

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PRIMEROS ESTADIOS DE LA GERMINACIÓN DE LAS CARPOSPORAS DE LAS DOS ESPECIES MEDITERRÁNEAS DEL GÉNERO *Predaea*

A. Vergés, J.M. Utgé i C. Rodríguez-Prieto *

Universitat de Girona. Facultat de Ciències. Campus de Montilivi. 17071 Girona

* Corresponding author

RESUM

En aquest treball es descriu i compara la germinació en cultiu de les carpospores de les dues espècies mediterrànies del gènere *Predaea* G. DeToni: *P. ollivieri* J. Feldmann i *P. pusilla* (Berthold) J. Feldmann. Les carpospores d'ambdues espècies, de 6-8 µm i 9-10 µm respectivament, es desenvolupen de manera diferent. Així, mentre que les de *P. ollivieri* en germinar formen una protuberància, que per elongació i posterior septació porta a la formació d'un filament unipolar, les de *P. pusilla* es divideixen inicialment en dues cèl·lules semiesfèriques que originen (igualment per elongació i posterior septació) un filament bipolar o, a vegades, tricorn i o tetracorn. Al cap d'un mes de cultiu, les germinacions de les dues espècies presenten un hàbit postrat, filaments uniseriats i uninucleats i cèl·lules amb nombrosos plasts discoidals; el seu aspecte és molt semblant a les espècies del gènere *Audouinella* Bory.

RESUMEN

En este trabajo se describe y compara la germinación en cultivo de las carposporas de las especies mediterráneas del género *Predaea* G. DeToni: *P. ollivieri* J. Feldmann y *P. pusilla* (Berthold) J. Feldmann. Las carposporas de las dos especies, de diámetros distintos (*P. ollivieri* 6-8 µm; *P. pusilla* 9-10 µm), presentan también formas de germinación distintas. Las carposporas de *P. ollivieri* al germinar forman una protuberancia que, por elongación y posterior tabicación, lleva a la formación de un filamento unipolar. En cambio, las carposporas de *P. pusilla* se dividen inicialmente en dos células semiesféricas que originan (igualmente por elongación y posterior tabicación) un filamento bipolar o, en ocasiones, tricorne o tetracorne. Al cabo de un mes de cultivo, las germinaciones de las dos especies presentan un hábito postrado, filamentosos, uniseriados y uninucleados y con numerosos plastos discoidales. Su aspecto es muy parecido al del género *Audouinella* Bory.

ABSTRACT

In this paper, we describe and compare the germination in culture of the carpospores of the two Mediterranean species of the genus *Predaea* G. DeToni. That is to say, *P. ollivieri* J. Feldmann and *P. pusilla* (Berthold) J. Feldmann. Carpospores of these species had different diameters (*P. ollivieri* 6-8 µm; *P. pusilla* 9-10 µm), as well as different germination patterns. In particular, carpospores of *P. ollivieri* developed a protuberance that, after elongation and division, formed a unipolar filament. On the other hand, carpospores of *P. pusilla* were initially divided into two semi-spherical cells, and developed a bipolar filament, or sometimes, a three-horned or even a four-horned filament. After one month of culture, the sporlings showed a filamentous prostrate thalli, uniseriate and unicelled, and bore numerous disc-shaped plasts; these characteristics correspond closely to those of the genus *Audouinella* Bory.

KEYWORDS: Carpospores culture, Germination, *Predaea ollivieri*, *Predaea pusilla*, Nemastomatales, Rhodophyta.

INTRODUCCIÓN

El género *Predaea* G. DeToni (*Nemastomataceae*, Nemastomatales) se encuentra representado en el Mediterráneo por las especies *P. ollivieri* J. Feldmann y *P. pusilla* (Berthold) J. Feldmann. Los gametófitos femeninos de estas dos especies son muy abundantes en primavera y verano en los fondos de coralígeno del Mediterráneo occidental. Por el contrario, el tetrasporófito no se ha hallado nunca en la naturaleza. Los únicos datos del mismo que se conocen hasta el momento son los obtenidos por Athanasiadis (1988) mediante el cultivo de las carposporas de *P. ollivieri*, de donde se deduce que esta especie presenta un esporófito postrado y filamentosos. Ahora bien, en dicho trabajo no se describen en ningún momento los primeros estadios de desarrollo de las carposporas, que desde nuestro punto de vista es una característica indispensable en la taxonomía del grupo, y tampoco se completa el ciclo vital de la especie. En cuanto a *P. pusilla*, no se ha realizado hasta el momento ningún tipo de cultivo en laboratorio.

La falta o escasez de conocimientos sobre la fase esporofítica de ambas especies es lo que nos ha inducido a realizar el cultivo de sus carposporas. En este trabajo se presentan los primeros resultados obtenidos, es decir, se describe y se compara la germinación en cultivo de las carposporas de ambas especies y su tipo de crecimiento durante el primer mes de cultivo. Los resultados del trabajo permitirán, presumiblemente, la asignación de los estadios esporofíticos a un taxón concreto.

MATERIAL Y MÉTODOS

La recolección de los ejemplares fértiles de *Predaea* se efectuó en fondos de coralígeno de diferentes localidades de la costa gerundense (Mediterráneo noroccidental) mediante el uso de la escafandra autónoma. Las muestras de *P. ollivieri* se obtuvieron el 1.8.1999 en las islas Formigues, Palamós, y el 5.9.1999 en Sa Tuna, Begur, a 35 y 20 m de profundidad, respectivamente. Los ejemplares de *P. pusilla* se recolectaron el 25.7.1999 en la zona conocida como Els Ullastres, Llafranc, a una profundidad de 45 m, y el 12.9.1999 en Aigua Gelida, Tamariu, a 35 m de profundidad. En total se recolectaron cinco individuos de cada especie.

Los ejemplares fueron transportados al laboratorio, donde se separaron los gametófitos femeninos maduros y se mantuvieron en la oscuridad a 8 °C durante unas 20 h. A continuación se iniciaron los cultivos colocando las algas en agua de mar esterilizada y a 21 ± 1 °C. El choque térmico provocó la liberación de las carposporas sobre diversos portaobjetos colocados en el fondo del recipiente. Al cabo de 24 h los portaobjetos se sumergieron en placas de Petri que contenían medio nutritivo (Von Stoch, 1964) modificado siguiendo las pautas de Guiry y Cunningham (1984). El crecimiento de diatomeas se controlaba añadiendo al medio GeO_2 (5 mg l⁻¹) (Lewin, 1966), y el desarrollo de cianobacterias y otras bacterias se evitaba mediante la adición de penicilina-G (3 mg l⁻¹). Los cultivos se mantuvieron a 21 ± 1 °C y 43 mmol de fotones m² s⁻¹, y bajo un régimen de luz/oscuridad de 8.16 h. En total se siguió el crecimiento de las carposporas de cinco ejemplares de cada especie, y de

cada ejemplar se siguió el crecimiento en dos portaobjetos distintos, con más de 100 carposporas cada uno. El medio de cultivo era renovado semanalmente.

El seguimiento de la germinación de las carposporas se realizó a diario mediante la observación al microscopio óptico Nikon PFX. El número de carposporas liberadas era muy elevado y, por esta razón, periódicamente se hacía un vaciado del portaobjetos para permitir un mejor desarrollo de los individuos. Las fotografías del hábito se realizaron con una cámara Pentax Programa (objetivo Macro Sigma F28 de 50 mm) y las fotografías al microscopio óptico se realizaron con una cámara Nikon F-601M acoplada al mismo.

Para realizar las fotografías al microscopio electrónico de transmisión, se fijaron los filamentos durante 1 h en glutaraldehído al 2,5 % en agua de mar. Se lavaron tres veces con agua de mar filtrada durante 10 minutos cada vez y se efectuó una fijación posterior con OsO₄ al 1% en agua de mar. Los especímenes fueron deshidratados en una serie de acetona e incluidos en SPURR. Las secciones fueron realizadas con un ultramicrotomo. Las observaciones se hicieron con un microscopio Zeiss EM 910.

Los gametófitos femeninos se conservan en el herbario HGI-A de la Universitat de Girona.

RESULTADOS

Los gametófitos femeninos de las dos especies de *Predaea* estudiadas son muy semejantes macroscópicamente, aunque *P. ollivieri* presenta las láminas muy divididas incluso en los individuos jóvenes, mientras que *P. pusilla* suele presentar la base no dividida (infundibuliforme) durante toda su vida (figs. 1-2). Aun así, la principal diferencia entre las dos se encuentra en la fase inicial del desarrollo del gonimoblasto, en la cual se forma *P. ollivieri* sobre el filamento de conexión, y en *P. pusilla* sobre la célula auxiliar (Verlaque, 1990).

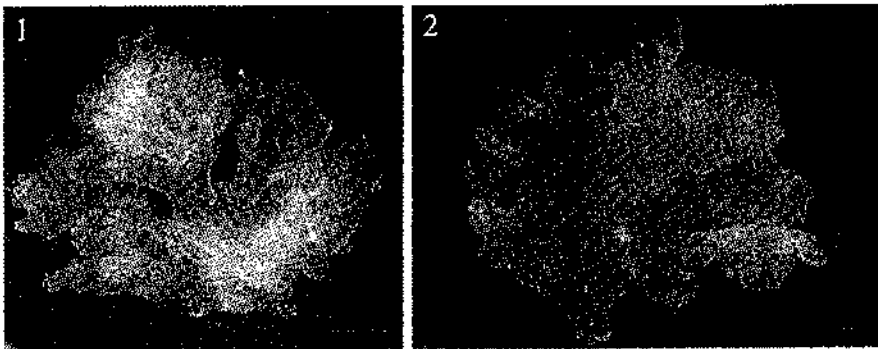


Figura 1. *Predaea ollivieri*. Aspecto general del talo. Escala: 1 cm.

Figura 2. *Predaea pusilla*. Aspecto general del talo. Escala: 1 cm.

Las carposporas de las dos especies de *Predaea* eran redondeadas, presentaban un único núcleo, un gran espacio vacuolar central y estaban fuertemente pigmentadas. El aspecto externo era similar y la única diferencia entre ellas se basaba en sus dimensiones, puesto que las de *P. ollivieri* oscilaban entre los 6-8 μm de diámetro (fig. 3), mientras que las de *P. pusilla* eran un poco más grandes, alcanzando los 9-10 μm (fig. 4). Las carposporas de las dos especies germinaron al cabo de 24 h de

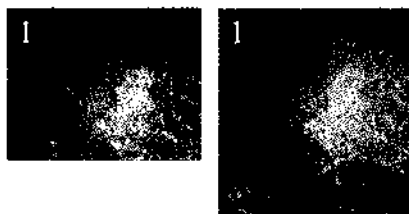
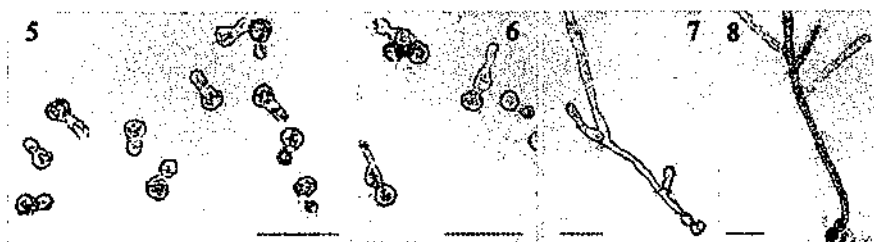


Figura 3. *Predaea ollivieri*. Carposporas recién liberadas. Escala: 25 μm .

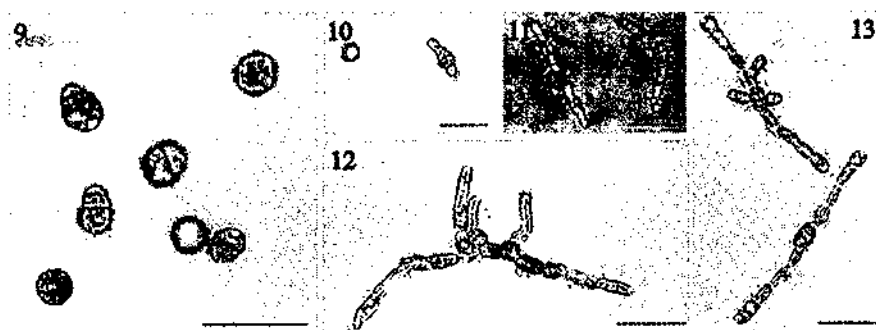
Figura 4. *Predaea pusilla*. Carposporas recién liberadas. Escala: 25 μm .

su liberación sin vaciar su contenido celular. En ambos casos las carposporas generaron filamentos reptantes, uniseriados, ramificados de forma irregular y uninucleados, donde cada célula del filamento poseía numerosos plastos discoidales situados parietalmente, de aspecto muy parecido al del género *Audouinella* Bory. Ahora bien, los estadios iniciales de germinación fueron muy distintos en las dos especies.

En *P. ollivieri*, una vez las carposporas se fijaron sobre el sustrato, se observó cómo se formaba en ellas una pequeña protuberancia que crecía por elongación y que finalmente se tabicaba, iniciándose así un filamento unipolar (fig. 5-8). En cambio, en *P. pusilla*, la mayor parte de las carposporas sufrieron una primera división transversal que condujo a la formación de dos células semiesféricas de tamaño similar. Inmediatamente, una de las dos células hijas de la carpospora formaba una pequeña protuberancia que, al elongarse y tabicarse, iniciaba un filamento en principio unipolar. En cuanto este filamento constaba de una célula, o en algunos casos de dos a cinco células, la segunda célula hija de la carpospora comenzaba el mismo proceso que la primera, con lo cual el resultado era la formación de un filamento bipolar (fig. 9-13). En algunas ocasiones, una o a veces



Figuras 5-8. *Predaea ollivieri*. **Fig. 5.** Segundo día de germinación donde se observa el inicio del filamento unipolar. **Fig. 6.** Aspecto de los filamentos durante la segunda semana de cultivo. **Fig. 7-8.** Tercera semana de cultivo donde se aprecia la ramificación irregular de los filamentos. Escala: 25 μm .



Figuras 9-13. *Predaea pusilla*. Fig. 9-10. Segundo y cuarto día de germinación donde se observa el inicio del filamento bipolar. Fig. 11. Aspecto de los filamentos bipolares durante la segunda semana de cultivo. Fig. 12-13. Tercera semana de cultivo en la que se aprecia la ramificación irregular de los filamentos. Escala: 25 μ m.

las dos células hijas de la carpospora podían dividirse en dos antes de comenzar a crecer y se originaba un filamento tricorne o tetracorne (fig. 12-13). En una ocasión se observó que las carposporas de *P. pusilla* generaban filamentos unipolares.

El crecimiento de los filamentos se daba en los dos casos por elongación de la célula apical y posterior tabicación. Durante el primer mes de cultivo las células próximas a la carpospora eran más o menos isodiamétricas, midiendo 10-15 x 9-10 en *P. ollivieri* y 14-18 x 11-13 μ m en *P. pusilla*, y estaban fuertemente pigmentadas. Por otra parte, las células más alejadas de la carpospora (las jóvenes) eran mucho más alargadas y un poco más estrechas que las de la base (*P. ollivieri*: 14-20 x 4-8 μ m; *P. pusilla*: 19-27 x 4-8 μ m) y estaban menos pigmentadas.

Los filamentos de ambas especies comenzaron a ramificarse al cabo de aproximadamente una semana de cultivo, observándose filamentos de hasta tercer orden a partir de la tercera semana. La longitud máxima de los filamentos era superior en *P. pusilla* que en *P. ollivieri* (tabla 1). Durante todo el desarrollo del talo continuó distinguiéndose claramente, por su fuerte pigmentación, la carpospora, única en *P. ollivieri* y dividida en dos en *P. pusilla*.

Las fotografías al microscopio electrónico mostraron que los filamentos de las dos especies presentaban numerosos plastos discoidales por célula, siempre con disposición parietal.

DISCUSIÓN

El cultivo de las carposporas de las dos especies mediterráneas de *Predaea* dio lugar a filamentos de tipo acroquetial. Esto concuerda con las características taxonómicas atribuidas normalmente al género merced a los cultivos realizados con otros representantes del mismo. En concreto, las especies del género que en cultivo

Tabla 1. Longitud máxima del filamento (en μm) originado en la germinación de las carposporas de *Predaea ollivieri* y *P. pusilla* durante las cuatro primeras semanas de cultivo.

	<i>P. ollivieri</i>	<i>P. pusilla</i>
Primera semana	30	94
Segunda semana	46	130
Tercera semana	65	158
Cuarta semana	100	> 200

Tabla 2. Características de la germinación de las carposporas de las distintas especies de *Predaea* cultivadas hasta ahora. Se indica el diámetro de las carposporas, el tipo de filamento originado (unipolar o bipolar), el tiempo que tarda el filamento en ramificarse (T_{ram}), el tipo de ramificación, la forma y número de los plastos del filamento, y la referencia donde se ha hallado la información (- = no consta).

Especie	Diámetro carposporas (μm)	Tipo de filamento	T_{ram} (en días)	Ramificación	Forma y número plastos	Referencia
<i>P. feldmannii</i>	8-10	Unipolar	12-15	Irregular	Alargada, varios	Lemus y Ganesan, 1977
<i>P. kreffiana</i>	< 18	-	-	Irregular	-	Millar y Guiry, 1989
<i>P. ollivieri</i>	6-10	-	-	Unilateral	-	Athanasiadis, 1988
<i>P. ollivieri</i>	6-8	Unipolar	14-21	Irregular	Discooidal, numerosos	Este trabajo
<i>P. pusilla</i>	9-10	Bipolar	8-16	Irregular	Discooidal, numerosos	Este trabajo
<i>P. tokidae</i>	5-10	Unipolar o bipolar	± 7	Irregular	-	Kajimura, 1990
<i>P. weldii</i>	6-10	Bipolar	-	Irregular	Alargada, numerosos	Lemus y Ganesan, 1977

desarrollan filamentos similares son *P. kraftiana* Millar y Guiry (Millar y Guiry, 1989), de la cual se ha completado el ciclo vital en el laboratorio y presenta un ciclo trigenético heteromórfico (tipo *Bonnemaisonia*, Dixon e Irvine, 1977), y las especies *P. feldmannii* Børgesen (Lemus y Ganesan, 1977), *P. weldii* Kraft y Abbott (como *P. pusilla* (Berthold) J. Feldmann en Lemus y Ganesan, 1977), y *P. tokidae* Kajimura (Kajimura, 1990), especies de las que no se ha completado su ciclo vital pero de las que se han descrito los primeros estadios de germinación de las carposporas. Por último, como se ha comentado anteriormente, la especie mediterránea *P. ollivieri* presenta también este tipo de filamentos (Athanasiadis, 1988; este trabajo). Las carposporas de todas las especies de *Predaea* estudiadas son redondeadas y oscilan habitualmente entre 5-10 μm de diámetro (tabla 2), excepto en el caso de *P. kraftiana*, en la que pueden alcanzar los 18 μm . Las carposporas de *P. ollivieri* descritas por Athanasiadis (1988) son ligeramente más grandes que las encontradas por nosotros, pues pueden alcanzar los 10 μm , mientras que las estudiadas por nosotros no superan los 8 μm .

Las diferencias observadas en el momento de la germinación creemos que son esenciales desde el punto de vista taxonómico, puesto que permiten diferenciar los esporófitos de las distintas especies y probablemente también nos permitirán atribuirlos a alguna especie ya descrita de la familia *Acrochaetiaceae*. Stegenga (1985) ya destacó la importancia de este carácter taxonómico en la clasificación de las especies de *Acrochaetiaceae*, junto al número y tipo de plastos por célula y al tipo de ciclo vital. Con este trabajo, donde se han hecho germinar como mínimo 100 carposporas en cada uno de los diez portaobjetos de cada especie, reforzamos la validez taxonómica de este carácter siempre que las condiciones de cultivo sean equivalentes.

Así, siguiendo este criterio podemos agrupar las especies del género *Predaea* descritas hasta el momento en tres grupos. Un primer grupo está formado por las especies cuyas carposporas sufren una tabicación inicial transversal y originan filamentos bipolares o incluso tricornos o tetracornos; en este grupo se integra *P. pusilla* (este trabajo). En cuanto al individuo de esta especie en que las carposporas no siguen el patrón indicado y generan filamentos unipolares, creemos que es debido a anomalías en el desarrollo de las carposporas y, por lo tanto, se ha descartado una posible dualidad en la germinación. Un segundo grupo lo forman las especies cuyas carposporas no sufren una tabicación inicial y por lo tanto forman filamentos unipolares. A este grupo pertenecen *P. feldmannii* (Lemus y Ganesan, 1977) y *P. ollivieri* (este trabajo). Por último, un tercer grupo lo integran *P. weldii* (Lemus y Ganesan, 1977) y *P. tokidae* (Kajimura, 1990), que presentan las dos posibilidades, pero los autores no especifican si una de ellas es poco frecuente o no (tabla 2).

Entre la primera y tercera semana de cultivo es cuando suelen aparecer los primeros ramos laterales en todas las especies de *Predaea* en que se conoce esta información (*P. feldmannii*, *P. tokidae*, *P. ollivieri* y *P. pusilla*). Hasta el primer mes de cultivo, los ramos de todas las especies presentan una disposición irregular, excepto en los cultivos de *P. ollivieri* llevados a cabo por Athanasiadis (1988), en los cuales la ramificación es básicamente unilateral. Este resultado contrasta con el cultivo de las carposporas de *P. ollivieri* de este trabajo, donde la ramificación es irregular (tabla 2).

Parece ser que en todas las especies descritas hasta ahora las germinaciones toman forma más o menos discoidal al cabo de un tiempo de cultivo, debida a la agrupación densa de sus ramas laterales de segundo o de tercer orden. En todos los casos la formación de discos requiere unos dos meses de cultivo, excepto en *P. tokidae*, donde esto sucede ya a las dos semanas (Kajimura, 1990). En nuestro caso, al cabo de un mes de cultivo no se observó ninguna formación discoidal.

En cuanto a los plastos, la observación al microscopio electrónico permitió distinguir numerosos plastos discoidales donde, con el microscopio óptico, parecía que existía un solo plasto parietal. Esta característica nos permitió atribuir finalmente la fase prostrada de las dos especies de *Predaea* al género *Audouinella*, siguiendo los criterios de Stegenga (1985), aunque por el momento no hemos encontrado ninguna especie descrita que se corresponda exactamente a los ejemplares obtenidos por nosotros en cultivo. Probablemente, en las descripciones de las especies del género *Audouinella* del Mediterráneo ha habido errores en el momento de determinar la forma y el número de plastos por célula, y por lo tanto tendremos que recurrir al estudio en el microscopio electrónico de los tipos.

Como conclusión del trabajo pensamos que las dos especies mediterráneas del género *Predaea* pertenecen a los rodófitos con ciclo de vida heteromórfico y que el esporofito de las mismas podría ser una especie ya descrita del género *Audouinella*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto PB95-0385-C06-06, subvencionado por la DGES.

Bibliografía

- ATHANASIADIS, A. 1988. North Aegean Marine Algae II. Studies on the thallus structure and reproduction of *Nemostoma dichotomum* J. Agardh and *Predaea ollivieri* J. Feldmann (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot. Mar.* 31: 23-32.
- DIXON, P.S. e IRVINE, L.M. 1977. *Seaweeds of the British Isles...* Vol. 1. *Rhodophyta*. Part 1. *Introduction, Nemaliales, Gigartinales*. British Museum (Natural History), London, xi + 252 pp., 90 fig.
- GUIRY, M.D. y CUNNINGHAM, E.M. 1984. Photoperiodic and temperature responses in the reproduction of North Eastern Atlantic *Gigartina acicularis* (Rhodophyta, Gigartinales). *Phycologia* 23 (3): 357-367.
- KAJIMURA, M. 1990. On carpospore germination in *Predaea tokidae* Kajimura (Gymnophloeaceae, Rhodophyta) in culture. *Mem. Fac. Sci. Shimane Univ.* 24: 63-69.
- LEMUS, A.J. y GANESAN, E.K. 1977. Morphological and culture studies in two species of *Predaea* G. de Toni (Rhodophyta, Gymnophloeaceae) from the Caribbean sea. *Bol. Inst. Oceanogr. Venez. Univ. Oriente* 16 (1 2): 63-77.
- LEWIN, J. 1966. Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatoms growth. *Phycologia* 6: 1-12.

- MILLAR, A.J.K. y GUIRY, M.D. 1989. Morphology and life history of *Predaea kraftiana* sp. nov. (Gymnophloeaceae, Rhodophyta) from Australia. *Phycologia* 28 (4): 409-421.
- STEGENGA, H. 1985. The marine Acrochaetiaceae (Rhodophyta) of Southern Africa. *S. Afr. J. Bot.* 51 (5): 292-330.
- STOSCH VON, H.A. 1964. Wirkungen von Jod und arsenit auf meeresalgen in kultur. En: D. de Virville y J. Feldmann (ed.) *Proceed. 4th Int. Seaweed Symp.* Pergamon Press, Nueva York, pp. 142-150.
- VERLAQUE, M. 1990. Contribution à l'étude du genre *Predaea* (Rhodophyta) en Méditerranée. *Phycologia* 29 (4): 489-500.