



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



*REEVALUACIÓN DE LAS PROPUESTAS TAXONÓMICAS
DEL ORDEN CORALLINALES (RHODOPHYTA).*

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Dra. en Ciencias

(Biología Marina)

p r e s e n t a

DALILA FRAGOSO TEJAS

Director de Tesis: Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas

Comité Tutorial:

Dra. G. Judith Márquez Guzmán

Dra. Elisa Serviere Zaragoza

Dr. José Francisco Flores Pedroche

Dra. Brigitta Ine Van Tussenbroek

Dr. Juan Francisco Efraín de Luna García

Dr. Daniel Piñero Dalmau

México, D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de estudios de doctorado.

Al Posgrado del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por haberme dado la oportunidad de formarme y conocer otros horizontes.

A todos los integrantes y personal del Laboratorio de Ficología y de la sección ficológica del herbario de la Facultad de Ciencias por el apoyo y formación.

A la Facultad de Ciencias por haberme recibido, orientado, formado, enseñado y educado en muchos aspectos académicos y no académicos.

Al Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN por su apoyo, colaboración y servicios siempre que fue necesario.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias, por su apoyo y la discusión constante.

Agradezco profundamente a mis maestros de la Facultad de Ciencias, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, del Instituto de Biología, del Instituto de Ecología, del Instituto de Ciencias Nucleares, del Instituto de Física, del Instituto de Materiales y de Universum de la UNAM; así como a mis maestros de la UAM Iztapalapa, del Instituto de Ecología, A.C., de Xalapa y de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por todo el apoyo, colaboración, orientaciones, discusiones y ese mucho más, invaluable que es la amistad.

A la Universidad de la Sierra, Moctezuma, Sonora, por su apoyo incondicional.

A mi comité tutorial, Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas, Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Dra. Brigitta Van Tussenbroek, Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dr. Francisco Flores Pedroche y Dr. Juan Francisco Efraín de Luna García.

Especialmente al Dr. Alejandro Heredia Barbero.

A Luis Buñuel por su ángel exterminador.

A Paco Ignacio Taibo II por hacerme reír, llorar, deprimirme y hacerme sentir a veces más y a veces menos marginal.

A José Saramago, por los incontables ratos de deleite y de sorpresa.

A Les Luthiers ...

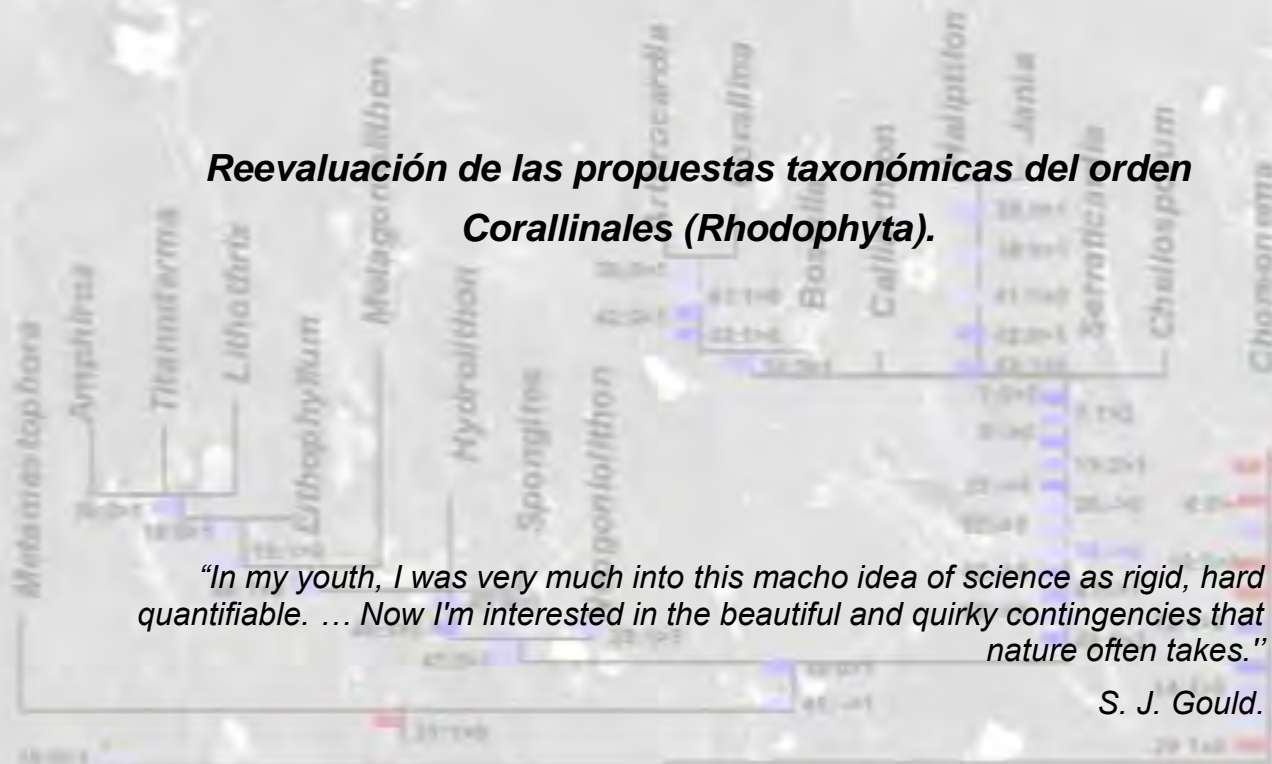
A mi queridísimo maestro Stephen Jay Gould por mucho más que todo.

*A mi mamita,
por estar conmigo en todo momento,
en cualquier circunstancia y a pesar de mi.*

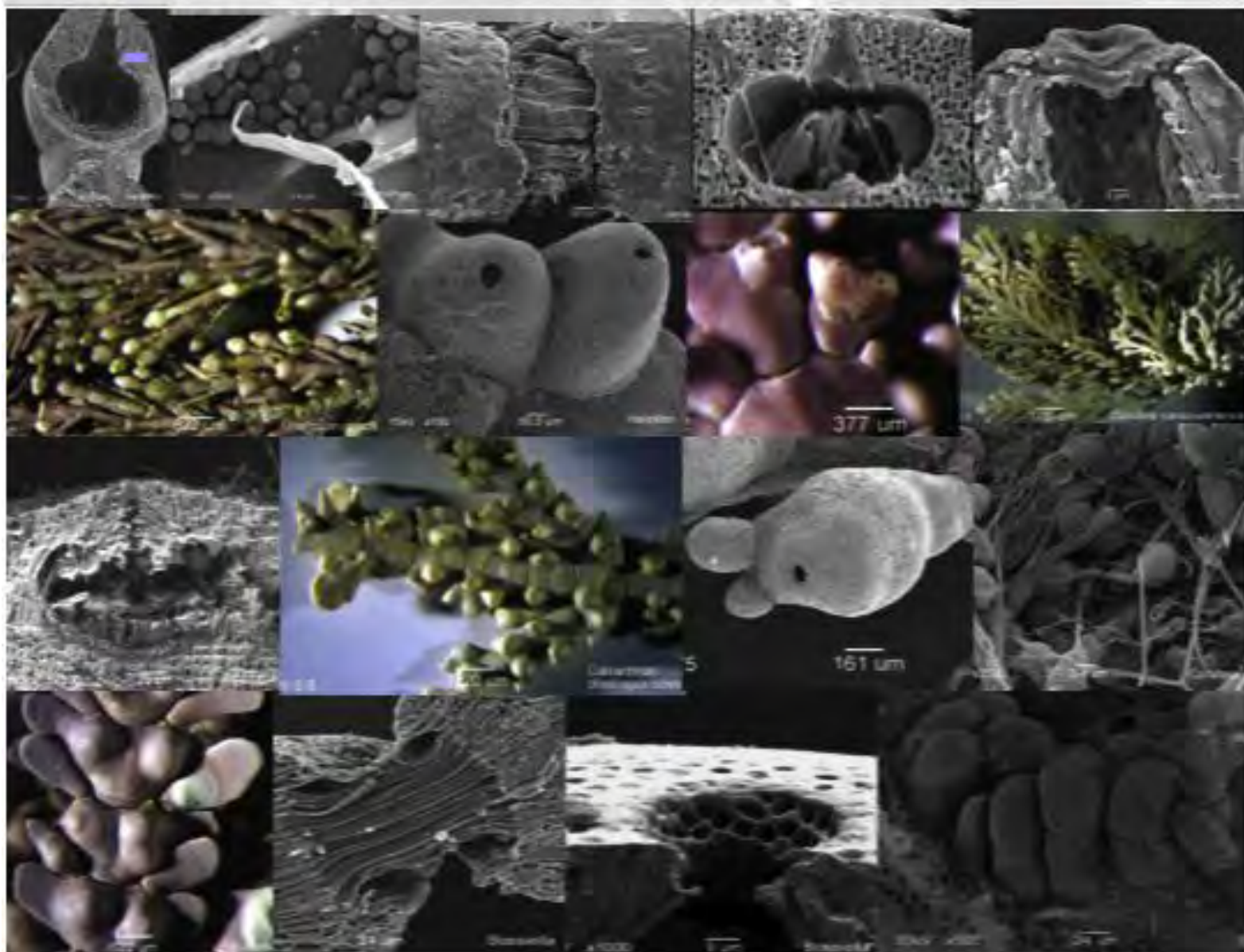
A mis hermanos Celia e Isaac, los reyes de mi vida.

*A mis sobrinos, los príncipes herederos:
Carlitos, Emilio, David y Sara*

**Reevaluación de las propuestas taxonómicas del orden
Corallinales (Rhodophyta).**



S. J. Gould.



**Reevaluación de las propuestas taxonómicas del orden
Corallinales (Rhodophyta).**

9	Resumen
13	I. Introducción
13	I.1. Las algas coralinas: una intrincada historia taxonómica
15	I.2. El ensamble de Rhodophyta y la segregación de las coralinas en el Orden.
16	I.3. La taxonomía del orden Corallinales
18	II. Objetivos
19	III. Metodología
20	IV. Resultados
20	IV.1. <i>Caracterización del biomineral CaCO₃ en algas rojas coralinas (Corallinales) de las Costas del Pacífico de México.</i>
36	IV.2. <i>Estudio de la morfología fina de las algas coralinas geniculadas (Rhodophyta) en las costas de México.</i>
51	IV.3. <i>Características morfológicas de las coralinas.</i>
75	IV.4. <i>Relaciones Filogenéticas del Orden Corallinales (Rhodophyta): un análisis a partir de datos morfológicos y combinados de caracteres.</i>
103	V. Discusión
107	VI. Conclusión
108	VII. Referencias
112	VIII. Anexo

Índice de Figuras

- 15 I.2.1. Ciclo de vida característico de las coralinas
- 27 IV.1.1. Mapa de distribución que muestra los sitios de colecta de las coralinas analizadas en el estudio de biomineral
- 24 IV.1.2. Imágenes de MEB de vacío mostrando la morfología de coralinas.
- 29 IV.1.3. Microscopía de efecto túnel de muestras pulverizadas de cuatro algas rojas coralinas depositadas en grafito pirolítico.
- 30 IV. 1.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de muestras pristinas de algas coralinas.
- 31 IV.1. 5. Difractograma de rayos X de las especies coralinas geniculadas.
- 32 IV.1. 6. Difractograma de rayos X de las especies de coralinas geniculadas.
- 38 IV.2.1. Hábitos de las diferentes especies de coralinas geniculadas analizadas.
- 42 IV.2.2. Vistas superficiales de talos de diferentes especies en MEB.
- 44 IV.2.3. Características de la micromorfología de estructuras reproductoras de diferentes especies de coralinas (MEB).
- 45 IV.2.4. Estructuras reproductoras gametangiales y espermatangiales de difetrentes especies de coralinas (MEB).
- 48 IV.2.5. Árbol de MP de datos micromorfoógicos.
- 53 IV.3.1. Patrón de desarrollo del talo en algas coralinas.
- 76 IV.4.1. Esquema taxonómico propuesto por Johansen (1981) – Woelkerling (1988), incorporando las modificaciones de Verheij(1993), Townsend, Chamberlain y Keats, 1994) y Harvey y Woelkerling (1995).
- 77 IV.4.2. Esquema taxonómico propuesto por Cabioch (1972).
- 78 IV.4.3. Esquema taxonómico propuesto a partir de las inferencias de filogenia molecular. Se han establecido algunas relaciones al interior de las subfamilias y entre subfamilias.
- 86 IV.4.4. Uno de los 158 árboles de MP, IC: 0.48; IR:0.74; en el cual se mapearon los caracteres.
- 87 IV.4.5. Árbol de consenso estricto de caracteres morfológicos.
- 89 IV.4.6. A) Árbol de consenso por mayoría y B) árbol de consenso estricto de datos información molecular del gen 18s del ARNr.
- 91 IV.4.7. Árbol de consenso estricto de datos combinados –morfológicos-moleculares.
- 92 IV.4.8. Se muestra uno de los 3 cladogramas de datos combinados. Se señalan los caracteres que sustentan algunos nodos (ver texto).
- 101 IV.4.9. Propuesta taxonómica para el orden Corallinales.

Índice de Tablas

22	IV.1.1. Especies de coralinas analizadas por diferentes métodos de microscopía.
28	IV.1. 2. Análisis elemental (%) mediante espectroscopía de dispersión de energía de especies de coralinas geniculadas.
28	IV.1.3. Análisis elemental (%) mediante espectroscopía de dispersión de energía de 2 especies de coralinas no geniculadas
32	IV.1.4. Comparaci. n de las posiciones en las reflexiones de Bragg de la calcita y la aragonita de origen mineral para el refinamiento Rietveld
33	IV.1.5. Parámetros de la red y factores de discrepancia para la fase calcítica de <i>Lithophyllum</i> sp.
39	IV.2.1. Especímenes de coralinas analizados en MEB y su registro de herbario.
40	IV.2.2. Caracteres y estados de carácter de las condiciones micromorfológicas (MEB) de las coralinas analizadas.
46	IV.2.3. Matriz de Datos micromorfológicos.
74	IV.3.1. Matriz de datos morfológicos usada para los análisis filogenéticos.
79	IV.4.1. Resumen de los principales esquemas de clasificación de algas rojas coralinas (Rhodophyta).
80	IV.4.2. Caracteres diagnósticos de las subfamilias que constituyen a las familias Sporolithaceae, Hapalidiaceae y Corallinaceae del orden Corallinales.
81	IV.4.3. Listado de especies usadas en los análisis filogenéticos morfológicos, moleculares y de evidencia combinada.
83	IV.4.4. Caracteres y estados de carácter usados en los análisis cladísticos.
102	IV.4.5. Esquema taxonómico del orden Corallinales. Taxones integrantes de acuerdo a los análisis combinados de datos morfológico-moleculares

Resumen

Aunque el orden Corallinales forma un grupo monofilético bien delimitado, análisis moleculares que concuerdan parcialmente con las propuestas de taxonomía clásica, han evidenciado inconsistencias taxonómicas de algunos grupos dentro del orden, tales como las subfamilias Lithophylloideae y Mastophoroideae. Esta tesis tiene como objetivo reevaluar las propuestas taxonómicas principalmente a través de un análisis de los caracteres morfológicos, además de compararlos y analizarlos conjuntamente con la información molecular para esbozar una hipótesis sobre la filogenia del grupo y plantear un ordenamiento taxonómico acorde con éste.

Se recopiló de la literatura la información morfológica, se ordenó, evaluó y se llevó a cabo un análisis cladístico de datos para determinar su señal filogenética.

Se consideró evaluar dos fuentes de información que no hayan sido utilizadas con anterioridad para fines taxonómicos pero que la literatura muestra como información relevante para el orden. Se realizaron estudios de la composición y estructura cristalinas del biomineral carbonato de calcio y de las variaciones micromorfológicas de los talos de corallinas geniculadas para evaluar su utilidad en las reconstrucciones filogenéticas.

El análisis cristalográfico de las paredes celulares mostró dos formas morfológicas de depositación de cristales: en aguja y en placas; un bajo contenido de materia orgánica ocluida en los cristales de calcita indicando que este biomineral fue sintetizado por un proceso extracelular.

En los análisis de micromorfología de las corallinas geniculadas se reconocieron estructuras anatómicas presumiblemente comunes del orden, asociadas a las estructuras reproductoras en las primeras etapas de desarrollo. La forma, tamaño, disposición y arreglo asociados a las células de la superficie del talo, así como las células que formaron y rodearon los poros conceptaculares gamentangiales y esporangiales, mostraron patrones que fueron distintos a nivel de género y especie, útiles en las reconstrucciones filogenéticas.

Para la reevaluación taxonómica se circunscribió a los caracteres morfológicos de la literatura utilizando sólo los caracteres o combinaciones de éstos que mostraron congruencia. Dicha información se analizó con la metodología cladística de forma independiente obteniendo cladogramas para cada grupo de datos y conjuntamente con los caracteres moleculares de la subunidad corta del gen 18s ARNr. Se llevó a cabo un análisis de caracteres y se optimizaron, para obtener el cladograma más parsimonioso a partir del cual se propuso una reconstrucción taxonómica del orden.

Se hizo evidente que el concepto de subfamilia no está sustentado desde el punto de vista filogenético de acuerdo a las relaciones mostradas en los diferentes cladogramas. Se propuso que la subfamilia Lithophylloideae se eleve

a familia Lithophyllaceae e incluya a los géneros *Metagoniolithon*, *Hydrolithon* y *Spongites*; implicando la desaparición de Metagoniolithoideae. La subfamilia Corallinoideae permanece como monofilética pero se propone su elevación a familia Corallinaceae. Los géneros *Neogonolithon* y *Metamastophora* se presentaron como linajes independientes hermanos tanto de los nuevos Lithophyllaceae y Corallinaceae probando la polifilia de la subfamilia Mastophoroideae; se propuso que por sus relaciones conformen la familia Metamastophoraceae. Las familias Sporolithaceae y Hapalidiace no cambian su circunscripción de acuerdo a la taxonomía vigente.

SUMMARY

Even though the order Corallinales forms a well-delimited monophyletic group, molecular analysis, that partly agrees with the proposals of classical taxonomy have shown taxonomic inconsistencies from certain groups within the order, such as the subfamilies Lithophylloideae and Mastophoroideae. The aim of this thesis is to reassess the taxonomic proposals mainly through an analysis of the morphological characters, as well as to compare and analyze them along with molecular data in order to outline a hypothesis about the phylogeny of the group; and to rise a taxonomic ordering in accordance thereto.

Morphological data was collected from the literature, was ordered and assessed; and a cladistic analysis on the data was carried out in order to determine its phylogenetic signal.

Two sources of data were considered for the assessment that have not been used before for taxonomic reasons, but that the literature shows as relevant data for the order. Studies of the crystalline composition and structure of the calcium carbonate biomineral were carried out, as well as the micromorphological variations of the thallus of the geniculate coralline in order to assess its use in the phylogenetic reconstructions.

Crystallographic analysis of the cell walls showed two morphologic forms of storage of crystals: in needle and in plates; a low content of organic matter occluded in the calcite crystals indicating that this biomineral was synthesized by an extracellular process.

In the micromorphological analysis of the geniculate corallines, anatomical structures were recognized presumably common of the order associated to the reproducing structures in the early stages of development. The shape, size, layout and arrangement associated to cells of the thallus surface; as well as the cells that formed and surrounded the conceptacular gametangial and sporangial pores showed patterns that were different to a genus and species level, useful in the phylogenetic reconstruction.

For the taxonomic reassessment, it was circumscribed to the morphologic characters of the literature by using only the characters or combinations thereof that showed congruency. Such data was analyzed through cladistic methodology in an independent way obtaining cladograms for each group of data, along with the molecular characters of the *ssu 18s* ARNr gene. An analysis of characters was carried out and optimized in order to obtain the most parsimonious cladogram, from which a taxonomic reconstruction of the order was proposed.

It was made evident that the concept of subfamily is not supported from the phylogenetic point of view according to the relations shown in the different cladograms. It was proposed that the subfamily Lithophylloideae is upgraded to family Lithophyllaceae and includes the genera *Metagoniolithon*, *Hydrolithon* and *Spongites*, implicating the disappearance of Metagoniolithoideae. The subfamily Corallinoideae remains as monophyletic, but it is proposed its upgrading to family Corallinaceae. Genera *Neogoniolithon* and *Metamastophora* were shown as independent lineages; siblings of both Lithophyllaceae and Corallinaceae, proving the polyphyly of the subfamily Mastophoroideae. Due to their relations, it was proposed that they form the

family Metamastophoraceae. The families Sporolithaceae and Hapalidiace do not change their circumscription according to current taxonomy.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Las algas coralinas: una intrincada historia taxonómica.

La segregación de organismos denominado „coralinas’ ha sido reconocida desde el siglo XIX por la mayoría de los naturalistas, como un ensamble de organismos distintivos por depositar carbonato de calcio en sus paredes celulares. Sin embargo, el calificativo de “coralinas” ha sido aplicado de manera diferencial a grupos de especies en diferentes momentos de la historia taxonómica y nomenclatural. La variación en los criterios de segregación está relacionada tanto con las características usadas para su definición, como con la concepción que se tuvo de estos organismos.

Lamouroux en 1812, (Dixon, 1973), reconoció al grupo Corallineae como un mismo ensamble, incluyendo a organismos fotosintéticos cuya característica propia, era la deposición de cristales de carbonato de calcio en sus paredes celulares. Este criterio permitió que se encontraran en un solo grupo tanto las algas coralinas (*s.str*) como especies algales de los géneros *Hildenbrandia*, *Peyssonelia* y *Galaxaura* pertenecientes a otros órdenes de las rodofitas; así como especies calcificadas de Sifonales, Chlorophyta.

Simultáneamente, se discutía si eran organismos intermedios entre minerales y vegetales por su naturaleza calcárea y fotosintética; o si su naturaleza biológica era exclusivamente de tipo vegetal o animal dada su morfología, estructura y forma de vida. Aquellos organismos que presentaban talos diferenciados en frondas con articulaciones (porciones calcificadas separadas por segmentos de tejido no calcificado) eran agrupados con animales sésiles de cuerpos flexibles como los hidroides y briozoarios, mientras las formas no flexibles y sin articulación eran distinguidas como corales de acuerdo con Lineo, por lo que durante algún tiempo fueron consideradas como organismos intermedios entre plantas y animales: zoofitas. (Gabrielson y Garbary, 1987 en Cole y Sheat, 1990).

Finalmente, se formó un solo grupo con aquellas coralinas que presentaban frondas flexibles y aquellas de talos no flexibles y de crecimiento costroso, aceptando también la idea de su naturaleza más vegetal que animal (Schweigger, 1819; Gray 1821; Philipi 1837 en Cole y Sheat, 1990).

Fueron Decaisne (1842) y Chauvin (1842) quienes agruparon a las dos formas de crecimiento en la *familia Corallinaceae*, originalmente establecida por Lamouroux (1812) como Corallineae. La segregación de las coralinas del resto de organismos calcificados estuvo en función de las estructuras reproductivas

que Decaisne consideraba de fundamental importancia para hacer una mejor segregación.

1.2. El ensamble de Rhodophyta y la segregación de las coralinas en el orden Cryptonemiales.

Aun cuando las algas rojas (Rhodophyta) han cambiado su clasificación, la clase Florideophyceae sigue vigente (Saunders y Hommersand, 2004). Inicialmente, en la clasificación de Bold y Wynne (1985) y van den Hoek (1995), la segregación de los órdenes al interior Florideophyceae se basó en los detalles morfo-anatómicos del sistema reproductivo femenino.

El ciclo de vida de la clase Florideophyceae es una alternancia de generaciones trimórfica y difásica, óogama, esto es: una fase sexual haploide: el gametofitode vida libre (masculino y femenino); una fase sexual diploide que se desarrolla directamente en el talo femenino: el carposporofito, y una fase diploide de vida libre portando meiosporangios: el tetrasporofito.

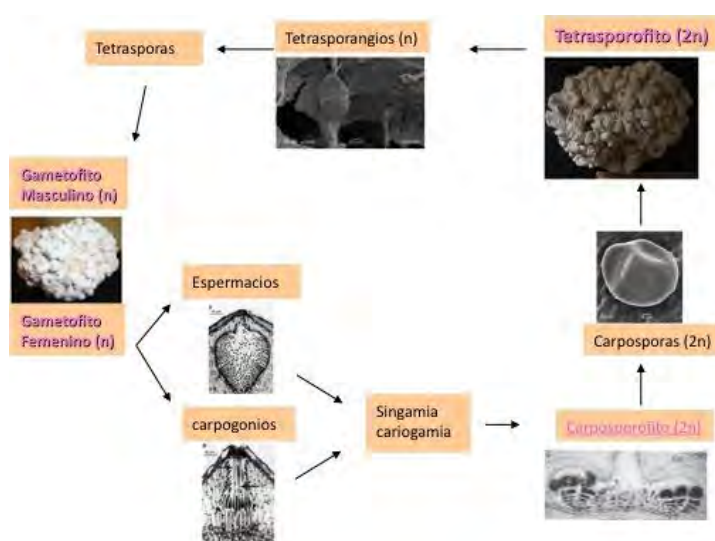


Fig. I.2.1. Ciclo de vida característico de las coralinas.

En los taxones de Florideophyceae primitivas el carpogonio fertilizado da lugar directamente a una estructura denominada gonimoblasto (2n). En los grupos mas avanzados, el carpogonio fertilizado produce filamentos conectores o células conectoras o se fusiona directamente con una o más células auxiliares, por lo que la formación del gonimoblasto es mediada por una o más células auxiliares. Las células auxiliares desempeñan un papel morfogénico en la formación del gonimoblasto, mientras que todas las células o estructuras especializadas están solo relacionadas con la nutrición (Hommersand y Fredericq, 1990). De acuerdo con estos autores, las células auxiliares tienen dos funciones para servir de apoyo al cigoto: a) como sitios para la introducción de factores morfogénicos que funcionan como disparadores en la formación del gonimoblasto, y b) como una barrera que opera a un segundo nivel que impide otras fertilizaciones mientras permite que los procesos continúen. A partir de la variación de estos caracteres postfertilización, se hizo una distinción entre las especies que desarrollan el gonimoblasto desde filamentos conectores y aquellas donde el núcleo diploide migra a una célula auxiliar antes de que las células iniciales del gonimoblasto se dividan. Estas variables entre otras, dieron lugar a que Schmitz (1892) propusiera cuatro órdenes:

Nemaliales, Gigartinales, Rhodymeniales y Cryptonemiales, que fueron reconocidos bajo los siguientes criterios:

1. Gonimoblasto con desarrollo directo del cigoto (ausencia de células auxiliares): Nemaliales.
2. Filamentos carpogoniales y células auxiliares usualmente pareadas para formar procarpos, raramente inmersas en el talo. El cigoto conectado con la célula auxiliar por medio de un filamento ooblasto usualmente corto. Gonimoblasto desarrollándose hacia el interior: Gigartinales.
3. Filamentos carpogoniales y células madres de las células auxiliares pareadas para formar un procarpo; el cigoto conectándose a una célula auxiliar por medio de un corto ooblasto, gonimoblasto desarrollándose hacia el exterior: Rhodymeniales.
4. Filamentos carpogoniales y células auxiliares inmersas en el talo (no dando lugar a un procarpo), el cigoto desarrollándose a través del talo, más o menos largo, frecuentemente ramificado, filamentos ooblastos fusionándose con las células auxiliares, gonimoblasto desarrollándose hacia el interior o hacia el exterior: Cryptonemiales (Dixon, 1973). En esta clasificación Schmitz (1892) colocó como pertenecientes al grupo de las Cryptonemiales a las Corallinaceae (carentes de procarpo *s. str.*).

La mayor o menor complejidad del sistema sexual postfertilización de las Florideophyceae, obedece al incremento en complejidad del talo vegetativo, fundamentalmente filamentoso y, las consecuentes modificaciones del aparato reproductivo que hacen más eficiente el proceso de nutrición del carposporofito. Cada estado de desarrollo del carposporofito es precedido por la transformación de células gametofíticas en tejido rico en proteínas; o por la formación de nuevo tejido gametofítico secundario que frecuentemente se caracteriza por contener núcleos modificados que elevan su contenido proteico. De esta forma el tejido nutricional está diferenciado en dos categorías: aquel que es funcional en un solo momento del desarrollo y aquel que persiste activo a lo largo de varios estados de desarrollo del carposporofito (el cual se ha denominado centro procesador de nutrientes). El tejido transformado puede estar constituido por ramas carpogoniales, ramas de células auxiliares; filamentos nemateciales; células vegetativas uninucleadas modificadas; grupos de filamentos estériles; células vegetativas multinucleadas especiales y fusiones celulares o placentas. El estudio de las modificaciones y grado de complejidad del tejido nutricio dio lugar a la segregación de 13 órdenes. Para 1985 aun es reconocido el orden Cryptonemiales por Bold y Wynne (Woelkerling, 1990). Sin embargo, para Silva y Johansen (1986), en las algas coralinas se reconocen filamentos carpogoniales incluidos en soros o en conceptáculos; los cuales parecen tener función similar al cistocarpo de las otras algas rojas del ensamble de las Florideophyceae; con la corteza¹ externa sirviendo de compartimiento fotosintético y la fusión celular actuando como un centro procesador de nutrientes (Hommersand y Fredericq 1990).

¹ En adelante se denominará corteza a la región más externa del talo tanto de individuos postrados como erectos, no haciendo referencia a alguna diferenciación anatómica.

Posterior a la fertilización, el núcleo del cigoto, o sus derivados son transportados hacia la célula de soporte del filamento fertilizado por una conexión directa o indirecta. Se piensa que el núcleo diploide se mueve a través de un canal por una fusión parcial del carpogonio, la célula hipógina y la célula de soporte. Aparentemente existe una célula de fusión pobremente definida en cada conceptáculo carpogonial, discontinua e irregular en forma, o muy pequeña en algunos géneros, y parece estar completamente ausente en otros (Melobesioideae) (Johansen 1981; Silva y Johansen, 1986). En taxones integrantes de las Corallinoideae, Amphiroideae, Mastophoroideae y Lithophylloideae se observa una sola fusión celular coherente que cubre casi completamente toda el área fértil del conceptáculo. Usualmente solo las células de soporte participan en la formación de la fusión celular. Los filamentos del gonimoblasto crecen hacia fuera del margen o de la superficie baja, justo detrás del margen y en la superficie superior de la fusión celular. Usualmente el gonimoblasto no se fusiona con otras células pero se ha observado que en algunos géneros se establecen conexiones abiertas con células de soporte periféricas como células auxiliares nutritivas, homólogas a aquellas células de soporte que reciben al núcleo diploide del carpogonio, pero difieren de éstas principalmente en el tiempo de su participación.

Las variaciones estructurales, de forma y función de la anatomía de las coralinas, llevan a Pueschel y Cole (1982), de forma implícita, a segregarse a la familia Corallinaceae del orden Cryptonemiales, y proponer elevarla a nivel de orden. Pero es hasta 1986, cuando Silva y Johansen formalizan el establecimiento del orden Corallinales considerando tanto la información postfertilización antes descrita, así como las diferencias anatómico estructural, morfológico vegetativas y reproductivas tetrasporangiales.

1.3. La taxonomía del orden Corallinales

La taxonomía moderna al interior del orden inicia con los trabajos de revisión de las características de la biología de las especies y la variación morfológica de sus poblaciones bajo diferentes condiciones ambientales. El esquema taxonómico de Woelkerling (1988) fue modificado por Verheij (1993), quien erige a la Familia Sporolithaceae. Más tarde Harvey y Woelkerling (1995), erigen a la subfamilia Austrolithoideae que incluyen los géneros nuevos *Austrolithon* y *Heydrichia*. Todos ellos bajo una perspectiva de formación de grupos en función de su parecido global.

Recientemente se han abordado las relaciones evolutivas del orden usando como fuente de información las secuencias moleculares de la subunidad corta del gen ARNr 18s de diferentes especies. A partir de las inferencias filogenéticas se ha dado lugar a un nuevo sistema taxonómico del orden bajo la perspectiva filogenética y ya no fenética (Bailey y Chapman, 1998; Bailey, 1999; Bailey *et al.* 2004; Harvey *et al.* 2002, Harvey *et al.* 2003). Sin embargo, la morfología por sí misma no ha sido evaluada a la luz de metodología cladística, independientemente de los datos moleculares. Es por eso que esta tesis se plantea los siguientes objetivos.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Hacer una reevaluación de las propuestas taxonómicas del Orden Corallinales (Rhodophyta) a través del análisis cladístico de datos morfológicos principalmente, comparándolos y analizándolos conjuntamente con información molecular para esbozar una hipótesis sobre la filogenia del grupo y plantear una propuesta taxonómica acorde.

Objetivos particulares

Contribuir al conocimiento del proceso de biomineralización usando como modelo algunas especies de coralinas (Corallinales) con distribución en México.

Describir la morfología fina de especies con distribución en las costas de México

Identificar caracteres o combinaciones de caracteres morfológicos que muestren las relaciones filogenéticas de los grupos que integran al orden Corallinales.

Realizar análisis combinados de datos para proponer una hipótesis de filogenia al interior del grupo y plantear un esquema taxonómico congruente.

III. METODOLOGÍA

Los resultados se presentan en forma de artículos independientes por lo que la metodología para cada uno se describe en los diferentes apartados de la sección de resultados.

Análisis biomineral

Apartado IV.1. El procesamiento de muestras y las técnicas de microscopía usadas se describen en la sección de metodología correspondiente en ese apartado.

Análisis de la morfología fina en corallinas geniculadas

Apartado IV.2. El procesamiento de muestras y las técnicas de microscopía usadas se describen en la sección de metodología correspondiente en ese apartado.

Características Morfológicas de las corallinas

Apartado IV.3. La búsqueda de información, la selección de los caracteres y su descripción se describen en esta sección.

Relaciones Filogenéticas del Orden Corallinales a partir de datos morfológicos

Apartado IV.4. La elección de los caracteres morfológicos, datos moleculares, y procedimientos cladísticos son descritos en este apartado.

IV. RESULTADOS

IV.1 Caracterización del biomineral CaCO_3 en algas rojas coralinas (Corallinales) de las Costas del Pacífico de México.

RESUMEN.

Se realizó una caracterización del contenido biomolecular así como de la estructura cristalina del biomineral en especies de algas coralinas de las costas del Pacífico mexicano mediante difracción de rayos X en polvos, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de túnel y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. El análisis de rayos X mostró dos fases minerales principales, calcita y aragonita, muy similares en sus parámetros estructurales a sus contrapartes minerales inorgánicas pero con modificaciones en la estructura molecular. Las formas y tamaños de los cristales, vistos mediante microscopía electrónica de túnel, son típicamente en placas y agujas de diferentes tamaños, entre 20 y 100 nm. Se llegó a la conclusión preliminar de que la calcita-aragonita tiene un muy bajo contenido de materia orgánica ocluida dentro de los cristales y que las moléculas orgánicas más probables son los hidratos de carbono; no se detectaron bandas de enlace peptídico, lo que sugiere que las proteínas no están relacionadas con la síntesis mineral o con su estabilización.

Palabras clave: Algas, Corallinales, biomineral, calcificación, calcita, aragonita

INTRODUCCIÓN

La calcificación de las paredes celulares de las algas coralinas (Corallinales, Rhodophyta) es el carácter distintivo del grupo, siendo una de las características de unidad que favoreció la erección del orden (Silva y Johansen, 1986).

La forma más estable de depositación del carbonato de calcio es la calcita birrefringente, isomorfa y romboédrica; sin embargo, la aragonita, de forma ortorrómbica es estable a temperatura y presión fisiológica, por lo que sería común la observación de ambos tipos de cristales en las paredes celulares de las coralinas. Estas dos formas de carbonato de calcio difieren marcadamente en su gravedad específica, dureza y solubilidad. El proceso de depositación de cristales de carbonato de calcio está determinado por varios factores tanto bióticos como abióticos. Entre los primeros podemos considerar que existen tres tipos: la depositación extracelular la intercelular y la intracelular. En las coralinas el proceso dominante (documentado) hasta ahora es el intercelular (Borowitzka, 1982). Entre los segundos están la luz, temperatura, tasa fotosintética, concentración de diferentes tipos de iones en el medio marino y el pH.

Por otra parte, las propiedades físicas y químicas de los dos tipos isomorfos de CaCO_3 difieren lo suficiente como para que sus cationes asociados sean diferentes. El alto contenido de MgCO_3 en algas coralinas puede explicarse por el hecho de que el Ca^{2+} de la calcita pueda ser reemplazado por cationes de radios pequeños tales como el Fe, Mg, Zn y Cd (Siegel y Siegel, 1973). La aragonita por otra parte, acepta cationes de radios más grandes que el Ca^{2+} (como Sr, Pb y Ba) pudiendo reemplazarse por SrCO_3 (Craigie, en Cole y Sheat, 1990). Todas las paredes celulares calcificadas también contienen pequeñas cantidades de materia orgánica que constituyen menos del 0,35% (w / w) y la cantidad de CaCO_3 , varía en la pared celular según la especie, tipo de célula, y la edad del alga. (Bignot, 1978).

Aunado a lo anterior, la formación de cristal requiere básicamente dos pasos: nucleación del cristal y crecimiento del cristal (cristalización).

La presencia de una matriz orgánica o sitio de nucleación sirven para acelerar la nucleación de cristales de CaCO_3 . En las paredes celulares de las coralinas donde los cristales de calcita son depositados se encuentran varias moléculas orgánicas, entre las que se supone que los materiales que funcionan como elementos de nucleación son un tipo de polisacáridos (Borowitzka, 1982). Una vez que el núcleo de cristal es suministrado continúa su crecimiento y éste puede proceder sin un mediador orgánico.

Estos antecedentes nos llevan a pensar que pudiera existir una variación en cuanto a la forma, talla y dimensiones de los cristales de carbonato de calcio depositados en las diferentes especies de coralinas así como en la composición de sus cationes asociados, dada su distribución geográfica como por su distribución en gradiente de profundidad. Por otra parte, también fue el interés de este análisis conocer el material que funciona como núcleo para el inicio del crecimiento de los cristales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron aleatoriamente especímenes de diferentes especies de algas rojas coralinas, todos ellos recolectados de la zona intermareal, en la costa del Pacífico de Baja California y del Pacífico tropical mexicano (Fig. IV.1.1), tomando en cuenta su abundancia y distribución (tabla IV.1.1).

Existen dos grupos de especies según las condiciones naturales. En la costa noroeste de México existen especies de agua fría como *Bossiella orbigniana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*, *Halitilon gracile* y *Lithothrix aspergillum*, cuya distribución está restringida principalmente a lo largo de la costa noroccidental de la Península de Baja California influenciada por la Corriente de California (Hubbs y Roden 1964, Wyrki 1965) y acarrea agua de bajas temperaturas, baja salinidad y alto contenido de oxígeno.

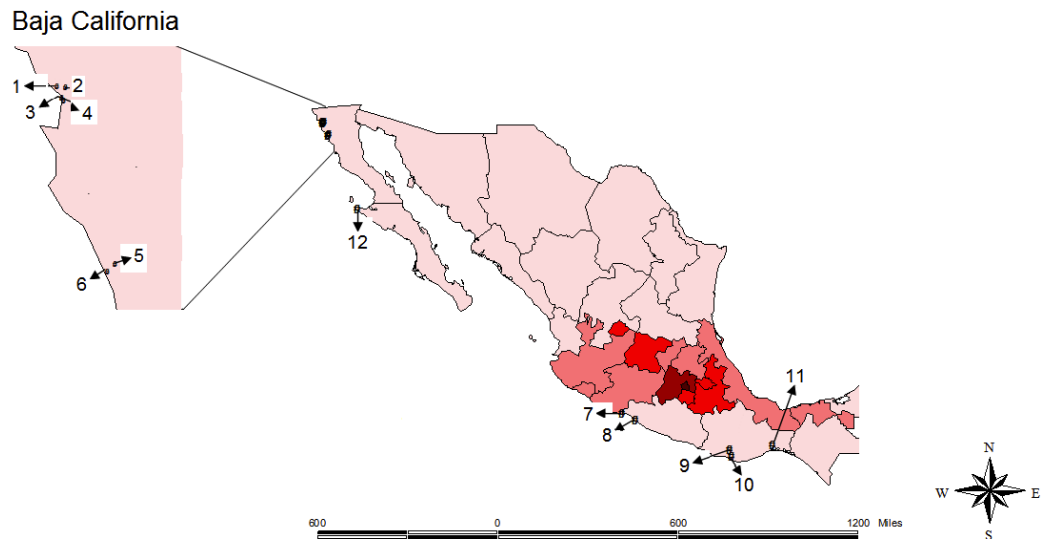


Figura IV.1.1. Sitios de colecta de coralinas: (1) Ensenada, Baja California (BC); (2) Punta Banda, BC; (3) Punta San Isidro, BC; (4) Eréndira, BC; (5) Punta Eugenia, Baja California Sur (BCS); (6) Bahía Tortugas, BCS; (7) Bahía Magdalena, BCS; (8) Caleta de Campo, Michoacán; (9) Zihuatanejo, Guerrero; (10) San Agustín, Oaxaca (Oax.); (11) Cacaluta, Oax.; y (12) La Ventosa, Oax.

Tabla IV.1.1. Especies de coralinas analizadas por diferentes métodos de microscopía.

Species	Herbarium reference
<i>Amphiroa mexicana</i> Taylor	PTM 6160
<i>Bosiella orbigniana</i> (Dec.) Silva ssp. <i>dichotoma</i> (Manza) Johansen	IPN 11938
<i>Calliarthron cheilosporoides</i> Manza	IPN 1235
<i>Corallina vancouveriensis</i> Yendo	IPN 12273
<i>Haliptilon gracile</i> (Lamour.) Johansen (Lam.) Garbary and HW Johansen	IPN 12266
<i>Jania tenella</i> (Kützing) Grunow	PTM 820, PTM 1384, PTM 1950, PTM 1703
<i>Neogoniolithon trichotomum</i> (Heydrich) Setchell and Mason	Neo01
<i>Pneophyllum</i> aff. <i>fragile</i> Kützing	Pne01
<i>Lithophyllum</i> aff. <i>frondosum</i> (Dufour) Furnari, Cornaci and Alongi	Lit01
<i>Lithothrix aspergillum</i> JE Gray	IPN 13029

El segundo grupo coralinas consiste de especies típicas de aguas tropicales como *Amphiroa mexicana*, *Jania tenella*, *Pneophyllum* aff. *fragile*, *Neogoniolithon trichotomum* y *Lithophyllum* aff. *frondosum*. Estas especies se distribuyen desde la zona intermareal y se han registrado en mayor abundancia particularmente en las costas de Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Toda esta región es influenciada por la Corriente Costera de Costa Rica, la cual deriva de la Contracorriente Ecuatorial y acarrea agua de origen tropical (Hubbs y Roden 1964, Wyrki 1965) caracterizada por altas temperaturas superficiales, alta salinidad y baja concentración de oxígeno. (de la Lanza 1991).

Procesamiento de muestras

Se lavaron las muestras de diferentes especies con agua de la llave durante 24 h. Sus superficies fueron cuidadosamente observadas bajo un estereomicroscopio, eliminando epifitos con un cepillo; luego se procesaron mediante diferentes análisis microscópicos. En general se usaron fragmentos pequeños de cada planta de cada especie. Las muestras consistieron de fragmentos del eje principal o de las ramas laterales asociadas (0.5–1 cm). Los especímenes de algas coralinas incrustantes se fracturaron y se analizaron piezas pequeñas (0.5–1 cm) de diferentes partes del talo. Las estructuras biominerales completas fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada y secadas al aire. Los especímenes se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido de bajo vacío LVSEM con espectroscopía de dispersión de energía (EDS), microscopía electrónica de túnel (STM), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos X en polvos (XRD). Se seleccionaron dos muestras con más de una fase cristalina para realizar XRD de alta resolución y determinar su contenido de material fino mediante refinamientos Rietveld.

LVSEM-EDS

En el análisis de LVSEM, se fijaron todas las muestras en un portamuestras usando sólo cinta de carbón, sin ninguna preparación adicional. Para este análisis se utilizó un instrumento JSM-5900LV. Las mediciones se realizaron a un bajo vacío de 1–250 Pa (0.01–2.5 Torr), con un voltaje de aceleración de 5–20 kV. Se llevaron a cabo análisis químicos adicionales midiendo espectros de EDS por análisis cuantitativo ZAF.

STM

Las muestras fueron pulverizadas y depositadas sobre superficies de grafito pirolítico de alto ordenamiento (soportes HOPG de ca 5 × 5 mm proporcionados con el instrumento). La STM (Binning *et al.* 1982) se trabajó en modo de corriente constante a temperatura ambiente. Se usaron las condiciones de túnel para optimizar las imágenes (voltaje de sesgo de 1.01–1.52 V y corriente túnel de 0.050–0.4 nA). Las imágenes de STM se obtuvieron al aire libre usando el sistema Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1 con un intervalo de barrido de 624 × 624 nm. Para el barrido se utilizaron sondas metálicas de Pt/Ir recién cortadas de 0.25 mm de diámetro. El depósito de las muestras sobre superficies de HPOG recientemente preparadas se realizó como sigue: el material algal fue lavado con agua destilada y secado; se trituraron porciones en un mortero de vidrio y el polvo se depositó sobre los sustratos de HOPG preparados para el análisis.

FTIR

Para obtener información sobre el tipo de biopolímero y la naturaleza química del biomineral, se realizaron mediciones de FTIR. Las muestras se trituraron y se mezclaron con polvo KBr (razón de 100:1), y posteriormente se comprimieron en píldoras. Se empleó un espectrómetro Nicolet 680 FT-IR con

una resolución de 4 cm⁻¹ y cada muestra se barrió 64 veces. Para determinar el número exacto de ondas de los diferentes grupos químicos producidos en los barridos, éstos se compararon con números de ondas de grupos específicos previamente publicados. En el caso de la FTIR de *Calliarthron* sp., se aplicó suavizado.

XRD

Para el análisis de XRD se estudiaron las muestras pulverizadas usando un difractómetro Bruker D8 Advance (a temperatura ambiente) con radiación de Cu K α una configuración θ - θ y un monocromador secundario de grafito. Se hicieron análisis cortos de XRD para examinar el contenido mineralógico de las estructuras enteras. El barrido se realizó entre 3° y 80°, con un paso de 2q° de 0.05 y 0.5 s por punto. Para los patrones de XRD adecuados para el refinamiento Rietveld se midieron las intensidades de difracción entre 20° y 80°, con un paso de 2q° de 0.02 y un tiempo de conteo de 8 s por punto.

Método de Rietveld para XRD en polvos

Implementado en el programa FULLPROF (Rodríguez-Carvajal 1981, Thompson *et al.* 1987, Young 1993), el método de Rietveld es utilizado para refinar estructuras de cristales con parámetros iniciales a partir de datos publicados para una estructura de tipo mineral, en este caso la calcita ($a = 4.9896 \text{ \AA}$, $c = 17.0610 \text{ \AA}$, y $a_1 = 90.0^\circ$, $b_1 = 90.0^\circ$, $g = 120^\circ$), la dolomita ($a = 4.812 \text{ \AA}$, $c = 16.020 \text{ \AA}$, y $a_1 = 90.0^\circ$, $b_1 = 90.0^\circ$, $g = 120^\circ$) (Effenberger *et al.* 1981), y la aragonita ($a = 4.9611 \text{ \AA}$, $b = 7.9672 \text{ \AA}$, $c = 5.7407 \text{ \AA}$, y $a_1 = 90^\circ$, $b_1 = 90^\circ$, $g = 90^\circ$) (Villiers 1971). El método de Rietveld se usa para varias cosas como estudiar el cambio en la anisotropía de las tensiones entre los átomos cuando éstos interactúan con moléculas orgánicas como en las conchas de moluscos (Pokroy *et al.* 2006) y corales (Przenioslo *et al.* 2008).

En el presente trabajo se modificaron los parámetros de Rietveld ya que los difractogramas mostraron cambios en los parámetros de la celda unitaria, los tamaños de los cristales y la forma de los picos, con colas del lado derecho; además se incluyeron átomos de Mg²⁺ en el modelo de la estructura de la calcita (Heredia *et al.* 2005). Se escogió una función pseudo-Voigt modificada por Thompson *et al.* (1987) para generar la forma de los picos de difracción.

Así también, se reporta el refinamiento de 19 parámetros independientes para los grupos espaciales R_c (calcita No. 167) y P_{mcn} (aragonita No. 62): punto cero, factor de escala, tres coeficientes polinomiales de fondo, dimensiones de la celda unitaria, ancho medio, pseudo-Voigt, parámetros de asimetría para la forma de los picos y factores isotrópicos posicionales y térmicos según las funciones normalmente empleadas en el refinamiento Rietveld, para las muestras trituradas. Se utilizó una región excluida (28.0–28.5 2q°).

Para estudiar la microtensión se usó la muestra pulverizada LaB₆ como estándar para corregir el ensanchamiento instrumental de las líneas de difracción. El análisis del tamaño y la microtensión en este estudio se realizó empleando el análisis del patrón completo dentro del método de Rietveld. Para

el análisis del tamaño y la microtensión dentro de este método se escogió la función del perfil de difracción pseudo-Voigt modificada por Thompson *et al.* (1987), con una función lorentziana para el tamaño y una gaussiana para la microtensión.

RESULTADOS

Estructura coralina y análisis elemental

La microestructura de los biominerales presenta dos principales tipos de formas cristalinas: en forma de agujas (*Neogoniolithon trichotomum*, *Jania tenella*, *Amphiroa mexicana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*) y en forma de placas (*Halitilon gracile*, *Bossiella orbigniana*, *Lithothrix aspergillum*). Las estructuras complejas (Fig. IV.1.2a,e) presentan cristales texturizados que pueden observarse en imágenes de LVSEM (Fig. IV.2b, c, d, f, g, h).

Las microesferas (Fig. IV.1.2b–c), interpretadas como gránulos de almidón por Woelkerling (1988), mostraron un contenido alto de Ca^{2+} según el análisis de EDS (ampliación en Fig. IV.1.2b; tablas IV.1.2; IV.1.3, columnas encabezadas “sphere”).

Además, las muestras con protrusiones cristalinas muestran una textura muy definida (Fig. IV.1.2a), que puede originarse de una capa central (flechas negras en Fig. IV.2c). El contenido de Mg (resultados de EDS, tabla IV.1.2) en algunas muestras puede ser un factor que reduzca la celda unitaria cristalina (Meldrum y Hyde 2001, Cusack *et al.* 2003) para incrementar la estabilidad (Antao *et al.* 2004). En este caso, en vista del bajo contenido de Mg^{2+} en la estructura coralina (~1%) el biomineral no puede considerarse CaCO_3 magnésico (Tucker y Wright 1991).

El análisis elemental por EDS de los cristales (ampliación en Fig. IV.1.2b) muestra una notable diferencia en la estequiometría del contenido de Ca en comparación con la calcita o la aragonita puras (tablas IV.1.2; IV.1.3). En este caso, el contenido de Ca es mucho mayor que en la estequiometría de las muestras biominerales, lo que podría estar relacionado con la presencia de otro sólido no identificado con cantidades mayores de Ca (posiblemente el responsable de los picos alrededor de 18.45, 21 y 23.9 en $2\theta^\circ$ del análisis de rayos X).

STM

Las imágenes de STM también muestran dos principales morfologías cristalinas: en forma de agujas y de placas. El bajo contenido de materia orgánica en el biomineral de las algas es favorable para la obtención de imágenes por STM ya que el rayo electrónico de túnel puede fácilmente rebasar el grosor del material carbónico (Fig. IV.1.3). En comparación, se observa grafito pirolítico en la superficie del lado izquierdo de *Neogoniolithon trichotomum* (flechas negras en Fig. IV.1.3a). En la tabla IV.1.2 se presentan las formas cristalinas correspondientes y sus tamaños, y en la Figura IV.1.3 se muestran ejemplos de muestras de biomineral de cuatro diferentes especies de algas.

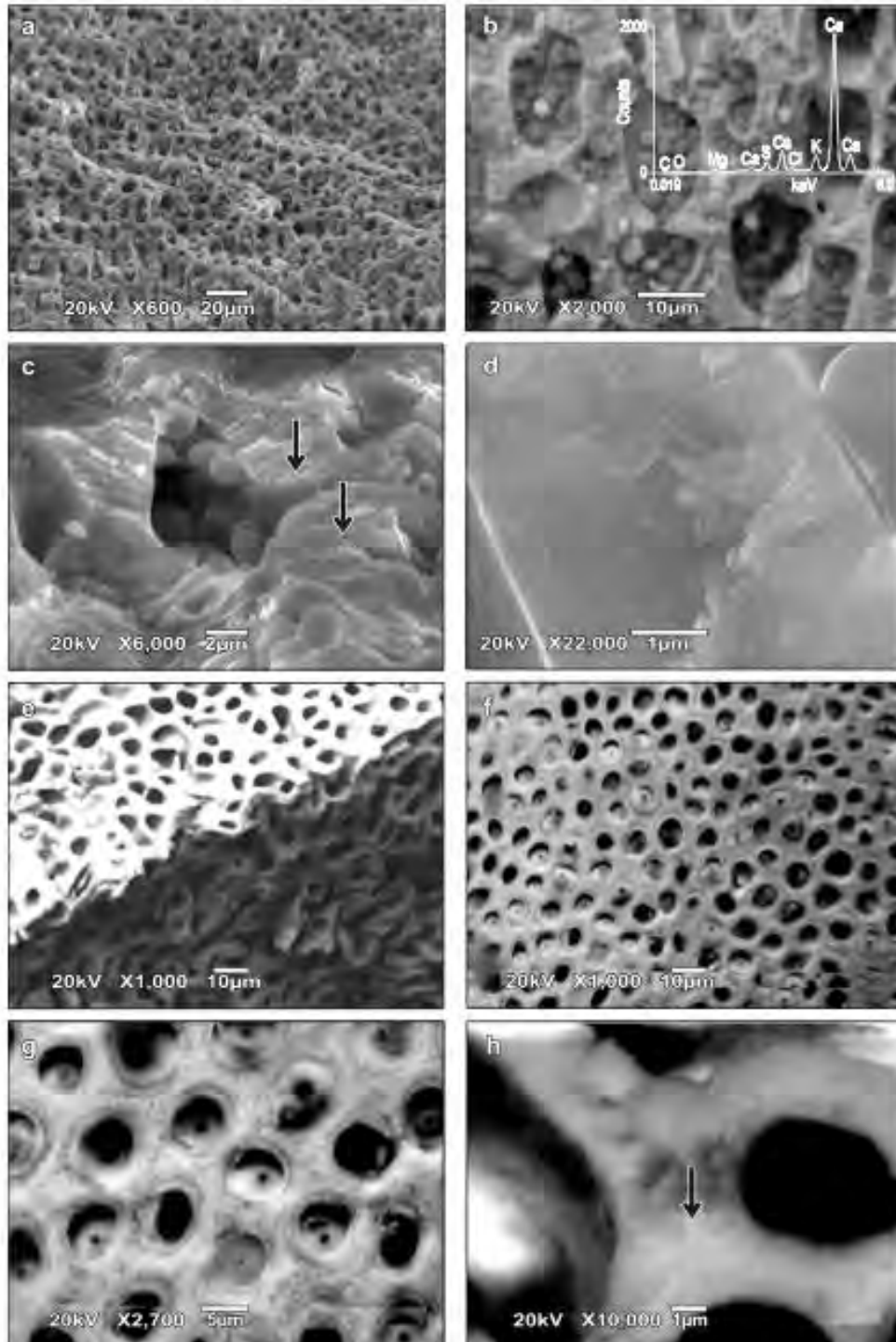


Figura IV.1.2. Imágenes de la microscopía electrónica de barrido de bajo vacío mostrando la morfología de *Lithophyllum* aff. *frondosum* (a–d) y *Calliarthron cheilosporoides* (e–h). En las imágenes de *L. aff. frondosum* es posible observar las esferas y las estructuras complejas y, en mayor detalle, los cristales texturizados uniéndose en una capa (flechas negras en c). Las imágenes de *C. cheilosporoides* muestran una estructura con textura cristalina similar a la de *L. aff. frondosum* (flecha negra en h, capa donde aparentemente se unen los cristales texturizados). El análisis con espectroscopía de dispersión de energía mostró cantidades altas de calcio (ampliación en b).

Las escalas de altura indican que la superficie de los cristales es muy homogénea; esto es, en casi ninguno de los casos se observan grandes contrastes de color (Fig. IV.1.3).

En la imagen de *N. trichotomum* (Fig. IV.1.3a) la forma de los cristales no parece ser estructuralmente homogénea aunque éstos presentan estructuras claramente definidas. En todos los casos el bajo contenido orgánico favoreció la toma de imágenes por STM. La mayor brillantez en comparación con las otras imágenes puede deberse a la presencia de materia orgánica no conductiva. La imagen de *Lithophyllum* aff. *frondosum* (Fig. IV.1.3b) muestra cristales en forma de placas (indicados con corchetes) con una superficie muy lisa, y relativamente homogéneos en tamaño y forma. En otras muestras (*Calliarthron cheilosporoides*, Fig. IV.1.3c) los cristales son menos simétricos pero es posible observar capas que probablemente constituyen planos cristalinos. En *Jania tenella* (Fig. IV.1.3d) los cristales son más grandes que los de otras muestras (ver tabla IV.1.2).

Tabla IV.1.2. Análisis elemental (%) mediante espectroscopía de dispersión de energía de especies de coralinas geniculadas.

Element wt (%)	<i>Calliarthron</i>	<i>Amphiroa</i>		<i>Bossiella</i>		<i>Jania</i>		<i>Lithothrix</i>		<i>Halipilton</i>
		Inner	Outer	Inner	Outer	Inner	Outer	Inner	Outer	
Ca	70.70	68.80	62.70	14.62	61.90	84.11	78.30	50.50	52.00	85.00
O	29.20	25.20	30.50	24.90	22.76	2.33	15.71	4.20	17.20	13.60
N	—	2.70	2.20	6.44	2.00	10.20	2.31	2.60	2.10	—
Mg	—	1.58	0.90	0.64	0.70	—	0.78	0.17	0.90	—
C	—	0.88	1.00	11.26	1.57	2.56	0.87	1.77	1.64	—
Si	—	0.063	0.13	2.24	0.82	—	0.20	0.07	0.14	—
S	—	0.34	1.00	9.57	1.35	0.11	1.00	0.78	2.00	0.60
CrSS* (nm)	Plate, ~10	Plate, 10–20		Needle, ~100		Needle, ~70		Needle, ~30		Needle ~50

CrSS= Forma y tamaño de los cristales en nm en microscopía de barrido de túnel

Tabla IV.1.3. Análisis elemental (%) mediante espectroscopía de dispersión de energía de 2 especies de coralinas no geniculadas

Element wt (%)	<i>Lithophyllum</i>		<i>Neogoniolithon</i>
	Inner	Sphere	
Ca	63.90	61.79	61.40
O	31.40	17.34	25.15
N	—	—	—
Mg	1.38	0.80	5.80
C	1.00	1.85	7.60
Si	0.11	—	—
S	0.61	1.98	—
Al	0.33	0.17	—
Cl	0.73	10.45	—
K	0.38	5.30	—
CrSS* (nm)	Plate, ~30		Needle, ~30

* CrSS = crystallite shape and size (nm) from scanning tunneling microscopy.

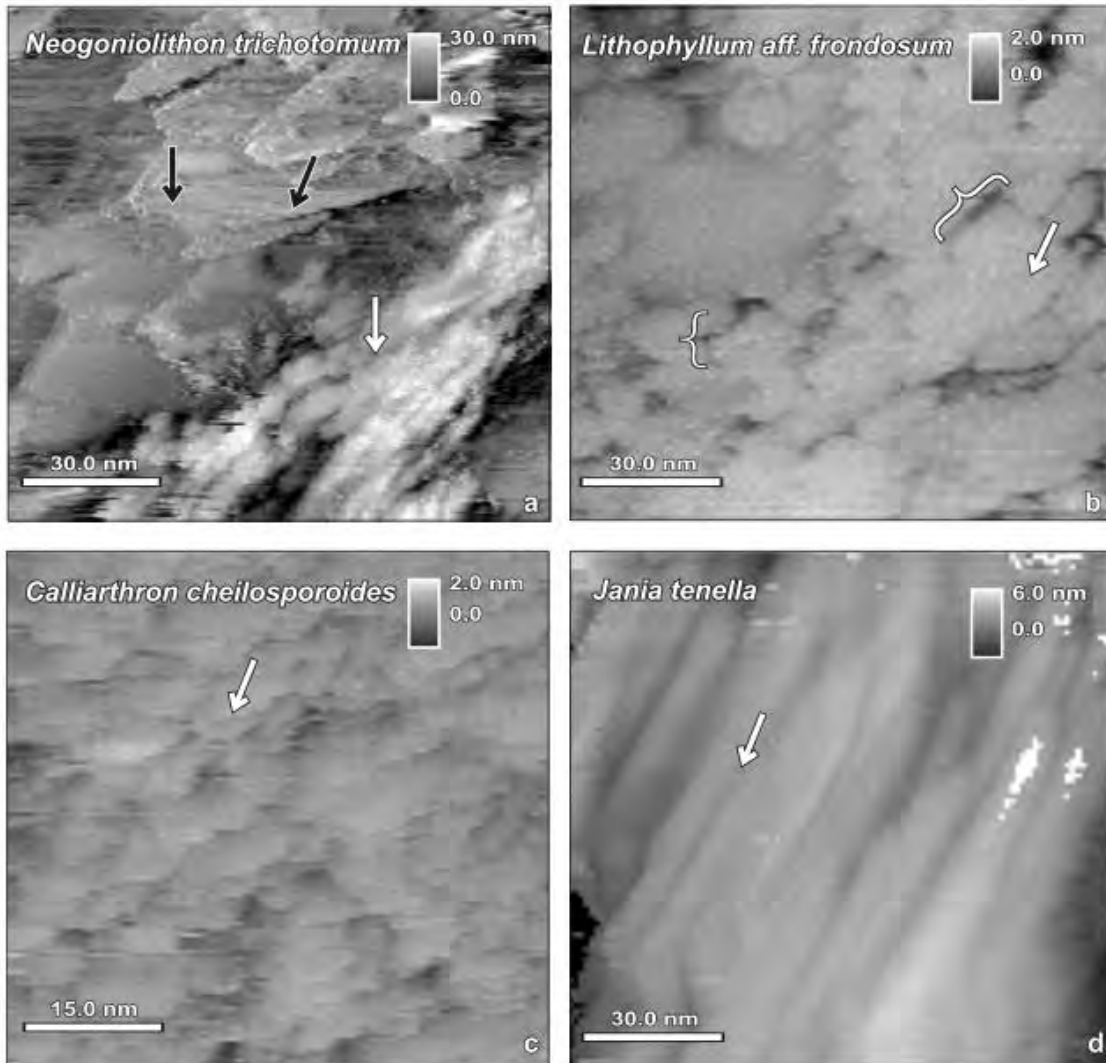


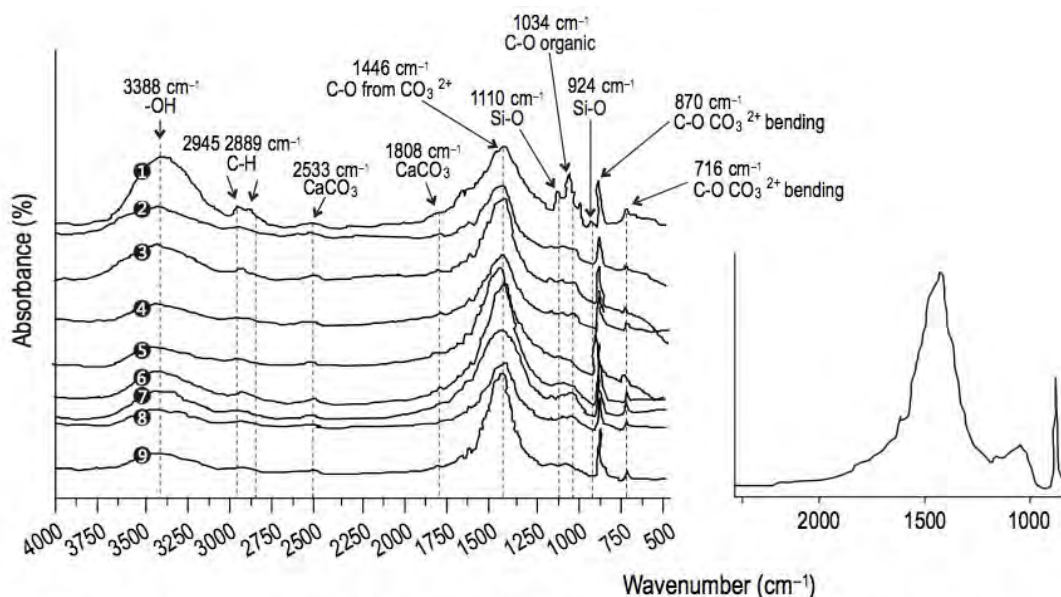
Figura IV.1.3. Microscopía de efecto túnel de muestras pulverizadas de cuatro algas rojas coralinas depositadas en grafito pirolítico. En *Neogoniolithon trichotomum* (a) los cristales no parecen ser estructuralmente homogéneos y no son muy regulares en su forma aunque claramente son estructuras en forma de aguja; la mayor brillantez en comparación con las otras imágenes puede atribuirse a la presencia de material orgánico no conductor. La imagen de *Lithophyllum aff. frondosum* (b) muestra cristales en forma de placa (corchetes) con superficies muy lisas y estructuras relativamente homogéneas. En *Calliarthron cheilosporoides* (c) los cristales presentan menor simetría y es posible observar ranuras que pueden ser planos cristalinos. En *Jania tenella* (d) los cristales son claramente más grandes que los observados en las otras imágenes, y muy homogéneos en superficie y tamaño.

FTIR

La naturaleza química de las algas muestra tres diferentes tipos de enlaces químicos: uno es un mineral carbonatado y los otros probablemente son un sólido de silicato y un biopolímero (Fig. IV.1.4).

De todas las series de bandas de las algas rojas las más notables son las de la calcita (Bottcher *et al.* 1997) a 2533, 1808, 1446, 870 y 716 cm^{-1} , aunque se pueden observar bandas de una molécula orgánica a 2945, 2889 (C-H) y 1034 cm^{-1} (C-O) en *Bossiella orbigniana* y *Calliarthron cheilosporoides*. También es posible observar bandas de un compuesto de silicio no cristalino a 1110 (Si-O)

y 924 cm^{-1} (Si-O) (Lazarev 1972). Las bandas a 2945 y 2889 cm^{-1} son de hidrocarburo (C-H). Todas las bandas atribuibles a los componentes orgánicos se encuentran notablemente disminuidas en comparación con la fase cristalina, lo que está relacionado con la razón de componentes inorgánicos/orgánicos. Esto sugiere que el contenido mineral excepcionalmente excede la cantidad de contenido orgánico (Fig. IV.1.4). Aunque el contenido químico de las muestras parece ser muy homogéneo, los casos de *C. cheilosporoides* y *B. orbigniana*, y en menor medida de *Corallina vancouveriensis*, son ligeramente diferentes debido a la fuerte intensidad de las bandas a 1110 (Si-O) y 1034 cm^{-1} (C-O).



1. *Calliarthron*, 2. *Lithothrix*, 3. *Bossiella*, 4. *Lithophyllum*, 5. *Neogoniolithon*, 6. *Haliptilon*, 7. *Corallina*, 8. *Amphiroa*, 9. *Jania*.

Figura IV.1.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de muestras prístinas de algas coralinas. Se puede observar una serie de bandas relacionadas con la calcita a 2533, 1808, 1446, 870 y 716 cm^{-1} . Las bandas a 2945, 2889 (C-H) y 1034 cm^{-1} (C-O) claramente indican la presencia de moléculas orgánicas, y las bandas a 1110 (Si-O) y 924 cm^{-1} (Si-O) la presencia de un compuesto de silicio. En la ampliación, una observación más precisa de las frecuencias alrededor de las posiciones de amida I y II muestra claramente la ausencia de estas bandas (cerca de las líneas verticales).

Estructura interna del biomineral por XRD en polvo

Las algas coralinas están principalmente compuestas de calcita muy cristalina, aragonita (Fig. IV.1.5) y una tercera fase cristalina no identificada (indicada con flechas en Fig. IV.1.6). En todos los casos la calcita es la fase mineral más representativa como se ha descrito en otros casos también en presencia de aragonita (Medaković *et al.* 1995).

La diferencia principal entre la calcita y la aragonita mineral y el biomineral de las algas coralinas es la posición de los picos, que está directamente relacionada con el contenido de Mg^{2+} y otros iones. Además, el contenido de materia orgánica puede modificar los parámetros cristalinos (tabla IV.1.4) (Medaković *et al.* 1995, Przenioslo *et al.* 2008).

Las algas coralinas presentan picos que cambiaron en sus posiciones cristalográficas hacia ángulos mayores. Esto significa un aumento en el tamaño

de la celda unitaria (Fig. IV.1.2) como el encontrado por otros autores (Medaković *et al.* 1995) en algas rojas.

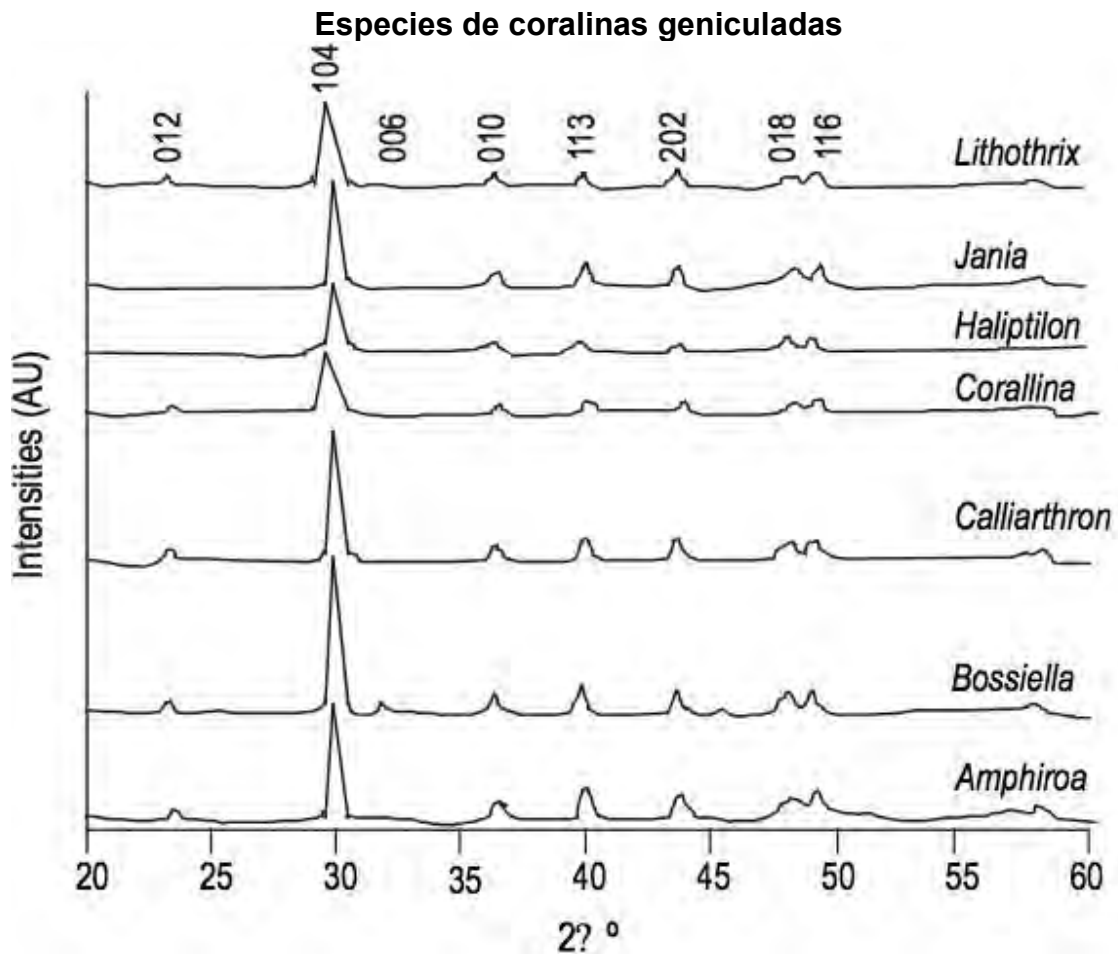


Figura IV.1.5. Difractograma de rayos X de las especies coralinas geniculadas. El pico más intenso corresponde a la reflexión de la calcita (104) y en ningún caso se observa una fase amorfa. La altura del pico refleja un incremento cualitativo en el tamaño de los cristales cuando tienen una forma isotrópica. En tal caso, *B. orbigniana* presentaría uno de los cristales más grandes del grupo.

Tabla IV.1.4. Comparación de las posiciones en las reflexiones de Bragg de la calcita y la aragonita de origen mineral para el refinamiento Rietveld y los picos encontrados en los experimentos de difracción de rayos X de las especies geniculadas y no geniculadas de algas rojas.

Reflections between (2θ°)	Calcite		Aragonite		Geniculate species*		Nongeniculate species*			Unknown	
	Angle (2θ°)	Reflection	Angle (2θ°)	Reflection	Angle (2θ°)	Reflection	d (nm)	Angle (2θ°)	Reflection	d (nm)	Angle (2θ°)
10–18	23.0	012	21.0	110	24.4	012	0.36	20.8a	110	0.43	26.0
	29.4	104	23.4	020	29.8c	104	0.29	23.8c	012	0.37	26.7
	31.5	006	26.24	111	31.73c	006	0.28	27.6c		0.32	28.4
			31.2	002							
	36.0	110	33.17	012	36.36c	010	0.25	33.0a	012	0.27	
			36.24	102				35.7a	010	0.25	
	39.4	113			39.84c	113	0.22	44.1c	010	0.2	
	43.2	202	37.3	031	43.7c	202	0.2	52.9c	113	1.7	
	47.5	018	41.2	211	48.1c	018	0.18	62.5c	202	0.15	
	48.5	116	45.94	221	49.1c	116	0.18				

*See table 1.

Análisis de la red cristalina usando el método de Rietveld para XRD en polvos

Con base en los datos de difracción se realizó un análisis de Rietveld de las muestras biogénicas. Las mediciones de XRD y Rietveld mostraron una estructura cristalina de calcita y aragonita ligeramente modificada y una tercera fase mineral no identificada (flechas en Fig. IV. 1.6). La principal reflexión (104) es de la calcita (Figs. IV.1.5, IV.1.6). En el refinamiento de los datos con mayores intensidades de aragonita no fue posible alcanzar un modelo estructural correcto. La razón puede hallarse en el bajo grado de cristalinidad y la escasa información (conteos) del mineral del grupo aragonita. Un paso adicional incluyendo sólo los datos de la fase de calcita mejoró el análisis (Figs. IV.1.5, IV.1.6).

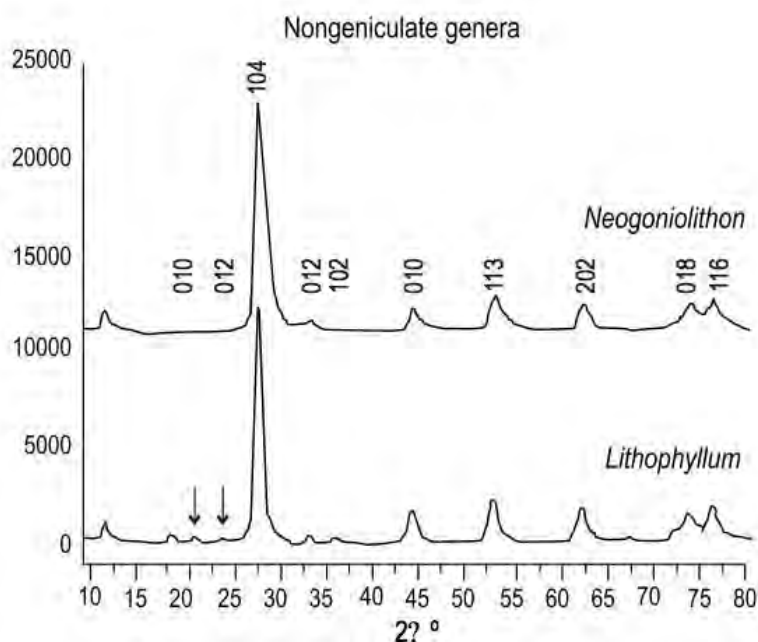


Figura IV.1.6. Difractograma de rayos X de las especies de coralinas geniculadas. A partir del FTIR, como se observa en la Figura IV.1.4, el pico más intenso corresponde a la reflexión de la calcita (104) y en ningún caso se observa una fase amorfa. No se identificó una tercera fase cristalina que corresponda a las posiciones indicadas con flechas. Casi todos los picos de la calcita muestran una alta asimetría con la cola del lado derecho.

En la tabla IV.1.5 se comparan los parámetros de la red de calcita y aragonita resultantes, así como los parámetros de tensión determinados en nuestras muestras con la calcita y aragonita de referencia y otros datos. La reducción en el tamaño de la celda unitaria se debe a Mg²⁺ incorporado en la red, y las tensiones y la anisotropía probablemente se deben a la presencia de estos iones en diferentes partes de la estructura cristalina y a que no están homogéneamente distribuidos en ella. Asimismo, la asimetría de los picos (Figs. IV.1.5, IV.1.6) puede estar relacionada con un cambio en los parámetros estructurales de la calcita (Itaya *et al.* 1997).

El valor de la microtensión (0.4%) probablemente se deba a la baja intensidad de las líneas de difracción en la fase aragonítica en comparación con la calcítica dentro del mismo patrón de XRD, lo cual podría indicar la presencia de impurezas. Además, en algunos casos las intensidades de las líneas de difracción son comparables con el fondo, lo que resulta una dificultad adicional en la determinación del tamaño y la microtensión mediante el método de Rietveld.

Tabla IV.1.5. Parámetros de la red y factores de discrepancia para la fase calcítica de *Lithophyllum* sp. Se observa una reducción clara en el tamaño de la celda unitaria así como en la tensión máxima. El valor de la tensión puede explicarse por la presencia de otros elementos en la celda unitaria y por una posible interacción con grupos orgánicos

Calcite lattice parameters	$a = 4.91807(5)$ $c = 16.72039(3)$
Decrease in size (%) compared with mineral calcite	$a = 1.4$ $c = 2.0$
Average maximum strain and standard deviation (anisotropy)	0.40% (5.4714)
R_{exp} (%)	4.32
R_{Bragg} (%)	3.72

DISCUSIÓN

En este estudio se consideraron especímenes de dos regiones biogeográficas con diferentes patrones de temperatura y salinidad; sin embargo, nuestros resultados no reflejan cambios significativos en los parámetros medidos mediante diferentes técnicas microscópicas. Medaković *et al.* (1995) mencionaron que las tasas de calcificación y la proporción de la calcita magnésica en aguas frías son menores que en aguas tropicales. Esto no resultó evidente en nuestro estudio, posiblemente porque las muestras en general correspondieron a la misma temporada en ambas regiones.

Se observaron dos principales formas cristalinas: cristales en forma de agujas y de placas. El análisis de elementos a veces mostró un contenido variable de éstos (tablas IV.1.2, IV.1.3), con un contenido muy alto de Ca en la estructura pero no necesariamente una cantidad muy alta de Mg (sólo en el caso de *N. trichotomum* el contenido fue de ~5.8%). Se observaron otros elementos como

Ca, O y C en casi todas las muestras aunque no en la misma proporción, pero se encontró un alto porcentaje de estos elementos en el material de CaCO_3 , como lo indican los análisis de FTIR y XRD (Figs. IV.1.4; IV.1.5; IV.1.6).

El mineral carbonatado tiene una textura muy ordenada desde la base donde se unen dos capas de cristales (flechas negras en Fig. IV.1.2). La LVSEM mostró una estructura policristalina muy ordenada (Fig. IV.1.2). El análisis de STM mostró que la topografía es muy homogénea y en algunas muestras el cambio de color (barras de escala) indica un cambio muy pequeño en altura entre los cristales. Esto significa que los nanocristales muy probablemente estén acoplados entre sí en conglomerados (Fig. IV.1.3).

Las características en los difractogramas de rayos X de *Calliarthron cheilosporoides* y *Bossiella orbigniana* son muy similares entre sí pero muy distintas a las de *Lithothrix aspergillum* y *Amphiroa mexicana*. Al menos en este caso estas diferencias concuerdan con las filogenias moleculares, lo que sugiere que el proceso de biomineralización puede ser controlado genéticamente expresando alguna característica filogenética.

CONCLUSIÓN

El análisis de XRD mostró dos fases minerales principales, calcita y aragonita, muy similares en sus parámetros estructurales a sus contrapartes minerales inorgánicas pero con modificaciones en la estructura molecular. Las formas y tamaños de los cristales, vistos mediante STM, son típicamente en placas y agujas de diferentes tamaños, entre 20 y 100 nm.

Por medio de LVSEM y STM se mostró que los cristales de los diferentes géneros estudiados están bien ordenados en dos escalas: (1) en conglomerados de nanocristales y (2) en una estructura como palizada en zonas donde la celda presumiblemente congrega estos cristales. Es posible que la calcita prismática crezca en vasos como racimos y luego se ordene capa por capa a lo largo de la superficie en la capa central o plantilla orgánica que ayuda a orientar y proporciona homogeneidad estructural. Según el análisis de FTIR, el contenido orgánico parece no ser proteico pero sí polisacárido, lo cual concuerda con las conclusiones y observaciones obtenidas por Borowitzka, 1982); aunque en nuestro caso se presenta un muy bajo contenido de materia orgánica ocluida dentro de los cristales. Esto puede ser explicado debido a que en un principio una matriz orgánica o sitio de nucleación sirve para acelerar la formación de los cristales de CaCO_3 , una vez que el núcleo del cristal es suministrado continua su crecimiento y éste puede proceder sin un mediador orgánico.

El análisis elemental mostró una gran diversidad de elementos como Mg^{2+} probablemente incluidos en la red y asociados con la reducción y cambio general en el tamaño de la celda unitaria de la calcita. Por tanto, el cambio en la celda unitaria pareciera ser isotrópico y la asimetría de los picos no tiene una clara interpretación, aunque algunos autores la consideran como cambios en los sólidos mineralógicos por actividad biológica llamados transiciones de fase mineralógica (Itaya *et al.* 1997). Esto se podría explicarse si el biomineral fuera

sintetizado por un proceso extracelular de mineralización controlado biológicamente, lo cual complementa los análisis de Borowitzka (1982) donde se menciona que la depositación es principalmente intercelular.

IV.2. Morfología fina de algunas especies de algas coralinas geniculadas (Rhodophyta) en las costas de México.

RESUMEN

Fue analizada la morfología fina a nivel de microscopía electrónica de barrido de 13 especies de los géneros *Amphiroa*, *Bossiella*, *Calliarthron*, *Corallina*, *Haliptilon* y *Jania*. Se encontró variación tanto en la ornamentación de la superficie del talo, así como en las características asociadas a las estructuras conceptaculares. Se reconocieron dos tipos de estructuras anatómicas comunes a las cámaras conceptaculares, una matriz de sostén de los reproductores, además de una película cerosa a manera de saco que envuelve cada gameto o espora desde las primeras etapas de su desarrollo y que se pierde cuando estos alcanzan su madurez. Para corroborar la existencia de estos caracteres en las especies de coralinas no geniculadas y por tanto, predecir su presencia en todo el orden, se analizaron cuatro especies pertenecientes a los géneros *Hydrolithon*, *Lithophyllum*, *Neogoniolithon* y *Pneophyllum*, en donde también se observaron dichas estructuras.

El análisis de los caracteres descritos para las especies de coralinas revisadas, indicó que pueden ser informativos en las reconstrucciones filogenéticas y por tanto usados en la propuesta de ordenamiento taxonómico del orden. El análisis filogenético de los caracteres generó un árbol parsimonioso de una longitud de 22 pasos, donde *Amphiroa*, *Bossiella* y *Calliarthron* forman grados y son linajes independientes, mientras que *Jania*, *Haliptilon* y *Corallina* forman un grupo monofilético. Los resultados mostraron que los caracteres micromorfológicos son congruentes con la morfología vegetativa y reproductiva de dichos taxones y por lo tanto podrán ser usados en análisis filogenéticos. Que tienen estructura para ser usados en separar taxones a nivel de género y especie. Sin embargo es necesario el análisis de estos caracteres en una muestra más amplia de taxones de diferentes géneros y a nivel poblacional, pues nuestros resultados muestran que las variaciones dadas por las condiciones ambientales, pueden modificar el rango de variación de los patrones encontrados.

INTRODUCCIÓN

La morfología de las especies de algas coralinas (Corallinales, Rhodophyta) ha sido objeto de revisiones exhaustivas durante los últimos 30 años, poniéndose especial énfasis en las coralinas no geniculadas y en particular en la morfología de las estructuras reproductoras (Johansen 1969, 1981; Woelkerling, 1988, 1996). A la fecha, para el reconocimiento y delimitación específica de las coralinas geniculadas, son indispensables el patrón de ramificación y las características de la genícula (Dawson 1953, Johansen 1976; Norris, 1976). Sin embargo, los estudios detallados de la micro-morfología reproductiva y vegetativa de estos taxones han sido escasos. Estudios de este tipo, han descrito para coralinas geniculadas algunas estructuras de la superficie del talo, como las megacélulas y el patrón del arreglo celular superficial (Judson y

Pueschel, 2002; Pueschel *et al.* 2002), sugiriendo que dichas características pueden ser informativas en términos taxonómicos.

Durante una revisión bibliográfica de dichos caracteres se registró que son pocas las especies donde se han llevado a cabo dichos estudios y que su distribución es local. Por lo que este estudio pretende realizar las observaciones que marca la literatura en especies con distribución templada y tropical de las costas de México, además de ampliar la muestra a analizar, para conocer la variación en los patrones descritos y analizar otras especies en donde puedan ser reconocidos dichos patrones o sugerir otros más.

En el proceso de análisis de la morfología fina (usando las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) de las especies de corralinas geniculadas presentes en las costas del Pacífico mexicano, fueron encontradas estructuras no descritas previamente, algunas de las cuales muestran variación entre los taxones y otras parecen ser comunes a todas las especies del orden. En este trabajo se describen, comparan e ilustran dichas características y se discute su valor informativo taxonómico y en las reconstrucciones filogenéticas.

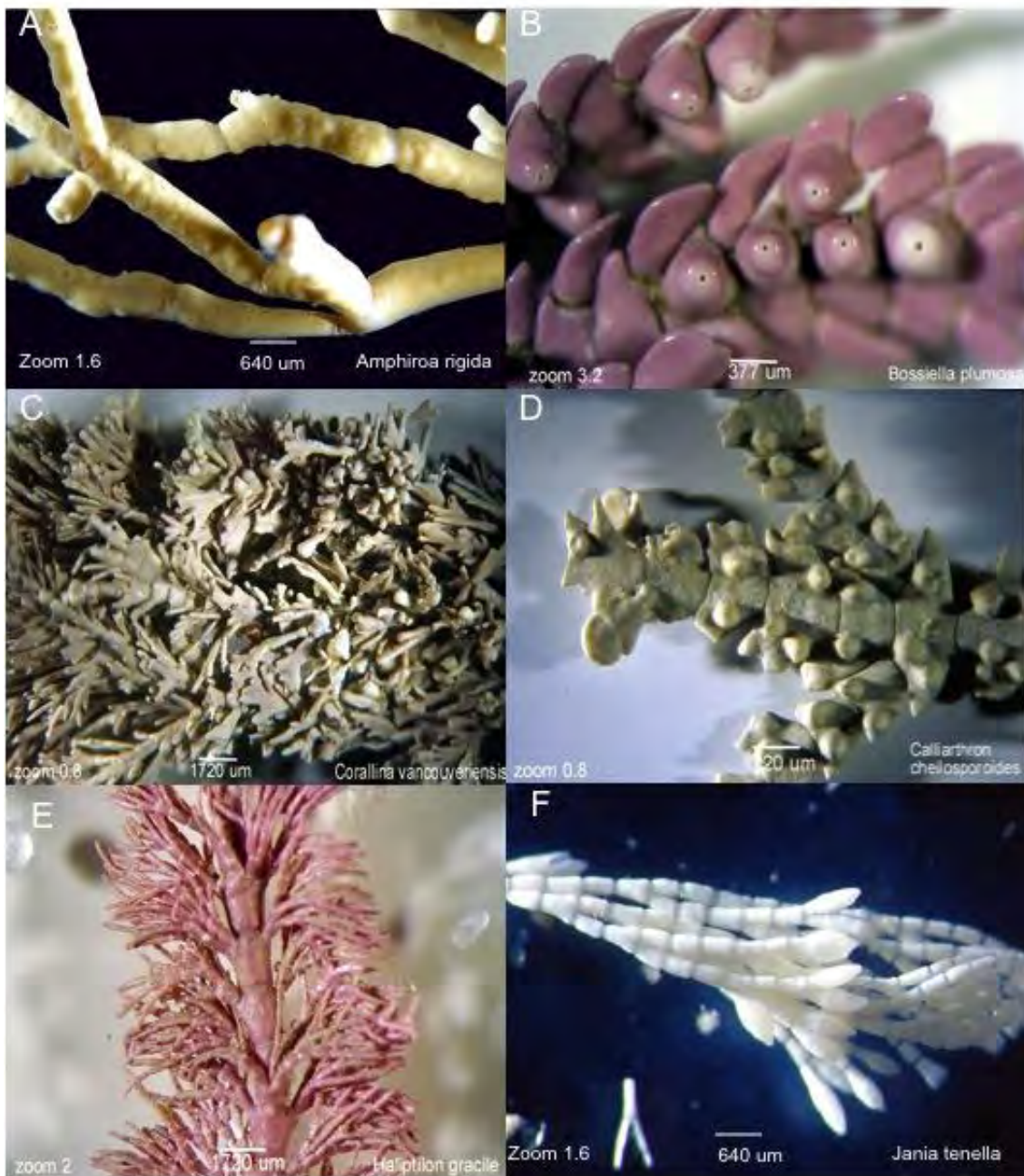


Fig. IV.2.1. Hábitos de las diferentes especies de coralinas geniculadas analizadas. A. *Amphiroa rigida*, B. *Bossiella plumosa*, C. *Calliarthron cheilosporoides*, D. *Corallina vancouveriensis*, E. *Haliptilon gracile*, F. *Jania tenella*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron ejemplares de especies *Amphiroa*, *Bossiella*, *Calliarthron*, *Corallina*, *Haliptilon* y *Jania* presentes en el Pacífico mexicano (Fig. IV.2.1.A-F); depositadas en la Sección de Algas del Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), UNAM y del Herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), del IPN (Tabla IV.2.1).

Tabla IV.2.1. Especímenes de coralinas analizados en MEB y su registro de herbario.

<i>Amphiroa dimorpha</i> Lem	PTM 6160, PTM 1978
<i>Amphiroa valonioides</i> Yendo	PTM 4837
<i>Amphiroa rigida</i> Lamour.	GC 193
<i>Bossiella orbigniana</i> (Dec.) Silva ssp. <i>dichotoma</i> (Manza) Johansen	IPN 11939, IPN 11938 IPN 12294
<i>Bossiella plumosa</i> (Manza) Silva	IPN 1303
<i>Calliarthron cheilosporoides</i> Manza	IPN 15741
<i>Calliarthron tuberculosum</i> (Post. & Rupr.) Dawson	EBC M19, IPN 15770
<i>Corallina polysticha</i> Dawson	EBC M12
<i>Corallina vancouveriensis</i> Yendo	EBC M7, IPN 12273
<i>Haliptilon gracile</i> (Lamour.) Johansen	IPN 12266
<i>Haliptilon roseum</i> (Lamark) Garbary & Johansen	IPN 14270
<i>Jania tenella</i> (Kütz.) Grun	PTM 820, PTM 1384 PTM 1950PTM 1703
<i>Neogoniolithon trichotomum</i> (Heydrich) Setchell & Mason	IPN Neo01
<i>Pneophyllum</i> sp	IPN Pne01
<i>Lithophyllum</i> sp	IPN Lit01
rodolito	---

Procedimientos para MEB

De cada ejemplar de colección, se tomaron porciones de ramas en estado reproductivo, se fracturaron longitudinalmente con la ayuda de una navaja de rasurar y un microscopio estereoscópico; los fragmentos fueron lavados en agua corriente y sumergidos en agua durante 24 hr., para hidratar completamente el tejido. Posteriormente se deshidrataron en series de alcoholes graduales y secados a punto crítico usando un desecador de CO₂ líquido (CPD 030, *Balt-Tec critical point dryer*). Los fragmentos de coralinas fueron montadas sobre porta muestras de aluminio, usando cinta doble de carbón y cubiertas con aproximadamente 200 nm de oro, en algunos otros casos fueron cubiertas con oro-paladio usando un baño *Denton Vacuum Desk II*. Las observaciones fueron hechas en un microscopio electrónico de barrido, MEB, (*Jeol JMS-35*). Se obtuvieron imágenes en archivos electrónicos e impresas en papel fotográfico.

A partir de la variación encontrada en la morfología fina de las especies revisadas, se delimitaron caracteres y sus estados, los que fueron codificados para hacer un análisis comparativo inter genérico y una evaluación de los mismos para conocer su valor informativo como caracteres taxonómicos-filogenéticos.

Análisis filogenético

Los datos fueron analizados en PAUP* (4.0b10 ppc, Swofford, 2002) por el método de máxima parsimonia, haciendo una búsqueda heurística con 1000 repeticiones, por adición al azar de ramas y el método de bisección, reconexión (TBR). Una vez encontrado el árbol de longitud mínima, se incluyó un análisis de branch and bound, para asegurar el hallazgo del árbol más corto. Se estimó

el soporte de las ramas por medio del índice de decaimiento, y por un análisis de Bootstrap, hecho sobre mil réplicas usando la misma estrategia de búsqueda mencionada anteriormente.

El soporte de ramas fue estimado aplicando el método estadístico de bootstrap (Felsenstein 1985) y los índices de declinación fueron calculados usando como referencia el árbol de parsimonia (Bremer, 1988).

RESULTADOS

A través del análisis de MEB se reconocieron 16 caracteres (Tabla IV.2.2) de los cuales 3 corresponden a estructuras vegetativas y 13 están asociados a características reproductivas; en conjunto se describe la morfología externa del talo, así como la estructura anatómica.

Características superficiales

Entre los rasgos de la morfología externa se observan aquellos de la superficie del talo (1), formados por las paredes anticlinales distales de las células epitiales y por el carbonato de calcio que las cubren, el cual produce un relieve característico.

	CARACTERES	ESTADOS DE CARÁCTER			
		0	1	2	3
	Ornamentación de la superficie calcárea				
1	Tipo de superficie	Tipo C	Tipo J	Tipo A	Tipo L
2	Textura	Granular	Lisa		
3	Poros en la superficie del talo formados por tricocitos	Ausentes	Presentes		
4	Ramas anteníferas	Ausentes	Presentes		
	Rasgos Asociados a las estructuras reproductoras				
5	Posición de los conceptáculos en vista superficial de acuerdo a su origen	Lateral	Terminal		
6	Posición del poro en relación a la superficie	En una depresión	Algo elevado respecto a la superficie		
7	Forma de los conceptáculos laterales en relación a la superficie del talo.	Lenticular	Esféricos	Cónicos	
8	Forma de la parte terminal de los conceptáculos	Esféricos	Ovales		
9	Ornamentación de los poros de conceptáculos tetrasporangiales	Simple	Con una cubierta pelicular	Con un anillo de fractura	
10	Ornamentación de los poros de conceptáculos espermatangiales	Simple	Con un anillo y células de protección		
	Anatomía Conceptacular				
11	Forma del conceptáculo bi/tetrasporangial en fractura	Esférico	Dorsiventral plano	Oval	
12	Ornamentación de la pared del conceptáculo bi/tetrasporangial	Plano o plano con costillas	Con escamas		

13	Forma del cuello del conceptáculo bi/tetrasporangial	Cilíndrico	Cónico		
14	Largo del cuello del conceptáculo bi/tetrasporangial	Corto	Largo		
15	Posición de las células que flanquean el cuello bi/tetrasporangial.	Oblicuas	Periclinales		
16	Pie de fijación en las estructuras reproductivas	No visible, Parte de la matriz cerosa.	Protuberante como un pedúnculo		

Se siguió la nomenclatura previamente usada por Garbary y Johansen (1982): superficie tipo C (para *Corallina*) y tipo J (para *Jania*). También se reconocieron otros tipos de superficies, dos de los cuales se incluyeron en el análisis filogenético: superficie tipo A (*Amphiroa*) y el tipo L (*Calliarthron*).

La superficie tipo A (Fig. IV.2.2 A-B), consiste de depresiones las cuales dan lugar a una apariencia granulosa. Estas depresiones están formadas por los bordes de las paredes celulares de las células epitaliales cuando la cutícula y el citoplasma de las células epitaliales se colapsan y se desintegran, dando lugar a cavidades cilíndricas. En la base de algunas depresiones se observan conexiones de orificio. En algunas muestras, las cavidades no son obvias y solamente las depresiones dejadas por bordes de las paredes celulares son observadas. Este tipo de superficie también se encontró en las muestras de *Lithophyllum*.

Superficie tipo L (Fig. IV.2.2 C). Consiste en depresiones formadas por elevaciones regulares de paredes celulares, las cuales crean un borde en forma de dona. No fueron observados conexiones de orificio secundarias en dichas depresiones.

Las muestras de *Neogoniolithon* y *Pneophyllum* presentaron sus propios tipos de superficies, sin embargo, estos datos no fueron incluidos en la matriz de análisis.

La superficie tipo N (Fig. IV.2.2 D-E). Tuvo una apariencia más lisa. Los límites de las células epitaliales fueron visibles, pero estos no se colapsan ni se desintegran, permanecen intactos. Consecuentemente no se forman cavidades o bordes. En el ejemplar rodolito protuberante, se observaron células epitaliales infladas o hinchadas; en este caso, las paredes celulares laterales permanecieron al ras de la superficie, de tal forma que en vez de una superficie con depresiones se observó una con elevaciones y áreas convexas.

La superficie tipo P (Fig. IV.2.2 F) parece que el citoplasma y la cutícula se hunden irregularmente para formar cavidades de forma y arreglo irregular.

Entre los caracteres de morfología externa se encuentran la apariencia de la superficie del talo, originada por la forma de las paredes periclinales de las células superficiales y por la forma de la cobertura de carbonato de calcio que producen un relieve particular. Algunas especies presentaron una textura granulosa (2), dada por las paredes marcadamente sobresalientes de las células superficiales de forma isodiamétrica, generalmente hexagonal, con una cobertura irregular de carbonatos (Fig. IV.2.2. A-C).

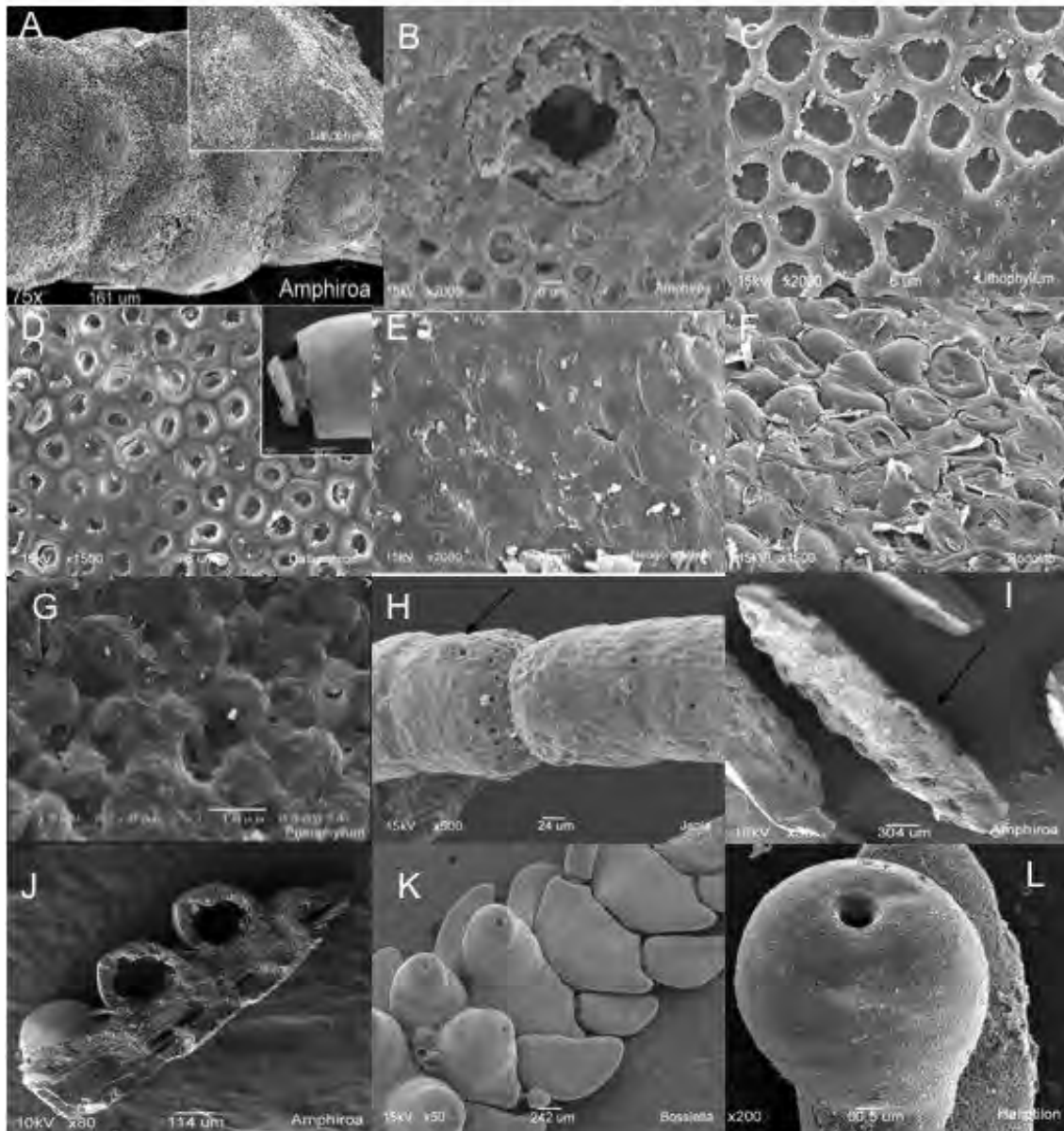


Fig. IV.2.2. A-C. Superficie tipo A en *Amphiroa* y *Lithophyllum*. A. *Amphiroa mexicana*, vista a baja resolución. En el recuadro se muestra la superficie de *Lithophyllum*. D. *Calliarthron tuberculosum*, detalle de la superficie. En el recuadro un fragmento de rama con genícula. E y F. Superficie tipo N de *Neogoniolithon trichotomum*. E, costra epilítica sin protuberancias. F. Rodolito con protuberancias. Superficie tipo P de *Pneophyllum* sp. H. Perforaciones dejadas por tricocitos. I. Conceptáculos laterales lenticulares de *Amphiroa beauvoissii*. J. Conceptáculos esféricos de *A. valonioides*. K. Conceptáculos cónicos de *Bossiella plumosa*. L. Conceptáculos esféricos terminales de *Halptilon gracile*.

La mayoría de las especies observadas presentaron una textura irregular, dada por las paredes planas o ligeramente sobresalientes, con una cobertura regular de carbonatos (Fig. IV.2.2. D-G). La presencia de tricocitos o megacélulas (3) distribuidas en la superficie del talo siendo más abundantes cerca de la genícula, contribuyen también, con las particularidades del relieve dado que la apariencia superficial de estas células es la de una perforación cortical con un diámetro \geq al de una célula normal (Fig. IV.2.2. H).

Fueron observadas ramas anteníferas (4) sobre las estructuras reproductoras de los conceptáculos tetrasporangiales de especies de *Corallina* y *Jania*.

Características superficiales de las estructuras reproductoras

El relieve puede modificarse aun más por las estructuras reproductoras cuando los conceptáculos son laterales (5) y desarrollados a partir del tejido cortical de las intergenículas. Los conceptáculos terminales no alteran el relieve.

Las formas de los conceptáculos laterales son variables y su apariencia superficial también. Existen conceptáculos que están al mismo nivel de la superficie del talo, de forma lenticular y son evidentes solo por los poros (Fig. IV.2.2. I) o pueden ser protuberantes con forma esférica (Lam 2. J) o cónico-truncados (Fig. IV.2.2 K). En el caso de los conceptáculos terminales de origen medular, pueden ser esféricos (Fig. IV.2.2. L y Fig. IV.2.3A).

En los conceptáculos laterales se observaron poros simples, esto es, las células que los delimitan no están diferenciadas, y no se observan ningún tipo de células de protección, en algunos casos son excéntricos (6), con una cubierta pelicular que recubre la apertura por debajo del borde del poro en la parte interna del canal (Fig. IV.2.3B), otros presentan poros céntricos pequeños con un anillo de células que delimita el área de fractura (Fig. IV.2.3C). En los conceptáculos terminales se presentan poros simples céntricos o excéntricos, proporcionalmente grandes con relación a la superficie apical del conceptáculo (Fig. IV.2.3. D, E).

Características anatómicas

La estructura anatómica vegetativa la forman células medulares diferenciadas en genícula e intergenícula, las que se observaron con las mismas características que han sido descritas histológicamente (Johansen, 1981).

La anatomía conceptacular mostró diferentes formas de la cámara (11), esférica (Fig. IV.2.2.J y L), ovada (Fig. IV.2.3.F), dorsiventralmente aplanada de forma regular (Fig. IV.2.3. G y J) o dorsiventralmente arriñonada (Fig. IV.2.3.I). Las paredes (12) de las cámaras son lisas (Fig. IV.2.3. F, I, J y K), que pueden tener algún tipo de ornamentación, como escamas (Fig. IV.2.3. J) o costillas (Fig. IV.2.3. K).

En la parte alta de la cámara hay un canal de salida de diferentes formas (13), desde cilíndricos y largos (Lam. 3 D, F, H) a cónicos (Fig. IV.2.3.L, M). En algunos casos los canales presentan una región ensanchada que da la apariencia de una subcámara (Fig. IV.2.3. M). Las células que constituyen las paredes del canal (15) pueden tener dos arreglos generales, oblicuas (Fig. IV.2.3.C, K) o periclinales (Fig. IV.2.3. H, M).

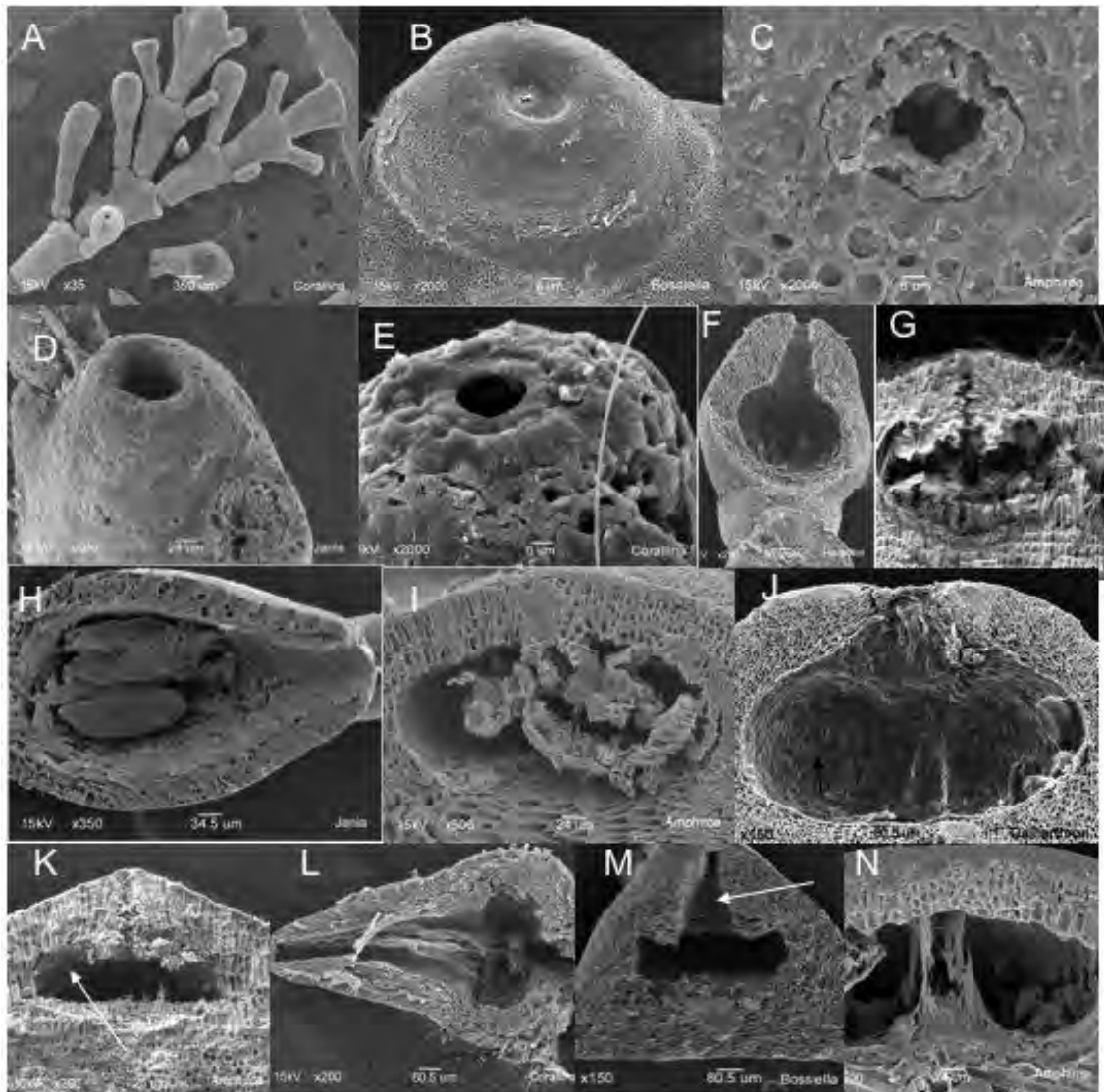


Fig. IV.2.3. A. Conceptáculos ovales terminales. B. Poro excéntrico con una película cubriendo la apertura del poro. C. Poro con un anillo de células, el cual delimita el área de perforación del poro. D. Poro terminal, céntrico y simple. E. Poro espermatangial mostrando una compleja ornamentación. F. Conceptáculos esféricos. G. Conceptáculos dorsiventralmente aplanados (arriñonados). H. Conceptáculos ovales. I, J, K. Plano interno de ornamentación, con escamas o costillas respectivamente. L-M. Conceptáculo masculino. M. se muestra una subcámara. (flecha) N. Matriz de soporte reticular en un conceptáculo tetrasporangial.

Los conceptáculos masculinos presentaron características distintivas. En términos generales éstos son más esbeltos y con cuellos mucho más largos en comparación con otros tipos de conceptáculos. Los conceptáculos espermatangiales, además, presentan poros con ornamentaciones (10) más complejas, se observaron poros céntricos con un anillo superficial de una capa de células rectangulares en posición perpendicular al eje central del conceptáculo y una vaina de células con forma de prisma rectangular, con las paredes ligeramente hinchadas formando un reborde (Fig. IV.2.4J).

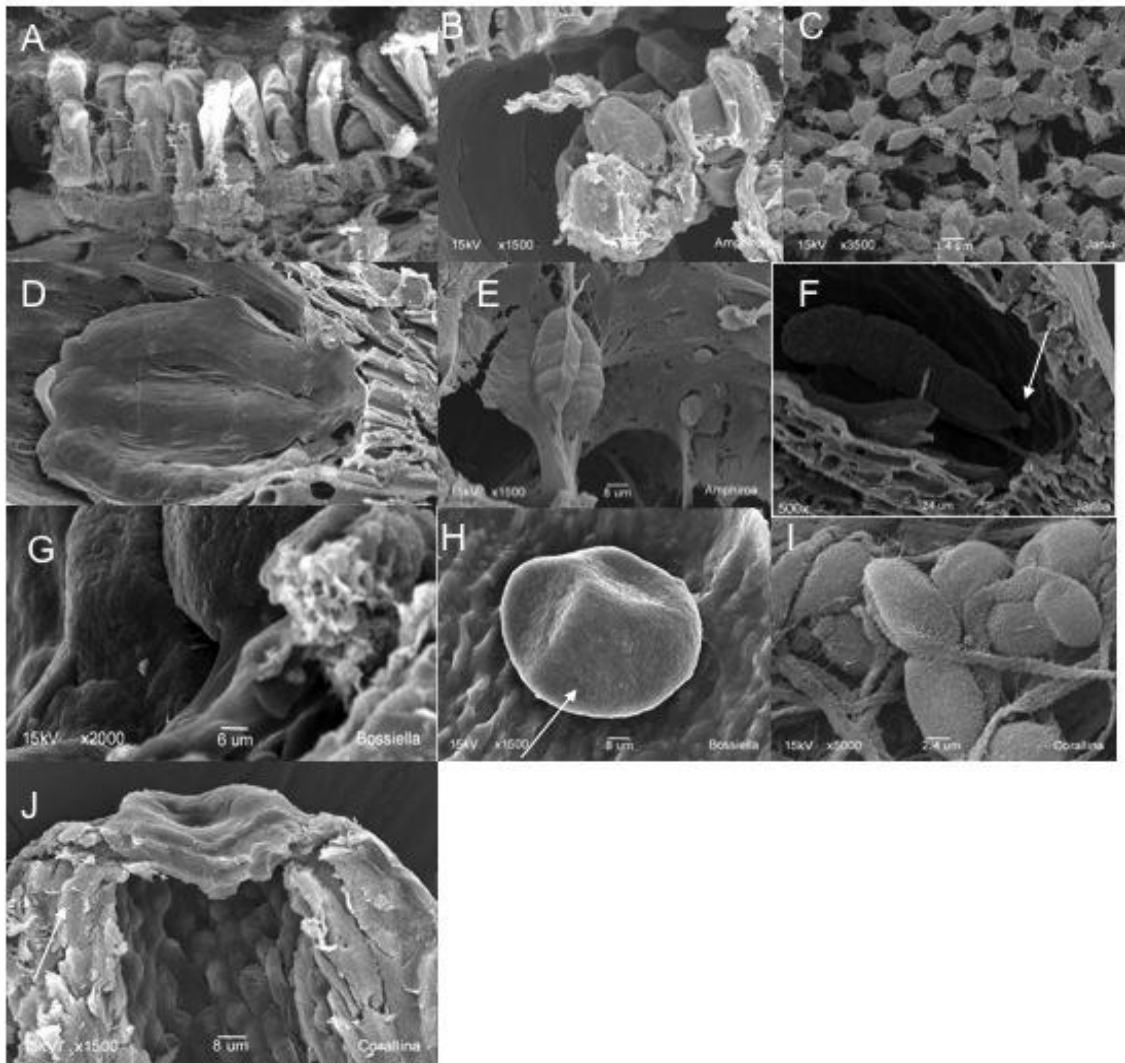


Fig. IV.2.4. A-D. Carpogonio, carposporas, espermatangios y tetrasporangios están cubiertos por un saco seroso. E. Tetrasporangios maduros sin el saco seroso. F. Pie de las estructuras tetrasporangiales. G. Carposporas mostrando un pedúnculo que las une a la superficie del piso de la cámara. H. Cavidades compatibles sobre la superficie de las carposporas. I. Espermatangios con una proyección a manera de rizoide. J. Los espermatangios están distribuidos en toda la superficie de la cámara dándole a ésta una apariencia granular.

En todos los tipos conceptaculares (tetrasporangiales, carposporangiales y espermatangiales) se observó que las estructuras producidas están protegidas por una matriz reticulada de soporte que es evidente en la Fig. IV.2.4.E. Además, cada célula carpogonial (Fig. IV.2.4.A), así como las carposporas (Fig. IV.2.4. B), espermatangios (Fig. IV.2.4.C) y tetrasporangios (Fig. IV.2.4.D), durante su desarrollo se encuentran protegidos individualmente por una película de apariencia cerosa en forma de saco, al llegar a la madurez dicho saco se degrada y las estructuras se liberan (Fig. IV.2.4.G, H, I).

Suponemos que éste saco protector está constituido de alguna sustancia parecida a la calosa, observada en plantas vasculares. En las plantas vasculares, la calosa se empieza a formar en las células madres de las microsporas (masculinos) o de las megasporas (femeninas) justo antes de que

se lleve a cabo la meiosis, y se degrada cuando las microsporas y/o megasporas han llegado a su madurez.

El saco descrito para las algas coralinas, no se ha observado en cortes histológicos, debido probablemente a que los especímenes son sometidos para su procesamiento histológico a soluciones ácidas, durante el proceso de descalcificación, y posteriormente a alcoholes o acetonas, parafinas o resinas y a calor, lo cual puede degradar los azúcares de los que está formada dicha estructura. El saco y la matriz reticulada, fueron observados en todos los ejemplares estudiados, así como en algunos ejemplares de coralinas no geniculadas.

En algunas especies, los tetrasporangios, carposporas y espermacios no presentan estructuras de fijación a las superficies conceptaculares y solo se encuentran embebidos en la matriz reticular. En algunas otras, los tetrasporangios tienen un pie de fijación (16) con una base discoidal adherida al piso (Fig. IV.2.4.F) y las carposporas presentan una especie de pedicelo que las fija a la superficie del conceptáculo (Fig. IV.2.4.G) y además, debido al patrón de agregación, las carposporas tienen formas regulares con la superficie cóncava. (Fig. IV.2.4.H). Los espermatangios pueden presentar una proyección celular larga parecida a un filamento rizoidal (Fig. IV.2.4.I) que los une a toda la superficie de la cámara, desde el piso hasta el poro por la parte interna del cuello, dando una apariencia granulosa a la cavidad, cuando se observa a baja resolución.

ANÁLISIS DE CARACTERES

Dado que se encontraron diferentes caracteres en diferentes ejemplares, no necesariamente de la misma especie, aunque sí del mismo género, se decidió trabajar a nivel genérico la información obtenida.

Se usó *Lithophyllum* como grupo externo. En la Tabla IV.2.3. se muestra la matriz de datos para cada uno de los géneros, elaborada a partir de los caracteres y estados de la tabla IV.2.2.

Tabla IV.2.3 Matriz de Datos. La referencia del número de carácter está en la tabla IV.2.2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Lithophyllum</i>	2	0	0	-	0	0	0	-	2	?	1	0	0	0	0	0
<i>Amphiroa</i>	2	0	0	0	0	0	0	-	2	0	0,1	0	0	0,1	0	0
<i>Bossiella</i>	0	1	0	0	0	0	1	-	1	?	0	0	1	1	0	1
<i>Calliarthron</i>	3	1	0	0	0	1	1	-	0	?	1	0	1	0	0	0
<i>Corallina</i>	0	1	1	1	1	1	-	1	1	1	0	0	1	0	1	0
<i>Haliptilon</i>	0	1	0	0	1	1	-	0	0	?	0	1	1	1	1	0
<i>Jania</i>	1	1	1	1	1	1	-	1	0	0	2	1	1	1	1	1

El análisis de parsimonia produjo 1 árbol de 22 pasos de largo (donde los 16 caracteres se analizaron como no ordenados, todos con el mismo peso, el carácter 15 fue constante y 5 caracteres no fueron parsimoniosamente informativos (1, 9, 10, 11 y 13). El IC para el árbol fue de 0.81 excluyendo los caracteres no informativos). Fig. IV.2.5.

Los clados apoyados por el análisis de bootstrap fueron los grupos hermanos formados por *Corallina* y *Jania* con el 88% de soporte, el grupo hermano a éste fue *Haliptilon* con un 92% de soporte y el grupo hermano de este grupo, *Calliarthron* con un 74%.

En el árbol de la Figura IV.2.5. se mapearon los cambios, mostrando que, los caracteres que fueron definitivamente más llamativos taxonómicamente, como son las diferencias entre los conceptáculos masculinos y los tetrasporangiales y carposporangiales, no mostraron valor informativo filogenéticamente, esto puede explicarse por la falta de información en varias de las especies. Lo que indica que es necesario hacer una revisión detallada de los diferentes estadios de las especies de coralinas geniculadas y precisar si existen diferencias significativas entre especies y géneros, o el caso de *Corallina* y *Jania*, son particulares.

El carácter que sustenta al clado formado por *Calliarthron*, *Corallina*, *Jania* y *Haliptilon*, es el de los poros que pasan de ser deprimidos a estar en la superficie del conceptáculo. Los caracteres que sustentan el clado formado por *Corallina*, *Jania* y *Haliptilon* son, la posición de las células que flanquean el canal, que pasan de la posición oblicua a la periclinal; y por la posición de los conceptáculos por su origen, que pasa de ser lateral (corticales) a terminales (medulares). Estos caracteres tienen que ser evaluados en otras especies de coralinas geniculadas y comparados con la información que existe a nivel de especie para las coralinas no geniculadas, y corroborar su congruencia y consistencia en el soporte de ramas.

Los caracteres que sustentan el grupo hermano formado por *Corallina* y *Jania*, son la presencia de ramas anteníferas y la presencia de megacélulas reconocibles por los poros en la superficie del talo.

El carácter 16, la presencia de estructuras de fijación de los esporangiales (carposporas y tetrasporas) parece ser un paralelismo entre *Bossiella* y *Jania*. Lo cual significa que pueden estar presentes en diferentes géneros, pero no tener el mismo origen. Sin embargo, este carácter también necesita ser evaluado en otras especies.

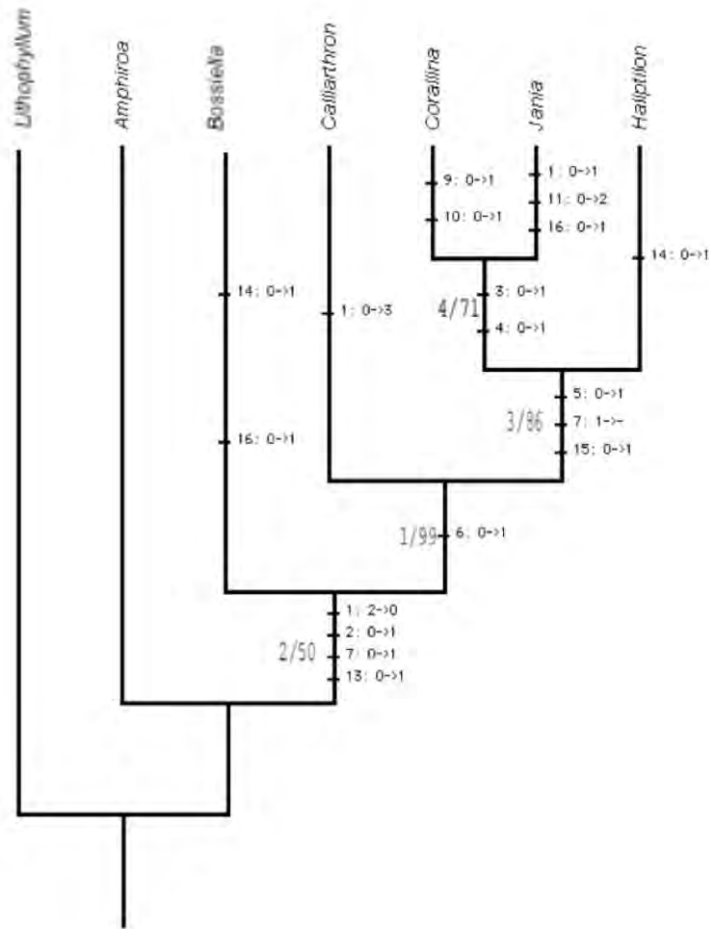


Fig. IV.2.5. Árbol de MP. Los números sobre las ramas a la derecha del slash representan el porcentaje de soporte de Bootstrap y a la izquierda se presenta el índice de decaimiento. Se muestran los cambios en los estados de carácter.

Los caracteres relacionados con las estructuras reproductoras (5, 6, 8, 9-16, Tabla IV.2.2.) pueden ser analizados también en las especies de corallinas no geniculadas para y elaborar un patrón si lo hay. Los resultados que se obtuvieron de las observaciones de 4 especies de no geniculadas, *Hydrolithon*, *Lithophyllum*, *Neogoniolithon* y el *rodolito*, mostraron que los caracteres asociados con la matriz reticulada y la película cerosa que envuelve a las estructuras reproductoras parecen ser comunes en las especies del orden. Estas estructuras han sido observadas en microfotografías para otras especies, tal es el caso de *Sporolithon* sp., donde se muestra el disco de fijación de los tetrasporangios y la envoltura a manera de saco, Lo que sugiere caracteres comunes para el orden. Por otra parte, es necesario hacer otros estudios sobre la estructura que aparenta ser una proyección de la pared celular de los espermacios, que puede ser también una proyección de este saco que los protege y envuelve durante un periodo de su desarrollo, para determinar su estructura. Porque no es lo mismo una proyección de una estructura de protección compuesta probablemente de calosa, a una proyección de la pared celular.

Finalmente se hace necesario hacer un análisis de caracteres, combinando los descritos en este trabajo, con todos aquellos caracteres morfológicos descritos en la literatura y hacer pruebas de congruencia y correlación de caracteres. De tal modo que pueda establecerse de manera más eficiente su uso para delimitar taxones y como caracteres filogenéticos.

DISCUSIÓN

En este trabajo se describieron estructuras que no habían sido descritas con anterioridad para especies geniculadas. Durante la revisión de la micromorfología usando MEB de la genícula de las especies coralinas de las costas del Pacífico de México, algunos rasgos difirieron entre taxones y otros estuvieron presentes en todas las especies.

De los 16 rasgos descritos 11 fueron corroborados en las descripciones proporcionadas en la literatura y cinco no habían sido mencionados con anterioridad: la textura de la superficie (2), la ornamentación de los poros de los conceptáculos tetrasporangiales (9), ornamentación de los poros de los conceptáculos espermatangiales (10), la ornamentación de las paredes internas de los conceptáculos tetrasporangiales (12), el pie de fijación en las estructuras reproductivas (16).

Además de otros caracteres que no fueron probados en el análisis filogenético y que necesitan de un mayor estudio y registro en otras especies, tales como la presencia de una sub-cámara en los conceptáculos espermatangiales, las proyecciones de fijación de los espermacios (como estructuras rozoidales), la matriz reticulada la cual soporta a las estructuras reproductivas y el saco seroso que los recubre. Estas dos últimas características fueron encontradas en todas las especies analizadas, sugiriendo que puede estar presente en todo el orden.

El saco seroso que protege a las estructuras reproductivas, fue observado por Rasser (2003) en micrografías electrónicas de *Sporolithon* spp, pero esta estructura no fue mencionada. Este carácter podría ser análogo a la cubierta de calosa observada en los estados iniciales de las estructuras reproductivas en plantas vasculares. Esta estructura inicia en las células madre de las microsporas (masculinas) o en las megasporas (femeninas) justo antes de la meiosis, y es degradada cuando las micro o megasporas han alcanzado su madurez. (Esau 1985).

La subcámara conceptacular masculina, fue observada en *Bossiella orbigniana*. La ornamentación del poro de los cámaras masculinas y las proyecciones de los espermacios fueron vistos solo en *Corallina vancouveriensis*, por lo que se hace necesaria una búsqueda más exhaustiva de estas características en otras especies para confirmar su presencia y determinar su valor taxonómico y su contenido filogenético.

La forma de la cámara conceptacular esporangial en corte (11) es un rasgo que ha sido mencionado como descriptivo para muchas especies y está relacionado con el alto y el diámetro de la cámara (Johansen 1981; Woelkerling

1988), y en algunos casos ha sido correlacionado con el número de estructuras reproductivas que ésta contiene (Johansen, 1970).

La presencia de estructuras de fijación de las carposporas y de los tetrasporangios (16) es una estructura compartida entre *Bossiella* y *Jania*, y también se detectó en ejemplares de *Neogoniolithon*, por lo que podría ser una característica generalizada. La ornamentación de los poros conceptaculares espermatangiales (10) se observó solo en *Corallina*, por lo que este carácter podría variar en cada uno de los géneros o diferenciarse entre las especies.

La condición de la superficie tipo J, solo se presenta en *Jania* (como lo discutió Garbary y Johansen (1982 y Pueschel y Judson (2002) y se considera como la sinapomorfia que resuelve el grupo en el cladograma (Fig. IV.2.5).

Los caracteres descritos en este trabajo, tienen valor taxonómico para reconocimiento y separación de géneros y especies, y es necesario continuar su estudio en poblaciones naturales de otras especies para reconocer su variación ecológica y las diferencias entre los taxones, para poder evaluar su significado filogenético.

IV.3. Características morfológicas de las coralinas

RESUMEN

Las algas del orden Corallinales se distinguen del resto de rodófitas y de todas las otras algas por su distintiva pared celular impregnada de carbonato de calcio, por la forma rígida de sus talos y su forma de crecimiento característicamente adherida al sustrato, formando costras o crecimientos protuberantes o ramificados (especies no geniculadas) o por talos ramificados con segmentos calcificados alternando con segmentos no calcificados (especies geniculadas). Originalmente las algas coralinas fueron diferenciadas justamente por la presencia o ausencia de la genícula (zonas no calcificadas del talo). Más tarde se diferenciaron usando las características de la anatomía vegetativa y de la morfología de los conceptáculos bi-tetrasporangiales. Desde 1950 a la fecha, la taxonomía de las coralinas ha estado basada casi exclusivamente en los atributos anatómicos de los conceptáculos tetrasporangiales. Aunque han sido considerados los rasgos asociados a la ontogenia de los conceptáculos gametangiales, su uso se ha limitado solo a algunas especies de algunos géneros. Esta información ha sido usada para establecer las relaciones fenéticas o de parecido global entre los taxones del orden, sin embargo, se desconoce su verdadero significado taxonómico y filogenético debido a que se carece de dicha información para las especies tipo de algunos géneros, además de su correlación con aquellos caracteres de tipo vegetativo.

En este estudio se realizó el análisis y recopilación de la información existente de los caracteres que definen a los taxones de coralinas y con ellos se construyó una matriz de datos para realizar los análisis filogenéticos correspondientes y proponer una hipótesis de parentesco entre los taxones del orden.

INTRODUCCIÓN

Morfología y Citología

Los talos de las algas coralinas del orden Corallinales, están formados por agregación de filamentos, dando lugar a una organización de naturaleza esencialmente pseudoparenquimatosa. Los filamentos que constituyen el talo se forman por la división de las células apicales e intercalares. Desde el punto de vista morfogenético se pueden distinguir dos tipos de construcción: los talos encostrantes y los talos erectos, sin embargo, es importante resaltar que todas las formas de construcción anatómica en las coralinas provienen de una serie de filamentos postrados formando una base costrosa (Cabiocch, 1988).

Los talos encostrantes son de construcción relativamente simple, consisten de una masa de organización radial de forma irregularmente lobada. Donde la

capa basal de filamentos agregados y en posición radial (hipotalo² o filamentos primigenios) son producidos directamente de la germinación de las esporas. Todas las células del sistema de filamentos postrados dan lugar a filamentos erectos (filamentos postígenos, reconocidos por algunos autores como peritalo³), los cuales son siempre simples o algunas raras veces ramificados. Los filamentos erectos pueden estar arreglados a ángulos rectos de los filamentos postrados (talos dímeros), o surgir en ángulo agudo y luego curvarse hacia arriba (talos coaxiales). Todos los filamentos se encuentran cementados por carbonato de calcio, además los filamentos adyacentes están unidos por conexiones celulares secundarias o por fusiones celulares. Los talos están adheridos al sustrato por células de adhesión. En las especies epífitas o semiendófitas suelen presentar pequeños rizoides o haustorios.

En las formas erectas de crecimiento los ejes tienen una organización multiaxial. Cada eje erecto consta de más o menos 250 filamentos y estos están agregados y cementados por carbonato de calcio y unidos lateralmente por uniones celulares secundarias o fusiones celulares. El talo se constituye de segmento calcificados separados por uniones flexibles no calcificadas, los ejes son cilíndricos en algunos géneros o marcadamente comprimidos en otros (Cabioch, 1972; Dixon, 1973; Johansen, 1981; Woelkerling, 1988).

A pesar de su mineralización, las células crecen y se ramifican por la división de las células iniciales localizadas cerca de la superficie del talo en posición terminal o intercalar.

Los meristemos terminales se encuentran en los márgenes de las formas incrustantes (*Lithothamnion*) o en los vértices de formas geniculadas, como *Corallina*. Estos meristemos pueden formar una o varias capas. Los meristemos intercalares están situados en posición subterminal sobre los filamentos erectos del talo (postígenos en talos postrados) o en las partes terminales de las ramas de talos erectos. Los meristemos intercalares están protegidos por una célula de cubierta (cap cell), o células epitales (Cabioch, 1972, 1988), característica de las corallinas. Son pequeñas células situadas en posición terminal sobre los filamentos erectos del talo y en muchos casos son mucho más pequeñas que las células sobre las que se encuentran. Las células de cubierta se forman previamente al desarrollo de los filamentos erectos, una vez formadas, ellas no se vuelven a dividir. El crecimiento de un filamento erecto por tanto, es debido a la actividad meristemática de la célula en posición secundaria.

Morfogénesis

El desarrollo de los talos proviene del desarrollo de las esporas característico de las Corallinales, tipo *Naccaria* (de acuerdo con Dixon, 1973), donde la espora después de adherirse usualmente se divide en un número de células de aproximadamente el mismo tamaño, aunque puede permanecer sin

² En adelante se denominará hipotalo a la región basal de filamentos constituidos por filamentos primigenios

³ En adelante se denominará peritalo a la región erecta de filamentos que sean derivados de los filamentos primigenios.

dividirse. La espora no dividida o sus células derivadas forma una o más protuberancias las cuales se dividen transversalmente; estos elementos retienen su contenido. Las protuberancias funcionan como células apicales y se dividen para formar una serie de filamentos los cuales rápidamente dan lugar a ramas laterales (Woelkerling, 1988).

Los estudios de caso realizados sobre especies en cultivo, mostraron que hay una variación en los tipos de desarrollo de la espora, los cuales pueden ser: desarrollo directo (*Choreonema* y especies de *Amphiroa* semiendofíticas). En el resto de coralinas la espora se transforma por segmentación en una masa germinativa de la cual surge el talo (Fig. IV.3.1).

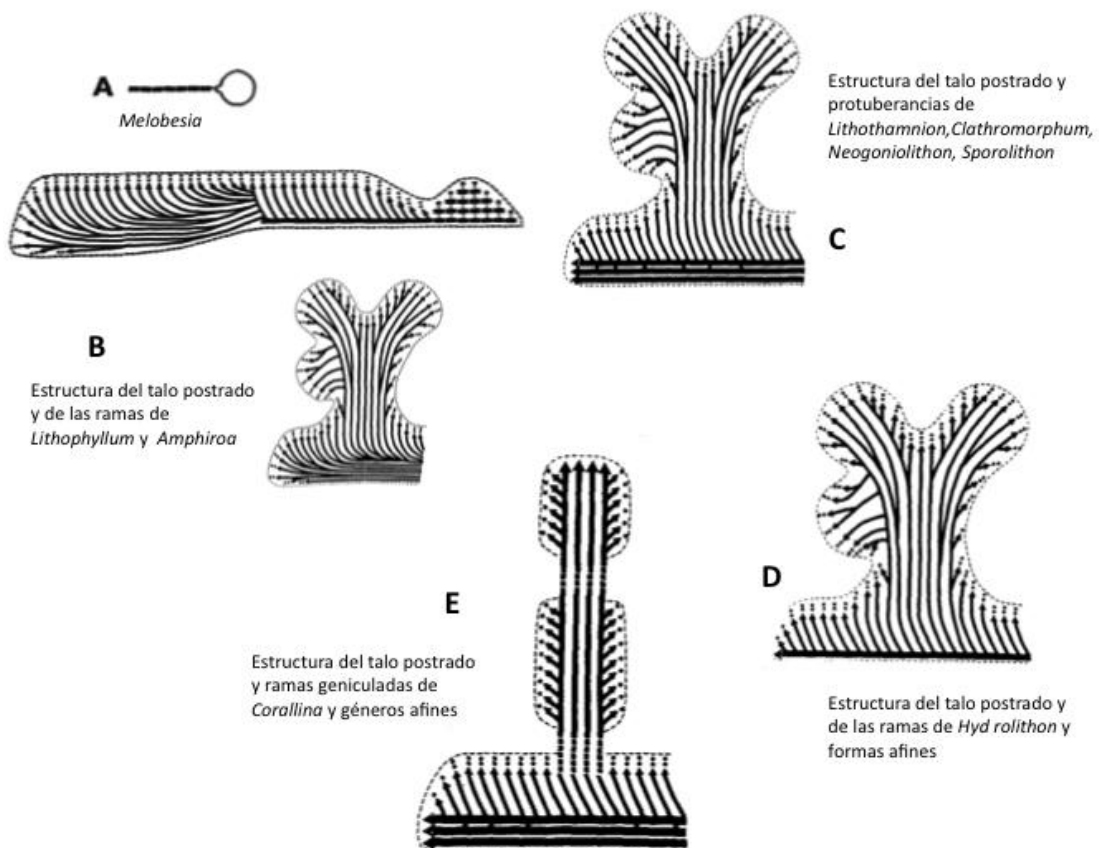


Fig. IV.3.1. Patrón de desarrollo del talo en algas coralinas. Reproducido y modificado de Cabioch (1972).

En la Fig. IV.3.1. se puede observar de manera gráfica, los patrones que propone Cabioch (1972) para segregar los diferentes grupos al interior de la antigua familia Corallinaceae. Desde el patrón de germinación más simple de las esporas característico de *Choreonema*, hasta aquellos patrones que dan lugar a talos complejos. En la Fig. IV.3.1. C y D., se muestra la estructura de las partes postradas y ramificadas (en los casos que existan), de talos no geniculados. Las principales diferencias se observan en el número de capas de filamentos primigenios y el patrón de formación de los filamentos postígenos.

Además, en ambos casos los ejes erectos de las ramas están formados por filamentos primigenios (o derivan directamente del hipotalo) como lo mencionó

Cabioch (1972). En las Figuras IV.3.1.B y E., se muestra la estructura de las partes postradas y ramificadas de los talos más complejos, entre los que se encuentran las coralinas geniculadas y *Lithophyllum*. Cabioch (1972) sugiere que originalmente se forma una costra unicelular, de la cual tienen lugar los filamentos postígenos o peritaliales (flecha azul) estos filamentos se ramifican y vuelven a su forma postrada dando lugar a un falso hipotalo o falsos filamentos primigenios, estos se ramifican hacia la superficie para formar el grosor de la costra. Los talos ramificados geniculados como *Amphiroa* y *Corallina* tienen un tipo de desarrollo donde los filamentos que conforman los ejes de las ramas son derivados de los filamentos postígenos.

Estos tipos de desarrollo se asocian con los caracteres citológicos mencionados en la primera parte de la introducción, dando lugar a un ensamble de características que Cabioch (1988) sugiere que reflejan los pasos evolutivos que comprenden toda la gama de posibilidades que despliegan las algas coralinas, desde sus formas simples a las más evolucionadas, erguidas y articuladas.

METODOLOGIA

Se realizó una búsqueda de información bibliográfica, utilizando la literatura taxonómica que describe los caracteres de definición y delimitación de los taxa del orden Corallinales entre ellos Cabioch, 1972; Johansen, 1981 y Woelkerling, 1988; 1996.

Se recopiló la información taxonómica por orden, familia, subfamilia y género. Considerando los géneros válidos para el orden.

Se elaboraron listas de caracteres sectorizados en: caracteres morfológicos y morfogenéticos, que incluyeron la morfología externa, anatomía, caracteres citológicos, caracteres reproductivos y los patrones de desarrollo de estructuras vegetativas y reproductivas.

Se llevó a cabo un análisis de caracteres para determinar su congruencia y homología, la cual fue asumida empíricamente para todos los casos. Después del análisis de caracteres y su codificación quedó un listado de 49 caracteres bien definidos para la mayoría de los géneros, con el menor número de ambigüedades

Se llevó a cabo la delimitación de caracteres y definición de estados de carácter y se hizo su codificación en matrices de datos.

Se seleccionó un grupo de 3 especies que se usaron como grupo externo y se obtuvo de ellas su caracterización morfológica.

RESULTADOS

Se analizaron 43 taxones a nivel de género y se seleccionó para reportar su morfología a la especie tipo. La primera revisión de caracteres a partir de la literatura arrojó un total de 106 caracteres. Como resultado de su análisis, definición, obtención de sus estados de carácter y comparación de información

disponible en todos o la mayoría de los taxones seleccionados, el número de caracteres se redujo a 49.

Respecto a la información sobre formación de las estructuras reproductivas tanto gametangiales (femenina y masculina) como carposporangiales y tetrasporangiales (bisporangiales), así como información sobre la formación de las cámaras conceptaculares no se encontró información suficiente en ningún género. La información es parcial para uno u otro tipo de estructura reproductora, las descripciones son resultado en algunos casos de material en cultivo y en otras ocasiones de análisis comparativos de poblaciones. A continuación se muestra una definición de los caracteres usados en los análisis filogenéticos. En la tabla IV.3.1. se muestra la matriz de datos morfológicos usada para los análisis filogenéticos.

CARACTERES MORFOLÓGICOS EXTERNOS

1. Arquitectura del talo: (0) No geniculado (1) Genícula tipo Amphiroidea (2) Genícula tipo Corallinoidea, (3) Genícula tipo Metagoniolithoidea, (4) Genícula tipo Lithothrioidea.

Las coralinas presentan dos formas de crecimiento característico. La forma costrosa, no articulado, que pueden ser incrustantes (adheridos a un sustrato) o de vida libre (rodolitos).

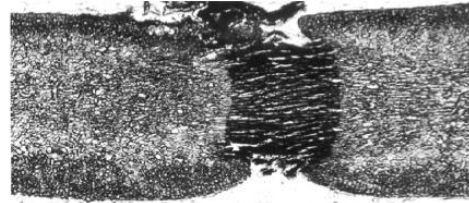
Las formas incrustantes se constituyen de filamentos que forman discos delgados de crecimiento radial, que pueden crecer sobre rocas (epilíticos) en la zona intermareal y submareal, sobre algas (epífitas) y otras plantas marinas, adaptados a rápidos ciclos de reproducción, o sobrecrecer alrededor de pequeños guijarros o partículas en el fondo marino, dando lugar a formas masivas, hasta 50 cm de diámetro, de hasta 100 años de edad, más comunes en aguas templadas y frías. Las formas costrosas pueden vivir a gran profundidad, o estar asociadas a los bancos arrecifales, característicos de aguas someras, tropicales. Desempeñan el papel de cementante y sirven de protección al arrecife.



La forma de crecimiento geniculada hace referencia a talos generalmente

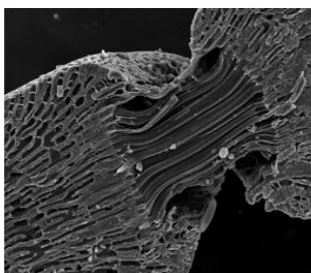
arborescentes articulados. Las articulaciones generalmente se refieren a áreas del tejido que no están calcificadas (genículas), flexibles, las cuales funcionan como uniones entre las áreas calcificadas (intergenículas).

La organización de la genícula difiere marcadamente entre cada uno de los grupos taxonómicos que incluyen especies articuladas.



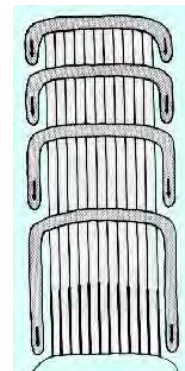
Amphiroa mexicana

Genícula tipo Amphiroidea:⁴ consiste de una o más hileras de células medulares⁵ al menos parcialmente calcificadas o descalcificadas, pero no marcadamente elongadas, su relación de largo respecto a las células intergeniculares es de 1-2; conexiones de orificio secundarios laterales; presentan corteza.



Genícula tipo Corallinoidea: consiste de una sola hilera no cortada de células medulares no calcificadas y por fusiones celulares laterales.

Genícula tipo Lithothroidea:⁶ el meristemo apical produce alternadamente hileras de células geniculares e intergeniculares; las células de las hileras geniculares son marcadamente elongadas, su relación de largo respecto a las intergeniculares puede ser hasta de 40; se observan descalcificadas en las partes bajas; células de hileras intergeniculares no elongadas, pero produciendo nuevas células por un meristemo marginal, éstas nuevas células crecen hacia abajo y cubren las células geniculares conforme éstas se elongan, por lo que la intergenícula podría considerarse ecorticada (dado que no la produce), pero si protegida por corteza.



⁴ Las hileras de células medulares son producidas por un meristemo apical. Cada hilera apical está formada por células cortas, pero la actividad meristemática deja a las hileras en posición subapical. Algunas de ellas se elongan, formando una secuencia irregular de hileras largas y cortas. Grupos alternantes de hileras permanecen calcificados para formar la intergenícula o se descalcifican para formar la genícula (Johansen, 1969). La corteza es producida a todo lo largo de la rama, llegando a descalcificarse cuando es parte de la genícula. Johansen & Silva (1978). La médula es formada por divisiones sincrónicas de las células apicales, por lo tanto dan lugar a hileras arqueadas en donde las células son del mismo largo, las divisiones en las hileras varían en altura de 10-20 micrómetros a más de 120 micrómetros. La corteza es gruesa o delgada, fuertemente demarcada de la médula, continuando su crecimiento lentamente de acuerdo a la edad de la intergenícula. La genícula constituida de una o más hileras de células medulares no calcificadas, la presencia de la genícula se distingue por la ausencia de calcita en las paredes, las hileras de células pueden ser parcialmente intergeniculares o geniculares. Corteza intergenicular usualmente presente, pero usualmente desorganizada y rota (Norris y Johansen, 1981).

⁵ En adelante el uso del término médula se usará solo para denotar la región de filamentos interna del talo sin hacer referencia a su origen.

⁶ Dos tipos de hileras alternantes de células son formadas en los ápices de las ramas, uno forma la intergenícula y otro la genícula. Las hileras intergeniculares las células son cortas y calcificadas, junto con aquellas de la superficie produciendo una corteza de crecimiento hacia abajo. Las células de la hilera genicular se elongan marcadamente pero no se dividen, y son cubiertas por las células de la corteza de la intergenícula. La parte distal de las primeras células formadas permanece calcificada, de tal forma que la genícula madura está parcialmente descalcificada. Johansen & Silva (1978).

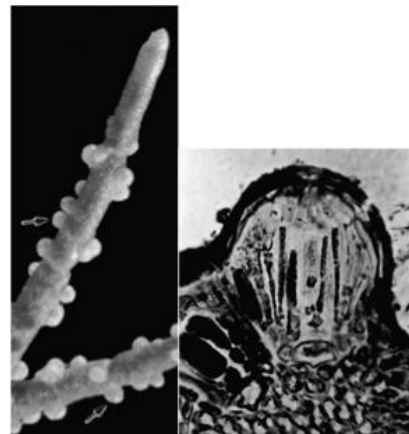
2. Forma de crecimiento: (0) Costroso, (1) Arborescente.

Este carácter parecería directamente relacionado con el anterior, y de hecho lo está. Sin embargo, cabe aclarar, que hay especies de coralinas que a pesar de tener una forma de crecimiento costrosa, y no presentar áreas del tejido descalcificadas, varían en su hábito y constituyen las diferencias para caracterizar géneros y especies, entre los costrosos se encuentran los lisos, rugosos, protuberantes, entre muchos otros, como *Lithophyllum*, *Hydrolithon*, *Neogoniolithon*. Los talos arborescentes son aquellos que son erectos y forman ramas las cuales pueden variar y ser acintadas (aplanadas), arrossetadas, espiniformes, foliosas, entre muchas otras, tal como *Mastophoropsis* y *Metamastophora* que son flabeliformes (Woelkerling, 1988) . (Woelkerling, Irvine & Harvey, 1993).

3. Forma de vida: (0) Semiendofítico, (1) Epígeno (de vida libre-rodolito), (2) Endofítico.

Los organismos con forma de vida semiendófitos presentan el talo vegetativo inmerso en el tejido del hospedero y solo las estructuras reproductoras son externas y calcificadas, como en *Choreonema* y *Lesueuria*. Los talos endofíticos están representados por *Austrolithon* y *Boreolithon* donde la mayor parte del talo crece en el talo del hospedero, incluyendo los conceptáculos.

Su talo es difuso y solo se encuentra parcialmente consolidado en las regiones donde se forman los conceptáculos. Por otra parte están los talos cuyos cuerpos vegetativos son epibióticos calcificados pero que tienen sus estructuras de fijación ancladas al hospedero o al sustrato, ya sean haustorios o rizoides, como en la mayoría de las coralinas. Los epígenos se desarrollan sobre un sustrato, o ruedan libres en el fondo marino (rodolitos).

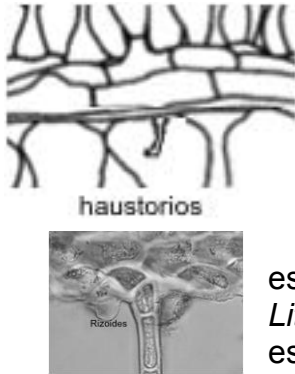


Choreonema. Conceptáculos visibles sobre ramas de *Jania* spp. Tomado de Broadwater 2002.

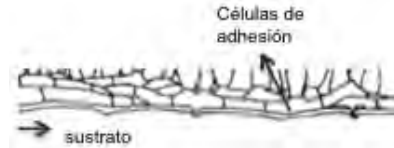
Woelkerling (1988) considera este carácter como parte de la forma de vida. En este estudio se ha separado y se le ha denominado forma de vida, debido a que los taxones que son endófitos o semiendófitos han pasado por una serie de modificaciones-adaptaciones morfológicas y fisiológicas para sobrevivir dependiendo de otros organismos. Estos taxones han perdido varios caracteres del grupo al que pertenecen (*Lesueuria*: Mastophoroideae) y han simplificando sus talos, tal como ocurre con otros organismos parásitos o semiendófitos animales o vegetales, donde hay una pérdida o reducción de estructuras. Por tal motivo, se propone que se analicen los caracteres ontogenéticos de estas especies para ubicar mejor tanto su posición taxonómica como sus relaciones filogenéticas dado que no forman un linaje en sí mismos.

4. Adhesión al sustrato: (0) Células de adhesión, (1) Haustorios, (2) Rizoides, (3) Disco de fijación.

Este carácter está relacionado con la forma crecimiento y la forma de vida. Y se refiere a cómo se sujetan los organismos al sustrato. La forma más común en las coralinas es la presencia de células de adhesión, que ocurre en las formas costrosas incrustantes.



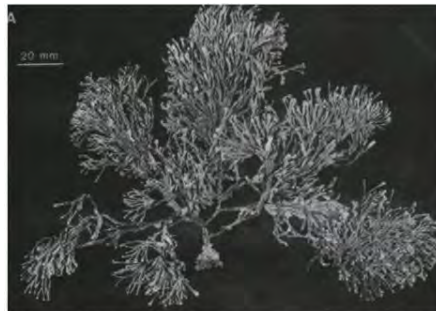
Los haustorios son células o extensiones de células basales del talo, las cuales se considera tienen la función de anclaje y absorción de nutrientes de un hospedero. Se caracterizan por tener haustorios los géneros *Ezo*, *Kvaleya* que son epifitas, mientras que *Lesueuria* es semiendófito. *Mastophora* y *Lithoporella* se caracterizan por estar adheridos al sustrato por células de adhesión o por rizoides dispersos.



Los discos de fijación son pequeñas costras que sostienen un estípote, o eje principal de donde se ramifica los talos característicos de *Metamastophora* y *Mastophoropsis*.

5. Estipe: (0) Ausente, (1) Presente.

No todos los talos arborescentes tienen estípote, por ejemplo *Mastophora*.



Metamastophora spp. Coralina no geniculada, frondosa, con disco de fijación y estipe.
Tomada de Woelkerling, 1988

6. Calcificación del talo: (0) Ausente, (1) Presente.



Este carácter se usó para delimitar al grupo externo, los cuales son no calcificados. Los talos con calcificación característica son las Corallinales. Las Corallinales asimilan HCO_3^- para precipitar CaCO_3 en sus tejidos a fin de construir sus estructuras biológicas rígidas constituidas de mineral micro y nanoestructurado, cuya formación está controlada biomolecularmente y en estrecha relación con el proceso de fotosíntesis. La calcita romboédrica isomórfica y birrefringente es la estructura más estable, sin embargo, también está ampliamente representada la aragonita (forma orto-rómbica) a temperatura y presión estable.



Por otro lado, la relación Ca:Mg presente en las diferentes especies, puede explicarse por la relativa abundancia de Mg en el medio marino, y por el hecho de que el Ca^{2+} en la calcita puede ser reemplazado por cationes de radio pequeño, tales como Mg, Fe, Zn y Cd. Por otra parte la aragonita, acepta cationes con radios más grandes que el calcio, tales como el Sr, Pb y Ba y puede ser enriquecido en SrCO_3 . La depositación de CaCO_3 , es 10 veces más rápida en presencia de luz que en la oscuridad (Borowitzka, 1982). Por otra parte, el proceso de calcificación es altamente dependiente de energía. Se demostró una alta actividad de la ATPasa dependiente de Ca en tres especies de corallinas.

La fotosíntesis puede favorecer el proceso de cristalización indirectamente por elevación del pH cerca de la superficie del alga si el CO_2 y/o el HCO_3^- están siendo capturados. Craige (1990) Por lo que se sugiere que el carbono que es capturado por el proceso de respiración es fijado e inmediatamente pasa a formar parte de las paredes celulares (Borowitzka, 1982). Recientemente se encontró que los depósitos de calcita-aragonita sobre las paredes celulares, tienen un muy bajo contenido de materia orgánica ocluida dentro de los cristales; siendo más probables los hidratos de carbono; y se mostró que las proteínas no están relacionadas con la síntesis mineral o con su estabilización. Esto podría explicarse si el biomineral fuera sintetizado por un proceso extracelular de mineralización controlado biológicamente. Para algunas especies de corallinas geniculadas, las formas y tamaños de los cristales, presentan dos formas características, en placas y en agujas de diferentes tamaños, entre 20 y 100 nm. (Fragoso *et al.* 2010).

7. Región calcificada del talo: (0) Parcial reproductiva, (1) Total, (2) Parcial vegetativa.



La calcificación parcial reproductiva se da en talos semiendófitos, donde solo el tejido reproductor que sobresale del hospedero presenta calcificación. La

calcificación parcial vegetativa se presenta en talos geniculados, donde la genícula es la región vegetativa que no se calcifica.

8. Consistencia de la calcificación: (0) Dura, (1) suave.

Woelkerling (1988:137) menciona que los estípites y las porciones más viejas de las hojas muestran una menor calcificación así como las porciones más jóvenes en *Metamastophora*. Por otra parte, los talos de *Lesueuria* a pesar de que pueden tener una organización dorsoventral y estructura dímera, parte del talo en el interior del hospedero está no consolidado, lo cual implica que ha perdido el carbonato de calcio de las paredes celulares o esta es muy insignificante.

9. Presencia de células corticales: (0) Sobre la intergenícula, (1) Cubriendo la genícula e intergenícula.

Carácter relacionado con taxones geniculados. Es considerado un carácter importante para delimitar subfamilias de acuerdo con Woelkerling (1988). Los taxones en donde la genícula está más o menos corticada delimitan a los taxones de la desaparecida subfamilia *Amphiroideae*.

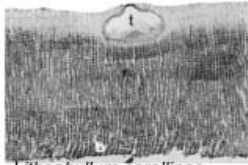
Los taxones donde la genícula no es corticada pertenecen a la subfamilia *Corallinoideae*. Finalmente están los taxones que tienen la genícula completamente corticada pertenecientes a la subfamilia *Metagoniolithoideae*.



Genicula corticada de *Amphiroa* spp.

CARACTERES ANATÓMICOS

10. Consolidación del talo: (0) Filamentoso, (1) Pseudoparenquimatoso.



Lithophyllum corallinae
Talo pseudoparenquimatoso
dorsoventral

Este carácter está relacionado con la forma de vida endófito y semiendófito, en donde los filamentos del talo pierden su calcificación y por lo tanto su estructura parenquimatoso, observándose un arreglo difuso de los filamentos.

11. Organización del talo: (0) Dorsoventral, (1) Bilateral, (2) De organización no definida.

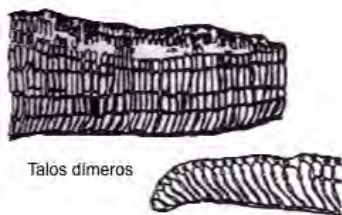
La organización del talo en forma bilateral es una característica que solo ocurre en *Tenarea*, e involucra un tipo especial de organización dímica. Cada rama del talo consiste de dos hileras de filamentos primigenios constituidos de células en empalizada. Los filamentos postígenos son limitados excepto en la formación de conceptáculos. La organización dorsoventral se refiere a talos de crecimiento radial, extendido, más o menos aplanados, con dos superficies características, la ventral y la dorsal. La organización no definida es característica de las especies endófitas y semiendófitas.

12. Construcción del talo: (0) Dímero, (1) Monómero, (2) Difuso.

13. Arreglo del talo: (0) No coaxial, (1) Coaxial.

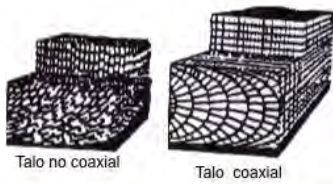
La construcción y arreglo del talo se refiere a como se desarrollan las células de los filamentos y cómo se ordenan en el espacio.

Los talos dímeros involucran dos tipos de filamentos, los cuales se orientan a ángulos rectos unos respecto de otros. Los talos monómeros presentan un sistema de filamentos repetidamente ramificados. Los filamentos basales se desarrollan paralelamente unos de otros paralelos a la superficie del sustrato. De estos filamentos algunas de sus ramas se curvan hacia la superficie para dar lugar al grosor de la costra. Los talos difusos involucran un solo sistema de filamentos que pueden o no estar ramificados, los cuales están parcialmente consolidados y en general carece de alguna estructura.



Los talos Dímeros y Monómeros forman pseudoparénquimas, mientras que los talos difusos no.

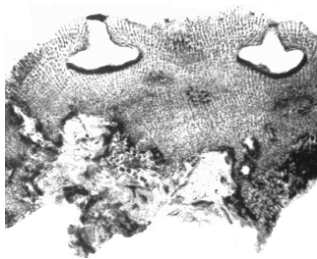
Coaxial se refiere a la organización anatómica de los células en porciones monómeras de los talos, en donde éstas están alineados los filamentos y las paredes terminales de las células parecen formar hileras que se curvan (*Mesophyllum* y *Neogoniolithon*).



Su contraparte son los talos plumosos, donde las paredes terminales células de los filamentos de talos monómeros no se alinean en hileras y donde parte de los filamentos se curvan tanto hacia la superficie ventral y parte hacia la superficie dorsal, o se curvan para formar protuberancias en la superficie del talo (*Synarthrophyton*). Este carácter ha sido considerado por Woelkerling para la delimitación de géneros, sin embargo, parece haber la presencia combinada de ambos tipos de organización en poblaciones de la misma especie, por lo cual se debe considerar con precaución. Woelkerling (1988). Dada esta observación, en este estudio se consideró más útil usar solo el carácter mejor delimitado (coaxial).

14. Grosor del talo vegetativo: (0) Mono-bistromático, (1) Polistromático.

El grosor del talo ha sido usado en diferentes momentos y por diferentes autores de varias formas, una de ellas representada por el número de capas celulares del talo.



Otra forma es por una medida cuantitativa particular, y la última está dada por un valor cualitativo: “gruesos” o “delgados”. Este carácter resulta importante para delimitar a *Lithoporella* y *Mastophora* (talos de 3-2 células de grosor) de *Metamastophora* (talos de hasta 50 capas de células de grosor). Los tres géneros se caracterizan por poseer un talo de construcción dímera y filamentos primigenios con células en empalizada.

Sin embargo, también se ha usado para diferenciar a *Hydrolithon*, *Pneophyllum*, *Melobesia* y *Spongites*.

15. Células epitiales: (0) Ausentes, (1) Presentes en regiones reproductivas, (2) Presentes en todo el talo, (3) Parcialmente presentes en regiones vegetativas

Las células epitiales en el caso de *Lesueuria*, solo se presentan en las regiones reproductivas y no en las vegetativas, por eso se optó por indicarlo como parcialmente presentes. Por otro lado para la opción 3, las células epitiales están presentes en la región intergenicular pero no en la génicula de las Corallinoideae y algunas Lithophylloideae.

16. Forma de las células epitaliales: (0) Redondeadas a aplanadas, (1) acampanadas.



Las células acampanadas originalmente fueron descritas para el género *Lithothamnion* y este tipo de ensanchamiento que presenta la pared distal de las células epitaliales es característico también de Sporolithaceae y del género *Exilicrusta*.

17. Organización de las células del hipotalo: (0) Células en empalizada, (1) Células no en empalizada (columnares)

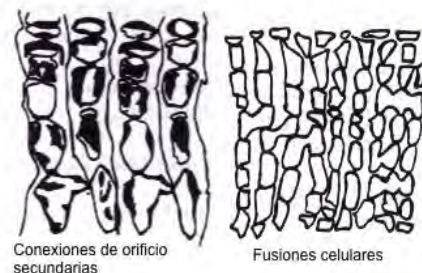
Las células en empalizada las define Woelkerling (1988) como células vegetativas de crecimiento paralelo al sustrato, y son más anchas que largas, si consideramos su patrón de formación, que está dado por la presencia de las conexiones de orificio primarios. Esto es, las paredes que poseen las conexiones de orificio primarias son mucho más largas. Este tipo de células solo ocurre en los filamentos primigenios de algunos géneros. Por otra parte, los filamentos primigenios son aquellos que en los talos dímeros forman una capa uniestratosa dorsoventral o dos capas centrales en talos bilaterales y surgen directamente de la germinación de las esporas.

Las células columnares son mucho más largas que anchas, esto es, las paredes que presentan las conexiones de orificio primarias son mas cortas. Este tipo de célula está mayormente distribuido en los taxones de las coralinas. En los talos dímeros, los filamentos postígenos forman ángulos rectos con los filamentos primigenios y nunca surgen directamente de la germinación de una espora.

18. Conexiones de orificio secundarias: (0) Ausentes, (1) Presentes.

19. Fusiones celulares: (0) Ausentes, (1) Presentes.

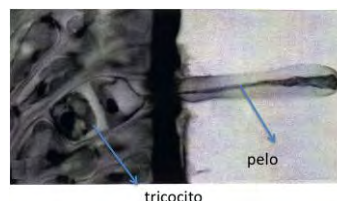
Las uniones celulares es uno de los principales caracteres de delimitación a nivel subfamilia (fusiones celulares vs conexiones de orificio secundarias, de acuerdo con Woelkerling (1996). Para el tipo de uniones celulares entre los filamentos adyacentes se tienen en las coralinas dos tipos: las conexiones de orificio secundarias y las fusiones celulares: la presencia de conexiones de orificio secundarias es una características consistente, pero que ocurren individualmente en otros



ordenes, es decir, no se presentan las fusiones. Dando una combinación única solo en el grupo de las Corallinales (Silva y Johansen, 1986). Las fusiones celulares se han vuelto el tipo de unión dominante, pero se han encontrado en muchos taxones, presencia relativa de conexiones de orificio secundarias en los talos y forman los filamentos postígenos.

20. Tricocitos: (0) Ausentes, (1) Presentes.

Denominados también por algunos autores como megacélulas. Son células desarrolladas a partir de filamentos postígenos, de mayor talla que las células vegetativas adyacentes, presentan gruesas paredes y son capaces de absorber con mayor intensidad los colorantes. Los tricocitos pueden presentarse sobre la superficie del talo de forma aislada, en campos horizontales, pueden ser capaces de presentar finos pelos o cicatrices que muestra que los tuvieron. En otros casos pueden presentarse inmersos en el tejido pseudoparenquimático.



21. Capas de los tapones de las conexiones celulares: (0) Una, (1) Dos.

22. Estructura de las capas de los tapones de las conexiones celulares: (0) Simple, (1) Placa, (2) Domo.

El carácter 21 y 22 están relacionados con las características del orden y fueron considerados para separar al grupo externo del interno. Pueschel (1982). Se denomina tapones a las estructuras que se encuentran entre las conexiones de orificio secundarias (pit-plugs). Después de que se forma una conexión de orificio, aparecen las membranas tubulares. Alrededor de las membranas se acumula una proteína granular formando un tapón en el centro de la conexión de orificio. Las membranas tubulares finalmente desaparecen. La presencia de otras estructuras asociadas a estos tapones depende del grupo taxonómico involucrado, pues es una característica usada para delimitar ordenes.

Algunos órdenes solo presentan un corazón central o tapón central sin ninguna estructura asociada, tal como las Rhodochaetales, Compsogonales, Ahnfeltiales, Gracilariales, Bonnemaisionales, Gigartinales, Rhodimoniales y Ceramiales. Que sería el tipo más básico y simple. Otros presentan una membrana cubriendo el tapón denominada capa (cap membrane) o capuchón, como las Bangiales, Hildenbrandiales, Gelidiales, (que en nuestro estudio hemos denominado como el estado de carácter simple, por presentar solo un solo capuchón o cubierta (carácter 0). En otros órdenes hay dos capas de material que cubren el tapón. Cuando se presentan dos capas protectoras o capuchones, a estos los separa una membrana. La capa externa puede ser delgada, formando una placa (estado de carácter 1 en este estudio) y que se presenta en el grupo de Nematiales, Palmariales.



Dos capas en forma de domo.
Tomado de Cole & Sheat (1990)

En otros casos esta membrana forma una estructura más compleja a manera de domo (Corallinales). El uso de la

morfología del tapón de las conexiones de orificio primarias para caracterizar al orden (propuesto por Pueschel y Cole (1982) y Pueschel (1987) parece prematuro de acuerdo con Woelkerling (1988), bajo el argumento de que sólo se ha comprobado este carácter en una decena de especies de las subfamilias Corallinoideae y Melobesioideae, de las aproximadamente 2000 que involucra el orden.

23. Espacio entre las conexiones de orificio secundarias y el citoplasma: (0) Ausente, (1) Presente.

Este espacio es característico del orden Corallinales, y se usó para separar a los taxones del grupo externo. Pueschel (1990).

24. Células de la genícula: (0) Unizonal, (1) Multizonal simple, (2) Multizonal ramificada.

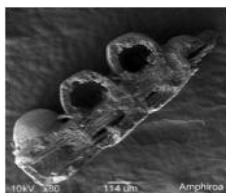
Características de la estructura y construcción de la genícula de especies articulados que se han usado para separación de géneros. Unizonal para *Lithothrix* (con conexiones de orificio secundarias) y las Corallinoideae (con fusiones celulares características), multizonal simple para *Amphiroa* y multizonal ramificada para *Metagoniolithon*.

25. Filamentos medulares en la genícula: (0) Rectos, (1) Oblicuos / entrelazados.

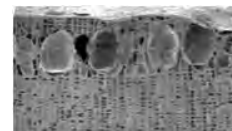
Este es un carácter que separa a la subfamilia Metagoniolithoideae de Lithophylloideae (para sus representantes articulados) y Corallinoideae.

CARACTERES ANATOMICO REPRODUCTIVOS

26. Tipo de esporangios reproductivos: (0) Soros inmersos en tejido pseudoparenquimatoso calcificado, (1) Conceptáculos inmersos en tejido no calcificado, (2) Conceptáculos calcificados, (3) Soros entre filamentos ordenados no calcificados.



Existe más de un patrón de desarrollo de los conceptáculos, sin embargo éstos son únicos en las corallinas tipo *Mesophyllum*, *Neogoniolithon* o *Lithophyllum*. (2). *Sporolithon* y *Heydrichia* no desarrollan sus estructuras reproductoras en conceptáculos, éstas están inmersas en el tejido vegetativo calcificado, aunque se reconocen compartimentos, donde los esporangios se desarrollan individualmente protegidos por los filamentos vegetativos (involucro), a todo este conjunto se le denominó *–complejo esporangial⁷*- por Townsend *et al.* (1994). Verheij (1993) los consideró como soros (0).



⁷Ahora bien, siguiendo a la autora tenemos que llamó a los filamentos estériles modificados que rodean al compartimento como „pared pseudoparenquimatosas”. Sin embargo, el término pared en Corallinales, usualmente se refiere más colectivamente a paredes celulares *sensu stricto*, por otra parte, todas las

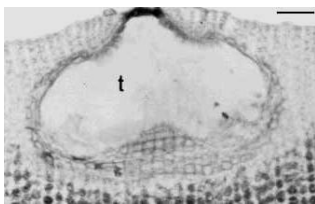


Por otra parte se encuentran los conceptáculos característicos de rodofitas no calcificadas costrosas, como *Hildenbrandia* (1).

El carácter 3 representa los soros presentes en el resto de las rodofitas formados por filamentos no calcificados, tal como se presentarían en *Palmaria* o *Gelidium*.

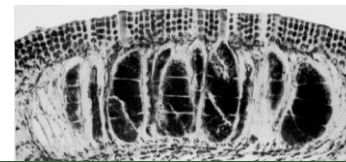


27. Poros conceptaculares: (0) Más de uno, (1) Uno.

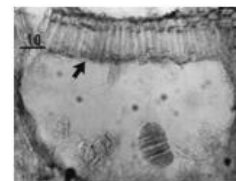


Carácter para delimitación de familias Sporolithaceae y Hapalidiaceae. Es un carácter asociado a talos no geniculados, con fusiones celulares como el tipo de interconexión entre filamentos predominante.

28. Grosor del techo conceptacular esporangial: (0) Una capa de células, (1) Varias capas de células.



Carácter diagnóstico a nivel de género. *Choreonema* presenta una sola capa de células formando el techo de sus conceptáculos esporangiales, y no presenta células epitaliales, en otros géneros se pueden presentar dos capas de células o ser aún más gruesos.



29. Filamentos dentro conceptáculo esporangial: (0) Columela, (1) Paráfisis, (2) Filamentos calcificados, (3) Ausentes.

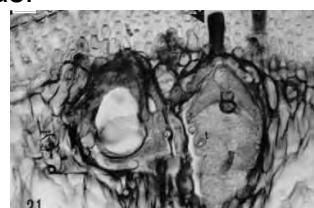
Es un carácter que está relacionado con el origen de la formación de la cámara conceptacular. Las cámaras formadas por filamentos intercalados entre los

partes estériles del talo son descritas como 'pseudoparenquima' en las Sporolithaceae (Woelkerling 1996), p. 153). Por lo que la definición de la estructura puede causar *confusión*. Respecto al término involucro Bold & Wynne (1985) y Womersley (1994) usaron el término involucro para describir un grupo de células estériles o filamentos formando una envoltura alrededor de una estructura reproductora. Aunque el término involucro frecuentemente aplica a filamentos que rodean a un carposporofito (Bold & Wynne 1985, pp. 561 y 612 para *Liagora* (p. 612), Ceramiaceae; y Hommersand & Fredericq 1990, figs 13-17 para *Gigartina*, este también ha sido aplicado a soros anteridiales masculinos (Bold & Wynne 1985, p. 338, para *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux).

esporangios, suelen presentar grupos de filamentos calcificados persistentes entre los esporangios (como en *Sporolithon*). En la subfamilia Melobesioideae estos grupos de filamentos intercalados se presentan pero no están calcificados (paráfisis). En algunos géneros mastoforoides y litofiloides se suele presentar también un grupo de filamentos en el centro del conceptáculo, los cuales llegan a ser senescentes y se denominan columela. Se ha relacionado a la columela con la formación del poro conceptacular.

30. Tapones esporangiales: (0) Ausentes, (1) Presentes.

Los tapones esporangiales son engrosamientos de la pared de los tetrasporangios, formados de mucílago su región apical en las especies de la familia Sporolithaceae y Hapalidiaceae exclusivamente. Este carácter está relacionado con las cámaras tetrasporangiales multiporadas.



31. División tetrasporangial: (0) Cruciado, (1) Zonado.

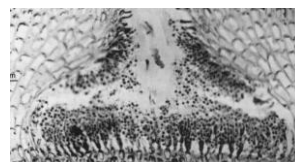
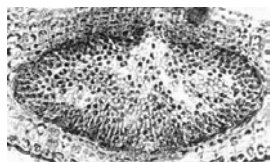
El patrón de división de las esporas es zonado en las Corallinales. Sin embargo, en una sola planta del género *Sporolithon* puede presentarse el patrón cruciado, o irregularmente zonado o zonado (Woelkerling, 1988). En el caso de *Heydrichia* los tetrasporangios están cruciadamente divididos. (Townsend, Chamberlain & Keats, 1994).

32. Estructuras reproductivas masculinas: (0) No en conceptáculos, (1) En conceptáculos.

33. Ramas espermatangiales: (0) Simples, (1) Ramificadas dendroides.

Carácter para delimitar al grupo externo. Los espermatangios se desarrollan en grupos de 2-5 sobre la célula madre de los esporangios en las rodofitas más primitivas (Bangiales filamentosas). Donde un solo espermacio se diferencia en cada espermatangios.

En las rodofitas más avanzadas (taloides) los espermatangios se forman en soros, son formados en ramas filamentosas derivadas de una célula inicial y alineada a la superficie de la cavidad. Los arreglos y patrones pueden variar dependiendo del orden. (Hommersand & Fredericq, 1990). En Corallinales los espermatangios se forman a partir de células iniciales que se encuentran en el piso de la cámara conceptacular, o en el piso, paredes y techo. Las cámaras espermatangiales son uniporadas. Las ramas espermatangiales pueden presentarse simples o dendroides.



34. Estructuras reproductivas femeninas: (0) En conceptáculos, (1) carpogonios desnudos o en cistocarpos.

Carácter para delimitar al grupo externo. En *Palmaria* los carpogonios se presentan como células individuales sólo en plántulas jóvenes. En *Gelidium* se presentan cistocarpos, los cuales son estructuras que formadas por tejido fotosintético externo, tejido diferenciado, gametofítico no fotosintético y desarrollo del carposporofito. En coralinas se presenta un conceptáculo gametangial donde en su base se diferencian células gametangiales (carpogonios formados por dos células y células auxiliares basales, después de la fecundación, las células auxiliares se fusionan y forman una fusión celular de la cual surgen los filamentos gonimoblásticos o carposporofito.



CARACTERES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO

35. Origen del techo conceptacular masculino: (0) sobrecrecimiento, (1) formado por tejido epi y peritalial (filamentos intercalados).

De acuerdo con Woelkerling (1988), hay dos modos de formación del techo, uno que denomina centrípeta (por sobre-crecimiento de filamentos) y vertical (por filamentos intercalados del tejido peri y epitalial). Solo se tiene registrado el crecimiento por filamentos intercalados en dos géneros *Clathromorphum* y *Melobesia*) y originalmente fue un carácter para separar géneros en la subfamilia Melobesioideae.

36. Células de los filamentos carpogoniales: (0) Dos células, (1) Una célula.

Las ramas carpogoniales en el orden Corallinales son bi-celulares con una célula sustentadora que sirve como célula auxiliar. En las cámaras gametangiales se desarrollan varias ramas carpogoniales, pero solo una es fecundada. Tras la fecundación varias células sustentadoras se fusionan para formar una gran célula de fusión (fusión celular), de la que parten los filamentos gonimoblásticos.

37. Fusión celular carpogonial: (0) Delgada y extendida, (1) Central conspicua (Gruesa y compacta), (2) Irregular y discontinua, (3) Corta.

No hay una descripción clara de esta estructura y Woelkerling (1988) menciona las siguientes variantes para este carácter:

a) fusión celular central de la cual surgen varios filamentos gonimoblásticos de algunas células los cuales soportan a los carposporangios terminales (*Choreonema*, *Lithophyllum*, *Amphiroa*, *Austrolithon*).

b) conspicua fusión celular central y varios filamentos gonimoblásticos de algunas de una célula que soportan a los carposporangios terminales (*Lesueuria*, *Metamastophora*, *Mastophora*, *Lithoporella*).

c) larga fusión celular central con cortos filamentos gonimoblásticos portando carposporangios terminales (*Spongites*, *Hydrolithon*, *Pneophyllum*).

d) carente de una fusión celular larga, portando cortos filamentos gonimoblásticos que en su parte terminal forman los carposporangios (*Neogoniolithon*).

e) delgada fusión celular dando lugar a filamentos de 2-6 células que portan los carposporangios (*Corallina*, *Metagoniolithon*).

f) superficie de la fusión celular con filamentos de 2-4 células que portan los carposporangios (*Arthrocardia*).

g) filamentos gonimoblásticos marginales que portan los carposporangios (*Jania*).

h) gruesa fusión celular con cortos filamentos gonimoblásticos que portan los carposporangios (*Haliptilon*, *Cheilosporum*).

i) fusión celular (no siempre evidente) con cortos filamentos gonimoblásticos portando los carposporangios terminales (*Synarthrophyton*).

j) Careciendo de una fusión celular o con una fusión celular discontinua, o con una fusión celular compleja y cortos filamentos gonimoblásticos que portan los carposporangios (*Mesophyllum*, *Melobesia*, *Mastophoropsis*, *Lithothamnion*, *Phymatolithon*).

Por lo que se decidió resumir tales características como sigue: opciones

a-b-h = estado de carácter (0)

c-e = estado de carácter (1)

d = estado de carácter (3)

fg = no determinados (?)

i-j = estado de carácter (2)

38. Desarrollo del filamento gonimoblasto: (0) Sobre la fusión celular, (1) Directamente de un carpogonio fertilizado.

Como se señaló en el carácter anterior, no está definido para todos los taxones donde se forman los filamentos gonimoblásticos, algunas veces se menciona que de la superficie ventral de la fusión celular, otras veces que a partir del margen, como en varias *Corallinoideae*. En este ejercicio se ha asumido que todas las variantes que se describen (superficie, superficie ventral y margen) se incluyen en el estado de carácter (0), que claramente se distingue del otro estado de carácter que ha sido descrito en las coralinas para *Sporolithon*.

39. Conceptáculos esporangiales originados sobre tejido del peritalo:

40. Conceptáculos esporangiales medulares

41. Conceptáculos esporangiales desarrollados en el tejido cortical

42. Conceptáculos esporangiales corticales y axiales

43. Conceptáculos esporangiales medulares y marginales

Los caracteres 39 a 43 fueron tratados de forma independiente, dado que algunos taxones tienen una región particular en el talo para formar los conceptáculos esporangiales. Se trataron de forma independiente para ver su grado de asociación. No se trataron como estados de carácter debido a que desde el principio se consideró la propuesta de Cabioch (1972) de que los taxones que presentan talos articulados no están relacionados filogenéticamente.

44. Patrón de elongación de las células iniciales: (0) Corto, (1) largas (2) iguales.

El patrón de elongación celular es un carácter que Woelkerling (1988) considera como una característica para delimitar géneros.

A) El primer patrón que se reconoce es donde las células iniciales primeramente se elongan y luego se dividen por lo que la elongación celular ocurre en las células iniciales vegetativas principalmente como fue observado en *Clathromorphum*.

B) El segundo patrón se observó en *Phymatolithon*, donde las células iniciales se alargan muy poco y se dividen, por lo que la mayor parte de la elongación celular ocurre en las células vegetativas recién formadas. Sin embargo, estos patrones de elongación solo son considerados formalmente para ambos géneros mencionados y no se conocen a ciencia cierta los patrones en el resto de las coralinas. Este carácter puede ser útil filogenéticamente pero requiere de la observación de su comportamiento en muchos otros géneros.

45. Techo de los conceptáculos esporangiales formado por filamentos intercalares al área fértil:

46. Techo conceptacular esporangial formado por filamentos que rodean el área fértil

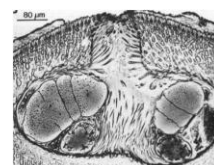
Hay dos patrones de formación del techo conceptacular tetrasporangial, de acuerdo con Townsend (1981) y Woelkerling (1988).

El primero lo describe el carácter 45 que ocurre en *Ezo*, *Lithoporella* y todos los géneros de Melobesioideae. Townsend (1981) encontró la formación de los techos conceptaculares de este tipo de manera consistente en *Lithophyllum* y *Titanoderma*.



El segundo el carácter (46) ocurre en *Choreonema*, *Lesueuria*, *Mastophora* y *Metamastophora*. *Spongites*, *Neogoniolithon*.

Woelkerling en su revisión de 1996, menciona que *Pneophyllum*, *Hydrolithon* y *Spongites* presentan ambos tipos de formación del techo conceptacular.



47. Formación de los tetrasporangios en la cámara conceptacular: (0) Sobre el piso de la cámara, (1) En los márgenes de la cámara.

Woelkerling (1988) considera este carácter para delimitar de géneros. Menciona que las células iniciales de las células esporangiales se desarrollan en forma dispersa por todo el piso de la cámara conceptacular (0), o más o menos alrededor de un anillo hacia la periferia del piso de la cámara conceptacular (1). Este patrón de distribución parece estar correlacionado con la presencia de columela.

48. Patrón de descalcificación de la genícula: (0) Medular, (1) Meristemo apical.

Johansen (1969) propuso que hay dos patrones de descalcificación en las especies de coralinas geniculadas. Uno que inicia en la región medular como en *Lithophylloideae*) y el otro que ocurre en las células terminales del meristemo apical (*Corallina*, *Metagoniolithon*).

49. Origen de los gametangios masculinos en la cámara conceptacular: (0) Sobre el piso de la cámara, (1) En el piso, paredes y techo de la cámara, (2) Sobre el piso y paredes de la cámara

De acuerdo con Woelkerling (1988), Lebednik (1978) notó que en todos los géneros de *Melobesioideae* las ramas espermatangiales estaban formadas en el piso, paredes y techos de los conceptáculos a excepción del resto de coralinas donde dichas estructuras están confinadas solo al piso. Sin embargo, *Exilicrusta* tiene espermatangios simples confinados solo al piso, lo que la diferencia del resto de taxones entre otras cosas.

Los siguientes caracteres fueron considerados como importantes y se asume que son significativos en su contenido filogenético, sin embargo no fueron usados debido a la falta de información para los taxones.

00. patrón de germinación de las esporas

De acuerdo con Woelkerling (1988) el desarrollo de las esporas se caracteriza por la fijación de la espora, después se segmenta y se transforma en una masa germinativa de células a partir de las cuales se forman las células iniciales del talo erecto. El autor muestra la regularidad de las primeras divisiones de la espora que conducen a la formación de una masa regular de células sobre el margen del cual se elaboran las células iniciales del talo adulto, concluyendo una generalidad del proceso para toda la familia. Posteriormente Adey (1965) en Woelkerling (1988) estudió el desarrollo de las esporas de *Clathromorphum*. Johansen (1969) mostró las primeras etapas de desarrollo *Calliarthron*. De acuerdo con Woelkerling hay poca información para este carácter de tal manera que no pueden proponerse patrones taxonómicos.

00. Meristemos terminales e intercalares

Las células meristemáticas intercalares no están presentes en todas las especies de coralinas y pueden ser características de especies en otros órdenes como las *Delesseriaceae*. (Woelkerling, 1988). Forman el tejido que da grosor a los talos costrosos y origina la intergenícula en los talos arborescentes articulados. Las células en constante división están protegidas por células superficiales (el epitalo).

00. Sistema de filamentos procarpiales.

Relacionado con los eventos de post-fertilización. Los filamentos procarpiales involucran un carposporofito resultante (fue llamado por Schmitz (1892) sincarpio), implicando que era de una naturaleza compuesta, donde según él, existían involucradas numerosas células auxiliares más que múltiples fertilizaciones. Sin embargo, esto no está descrito para la gran mayoría de taxones (Silva y Johansen, 1986)

00. Presencia de Bisporas.

La fase bisporangial es presumiblemente diploide (como parte de la reproducción de autoperpetuación asexual), sin embargo esto no está comprobado aun para una gran mayoría de taxones. (Silva y Johansen, 1986; Woelkerling, 1988, 1996).

00. Patrones de desarrollo morfogenético

Cabioch (1972), hace un amplio estudio sobre el desarrollo morfogenético de especies particulares de coralinas y bajo condiciones de cultivo. Sin embargo, no hay una definición y delimitación clara de que tipo de desarrollo ocurre de manera inequívoca en cada género del grupo de las coralinas, puesto que la mayor parte de los estudios realizados se hace sobre poblaciones de talos adultos, y esto puede enmascarar el desarrollo.

DISCUSIÓN

Anatomía vegetativa

En las algas coralinas existen varias estructuras vegetativas características que han sido usadas en la taxonomía del grupo y que sin embargo hay que considerar algunos detalles.

Las células epitaliales o células de cubierta (cap cells), que se encuentran en la superficie del talo, están descalcificadas y por lo tanto algunas veces no están bien preservadas en material seco. Estas células por tanto, tienden a colapsarse y a perderse tanto en material preservado como aquel que es preparado para microscopía electrónica de barrido. El fenómeno de pérdida de las células epitaliales puede dejar huecos en la superficie del talo. Estos huecos han sido reconocidos por Garbary (1978) como concavidades epitaliales. Por lo que el uso de este carácter debe ser manejado con precaución y considerar los estados de carácter asociados. Es decir, si están presentes las células epitaliales, si no lo están o si existe rastro de su existencia a través de las concavidades.

Los tricocitos o megacélulas o heterocitos son células diferenciadas del resto de las células vegetativas, son más grandes, con paredes más gruesas y se tiñen intensamente. Potencialmente son capaces de formar un pelo en su superficie. La variación encontrada en la expresión de este carácter

corresponde al nivel de especie, por lo que en este estudio solo se consideró su presencia o ausencia.

Morfogénesis

Variación en el patrón de germinación de las esporas no se ha logrado identificar plenamente debido a que las células que se producen durante la germinación y el desarrollo temprano del talo, son incorporadas rápidamente a la estructura del talo y su patrón es irreconocible. Sin embargo, en talos de pocas células de grosor como *Melobesia* y *Choreonema*, las células que se producen durante los primeros estados de desarrollo son reconocibles y usualmente están arregladas en patrones distintivos (Woelkerling, 1988). Esto sugiere que podrían encontrarse patrones comunes al interior del orden, sin embargo, hace falta un análisis a mayor detalle de este proceso.

El ciclo de vida característico de las corallinas es la reproducción sexual trifásica, sin embargo, se han reportado especies apomícticas, es decir, que producen esporas sin que ocurra meiosis ni fertilización, por lo que sus descendientes son genéticamente idénticos. En otras especies solo se ha registrado la reproducción asexual por fragmentación y en otros casos solo se han registrado especies en estado estéril, siendo la información de las características sexuales fragmentada y varios detalles sobre estructuras reproductoras y procesos de formación de las mismas deberán ser descritos.

CONCLUSION

Aun cuando hay mucha información que parece contener un gran significado evolutivo y filogenético para las especies del orden Corallinales, la falta de información o la información fragmentada que existe hasta el momento forzó a que se usara solo para los análisis de filogenia solo los caracteres más representativos y con información para los taxones seleccionados.

IV.4. Relaciones Filogenéticas del Orden Corallinales (Rhodophyta): A partir de análisis morfológicos y combinados de caracteres.

RESUMEN

Se evaluó el contenido filogenético de los caracteres morfológicos comúnmente usados por la taxonomía clásica para el orden Corallinales. Fueron realizados análisis de máxima parsimonia de datos morfológicos, moleculares y de datos combinados. A partir del análisis morfológico se propone que las corallinas tuvieron una divergencia en su evolución, originando por una parte a Melobesioideae por otra Lithophylloideae y Mastophoroideae-Corallinoideae (s. str.). El análisis del gen 18s ARNr concuerda parcialmente con la hipótesis anterior. El cladograma de datos combinados sugiere que *Sporolithon* y *Heydrichia* son taxones basales y parafiléticos compartiendo los caracteres más primitivos de las Rhodophyta (conexiones intercelulares secundarias y estructuras reproductoras desarrolladas en soros). Los géneros *Boreolithon*, *Austrolithon*, *Choreonema* y *Lesueuria* conforman un clado monofilético apoyado por tres caracteres: pérdida de calcificación del talo vegetativo; ausencia de cualquier tipo de unión celular y techos conceptaculares tetrasporangiales formados por una sola capa de células. Se discute el valor filogenético de estos caracteres y la posibilidad de que enmascaren otro tipo de información biológica, ya que están más relacionados con la forma de vida endófito. Adicionalmente, se propone que la genícula tiene cuatro orígenes diferentes dados su estructura, grado de calcificación, uniones intercelulares, tipo y arreglo de células. Se concluye que los 49 caracteres morfológicos utilizados mostraron tener un valor filogenético, evidenciando la trascendencia del uso simultáneo de ambos tipos de información en los análisis cladísticos.

Palabras clave: sistemática, cladística, Corallinales, caracteres morfológicos, 18s ARNr.

INTRODUCCIÓN

El orden Corallinales fue descrito por Silva & Johansen (1986) y se caracteriza principalmente por tener paredes celulares impregnadas de carbonato de calcio; meristemas terminales e intercalares; los tapones (plugs) de las conexiones de orificio (pit connections) primarias presentan dos capas en forma de domo; uniones entre las células de filamentos adyacentes tipo conexiones intercelulares secundarias y fusiones celulares; células reproductoras en conceptáculos; tetrasporangios formados por división simultánea zonada o cruciada; fase bisporangial presumiblemente diploide; los eventos de post-fertilización involucran un sistema de filamentos procarpiales; filamentos carpogoniales de dos células.

La taxonomía moderna del orden, propone su división en tres familias con representantes vivos (Harvey *et al.*, 2003). La familia Sporolithaceae cuyos géneros *Sporolithon* Heydrich y *Heydrichia* Townsend, Chamberlain & Keats son no geniculados, con una forma de crecimiento costrosa, adherida al sustrato o formando rodolitos y completamente calcificados. La familia

Hapalidiaceae resucitada por Harvey *et al.* (2003), incluye a las subfamilias Choreonematoideae, Melobesioideae, y Austrolithoideae, y la familia Corallinaceae (Johansen, 1981; Woelkerling, 1988; 1996), que incluye las subfamilias Lithophylloideae, Mastophoroideae y Corallinoideae. Esta última familia es la única que comprende taxones con forma de crecimiento tanto no geniculada, como geniculada; caracterizada por presentar secciones de tejido no calcificado, dando lugar a talos articulados.

La delimitación de taxones en el orden Corallinales ha estado fundada en comparaciones fenéticas desde su primera descripción formal por Areschoug en 1852 (Woelkerling, 1988). A partir de la década de 1950, se retomó el interés de manera marcada en la taxonomía del grupo, pero con la misma perspectiva morfológica.

Para este trabajo retomamos la propuesta de Woelkerling (1996) que resume su trabajo taxonómico con géneros no geniculados e incluye la propuesta taxonómica de Johansen (1981) con taxones geniculados. Ambos autores basan sus resultados en análisis comparativos de la variación poblacional de caracteres y hacen uso de las diferencias en la anatomía vegetativa para delimitar unidades taxonómicas de diversas jerarquías, sin asignarles ninguna relación o importancia evolutiva. Tales caracteres se sustentan en la presencia o no de genícula y sus diferencias anatómico-estructurales; el tipo de conexiones celulares entre células de filamentos adyacentes del talo (fusiones celulares y/o conexiones intercelulares secundarias); organización del talo (dorsoventral, radial, isobilateral) y su construcción (monómero, dímero o difuso), presencia de haustorios; células epitiales y tricocitos (forma y ocurrencia); patrón de elongación celular; así como los caracteres reproductivos, principalmente los asociados a la cámara conceptacular bi-tetrasporangial; número de poros de la cámara, presencia de tapones esporangiales (plugs), modo de formación del techo conceptacular y grosor, presencia de columela, persistencia de filamentos calcificados, distribución de los esporangios en la cámara y arreglo de las esporas. Estos caracteres han sido usados para delimitar las subfamilias y los géneros al interior del orden, propuesta nomenclatural que también es la base de este trabajo (Fig. IV.4.1).

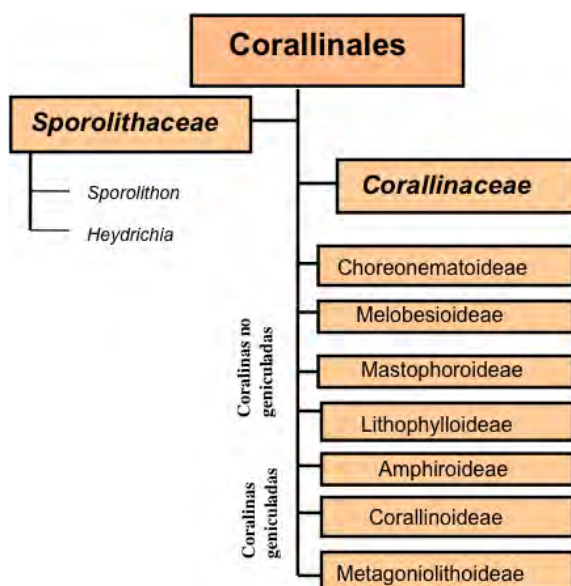


Fig. IV.4.1. Esquema taxonómico propuesto por Johansen (1981) - Woelkerling (1988), incorporando las modificaciones de Verheij (1993), Townsend, Chamberlain y Keats, 1994) y Harvey y Woelkerling (1995)

Otra propuesta taxonómica de interés en este estudio fue la de Cabioch (1972). La autora usa los caracteres morfogenéticos vegetativos y reproductivos, para establecer relaciones evolutivas entre las coralinas y proponer un esquema taxonómico. Discute que la segregación de grupos geniculados y no geniculados no tiene validez en términos filogenéticos y por tanto, que la clasificación resultante basada en grupos diferenciados por su forma de crecimiento, no refleja las relaciones de parentesco al interior del orden y sugiere que esos caracteres deben ser considerados como caracteres secundarios, supeditados a otros con contenido evolutivo, tales como el patrón de germinación de las esporas; patrón de desarrollo del talo; tipo de meristemas (terminales-marginales, intercalares, uniestratificados o multiestratificados); características del proceso y patrón de descalcificación del talo; origen, distribución y organización de tricocitos; diferenciación del tejido medular y origen de las células reproductoras (Fig. IV.4.2).

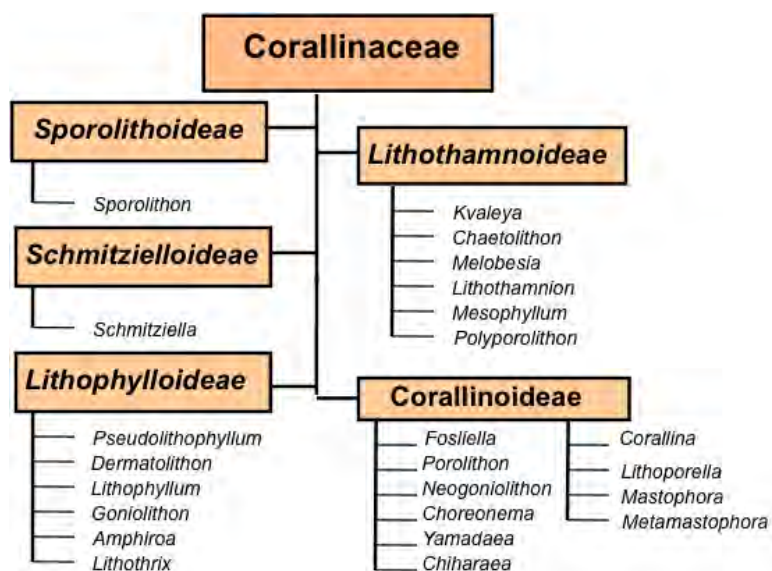


Fig. IV.4.2. Esquema taxonómico propuesto por Cabioch (1972). *Pseudolithophyllum* sinónimo heterotípico de *Lithophyllum*; *Dermatolithon* sinónimo homotípico de *Titanoderma*; *Chaetolithon* sinónimo heterotípico de *Choreaonema*; *Polyporolithon* sinónimo heterotípico de *Mesophyllum*; *Fosliella* sinónimo homotípico de *Hydrolithon*, *Porolithon* sinónimo heterotípico de *Spongites* (Woelkerling, 1988). *Schmitziella* fue excluida del orden por no poseer ninguna de las características diagnósticas (Woelkerling e Irvine, 1982).

Entre ambas propuestas existe una diferencia sustancial. Johansen-Woelkerling, no hacen inferencias evolutivas explícitas entre los grupos al interior del orden y todo su esquema sustenta claramente las relaciones fenéticas. Cabioch, sugiere relaciones de parentesco entre sus subfamilias y tribus, además propone líneas de descendencia en función de la discusión del comportamiento de algunos caracteres, pero no se apoya en ningún método formal que ayude a estimar el tipo y grado de asociación de caracteres, ni el establecimiento de su importancia filogenética.

Con estos antecedentes taxonómicos de contexto y con la intención de hacer inferencias filogenéticas, hace más de 10 años se inició el trabajo de

secuenciación molecular de la subunidad corta del gen 18s del ARNr (Bailey & Chapman, 1998; Bailey, 1999), en diferentes especies del orden Corallinales. Los estudios mostraron primeramente que el orden es monofilético, que la subfamilia Corallinoideae es monofilética y que el resto de los taxones se arreglan parcialmente de manera similar a la propuesta de Johansen-Woelkerling, y en parte también concuerdan con las sugerencias de Cabioch.

Estos resultados han tenido consecuencias taxonómicas en diferentes categorías, por ejemplo, la subfamilia Amphiroideae no fue reconocida y sus integrantes, *Amphiroa* Lamouroux y *Lithothrix* Gray, hoy son parte de la subfamilia Lithophylloideae (Bailey, 1999), como sugirió Cabioch (1972). El género *Spongites* Kützing, antes del grupo de las Mastophoroideae, en la propuesta de Bailey (1999) es clasificado como parte de la subfamilia Corallinoideae y la propia subfamilia Mastophoroideae es ahora considerada como polifilética (Bailey *et al.*, 2004). Fig. IV.4.3. Tabla IV.4.1 y IV.4.2.

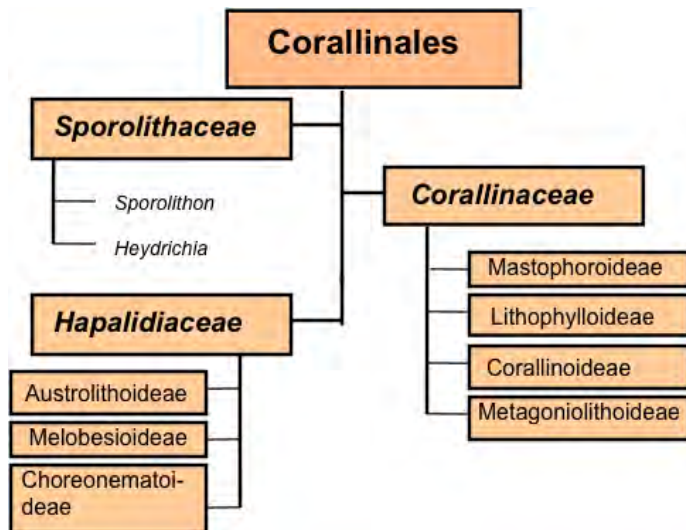


Fig. IV.4.3. Esquema propuesto a partir de las inferencias de filogenia molecular. Se han establecido algunas relaciones al interior de las subfamilias y entre subfamilias.

En los trabajos anteriormente citados, la información morfológica, ha sido usada para confirmar, corroborar y/o ratificar las relaciones de parentesco que se infieren a partir de las hipótesis de la filogenia molecular.

Este trabajo constituye el primer ejercicio donde los caracteres morfológicos se analizan independientemente a la luz de la metodología cladística para evaluar su contenido filogenético. Analizar su congruencia con los caracteres moleculares del gen 18s del ARNr y, llevar a cabo análisis de parsimonia de datos combinados. Los caracteres morfológicos fueron tomados en el mismo sentido que han sido descritos en la literatura, asumiendo que son homólogos. Todos los análisis se hacen bajo el método de máxima parsimonia A cada conjunto de datos se le aplicaron las pruebas de confianza correspondientes.

TABLA IV.4.1. Resumen de los principales esquemas de clasificación de algas rojas coralinas.

AUTOR	SUBFAMILIAS	TRIBUS
Areschoug 1852		Corallineae Melobesieae
Foslie 1908	Corallineae Melobesieae	
Svedelius 1911		Schmitzielleae, Chaetolithoneae, Lithothamnioneae, Choreonemeae, Melobesieae Mastophoreae, Corallineae
Setchell 1943	Corallinae, Mastophoreae, Sporolithaeae, Lithothamnieae, Lithophylleae	
Hamel & Lemoine 1953	Melobesiées	Lithophyllées, Archaeolithothamniées, Lithothamniées, Mastophorées, Epilithonées
	Schmitziellées, Corallinées	
Mason 1953	Melobesioideae Corallinoideae	Lithothamnieae, Lithophylleae
Cabioch 1972	Schmitzielloideae, Sporolithoideae Lithothamnioideae, Corallinoideae Lithophylloideae	Schmitzielleae, Sporolithaeae Lithothamnieae Mastophoreae, Neogoniolithaeae, Corallineae Lithophylleae, Dermatolithaeae, Amphiroeae
Johansen 1981	Amphiroideae, Corallinoideae, Metagoniolithoideae, Lithophylloideae, Mastophoroideae Melobesioideae	Lithothamnieae, Phymatolithaeae
	Schmitzielloideae	
Woelkerling 1988	Amphiroideae, Corallinoideae, Metagoniolithoideae, Choreonematoideae, Lithophylloideae Melobesioideae, Mastophoroideae	
Woelkerling 1996	FAMILIAS SUBFAMILIAS Sporolithaceae Corallinaceae	
	Amphiroideae Corallinoideae Metagoniolithoideae Choreonematoideae Lithophylloideae Melobesioideae Mastophoroideae	Janieae y Corallineae
Harvey <i>et al.</i> , (2003)	Sporolithaceae Hapalidiaceae	
	Austrolithoideae, Choreonematoideae, Melobesioideae	
	Corallinaceae	Corallinoideae, Metagoniolithoideae, Lithophylloideae, Mastophoroideae
		Janieae y Corallineae

De 1852 a 1988 los autores reconocen una sola familia: Corallinaceae. La información de Areschoug, Foslie, Svedelius y Setchell, fueron tomadas de Cabioch (1972). El resto de la información fue tomado de Woelkerling (1988). El esquema de Woelkerling de 1996, incluye las propuestas de Townsend & Adey (1990), Penrose (1992), Verheij (1992, 1993), Woelkerling & Campbell (1992), Woelkerling & Harvey (1992), Townsend *et al.* (1994) y Harvey & Woelkerling (1995). El esquema propuesto por Harvey *et al.*, (2003) está basado en la subunidad corta del gen 18s ARNr.

Tabla IV.4.2. Caracteres diagnósticos de las subfamilias que constituyen a las familias Sporolithaceae, Hapalidiaceae y Corallinaceae del orden Corallinales, de acuerdo con el esquema Johansen-Woelkerling-Bailey, entre otros).

Familia	Subfamilia	Caracteres diagnósticos de subfamilia	Notas
Sporolithaceae		No se han reconocido subfamilias para este taxa	La familia fue establecida por Verheij (1993) a partir de información morfológica y corroborada por Harvey <i>et al.</i> Con información molecular del gen 18s.
Hapalidiaceae	Austrolithoideae	Ausencia de uniones celulares entre los filamentos; ausencia de genícula; presencia de una placa mutiporada compuesta de células en la madurez.	Harvey <i>et al.</i> (2003) resucitan a la familia Hapalidiaceae, considerando que todos los géneros que presentan conceptáculos multiporados mantienen relaciones filogenéticas
	Choreonematoideae	Ausencia de uniones celulares entre los filamentos; genícula ausente; presencia de una placa multiporada acelular en la madurez constituida solo de una matriz de carbonato de calcio.	
Corallinaceae	Melobesioideae	Presencia de fusiones celulares; genícula ausente; placa multiporada constituida de células en la madurez	
	Corallinoideae	Presencia de por fusiones celulares; genícula constituida por una hilera de células	
	Metagoniolithoideae	Presencia de fusiones celulares; genícula constituida por filamentos multicelulares no formando hileras claramente delimitadas	
	Mastophoroideae	Presencia principal o exclusivamente de fusiones celulares; pit connections secundarios presentes solo en bajas proporciones en especies de algunos géneros	
	Lithophylloideae	Presencia principal o exclusivamente de pit connections secundarios; fusiones celulares registradas en algunas especies; genícula (cuando presente) constituida de una o más hileras de células.	

MÉTODOS

Se construyó una matriz de datos morfológicos con 43 géneros representantes de la diversidad del orden Corallinales y 49 caracteres, los cuales fueron seleccionados de la literatura de acuerdo con Cabioch (1972), Johansen (1981) y Woelkerling (1988, 1996). La mayoría de los caracteres son multiestado y los estados de carácter se codificaron de manera desordenada. Éstos fueron tratados de manera independiente, para evitar especular sobre los estados primitivos en comparación con los derivados.

Para los análisis llevados a cabo, la determinación de la polaridad de los caracteres se hizo por comparación con un grupo externo. Se seleccionaron

tres taxones emparentados con las Corallinales: Palmariales: *Palmaria palmata* (Linnaeus) Weber et Mohr, Hildenbrandiales: *Hildenbrandia rubra* (Sommerfelt) Meneghini y Gelidiales: *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, siguiendo a Gabrielson & Garbary (1987); Freshwater *et al.* (1994), Ragan *et al.* (1994) y Saunders & Hommersand (2004). Los análisis filogenéticos fueron hechos con PAUP v. 4.010 (Swofford, 2002). Las búsquedas heurísticas con 1000 repeticiones se efectuaron con adiciones al azar (random stepwise additions); el cambio de ramas por bisección y reconexión (TBR; Tree bisection and reconnection swap branches) fueron hechas bajo MP.

Los índices de consistencia (IC), retención (IR) y homoplasia fueron reportados en cada análisis. El nivel de confiabilidad de cada nodo de los árboles de MP fue evaluado usando pruebas no paramétricas de Bootstrapping y Jackknife basados sobre 1000 réplicas. Los valores de soporte (BS) de Bremer (1988) fueron usados como medidas adicionales de la estabilidad de los nodos bajo parsimonia. Se analizó uno de los 158 árboles de MP obtenido de los datos morfológicos, el más concordante con el árbol de consenso por mayoría y sobre él analizaron los caracteres morfológicos.

Las secuencias genéticas de la subunidad corta del gen 18s del ARNr fueron obtenidas del Genbank. La información de los especímenes de respaldo se enlista en la Tabla IV.4.3. Las secuencias fueron alineadas usando Sequence Navigator 1.0.1 (PE Applied Biosystems). En el análisis molecular, los espacios en blanco en una secuencia o gaps, fueron tratados como datos faltantes. Se aplicó asimismo el método de evolución mínima para los datos moleculares, con distancias de máxima verosimilitud basadas sobre el modelo GTR (General Time Reversible) (Rodríguez, *et al.* 1990), incluyendo una distribución gamma (G) y proporciones de sitios invariables (I), llevado a cabo en Model Test v. 3.06 (Posada & Crandall, 1998).

Dado que no hubo información molecular disponible para todos los taxones, la composición taxonómica de cada serie de datos en los análisis es necesariamente diferente. Los grupos de datos fueron analizados por separado; posteriormente se reunió la información compatible y se analizó bajo las mismas pruebas de MP, para conocer su potencial de eficiencia descriptiva y poder explicativo.

Tabla IV.4.3. Listado de especies usadas en los análisis filogenéticos morfológicos, moleculares y de evidencia combinada

Especies	Tipo de análisis	No. Acceso al Genbank
<i>Choreonema thuretii</i> (Bornet) Schmitz	Mol y morf	AY221254.1
<i>Lesueuria minderiana</i> Woelkerling & Ducker	Morf	
<i>Lithoporella melobesioides</i> (Foslie) Foslie	Morf	
<i>Mastophora rosea</i> (C.Agardh) Setchell	Morf	
<i>Metamastophora flabellata</i> (Sonder) Setchell	Mol y morf	AY234239.1
<i>Neogoniolithon fosliei</i> (Heydrich) Setchell & Mason	Morf	
<i>Neogoniolithon brassica-florida</i> (Harvey) Setchell & Mason	Mol	AY233346.1
<i>Neogoniolithon spectabile</i> (Foslie) Setchell & Mason	Mol	AY234238.1
<i>Pneophyllum fragile</i> Kützting	Morf	

<i>Spongites fruticulosus</i> Kützing	Morf	
<i>Spongites yendoi</i> (Foslie) Chamberlain	Mol	SYU60948
<i>Hydrolithon reinboldii</i> (Foslie) Foslie	Morf	
<i>Hydrolithon onkodes</i> (Heydrich) Penrose & Woelkerling	Mol	AY234237.1
<i>Hydrolithon pachydermum</i> (Foslie) Bailey, Gabel, & Freshwater	Mol	AY234235.1
<i>Hydrolithon bamoense</i> (Foslie) Keats & Chamberlain	Mol	AY234236.1
<i>Clathromorphum compactum</i> (Kjellman) Foslie	Mol	CCU60742
<i>Clathromorphum parcum</i> (Setchell & Foslie) Adey	Mol	CPU61252
<i>Melobesia membranacea</i> (Esper) Lamouroux	Morf	
<i>Mastophoropsis canaliculata</i> (Harvey in Hooker) Woelkerling	Mol y morf	MCU62118
<i>Lithothamnion muelleri</i> Lenormand ex Rosanoff	Morf	
<i>Lithothamnion glaciale</i> Kjellman	Mol	LGU60738
<i>Lithothamnion tophiforme</i> (Esper) Unger	Mol	LTU60739
<i>Phymatolithon calcareum</i> (Pallas) Adey & McKibbin	Morf	
<i>Phymatolithon laevigatum</i> (Foslie) Foslie	Mol	PLU60740
<i>Phymatolithon lenormandii</i> (Areschoug) Adey	Mol	PLU60741
<i>Synarthrophyton patena</i> (Hooker & Harvey in Harvey) Townsend	Mol	SPU61255
<i>Kvaleya epilaeve</i> Adey & Sperapani	Morf	
<i>Mesophyllum lichenoides</i> (Ellis) Lemoine	Morf	
<i>Mesophyllum engelhartii</i> (Foslie) Adey	Mol	MEU61256
<i>Mesophyllum erubescens</i> (Foslie) Lemoine	Mol	MEU61257
<i>Exilicrusta parva</i> Chamberlain	Morf	
<i>Leptophytum acervatum</i> (Foslie) Chamberlain & Keats	Mol y morf	LAU62119
<i>Leptophytum ferox</i> (Foslie) Chamberlain & Keats	Mol	LFU62120
<i>Austrolithon intumescens</i> Harvey & Woelkerling	Morf	
<i>Boreolithon van-heurckii</i> (Heydrich) Harvey & Woelkerling	Morf	
<i>Sporolithon ptychoides</i> Heydrich	Morf	
<i>Sporolithon durum</i> (Foslie) Townsend & Woelkerling	Mol	SDU61254
<i>Heydrichia woelkerlingii</i> Townsend, Chamberlain & Keats	Mol y morf	HWU61253
<i>Heydrichia homalopasta</i> Townsend & Borowitzka	Mol	AF411629.2
<i>Lithophyllum incrustans</i> Phillipi	Mol y morf	AF093410
<i>Lithophyllum kotschyannum</i> Unger	Mol	LKU62117
<i>Ezo epiyessoense</i> Adey, Masaki & Akioka	Morf	
<i>Titanoderma pustulatum</i> (Lamouroux) Nageli	Mol y morf	AF093409
<i>Amphiroa tribulus</i> (Ellis & Solander) Lamouroux	Mol	AY234234.1
<i>Amphiroa fragilissima</i> (Linnaeus) Lamouroux	Mol y morf	AFU60744
<i>Amphiroa hancockii</i> Taylor	Mol	AY234233.1
<i>Lithothrix aspergillum</i> Gray	Mol y morf	LAU61249
<i>Tenarea tortuosa</i> (Esper) Lemoine	Morf	
<i>Paulsilvella huveorum</i> Woelkerling, Sartoni & Boddi	Morf	
<i>Corallina officinalis</i> Linnaeus	Morf	
<i>Corallina elongata</i> Ellis & Solander	Mol	CEU60946
<i>Arthrocardia corymbosa</i> (Lamarck) Decaisne	Morf	
<i>Arthrocardia filicula</i> (Lamarck) Johansen	Mol	AFU61258
<i>Jania rubens</i> (Lamouroux) Lamouroux	Mol y morf	JRU61259
<i>Jania crassa</i> Lamouroux	Mol	CU62113
<i>Halptilon gracile</i> (Lamouroux) Johansen	Morf	
<i>Halptilon roseum</i> (Lamarck) Garbary & Johansen	Mol	HRU60947
<i>Cheilosporum sagittatum</i> (Decaisne) Zanardini	Mol y morf	CSU60745
<i>Alatocladia modesta</i> (Yendo) Johansen	Morf	
<i>Calliarthron cheilosporoides</i> Manza	Mol y morf	CCU60943
<i>Calliarthron tuberculosum</i> (Postels & Ruprecht) Dawson	Mol	CTU60944

<i>Chiharaea bodegensis</i> Johansen	Morf	
<i>Marginisporum crassissimum</i> (Yendo) Ganesan	Morf	
<i>Serraticardia maxima</i> (Yendo) Silva	Morf	
<i>Serraticardia macmillanii</i> (Yendo) Silva	Mol	SMU62114
<i>Yamadaea melobesioides</i> Segawa	Morf	
<i>Bossiella plumosa</i> Silva	Morf	
<i>Bossiella californica</i> (Decaisne) Silva	Mol	BCU60945
<i>Bossiella orbigniana</i> (Decaisne) Silva	Mol	IOU60746
<i>Metagoniolithon chara</i> (Lamarck) Ducker	Mol y morf	MCU60743
<i>Metagoniolithon radiatum</i> (Lamarck) Ducker	Mol	MRU61250
<i>Metagoniolithon stelliferum</i> (Lamarck) Ducker	Mol	MSU61251

Para el análisis molecular se usaron las secuencias disponibles en el Genbank, que no coinciden necesariamente con la especie tipo. Mol: usada en el análisis molecular. Morf: usada en el análisis morfológico. En los cladogramas de los análisis moleculares se colapsaron las ramas correspondientes a las mismas especies.

Tabla IV.4.4. Caracteres y estados de carácter usados en los análisis cladísticos

CARACTERES MORFOLOGICOS EXTERNOS

- Arquitectura del talo: (0) No geniculado (1) Genícula tipo *Amphiroidea* (2) Genícula tipo *Corallinoidea*, (3) Genícula tipo *Metagoniolithoidea*, (4) Genícula tipo *Lithothryoidea*.
- Hábito del talo: (0) Costroso, (1) Arborescente carnoso (2) Arborescente calcificado.
- Forma de vida: (0) Semiendofítico⁸, (1) Epígeno (de vida libre-rodolito), (2) Endofítico,
- Adhesión al sustrato: (0) Células de adhesión, (1) Haustorios, (2) Rizoides, (3) Disco de fijación.
- Estipe: (0) Ausente, (1) Presente.
- Calcificación del talo: (0) Ausente, (1) Presente.
- Región calcificada del talo: (0) Parcial reproductiva⁹, (1) Total, (2) Parcial vegetativa¹⁰.
- Consistencia de la calcificación: (0) Dura, (1) suave.
- Presencia de células corticales: (0) Sobre la intergenícula, (1) Cubriendo la genícula e intergenícula.

CARACTERES ANATÓMICOS

- Consolidación del talo: (0) Filamentoso, (1) Pseudoparenquimatoso.
- Organización del talo: (0) Dorsoventral, (1) Bilateral, (2) De organización no definida.
- Construcción del talo: (0) Dímero, (1) Monómero, (2) Difuso.
- Arreglo del talo: (0) No coaxial, (1) Coaxial.
- Grosor del talo vegetativo: (0) Mono-bistromático, (1) Polistromático.
- Células epitaliales: (0) Ausentes, (1) Presentes en regiones reproductivas¹¹, (2) Presentes en todo el talo, (3) Parcialmente presentes en regiones vegetativas¹²
- Forma de las células epitaliales: (0) Redondeadas a aplanadas, (1) acampanadas invertidas (flared).
- Organización de las células del basales del talo: (0) Células en empalizada, (1) Células no en empalizada (columnares)
- Conexiones de orificio secundarias: (0) Ausentes, (1) Presentes.
- Fusiones celulares: (0) Ausentes, (1) Presentes.
- Tricocitos: (0) Ausentes, (1) Presentes.
- Capas de los tapones de las conexiones celulares: (0) Una, (1) Dos.

⁸ Donde el talo vegetativo esta inmerso en el tejido del hospedero y solo las estructuras reproductivas son externas y calcificadas. O talos cuyos cuerpos vegetativos son epibionticos calcificados pero que tienen sus estructuras de fijación ancladas en el hospedero, ya sean haustorios o rizoides.

⁹ Se da en talos semiendofitos, donde solo el tejido reproductor que sobresale del hospedero presenta calcificación

¹⁰ se presenta en talos geniculados, donde la genícula es la región vegetativa que no se calcifica

¹¹ Las células epitaliales en el caso de *Lesueuria*, las células epitaliales solo se presentan en las regiones reproductivas y no en las vegetativas, por eso se optó por indicarlo como parcialmente presentes.

¹² Las células epitaliales están presentes en la región intergenicular pero no en la genícula de algunas *Corallinoideae* y *Lithophylloideae*.

22. Estructura de las capas de los tapones de las conexiones celulares¹³: (0) Simple, (1) Placa, (2) Domo.

23. Espacio entre las conexiones de orificio secundarias y el citoplasma: (0) Ausente, (1) Presente

24. Células de la genícula: (0) Unizonal, (1) Multizonal simple, (2) Multizonal ramificada.

25. Filamentos medulares en la genícula: (0) Rectos, (1) Oblicuos/entrelazados.

CARACTERES ANATOMICO REPRODUCTIVOS

26. Tipo de esporangios reproductivos: (0) Soros inmersos en tejido pseudoparenquimatoso calcificado¹⁴, (1) Conceptáculos inmersos en tejido sin calcificación¹⁵, (2) Conceptáculos calcificados, (3) Soros entre filamentos ordenados no calcificados¹⁶.

27. Poros conceptaculares: (0) Más de uno, (1) Uno.

28. Grosor del techo conceptacular esporangial: (0) Una capa de células, (1) Varias capas de células.

29. Filamentos dentro conceptáculo esporangial: (0) Columela, (1) Parátesis, (2) Filamentos calcificados, (3) Ausentes.

30. Tapones esporangiales: (0) Ausentes, (1) Presentes.

31. División tetrasporangial: (0) Cruciado, (1) Zonado.

32. Estructuras reproductivas masculinas: (0) No en conceptáculos, (1) En conceptáculos

33. Ramas espermatangiales: (0) Simples, (1) Ramificadas dendroides

34. Estructuras reproductivas femeninas: (0) En conceptáculos, (1) Carpogonios desnudos.

CARACTERES RELACIONADOS CON EL DESARROLLO

35. Origen del techo conceptacular masculino: (0) Sobrecrecimiento, (1) filamentos intercalados entre las células reproductoras (formado por tejido epi y peritalial).

36. Células de los filamentos carpogoniales: (0) Dos células, (1) Una célula.

37. Fusión celular carpogonial: (0) Delgada y amplia, (1) Gruesa y compacta, (2) Irregular y discontinua, (3) Corta.

38. Desarrollo del filamento gonimoblasto¹⁷: (0) Sobre la fusión celular¹⁸, (1) Directamente de un carpogonio fertilizado.

39. Conceptáculos esporangiales originados sobre tejido del peritalo: (0) Ausentes, (1) Presentes.

40. Conceptáculos esporangiales medulares: (0) Ausentes, (1) Presentes.

41. Conceptáculos esporangiales desarrollados en el tejido cortical: (0) Ausentes, (1) Presentes.

42. Conceptáculos esporangiales corticales y axiales: (0) Ausentes, (1) Presentes.

43. Conceptáculos esporangiales medulares y marginales: (0) Ausentes, (1) Presentes.

44. Patrón de elongación de las células iniciales: (0) Corto, (1) largas (2) iguales.

¹³ Tapones de conexión de las sinápsis (pit-plug en inglés). Después de que se forma una sinapsis (pit connection), aparecen las membranas tubulares. Alrededor de las membranas se acumula una proteína granular, formando un tapón en el centro de la sinapsis. Las membranas tubulares finalmente desaparecen. La presencia de otras estructuras asociadas a estos tapones dependen del grupo taxonómico involucrado, pues es una característica usada para delimitar ordenes. Algunos ordenes solo presentan un corazón central o tapón central sin ninguna estructura asociada, tal como las Rhodochaetales, Compsogonales, Anfeltiales, Gracilariales, Bonnemaisionales, Gigartinales, Rhodimenciales y Ceramiales. Que sería el tipo más básico y simple. Otros presentan una membrana cubriendo el tapón denominada capa (cap membrane o capuchón) como las Bangiales, Hildenbrandiales, Gelidiales, (que en nuestro estudio hemos denominado como el estado de carácter simple, por presentar solo un solo capuchón o cubierta (carácter 0). En otros órdenes hay dos capas de material que cubren el tapón. Cuando se presentan dos capas protectoras o capuchones, a estos los separa una membrana. La capa externa puede ser delgada, formando una placa (estado de carácter 1 en este estudio) y que se presenta en el grupo de Nematiales, Palmariales. En otros casos esta membrana forma una estructura más compleja a manera de domo (Corallinales). Cole y Sheat (1990)

¹⁴ Soros de corlinas tipo *Sporolithon*

¹⁵ Conceptáculos característicos de rodofitas no calcificadas costrosas, como *Hildenbrandia*.

¹⁶ soros de rodofitas no coralinas

¹⁷ Woelkerling (1988) no da mas datos para el caso de *Choreonema*, solo menciona que es pequeña. También se codificó para las especies que Woelkerling menciona que tienen una inconspicua fusión celular como el caso de *Sporolithon* y *Melobesia* (en Womersley 1996).

¹⁸ Woelkerling (1988) menciona que en algunos casos se forman los filamentos gonimoblásticos de la superficie ventral, pero no menciona cual es la generalidad. Nosotros hemos asumido todas las variantes que se describen (superficie, superficie ventral y margen) como: sobre la superficie de la fusión celular, que claramente se distingue del otro estado de carácter.

-
45. Techo de los conceptáculos esporangiales formado por filamentos intercalares al área fértil¹⁹: (0) Ausente, (1) Presente.
46. Techo conceptacular esporangial formado por filamentos que rodean el área fértil: (0) Ausente, (1) Presente.
47. Formación de los tetrasporangios en la cámara conceptacular: (0) Sobre el piso de la cámara, (1) En las paredes de la cámara.
48. Patrón de descalcificación de la genícula: (0) medular, (1) Meristemo apical.
49. Origen de los gametangios masculinos en la cámara conceptacular²⁰: (0) Sobre el piso de la cámara, (1) En el piso, paredes y techo de la cámara, (2) Sobre el piso y paredes de la cámara
-

RESULTADOS

Datos morfológicos

Se obtuvo un total de 158 árboles igualmente parsimoniosos. En la Fig. IV.4.4. se muestra uno de ellos (IC=0.488; IR=0.778; IH=0.51). La mayor parte de los caracteres se distribuyeron en las partes terminales de las ramas, lo que implica un mayor número de cambios en los taxones terminales (autopomorfias) y pocos caracteres que sustenten los nodos. El árbol de consenso por regla de mayoría incluyeron todos los grupos compatibles con los árboles de máxima parsimonia con valores por arriba del 50%. Estos se compararon y dado que sus estadísticas e índices fueron muy semejantes, se resumen en la Figura IV.4.5. Este árbol de consenso por mayoría de máxima parsimonia tuvo un soporte de ramas del 100%.

El árbol de MP muestra las asociaciones constantes entre los taxones, tales como *Sporolithon* y *Heydrichia* en posición basal, pero no conformando un grupo monofilético. Las subfamilias Melobesioideae, Lithophylloideae y Mastophoroideae, no se muestra como monofiléticas en nuestros análisis, por lo que en adelante nos referiremos a los taxones que incluyen como géneros melobesioides, litofiloides y mastoforoides, para tener la referencia solamente que pertenecieron a esas subfamilias.

Los géneros melobesioides se muestran en este análisis como polifiléticos. La agrupación monofilética la conforman: el ensamblaje formado por *Boreolithon* Harvey & Woelkerling, *Austrolithon* Harvey & Woelkerling, *Lesueuria* Woelkerling & Ducker y *Choreonema* Schmitz, cuya asociación será discutida más adelante. Otro linaje monofilético siempre bien sustentado es la subfamilia Corallinoideae.

¹⁹ Woelkerling (1988) menciona que los géneros *Ezo*, *Lithoporella*, y todos los géneros de Melobesioideae tienen este tipo de formación de techos conceptaculares. Townsend (1981) encontró la formación de los techos conceptaculares de este tipo de manera consistente en *Lithophyllum* y *Titanoderma*.

²⁰ De acuerdo con Woelkerling (1988), Lebednik (1978) noto que en todos los géneros de Melobesioideae las ramas espermatangiales estaban formadas en el piso paredes y techos de los conceptáculos a excepción del resto de coralinas donde dichas estructuras están confinadas solo al piso. Sin embargo, *Exilicrusta* tiene espermatangios simples confinados solo al piso, lo que la diferencia de *Lithothamnion* entre otras cosas.

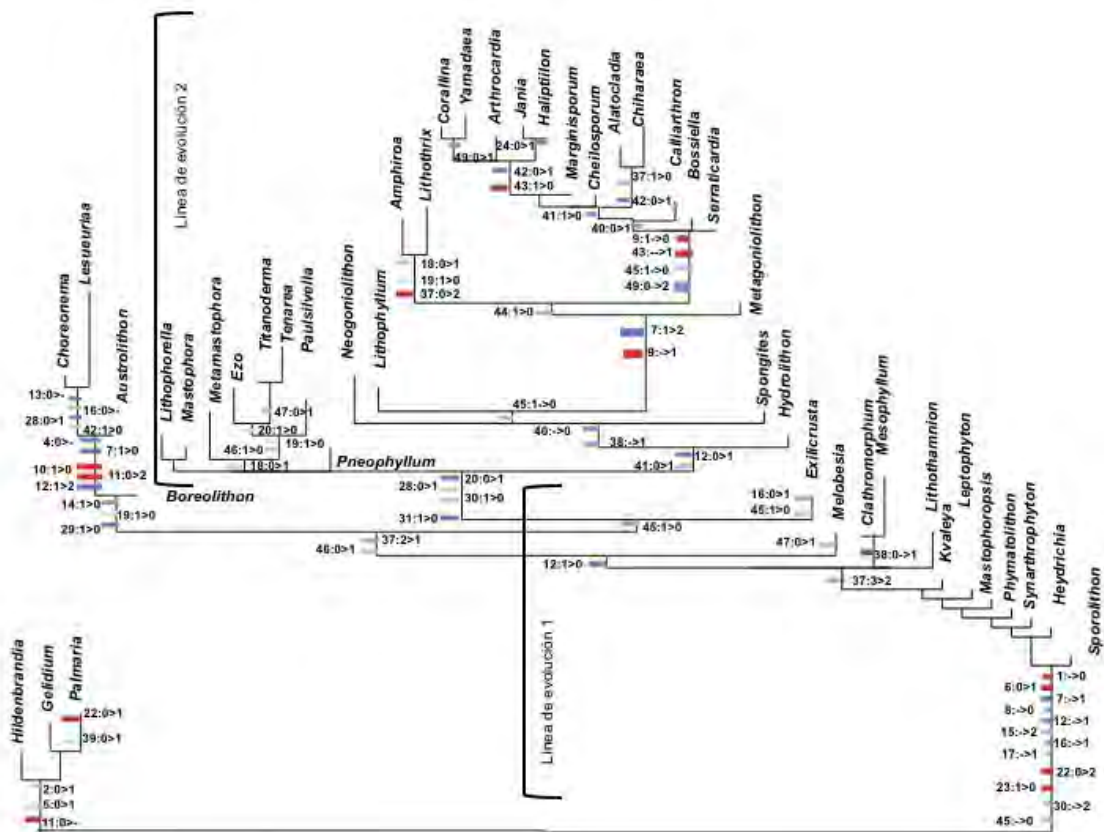


Fig. IV.4.4. Uno de los 158 árboles de MP, IC: 0.48; IR:0.74; en el cual se mapearon algunos de los caracteres. Las líneas en rojo representan las sinapomorfias, las líneas en tonos de azul representan plesiomorfias e indican el índice de consistencia, mientras más claro, más bajo su valor. (-) representa "de no presentarse" o "pérdida". Algunos caracteres no se observan en la Figura porque sus índices de consistencia fueron muy bajos.

El análisis de la distribución de caracteres o grupos de caracteres sobre uno de los árboles de MP permitió formular una hipótesis sobre la relación entre los caldos y ayudó a explicar la secuencia de cambio de primitivo a derivado de los caracteres, así como qué estados de éstos definen uno o más de los linajes.

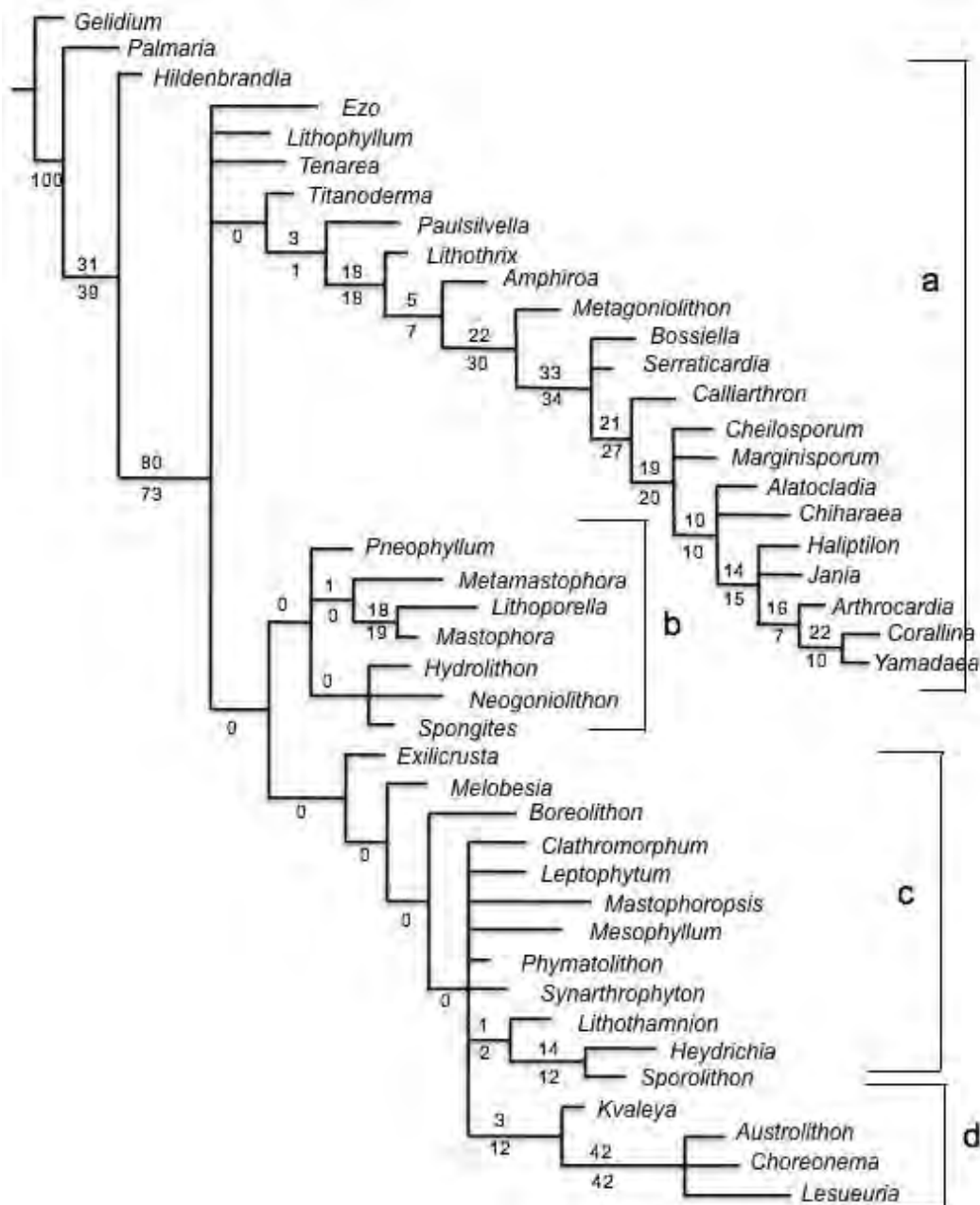


Fig. IV.4.5. Árbol de consenso estricto de caracteres morfológicos. Sobre las líneas se presentan los valores de Jackknife y debajo los de Bootstrap.

La Figura muestra como agrupaciones constantes a la subfamilia Corallinoideae, Metagoniolithoideae y Lithophylloideae formando un grupo monofilético. El grupo de las coralinas pertenecientes a la subfamilia Mastophoroideae se asociaron en un solo clado, a excepción de *Lesueuria*, que se asocia con el resto de especies de hábito semiendófito. La subfamilia Melobesioideae no se resolvió y aparece como grupo hermano de *Sporolithon* y *Heydrichia* dentro de la misma politomía.

Es de considerar los valores de bootstrap y de jackknife, que para la mayor parte de los clados resultaron valores muy bajos, indicando que la probabilidad de formar otras asociaciones es alta si cambian un poco los datos de la matriz asociados al árbol. Sin embargo, se puede rescatar el hecho de que los dos principales grupos derivados del orden tienen un valor de soporte de ramas alto

(80/73). Hay que considerar también que los métodos de remuestreo son sensibles a los datos faltantes, no conocidos o no aplicables (que son tomados como caracteres no informativos).

Evolución de Caracteres

En primer término reconocemos todos aquellos caracteres que delimitan al grupo de las Corallinales, entre ellos destacan:

El cambio de una forma de crecimiento arborescente carnosa multiaxial a una forma costrosa de crecimiento radial (1-2: caracteres de la tabla IV.4.4). Adquisición de la calcificación en las paredes celulares de todo el talo (6) con una fuerte consistencia (7-8). El paso de la construcción del talo de multiaxial a monómero (12), con presencia de células epitaliales en todo el talo (15) y de forma característica (16). Reorganización de la arquitectura de las células basales para formar un hipotalo monómero (17).

Así mismo se presentó una modificación en las capas que protegen los tapones de las conexiones celulares, pasando de simples a dobles en forma de domo (22) y perdiendo el espacio entre las conexiones intercelulares secundarias y el citoplasma (23). Por otra parte, se presenta una modificación radical en la forma y organización de las estructuras reproductoras, tal que se reorganizan en soros, que se definen como complejos esporangiales dispersos entre filamentos de células calcificadas elongadas y que se reconocen como paráfisis (29). Los esporangios no se liberan hasta estar completamente maduros, lo cual es garantizado por una estructura nueva, el tapón esporangial (30). Estos tapones se encuentran entre una estructura a manera de techo formada por filamentos intercalados al área fértil o complejo de esporangios (45). Esto marca el inicio de las novedosas cámaras conceptaculares características de las Corallinales.

Al interior de Corallinales

En el árbol de consenso (Fig. IV.4.5) se delinear claramente, cuatro agrupaciones.

El clado (a), incluye un complejo de especies tanto del grupo de la subfamilia Lithophylloideae (*s.str.*), Metagoniolithoideae y Corallinoideae; formando un grupo monofilético.

En el clado (b) las corallinas no geniculadas de la subfamilia Mastophoroideae que en este análisis se agruparon formando un grupo monofilético. A excepción de *Lesueuria*.

En el clado (c) los géneros más antiguos del orden. El nodo que los define presenta caracteres plesiomórficos: las estructuras reproductoras se forman en soros (26) o en conceptáculos multiporados (27). Algunos de los taxones incluidos, presentan comúnmente en el interior de la cámara conceptacular esporangial paráfisis o filamentos calcificados y tapones esporangiales (29,30), además de que el hipotalo de células característicamente no en empalizada

(multiestratoso) (14), deriva en un hipotalo conformado por un menor número de células. En algunas especies el hipotalo sólo está representado por una sola capa de filamentos primigenios como en *Melobesia* Lamouroux.

El clado (d) está conformado por los taxones con una forma de vida endófito o semiendófito que expresan una aparente pérdida de caracteres por reducción de la estructura del talo. En este análisis no están determinadas claramente sus relaciones con el grupo de las melobesioides basales (a).

Datos moleculares

El alineamiento final de la subunidad corta del gen 18s ARNr resultó en 1680 nucleótidos de los cuales 1060 fueron constantes, 239 fueron variables y 381 filogenéticamente informativos. El análisis de máxima parsimonia arrojó un total de 20 árboles igualmente parsimoniosos y un árbol de consenso estricto que se muestra en la Figura IV.4.6.

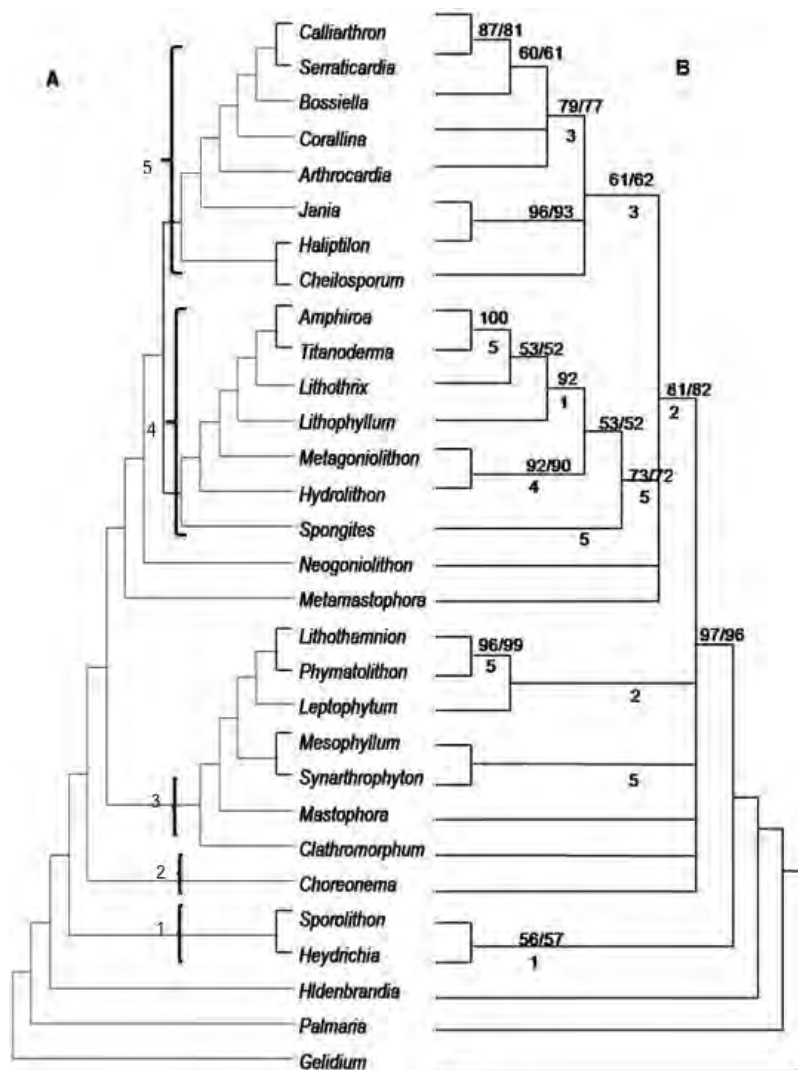


Fig. IV.4.6. A) Árbol de consenso por mayoría y B) árbol de consenso estricto de datos información molecular del gen 18s del ARNr. Sobre las líneas se presentan los valores de bootstrap/Jackknife y debajo los valores de Bremer.

El índice de consistencia fue de 0.71 y el índice de retención de 0.75. Todas las ramas tuvieron una frecuencia del 100% a excepción del nodo que soporta a *Mastophora* Decaisne, *Synarthrophyton* Townsend (75%) y *Calliarthron* Manza (60%). Las topologías de los árboles resultantes de las pruebas de robustez no difirieron significativamente del árbol de consenso estricto, por lo que en la Fig. IV.4.6., se anotan en la parte superior de las ramas los índices de Bootstrapping y Jackknife y en la parte inferior el Bremer.

El árbol de consenso mostró 5 grupos, su topología es consistente con el análisis de máxima verosimilitud (no incluido) y con los análisis previos de Bailey (1999) y Bailey *et al.* (2004). En la parte basal del árbol se reconoce a *Sporolithon* y *Heydrichia* como grupo monofilético (1), lo que no ajusta con los análisis morfológicos.

Se reconoce como un linaje independiente a *Choreonema* (2), derivada del grupo basal *Sporolithon-Heydrichia* y presentándose como grupo hermano del resto de las coralinas. Las especies del grupo (3), forman parte de los géneros melobesioideos. En este cladograma forman grados, donde no es evidente la relación entre unos y otros. El clado (4) monofilético, incluye a especies de *Amphiroa*, *Titanoderma* Nägeli, *Lithothrix* y *Lithophyllum* Philippi, de la actualmente reconocida subfamilia Lithophylloideae y además a los géneros *Metagoniolithon* Weber-van Bosse de la subfamilia Metagoniolithoideae, y los géneros mastoforoides *Hydrolithon* (Foslie) Foslie, *Spongites* y *Metamastophora*. El clado (5) resulta el más constante en todos los análisis realizados y sus integrantes pertenecen a la bien delimitada subfamilia Corallinoideae.

Datos combinados

El análisis de datos morfológicos y moleculares resultó en 3 árboles igualmente parsimoniosos (IC=0.544; IR=0.576; IH=0.465). El árbol de consenso estricto mostró 5 grupos que son apoyados por valores promedio de Bootstrapping y Jackknife de 76.4 y 75 respectivamente (Fig. IV.4.7). La topología de los árboles del análisis combinado de MP es altamente congruente y en concordancia con los resultados tanto morfológicos como moleculares (Fig. IV.4.8).

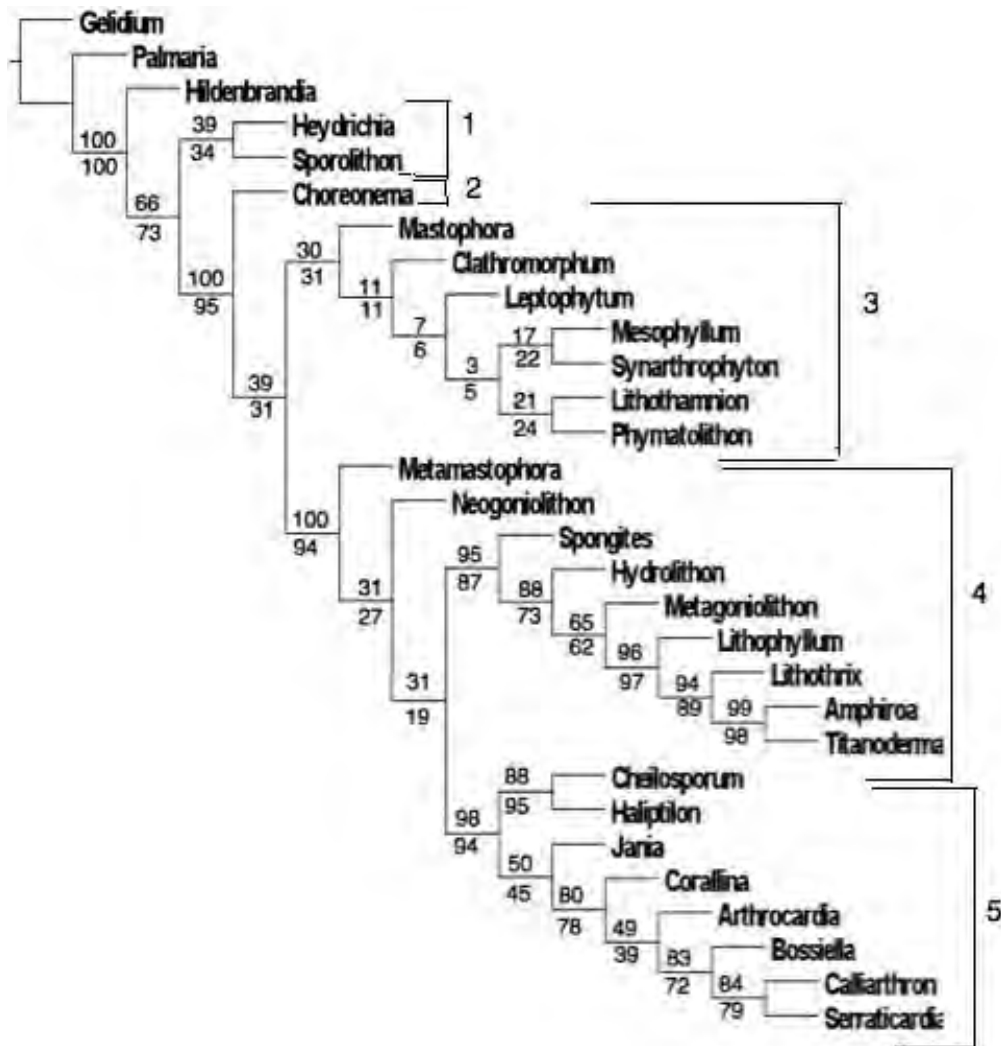


Fig. IV.4.7. Árbol de consenso estricto de datos combinados –morfológicos-moleculares. Sobre las ramas se muestran los valores de Jackknife y debajo los de Bootstrap.

La Figura muestra que el clado (1) formado por *Sporolithon* y *Heydrichia* tiene valores bajos de bootstrap y jackknife. *Choreonema* (2) vuelve a aparecer como un linaje independiente. En este análisis la subfamilia Melobesioideae (3) se presenta como monofilética, pero con valores de bootstrap y jackknife muy bajos. El ensamble formado por las subfamilias Mastophoroideae, Metagonioliithoideae y Lithophylloideae (4) se vuelve a conformar de forma muy similar como se presentaron en los datos moleculares y morfológicos separadamente. La subfamilia Corallinoideae (5) se recupera como monofilética.

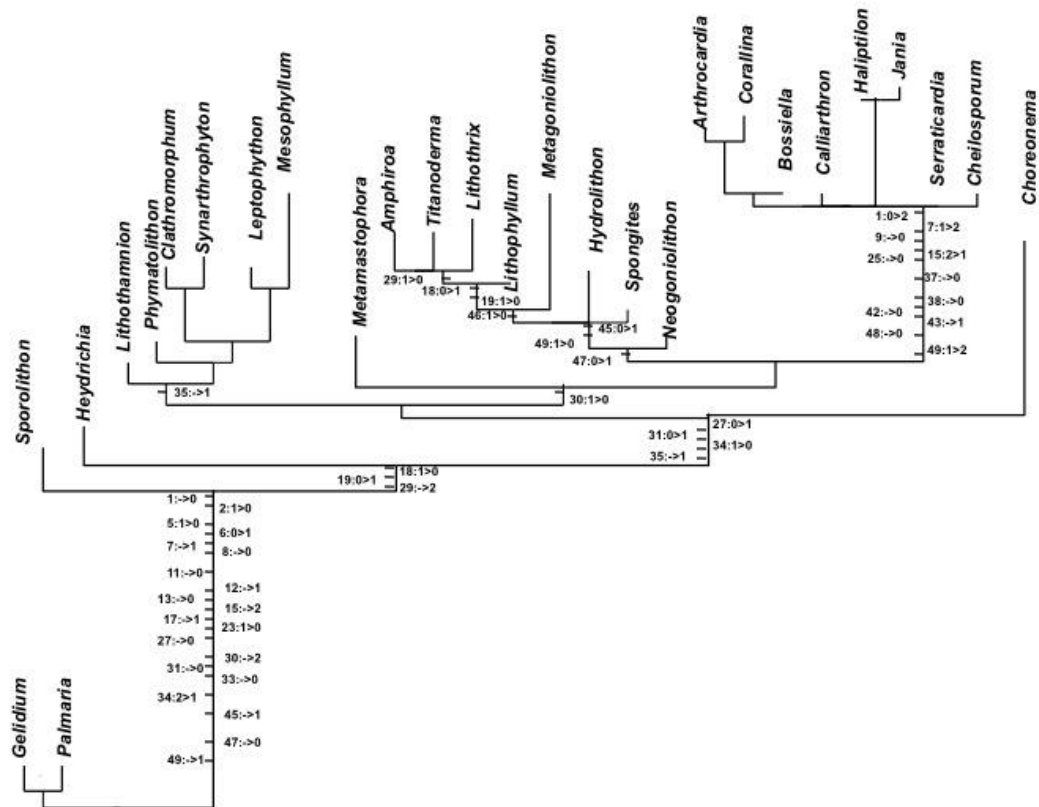


Fig. IV.4.8. Se muestra uno de los 3 cladogramas de datos combinados. Se señalan los caracteres que sustentan algunos nodos (ver texto).

DISCUSIÓN

Análisis morfológico

Inicialmente es importante señalar que, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se reconocen como categorías válidas taxonómicamente, al orden Corallinales; a la familia Sporolithaceae que incluye a los géneros *Sporolithon* y *Heydrichia* como parte de éste orden. La familia Hapalidiaceae, que incluye a las subfamilias Melobesioideae, Choreonematoideae, Austrolithoideae. La subfamilia Melobesioideae en el análisis morfológico resultó no ser monofilética, está organizada en grados, donde no son claras las relaciones entre sus géneros, por lo que se manejará en adelante como el grupo melobesioide. En el análisis de evidencia combinada tiene valores muy bajos de bootstrap y jackknife.

La familia Corallinaceae pierde su sentido taxonómico de acuerdo con nuestros análisis, pues las subfamilias Lithophylloideae y Mastophoroideae resultan ser parafiléticas, así mismo la subfamilia Metagoniolithoideae, parece estar más relacionado con la subfamilia Lithophylloideae.

De esta forma en la discusión siguiente deberá tomarse en cuenta que se manejan los adjetivos melobesioide, mastoforoide, litofiloide, metagoniolitoide para referirnos a los taxones antes incluidos en las subfamilias mencionadas que no son monofiléticas y, que para este estudio han perdido su delimitación taxonómica.

El orden Corallinales

Las sinapomorfias que sustentan la monofilia del orden Corallinales son (Fig. IV.4.4):

La adquisición de la calcificación en las paredes celulares de todo el talo. El proceso de biomineralización ha sido poco explorado aun; sin embargo, un estudio reciente muestra variación en la composición, indicando que hay una mayor proporción de calcita que de aragonita en las especies que se analizaron, así como en la forma y disposición de los cristales (Fragoso *et al.*, 2010), lo que sugiere que estas variaciones podrían usarse como caracteres para segregar clados.

La forma de crecimiento costrosa que proviene de un arreglo de filamentos multiaxiales para producir una estructura dorsiventral sin diferenciación entre sus filamentos.

La pérdida de conexiones intercelulares secundarias para formar fusiones celulares, implicando la pérdida también de todos los caracteres asociados a estas conexiones (tabla IV.4.4. caracteres 21, 22, 23).

Desde el punto de vista morfológico existe información para incluir a *Sporolithon* y *Heydrichia* junto con el resto de los taxones del orden Corallinales, dado que comparten características tanto morfológicas como ontogenéticas. Entre las primeras podemos resumir las siguientes plesiomorfias a nivel de orden: ambos géneros presentan forma de crecimiento costrosa (2), presentan todas las células del talo calcificadas (6, 7, 8), son monómeros (12) y tienen células epitaliales en forma de campana invertida (flared: Woelkerling, 1988). (16). Respecto a las segundas, presentan tetrasporangios en soros (26), conceptáculos gametangiales uniporados (32, 34) y ramas espermatangiales dendroides (33).

Originalmente se estableció que el orden Corallinales incluyera todos los taxones de algas rojas en los cuales las estructuras reproductivas se desarrollaran en conceptáculos (Silva & Johansen, 1986). No obstante, *Sporolithon* y *Heydrichia* fueron específicamente incluidos aun cuando carecen de estructuras conceptaculares tetrasporangiales, asumiendo que los soros de estos taxones son caracteres derivados homólogos de las estructuras tetrasporangiales del resto de los miembros de Rhodophyta (Verheij, 1993).

La serie de transformación del carácter desde los soros típicos de Rhodophyta hasta los conceptáculos típicos de Corallinales podría inferirse comparando la diferenciación de las áreas fértiles de los tetrasporofitos de *Sporolithon* (Verheij 1992, 1993) donde no hay diferencia entre los filamentos corticales intercalados en los esporangios y los de la corteza con *Mesophyllum* (Woelkerling & Harvey 1992) donde las modificaciones se presentan en la forma de descalcificación de las porciones de los filamentos corticales intercalados entre los esporangios, aunque estos filamentos permanecen indeterminados.

Posteriormente, en *Lithophyllum* (Townsend 1981; Woelkerling & Campbell 1992) se observa que ciertos filamentos corticales llegan a ser determinados y en *Neogoniolithon* Setchell & Mason (Townsend 1981; Penrose 1992), se observa la máxima diferenciación, pues todos los filamentos corticales asociados con los esporangios son determinados. De acuerdo con esta información, esta serie de transformación es producto de la adquisición de la calcificación del talo y la forma costrosa. Así, las características de los soros conformaron el criterio básico para la separación de estos dos géneros del resto de las corallinas, proponiendo dos familias, Sporolithaceae y Corallinaceae (Townsend *et al.* 1994).

Sin embargo, hay un conjunto de caracteres que hacen diferentes a *Sporolithon* de *Heydrichia* (Tabla IV.4.5) que podrían explicar la separación de estos géneros en el árbol de caracteres morfológicos y su bajo valor de bootstrap y jackknife en el análisis de datos combinados, sustentando la parafilia entre los taxones y sugiriendo que los caracteres de la tabla IV.4.5., tienen un alto valor filogenético y probablemente trascendencia taxonómica (lo cual tendrá que probarse en otro análisis).

Las pocas sinapomorfias mostradas en la parte basal del árbol para los taxones melobesioides ordenados en grados revela que éstos comparten algunos caracteres derivados vinculados con las modificaciones de las estructuras reproductoras carpogoniales, particularmente en la fusión celular (37) que de no presentarse en *Heydrichia* y *Sporolithon*, pasa a ser una estructura corta y después una estructura irregular y discontinua. La construcción de techos conceptaculares tetrasporangiales se caracteriza por presentar filamentos intercalados entre los tetrasporangios (45) con algunas células de grosor y células terminales epitaliales. Cada tetrasporangio forma en su región apical un engrosamiento de la pared, dando lugar a un tapón apical (30) que bloquea el poro de salida hasta que éste madura (Woelkerling 1988). Los tetrasporangios se forman inicialmente en el piso de la cámara y posteriormente también lo hacen en el piso y paredes del conceptáculo (47).

La división meiótica para formar las tetrasporas pasa de cruciada a simultánea zonada (31). Respecto a la construcción del talo o se conserva monómero en varios géneros o pasa a dímero en otros (12) y el grosor del talo vegetativo pasa de polistromático a bistromático en algunos taxones (14). Disminuye la frecuencia de las conexiones intercelulares secundarias hasta desaparecer o ser poco evidentes y se vuelven dominantes las fusiones celulares en todos los taxones melobesioides (19). Las células epitaliales que en los géneros más primitivos se presentan con cierta frecuencia en forma de campana invertida ahora pasan a tener una forma predominantemente redondeada (16).

Sin embargo todo lo anterior, la relación en grados mostrada por estos géneros, pone de manifiesto la necesidad de analizar los caracteres morfológicos y morfogenéticos que no se tienen codificados para ellos (tabla IV.4.4.) para esclarecer sus relaciones. Por otra parte, se desprende un clado que incluye a *Kvaleya* (Melobeioideae), *Austrolithon* (Austrolithoideae), *Choreonema* (Choreonematoideae) y *Lesueuria* (mastoforoide) grupo d en Fig. IV.4.5); cuyos caracteres de soporte son: la pérdida de calcificación en

filamentos vegetativos (6, 7); pérdida de cualquier tipo de unión celular (18,19); arreglo difuso de los filamentos vegetativos (12) y techos de los conceptáculos tetrasporangiales formados por una capa de células (28).

Todos estos caracteres se presentan como homoplasias que han sido interpretados en este estudio como adaptaciones a la forma de vida semiendófito y endófito, las cuales están enmascarando sus auténticas relaciones filogenéticas.

Entre *Boreolithon* y *Austrolithon* se observan elementos comunes en el arreglo orden y disposición de los conceptáculos esporangiales, que pasan de multiporados a uniporados (27); presencia de un tapón apical en los conceptáculos que evita que los esporangios sean liberados antes de su madurez (30). Paso de un talo de estructura pseudoparenquimatosa a filamentosa (10) y arreglo del talo de no coaxial a irregular (13). Todos estos caracteres han sido interpretados en este análisis también, como una adaptación a su forma de vida.

En el caso de *Choreonema* se presenta un solo poro de salida en el conceptáculo (27), el análisis de su estructura interna muestra los restos de cámaras individuales donde se forma un solo tetrasporangio y dónde cada uno de ellos ha formado un tapón esporangial, todos los cuales ocluyen el único poro de salida. Este comportamiento puede leerse como una modificación del techo conceptacular, debido a la reducción del talo como resultado a su forma de vida, donde se han fusionado todos los poros, pero aun no se han perdido los tapones que forma cada esporangio, sugiriendo la presencia reminiscente de un conceptáculo multiporado.

Lesueuria presenta talos en su mayor parte no consolidados y los conceptáculos son las únicas estructuras externas calcificadas. Su organización interna es irregular de construcción difusa. El resto de caracteres en el cladograma se presentan como autopomorfias.

Los filamentos del talo están unidos por fusiones celulares, con presencia de células epitaliales redondeadas o aplanadas en las partes terminales de los filamentos de los conceptáculos. Presenta conceptáculos uniporados y espermatangios producidos en el piso de la cámara. Tetrasporangios formados periféricamente alrededor de una columela, filamentos del techo del conceptáculo tetrasporangial rodeando los filamentos fértiles, cada tetrasporangio de arreglo zonado y careciendo de tapones esporangiales. Lo que concuerda más con la afinidad mastofoide de *Lesueuria*. Por lo que la interpretación de que los taxones de este clado están relacionados más por su adaptación a la vida endófito más que por reflejar relaciones filogenéticas tiene un costo evolutivo mucho menor que el tratar de explicar que los mismos caracteres surgieron paralelamente en dos clados diferentes.

A la luz del análisis anterior es posible concluir que la evolución de caracteres divergió en dos grandes rutas, dadas las modificaciones de los caracteres derivados registrados en los dos grandes clados del árbol (Fig. IV.4.4).

Primera línea de evolución. Comprende a la familia Sporolithaceae y a las subfamilias Australithoideae, Choreonemathoideae y Melobesioideae y que puede ser interpretada a partir de dos rutas diferentes:

A. Donde el ancestro hipotético entre las Rhodophyta y las Corallinales dio lugar a taxones tipo litofiloides que mantuvieron como uniones celulares entre los filamentos a las conexiones intercelulares secundarias y por otra parte, al ancestro de las melobesiodes (lithothamnioides de acuerdo con Cabioch, 1972) que adquirieron por el contrario, las fusiones celulares que constituyó la novedad evolutiva, de las que habrían derivado Mastophoroideae, Metagoniolithoideae y Corallinoideae. Si lo anterior fuera cierto, entonces todos los caracteres relacionados con las cámaras conceptaculares esporangiales, resultarían ser homoplásicos.

B. Donde el ancestro hipotético entre las Rhodophyta y las Corallinales dio lugar al linaje de melobesiodes en el que se fijan las fusiones como único tipo de unión celular. Posteriormente las melobesiodes habrían divergido en litofiloides que presentarían una reversión a las conexiones intercelulares secundarias y por otra parte, al resto de los grupos que habrían mantenido las fusiones, como se muestra en los cladogramas de este trabajo. Si esta opción fuera cierta, entonces todos los caracteres relacionados con las cámaras conceptaculares esporangiales, resultarían ser sinapomórficos.

Las formas más primitivas y simples en las Corallinales (Sporolithaceae), en este contexto, representarían el estado intermedio entre el ancestro hipotético y las Melobesioideae.

Segunda línea de evolución. Esta línea se presentaría de manera consecutiva a cualquiera de las opciones (A o B) de la primera línea de evolución. Respecto a la diferenciación celular en el tejido medular vegetativo, en linajes mastoforoides y corallinoides se diferencian células en forma y talla, en posición terminal o intercalar en la corteza del talo, denominadas tricocitos; para las litofiloides no hay registros ciertos sobre este carácter.

Una característica novedosa es el proceso de descalcificación controlado sobre ciertas regiones del talo, para dar lugar a las formas geniculadas, la que está regulada por las células iniciales o meristemas terminales. La ruta propuesta es que primero se descalcifica una región de células de la misma forma y talla (regiones unizonales) y posteriormente se produce la descalcificación multizonal. Asimismo se da una regionalización de las células corticales, las cuales pueden estar presentes en todo el talo o restringirse a las áreas calcificadas solamente. Los techos conceptaculares tetrasporangiales en esta línea evolutiva, se forman por filamentos que rodean un grupo de células iniciales esporangiales o por crecimiento de filamentos entremezclados entre las células iniciales esporangiales, además de presentar un penacho de filamentos estériles denominados columela. El poro conceptacular tetrasporangial se forma por rompimiento de la parte superior de los filamentos de la columela (Townsend, 1981). Estas características las presentan los taxones mastoforoides, litofiloides y corallinoides.

En taxones articulados de corallinoides, litofiloides y metagoniolitoides, la otra modificación que tiene que ver con la forma de vida de costrosa a arborescente y la arquitectura de las ramas, es la posición de los conceptáculos tetrasporangiales que pasan de estar inmersos en el tejido a localizarse en regiones corticales y axiales o medulares, según el taxón en particular.

Si bien es posible establecer dos líneas de evolución, los caracteres que han permitido describir a los géneros de mastoforoides: variaciones en la estructura, disposición y origen de los reproductores tanto femeninos, masculinos como tetrasporangiales, aun son desconocidos para varios de sus integrantes dado que no se han encontrado las fases gametangiales, por lo que resultan insuficientes para discernir sus relaciones filogenéticas con el resto de clados (tabla IV.4.4.).

Algunos de los géneros mastoforoides se presentan como linajes independientes: *Hydrolithon*, *Spongites* y *Neogoniolithon* y otros parecen relacionarse más con los géneros de la subfamilia Lithophylloideae (sensu Bailey, 1999), tales como *Lithoporella*, *Mastophora* y *Metamastophora*.

Los taxones que conservaron estrechas relaciones tanto en los análisis morfológicos como en los moleculares y mantuvieron su coherencia en el análisis combinado, fueron las Corallinoideae (s.str.), sin embargo, en el análisis morfológico su ancestro parece ser la subfamilia Metagoniolithoideae (s.str.). Cabe destacar también que aun cuando no hay una diferencia clara entre las tribus Janieae y Corallineae, puede notarse en las Figuras IV.4.4 y IV.4.8, que los géneros *Jania*, *Haliptilon* y *Cheilosporum* permanecen juntos, aunque se encuentran en una politomía y sus relaciones no sean absolutamente claras. De acuerdo con Kim *et al.* (2007) este ensamble podría derivar en la desaparición de los conceptos de *Haliptilon* y *Cheilosporum* y sus especies pasar a ser parte de *Jania*.

En el caso de *Amphiroa* y *Lithothrix*, aun cuando se encuentren en este análisis como parafiléticas del resto de las Lithophylloideae siempre se segregaron como un grupo hermano.

Finalmente, el establecimiento de las relaciones entre los géneros geniculados en este análisis, nos lleva a inferir que la condición geniculada tiene cuatro orígenes diferentes, considerando su estructura, grado de calcificación, tipo de uniones celulares, así como el tipo, arreglo, ordenación y jerarquía de las células que las conforman.

1. Genícula Amphiroidea (Lithophylloideae), cuya caracterización corresponde a la de Woelkerling (1996) para el género *Amphiroa*, donde la intergenícula está formada por una o numerosas hileras de células similares en estructura, células de talla corta, alternándose con hileras de células largas. La genícula está formada por una a varias hileras de células similares. Las intergenículas no producen ramas laterales, hay presencia de células epitiales y de una corteza de filamentos anticlinales de células isodiamétricas al igual que en la genícula.

2. Genícula Lithothrioidea (Lithophylloideae), cuya caracterización corresponde a la de Johansen (1981) para el género *Lithothrix* con una intergenícula consistiendo de una hilera de células medulares, con presencia de corteza uniestratosa y con células epitaliales creciendo hacia las regiones geniculares. La genícula es característicamente de una sola hilera de células mucho más largas que las intergeniculares, donde sólo la parte proximal de estas células no está calcificada.

3. Genícula Metagoniolithoidea (Metagoniolithoideae), cuya caracterización corresponde a la de Woelkerling (1996) para el género *Metagoniolithon* donde la intergenícula tiene una médula de varias capas de hileras de células entrelazadas, con fusiones laterales. La genícula está formada por muchas células que no forman hileras y que parecen entrelazadas, con presencia de ramas laterales; la corteza formada de filamentos cortos y dispersos está presente tanto en la intergenícula como en la genícula, aunque menos desarrollada en ésta última.

4. Genícula Corallinoidea (Corallinoideae), cuya caracterización corresponde a la de Woelkerling (1996) para el género *Corallina* donde la intergenícula presenta una médula formada por filamentos de arreglo coherente de 1-25 (-50) hileras de células, con presencia de fusiones celulares. La genícula con una sola hilera de células no calcificadas, comúnmente más largas que las células de la intergenícula. Corteza presente sólo en la región intergenicular, con células epitaliales sobre toda la región calcificada de las ramas.

Análisis molecular

Como se observa en el cladograma de la Figura IV.4.6, se sustenta la posición basal y la monofilia de las Sporolithaceae. Las subfamilias Lithophylloideae, Metagoniolithonideae y Mastophoroidea se muestran como monofiléticos. Los géneros representantes de Melobesioideae son presentados como grupo monofilético.

Cabe mencionar que en los primeros análisis de datos moleculares se incluyó al género *Rhodogorgon* como grupo externo; a pesar de que este taxón quedaba incluido dentro del grupo externo, se decidió excluirlo de los análisis, debido a que en la matriz de datos morfológicos, muchos de los caracteres aparecían como no aplicables o desconocidos. Esto biológicamente no pudo ser sustentado a la hora de establecer las relaciones entre los taxones. Considerando la discusión de Le Gall & Saunders (2007), de la estrecha relación entre Corallinales y Rhodogorgonales, se asume que es necesario incluir a este taxón como uno de los grupos más relacionado al grupo en estudio.

Al término de este manuscrito se conocieron los resultados de los análisis de Le Gall *et al.* (2010), que muestran las relaciones y afinidades más estrechas entre Rhodogorgonales y Corallinales y donde las primeras son un ingroup, hermano de las Sporolithaceae. Todo esto a partir de un análisis de varios genes y estudios de filogenia molecular, por lo que se revisará a detalle la

ontogenia de los caracteres que comparten las Rhodogorgonales para reevaluar la distribución de caracteres morfológicos (en preparación) de la recién erigida subclase Corallinophycidae, con sus órdenes Corallinales, Rhodogorgonales y Sporolithales.

Análisis de datos combinados

El resultado de este análisis es más congruente con el de datos moleculares que con el de los morfológicos. Esto puede interpretarse como un artefacto debido a la diferencia en el número de taxones terminales usados en el análisis morfológico y a la homogeneidad de terminales usados tanto en el análisis molecular como el de evidencia combinada.

Una diferencia importante entre el análisis de datos morfológicos y el de evidencia combinada es que *Choreonema* estrechamente relacionado con las Sporolithaceae, aparece como un linaje independiente y queda claro que el cambio de soros a conceptáculos tetrasporangiales, constituye la sinapomorfia que lo soporta.

Por su parte, los géneros melobesioides pertenecen a un clado monofilético respaldado solamente por los rasgos de los conceptáculos gametangiales, en contraste con el análisis morfológico, donde las relaciones entre los géneros no están bien delimitadas y los diferentes clados presentan grupos parafiléticos.

El resto de los taxones están respaldados por caracteres que requieren de un estudio más exhaustivo para determinar si son verdaderas sinapomorfias. Por ejemplo, *Metamastophora* es un linaje independiente, hermano al clado compuesto por una rama que contiene a *Neogoniolithon*, *Spongites*, *Hydrolithon*, (Mastophoroideae), *Metagoniolithon* (Metagoniolithoideae) y *Lithophyllum*, *Lithothrix*, *Titanoderma* y *Amphiroa* (Lithophylloideae) como cladomonofilético. Estas relaciones difieren marcadamente de los resultados morfológicos, donde los géneros de litofiloides y mastoforoides aparecen en clados independientes.

Los géneros de Corallinoideae forman un clado sustentado por caracteres de la genícula y por el modo de formación del techo de los conceptáculos tetrasporangiales. En los análisis de los árboles mostrados aquí, este clado es consistente y siempre se mantuvo como monofilético, lo cual coincide con la propuesta taxonómica fenética de Johansen (1981) y Woelkerling (1988, 1996) y con los análisis moleculares de Bailey & Chapman (1998), Harvey *et al.* (2002) y Harvey *et al.* (2003).

CONCLUSIÓN

El análisis cladístico de los 49 caracteres morfológicos, mostró que éstos tienen estructura, orden y contenido filogenético, además de que a partir de la evaluación de ellos, fue posible corroborar algunas series de transformación y reconocer caracteres sinapomórficos y autopomórficos, así como las tendencias evolutivas al interior del orden Corallinales.

No obstante, durante el proceso de análisis se consideraron originalmente más de 100 caracteres que en los primeros ensayos de MP fueron depurados

porque muchos resultaron no informativos, otros fueron faltantes o desconocidos para muchos de los taxones bajo análisis. Se procedió a explorar las causas y el resultado indicó que algunos caracteres sólo representaban variación poblacional como el tipo de ramificación, forma y disposición de las ramas, número, posición y organización de tricocitos, entre otros por lo que fueron excluidos hasta contar con más información sobre ellos. Otros que conformaron complejos como el patrón de germinación de las esporas; patrón de desarrollo del talo; tipo de meristemas (terminales-marginales, intercalares, uniestratificados o multiestratificados); características del proceso y patrón de descalcificación del talo; origen de tricocitos; diferenciación del tejido medular y origen de las células reproductoras, o caracteres dependientes y asociados tales como la formación de biesporangios, el patrón de elongación de las células iniciales, la presencia de células estériles en el procarpo, número de células esporangiales iniciales, número de esporangios por cámara y muchos otros que fueron tratados con la intención de complementarlos, precisarlos y recodificarlos; desafortunadamente la información recuperada de la literatura fue insuficiente en casi todos los casos, por lo que fueron excluidos también.

Los 49 caracteres utilizados mostraron tener un valor filogenético evidenciando la trascendencia del uso simultáneo y combinado de ambos tipos de información.

Asimismo, todos los análisis de este trabajo, respaldan la propuesta de la línea de evolución B para el orden Corallinales.

Propuesta taxonómica a partir de los análisis cladísticos morfológicos y de datos combinados.

En el cladograma de datos morfológicos (Fig. IV.4.4) se observa que *Sporolithon* y *Heydricia* no son grupos hermanos, lo cual también se observa en el árbol de de MP de datos combinados. (Fig. IV.4.7). Por lo que en este trabajo se considera que la familia Sporolithacea considerando también los valores bajos de Jackknife y Bootstrap.

Derivado del grupo de las melobesioides se deriva un clado que sustenta a los géneros con representantes con forma de vida semiendófito o endófito, problemática que se discutió en el apartado correspondiente. Otro aspecto interesante es que *Metagoniolithon* aparece como grupo hermano de las Corallinoideae (Fig. IV.4.4.). Las mastoforoides se agrupan tanto con las litofiloides como en linajes independientes hermanos tanto de las litofiloides como de la subfamilia Corallinoideae. En los árboles de consenso estricto, tanto los taxones mastoforoides como *Metagoniolithon* se encuentran agrupados en un clado junto con las litofiloides. Por lo que un análisis mucho más fino de los datos morfológicos es necesario para dilucidar las relaciones entre los diferentes taxones de ese clado.

Los árboles de datos moleculares y combinados son muy parecidos. Y en ellos encontramos que Corallinoideae es un grupo monofilético, hermano de las litofiloides, lo cual también se obtuvo en el cladograma de morfológicos. Las litofiloides incluyen como grupo hermano a *Metagoniolithon*, *Hydrolithon* y *Spongites* (Fig. IV.4.6 y IV.4.7). *Metagoniolithon* resulta un clado hermano tanto

de Corallinoideae como de algunos taxones litofiloides. Dado que los diferentes análisis muestran conflicto de caracteres, se optó por analizar el árbol de consenso estricto de datos combinados. En este clado, los géneros mastoforoideos, *Metamastophora* y *Neogoniolithon* se definen como linajes independientes y hermanos tanto de Corallinoideae como de las litofiloides. Mientras que *Metagoniolithon*, *Hydrolithon* y *Spongites* se agrupan en un linaje monofilético junto con las litofiloides.

De esta manera, nos resulta complejo el reconocimiento del concepto de subfamilia Lithophylloideae (*sensu* Bailey, 1999), por lo que se propone que este clado se eleve a categoría de Familia; que incluya a todos los miembros de la antigua subfamilia, más *Metagoniolithon*, *Hydrolithon* y *Spongites*. Desapareciendo también a la subfamilia Metagoniolithoideae.

Para los linajes independientes de *Neogoniolithon* y *Metamastophora* aun cuando no conforman un grupo monofilético, se propone conformen la familia Metamastophoraceae, que por el momento resultaría parafilética, pues seguramente la inclusión del resto de las especies mastoforoideas modificará su arreglo y sus relaciones con el resto de los taxones.

El clado que no se modifica en ningún análisis, es el de Corallinoideae, lo que muestra las fuertes relaciones tanto fenéticas como filogenéticas. En este trabajo proponemos que este taxón se eleve a la categoría de familia Corallinaceae.

Los clados que no se modificaron de acuerdo a la taxonomía previa basada en análisis moleculares son Hapalidiaceae, que para este trabajo consideramos monofilética y Sporolithaceae como parafilética.

Por lo tanto, la propuesta de orden generada para esta tesis se muestra en la Fig. IV.4.9 y la tabla IV.4.5.

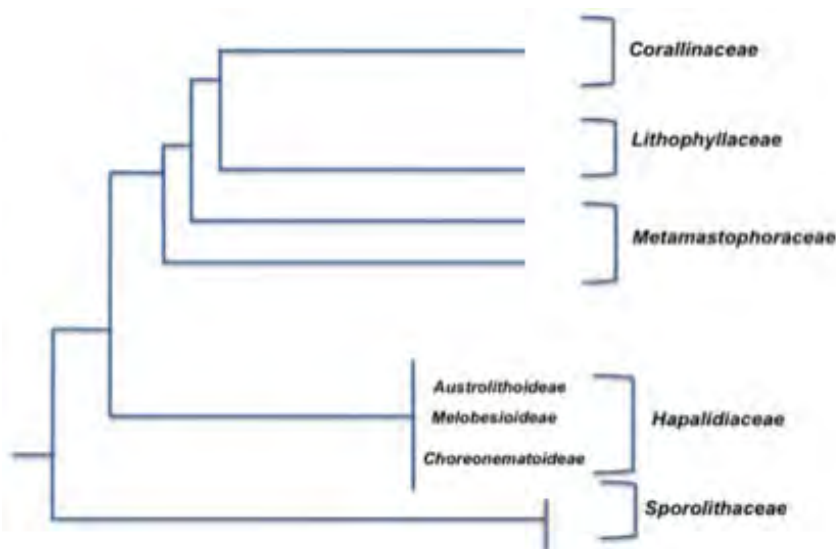


Fig. IV.4.9. Propuesta taxonómica para el orden Corallinales.

Tabla IV.4.5. Esquema taxonómico del orden Corallinales. Taxones integrantes de acuerdo a los análisis combinados de datos morfológico-moleculares

Orden	Familia	Géneros
Corallinales	Sporolithaceae	<i>Sporolithon, Heydrichia</i>
	Hapalidiaceae	<i>Choreonema</i> <i>Mastophora, Clathromorphum</i> <i>Leptophytum, Mesophyllum</i> <i>Lithothamnion, Phymatolithon</i>
	Metamastophoraceae	<i>Metamastophora</i> <i>Neogoniolithon</i>
	Lithophyllaceae	<i>Amphiroa, Lithothrix</i> <i>Lithophyllum, Titanoderma</i> <i>Metagoniolithon, Hydrolithon, Spongites</i>
	Corallinaceae	<i>Serraticardia, Calliarthron, Bossiella</i> <i>Jania, Arthrocardia</i> <i>Cheilosporum, Corallina, Haliptilon</i>

V. DISCUSIÓN

Un esquema taxonómico un sistema de ordenamiento en una jerarquía anidada, la cual debe reflejar las relaciones de parentesco entre los taxones y su historia evolutiva.

Como hemos visto a lo largo de este trabajo, la taxonomía del orden Corallinales se ha modificado en la última década, principalmente por el cambio de perspectiva, es decir, de ordenamientos basados solo en la morfología y sin la intención principal de buscar sus relaciones filogenéticas, a propuestas de orden donde lo más importante son las filogenias moleculares. Sin embargo, el análisis de la bibliografía taxonómica (Cabioch, 1972, 1988; Woelkerling, 1988, 1996²¹; Bailey & Chapman 1998; Bailey 1999; Bailey *et al.* 2004; Harvey *et al.* 2002; Harvey *et al.* 2003; Kim *et al.* 2007; Le Gall & Saunders. 2007), muestra que las hipótesis sobre las relaciones filogenéticas que pueden establecerse entre los taxones del orden Corallinales basadas en el análisis de la subunidad corta del gen 18s del ARNr, son parcialmente concordantes con las propuestas taxonómicas basadas solo en la morfología. Los resultados obtenidos en éste trabajo, también son concordantes con los presentados en la bibliografía reciente, principalmente con el trabajo de Bailey *et al.* (2004), quienes enfatizan la importancia de los caracteres morfológicos.

La propuesta taxonómica del orden que sustenta esta tesis, supone los siguientes postulados: 1. El orden Corallinales es un grupo monofilético. 2. La familia Sporolithaceae pertenece al orden Corallinales. 3. Sporolithaceae es una familia parafilética. 4. La familia Hapalidiaceae es monofilética. 5. La subfamilia Corallinoideae es monofilética. 6. Los taxones litofiloides forman un clado monofilético junto con *Metagoniolithon*, *Hydrolithon*, *Spongites* y *Neogoniolithon*. 7. Los grupos más primitivos del orden son las Sporolithaceae. 8. Los caracteres con mayor peso filogenético y que delimitan familias y subfamilias están relacionados con las estructuras reproductoras esporangiales. 9. Las estructuras reproductoras gamentangiales, los caracteres vegetativos del talo y las características de las genículas, delimitan taxones por debajo del nivel de subfamilia.

De acuerdo con la reevaluación de los esquemas taxonómicos y el esquema propuesto previamente, el concepto de subfamilias dentro del orden Corallinales se ha desvanecido conforme a los resultados de los análisis filogenéticos de datos morfológicos, moleculares y de datos combinados. Por tal motivo se propone una reorganización en familias.

En este esquema se erige una familia para los géneros *Metamastophora* y *Neogoniolithon* (Fig. IV.4.6 y IV.4.7), que sería el taxón hermano tanto de la familia Lithophyllaceae como de familia Corallinaceae. La familia Lithophyllaceae incluye tres miembros nuevos. Desaparece también el concepto de subfamilia Metagoniolithoideae.

²¹ Recuérdese que este esquema recopila la información de un otros autores que ya han sido citados en otros capítulos.

Los grupos que no se modifican respecto a la taxonomía de Harvey *et al.* (2003) y Bailey *et al.* (2004) son: la familia Sporolithaceae y Hapalidiaceae, aunque en el primer caso se considera que no la familia no es monofilética y se requieren más estudios morfológicos y de otros marcadores moleculares para probarlo.

Para el caso particular de Hapalidicaceae, los caracteres morfológicos no han ayudado grandemente en este ejercicio, puesto que varios de sus representantes (que forman las subfamilias Austrolithoideae y Choreonematoideaea) muestran morfológicamente, caracteres más relacionados con su forma de vida. Los datos moleculares indican que están muy cercanas al grupo de la Melobesioideae, sin embargo, la falta de información morfológica, anatómica y estructural para muchas de las especies incluidas en éste análisis afectaron notoriamente los resultados.

Esta problemática fue evidenciada para el análisis en su conjunto dado que en los resultados de los análisis de máxima parsimonia, hubo frecuentemente formación de islas, es decir, un conjunto de árboles cortos parsimoniosos interconectados (que difieren entre si por un solo rearrreglo de sus ramas). La causa de formación de las islas es debido a la presencia en la matriz de caracteres biestado; polimórficos, datos faltantes y caracteres inaplicables, además de que el análisis de caracteres mostró que hay un fuerte número de homoplasias. Por otra parte, el algoritmo de Wagner utilizado como parte de la metodología cladística, es sensible a la homoplasia y dependiente de la secuencia de adición de terminales debido a la misma. Añadido a esto, la matriz de caracteres moleculares no fue equivalente a la matriz de morfológicos, debido a que no existen secuencias representativas para cada género de coralinas. Por lo tanto, mientras mayor sea el grado de conflicto entre los caracteres, la búsqueda de los árboles más parsimoniosos se hace más compleja y menos confiable. Teniendo al final de nuestros análisis solo una aproximación parcial a la filogenia del grupo.

Los caracteres de mayor peso filogenético tanto para segregar al orden como para segregar a sus miembros, están relacionados con la forma de crecimiento, características vegetativas como el tipo de uniones celulares, la variación en la formación del 'complejo conceptacular' esporangial. Este conjunto de caracteres se ha mantenido con variaciones, que por el momento han resultado poco perceptibles, a lo largo de la evolución, en un grupo de organismos que ocupa un ambiente relativamente homogéneo, que ha adquirido una forma de vida muy peculiar y que ha tendido a la eliminación de características morfológicas externas.

Algo interesante de este trabajo fue que se hicieron evidentes las jerarquías en cuanto al uso de los caracteres para delimitar categorías. La información relacionada con las estructuras reproductoras tetrasporangiales, así como la ontogenia de la cámara conceptacular esporangial y su correlación con caracteres vegetativos como el tipo de uniones celulares, el arreglo y arquitectura del talo, mostró la tendencia a diferenciar grandes clados. Sin embargo y, recordando los antecedentes de esta tesis, debemos reconocer que el patrón de características del proceso de postfertilización que ayudó a

delimitar el orden, no está estudiado de forma consistente en todas las especies tipo de éste. Se puede asumir que dado que definen al orden se encuentran en todos los grupos y que por tanto no son informativas.

Sin embargo, en la descripción de algunas especies, se encontró variación en caracteres tales como formas de la fusión celular (que puede estar relacionada con el número de células auxiliares con las cuales se relaciona el carpogonio fertilizado y el patrón de formación del tejido nutritivo): en la posición de los filamentos gonimoblásticos; en el patrón de formación de los tetrasporangios.

Por otra parte, existen diferencias en los patrones de germinación de las esporas en diferentes especies (Cabioch, 1972), y en el patrón de división de las células meristemáticas terminales e intercalares; por mencionar algunas. El no reconocimiento de la magnitud y por lo tanto de la importancia significativa o no de la variación en los patrones de definición del grupo de las corallinas, debilita el uso de dichas características y por lo tanto la interpretación de las relaciones que pueda establecerse usando otros marcadores y otros taxones.

El estudio sistemático de los caracteres mencionados anteriormente, así como de diferentes marcadores moleculares, facilitará el reconocimiento de patrones taxonómicos y filogenéticos.

Por otra parte, el patrón de biomineralización parece ser que puede dar fuertes evidencias de la distribución de los grupos al interior del orden. La micromorfología ayudará a la delimitación de géneros y especies, sin embargo, aquí se ha planteado solo el bosquejo de lo que podría resultar información útil. Resta una tarea ardua para el análisis de estos caracteres en los diferentes taxones, tiempos y espacios.

Todo este ensamble de características hace de las Corallinales un grupo con una fuerte identidad, y aun cuando se haya planteado por otros autores (Le Gall & Saunders, 2007), relaciones filogenéticas estrechas con otros organismos con patrones de depositación de calcita, como Rhodogorgonales, hace falta realizar análisis globales de toda la información biológica disponible y aun cuando por análisis combinados (2 marcadores moleculares), las Rhodogorgonales y Corallinales han resultado grupos hermanos, las Corallinales *s.str.* siguen manteniendo su unidad. Esto nos lleva a una conclusión más. Con base en todos los estudios y análisis que se han llevado a cabo hasta el momento sobre los patrones ontogenéticos de las estructuras reproductivas, el proceso de biomineralización, los ecosistemas donde se desarrollan, así como los análisis de secuenciación molecular del marcador 18S ARNr, la familia Sporolithaceae forma parte del orden Corallinales.

Tal vez, y como una propuesta muy aventurada de esta tesis, se sugeriría que sus miembros no son hermanos como lo mostraron algunas pruebas en nuestros análisis y por lo tanto que la familia Sporolithaceae no es monofilética (Fig. IV.4.6 y Fig. IV.4.8). Sin embargo, aun no se tienen todos los estudios necesarios para avalar dicha propuesta. Por el momento en nuestro esquema queda como una familia del orden y la más primitiva de todos los grupos (Ver Le Gall & Saunders 2007 y Le Gall *et al.* 2010 para una mayor discusión).

La gran problemática que es evidente entre los taxones de mastoforoides, no se pudieron dilucidar claramente, sin embargo, comparando nuestros resultados con los resultados de Bailey (1999), Bailey *et al.* (2004), así como con los resultados obtenidos por Harvey *et al.* (2003), proponemos que el complejo *Hydrolithon*, *Spongites* forman parte de la familia Lithophyllaceae (propuesta por este trabajo). Al igual que el género *Metagoniolithon*, por lo cual desaparece la familia Metagoniolithoideae.

Una constante en todos los análisis filogenéticos, como se muestra en los cladogramas de consenso estricto para datos moleculares y de evidencia combinada también, es que *Metamastophora* y *Neogoniolithon*, permanecen como linajes independientes y como grupos hermanos de Lithophyllaceae y Corallinoideae (*s.str.*). Por lo cual aquí proponemos una familia que los integre aun cuando no haya relación monofilética entre ellos: la familia Metamastophoraceae. Es muy importante no olvidar que hacen falta los estudios moleculares de la mayor parte de los representantes mastoforoides, lo cual podría cambiar drásticamente el esquema.

Finalmente el grupo taxonómico que ha pasado todas las pruebas tanto morfológicas como moleculares es el ensamble que conforma a la subfamilia Corallinoideae. Sin embargo, de acuerdo a los diferentes hipótesis filogenéticas, su grupo ancestral cambia, pudiendo ser *Neogoniolithon*, como se observa en el trabajo de Bailey *et al.* (2004), o puede ser *Metagoniolithon* como lo muestra el análisis de Harvey *et al.* (2003), lo cual concuerda parcialmente con el análisis morfológico de esta tesis (sin embargo, cabe destacar que las diferencias en el arreglo de los clados en los diferentes trabajos citados, puede deberse a que no en todos son usados los mismos terminales).

Por el momento una propuesta que surgiría del análisis comparativo entre autores es que la familia Corallinaceae propuesta en este trabajo pudiera ser parafilética, dado que no incluye a su ancestro inmediato. Sin embargo, esto aun requiere ser probado, dado que en los diferentes análisis se hace evidente el conflicto entre el uso de caracteres y terminales.

VI. CONCLUSIÓN

La reevaluación de las propuestas taxonómicas del orden mostró que la información morfológica tiene estructura, orden y contenido filogenético. Sin embargo, son muy importantes y necesarios los estudios de colecciones de herbario y estudios extensivos de poblaciones, para obtener los patrones de desarrollo característicos de los diferentes taxones de corallinas que complementen los patrones conocidos y realizar una mejor definición de caracteres de lo que ahora se tiene.

Por otra parte, los caracteres micromorfológicos requieren una evaluación extensiva en un mayor número de representantes del orden. La información que proporcionan es útil a nivel de delimitación de especies.

Los relacionados con el proceso de biomineralización requieren de estudio extensivos y comparativos, tanto al interior del orden Corallinales como con especies relacionadas para establecer las diferencias en los patrones de depositación y su variación en el orden. Además de la implementación de estudios fisiológicos y Bioquímicos.

Los análisis de evidencia combinada entre caracteres morfológicos y moleculares, mostraron una mejor definición de las relaciones al interior del orden, sin embargo, es necesario realizar un análisis más preciso de los caracteres morfológicos, de su delimitación y de su definición de caracteres y estados de carácter.

Hasta el momento solo se tiene información del marcador molecular 18s ARNr, por lo que es necesario incluir otros marcadores moleculares que ayuden y faciliten dilucidar las relaciones filogenéticas al interior del orden.

Con la información hasta ahora recopilada se puede proponer que la categoría de subfamilia al interior del orden ha perdido un significado en la interpretación de las relaciones de parentesco, aunque taxonómicamente pueda ayudar a delimitar características presentes en los grupos. Por lo que se sugirió que dicha categoría desaparezca y se maneje la categoría de familia solamente, hasta tener mayor evidencia de las relaciones intraordinales.

VII. REFERENCIAS

- Areschoug, J.E. 1852. En: Woelkerling, Wm. J. 1988. *The Coralline Red Algae: An Analysis of the genera and Subfamilies of Nongeniculate Corallinaceae*. British Museum, Oxford University Press, London & Oxford. xi + 268 pp
- Bailey, J.C. & R.L. Chapman. 1998. A phylogenetic study of the Corallinales (Rhodophyta) based on nuclear small-subunit rRNA gene sequences. *Journal of Phycology*. 34: 692-705.
- Bailey, J.C. 1999. Phylogenetic positions of *Lithophyllum incrustans* and *Titanodermapustulatum* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on 18S rRNA gene sequence analyses, with a revised classification of the Lithophylloideae. *Phycologia* 38(3):208-216.
- Bailey, J.C., J.E. Gabel & D.W. Freshwater. 2004. Nuclear 18s rRNA gene sequence analyses indicate that the Mastophoroideae (Corallinaceae, Rhodophyta) is a polyphyletic taxon. *Phycologia* 43: 3-12.
- Bold, H.C. & M.J. Wynne. 1985. *Introduction to the Algae: Structure and Reproduction*. 2nd ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. 720 pp.
- Borowitzka M.A. 1979. Calcium exchange and the measurement of calcification rates in the calcareous red alga *Amphiroa foliacea*. *Mar. Biol.* 50: 339–347.
- Borowitzka M.A. 1982. The morphology and cytology of calcium carbonate deposition by algae. *International Review of Cytology* 74: 127-162.
- Bremer K. 1988. The limit of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- Broadwater, S. T., Harvey, A. S., LaPointe, E. A. & Woelkerling, Wm. J. 2002. Conceptacle structure of the parasitic coralline red alga *Choreonemathuretii* (Corallinales) and its taxonomic implications. *Journal of Phycology*. 38:1157–68.
- Cabioch, J. 1972. Étude sur les Corallinacées. II. La morphogénèse; conséquences, systématiques et phylogénétiques. *Cahiers de Biologie Marine*, 13:137-288.
- Cabioch, J. 1988. Morphogenesis and generic concepts in coralline algae a reappraisal. *Helgoländer Meeresunters.* 42: 493-509.
- Dawson E.Y. 1953. Marine Red Algae of Pacific Mexico. . Part I. Bangiales to Corallinaceae subf. Corallinoideae. *Allan Hancock Pacific Expedition*. 17 (1): 1-171, pl. 1-33.
- Dixon, P.S. 1973. *Biology of the Rhodophyta*. Hafner Press, New York 285 p.
- Esau, K. 1985. Anatomía Vegetal. Ed. Omega, 3ª. ed. Barcelona. 779 pp.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Freshwater, D.W., S. Fredericq, B.S. Buttler, M.H. Hommersand & M.V. Chase. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) bases on plastid rbcL. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 91: 7281-7285.

- Gabrielson, P.W. & D. Garbary. 1987. A cladistic analysis of Rhodophyta: Floridophycidean Orders. *British Phycological Journal* 22: 125-138.
- Garbary D.J. 1978. An introduction to the scanning electron microscopy of red algae. 205-222 in: modern approaches to the taxonomy of red and brown algae (Ed. By DEG Irvine and JH Price). Academic Press. London.
- Garbary D.J. & H.W. Johansen. 1982. Scanning electron microscopy of *Corallina* and *Haliptilon* (Corallinaceae, Rhodophyta): surface features and their taxonomic implications. *Journal of Phycology*. 18: 211-219.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2010. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 19 August 2010.
- Harvey, A.S. & Wm.J. Woelkerling, 1995. An Account of *Austrolithonintumescens* gen. et. sp. nov. and *Boreolithonvan-heurckii* (Heydrich) gen. et. comb. nov. (Austrolithoideae subfam. nov., Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 34(5): 362-382.
- Harvey, A.S., Wm. J. Woelkerling & A.J.K. Millar. 2002. The Sporolithaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia: taxonomy and 18S rRNA phylogeny. *Phycologia* 41(3): 207-227.
- Harvey, S.A., S.T. Broadwater, Wm.J. Woelkerling & P.J. Mitrovski. 2003. *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapalidiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae y Melobesioideae, *Journal of Phycology*, 39: 988-998.
- Hoek, C. van den, D. Mann & H.M. Jahns. 1995. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press.
- Hommersand, M.H. & S. Fredericq 1990. In: Cole K.M. & R.G. Sheat. *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press. pp. 305-346
- Johansen H.W. 1969. Morphology and systematics of coralline algae with special reference to *Calliarthron*. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 49: 98 pp.
- Johansen H.W. 1976. Current status of generic concepts in coralline algae (Rhodophyta). *Phycologia*. 15: 221-244.
- Johansen H.W. 1981. *Coralline Algae*. A first synthesis. CRC Press, Boca Raton, Florida. (vii) + 239 pp.
- Johansen, H.W. & P.C. Silva. 1978. Janieae and Lithotricheae: two new tribes of articulated Corallinaceae (Rhodophyta). *Phycologia* 17(4): 413-417.
- Johansen, H.W. 1970. The diagnostic value of reproductive organs in some genera of articulated coralline algae. *British Phycological Journal*. 5: 79
- Judson B.L. y C.M. Pueschel. 2002. Ultraestructura of trichocyte (hair cell) complexes in *Jania adherens* (Corallinales, Rhodophyta). *Phycologia*. 41(1): 68-78.
- Kim, J.H. M.D. Guiry, J.H. Oak, D.S. Choi, S.H. Kang, H. Chung & H.G. Choi. 2007. Phylogenetic relationships within the tribe Janieae (Corallinales, Rhodophyta) based on molecular and morphological data: A Reappraisal of *Jania*. *Journal of Phycology* 43:1310-1319
- Le Gall, L. & G.W. Saunders. 2007. A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit and large subunit ribosomal DNA: Establishing the new red algal subclass *Corallinophycidae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 1118-1130.

- Le Gall, L., C.E. Payri, L. Bittner & G.W. Saunders. 2010. Multigene phylogenetic analyses support recognition of the Sporolithales ord. nov. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54(1):302-5.
- Lebednik, P.A., 1978. Development of male conceptacles in *Mesophyllum* Lemoine and other genera of the Corallinaceae (Rhodophyta). *Phycologia*, 17: 388-395.
- Matty, P.J. & H.W. Johansen. 1981. A histochemical study of *Corallina officinalis* (Rhodophyta, Corallinaceae). *Phycologia* (20)1: 46-55
- Norris J.N. 1976. Taxonomy of marine algae in the north part of the Gulf of California. PhD. Thesis, University of California, Santa Barbara, USA, 595 pp.
- Norris, J. N. & H. W. Johansen. 1981. Articulated coralline algae of the Gulf of California, México. I. *Amphiroa* Lamouroux. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences* 9:1-29.
- Penrose D. 1992. *Neogoniolithon fosliei* (Corallinaceae, Rhodophyta), the type species of *Neogoniolithon* in southern Australia. *Phycologia* 31: 338-350.
- Posada, D. & K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution, *Bioinformatics* 14(9): 817-818.
- Pueschel C.M. 1990. In: Cole K.M. & R.G. Sheat. *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press. pp. 305-346.
- Pueschel, C.M. & K.M. Cole. 1982. Rhodophycean pit plugs: An Ultrastructural Survey with taxonomic implications. *American Journal of Botany*. 69(5): 703-720.
- Pueschel, C.M. 1987. Absence of cap membranes as a characteristic of pit plugs of some red algal orders. *Journal of Phycology*. 23(2): 150–156.
- Pueschel, C.M., B.L. Judson, J.E. Esken, E.L. Beiter. 2002. A developmental explanation for the *Corallina*- and *Jania*- types of surfaces in articulated coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). *Phycologia*: (41)1:79-86.
- Ragan, M.A., J.C. Bird, E.L. Riceo, R.R. Gutell, C.A. Murphy & R.K. Singh. 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91:7276-7280.
- Rodríguez, F. J.L. Oliver, A, Mann & J.R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. 142(4): 485-501.
- Saunders, Gary W. & M.H. Hommersand. 2004. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany*. 91(10): 1494–1507.
- Silva PC, Johansen HW. 1986. A reappraisal of the order Corallinales (Rhodophyceae). *Br. Phycol. J.* 21: 245–254.
- Swofford, D.L 2002. PAUP* *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)* 4.0 Beta. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Townsend R. A., Y.M. Chamberlain & D. W. Keats. 1994. *Heydrichiawoelkerlingiigen. et sp. nov.*, a newly discovered non-geniculate red alga (Corallinales, Rhodophyta) from Cape Province, South Africa. *Phycologia* 33(3):177-186.
- Townsend, R.A. & W.H. Adey. 1990. Morphology of the Caribbean alga: *Goniolithon improcerum* Foslie et Howe in Foslie (Corallinaceae, Rhodophyta). *Botanica Marina* 33: 99-116.

Townsend, R.A. 1981. Tetrasporangial conceptacle development as a taxonomic character in the Mastophoroideae and Lithophylloideae (Rhodophyta). *Phycologia* 20: 407-414.

Verheij, E. 1993. The genus *Sporolithon* (Sporolithaceae fam. nov, Corallinales, Rhodophyta) from the Spermonde Archipelago, Indonesia, *Phycologia* 32(3):184-96.

Woelkerling W. J. 1988. The Coralline Red Algae: An Analysis of the genera and Subfamilies of Nongeniculate Corallinaceae. British Museum, Oxford University Press, London & Oxford. xi + 268 pp.

Woelkerling W.J. 1988. The Coralline Red Algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. British Museum and Oxford University Press, London and Oxford, 268 pp.

Woelkerling, W. J., L.M. Irvine & A. S. Harvey. 1993. Growth-forms in Non-geniculate Coralline Red Algae (Corallinales, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6: 277-293

Woelkerling, W.J. & A. Harvey. 1992. *Mesophyllum incisum* (Corallinaceae, Rhodophyta) in Southern Australia: implications for generic specific delimitation in the Melobesioideae. *British Phycological Journal* 27: 381-399.

Woelkerling, W.J. & S.J. Campbell. 1992. An account of southern Australian species of *Lithophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Bulletin of the British Museum (Natural History, Botany)* 22: 1-107.

Woelkerling, W.J. 1990. An Introduction. In: Cole K.M. & R.G. Sheat. Biology of the Red Algae. Cambridge University Press. pp. 1-6.

Woelkerling, W.J. 1996. Corallinales. In: Womersley H.B.S. 1996. The marine benthic flora of Southern Australia. Part. IIIB. Flora of Australia Supplementary Series Number 5. Canberra, Australia.

Woelkerling, Wm.J., G. Sartoni & S. Boddi. 2002. *Paulsilvellahuveorum gen. & sp. nov.* (Corallinaceae, Rhodophyta) from the Holocene of Somalia and Kenya, with a reassessment of *Lithothrix antiqua* from the Late Pleistocene of Mauritius. *Phycologia* 41(4): 358-373.

Womersley, H.B.S. 1994. The marine benthic flora of southern Australia - Part IIIA - Bangiophyceae and Florideophyceae (Acrochaetiales, Nemaliales, Gelidiales, Hildenbrandiales and Gigartinales sensu lato). Australian Biological Resources Study. pp. 1-508, 167.

VIII. ANEXO:

Ciencias Marinas (2010), 36(1): 41–58

Characterization of the CaCO₃ biomineral in coralline red algae (Corallinales) from the Pacific coast of Mexico

Caracterización del biomineral CaCO₃ en algas rojas coralinas (Corallinales) de las costas del Pacífico mexicano

D Fragoso^{1,4*}, F Ramírez-Cahero², A Rodríguez-Galván², R Hernández-Reyes³, A Heredia^{2*}, D Rodríguez, M Aguilar-Franco³, L Bucio³, VA Basiuk²

¹ Laboratorio de Ficología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Apartado postal 70–592, 04510 México DF, México. * E-mail: dalila_f@live.com.mx, alejandropicoheredia@googlemail.com

² Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 México DF, Mexico.

³ Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 01000 México DF, México.

⁴ Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

ABSTRACT. Coralline red algae assimilate HCO₃⁻ to precipitate CaCO₃ in their tissues in the form of calcite or aragonite. A characterization of the biomolecular content and the crystalline structure of the biomineral of coralline red algae from the Pacific coast of Mexico was performed by powder X-ray diffraction (XRD), scanning electron (SEM) and tunneling microscopy (STM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The preliminary conclusion drawn from the results is that this type of calcite-aragonite biomineral has a very low organic content occluded within the crystals. FTIR bands at 2945 and 2889 cm⁻¹ indicate that the most likely organic molecules are carbohydrates; moreover, peptide bond bands (amide I ~1640 and amide II ~1540 cm⁻¹) were not detected, suggesting that proteins are not related to mineral synthesis or their stabilization. This could be explained if a biologically controlled extracellular mineralization process synthesizes the biomineral. The XRD study showed two main mineral phases, calcite and aragonite, with very similar structural parameters to the inorganic mineral counterparts. The crystallite shapes, seen by STM, were found as plates and needles with different sizes, between 20 and 100 nm.

Key words: Corallinales, biomineral, Rietveld method, nanostructure, scanning tunneling microscopy

RESUMEN. Las algas rojas coralinas asimilan HCO₃⁻ para precipitar CaCO₃ en sus tejidos en forma de calcita o aragonita. Se realizó una caracterización del contenido biomolecular así como de la estructura cristalina del biomineral en algas rojas coralinas de las costas del Pacífico mexicano mediante difracción de rayos X (XRD) en polvos, microscopía electrónica de barrido (MEB) y de túnel (STM), y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Con los resultados se llegó a la conclusión preliminar de que este tipo de calcita-aragonita tiene un muy bajo contenido de materia orgánica oculta dentro de los cristales. Las bandas de FTIR a 2945 y 2889 cm⁻¹ encontradas indican que las moléculas orgánicas más probables son los hidratos de carbono; además, no se detectaron bandas de enlace peptídico (amida I ~1640 y amida II ~1540 cm⁻¹), lo que sugiere que las proteínas no están relacionadas con la síntesis mineral o con su estabilización. Esto se podría explicar si el biomineral fuera sintetizado por un proceso extracelular de mineralización controlado biológicamente. El análisis de XRD mostró dos fases minerales principales, calcita y aragonita, muy similares en sus parámetros estructurales a sus contrapartes minerales inorgánicas pero con modificaciones en la estructura molecular. Las formas y tamaños de los cristales, vistos mediante STM, son típicamente en placas y agujas de diferentes tamaños, entre 20 y 100 nm.

Palabras clave: Corallinales, biomineral, método de Rietveld, nanoestructura, microscopía de túnel.

INTRODUCTION

The most important carbonate plant producers in aquatic ecosystems are the multicellular red coralline algae, taxonomically classified in the order Corallinales (Silva and Johansen 1986). In this algal group, calcite is deposited throughout the cell walls except in some limited and specialized regions, such as articulations. Similar to other groups of marine organisms like coral reefs (Mann 2001), these algae

assimilate HCO₃⁻ to precipitate CaCO₃ in their tissues in order to build their hard biological structures. As is well known, their cell

INTRODUCCIÓN

Los principales vegetales productores de carbonato en los ecosistemas acuáticos son las algas coralinas rojas multicelulares, taxonómicamente clasificadas en el orden Corallinales (Silva y Johansen 1986). En este grupo de algas la calcita es depositada sobre las

paredes celulares excepto en algunas regiones limitadas y especializadas como las articulaciones. Al igual que otros grupos de organismos marinos como los arrecifes coralinos (Mann 2001), estas walls consist of micro- and nanostructured carbonate mineral, mainly calcite, with a hierarchically ordered structural design exceeding current manufacturing capabilities. Similar to other biominerals, biologically formed carbonates in red algae are produced under biomolecular-controlled mechanisms not yet understood (Addadi and Weiner 1992, Mann 2001) but closely related to the photosynthesis process (Borowitzka 1979, Haïkali *et al.* 2004). Calcium carbonate biomineralizing organisms use Ca^{2+} , Mg^{2+} , and CO_3^{2-} as the source for developing the mineral, which is then processed by coupling to specific organic molecules to form the calcite-aragonite related structures. In this regard, recent findings of some biomolecules related to biominerals are very important to determine how those biomolecule-crystal interactions occur, as well as to determine how molecules change the shape and atomic parameters of the unit cell of the inorganic solid.

Apparently, CaCO_3 formation in red algae is a highly dynamic process, during which interactions between C=O bonded molecules and chemical elements contribute to change the crystalline d -parameters and crystallite shapes (Pueschel *et al.* 1992). The crystals appear first in the cell in a reticulum with shapes from rhombohedral to subspherical (Pueschel *et al.* 1992). Other studies condensed in the review of Bilan and Usov (2001) clearly show that the mineralization process in coralline algae is a very complex phenomenon not just in the biomineral formation but in the synthesis of rare organic polysaccharides (Bilan and Usov 2001). Moreover, unlike other biomineral structures, coralline red algae have the exceptional ability to modify their biomineral (Allemand *et al.* 2004) and organic (Bilan and Usov 2001) content during different seasons by alternating between calcite and aragonite (Adey 1970), or to include different elements controlled by changes in environmental temperature (Kamenos *et al.* 2008). The lack of information about molecules encapsulated in the walls of coralline red algae (CaCO_3 , MgCO_3) makes it difficult to determine how interactions between inorganic groups and organic compounds occur (Allemand *et al.* 2004). Hence, unraveling the processes

involved in CaCO_3 biomolecular and physicochemical aspects contribute to the formation of mineral cellular structures (Addadi and Weiner 1992, Mann 2001, Allemand *et al.* 2004). In CaCO_3 from coralline red algae the interactions between Ca^{2+} and CO_3^{2-} species with organic molecules may be of prime importance in crystal nucleation and growth in the hierarchical biomineral (Medakovi *et al.* 1995). Indeed, organic molecules modify almost all the hierarchies in the inorganic solid in a bottom-up strategy including the atom parameters and crystal unit cell as in bone apatite (Heredia 2000),

mol-lusks (Pokroy *et al.* 2006), and corals (Pokroy *et al.* 2006, Przenioslo *et al.* 2008). In coralline algae, the low concentration of organic molecules allows algae to assimilate HCO_3^- to precipitate CaCO_3 in their tissues in order to construct their biological structures rigidly. As is well known, their cellular walls are constituted of micro and nanostructured, principally calcite, with ordered structures hierarchically that up to the moment have been impossible to manufacture. Al igual que otros biominerales, los carbonatos formados biológicamente en las algas rojas son producidos mediante mecanismos controlados biomolecularmente que aún no se entienden (Addadi y Weiner 1992, Mann 2001) pero que están estrechamente relacionados con el proceso de fotosíntesis (Borowitzka 1979, Haïkali *et al.* 2004). Los organismos que biomineralizan CaCO_3 utilizan Ca^{2+} , Mg^{2+} y CO_3^{2-} como fuente para generar los minerales que luego se acoplan a moléculas orgánicas específicas, formando estructuras relacionadas de calcita-aragonita. En este sentido, los recientes hallazgos de algunas biomoléculas derivadas de biominerales resultan de gran importancia para entender las interacciones entre biomoléculas y cristales, así como para determinar cómo inciden las moléculas en la forma y los parámetros atómicos de la celda unitaria del sólido inorgánico.

Aparentemente, la formación de CaCO_3 en las algas rojas es un proceso muy dinámico durante el cual las interacciones entre las moléculas ligadas mediante enlaces C=O y otros elementos químicos contribuyen en la modificación de las formas y los parámetros d cristalinos (Pueschel *et al.* 1992). Los cristales aparecen primero en la célula en un retículo con formas que van de romboédricas a subsféricas (Pueschel *et al.* 1992). Otros estudios (ver revisión de Bilan y Usov 2001) muestran claramente que la mineralización en algas coralinas es un proceso muy complejo no sólo en la formación de biominerales sino también en la síntesis de polisacáridos orgánicos poco comunes (Bilan y Usov 2001). Además, a diferencia de otras estructuras biominerales, las algas rojas coralinas tienen una capacidad excepcional para modificar su contenido de biominerales (Allemand *et al.* 2004) y orgánico (Bilan y Usov 2001) en las diferentes estaciones del año alternando entre calcita y aragonita (Adey 1970), o de incluir diferentes elementos controlados por cambios en la temperatura ambiental (Kamenos *et al.* 2008). La falta de información sobre moléculas encapsuladas en las paredes de las algas rojas coralinas (CaCO_3 , MgCO_3) dificulta la determinación de cómo suceden las interacciones entre grupos inorgánicos y compuestos orgánicos (Allemand *et al.* 2004). Por ende, el estudio de los procesos involucrados en la biosíntesis de CaCO_3 proporcionará información sobre aspectos biomoleculares y fisicoquímicos que contribuyen a la formación de estructuras celulares biominerales (Addadi y Weiner 1992, Mann 2001, Allemand *et al.* 2004). En el CaCO_3 de las algas rojas coralinas,

las interacciones entre especies de Ca^{2+} y CO_3^{2-} y moléculas orgánicas podría ser de vital importancia en la formación de núcleos y en el crecimiento de in the biomineral (Medaković *et al.* 1995) makes it difficult to establish how the organic components are responsible for the anisotropy or uptake of inorganic ions in the inorganic structures (Degens 1989, Aizenberg *et al.* 1994). These studies are of interest in order to tailor the (bio)physicochemical properties of a synthesis route for the production of highly hierarchical ordered structures or to translate this knowledge to understand the self-assembly and design of novel high performance calcium- based materials (Mann 2001).

We approached this challenge by analyzing different species of the order Corallinales. The calcite and aragonite of these species exhibit higher Mg^{2+} content than the mineral species (Medaković *et al.* 1995), decreasing the unit cell size in a more compact biomineral structure (Cusack *et al.* 2003). The CaCO_3 biomineral of coralline red algae is located at the exterior of the plasma membrane of the cells and is protected against spontaneous dissolution in aquatic ecosystems by the texture of crystals or inclusion of Mg^{2+} atoms in the unit cell of the crystallites (Medaković *et al.* 1995).

Here, we revised the taxonomy of coralline red algae to gain an insight of their structural features at different scales, such as its bio-organic content associated with the CaCO_3 biomineral, its mineralogical content and its microscale crystalline arrangement, and we used the Rietveld method to analyze the nanoscale deformation of the atomic parameters of the biomineral. The interest of this paper is the biomineral analysis of different species of coralline red algae obtained from the Pacific coast of Mexico, by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), powder X-ray diffraction (XRD), low vacuum scanning electron microscopy (LVSEM) with energy dispersive spectroscopy (EDS), and scanning tunneling microscopy (STM). The aim of the present study was to obtain information and new data on the composition of the mineral deposits and nanostructure regarding mineral content and to perform an elemental analysis of the different genera of coralline red algae (e.g., *Amphiroa*, *Jania*, *Lithophyllum*, *Neogoniolithon*, and *Pneophyllum*) that are predominantly distributed on the tropical Pacific coast of Mexico. Some of these species have been the object of CaCO_3 biomineral characterization; however, little information is available on the composition and structure of the mineral deposits of these species on the Mexican coast. A comparison is also made with other species (e.g., *Bossiella*, *Calliarthron*, *Halitilton*, and *Lithothrix*) that have a particular distribution, mainly on the Pacific coast of northern Mexico. Little is also known about relationships and interactions between the composition of mineral deposits and environmental factors.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

los cristales de un biomineral jerárquicamente ordenado (Medaković *et al.* 1995). De hecho, las moléculas orgánicas modifican casi todas las jerarquías en el sólido inorgánico en una estrategia de abajo hacia arriba que incluye parámetros atómicos y la celda cristalina unitaria tal como sucede en la apatita ósea (Heredia 2000), moluscos (Pokroy *et al.* 2006) y corales (Pokroy *et al.* 2006, Przenioslo *et al.* 2008). En las algas coralinas, la baja concentración de moléculas orgánicas en el biomineral (Medaković *et al.* 1995) complica establecer la contribución de los compuestos orgánicos a la anisotropía o la captación de iones inorgánicos por las estructuras inorgánicas (Degens 1989, Aizenberg *et al.* 1994). Estos estudios son de interés para determinar las propiedades (bio) físicoquímicas de una ruta de síntesis para la producción de estructuras con un gran orden jerárquico o para traducir este conocimiento para entender la generación y diseño de materiales novedosos de alto desempeño, a base de calcio (Mann 2001).

Este tema se abordó analizando el biomineral de diferentes especies del orden Corallinales. La calcita y la aragonita en estas especies muestran un mayor contenido de Mg^{2+} que sus contrapartes de origen orgánico (Medaković *et al.* 1995), disminuyendo el tamaño de la celda unitaria en una estructura biomineral más compacta (Cusack *et al.* 2003). El biomineral de CaCO_3 de las algas rojas coralinas se encuentra en el exterior de la membrana plasmática de las células y en los ecosistemas acuáticos es protegido contra su disolución espontánea mediante la textura de los cristales o la inclusión de átomos de Mg^{2+} en la celda cristalina unitaria (Medaković *et al.* 1995).

En este trabajo se hizo una revisión taxonómica de las algas rojas coralinas para entender mejor sus características estructurales a diferentes escalas, como su contenido bioorgánico asociado con el CaCO_3 biomineral, su contenido mineralógico y su organización cristalina a microescala, y se utilizó el método de Rietveld para analizar la deformación de los parámetros atómicos del biomineral a nano escala. Este trabajo está enfocado al análisis biomineral de diferentes especies de algas rojas coralinas obtenidas de las costas del Pacífico de México, mediante la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés), difracción de rayos X en polvos (XRD), microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LVSEM) con espectroscopía de dispersión de energía (EDS) y microscopía de efecto túnel (STM). Su objetivo fue obtener información y nuevos datos sobre la composición de los depósitos de minerales y la nanoestructura en cuanto a su contenido mineral, así como desarrollar un análisis elemental de los diferentes géneros de algas rojas coralinas (e.g., *Amphiroa*, *Jania*, *Lithophyllum*, *Neogoniolithon* y *Pneophyllum*) que se encuentran principalmente en las costas tropicales del Pacífico

mexicano. Algunas de estas especies han sido caracterizadas en su contenido de CaCO₃ biomineral. Specimens of different species of coralline red algae were randomly selected considering their representativeness on the Pacific coast of Mexico (fig. 1), taking into consideration their abundance and distribution (table 1). All specimens were collected from the intertidal zone.

There are two groups of species according to the natural conditions. Cold-water species live on the northwestern coast of Mexico, such as *Bossiella orbigniana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*, *Haliptilon gracile*, and *Lithothrix aspergillum*. These species have a restricted distribution, mainly along the northwestern coast of the Baja California Peninsula. The peninsula is influenced by the California Current (Hubbs and Roden 1964, Wyrki 1965), which flows to the SE of the North Pacific Current, carrying water of subarctic origin characterized by low temperatures, low salinity, and high oxygen content. The pattern of flow and limits vary seasonally: from December to July the current flows almost parallel to the coast, covering the entire length of the west coast of the Baja California Peninsula, whereas from December to April coastal components move SE to about 15° N in the tropics; from August to November the direction is variable, most of the flow being offshore and having as inferior limit Punta Eugenia (28° N), where it deflects towards the SW. The surface temperature of coastal waters increases in relation to the latitudinal gradient following a general NW—SE direction. During the winter, the change in temperature is continuous along the ocean margin, between 32°43' and 18° N, throughout the west coast of the Baja California Peninsula, continuing to the tropical coast of Mazatlán. In summer the pattern holds, presenting a shift from 15°C to 29°C. Salinity presents a similar pattern to temperature, decreasing latitudinally towards the SE. It varies from 33.6 to 34.8 in both summer and winter, but a higher gradient is observed during the latter, reaching 34 at the latitude of Punta Eugenia, while in the summer this salinity is not reached but at Magdalena Bay (Maluf 1983).

The second group of corallines consists of typical tropical water species, such as *Amphiroa mexicana*, *Jania tenella*,

sin embargo, existe poca información sobre la composición y la estructura de los depósitos de minerales de estas especies en las costas de México. También se realizó una comparación con otras especies (e.g., *Bossiella*, *Calliarthron*, *Haliptilon* y *Lithothrix*) que tienen una distribución particular, especialmente en la costa del Pacífico del norte de México. Cabe hacer notar que tampoco se sabe mucho sobre la relación e interacción entre la composición de los depósitos de minerales y los factores ambientales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se seleccionaron aleatoriamente especímenes de diferentes especies de algas rojas coralinas, todos ellos recolectados de la zona intermareal, considerando su representatividad en la costa del Pacífico mexicano (fig. 1) y tomando en cuenta su abundancia y distribución (tabla 1).

Existen dos grupos de especies según las condiciones naturales. En la costa noroeste de México existen especies de agua fría como *Bossiella orbigniana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*, *Haliptilon gracile* y *Lithothrix aspergillum*, cuya distribución está restringida principalmente a lo largo de la costa noroccidental de la Península de Baja California que es influenciada por la Corriente de California (Hubbs y Roden 1964, Wyrki 1965) que fluye hacia el SE de la Corriente del Pacífico Norte y acarrea agua de bajas temperaturas, baja salinidad y alto contenido de oxígeno, de origen subártico. El patrón y los límites de este flujo varían estacionalmente: de diciembre a julio la corriente fluye en dirección casi paralela a la costa, cubriendo todo lo largo de la costa occidental de la península, mientras que entre diciembre y abril los componentes costeros se trasladan al SE hasta alrededor de los 15° N en el trópico; de agosto a noviembre su dirección es variable, la mayoría del flujo es mar adentro y su límite inferior es Punta Eugenia (28° N), donde se desvía hacia el SO. La temperatura superficial de las aguas costeras incrementa en relación con el gradiente latitudinal siguiendo en general una dirección NO—SE. Durante el invierno, el

Pneophyllum aff. *fragile*, *Neogoniolithon trichotomum*, and *Lithophyllum* aff. *frondosum*.

Table 1. Species of Corallinales analyzed by different methods of microscopy.

Tabla 1. Especies de Corallinales analizadas por diferentes métodos de microscopía.

Species	Herbarium reference
<i>Amphiroa mexicana</i> Taylor	PTM 6160
<i>Bossiella orbigniana</i> (Dec.) Silva sup. <i>dichotoma</i> (Matz) Johansen	IPN 11938
<i>Calliarthron cheilosporoides</i> Matz	IPN 1235
<i>Corallina vancouveriensis</i> Yendo	IPN 12275
<i>Haliptilon gracile</i> (Lamour.) Johansen (Lam.) Garbary and HW Johansen	IPN 12266
<i>Jania tenella</i> (Kützting) Grunow	PTM 820, PTM 1384, PTM 1950, PTM 1703
<i>Neogoniolithon trichotomum</i> (Heydrich) Setchell and Mason	Neo01
<i>Pneophyllum</i> aff. <i>fragile</i> Kützting	Pne01
<i>Lithophyllum</i> aff. <i>frondosum</i> (Dufour) Frazar, Cornaci and Alongi	Li01
<i>Lithothrix aspergillum</i> JE Gray	IPN 13029

These species are distributed from the intertidal zone and have been recorded in greater abundance mainly on the coast of Jalisco, Michoacán, Guerrero, and Oaxaca. This entire region is influenced by the Costa Rica Coastal Current, which derives from the Equatorial Countercurrent carrying water of tropical origin (Hubbs and Roden 1964, Wyrki 1965). High surface temperatures, high salinity, and low oxygen concentration characterize it. The seasonal variation in average minimum temperatures is of one degree (28–29°C); however, local changes occur either due to the influence of upwelling, when lower temperatures are superimposed to the general pattern, or by the isolation of water bodies, causing an increase in temperature. In the tropical portion, salinity is relatively high and fairly uniform, with values ranging from 32 to 36.5 (de la Lanza 1991). It is important to note that though Corallinales species are widely distributed on the Mexican Pacific coast, most studies are related to the Mexican tropical Pacific region. Nongeniculate coralline species are early colonists covering 80–90% of the primary substrate (Steneck 1986) to become substrate of the rest of the benthic algal assemblage. There are as many as 50 nongeniculate species distributed throughout the Mexican tropical Pacific region (Fragoso and Rodríguez 2002).

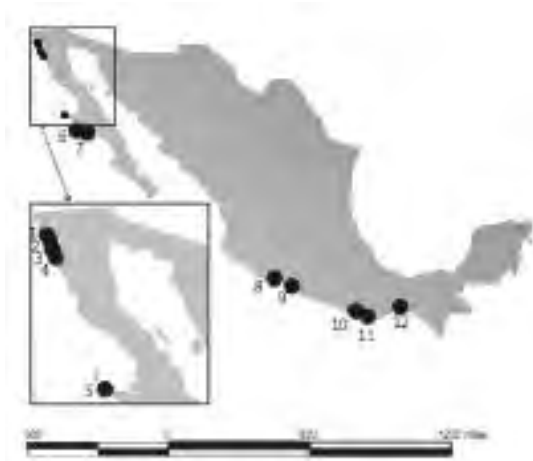


Figure 1. Coralline sampling sites: (1) Ensenada, Baja California (BC); (2) Punta Banda, BC; (3) Punta San Isidro, BC; (4) Irrendra, BC; (5) Punta Eugenia, Baja California Sur (BCS); (6) Bahía Tortugas, BCS; (7) Bahía Magdalena, BCS; (8) Caleta de Campo, Michoacán; (9) Zihuatanejo, Guerrero; (10) San Agustín, Oaxaca (Oax.); (11) Cacaluta, Oax., and (12) La Ventosa, Oax.

Figure 1. Sitios de colecta de corallinas: (1) Ensenada, Baja California (BC); (2) Punta Banda, BC; (3) Punta San Isidro, BC; (4) Irrendra, BC; (5) Punta Eugenia, Baja California Sur (BCS); (6) Bahía Tortugas, BCS; (7) Bahía Magdalena, BCS; (8) Caleta de Campo, Michoacán; (9) Zihuatanejo, Guerrero; (10) San Agustín, Oaxaca (Oax.); (11) Cacaluta, Oax., y (12) La Ventosa, Oax.

gradiente de temperatura es continuo en el margen

oceánico entre 32°43 y 18°N a lo largo de la costa occidental de la Península de Baja California, continuando hasta la costa tropical de Mazatlán. Este patrón prevalece en el verano, presentando un cambio de 15°C a 29°C. La salinidad muestra un patrón similar al de la temperatura, decreciendo latitudinalmente hacia el SE; varía entre 33.6 y 34.8 tanto en verano como en invierno, pero aumenta más rápidamente durante este último, alcanzando 34 a la altura de Punta Eugenia, mientras que en verano esta salinidad no se alcanza sino hasta Bahía Magdalena (Maluf 1983).

El segundo grupo corallinas consiste de especies típicas de aguas tropicales como *Amphiroa mexicana*, *Jania tenella*, *Pneophyllum* aff. *fragile*, *Neogoniolithon trichotomum* y *Lithophyllum* aff. *frondosum*. Estas especies se distribuyen desde la zona intermareal y se han registrado en mayor abundancia particularmente en las costas de Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Toda esta región es influenciada por la Corriente Costera de Costa Rica, la cual deriva de la Contracorriente Ecuatorial y acarrea agua de origen tropical (Hubbs y Roden 1964, Wyrki 1965) caracterizada por altas temperaturas superficiales, alta salinidad y baja concentración de oxígeno. La variación estacional de la temperatura media mínima es de un grado (28–29°C); sin embargo, se presentan cambios locales debido a la influencia de surgencias, cuando menores temperaturas se imponen al patrón general, o por el aislamiento de cuerpos de agua que ocasiona incrementos en la temperatura. En la porción tropical la salinidad es relativamente alta y bastante uniforme, con valores que varían entre 32 y 36.5 (de la Lanza 1991).

Es importante indicar que a pesar de la amplia distribución de las Corallinales en las costas del Pacífico mexicano, la mayoría de sus estudios se enfocan en la región tropical. Las especies no geniculadas son los primeros colonizadores y cubren 80–90% del sustrato primario (Steneck 1986) para convertirse en el sustrato del conjunto de las demás algas bentónicas. Existen hasta 50 especies no geniculadas en todo el Pacífico tropical mexicano (Fragoso y Rodríguez 2002), donde trabajos realizados muestran que, especialmente en Guerrero y Oaxaca, *L. aff. frondosum* y sus especies relacionadas son las más importantes, presentando el mayor índice de abundancia específico en base a frecuencia y cobertura (López *et al.* 2000, 2004); este también parece ser el caso de *P. aff. fragile* y *N. trichotomum* (obs. pers.). En los ecosistemas de arrecifes coralinos, los cambios en la abundancia de algunas especies de algas corallinas no geniculadas pueden regular la abundancia de otros componentes arrecifales, incluyendo los corales, y modificar la estructura y función del ecosistema, por lo que son consideradas grupos funcionales claves (Harrington 2004). En las comunidades corallinas de Zihuatanejo y Huatulco (Pacífico tropical mexicano), las bases de las colonias de diferentes especies de *Pocillopora*, cuya característica distintiva es no Studies in this region have shown that in Guerrero

and Oaxaca especially, *L. aff. frondosum* and related species are the most important for they have the highest specific abundance index based on their cover and frequency values (López *et al.* 2000, 2004); this also seems to be the case for *P. aff. fragile* and *N. trichotomum* (pers. obs.). In coral reef ecosystems, changes in the abundance of some nongeniculate coralline species can regulate the abundance of other reef components, including corals, and modify the structure and function of the ecosystem; they are then considered key functional groups (Harrington 2004). In the coralline communities of Zihuatanejo and Huatulco (Mexican tropical Pacific), the bases of *Pocillopora* colonies of different species, whose distinctive feature is that they can not form solid and large calcareous basements, are colonized by nongeniculate coralline species, giving the colony a great structural support (Oseguera pers. comm.).

The geniculate or articulated coralline species together with other algal species form a dense turf. *Amphiroa* and *Jania* species are the most important along the Mexican Pacific coast, excluding the nongeniculate species. Due to the architectural complexity of turf, it provides habitat for diverse assemblages of macrofauna (Kelaher *et al.* 2003), giving space, refuge, and food resources to several species. Data from Zihuatanejo Bay (García 2009) show that the macrofauna (organisms of 0.5–1 mm *sensu* Bilyard 1987, Warwick 1988) include a large number of species belonging to six phyla (Annelida, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, Sipuncula, and Platyhelminthes), with high densities, generally greater than 200 ind 0.1 m⁻².

Processing samples

The samples of different species were washed with tap water for 24 h. Their surfaces were carefully observed under a stereomicroscope and brushed with a bristle brush to remove any epiphytes, and were then processed for different microscopy analysis. In general, small fragments of each plant of each species were used. The samples consisted of fragments (0.5–1 cm) of the main or associated lateral branches. The crustose coralline specimens were fractured and small pieces (0.5–1 cm) of different parts of the thallus were analyzed. The entire biomineral structures were carefully washed with distilled water and air dried. The specimens were analyzed by LVSEM-EDS, STM, FTIR, and XRD. Two samples with more than one crystalline phase were selected to perform high resolution XRD to gain an insight of their fine mineral content by Rietveld refinements.

LVSEM-EDS

In the LVSEM analysis, all the samples were fixed in a sample holder using only carbon ribbon, without any additional preparation.

poder formar bases calcáreas sólidas y grandes, son colonizadas por especies no geniculadas que proporcionan a la colonia un gran soporte estructural (Oseguera com. pers.).

Las algas geniculadas o articuladas, junto con otras especies, forman una densa cobertura vegetal. Las especies de *Amphiroa* y *Jania* son las más importantes a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, después de las especies no geniculadas. La complejidad arquitectural de esta cobertura la convierte en un hábitat para diversos conjuntos de macrofauna (Kelaher *et al.* 2003), a quienes proporciona espacio, refugio y alimento. Datos de la bahía de Zihuatanejo (García 2009) muestran que esta macrofauna (organismos de 0.5–1 mm según Bilyard 1987, Warwick 1988) incluye gran número de especies que pertenecen a seis filos (Annelida, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, Sipuncula y Platyhelminthes), con altas densidades, generalmente mayores que 200 ind 0.1 m⁻².

Procesamiento de muestras

Se lavaron las muestras de diferentes especies con agua de la llave durante 24 h. Sus superficies fueron cuidadosamente observadas bajo un estereomicroscopio, eliminando epífitos con un cepillo, y luego se procesaron mediante diferentes análisis microscópicos. En general se usaron fragmentos pequeños de cada planta de cada especie. Las muestras consistieron de fragmentos del eje principal o de las ramas laterales asociadas (0.5–1 cm). Los especímenes de algas coralinas incrustantes se fracturaron y se analizaron piezas pequeñas (0.5–1 cm) de diferentes partes del talo. Las estructuras biominerales completas fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada y secadas al aire. Los especímenes se analizaron por LVSEM-EDS, STM, FTIR y XRD. Se seleccionaron dos muestras con más de una fase cristalina para realizar XRD de alta resolución y determinar su contenido de material fino mediante refinamientos Rietveld.

LVSEM-EDS

En el análisis de LVSEM, se fijaron todas las muestras en un portamuestras usando sólo cinta de carbón, sin ninguna preparación adicional. Para este análisis se utilizó un instrumento JSM-5900LV. Las mediciones se realizaron a un bajo vacío de 1–250 Pa (0.01–2.5 Torr), con un voltaje de aceleración de 5–20 kV. Se llevaron a cabo análisis químicos adicionales midiendo espectros de EDS por análisis cuantitativo ZAF.

STM

Las muestras fueron pulverizadas y depositadas sobre superficies de grafito pirolítico de alto ordenamiento (soportes HOPG de ca 5 × 5 mm

proporcionados con el instrumento). La STM (Binning *et al.* 1982) se trabajó en modo de corriente constante a temperatura ambiente. Se usó un LVSEM JSM-5900LV instrument was used. We performed measurements at a low vacuum of 1—250 Pa (0.01—2.5 Torr), with an acceleration voltage of 5—20 kV. Additional chemical analyses were performed measuring EDS spectra by ZAF quantitative analysis.

STM

The samples were pulverized and deposited on surfaces of highly ordered pyrolytic graphite (HOPG *ca* 5 × 5-mm supports supplied with the instrument); STM (Binning *et al.* 1982) was operated in constant current mode at room temperature. Tunneling conditions were used to optimize the imaging (bias voltage 1.01—1.52 V and tunneling current 0.050—0.4 nA). STM imaging was carried out under open-air conditions using Nanosurf EasyScan E-STM version 2.1 hardware with a maximum scan range of 624 × 624 nm. Freshly cut Pt/Ir wire probes of 0.25-mm diameter were used for the scan. Deposition of the samples onto freshly cleaved HOPG surfaces was performed as follows: red algal material was cleaned with distilled water and then dried; portions were ground in a glass mortar and the powder deposited on the HOPG substrates ready for analysis.

FTIR

In order to gain some insight into the type of biopolymer and the chemical nature of the biomineral, FTIR measurements were performed. The samples were ground and mixed with KBr powder (100:1 ratio), and then compressed into pellets. A Nicolet 680 FT-IR spectrometer was used with a 4 cm⁻¹ resolution and each sample was scanned 64 times. To determine the precise wave number of the different chemical groups produced in the scans, cross-referencing was performed against previously reported group-specific wavenumbers. In the case of the FTIR of *Calliarthron* sp., smoothing was applied.

XRD

For XRD analysis, the ground samples were studied using a Bruker D8 Advance diffractometer (room temperature) with Cu K α radiation having a $\lambda = 1.5406$ configuration and a graphite secondary beam monochromator. We performed short XRD analysis in order to inspect the mineralogical content of the whole structures. The scan was done between 3° and 80°, with a 2 θ step of 0.05 and 0.5 s per point. For the XRD patterns suitable for Rietveld refinement we measured the diffraction intensities between 20° and 80°, with a 2 θ step of 0.02 and a counting time of 8 s per point.

Rietveld method for powder XRD

ron las condiciones de túnel para optimizar las imágenes (voltaje de sesgo de 1.01—1.52 V y corriente túnel de 0.050—0.4 nA). Las imágenes de STM se obtuvieron al aire libre usando el sistema Nanosurf EasyScan E-STM versión 2.1 con un intervalo de barrido de 624 × 624 nm. Para el barrido se utilizaron sondas metálicas de Pt/Ir recién cortadas de 0.25 mm de diámetro. El depósito de las muestras sobre superficies de HPOG recientemente preparadas se realizó como sigue: el material algal fue lavado con agua destilada y secado; se trituraron porciones en un mortero de vidrio y el polvo se depositó sobre los sustratos de HOPG preparados para el análisis.

FTIR

Para obtener información sobre el tipo de biopolímero y la naturaleza química del biomineral, se realizaron mediciones de FTIR. Las muestras se trituraron y se mezclaron con polvo KBr (razón de 100:1), y posteriormente se comprimieron en píldoras. Se empleó un espectrómetro Nicolet 680 FT-IR con una resolución de 4 cm⁻¹ y cada muestra se barrió 64 veces. Para determinar el número exacto de ondas de los diferentes grupos químicos producidos en los barridos, éstos se compararon con números de ondas de grupos específicos previamente publicados. En el caso de la FTIR de *Calliarthron* sp., se aplicó suavizado.

XRD

Para el análisis de XRD se estudiaron las muestras pulverizadas usando un difractómetro Bruker D8 Advance (a temperatura ambiente) con radiación de Cu K α una configuración $\lambda = 1.5406$ y un monocromador secundario de grafito. Se hicieron análisis cortos de XRD para examinar el contenido mineralógico de las estructuras enteras. El barrido se realizó entre 3° y 80°, con un paso de 2 θ de 0.05 y 0.5 s por punto. Para los patrones de XRD adecuados para el refinamiento Rietveld se midieron las intensidades de difracción entre 20° y 80°, con un paso de 2 θ de 0.02 y un tiempo de conteo de 8 s por punto.

Método de Rietveld para XRD en polvos

Implementado en el programa FULLPROF (Rodríguez- Carvajal 1981, Thompson *et al.* 1987, Young 1993), el método de Rietveld es utilizado para refinar estructuras de cristales con parámetros iniciales a partir de datos publicados para una estructura de tipo mineral, en este caso la calcita ($a = 4.9896$ Å, $c = 17.0610$ Å, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$), la dolomita ($a = 4.812$ Å, $c = 16.020$ Å, $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) (Effenberger *et*

al. 1981), y la aragonita ($a = 4.9611 \text{ \AA}$, $b = 7.9672 \text{ \AA}$, $c = 5.7407 \text{ \AA}$, y $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$) (Villiers 1971). El método de Rietveld se usa para varias cosas como estudiar el cambio en la anisotropía de las tensiones entre los átomos cuando Implemented in the FULLPROF program (Rodríguez- Carvajal 1981, Thompson *et al.* 1987, Young 1993), the Rietveld method is used to refine crystal structures with initial parameters from the data reported for a mineral type structure, in this case calcite ($a = 4.9896 \text{ \AA}$, $c = 17.0610 \text{ \AA}$, and $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$), dolomite ($a = 4.812 \text{ \AA}$, $c = 16.020 \text{ \AA}$, and $\alpha = 90.0^\circ$, $\beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) (Effenberger *et al.* 1981), and aragonite ($a = 4.9611 \text{ \AA}$, $b = 7.9672 \text{ \AA}$, $c = 5.7407 \text{ \AA}$, and $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$) (Villiers 1971). The Rietveld method is used with many other aims, such as to study the change in the anisotropy of the tensions among atoms when they interact with the organic molecules as in the case of mollusk shells (Pokroy *et al.* 2006) and corals (Przenioslo *et al.* 2008). We modified the Rietveld parameters because the diffractograms showed changes in unit cell parameters, crystal sizes, and peak shape, with tails on the right side. Additionally, we included Mg^{2+} atoms in the calcite structure model (Heredia *et al.* 2005). A pseudo-Voigt function modified by Thompson *et al.* (1987) was chosen to generate the shape of the diffraction peaks. Here we report the refinement of 19 independent parameters for the space group Rc (No. 167 calcite) and Pmcn (No. 62 aragonite): zero point, scale factor, three background polynomial coefficients, unit cell dimensions, half-width, pseudo-Voigt, asymmetry parameters for the peak shape, and positional and thermal isotropic factors according to the usual functions used in Rietveld refinements, for the ground samples. One excluded region ($28.0^\circ - 28.5^\circ 2\theta$) was used. For the microstrain study, the LaB_6 powdered sample was used as standard in order to make corrections due to the instrumental broadening of diffraction lines. The size-microstrain analysis in this study was done using whole-pattern analysis within the Rietveld method. For the size-microstrain analysis within the Rietveld method, the chosen diffraction profile function was the modified Thompson-Cox-Hastings pseudo-Voigt (Thompson *et al.* 1987), with a Lorentzian function for size and a Gaussian for microstrain.

RESULTS

Coralline structure and elemental analysis

The crystal microstructure presents two main types of crystallite shapes: needle-like shapes (*Neogoniolithon trichotomum*, *Jania tenella*, *Amphiroa mexicana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*) and plate like shapes (*Halitilon gracile*, *Bossiella orbigniana*, *Lithothrix aspergillum*). The complex structures (fig. 2a, e) present textured crystals that can be seen from LVSEM images (fig. 2b, c, d, f, g, h).

The microspheres (fig. 2b—c), interpreted as starch granules by Woelkerling (1988), presented a high Ca^{2+} content, as shown by the EDS analysis (inset in fig. 2b; tables 2, 3, ““sphere”” columns). Additionally, the samples with crystalline éstos interactúan con moléculas orgánicas como en las conchas de moluscos (Pokroy *et al.* 2006) y corales (Przenioslo *et al.* 2008). En el presente trabajo se modificaron los parámetros de Rietveld ya que los difractogramas mostraron cambios en los parámetros de la celda unitaria, los tamaños de los cristales y la forma de los picos, con colas del lado derecho; además se incluyeron átomos de Mg^{2+} en el modelo de la estructura de la calcita (Heredia *et al.* 2005). Se escogió una función pseudo-Voigt modificada por Thompson *et al.* (1987) para generar la forma de los picos de difracción. Aquí se reporta el refinamiento de 19 parámetros independientes para los grupos espaciales Rc (calcita No. 167) y Pmcn (aragonita No. 62): punto cero, factor de escala, tres coeficientes polinomiales de fondo, dimensiones de la celda unitaria, ancho medio, pseudo-Voigt, parámetros de asimetría para la forma de los picos y factores isotrópicos posicionales y térmicos según las funciones normalmente empleadas en el refinamiento Rietveld, para las muestras trituradas. Se utilizó una región excluida ($28.0^\circ - 28.5^\circ 2\theta$). Para estudiar la microtensión se usó la muestra pulverizada LaB_6 como estándar para corregir el ensanchamiento instrumental de las líneas de difracción. El análisis del tamaño y la microtensión en este estudio se realizó empleando el análisis del patrón completo dentro del método de Rietveld. Para el análisis del tamaño y la microtensión dentro de este método se escogió la función del perfil de difracción pseudo-Voigt modificada por Thompson *et al.* (1987), con una función lorentziana para el tamaño y una gaussiana para la microtensión.

RESULTADOS

Estructura coralina y análisis elemental

La microestructura de los biominerales presenta dos principales tipos de formas cristalinas: en forma de agujas (*Neogoniolithon trichotomum*, *Jania tenella*, *Amphiroa mexicana*, *Calliarthron cheilosporoides*, *Corallina vancouveriensis*) y en forma de placas (*Halitilon gracile*, *Bossiella orbigniana*, *Lithothrix aspergillum*). Las estructuras complejas (fig. 2a, e) presentan cristales texturizados que pueden observarse en imágenes de LVSEM (fig. 2b, c, d, f, g, h).

Las microesferas (fig. 2b—c), interpretadas como gránulos de almidón por Woelkerling (1988), mostraron un contenido alto de Ca^{2+} según el análisis de EDS (ampliación en fig. 2b; tablas 2, 3, columnas encabezadas ““sphere””). Además, las muestras con protrusiones cristalinas muestran una textura muy definida (fig. 2a), que puede originarse de una capa central (flechas negras en fig. 2c). El

contenido de Mg (resultados de EDS, tabla 2) en algunas muestras puede ser un factor que reduzca la celda unitaria cristalina (Meldrum y Hyde 2001, Cusack *et al.* 2003) para incrementar la estabilidad (Antao *et al.* 2004). En este caso, en vista del bajo contenido de Mg²⁺ en la estructura coralina (~1%) el biomineral no puede considerarse CaCO₃ magnésico (Tucker y Wright 1991).

Fragoso *et al.*: CaCO₃ in coralline red algae from the Pacific coast of Mexico

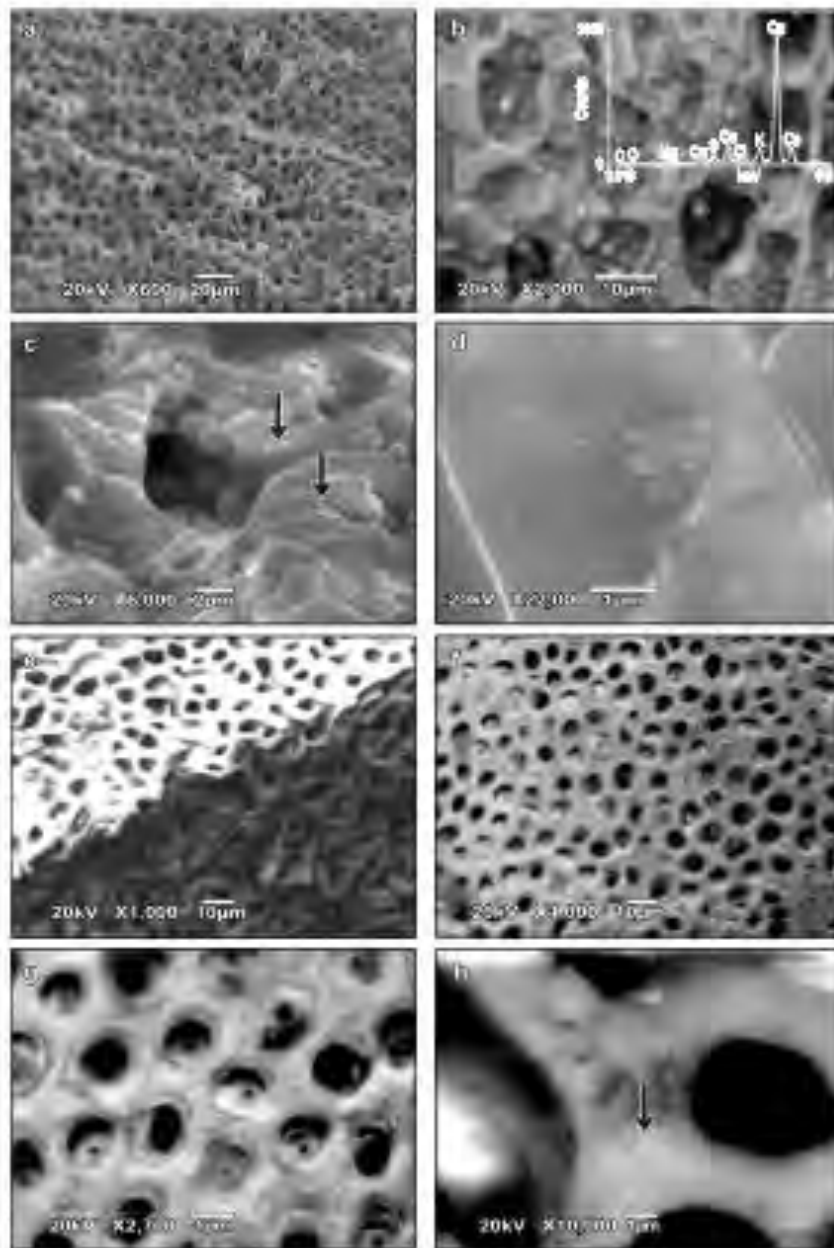


Figure 2. Low vacuum scanning electron microscopy images showing the morphology of *Lithophyllum* aff. *frondosum* (a–d) and *Calliarthron cheilosporoides* (e–h). In the *L.* aff. *frondosum* images it is possible to see the spheres and complex structures and, in more detail, textured crystals joining in a layer (black arrows in c). The *C. cheilosporoides* images show a black structure with crystalline texture similar to that of *L.* aff. *frondosum* (black arrow in h, layer where the textured crystals seem to join). The energy dispersive spectroscopy analysis showed high quantities of calcium (inset in b).

Figura 2. Imágenes de la microscopía electrónica de barrido de bajo vacío mostrando la morfología de *Lithophyllum* aff. *frondosum* (a–d) y *Calliarthron cheilosporoides* (e–h). En las imágenes de *L. aff. frondosum* es posible observar las esferas y las estructuras complejas y, en mayor detalle, los cristales texturizados uniéndose en una capa (flechas negras en c). Las imágenes de *C. cheilosporoides* muestran una estructura con textura cristalina similar a la de *L. aff. frondosum* (flecha negra en h, capa donde aparentemente se unen los cristales texturizados). El análisis con espectroscopía de dispersión de energía mostró cantidades altas de calcio (ampliación en b).

protrusions show a very defined texture (fig. 2a), which can be originated from a central layer (black arrows in fig. 2c). The Mg content (EDS results, table 2) in some samples might

be a factor for decreasing the crystalline unit cell (Meldrum and Hyde 2001, Cusack *et al.* 2003) to increase stability (Antao *et al.* 2004). In this case, because of the low Mg²⁺ content in the coralline structure (~1%) the biomineral cannot be considered magnesian CaCO₃ (Tucker and Wright 1991).

The EDS elemental analysis of the crystals (inset in fig. 2b) shows a notable difference in stoichiometry in Ca content compared with the pure calcite or aragonite (tables 2, 3). In this case, the Ca content is much higher than the stoichiometrical one in the mineral samples, which can be related to the presence of another unidentified solid containing higher quantities of Ca (possibly the one responsible for the peaks at about 18.45, 21, and 23.9 in 2 θ of the X-ray analysis).

STM

The scanning tunneling images also show two main nanocrystal morphologies (fig. 3; tables 2, 3): needle- and plate- like shapes. The low content of organic material in the biomineral of the algae assists STM imaging because the tunneling electron beam can easily overcome the thickness of the carbonaceous material (fig. 3). For comparison, pyrolytic graphite can be observed at the surface on the left side of *Neogoniolithon trichotomum* (black arrows in fig. 3a). The corresponding crystal shapes and their sizes are shown in table 2, and examples of biomineral samples from four different algal species are shown in figure 3.

The height scales show that the surface of the crystals is very homogeneous; that is, in almost all cases no big color contrasts can be seen (fig. 3).

In the *N. trichotomum* image (fig. 3a), the crystallites do not look structurally homogeneous in shape although they clearly present defined structures. In all cases the low organic content assisted STM imaging. The higher brightness compared with the other images can be due to the presence of non-conductive organic material. The image of *Lithophyllum* aff. *frondosum* (fig. 3b) shows plate-like crystallites (indicated by brackets) that are very smooth in surface and relatively homogeneous in size and shape. In other samples (*Calliarthron cheilosporoides*, fig. 3c) the crystallites have less symmetry but it is possible to observe layers, which are probably crystalline planes. In *Jania tenella* (fig. 3d) the crystals are bigger than those in the other samples (see table 2).

FTIR

The chemical nature of the algae shows three different types of chemical bonds: one is a carbonate mineral and the others are probably a silicate solid and a biopolymer (fig. 4). Of all the series of bands

El análisis elemental por EDS de los cristales (ampliación en fig. 2b) muestra una notable diferencia en la estequiometría del contenido de Ca en comparación con la calcita o la aragonita puras (tablas 2, 3). En este caso, el contenido de Ca es mucho mayor que en la estequiometría de las muestras biominerales, lo que podría estar relacionado con la presencia de otro sólido no identificado con cantidades mayores de Ca (posiblemente el responsable de los picos alrededor de 18.45, 21 y 23.9 en 2 θ del análisis de rayos X).

STM

Las imágenes de STM también muestran dos principales morfologías cristalinas: en forma de agujas y de placas. El bajo contenido de materia orgánica en el biomineral de las algas es favorable para la obtención de imágenes por STM ya que el rayo electrónico de túnel puede fácilmente rebasar el grosor del material carbónico (fig. 3). En comparación, se observa grafito pirolítico en la superficie del lado izquierdo de *Neogoniolithon trichotomum* (flechas negras en fig. 3a). En la tabla 2 se presentan las formas cristalinas correspondientes y sus tamaños, y en la figura 3 se muestran ejemplos de muestras de biomineral de cuatro diferentes especies de algas.

Las escalas de altura indican que la superficie de los cristales es muy homogénea; esto es, en casi ninguno de los casos se observan grandes contrastes de color (fig. 3).

En la imagen de *N. trichotomum* (fig. 3a) la forma de los cristales no parece ser estructuralmente homogénea aunque éstos presentan estructuras claramente definidas. En todos los casos el bajo contenido orgánico favoreció la toma de imágenes por STM. La mayor brillantez en comparación con las otras imágenes puede deberse a la presencia de materia orgánica no conductiva. La imagen de *Lithophyllum* aff. *frondosum* (fig. 3b) muestra cristales en forma de placas (indicados con corchetes) con una superficie muy lisa, y relativamente homogéneos en tamaño y forma. En otras muestras (*Calliarthron cheilosporoides*, fig. 3c) los cristales son menos simétricos pero es posible observar capas que probablemente constituyen planos cristalinos. En *Jania tenella* (fig. 3d) los cristales son más grandes que los de otras muestras (ver tabla 2).

FTIR

La naturaleza química de las algas muestra tres diferentes tipos de enlaces químicos: uno es un mineral carbonatado y los otros probablemente son un sólido de silicato y un biopolímero (fig. 4).

De todas las series de bandas de las algas rojas las más notables son las de la calcita (Bottcher *et al.* 1997) a 2533, 1808, 1446, 870 y 716 cm^{-1} , aunque se pueden observar bandas de una molécula from the Coralline red algae, the most notable are those of calcite (Bottcher *et al.* 1997) at 2533, 1808, 1446, 870, and 716 cm^{-1} , although bands from an organic molecule at 2945, 2889 (C-H), and 1034 cm^{-1} (C-O) can be seen in *Bossiella orbigniana* and *Calliarthron cheilosporoides*. It is also possible to

of organic content (fig. 4). Although the chemical content in the samples seems to be very homogeneous, the cases of *C. cheilosporoides* and *B. orbigniana* and to a lesser extent of *Corallina vancouveriensis* are slightly different due to the high intensities of the bands at 1110 (Si-O) and 1034 cm^{-1} (C-O).

orgánica a 2945, 2889 (C-H) y 1034 cm^{-1} (C-O) en *Bossiella orbigniana* y *Calliarthron cheilosporoides*. También es posible observar bandas de un compuesto de silicio no cristalino a 1110 (Si-O) y 924 cm^{-1} (Si-O) (Lazarev 1972). Las bandas a 2945 y 2889 cm^{-1} son de hidrocarburo

Table 2. Elemental analysis (%) by energy dispersive spectroscopy of species of geniculate Corallinales.
Tabla 2. Análisis elemental (%) mediante espectroscopia de dispersión de energía de especies de Corallinales geniculadas.

Element wt (%)	Calliarthron	Amphiroa		Bossiella		Jania		Lithothamnion		Halysclia
		Inner	Outer	Inner	Outer	Inner	Outer	Inner	Outer	
Ca	70.70	68.80	62.70	14.62	61.90	84.31	78.30	50.50	52.00	85.00
O	29.20	25.20	30.50	24.80	22.76	2.33	15.71	4.20	17.20	13.60
N	—	2.70	2.20	6.44	2.00	10.20	2.31	2.80	2.10	—
Mg	—	1.58	0.90	0.64	0.70	—	0.78	0.17	0.90	—
C	—	0.88	1.00	11.26	1.57	2.56	0.87	1.77	1.64	—
Si	—	0.063	0.13	2.24	0.82	—	0.20	0.07	0.14	—
S	—	0.34	1.00	9.57	1.35	0.11	1.00	0.78	2.00	0.60
CrSS* (nm)	Plate, <10	Plate, 10-20	Needle, <100	Needle, <70	Needle, <30	Needle, <50				

* CrSS = crystallite shape and size (nm) from scanning tunneling microscopy.

Table 3. Elemental analysis (%) by energy dispersive spectroscopy of species of non-geniculate red algae.

Tabla 3. Análisis elemental (%) mediante espectroscopia de dispersión de energía de dos especies de algas rojas no geniculadas.

Element wt (%)	Lithothylaei		Neogoniolithus
	Inner	Spines	
Ca	63.80	61.79	61.40
O	31.40	17.34	25.15
N	—	—	—
Mg	1.38	0.80	5.80
C	1.00	1.85	7.60
Si	0.11	—	—
S	0.61	1.98	—
Al	0.33	0.17	—
Cl	0.73	10.45	—
K	0.38	5.30	—
CrSS* (nm)	Plate, <30	Needle, <30	

* CrSS = crystallite shape and size (nm) from scanning tunneling microscopy.

detect bands of a non-crystalline silicon compound at 1110 (Si-O) and 924 cm^{-1} (Si-O) (Lazarev 1972). The bands at 2945 and 2889 cm^{-1} are hydrocarbon bands (C-H). All the bands due to organic components are strongly reduced when compared with the crystalline phase, which is related to the inorganic/organic ratio. This suggests that the mineral content exceeds exceptionally the quantity

(C-H). Todas las bandas atribuibles a los componentes orgánicos se encuentran notablemente disminuidas en comparación con la fase cristalina, lo que está relacionado con la razón de componentes inorgánicos/orgánicos. Esto sugiere que el contenido mineral excepcionalmente excede la cantidad de contenido orgánico (fig. 4). Aunque el contenido químico de las muestras parece ser muy homogéneo, los casos de *C. cheilosporoides* y *B. orbigniana*, y en menor medida de *Corallina vancouveriensis*, son ligeramente diferentes debido a la fuerte intensidad de las bandas a 1110 (Si-O) y 1034 cm^{-1} (C-O).

Estructura interna del biomineral por XRD en polvo

Las algas coralinas están principalmente compuestas de calcita muy cristalina, aragonita (fig. 5) y una tercera fase cristalina no identificada (indicada con flechas en fig. 6). En todos los casos la calcita es la fase mineral más representativa como se ha descrito en otros casos también en presencia de aragonita (Medakovi *et al.* 1995).

La diferencia principal entre la calcita y la aragonita mineral y el biomineral de las algas coralinas es la posición de los picos, que está directamente relacionada con el contenido de Mg^{2+} y otros iones. Además, el contenido de materia orgánica puede modificar los parámetros cristalinos (tabla 4) (Medakovi *et al.* 1995, Przenioslo *et al.* 2008).

Las algas coralinas presentan picos que cambiaron

en sus posiciones cristalográficas hacia ángulos mayores. Esto significa un aumento en el tamaño de la celda unitaria (fig. 2) como el encontrado por otros autores (Medaković *et al.* 1995) en algas rojas.

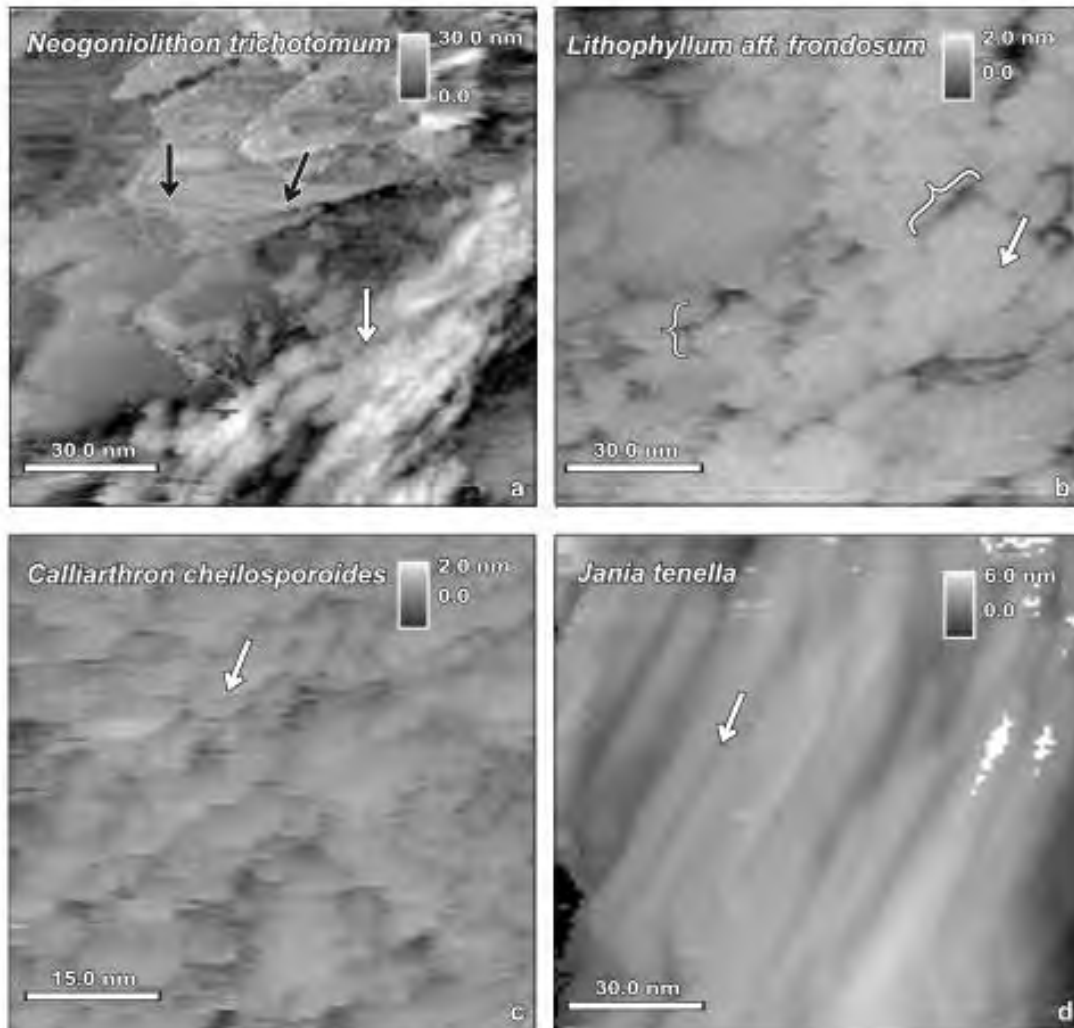
Rietveld para XRD en polvos

Con base en los datos de difracción se realizó un análisis de Rietveld de las muestras biogénicas. Las

Análisis de la red cristalina usando el método de

Figure 3. Scanning tunneling microscopy of ground samples of four coralline red algae deposited onto pyrolytic graphite. In *Neogoniolithon trichotomum* (a) the crystallites do not look structurally homogeneous and are not very regular in shape although clearly needle-like structures; the higher brightness compared with the other images can be due to the presence of non-conductive organic material. The *Lithophyllum aff. frondosum* (b) image shows plate-like

Ciencias Marinas, Vol. 36, No. 1, 2010



crystallites (brackets) that are very smooth in surface and relatively homogeneous in structure. In *Calliarthron cheilosporoides* (c) the crystallites have less symmetry and it is possible to observe grooves that can be crystalline planes. In *Jania tenella* (d) the crystals are clearly bigger than those observed in the other images, and are very homogeneous in surface and in size.

Figura 3. Microscopía de efecto túnel de muestras pulverizadas de cuatro algas rojas coralinas depositadas en grafito pirolítico. En *Neogoniolithon trichotomum* (a) los cristales no parecen ser estructuralmente homogéneos y no son muy regulares en su forma aunque claramente son estructuras en forma de aguja; la mayor brillantez en comparación con las otras imágenes puede atribuirse a la presencia de material orgánico no conductivo. La imagen de *Lithophyllum aff. frondosum* (b) muestra cristales en forma de placa (corchetes) con superficies muy lisas y estructuras relativamente homogéneas. En *Calliarthron cheilosporoides* (c) los cristales presentan menor simetría y es posible observar ranuras que pueden ser planos cristalinos. En *Jania tenella* (d) los cristales son claramente más grandes que los observados en las otras imágenes, y muy homogéneos en superficie y tamaño.

XRD analysis

Inner structure of the biomineral by powder

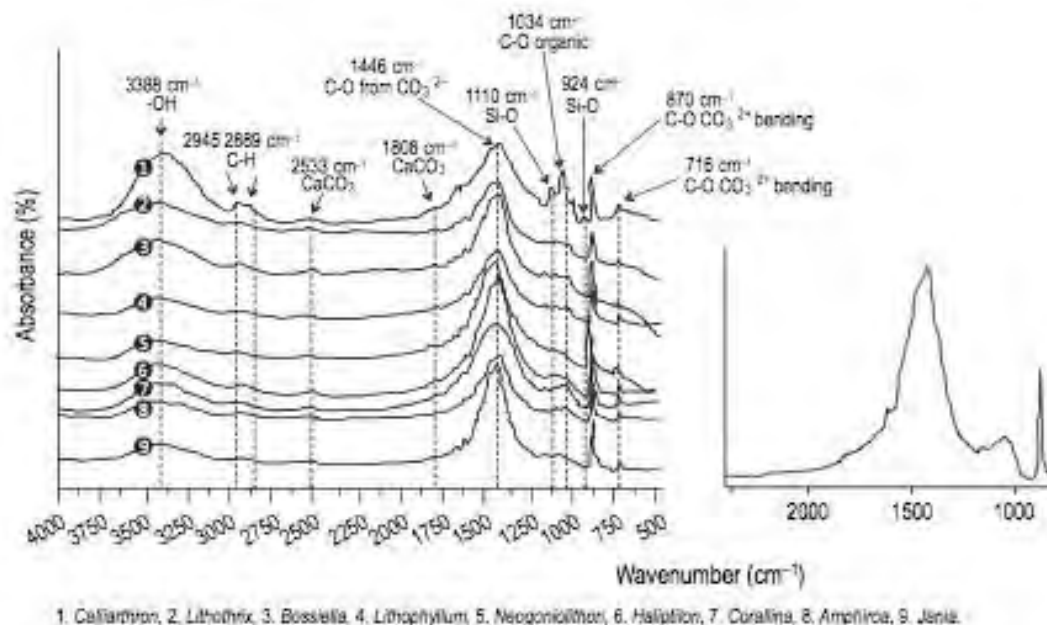
Coralline algae are mainly composed of highly crystalline calcite, aragonite (fig. 5), and a third crystalline phase not identified (reflectios with

ligeramente modificada y una tercera fase mineral no identificada (flechas en fig. 6). La principal reflexión (104) es de la calcita (figs. 5, 6). En el refinamiento de los datos con mayores intensidades

mediciones de XRD y Rietveld mostraron una estructura cristalina de calcita y aragonita

Figure 4. Fourier transform infrared spectroscopy of pristine samples of red algae. A series of bands related to calcite

Fragoso *et al.*: CaCO_3 in coralline red algae from the Pacific coast of Mexico



can be observed at 2533, 1808, 1446, 870, and 716 cm^{-1} . The bands at 2945, 2889 (C-H), and 1034 cm^{-1} (C-O) clearly indicate the presence of organic molecules, and those at 1110 (Si-O) and 924 cm^{-1} (Si-O) the presence of a silicon compound. In the insert, a more accurate observation of the frequencies around the amide I and II positions clearly shows no presence of those bands (near the vertical lines).

Figura 4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de muestras pristinas de algas rojas. Se puede observar una serie de bandas relacionadas con la calcita a 2533, 1808, 1446, 870 y 716 cm^{-1} . Las bandas a 2945, 2889 (C-H) y 1034 cm^{-1} (C-O) claramente indican la presencia de moléculas orgánicas, y las bandas a 1110 (Si-O) y 924 cm^{-1} (Si-O) la presencia de un compuesto de silicio. En la ampliación, una observación más precisa de las frecuencias alrededor de las posiciones de amida I y II muestra claramente la ausencia de estas bandas (cerca de las líneas verticales).

arrows in fig. 6). In all cases calcite is the most representative mineral phase as is described in other cases with the presence of aragonite (Medakovi *et al.* 1995).

The main difference between the mineral calcite and aragonite and coralline alga biomineral is the position of the peaks, which is directly related to their Mg^{2+} content as well as to other ions. Additionally, the content of organic material can change the crystalline parameters (table 4) (Medakovi *et al.* 1995, Przenioslo *et al.* 2008). Coralline algae have peaks that changed in their crystallographic positions. The change is towards higher angles. It means a decrease in the unit cell size (fig. 2) as reported for red algae by other authors (Medakovi *et al.* 1995).

Analysis of the bulk crystalline lattice using the Rietveld method for powder XRD

Based on diffraction data we performed Rietveld analysis of the biogenic samples. The XRD and Rietveld measurements showed a slightly modified

de aragonita no fue posible alcanzar un modelo estructural correcto. La razón puede hallarse en el bajo grado de cristalinidad y la escasa información (conteos) del mineral del grupo aragonita. Un paso adicional incluyendo sólo los datos de la fase de calcita mejoró el análisis (figs. 5, 6).

En la tabla 5 se comparan los parámetros de la red de calcita y aragonita resultantes, así como los parámetros de tensión determinados en nuestras muestras con la calcita y aragonita de referencia y otros datos. La reducción en el tamaño de la celda unitaria se debe a Mg^{2+} incorporado en la red, y las tensiones y la anisotropía probablemente se deben a la presencia de estos iones en diferentes partes de la estructura cristalina y a que no están

homogéneamente distribuidos en ella. Asimismo, la asimetría de los picos (figs. 5, 6) puede estar relacionada con un cambio en los parámetros estructurales de la calcita (Itaya *et al.* 1997).

El valor de la microtensión (0.4%) probablemente se deba a la baja intensidad de las líneas de difracción en la fase aragonítica en comparación calcite and aragonite crystalline structure and an unidentified third mineral phase (arrows in fig. 6).

The main reflection (104) is of the calcite (figs. 5, 6). In the refinement of the data with higher aragonite intensities it was not possible to attain a correct structural model. The reason can be the low degree of crystallinity and scant information (counts) in the aragonite group mineral. A further step just including the calcite phase data improved the analysis (figs. 5, 6).

The resulting lattice parameters of calcite and aragonite, as well as the strain parameters determined for our samples are compared with the reference calcite and aragonite and other data in table 5. The reduction in unit cell size is due to the Mg²⁺ incorporated into the lattice, and the strains and anisotropy are probably due to the presence of these ions in different parts of the crystallite structure and not homogeneously distributed in it. Moreover, the asymmetry of the peaks (figs. 5, 6) could be related to a change in the structural parameters of the calcite (Itaya *et al.* 1997).

Furthermore, the microstrain value (0.4%) is probably due to the low intensity of the diffraction lines in the aragonite phase as compared with those from calcite within the same XRD pattern. This may confirm the presence of impurities. Moreover, in some cases the intensities of those diffraction lines are comparable with the background, which is an additional difficulty in extracting size-microstrain by the Rietveld method.

DISCUSSION

Since LVSEM can produce high resolution images of biological samples we expect to have homogeneous images of the organic and inorganic material, as seen in figure 2. It is clear that the carbonate mineral is highly arranged in texture starting at a base where two layers of crystals join (black arrows in fig. 2). LVSEM showed a highly ordered polycrystalline structure (fig. 2). Moreover, the organic content is low, enabling STM imaging to be performed relatively easily without regions blocking the electron current intensities (fig. 3). Another interesting structural aspect of the high resolution STM is the sensitivity to changes in topography. In our case the topography is very homogeneous and in some samples the change in color (scale bars) indicates a very small change in height between crystals. This means that the nanocrystals are most probably coupled to each other in clusters (fig. 3). These clusters explain why the Rietveld measurement produced an average crystal size of ~200 nm. Two main crystal shapes were observed: needle- and plate- like crystallites.

The elemental analysis sometimes showed a variable content of elements (tables 2, 3), with a very high content of Ca in the structure and not necessarily a high amount of Mg in it (just in the case of *N. trichotomum* the content is ~5.8%). Other elements such as Ca, O, and C occurred in almost all the

con la calcítica dentro del mismo patrón de XRD, lo cual podría indicar la presencia de impurezas. Además, en algunos casos las intensidades de las líneas de difracción son comparables con el fondo, lo que resulta una dificultad adicional en la determinación del tamaño y la microtensión mediante el método de Rietveld.

DISCUSIÓN

Dado que la LVSEM puede producir imágenes de muestras biológicas con alta resolución, cabe esperar imágenes homogéneas del material orgánico

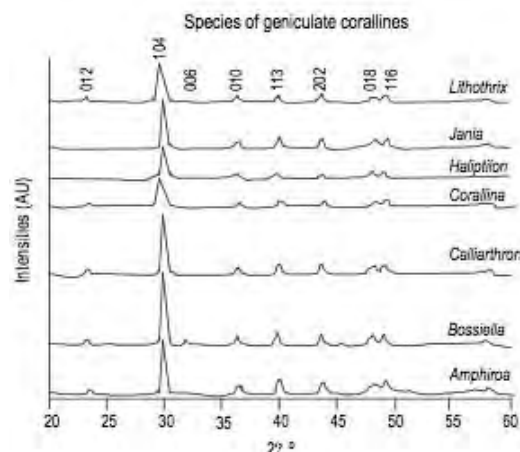


Figure 5. X-ray diffractogram of geniculate coralline species. The most intense peak corresponds to the calcite (104) reflection and no amorphous phase is seen in any case. The height of the peak reflects a qualitative increase in size of the crystallites when the crystals have an isotropic shape. In that case, *B. orbigniana* would present one of the biggest crystallites in the group.

Figura 5. Difractograma de rayos X de las especies coralinas geniculadas. El pico más intenso corresponde a la reflexión de la calcita (104) y en ningún caso se observa una fase amorfa. La altura del pico refleja un incremento cualitativo en el tamaño de los cristales cuando tienen una forma isotrópica. En tal caso, *B. orbigniana* presentaría uno de los cristales más grandes del grupo.

e inorgánico como las que se aprecian en la figura 2. Es claro que el mineral carbonatado tiene una textura muy ordenada desde la base donde se unen dos capas de cristales (flechas negras en fig. 2). La LVSEM mostró una estructura policristalina muy ordenada (fig. 2). Además, el bajo contenido orgánico permitió tomar imágenes por STM con cierta facilidad sin que algunas regiones obstruyeran el flujo de electrones (fig. 3). Otro aspecto estructural de interés de la STM de alta resolución

es la sensibilidad a cambios en la topografía. En nuestro caso de estudio la topografía es muy homogénea y en algunas muestras el cambio de color (barras de escala) indica un cambio muy pequeño en altura entre los cristales. Esto significa que los nanocristales muy probablemente estén acoplados entre sí en conglomerados (fig. 3) que explican por qué la medición Rietveld produjo un

The asymmetry of the XRD peaks is noteworthy, although its relevance to the crystal shape or relationship with the elemental content is not straightforward. The structure of the crystallite is an increase in the strain of This may be organic.

Further analytical studies with the Rietveld method are planned to visualize the lattice structures and

Table 4. Comparison of the positions in the Bragg reflections of the calcite and aragonite of mineral origin for the Rietveld refinement and the peaks found in the X-ray diffraction experiments of the geniculate and nongeniculate species of red algae.

Tabla 4. Comparación de las posiciones en las reflexiones de Bragg de la calcita y la aragonita de origen mineral para el refinamiento Rietveld y los picos encontrados en los experimentos de difracción de rayos X de las especies geniculadas y no geniculadas de algas rojas.

Reflections between (2θ°)	Calcite		Aragonite		Geniculate species*		Nongeniculate species*			Unknown	
	Angle (2θ°)	Reflection	Angle (2θ°)	Reflection	Angle (2θ°)	Reflection	d (nm)	Angle (2θ°)	Reflection	d (nm)	Angle (2θ°)
10–18	23.0	012	21.0	110	24.4	012	0.36	20.8a	110	0.43	26.0
	29.4	104	23.4	020	29.8c	104	0.29	23.8c	012	0.37	26.7
	31.5	006	26.24	111	31.73c	006	0.28	27.6c		0.32	28.4
			31.2	002							
	36.0	110	33.17	012	36.36c	010	0.25	33.0a	012	0.27	
			36.24	102				35.7a	010	0.25	
	39.4	113			39.84c	113	0.22	44.1c	010	0.2	
	43.2	202	37.3	031	43.7c	202	0.2	52.9c	113	1.7	
	47.5	018	41.2	211	48.1c	018	0.18	62.5c	202	0.15	
	48.5	116	45.94	221	49.1c	116	0.18				

*See table 1.

Table 5. Lattice parameters and discrepancy factors for the calcite phase of *Lithophyllum* sp. A clear decrease can be observed in the unit cell size as well as in the maximum strain. The strain value can be explained by the presence of other elements in the unit cell and a possible interaction with organic groups.

Tabla 5. Parámetros de la red y factores de discrepancia para la fase calcítica de *Lithophyllum* sp. Se observa una reducción clara en el tamaño de la celda unitaria así como en la tensión máxima. El valor de la tensión puede explicarse por la presencia de otros elementos en la celda unitaria y por una posible interacción con grupos orgánicos.

Calcite lattice parameters	$a = 4.91807(5)$ $c = 16.72039(3)$
Decrease in size (%) compared with mineral calcite	$a = 1.4$ $c = 2.0$
Average maximum strain and standard deviation (anisotropy)	0.40% (5.4714)
R_{exp} (%)	4.32
R_{fit} (%)	3.72

samples though not in the same proportion, but a high percent of those elements were present in the CaCO₃ material as shown by the FTIR and XRD analyses (figs. 4, 5, 6).

their geometrical distortions. The features in the X-tamaño de cristal medio de ~200 nm. Se observaron dos principales formas cristalinas: cristales en forma de agujas y de placas. El análisis de elementos a veces mostró un contenido variable de éstos (tablas 2, 3), con un contenido muy alto de Ca en la estructura pero no necesariamente una cantidad muy alta de Mg (sólo en el caso de *N. trichotomum* el contenido fue de ~5.8%). Se observaron otros elementos como Ca, O y C en casi todas las muestras aunque no en la misma proporción, pero se encontró un alto porcentaje de estos elementos en el material de CaCO₃, como lo indican los análisis de FTIR y XRD (figs. 4, 5, 6).

La asimetría de los picos de XRD es notable, aunque no es clara su relevancia en la forma del cristal o su relación con el contenido elemental. La estructura del cristal está distorsionada y nuestro modelo supone un incremento en la tensión de los componentes de los cristales. Esto podría ser orgánico.

Se planea realizar estudios analíticos adicionales con el método de Rietveld para visualizar las estructuras de la red y sus distorsiones geométricas. Las características en los difractogramas de rayos X de *Calliarthron cheilosporoides* y *Bossiella orbigniana* son muy similares entre sí pero muy distintas a las de *Lithotrix aspergillum* y *Amphiroa mexicana*. Al menos en este caso estas diferencias concuerdan con las filogenias moleculares, lo que sugiere que el proceso de bio-mineralización puede ser controlado genéticamente expresando alguna característica filogenética.

En este estudio se consideraron especímenes de dos regiones biogeográficas con diferentes patrones de temperatura y salinidad; sin embargo, nuestros resultados no reflejan cambios significativos en los parámetros medidos mediante diferentes técnicas

ray diffractograms of *Calliarthron cheilosporoides* and *Bossiella orbigniana* are very similar among them but very different to those of *Lithotrix aspergillum* and *Amphiroa mexicana*. At least in this case these differences agree with the molecular phylogenies, suggesting that the biomineralization process can be genetically controlled expressing some phylogenetic features.

This study considered specimens from two biogeographic regions with different temperature and salinity patterns; however, our results do not reflect significant changes in the parameters measured using different microscopy techniques. Medaković *et al.* (1995) mentioned that calcification rates and the proportion of magnesium calcite in colder waters are lower than those in the tropics. This was not observed in our analysis, possibly because the samples, in general, corresponded to the same season in both regions. According to these results, in future studies it is necessary to compare one or more species in both regions during the same seasonal period and analyze their behavior with respect to biomineralization.

CONCLUSION

We have shown, by LVSEM and STM, that the crystals of the different genera studied here are very well arranged on two scales: (1) in clusters of nanocrystals and (2) in a palisade-like structure in areas where presumably the cell assembles these crystals. It is feasible that prismatic calcite grows in vessels as clusters and is then arranged layer by layer along the surface in the central layer or organic template which helps to orient and give structural homogeneity. The organic content seems to be non-proteinaceous by FTIR analysis. Furthermore, the elemental analysis showed a high diversity of elements such as Mg^{2+} probably included in the lattice and related to the reduction and general change in calcite unit cell size. Hence, the change in unit cell seems to be isotropical and the peak asymmetries have no clear interpretation although some authors regard them as changes in the mineralogical solids by biological activity called mineralogical phase transitions (Itaya *et al.* 1997).

In summary, biostructural studies of biogenic crystals will lead to a better understanding of their complicated properties and mechanisms of growth. Additional studies with more red coralline algal species are necessary to understand if the biomineralization is related to the phylogenetic relationships and biomineral micro- and nanostructure. In the case of red algae, further studies using STM and the Rietveld method are being conducted by our group to better determine the responsibility of ions and biopolymers in the formation of the biomineral.

microscópicas. Medaković *et al.* (1995) mencionaron que las tasas de calcificación y la proporción de la calcita magnésica en aguas frías son menores que en aguas tropicales. Esto no resultó evidente en nuestro estudio, posiblemente porque las muestras en general correspondieron a la misma temporada en ambas regiones. De acuerdo con nuestros resultados, en futuros trabajos será necesario comparar una o más especies en ambas regiones durante el mismo periodo estacional y analizar su comportamiento con respecto a la biomineralización.

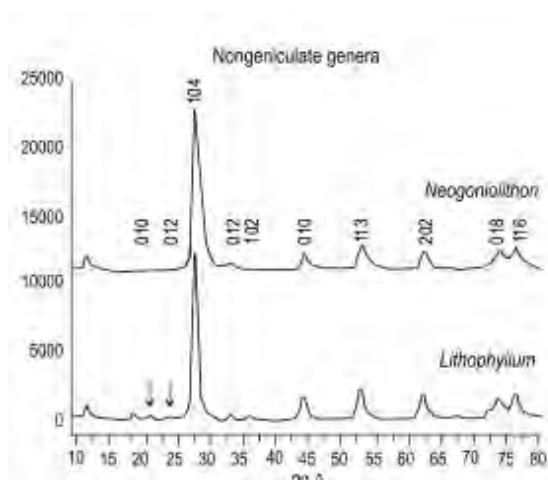


Figure 6. X-ray diffractograms of species of nongeniculate corallines. From the FTIR, as seen in figure 4, the most intense peak corresponds to the calcite (104) reflection and no amorphous phase is seen in any case. A third crystalline phase corresponding to the positions indicated by arrows was not identified. Almost all the calcite peaks show high asymmetry with a tail on the right side.

Figura 6. Difractograma de rayos X de las especies de corallinas geniculadas. A partir del FTIR, como se observa en la figura 4, el pico más intenso corresponde a la reflexión de la calcita (104) y en ningún caso se observa una fase amorfa. No se identificó una tercera fase cristalina que corresponda a las posiciones indicadas con flechas. Casi todos los picos de la calcita muestran una alta asimetría con la cola del lado derecho.

CONCLUSIÓN

Por medio de LVSEM y STM se mostró que los cristales de los diferentes géneros estudiados están bien ordenados en dos escalas: (1) en conglomerados de nanocristales y (2) en una estructura como palizada en zonas donde la celda presumiblemente congrega estos cristales. Es posible que la calcita prismática crezca en vasos

como racimos y luego se ordena capa por capa a lo largo de la superficie en la capa central o plantilla orgánica que ayuda a orientar y proporciona homogeneidad estructural. Según el análisis de FTIR, el contenido orgánico parece no ser protéico.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CONACYT (Mexico) and UNAM. The first author thanks CONACYT for financial support (grant no. 144066). We thank the central microscopy laboratory at the Physics Institute (UNAM) and especially C Magaña for his technical assistance, as well as M Cusack (Department of Geographical and Earth Sciences, University of Glasgow) for her great interest, scientific support, and helpful discussions. All authors thank AM D'amore Wilkinson from the department of Linguistics, Universidad Autónoma de Zacatecas for her important help with the English version.

REFERENCES

Addadi L, Weiner S. 1992. Control and design principles in biological mineralization. *Angew. Chem.* 31(2): 153—169.

Adey WH. 1970. The effects of light and temperature on growth rates in boreal-subarctic crustose corallines. *J. Phycol.* 6: 269—276.

Aizenberg J, Albeck S, Weiner S, Addadi L. 1994. Crystal-protein interactions studied by overgrowth of calcite on biogenic skeletal elements. *J. Crystal Growth* 142: 156—164.

Allemand D, Ferrier-Pages C, Furla P, Houlbreque F, Puverel S, Reynaud S, Tambutte E, Tambutte S, Zoccola D. 2004. Biomineralisation in reef-building corals: From molecular mechanisms to environmental control. *C. R. Palevol.* 3: 453—467.

Antao SM, Mulder WH, Hassan I, Crichton WA, Parise JB. 2004. Cation disorder in dolomite, $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$, and its influence on the aragonite + magnesite \rightarrow dolomite reaction boundary. 89(7): 1142—1147.

Bilan MI, Usov AI. 2001. Polysaccharides of calcareous algae and their effect on the calcification process. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 27: 2—16.

Bilyard RG. 1987. The value of benthic infauna in marine pollution monitoring studies. *Mar. Pollut. Bull.* 18(11): 581—585.

Binning G, Rohrer H, Gerber C, Weibel E. 1982. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 49: 57.

Borowitzka MA. 1979. Calcium exchange and the measurement of calcification rates in the calcareous red alga *Amphiroa foliacea*. *Mar. Biol.* 50: 339—347.

Bottcher ME, Gehlken PL, Steele DF. 1997. Characterization of inorganic and biogenic magnesian calcites by Fourier transform infrared spectroscopy. *Solid State Ionics* 101—103: 1379—1385.

Cusack M, Fraser AC, Stachel T. 2003. Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 134: 63—69.

Degens T. 1989. *Perspectives on Biogeochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 423 pp.

De la Lanza EG. 1991. *Oceanografía de Mares Mexicanos*. AGT Editor, Mexico, 579 pp.

Effenberger H, Mereiter K, Zemann J. 1981. Crystal structure refinements of magnesite, calcite, rhodochrosite, siderite, smithonite, and dolomite, with Además, el análisis elemental mostró una gran diversidad de elementos como Mg^{2+} probablemente incluidos en la red y asociados con la reducción y cambio general en el tamaño de la celda unitaria de la calcita. Por tanto, el cambio en la celda unitaria parece ser isotrópico y la asimetría de los picos no tiene una clara interpretación, aunque algunos autores la consideran como cambios en los sólidos mineralógicos por actividad biológica llamados transiciones de fase mineralógica (Itaya *et al.* 1997). En resumen, los estudios bioestructurales de cristales biogénicos proporcionan un mejor conocimiento de sus complicados mecanismos de crecimiento y propiedades. Se requieren más trabajos sobre especies de algas rojas coralinas para entender si la biomineralización está relacionada con las relaciones filogenéticas y la micro y nanoestructura de biomineral. En el caso de las algas rojas, se están realizando más estudios usando STM y el método de Rietveld para poder determinar mejor la responsabilidad de los iones y los biopolímeros en la formación del biomineral.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT (México) y la UNAM. D. Fragoso agradece a CONACYT (México) por el apoyo financiero (num. de beca 144066). Agradecemos al laboratorio central de microscopía del Instituto de Física (UNAM) y en particular a C Magaña por su asistencia técnica, así como a M Cusack (Departamento de Ciencias Geográficas y de la Tierra, Universidad de Glasgow) por su gran interés, apoyo científico y discusiones beneficiosas. Todos los autores agradecen a AM D'amore Wilkinson del departamento de Linguística de la Universidad Autónoma de Zacatecas por su importante ayuda en la versión original en inglés.

Traducido al español por Christine Harris.

calcite type carbonates. *Z. Kristallogr.*: 233—243.

Fragoso D, Rodríguez D. 2002. Coralinas no geniculadas en las costas del Pacífico tropical mexicano. *An. Inst. Biol. Ser. Bot.* 73(2): 97—136.

García M. 2009. Estructura comunitaria de la fauna asociada a algas submareales en tres sitios contrastantes en Zihuatanejo, Guerrero. M.Sc. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, 99 pp.

- Haikali BE, Bensoussan N, Romano JC, Bousquet V. 2004. Estimation of photosynthesis and calcification rates of *Corallina elongata* Ellis and Solander, 1786, by measurements of dissolved oxygen, pH and total alkalinity. *Sci. Mar.* 68(1): 45—56.
- Harrington LM. 2004. Ecology of crustose coralline algae: Interactions with scleractinian corals and responses to environmental conditions. Ph.D. thesis, School of Marine Biology and Aquaculture, James Cook University, 149 pp.
- Heredia A. 2000. Analysis of modern and ancient bones: Morphology, structure and contributions to the study of biomaterials. B. Sc. Thesis. Faculty of Sciences. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. 64 pp.
- Heredia A, Rodríguez-Hernández AG, Lozano LF, Peña-Rico MA, Velázquez R, Basiuk VA, Bucio L. 2005. Microstructure and thermal change of texture of calcite crystals in ostrich eggshell *Struthio camelus*. *Mater. Sci. Eng. C25*: 1—9.
- Hubbs CL, Roden GI. 1964. Oceanography and marine life along the Pacific coast of Middle America. In: Wauchope R (ed.), *A Handbook of Middle American Indians*. Univ. Texas Press, Austin, pp. 143—186.
- Itaya T, Tomuro M, Ninagawa K. 1997. Asymmetric X-ray diffraction peak of metamorphosed carbonaceous material. *Island Arc* 6: 228—232.
- Kamenos NA, Cusack M, Moore PG. 2008. Coralline algae are global palaeothermometers with bi-weekly resolution. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72: 771—779.
- Kelaker BP, Underwood AJ, Chapman MG. 2003. Experimental transplantations of coralline algal turf to demonstrate causes of differences in macrofauna at different tidal heights. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 282: 23—41.
- Lazarev AN. 1972. *Vibrational Spectra and Structure of Silicates*. Consultants Bureau, New York.
- López N, Rodríguez D, Candelaria C, González-González J. 2000. Subtidal macroalgal communities in Acapulco and Zihuatanejo, Guerrero, Mexico. In: Munawar M, Laurence SG, Munawar IF, Malley DF (eds.), *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. *Ecovision World Monograph Series*, pp. 335—351.
- López N, Rodríguez D, Candelaria C. 2004. Intraspecific variation in algal species in Guerrero, Mexico. *Universidad y Ciencia (spec. num.)* 1: 7—15.
- Maluf LY. 1983. Physical oceanography. In: Cody TJ, Cody ML (eds.), *Island Biogeography in the Sea of Cortez*. Univ. California Press, Berkeley, pp. 13—25.
- Mann S. 2001. *Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Medaković D, Popović S, Zavodnik N, Grčić B, Plazonić M. 1995. X-ray diffraction study of mineral components in calcareous algae (Corallinaceae, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 122: 479—485.
- Meldrum FC, Hyde ST. 2001. Morphological influence of magnesium and organic additives on the precipitation of calcite. *J. Crystal Growth* 231: 544—558.
- Pokroy B, Fitch AN, Lee PL, Quintana JP, Caspi EN, Zolotoyabko E. 2006. Anisotropic lattice distortions in the mollusk-made aragonite: A widespread phenomenon. *J. Struct. Biol.* 153: 145—150.
- Przeniosło R, Stolarski J, Mazur M, Brunelli M. 2008. Hierarchically structured scleractinian coral biocrystals. *J. Struct. Biol.* 161: 74—82.
- Pueschel CM, Eichelberger HH, Trick HN. 1992. Specialized calciferous cells in the marine alga *Rhodogorgon carriebowensis* and their implications for models of red algal calcification. *Protoplasma* 166: 89—98.
- Rodríguez-Carvajal J. 1981. FULLPROF program for Rietveld refinement and pattern matching analysis (unpublished). The program is a strongly modified version of that described by DB Wiles and RA Young.
- Silva PC, Johansen HW. 1986. A reappraisal of the order Corallinales (Rhodophyceae). *Br. Phycol. J.* 21: 245—254.
- Steneck RS. 1986. The ecology of coralline algal crusts: Convergent patterns and adaptive strategies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17: 273—303.
- Thompson P, Cox DE, Hastings JB. 1987. Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron X-ray data from Al₂O₃. *J. Appl. Crystallogr.* 20: 79—83.
- Tucker ME, Wright VP. 1991. *Carbonate Sedimentology*. Wiley-Blackwell.
- Villiers JPR. 1971. Crystal structures of aragonite, strontianite and witherite. *Am. Mineral.* 56: 758—767.
- Warwick RM. 1988. The level of taxonomic discrimination required to detect pollution effects on marine benthic communities. *Mar. Pollut. Bull.* 19: 259—268.
- Woelkerling WJ. 1988. *The Coralline Red Algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae*. British Museum and Oxford University Press, London and Oxford, 268 pp.
- Wyrčki K. 1965. Corrientes superficiales del Océano Pacífico oriental tropical. *Bull. Inter-Am. Trop. Tuna Comm.* 9(5): 270—295.
- Young RA. 1993. *The Rietveld Method*. Oxford Univ. Press, Oxford.

Recibido en mayo de 2009;
aceptado en diciembre de 2009.