

CULTIVO ARTIFICIAL DEL LUCHE, *PORPHYRA COLUMBINA* (MONTAGNE 1845) (RHODOPHYTA, BANGIACEAE)

HÉCTOR ETCHEVERRY D. y GLORIA COLLANTES S.

ABSTRACT. The artificial culture of *Porphyra columbina* (Montagne) is studied in the laboratory under various controlled conditions with the purpose of elucidating its biological cycle and contributing to the development of a mass culture. The present work deals with the formation of the conchocelis phase and the conchospores. The development and morphology of the conchocelis phase is presented.

The experiment allows to establish the presence of the conchocelis phase of the species inhabiting the Chilean coast and to determine the different parameters affecting the growth of the alga, such as temperature, illumination and photoperiod. The cultures were maintained between 10° and 12°C, 1500 lux, and 10 hours illumination, in natural sea water enriched with nitrates and phosphates, using shell substrate or freeliving culture. Observations were made for a period of one year. We were able to correlate its behavior with other species of the genus.

INTRODUCCION

El descubrimiento realizado por Drew (1949) en *Porphyra umbilicalis* Jacobo Agardh, al estudiar su reproducción y constatar que lo que se conocía como *Conchocelis rosea* Batters 1894, no era sino una etapa en el ciclo de vida de ella, movió a muchos investigadores a realizar el cultivo artificial de las especies de *Porphyra*.

Hollenberg (1958) comprobó la presencia de la fase en *P. perforata* J. Ag.; Iwasaki (1961) en la especie japonesa *P. tenera* Kjellm.; Teramoto y Kinoshita (1969) en *P. yezoensis*; Joly y Yamaguchi (1963) en *P. atropurpurea* de Brasil; Conway (1964) nuevamente en *P. umbilicalis* de Norteamérica; Krishnamurthy (1969) en *P. cuneiformis*, *P. perforata* y *P. nereocystis* y en el trabajo más reciente de Conway *et al.* (1975) en especies de Canadá (Columbia Británica) y Estados Unidos (costa noroccidental).

Todas las especies estudiadas obedecen a un esquema básico común en su ciclo de vida, que comprende una alternancia de dos generaciones: gametófita, representada por la planta adulta foliosa, y la fase conchocelis.

El objetivo de esta investigación es desarrollar y conocer el ciclo de vida de *Porphyra columbina* (Mont.), primero en el laboratorio y luego en el mar, para poder introducir a nivel artesanal dicho cultivo, "porfiricultura",

como se realiza en los países orientales, de preferencia en el Japón y que proporciona ingentes recursos a los pescadores. *Porphyra columbina*, conocida con el nombre vulgar de luce, se consume desde hace mucho tiempo en la alimentación popular chilena.

Se presenta bajo dos formas (Hamel 1952): forma *kunthiana* (Kütz.) Hamel y forma *decipiens* Hamel. Es un alga roja de fronda laminar, plana membranacea, cortamente estipitada umbilicada, de bordes ondulados, oblonga hasta linear lanceolada en su forma, de márgenes enteros o laciniados, color rojo violado a negruzco cuando se saca del mar. El nombre específico *columbina* se refiere al color, que es el del pecho de la paloma silvestre *Columbia livia*, común en la costa chilena.

La fronda es monostromática, de células alargadas, por lo que se la incluye en el subgénero *Euporphyra*. La forma *kunthiana* Hamel es de frondas numerosas y cortas, de 3 a 10 cm de alto, insertas alrededor de un punto central, y la forma *decipiens* es de frondas más grandes, de hasta 20 cm de alto, más anchas y laciniadas, de células cúbicas. Las dos formas se dan en la costa chilena y su hábitat ecológico es el supralitoral.

La especie chilena es afín a *Porphyra umbilicalis* (L.) J. Ag. y de distribución amplia, tanto en el norte y centro de Chile. En la fig. 1 se reproduce la fotografía del tipo *Porphyra*



Fig. 1. Tipo de *Porphyra columbina* (Montagne 1845) forma *kunthiana*. Reproducido del material existente en el laboratorio de criptogamia del Museo de Historia Natural de París

kunthiana Kütz = *P. columbina* forma *kunthiana* (Kütz) Hamel.

Las frondas fértiles se reconocen porque sus bordes toman color amarillo rojizo. La especie es monoica; presenta, por lo tanto, en la misma fronda zonas con órganos masculinos y femeninos. La reproducción sexual se realiza por espermios inmóviles o espermacios producidos en espermatangios o anteridios, que son los órganos masculinos, y por carpogonios los femeninos, que llevan la célula ovular. Fecundado el carpogonio, el cigoto después de dividirse origina 4, 8, 16, etc., carpósporas que van a ser liberadas (fig. 2).

La nomenclatura con que designan diversos autores los elementos reproductores y conchosporas, es diferente y se presta a confusión.

K.M. Drew denominaba células madres a las células capaces de producir estructuras reproductoras que generarían esporas y espermacios; Dawson (1966), las denomina carposporangios y espermatangios que generarían carpósporas y espermacios; Conway (1964), esporas a las estructuras femeninas y a las masculinas; Kurogi (1972), cistocarpos y anteridios. Para otros autores son sólo esporas de dos diferentes tamaños originadas por la misma planta, pigmentadas unas, incoloras las otras.

Silva *et al.* (1965) revelan la existencia en esta especie de la mayoría de los aminoácidos esenciales y de un contenido protéico alto.

MATERIAL Y METODOS

Se colectó el material fértil de *Porphyra columbina* en los roqueríos de Montemar y Cachagua (Valparaíso, Chile) en lugares en lo posible libres de contaminantes. Las frondas fértiles se reconocen porque sus bordes toman color amarillo rojizo, y como la especie es monoica presenta zonas con órganos masculinos y femeninos que, maduros, liberan espermacios y carpósporas.

Los cultivos se hicieron utilizando, como cámara de incubación, un refrigerador con una unidad de enfriamiento reforzada. La temperatura osciló entre 8 a 12°C y la intensidad de la luz fue del orden de 1000-1500 lux, proporcionada por un grupo de tubos fluorescentes Philips de 40 W, luz blanca. La fotoperiodicidad fue del orden de 8 a 10 hrs luz por 12 a 14 hrs de oscuridad; oxigenación proporcionada diariamente por una bomba de aire durante 5 minutos. Para los cultivos se emplearon cápsulas Petri de 10 a 15 cm de diámetro, debidamente esterilizadas.

Como medio de cultivo se utilizó agua de mar natural filtrada y esterilizada, colectada a unas 4 millas de la costa, que en algunos experimentos se dejó envejecer durante 30 días; se enriqueció el agua de mar con dos

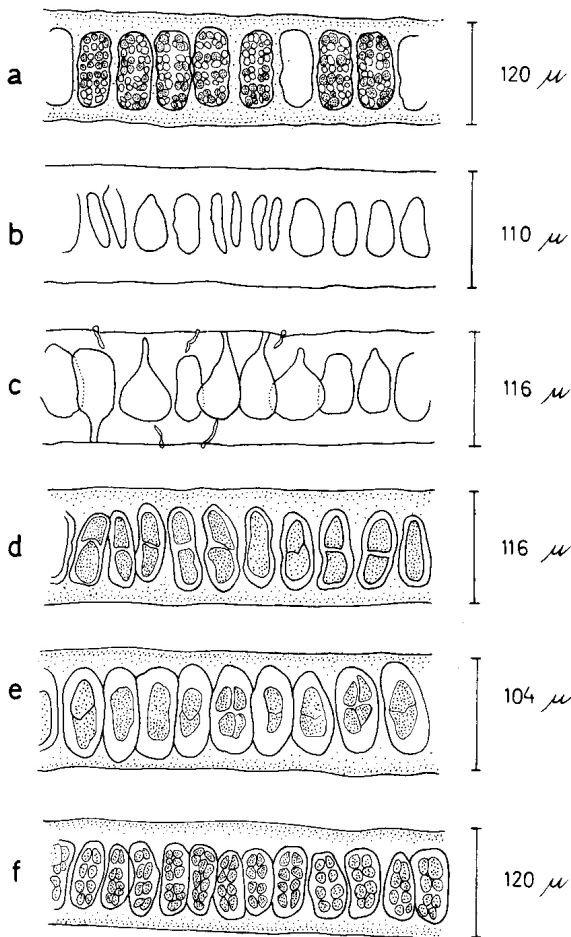


Fig. 2. Corte transversal de la fronda de *Porphyra columbina* a: espermatangio; b: células estériles; c: carogonio; d-f: formación de carpósporas.

nutrientes: NaNO_3 (0,2 g por lt) y Na_2HPO_4 (0,03 g por lt). En algunos ensayos se agregó extracto de tierra vegetal, pero su uso no fue general debido al excesivo desarrollo de bacterias que se produjo. La solución alimenticia se cambió semanalmente.

Se realizaron tres series de experiencias:

- Con substrato calcáreo utilizando arena fina, trozos pequeños de conchas de moluscos, preferentemente *Ostrea* y *Tagelus*, las cuales se distribuyeron en el fondo de las cápsulas.
- In vitro*, colocando como substrato de fijación de las carpósporas cubreobjetos o portaobjetos limpios y esterilizados.
- Cultivo libre (free-living culture), sin substrato.

El material de *Porphyrha columbina* (Mont.), fértil, colectado en otoño o fines de invierno y primavera (septiembre-octubre), aséptico en lo posible, después de un cuidadoso lavado en agua de mar filtrada y esterilizada, se mantuvo 24 horas en el refrigerador a 10°C. Posteriormente, fue retirado y nuevamente lavado, colocándose frondas aisladas o porciones pequeñas en las cápsulas Petri, y con el objeto de obtener liberación rápida de las carpósporas se sometió a cambios bruscos de temperatura desde la ambiental hasta 10°C, durante cortos lapsos de tiempo.

No se exagera al insistir en que las condiciones de limpieza, tanto del material vivo como del que servirá de substrato a los cultivos, deben extremarse si se desea tener cultivos más o menos puros, unialgales, libres de diatomeas y bacterias en lo posible.

Los parámetros ideales que se tradujeron en un desarrollo adecuado de los cultivos hasta la formación de la fase conchocelis, fueron: iluminación, 1500 lux; fotoperiodicidad, 10 horas de luz y 14 de oscuridad; temperatura, 10 a 12°C; oxigenación, en lo posible diaria y cambio de la solución alimenticia, semanal.

El medio de cultivo estuvo constituido por:

- Agua de mar natural enriquecida con nitrato y fosfato, con o sin extracto de tierra vegetal.
- Agua de mar enriquecida según Iwasaki (1961).

- Agua de mar artificial según K. Teramoto (comunicación personal), especial para la fase conchocelis libre, que es similar a la solución ASP_2 , dada por Provasoli (1957), enriquecida con B_1 , biotina y elementos trazas.

Se controló el desarrollo de las diatomeas mediante el empleo de GeO_2 según las indicaciones de Lewin (1966), agregando 2 ml de solución stock de GeO_2 por cada 1.000 ml de medio de cultivo. La solución stock de GeO_2 contenía 10 mg por μm^2 .

RESULTADOS

Producida la expulsión masiva de las carpósporas por las porciones de fronda, a los 4 días de colocadas, al fijarse forman manchas rojizas sobre el substrato calcáreo, cubres o portaobjetos, que no son nuevas plantas, sino prototalos filamentosos constituidos por tubos que van horadando la concha, formando una especie de micelio de hongo, denominado fase conchocelis. El nombre fue dado por Drew (1949), quien realizó la observación en *Porphyrha umbilicalis* de Inglaterra y que correspondía a lo que Batters, en 1892, denominó *Conchocelis rosea*, una especie de alga hasta entonces.

Las carpósporas liberadas por la fronda son redondeadas, con un tamaño que fluctúa entre 8 a 16 μ ; el término medio es de 12 μ . Fue posible establecer la existencia de dos tipos de carpósporas, que asimilamos a lo que Conway (1964) denominara α y β esporas. La de mayor tamaño (α) de 12 μ y las (β) más pequeñas de 8 a 10 μ , pero que no son elementos sexuados. A pesar de las observaciones diarias no se comprobó transformaciones que implicaran una fecundación posterior a su liberación, si se tratase de tales.

Al cabo de dos días, las frondas se retiraron; al tercero ya habían sedimentado las carpósporas y el cigoto formado iniciaba el proceso de desarrollo (fig. 3a). A los 6 días se pudo apreciar la iniciación de la fase conchocelis. Las carpósporas emiten un tubo corto lateral, tubo de germinación que luego se alarga gradualmente. A los 10 días, éste se

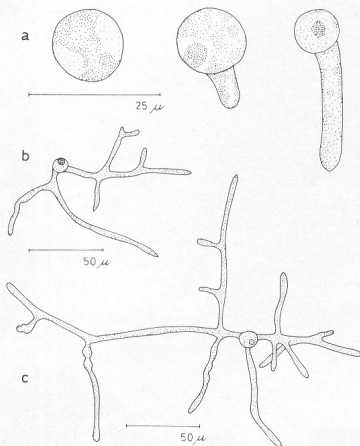


Fig. 3. Desarrollo de la fase conchocelis. a: carpósporas y formación del tubo de germinación; b: iniciación de la fase conchocelis; c: fase conchocelis avanzada (3 meses).

encuentra perfectamente conformado y tiene una longitud de 57μ y poco a poco se van formando las ramificaciones laterales que llegan a alcanzar 100μ de largo y 15 a 20 de diámetro (fig. 3b).

Las células de los filamentos son angostas, contienen un cromatóforo estrellado y la terminal que se alarga, se divide por un tabique transversal; el proceso repetido sucesivamente da lugar a la estructura micelial ya descrita (fig. 3c).

A los tres meses de iniciados los cultivos, los sustratos de conchas, cubres y portaobjetos han tomado un color rojizo intenso, y con una lupa es posible apreciar toda la formación de tubos ramificados, que se entrecruzan, con puntos más resaltantes que son las carpósporas iniciales (fig. 4).

El cultivo libre no produjo masas esféricas, como en otras investigaciones (Teramoto y Kinoshita 1969, Iwasaki 1961) sino membranas rojas que se fijaron al fondo del Erlenmeyer que se van engrosando gradualmente.

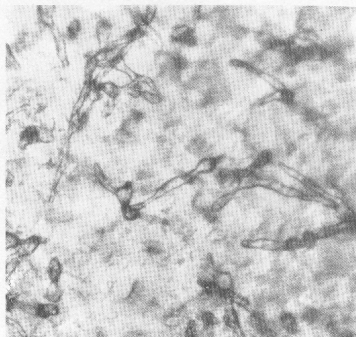


Fig. 4. Detalle del desarrollo de la fase conchocelis en las conchas de moluscos. $\times 1.000$.

Sobre los cubres y portaobjetos la fase conchocelis también evolucionó favorablemente.

El proceso de crecimiento y comienzo de la germinación muestra las características señaladas en los trabajos de Drew (1954), Iwasaki (1961), Kornmann (1961), Krishnamurthy (1964) y Bourne *et al.* (1970), para diferentes especies de *Porphyra*.

DISCUSION

No fue posible observar la fecundación propiamente tal, pero se comprobó la formación de los espermacios y su fijación a la papila de fecundación o tricógino, en cortes por congelación del material recolectado antes de la liberación de las carpósporas. No apreciamos el proceso de división que le sigue, lo que no permite otras consideraciones sobre los cambios a nivel de núcleo; sin embargo las observaciones continúan en los nuevos cultivos para precisar la fecundación y el momento de la división reductora. En otras especies, como *P. umbilicalis*, las observaciones sobre el particular son discutibles. Según algunos la meiosis se produciría luego de la formación del cigoto y aun durante la formación de las carpósporas.

En nuestras experiencias las monósporas aparecieron aisladamente, terminales, esféricas, de pared firme, con un diámetro de 35μ como promedio y no evolucionaron una vez liberadas (fig. 5). Es posible que, en el medio natural, lo hagan, dando origen a una fronda adulta, cerrando el ciclo sexual. Existe en Valparaíso una forma (*P. columbina*) que los pescadores denominan "miniluche", que podría corresponder a esta etapa; es de fronda alargada, de no más de 10 cm y se encuentra en playas arenosas, cerca del área de muestreo (Montemar), en la arena. En otras especies denominan este estado, plantas enanas, brotes o germlings. En *P. columbina* las monósporas, aparecieron a comienzos de primavera y fines de otoño, cuando la fotoperiodicidad era de 12 horas luz.

Las conchósporas se forman en ramas laterales después de los 8 meses. Cada rama conchospórfica consta de 5 a 6 células (fig. 6), más altas que anchas, ligeramente redondeadas, de paredes gruesas con 60 a 70μ de largo, por 8 a 15μ de ancho. Se presentaron en los cultivos, en los meses de octubre a diciembre, preferentemente en aquellos sin substrato calcáreo o libres. Con temperaturas superior a 14°C , no evolucionaron *in situ*;

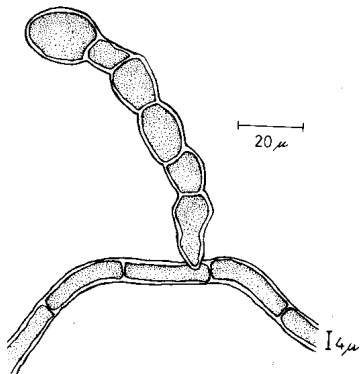


Fig. 5. Rama esporangífera con una hilera de conchósporas.

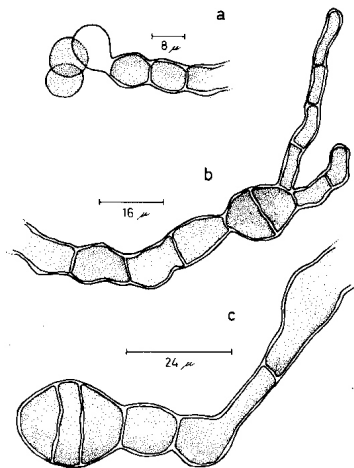


Fig. 6. Fase conchocelis con esporangios y conchósporas libres. a: germinación de conchósporas; b: conchosporangio intercalar; c: conchosporangio terminal.

tal vez requieren mayor oxigenación y luminosidad, condiciones que se dan en el medio natural y difícil de tener en el laboratorio.

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha constatado la existencia de la fase conchocelis en *Porphyra columbina* (Montagne) y permite afirmar que tiene un comportamiento análogo al de especies de *Porphyra* del subgénero *Euporphyra*, estudiadas en diversos países, en cuanto a formación y esporulación. Se comprobó que no era necesaria la presencia de sustrato calcáreo para su formación. La liberación de monósporas y conchósporas fue observada en un número aceptable de casos. También hemos apreciado la presencia de nuevas colonias de conchocelis a partir de las ya formadas, con iluminación continua, dada su condición perennante.

Las observaciones realizadas permiten

postular, a modo de hipótesis, que el ciclo de *Porphyra columbina* (Mont.) presentaría una alternancia de dos fases: gametofítica, representada por la planta adulta, y esporofítica, de la fase conchocelis. La fase conchocelis puede producir nuevas plantas, ya sea por la vía de formación de monósporas o de conchósporas, lo que depende de las condiciones ambientales. Para aclarar la forma como se relacionan ambos procesos, requerirá de nuevas experiencias en las etapas sucesivas del trabajo que realizamos. Le atribuimos especial significado a esta investigación con el propósito de establecer las bases biológicas de explotación artificial de un recurso marino de abundante consumo y que sólo cuenta con la producción natural.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia el cultivo de *Porphyra columbina* (Mont.) en condicio-

nes de laboratorio, controlando diversos parámetros tales como temperatura, fotoperiodicidad e intensidad luminosa, con el propósito de conocer el ciclo biológico a fin de contribuir al cultivo masivo de la especie en vista a una porfíricultura. Los experimentos realizados permiten establecer la presencia de la fase conchocelis en esta especie que crece a lo largo de la costa de Chile central.

Los cultivos se mantuvieron entre 10° y 12°C, con 1.500 lux de intensidad luminosa y 10 horas de iluminación. El medio de cultivo fue agua de mar enriquecida con nitrato y fosfato, usando sustrato calcáreo o cultivada libremente. Las observaciones cubren un período superior a un año y nos permitieron valorar y relacionar su comportamiento con el de otras especies del género.

Se estudia, finalmente, el desarrollo y morfología de la fase conchocelis en la especie citada.

LITERATURA CITADA

- BATTERS, E.A. On Conchocelis a new genus of perforating Algae. En: Phycology Memoirs, pp. 25-27. G. Murray; 1892 London.
- BOURNE, V.L., E. CONWAY and K. COLE. On the ultrastructure of pit connections in the conchocelis phase of the red algae *Porphyra perforata* J. Ag. *Phycologia*, 9(1): 19-81.
- CHEN, L.C.M., T. EDELSTEIN, E. OGATA and J.M. Mc LACHLAN. The life history of *Porphyra miniata*. *Can. J. Bot.*, 1969 **48**: 385-389.
- CONWAY, C. Autoecological studies of the genus *Porphyra*: II. *Porphyra umbilicalis* (L.) J. Ag. *Brit. phyc. Bull.* 2 (5): 1964 349-363.
- CONWAY, C., F. MUMFORD JR., and R.F. SCAGEL. The genus *Porphyra* in British Columbia and Washington, *Syesis*, 1975 **8**: 185-244.
- DAWSON, E. Y. Marine Botany: An introduction, 371 pp., Holt, Rinehart and Winston, New York. 1966
- DODGE, J.D. The fine structure of Algal Cells, 102 pp., Acad. Press, London. 1973
- DREW, K.M. Conchocelis-Phase in the Life-History of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. *Nature*, **164**: 748-749. 1949
- DREW, K.M. Studies in the Bangioideae III. The Life-History of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz var. *laciniata* (Lightf). 1954 J. Ag. The Conchocelis phase in culture. *Ann. Bot.*, **184**: 183-211, Pl. IX-XII.
- HAMEL, G. Sur quelques *Porphyra* des mers Australes. *Annales de Cryptogamie Exotique*, Tom. I, Fasc. 1, Paris. 1928
- HOLLENBERG, G.J. Cultures studies of marine algae III. *Porphyra perforata*. *Am. J. Bot.*, **45**: 653-656. 1958
- IWASAKI, H. The life-cycle of *Porphyra tenera* in vitro. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*, **121**: 173-187. 1961
- IWASAKI, H. Nutritional studies of the edible seaweed *Porphyra tenera*. II Nutrition of Conchocelis phase. *J. Phycol.* 1967 **3**: 30.
- JOLY, A.B. and N.T. YAMAGUSHI. The life history of *Porphyra atropurpurea* (Olivi) De Toni. *Bol. Fac. Fil., Cien. e Letre. Univ. S. Paulo*, **267**: 115-131.

- KORNMAN, P. Die Entwicklung von *Porphyra leucosticta* im Kulturversuch. *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **8**: 167-175.
1961
- KRISHNAMURTHY, V. The conchocelis of three species of *Porphyra* in culture. *J. Phycol.*, **5**: 42-47.
1969
- KUROGI, M. Studies of the life-history of *Porphyra*. 1. The germination and development of carpospores. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Lab.*, **2**: 67-103.
1953
- LEVRIG, T. The marine Algae of Australia. 1. Rhodophyta. *Ark. Bot., Serie 2*, **2** (6): 457-530.
1953
- LEVRING, T. Contribution to the marine algal Flora of Chile. Reports Lund Univ. Chile Exp. 39. *Lunds Univ. Arsskv.* 1960. *N. F. Avd. 2*, **56**(10): 1-84.
- LEWIN, J. Silicon Metabolism in Diatoms. Germanium Dioxide a specific inhibitor of Diatom Growth. *Phycologia*, 1966. **6** (1): 1-12.
- MIURA, A. A new species of *Porphyra* and its conchocelis-phase in nature. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **47**: 305-311.
1961
- MONTAGNE, P.C. *Prodomus gener. spec. Phyc. En: Voyage au Pole Sud*, p. 14, Dumont D'Urville (ed.).
1842
- MONTAGNE, P.C. Algas. En: C. Gay, *Historia Física y Política de Chile*, Vol. 8 (Botánica), pp. 228-393, Paris.
1852
- PROVASOLI, L., Mc LAUGHLIN and M.R. DROOP. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, 1957. **25** (1): 392-428.
- REFS, T.K. A preliminary account of the life history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Ag. *Ann. Bot. Lond N.S.*, **4**: 669-677.
1949
- SILVA, F., H. ETCHEVERRY and W. QUILHOT. Determinación cromatográfica de aminoácidos en algas marinas. *Bot. Mar.* 1965. **8** (2-4).
- STEIN, J.R. *Handbook of Phycological methods*. Cambridge Univ. Press.
1973
- SUTO, S. Variation in species characteristics of *Porphyra* under culture conditions. In: *Contrib. Systems Bent. Mar. Alg.* 1972. N. Pac. Jap. Phyc. Soc. Kobe, pp. 193-201.
- TANAKA, T. The systematic study of the Japanese protofloridae. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **2** (2): 1-92.
1952.
- TERAMOTO, K. and S. KINOSHITA. A method for the artificial culture of laver. *Porphyra sp.* *Bull. Jap. Soc. Phycol.*, 1969. **17** (1): 24.
- TESENG, C.K. and T.J. CHANG. Studies on the life history of *Porphyra tenera* Kjellm. *Scientia Sinica*, **4**: 375- 398.
1955
- UFIDA, S. On the life-history of *Porphyra tenera* Kjellm. *Journal Imperial Fisheries Institute*, **24**: 139-142.
1929