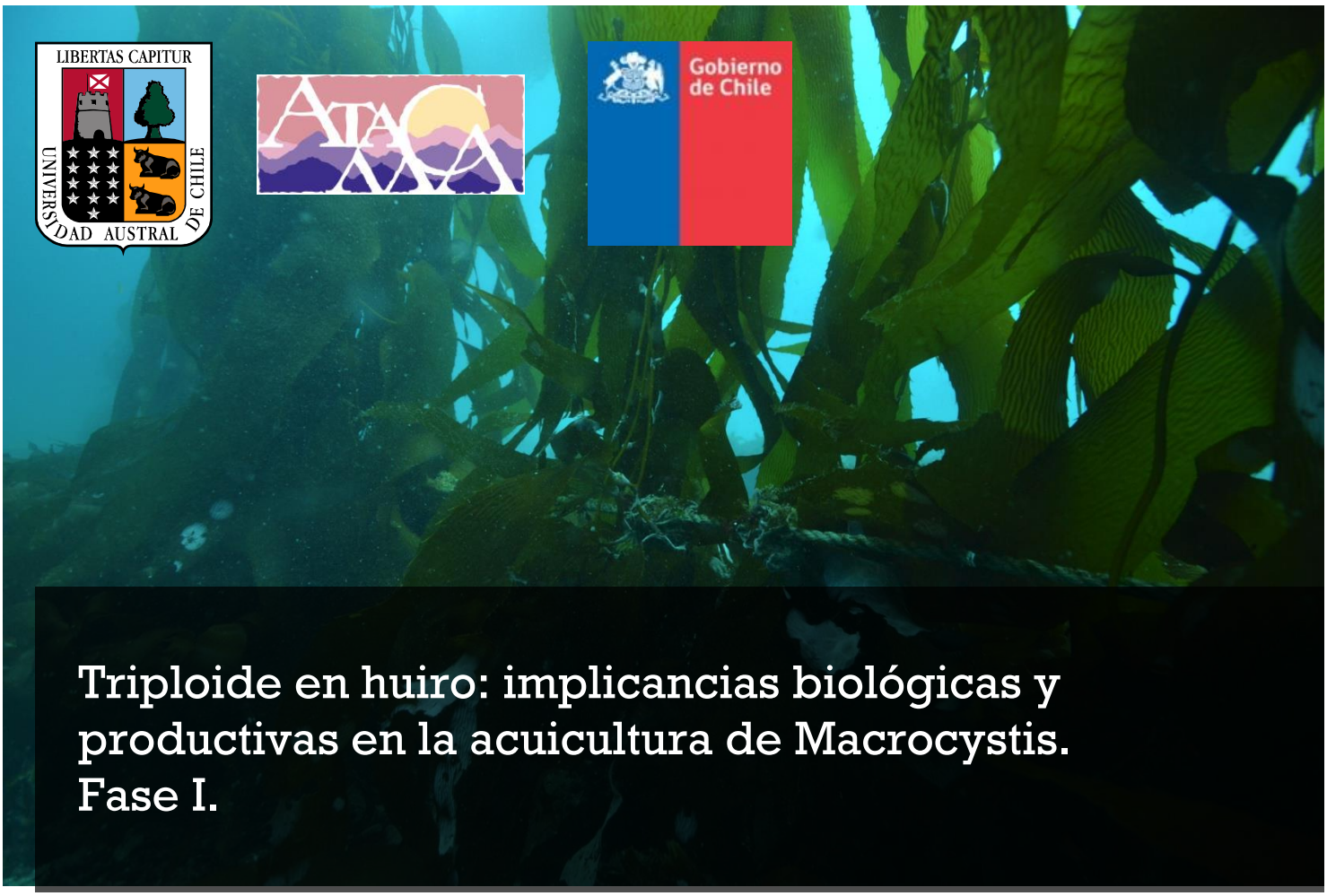


Triploide en huiro: implicancias biológicas y productivas en la acuicultura de Macrocystis. Fase I.

Dr. Renato Westermeier H.
Laboratorio de Macroalgas
Instituto de Acuicultura
Universidad Austral de Chile
Puerto Montt

Puerto Montt, 2015.

Triploide en huiro: implicancias biológicas y productivas en la acuicultura de Macrocystis. Fase I.

Director de proyecto

Dr. Renato Westermeier

Equipo científico y técnico

Dr. Renato Westermeier

Dr. Dieter Müller

Dr. Ingo Maier

Ing. Acuic. Pedro Murúa

Tec. Lab. y Mar. David J. Patiño

Tec. Lab. Paola Aguilera

Buzo. Carlos Atero

Buzo. Jaime Martínez

Tec. Adm. Lucia Barros

2015

Informe final del proyecto financiado por el Gobierno Regional de Atacama, Fondo para la innovación y la competitividad FIC 2013.N° 33-01-244, Triploidía en huiro: implicancias biológicas y productivas en la acuicultura de Macrocystis. Fase 1.

Se prohíbe reproducción total o parcial de la información contenida en este documento sin previa autorización del Gobierno Regional de Atacama y de los autores.

Citar este reporte como:

Westermeier R, Müller DG, Maier I, Patiño DJ, Murúa P, Aguilera P, Atero C, Martínez J, Barros L (2015) Triploidía en huiro: implicancias biológicas y productivas en la acuicultura de *Macrocystis*. Fase I. Informe final proyecto FIC Atacama. Universidad Austral de Chile, Puerto Montt. 97 pp.

Imagen de portada: Individuo adulto triploide de Macrocystis, cultivado en la Región de Atacama

Tabla de contenido

RESUMEN EJECUTIVO 6

1. INTRODUCCIÓN 9

A. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS DEL HUIRO EN CHILE 9
A. BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA 10
B. TAXONOMÍA DE LA ESPECIE *MACROCYSTIS PYRIFERA* (SEGÚN GUIRY & GUIRY 2015). 12
B. ANTECEDENTES ECONÓMICOS DEL HUIRO EN CHILE 12
A. PESQUERÍA DEL HUIRO 12
B. ACUICULTURA DEL HUIRO 13
C. USOS ACTUALES Y POTENCIALES DEL HUIRO 16
C. TRIPLOIDÍA EN ESPECIES MARINAS 20
D. OBJETIVOS DEL PROYECTO 22
A. OBJETIVO GENERAL 22
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22

2. MATERIALES Y MÉTODOS 23

A. OBTENCIÓN DEL MATERIAL REPRODUCTIVO DE *M. PYRIFERA* 23
B. DIPLOIDIZACIÓN DE GAMETOFITOS DE *M. PYRIFERA* 23
C. CRUZAMIENTO DE GAMETOFITOS HAPLOIDES Y DIPLOIDES DE *M. PYRIFERA* 24
D. CULTIVO EN LABORATORIO 26
E. CULTIVO EN EL MAR 28
F. ANÁLISIS DE NUTRIENTES EN AGUA DE BAHÍA INGLESA Y BAHIA SALADO 29
G. CITOMETRÍA DE FLUJO 29
H. MORFOMETRÍA 29
I. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ALGAS TRIPLOIDES 29

3. RESULTADOS 30

A. VIABILIDAD DE CRUZAMIENTOS DE *M. PYRIFERA* CON DIFERENTES NIVELES DE PLOIDÍA EN LABORATORIO 30
B. CRECIMIENTO DE CRUZAMIENTOS DIPLOIDES Y TRIPLOIDES BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO 33
C. CRECIMIENTO DE *MACROCYSTIS* TRIPLOIDES EN CONCESIONES ACUÍCOLAS DE LA REGIÓN DE ATACAMA 36
D. ANÁLISIS DE NUTRIENTES EN AGUAS DE BAHÍA INGLESA Y B. SALADO 41
E.* COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PROXIMAL ENTRE CRUZAMIENTOS DIPLOIDES Y TRIPLOIDES DE *MACROCYSTIS 44
F. CITOMETRÍA DE FLUJO 47
G. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CROMOSOMAS 48

4. DISCUSIÓN 49

5. CONCLUSIONES 53

I. BIBLIOGRAFÍA 57

J. ANEXOS 63

A. ANEXO A. CRECIMIENTO SEMANAL DE CRUZAMIENTOS DIPLOIDES Y TRIPLOIDES EN CONDICIONES DE LABORATORIO. 63

I. Primer Inoculo (Octubre 2013) 63
II. Segundo Inoculo (Abril 2014) 66
III. Tercer Inóculo (Junio 2014) 71
B. Anexo B. Crecimiento mensuales de cruzamientos diploides y triploides de Macrocystis en el mar 75
I. Siembra 1 (Marzo 2014) 75
II. Siembra 2a (Agosto 2014) 79
III. Siembra 2b (Octubre 2014) 84
C. Anexo C. Tasas de crecimiento relativas máximas de cultivos de Macrocystis y su relación con la concentración de nutrientes en el mar 89
D. Anexo D: Composición química de Macrocystis diploides y triploides 91
I. Primera siembra 91
II. Segunda y tercera siembra (B. Inglesa) 93

Resumen ejecutivo

Históricamente, *Macrocystis* (huiro) ha sido un recurso marino altamente demandado en la región de Atacama. Gracias a iniciativas desarrolladas por el laboratorio de Algas de la Universidad Austral de Chile, por más de 10 años el cultivo de esta especie se ha estado desarrollando y perfeccionando, llegando, tanto en el Norte como en el sur de Chile, a escalas piloto y pre-comercial con variedades de alto desarrollo. Durante estas mismas iniciativas se lograron desarrollar variedades mejoradas, inóculos capaces de crecer más rápido y lograr mejores biomasas y contenidos químicos de mayor valor en pocos meses, pero difícil de proteger del plagio. La solución propuesta para este problema es la inducción a la diploidía de gametofitos, que permitiría formar esporofitos triploides los que tendrían propiedades de ser más productivos y como consecuencia de ello entregarían mayores aportes de biomasa.

Se logró producir una variedad de gametofito diploide con el uso de la sustancia química conocida como colchicina, a la que se denominó Mpyr1 (2n). Esta variedad, previa corroboración de la ploidía mediante técnicas morfométricas y luego con el uso de la citometría de flujo, se cruzaron con variedades de distintos orígenes de *Macrocystis pyrifera* e *integrifolia*, formando esporofitos triploides, lográndose un 50% de éxito en los diferente cruces realizados, lo que es similar a los cruzamientos intra- o inter-específicos diploides. En total se hicieron tres activaciones de esporofitos, los que posteriormente a la etapa de laboratorio fueron sembrados en el mar. En ellas se evaluaron la fenología de reproducción, crecimiento, sobrevivencia y composición química. Al mismo tiempo se evaluó si estos esporofitos triploides formaban esporas, germinaban y si finalmente los gametofitos formados luego del proceso de germinación eran viables sexualmente.

Los resultados obtenidos, presentaron ventajas importantes al cultivar triploides en relación a cultivos normales de *Macrocystis*. Así ya en el

Laboratorio, algunos cruzamientos triploides lograron mayores tasas de desarrollo, medidos en tasas de fertilidad (menores tiempos de formación de cigotos). De igual forma, algunos triploides tuvieron mayores tasas de crecimiento en laboratorio hasta formar plantas aptas para la siembra (10 cm), siendo necesarios 2-3 semanas menos en los triploides. Otros tuvieron la capacidad de mantenerse mayores tiempos en el laboratorio, sobrevivir y seguir creciendo en estanques hasta la talla de 45 cm, situación que raramente se observa en cultivos de esporofitos diploides.

Si bien es cierto en el laboratorio las diferencias entre el crecimiento de cultivos diploides y triploides fue mínima, los cultivos en el mar fueron en su totalidad mayores en los triploides en cada condición experimental, independiente de la época de siembra o la localidad. Los mejores triploides lograron 5 metros de longitud en un periodo de 5 a 6 meses de cultivo, valores similares a las que logra Macrocystis en su hábitat natural, pero en un tiempo mayor y dependiendo de la estacionalidad. Los mejores resultados se obtuvieron en la siembra de Marzo 2014, ya que en los meses siguientes se produjo una proliferación de briozoos, que corresponden a epibiontes coloniales, lo que se tradujo en una disminución de las productividades. Estas proliferaciones son consideradas un punto crítico en la maricultura de Macrocystis en la región.

La composición química no fue significativamente distinta entre cruzamientos triploides y diploides, y al igual que en estudios anteriores mostro marcadas diferencias a nivel de los distintos órganos de la planta. Así es como las esporofilas, que corresponden a frondas reproductivas, alcanzaron una mayor cantidad de lípidos que otras secciones del talo analizados. Los hidratos de carbono, en cambio, fue el mayor constituyente químico presente en los talos de Macrocystis. Razón que justifica su uso en las industrias relacionadas con

alimentación (animal y humana), ficocoloides (alginatos) y eventualmente biocombustibles.

Los resultados obtenidos en este proyecto, revelan claramente diferencias notables en productividad entre los esporofitos diploides y los triploides producidos en este proyecto. Estos hallazgos apuntan sin duda a su uso como una futura alternativa en la maricultura de Macrocystis. Sus mayores tasas de crecimientos, sumados a su inviabilidad reproductiva son entre otras, ventajas a considerar al momento de transar variedades en el mercado que no se pueden plagiar fácilmente. Queda pendiente, no obstante, evaluar económicamente un eventual escalamiento de la producción de estos triploides considerando ventajas económicas de interés como son las resistencia a plagas o enfermedades, mayor palatabilidad, mejor calidad de alginatos u otros compuestos de importancia comercial, entre otros. Se debe agregar a lo anterior mayores pruebas experimentales de estos poliploides, entre ellos, especialmente triploides y tetraploides, cuyos resultados serán sin duda un aporte al desarrollo de nuevos usos, de diversificar el valor agregado, lo que sentará las bases científicas en el desarrollo de la agronomía marina en Chile.

1. Introducción

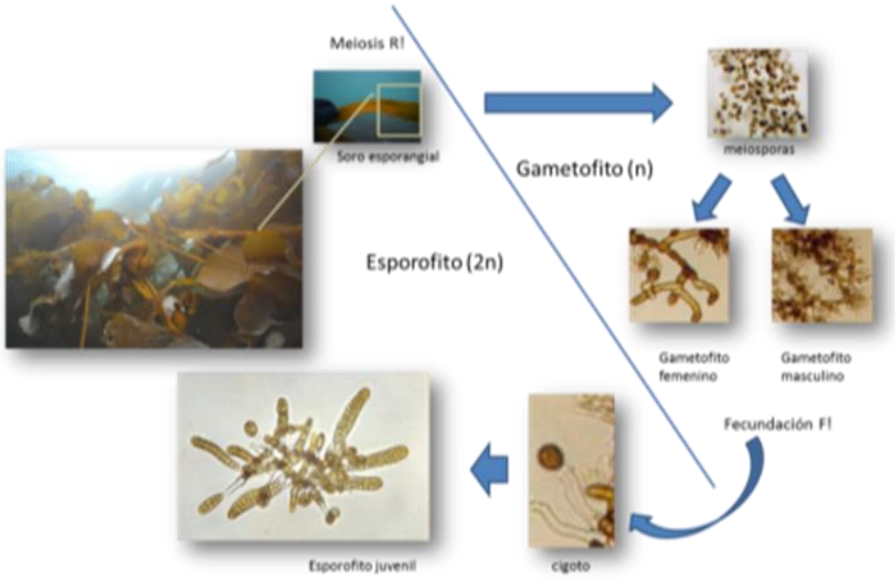
a. Antecedentes biológicos del huiro en Chile

Macrocystis es un género de algas pardas conocido como huiros o sargazo, alcanzan grandes tamaños, superando fácilmente los 15 m de longitud. Se adhiere al sustrato mediante un disco de fijación, del cual surgen cauloides, lo que terminan en numerosas frondas laterales provistas de un aerocisto piriforme basal, para la flotabilidad (Hoffman & Satelices 1997). Tienen distribución bipolar, específicamente a lo largo de las costas del Pacífico de México y Estados Unidos -incluido Alaska- en el hemisferio norte (Schiel & Foster 2015) y desde Perú hasta Cabo de Hornos en la costa sur Pacifica y sur de Argentina y Falkland Islands en el Atlántico Sur-occidental (Hoffmann & Santelices 1997; Asensi & Küpper 2012). También es posible encontrarla en Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (Attwood et al. 1991; Graham et al. 2007). En Chile, se distribuye en toda su costa, desde Arica hasta el Cabo de Hornos (Westermeier 1980; Santelices & Ojeda 1984), distinguiéndose dos morfologías que alguna vez se agruparon como especies hermanas: *Macrocystis integrifolia* y *M. pyrifera,* y cuya gran diferencia se basa en la morfología del disco de fijación.

Recientemente, se ha demostrado que 1) las especies de *Macrocystis* son inter-fértiles, 2) que hay formas con morfologías intermedias en el ambiente natural y 3) que el género exhibe una gran plasticidad fenotípica, lo cual ha sugerido reclasificarla como una sola especie: M. pyrifera (Graham et al. 2007; Westermeier et al. 2007; Demes et al. 2009; Macaya & Zuccarello 2010). Actualmente el laboratorio de algas de la Universidad Austral de Chile en la sede Puerto Montt posee material de ambos morfos en su banco genético y que fueron utilizados en el marco de este proyecto.

a. Biología y ciclo de vida

Las algas pardas Laminariales (grupo al que pertenece *Macrocystis*) poseen, típicamente, un ciclo de vida bifásico y heteromorfo. Las plantas que se observan en los bosques submareales corresponden al esporofito (diploide/2n). Tras alcanzar la madurez sexual, estos esporofitos llevan en sus frondas los esporangios, donde ocurren procesos meióticos con la liberación de esporas (haploides/n). Dichas esporas liberadas al mar, las que al germinar, forman un 50% gametofitos masculinos (n) y 50% gametofitos femeninos (n). Estas estructuras sexuales son microscópicas y que alcanzan su madurez. Estos gametofitos son capaces de formar espermatozoides (machos), los que son atraídos por las células huevos. Tras su fusión se forman los cigotos (2n), los que a través de sucesivas divisiones crecerán y generaran un embrión de pocas células y más tarde al individuo adulto, completándose el ciclo (Schiel & Foster 2015).



Ciclo de vida de Macrocystis pyrifera

Sin embargo, Westermeier et al. (2012b; 2014a) establecieron dentro del marco del proyecto FIC Atacama 2013 N°33-01-244 una nueva variante del ciclo de vida, donde a través de fragmentación del disco de fijación (o grampón), se pueden generar nuevos individuos. Esta fragmentación puede ser por causas naturales (muerte de una sección del disco) o antropogénicas (como las que se utilizaron para el repoblamiento de estos recursos).

Trozos de disco de fijación, creciendo en diferentes sustratos.

b. **Taxonomía de la especie *Macrocystis pyrifera*** (según Guiry & Guiry 2015)***.***

- Imperio: Eukaryota
- Reino: Chromista (Chormoalveolata)
- División: Ochorophyta (anteriormente conocida como Heterokontophyta)
- Clase: Phaeophyceae
- Orden: Laminariales
- Familia: Lessoniaceae
- Género: Macrocystis
- Especie: Macrocystis pyrifera (LC Agardh) (morfo pyrifera)
- Nombre común: Huiro

b. Antecedentes económicos del huiro en Chile

a. Pesquería del huiro

La obtención de Macrocystis en Chile desde sus inicios hace más de 40 años hasta ahora ha sido basada en la pesquería. Esta actividad -que comenzó muy focalizada en el norte grande de nuestro país- se extiende actualmente entre las XV y la X regiones, con desembarques que superaron los 30.000 ton año-1 en el 2013 (Sernapesca 2015). La mayoría de esta biomasa es destinada para abastecer las empresas abaloneras en el norte de Chile (ver sección: Usos actuales y potenciales del huiro).

La pesquería del huiro así como la de algas marinas chilenas en general se caracteriza por ser una actividad 100% realizada por algueros/pescadores artesanales. Sus métodos de cosechas han sido muy cuestionados por entidades de gobierno y la academia, pero estudios realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que los métodos convencionales de cosecha para M. pyrifera, (específicamente el morfo integrifolia de Bahía Chasco) y utilizados

por pescadores son los más idóneos desde un punto vista biológico y práctico (Westermeier et al. 2014b). Este se caracteriza por la remoción completa de individuos longevos, los que no están firmemente fijos al sustrato y una remoción parcial de individuos más jóvenes, que al emplear la misma fuerza para extraerlos solo son removidos parcialmente. Esto constituye una forma de raleo exitoso, que ha mantenido la población de huiros estable. En las variaciones estacionales de producción, como de cosecha regulada, incluso ello ha ayudado al proceso de reclutamiento de nuevos individuos y con ello la renovación de la población. Sin embargo, no se tiene claridad si con cambios a nivel de extracción, al aumento de algueros por localidad o el aumento de la cuota, generaría cambios irreversibles en su dinámica poblacional.

b. Acuicultura del huiro

Uno de los géneros de algas pardas con mayor estado de conocimiento en Chile y a nivel mundial es *Macrocystis*. Los primeros intentos de cultivo en Chile fueron llevados a cabo por Braud et al. (1974), quienes sembraron esporas en cordeles de nylon y cuyos esporofitos alcanzaron hasta 15m de longitud cuando fueron transportados a costas francesas. Otros estudios llevados a cabo por Etcheverry & Collantes (1978); Candia et al. (1979); Alveal et al. (1982) y Westermeier et al. (1989) fueron pioneros en el cultivo de fases tempranas de *Macrocystis*, determinando factores claves para el desarrollo de los esporofitos como condiciones de luz y temperatura entre otros. Estudios más tardíos en fases microscópicas fueron desarrollados por Celis-Plá & Alveal (2003) y Palacios & Mansilla (2003), ambos enfocados en el estudio del ciclo de vida hasta esporofito inicial y juvenil y su aproximación para el cultivo. En condiciones de laboratorio se estimó que los gametofitos crecen a mejores tasas con un fotoperiodo de día largo, a 12°C y entre 25-52 µmol m-2 s-1 de irradiación (Westermeier et al. 1989). Autores que manejaron temperaturas o fotoperiodos menores obtuvieron gametofitos igual de viables,

pero a un tiempo de cultivo mayor (Etcheverry & Collantes 1978; Devinny & Leventhal 1979).

Dada la importancia que tomaba *Macrocystis* en la industria de los abalones varios autores tuvieron éxito con el cultivo en el mar de esta especie. La mayoría de las pruebas fueron hechas con material originado de esporas, siguiendo el método de cultivo japonés de *Laminaria* (Kawashima 1993). Este método consiste en inoculación directa de esporas sobre cordeles, en donde ocurren la mayoría de los procesos ontogénicos del alga. Cuando el esporofito se hace visible al ojo desnudo, el cordel es llevado al mar y enrollado cuidadosamente sobre la línea madre. Bajo este sistema, Gutierrez et al. (2006) logró biomasas de *M. pyrifera* de 14,4 kg m-1 en 8 meses de cultivo en el mar, mientras que Buschmann et al. (2008) obtiene biomasas significativamente mayores a través de acuicultura integrada (25 kg m-1 en 5 meses) con la misma especie. Macchiavello et al. (2010) logró 22 kg m-1 en 5, meses cultivando *M. pyrifera* en el norte de Chile. El sistema presenta como principal ventaja su fácil implementación, pero exhibe una alta variación en sus resultados productivos dada la alta competencia intra-especifica así como con otros epibiontes, con lo cuales compiten por luz, nutriente y/o sustrato desde que los esporofitos son muy pequeños.

De forma paralela a estos trabajos realizados con esporas en el norte y sur de Chile, Westermeier et al (2006) desarrolló un método de producción masiva de esporofitos, los cuales presentaban dos características distintivas: i) por una parte eran generados a través del cruzamiento de gametofitos puros, y por otro lado ii) los esporofitos originados eran de vida libre, siendo cultivados en estanques e inoculados a la línea madre cuando forman disco de fijación (entre 3 y 10 cm de longitud) (Westermeier et al. 2005; 2006; 2007; 2010; 2011)
Cultivar a base de gametofitos mostró ventajas competitivas inmediatas. En general las esporas presentan una variación estacional en su viabilidad, variando ampliamente el grado de germinación y desarrollo de los estadios

sucesivos acorde a las condiciones ambientales a las cuales son sometidas en su ambiente natural (Westermeir et al 1989; Tala et al. 2004; Murúa et al. 2013). Aun así es muy frecuente encontrarse con bacterias y algas competidores – como diatomeas, algas epifitas o algas verdes unicelulares – que finalmente contaminan el cultivo, retrasan el crecimiento y terminan por eliminar a las jóvenes plantas (Westermeier et al. 2005; 2006; Shea & Chopin 2007; Müller et al. 2008)

Sin embargo, la ventaja más destacable de cultivar desde gametofitos fueron los rendimientos productivos. Sólo por el hecho de partir desde la fase gametofítica se redujeron entre 2-4 semanas de cultivo en laboratorio, que es el tiempo que las esporas tardan generalmente en formar gametofitos (Westermeier et al. 1989; 2005; 2006). Lo más importante aún, poseer diferentes cultivos de gametofitos tanto hembras como machos permitió realizar cruzamientos selectivos, generando variedades mejoradas (o incluso híbridos entre las dos especies de Macrocystis), que gracias al "efecto heterosis" o "vigor híbrido" exhibieron atributos productivos optimizados: altas tasas de crecimiento, altas biomasas en el mar, características fenotípicas (morfología) idénticas entre los individuos de cada batch, composición química homogénea con cantidades considerable de proteínas y lípidos e hipertrofia de ciertas secciones del talo entre otras (Westermeier et al. 2007; 2010; 2011; 2012). Estas variedades pueden ser elegidas de acorde al contexto productivo en que se pretenda cultivar y en cualquier estación del año, permitiendo proyectar una producción constante e ininterrumpida en el tiempo en concesiones de cultivo.
En el mar los valores de biomasa por planta son marcadamente mejores llegando hasta valores de 8 a 10kg por planta, lo que significa sobre 50 kg por metro lineal (Westermeier et al 2015)

En estos momentos, poseer estos cultivos unisexuales de gametofitos es fundamental para el mejoramiento del cultivo de Macrocystis desde el punto de vista biológico y genético, ya que se pueden mantener creciendo

vegetativamente en el tiempo en laboratorio, por más de 10 años, sin perder potencial reproductivo (Westermeier et al. 2006; Müller et al. 2008; Westermeier et al. 2010). Estos gametofitos son la base para este proyecto, ya que es a través de su ‘‘manipulación’’ se formaron esporofitos triploides. Estos gametofitos ‘‘diploides’’ al ser únicos y no presentes de forma natural podrán ser sometidos a un proceso de patentamiento, lo cual asegura la exclusividad de los resultados y/o productos obtenidos. Sin embargo ello deberá ser investigado con mayor dedicación, ya que en este proyecto se establece por primera vez en la literatura de Macrocystis que estos gametofitos descritos siempre como haploides, podrían ser ‘‘diploides’’, encontrarse en la naturaleza y con ello no solo el ciclo de vida sería diferente, sino que también las políticas de cultivo y manejo podrían ser diferentes.

c. Usos actuales y potenciales del huiro

A comienzos de los 90 había autores que postulaban que en países como Chile no era necesario un cultivo de algas pardas para la industria de alginatos, debido a la gran disponibilidad de la materia prima en el ambiente natural (Oliveira 1989). No obstante, desde ya en esa época se pensaba en el cultivo como alternativa para recuperar áreas sobreexplotadas y en un futuro complementar a la demanda de materia prima para ácido algínico, y como alimento fresco para haliótidos y equinodermos comestibles.

Gran parte de la importancia pesquera de las algas pardas está justificada en su rol como materia prima para la obtención de ácido algínico, un polímero formado por segmento de ácido D-manurónico, acido L-gulurónico y de secuencias mixtas de ambos (Larsen 1981). Sus aplicaciones abarcan la industria textil, de alimentos, del papel y farmacéutica, entre otras , y se obtienen de algas del orden Fucales, Laminariales y Durvilleales. En Sudamérica la extracción de alginatos es relativamente nueva, y está sustentada principalmente por los géneros Lessonia y Macrocystis, cuyas reservas naturales, una de las mayores del mundo, se encuentran en las costas de Chile

y sur de Argentina (Vasquez & Fonck 1993). A pesar de un marcado aumento de 4 veces más en la producción de alginato en los últimos 10 años, Chile se ha caracterizado por ser un productor de materia prima, lo cual queda perfectamente reflejado en el cerca de 90% del alga seca exportada a Japón, Reino Unido, Estados Unidos y Francia, principales productores de este hidrocoloide (McHugh 2003).

Las tendencias productivas en la fabricación de este polímero muestran que en caso que no aparezca otro coloide con mejores características (calidad, rendimiento y/o precio) y la industria se mantenga relativamente estable en el tiempo, habrá un incremento sostenido en la elaboración de alginatos, dado el aumento demográfico y aumento de calidad de vida de las personas, lo cual se encuentra asociado directamente a la masificación de productos de mayor elaboración (Jensen 1993). En este escenario Chile podría ser protagonista en la contribución de alga seca para los grandes productores o bien, siendo optimistas, insertándose en la industria de los alginatos, autoabasteciéndose de la materia prima y reduciendo costos de transporte y logística de la misma.

La industria de los abalones es el otro fin que las algas pardas tienen como destino final. En contexto global donde los desembarques de haliótidos por concepto de pesquerías iban en constante decrecimiento y la demanda de esta exquisitez quedaba insatisfecha, a comienzos de los 90 se decide introducir las especies *Haliotis rufescens* y *Haliotis discus-hannai* por parte de Fundación Chile y de la Universidad Católica del Norte, respectivamente, de las cuales la primera se perfilaba como el nuevo protagonista del escenario productivo y diversificación de la acuicultura. A partir de esa época se han abierto empresas en Atacama, Coquimbo, Valparaíso, Los Ríos y Los Lagos del país de producción de este gastrópodo, demostrando ser un actividad altamente rentable, con un aumento en su producción en el periodo 1999-2013 de más de diez ordenes de magnitud

(Sernapesca 2015). En este contexto algunas empresas tienen proyectado producir en el mediano plazo 1000 ton (Salinas com. pers).

En Chile, los hábitos alimenticios de este organismos están restringidos principalmente a Macrocystis y en menor grado a Lessonia trabeculata en el norte de Chile (Westermeier et al. 2006; 2012 b) mientras en el sur las dietas están compuestas por Macrocystis en su mayoría y Gracilaria chilensis en menor grado. Se estima que 50 ton de abalón consumen entre 400 – 500 ton de alga húmeda por año (Subpesca 2006), o dicho de otra forma, se necesitan 23kg de alga húmeda para engordar un 1 kg de carne, cantidad no menor considerando que los volúmenes de desembarque antes mencionados están en aumento y que logra entre los 2-5 años su talla comercial. Por lo mismo uno de los desafíos de la industria abalonicultora es mantener el crecimiento sostenido de la actividad, asegurando los requerimientos alimenticios de los planteles de abalón en cultivo a través del alga proveniente del medio, o bien, un poco más riesgoso, probando dietas artificiales altamente inestables en el agua dados los problemas de lixiviación en corto tiempo que sufre. La solución más concreta en este caso es trabajar las praderas naturales a través de un modelo de manejo para obtener de forma constante las cantidades necesarias para alimentar, o, en última instancia, desarrollar un cultivo donde se conozcan las biomasas finales para de esta forma poder proyectar las producciones finales de abalón en un tiempo determinado.

Otro uso potencial de algas pardas del genero Macrocystis es la de biocombustibles. Nuestra dependencia a los combustibles fósil es un problema tanto porque promueve al aumento de la cantidad de gases invernadero y por la baja disponibilidad de este recurso finito, siendo su extracción cada vez más costosa (Jeason & Carrera 2000). Dado este contexto han surgido varias fuentes alternativas de generación de energías ‘‘limpias’’, con bajo impacto medioambiental y renovables, entre las que destacan las del tipo termosolar, eólica, hidráulicas y las proveniente de biomasa, de materia orgánica de

origen animal o vegetal, generalmente madera y desechos de maderas o residuos de la industria agrícola, desechos de animales, desechos de la industria de los alimentos, plantas acuáticas y algas (Demirbas et al. 2009). China e India son potencias productoras de biogás con miles de plantas instaladas (Hall & House 1995), mientras que Brasil es potencia sudamericana en la producción de bioetanol a base de caña de azúcar, autoabasteciéndose en un alto porcentaje en combustibles para el uso de automóviles (Klass 1998).

Las algas pardas poseen un alto contenido de carbohidratos de fácil degradación, haciéndolas idóneas para la producción de biocombustibles líquidos como bioetanoles o producción de biogás a base de metano (Horn 2000; Horn et al. 2000). Por otro lado, las algas marinas son un recurso atractivo dado que generan rendimientos de gas que son comparables o mejor que otros sustratos. Según las estructuras de los polisacáridos de las algas marinas, éstas debieran ser convertidas eficazmente a metano, junto con ello las algas presentan altas concentraciones de agua (70% - 90%) y un contenido bajo de lignina lo que favorece la producción, constituyendo un sustrato conveniente (Chinoweth & Fannin 2002)

El etanol es uno de los más importantes productos químicos orgánicos, debido a su combinación única de propiedades como solvente, combustible, germicida, bebida, anticongelante y como producto intermedio en la producción de otros productos químicos. A diferencia de la serie de reacciones que conlleva la producción de metano, al ser un producto intermedio es mucho más simple, pero que necesita cepas específicas para su producción. Las más usadas son la levadura Saccharomyces cerevisiae y la bacteria Zymomonas mobilis (Rogers et al. 2007) y en general se produce con cualquier producto que contenga azúcar, siendo la más eficiente la caña de azúcar, con 7.080 litros/ha (Fuente: Petrobras Brasil). Hoy, las materias primas utilizadas en la fabricación de etanol por fermentación se clasifican como azúcares, almidones y materiales

celulósicos (Bailey & Ollis 1986). Los azúcares se pueden convertir directamente al etanol, mientras que los almidones primero tienen que ser hidrolizados a azúcares fermentables por la acción de enzimas. Asimismo, la celulosa debe ser convertida en azúcar antes de la fermentación, generalmente por la acción de ácidos minerales (Bashir & Lee 1994).

A pesar de ser una tecnología con poco nivel de desarrollo tecnológico, poco a poco los biocombustibles se empiezan a trasformar en una alternativa real como fuente energética. Las algas podrían jugar un rol relevante como materia prima de esta incipiente industria, y dado los requerimientos energéticos proyectados en el mediano plazo va a ser fundamental asegurar dicho abastecimiento, a través de pesquerías sustentables o desarrollo de cultivos masivos. Prueba de lo anterior es el proyecto Innova Corfo, consorcio conformado por BAL Chile, Universidad de Los Lagos y empresas del rubro energético, y pretende cubrir el 10% de la demanda de combustible de la Región de los Lagos. Para ello se requerirán más de 10,000 hectáreas de alga sembradas a nivel nacional; sin embargo, este proyecto al parecer no fue viable, y no se conoce luego de algunos años de finalización el verdadero aporte en los objetivos que se plantearon. Al menos al cultivo que fue más bien experimental en áreas de mayor superficie sembrada, no se conocen nuevos aportes de lo ya discutido y conocido en la literatura de esta especie.

c. Triploidía en especies marinas

Cada especie de organismo posee un número constante de cromosomas, la molécula que contiene la información genética, siendo, en la mayoría de los cosas, una dotación diploide (2n). Poliploidía, en términos generales, se describe como los casos en donde se encuentran múltiplos de más de dos dotaciones haploides de cromosomas en un organismo (Lacadena 1981; Arai & Fujimoto 2013). Por lo general, un organismo poliploide con un número impar de cromosomas homólogos no produce gametos genéticamente equilibrados, por los que organismos triploides (3n), tetraploides (4n), pentaploides (5n) y

similares no se encuentran generalmente en especies que dependen exclusivamente de la reproducción sexual para su proliferación (Klug et al. 2006). Por la misma razón esta situación es relativamente rara de forma natural en muchas especies animales, aunque está bien documentada en algunas lagartijas, anfibios y peces. Por otro lado, en organismos vegetales es más común, dado que en casi la totalidad de los casos poseen un ancestro poliploide en común y que significa, en muchos casos, el comienzo de un proceso de especiación inclusive en nuestros días (Hilu 1993; Wood et al. 2009).

Es muy frecuente que en términos productivos se utilice la poliploidía (específicamente la triploidía) para mejorar los rendimientos de las cosechas. De hecho, estos organismos triploides son muy comunes en agricultura tradicional, alcanzando más del 80% de los cultivos a nivel mundial (Leitch & Leitch 2008). Mucho menos común que las plantas triploides, los triploides animales se encuentran preferentemente utilizados en producción acuícola, particularmente en peces y moluscos (Piferrer et al. 2009; Flajšhans et al. 2010). La mayor ventaja de los triploides usados en estas instancias es que los individuos generados son estériles dado un bajo desarrollo de las estructuras reproductivas. Este fenómeno se traduce en una redistribución de la energía en crecimiento y desarrollo de otros tejidos, alcanzando tallas comerciales más rápidamente. Esto además tiene otra ventaja productiva al permitir el patentamiento que otras técnicas como el manejo genético o la hibridación no permiten tan fácilmente. Otras ventajas secundarias asociadas a organismos triploides son: la generación de plantas sin semillas o uniformidad en el compartimento de animales con alta territorialidad.

En general hay varios estudios relacionados con la variación en la ploidía de algas pardas, mucho de los cuales tienen que ver con los ciclo de vida de algas y su implicancia en ecología y evolución (ver Lewis 1996 y referencias alli). Sin embargo, estudios relacionados con el ciclo de vida del alga filamentosa

Ectocarpus siliculosus (Phaeophyceae; Ectocarpales) permiten concluir claramente que al igual que en plantas superiores y animales los cambios en la ploidía de estos organismos ocurren de forma natural y espontánea (Müller 1967), pero que también pueden ser inducidos experimentalmente (Müller 1970). Esto último se puede obtener a través de la diploidización de los gametofitos con colchicina, consiguiendo fragmentos estables y sexualmente activos, Müller (1975) logró obtener esporofitos triploides de *E. siliculosus* a través de la cruza de gametofitos diploides femeninos con gametofito haploides masculinos (y su respectivo reciproco), siendo los individuos resultantes somáticamente normales.

d. Objetivos del proyecto

a. Objetivo general

"Desarrollar una variedad triploide de huiro (Macrocystis), con crecimiento y productividad optimizada"

b. Objetivos específicos

- Producción de un banco de gametofitos diploides de *Macrocystis*
- Producción de esporofitos triploides en laboratorio
- Evaluación de la productividad del mejor cruzamiento triploide en el mar
- Comprobación de la triploidía a través de microscopia y cultivos

2. Materiales y Métodos

a. Obtención del material reproductivo de *M. pyrifera*

Bajo los proyectos FONDEF D00I1144 y D04I1288 fue posible generar la infraestructura y protocolos necesarios para la separación y propagación de gametofitos de *Macrocystis pyrifera* y *M. integrifolia* (Westermeier et al. 2005; 2006; 2010; 2011), generando cultivos unisexuales y axénicos los cuales permanecen actualmente estériles, en estado de latencia y creciendo vegetativamente por tiempos indefinidos (en algunos casos se reportan por más de 10 años). Este stock de gametofitos fue en su momento utilizado con éxito para la reproducción selectiva y formación de variedades mejoradas e híbridos de *Macrocystis*, y en este proyecto fueron usados para la formación de estructuras sexuales diploides, línea base para formación de esporofitos triploides.

Este "germoplasma" depositado en los laboratorios de algas de la Universidad Austral de Chile en Puerto Montt reúne gametofitos de más de 30 localidades de gran parte de la costa norte y sur de Chile, y del Atlántico sur. De ellos, se seleccionaron gametofitos machos y hembras de *Macrocystis*, considerando como principal criterio los resultados productivos obtenidos en experiencia de cultivo anteriores, para la formación de cruces triploides.

b. Diploidización de gametofitos de *M. pyrifera*

Actualmente, existen 3 métodos para la inducción de la poliploidía: i) métodos térmicos, usando gradientes de temperatura, ii) métodos con shock eléctricos y iii) métodos químicos, a base de la sustancia antimitótica colchicina (Klug et al. 2006). No obstante en algas solo existen reportes exitosos con la aplicación esta última, particularmente en el alga parda *Ectocarpus siliculosus* (Müller 1970).

Básicamente el efecto de la colchicina es inhibir la división celular en metafase y anafase, afectando la actividad de los husos mitóticos después de la duplicación de los cromosomas, donde finalmente se forma una única célula con su material genético duplicado (diploide, tetraploides o poliploide dependiendo de la dotación inicial).

En este estudio gametofitos machos y hembras de cada localidad fueron expuestos a diferentes concentraciones de colchicina (colch 1, colch 2 y colch 3), además de un control (colch 0), en 3 diferentes tiempos de exposición y en triplicado. Las condiciones de incubación fueron 10°C de temperatura, fotoperiodo 12:12 (L: O) y 10 uE m-2 s-1 de irradiancia. En total 10 gametofitos entre machos y hembras fueron sometidos a estos tratamientos con colchicina, de los cuales la cepa que nombramos en este informe como **Mpyr1** mostró tener características diploides tanto por análisis de a) cuantificación de la ploidía a través de citometría de flujo y de b) morfometría, midiendo longitud y ancho máximo de 150 células de cada tratamiento, con diferencias en tamaño, como fue descrito para gametofitos diploides de *Ectocarpus siliculosus* (Müller 1967; 1970).

c. Cruzamiento de gametofitos haploides y diploides de *M. pyrifera*

La activación de cultivos de huiro procedió de igual manera que un cultivo de huiro convencional según Westermeier et al. (2006): 5 mg (2 – 3 milímetros cúbicos) de gametofitos macho y hembra de *Macrocystis*, procedentes del germoplasma de la Universidad Austral de Chile en Puerto Montt (foto 1; 2), fueron mezclados en 400 ml de medio de cultivo Provasoli. Las condiciones de cultivo fueron cambiadas, disminuyendo los niveles de temperatura y aumentando la luminosidad para promover la reproducción sexual. Siguiendo estas metodologías se realizaron los cruzamientos de acuerdo a la tabla 1:

Foto 1. Germoplasma UACh con gametofitos puros (haploides y diploides) del laboratorio de Macroalgas UACh – Sede Puerto Montt.

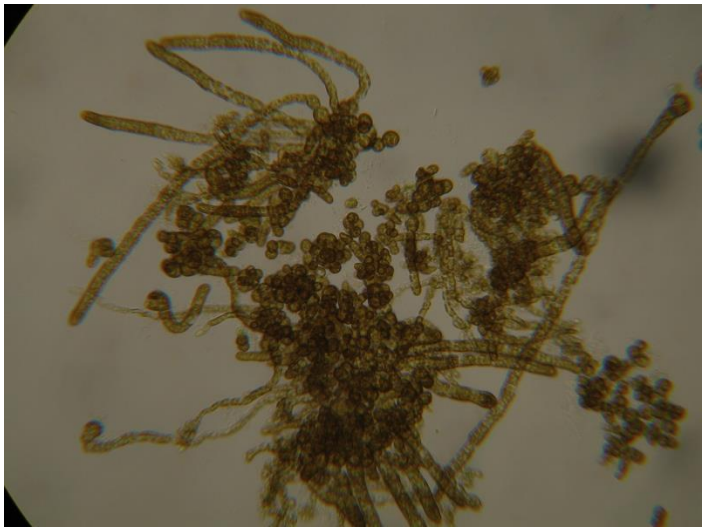


Foto 2. Gametofitos machos y hembra de Macrocystis pyrifera

Tabla 1. Cruzamientos de gametofitos haploides y diploides de M. pyrifera realizados en las tres activaciones (Octubre 2013, Abril y Julio 2014). 2n = diploide (controles); 3n = triploide (en rojo)

Fecha activación	Código proyecto	Cruzamiento	Dotación cromosómica
Octubre 2013	194	Mpyr1 (n) x Mint1 (n)	2n
	195	Mint1 (n) x Mpyr1 (n)	2n
	196	Mpyr1 (2n) x Mpyr2 (n)	3n
	197	Mpyr1 (2n) x Mpyr1 (n)	3n
	198	Mpyr1 (2n) x Mint1 (n)	3n
	199	Mpyr1 (n) x Mpyr1 (n)	2n
	200	Mpyr1 (n) x Mint1 (n)	2n
	201	Mpyr2 (n) x Mpyr2 (n)	2n
	202	Mpyr2 (n) x Mpyr1 (n)	2n
	203	Mpyr1 (n) x Mpyr2 (n)	2n
	204	Mint1 (n) x Mint1 (n)	2n
Abril 2014	205	Mpyr1 (n) x Mint1 (n)	2n
	206	Mpyr1 (2n) x Mint1 (n)	3n
	208	Mpyr2 (n) x Mpyr3 (n)	2n
	209	Mpyr1 (n) x Mpyr1 (n)	2n
	210	Mpyr3 (n) x Mpyr3 (n)	2n
	211	Mpyr4 (n) x Mpyr4 (n)	2n
	212	Mpyr2 (n) x Mpyr2 (n)	2n
	213	Mpyr1 (2n) x Mpyr3 (n)	3n
	214	Mpyr1 (2n) x Mpyr2 (n)	3n
	215	Mpyr1 (2n) x Mpyr4 (n)	3n
Julio 2014	216	Mpyr3 (n) x Mpyr1 (n)	2n
	217	Mpyr1 (n) x Mpyr3 (n)	2n
	218	Mpyr1 (n) x Mpyr2 (n)	2n
	219	Mpyr2 (n) x Mpyr1 (n)	2n
	220	Mpyr3 (n) x Mpyr2 (n)	2n
	221	Mpyr2 (n) x Mpyr3 (n)	2n
	222	Mpyr4 (n) x Mpyr2 (n)	2n
	223	Mpyr1 (2n) x Mpyr1 (n)	3n
	224	Mpyr1 (2n) x Mint1 (n)	3n

d. Cultivo en laboratorio

Antes de que se formen células huevos, los cultivos se mantuvieron en bolsas plásticas, con recambios de medio de cultivo semanal. Después de que ocurre reproducción sexual y los cigotos son evidentes, los cultivos son trasladados a botellas de 1L con aireación y agitación constante. Dependiendo de la densidad y de la longitud, los esporofitos son traspasados las semanas siguientes a botellas de 2 y 5 L (foto 3) y a cilindros de acrílico de 15 y 50 L hasta que llegan a 2 – 3 cm (foto 4), donde son traspasados a estanques de 1000 L con agua circulante. Una vez aquí alcanzando los 10 cm en promedio, están listas para su siembra en el mar (foto 5).

Foto 3. Cultivo en reactores (botellas de 1, 2 y 5 L) de esporofitos tempranos de M. pyrifera.

Foto 4. Cultivo intermedio de *M. pyrifera* en cilindro de acrílico de 15 y 50 L

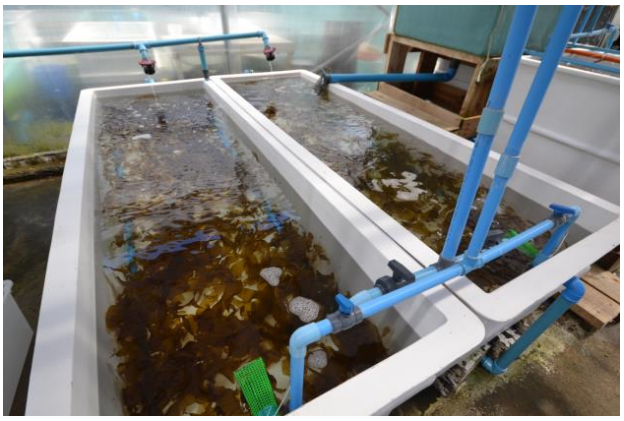


Foto 5. Cultivo en invernadero de *M. pyrifera*, en estanques de 1000 L

e. Cultivo en el mar

Plántulas de entre 8 – 10 cm de los diferentes inóculos fueron transportadas desde Puerto Montt a la Región de Atacama. Estas plantas se inocularon en trozos de cabo de polipropileno de 4 mm de diámetro (foto 6), los que a su vez fueron dispuestos sobre long-lines y posteriormente sembrados en Bahía Inglesa (protegido) y Bahía Salado (expuesto), a 8 m de profundidad. Mensualmente se caracterizó el crecimiento (medido en longitud total) de estas plantas.

Foto 6. Inoculación de esporofitos triploides en la empresa Hidrocultivos S.A., región de Atacama.

f. Análisis de nutrientes en agua de Bahía Inglesa y Bahia Salado

Como otro factor que afecta el crecimiento de las algas en el ambiente marino son los nutrientes en la columna de agua, mensualmente se tomaron muestras de agua y se analizaron para nitratos amonio y ortofosfatos, segun el método descrito por AOAC (2012), para detectar diferencias a nivel de localidad.

g. Citometría de Flujo

Esta es una técnica altamente desarrollada que permite determinar el contenido de DNA. El método utilizado fue el de Bothwell et al, (2010) .

h. Morfometría

Esta técnica consistió en la medición de células del tejido de Macrocystis 2n y 3n. Este muy difícil de cuantificar, ya que las células que forman este tejido en Macrocystis no mostraron diferencias claras entre ellas.

i. Estudio de la composición química de algas triploides

Algas provenientes de la primera y segunda siembra fueron cosechadas desde Bahía Inglesa y Bahía Salado cuando estaban en su quinto mes de cultivo, limpiadas de visibles epibiontes y separadas en discos de fijación, estipes, frondas vegetativas (frondas), frondas fértiles (esporofilas) y aerocistos. Cada órgano fue deshidratado por separado a 60°C y pulverizadas para los subsecuentes análisis químicos (ver Westermeier et al. 2012a y referencias allí). Se analizaron la composición porcentual de proteínas, lípidos, fibra cruda, carbohidratos totales, cenizas y energía total.

3. Resultados

a. Viabilidad de cruzamientos de *M. pyrifera* con diferentes niveles de ploidía en laboratorio

Una vez teniendo certeza que el gametofito fuese diploide, se iniciaron los cruzamientos para determinar la productividad de diferentes cruzamientos triploides. La aparición de las primeras células huevos para cada cruzamiento se registró semanalmente y se muestran en la figura 1. De estos resultados se infiere que no hay diferencias entre el tiempo de aparición de esporofitos (y células huevo fertilizadas) entre cruzamientos diploides y triploides. Por ende el grado de fertilidad y éxito reproductivo es el mismo, en 3 semanas de tiempo promedio en que los cruzamientos de este estudio (2n o 3n) mostraron los primeros signos de reproducción (fig. 2).

No obstante, diferencias significativas en este indicador se mostraron dependiendo de la fecha de activación de los cruces (fig. 3). En primavera, la fecundación in vitro fue cerca del doble más rápida con respecto a cruces en otoño e invierno. Estas diferencias podrían deberse a que variables como el agua de mar seria de una composición considerablemente distinta. Se sugiere determinar posibles fuentes de variación, como el pH, la salinidad, luz y temperatura.

Se encontró una correlación entre el tiempo que se produce este reclutamiento in vitro y la tasa de crecimiento o máximas longitudes que estos esporofitos pueden alcanzar en laboratorio, la que se hace notoria después de la tercera semana (fig. 4). En la práctica esto significa que individuos que se forman· más rápidamente (alrededor de 2 semanas después de la activación) tienen más posibilidades de exhibir mayores tasas de crecimientos (o mayores longitudes) que aquellos que tardan 3 o más semanas en reclutar.

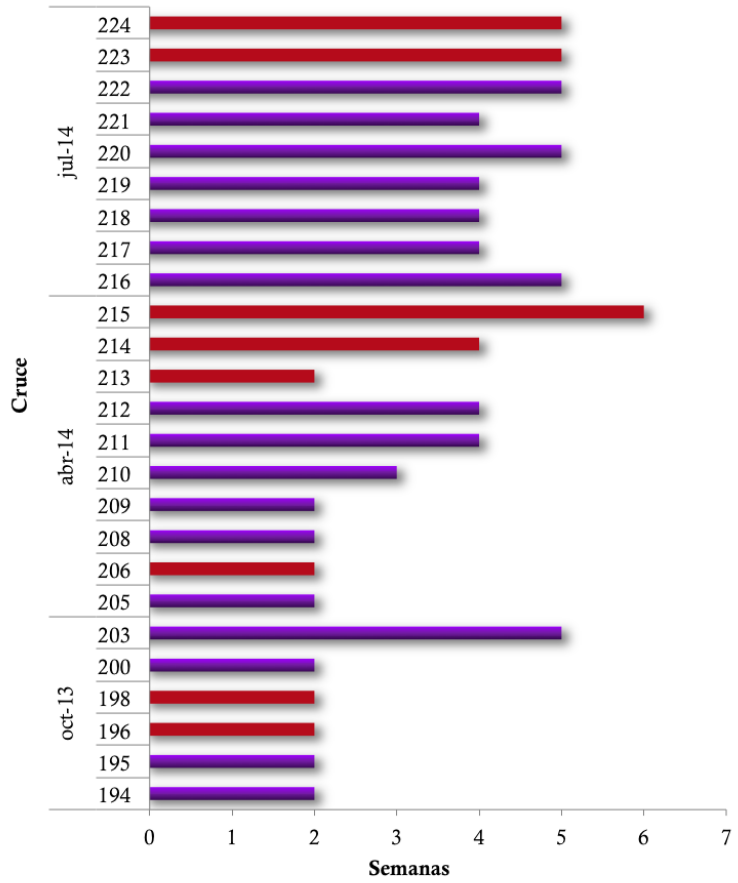


Fig. 1. Semanas necesarias para observar los primeros signos de reproducción en cada cruce, en términos de cigotos o esporofitos iniciales. En rojo los cruces triploides

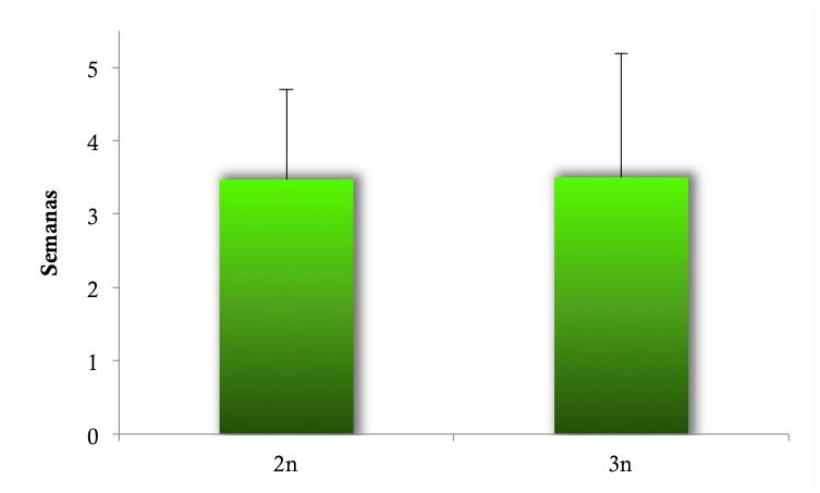


Fig. 2. Comparación del tiempo promedio (en semanas) necesarios para observar los primeros signos de reproducción en cruces diploides (2n) y triploides (3n).

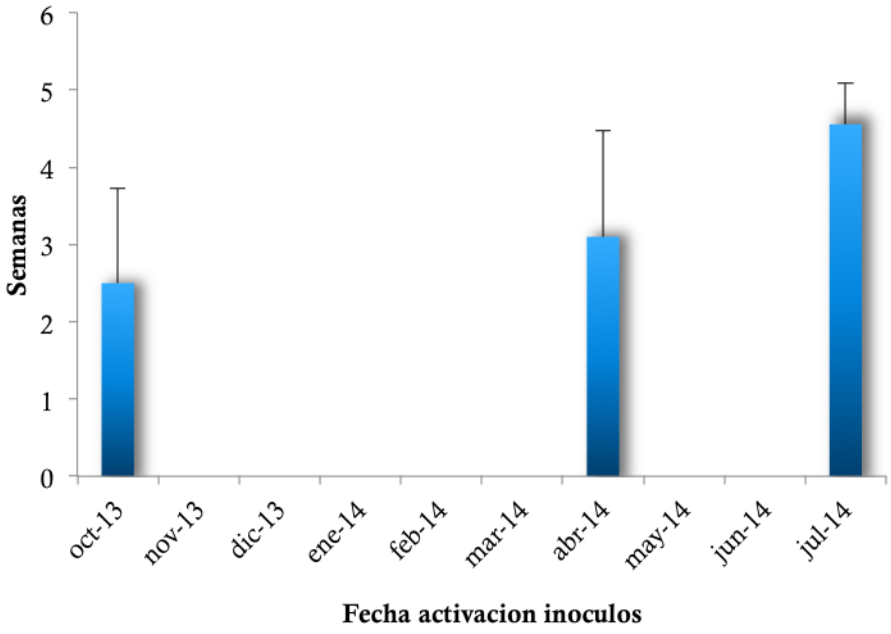


Fig. 3. Tiempo de aparición de primeros células huevos y esporofitos (en semanas) en tres activaciones de distintas estaciones del año.

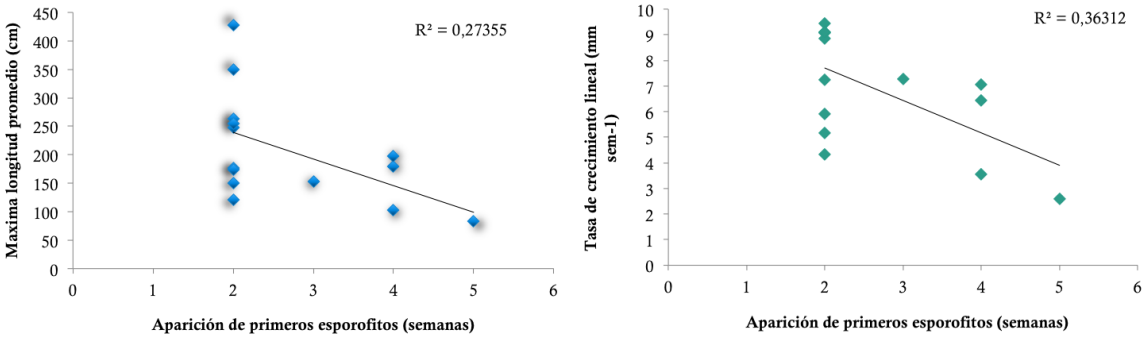


Fig. 4. Correlación entre el tiempo que se los cruces tardan en formar los primeros esporofitos y la talla promedio final que logran esos cultivos (izquierda) o la tasa crecimiento promedio (derecha).

En su totalidad, de un total de 30 cruces realizados en el proyecto, la cantidad de cruzamientos exitosos (cruces donde hubo reproducción y los esporofitos alcanzaron talla de siembra en el mar) superó el 50% tanto en cruces normales (2n) como triploides (fig. 5). Los cruzamientos que no fueron exitosos generalmente porque no hubo fecundación o los esporofitos no se desarrollaron después de las primeras semanas.

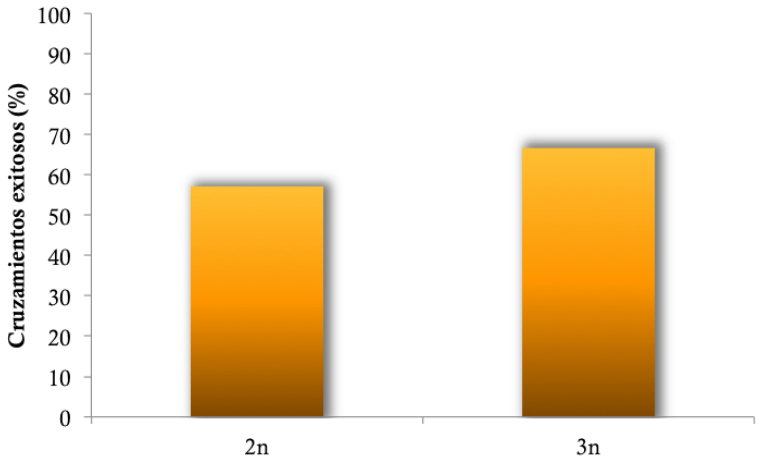


Figura 5. Porcentaje de cruces diploides y triploides exitosos en el marco del desarrollo del proyecto.

b. Crecimiento de cruzamientos diploides y triploides bajo condiciones controladas de laboratorio

En total, se realizaron tres activaciones (octubre 13, abril y junio 14). La fig. 6 presenta los resultados de la longitud promedio de los esporofitos de cada cruce a la semana 24 de cultivo, y en donde se puede apreciar que en al menos dos activaciones (octubre 13 y junio 14) los cruces triploides crecieron alrededor de un 40% más que los controles diploides, controles que habían demostrado ser altamente productivos en pruebas de hibridación y cultivo en experiencias anteriores. Esta situación se refleja comparando las longitudes promedio de cruces diploides y triploide, siendo estas últimas 20 mm más altas (fig. 7),

Los cruces triploides 198 (cruce Mpyr1 [2n] x Mint1 [n]), 213 (Mpyr1 [2n] x Mpyr3 [n]) y 214 (Mpyr1 [2n] x Mpyr2 [n]) mostraron tener potencial para una futura maricultura, tras lograr altas tasas de crecimiento en laboratorio sobre 100 mm en 24 semanas. El cruce 224 -también Mpyr1 [2n] x Mint1 [n] no logró estas tallas pero fue el que más creció de los cruces en la activación de junio 2014.

Los mismos cruces se destacan en el tiempo, ya que para lograr plántulas de 10 cm y plantas para la siembra, se necesitan entre 20-25 semanas desde su activación (con la excepción de la tercera activación en octubre con 40 semanas, pero que igualmente fue mayor en comparación a los diploides de las mismas fecha) (Fig. 8). En promedio, un triploide requiere 2-3 semanas menos para lograr estas longitudes (Fig. 9).

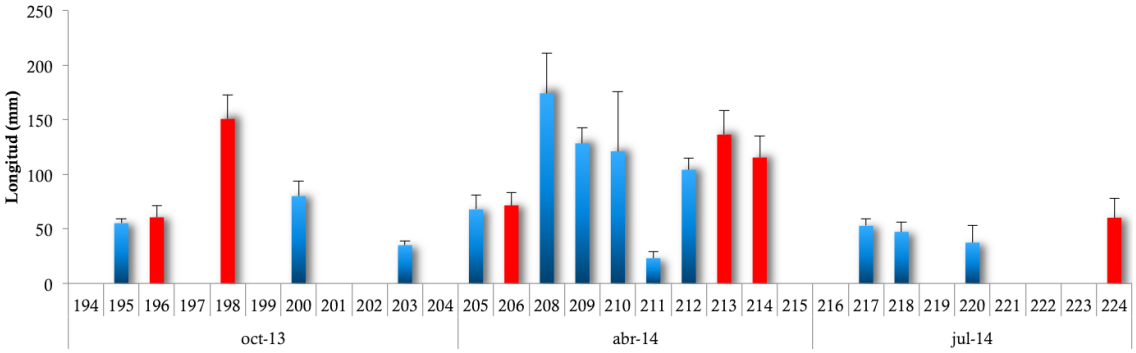


Fig. 6. Longitud promedio de cruzamientos de *Macrocystis* a la semana 24 de cultivo en laboratorio. En rojo los cruces triploides. La barra de error corresponde a la desviación estándar de 30 individuos seleccionados aleatoriamente.

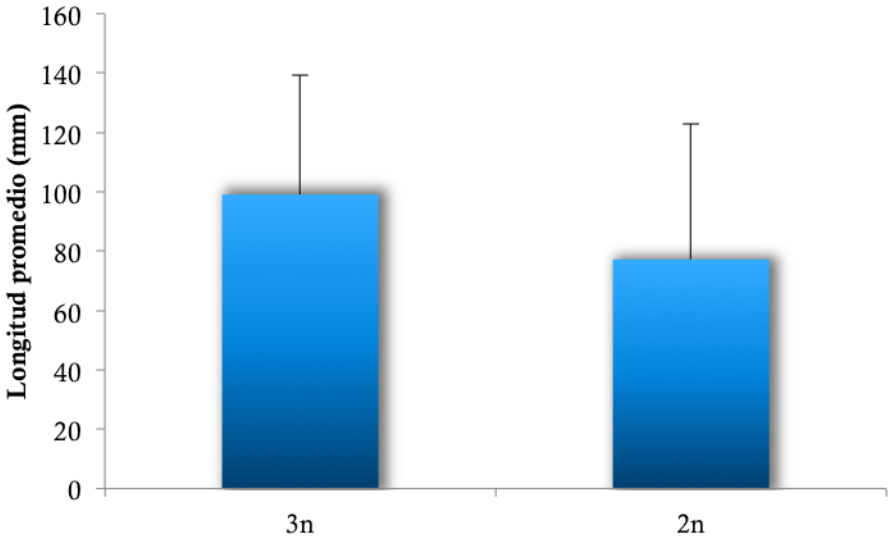


Fig. 7. Comparación de longitudes promedio de cruzamientos de *Macrocystis* triploides (3n) y diploides (2n) a la semana 24.

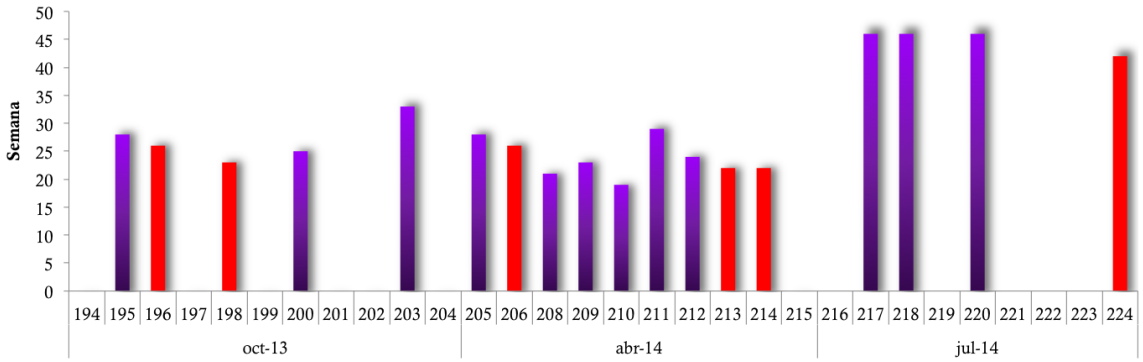


Fig. 8. Tiempo promedio de cultivo de cada cruzamiento necesario para lograr individuos de aproximadamente 10 cm. (en rojo triploides)

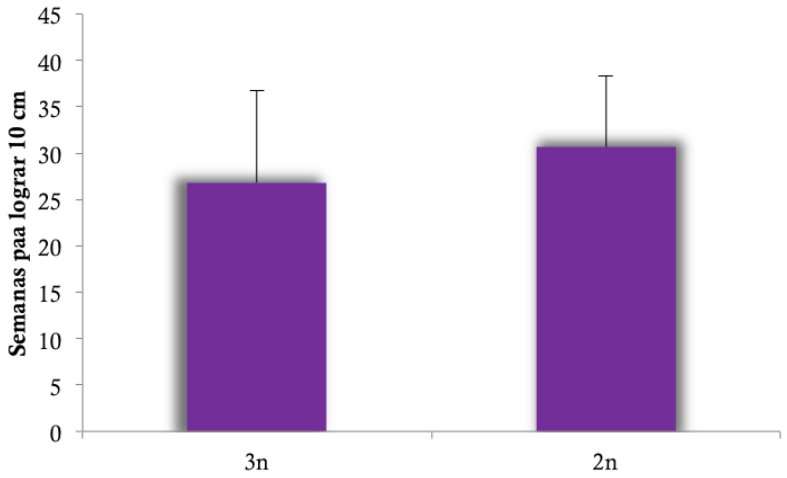


Fig. 9. Comparación de tiempos de cultivo de cruzamientos de *Macrocystis* triploides (3n) y diploides (2n) necesarios para lograr individuos para la siembra.

Foto 7. Individuos triploides en estanques listos para la siembra

c. Crecimiento de *Macrocystis* triploides en concesiones acuícolas de la Región de Atacama

Las diferencias en crecimiento entre cruces triploides y diploides se hicieron aún más evidentes en el mar (fig. 10). Todos los cruces triploides fueron mayores que sus grupos controles para cada condición experimental, siendo los más productivos los cruces 198 (Marzo 2014), 213 (Agosto 2014) y 206 (Octubre 2014) con plantas entre 3.5 y 5 m en promedio en 5-6 meses, que es la talla máxima que también alcanza *Macrocystis* en su hábitat natural en el norte de Chile (ver anexo B para detalles del crecimiento en el mar).

Estos crecimientos fueron más altos al comparar cada siembra y específicamente dentro de cada localidad. Los triploides fueron mayores entre 50 – 100 cm con respectos a sus controles diploides, siendo las mejores épocas para su siembras en Marzo y Octubre (fig. 11). También se detectaron diferencias menores entre localidades, con valores mayores en Bahía Inglesa en un 20% (fig. 12). Estos valores fueron más bajos que los esperados, considerando que en ambas localidades hubo proliferaciones de epibiontes (briozoos) que impidieron un crecimiento mayor. Estas "pestes" se representaron en ambas localidades, pero superiores en Bahía Salado, y claramente afectaron sus crecimientos, productividades y desprendimiento del sustrato (foto 8 – 12).

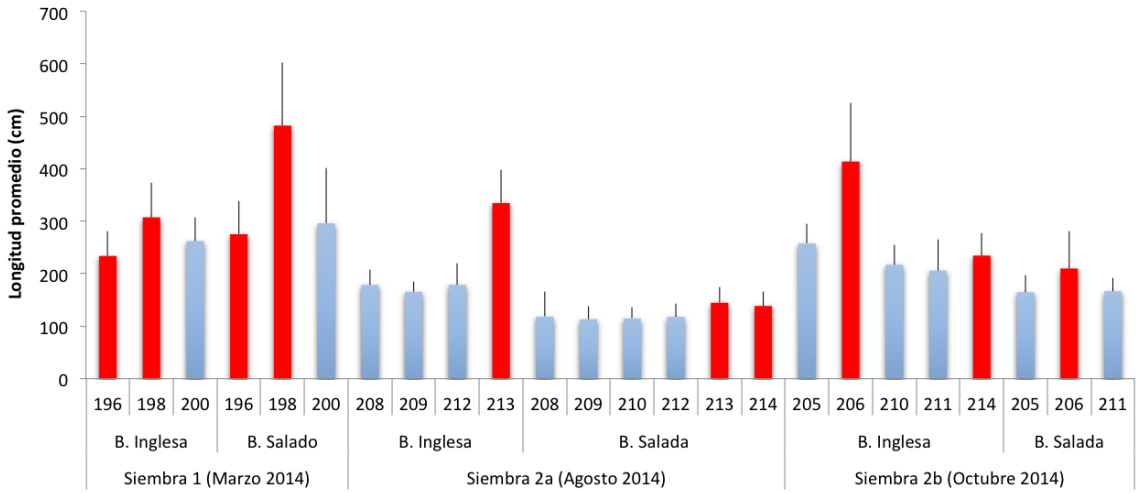


Fig. 10. Longitud promedio de cruzamientos de *Macrocystis* al sexto mes de cultivo en el mar. En rojo los cruces triploides. La barra de error corresponde a la desviación estándar de ca. 30 individuos seleccionados aleatoriamente.

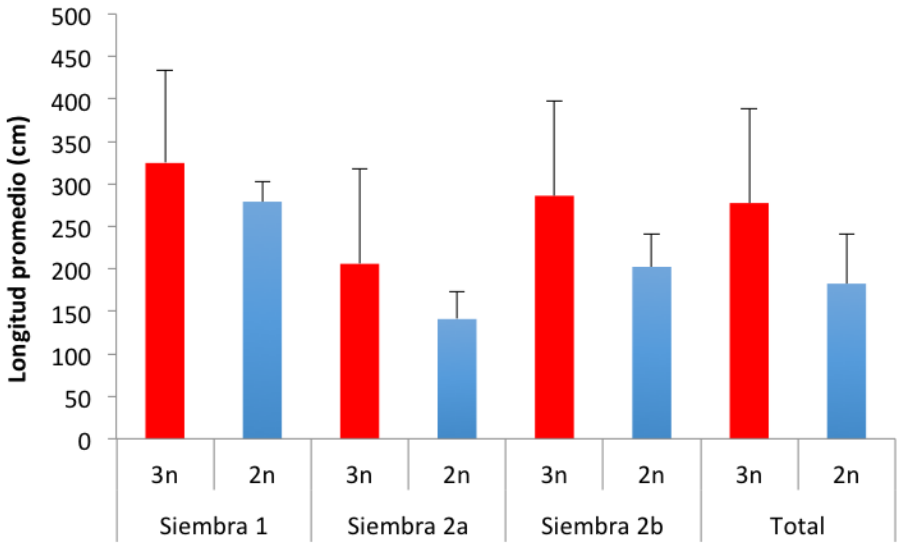


Fig. 11. Longitud promedio de cruzamientos triploides y diploides de *Macrocystis* al sexto mes de cultivo, separado por época de siembra y el total acumulado. En rojo los cruces triploides. La barra de error corresponde a la desviación estándar de todos los cruces estudiados en este proyecto.

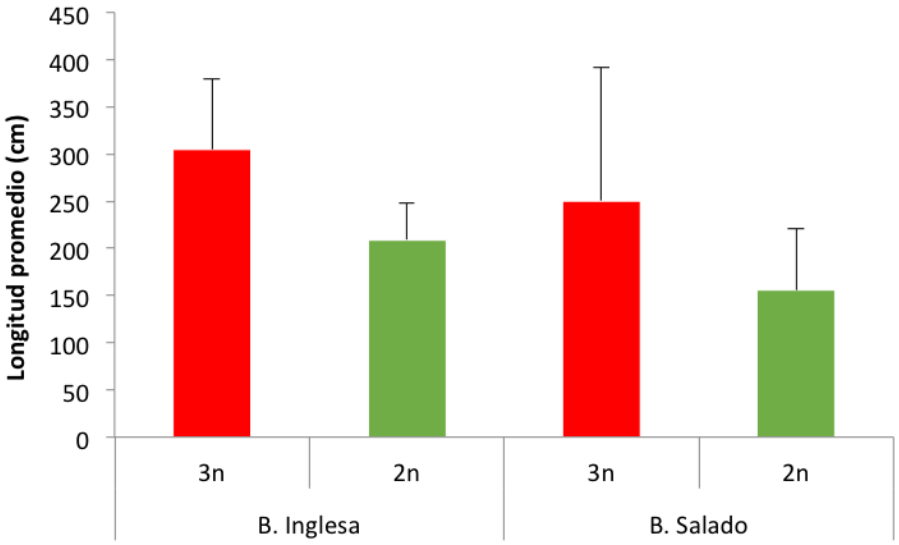


Fig. 12. Longitud promedio de cruzamientos triploides y diploides de *Macrocystis* al sexto mes de cultivo, separado por localidad. En rojo los cruces triploides. La barra de error corresponde a la desviación estándar de todos los cruces estudiados en este proyecto.

Foto 8. Siembra inicial de M. pyrifera (esporofitos triploides)

Foto 9. Desarrollo inicial de colonias de briozoos (puntos blancos) en plantas de Macrocystis de un mes de cultivo.

Foto 10. Estado avanzado de briozoos (manchas blancas) en plantas de Macrocystis en plantas de cerca de dos meses de cultivo de B. Inglesa.

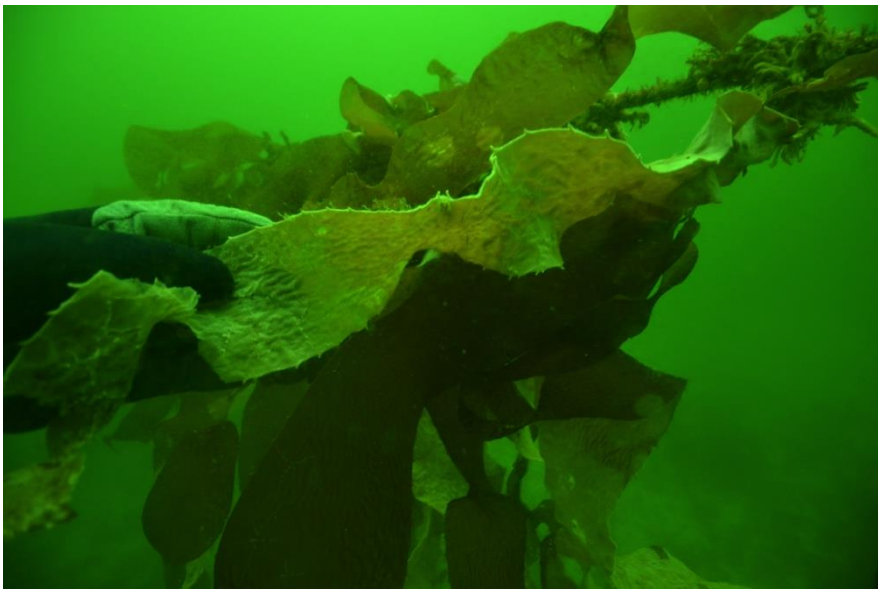


Foto 11. Estado finales de briozoos (manchas blancas) en plantas de Macrocystis de dos meses de cultivo de B. Salado.

Foto 12. Colonización de briozoos en estipes de Macrocystis, los que por abrasión terminan cortándose.

Las biomasas obtenidas durante el proyecto fueron altas en los triploides arriba señalados, con valores de entre 4 y 8 kg planta-1, muy superiores a los entre 2 y 4 kg planta-1 generalmente obtenidos en cruces diploides (fig.13).

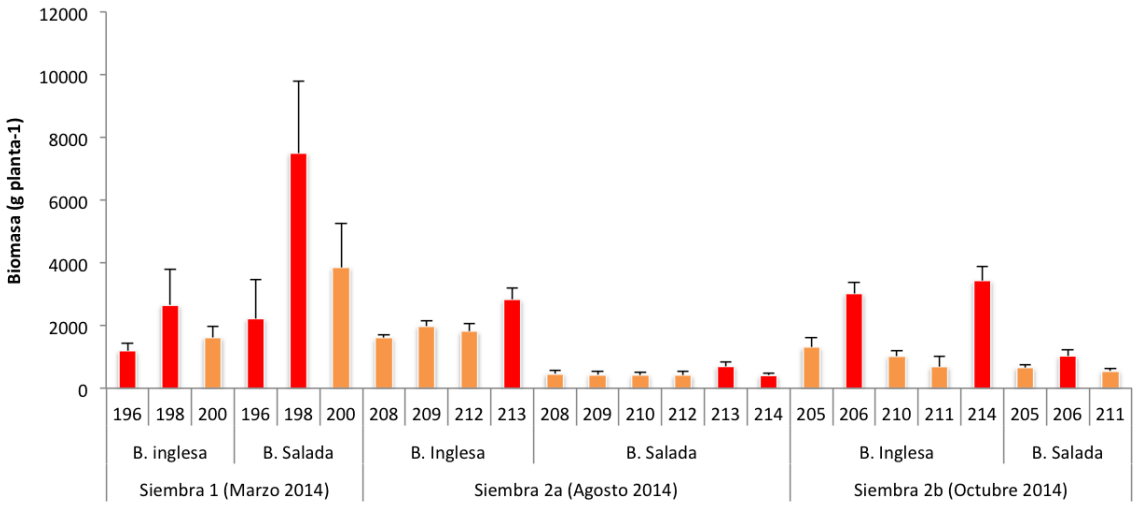


Fig. 13. Biomasa promedio de cruzamientos de *Macrocystis* al sexto mes de cultivo en el mar. En rojo los cruces triploides. La barra de error corresponde a la desviación estándar de aproximadamente 30 individuos seleccionados aleatoriamente.

d. Análisis de Nutrientes en aguas de Bahía Inglesa y B. Salado

Las figuras 14 - 16 muestran las concentraciones promedio de nitrato (NO3-), amonio (NH4+) y fosfato (PO4-3) en B. Inglesa y B. Salado. Mientras el nitrato es mayoritariamente abundante en invierno (0.6 mg L-1), los amonios y fosfatos lo son en otoño (0,9 y 9,95 mg L-1), fechas de menor productividad primaria en el ambiente del norte de Chile. Aunque se observa una clara variación estacional de estos compuestos, no hay diferencias a nivel de localidad, por lo que no estarían explicando la variación geográfica del crecimiento entre B. Inglesa y B. Salado, ni las variaciones entre los diferentes inóculos. No obstante, habría una relación considerable entre las concentraciones de amonio y fosfato y las tasas de crecimiento máximas que logran tanto cultivos diploides como triploides en el mar, y que se hacen particularmente evidentes cuando se encuentran en concentraciones mayores a 0,5 mg L-1 y 4 mg L-1 respectivamente (ver anexo C).

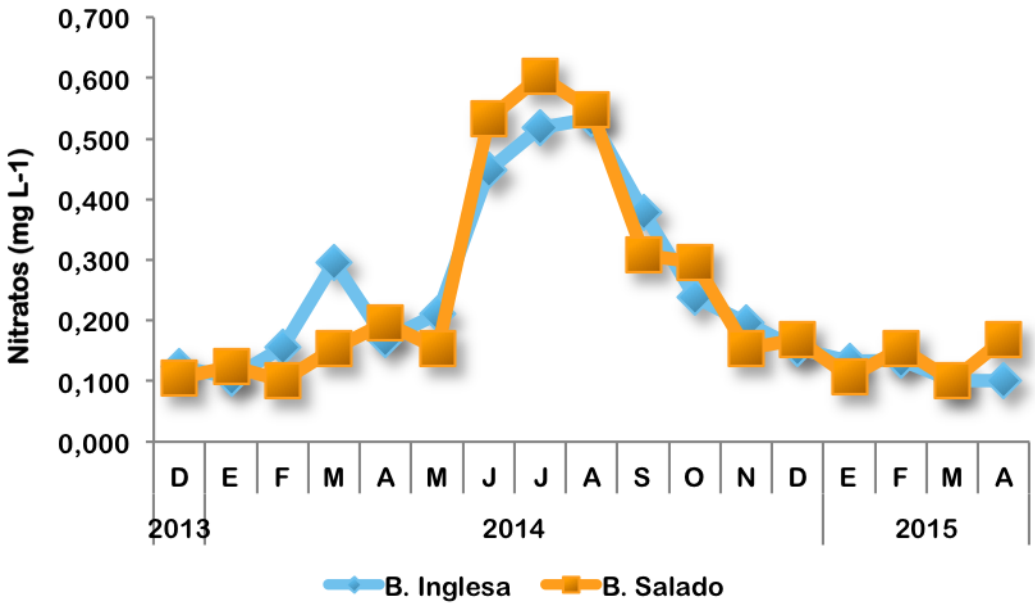


Fig. 14. Variación mensual en la concentración de nitratos en B. Inglesa y B. Salado

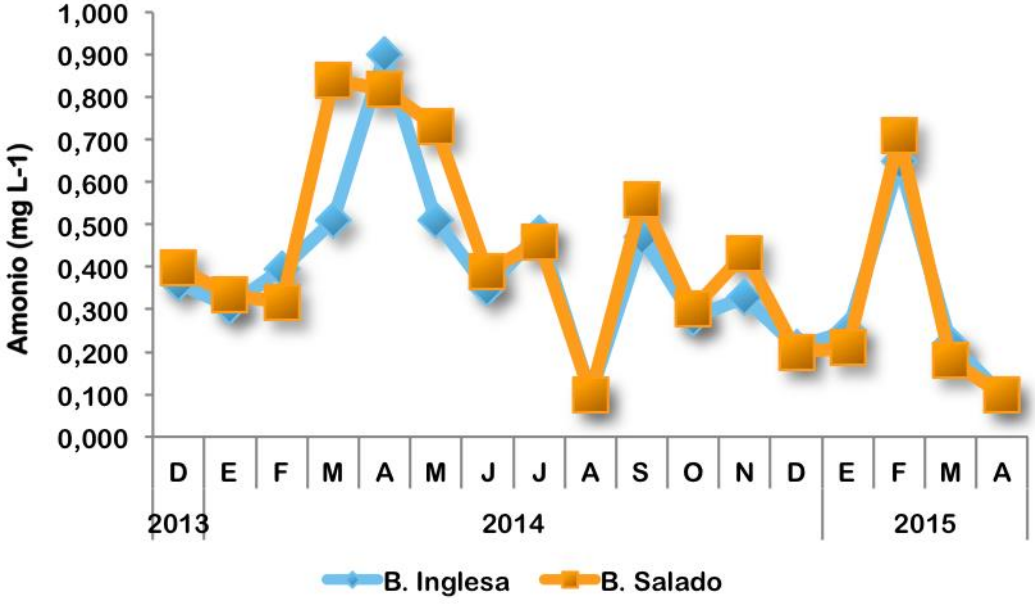


Fig. 15. Variación mensual en la concentración de amonio en B. Inglesa y B. Salado

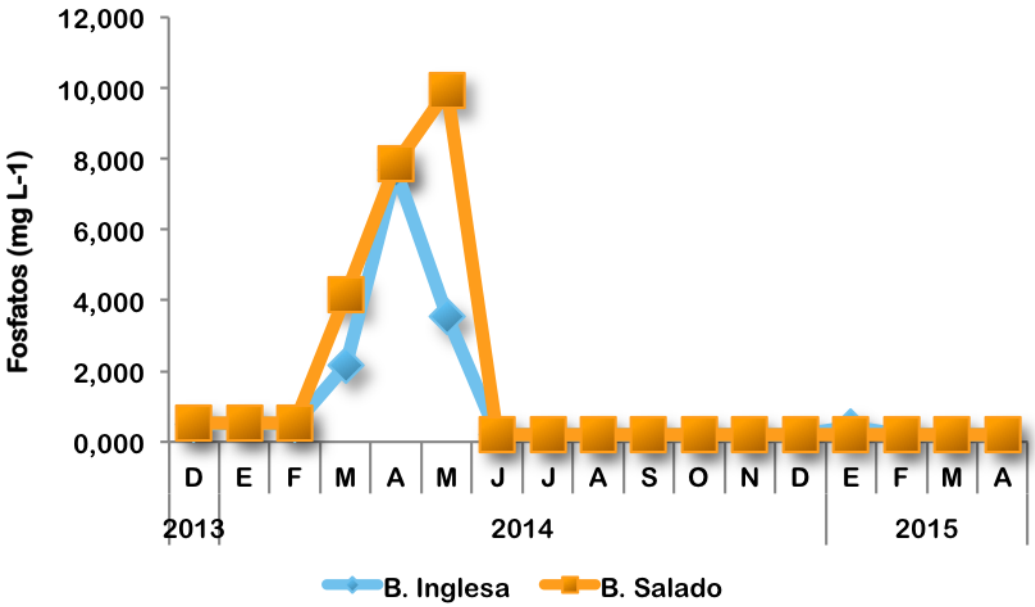


Fig. 16 Variación mensual en la concentración de fosfatos en B. Inglesa y B. Salado

e. Comparación de la composición proximal entre cruzamientos diploides y triploides de *Macrocystis*

La composición química de las variedad diploides y triploides son ilustrados en la fig. 17 para diferencias a nivel de localidad y fig. 18 para distintos órganos del talo, y en mayor detalle para cada cruzamiento de la primera siembra y segunda siembra en Bahía Inglesa en el anexo D. Las diferencia fueron mínimas entre diploides y triploides (de la misma especie), y cuya variabilidad estaría explicada por variables exógenas, aun cuando, los nutrientes analizados fueron similares (fig. 17).

Las mayores diferencias se detectaron en los diferentes ‘‘órganos’’ de Macrocystis. (fig. 18). El disco de fijación se caracteriza por un alto porcentaje de proteína (14 – 18 %) y de fibra cruda (7 – 8 %). Las frondas -y especialmente las esporofilas- poseen la mayor composición de lípidos, entre 3,5% y 4,2%, y que son significativamente más altos que los valores reportados por Westermeier et al (2012) para esta especie (1% PS). Los carbohidratos representan los mayores valores, y en los estipes (cauloides) alcanzaron entre 48 - 50% PS en comparación a las otras secciones del talo. Las cenizas son abundantes en frondas y aerocistos con valores que oscilaron entre 35 - 50%.

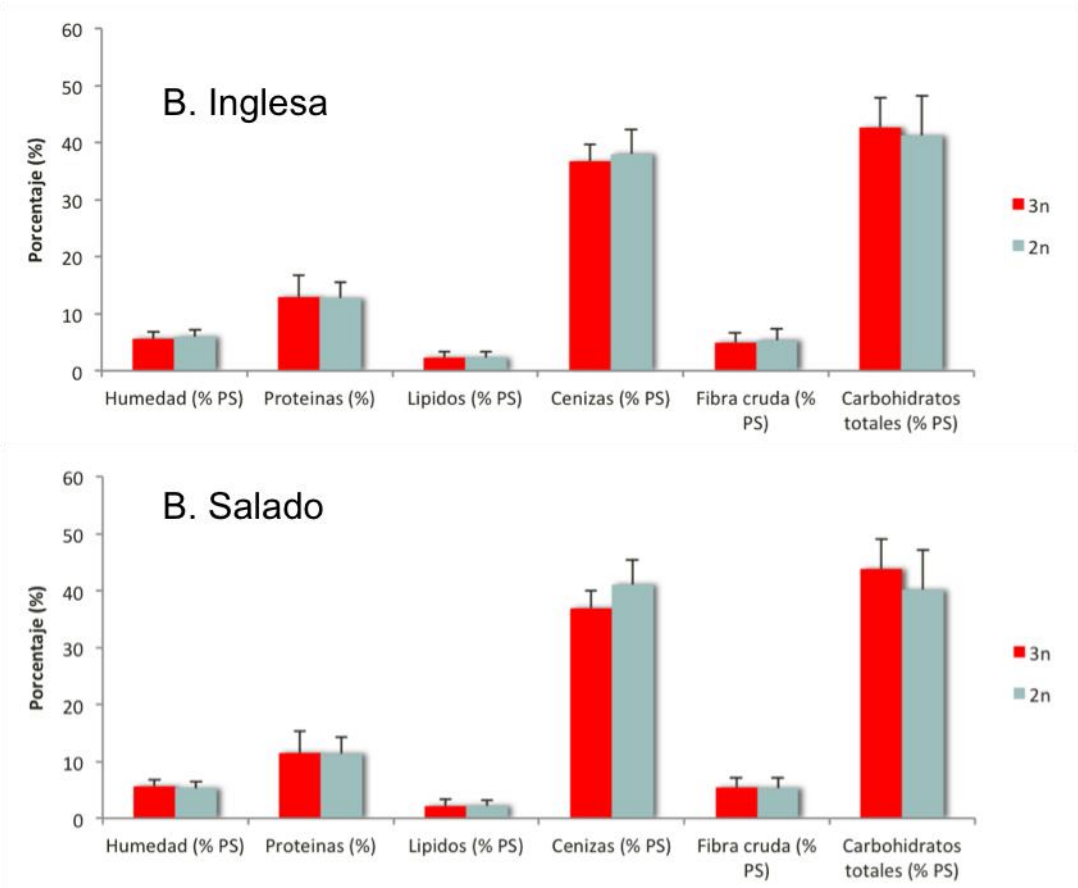


Fig. 17. Composición proximal promedio de plantas diploides (2n) y triploides (3n) cultivadas en Bahía Inglesa y Bahía Salado.

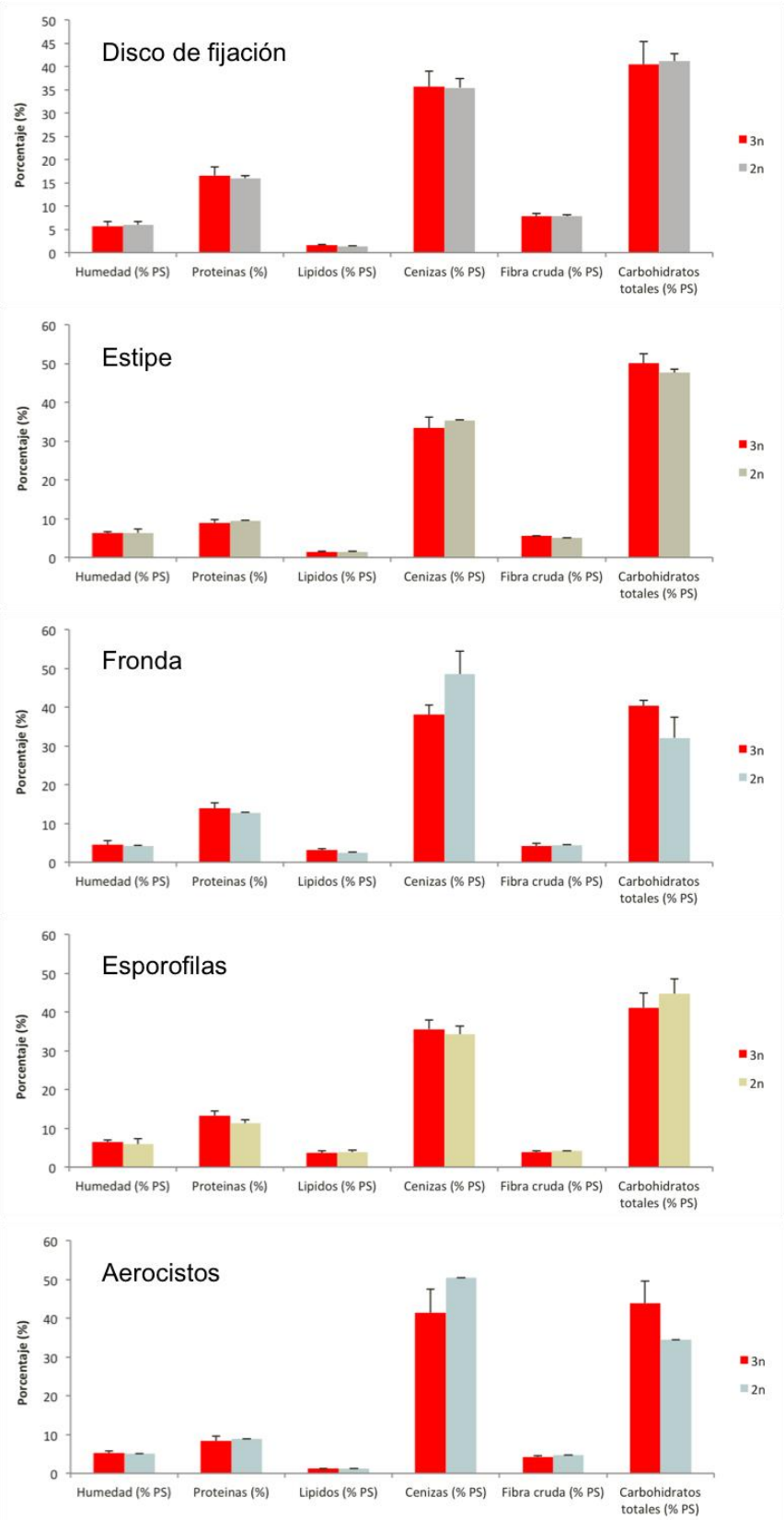


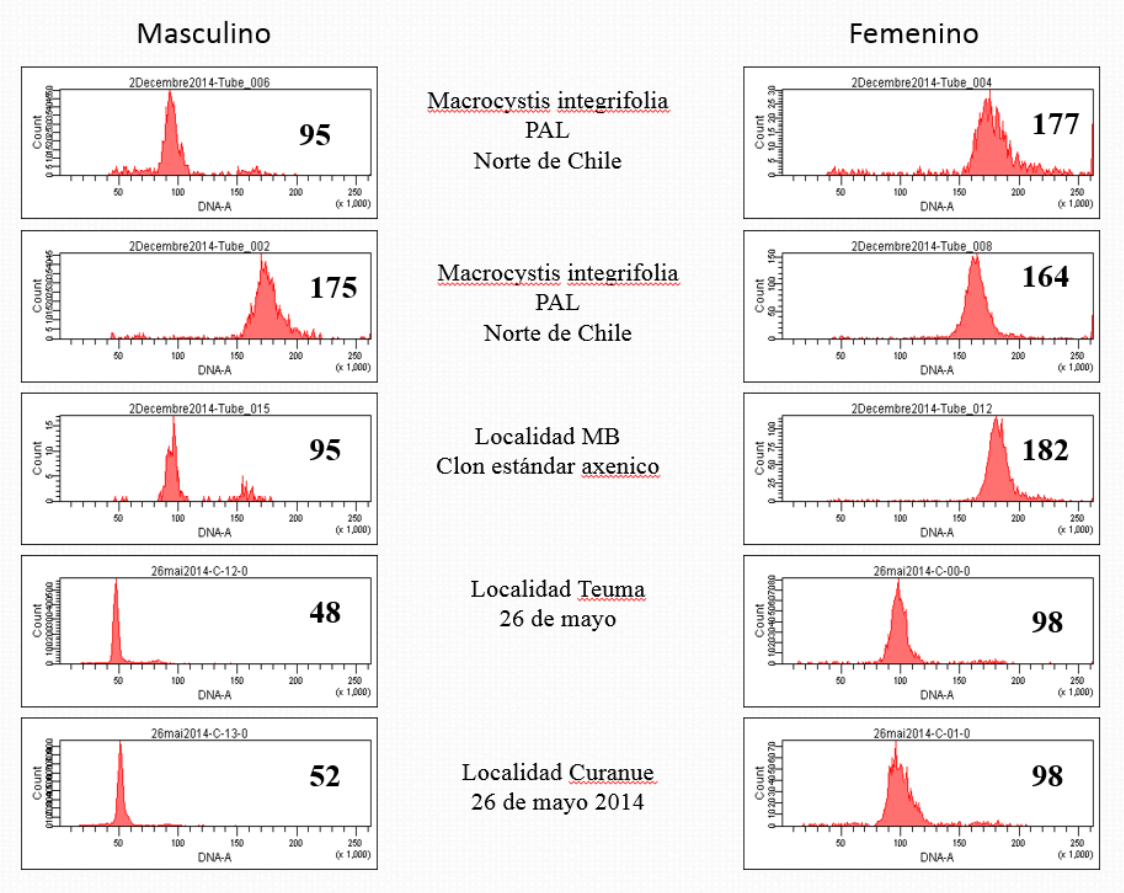
Fig. 18. Composición proximal promedio en diferentes partes del talo de plantas diploides (2n) y triploides (3n), cultivadas en la Región de Atacama

f. Citometría de Flujo

En los ciclos de vida, el contenido nuclear de DNA mínimo por célula está definido como 1C y ello debiera ocurrir en ciclos de vida como el de Macrocystis que corresponde a un ciclo de vida haplode – diploide, (Voglmayr, 2007). Nuestros resultados confirman esta situación para 5 de los gametofitos masculinos utilizados, mientras que el número 6 analizado presenta carácter diploide, 1.7C. En tres de los gametofitos femeninos analizados, y que se presentan en este informe mostraron valores de DNA entre 1.6 y 1.8. Ello significa un contenido doble de DNA, es decir el femenino es mayor que el masculino (Fig. 19)

Cuando se realiza un cruzamiento de gametofitos 1C y 1.8C, el esporofito que se forma es 2.2C, lo que muestra un DNA del esporofito sobre 2C.

Fig. 19 Análisis de citometría de flujo en gametofitos masculinos y femeninos.



g. Determinación del Número de Cromosomas

Existen en la literatura de algas discrepancias con los valores de cromosomas que se observan al microscopio en el núcleo. Así es como diversos autores reportan para Macrocystis estructuras haploides un n=16 y 2n=32 (Walker 1952). Yabu & Saubosuga (1987), en cambio determinan en organismos haploides un n=32 y en el 2n=64. Nuestros resultados obtenidos en este proyecto fueron de n=20 y 2n= entre 41-43 cromosomas.

4. Discusión

Hasta hace poco, la maricultura de Macrocystis era una actividad que había sido considerada mayoritariamente por el mundo académico, como una solución a problemas de sobreexplotación del recurso especialmente en el norte de Chile. Estos cultivos fueron originados a través de la siembra directa esporas en sustratos y su posterior cultivo en el mar (sistema japonés) o a través de la producción utilizando sistemas flotación libre en el laboratorio (cultivo free-floating) que se fijarían más tarde de forma manual al sustrato, Gutierrez et al 2006; Westermeier et al.2006, respectivamente. La primera técnica es de menores costos, más rápida pero carece de la tecnificación mínima necesaria para poder proyectar resultados, siendo altamente impredecible. La segunda es más costosa, más técnica y eventualmente promete ser el futuro de la agronomía marina del huiro en Chile, pero al igual que la anterior, impide proteger las ‘‘semillas’’ (material reproductivo) que sean seleccionadas como optimas, lo que impide que genere mayor interés comercial. La obtención de gametofitos diploides de Macrocystis con fines económicos y el posterior cultivo exitoso de triploides es un evento único a nivel mundial, ya que permite que cuando que se encuentren variedades con atributos comerciales de interés, estos puedan ser protegidos y comercializados como variedades únicas. Asimismo, la incapacidad de reproducción de estos ejemplares se tradujo en un incremento en los crecimientos significativo en el caso del cultivo en el mar, crecimiento que puede ser mejorado con un estudio a mayor plazo donde características ambientales desfavorables como los briozoos estén ausentes. De igual forma se puede incorporar más atributos productivos dependiendo de las cepas parentales que se elijan para cruzar (Tabla 1), ya que este proyecto es pionero y muestra que existen variables que deben ser consideradas en una segunda, tercera o más fases de investigación.

Tal como fue reportado por (Westermeier et al. 2010; 2011; 2012c) los atributos que podrían ser mejorados son las tasas de crecimiento, biomasas finales (tabla

2), morfologías y en ciertos casos la composiciones químicas (Tabla 3), pero claramente podrían ser aún más. Especial interés económico tendrían por ejemplo aumentar la tolerancia a las condiciones de estanques como en el cruce 206 para lograr tallas mayores en laboratorio, o incrementar la resistencia a plagas como los briozoos. Las posibilidades son insospechadas una vez logrando producir nuevas variedades de Macrocystis, evaluadas especialmente en el mar.

Tabla 1-. Conocimiento biológicos de M. pyrifera "Sin proyecto", "Con el proyecto Triploides".

	Antes del Proyecto 3n	Con el Proyecto 3n
Ciclo de vida	Normal según la literatura; Estructuras sexuales: Haploides, Esporofito: diploide	Se determinan estructuras sexuales diploides. • Masculino: 2n (1 ejemplo) • Femenino: 2n (varios ejemplos) Otros: - Masculino: n - Femenino: n
Estudio Triploidía	No existían. No conocidos en la literatura de Macrocystis.	Se generan bancos diploides que se usan para producir triploides viables en laboratorio y mar.
Condiciones Laboratorio	Formación esporofito. Estacionalidad según inoculo (2 a 6 semanas) en inóculos primavera-otoño	
Longitud (mm)	Primavera: 35-50 mm (2n) Otoño: 20-150 mm (2n) Invierno: 40-60 mm (2n)	50-150 mm (3n) 50-140 mm (3n) 70 mm (3n)
Condiciones Mar (5- 6 meses)		
Longitud (mm)	100-300 (2n)	3500-5000 (3n)
Biomasa por planta (Kg):	2-4 (2n)	4-8 (3n)

Estos valores de crecimiento de biomasa son bajos tanto para diploides como triploides cultivados en B. Inglesa, B. salado (5 meses). Es posible que factores de la dinámica de la bahía, nutrientes y epibiontes estén asociados a las bajas de producción obtenidas. Aun así las diferencias son claras entre plantas 2n y 3n.

Tabla 2-. Valores de crecimiento y biomasa en el Mar de diploides (2) y triploides (3), cultivados en B. Inglesa y B. Salado (5 meses). Se indica porcentajes diferenciales entre 3n y 2n.

Fechas de Siembra	**Bahía Inglesa**			**Bahía Salado**		
	2n	**3n**	**%**	**2n**	**3n**	**%**
Inóculos otoño						
Longitud (mm)	280	310	10 (3n)	300	500	60 (3n)
Biomasa (gr)	2000	2500	20 (3n)	4000	8000	100 (3n)
Inóculos Primavera						
Longitud (mm)	290	410	64.0 (3n)	180	250	38.0 (3n)
Biomasa (gr)	1500	3900	38.4 (3n)	1000	1800	55.5 (3n)
Inóculos Invierno						
Longitud (mm)	180	350	51.4 (3n)	110	150	36.3 (3n)
Biomasa (gr)	2000	3000	50.0 (3n)	500	1000	100 (3n)

	2n				**3n**			
Contenidos Energéticos	*Disco*	*Estipe*	*Fronda*	*Aerocisto*	*Disco*	*Estipe*	*Fronda*	*Aerocisto*
Proteínas (%)	16,0	9,1	13,0	7.0	16,3	8,87	13,3	7,8
Lípidos (% PS)	1,2	1,1	2,4	1.0	1,5	1,35	2,9	1,0
Cenizas (% PS)	34,8	33,0	41,4	44.0	35,3	33,08	38,8	42,1
Fibra cruda (% PS)	7,2	6,3	4,3	5.0	7,8	5,76	4,1	4,5
Extracto no nitrogenado (% PS)	33,5	45,0	33,8	36.0	33,1	45,62	36,3	39,8
Carbohidratos totales (% PS)	40,7	51.3	38,1	41.0	40,9	50,40	40,4	44,6

Tabla 3-. Porcentajes de contenidos energéticos de M. pyrifera. (2n y 3n)

Los principales usos actuales de *Macrocystis pyrifera* comprenden la abalonicultura e industria de los alginatos y potencialmente, producción de biocombustibles (bioetanol), gastronomía gourmet y su uso en agronomía como fertilizante o alimento de ganado bovino. La posibilidad de obtener de variedades con diferencias en la composición química podría eventualmente rentabilizar aún más su cultivo en escalas mayores. Hasta el momento los

resultados sugieren que la calidad química del triploide (tabla 3) no cambiaría significativamente con respecto al que se esperaba para esta especie, sin embargo podría ser diferente si el contenido energético se midiera en plantas nuevas, juveniles y adultas. Esto, de la mano con un perfeccionamiento en la ingeniería del cultivo haría altamente atractiva la actividad desde un punto de vista no solo técnico sino económico. Independiente de la demanda futura de Macrocystis, es una de las alternativas más prometedores que se vislumbran para suministrar de forma sostenible biomasa de huiro a nivel regional, nacional y especialmente hoy para alimento de abalones. Es necesaria mayor investigación en la diversificación del uso de la biomasa y como variedad triploides podrían relacionarse con estos usos.

Un resultado relevante en este estudio lo representa en los hallazgos de ploidía en gametofitos masculinos y femeninos, que formula preguntas y dudas sobre lo que significa haploide y diploides en ciclo de vida de *Macrocystis*. El análisis de la citometría de flujo reveló que un gametofito masculino, de 6 gametofitos frecuenciados donde era de esperar un DNA nuclear 1C, el análisis representa 2C (Müller et al 2015). Ello ocurriría de manera espontánea y natural en el ambiente como lo demuestran un número importante de gametofitos femeninos de diferentes procedencias con un valor promedio superior. Es decir, un gametofito que podría corresponder a un 2n, lo que significaría poder encontrar en la naturaleza organismos triploides y tetraploides. Nuestros resultados demuestran diferencias sexuales específicas en el DNA contenido en el núcleo, de los gametofitos analizados. Esta condición diplotenica hace que la técnica de la citometría de flujo es la clave, para la medición del contenido de DNA nuclear. La medición del número de cromosomas via microscópica debe ser correlacionado con esta técnica de la citometría de flujo, para explicar lo que estaría ocurriendo con el ciclo de vida de Macrocystis en las costas del Pacifico y Atlántico Sur.

5. Conclusiones

- Objetivos Específicos y su relación de éxito

i. Producción de Banco de Gametofitos (2n): Logrado para el proyecto y la técnica se ha perfeccionado.

ii. Producción de Esporofitos (3n): Logrado para el proyecto. Debe seguirse produciendo un mayor número y con resultados a evaluar en diversos lugares /regiones en el mar.

iii. Evaluación de productividad (3n) en el laboratorio
   - No hay diferencias significativas entre 2n y 3n.

iv. Evaluación de productividad en el Mar.
   - 3 inóculos de un total de 10 altamente productivos
   - Relación de producción de biomasa de 3n sobre 2n es de un 60% superior.

v. Comprobación de triploidía
   - Microscopia número de cromosoma n= 20 ; 2n = 41-43
   - Corte histológico, no se detectó diferencias morfológicas del talo entre 2n y 3n Debe mejorarse esta técnica.
   - Citometria de flujo
   - En el mar existen los mayores valores de longitud y biomasa en los triploides, lo que demuestra la certeza del método.

- Los cruces triploides crecieron significativamente más que los controles diploides, especialmente en el mar. Esto indicaría que nos aproximamos a una mejora de la productividad y con ello en la acuicultura de este recurso, a través de herramientas moleculares. Es una señal clara de un avance progresivo en la actividad de investigación con este recurso en Chile.

- Los ejemplares adultos y esporofitos, mostraron signos de ser reproductivos. Sin embargo las esporas aunque germinan formando gametofitos estos, no son viables. Esto permitiría tener cepas susceptibles a ser protegidas y comercializadas sin riesgo de plagio o copia. Se cumple con el objetivo del proyecto en el sentido que estos triploides no tienen descendencia viable. Ello ocurrió en todos los triploides analizados y puestos a cultivar en el mar.

- No obstante, habrían otras variables que afectarían el crecimiento de los triploides, y que deben ser conocidas para mejorar el crecimiento de ellos. En el laboratorio generalmente las variables son controladas y constantes, por lo que manteniendo el protocolo descrito en Westermeier et al. (2006) para el cultivo de huiro las productividades debiesen ser atractivas. En el mar la alta variación de las distintas variables bióticas (por ejemplo briozoos) y abióticas (e.g. nutrientes) hacen necesario crear estrategias para predecir estas variables y mitigar sus efectos en los cultivos. Se hace urgente conocer las dinámicas de los nutrientes, corrientes, físico –química del agua y aparecieron de briozoos, entre otras variable de las bahías de Atacama.

- De igual forma la época de siembra y la localidad geográfica son variables importantes a considerar para maximizar productividades. Pensando en un centro productor de algas se deben generar medidas que permitan conocer y poder predecir las estacionalidad (u otra oscilación en otro rango temporal) de estas variables, a modo de rentabilizar aún más los cultivos a un nivel comercial.

- La estacionalidad de la composición química proximal de las algas no es significativa. Si lo es para el disco de fijación con los porcentajes de proteínas y con el estipe, frondas y aerocistos para los hidratos de

carbono. Estos resultados abren expectativas para usar esta biomasa en otros productos, lo que significa diversificar su uso.

- El hallazgo de un gametofito masculinos 2C como también de varios gametofitos femeninos 2C, y que se presentan espontáneamente en la naturaleza (Müller et al 2015), deben ser considerados para aplicaciones en las políticas de Subpesca relacionados con los cultivos triploides e incluso de otras ploidias de Macrocystis que pudiesen desarrollarse naturalmente en las costas de Chile. No tiene sentido seguir pensando que ello corresponde a procesos de manipulación genética en el laboratorio: con estos antecedentes de ploidía reportados en este estudio se debería descartar dicha consideración para la realización de cultivos de variedades mejoradas, por este organismo del Estado.

- Estas variantes de ploidía determinadas y una vez probadas con mayor certeza en el número de triploides que se analicen tanto en el laboratorio, como en el ambiente natural, deberían ser un prerrequisito importante a considerar en planes futuros de cultivo y manejo en el desarrollo de la agronomía marina de Macrocystis en Chile.

- En los resultados obtenidos de este proyecto, el ciclo de vida de Macrocystis pyrifera en Chile sería diferente al que se reporta en la literatura y en textos de estudio para la enseñanza de la botánica marina y en general de textos de biología. A continuación se señalan las principales diferencias encontradas:

Ciclo de vida sin proyecto	**Ciclo de Vida con Proyecto**
Gametofitos Masculino = n	Gametofitos Masculino = n /2n
Gametofitos Femenino = n	Gametofitos Femenino = n /2n
Esporofito = 2n	Esporofito = 2n o superior

- Los resultados obtenidos en este proyecto son pioneros y fundamentales para estudios posteriores. Demuestra que la técnica es viable, pero debe evaluarse en un número mayor de cruzamientos, es decir producir un número mayor de triploides y que deben ser probados a lo largo de la costa de Chile, al menos desde Taracapa a Coquimbo, regiones donde la extracción está siendo extremadamente fuerte por la necesidad de biomasa utilizada especialmente en la alimentación de abalones. El futuro en la masificación de la producción de este invertebrado, depende de este recurso algal.
- Con un número mayor de estos triploides se podrá determinar además si alguno de ellos presenta inmunidad a "pestes" como briozoos, que fueron un factor gatillante en los valores de biomasa determinados y reportados en este proyecto.

i. Bibliografía

Alveal K, Romo H, Avila M (1982) Estudios de ciclos de vida de Macrocystis pyrifera de Isla Navarino, Chile. Gayana Bot 39:1–12.

AOAC (2012) Official methods of analysis, 19th Editi.

Arai K, Fujimoto T (2013) Genomic constitution and atypical reproduction in polyploid and unisexual lineages of the Misgurnus loach, a teleost fish. Cytogenet Genome Res 140:226–240. doi: 10.1159/000353301

Asensi AO, Küpper FC (2012) Seasonal periodicity and reproduction of brown algae (Phaeophyceae) at Puerto Deseado (Patagonia). Bot Mar 55:217–228. doi: 10.1515/bot-2012-0002

Attwood CG, Lucas MI, Probyn (1991) Production and standing stocks of the kelp Macrocystis laevis Hay at the Prince Edward Islands, Subantarctic. Polar Biol 11:129–133. doi: 10.1007/BF00234275

Bailey J, Ollis D (1986) Biochemical engineering fundamentals. McGraw-Hill Co.

Bashir S, Lee S (1994) Fuel ethanol production from agricultural lignocellulosic feedstock. A review. Pet Sci Technol 12:1427 – 1443.

Braud JP, Etcheverry H, Pérez P (1974) Development de l'algue M. pyrifera (L.) Ag. sur les côtes Bretonnes. Bull Inst Pêches Marit Paris 233:1–15.

Bothwell, J. H., Marie, D., Peters, A., Cock, J. M. & Coelho, S. M. 2010. Role of endore duplication and apomeiosis during parthenogenetic reproduction in the model brown alga *Ectocarpus*. *New Phytologist* 188: 111-21.

Buschmann AH, Varela D a., Hernández-González MC, Huovinen P (2008) Opportunities and challenges for the development of an integrated seaweed-based aquaculture activity in Chile: Determining the physiological capabilities of Macrocystis and Gracilaria as biofilters. J Appl Phycol 20:571–577. doi: 10.1007/s10811-007-9297-x

Candia A, Romo H, Alveal K, Delarossa V (1979) Cultivo unialgal de Macrocystis pyrifera (L.) C. Ag. de la Bahía de Concepción. Rickia 8:75–83.

Celis-Plá P, Alveal K (2003) Técnicas de cultivo sobre substrato artificial, para el alga Macrocystis pyrifera (Linnaeus) C. Agardh, (Phaeophyta, Laminariales). An Inst Patagon 2003:67–72.

Chinoweth D, Fannin K (2002) Biological Gasification of Marine Algae. Florida

Demes KW, Graham MH, Suskiewicz TS (2009) Phenotypic plasticity reconciles incongruous molecular and morphological taxonomies: The giant kelp, macrocystis (laminariales, phaeophyceae), is a monospecific genus. J Phycol 45:1266–1269. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00752.x

Demirbas MF, Balat M, Balat H (2009) Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. Energy Convers Manag 50:1746–1760. doi: 10.1016/j.enconman.2009.03.013

Devinny JS, Leventhal J (1979) New methods for mass culture of Macrocystis pyrifera sporophytes. Aquaculture 17:241–250. doi: 10.1016/0044-8486(79)90127-3

Etcheverry H, Collantes G (1978) Cultivo artificial de Macrocystis pyrifera (L.) C. Agardh (Phaeophyta, Laminariales). Arch del Mus Hist Nat Valparaiso 11:9–17.

Flajšhans M, Gela D, Kocour M, et al (2010) A review on the potential of triploid tench for aquaculture. Rev Fish Biol Fish 20:317–329. doi: 10.1007/s11160-009-9144-z

Graham MH, Vásquez J., Buschmann AH (2007) Global ecology of the giant kelp. Oceanogr Mar Biol 45:39–88.

Guiry MD, Guiry GM (2015) AlgaeBase. In: World-wide Electron. Publ. Natl. Univ. Ireland, Galway. http://www.algaebase.org. Accessed 11 Jun 2015

Gutierrez A, Correa T, Muñoz V, et al (2006) Farming of the giant kelp macrocystis pyrifera in southern Chile for development of novel food products. J Appl Phycol 18:259–267. doi: 10.1007/s10811-006-9025-y

Hall DO, House J (1995) Biomass: an environmentally acceptable fuel for the future. J Power Energy 209:203–213.

Hilu KW (1993) Polyploidy and the evolution of domesticated plants. Am J Bot 80:1494–1499. doi: 10.2307/2445679

Hoffmann AJ, Santelices B (1997) Marine Flora of Central Chile. Ediciones Universidad Cátolica de Chile, Santiago

Horn SJ (2000) Bioenergy from brown seaweeds. Sci Technol November:Department of Biotechnology, Norweigian University.

Horn SJ, Aasen IM, Stgaard K (2000) Ethanol production from seaweed extract. J Ind Microbiol Biotechnol 25:249–254. doi: 10.1038/sj.jim.7000065

Jeason D, Carrera J (2000) Avances en Biotecnología Ambiental, tratamiento de residuos líquidos y sólidos. Acribia, Madrid

Jensen A (1993) Present and future needs for algae and algal products. Hydrobiologia 260/261:15–23.

Kawashima S (1993) Cultivation of the brown alga Laminaria "Kombu." In: Ohno M, Critchley AT (eds) Seaweed cultivation and marine ranching. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, pp 25–40

Klass DL (1998) Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals, Academic P. San Diego

Klug WS, Cummins MR, Spencer CH (2006) Conceptos de genetica. Pearson Education, Madrid

Lacadena JR (1981) Genética, Tercera ed. AGESA, Madrid

Larsen B (1981) Biosynthesis of alginate. Proceedings 10th International Seaweed Symposium. Walter de Gruyter and Co., Gothenburg, pp 7–34

Leitch a R, Leitch IJ (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. Science 320:481–483. doi: 10.1126/science.1153585

Lewis RJ (1996) Chromosomes of the brown algae. Phycologia 35:19–40.

Macaya EC, Zuccarello GC (2010) DNA barcoding and genetic divergence in the giant kelp Macrocystis (Laminariales). J Phycol 46:736–742.

Macchiavello J, Araya E, Bulboa C (2010) Production of Macrocystis pyrifera (Laminariales; Phaeophyceae) in northern Chile on spore-based culture. J Appl Phycol 22:691–697. doi: 10.1007/s10811-010-9508-8

McHugh, D.J., 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.

Müller DG (1967) Generationswechsel, Kernphasenwechsel und Sexualität der Braunalge Ectocarpus siliculosus im Kulturversuch. Planta 75:39–54.

Müller DG (1970) Diploide, heterozygote gametophyten bei der braunalge Ectocarpus siliculosus. Naturwissenschaften 57:357–358.

Müller DG (1975) Experimental evidence against sexual fusions of spores from unilocular sporangia of Ectocarpus siliculosus (Phaeophyta). Br Phycol J 10:315–321.

Müller DG, Gachon CMM, Küpper FC (2008) Axenic clonal cultures of filamentous brown algae : initiation and maintenance. 59–65.

Müller DG, Maier I, Marie D & Westermeier R. 2015. Nuclear DNA level and life cycle of kelps: What is haploial and diploial in Macrocystis (Laminariales, phaeophyceal). Journial of Phycology. (Submited).

Murúa P, Westermeier R, Patiño DJ, Müller DG (2013) Culture studies on early development of Lessonia trabeculata (Phaeophyceae, Laminariales): Seasonality and acclimation to light and temperature. Phycol Res 61:145–153. doi: 10.1111/pre.12013

Oliveira EC (1989) The rationale for seaweed cultivation in South America. In: Oliveira EC, Kautsky N (eds) Cultivation of Seaweeds in Latin America. pp 135–141

Palacios M, Mansilla A (2003) Desarrollo De Gametófitos Y Esporófitos De Macrocystis Pyrifera (L.) C. Agardh (Laminariales: Lessoniaceae) De La Región De Magallanes En Condiciones De Laborato- Rio. An Inst Patagon 31:43–53.

Piferrer F, Beaumont A, Falguière JC, et al (2009) Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture 293:125–156. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.036

Rogers PL, Jeon YJ, Lee KJ, Lawford HG (2007) Zymomonas mobilis for Fuel Ethanol and Higher Value Products. In: Olsson L (ed) Biofuels. Springer Berlin Heidelberg, pp 263–288

Santelices B, Ojeda FP (1984) Population dynamics of coastal forests of Macrocystis pyrifera in Puerto Toro, Isla Navarino, Southern Chile. Mar Ecol Prog Ser 14:175–183.

Schiel DR, Foster MS (2015) The biology and ecology of giant kelp forests. University of California Press

Sernapesca (2015) Anuario estadistico de Pesca 2013. www.sernapesca.cl.

Shea R, Chopin T (2007) Effects of germanium dioxide, an inhibitor of diatom growth, on the microscopic laboratory cultivation stage of the kelp,

Laminaria saccharina. J Appl Phycol 19:27–32. doi: 10.1007/s10811-006-9107-x

Subpesca (2006) Caracterización de la pesquería de algas pardas de las regiones I y IV, 2005. Informe bimensual.

Tala F, Edding M, Vásquez J (2004) Aspects of the reproductive phenology of Lessonia trabeculata (Laminariales: Phaeophyceae) from three populations in northern Chile. New Zeal J Mar Freshw Res 38:255–266. doi: 10.1080/00288330.2004.9517235

Vasquez JA, Fonck E (1993) Estado actual y perspectivas de la explotacion de algas alginófitas en Sudamérica. In: Zertuche-González JA (ed) Situación actual de la industria de macroalgas productoras de ficocoloides en America Latina y el Caribe, Documento . FAO-Italia, pp 17–25

Voglmayr, H. 2007. DNA flow cytometry in non-vascular plants. In Doležel, Greilhuber. J. & Suda, J. [Eds.] *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH Verlag Weinheim, Germany, pp 267-285*

Westermeier R (1980) The marine seaweed of Chile's tenth region (Valdivia, Osorno, Llanquihue and Chiloe). In: Levring T (ed) Proceedings of the 10th International Seaweed Symposium. Walter de Gruyter and Co., Berlin, pp 215 – 220

Westermeier R, Cid M, Rivera PJ (1989) Efecto de factores ambientales sobre fases microscópicas de Macrocystis pyrifera (L). C. Ag. en cultivo. Medio Ambient 10:13–22.

Westermeier R, Patiño DJ, Piel MI, Müller DG (2005) Manual de cultivo del alga parda Macrocystis pyrifera (huiro) en Chile, Proyecto FONDEF D00I1144 Universidad Austral de Chile, Puerto Montt

Westermeier R, Patiño D, Piel MI, et al (2006) A new approach to kelp mariculture in Chile: Production of free-floating sporophyte seedlings from gametophyte cultures of Lessonia trabeculata and Macrocystis pyrifera. Aquac Res 37:164–171. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01414.x

Westermeier R, Patiño D, Müller DG (2007) Sexual compatibility and hybrid formation between the giant kelp species Macrocystis pyrifera and M. integrifolia (Laminariales, Phaeophyceae) in Chile. J Appl Phycol 19:215–221. doi: 10.1007/s10811-006-9126-7

Westermeier R, Patiño DJ, Müller H, Müller DG (2010) Towards domestication of giant kelp (Macrocystis pyrifera) in Chile: Selection of haploid parent

genotypes, outbreeding, and heterosis. J Appl Phycol 22:357–361. doi: 10.1007/s10811-009-9466-1

Westermeier R, Patiño DJ, Murúa P, Müller DG (2011) Macrocystis mariculture in Chile: Growth performance of heterosis genotype constructs under field conditions. J Appl Phycol 23:819–825. doi: 10.1007/s10811-010-9581-z

Westermeier R, Murúa P, Patiño DJ, et al (2012a) Variations of chemical composition and energy content in natural and genetically defined cultivars of Macrocystis from Chile. J Appl Phycol 24:1191–1201. doi: 10.1007/s10811-011-9752-6

Westermeier R, Patiño DJ, Murúa P, et al (2012b) Manual de repoblamiento de Macrocystis integrifolia en la Región de Atacama. Universidad Austral de Chile, Puerto Montt

Westermeier R, Patiño DJ, Murúa P, et al (2012c) A pilot-scale study of the vegetative propagation and suspended cultivation of the carrageenophyte alga Gigartina skottsbergii in southern Chile. J Appl Phycol 24:11–20.

Westermeier R, Murúa P, Patiño DJ, et al (2014a) Repopulation techniques for Macrocystis integrifolia (Phaeophyceae: Laminariales) in Atacama, Chile. J Appl Phycol 26:511–518. doi: 10.1007/s10811-013-0069-5

Westermeier R, Murúa P, Patiño DJ, et al (2014b) Giant kelp (Macrocystis) fishery in Atacama (Northern Chile): biological basis for management of the integrifolia morph. J Appl Phycol 26:1071–1079. doi: 10.1007/s10811-013-0176-3

Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, et al (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. Proc Natl Acad Sci U S A 106:13875–13879. doi: 10.1073/pnas.0811575106

j. Anexos

a. Anexo A. Crecimiento semanal de cruzamientos diploides y triploides en condiciones de laboratorio.

i. Primer Inoculo (Octubre 2013)

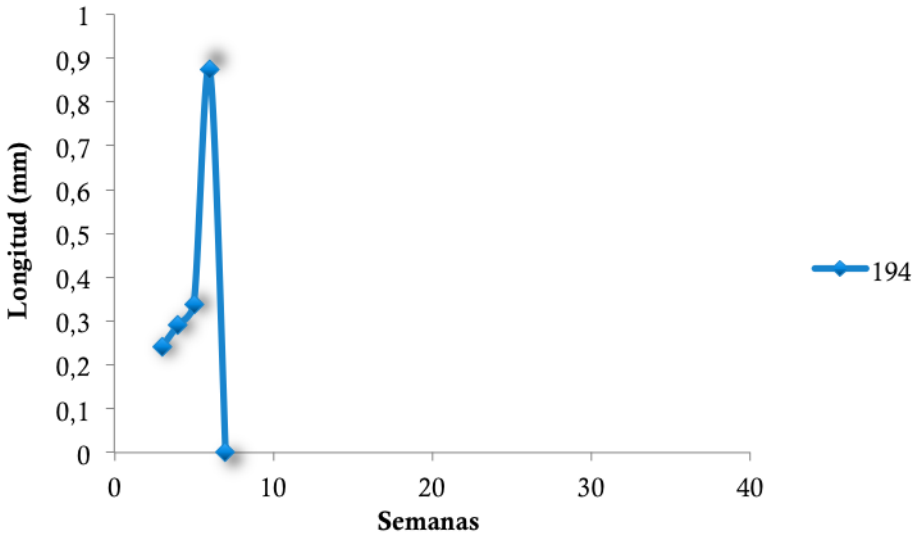


Fig. A1. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 194.

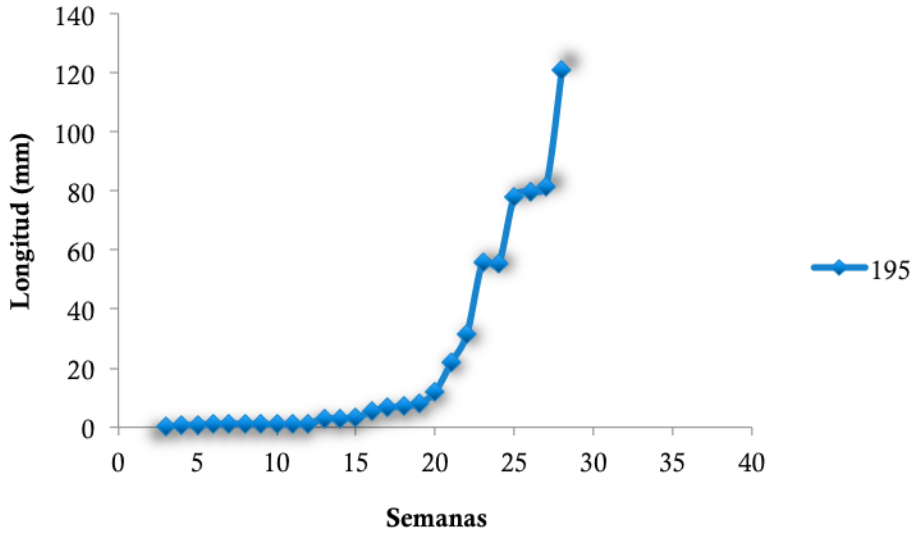


Fig. A2. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 195.

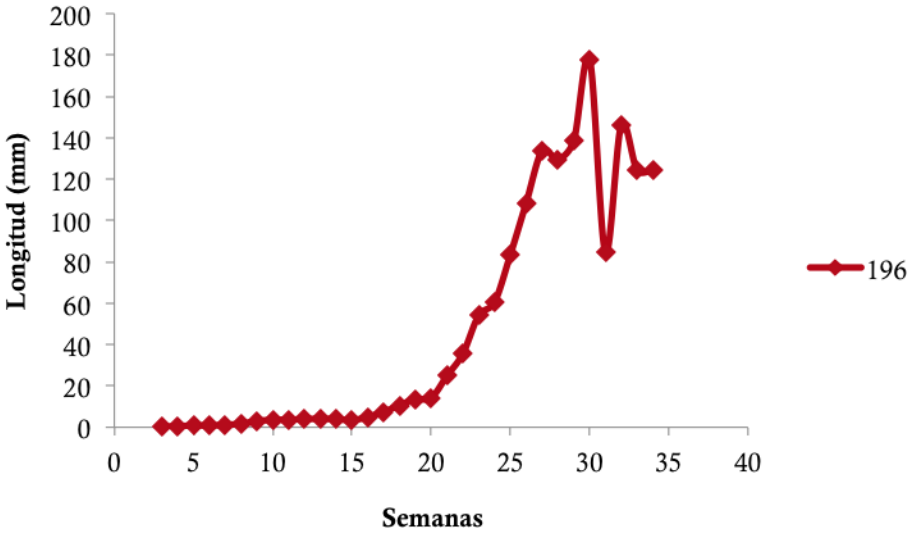


Fig. A3. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 196.

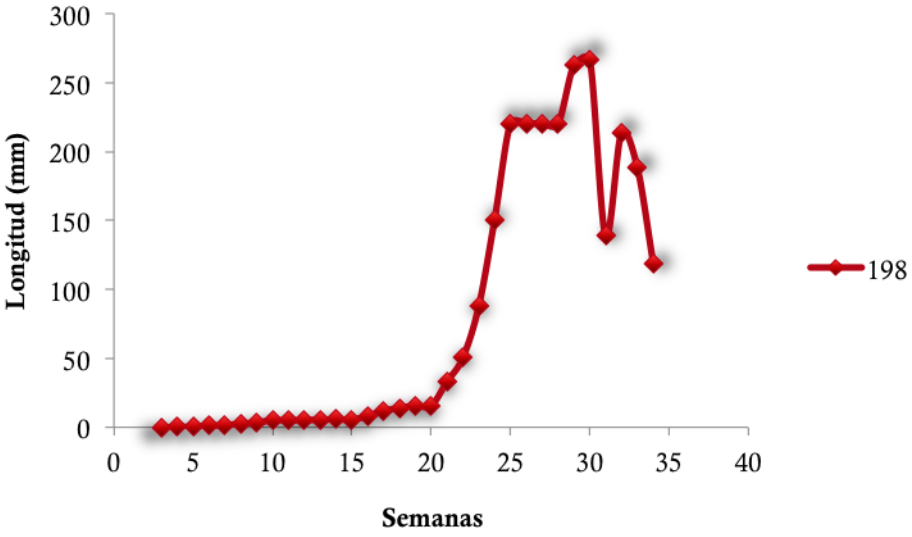


Fig. A4. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 198.

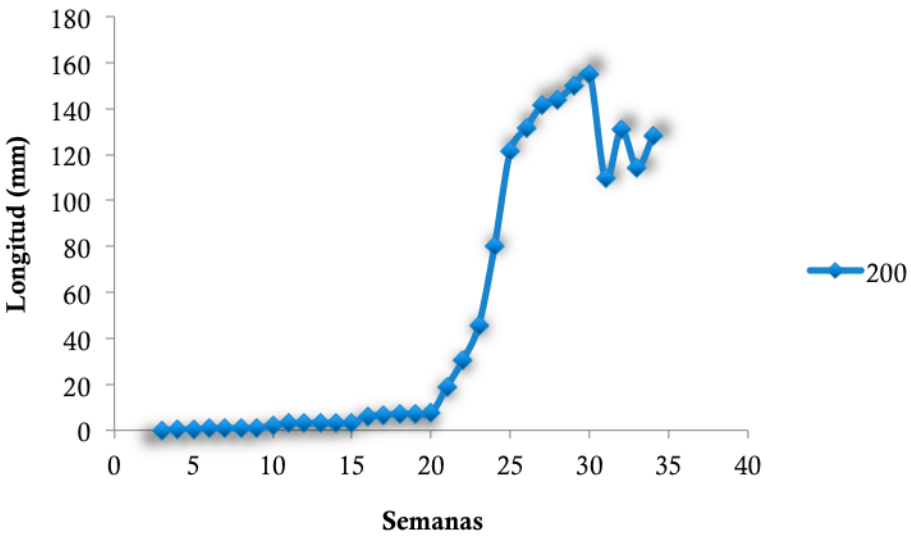


Fig. A5. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 200.

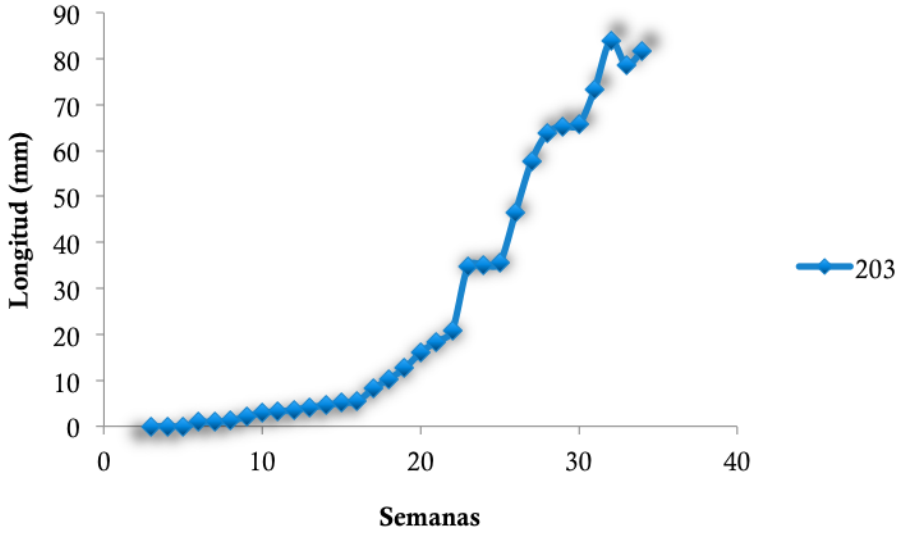


Fig. A6. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 203.

ii. Segundo Inoculo (Abril 2014)

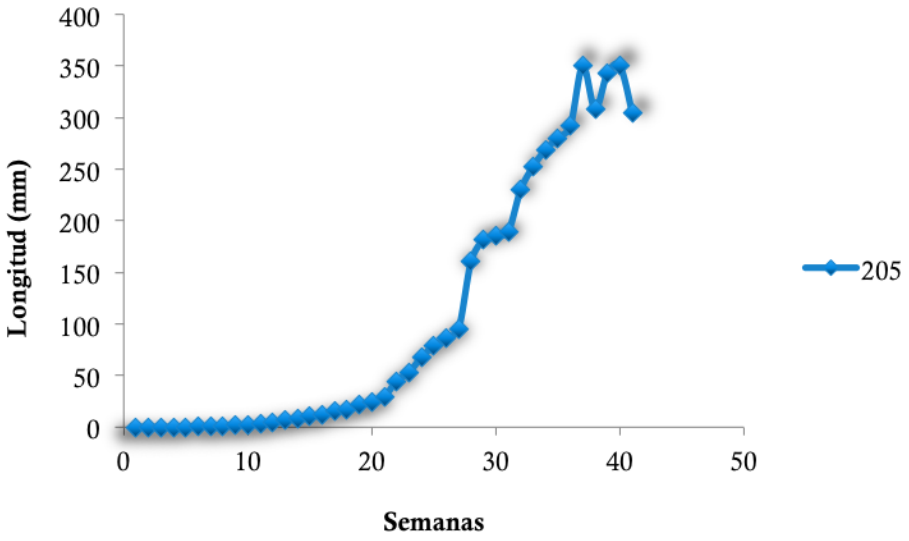


Fig. A7. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 205.

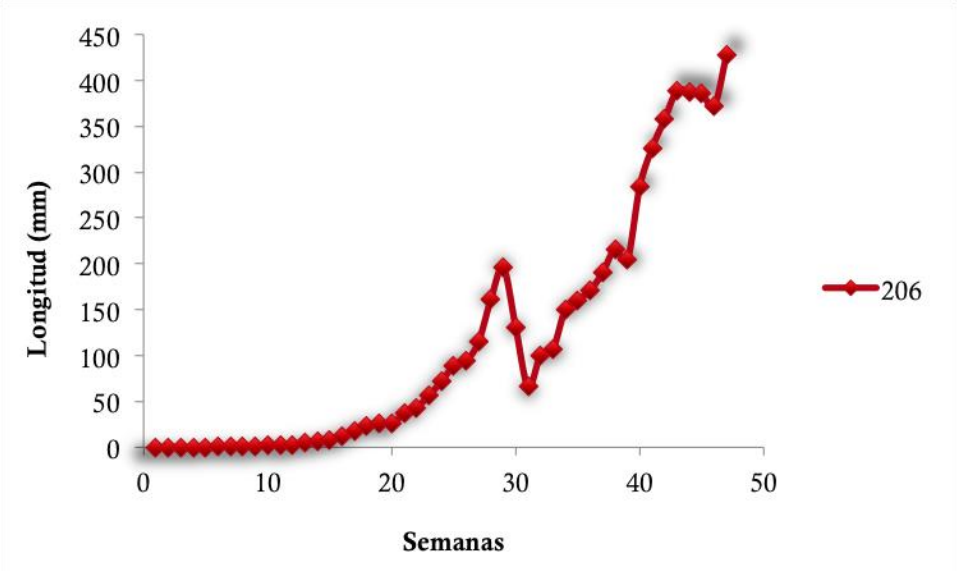


Fig. A8. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 206.

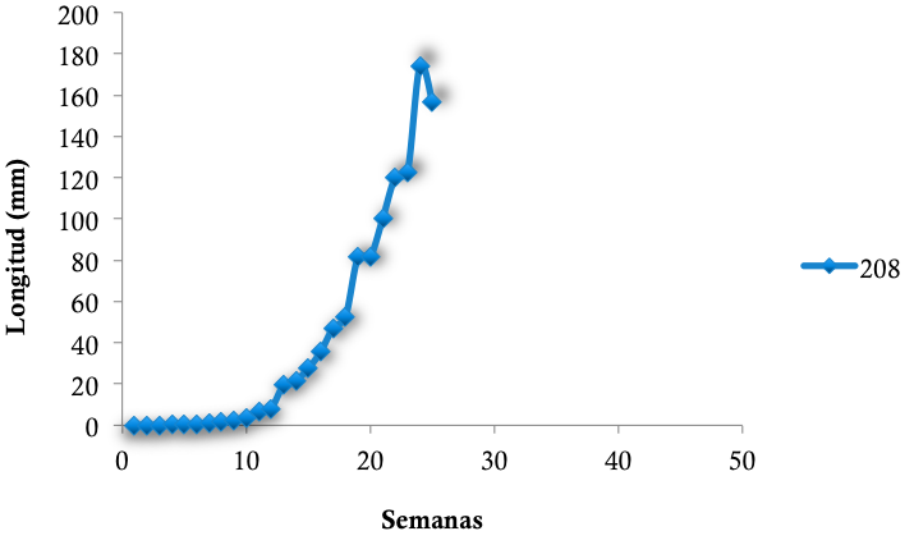


Fig. A9. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 208.

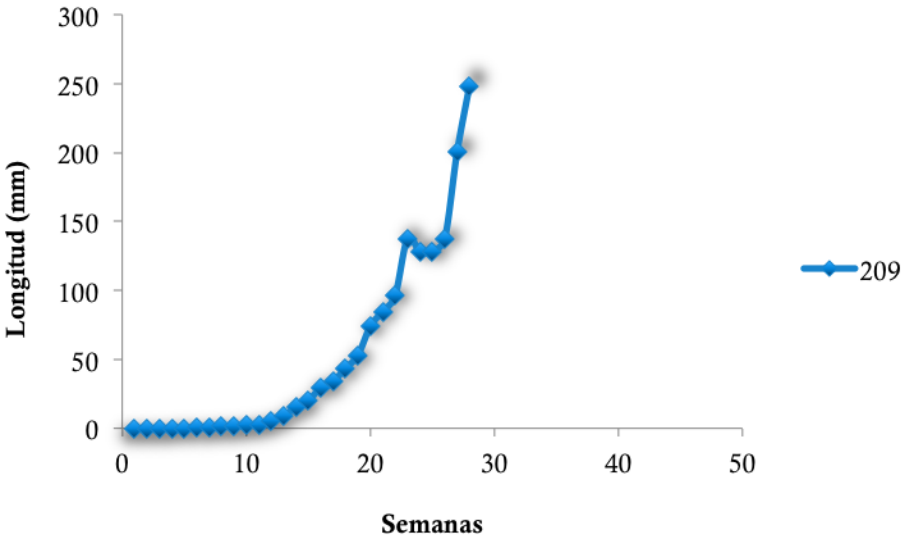


Fig. A10. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 209.

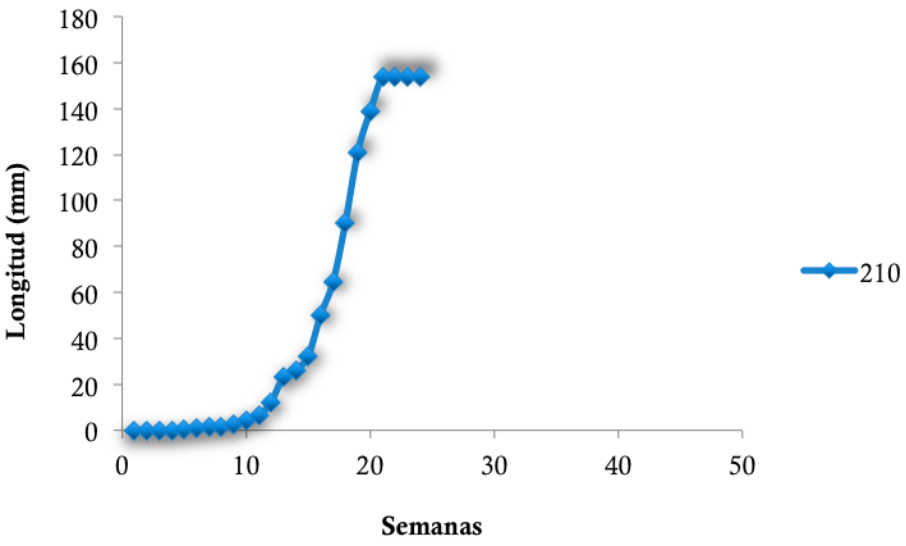


Fig. A11. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 210.

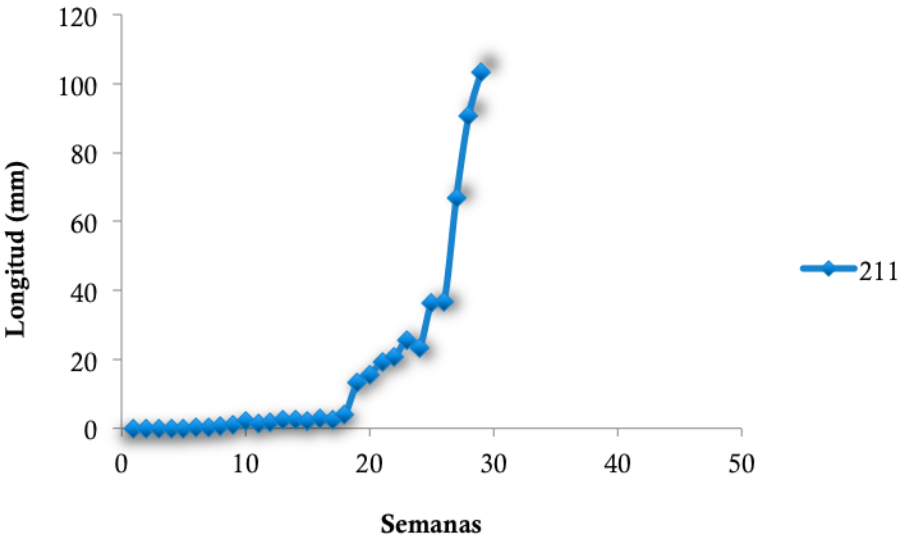


Fig. A12. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 211.

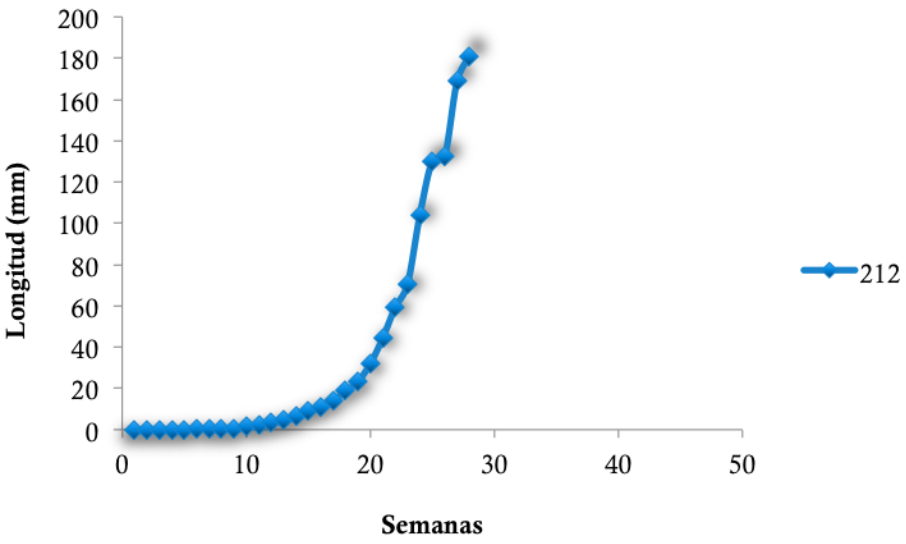


Fig. A13. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 212.

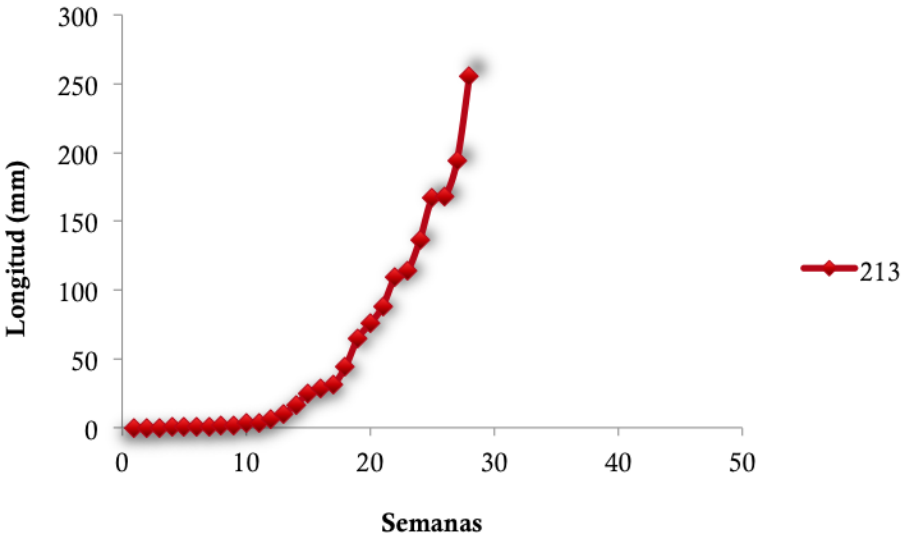


Fig. A14. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 213.

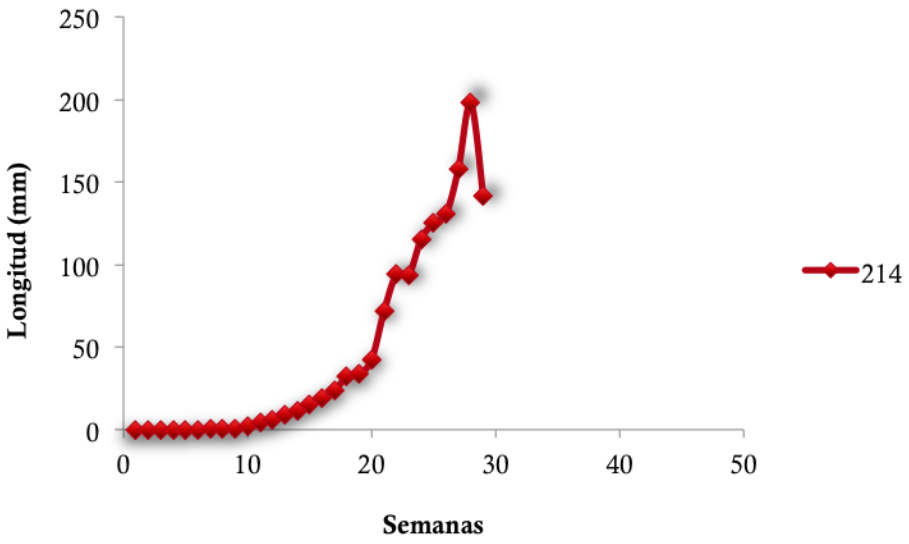


Fig. A15. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 214.

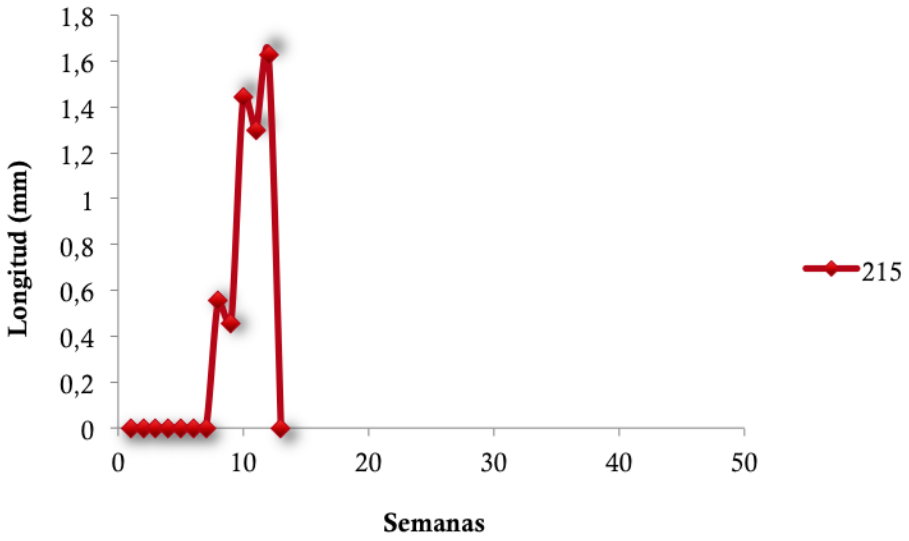


Fig. A16. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 215.

iii. Tercer Inóculo (Junio 2014)

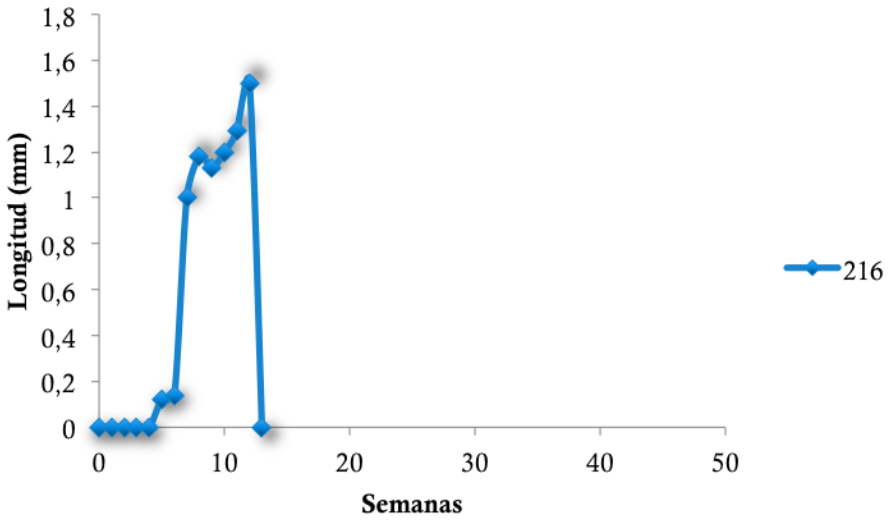


Fig. A17. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 216.

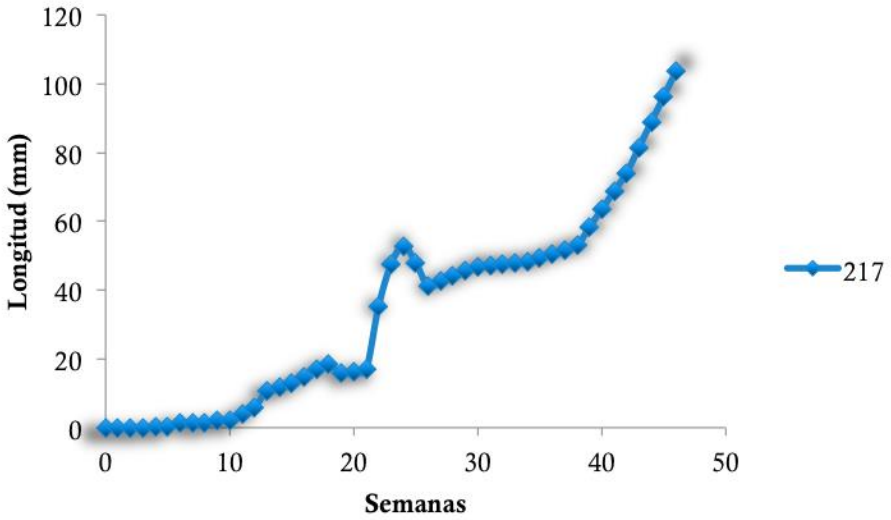


Fig. A18. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 217.

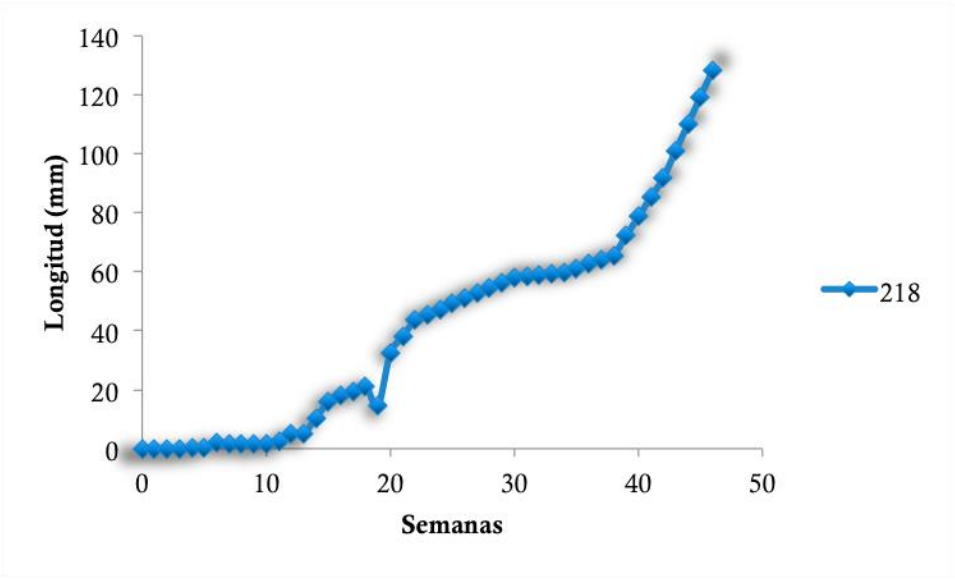


Fig. A19. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 218.

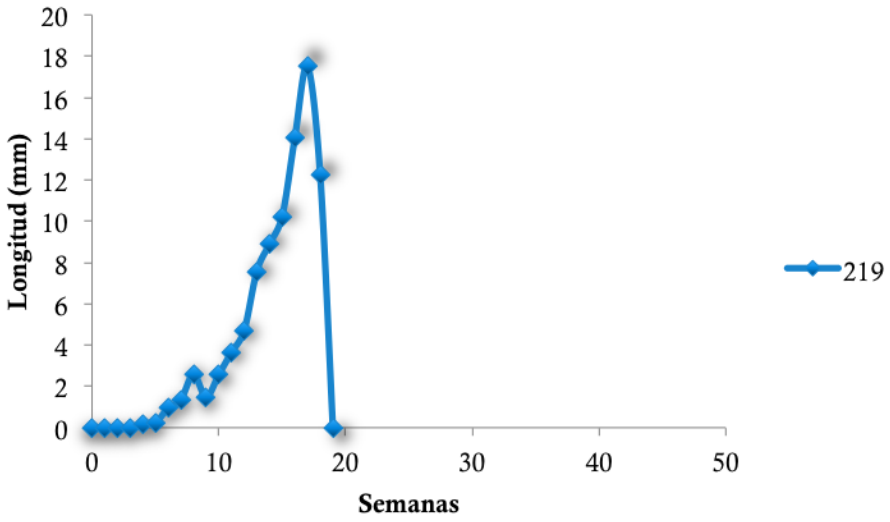


Fig. A20. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 219.

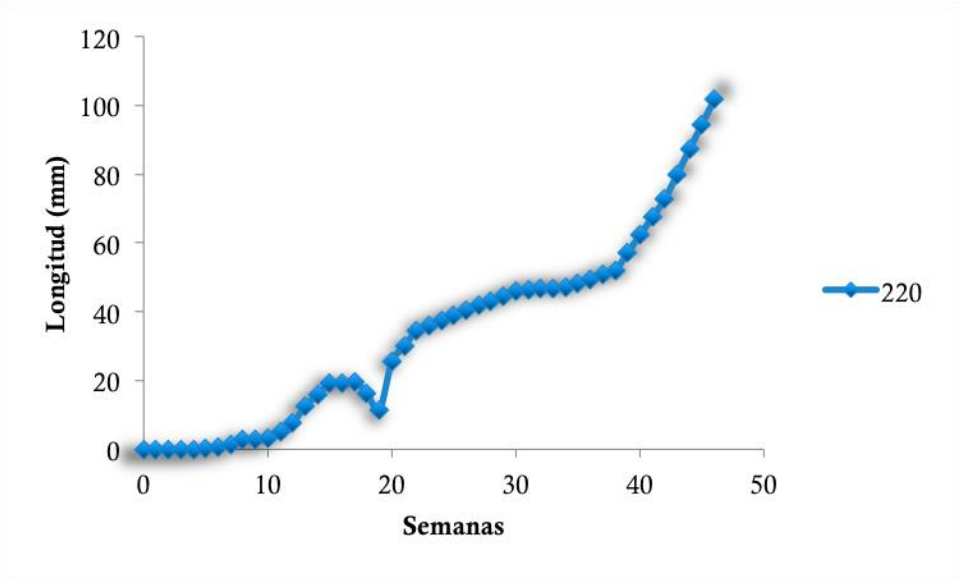


Fig. A21. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 220.

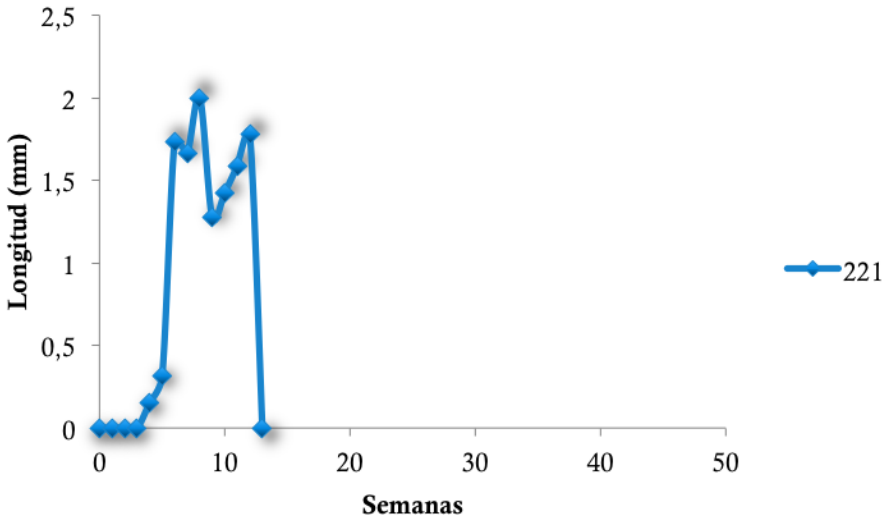


Fig. A22. Crecimiento semanal (en mm) del cruce diploide 221.

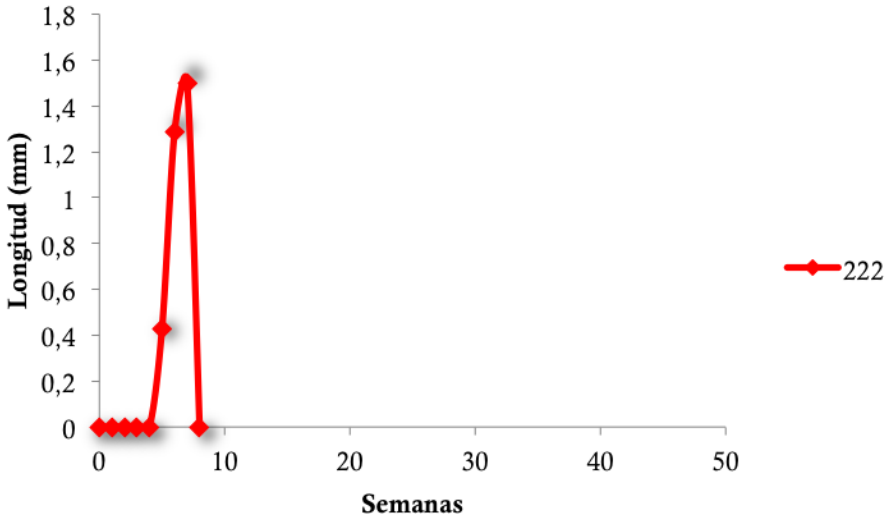


Fig. A23. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 222.

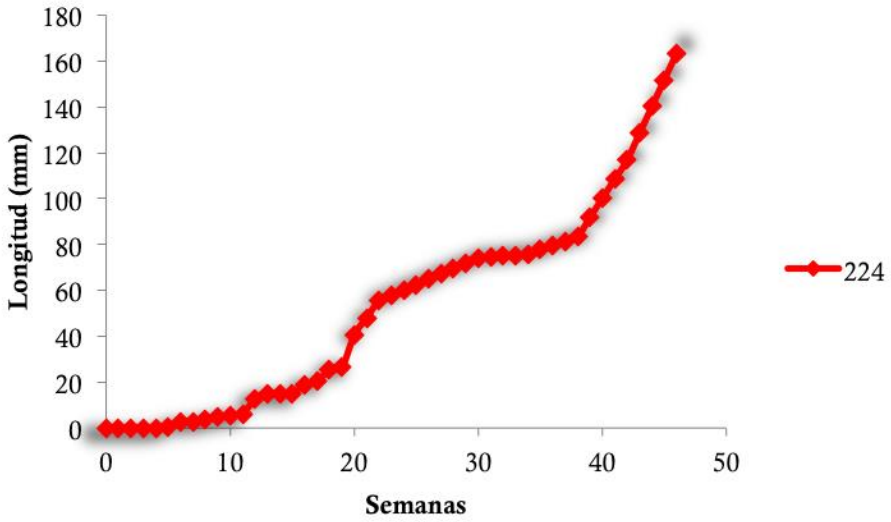


Fig. A24. Crecimiento semanal (en mm) del cruce triploide 224.

b. Anexo B. Crecimiento mensuales de cruzamientos diploides y triploides de Macrocystis en el mar

i. Siembra 1 (Marzo 2014)

1. Bahía Inglesa

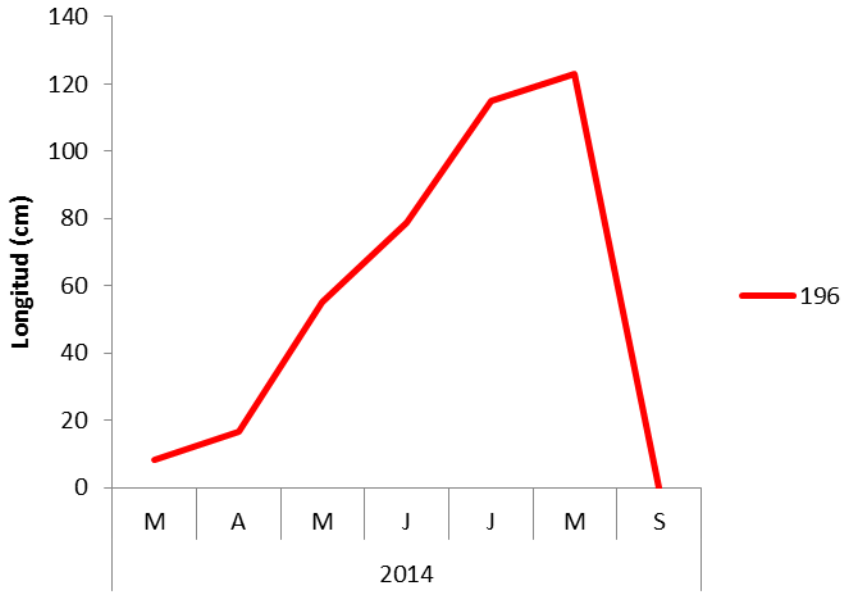


Fig. B1. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 196 en Bahía Inglesa.

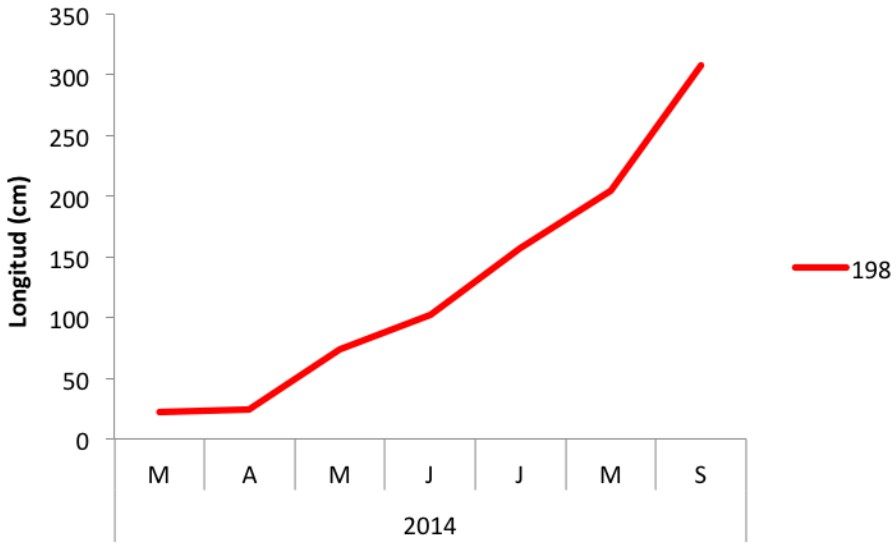


Fig. B2. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 198 en Bahía Inglesa.

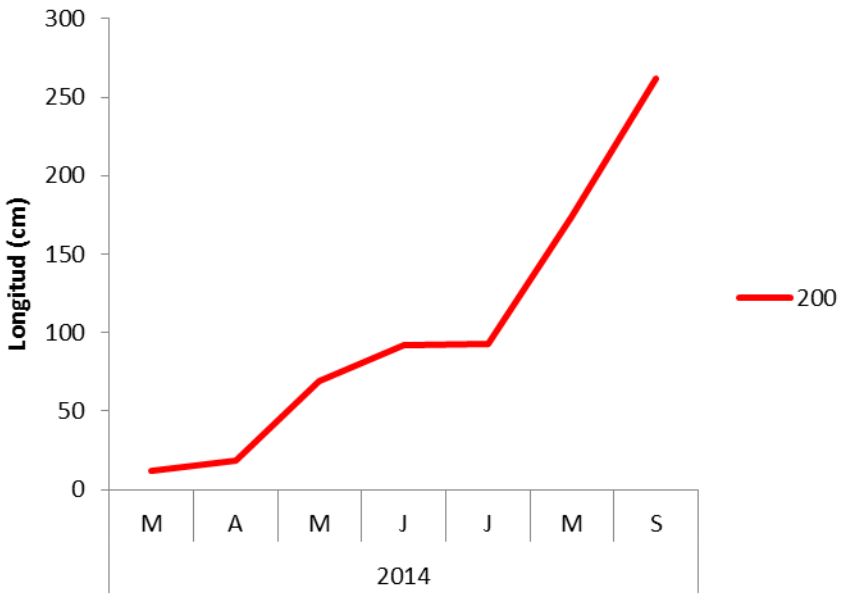


Fig. B3. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 200 en Bahía Inglesa.

2. Bahía Salada

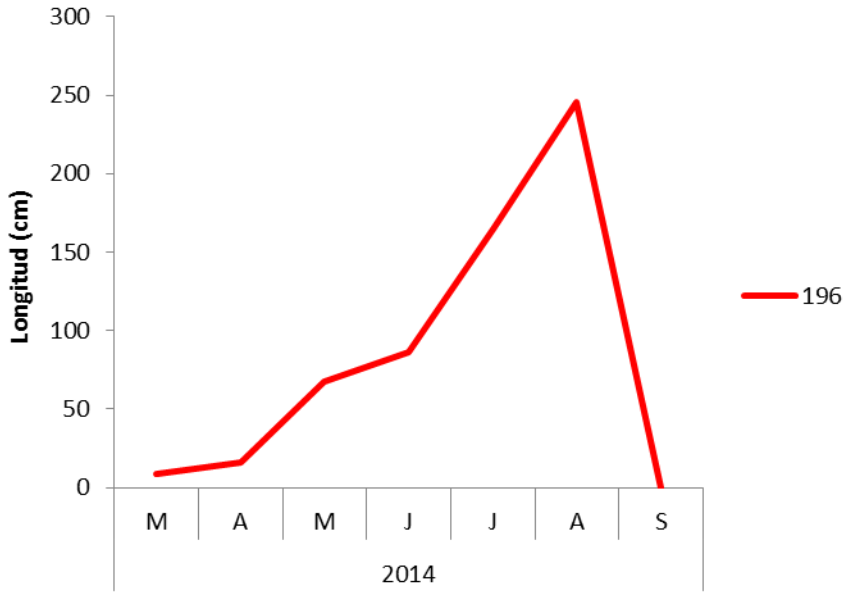


Fig. B4. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 196 en Bahía Salada.

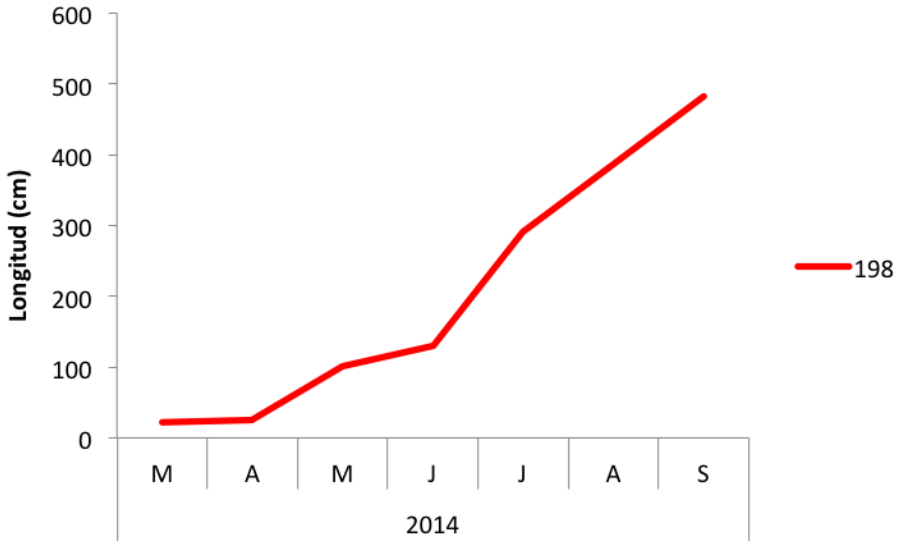


Fig. B5. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 198 en Bahía Salada.

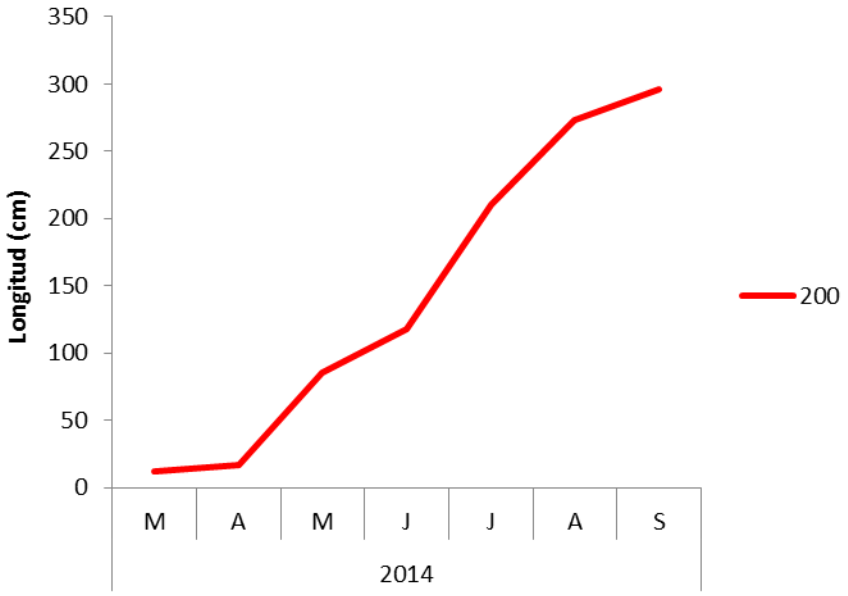


Fig. B6. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 200 en Bahía Salada.

ii. Siembra 2a (Agosto 2014)

1. Bahía Inglesa

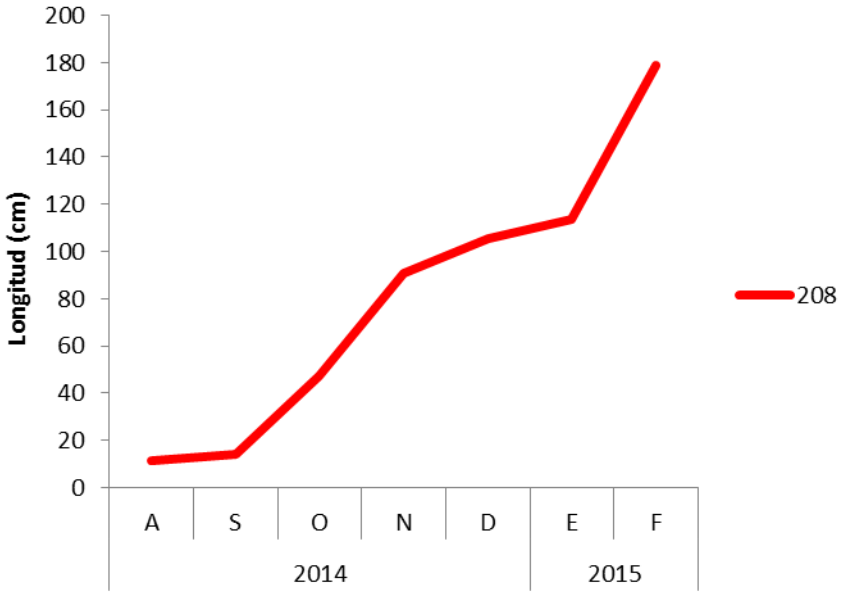


Fig. B7. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 208 en Bahía Inglesa.

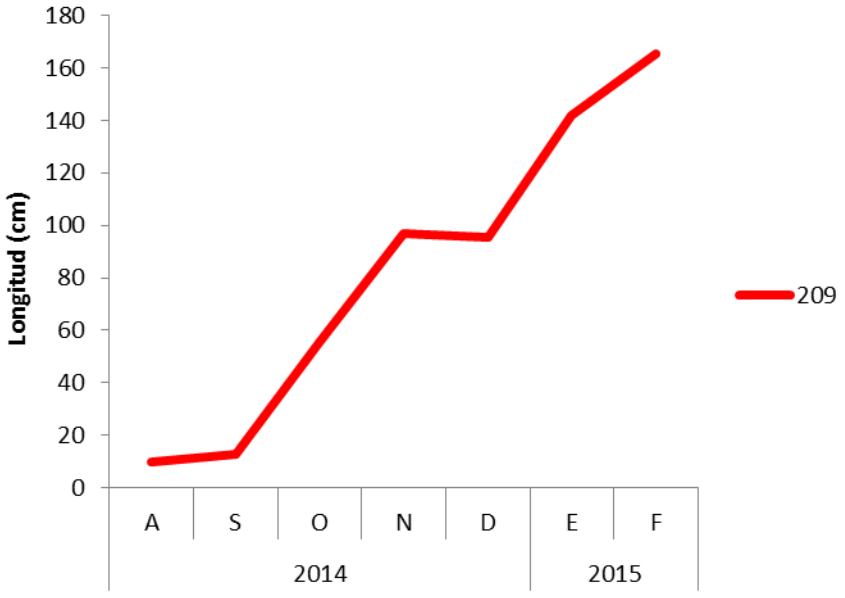


Fig. B8. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 209 en Bahía Inglesa.

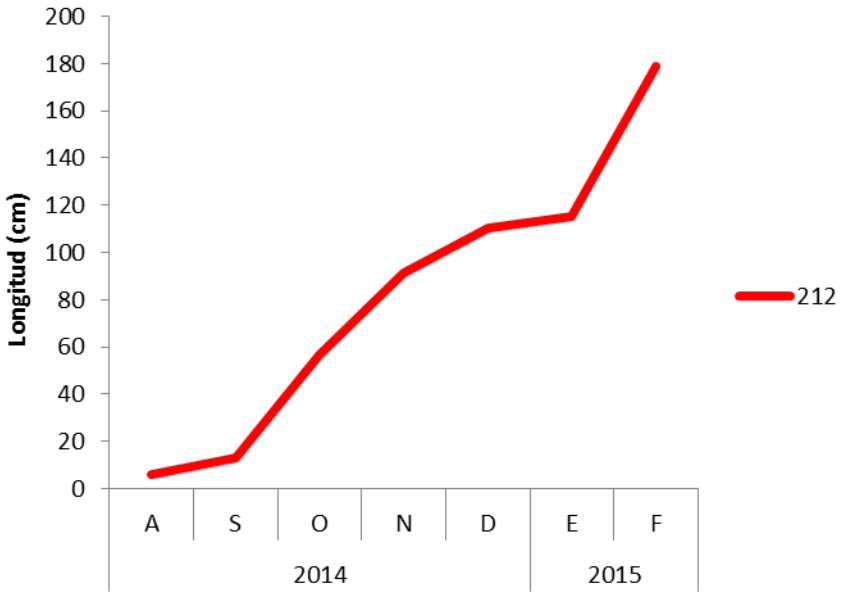


Fig. B9. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 212 en Bahía Inglesa.

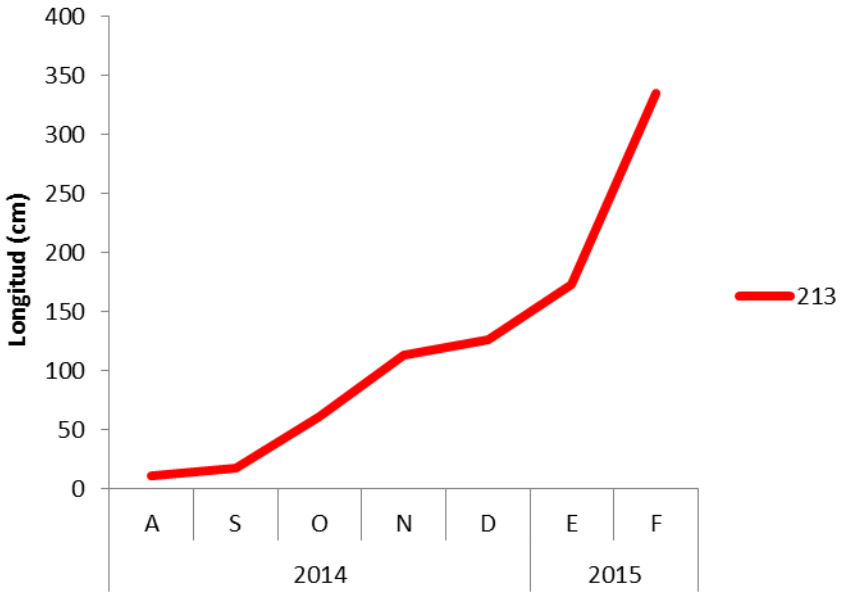


Fig. B10. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 213 en Bahía Inglesa.

Bahía Salada

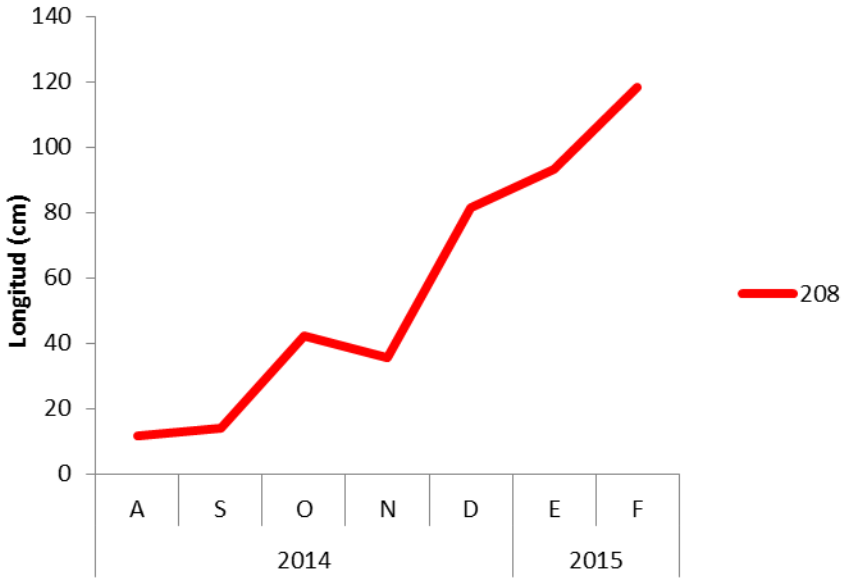


Fig. B11. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 208 en Bahía Salada.

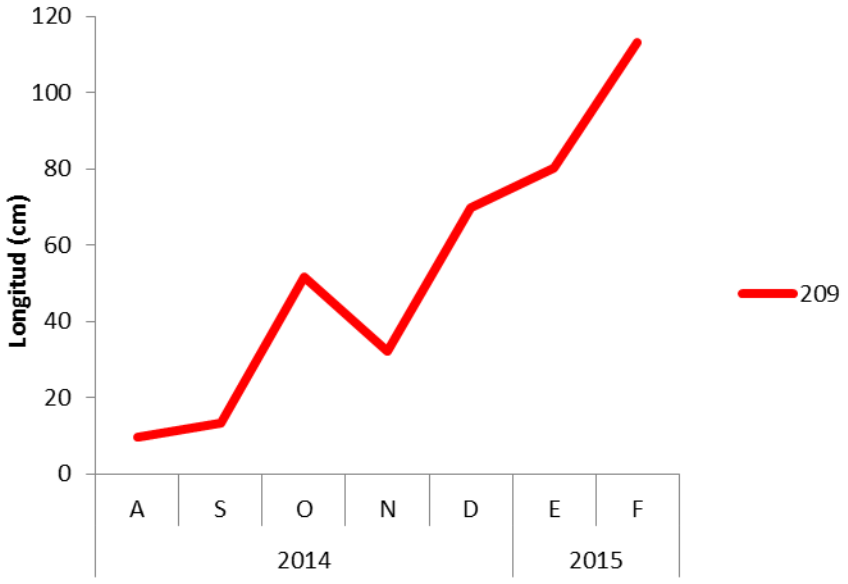


Fig. B12. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 209 en Bahía Salada.

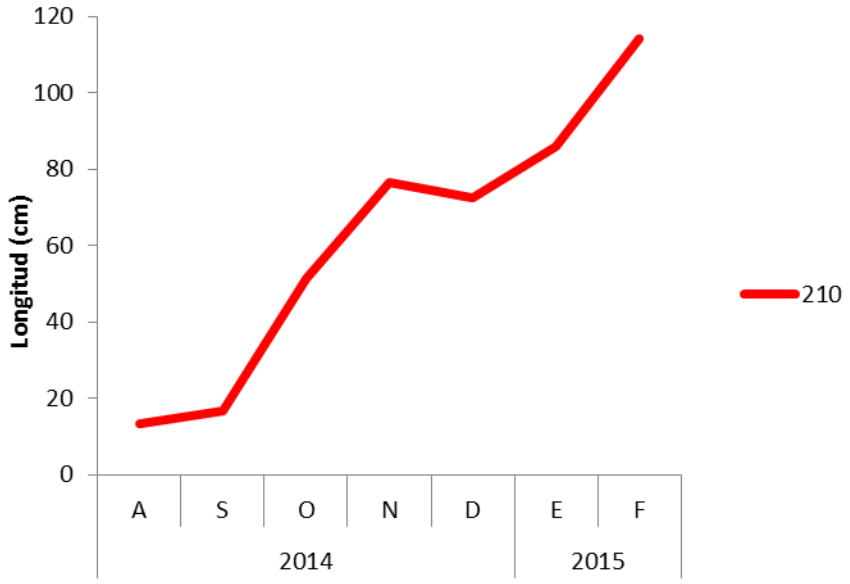


Fig. B13. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 210 en Bahía Salada.

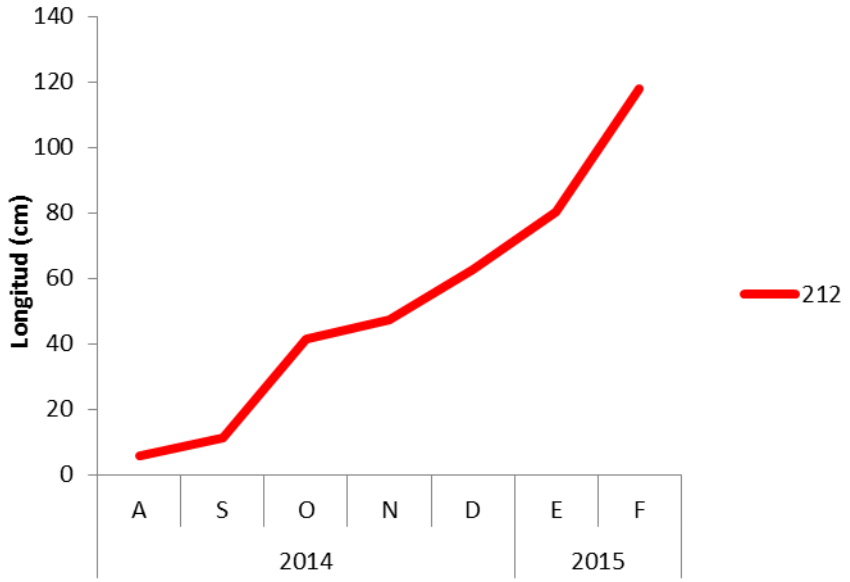


Fig. B14. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 212 en Bahía Salada.

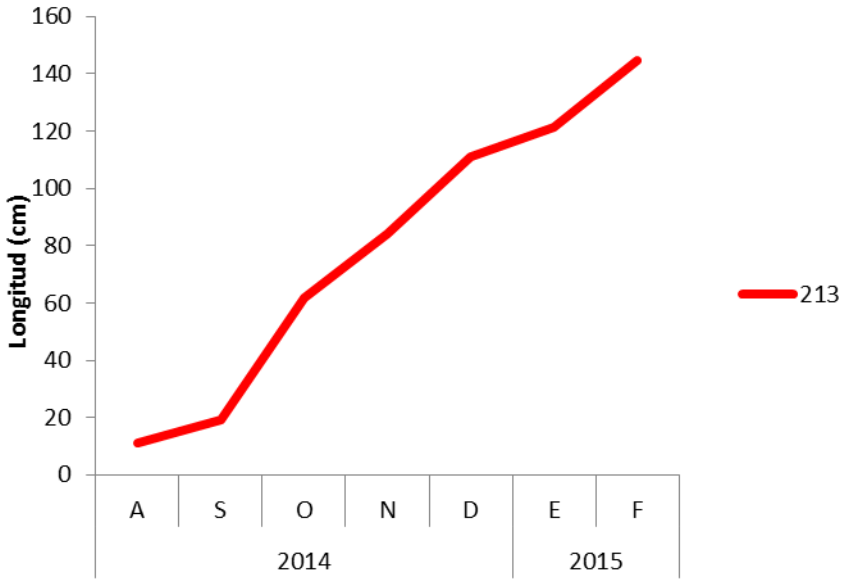


Fig. B15. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 213 en Bahía Salada.

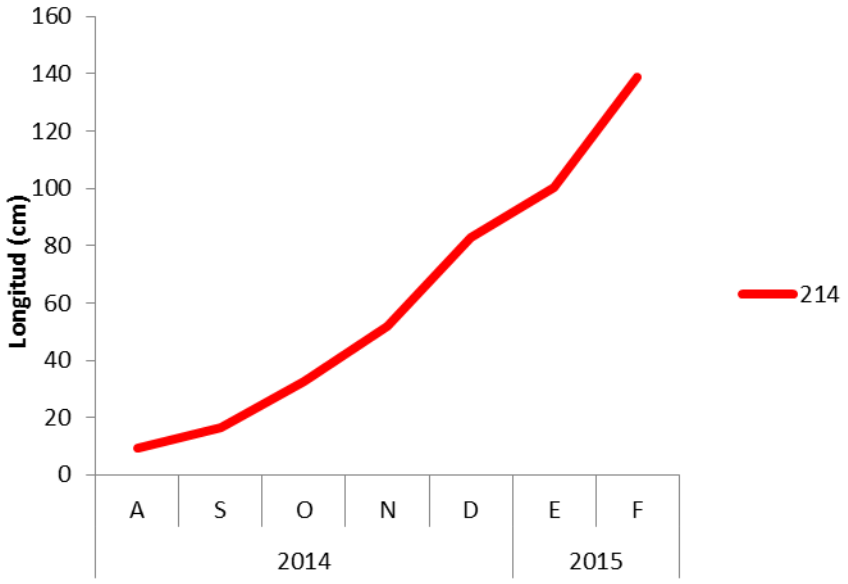


Fig. B16. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 214 en Bahía Salada.

iii. Siembra 2b (Octubre 2014)

1. Bahía Inglesa

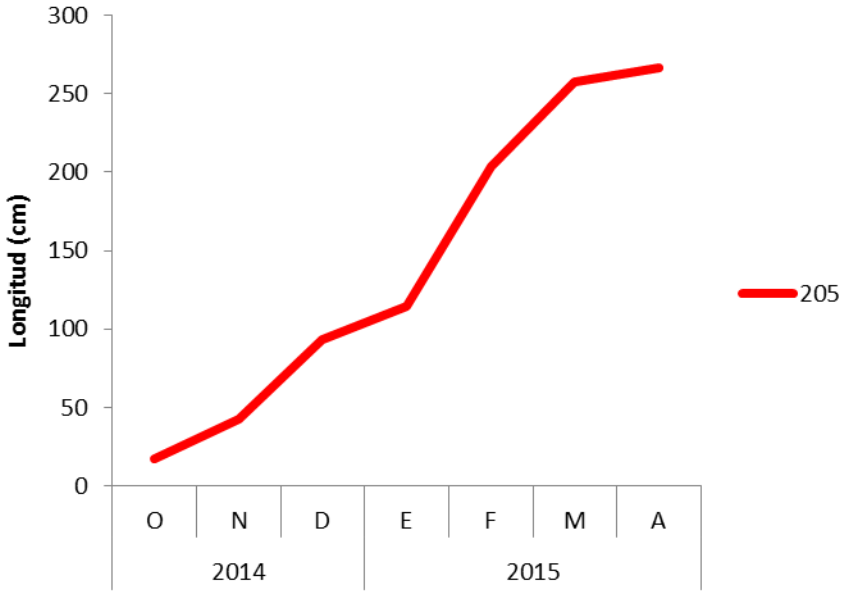


Fig. B17. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 205 en Bahía Inglesa.

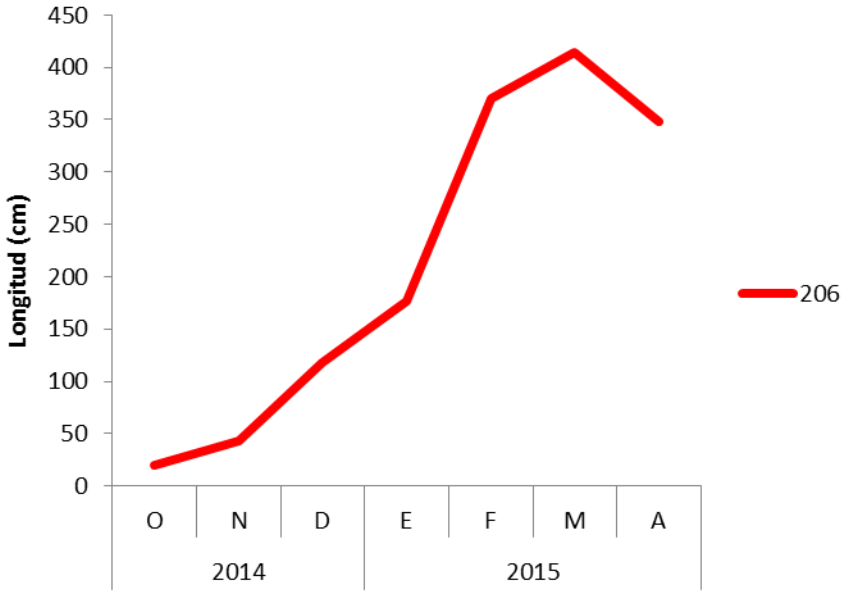


Fig. B18. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 206 en Bahía Inglesa.

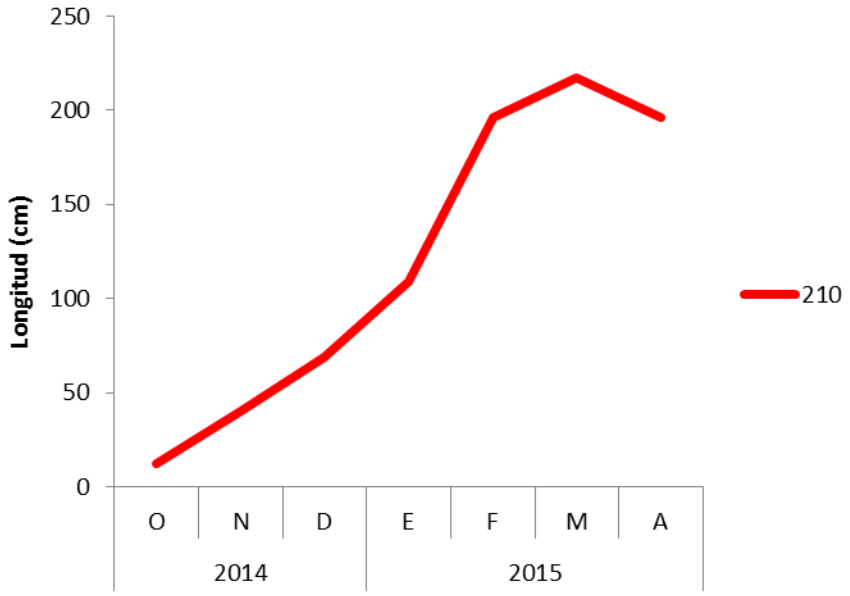


Fig. B19. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 210 en Bahía Inglesa.

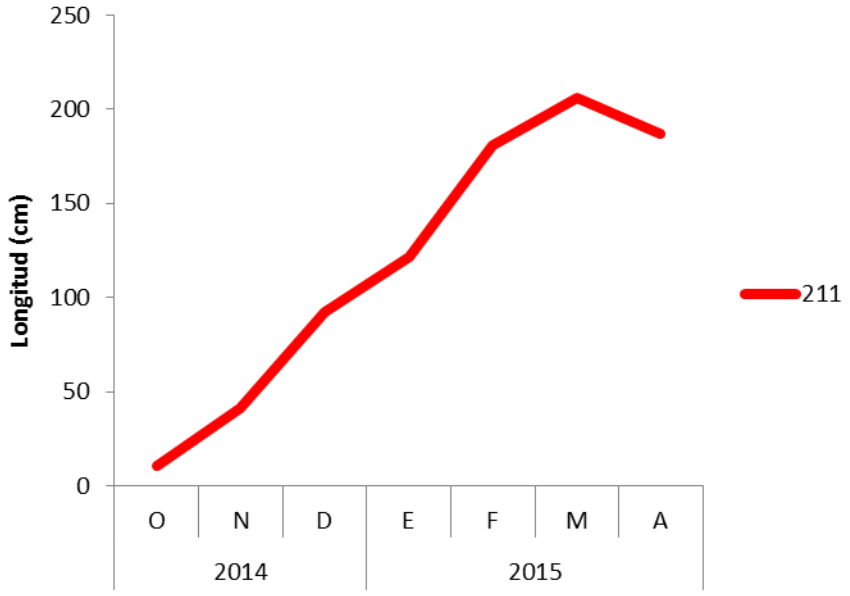


Fig. B20. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 211 en Bahía Inglesa.

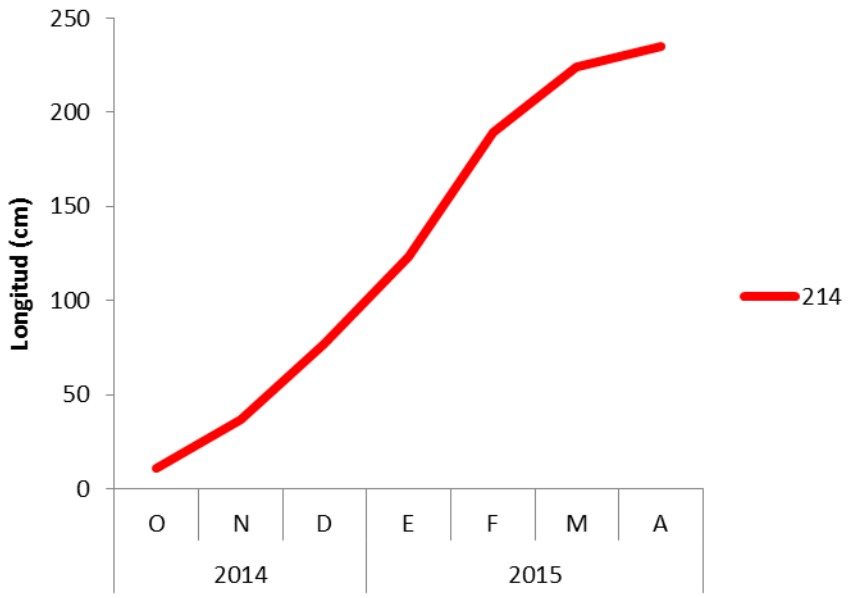


Fig. B21. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 214 en Bahía Inglesa.

2. Bahía Salada

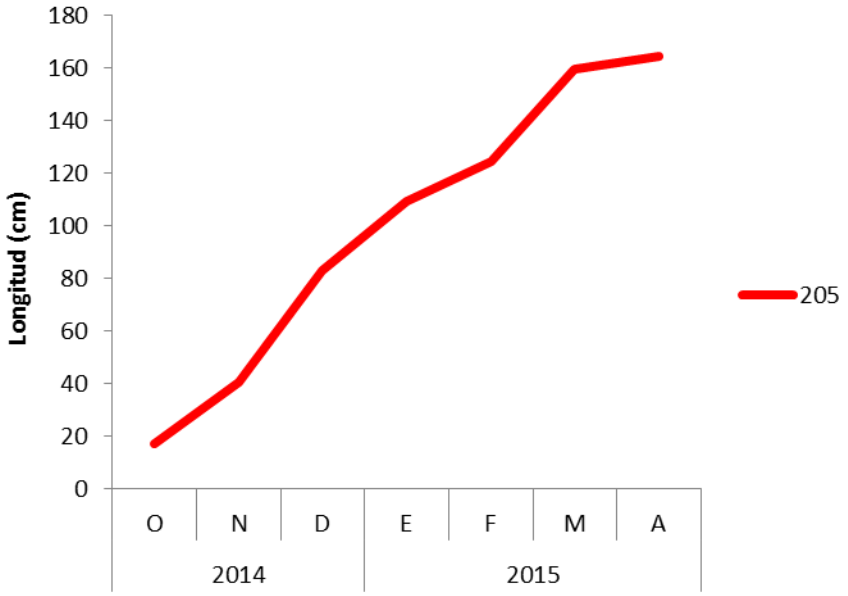


Fig. B22. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 205 en Bahía Salada.

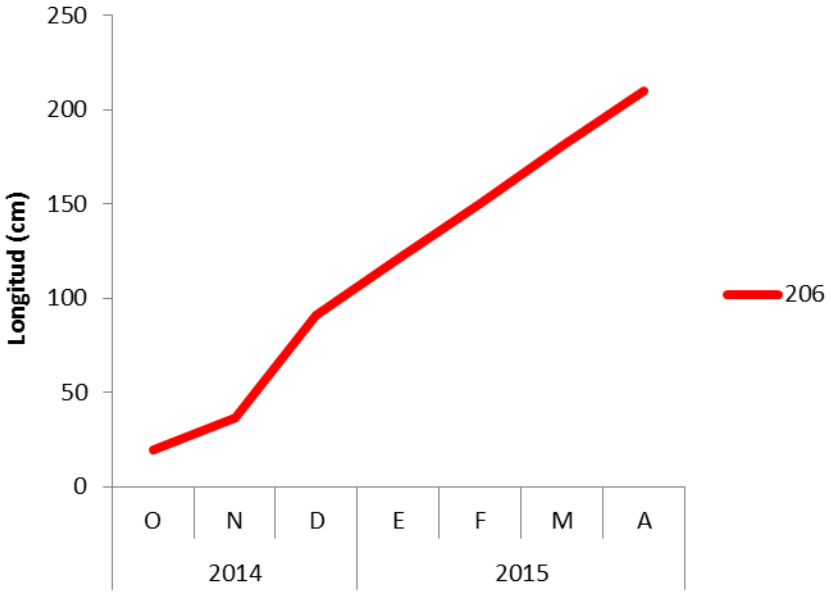


Fig. B23. Crecimiento mensual (en cm) del cruce triploide 206 en Bahía Salada.

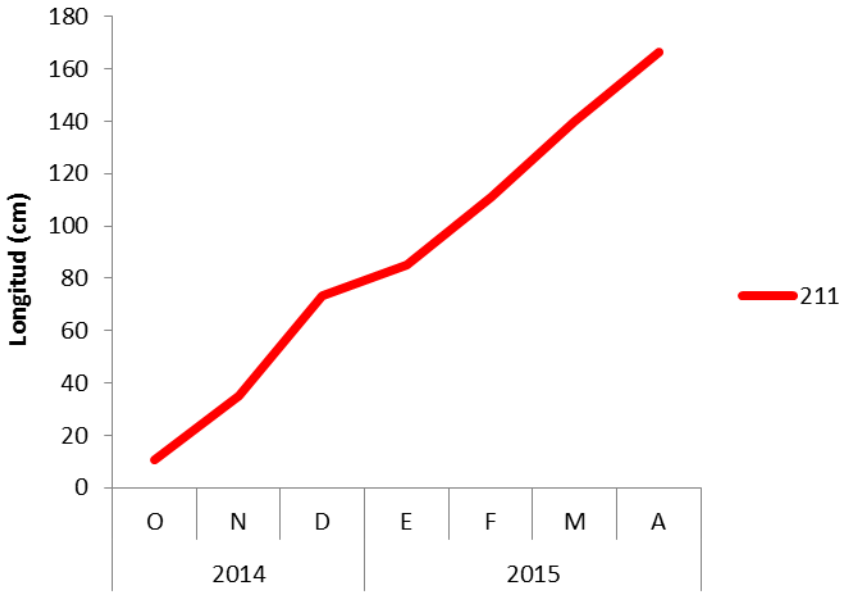


Fig. B24. Crecimiento mensual (en cm) del cruce diploide 211 en Bahía Salada.

c. Anexo C. Tasas de crecimiento relativas máximas de cultivos de Macrocystis y su relación con la concentración de nutrientes en el mar

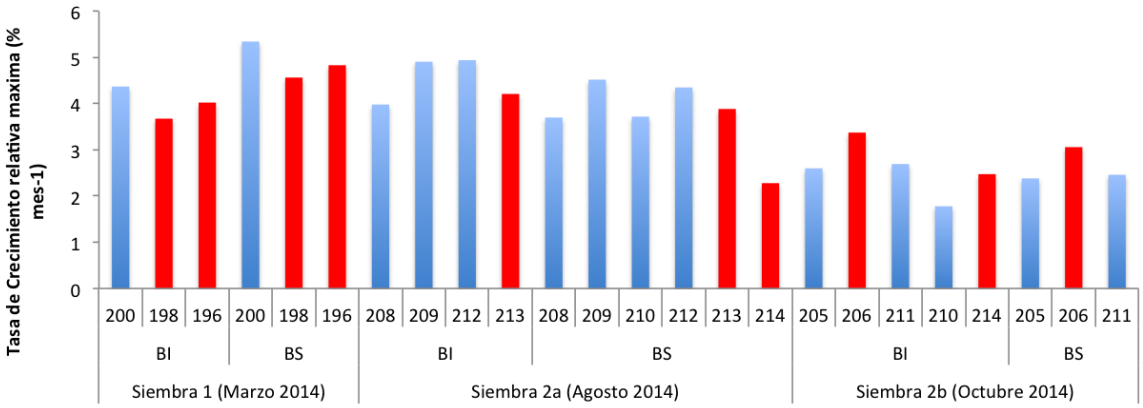


Fig. C1. Tasas de crecimiento relativa (% mes-1) de cruzamientos diploides y triploides (en rojo) de Macrocystis en el mar, durante el segundo mes de cultivo cuando estas fueron máximas.

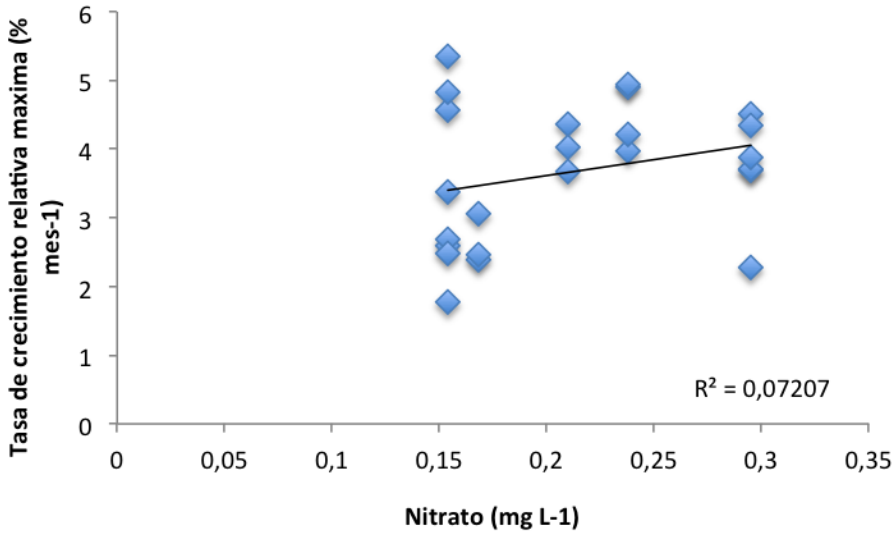


Fig. C2. Correlación entre tasas de crecimiento (máxima) de Macrocystis en cultivo y la concentración de nitratos en el mar.

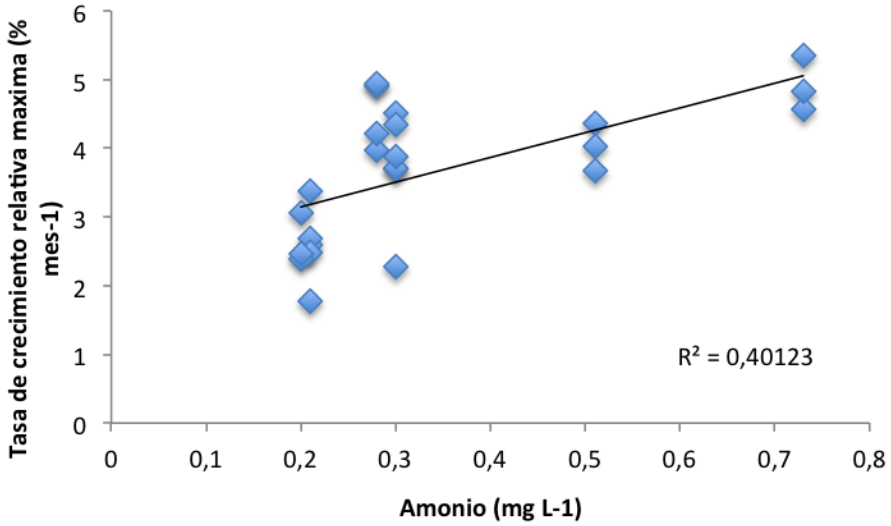


Fig. C3. Correlación entre tasas de crecimiento (máxima) de Macrocystis en cultivo y la concentración de amonio en el mar.

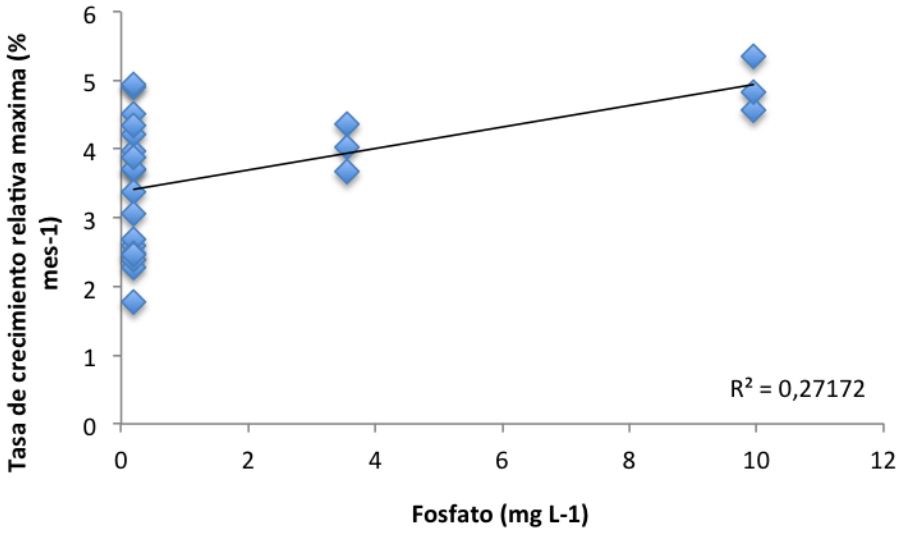


Fig. C4. Correlación entre tasas de crecimiento (máxima) de Macrocystis en cultivo y la concentración de fosfatos en el mar

d. Anexo D: Composición química de Macrocystis diploides y triploides

i. Primera siembra

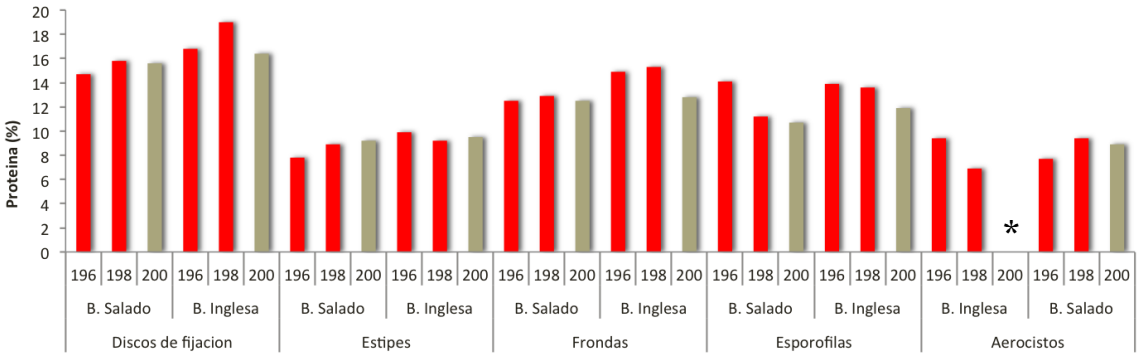


Fig. D1. Composición de proteínas (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Salado y Bahía Inglesa.

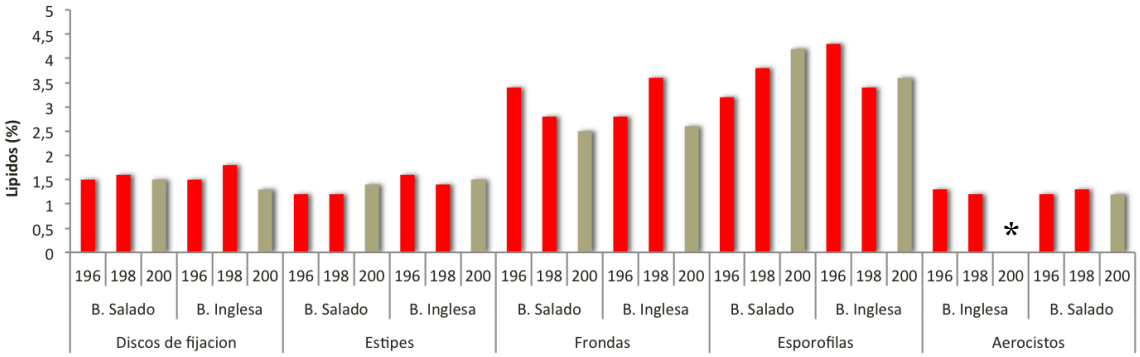


Fig. D2. Composición de lípidos (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Salado y Bahía Inglesa.

(*Insuficiente material para análisis).

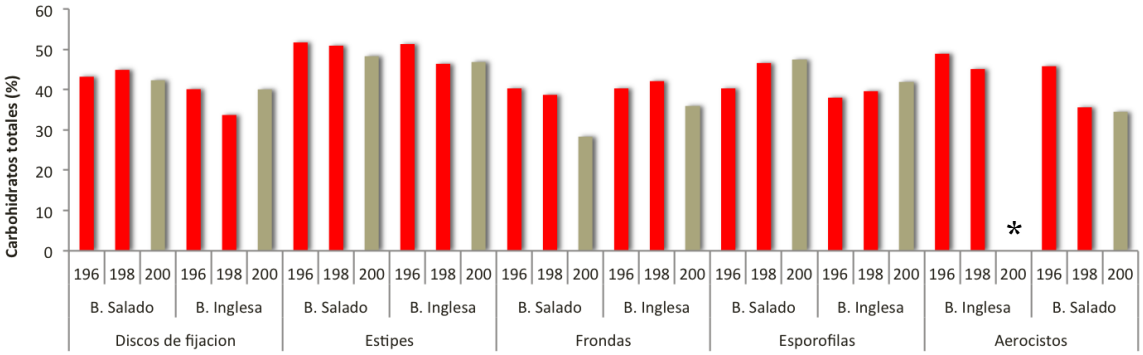


Fig. D3. Composición de carbohidratos totales (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Salado y Bahía Inglesa.

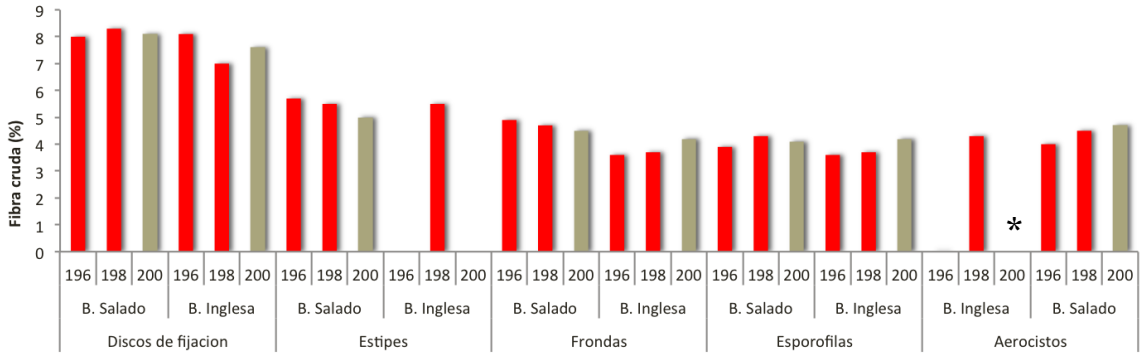


Fig. D4. Composición de fibra cruda (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Salado y Bahía Inglesa.

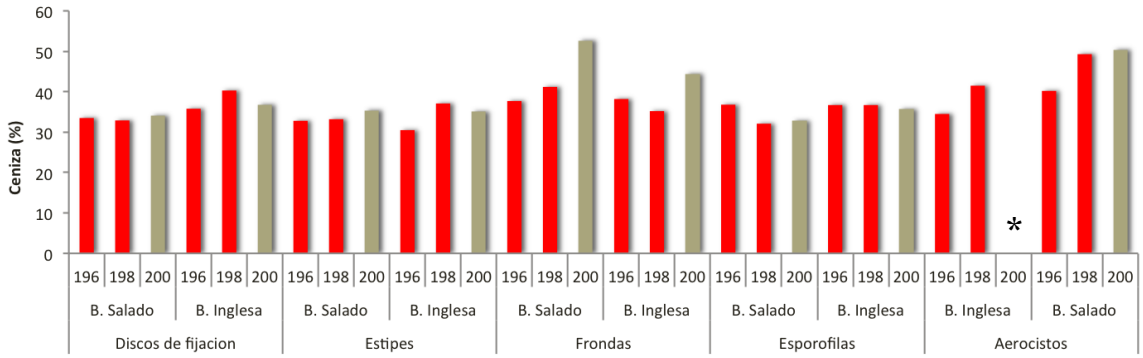


Fig. D5. Composición de ceniza (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Salado y Bahía Inglesa. Los valores en blanco indican no presencia de suficiente biomasa del órgano a analizar.

(*Insuficiente material para análisis)

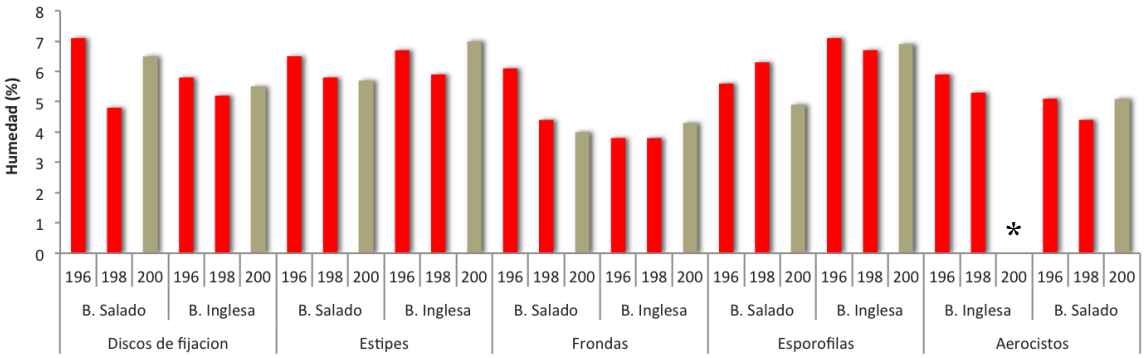


Fig. D6. Composición de ceniza (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Salado y Bahía Inglesa.

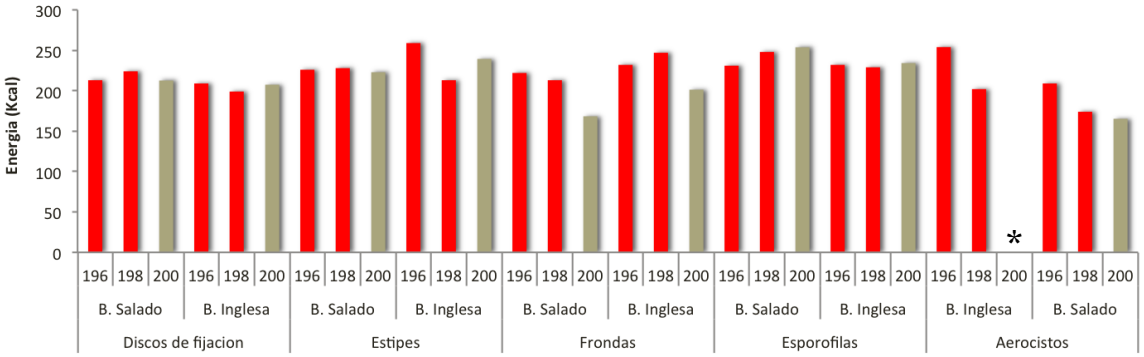


Fig. D7. Composición energética (Kcal por 100 g peso seco) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Salado y Bahía Inglesa.

(*Insuficiente material para análisis).

ii. Segunda y tercera siembra (B. Inglesa)

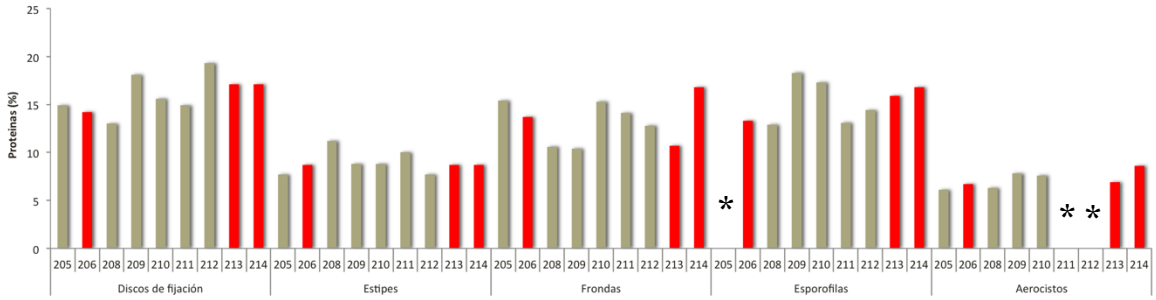


Fig. D8. Composición de proteínas (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Inglesa.

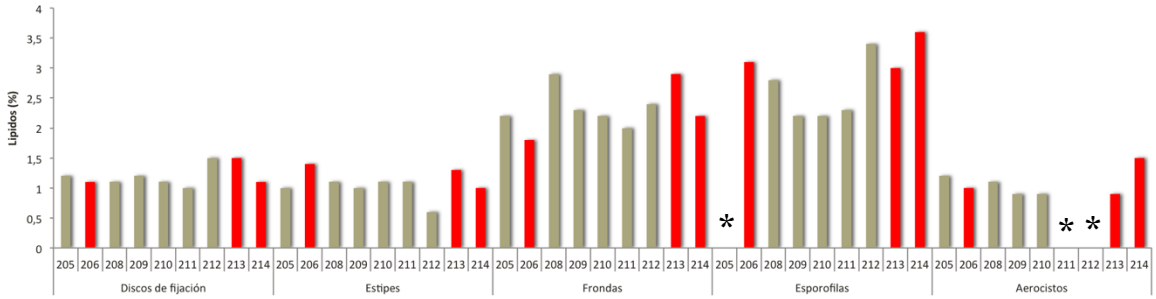


Fig. D9. Composición de lípidos (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Inglesa.

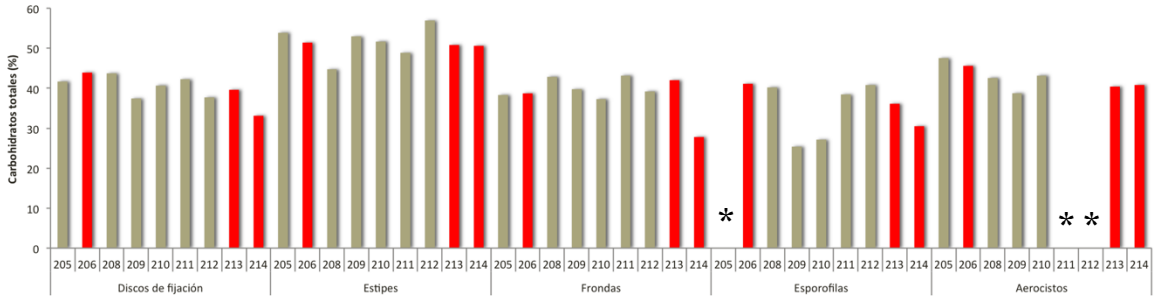


Fig. D10. Composición de carbohidratos totales (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Inglesa.

(*Insuficiente material para análisis).

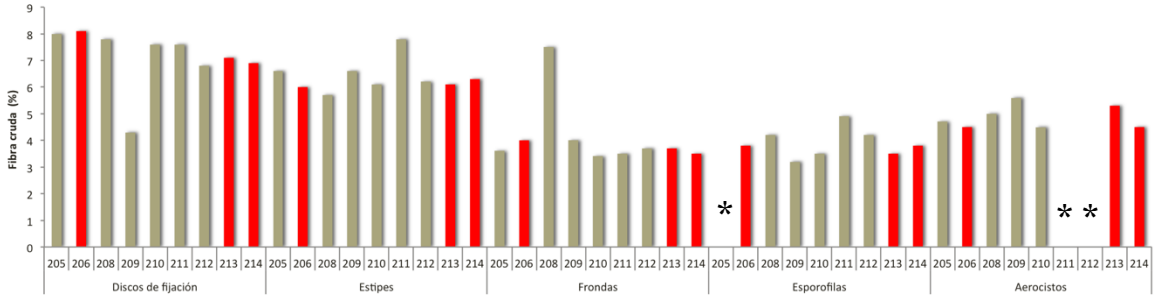


Fig. D11. Composición de fibra cruda (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Inglesa.

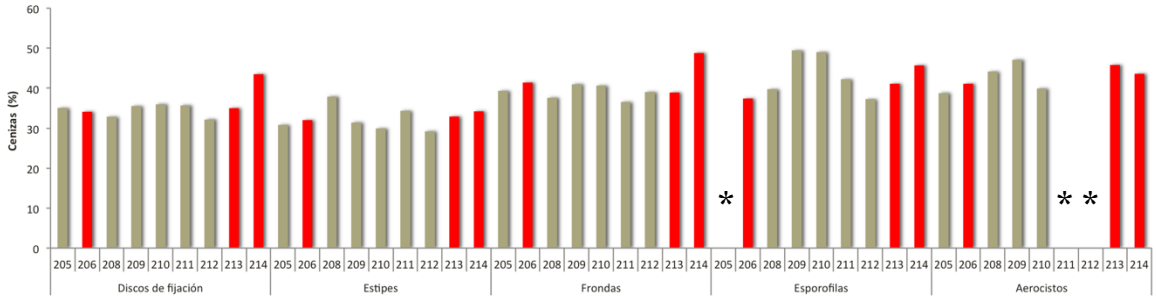


Fig. D12. Composición de cenizas (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Inglesa.

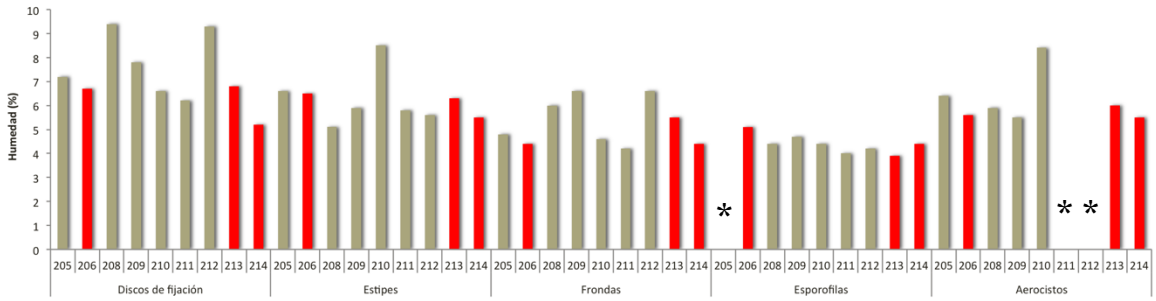


Fig. D13. Composición de humedad (%) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Inglesa.

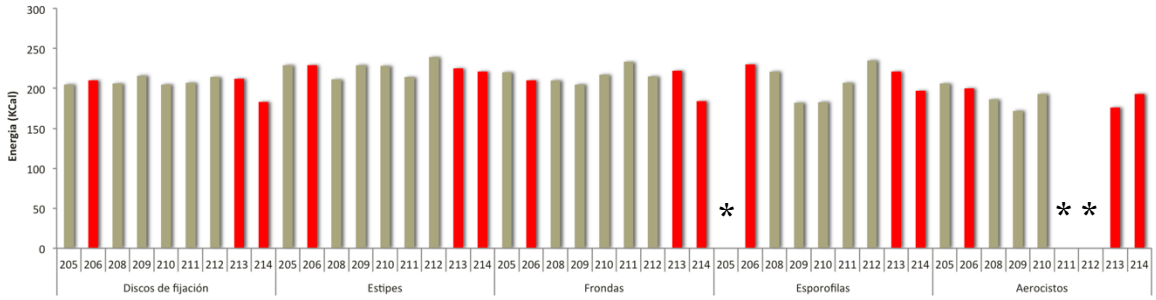


Fig. D14. Composición energética (Kcal por 100g peso seco) en distintas partes del talo de algas de cultivo de *Macrocystis pyrifera* diploides y triploides (en rojo), provenientes de Bahía Inglesa.

(*Insuficiente material para análisis)