

ESTUDIOS EN LAS ALGAS *CORALLINACEAE* (*RHODOPHYTA*) DE LAS ISLAS CANARIAS.

I. ASPECTOS METODOLOGICOS

por

J. AFONSO-CARRILLO, M. C. GIL-RODRÍGUEZ y

W. WILDPRET de la TORRE

RESUMEN

En este artículo se describe el método para el estudio de las especies de la familia *Corallinaceae*. Las coralináceas son recolectadas y fijadas inmediatamente en agua de mar formolada al 4 %. Después del estudio morfológico se seleccionan fragmentos que son descalcificados en líquido de Perenyi o en ácido nítrico 0,6 N. Ocasionalmente se utiliza la mezcla de Susa como fijador-descalcificador. Los fragmentos son incluidos en parafina, seccionados en el microtomo a 8 μ m de grosor, teñidos con hematoxilina eosina o fucsina ácida y montados en bálsamo de Canadá.

ABSTRACT

The methodology for study of species of the *Corallinaceae* family is described in this paper. Plants of *Corallinaceae* were collected and fixed immediately in 4 % formalin-seawater. After morphological study, selected parts of the fixed material were decalcified in Pereny's solution or 0,6 N nitric acid. Sometimes Susa solution was used as a fixative and decalcifying agent. The portions were sectioned by standard paraffin-microtome techniques at 8 μ m thick, stained with Ehrlich hematoxylin eosin or acid fuchsin and permanently mounted with Caedax on microscope slides.

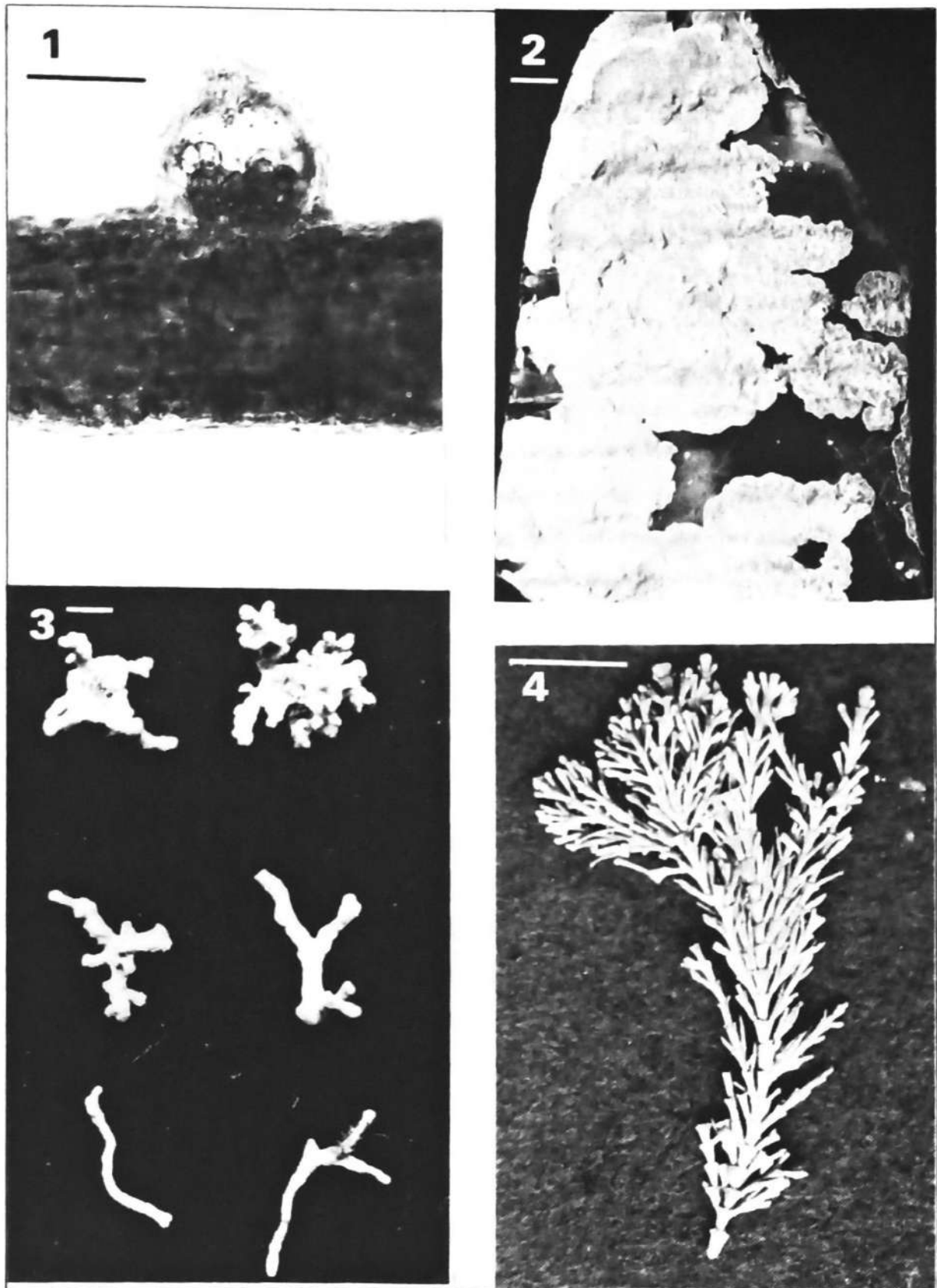
Introducción

Este artículo, en el que se exponen los aspectos generales de la metodología a seguir en el estudio de las algas coralináceas, constituye el primero de una serie de contribuciones que pretenden mejorar el conocimiento

de un grupo de algas marinas que intervienen de una forma destacada en la configuración del paisaje litoral canario. Estas especies merecen ser destacadas tanto por su biomasa como por su diversidad, así como por estar ampliamente representadas en todos los niveles de los pisos meso e infralitoral.

Los datos que se conocen en la actualidad sobre las especies de esta familia presentes en Canarias están muy dispersos: FOSLIE (1905 y 1906), describe seis nuevas especies; SAUVAGEAU (1912), publica una lista de trece especies determinadas por Foslíe; LEMOINE in BOERGESEN (1929), reconoce veintinueve especies incrustantes, de ellas ocho nuevas para la ciencia; BOERGESEN (1929), incluye en su monografía cinco especies articuladas; LEMOINE (1929), discute las afinidades de las especies canarias; AFONSO - CARRILLO (1980 y 1982) cita cuatro nuevas especies para las islas y describe la formación de los conceptáculos asexuales en Porolithon, respectivamente; y AFONSO - CARRILLO y GIL - RODRIGUEZ (1982) descubren la existencia de un fondo de maerl.

La familia Corallinaceae fue descrita por LAMOUREUX (1812), como familia Corallineae, para englobar un importante número de formas calcáreas que siguiendo las corrientes de la época, fueron incluidas en el reino animal junto con otras formas coralígenas. Así, aunque TOURNEFORT (1719) y RAY (1724) consideraron a las especies articuladas como vegetales, sin duda debido a su aspecto arborescente y a permanecer fijas al sustrato, lo que las relacionaba más con las plantas que con los animales, los estudios anatómicos de ELLIS (1756) llevados a cabo en una serie de organismos a los que este autor denomina "zoophytes", convence a la mayor parte de los naturalistas de ese tiempo (Pallas, Linneo, Lamouroux) de que los organismos calcáreos son en realidad animales constituidos por el concurso de numerosos políperos. Es así como, hasta que GRAY (1821) no realiza una nueva revisión anatómica de ciertas especies articuladas, no son devueltas estas plantas al reino vegetal. No obstante, las formas incrustantes, no articuladas, cuya base animal no había sido puesta en duda hasta ese momento, no son estudiadas detenidamente hasta que PHILIPPI (1837) demuestra por primera vez la naturaleza vegetal de este grupo.



Figs. 1-4. Tipos morfológicos en *Corallinaceae*: 1. Formas filamentosas (*Choreonema*), los conceptáculos son las únicas estructuras que se forman fuera del huésped (50 μ m); 2. Formas costrosas de *Neogoniolithon* (0,5 cm); 3. Formas arbusculares no articuladas de *Lithothamnium* (0,5 cm); 4. Formas articuladas de *Corallina* (0,5 cm).

Las coralináceas constituyen posiblemente uno de los grupos sistemáticos más fáciles de reconocer a nivel morfológico por la importante calcificación que impregna la pared de sus células. Esta calcificación es de calcita y confiere un aspecto pétreo característico a estas plantas, en las que esquemáticamente pueden ser diferenciados cuatro tipos morfológicos: a- formas filamentosas (características de algunos parásitos o endófitos en los que el talo está reducido a una serie de filamentos que se introducen en el interior del huésped, fig. 1); b- formas costrosas (talos laminares habitualmente dispuestos paralelos al sustrato al que están adheridos con diferente intensidad según los casos, corresponde al aspecto externo de un gran número de especies y de muchos talos juveniles de otras con morfologías más complejas, fig. 2); c- formas arbusculares (originadas a partir de costras basales, con número y tamaño de ramas muy variable, fig. 3); y d- formas articuladas (talos erectos en los que porciones calcificadas, artejos o intergenículos, alternan con otras desprovistas de calcificación, articulaciones o genículos, fig. 4).

La facilidad con que la calcificación permite reconocer a un individuo de esta familia, contrasta con las dificultades que se plantean al querer realizar un estudio más profundo puesto que los caracteres propios de la estructura son los únicos fiables y sobre los que se apoya la sistemática actual (CABIOCH, 1972; JOHANSEN, 1976), de modo que han fracasado todos los intentos de construcción de una sistemática basada en caracteres morfológicos. Los caracteres utilizados hacen referencia a la citología (presencia de sinapsis secundarias o de fusiones entre células de filamentos vecinos, figs. 5 y 6), a las estructuras reproductoras (número de poros por los que se abren al exterior los conceptáculos asexuales, figs. 7 y 8) y a las estructuras vegetativas (disposición de los diferentes estratos de filamentos que constituyen el talo: hipotalo, peritalo y epitalo, lo que ha permitido a CABIOCH (1972) distinguir estructuras simples, lithophylloides y lithothamnioides, figs. 9-12). Es por esto por lo que se hace necesario la aplicación de una metodología particular, diferente a la que se emplea clásicamente en el estudio del resto de las algas, y que hace intervenir de forma sistemática técnicas histológicas, que convierten en bastante laborioso el procedimiento a seguir en el estudio de un representante de esta familia.

La ausencia en la actualidad de cualquier tipo de información en castellano sobre la metodología a seguir en el estudio de estas algas, así como lo sucinto de las referencias que sobre el método aparecen en los artículos más recientes, que plantean numerosas incógnitas a los que pretenden iniciarse en este tema, nos han animado a realizar algunas consideraciones generales sobre el procedimiento que se puede seguir en el estudio de las coralináceas:

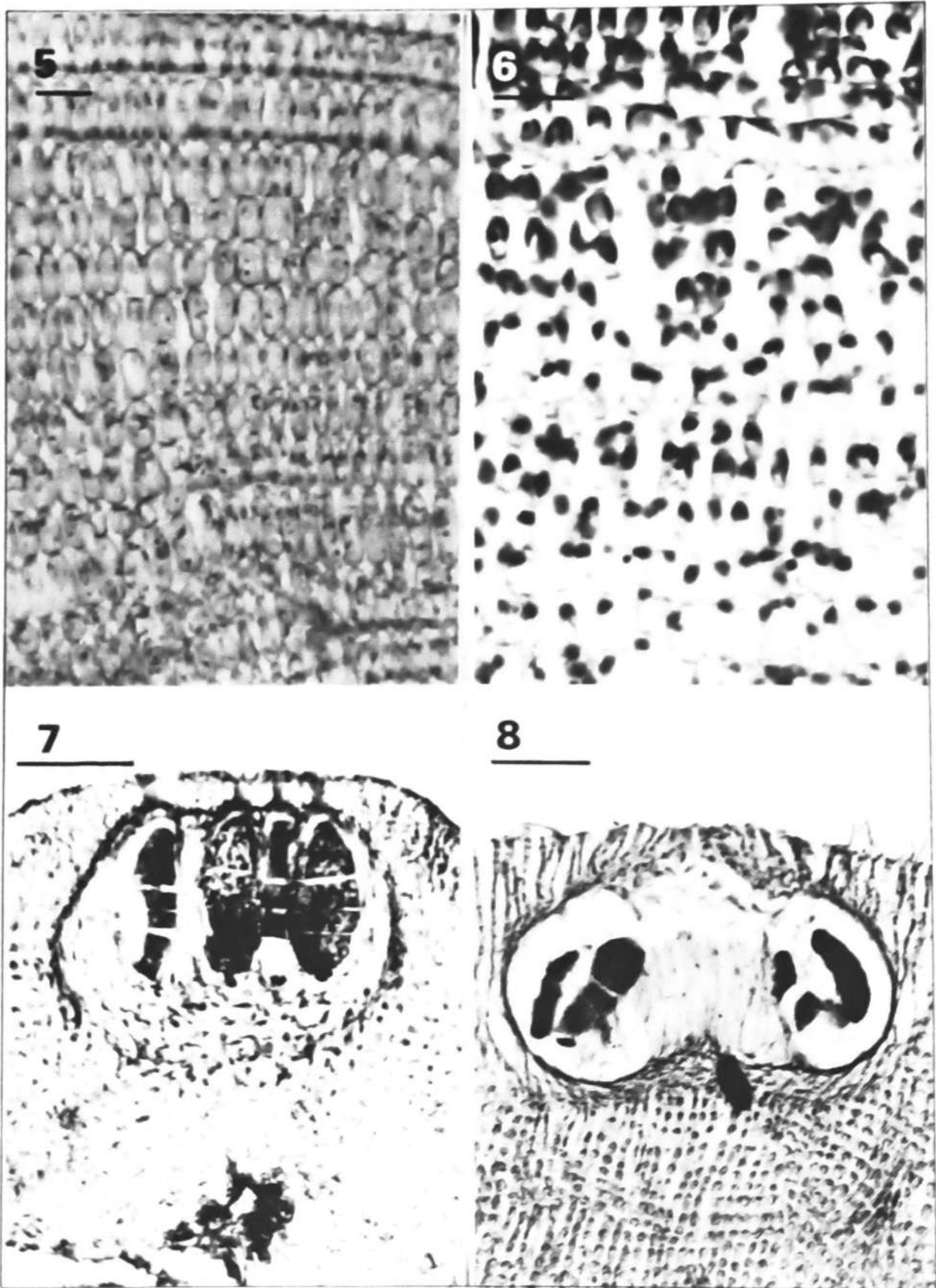
Recolección y fijación

Se deben recolectar siempre individuos enteros, puesto que los caracteres anatómicos de las regiones próximas al sustrato son imprescindibles para realizar una correcta determinación. Salvo en algunos casos en los que las costras están fijadas débilmente o bien, crecen superpuestas, de modo que la situada superficialmente tiene la integridad asegurada, se puede proceder a la separación del sustrato simplemente con la ayuda de una espátula. Se puede actuar de igual modo con las especies articuladas. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, donde se incluyen tanto especies saxícolas, como epífitas y parásitas, las costras crecen íntimamente unidas al sustrato y suelen poseer unas dimensiones tan reducidas que impiden cualquier tipo de manipulación a simple vista. Por todo ello, como norma general y siempre que sea posible, las recolecciones de coralináceas deben incluir el sustrato sobre el que se asientan. En este sentido, el martillo de geólogo se convierte en instrumento insustituible cuando se pretende la recolección de costras sobre sustratos duros.

La fijación de las recolecciones debe ser realizada rápidamente sobre el terreno para asegurar la perfecta conservación de las estructuras celulares. La solución fijadora es la misma que se usa habitualmente con el resto de las algas marinas (formalina al 4 % en agua de mar). Es conveniente neutralizar el fijador (p. ej. con NaOH 0,01 M) y dejar las muestras durante varias semanas en esta solución antes de proceder a seleccionar fragmentos para el estudio anatómico.

Estudio morfológico

Las características morfológicas de los talos incrustantes constituyen



Figs. 5–8 Conexiones intercelulares. 5 Sinapsis secundarias en *Goniolithon* (20 μm). 6 Fusiones celulares en *Neogoniolithon* (10 μm) Estructuras reproductoras asexuales. 7 Conceptáculo multiporado en *Phymatolithon* (50 μm); 8 Conceptáculo uniporado en *Lithophyllum* (50 μm).

un tipo de información muy importante pero con el inconveniente de que es difícil de utilizar por quien no está habituado a la manipulación de estas costras. Esto es posiblemente debido a que los márgenes de variación morfológica son bastante estrechos, de manera que calificativos muy sutiles pueden ser decisivos para diferenciar varias costras. Los caracteres de la morfología que deben ser consignados hacen referencia a un gran número de aspectos como tamaño y forma del talo, color, presencia o no de articulaciones, modo de fijación al sustrato, accidentes en la superficie, tipo de margen, forma y poros de los conceptáculos, etc. Algunas de estas observaciones, como la referente al color, debe realizarse con prontitud, puesto que la conservación en fijador, aún en la oscuridad, modifica paulatinamente este carácter. El resto de los caracteres pueden ser estudiados, si se prefiere, en muestras que hayan sido secadas para su conservación de este modo en colecciones de herbario. En la Tabla I se incluyen algunos de los términos más ampliamente utilizados para caracterizar morfológicamente a las coralináceas. Es conveniente que las muestras destinadas a herbario hayan sido fijadas previamente puesto que de esta forma pueden ser utilizadas para estudios anatómicos después de varias semanas de rehidratación en agua de mar formolada.

El estudio morfológico nos permite la selección de un fragmento del talo para realizar el estudio anatómico. El fragmento seleccionado debe caracterizarse por ser lo más completo posible, de modo que debe reunir a priori el mayor número de caracteres para que la determinación se vea facilitada. Así, aparte de las estructuras reproductoras, principalmente asexuales, que poseen un valor taxonómico elevado, y que suelen ser fácilmente reconocibles a la lupa, es importante que comprenda todas las estructuras vegetativas, particularmente aquellas más próximas al sustrato, con frecuencia decisivas en el momento de realizar la determinación. Si los talos son libres o están fijos de forma laxa, no existe ninguna dificultad a la hora de obtener fragmentos completos. En este mismo sentido, cuando crecen sobre sustratos blandos, por ejemplo epífitas sobre otras algas, lo más práctico es proceder incluyendo parte del sustrato. Sin embargo, con las costras fuertemente adheridas al sustrato hay que obrar con mucha precaución. En algunos casos basta con presionar con la punta de un bisturí, de forma

TABLA I.- Relación de algunos de los términos más utilizados para caracterizar morfológicamente los talos de coralináceas.

Talos incrustantes

Aspecto general:

FORMA: orbicular, redondeada, irregular, confluyente, ...
DIMENSIONES: longitud, grosor.
CONSISTENCIA: frágil, sólida, ...
COLOR: violáceo, rojizo, rosa, blanquecino, ... (en fresco y en seco)
SUPERFICIE: lisa, rugosa, ondulada, con papilas, excrescencias, pliegues, espinas, ...
FIJACIÓN: intensa, laxa, sólo en la porción central, costras superpuestas, ...
ECOLOGÍA: saxícolas, epífitas, parásitas, libres.

Margen:

FORMA: entero, lobado, engrosado, atenuado, plegado, ...
COLOR: igual a la costra, blanquecino, ...
SUPERFICIE: lisa, brillante, rugosa, estriada, ...
FIJACIÓN: aplicado, libre, ...

Conceptáculos:

NATURALEZA: asexuales, masculinos, femeninos, carposporofíticos.
(plantas monoicas o dioicas).
POROS: uniporados, multiporados.
FORMA: hemisféricos, cónicos, convexos, lisos, hundidos, ...
DIMENSIONES: altura, diámetro.
FRECUENCIA: escasos, numerosos, aislados, agrupados, ...

Talos ramificados (aparte de los caracteres señalados para los talos in crustantes debe consignarse):

Aspecto de las ramas:

FORMA: cilíndricas, claviformes, atenuadas, engrosadas, arbusculares, irregulares, ...
DIMENSIONES: longitud, grosor.
RAMIFICACIÓN: dicótoma, pseudodicótoma, irregular, abundante, escasa, ...
CONSISTENCIA: sólida, frágil, ...

Talos articulados (aparte de los caracteres señalados para los talos in crustantes debe consignarse):

Aspecto general:

FORMA: cespitosa, en pulvínulos, en tufos, ...
DIMENSIONES: altura, grosor.
RAMIFICACIÓN: dicótoma, tricótoma, pinnada, irregular, ... (a nivel o no de la articulación).

Artejos:

FORMA: cilíndricos, comprimidos, ensanchados, lobados, ...
DIMENSIONES: longitud, grosor.

Conceptáculos:

SITUACIÓN: axiales, marginales, laterales, intercalares.

brusca, para que se logre la separación de un fragmento que puede ser suficiente. No obstante, la complicación puede ser creciente, hasta tal punto que en costras muy delgadas y muy adheridas es preferible descalcificar directamente sobre el sustrato y luego separar la costra con la ayuda de una hoja de afeitar que discurra paralela al sustrato. En todo momento ha de tenerse la precaución de deteriorar lo menos posible la muestra puesto que ésta es conveniente conservarla como referencia. Es interesante que el fragmento corresponda a partes con actividad vital patente, por eso es aconsejable que en las costras los fragmentos obtenidos correspondan a las zonas con conceptáculos más próximas a los márgenes. En las especies articuladas deben seleccionarse ramas que incluyan, aparte de los conceptáculos, varias articulaciones, puesto que la taxonomía de estas plantas utiliza caracteres propios de estas estructuras.

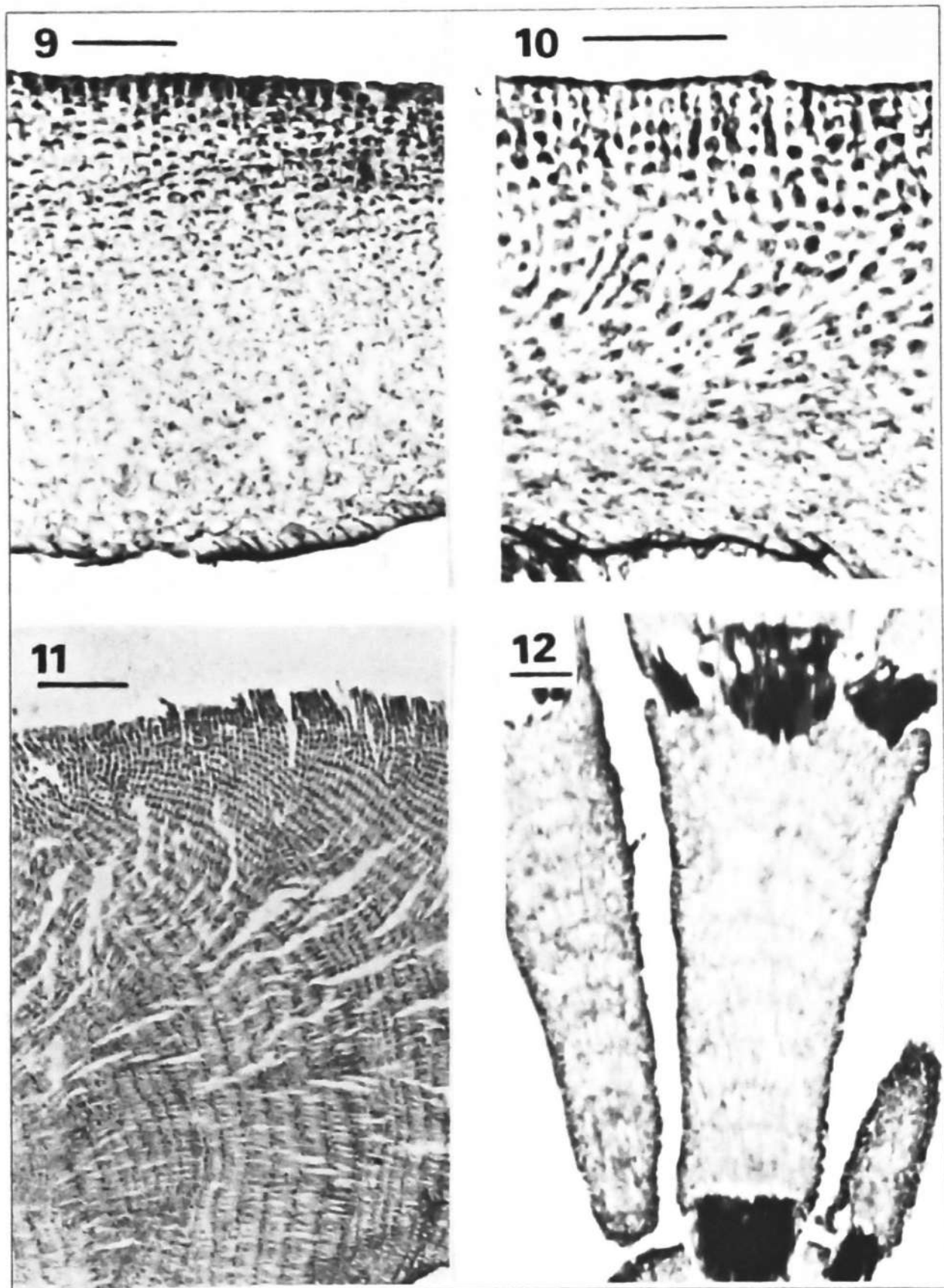
En todo caso, es importantísimo conocer perfectamente la posición relativa en el talo del fragmento seleccionado, de manera que podamos posteriormente realizar una correcta orientación de los cortes.

Descalcificación

El carbonato cálcico que impregna las paredes celulares de los talos de las coralináceas ha de eliminarse para realizar el estudio anatómico. La descalcificación ha de ser poco violenta para que el burbujeo originado por la reacción ácida con la liberación de dióxido de carbono altere lo menos posible las estructuras.

Tradicionalmente se han utilizado varias mezclas de ácidos que dan buenos resultados. Quizá el más ampliamente conocido es el denominado líquido de Perenyi, recomendado por LEMOINE (1911), cuya composición es: 30 cc de ácido crómico al 1 %, 30 cc de ácido nítrico al 20 % y 40 cc de alcohol absoluto. También, la mezcla de Susa, preconizada por SUNESON (1937), que posee la ventaja de ser simultáneamente fijador, es utilizada por numerosos autores, consta de 4,5 gr de cloruro mercuríco, 0,5 gr de cloruro sódico, 2 gr de ácido tricloroacético, 4 cc de ácido acético, 20 cc de formalina y 80 cc de agua.

Recientemente, WOELKERLING (1978) ha recomendado el uso como descalcificante de ácido nítrico 0,6 N, que al parecer da resultados tan satisfacto-



Figs. 9-12. Tipos de estructura en *Corallinaceae*: 9. Estructura simple de *Pseudolithophyllum* (50 μm); 10. Estructura lithothamnioide de costra en *Phymatolithon* (50 μm); 11. Estructura lithophylloide en *Lithophyllum* (100 μm); 12. Estructura lithothamnioide de rama articulada en *Corallina* (100 μm).

rios como el líquido de Perenyi. Por otra parte, este mismo autor ha sugerido tomar precauciones en la aplicación de la mezcla de Susa, puesto que el empleo de ácidos clorados en la descalcificación, después de haber fijado con formalina, puede conducir a la producción de bi-clorometileter, un potencialmente fuerte carcinógeno.

Realización de los cortes

La muestra descalcificada debe ser deshidratada con baños sucesivos en alcohol de concentración creciente para permitir la penetración de la parafina y poder construir el bloque siguiendo las técnicas histológicas habituales. La muestra debe ser orientada debidamente para posteriormente poder interpretar la estructura del talo. Teniendo en cuenta la posición relativa en el conjunto del talo la muestra debe permitir la obtención de cortes longitudinales radiales en las especies costrosas o longitudinales axiales en las arbusculares o en las articuladas (fig. 13). Series de cortes de 8 μm de grosor permiten obtener resultados satisfactorios en la mayor parte de las especies.

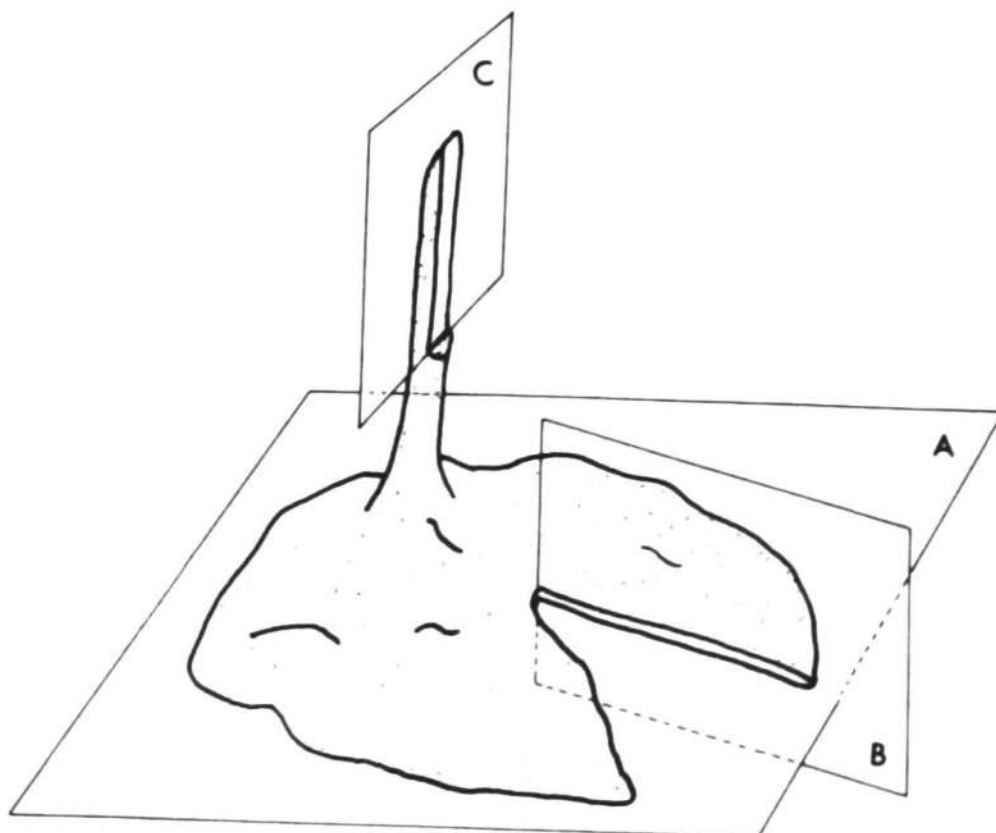


Fig 13. Representación esquemática de los planos en los que ha de realizarse la observación en las coralináceas: A. plano de la base, B. plano longitudinal radial, C plano longitudinal axial.

Es aconsejable la utilización de cualquier colorante que permita reconocer con facilidad las sinapsis, carácter sistemático de primer orden. Por eso es bastante práctico el uso de hematoxilina de Ehrlich, recomendada por CABIOCH (1971), contrastada con eosina en medio acuoso o fucsina ácida. Los cortes teñidos son deshidratados y montados en bálsamo de Canadá lo que permite una larga conservación.

(Recibido el 2 de febrero de 1983)

Departamento de Botánica
Facultad de Biología
Universidad de La Laguna
Tenerife, Islas Canarias

BIBLIOGRAFIA

- AFONSO-CARRILLO, J., 1980: Nota sobre algunas Corallinaceae (Rhodophyta) nuevas para la flora ficológica de las Islas Canarias. Vieraea, 10: 53-58.
- 1982: Sobre el modo de formación de los conceptáculos asexuales en Porolithon Foslie (Corallinaceae, Rhodophyta). Inv. pesq., 46(2): 255 - 262.
- AFONSO-CARRILLO, J. y M.C. GIL-RODRIGUEZ, 1982: Sobre la presencia de un fondo de "maerl" en las Islas Canarias. Collectanea Botánica, 13(2): 703-708.
- BOERGESEN, F., 1929: Marine algae from the Canary Islands. III. Rhodophyceae, part. II. D. kgl. d. Vid. Selsk. Biol. Medd., 8(1): 1-97.
- CABIOCH, J., 1971: Étude sur les Corallinacées. I. Caractères généraux de la cytologie. Cah. Biol. Mar., 12: 121-186.
- 1972: Étude sur les Corallinacées. II. La morphogenèse: conséquences systématiques et phylogénétiques. Cah. Biol. Mar., 13: 137-287.
- ELLIS, 1756: Essai sur l'histoire naturelle des Corallines. La Haya.
- FOSLIE, M., 1905: New Lithothamnia and systematical remarks. Det. Kgl. Norske Vidensk. Selsk. Skrifter, 1905 (5): 1-9.
- 1906: Den botaniske samling. Det. Kgl. Norske Vidensk. Selsk. Aarsberetning, 17-24.
- GRAY, S.F., 1821: A Natural Arrangement of British Plants. Vol. I. Baldwin, Cradock & Joy, Londres.
- JOHANSEN, H.W., 1976: Current status of generic concepts in Coralline algae (Rhodophyta). Phycologia, 15(2): 221-244.

- LAMOUREUX, J.V.F., 1812: Extrait d' une mémoire sur le classification des Polypiers coralligènes non entierement pierreux. Nouv. Bull. Sci. Soc. Phylom. Paris, 3(5): 181-188.
- LEMOINE, P., 1911: Structure anatomique des Mélobésiées. Application à la classification. Ann. Inst. Océan. Monaco, 2: 1-215.
- 1929a: Mélobésiées In Boergesen. Marine algae from the Canary Islands III. Rhodophyceae, part. II. Det. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Biol. Medd., 1, pp. 19-68.
- 1929b: Les algues calcaires (Mélobésiées) des Canaries, leurs affinites. Ass. Fr. Av. Ser., Congrès de la Rochelle: 658-662.
- PHILIPPI, 1837: Beweis das di Nulliporen Pflanzen sind. Arch. f. Nat. her. Dr. Wiegmann, 3(1): 387-393.
- RAY, J., 1724: Synopsis methodica Stiripium Britanicarum. London, 3 Ed. (1973 facsimile reproduction, The Ray Society, London).
- SAUVAGEAU, C., 1912: A propos de Cystoseira de Banyuls et de Guéthary. Bull. St. Biol. Arcachon, 14^e année, 423 pp.
- SUNESON, S., 1937: Studien ueber die entwicklungsgeschichte der Corallinaeen. Univ. Lund. N.F. Adv., 2(33): 1-101.
- TOURNEFORT, J.P., 1719: Institutiones rei herbarie. Typographia Regia, Paris. 3 Ed., Vol. 1-3.
- WOELKERLING, W.J., 1978: Mastophoropsis canaliculata (Harvey in Hooker) gen. et comb. nov. (Corallinaceae, Rhodophyta) in Southern Australia. Br. Phycol. J., 13: 209-225.