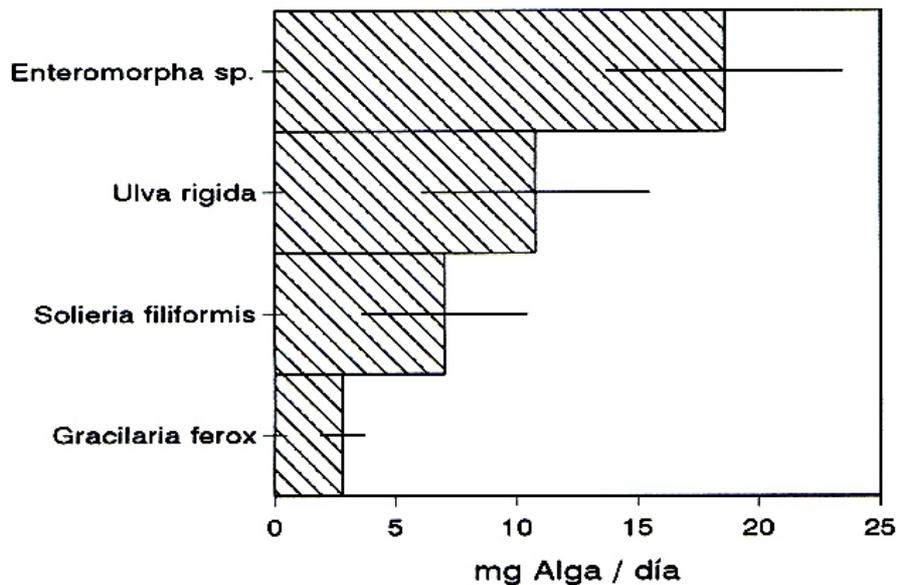


Fig. 3.6.- Preferencias alimenticias de *Hyale schmidtii*.

El pastoreo sobre plantas de *Solieria filiformis* altamente epifitadas con *U. rigida* y *Enteromorpha spp.* confirmó las preferencias del anfípodo. A los tres días la cantidad de epífitos se redujo drásticamente y a los siete días era casi inapreciable. No obstante, en cuanto la cantidad de biomasa epifita disminuía excesivamente, los anfípodos comenzaban a consumir *Solieria filiformis*, provocando la fragmentación de las plantas (Fig. 3.7).



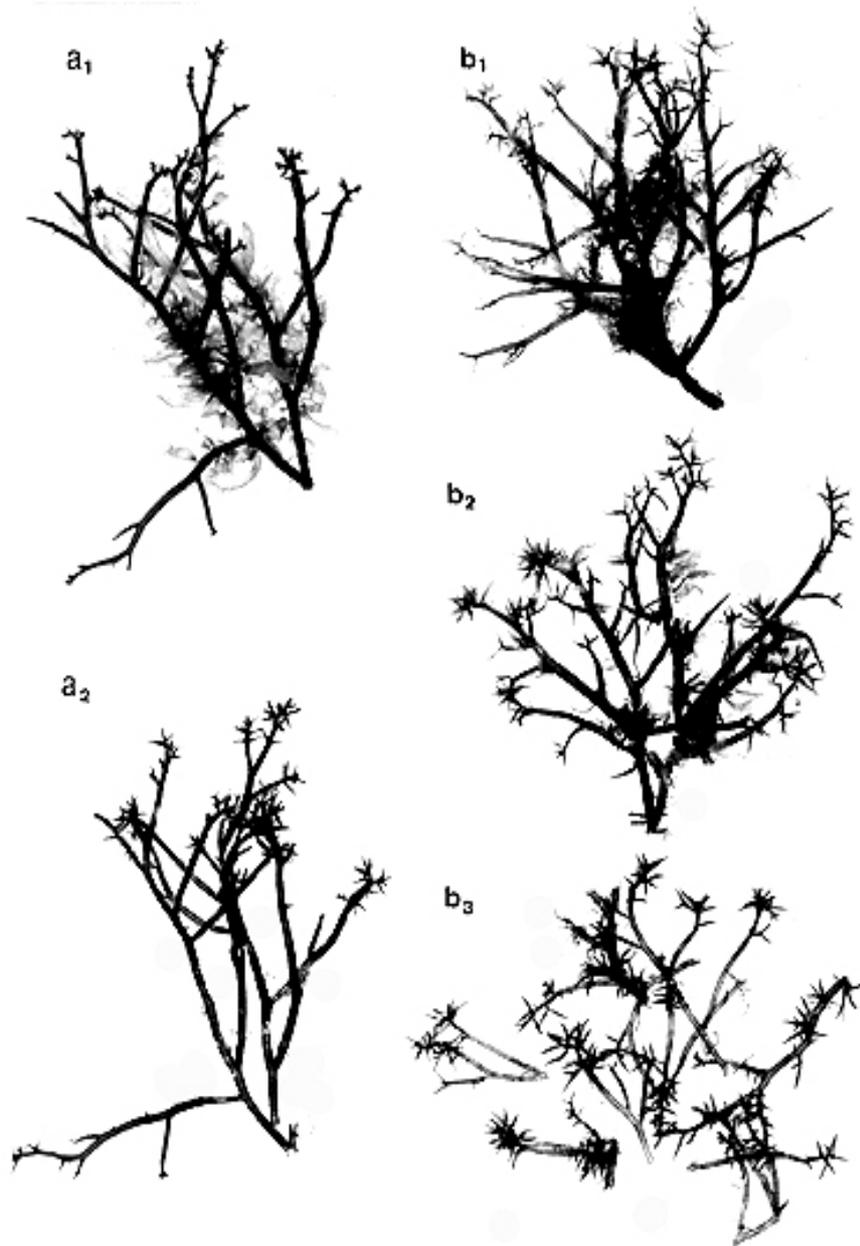


Fig. 3.7.- Plantas de *Solieria filiformis* antes del tratamiento con *Hyale schmidtii* (a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>), tres días después (a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>) y siete días después (b<sub>3</sub>).



### 3.2.- Tratamiento con hipoclorito de sodio.

El tratamiento con NaClO de plantas epifitadas de *Grateloupia doryphora* se muestran en la Tabla 3.5. Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de 1.0% y 3.0% y periodos de incubación de 30 y 15 segundos respectivamente. Concentraciones o tiempos de incubación superiores dañaron (depigmentaron) significativamente al huésped.

**Tabla 3.5.- Tratamiento de *Grateloupia doryphora* con distintas concentraciones de NaClO, a diferentes tiempos de incubación, y su efecto sobre *Ulva rigida*.**

Tiempo	Concentración % NaClO		
	0.5	1.0	3.0
seg.	0.5	1.0	3.0
15	-	X	XX
30	X	XX	XXX
60	X	XXX	XXX

- Ningún efecto  
 X Decoloración marginal en *Ulva*  
 XX Decoloración significativa de *Ulva*  
 XXX Decoloración apical en *Grateloupia*

La actividad fotosintética de los explantos de *Grateloupia doryphora* fue inversamente proporcional a la concentración de lejía y a los tiempos de incubación (Fig. 3.8). Sin embargo, las tasas de respiración no variaron entre los distintos tratamientos y tiempos de incubación.

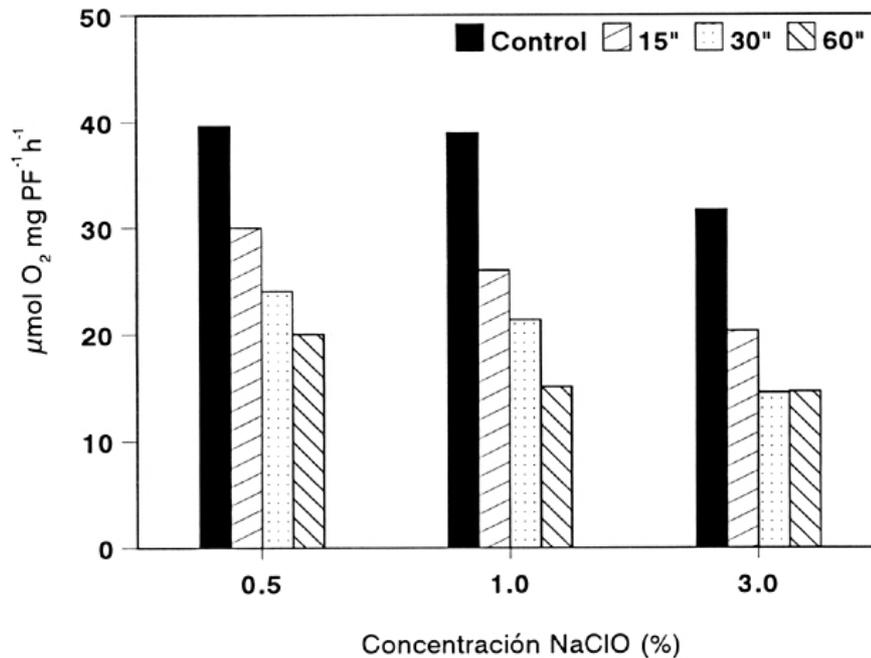


Fig. 3.8.- Fotosíntesis máxima de *Grateloupia doryphora* una hora después de los distintos tratamientos con NaClO.

### 3.3.- Tratamiento con sulfato de cobre.

#### 3.3.1.- Crecimiento en cultivo.

El efecto de las distintas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  en el cultivo de *Ulva rigida*, *Fucus spiralis*, *Grateloupia doryphora* y *Gracilaria cornea* se muestran en la Figura 3.9. *U. rigida* mostró la mayor sensibilidad y *F. spiralis* la mayor tolerancia.

Extrapolando las curvas de la Fig 3.9, las concentraciones a las que se inhibe al 50% la tasa de crecimiento de *U. rigida* y *G. cornea* son  $154 \mu\text{gCu}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $258 \mu\text{gCu}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente. A las mayores concentraciones empleadas, *G. doryphora* y *F. spiralis* sólo mostraron reducciones de la tasa de crecimiento del 36.1% y 43.9% respectivamente.

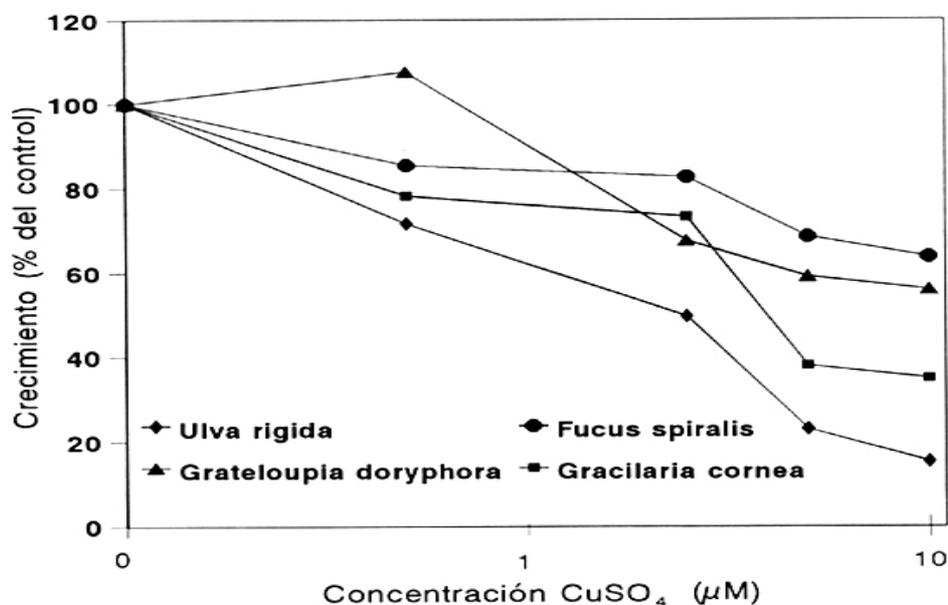


Fig. 3.9.- Efecto del CuSO<sub>4</sub> sobre la tasa de crecimiento de *Ulva rigida*, *Fucus spiralis*, *Grateloupia doryphora* y *Gracilaria cornea*.

### 3.3.2.- Fotosíntesis y Pigmentos.

Las curvas de fotosíntesis (Anexo I) y la tasa de fotosíntesis máxima de las cuatro especies mostraron una relación inversa con la concentración de Cu<sup>2+</sup>, exceptuando *Fucus spiralis*, que a la menor concentración (0.5 μM), dió valores superiores al control (Tabla 3.6).

La especie más sensible fue *G. cornea*, la cual a concentraciones superiores a 2.5 μM no mostró disminución significativa de fotosíntesis. *F. spiralis* fue la única especie que no alcanzó valores de inhibición del 50% de su fotosíntesis, ni siquiera a la concentración más elevada.

Igualmente, el contenido en pigmentos de la cuatro especies mostró una relación inversa con la concentración de cobre. Además de la excepción de *F. spiralis*, en cuanto al contenido en clorofila *a*, también *Ulva rigida* mostró un mayor contenido a la concentración de 0.5 μM (Tabla 3.7).

**Tabla 3.6.- Efecto de las distintas concentraciones de cobre en la fotosíntesis neta a intensidad de saturación ( $P_m = \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ segundo}^{-1}$ ), y sobre la fluorescencia variable ( $F_v =$  en unidades relativas) durante los tratamientos de una semana.**

$\mu\text{MCuSO}_4$	$P_m$	%	$F_v$	%
<i>Ulva rigida</i>				
Control	1.09(0.02)	100	0.88(0.17)	100
0.5	0.95(0.02)	87.1	0.72(0.11)	81
2.5	0.82(0.02)	75.2	0.30(0.02)	41
5.0	0.76(0.01)	69.7	0.11 ---	15
10.0	0.49(0.02)	44.9	0.07 ---	9
<i>Fucus spiralis</i>				
Control	1.54(0.03)	100	0.34(0.03)	100
0.5	1.69(0.1)	109.7	0.36(0.07)	105
2.5	1.14(0.04)	74.0	0.30(0.06)	88
5.0	1.01(0.04)	65.6	0.25(0.03)	73
10.0	0.82(0.08)	53.2	0.26(0.08)	76
<i>Grateloupia doryphora</i>				
Control	1.13(0.09)	100	0.54(0.03)	100
0.5	0.90(0.12)	83.3	0.54(0.07)	100
2.5	0.74(0.09)	68.5	0.42(0.14)	77
5.0	0.52(0.06)	48.1	0.40(0.12)	74
10.0	0.42(0.04)	38.9	0.36(0.12)	66
<i>Gracilaria cornea</i>				
Control	1.70(0.12)	100	1.02(0.23)	100
0.5	1.01(0.1)	59.4	0.90(0.15)	88
2.5	0.74(0.06)	43.5	0.88(0.11)	86
5.0	0.72(0.04)	42.3	0.76(0.24)	74
10.0	0.69(0.06)	40.6	0.69(0.04)	67

En *G. cornea*, aunque la concentración de clorofila fue superior al 50% (respecto al control) a la mayor concentración de cobre, la concentración de ficobiliproteínas disminuyó casi al 10% a partir de 2.5  $\mu\text{M}$  (Tabla 3.8).

**Tabla 3.7.- Concentración de pigmentos ( $\mu\text{g}$  por gramo peso fresco) en *Ulva rigida* y *Fucus spiralis* cultivada durante una semana en distintas concentraciones de cobre (n=3, Desviación estándar indicada).**

[Cobre] $\mu\text{M}$	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>c</i>
<i>U. rigida</i>			
0	551 $\pm$ 20	387 $\pm$ 4	
0.5	645 $\pm$ 14	475 $\pm$ 6	
2.5	510 $\pm$ 21	424 $\pm$ 20	
5.0	398 $\pm$ 19	352 $\pm$ 2	
10.0	304 $\pm$ 3	304 $\pm$ 3	
<i>F. spiralis</i>			
0	440 $\pm$ 51		35 $\pm$ 8
0.5	461 $\pm$ 80		49 $\pm$ 17
2.5	229 $\pm$ 32		28 $\pm$ 7
5.0	169 $\pm$ 14		16 $\pm$ 2
10.0	138 $\pm$ 19		15 $\pm$ 2

**Tabla 3.8.- Concentración de pigmentos ( $\mu\text{g}$  por gramo peso fresco) en *Grateloupia doryphora* y *Gracilaria cornea* cultivada durante una semana en distintas concentraciones de cobre (n=3, Desviación estándar indicada).**

[Cobre] $\mu\text{M}$	Clorofila <i>a</i>	Ficoeritrina	Ficocianina
<i>G. doryphora</i>			
0	122 $\pm$ 3	830 $\pm$ 20	184 $\pm$ 14
0.5	98 $\pm$ 4	323 $\pm$ 8	86 $\pm$ 5
2.5	87 $\pm$ 3	305 $\pm$ 33	80 $\pm$ 19
5.0	61 $\pm$ 1	145 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1
10.0	23 $\pm$ 1	42 $\pm$ 29	9 $\pm$ 2
<i>G. cornea</i>			
0	77 $\pm$ 1	650 $\pm$ 13	141 $\pm$ 12
0.5	71 $\pm$ 3	358 $\pm$ 33	76 $\pm$ 14
2.5	61 $\pm$ 2	346 $\pm$ 13	17 $\pm$ 1
5.0	57 $\pm$ 1	140 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1
10.0	41 $\pm$ 1	---	11 $\pm$ 2

### 3.3.3.- Fluorescencia.

En la Figura 3.10 se muestran las variaciones de fluorescencia variable en los diversos tratamientos con cobre. La relación inversa entre Fv y concentración de cobre fue similar a la descrita en el apartado anterior para fotosíntesis.

---

*Ulva rigida* mostró las mayores reducciones de  $F_v$  a partir de concentraciones superiores a  $0.5 \mu\text{M}$ . En *F. spiralis* no se observó una reducción muy marcada, mostrando incluso un aumento en medios con  $0.5 \mu\text{M}$ . En *G. doryphora* se observó el mismo efecto que en *Fucus* sin variar la señal de fluorescencia entre el control y el tratamiento a  $0.5 \mu\text{M}$ . *G. cornea* mostró una disminución paulatina de la fluorescencia.

La relación  $F_v/F_m$  varió de forma similar a la fluorescencia variable (Fig. 3.11). Nuevamente, la disminución fue más marcada en *U. rigida*, y aunque no tan progresivamente, la señal de *G. cornea* también disminuyó al aumentar la concentración de cobre. *G. doryphora* sólo mostró una reducción muy leve a la concentración más alta de cobre. En *F. spiralis* no se observó reducción, aunque sí un ligero aumento, al igual que en los valores de  $F_v$  y fotosíntesis.

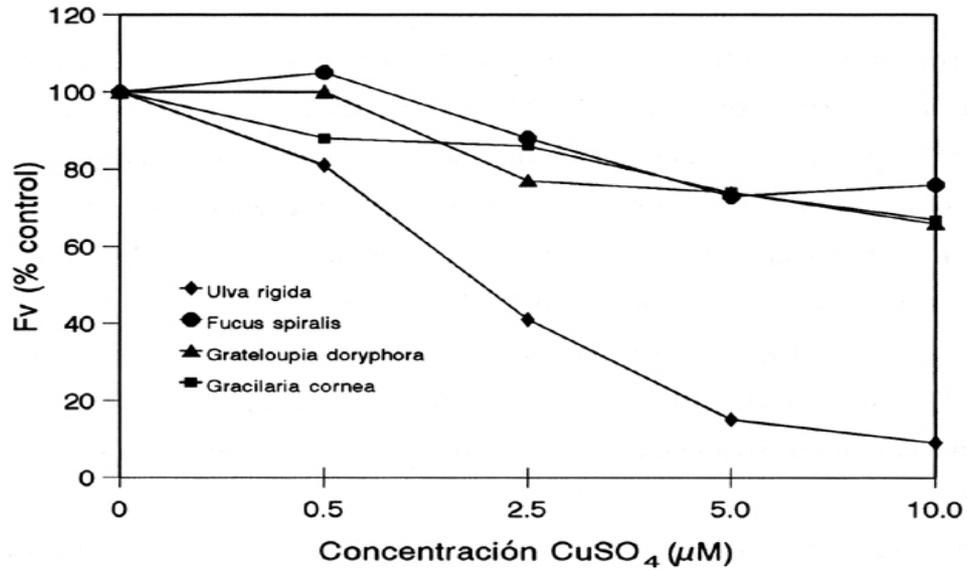


Fig. 3.10.- Disminución de la fluorescencia variable con respecto a la concentración de cobre.

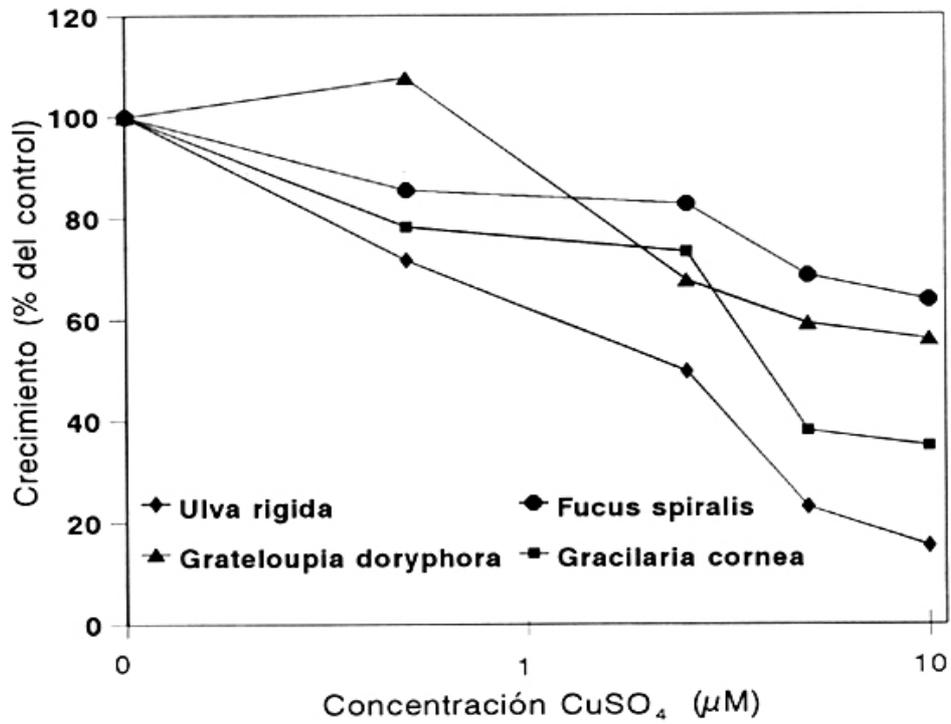


Fig. 3.11.- Relación Fv/Fm para cada especie con respecto a la concentración de cobre empleada.

**Tabla 3.9.- Correlación entre: A= Fotosíntesis vs Fv, B= Fotosíntesis vs Clorofila, C= Fv vs Clorofila, de los tratamientos con cobre.**

	A	B	C
<i>Ulva rigida</i>			
Correlación (r)	0.90	0.86	0.85
Significancia	P<0.05	P<0.05	P<0.05
<i>Fucus spiralis</i>			
Correlación (r)	0.95	0.96	0.98
Significancia	P<0.001	P<0.001	P<0.001
<i>Gracilaria cornea</i>			
Correlación (r)	0.85	0.75	0.95
Significancia	P<0.05	n.s.	P<0.05
<i>Grateloupia doryphora</i>			
Correlación (r)	0.93	0.96	0.89
Significancia	P<0.05	P<0.05	P<0.05

En todas las especies estudiadas las medidas de fluorescencia, fotosíntesis y clorofila *a*, se correlacionaron significativamente (Tabla 3.9), excepto para el análisis de correlación de fotosíntesis vs clorofila *a* en *Gracilaria cornea*.

Las mediciones en fragmentos de *U. rigida* incubados durante seis horas con distintas concentraciones de cobre, no mostraron diferencias significativas entre las señales de Fv/Fm, ni del análisis de los coeficientes de extinción fotoquímica (q<sub>p</sub>) y no-fotoquímica (q<sub>N</sub>), aunque se observó una reducción en la F<sub>v</sub> (Fig. 3.12, 3.13).

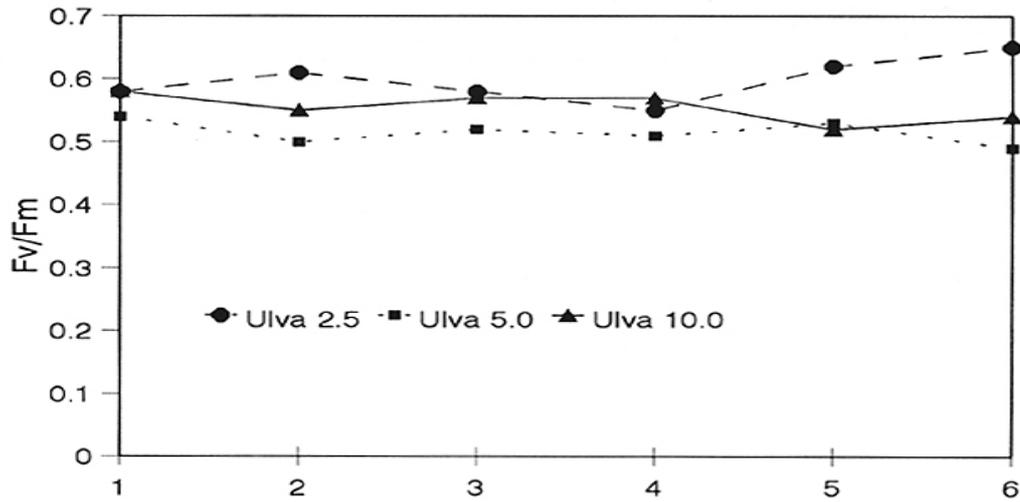


Fig. 3.12.- Efecto de la concentración de cobre sobre la relación  $F_v / F_m$  en *Ulva rigida* durante las primeras seis horas de incubación.

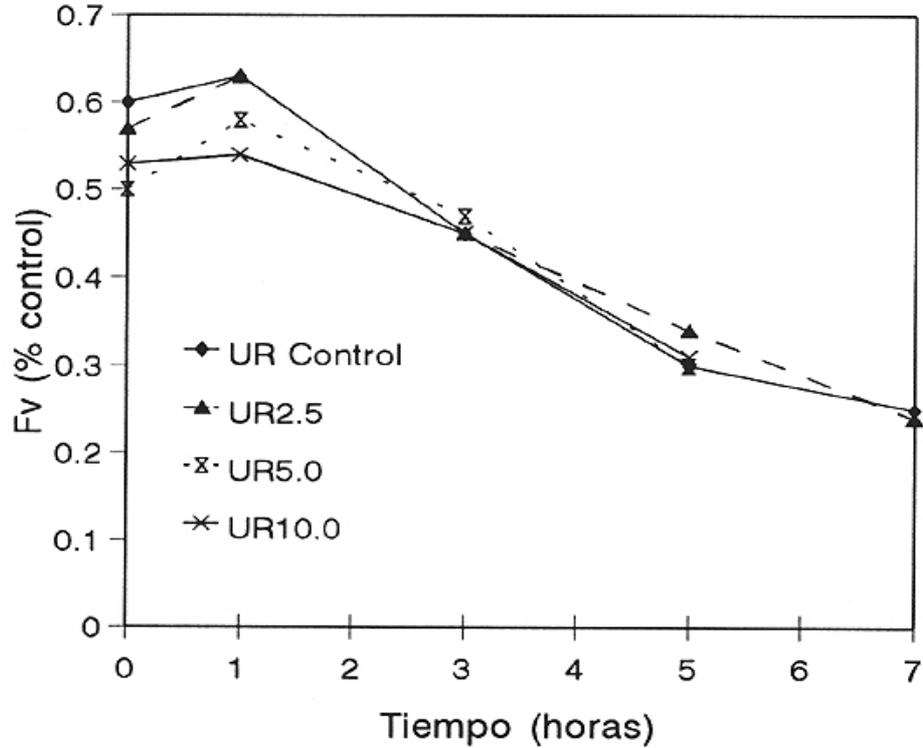


Fig. 3.13.- Fluorescencia variable en *Ulva rigida* tratada con distintas concentraciones de cobre durante un periodo de seis horas.

#### 4.- Fisiopatología de infecciones víricas en macroalgas.

##### 4.1.- Fotosíntesis en *Feldmannia* infectada con virus.

###### *Feldmannia simplex*

El clon sano (**Flex 12 n**) mostró signos de fotoinhibición a una irradiación de  $454 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , mientras que el clon asintomático (**Flex 12 n-v-n**) comenzó a mostrar una ligera fotoinhibición a partir de  $620 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig. 3.14) y no se observó fotoinhibición en el clon infectado (**Flex 12 n-v**). No se detectaron diferencias significativas de respiración ( $R_d$ ) y fotosíntesis máxima ( $P_m$ ) entre ninguno los tres clones.

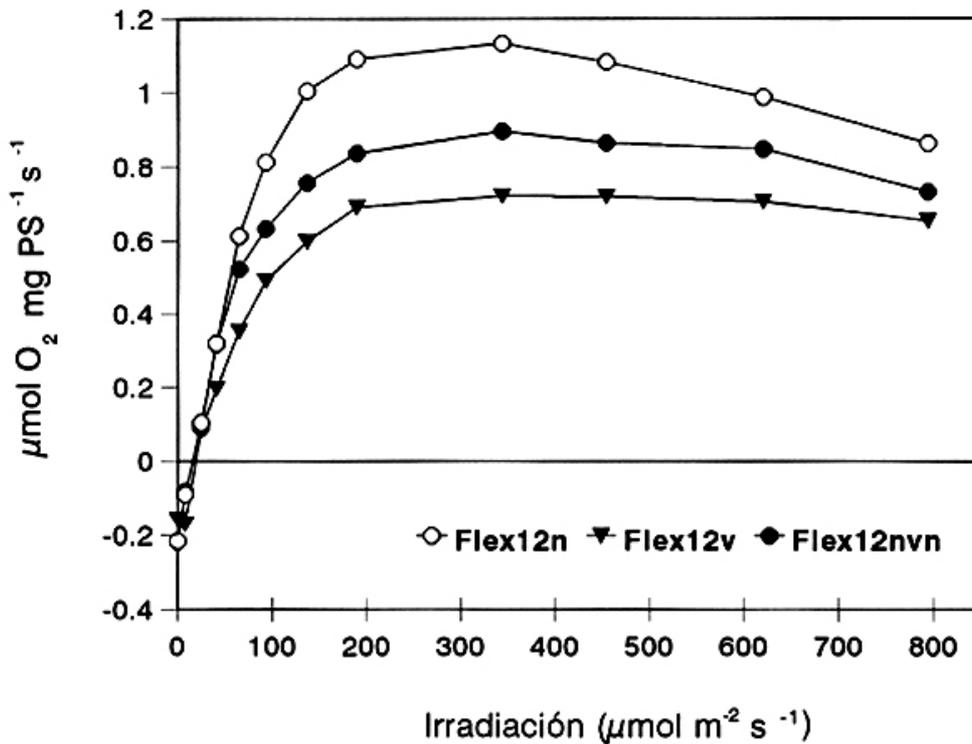


Fig. 3.14.- Curvas de fotosíntesis - irradiación de los distintos clones de *Feldmannia simplex*.

Las plantas sanas mostraron una mayor actividad fotosintética ( $P < 0.05$ ) que las asintomáticas, y éstas a su vez superiores a las plantas infectadas.

Sólo se detectaron diferencias significativas en el valor de la pendiente de la curva de fotosíntesis/irradiación entre los clones sanos e infectados. Tanto los valores de la pendiente de la curva como los de intensidad de compensación de plantas asintomáticas, fueron similares a los de plantas sanas (Tabla 3.10). La tasa de respiración fue similar entre plantas sanas y asintomáticas e inferior a plantas infectadas.

**Tabla 3.10.- Datos de las curvas fotosíntesis versus irradiación de plantas sanas, asintomáticas e infectadas de *Feldmannia simplex* y *F. irregularis* :**

**$P_m$  = fotosíntesis neta a intensidad de saturación ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg peso seco}^{-1} \text{segundo}^{-1}$ );  $R_d$  = respiración; alfa = pendiente de la curva [ $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg peso seco}^{-1} \text{segundo}^{-1} \cdot (\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{segundo}^{-1})$ ];  $I_c$  = punto de compensación ( $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{segundo}^{-1}$ ). Desviación estándar entre paréntesis.**

Clones	$P_m$	$R_d$	alfa	$I_c$
<i>Feldmannia simplex</i>				
sana Flex 12 n	1.09 (0.41)	-0.21 (0.06)	0.019* (0.002)	15.6 (2.3)
asintomática Flex 12 n-v-n	0.83 (0.26)	-0.21 (0.05)	0.014 (0.001)	15.9 (5.3)
infectada Flex 12 n-v	0.69 (0.31)	-0.15 (0.05)	0.013* (0.005)	20.7 (9.3)
<i>Feldmannia irregularis</i>				
sana Firr 28 n	0.69* (0.15)	-0.13 (0.04)	0.012** (0.001)	15.71 (4.7)
infectada Firr 63 v	0.22* (0.11)	-0.10 (0.04)	0.004** (0.001)	37.25 (8.4)

\* =  $P < 0.05$  \*\* =  $P < 0.01$

La concentración de clorofilas (*a*, *c*) en el clon sano fue superior ( $P < 0.05$ ) a la de clones infectados, mostrando los asintomáticas valores intermedios (Tabla 3.11). La proporción entre clorofila *c* y *a* fue ligeramente mayor en el clon infectado (0.39), y similar entre los clones sano y asintomático (0.36).

#### *Feldmannia irregularis*

No se observaron signos de fotoinhibición ni en los clones sanos ni en los infectados. La actividad y punto de compensación fotosintética ( $P < 0.01$ ) y el valor de fotosíntesis máxima ( $P < 0.05$ ) del clon infectado (**Firr 63 v**) fueron inferiores a la del clon sano (**Firr 28 n**) (Fig. 3.15). No obstante, la tasa de respiración de ambos clones fue similar (Tabla 3.10).

La eficacia fotosintética de *F. simplex* fue superior a la de *F. irregularis*.

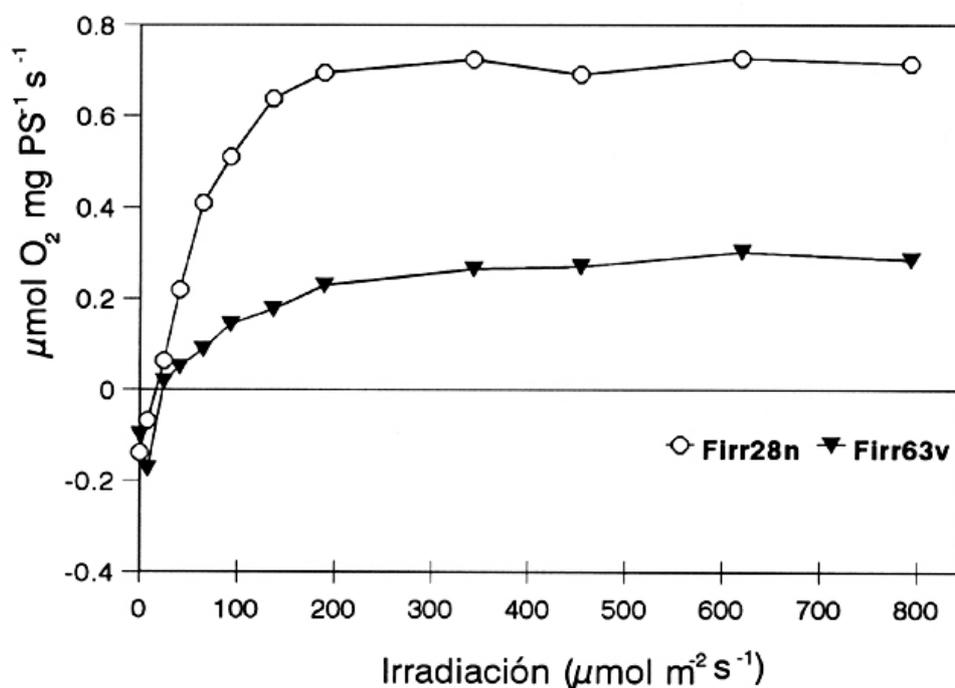


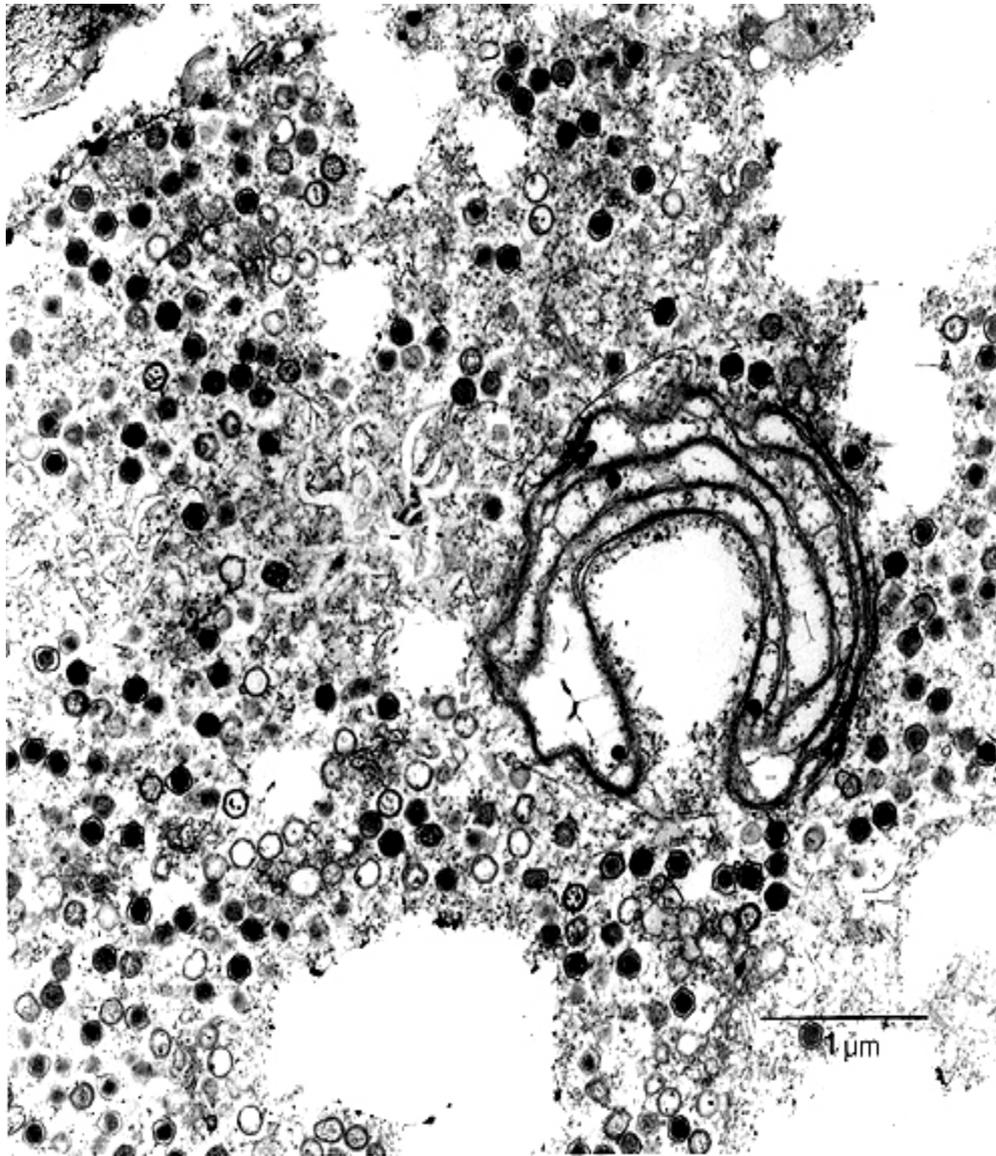
Fig. 3.15.- Curvas de fotosíntesis - irradiación de los distintos clones de *Feldmannia irregularis*.

La concentración de clorofila y la relación clorofila *c/a* fue significativamente superior en el clon sano ( $P < 0.05$ ) (Tabla 3.8).

Las células de clones infectados mostraron un severo deterioro de los cloroplastos (Fig. 3.16).

**Tabla 3.11.- Concentración de clorofilas ( $\mu\text{g}$  por gramo peso fresco) en plantas sanas, asintomáticas e infectadas de *Feldmannia simplex* y *F. irregularis*, ( $n = 3$ , Desviación estándar indicada).**

Clones	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>c</i>	Chlc/Chla
<i>Feldmannia simplex</i>			
sana Flex 12 n	332 $\pm$ 15	121 $\pm$ 12	0.36 $\pm$ 0.02
asintomática Flex 12 n-v-n	272 $\pm$ 60	99 $\pm$ 16	0.36 $\pm$ 0.02
infectada Flex 12 n-v	193 $\pm$ 26	77 $\pm$ 16	0.39 $\pm$ 0.05
<i>Feldmannia irregularis</i>			
sana Firr 28 n	398 $\pm$ 21	195 $\pm$ 19	0.47 $\pm$ 0.02
infectada Firr 63 v	303 $\pm$ 12	112 $\pm$ 10	0.37 $\pm$ 0.04



*Fig. 3.16.- Sección al microscopio electrónico de una zona infectada en Feldmannia irregularis mostrando la destrucción del cloroplasto y la gran cantidad de partículas virales asociadas.*



**IV. DISCUSIÓN.**

---

### 1.- Cultivo por aspersión.

Las mayores tasas de crecimiento y producción de *Codium taylori*, *Grateloupia doryphora* y *Laurencia obtusa* indican que tanto una morfología no filamentosa y rígida como un hábitat intermareal, son dos factores determinantes para la selección de especies potencialmente cultivables en el sistema por aspersión, aunque no los únicos. La depigmentación apical de especies de morfología rígida (p.e. *Gracilaria cornea*) y las bajas tasas de crecimiento de especies intermareales rígidas (*Gelidium canariensis*, *G. arbuscula*, *Pterocladia capillacea*) indican la imposibilidad de aplicar criterios generalizables de evaluación *a priori* de la potencialidad en dicho sistema de cultivo.

La tasa de crecimiento de *Furcellaria lumbricalis* fue inferior a la obtenida por Lignell y Pedersen (1986) (2.4% d<sup>-1</sup>), aunque superior a la descrita por Haglund y Pedersén (1988). No obstante, dichos cultivos no pudieron mantenerse durante más de 30 días, ya que, probablemente debido a las elevadas temperaturas (entre 20-26°C), las plantas se desintegraron.

Los procesos de depigmentación apical o desintegración (*Gracilaria ferox*, *G. cornea*, *G. verrucosa*, *Pterocladia capillacea*, *Gelidium arbuscula*, *G. canariensis* e *Hypnea musciformis*) concuerdan con procesos similares descritos en otras Rodofitas (Hanisak 1987, Haglund y Pedersén 1988).

Contrariamente al crecimiento fotófilo de *Gelidium sesquipedale* cultivado en un sistema por aspersión (Salinas 1991), el crecimiento de las neobrotaciones de *G. canariensis* fue fotófobo. Las diferencias de irradiación y la mayor incidencia de irradiación reflejada en nuestro sistema pueden explicar las diferencias en el tipo de crecimiento.

La inexistencia de datos de producción en la literatura del cultivo por aspersión de macroalgas no nos permite efectuar comparaciones, aunque tomando como dato indicativo las tasas de crecimiento y las densidades empleadas por otros autores (Tabla 1.1, 1.2) es muy probable que no sean diferentes a las obtenidas en

nuestro estudio y, en cualquier caso, similares a los datos de producción de *Ahnfeltia plicata* (Indergaard *et al.* 1986).

Los valores de producción están muy lejos de los descritos en cultivos por aspersión (en seis bandejas) de *Ascophyllum nodosum* ( $68 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) (Moeller *et al.* 1984). Es muy probable que estos valores se obtuvieran durante periodos cortos y en primavera, de lo contrario, demostrarían una capacidad excepcional de la especie intermareal *A. nodosum* para crecer en cultivos por aspersión que, a la vista de nuestros resultados, no puede extrapolarse a otras especies intermareales.

### **1.1.- Acumulación de metales.**

El mayor contenido en metales de *Grateloupia doryphora* cultivada por aspersión (Tabla 3.2) puede ser debido a un efecto combinado de las elevadas tasas de evaporación, tanto en el sistema como en la planta, y por la recirculación del medio inherente al sistema experimental. En este sentido, las mayores correlaciones en el contenido en metales entre las plantas de poblaciones naturales y tanque con las existentes en cultivos por aspersión, durante los periodos de invierno y primavera (Fig 3.2), pueden explicarse por la mayor incidencia del efecto de temperatura e irradiación (evaporación) sobre el sistema por aspersión en otoño. En sistemas de cultivo abiertos se han descrito concentraciones de metales en *Fucus vesiculosus* y *Furcellaria lumbricalis* muy inferiores a las detectadas en este estudio (Haglund *et al.* 1991).

Los altos niveles de **Ca** pueden ser debidos a la utilización periódica de agua potable, con un elevado contenido en  $\text{CaCO}_3$ , para regular la salinidad. La acumulación de metales en el sistema por aspersión parece estar mucho más relacionada con procesos de adsorción que con los procesos de transporte activo descritos por Rice y LaPointe (1981). El contenido en metales tanto de poblaciones naturales como de ambos sistemas de cultivo están dentro del rango de los descritos por otros autores (Yamamoto *et al.* 1979, Maeda y Sakaguchi 1990), exceptuando:

---

**Ti, Cr, Cd** en el cultivo por aspersión en otoño (de 1.3 a 2.5 veces superior al valor más alto descrito en macroalgas costeras de zonas contaminadas).

**Ni**, para ambos sistemas de cultivo en otoño (5 veces superior al valor más alto descrito en macroalgas costeras de zonas contaminadas).

Los altos niveles de **Ti** pueden explicarse por la difusión al medio procedente tanto de láminas de poliestireno (que cubrían la superficie del tanque para reducir la evaporación) como de la pintura epóxica que cubría los tanques. El elevado contenido en **Cr** y **Ni** puede ser debido a la contaminación producida tanto por la estructura cromada del invernadero, como por las mallas de sombreado, parcialmente metálica.

El elevadísimo contenido en **Co** de poblaciones naturales (12-17 veces superior al de plantas en cultivo) puede ser debido a un escape fortuito (en análisis posteriores no se volvieron a detectar) de **Co** procedente de un Hospital cercano, cuyos desagües están muy próximos a la población de donde se tomaron las plantas.

Las concentraciones de **Pb** y **As** de las plantas cultivadas por aspersión indican los riesgos que conlleva este sistema para cultivar macroalgas destinadas para consumo humano, ya que sobrepasan los valores máximos permitidos en macroalgas alimentarias (5.0 y 3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente, Whyte y Englar 1983, Mabeau 1989). No obstante, las elevadas concentraciones de Hg en poblaciones naturales durante los periodos de muestreo, las hacen, al menos a *G. doryphora*, no aptas para consumo humano.

## 2.- Adaptación morfológica de *Solieria filiformis*

La rápida desorganización apical de los cultivos en tanques con turbulencia de *Solieria filiformis* (Tabla 3.3) demuestran la relación entre desorganización y turbulencia, ya que las variables entre sistemas turbulentos y estacionarios fueron prácticamente las mismas. La desorganización apical generalizada es muy probable que sea debida a un proceso intermitente de contacto con un sustrato. Por la

turbulencia del sistema y la morfología de la planta puesta en cultivo, la continua rotación en el tanque provoca un contacto intermitente de las zonas apicales con las paredes y el fondo. En los cultivos en tanque turbulentos, el estímulo por contacto con las paredes y el fondo se efectúa intermitentemente y es más intenso en los tanques agitados por aire que en los agitados por inyección de agua. Esta diferencia en la intensidad del estímulo explicaría las diferencias significativas de desorganización apical entre sistemas agitados por aire o por inyección de agua (Tabla 3.3). Aunque en ambos sistemas turbulentos la rotación de la planta es similar (aproximadamente 3 rpm), en los tanques agitados por inyección de aire se produce una mayor rotación de la planta sobre su eje, por lo que el contacto con las paredes del tanque es mucho más intenso.

Diversos autores (Floch *et al.* 1987, Shintani 1988, Perrone y Cecere 1991) han descrito la capacidad de los ápices de *Solieria* para, tras un contacto con el sustrato, diferenciarse en estructuras de fijación, lo que favorece su propagación. Mientras que en cultivo, al generarse un estímulo de contacto periódico de suficiente intensidad, el ápice desorganizado no completa su reorganización en una estructura de fijación definida, sino que continúa el crecimiento desorganizado, es decir, forma un callo (Fig. 4.1).

Tal como sucede en los cultivos *in vitro* de callo (García-Reina *et al.* 1988, Robaina *et al.* 1990), al alcanzar un determinado diámetro se produce una reorganización de las células y, como en nuestro caso, la detención del crecimiento desorganizado. Estos resultados, y su interpretación, concuerdan con la dificultad de definición conceptual del término callo en macroalgas (García-Reina *et al.* 1991), ya que, más que una desorganización artificial, puede constituir una respuesta natural (resistencia o adaptación morfológica)

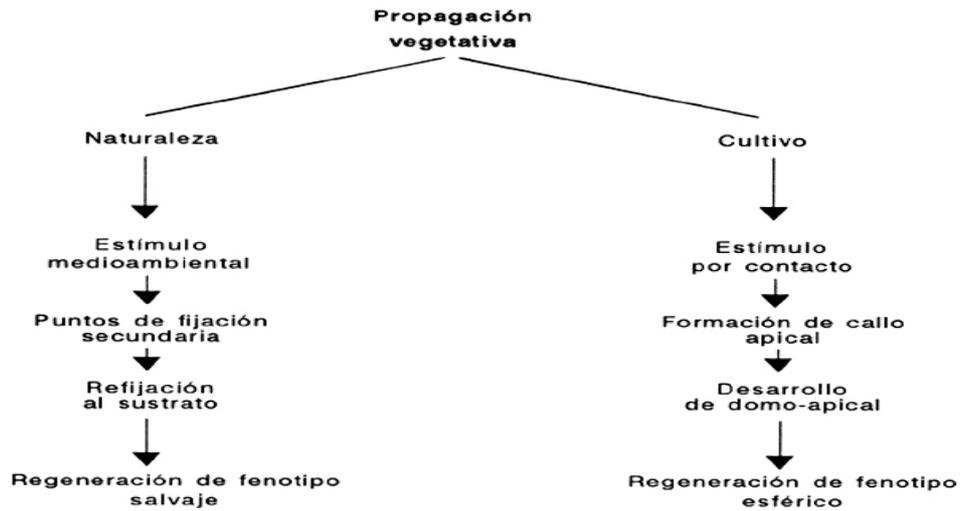


Fig. 4.1.- Proceso de propagación en *Solieria filiformis*, en la naturaleza y en cultivo turbulento.

frente a determinados estímulos ambientales.

En los cultivos en laboratorio, la mayor resistencia de los callos se evidencia por la supervivencia de un 100 % de los explantos cultivados en medio agarizado, en comparación a un 53% de los ápices normales (Tabla 3.4). La mayor formación de callos secundarios en medios de cultivo no enriquecidos (59%) en comparación a los cultivados en medios enriquecidos (15%), apoya la hipótesis de la hiperplasticidad morfológica como respuesta adaptativa a determinados estrés ambientales. En el cultivo *in vitro* de callos de macroalgas marinas existen referencias de este tipo de respuesta morfológica frente a condiciones carenciales (Pedersén 1968, Fries 1980, Bradley y Cheney 1986, Pole-Fuller y Gibor 1987, Lawlor *et al.* 1989).

En cualquier caso, la utilización de ápices de *S. filiformis* como explantos pre-desorganizados para el cultivo *in vitro* de callos de macroalgas, constituye el método de mayor efectividad descrito hasta ahora (Tabla 4.1), tanto en cuanto al porcentaje de formación de callo primario y secundario, como de crecimiento libre del callo, no unido al explanto primario.

**Tabla 4.1. Potencial "calligénico" expresado como porcentaje de tejido de explantos que desarrollan callo (datos de Gusev *et al.* 1987, Kawashima y Tokuda 1989, García Reina *et al.* 1991, Polne Fuller y Gibor 1987)**

**Clorofita**

88.0%	<i>Enteromorpha intestinalis</i>
86.0%	<i>Ulva augusta</i>

**Feofita**

70.0%	<i>Ecklonia cava</i>
29.0%	<i>Macrocystis pyrifera</i> (gametofito)
20.0%	<i>Laminaria sinclairii</i> (gametofito)
17.0%	<i>Sargassum muticum</i>
17.0%	<i>Pelvetia fastigiata</i>
10.0%	<i>Sargassum hystrix</i>
10.0%	<i>Cystoseira osmundacea</i>
9.2%	<i>Laminaria sinclairii</i> (esporofito)
9.0%	<i>Sargassum fluitans</i>
7.8%	<i>Macrocystis pyrifera</i> (esporofito)

**Rodofita**

87.0%	<i>Porphyra lanceolata</i>
84.0%	<i>Porphyra perforata</i>
81.0%	<i>Porphyra nereocystis</i>
75.0%	<i>Smithora naiadum</i>
33.0%	<i>Laurencia sp</i>
18.0%	<i>Phyllophora nervosa</i>
16.0%	<i>Furcellaria fastigiata</i>
15.0%	<i>Gelidium vagum</i>
10.0%	<i>Gracilaria ferox</i>
7.0%	<i>Eucheuma alvarezii</i>
4.0%	<i>Gracilaria verrucosa</i>
2.0%	<i>Ceramium kondoi</i>
1.0%	<i>Gigartina exasperata</i>
0.9%	<i>Eucheuma uncinatum</i>
0.6%	<i>Gelidium robustum</i>
0.5%	<i>Gracilaria papenfusii</i>
0.3%	<i>Gelidium versicolor</i>

---

### 3.- Control de epifitos.

#### 3.0.- Control de epifitos con mesoherbívoros.

Los resultados del cocultivo del anfípodo *Hyale schmidtii* (Fig. 3.6) demuestran una marcada preferencia por las especies distromáticas epifitas *Enteromorpha sp.* y *U. rigida* respecto a las Rodofitas *G. ferox* y *S. filiformis*. Estas preferencias pueden ser debidas a la escasa digestibilidad de los polisacáridos matriciales de estas especies (Viejo y Arrontes 1992), o por la mayor dureza de su talo (Watson y Norton 1985). Nuestros resultados concuerdan con las preferencias de anfípodos sobre *Enteromorpha spp* y *Ectocarpus spp* respecto a *Gracilaria spp* y *Chondrus crispus*, descritos por otros autores (Brawley y Fei 1987, Shacklock 1992).

Sin embargo, el cocultivo de anfípodos con plantas de *Solieria filiformis* altamente epifitadas, mostró que las preferencias están condicionadas por la abundancia relativa de epifitas, ya que al cabo de 7 días cuando la mayor parte de las epifitas habían sido consumidas, los anfípodos consumían el huésped (Fig. 3.7). El que los talos de *Solieria filiformis* se fragmentaran por diversos puntos, pero no fueran consumidas sus porciones apicales, puede deberse a una mayor acumulación de deterrentes químicos en la zona apical (Steinberg 1984). El que no consuman los puntos de crecimiento es una ventaja añadida como método de control de epifitos, pero al fragmentar la planta se reduce la producción por pérdidas al colarse los fragmentos por las mallas del desagüe.

Los resultados demuestran la posibilidad de utilizar *Hyale schmidtii* como método de lucha biológica contra epifitos, pero asimismo demuestran la necesidad de disponer de un sistema rápido de control sobre la población del anfípodo, ya que de lo contrario reducen significativamente la producción de las Rodofitas en cultivo (Nicotri 1977). En cualquier caso, la estrategia del control de epifitos con anfípodos no ha de plantearse en términos de eficacia máxima, ya que, aún existiendo epifitos, por debajo de un cierta densidad los anfípodos comienzan a preñar sobre el huésped.

### **3.1.- Control de epifitos con NaClO.**

La destrucción, tanto de zonas marginales como basales, de Ulváceas epifitas sobre *Grateloupia doryphora* con incubaciones en soluciones al 3% de hipoclorito sódico durante quince segundos (Tabla 3.5) demuestran la alta efectividad de este tratamiento. Aunque la fotosíntesis de los explantos tratados fue un 25% inferior al cabo de una hora de tratamiento, crecieron normalmente. Este hecho indica que la utilización de la fotosíntesis para estimar el posible efecto tóxico del tratamiento de desinfección sobre el huésped ha de evaluarse al cabo de varias horas y que, en todo caso, disminuciones del 25% de la fotosíntesis (al cabo de una hora del tratamiento) no son indicativas de la vitalidad del material. A la vista de estos resultados puede que la efectividad de los tratamientos de desinfección descritos por Aguirre y Evans (1993) en base a las tasas de fotosíntesis al cabo de una hora del tratamiento deban ser reconsiderados.

La relación entre reducción de fotosíntesis e intensidad de los tratamientos con cloro concuerdan con los resultados de Eppley *et al.* (1976) y es muy probable que esté asociada con daños a los cloroplastos.

La destrucción de *Gracilaria chilensis* tras diversos tratamientos para controlar epifitas con hipoclorito sódico (Ugarte y Santelices 1992), más que con la falta de efectividad del método, es muy probable que esté relacionada con las elevadas concentraciones y tiempos de incubación utilizados por estos autores.

### **3.2.- Tratamientos con cobre**

Los resultados de los tratamientos con cobre indican un efecto tóxico selectivo (por reducción del crecimiento, Fig 3.9) sobre Feofitas (*Fucus spiralis*), carragenofitas (*Grateloupia doryphora*), agarofitas (*Gracilaria cornea*) y Clorofitas (*Ulva rigida*) que, muy probablemente está relacionado con las diferencias de

---

adsorción por los polisacáridos matriciales característicos de cada uno de estos grupos. La capacidad diferencial de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  de las especies estudiadas, puede estar relacionada con las diferencias de radicales negativos en la pared celular, de tal forma que el fucoidano característico de *Fucus spp* actuará como un intercambiador iónico más potente que el carragenato (con abundantes grupos sulfatos) de *Grateulopia doryphora*, que a su vez es más potente que el agar (con escasos grupos aniónicos) de *Gracilaria cornea* y éste superior al de la simple pared celulósica de *Ulva rigida*. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar tratamientos de Cobre como herbicida selectivo contra las especies de algas verdes que más comunmente infectan los cultivos de macroalgas.

Las diferencias significativas de Fv y Fv/Fm entre *Ulva rigida* y las demás especies estudiadas (Fig. 10 y Fig. 11) podrían interpretarse igualmente en base a la menor capacidad de adsorción de  $\text{Cu}^{2+}$  de las paredes celulares de *U. rigida*.

La reducción del crecimiento en *F. spiralis* a concentraciones superiores a  $7.87 \mu\text{g/l}$ , confirma los resultados de Strömngren (1980). Asimismo concuerdan con las mayores concentraciones de Cu necesarias para reducir un 50% las tasas de crecimiento de *Gracilaria tenuistipitata* en comparación a *Enteromorpha spp*, descritas por Haglund (1992). Las mayores concentraciones de Cu ( $330 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) necesarias para reducir un 50% la tasa de crecimiento de *Gracilaria tenuistipitata*, (Haglund 1992) en comparación a *G. cornea* ( $258 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , Fig 3.9), podrían explicarse por las diferencias en el contenido de grupos sulfato (responsables de la adsorción de Cu) en el agar de ambas especies. Mientras que el agar de *G. tenuistipitata* no genera fuerzas de gel superiores a 700 nikkan, el agar de *G. cornea* supera 1,500 nikkan (Freile-Pelegrin *et al.*, datos no publicados).

En base a los resultados la explicación de las diferencias entre *U. rigida* y las demás especies es la de una capacidad de adsorción diferencial de Cu por la pared celular (aunque tanto fotosíntesis Tabla 3.6, como la concentración de clorofila no muestren diferencias interespecíficas significativas), aunque tampoco habría que

descartar la existencia de permeabilidad diferencial de membrana plasmática al Cu, demostrada por Hall (1981) en *Ectocarpus siliculosus*.

No obstante la concentración real de  $\text{Cu}^{2+}$  libre en el medio puede ser inferior a la concentración total de Cu, debido a la actividad quelante de exudados orgánicos emitidos al medio por las algas (Sueur *et al.* 1982). Como la cantidad de exudados orgánicos emitidos al medio varían entre especies y en función del ambiente, las concentraciones a las que se alcancen efectos semi-letales pueden variar, incluso para una misma especie, en función de la manipulación de las variables físico-químicas del cultivo.

De los análisis de correlación entre fotosíntesis, fluorescencia variable y clorofila *a*, se esperaba obtener una correlación significativa (Tabla 3.9), y en cualquier caso una disminución de la tasa de crecimiento, fotosíntesis y contenido en pigmentos con un aumento de fluorescencia por efecto del estrés generado por el  $\text{Cu}^{2+}$ , ya que al igual que otros herbicidas, el Cu bloquea el transporte electrónico entre los aceptores primarios y el fotosistema II (Renger y Schreiber 1989, Mohanty *et al.* 1989), por lo que deberían producir un aumento de la señal de fluorescencia, y por el mismo efecto inhibitorio del  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la fotosíntesis en algas (Gimmler *et al.* 1991, Markham *et al.* 1980). Sorprendentemente:

1.- la relación  $F_v/F_m$ , excepto en *Fucus spiralis*, fue inferior al valor estándar (0.8) de dicha relación (Van Kooten y Snel 1990) (Fig. 3.11) y, además, no disminuyó significativamente por efecto del Cu, excepto en *Ulva rigida* a concentraciones superiores a  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

2.- la  $F_v$  no sólo no aumentó en ninguna de las especies y concentraciones de  $\text{Cu}^{++}$  (excepto *Fucus spiralis* a  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , Fig. 10), sino que disminuyó progresivamente con las concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  (de una forma mucho más acentuada en *Ulva rigida*). La reducción de  $F_v$  se asemeja a los resultados obtenidos con *Dunaliella tertiolecta*, en la que se detectó una reducción, tanto en la evolución de oxígeno como en  $F_v$  al ser tratadas con cobre (Samson *et al.* 1988).

---

Estos datos demuestran que el valor estándar de  $F_v/F_m$  próximo a 0,8 aceptado por diversos autores (Van Kooten y Snel 1990, Krauss y Weis 1991) como valor útil y sugerido como indicador de estrés en plantas terrestres, no sólo no es válido como valor generalizable en macroalgas, sino que tal índice no es válido como indicador fiable de estrés. Por el contrario, el valor de  $F_v$ , aunque decreciente, muestra una correlación altamente significativa con fotosíntesis, y contenido en clorofila en situaciones estresantes (Tabla 3.9) y por tanto constituye un indicador fiable y extremadamente rápido del estado fisiológico de macroalgas. En este sentido nuestros datos concuerdan con la potencialidad de  $F_v$  como indicador fiable de estrés en plantas terrestres (Renger y Scriber 1986).

La ausencia de correlación entre fotosíntesis y concentración de clorofila en *Gracilaria cornea* (Tabla 3.9) concuerda con los resultados en *Laminaria saccharina* como respuesta a concentraciones elevadas de Cd (Markham *et al.* 1980).

#### **4.- Fisiopatología de la infección vírica en macroalgas.**

La reducción de la actividad fotosintética (Fig. 3.14 y 3.15), la destrucción de cloroplastos (Fig. 3.16) y la reducción del contenido en clorofila (Tabla 3.11) en macroalgas infectadas por virus, constituye la primera evidencia del carácter patológico de una infección viral en macroalgas. Asimismo, las menores tasas de crecimiento de cultivos infectados de *Feldmania* (D.Müller 1993, comunicación personal) es muy probablemente consecuencia de la disminución en la actividad fotosintética provocada por la infección. Estos resultados demuestran que el efecto de la infección vírica en macroalgas es bastante similar al de plantas terrestres, en las que igualmente se han descrito disminuciones de la actividad fotosintética por destrucción de la estructura del cloroplasto, por reducción en el contenido en pigmentos fotosintéticos y por la pérdida de proteínas específicas asociadas al fotosistema II (van Kooten *et al.* 1990).

Los valores intermedios de fotosíntesis máxima de los clones asintomáticos de *Feldmania simplex* (Fig 3.14), indican que el efecto fisiopatológico de la infección vírica, más que condicionado por periodos de latencia, está regulado por distintos niveles de virulencia.

La mayor reducción de la fotosíntesis de las plantas infectadas de *Feldmannia irregularis* (Fig. 3.15) puede estar relacionado con la mayor virulencia del genoma viral que la afecta (Müller y Stache 1992) en comparación a la virulencia del que infecta específicamente a *F. simplex*.

La variación en el valor de la pendiente ( $\alpha$ ) entre plantas sanas e infectadas se explicaría por la reducción en clorofila *a* y *c* (Ramus 1981) de las plantas infectadas, producido, probablemente, por la destrucción de los cloroplastos (Fig. 3.16)





---

## 1.- Conclusiones.

**1.1.-** Aunque la adaptación de macroalgas al sistema de cultivo por aspersión está condicionada tanto por la morfología como por el hábitat intermareal natural, sólo estas características no son indicativas de su productividad en cultivo por aspersión. La producción de especies agarofitas y carragenofitas de interés industrial en sistemas por aspersión son muy bajas, por lo que no es económicamente rentable su cultivo por este sistema.

**1.2.-** El cultivo por aspersión genera un aumento significativo del contenido en metales pesados de las macroalgas a niveles que imposibilitan su utilización para consumo animal.

**1.3.-** Los morfotipos esféricos de *Solieria filiformis* generados por cultivo en tanques turbulentos se producen por organogénesis espontánea de callos apicales. Los callos apicales se generan por estímulos de contacto intermitentes en las zonas meristemáticas. La intensidad y frecuencia del estímulo condiciona la amplitud de la desorganización. Los callos constituyen una manifestación de hiperplasticidad morfológica adaptativa al ambiente y son estructuras más resistentes al estrés que la morfología normal. La mejor fuente de explantos para desarrollar las biotecnologías celulares de macroalgas marinas, la constituyen los callos primarios pre-desorganizados por estimulación intermitente.

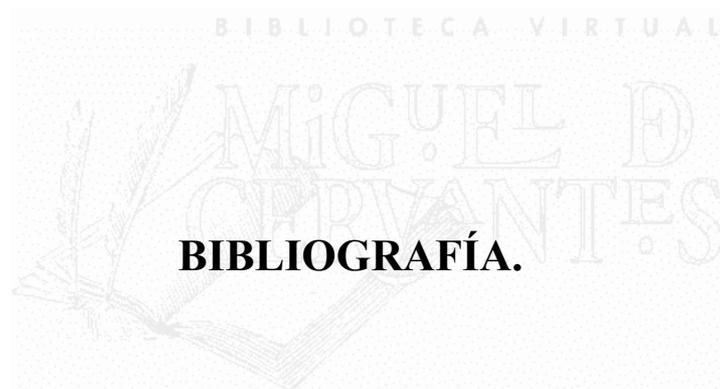
**1.4.-** Incubaciones de 15 segundos con un 3% de hipoclorito sódico en agua de mar constituyen el tratamiento más efectivo contra macroalgas epifitas sobre carragenofitas. La medición de la actividad fotosintética del huésped al cabo de una hora del tratamiento desinfectante no es indicativa de la reducción de la vitalidad.

**1.5.-** La preferencia del anfípodo *Hyale schmidtii* sobre las especies epífitas más comunes de cultivos intensivos de carragenofitas permiten considerar su cocultivo como una estrategia válida de lucha biológica. No obstante, esta estrategia sólo permitiría un control parcial de la cantidad de biomasa epífita ya que un determinado nivel de escasez provocaría pérdidas de biomasa por fragmentación.

**1.6.-** La toxicidad diferencial del **Cu** sobre Clorofitas, Feofitas y Rodofitas le confieren potencialidad como herbicida selectivo. La toxicidad diferencial está relacionada tanto con la existencia de polisacáridos matriciales como con la cantidad de radicales aniónicos característicos de cada tipo de polisacárido matricial.

**1.7.-** El índice basal de Fv/Fm es inferior al de plantas terrestres en especies agarofitas, carragenofitas y sobre todo en *Ulva rigida*. Este índice, como indicador del estado fisiológico de macroalgas marinas es de escasa significancia. El estrés fisiológico de macroalgas marinas genera disminución de la Fv. Existe una elevada correlación entre el estrés fisiológico, la fotosíntesis y la fluorescencia variable, por lo que la Fv constituye un indicador altamente fiable del estado fisiológico de macroalgas marinas.

**1.8.-** La infección viral sobre *Feldmannia* tiene efectos fisiopatológicos significativos, similares a los producidos en plantas terrestres: reducción de fotosíntesis, del contenido en clorofila y destrucción de cloroplastos. Existen distintos niveles de virulencia, asociados tanto a la sintomatología como a la especificidad del genoma viral y del huésped



**BIBLIOGRAFÍA.**



- 
- Aguirre-Lipperheide,M; L.V.,Evans (1993): A sterilization protocol for the Dictyotales (Phaeophyceae). LPhycol. 29, 243-251.
- Andrews,JH (1976): The pathology of marine algae. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 51, 211-253.
- Apt,KE (1988): Etiology and development of hyperplasia induced by *Streblonema* sp. (Phaeophyta) on members of the Laminariales (Phaeophyta). LPhycol. 24, 28-34.
- Apt,KE; A.Gibor (1991): The ultrastructure of galls on the red alga *Gracilaria epihippisor*a. LPhycol. 27, 409-413.
- Arrontesj (1990): Diet, food, preference and digestive efficiency in intertidal isopods inhabiting macroalgae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 139, 231-249.
- Augier,H; Boen; Le Tallec,N; P.,Faugeras; R.,Piccinato (1992): Essais toxicologiques a Vaide du bore, du cuivre et du vanadium sur Valgue tropicale *Caulerpa taxifolia* recemment installee en mediterranee. Revue Internationale d'Océanographie Médicale 107-108, 90-95.
- Beer,S; A.,Eshel (1985): Determining Phycoerythrin and Phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. Aust. J. Mar. Freshw. Res. 36, 785-795.
- BeIsher, T. (1989): *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt sur le littoral franQais, synthese des etudes 1983-1989. IFREMER Centre de Brest. 99PP.
- Bidwell,RGS; J.,McLachlan; N.D.H.,Lloyd (1985): Tank cultivation of Irish moss, *Chondrus crispus* Stackh. Bot. Mar. 28, 87-97.
- Boney,AD (1963): The effects of 3-amino-1,2,4-triazole on the growth of sporelings of marine algae. J. Mar Biol. Ass. 43, 643-652.
- Booth,WE (1981): A method for removal of some epiphytic diatoms. Bot. Mar. 24, 603-609.
- Bradley, PM.; DP. Cheney (1986): Morphogenetic variation in tissue cultures of a red seaweed. Plant. Physiol. Suppl. 80, 129.
- Brawley,SH; X.G.,Fei (1987): Studies on mesoherbivory in aquaria and in an unbarricaded mariculture farm on the chinese coast. J.Phycol. 23, 614-623.

- Buggeln, R.G., (1.981): Morphogenesis and growth regulators. En: C.S.Lobban and M.J. Wynne (eds), The Biology of Seaweeds. Blackwell Science Publishers, Oxford: 627-660.
- Buschmann,AH (1.990): Intertidal macroalgae as refuge and food for amphipoda in central Chile. *Aq. Bot* 36, 237-245.
- Buschmann,AH (1991): Amphipod food preference and *Iridaea spp.* (Rhodophyta) spore release and dispersal. *J. Mar Biol. Ass.* 71, 891-897.
- Carefootj (Ed.) (1977): Pacific seashores. A guide to intertidal ecology. University of Washington Press, Seattle. 208 pages.
- Chapman,ARO (1973): Methods for macroscopic algae. In: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods & Growth Measurements. (Ed: J.R.,Stein) Cambridge University Press, New York, 87-107.
- Chapman,VJ; D.J.,Chapman (1980): Seaweeds and their uses. Third ed. Chapman and Hall, London. 497 pages.
- CorreaJA; J.L.,McLachlan (1991): Endophytic algae of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) 111: Host specificity. *LPhycol.* 27, 448-459.
- D'Antonio,C (1985): Epiphytes in the rocky intertidal red algae *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh: negative effects on the host and food for herbivores? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 86, 197-218.
- DeBoer, JA; J.H. Ryther (1977): Potential yields from waste recycling algal mariculture system. En: The marine plant biomass of the Pacific Northwest Coast. R.W. Krauss (Ed.). Corvallis Oregon State University Press. pp. 231-249.
- DeBoer, JA (1981): Nutrients. En: The Biology of Seaweeds. C.S. Lobban & M.J. Wynne (Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 356-391.
- DeBusk,TA; M.,Blakeslee; J.H.,Ryther (1986): Studies on the outdoor cultivation of *Ulva lactuca* L. *Bot. Mar.* 29, 381-386.
- Doty,M (1979): Status of marine agronomy, with special reference to the tropics. En: Proceedings International Seaweed Symposium. Vol. 9. (Eds: A.Jensen; J.R.,Stein) Science Press, Princeton, 35-58.

- 
- Duncan, MJ; P.J. Harrison. (1982): Comparison of solvents for extracting chlorophylls from marine macrophytes. *Bot. mar.*, 25: 445-447.
- Eide, I; S., Myklestad; S., Møller (1980): Long-term uptake and release of heavy metals by *Ascophyllum nodosum* (L). *Le Jol. (Phaeophyceae) in situ. Environ. Pollut.* 23, 19-28.
- Eppley, RW; E.H., Renger; P.M., Williams (1976): Chlorine reactions with seawater constituents and the inhibition of photosynthesis of natural marine phytoplankton. *Estuarine and Coastal Marine Science* 4, 147-161.
- Evans, LV (1990): Marine biofouling and its control: State-of-the-art and future prospects. In: *Experimental Phycology 1. Cell walls and surfaces, reproduction, photosynthesis.* (Eds: Wiessner, Robinson, DG; Starr, RC) Springer-Verlag, Berlin, 222-235.
- Fletcher, RL (1989): A consideration of some problems associated with the outdoor cultivation of algae. In: *Outdoor Seaweed Cultivation. Proc. COST-48 ed. Vol. Port Erin, Brithis Isles.* (Eds: Kainj, M; Andrews, JW; McGregor, BJ) CEE, Brussels, 5-11.
- Floc'h, J-Y.; E. Deslandes; Y. Le Gall (1987): Evidence for vegetative propagation of the carragenophyte *Sofieria chordalis* (Solieraceae, Rhodophyceae) on the coast of Brittany (France) and in culture. *Bot. mar.* 30: 315-321.
- Friedlander, M (1992): *Gracilaria conferta* and its epiphytes: The effect of culture conditions on growth. *Bot. Mar.* 35, 423-428.
- Fries, L (1980): Axenic tissue cultures from the sporophytes of *Laminaria digitata* and *L. hyperborea*. *J. Phycol.* 16, 475-477.
- García-Reina, G; R. Robaina; M. Tejedor; A. Luque (1988): Attempts to establish axenic cultures and photoautotrophic growth of *Gelidium versicolor*, *Gracilaria ferox* and *Laurencia sp.* cell cultures. En: Algal Biotechnology. T. Stadler, J. Mollion, M.C. Verdus, Y. Karamanos, H. Morvan, D. Christiaen (eds), Elsevier Applied Science, London & New York: 111-118.
- Gibor, A (1980): Studies on vegetative propagation of benthic marine algae. En: Pacific Seaweed Aquaculture. (Eds: Abott, IA; Foster, M; Eklund, LF) California Sea Grant College Program, California, USA, 152-156.

- Gimmler,H; B.,Treffny;M.,Kowalski; U.Jimmermann (1991): The resistance of *Dunaliella acidophila* against heavy metals: The importance of the Zeta potential. *J. Plant Physiol.* 138, 708-716.
- GuerinjM; K.T.,Bird (1987): Effects of aeration period on the productivity and agar quality of *Gracilaria* sp. *Aquaculture* 64, 105-110.
- Haglund, K. (1992): Photosynthesis and growth of some marine algae, with emphasis on the Rodophyte *Gracilaria tenuistipitata*. Doctoral Dissertation at Uppsala University. pp. 48.
- Haglund,K; M.,Pedersén (1988): Spray cultivation of seaweeds in recirculating brackish water. *Aquaculture* 72, 181-189.
- Haglund,K; D.R.,Robledo; G.,Garcia-Reina; M.,Pedersén (1991): Increased metal content in spray cultivated seaweeds, Proc. COST-48 Workshop "Seaweed Cellular Biotechnology, Physiology and intensive Cultivation, (Eds. G., Garcia-Reina & M., Pedersén), Las Palmas de Gran Canaria, España, pp. 245-256.
- Hall,A (1981): Copper accumulation in copper-tolerant and non-tolerant populations of the marine fouling algae, *Ectocarpus siliculosus* (Dillw.) Lyngbye. *Bot. Mar.* 24, 223-228.
- Hanisak, M.D.; M.M. Littler; D.S. Littler (1990): Application of the functional-form model to the culture of seaweeds. *Hydrobiologia* 204/205: 73-77.
- Hanisak,MD (1987): Cultivation of *Gracilaria* and other macroalgae in Florida for energy production. En: Seaweed Cultivation for Renewable Resources. Vol. 16. (Eds: K.T.,Bird;P.H.,Benson) Elsevier, New York, 191-217.
- Hansen, J.E.; Packard, T.E; W.T. Doyle (1981): Mariculture of red seaweeds. Report # T-CSGCP-002. California Sea Grant College Program Publication. pp. 42.
- Harlin,MM; B.,Thorne-Miller; G.B.Jhursby (1977): Ammonium uptake by *Gracilaria* sp. (Florideophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in closed system fish culture. En: *Procc. Int. Seaweed Symp.* Vol. 9. (Eds: A.Jensen; J.R.,Stein) Princeton Sci., Sta Barbara California, 285-292.
- Hillebrand,H; P.J.R.,DeVries (1.986): Growth of the fouling algae ***Cladophora glomerata*** (L.) Kutz. at various concentrations of copper. In: *Algal*

- 
- biofouling. Studies in Environmental Science. Vol. 28. (Eds: Evans,LV; Hoagland,KD) Elsevier, Amsterdam, 175-179.
- Hopkin,R; J.M.,Kain (1978): The effects of some pollutants on the survival, growth and respiration of *Laminaria hyperborea*. Estuarine and Coastal Marine Science 7, 531-553.
- Indergaard,M; K,Ostgaard; A.Jensen; O.,Storen (1986): Growth studies of macroalgae in a microcomputer-assisted spray cultivation system. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 98, 199-213.
- Jeffrey, SW; F.T. Haxo (1968): Photosynthetic pigments of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) from corals and clams. Bio. Bull., 135: 149-165.
- Jeffrey,SW; GT.,Humphrey (1975): New spectrophotometric equations for determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen 167, 191-194.
- Krause,GH; E.,Weis (1984): Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res. 5, 139-157.
- Krause, GH; E., Weis (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 42, 313-349.
- Kuschel,FA; A.H.,Buschmann (1991): Abundance, effects and management of epiphytism in intertidal cultures of *Gracilaria* (Rhodophyta) in Southern Chile. Aquaculture 92, 7-19.
- Lapointe,BE; J.H.,Ryther (1978): Some aspects of the growth and yield of *Gracilaria tikvahiae* in culture. Aquaculture 15, 185-193.
- Lapointe,BE; J.H.,Ryther (1979): The effects of nitrogen and -seawater flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria officifera* var. *angustissima* in mass outdoor cultures. Bot. Mar. 22, 529-537.
- Lawlor, HJ; J.A. McComb; M.A. Borowitz (1989): Tissue culture of *Ecklonia radiata* (Phaeophyceae, Laminariales): effects on growth of light, organic carbon source and vitamins. J. Appl. Phycol. 1, 105-112.
- Lignell, A; G.M. Roomans; M. Pedersén (1982): Localization of absorbed Cadmium in *Fucus vesiculosus* L. by X-ray microanalysis. Z. Pflanzenphysiol. 105, 103-109.

- Lignell,A; M.,Pedersén (1986): Spray cultivation of seaweeds with emphasis on their light requirements. Bot. Mar. 29, 509-516.
- Lignell,A; P.,Ekman; M.,Pedersen (1987): Cultivation technique for marine seaweeds allowing controlled and optimized conditions in the laboratory and on a pilotscale. Bot. Mar. 30, 417-424.
- Lloyd, N.D.H.; J.L. McLachlan; R.G.S. Bidwell. (1981): A rapid infra-red carbon dioxide analysis screening technique for predicting growth and productivity of marine algae. En: Proc. International Seaweed Symp. 10th. T. Leváng (Ed). Berlin. Walter de Gruyter. pp. 461-466.
- Lobban,CS; P.J.,Harrison; M.J.,Duncan (Eds.) (1985): The Physiological ecology of seaweeds. First ed. Cambridge University Press, Cambridge. 241 pages.
- Mabeau,S (1989): La "Tilière algue française" en 1988: atouts et points de blocage. Océanis 15(5), 673-692.
- Maeda,S; T.,Sakaguchi (1990): Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae. En: Introduction to Applied Phycology. (Ed: 1,Akatsuka) SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands, 107-135.
- Markham,JW; B.P.,Kremer; K.R.,Sperling (1980): Effects of cadmium on *Laminaria saccharina* in culture. Mar. Ecol. Prog. Ser. 3, 31-39.
- Matthews, R.E.F. (1991): Disease symptoms and effects on metabolism. En: Plant virology (Matthews, R.E.F.,editor), 380-442. Academic Press Inc., California USA.
- McHugh,DJ (Ed.) (1987): Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO ed. Vol. Fish. Tech. Pap. 288,
- Misra,A; R.,Sinha; S.,Jha; V.,Jha; B.,Singh; B.,Prasad Sharma (1982): Virus infection of marine algae. En: Marine Algae in Pharmaceutical Science. Vol. 2. (Eds: Hoppe,HA; Levring,T) Walter de Gruyter, Berlin, 289-297.
- Moeller, H.W.; S.M. Garber. (1982): Methods for reducing pumping energy for a spray culture seaweed farm. Internal Memorandum HydroBotanicals Co. 12 pp.

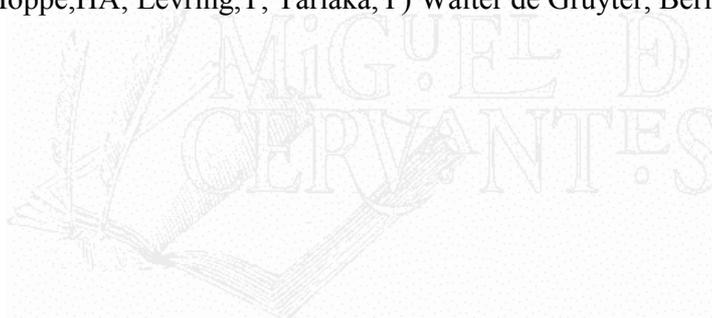
- 
- Moeller,HW; G.,Griffin; V.,Lee (1982): Aquatic biomass production on sand using seawater spray. Symposium Papers, Energy from Biomass and Energy Wastes VI. Lake Buena Vista, Florida, January 25-29, 1982. Institute of Gas Technology, Chicago, pp. 237-248.
- Moeller,HW; S.M.,Garber; GT.,Griffin (1984): Biology and economics of growing seaweeds on land in a film culture. *Hydrobiologia* 116/117, 299-302.
- Mohanty, N; I. Vass; S. Demeter. (1989): Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, QB- Plant. *Physiol.*, 90: 175-179.
- Morgan,KC; P.F.,Shacklock; F.L,Simpson (1980): Some aspects of the culture of *Palmaria palmata* in greenhouse tanks. *Bot. Mar.* 23, 765-770.
- Morris,AW; A.J.,Bale (1975): The accumulation of cadmium, copper, manganese, and zinc by *Fucus vesiculosus* in the Bristol Channel. *Estuar. cstl. mar. Sci.* 3, 153-163.
- Moss,B; P.,Woodhead (1976): The effect of two commercial herbicides on the settlement, germination and growth of *Enteromorpha*. *Mar. Pollut. Bull.* 7, 189-192.
- Müller,DG (1991): Mendelian segregation of a virus genome during host meiosis in the marine brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *J. Plant Physiol.* 137, 739-743.
- Müller,DG; K.,Frenzer (1993): Virus infections in three marine brown algae: *Fenmannia irregularis*, *F. simplex*, and *Ectocarpus siliculosus*. *Hydrobiologia* 000, 1-8.(en prensa)
- Müller,DG; B.,Stache (1992): Worldwide occurrence of virus-infections in filamentous marine brown algae. *Helgoländer Meeresunters.* 46, 1-8.
- Müller,DG; H.,Kawai; B.,Stache; S.,Lanka (1990): A virus infection in the marine brown alga *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Botanica Acta* 103, 72-82.
- Neish, IC (1979): Principles and perspectives of the cultivation of seaweeds in enclosed systems. En: *Actas 1. Algas Marinas chilenas*. B. Santelices (Ed.). Santiago Chile. Subsecretaria de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. pp. 59-74.

- Neish,AC; P.F.,Shacklock; C.H.,Fox;F.L,Simpson (1977): The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. Can. J. Bot. 55, 2263-2271.
- Nicotri,ME (1977): Impact of crustacean herbivores on cultured seaweed populations. Aquaculture 12, 127-136.
- NortonJA; A.L.,Mathieson (1983): The biology of unattached seaweeds. En: Progress in Phycological research. Vol. 2. (Eds: F.E.,Round; DJ,Chapman) Elsevier, Amsterdam, 333-387.
- Ouddane,B; J.C.,Fischer; M.,Wartel (1992): Evaluation statistique de la répartition des métaux en traces Cd, Pb, Cu, Zn et Mn dans la Seine et son estuaire. Oceanologica Acta 15(4), 347-354.
- Pedersén, M. (1968): *Ectocarpus siliculosus*: marine brown algae requiring kinetin. Nature 218, 5143.
- Perrone, C.; E. Cecere (1991): How *Sofieriafilifonnis* (Kützing) Gabrielson performs secondary attachment. J. Phycol. (supp.) 27 (3): 58.
- Provasoli,L (1968): Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: Cultures and Collection of Algae. (Eds: Watanabe,A; Hattori,A) Jap. Soc. Plant Physiol., Proc. U.S.-Japan Conf. Hakone, 63-75. (September 1966)
- Quadir, A; P.J. Harrison; R.E. DeWreede (1979): The effect of emergence and submergence on the photosynthesis and respiration of marine macrophytes. Phycologia 18, 83-88.
- Renger,G; U.,Schreiber (1986): Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plant research. In: Light emission by plants and bacteria. (Eds: Govindjee; Amesj; Forte,DC) Academic Press, London, 587-619.
- Rheault,RB; J.H.,Ryther (1983): Growth, yield and morphology of *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta) under continuous and intermittent seawater spray culture regimens. LPhycol. 19, 252-254.
- Rice,DL; B.E.,Lapointe (1981): Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. 11. Trace metal chemistry. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 54, 1-11.

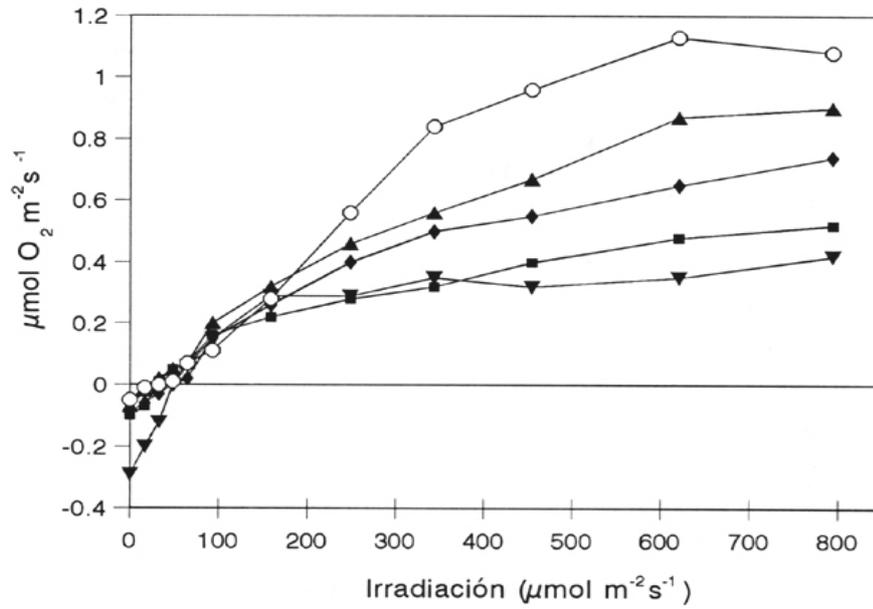
- 
- Robaina, R.R.; P. García; G. García-Reina; A. Luque (1990): Morphogenetic effect of glycerol on tissue cultures of the red seaweed *Grateloupia doryphora*. J. Appl. Phycol. 2(2): 137-143.
- Rohlf, FJ (1990): Numerical taxonomy and multivariate analysis system. (Exeter Software) Applied Biostatistics, New York. pp. 131.
- Ryther, JH; DeBoer, J.A.; Lapointe, B.E. (1978): Cultivation of seaweeds for hydrocolloids, waste treatment and biomass forenergy conversion. En: Procc. 9th International Seaweed Symposium. A. Jensen & J.R. Stein (Eds). Princenton, Science Press. pp. 1-16.
- Ryther, JH; N., Corwin; T.A., DeBusk; L.D., Williams (1982): Nitrogen uptake and storage by the red algae *Gracilaria tikvahiae*. Aquaculture 26, 107-115.
- Salinas, JM. (1991): El proceso de refijación en *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thur. (Gelidiales; Rhodophyta). Boletín Instituto Español de Oceanografía, Vol. 7(2), 3-59.
- Samson, G.; J.C. Morissette; R. Popovic (1988): Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PSII photochemistry. Photochemistry and Photobiology, 48: 329-333.
- Santelices, B (1989): Algas marinas de Chile. Universidad Católica de Chile ed., Santiago de Chile. pp. 399.
- Schramm, W. (1991): Cultivation of unattached seaweeds. En: Seaweeds Resources in Europe, uses and potential. M.D. Guiry & G. Blunden (Ed.). John Wiley & Sons Ltd. Reino Unido. pp. 379-408.
- Shacklock, PF (1992): Biology of *Idotea haltica* in *Chondrus* aquaculture. J. World Aquaculture Soc. 23(3), 241-249.
- Shacklock, PF; R.W., Doyle (1983): Control of epiphytes in seaweed culture using grazers. Aquaculture 31, 141-151.
- Shintani, RS (1988): Aspectos da biologia de *Agardhiella subulata* (C.Ag.) Kraft et Wynne e *Sofieria filiforinis* (Kuetzing) Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales) da praia do Codó, Ubatuba, Sao Paulo, Brasil. Master's degree Thesis, Instituto de Biociencias da Universidad de Sao Paulo. 107p.

- Starr, R.C.;J.A. Zeikus (1987): UTEX - The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. J. Phycol., 23 suppl.: 1-74.
- Steinberg,PD (1984): Algal chemical defense against herbivores: allocation of phenolic compounds in the kelp *Alaria marginata*. Science 223,405-406.
- Strómgren,T (1980): The effect of dissolved copper on the increase in length of four species of intertidal fucoid algae. Mar. Environ. Res. 3, 5-13.
- Sueur,S; C.M.G.,van den Berg; J.P.,Riley (1982): Measurement of the metal complexing ability of exudates of marine macroalgae. Limnol. Oceanogr. 27(3), 536-543.
- Thomas,TE; D.H.,Turpin (1980): Desiccation enhanced nutrient uptake rates in the intertidal alga *Fucus distichus*. Bot. Mar. 23, 479-481.
- Toth,R; R.T.,Wilce (1972): Virus-like particles in the marine alga *Chorda tomentosa* Lyngbye (Phaeophyceae). J.Phycol. 8, 126-130.
- Tseng,CK; X.G.,Fei (1987): Macroalgal commercialization in the Orient. Hydrobiologia 151/152, 167-172.
- Ugarte,R; B.,Santelices (1992): Experimental tank cultivation of *Gracilaria chilensis* in central Chile. Aquaculture 101, 7-16.
- Van Kotten, O.; C. Meurs; L.C. Van Loon (1990): Photosynthesis electron transport in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. Physiol. Plant., 80: 446-452.
- Van Kooten,O; J.F.H.,Snell (1990): The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth. Res. 25, 147-150.
- Van Etten, J.L.; L.C. Lane; R.H. Meints. (1991): Viruses and virus-like particles of eukaryotic algae. Microbiol. Rev., 55: 586-620.
- Veroy,RL; N.,Montaño; M.L.B.,de Guzmán; E.C.,Laserna; G.J.B.,Cajipe (1980): Studies on the binding of heavy metals to algal polysaccharides from Philippine seaweeds. 1. Carragenan and the binding of lead and cadmium. Bot. Mar. 23, 59-62.
- Viejo,RM; J.,Arrontes (1992): Interactions between mesograzers inhabiting *Fucus vesiculosus* in northern Spain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 162, 97-111.

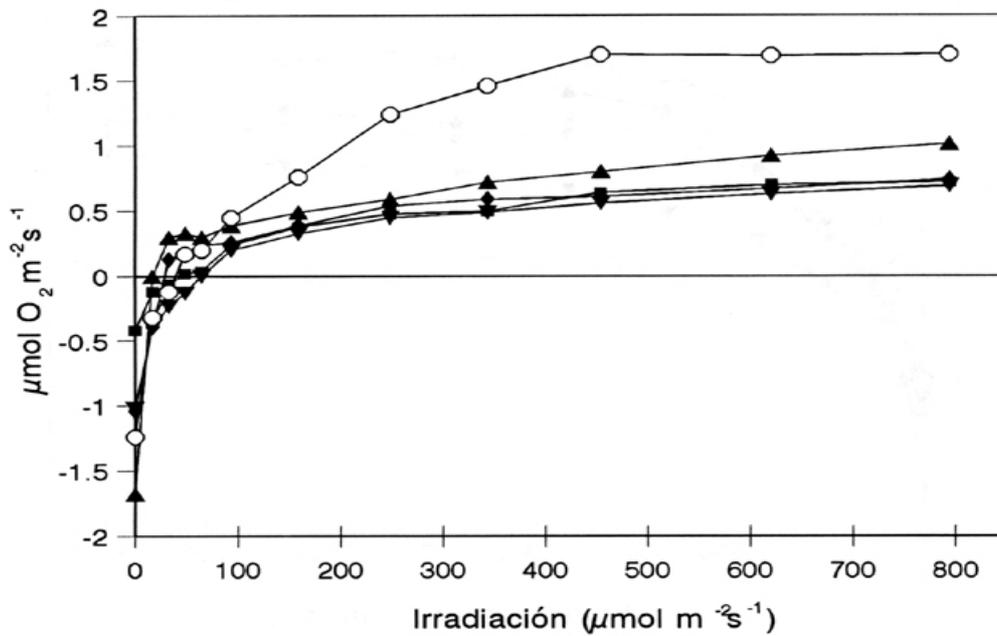
- 
- Waaland, J.R. (1977): Growth of pacific Northwest marine algae in semiclosed cultures. En: The marine plant biomass of the Pacific Northwest Coast. R.W. Krauss (Ed.). Corvallis Oregon State University Press. PP. 231-249
- Watson,DC; T.A.,Norton (1985): The physical characteristics of seaweed thalli as deterrents to littorine grazers. Bot. Mar. 28, 383-387.
- WhytejNC; J.R.,Englar (1983): Analysis of inorganic and organic-bound arsenic in marine brown algae. Bot. Mar. 26, 159-164.
- Yamamoto,T; Y.,Otsuka; M.,Okazaki; K.,Okamoto (1979): The distribution of chemical elements in algae. En: Marine Algae in pharmaceutical Science. (Eds: Hoppe,HA; Levring,T; Tariaka,Y) Walter de Gruyter, Berlin, 569-607.



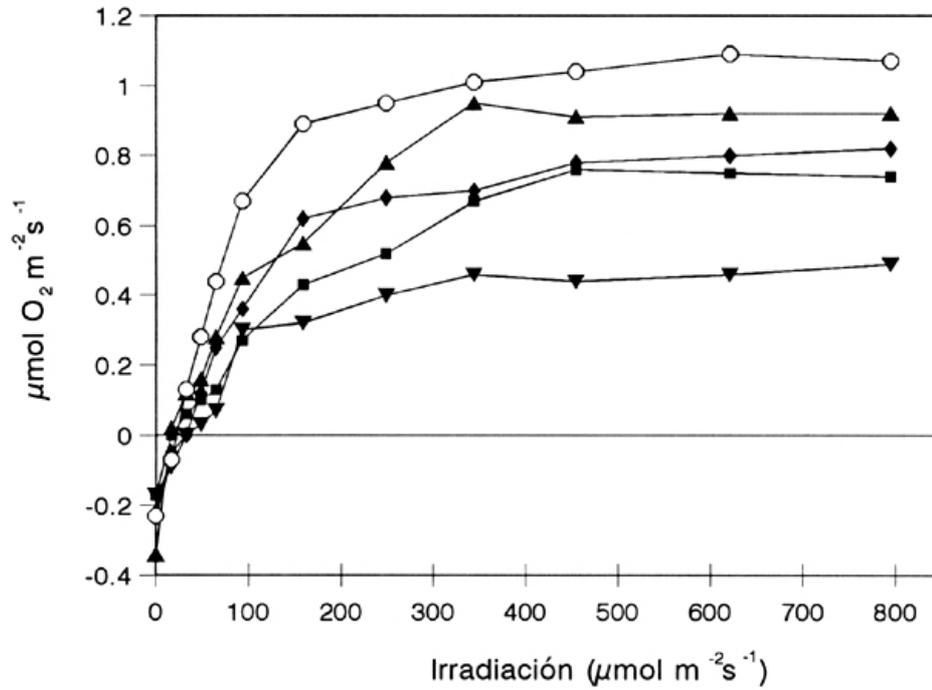




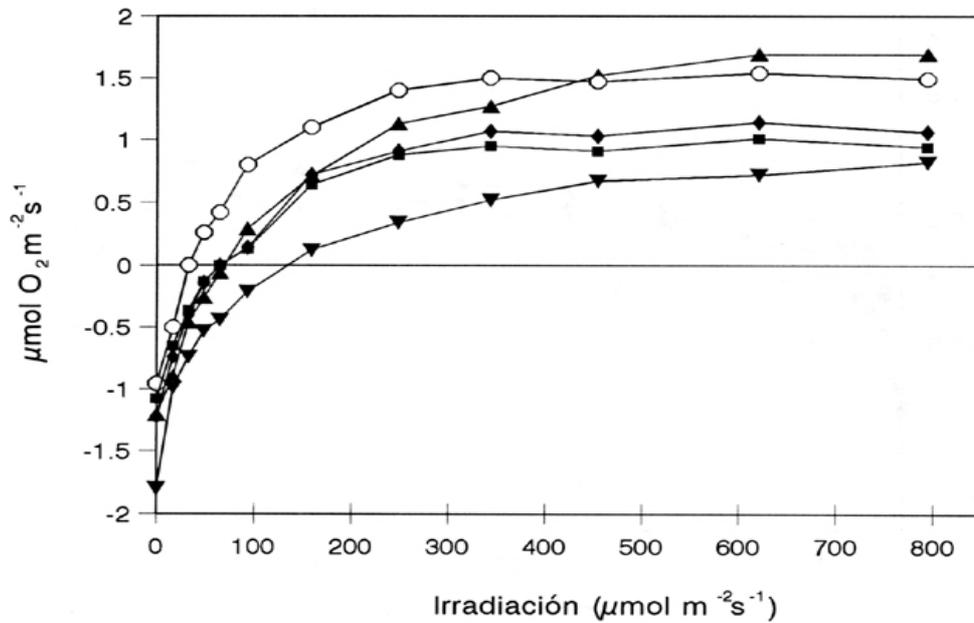
Curvas de fotosíntesis para *Grateloupia doryphora* tratada con  $\text{CuSO}_4$ , control (○), 0.5 (▲), 2.5 (◆), 5.0 (□), 10.0 (▼)  $\mu\text{M}$  Cu.



Curvas de fotosíntesis para *Gracilaria cornea* tratada con  $\text{CuSO}_4$ , control (○), 0.5 (▲), 2.5 (◆), 5.0 (□), 10.0 (▼)  $\mu\text{M}$  Cu.



Curvas de fotosíntesis para *Ulva rigida* tratada con  $\text{CuSO}_4$ , control (○), 0.5 (▲), 2.5 (◆), 5.0 (◻), 10.0 (▼)  $\mu\text{M}$  Cu.



Curvas de fotosíntesis para *Fucus spiralis* tratada con  $\text{CuSO}_4$ , control (○), 0.5 (▲), 2.5 (◆), 5.0 (◻), 10.0 (▼)  $\mu\text{M}$  Cu.