

CULTIVO EN TANQUES EXTERIORES DEL ALGA ROJA *Euचेuma uncinatum* DEL GOLFO DE CALIFORNIA.

TANK CULTURE OF THE RED SEAWEED *Euचेuma uncinatum* FROM THE GULF OF CALIFORNIA

José A. Zertuche González¹

Zaúl García Ezquivel¹

Boudewijn H. Brinkhuis²

¹Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado Postal 453

Ensenada, Baja California, México

²Marine Sciences Research Center, SUNY
at Stony Brook, New York. 11794-5000

Contribución No. 87-1 del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California y N. 577 del Marine Sciences Research Center of the State University of New York. Contribution No. 87-1 of the Instituto de Investigaciones Oceanológicas of the Universidad Autónoma de Baja California, and No. 577 of the Marine Sciences Research Center of the State University of New York.

ZERTUCHE-GONZALEZ José A., García Ezquivel Z. y Brinkhuis B.H.. Cultivo en tanques exteriores del alga roja *Euचेuma uncinatum* del Golfo de California. Tank culture of the red seaweed *Euचेuma uncinatum* from the Gulf of California. Ciencias Marinas, Vol 13(2);1-18.

RESUMEN

Ejemplares del alga roja productora de carragenina *Euचेuma uncinatum* fueron colectados en Bahía de Los Angeles en el Golfo de California y mantenidos en tanques exteriores bajo un sistema de cultivo abierto. Se midió el crecimiento de las plantas bajo varias condiciones de luz y nutrientes en un diseño de matriz factorial de 3 x 3 en diferentes épocas del año. La irradiación fue un factor limitante para el crecimiento en invierno, mientras que los nutrientes fueron limitantes en el verano. Las máximas tasas de crecimiento se registraron en el verano y otoño (8%/día) en cultivos fertilizados. Cosechas regulares del tejido viejo y fertilizaciones de 80:8 µM NO₃:PO₄ tres veces por semana mantuvieron las plantas creciendo vigorosamente a lo largo del verano, a pesar de las altas temperaturas. Las estrategias de cultivo empleadas en este estudio permitieron mantener a *E. uncinatum* creciendo todo el año y podrían emplearse para hacer posible ahora el cultivo extensivo de esta especie.

ABSTRACT

The red carragenophyte *Euचेuma uncinatum* was collected from Bahía de Los Angeles and maintained in outdoor tanks in an open culture system. Plant growth was measured under 3 x 3 factorial design matrix of irradiance and nutrients concentrations throughout the year. Irradiance was a limiting factor for growth in the winter, while nutrients were limiting in the summer. Maximum growth rates were observed in the summer and fall (8%/day) in fertilized cultures. Regular harvesting of all old tissue and pulse fertilizations of 80:8 µM NO₃:PO₄ three times a week kept the plants growing vigorously throughout the summer, despite warm water temperatures. The culture strategies employed in this study allowed to keep *E. uncinatum* growing throughout the year and could be employed to make now possible the extensive mariculture of this species.

INTRODUCCION

Euचेuma ha sido considerada como un recurso de valor comercial a nivel mundial por su alto contenido de carragenina. El género *Euचेuma* es ampliamente cultivado en las Filipinas y es responsable de aproximadamente el 50% de la producción mundial de carragenina (Parker, 1974). Junto con *Chondrus* son las especies de algas marinas en cultivo más importantes como productoras de carragenina (Hansen et al., 1981). Este ficolóide tiene una extensa aplicación como agente gelante, homogenizador, emulsificante y otros usos en la industria alimenticia y farmacéutica. Es un ingrediente común en alimentos tales como flanes, mermeladas, jarabes endulzantes, etc. (Hansen et al., 1981).

Euचेuma uncinatum es una especie endémica del Golfo de California. Aunque la taxonomía de esta especie aún es tema de controversia y recientemente se ha propuesto eliminarla del presente género (Norris 1985), está plenamente identificada como fuente de κ -carragenina (Dawes et al., 1977). Guzmán del Proó (1967) encontró que en Baja California existen grandes cantidades de esta especie susceptibles de ser explotadas. Hasta ahora, no ha sido explotada comercialmente en México.

Intentos previos de explotar las poblaciones naturales o cultivos de *E. uncinatum in situ* han sido abandonados por considerarse que esta especie no puede cultivarse durante todo el año (Dawes et al., 1977; Polne et al., 1980). Varios autores han reportado que *E. uncinatum* desaparece durante el verano cuando las aguas del Golfo alcanzan 28°C (Dawes et al., 1977; Norris, 1975, 1984).

Polne et al. (1980, 1981) realizaron un extenso estudio de la fisiología de *E. uncinatum* que incluyó su cultivo en tanques. Estos estudios se llevaron a cabo en aguas relativamente más frías (Santa Bárbara, California) que las temperaturas a las que la planta está expuesta en su ambiente natural (Golfo de California). Aunque Polne et al. (1980, 1981) pudieron mantener a *E. uncinatum* indefinidamente dentro de incubadores, sus cultivos exteriores dejaron de crecer durante el verano. Los autores consideran que su decaimiento no

INTRODUCTION

Euचेuma has been considered a commercial worldwide resource because of its carrageenan content. The genus *Euचेuma* sp. is extensively cultured in the Philippines and is responsible for approximately 50 % of the world's carrageenan production (Parker, 1974). Together with *Chondrus*, they are the most important cultured carrageenophyte seaweed species. This phycocolloid has an extensive application as a gelling agent, homogenizer, emulsifier and other uses in the food and pharmaceutical industries. It is a common ingredient in foods such as pudding, marmalade, flavored syrups, etc. (Hansen et al. 1981).

Euचेuma uncinatum is an endemic species from the Gulf of California. Although its taxonomy is still subject to debate and recently has been suggested for removal from this genus (Norris, 1985), it has been well recognized as an κ -carrageenan producer (Dawes et al. 1977). Guzmán del Proó (1967) mentioned that there are large quantities of this species susceptible to exploitation. Until now, it has not been commercially exploited in México.

Previous attempts to exploit *E. uncinatum* from natural populations or *in situ* cultures were abandoned when it was reported that it cannot be cultured all year round (Dawes et al. 1977; Polne et al. 1980). Several authors have reported that *E. uncinatum* disappears during the summer when the water temperature of the Gulf of California reaches 28°C (Dawes et al. 1979; Norris, 1975, 1984).

Polne et al. (1980, 1981) conducted extensive studies on the physiology of *E. uncinatum* that included tank culturing. These studies were carried out in relatively cooler waters (Santa Barbara, California) than the temperatures to which the plant is exposed in the Gulf of California. Although Polne et al. were able to keep *E. uncinatum* indefinitely inside an incubator, their outdoor cultures stop growing during the summer. They considered that its decay was not a light effect and suggested that it may be a response to an inherent growth cycle of the plant.

es un efecto de luz y sugirieron que podría ser una respuesta a un ciclo inherente de la planta.

A principios de 1985, el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, inició un estudio con el objetivo de desarrollar el cultivo de *E. uncinatum* en tanques exteriores durante todo el año. Considerando la hipótesis que la luz, los nutrientes y el tiempo de cultivo (edad del tejido), serían condiciones que afectarían el crecimiento de esta planta en diferentes estaciones del año, se llevaron a cabo cultivos en tanques exteriores bajo una variedad de condiciones de luz y nutrientes, en diferentes épocas del año.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de *Eucheuma uncinatum* fueron obtenidas de Bahía de los Angeles aproximadamente cada dos meses. Las plantas fueron transportadas dentro de hieleras con agua de mar. Al llegar a las instalaciones de cultivo en Ensenada, las plantas fueron limpiadas y seleccionadas para los experimentos.

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones de cultivo al aire libre del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Las instalaciones consistieron de un sistema abierto de tanques de cultivo abastecidos con agua de mar y aire en forma continua. Los tanques se hicieron de tambos de plástico de 200 litros cortados a la mitad longitudinalmente. Cada mitad se utilizó como un tanque de cultivo. Los tanques descansaron sobre bases de concreto alineados a las tuberías de aire y agua de mar que los abastecieron. El aire se introdujo desde el fondo del tanque a través de un tubo de cloruro de polivinilo (PVC) de media pulgada con pequeñas perforaciones. La aireación en los tanques permitió tener los cultivos en constante movimiento. El aire se obtuvo con un compresor CONDE.

Las condiciones de cultivo consistieron de un diseño factorial de 3 x 3 sin réplica para probar diferencias en el crecimiento de *E.*

Since early 1985, the Instituto de Investigaciones Oceanológicas of the Universidad Autónoma de Baja California initiated a study with the objective to develop the culture of *E. uncinatum* in an outdoor tank facility throughout the year. Considering the hypothesis that irradiance, nutrients, or time of culturing (tissue age) would be affect the growth of this plant in different seasons, tank cultures were carried out under a variety of irradiance and nutrient conditions at different times of the year.

MATERIALS AND METHODS

Samples of *Eucheuma uncinatum* were obtained from Bahía de los Angeles approximately every two months. Plants were transported inside ice boxes with sea water. Upon arrival at the culture facilities at Ensenada, plants were cleaned and selected for the experiments.

The experiments were carried out at the outdoor culture facility of the Instituto de Investigaciones Oceanológicas. The facilities consisted of an open system of culture tanks supplied with seawater and air continuously.

Tanks were made from 200 l plastic drums cut in half longitudinally. Each half was used as a culture tank, The tanks rested on concrete bases aligned to the water and air lines that supplied them. The air was introduced from the bottom of the tank through a half inch PVC pipe with small holes. The aeration of the tanks permitted the culture to be in continuous motion. The air was supplied with a CONDE air compressor.

The culture conditions consisted of a factorial design 3 x 3 with no replicates to test the differences of *E. uncinatum* growth under three nutrient concentrations ($\text{NO}_3 + \text{PO}_4$) and solar radiation. A total of six experiments were carried out within a year (Table I). Each of the nine tanks received approximately eight volumes of seawater per day from the adjacent beach at the Instituto de Investigaciones Oceanológicas. The plants received an appropriate dose of nutrients (N:P, 10:1) every third day. Stock solutions of NaNO_3 and Na_2PO_4 were use as a source of nitrates and phos-

Tabla I. Condiciones experimentales para los cultivos en tanques.

Table I. Experimental conditions for the tank cultures.

EXP.	Tipo de ejemplares	Período experimental	Duración días	Condiciones de iluminación (I _o = luz ambiental)	Condiciones de nutrición (μ moles/lit)
1	Trozos viejos de estipes con ramificaciones	13 dic. a 27 feb.	76	33%I _o ; 19%I _o ; 10%I _o	Sin nutrientes; 20NO ₃ ; 20NO ₃ + 2PO ₄
2	Adultos	27 feb. a 3 abril	35	33%I _o ; 19%I _o ; 10%I _o	Sin nutrientes; 20NO ₃ ; 20NO ₃ + 2PO ₄
3	Adultos	24 feb. a 22 de mayo	28	33%I _o ; 19%I _o ; 10%I _o	Sin nutrientes; 20NO ₃ + 2PO ₄ 40NO ₃ + 4PO ₄
4	Apices de adultos (aprox. 20cm.)	2 junio a 7 agosto	66	33%I _o ; 19%I _o ; 10%I _o	Sin nutrientes; 40NO ₃ + 4PO ₄ 80NO ₃ + 8PO ₄
5	Apices de adultos (aprox. 20cm.)	12 agosto a 17 oct.	66	33%I _o ; 19%I _o ; 10%I _o	Sin nutrientes; 40NO ₃ + 4PO ₄ 80NO ₃ + 8PO ₄
6	Apices de adultos (aprox. 20cm.)	17 oct. a 28 nov.	42	53%I _o ; 33%; 19%I _o	40NO ₃ + 4PO ₄ 80NO ₃ + 8PO ₄ 120NO ₃ + 12PO ₄

uncinatum bajo tres diferentes concentraciones de nutrientes (NO₃ + PO₄) y radiación solar. Se llevaron a cabo un total de seis experimentos a lo largo del año (Tabla I). Cada uno de los nueve tanques recibió aproximadamente 8 volúmenes de agua de mar por día, proveniente de la playa adyacente al Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Las plantas recibieron una dosis apropiada de nutrientes (N:P de 10:1) cada tercer día. Se utilizaron soluciones stock de NaNO₃ y Na₂HPO₄ como fuentes de nitratos y fosfatos respectivamente. Para fertilizar, se cortó el abastecimiento de agua por las mañanas dejando las plantas con movimiento. Después

phates respectively. To fertilize, water supply was stopped early in the morning while leaving the plants with motion. After three hours, the water flow was re-establish. The irradiance was regulated using plastic screen upon the tanks. One to four screens were use during the experiments (Table I). Tanks with one screen received the highest irradiance, corresponding to 53 % of the incident ambient irradiance (I_o). The ones with two, three and four screens received 33, 19 and 10 % of I_o, respectively. The light regimes selected in all the experiments encompasses the light regime to which the plant was exposed at the time it was collected.

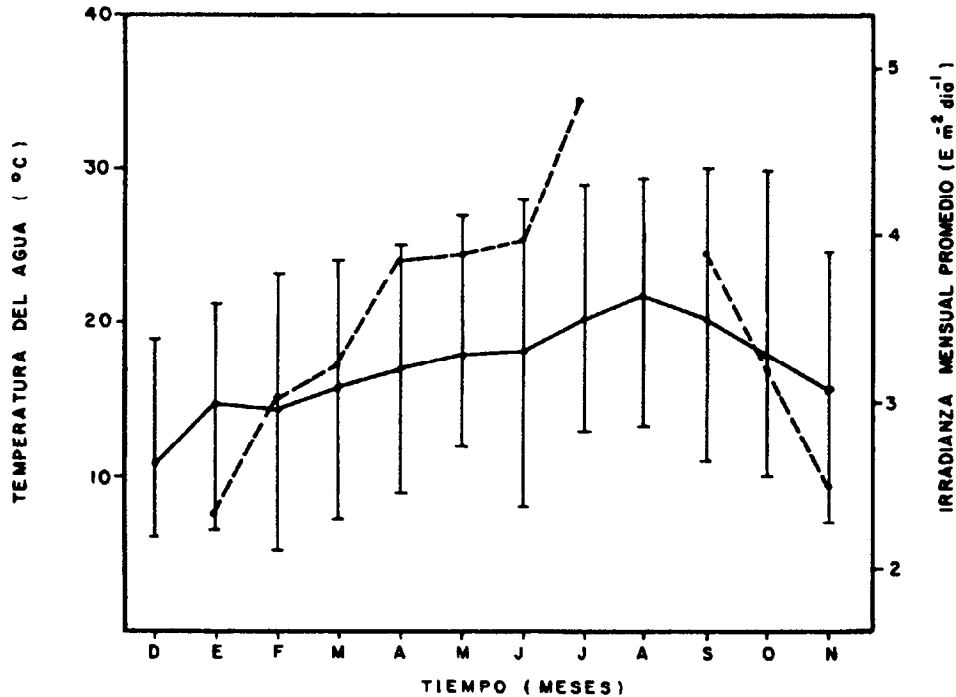


Figura 1. Luz ambiental (- - -) y promedio mensual de la temperatura del agua (—) en los tanques de cultivo. Las líneas verticales muestran los rangos de temperatura.

Figure 1. Ambient light (- - -) and monthly average of water temperature (—) in the culture tanks. Vertical lines show the range in temperatures.

de tres horas se restablecía el flujo de agua. La irradiación fue regulada utilizando mallas de plástico de mosquitero sobre los tanques. Se utilizaron de una a cuatro mallas por tanque durante los experimentos (Tabla I). Los tanques con una malla recibieron la mayor cantidad de luz solar correspondiente al 53% de la luz ambiental incidente (I_0). Los de dos, tres y cuatro mallas recibieron el 33, 19 y 10% respectivamente. Los intervalos de luz seleccionados comprendieron la condición de luz a la cual se encontraban las plantas al tiempo de colectarse.

Se midió la radiación solar total diaria sobre la superficie de la tierra con un actinógrafo Bimetallic No. 01AM100. Se reporta la radiación mensual promedio calculada con los tres primeros días de cada semana desde enero

Total solar irradiance was measured daily on land surface with a Bimetallic recording solarimeter No. 01AM100. The mean daily solar radiation was calculated from the three first days of the week from January to October 1986, the period in which the experiments were carried out (Fig. 1). Temperature inside the tanks was measured with a maximum and minimum thermometer.

The samples for the first experiment consisted of old thallus that survived the previous summer in its natural habitat, and from which new branches were noticed coming out. For the two following experiments (March-May), adult samples were used from material that was abundant in the field. In the fourth and fifth experiments (June-October), only young branches from the adult plants found in the field were used. For the

hasta octubre, período en que se realizaron los experimentos. La temperatura máxima y mínima diaria dentro de los tanques se midió con un termómetro de máximos y mínimos.

Las muestras del primer experimento (invierno) consistieron de talos viejos que sobrevivieron el verano en su habitat natural, y de los cuales nacían nuevas ramificaciones. Para los dos siguientes experimentos (marzo a mayo), se utilizaron ejemplares adultos que se encontraron en abundancia en el campo. En el cuarto y quinto experimento (junio a octubre) se procuró utilizar únicamente partes jóvenes de las plantas adultas que se encontraban en el campo. Para el sexto experimento (octubre a noviembre) se utilizaron partes jóvenes de plantas cultivadas en el quinto experimento bajo 19% de I₀ y 80:8 μM NO₃:PO₄. Los experimentos duraron aproximadamente dos meses a excepción de los experimentos dos y tres que duraron alrededor de un mes porque los cultivos decayeron antes de los dos meses. En los experimentos cuatro, cinco y seis se realizaron cosechas parciales a mediados del experimento, dejando en los tanques el tejido más joven para probar el efecto que podría tener la edad del tejido en los cultivos. Los tanques de cultivo fueron limpiados semanalmente para eliminar las epifitas asentadas.

Las plantas se pesaron una vez por semana (peso húmedo) para medir la velocidad de crecimiento. El crecimiento se calculó en incremento de peso en por ciento por día utilizando la fórmula:

$$G = \left((W_t / W_o)^{\left(\frac{1}{t}\right)} - 1 \right) \times 100$$

donde G = porcentaje en incremento de peso húmedo por día, W₀ = peso inicial, W_t = peso después de t días (Hoyle, 1978).

Los datos de crecimiento fueron probados con un análisis de varianza no paramétrico según Wilson (1956), considerando como factores: la luz, la concentración de nutrientes y la duración del cultivo. Para los cálculos se utilizó el paquete estadístico ESIMSL y una computadora PRIME 400.

sixth experiment (October-November), young branches from the plants cultured during the previous experiment under the 19 % I₀ and 80:8 μM NO₃:PO₄ were used. Each experiment lasted approximately two months except for the second and third experiments that lasted one month because the cultures decayed before the two months. In the fourth, fifth and sixth experiment, partial harvestings were done weekly during the experiment, leaving the youngest tissue in culture to test for the possible effect that the age of the tissue may had. The culture tanks were cleaned weekly to avoid epiphyte settling.

The plants were weighed (wet weight) to measure growth rate, which was calculated as % increase in weight per day using the formula:

$$G = \left((W_t / W_o)^{\left(\frac{1}{t}\right)} - 1 \right) \times 100$$

where G = percent increase in wet weight per day, W₀ = initial weight, W_t = weight after t days (Hoyle, 1978).

The growth data was tested with a non-parametric analysis of variance according to Wilson (1956), considering irradiance, the nutrient concentration and length of the culture as factors. An ESIMSL statistical package and a 400 PRIME computer were used for these calculations.

RESULTS

During the December-February experiment, plants that received the highest irradiance showed the highest growth. Thus, the growth differences observed among the different treatments (10% to 33% I₀) were highly significant. The factorial analysis also showed that the time factor was highly significantly different from nutrients, since no differences in the growth rates of fertilized and non-fertilized plants were detectable. After the sixth week, approximately, the majority of the old thallus that was originally used for this experiment had disintegrated completely, leaving only the biomass made by the young branches in the tanks. From here on, a

RESULTADOS

En el experimento de diciembre-febrero (exp. 1), las plantas que recibieron la mayor irradiación mostraron el mayor crecimiento. Así, las diferencias observadas en los intervalos de luz aplicados (10% I₀ al 33% I₀) resultaron altamente significativas ($p = 0.001$). El análisis factorial mostró también que el tiempo de cultivo (edad del tejido) fue un factor altamente significativo más no así los nutrientes, puesto que no se detectaron diferencias en las tasas de crecimiento entre las plantas fertilizadas y no fertilizadas. Después de la sexta semana aproximadamente, la mayor parte del talo viejo que originalmente se utilizó para este experimento se desintegró completamente, dejando en el tanque únicamente ramificaciones jóvenes. A partir de entonces se acrecentó el crecimiento en la mayoría de los cultivos, llegando a obtener tasas de crecimiento hasta de un 4%/día en el momento en que el experimento fue suspendido (fig. 2).

En el experimento dos (feb-abr), se observó la ausencia de crecimiento en prácticamente todos los tratamientos después de la segunda semana. La pérdida de peso fue mayor en las algas no fertilizadas. Los tanques fertilizados con NO₃ + PO₄ mostraron un menor crecimiento que los tanques fertilizados exclusivamente con nitratos (Tabla II). Previendo que pudiera haber algún efecto tóxico por la solución stock de fosfatos empleada, se utilizó una nueva solución para los próximos experimentos y se incrementó la concentración máxima de nutrientes.

En el tercer experimento, (abr-may) únicamente las algas que recibieron la mayor cantidad de nutrientes mostraron crecimiento durante las cuatro semanas que duró el experimento (Tabla II). Sin embargo, este efecto no se distingue en el análisis factorial; el tiempo fue el único tratamiento que mostró diferencias significativas (Tabla II).

En los tres últimos experimentos se utilizaron únicamente partes jóvenes de las plantas adultas y los cultivos crecieron vigorosamente. En el experimento cuatro (jun-ago) la mayoría de los cultivos

positive growth was noticed in the majority of the cultures, reaching growth rates up to 4%/day at the time the experiment was ended.

In the second experiment (February-April), a negative growth rate was observed in practically all treatments after the second week. The loss in weight was larger for the plants without fertilizer additions. The tanks fertilized with NO₃ + PO₄ grew less than the plants fertilized only with NO₃ (Table II). Preventing the possibility that the phosphate solution used had some toxic effect or that the amount of nutrients was too small, a new stock solution was used for the next experiments and the treatment concentrations were increased.

In the third experiment (April-May), only the plants that received the highest amount of nutrients showed a positive growth during the four weeks that the experiment lasted (Table I). However, this effect was not distinguishable in the factorial analysis; time was the only significant treatment effect.

In the last three experiments, only young tissue from adult plants were used, and the cultures grew vigorously. During the fourth experiment (June-August), the majority of the cultures showed a positive growth. Only two of the cultures that were not fertilized could not be recovered after the first harvest. For the rest of the cultures, there were no differences with respect to irradiance, but significant differences were noticed with respect to nutrients (Table II). The cultures that registered the highest growth rates (up to 5%/day) corresponded to those fertilized with 80:8 μ M NO₃:PO₄ and 19% I₀ (Fig. 3).

In the fifth experiment, the plants cultured with 80:8 μ M NO₃:PO₄ grew up to 8%/day. The tanks were harvested for the first time after 32 days and thirteen days later. After the first harvest, the plant kept showing positive growth (above 2%/day), except for the cultures not fertilized and receiving irradiances of 33 and 10% I₀ (Fig. 4).

The highest growth rates were measured during the sixth (autumn) experiment (Table III). With the exception of plants cultured

mostraron un buen crecimiento. Únicamente dos de los cultivos sin fertilizar no pudieron recuperarse después de la primera cosecha. Para el resto de los cultivos no hubo diferencias con respecto a la irradiación pero se notaron diferencias significativas con respecto a los nutrientes (Tabla II). Los cultivos que registraron las más altas tasas de crecimiento (hasta 5%/día) correspondieron a los fertilizados con 80:8 μM de $\text{NO}_3:\text{PO}_4$ y 19% Io (fig. 3).

En el quinto experimento (ago-oct), las plantas cultivadas con 80:8 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$ crecieron hasta un 8% por día. Los tanques fueron cosechados por primera vez a los 32 días y a los trece días posteriores. Después de la primera cosecha, las plantas se mantuvieron creciendo (arriba de 2%/día) con excepción de los cultivos sin fertilizante expuestos a irradiancias de 33 y 19% Io (fig. 4).

Las más elevadas tasas de crecimiento fueron medidas durante el sexto (otoño) experimento (Tabla III). Con excepción de las plantas sometidas a 19% Io y 40:4 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$, en el resto de los tratamientos *E. uncinatum* alcanzó crecimientos del seis por ciento o mayores. Sólo las diferencias en crecimiento por efecto de la luz resultaron significativas ($p = 0.05$, Tabla II), con un mayor incremento en peso para las algas con 33% Io. A esta intensidad la tasa de crecimiento se mantuvo alrededor del 8% diario (fig. 5 a-c).

En todos los cultivos se observaron fuertes diferencias en la coloración de las plantas. A bajas condiciones de luz, los ejemplares adquirieron una tonalidad púrpura. Conforme se incrementó la cantidad de luz, las plantas se hicieron más flexibles y pasaron de un color café hasta amarillo claro. Las plantas más decoloradas tendieron a fragmentarse. El efecto de decoloración y fragmentación por exceso de luz se vió reducido en cultivos fertilizados. Los cultivos con altas concentraciones de nutrientes (80:8 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$) no mostraron fragmentación aún a mayores cantidades de luz (33% y 53% Io).

En algunas ocasiones, las epifitas fueron otro factor (además de la irradiación , nutrientes y tiempo) que influyeron sobre los

under 19% Io and 40:4 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$, growth rates of *E. uncinatum* in the rest of the treatments reached 6%/day, or more. Only the differences in growth due to irradiance were significant ($p=0.05$, Table II), with the highest increase in growth for the plants under 33% Io. At this irradiance, the growth rate was maintained at around 8 %/day (Fig. 6 a-c).

Tabla II. Resultado del ANOVA no paramétrico de tres vías para comparación de crecimiento en *E. uncinatum* teniendo como factores la luz (L); nutrientes (N) y la duración del cultivo (T). (* =0.05; ** =0.01; *** =0.001).

Table II. Non-parametric three way ANOVA to compare *E. uncinatum* growth considering light (L), nutrients (N) and duration of the culture (T) as treatments. (* =0.05; ** =0.01; ***0.001).

EXPER.	PERIODO EXPERIMENTAL	RESULTADO DEL ANOVA
1	13 dic.-1985	L **
	al	N ns
	27 feb.-1986	T ***
2	27 feb.-1986	L ns
	al	N *
	3 abr.-1986	T ns
3	27 abr.-1986	L ns
	al	N ns
	22 may.-1986	T **
4	2 jun.-1986	L ns
	al	N ***
	7 ago.-1986	T *
5	12 ago.-1986	L ns
	al	N ***
	17 oct.-1986	T **
6	17 oct.-1986	L *
	al	N ns
	28 nov.-1986	T ns

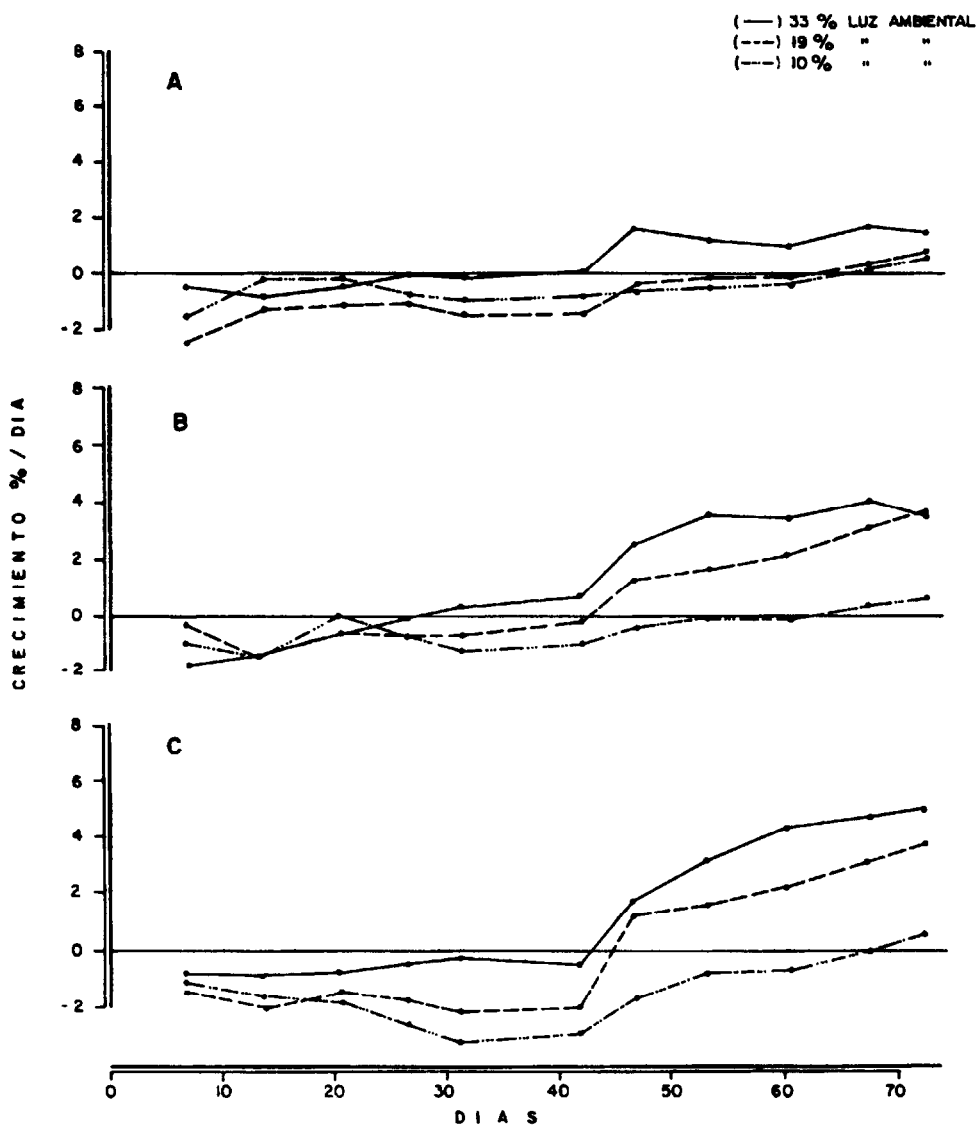


Figura 2. Crecimiento de *E. uncinatum* en tanques de cultivo de diciembre a febrero. Diseño factorial 3 x 3, luz vs nutrientes. A) Cultivos sin fertilizar; B) Cultivos fertilizados con 20 μM de N₀₃; C) Cultivos fertilizados con 20:2 μM N₀₃:P₀₄. Las líneas indican los porcentajes de luz ambiental sobre los tanques.

Figure 2. Growth of *E. uncinatum* in culture tanks from December to February. Factorial design 3 x 3, light vs nutrients A) Cultures without fertilization; b) Cultures fertilized with 20 μM of N₀₃; B) cultures fertilized with 20:2 μM N₀₃:P₀₄. The lines indicate the percent ambient light on the tanks.

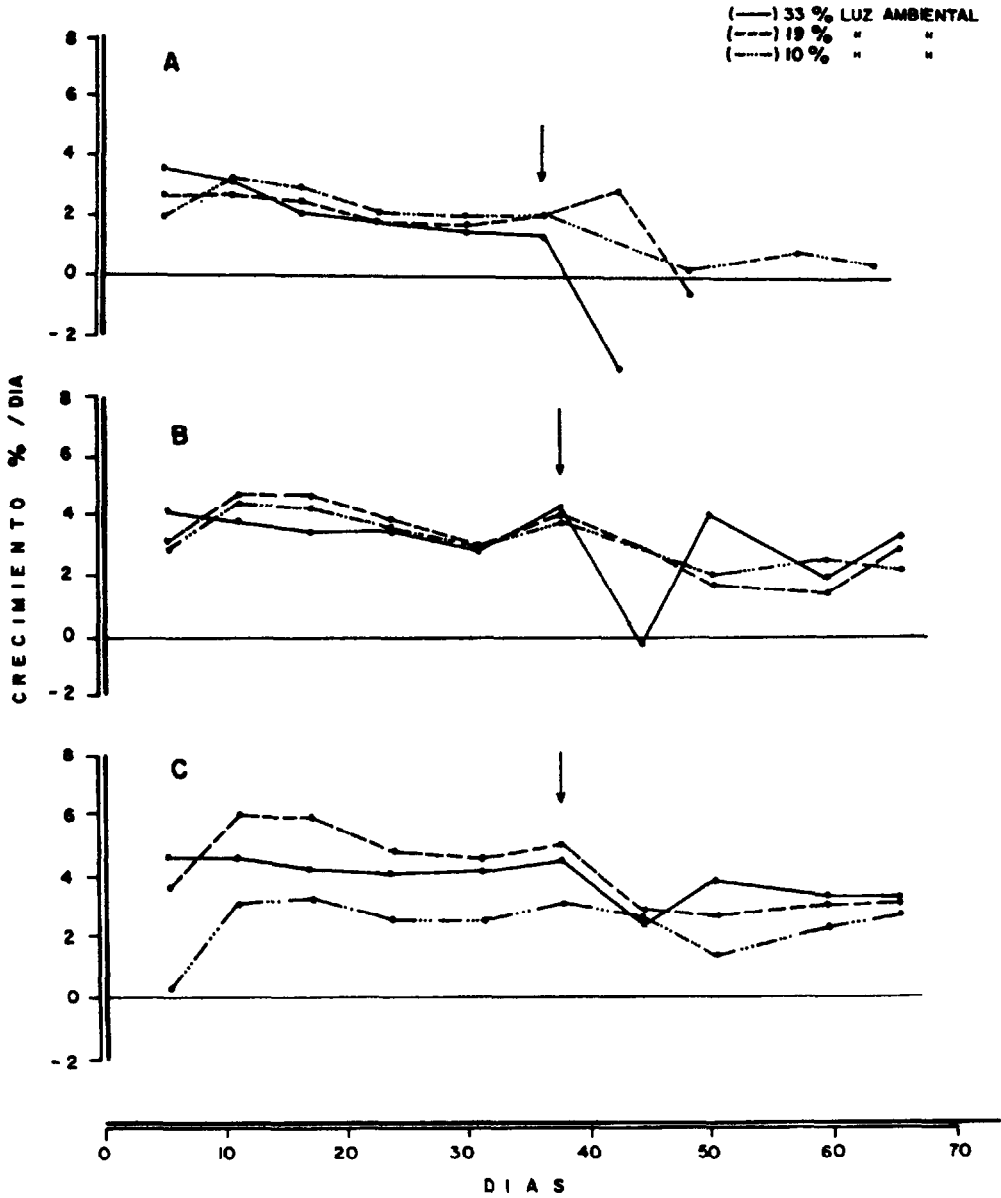


Figura 3. Crecimiento de *E. uncinatum* en tanques de cultivo de junio a agosto. Diseño factorial 3 x 3, luz vs nutrientes. A) Cultivos sin fertilizar; B) Cultivos fertilizados con 40:4 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; C) Cultivos fertilizados con 80:8 μM de $\text{N}_03:\text{P}_04$. Las líneas indican los porcentajes de luz ambiental sobre los tanques. Las flechas indican fechas de cosecha.

Figure 3. Growth of *E. uncinatum* in tanks from June to August. Factorial design 3 x 3, light vs nutrients. A) Cultures without fertilization; B) Cultures fertilized with 40:4 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; C) Cultures fertilized with 80:8 μM of $\text{N}_03:\text{P}_04$. The lines indicate the percent ambient light on the tanks. The arrows indicate the dates of harvesting.

resultados de crecimiento. *Enteromorpha* sp. y *Ectocarpus* sp. fueron comunes a lo largo del año con una mayor abundancia en verano y menor en invierno. Aunque su presencia ocurrió a partir de la primera semana de cultivo, sólo a partir de la cuarta o quinta semana su biomasa aumentaba considerablemente al grado de tener que suspender, en algunas ocasiones, los cultivos. Los cultivos más afectados fueron aquellos expuestos a altas irradiaciones y bajos nutrientes. Bajo estas condiciones las plantas comunmente tendían a fragmentarse después de un cierto tiempo. La presencia de *Ectocarpus* sp. se presentó abundantemente en los tanques expuestos a 33% Io como en los de 19% Io, mientras que la presencia de *Enteromorpha* sp. generalmente estuvo restringida a los tanques con 33% Io.

Otras epífitas cuya presencia fue observada sobre los cultivos, aunque en menor cantidad que las especies mencionadas, fueron: *Cladophora* sp., *Ulva* sp., *Colpomenia* sp. durante la primavera *Cladophora* sp., *Ceramium* sp., y *Polysiphonia* sp. en el verano.

El cepillar semanalmente las algas con un cepillo de cerdas de nailon y cosechar cada dos semanas las regiones más viejas de la planta, resultó ser la mejor estrategia para disminuir las epífitas. Este tratamiento permitió mantener los cultivos de verano (exp.5) libres de epífitas durante siete semanas, aún a 33% Io. A intensidades de luz de 19% Io o menores, las plantas se mantuvieron relativamente libres de epífitas siempre y cuando fueran fertilizadas con dosis de 40 μM NO_3 o mayores. A lo largo de todo el experimento seis (otoño) las plantas fueron cultivadas exitosamente sin epífitas, en todos los intervalos de luz (19 a 53% Io) y nutrientes (40:4 a 120:12 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$) siguiendo este tratamiento.

DISCUSION

El maricultivo extensivo de macroalgas comerciales debe de estar fuertemente apoyado por estudios ecológicos, fisiológicos y cultivos experimentales que muestren los intervalos de tolerancia de factores químicos y físicos dentro de los cuales las plantas se puedan

Strong differences in plant coloration were observed among the cultures. Under low irradiance conditions, the plants showed a purple color. As the irradiance increased, the plants became more flexible and turned into a brown, and even clear yellow. The more bleached plants tended to desintegrated. The effect of discoloration and fragmentation under an excess of light was reduced in fertilized cultures. The cultures with high nutrients concentrations (80:8 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$) did not show fragmentation, even at the highest treatments (33% and 53% Io).

In some cases, epiphytes was other factor (besides irradiance, nutrients and time) that influenced the grow results. *Enteromorpha* sp. and *Ectocarpus* sp. showed a strong presence along the year, with the highest abundance in the summer and minimum in the winter. Although their presence occurred from the first week of culture initiation, only by the fourth or fifth week was their biomass considered high enough so that, in some cases, the cultures had to be suspended. The cultures more affected were those exposed to high irradiance and without nutrient additions. Under these epiphytized conditions, the plants commonly tended to fragment after a certain time. The presence of *Ectocarpus* sp. was abundant in the cultures with 33% and 19% Io, while the presence of *Enteromorpha* sp. was restricted to tanks with 33% Io.

Other epiphytes that were present, but in less amounts than those previously mentioned were: *Cladophora* sp., *Ulva* sp., *Colpomenia* sp. during the spring and; *Cladophora* sp., *Ceramium* sp. and *Polysiphonia* sp. in the summer.

Weekly brushing of the plants with a nylon bristle brush and bi-weekly harvesting of the oldest regions of the plants resulted in diminished epiphytes. These treatments permitted us to keep the cultures free of epiphytes during the summer (experiment 5) for the seven weeks, even at 33% Io. At irradiances of 19% or less, the plants were kept relatively free of epiphytes as long they were fertilized with 40:4 μM NO_3 or more. During the sixth experiment (autumn), the plants

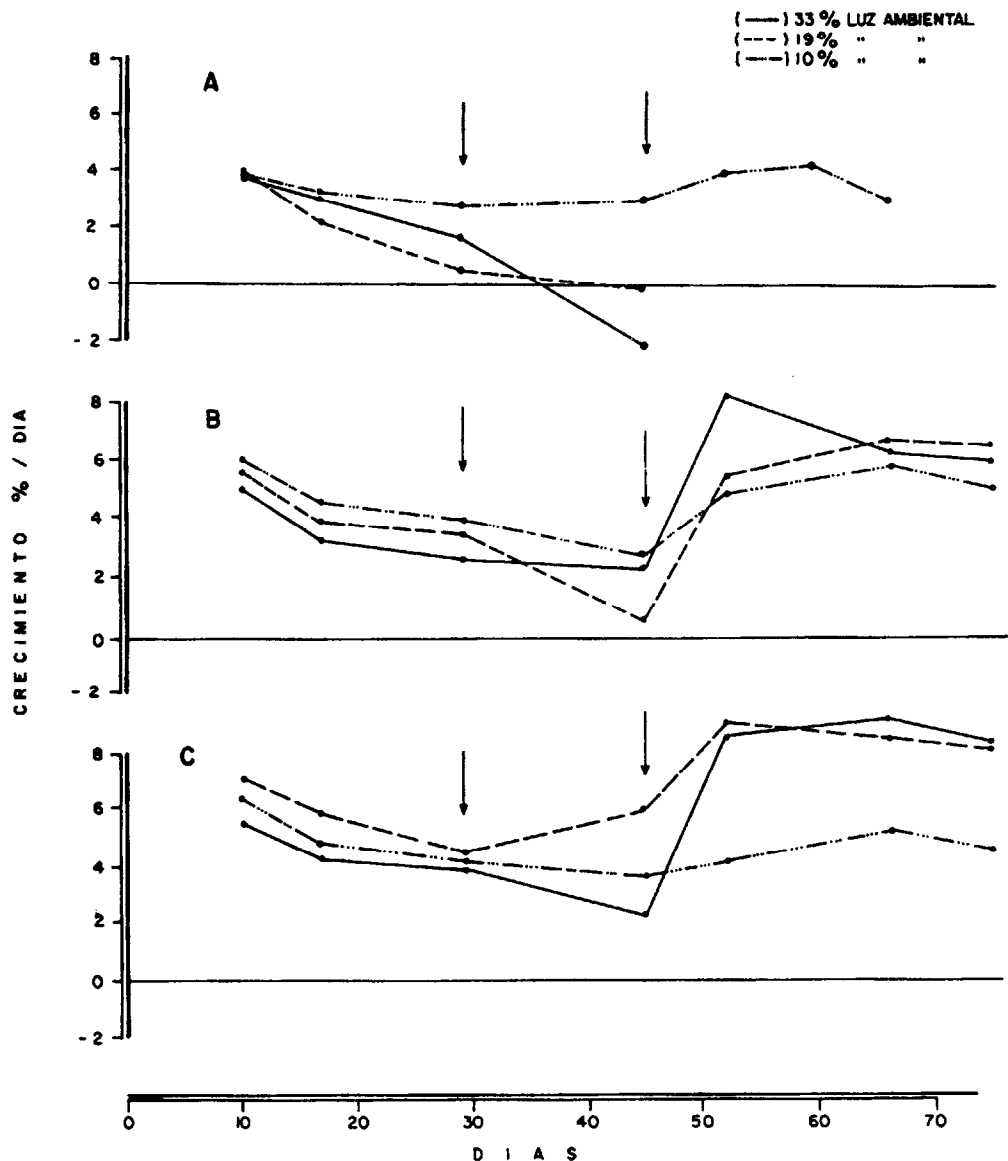


Figura 4. Crecimiento de *E. uncinatum* en tanques de cultivo de agosto a octubre. Diseño factorial 3 x 3 luz vs nutrientes. A) Cultivos sin fertilizar B) Cultivos fertilizados con 40:4 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; C) Cultivos fertilizados con 80:8 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$. Las líneas indican los porcentajes de luz ambiental sobre los tanques. Las flechas indican fechas de cosecha.

Figure 4. Growth of *E. uncinatum* in tanks from August to October. Factorial design 3 x 3, light vs nutrients. A) Cultures without fertilization; B) cultures fertilized with 40:4 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; C) cultures fertilized with 80:8 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$. The lines indicate the percent ambient light on the tanks. The arrows indicate the dates of harvesting.

Tabla III. Peso inicial en gramos (Po), final (Pf) y crecimiento en % día (C), de *E. uncinatum* cultivada bajo tres intensidades de luz (L) y tres condiciones de nutrientes (N). SN= sin nutrientes; NB= nutrientes bajos; NA y NA'= nutrientes altos. Las concentraciones de NB, NA, y NA' para cada experimento se presentan en la tabla I.

Table III. Initial (Po) and final (Pf) weight in grams and growth in % day (C), of *E. uncinatum* cultured under three light (L) and nutrients (N) conditions. SN= without nutrients; NB= low nutrients; NA and NA' = high nutrients. The concentrations NB, NA and NA' for each experiment are presented on table I.

FACTOR		EXP. 1		EXP. 2		EXP. 3		EXP. 4		EXP. 5		FACTOR		EXP. 6	
		Po= 60 gr		Po= 75 gr		Po= 200gr		Po= 200gr		Po= 200gr				Po= 70 gr	
L	N	Pf	C	Pf	C	Pf	C	Pf	C	Pf	C	L	N	Pf	C
	SN	89	0.5	44	-1.5	105	-2.3	238	-2.4	256	0.4		NB	483	6.9
	NB	198	1.7	139	1.8	336	1.9	828	2.7	741	2.8		NA	689	8.7
	NA	183	1.8	63	-0.5	297	1.4	924	2.9	1160	3.9		NA'	748	9.2
	SN	39	-1.8	40	-1.8	93	-2.7	339	0.5	248	1.3		NB	668	8.5
	NB	138	-0.7	59	-0.7	179	-0.4	823	2.6	877	2.8		NA	729	9.0
	NA	109	-0.3	67	-0.3	266	1.0	931	2.8	1320	4.9		NA'	731	9.1
	SN	48	-0.2	07	-6.5	107	-2.2	386	1.0	659	2.6		NB	486	6.6
	NB	47	-0.2	24	-3.2	197	0.0	733	2.3	895	3.2		NA	618	8.0
	NA	20	-1.2	18	-4.0	212	0.2	628	2.1	910	3.4		NA'	531	7.1

cultivar (Hansen 1983, Mumford y Waaland 1980). En el presente estudio se llevó a cabo el cultivo de *Eucheuma uncinatum* en un sistema abierto de tanques exteriores bajo una variedad de condiciones de luz y nutrientes en diferentes épocas del año. En este tipo de sistema, estos factores únicamente son regulados ya que no se controlan con precisión; la luz ambiental que llega a los cultivos se reduce incrementando el número de mallas y la cantidad de nutrientes se incrementa por medio de fertilizaciones. Sin embargo, este tipo de estudios son esenciales porque son la más cercana aproximación al resultado que se obtendría en un cultivo extensivo, donde no sería factible controlar la temperatura, pero sería posible fertilizar las plantas o regular la intensidad de luz a la que se exponen los cultivos controlando la profundidad a la que se instalen (Tseng, 1981).

Este estudio muestra que durante el invierno y otoño los cultivos estuvieron limitados por luz. En verano, cuando la irradiación

were maintained successfully without epiphytes in all treatments of light (19 to 53% I₀) and nutrients (40:4 to 120:12 μ M NO₃:PO₄) following this treatment regimen.

DISCUSSION

Extensive mariculture of commercial seaweeds must be strongly supported by ecological, physiological, and experimental culture studies that show the ranges of tolerance of chemical and physical factors within which the plants can be cultured (Hansen, 1983; Mumford and Waaland, 1980). In the present study, the culture of *Eucheuma uncinatum* was done in an open seawater system with experimental outdoor tanks under a variety of irradiance and nutrient conditions at different times of the year. In this type of system, these factors are only regulated since they cannot be controlled with precision; ambient light that reaches the cultures is reduced by increasing the number of screens and the amount of nutrients is increased by

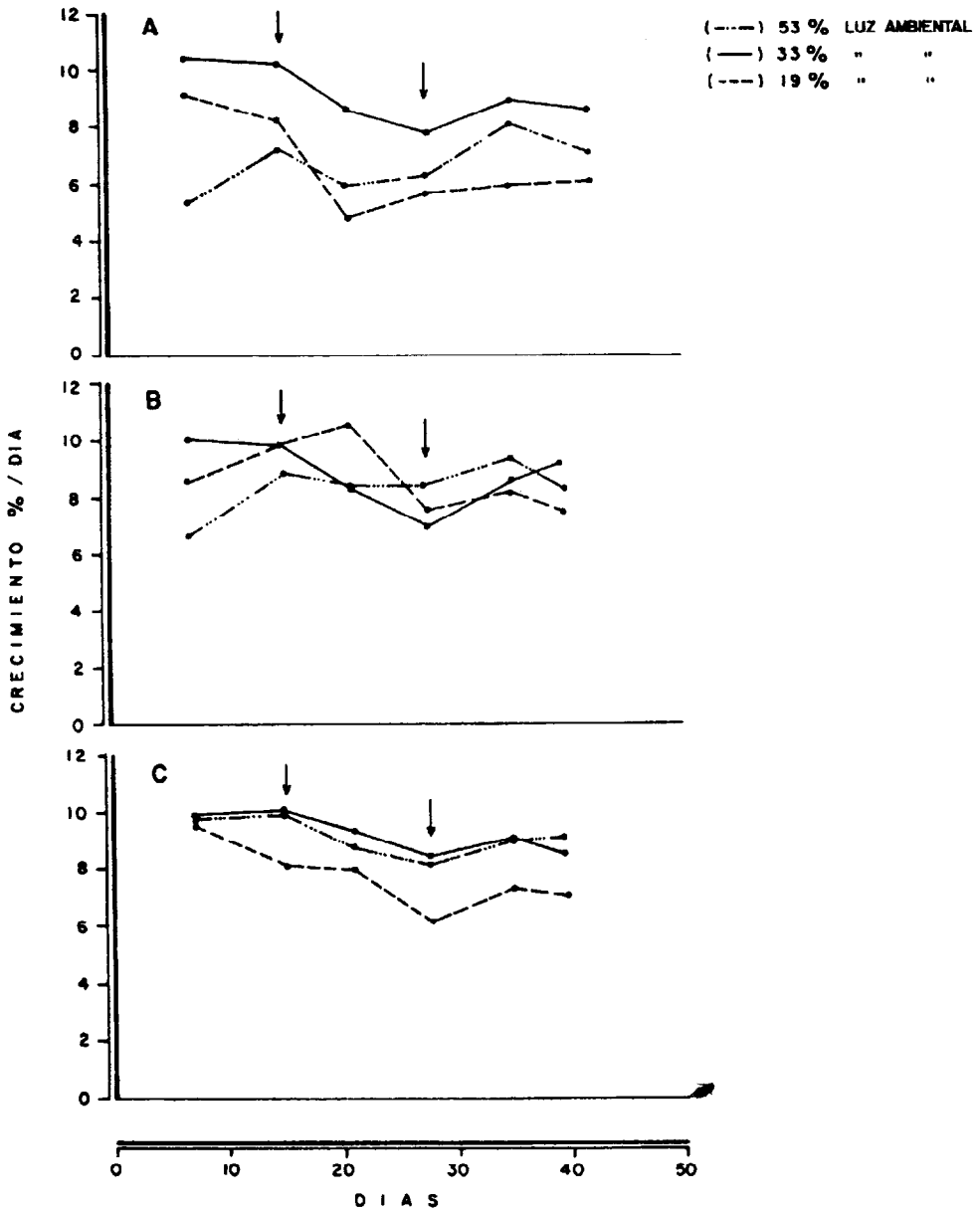


Figura 5. Crecimiento de *E. uncinatum* en tanques de cultivo de octubre a noviembre. Diseño factorial 3 x 3, luz vs nutrientes. A) Cultivos fertilizados con 40:4 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; B) cultivos fertilizados con 80:8 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; C) Cultivos fertilizados con 120:12 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$. Las líneas indican los porcentajes de luz ambiental sobre los tanques. Las flechas indican fechas de cosecha.

Figure 5. Growth of *E. uncinatum* in tanks from October to November. Factorial design 3 x 3, light vs nutrients. A) Cultures fertilized with 40:4 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; B) Cultures fertilized with 80:8 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$; C) Cultures fertilized with 120:12 μM $\text{N}_03:\text{P}_04$. The lines indicate the percent ambient light on the tanks. The arrows indicate the dates of harvesting.

es máxima y la disponibilidad de nutrientes en el medio ambiente es baja, los resultados indican que los cultivos sin fertilización estuvieron limitados por nutrientes. Mientras que los cultivos de invierno estuvieron saturados por nutrientes con fertilizaciones de 20 μM de NO_3 , aún aquellos que recibieron la mayor cantidad de luz, los cultivos de verano y otoño requirieron concentraciones arriba de 40 μM .

Hanisak (1983) menciona que la evidencia más convincente de que existe limitación por nutrientes es cuando se observa un incremento en el crecimiento seguido de una fertilización *in situ*. Los datos de este estudio sugieren que el crecimiento de los cultivos de junio a octubre no alcanzó a saturarse con fertilizaciones de 40:4 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$ ya que los cultivos con fertilizaciones de 80:8 μM crecieron mejor.

La razón por la cual decayó la razón de crecimiento de los cultivos del segundo y tercer experimento (febrero-abril) probablemente se debió a dos factores; a) una deficiente disponibilidad de nutrientes (40 μM no fue una concentración suficientemente alta de NO_3 para mantener un crecimiento saludable) y b) la edad del tejido de la planta, lo cual probablemente se relaciona con lo que Polne *et al.* (1980) consideran como un ciclo inherente de la planta.

Polne *et al.* (1980) fueron capaces de cultivar *Eucheuma uncinatum* en tanques a partir de una muestra colectada en abril. Sus resultados indicaron que esta especie no fue capaz de crecer debajo de 15 $^\circ\text{C}$, ni arriba de 30 $^\circ\text{C}$, mantenidos a temperatura constante. Independientemente de la temperatura, sus cultivos dejaron de crecer en agosto. Los autores mencionaron que esto pareció no ser un efecto de la luz y sugirieron que un ciclo inherente de la planta causa su decaimiento. Este fenómeno ha sido observado por Edelman *et al.* (1976) en *Gracilaria* y por Waaland (1976) y Mumford (1979) en *Iridaea cordata*.

El incremento en crecimiento observado en los cultivos de invierno a partir de la sexta semana, cuando la mayoría del talo viejo se desintegró y la mayoría del tejido pasó a ser

fertilization. These types of studies, however are essential because they are the closest approximation to the results that may be obtained in an extensive field mariculture where it would not be feasible to control the temperature, but it would be possible to fertilize the plants or regulate the light to which the cultures are exposed by controlling the depth at which the cultures are installed (Tseng, 1981).

This study shows that during the winter and autumn the cultures were limited by light. In summer, when the irradiance is maximum and the availability of nutrients in the environment is low, the results indicate that the cultures without fertilization were limited by nutrients. While the winter cultures were nutrient saturated with fertilizations of 20 μM of NO_3 , even those that received the highest amount of light, the summer and autumn cultures required concentrations above 40 μM .

Hanisak (1983) mentioned that the most convincing evidence that there is nutrient limitation is when an increase in growth following fertilization *in situ* is observed. The growth data of the cultures from June to October suggest that they did not reach saturation with fertilizations of 40:4 μM $\text{NO}_3:\text{PO}_4$ since the cultures with 80:8 μM grew better.

The reason for the decay in the growth rate of the cultures from the second and third experiments (February-April) was probably due to two factors: a) a deficient availability of nutrients (40 μM was not a sufficiently high concentration of NO_3 to maintain a positive growth) and b) the age of the plant tissues, which is probably related to what Polne *et al.* (1980) considers an inherent cycle of the plant.

Polne *et al.* (1980) were able to culture *Eucheuma uncinatum* in tanks from a sample collected in April. Their results indicated that this species was not able to grow below 15 $^\circ\text{C}$, nor above 30 $^\circ\text{C}$, kept at a constant temperature. Independently of temperature, their cultures stop growing in August. The authors mentioned that this seems not to be an effect of light and suggested that an inherent cycle of the plant causes its decay. This phe-

tejido joven, sugirió la hipótesis de que la edad del tejido era un factor importante para poder mantener los cultivos en una fase de crecimiento activo. En los experimentos posteriores, donde se tuvo cuidado en utilizar y mantener únicamente tejido "joven" en cultivo por medio de cosechas regulares, se pudo comprobar que la edad del tejido es un factor determinante en la condición del cultivo.

Mumford y Waaland (1980) informaron que cosechas regulares de *Iridaea cordata* en el campo permitió extender el cultivo de esta especie. Los autores mencionan, sin embargo, que a pesar de este tratamiento los cultivos decayeron en el verano.

Los resultados de este estudio en el verano demostraron que si los cultivos se mantuvieran con altas fertilizaciones, adecuadamente sombreados y con cosechas regulares para mantener el cultivo relativamente joven, la planta no se desintegraría sino por el contrario, sería capaz de crecer vigorosamente durante esta época. Este tipo de condiciones son posibles de practicarse en un cultivo extensivo, lo que los autores de este trabajo esperan probar en un estudio futuro. Además, estos resultados sugieren fuertemente que las altas temperaturas no son el principal factor responsable por la desaparición estacional de esta especie en algunas regiones del Golfo de California.

La presencia de epífitas es un problema aún no resuelto para cultivos en tanques exteriores (Edelstein et al. 1976, Waaland 1976, Mumford 1980, Gallagher and Humm 1983). Sin embargo, el cepilleo semanal de *Eucheuma uncinatum* fue una buena alternativa usada en estos experimentos que, combinada con cosechas regulares del tejido viejo, permitió mantener los cultivos libres de epífitas.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que es factible cultivar a *Eucheuma uncinatum* en tanques exteriores, bajo condiciones naturales de luz y temperatura. Los requerimientos de nutriente de *E. uncinatum* en tanques exteriores varían

nomenon has been observed by Edelstein et al. (1976) in *Gracilaria* and by Waaland (1976) and Mumford (1979) in *Iridaea cordata*.

The increase in growth for the winter cultures from the sixth week on when the majority of the old thallus was disintegrated and the majority of the tissue became young tissue, suggested the hypothesis that the age of the tissue was an important factor to be able to keep the cultures in a constant positive growth phase. In the latter experiment, where care was taken to utilize and maintain only "young" tissue in the cultures through regular harvesting, it was possible to prove that the age of the tissue was a determinat factor in the condition of the culture.

Mumford and Waaland (1980) reported that frequent harvesting in the field of *Iridaea cordata* allowed them to extend the culture of this species. The authors mentioned, however, that in spite of this treatment the cultures decayed in summer.

The results of this study in the summer demonstrated that if the cultures were kept with high fertilizations, adequate shading and regular harvesting to keep the cultures relatively young, the plants did not disintegrate but were capable to grow vigorously during this season. These types of manipulations are feasible to practice in extensive mariculture, which the authors of this study will try to prove in a future study. Further, these results strongly suggest that high seawater temperatures are not a principal factor accounting for the seasonal disappearance of the species from some portions of the Gulf of California.

The presence of epiphytes is an unsolved problem for outdoor tank cultures (Edelstein et al. 1976, Waaland 1976, Mumford 1980, Gallagher and Humm 1983). However, a weekly brushing of *Eucheuma uncinatum* was a good alternative used in these experiments that, combined with periodic harvesting of old tissue, allowed us to keep the cultures free of epiphytes.

CONCLUSIONS

This study demonstrates that is feasible to culture *Eucheuma uncinatum* in tanks

de acuerdo a la estación del año, siendo la demanda de saturación menor en invierno y máxima en verano. El patrón inverso ocurre con la luz. El decaimiento natural de *E. uncinatum* puede ser evitado en tanques exteriores de cultivo mediante cosechas regulares de las partes viejas de las plantas. Los manejos aplicados en este estudio para mantener los cultivos de *E. uncinatum* creciendo saludablemente durante cualquier época del año, podrían ser practicados en el cultivo extensivo de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica de Isaf Pacheco y los comentarios de los revisores de este artículo. Este trabajo fue realizado con financiamiento otorgado al primer autor por parte de la Universidad Autónoma de Baja California y la Secretaría de Educación Pública (convenio No. C86-01-0121) y con financiamiento de la National Science Foundation y el New York Sea Grant Institute otorgado a BHB. Resultados preliminares de este estudio fueron presentados en el I Congreso Nacional de Acuicultura celebrado en Pachuca, Hidalgo, México en diciembre de 1986.

LITERATURA CITADA

EDELSTEIN, T., Bird C.J., and McLachlan, J. (1976) Studies on *Gracilaria*. 2. Growth under Greenhouse Conditions. Can. J. Bot., Vol. 54: 2275-2290.

DAWES, C.J., Stanley, N.F. and Moon, R.E. (1977a) Physiological and Biochemical studies on the ν -carrageenan producing red algae *Euclima uncinatum* Setchell and Gardner from the Gulf of California. Bot. Mar., Vol. XX pp. 437-442.

GALLAGHER, S.B. and Humm, H.J. (1983) Techniques of Laboratory Cultivation of Marine Algae. Technical Report. GRI-83/0056. Univ. of South Florida, St. Petersburg. V + 119 pp.

under natural conditions of light and temperature. The requirements of *E. uncinatum* for nutrients in outdoor tanks varies according with the season; the demand for saturation is less in winter and greater in summer. The inverse pattern occurs with light. The natural decay of a semi-annual plant in culture like *E. uncinatum* may be avoided through regular harvesting of the old parts of the plant. The handling applied in this study to keep the cultures of *E. uncinatum* growing healthily during any season of the year could be practiced in the extensive culture of this species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Isaf Pacheco for technical assistance and the reviewers of the manuscript. This research was supported by grants from the Universidad Autónoma de Baja California and Secretaría de Educación Pública (Agreement No. C86 - 01 - 0121) to the first author, and from the New York Sea Grant Institute and the National Science Foundation to B. Brinkhuis. Preliminary results of this study was presented in the I Congreso Nacional de Acuicultura, carried out in Pachuca, Hidalgo, México, in December 1986.

Traduction by the author.

GUZMAN del Proó, S.A. (1967) Evaluación de Bancos de *Euclima uncinatum* en el Golfo de California. Resultados preliminares. III Congreso Nacional de Oceanografía, Campeche, Camp. (resúmen).

HANISAK, M.D. (1983) The Nitrogen Relationship of Marine Macroalgae. In: Carpenter, E.J. and D.J. Capone (Eds.), Nitrogen in the Marine Environment. Academic Press, N.Y.: 699-730.

HANSEN, J.E. (1983) A Physiological approach to Mariculture of Red Algae. J. World Maricul. Soc. 14: 380-391.

HANSEN, J.E., Parckard, J.E. and Doyle, W.T. (1981) Mariculture of red Seaweeds. Report # T-CSGCP-002, California Sea Grant Publication, 42 p.

- HOYLE, M.D. (1978) Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. *J. mar. Biol. Ecol.*, 35: 273-283.
- MUMFORD, T.F. Jr. (1979) Field and laboratory experiments with *Iridea cordata* (Florideophyceae) grown on nylon netting. *Proc. Intl. Seaweed Symp.* 9: 515-523.
- MUMFORD, T.F. and Waaland, J.R. (1980) Progress and Prospects for field cultivation of *Iridea cordata* and *Gigarina exasperata*. In: I. Abbott, M. Foster and L. Eklund (eds.) *Pacific Seaweed Aquaculture*, La Jolla, Ca. California Sea Grant College Program, USCD; 92-105.
- NORRIS, J.N. (1975) The marine Algae of the Northern Gulf of California. Ph.D. Dissertation. Univ. Calif. Santa Barbara, CA., XX + 575 pp.
- NORRIS, J.N. (1985) *Euचेuma* J. Agarth (Solieracear, Rhodophyta) from the Gulf of California. In: *Taxonomy of Economics Seaweed*, Abbott, I.A. and Norris, J.A. (eds.) Calif., Sea Grant Prog., La Jolla, Calif. 167 pp.
- PARKER, H.S. (1974) The culture of the red algae genus *Euचेuma* in the Philippines. *Aquaculture*, 3: 425-439.
- POLNE, M., Neushul, M. and Gibor, A. (1980) Growing *Euचेuma uncinatum* in culture, the domestication of a marine crop plant. In: *Pacific Seaweed Aquaculture*, Abbott I.A., Foster M. and Eklund L.E. (eds). California Sea Grant College Program, UCSD, 115-123 p.
- POLNE, M., M. Neushul, and A Gibor. (1981) Studies in Domestication of *Euचेuma uncinatum*. *Proc. Intl. Seaweed Symp.* 10: 619-624.
- TSENG, C.K. (1981) Commercial Cultivation. In: *The Biology of Seaweeds* (Eds. C.S. Lobban and M.J. Wynne). *Botanical Monographs V. 17*. Univ. of California Press. 680-722.
- WAALAND, J.R. (1976) Growth of the red algae *Iridea cordata* (Turner) Bory in Semi-closed culture. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* Vol. 23: 45-53.
- WILSON, K.V. (1956) A distribution-free test of analysis of variance hypothesis. *Psychological Bulletin*, 53(1); 96-101.