

**ANATOMIA, HISTOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA DEL OOSPORANGIO  
DE *Chara hydropitys* Reich. (CHAROPHYTA)**



**YENNY MAGALY CASTRILLÓN BOLAÑOS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN  
2011**

**ANATOMIA, HISTOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA DEL OOSPORANGIO  
DE *Chara hydropitys* Reich. (CHAROPHYTA)**

**YENNY MAGALY CASTRILLÓN BOLAÑOS**

**DIRECTOR**

**MS.c GERARDO ANDRES TORRES RODRIGUEZ  
DOCENTE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**CODIRECTOR**

**EDGAR JAVIER RINCON BARON  
DOCENTE UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
GRUPO SEMILLERO ECOLÓGICO  
CANDIDATO A DOCTORADO UNIVERSIDAD DEL VALLE**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial  
para optar al Título de Bióloga**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN**

Nota de Aceptación

APROBADO

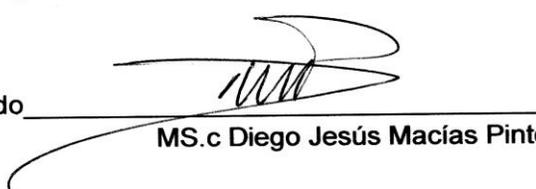
Director

  
MS.c Gerardo Andrés Torres Rodríguez

Jurado

  
MS.c Gerardo Ignacio Naundorf Sanz

Jurado

  
MS.c Diego Jesús Macías Pinto

Popayán, 24 de Noviembre de 2011

Con este trabajo culminó una etapa de mi vida  
por eso doy gracias a Dios  
A la vida por brindarme la oportunidad de seguir este camino,  
A mis padres por su apoyo y confianza incondicional,  
A mis hermanos por estar a mi lado, acompañándome,  
A los que hoy no puedo abrazar pero se comparten mi alegría,  
A mi pareja sentimental quien me alentó constantemente,  
A mis amigas con las que compartí muchos momentos,  
A mis compañeros y demás personas con quienes compartí un instante, porque de una u otra forma contribuyeron a lograr uno de los propósitos más importantes en mi vida.

*“Nacemos para vivir, por eso el capital más importante que tenemos es el tiempo, es tan corto nuestro paso por este planeta que es una pésima idea no gozar cada paso y cada instante, con el favor de una mente que no tiene límites y un corazón que puede amar mucho más de lo que suponemos”.*

Facundo Cabral

## **AGRADECIMIENTOS**

Al director de mi trabajo de grado Gerardo Andrés Torres Rodríguez por abrir las puertas de la Unidad de Microscopía Electrónica, orientarme y colaborarme en el desarrollo de este estudio.

A Edgar Javier Rincón Barón, mi asesor por haber guiado el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, ayudo de forma pertinente en mis inquietudes y desarrollo de mi trabajo.

A Lyda Patricia Mosquera quien me brindo su amistad, apoyo y orientación en las actividades realizadas en la Unidad de Microscopía Electrónica.

A la Universidad del Cauca y en especial a la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación por darme la formación académica que me permitió crecer en mi carrera profesional.

A mis compañeros y amigos con quienes compartí momentos de alegría, tristeza y aventura en el transcurso de mi formación profesional.

A mis padres, hermanos y demás familiares que me apoyaron de manera incondicional y me dieron motivos para seguir adelante.

A Oscar Felipe Jiménez quien siempre me dio su mano y me brindo su ayuda de forma constante.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, participaron en la realización de este trabajo, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

## CONTENIDO

	Pág.
Resumen	
Introducción	12
1. Planteamiento del problema	17
2. Justificación	20
3. Objetivos	22
4. Marco teórico	23
4.1 Morfología vegetativa	24
4.2 Morfología reproductiva	27
5. Antecedentes	40
6. Materiales y métodos	45
6.1 Área de estudio	45
6.2 Tratamiento de las muestras	48
6.2.1 Microscopía Óptica de Alta Resolución	49
6.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión	50
6.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido	50
6.2.4 Microscopía de Fluorescencia	50

<b>7. Resultados</b>	<b>51</b>
<b>7.1 Descripción morfológica vegetativa de <i>Chara hydrophytes</i></b>	<b>51</b>
<b>7.2 Descripción estructural del oosporangio de <i>C. hydrophytes</i></b>	<b>55</b>
<b>7.3 Descripción ultraestructural del oosporangio de <i>C. hydrophytes</i> mediante Microscopía Electrónica de Transmisión</b>	<b>61</b>
<b>7.4 Descripción ultraestructural del oosporangio y oospora de <i>C. hydrophytes</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido</b>	<b>67</b>
<b>7.5 Autofluorescencia del oosporangio de <i>C. hydrophytes</i></b>	<b>70</b>
<b>8. Discusión</b>	<b>71</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>77</b>
<b>10. Recomendaciones</b>	<b>79</b>
<b>11. Literatura citada</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
<b>Figura 1.</b> Habito de <i>Chara</i> .	26
<b>Figura 2.</b> Morfología de las Charales.	27
<b>Figura 3.</b> Formación y disposición del anteridio de <i>Chara</i> sp.	30
<b>Figura 4.</b> Etapas de desarrollo del oosporangio de <i>Chara</i> sp.	31
<b>Figuras 5.</b> Oosporangio	33
<b>Figuras 6.</b> Desarrollo de la Pared Oosporongial Compuesta.	35
<b>Figura 7.</b> Etapas en la deposición de la capa de calcina.	36
<b>Figura 8.</b> Departamento del Valle del Cauca.	45
<b>Figuras 9-12.</b> Área de recolecta de <i>Chara hydrophytes</i> .	46-48
<b>Figuras 13-16.</b> Características vegetativas de <i>C. hydrophytes</i> observadas <i>in vivo</i> bajo estereoscopio y microscopio óptico.	53
<b>Figuras 17-20.</b> Gametangios femeninos y masculinos de <i>C. hydrophytes</i> observados <i>in vivo</i> al estereoscopio.	54
<b>Figuras 21-28.</b> Estructura de los oosporangios de <i>C. hydrophytes</i> observada mediante microscopía óptica de alta resolución.	58-59

<b>Figuras 29-31.</b> Deposición progresiva del carbonato de calcio sobre la pared oosporongial compuesta.	60
<b>Figuras 32-35.</b> Detalles ultraestructurales de la pared oosporongial compuesta observada mediante microscopía electrónica de transmisión.	63
<b>Figuras 36-39.</b> Detalles ultraestructurales del citoplasma de la oosfera, células espirales y capa calcificada.	65
<b>Figuras 40-42.</b> Detalles ultraestructurales del borde espiral, <i>ribbon</i> y cloroplastos.	66
<b>Figura 43.</b> Micrografía electrónica del oosporangio de <i>C. hydrophitys</i> obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.	68
<b>Figuras 44-46.</b> Detalles ultraestructurales de la oospora de <i>C. hydrophitys</i> .	68
<b>Figuras 47-48.</b> Detalles ultraestructurales sobre la microornamentación en la superficie de la fosa de la oospora de <i>C. hydrophitys</i> .	69
<b>Figura 49.</b> Micrografía autofluorescente del oosporangio de <i>C. hydrophitys</i> .	70

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características morfométricas del oosporangio de <i>Chara hydrophytis</i> .	57
<b>Tabla 2.</b> Características morfométricas del oosporangio de <i>C. hydrophytis</i> recolectada en diferentes lugares.	75

## RESUMEN

El género *Chara* está representado por algas macrófitas comunes en ambientes dulceacuícolas oligotróficos. Se reconocen por la complejidad de su morfología vegetativa y reproductiva, esta última constituida por gametangios femeninos y masculinos, oosporangios y anteridios respectivamente; cuyas características estructurales y ultraestructurales han sido poco estudiadas. Se han registrado aproximadamente 20 especies entre ellas, *Chara hydropitys* Reich. una especie monoica que se reconoce por desprender un fuerte olor similar a cebolla. El objetivo principal de este trabajo es describir a nivel estructural y ultraestructural el oosporangio de *C. hydropitys*.

El material de trabajo fue recolectado en una quebrada tributaria del Río Meléndez en la ciudad de Cali; los ejemplares fértiles fueron fijados y procesados según el protocolo sugerido por Bozzola & Russell (1998). Las secciones semifinas y ultrafinas se observaron en microscopía óptica de alta resolución y electrónica de transmisión. De igual manera se siguió el protocolo para microscopia de barrido y de fluorescencia.

Entre los resultados se encontró al oosporangio constituido por la célula estéril, la célula central, la célula pedicelar, las células coronulares, las células espirales y la oosfera. La ultraestructura de la pared oosporangial esta formada por ocho capas depositadas por las células espirales y la oospora, estas son: pared primaria de la oospora, capa amorfa, capa helicoidal, capa microfibrilar, pared primaria de células espirales, capa cristalina, capa helicoidal pigmentada y capa de ornamentación. La microornamentación de esta última capa es verrucada y consiste de pequeñas papilas pustuliformes con poro apical central.

**Palabras clave:** *Chara hydropitys*, Charales, microornamentación, morfología, oosporangio, oospora, ultraestructura.

## INTRODUCCIÓN

Las Chlorophytas son una división de algas eucariotas que incluye más de 15000 especies con una amplia variación morfológica y estructural, que incluye desde organismos unicelulares hasta estructuras talosas más especializadas, entre las cuales se encuentran varias especies todavía con conocimiento incompleto. Habitan principalmente aguas dulces y solo el 10% son marinas (Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008, Lee 2008).

La subdivisión de las Chlorophytas depende del sistema de clasificación que utilice el autor, Gallardo *et al.* (2004) consideran cinco clases: Prasinophyceae, Chlorophyceae, Ulvophyceae, Trebouxiophyceae, y Charophyceae, mientras Hoek, van den *et al.* (1995) la subdivide en once clases entre las cuales se encuentran las anteriormente mencionadas excepto Trebouxiophyceae y adicionalmente las clases Cladophorophyceae, Klebsormidiophyceae, Dasycladophyceae, Trentepohliophyceae, Pleurastrophyceae, Bryopsidophyceae y Zygnematophyceae.

Sin embargo estudios realizados por Karol *et al.* (2001), Lewis *et al.* (2004) y McCourt *et al.* (2004), indican que las Chlorophytas se dividen en dos linajes: uno que comprende la división Chlorophyta y el otro la división Charophyta (Streptophyta), conformada por algunas embriofitas y unos pocos géneros de algas verdes, entre los cuáles ubican a *Chara* L., excluyéndola de la división Chlorophyta.

Para la clasificación se tienen en cuenta características relacionadas con el ciclo de vida, división celular, ultraestructura de los zoides, entre otras. El presente

trabajo se ciñe a la clasificación propuesta por Hoek, van den (1995) ya que hasta el momento es la más aceptada en el campo de la ficología.

La clase Charophyceae se encuentra conformada por algas verdes que crecen como macrófitas sumergidas en aguas dulces o salobres, lénticas o lólicas. Esta clase comprende el orden más especializado, las *Charales* (Gomez 1970, Hutchinson 1975, Leitch 1989, Haas 1994, Hoek, van den 1995, Casanova 1997, Wetzel 2001, Coops 2002, Gallardo *et al.* 2004, Sosnovsky *et al.* 2005, Casanova *et al.* 2007, De Winton *et al.* 2007, Lee 2008, Blume *et al.* 2009, Bueno *et al.* 2009, Sakayama *et al.* 2009). Dentro del orden de las Charales encontramos la familia Characeae constituida por cerca de 292 especies reconocidas y distribuidas dentro de seis géneros: *Chara*, *Nitella* C. Agardh, *Tolypella* A. Braun, *Lychnothamnus* Leonhardi, *Lamprothamnium* J. Groves y *Nitellopsis* Hy. (Wood 1952, Mattox & Stewart 1984, Leitch *et al.* 1990, Haas 1994, Picelli *et al.* 2004, Chou *et al.* 2007, Graham *et al.* 2008, Sakayama 2008, Caisová & Gařka 2009).

El género *Chara* se encuentra en ambientes tropicales secos y tropicales húmedos con temperaturas generalmente cálidas, y ocupando aguas expuestas al sol o en lugares poco sombreados. Se representa por aproximadamente 20 especies que se caracterizan por la complejidad de su morfología vegetativa y reproductiva (Gómez 1970, Hoek, van den *et al.* 1995, Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008, Bueno *et al.* 2009). Además las especies de este género se han convertido en importantes organismos modelo para realizar investigaciones a nivel celular y fisiológico (Domozych *et al.* 2010).

Su estructura vegetativa se representa por un talo macroscópico diferenciado en nudos y entrenudos los cuales se alternan a lo largo de la planta. Los nudos originan ramas en disposición verticilada que crecen desde el talo, conocidas como ramas de crecimiento ilimitado, ramas de crecimiento limitado o ramitas y

filamentos que actúan como rizoides desarrollados a partir de los nudos basales del talo o de las ramitas (Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den *et al.* 1995, Gallardo *et al.* 2004, Casanova *et al.* 2007, Graham *et al.* 2008, Lee 2008, Sakayama, 2008).

La estructura reproductiva cuenta con gametangios femeninos y masculinos, oosporangios y anteridios respectivamente; el oosporangio es un órgano de forma ovalada que consiste de células coronulares, célula central, célula pedicelar y una ovocélula también conocida como oosfera rodeada por células escuderas, llamadas así a las células espirales y célula estéril. Los anteridios son órganos globulares que se encuentran protegidos por células escuderas; en su interior se disponen los filamentos anteridiales formados por numerosas células que al final darán origen a los espermatozoides; ambos órganos nacen de la parte adaxial del nudo de las ramas de crecimiento limitado. Las especies del género *Chara* se caracterizan por ser oogámicas y presentar ciclos de vida haploide con cigoto diploide (Leitch 1989, Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den *et al.* 1995, Mandal *et al.* 2002, Gallardo *et al.* 2004, Casanova *et al.* 2007, Graham *et al.* 2008, Lee 2008, Sakayama 2008, Sakayama *et al.* 2009).

Las Charophyceae además de la complejidad morfológica, se caracterizan porque cumplen una importante función en los ecosistemas acuáticos; mantienen el medio dominado por macrófitas acuáticas, controlan la abundancia de fitoplancton; su presencia durante la mayor parte del año principalmente en ecosistemas de aguas permanentes, favorecen el crecimiento y reproducción de las comunidades de peces, aves, mamíferos y algunos invertebrados. En ocasiones estas algas se consideran un verdadero problema como en el caso de los cultivos de arroz, aunque algunos estudios le atribuyen el mantenimiento en la fertilidad del suelo, gracias al reciclaje de nutrientes y fijación de nitrógeno (Pereyra-Ramos 1981, Duarte *et al.* 1986, Hanson 1990, Moss 1990, Underwood *et al.* 1992, Kufel & Ozimek 1994, Hargeby *et al.* 1994, Guha 1995, Scheffer 1998, Wetzel 2001,

Coops 2002, Ariosa *et al.* 2004, Sosnovsky *et al.* 2005, Cubas 2008, Graham *et al.* 2008).

Contribuyen de esta manera en el mantenimiento y productividad de la cadena trófica, ya que establece una parte significativa en la producción primaria (Cubas 2008). De la misma manera, algunas especies de Charophyceae han despertado desde hace tiempo el interés de investigadores; ya que su presencia en el agua especialmente las del género *Chara*, tienen un efecto negativo en el desarrollo de las larvas de dípteros, tales como los mosquitos transmisores del paludismo y de fiebre amarilla. Un ejemplo de ello es *Chara fragilis* y *Chara foetida*, las cuales ejercen un control biológico al no permitir el desarrollo de las larvas de estos mosquitos; debido a la segregación de un principio tóxico mortal (Caballero 1922, Matheson 1930).

Adicionalmente se las considera un buen indicador de la calidad del agua, por lo cual son utilizadas como biomonitores que proporcionan alertas y medidas en el deterioro de las condiciones ambientales; debido a que algunas de sus especies son más sensibles que otras a la contaminación, convirtiéndose este en el principal factor que ocasiona disminución o desaparición de sus hábitats naturales, lo que conlleva a que este tipo de algas terminen por extinguirse cuando la eutrofización del agua aumenta. A esto se suma el desplazamiento o desaparición que se produce por el desarrollo de angiospermas, y al efecto de sombreado que producen tanto el fitoplancton como el perifiton (Phillips *et al.* 1978, Van Dijk & Van Vierssen 1991, Scheffer *et al.* 1993, Coops 2002, Cirujano *et al.* 2007, Schneider 2007, Cubas 2008, Rodrigo *et al.* 2009).

Por otra parte la alta variabilidad morfológica que presentan las Charophyceae hace que su taxonomía sea compleja. Respecto a esto los estudios tradicionales que han aplicado para la determinación taxonómica de este grupo, generalmente han empleado características morfológicas tales como: corticación del talo,

diferencias en las ramificaciones, estipuloides, células espiniformes, disposición de los gametangios, número de células coronulares en el oosporangio, entre otras (Wood 1965, Krishnan 2006, Boegle *et al.* 2007, Cirujano *et al.* 2007, Graham *et al.* 2008, Sakayama *et al.* 2002, 2005, 2009, Sakayama, 2008).

Sin embargo desde hace algunos años se han venido desarrollando diferentes estudios a nivel molecular que han aportado información valiosa para la sistemática de estos organismos, especialmente las investigaciones relacionadas con la morfología de los órganos reproductivos, donde cobran importancia los análisis ultraestructurales y su significado taxonómico para la determinación de especies, de igual manera los caracteres macro ayudan a la identificación de géneros (Leitch 1989, John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Casanova 1991, 1997, Hoek, van den *et al.* 1995, Nozaki *et al.* 1998, Mandal *et al.* 2002, Sakayama *et al.* 2002, 2004, 2005, 2009, Mandal & Ray 2004, Krishnan 2006, Chou *et al.* 2007, Caisová *et al.* 2008, Sakayama 2008, Blume *et al.* 2009, Bueno *et al.* 2009).

El presente trabajo de investigación se enmarco en la línea de Biología celular y molecular, se realizo en el Laboratorio de Microscopia de la Universidad del Cauca y fue desarrollado por el grupo de investigación en Microscopia y Sistema de Análisis de Imágenes (GIMAI); orientándose principalmente en la descripción morfológica del órgano reproductor femenino de *Chara hydrophytes*, contribuyendo así en el conocimiento de la estructura y ultraestructura de esta especie, aportando información para el entendimiento de la biología reproductiva de las Charophytas.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir del siglo XIX se ha obtenido información sobre la morfología de la superficie del oosporangio y de la oospora, características tales como: posición y arreglo sobre el talo, forma, número de células coronulares, número de células estériles, presencia de la capa de calcina, bordes espirales, amplitud de la fosa, extensión en los bordes, y especialmente las características asociadas con la pared oosporangial compuesta (textura, color, ultraestructura, microornamentación de la superficie); han demostrado ser taxonómicamente valiosas, algunas han sido descritas e ilustradas en estudios florísticos (Groves & Bullock-Webster 1920, Griffin & Rhodes 1965, Leitch *et al.* 1990, Casanova 1997, Nozaki *et al.* 1998, Sakayama *et al.* 2002, 2006, Mandal & Ray 2004, Picelli *et al.* 2004, De Winton *et al.* 2007, Caisová *et al.* 2008, Sakayama 2008, Blume *et al.* 2009, Bueno *et al.* 2009, Caisová & Gąbka 2009; Rodrigo *et al.* 2009).

Las especies del género *Chara* presentan una alta variabilidad morfológica que hace difícil su identificación. Wood & Imahori (1965) diferencian 18 macroespecies, cada una incluyendo muchas variedades y formas taxonómicas. Wood (1965) clasificó algunas especies del género *Nitella*, basándose principalmente en diferencias sobre la morfología vegetativa, utilizando la morfología de la oospora especialmente la microornamentación de la pared de la oospora como carácter diagnóstico a nivel intraespecífico; por consiguiente redujo varios taxa que ya habían sido aceptados como especies a nivel intraespecífico. Sin embargo John & Moore (1987) sugieren que la morfología de la oospora debe ser usada para describir las especies de *Nitella*, dado que parece ser una característica bastante estable; además basados en la microornamentación de la

oospora proponen que algunos de los taxa intraespecíficos reconocidos por Wood deben ser llevados a especies.

Sakayama *et al.* (2002) en su estudio sobre varias especies de *Nitella* ha demostrado que los taxa previamente tratados a nivel intraespecífico por Wood tienen distinta microornamentación en la oospora y al parecer representan especies distintas. En su investigación integra análisis de la morfología de la oospora mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y análisis filogenéticos moleculares basados en la secuenciación de genes, que parecen apropiados para resolver los problemas taxonómicos del género *Nitella*. No obstante en algunos casos cuando la secuenciación de genes es idéntica, se recurre a la diferencia en la microornamentación de la pared para distinguir los taxa.

Cabe resaltar que se ha demostrado la validez filogenética del uso de la morfología de la oospora para la diagnosis de algunas especies de *Nitella*. Resultaría conveniente realizar investigaciones como las propuestas por Sakayama *et al.* (2002, 2005, 2006, 2009) y Krishnan (2006) en el género *Chara*, puesto que ayudarían a la revisión taxonómica de sus especies.

Vale la pena señalar que la mayoría de estudios se han realizado mediante MEB aportando de gran manera al conocimiento sobre la morfología del oosporangio de los géneros *Nitella* y *Chara*. Los estudios más significativos que utilizan MET fueron realizados por Leitch (1989) y Leitch *et al.* (1990) los cuáles describen detalladamente la ultraestructura y el arreglo interno de las capas de la pared que conforman el oosporangio de los géneros *Chara*, *Lamprothamnium* y *Nitella* encontrando cierta uniformidad en cuanto al número de capas que conforman la pared oosporangial compuesta. Sin embargo se encuentran especies como *Nitella opaca* C. Agardh ex Bruzelius, que muestran algunas diferencias en la estructura

de esta pared, lo que sugiere que no todas las especies pertenecientes a estos géneros presentan la misma arquitectura en la pared.

Si bien es cierto que se han venido realizando diferentes estudios sobre la morfología del oosporangio, reconociendo su importancia en la taxonomía de las Charophyceae, todavía existen muchas especies que carecen de información sobre su biología reproductiva, por lo cual se hace necesaria la realización de investigaciones que permitan explorar la estructura y ultraestructura del oosporangio en las especies que habitan los diferentes medios acuáticos presentes en nuestro territorio. De acuerdo a lo mencionado, el presente trabajo de investigación se enfoca a la descripción detallada del oosporangio de la especie *Chara hydrophytis*.

Con lo expuesto anteriormente se plantean los siguientes interrogantes:

¿La morfología interna y externa del órgano reproductor femenino de *Chara hydrophytis*, es similar a la de otras especies de Charophyceae ya descritas?

¿El arreglo ultraestructural de la pared oosporangial compuesta y la microornamentación de la pared de la oospora es una característica única de esta especie o es semejante al de otras especies de Charophyceae?

## 2. JUSTIFICACION

Las características de la morfología vegetativa han permitido clasificar los diferentes grupos de Charophyceae, sin embargo este tipo de organización vegetativa solo permite discriminar un número limitado de especies. En contraste el estudio de los órganos reproductores, especialmente la morfología externa de la estructura femenina, la apariencia general, número de bordes espirales y microornamentación de la pared se han utilizado como caracteres taxonómicos y diagnósticos a nivel específico; demostrando que el análisis de la morfología externa del oosporangio evaluada mediante MEB es de gran utilidad para delimitar las especies dentro de los géneros (Groves & Bullock-Webster 1920, Zaneveld 1940, John & Moore 1987, John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Casanova 1991, 1997, Nozaki *et al.* 1998, Mandal *et al.* 2002, Sakayama *et al.* 2002, 2005, Mandal & Ray 2004, Picelli *et al.* 2004, Krishnan 2006, De Winton *et al.* 2007, Sakayama 2008, Bueno *et al.* 2009, Caisová *et al.* 2008, Blume *et al.* 2009, Rodrigo *et al.* 2009).

Estudios realizados por Leitch (1989), Leitch *et al.* (1990), Sakayama *et al.* (2005, 2006), Sakayama (2008) proponen que además de tener en cuenta la morfología externa del oosporangio y de la oospora, se considere la morfología interna de la pared de la oospora, reconociendo que presenta características útiles cuando se estudian las capas de la pared de la oospora, de manera que brindan información valiosa para la delimitación de taxa estrechamente relacionados. Como se ha expresado anteriormente, el estudio de los órganos reproductores de las Charophyceae es de gran importancia para establecer la clasificación y relaciones filogenéticas (John *et al.* 1990, Casanova 1991, Nozaki *et al.* 1998, Krishnan 2006, Sakayama *et al.* 2005, De Winton *et al.* 2007, Sakayama 2008, Mandal & Ray 2004, Blume *et al.* 2009).

Dado que la estructura y ultraestructura en estos órganos no ha sido ampliamente estudiada, se sugiere realizar investigaciones que se enfoquen a la descripción morfológica, disposición y detalles ultraestructurales de las estructuras que hacen parte de los órganos reproductores; puesto que brindan la opción de obtener nuevas observaciones e interpretaciones de las especies pertenecientes al género *Chara*, en nuestro caso de la especie *Chara hydrophytes*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GENERAL

Describir la anatomía, histología y ultraestructura del órgano reproductor femenino: oosporangio de *Chara hydrophytes*. Reich (Charophyta).

#### 3.2 ESPECÍFICOS

1. Describir la estructura del órgano reproductor femenino de *Chara hydrophytes* empleando Microscopía Óptica de Alta Resolución.
2. Identificar los detalles ultraestructurales que presentan el oosporangio y oospora de *Chara hydrophytes* mediante Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Electrónica de Transmisión.
3. Reconocer la presencia de pigmentos como la clorofila en el oosporangio de *Chara hydrophytes* mediante Microscopía de Fluorescencia (M.F.).

#### 4. MARCO TEÓRICO

La familia Characeae es un grupo de algas verdes macrófitas (Chlorophyta) que presentan una amplia distribución; habitan principalmente en aguas dulces oligotróficas temporales y permanentes con fondos arenosos o fangosos tales como ríos, lagos, charcas, humedales, estanques, entre otros. Aunque unas pocas especies se encuentran en aguas salobres (Wood 1952, Julia 1991, Jones *et al.* 1996, Casanova 1991, 1997, van Nes *et al.* 1999, Coops 2002, Gallardo *et al.* 2004, Sharma 2007, Sakayama 2008, Boszke & Bociąg 2008, Caisová & Gąbka 2009).

La mayoría de especies que pertenecen a esta familia crecen a una profundidad entre 1-14m en aguas con pH entre 5-10, mineralizadas y duras donde la mayoría de iones son bicarbonatos, calcio y magnesio; su colonización en el ecosistema acuático depende principalmente de factores como la disponibilidad de luz y de nutrientes (Hutchinson 1975, Spence 1982, Wetzel 2001, Kufel & Kufel 2002).

Esta familia comprende numerosas especies, variedades y formas que se incluyen en seis géneros divididos en dos subfamilias: Chareae y Nitelleae. La subfamilia Chareae contiene los géneros: *Chara*, *Lamprothamnium*, *Nitellopsis* y *Lychnothamnus*; mientras Nitelleae contiene los géneros: *Nitella* y *Tolypella* (Haas 1994, Mandal & Ray 2004, Sosnovsky *et al.* 2005, Cirujano *et al.* 2002).

Para esta clasificación Wood & Imahori (1965) se basaron en caracteres morfológicos, posteriormente se apoyó con análisis en los caracteres de los gametangios fósiles, “girogonitos” (Grambast 1974, Graham *et al.* 2008, Sakayama 2008, Caisová & Gąbka 2009). La familia Characeae se ubica en el orden de las Charales y se considera como uno de los grupos de algas con mayor especialización, se caracterizan por la complejidad del talo y de los órganos

reproductores (Leitch 1989, van Nes *et al.* 1999, Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008).

#### **4.1 MORFOLOGÍA VEGETATIVA**

El género *Chara* consta de aproximadamente 20 especies, muy similares en su morfología vegetativa. El talo es macroscópico, se caracteriza por ser erguido y se constituye de filamentos ramificados, alcanza una longitud entre 20-30 cm, aunque algunas especies pueden medir de 90-100 cm. El talo consiste de región apical, región basal, se diferencia y alterna en nudos y entrenudos (Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den *et al.* 1995, Picelli *et al.* 2004, Sharma 2007, Graham *et al.* 2008, Lee 2008, Sakayama 2008).

La región basal se encuentra por lo general en sustratos lodosos o limosos y consta de un conjunto de filamentos ramificados, multicelulares e incoloros que actúan como rizoides, sus células se diferencian en siete zonas: zona vacuolar, zona núcleo-vacuola, zona nuclear, zona clara, zona plastidio/vesícula, zona estatolito y zona apical. Los rizoides se desarrollan de los nudos del talo como también de los nudos basales de las ramas de crecimiento ilimitado; y son importantes no solo en el anclaje del alga al sustrato sino también en la captura de nutrientes (fig. 1) (Andrews *et al.* 1984, Julia 1991, Hoek, van den *et al.* 1995, Gallardo *et al.* 2004, Sharma 2007, Graham *et al.* 2008, Lee 2008).

Los nudos están formados por una masa de células discoidales, mientras los entrenudos consisten de una sola célula que puede alcanzar longitudes hasta de 15 cm y contiene cientos de núcleos (Hoek, van den *et al.* 1995, Graham *et al.* 2008).

De las células nodales se desarrollan todos o algunos de los siguientes apéndices: cortéx, estipuloides, ramas de crecimiento ilimitado y ramas de crecimiento limitado. El cortéx, constituido por filas de células extendidas en forma vertical cubren el entrenudo, lo que se conoce como talo corticado, algunas especies son parcialmente corticadas o no tienen cortex (ecorticadas); los estipuloides son estructuras unicelulares formadas del nudo basal de las ramas de crecimiento limitado, el género *Chara* se caracteriza por presentar doble fila de estipuloides (diplóstico) (Fig. 2). Las ramas de crecimiento ilimitado se originan de los nudos del talo; y por último las ramas de crecimiento limitado dispuestas en verticilio, divididas también en nudos y entrenudos donde están presentes algunos pelos unicelulares (Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den *et al.* 1995, Graham *et al.* 2008, Sakayama 2008, Caisová & Gąbka 2009).

Cook *et al.* (1997) menciona que el talo cuenta con una placa celular que separa los nudos y entrenudos, se caracteriza por tener poros muy grandes que permiten el paso de materiales.

La pared celular presenta invaginaciones conocidas como charasomas, que pueden aparecer a lo largo de la periferia celular y su función aun es desconocida (Lucas *et al.* 1989. Citado por Graham *et al.* 2008). Además está compuesta por diferentes capas, entre estas celulosa, la cual es relativamente gruesa para dar protección frente a microorganismos como protistos incluyendo flagelados, ameboides y ciliados, zooplancton (rotíferos, copépodos y cladóceros) y algunos macroinvertebrados (Hoek, van den 1995, Graham *et al.* 2008).

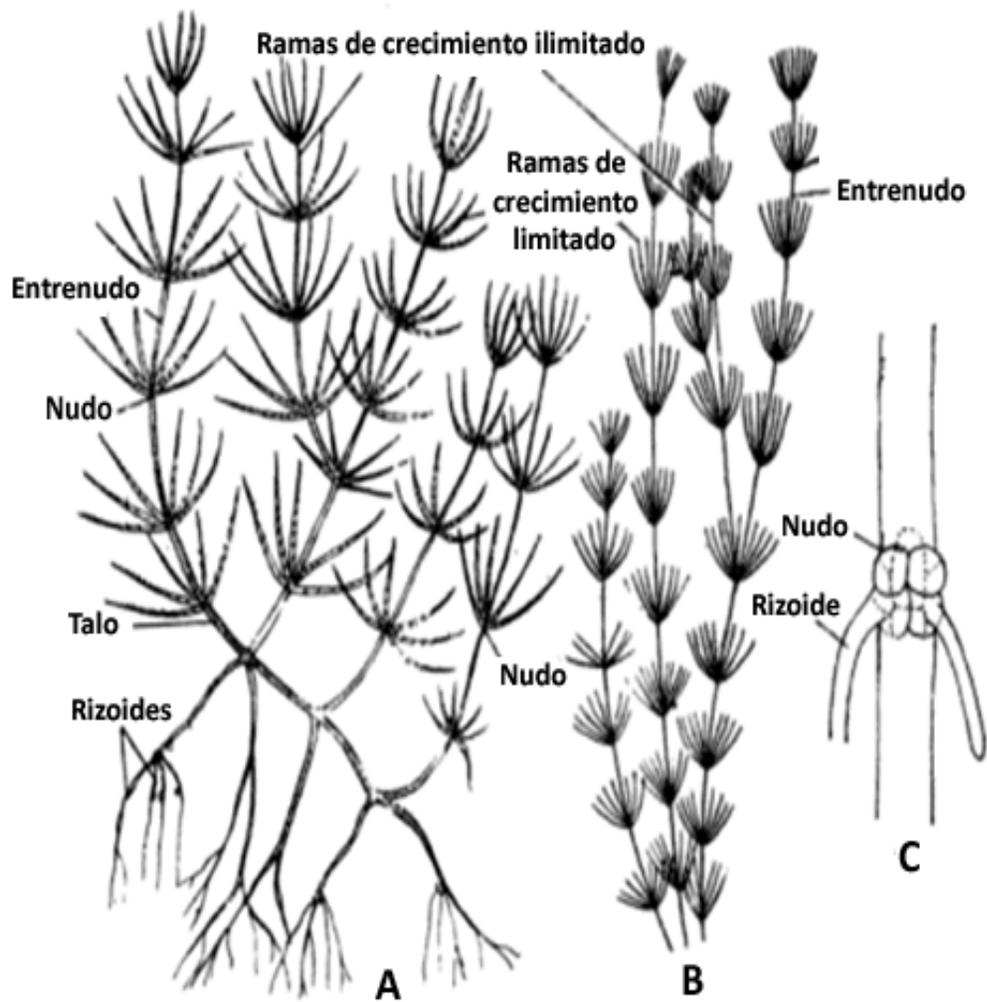


FIGURA 1. Habito de *Chara* **A.** *C. zeylanica*; **B.** *C. deliculata*; **C.** Raiz primaria de *C. aspera* con formación de rizoides.

Tomado y modificado de Sharma 2007.

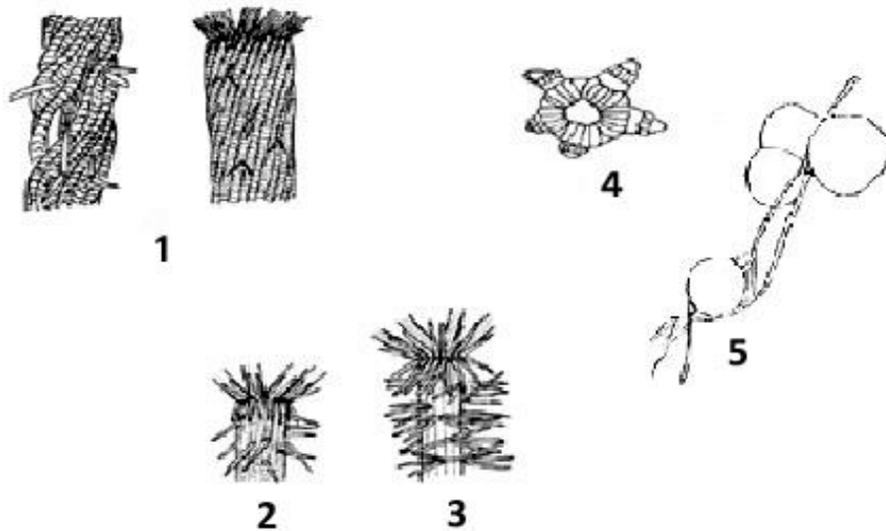


FIGURA 2. Morfología de las Charales: **1.** superficie del eje principal cubierta con células corticales y espinas; **2.** estipulas, dispuestas en la base de las ramificaciones de los nodos. El cortex del talo principal está formado por hileras de células dispuestas longitudinalmente, con espinas organizadas de manera solitaria; **3.** o en grupos. **4.** La reproducción vegetativa se origina en un complejo nodal o en estructuras de forma estrellada **5.** o esférica. La presencia de estas características varía entre las especies.

Tomado y modificado de Caisová *et al.* 2009

#### 4.2 MORFOLOGÍA REPRODUCTIVA

Respecto a su reproducción puede ser de manera asexual o sexual; la primera puede suceder por fragmentación mediante agregados celulares con forma estrellada, conocidos como estrellas amilo porque están llenos de almidón; por bulbillos blancos y esféricos; o por la formación de un protonema. Las formas de reproducción asexual se desarrollan sobre los rizoides o en el complejo nodal de

algunas especies y tienen como función la dispersión y perennación (fig. 2) (Sederias & Colman 2007, Graham *et al.* 2008, Lee 2008).

El segundo tipo de reproducción en las Charophyceae es por oogamia, es decir se debe a estructuras sexuales complejas y especializadas conocidas como gametangios y son de dos tipos, el masculino “anteridio” donde se desarrollan cientos de espermatozoides con forma helicoidal y biflagelada, y el femenino “oosporangio” que cuenta con una ovocélula u oosfera. Ambos gametangios poseen células estériles conocidas como células escuderas que los rodean y protegen (John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Picelli *et al.* 2004, Gallardo *et al.* 2004, Sharma 2007, Graham *et al.* 2008, Lee 2008, Sakayama 2008, Blume *et al.* 2009).

El ciclo de vida de estas algas es haploide y solo se forma una etapa diploide después de la fecundación que inmediatamente sufre meiosis, con lo cual el talo que se genera a partir de la oospora es haploide y por consiguiente los gametos se forman por mitosis (Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008, Hoek, van den *et al.* 1995, John *et al.* 1990).

Los anteridios son órganos de forma globular hueca, están compuestos por ocho células escuderas, las cuales se unen a las células columnares conocidas como manubrio, este manubrio se asocia con las células internas que forman el capítulo primario y secundario; el último capítulo da lugar a los filamentos anteridiales que contienen entre 5-50 células madre espermáticas, donde cada una produce un anterozoide biflagelado, uninucleado y con forma helicoidal (fig. 3).

Cuando los anterozoides están maduros las células escuderas del anteridio se separan unas de otras, exponiendo los filamentos anteridiales, lo que provoca la salida de los anterozoides. Los anteridios se caracterizan por ser de color verde

cuando están jóvenes y naranja brillante o rojo en la madurez, coloración que se debe a la acumulación de carotenoides. (Leitch *et al.* 1990, Hoek van den *et al.* 1995, Gallardo *et al.* 2004, Sharma 2007, Graham *et al.* 2008, Lee 2008).

Ambos órganos reproductores se desarrollan en las ramificaciones acompañados de dos brácteas que se forman del nudo basal de los anteridios, los oosporangios se ubican en la parte adaxial del nudo en la rama con crecimiento limitado, y los anteridios se ubican inmediatamente debajo del oosporangio, (fig. 3). (Leitch 1989, Sakayama 2008, Kalin & Smith 2007, Hoek, van den *et al.* 1995).

El nudo que origina el anteridio también genera la célula para la formación del oosporangio. Esta célula inicial se divide originando tres células, la célula apical es la célula madre de la oosfera; la célula central sufre una serie de divisiones que dan lugar a las células espirales, estas se elongan y forman una capa cortical que envuelve totalmente la oosfera, excepto en el extremo donde las células espirales se dividen y forman una corona apical; y la célula basal da origen al pedicelo del oosporangio (fig. 4) (Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den *et al.* 1995, Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008, Lee 2008).

Las células espirales se elongan y dividen transversalmente formando dos filas de células, de las cuales la fila superior consta de cinco células que serán las células de la corona y la fila inferior también de cinco células corresponden a las células espirales (Leitch *et al.* 1990, Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008, Lee 2008). Toda esta serie de divisiones llevan a que el oosporangio en su madurez se caracterice por ser una estructura ovalada con una gran ovocélula central llamada oosfera, que cuenta con un núcleo en la parte basal, un sitio receptor en el extremo apical, gran cantidad de almidón en su citoplasma (Leitch 1989).

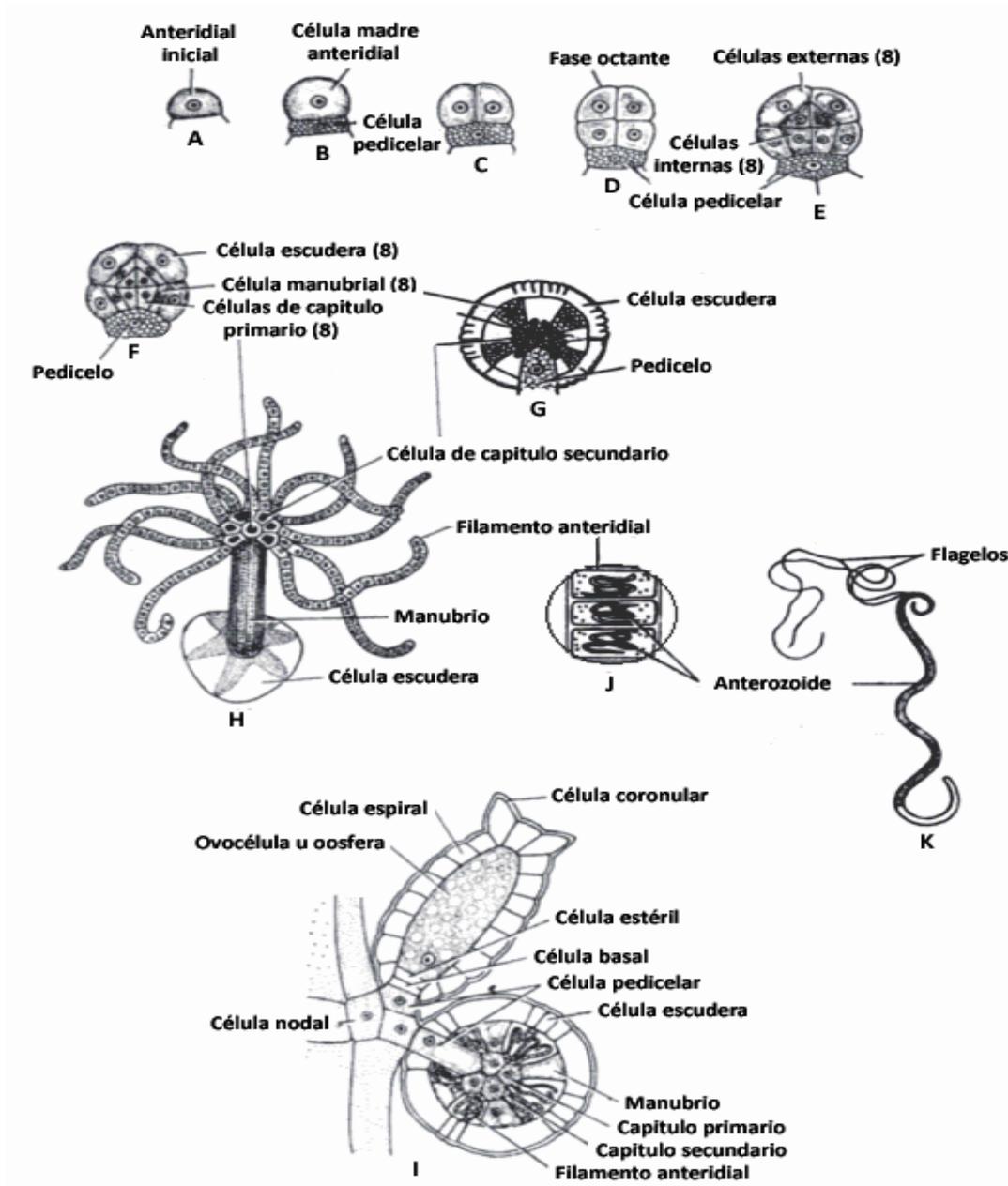


FIGURA 3. Formación y disposición del anteridio de *Chara* sp. **A-H**. Etapas del desarrollo del anteridio; **I**. Anteridio maduro y oosporangio dispuestos en el nodo de una rama de crecimiento limitado; **J**. Filamento anteridial; **K**. Espermatozoide. Tomado y modificado de Sharma 2007.

La oosfera se encuentra cubierta por las células escuderas entre las que tenemos a las células espirales y a la célula estéril; las células espirales se encuentran dispuestas de manera helicoidal en sentido dextrógiro rodeando la oosfera, mientras la célula estéril se ubica en la parte basal; estas células están encargadas de brindarle protección (Fig. 4) (John & Moore 1987, Leitch 1989, John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Mandal *et al.* 2002, Sharma 2007, Lee 2008, Sakayama 2008, Urbaniak 2009).

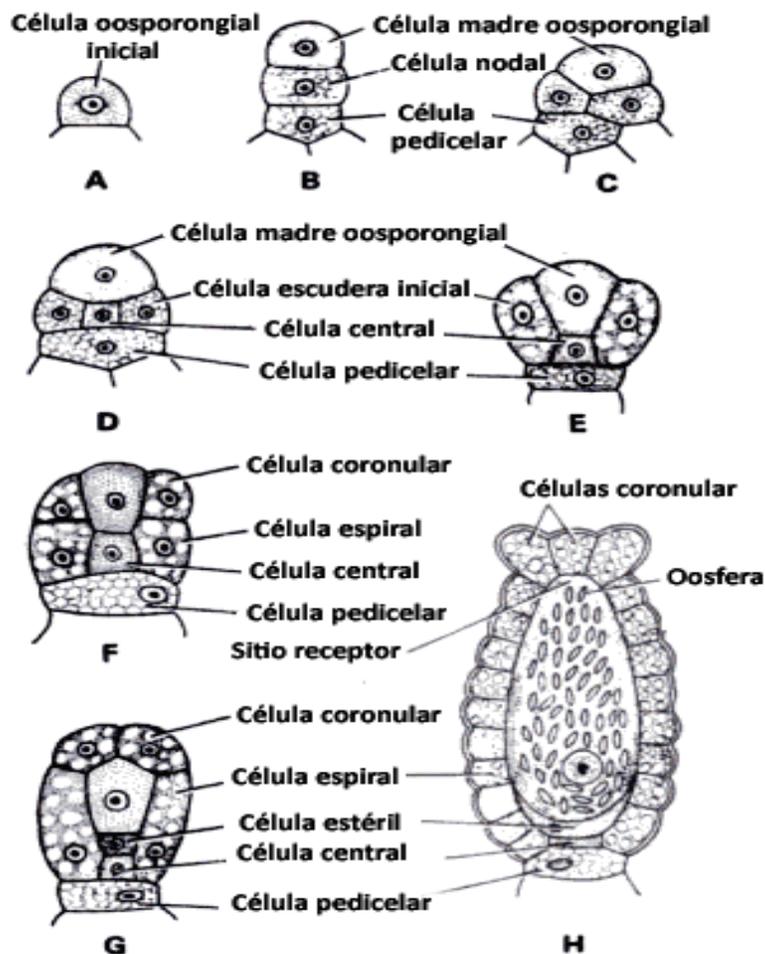


FIGURA 4. A-H. Etapas de desarrollo del oosporangio de *Chara* sp. Tomado y modificado de Sharma 2007

Para la fertilización se hace necesario un medio acuoso que permita el paso de los anterozoides biflagelados hacia el oosporangio. En el oosporangio la zona de las células espirales que está unida con las células coronulares comienza a separarse ligeramente una de otra, dando espacio a cinco aperturas que permanecen con un líquido viscoso e incoloro al cual se adhieren los anterozoides (Pal. *et al.* 1962). Los anterozoides son liberados por la gelatinización de las células madre espermáticas y por la caída de las células escuderas. Posteriormente, el anterozoide penetra a la oosfera por medio del sitio receptor y finalmente se fusiona con el núcleo femenino para formar un cigoto diploide conocido como oospora (John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den 1995, Gallardo *et al.* 2004, Sharma 2007, Lee 2008).

Después de la fertilización la oospora aumenta de tamaño, sufre cambios rápidos en la pared de las células escuderas y la pared de la oospora misma, con el fin de brindar protección contra la desecación o herbivoría, a este órgano que permanecerá en el fondo del medio acuático. Estos cambios llevan a la formación de una pared compuesta de múltiples capas y con frecuencia cubierta por calcina (John & Moore 1987, Leitch 1989, Leitch *et al.* 1990; John *et al.* 1990, Julia 1991, Haas 1994, Casanova 1997, Mandal *et al.* 2002, Mandal & Ray 2004, Boszke & Bociąg 2008, Sakayama 2008, Blume *et al.* 2009, Urbaniak 2009).

Con la ruptura de la pared exterior del oosporangio el cigoto se desprende, y sufre meiosis para formar un protonema que dará lugar a un nuevo individuo. Los cigotos de algunas especies de *Chara* germinan bajo condiciones anaerobias, con disponibilidad de luz y particularmente en sedimentos que son ricos en materia orgánica (Hoek, van den *et al.* 1995, Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008).

Horn af Rantzien (1956) utiliza los términos esporostina, esporina, ectosporina y endosporina para referirse a la formación de la pared oosporangial múltiple. La esporostina corresponde a las capas formadas por la oosfera, caracterizada por

presentar una pigmentación oscura; la esporina es la capa más interna y se deriva de las cinco células espirales que envuelven el cigoto, en ella también se diferencia la ectosporina y endosporina. La primera formada por la oosfera antes de la fecundación y la segunda después de la fecundación, que se cree es producto de los residuos adaxiales de la pared celular de las células espirales.

La ectosporina se describe como una banda bien delimitada normalmente de un color rojo brillante; y la endosporina incolora, situada inmediatamente por debajo de la ectosporina (fig. 5). Dyck (1970) adiciona los términos *sculptine* y *crystine* para describir dos capas derivadas de las células escuderas; *crystine* hace referencia a la capa de cristales y *sculptine* es señalada como una capa simple, pero en estudios posteriores se reconocen en ella dos capas, una corresponde a la capa de ornamentación; así que para evitar confusión este término fue rechazado.

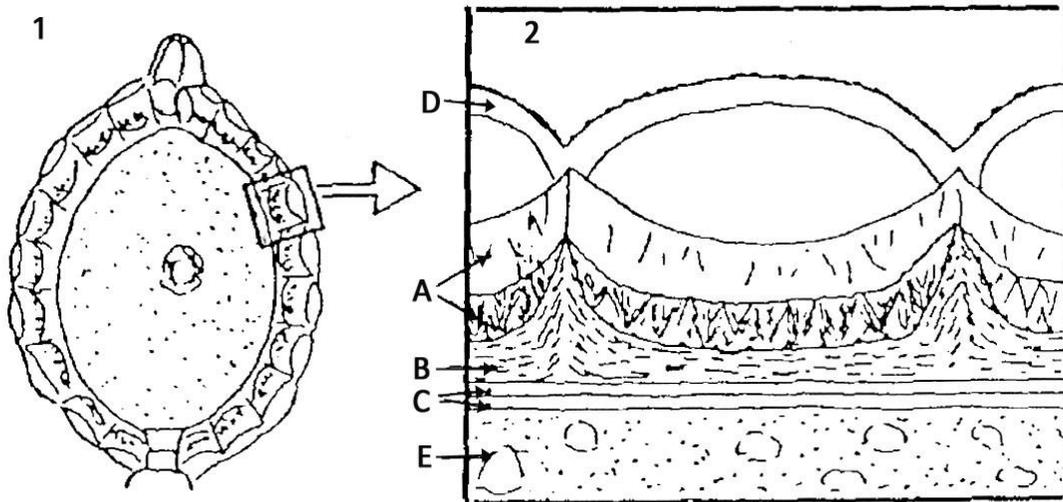


FIGURA 5. Oosporangio 1. Corte longitudinal de un oosporangio maduro. 2. Corte transversal de una célula espiral: **A.** Calcina; **B.** Esporostina; **C.** Esporina; **D.** Pared abaxial de las células espirales; **E.** Citoplasma de la oospora.

Tomado de Julia 1991.

Posteriormente, Leitch (1989) y Leitch *et al.* (1990) en sus investigaciones proponen nuevos términos para las capas de la pared oosporongial compuesta, y actualmente son los más empleados. Dichos autores reconocen que la pared oosporongial compuesta se encuentra constituida por ocho capas, dos de ellas son paredes primarias: una es la pared celular desarrollada por las células escuderas y la otra es la pared de la oosfera; las seis restantes son capas secundarias depositadas de manera secuencial, estas son: capa cristalina, capa helicoidal pigmentada, capa de ornamentación, capa amorfa, capa helicoidal de la oospora y capa microfibrilar. Las tres primeras formadas por las células escuderas y las últimas por la oospora.

En los estudios, utilizaron el término “capa de ornamentación” para la capa externa, debido a que su superficie es con frecuencia tallada o esculpida, por la deposición diferencial de una sustancia química similar a la esporopolenina, que se extiende hasta la pared lateral de las células escuderas. Esta pared lateral forma elevaciones conocidas como bordes espirales, característicos porque ascienden de derecha a izquierda en líneas helicoidales que parten de una base pentagonal del oosporangio y crean al unirse un centro excéntrico en la zona apical. A su vez los bordes espirales tienen un *ribbon*, término inglés que hace referencia a la extensión presente sobre el borde espiral, el cuál puede mostrar o no algún tipo de microornamentación (fig. 6) (John & Moore 1987, Leitch *et al.* 1990).

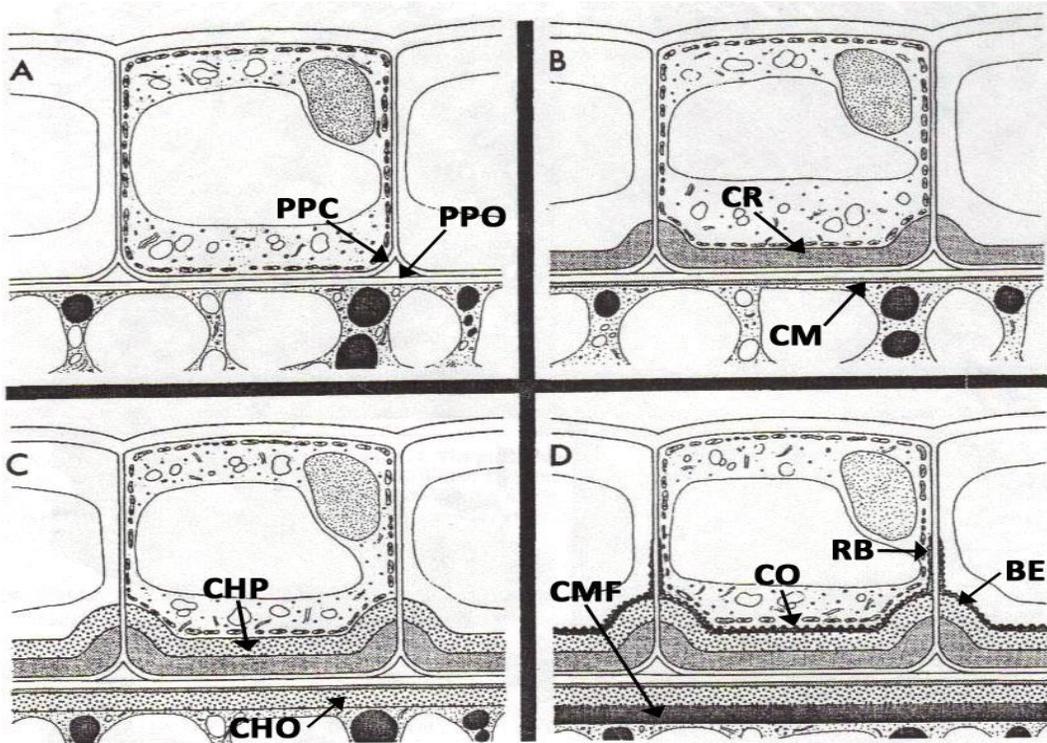


FIGURA 6. Desarrollo de la Pared Oosporongial Compuesta (POC). Las letras A – D describen la secuencia de la deposición en la POC. Las células espirales están en la parte superior y la oospora está en la parte inferior representada por reserva de almidón y lípidos. **A.** Paredes primarias (PPC) y (PPO); **B.** Deposición de la capa cristalina (CR) y amorfa (CM); **C.** Deposición de la capa helicoidal pigmentada (CHP) y capa helicoidal de la oospora (CHO); **D.** Deposición de la capa de ornamentación (CO), capa microfibrilar (CMF) y formación del borde espiral (BE) y *ribbon* (RB).

Tomado y modificado de Leitch 1989.

Después de la formación de la pared oosporongial compuesta, se deposita sobre ella la calcina, una capa gruesa de carbonato de calcio cuya parte más interna presenta a menudo una estructura formada por estrechas columnas que corren paralelas unas a otras (John & Moore 1987, Leitch *et al.* 1990, Mandal *et al.* 2002).

Horn af Rantzien (1956) denomina a esta zona acanalada como endocalcina y a su zona externa como ectocalcina, siendo esta última la más resistente y cuya superficie presenta generalmente algún tipo de microornamentación.

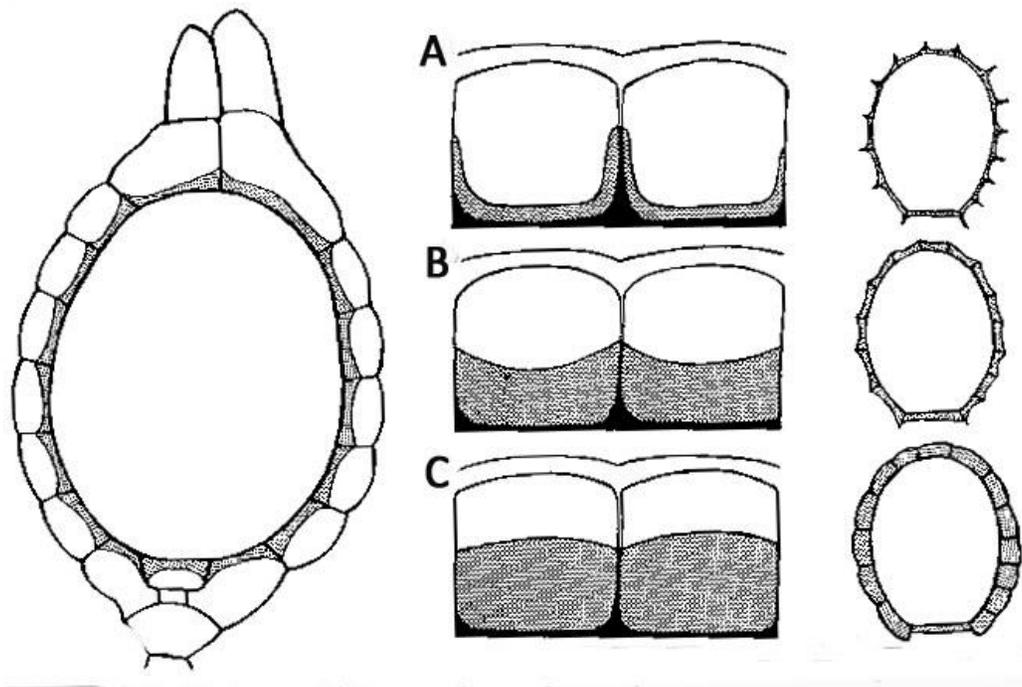


FIGURA 7. Etapas en la deposición de la capa de calcina. **Izquierda:** Sección longitudinal del oosporangio; **Centro:** A, B y C representan el grado progresivo de calcificación en las células escuderas; **Derecha:** termino de la calcificación en las tres etapas, cada una con diferente perfil.

Tomado y modificado de Leitch *et al.* 1990

Las Charophyceae son importantes tanto evolutiva como ecológicamente, ya que presentan una historia fósil basada primordialmente en los oosporangios calcificados, llamados girogonitos. La fijación de carbonato de calcio permite que los oosporangios una vez fecundados y desprendidos del talo se puedan fosilizar

con facilidad, preservándose en el registro geológico. En la dehiscencia las oosporas caen dormidas a los sedimentos, permaneciendo enterradas durante décadas hasta que las condiciones para la germinación sean favorables (Proctor 1967, Haas 1994, de Winton & Clayton 1996, 2000, Casanova 1997, Coops 2002, Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008, Rodrigo *et al.* 2009).

Debido a lo anterior existe un potencial para utilizarlos en reconstrucciones climáticas y ecológicas, ya que permiten extraer información bioquímica estableciendo una relación charophyceae - medio ambiente; además suministra datos sobre procesos evolutivos y modelos de extinción (Proctor 1975, Haas 1994, Jones *et al.* 1996, Martin-Closas 2003, Zaton *et al.* 2005, Graham *et al.* 2008, Rodrigo *et al.* 2009). Las Charophyceae fueron consideradas durante mucho tiempo como un grupo de algas ancestrales; fue Luis Grambast en el siglo XX quien reconoce la importancia de las Charophyceae como marcadores bioestratigráficos e inmejorable objeto de estudios filogenéticos (Julia 1991).

Los caracteres morfológicos usados para la delimitación de géneros y especies fueron precisándose cada vez más y las charophyceae pasan a considerarse un grupo de grandes cambios evolutivos (Soulié-Märsche 1989). Grambast (1974) y McCourt *et al.* (1996) mencionan que algunos estudios morfológicos de girogonitos han mostrado la tendencia a simplificar los órganos reproductivos, reduciendo el número de células espirales y modificando su orientación sobre la oosfera. Asimismo los análisis morfológicos, ultraestructurales y moleculares han considerado a las Charales como grupo hermano existente de las plantas terrestres, sin embargo esta relación no ha sido totalmente esclarecida (Grambast 1974, Mattox & Stewart 1984, Mishler & Churchill 1985, Surek *et al.* 1993, McCourt 1995, Melkonian & Surek 1995, McCourt *et al.* 1996, 2004, Martin-Clossas 2003, Karol *et al.* 2001, Graham *et al.* 2008).

De otro lado, las Charophyceae al formar parte de la vegetación sumergida en los cuerpos de agua, cumplen una función importante en los ecosistemas acuáticos porque juegan un papel significativo como productor primario y brindan refugio al zooplancton (Moss 1990, Blindow *et al.* 2002, Coops 2002, Kuster *et al.* 2005, Sosnovsky *et al.* 2005, Graham *et al.* 2008, Caisová & Gąbka 2009).

Adicionalmente, se reconoce la significancia ecológica de las Charophyceae en la conservación y restauración de cuerpos de agua, demostrado en lagos de Europa y Norte América, por lo cuál pasan a considerarse bioindicadores de aguas oligotróficas. El mecanismo para mantener el estado trófico del agua consiste en que la alta biomasa y la fijación de carbonato de calcio, permite en las Charophyceae que grandes cantidades de nutrientes sean absorbidas, restringiendo la disponibilidad de nutrientes para el fitoplancton (Krause 1981, Moss 1990, Blindow *et al.* 2002, Van den Berg *et al.* 1998, 1999, Coops 2002, Kufel & Kufel 2002).

En los últimos años las macrófitas de la familia Characeae han disminuido en los diferentes cuerpos de agua, en respuesta a los cambios de su hábitat; uno de los factores negativos es la reducción en la disponibilidad de luz ya que la poca presencia de macrófitas puede resultar en un incremento de fitoplancton, en responsabilidad al enriquecimiento de nutrientes o sólidos inorgánicos suspendidos (Johnstone & Robinson 1987, Vant 1987, Scheffer 1990, Chambers *et al.* 1993, Tanner *et al.* 1993, Haas 1994, Blindow & Langangen 1995).

En este sentido, aspectos importantes como la contaminación y eutrofización, limitan y reducen la abundancia de Charophyceae en los cuerpos de agua; en un inicio se produce un desplazamiento de las charophyceae por el desarrollo de las angiospermas, y por último desaparecen debido al efecto de sombreado que ocasiona tanto el fitoplancton como el perifiton; sin olvidar la contaminación

artificial de origen agrícola y urbano. Este problema podría prevenirse mediante la conservación de los cuerpos de agua naturales y las estrategias de conservación basadas en la protección de hábitats y ecosistemas en peligro (Phillips *et al.* 1978, Pieczynska *et al.* 1988, Van Dijk & Van Vierssen 1991, Blindow 1992, Scheffer *et al.* 1993, Hoek, van den *et al.* 1995, Bonis & Grillas 2002, Sosnovsky *et al.* 2005, Rodrigo *et al.* 2009).

## 5. ANTECEDENTES

Las investigaciones en los géneros *Chara* y *Nitella* se han enfocado en diferentes aspectos como: taxonomía, ecología, fisiología, morfología vegetativa, entre otros (Griffin 1963, Daily 1964, Blindow *et al.* 2002, Sakayama *et al.* 2002, 2005, 2006, Vieira & Necchi 2003, Boegle *et al.* 2007, Sederias & Colman 2007, Cirujano *et al.* 2007, Caisová & Gábka 2009). Sin embargo en los últimos años ha despertado interés la morfología reproductiva, especialmente el órgano reproductor femenino; estructura de gran importancia en la taxonomía del grupo de las Charales (John & Moore 1987, Leitch 1989, John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Mandal & Ray 2004, Sakayama *et al.* 2004, 2005, Sakayama 2008).

Estudios realizados en la oospora mencionan que los aspectos más importantes en la descripción morfológica e identificación taxonómica de las especies de *Chara*, son la microornamentación y morfometría que esta estructura presenta. El tipo de microornamentación en la pared de la oospora ha sido descrito mediante microscopía óptica y electrónica de barrido para un gran número de taxa pobremente definidos. Adicionalmente se han realizado claves y ensayos para identificar las especies de *Chara* y *Nitella* basadas únicamente sobre las características de la oospora (Groves & Bullock-Webster 1920, Wood 1965, John & Moore 1987, Leitch 1989, Casanova & Brock 1990, John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Casanova 1991, Haas 1994, Nozaki *et al.* 1998, Mandal *et al.* 2002, 2004, 2008, Sakayama *et al.* 2002, 2004, 2005, Krishnan 2006).

Los primeros estudios basados en el órgano reproductor femenino de las Charales fueron realizados por Griffin (1963) y Daily (1964) quienes evaluaron la variación de las oosporas en seis especies del género *Chara*, realizando cultivos en diferentes condiciones físico-químicas. El principal objetivo de estos estudios fue

determinar el valor taxonómico de las medidas en la oospora, y establecer la relación de esta estructura con los parámetros físico-químicos. Desde entonces los parámetros morfométricos de las oosporas han sido utilizados en la diferenciación parcial o completa de las variedades en algunas especies de *Chara*.

En otras investigaciones se comenzó a observar y analizar la microornamentación en la pared externa de la oospora de las Charales, presente en diferentes formas: granulada, tuberculada, papilada, lisa y reticulada; y se ha usado por diversos autores como criterio taxonómico para la identificación de especies y en el análisis entre taxas estrechamente relacionados (Griffin & Rhodes 1965, John & Moore 1987, John *et al.* 1990, Leitch *et al.* 1990, Casanova 1991, Mandal *et al.* 2002, Sakayama 2008, Sakayama *et al.* 2009).

Entre los estudios realizados se encuentra el de John *et al.* (1990) quienes realizan un estudio preliminar que buscaba catalogar diferentes tipos de microornamentación en la superficie y estructura externa de la pared de la oospora, para ello utilizaron especímenes pertenecientes a 28 especies del género *Chara*, a los cuales se les hizo una descripción minuciosa mediante MEB; para luego hacer un ensayo clasificando los taxa estudiados usando solo los caracteres oosporongiales.

Luego Casanova (1997) determina la variación existente entre las especies *Chara australis* R. Brown, *C. muelleri* A. Braun. y *C. fibrosa* C. A. Agardh. localizadas en diferentes hábitats; en las cuales realizó análisis morfométricos, genéticos y de microornamentación.

Posteriormente, los diferentes estudios realizados por Mandal *et al.* (2002, 2004, 2008) reportan los tipos de microornamentación presentes en la oospora de algunas especies pertenecientes a los géneros *Chara*, *Nitella*, *Lamprothamnium* y

*Lychnothamnus*; considerando de manera simultánea algunos parámetros morfométricos tales como: longitud y diámetro de la oospora, amplitud de la fosa y número de bordes espirales. Buscando establecer correlaciones entre los distintos parámetros morfométricos, así como también la especificidad de las dimensiones de la oospora en cada una de las especies estudiadas.

En otro estudio, Boszke & Bociąg (2008) revisan las características morfológicas de la oospora de *Chara braunii* C. Gmelin. Los análisis morfométricos aplicados a 90 muestras fueron sobre largo del eje polar, diámetro del eje ecuatorial, índice de isopolaridad (índice= largo eje polar / diámetro eje ecuatorial\*100), número de bordes espirales, amplitud de la fosa; además se examinó el tipo de microornamentación de la oospora mediante MEB. Los resultados sugieren que el diámetro de la oospora es la característica más variable, mientras el número de bordes es la más estable, razón por la cual se asume que este carácter puede ser usado de manera confiable para la identificación de especies.

Blume *et al.* (2009) examinan la variación morfométrica de las oosporas de *Chara báltica* Bruzelius. realizando una comparación, entre poblaciones, individuos y taxa estrechamente relacionados.

Subsecuentemente, Bueno *et al.* (2009) realizan un levantamiento florístico de la familia Characeae, los ejemplares se colectaron en varios municipios de los estados de Mato Grosso y Mato Grosso del Sur, Brasil. Este estudio del género *Chara* resultó en la identificación, descripción e ilustración tanto en su aspecto vegetativo como reproductivo de las especies *Chara kenoyeri* Howe., *C. guairensis* Bicudo., *C. martiana* Braun., *C. fibrosa* Agardh ex Bruzelius emend R. D. Wood *var. hydropitys* (Reich) R. D. Wood emend. R. D. Wood *f. hidropitys*, *C. rusbyana* Howe., *C. socotrens* Nordstedt.

En un estudio posterior Bueno *et al.* (2011) describe e ilustra aspectos vegetativos y reproductivos para doce taxa del género *Chara*, entre los cuales se encuentra *C. hydrophytes*. Además muestra la distribución geográfica para cada uno de los taxa registrados en los estados de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul localizados en el Sur del Brasil.

En cuanto a los estudios realizados sobre la ultraestructura del oosporangio, Dyck (1970) fue el primero en llevar a cabo una investigación ultraestructural sobre los eventos post-fertilización concernientes al desarrollo y morfología de la pared oosporangial.

Más tarde, Leitch en el trabajo de 1989 describe detalladamente la formación y ultraestructura de la pared múltiple que rodea la oospora de los géneros *Chara* y *Lamprothamnium*, revisando las especies *Chara hispida* Linnaeus., *C. delicatula* Agardh y *Lamprothamnium papulosum* (Wallr.) J. Groves mediante MET y MEB. A partir de las observaciones logro determinar que la pared oosporangial compuesta (POC) se encuentra constituida por ocho capas diferentes que se derivan de la oospora y de las células escuderas. Dos de ellas son las capas primarias; mientras el desarrollo post-fertilización da lugar a la deposición de seis capas secundarias, de las cuales las depositadas por la oospora en su orden son: primera la capa amorfa, segunda la capa helicoidal de la oospora, tercera la capa microfibrilar, y las capas secundarias de la pared depositadas por las células escuderas son: primera la capa cristalina, segunda la capa pigmentada y finalmente la capa de microornamentación. En algunas especies la capa de microornamentación varía en el grosor, debido a la formación de microornamentos en la superficie de la POC.

Posteriormente, Leitch *et al.* (1990) realizan un amplio estudio sobre la morfología del oosporangio de las Characeae, recopilando las observaciones hechas sobre

las diferentes especies, en su mayoría analizadas mediante MET y MEB. El trabajo expone el proceso de formación del oosporangio, su disposición en las ramificaciones y frente al anteridio. Describe la morfología de la oospora, los eventos post-fertilización dirigidos al desarrollo de la POC; así como la deposición de la capa calcificada. Finalmente presenta los caracteres morfológicos considerados de significancia taxonómica asociados con el oosporangio tales como: forma, bordes espirales, presencia de calcina, detalles de la POC, posición sobre el talo, número de células coronulares y células estériles; además menciona los tipos de microornamentación posibles en la pared externa de la oospora.

En los últimos años algunas investigaciones han combinado la descripción morfológica con diferentes análisis genéticos y moleculares. Krishnan (2006) realiza un estudio comparativo entre las especies *Chara gymnopitys* A. Braun. y *Chara hydropitys* utilizando análisis de isozimas, caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos. Los análisis de isozimas revelan diferencias entre *C. gymnopitys* y *C. hydropitys*, brindando soporte a los estudios morfológicos. De igual manera las características morfométricas y la ultraestructura de la microornamentación en la pared de la oospora muestran diferencias que justifican su separación como especies diferentes. El estudio reporta que *C. hydropitys* tiene microornamentación verrucada, la mayoría de elevaciones tienen un poro central, la amplitud de la fosa mide 28  $\mu\text{m}$  y presentan entre 8-14 bordes espirales.

Finalmente, Sakayama *et al.* (2009) reexaminan el estado taxonómico de *Chara vulgaris* Linnaeus. mediante el análisis filogenético molecular y las observaciones realizadas en la morfología vegetativa y oospora. Los autores demuestran mediante este estudio y otros realizados en especies del género *Nitella*, que los análisis combinados entre la morfología de la oospora y la filogenia molecular basada en la secuenciación de genes, es una herramienta eficaz para la identificación de especies.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 AREA DE ESTUDIO

Las muestras de *C. hydropitys* se recolectaron en una quebrada tributaria al Río Meléndez, localizada a N 3°21'23'' y W 76°32'5.2'' en el área metropolitana del barrio Ciudad Jardín parte alta en la zona sur de la ciudad de Cali, departamento del Valle del Cauca (Fig. 8-9). Las características climáticas que presenta esta zona de vida cálida son: temperatura promedio 23.8°C, precipitación 1000 mm y altitud 995 m.s.n.m.



FIGURA 8. Departamento del Valle del Cauca



FIGURA 9. Área de recolecta de *Chara hydrophytes*, tomada de Google Earth.

La quebrada se encuentra en estado oligotrófico; cuenta con una profundidad cercana a los 30 cm y presenta algunas áreas donde sus aguas se hallan sombreadas de manera predominante por pastos, por lo cual la presencia de *C. hydrophytes* es escasa (Fig. 10); en contraste las aguas con mayor exposición al sol albergan una mayor proporción de la especie (Fig. 10-12).



FIGURA 10. Área donde las aguas de la quebrada son altamente sombreadas en su mayoría por pastos.



FIGURA 11. Área donde las aguas de la quebrada presentan una alta exposición solar.



FIGURA 12. Presencia de *Chara hydrophytes* en el borde de la quebrada.

## 6.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La especie *C. hydrophytes* se identificó con la ayuda de claves (Wood 1964, Haas 1994, de Winton *et al.* 2007) y asesorías de la doctora Norma Catarina Bueno especialista en el grupo, perteneciente a la Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil.

Para su identificación se tuvieron en cuenta características vegetativas y reproductivas, tales como: si es un alga dioica o monoica, altura del alga, apariencia general del talo, bifurcación en las ramificaciones, presencia de brácteas y tipo de ápice, forma y número de células que conforman el dátil, número de filas de estipuloides, presencia o ausencia de células corticales en el talo y ramificaciones, agrupación de las células espiniformes, número, posición, forma y tamaño del oosporangio, número y arreglo de las células coronulares en el ápice del oosporangio, número de bordes espirales y microornamentación de la oospora. El ejemplar de la especie *C. hydrophytes* queda depositado en el herbario CAUP de la Universidad del Cauca.

### 6.2.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (M. O. A. R.)

Los oosporangios de *Chara hydrophytes* se procesaron de acuerdo al protocolo manejado para el tratamiento de material vegetal propuesto por Bozzola & Russell (1998); iniciando con la fijación de muestras en Glutaraldehído al 2.5% por 12 horas. Una vez fijado el material se lavó tres veces con buffer fosfato al 0.2 M (pH 7.2) por un periodo de 30 min. Posteriormente se postfijo en Tetróxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2% en Ferrocianuro de Potasio al 1.5% durante 4 h en la oscuridad con agitación constante y a 4°C. Posteriormente, el material posfijado se lavo en el mismo buffer por 40 min. Luego se procedió a la deshidratación del material por inmersión en series crecientes de Acetona (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95% y 100%) para continuar con la imbibición de las muestras en mezclas de Resina Spurr® (Spurr, 1969) - Acetona mediante goteo (1 gota de resina cada 10 min.) alcanzando una proporción de 3 : 1 en un tiempo de 12 h, finalmente se realizaron 3 cambios en resina pura por 48 h a temperatura ambiente y con agitación constante. La polimerización de la resina se realizo en horno a 60°C - 70°C por 48 horas.

Los cortes semifinos 100-500 nm se obtuvieron en Ultramicrotomo (Ultracut UCT-Leica); luego fueron coloreados con azul de toluidina por 30-40s. Las observaciones se realizaron con un microscopio óptico de alta resolución (Nikon 80i Eclipse), equipado con contraste diferencial de interferencia (DIC). La fotodocumentación se obtuvo con cámara digital (Nikon DIGITAL SIGHT DS-2MV); la edición fotográfica se realizó con el programa NIS Elements versión 3.07 de Nikon<sup>1</sup> y las medidas se tomaron por medio del software Imagen-Pro Analyzer 6.3 de Media Cybernetics<sup>2</sup>.

---

<sup>1,2</sup> Las licencias de los respectivos software fueron obtenidas por la Unidad de Microscopia Electrónica de la Universidad del Cauca.

### **6.2.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (M. E. T.)**

Los oosporangios de *Chara hydrophytes* se procesaron de acuerdo al protocolo propuesto por Bozzola & Russell (1998) anteriormente descrito. Se realizaron cortes ultrafinos a un espesor de 70-100 nm con cuchillas de vidrio en el Ultramicrotomo (Ultracut UCT - Leica). Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de cobre con membrana Formvar y luego fueron contrastadas con Acetato de Uranilo por 40 min. y Citrato de Plomo por 15 min. La observación se realizó en microscopio electrónico de transmisión (JEOL, JEM-1200EX). Los negativos obtenidos se digitalizaron en un escáner (EPSON PERFECTION 4490 PHOTO).

### **6.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (M. E. B.)**

Para la observación del material en MEB, las muestras se fijaron en Glutaraldehído al 2.5% y buffer fosfato 0.2 M (pH 7.2); luego se deshidrataron en una serie creciente de etanol como se describió anteriormente. Se desecaron a punto crítico en desecadora (CPD 030 Bal-Tec, Cheshire SK23 7RE UK) y se cubrieron con oro en un ionizador (Denton Vacuum Desk II, Moorestown, NJ USA). Las observaciones y registro fotográfico se hicieron mediante microscopio electrónico de barrido (JSM-5310 LV, JEOL, Inc. Peabody, MA, USA).

### **6.2.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (M. F.)**

Los oosporangios se colocaron directamente sobre un portaobjetos y se llevaron al microscopio de fluorescencia (Nikon MICROPHOT EPI – FL, JAPAN), utilizando el filtro B-2 (filtro de excitación 450-490nm y filtro barrera 515nm) provocando autofluorescencia en la estructura. Las fotomicrografías se obtuvieron con cámara digital (Nikon DIGITAL SIGHT DS-2MV).

## 7. RESULTADOS

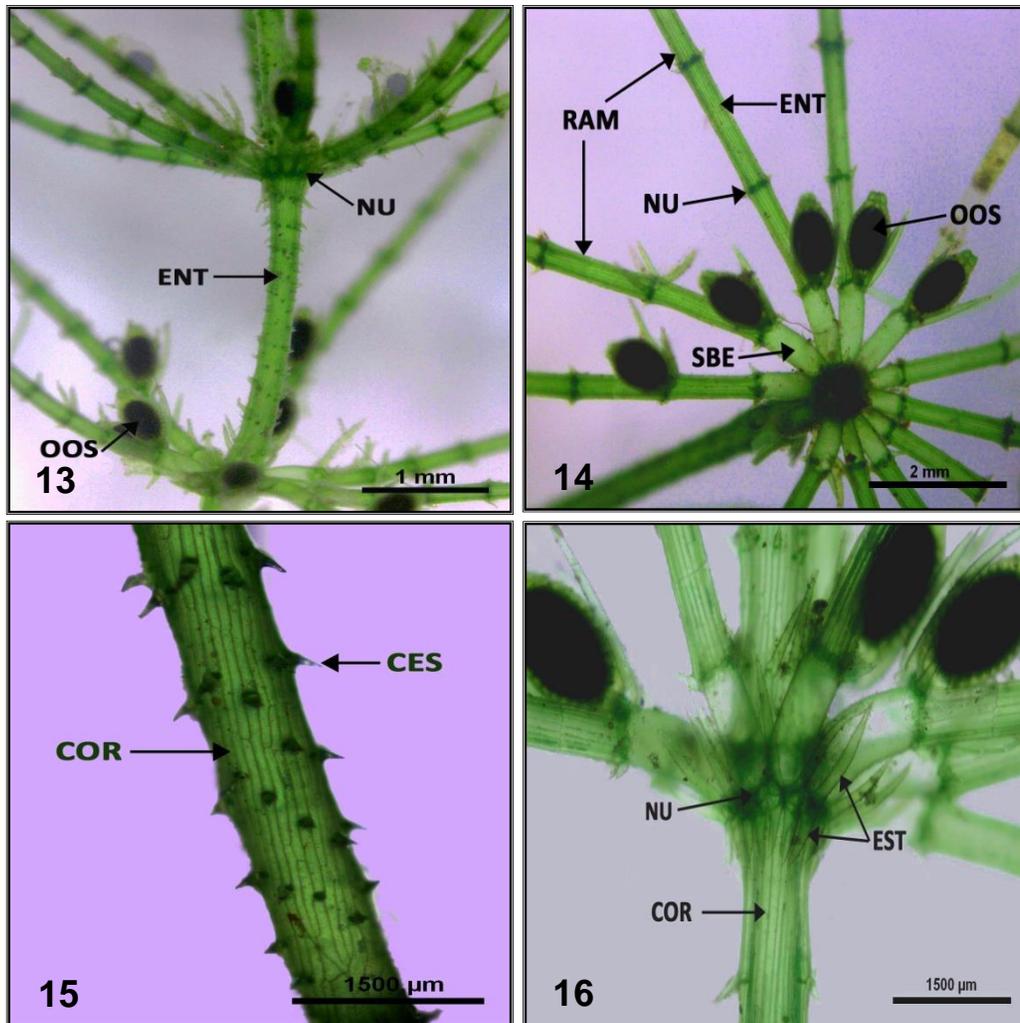
### 7.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA VEGETATIVA DE *Chara hydrophytes*

La especie *Chara hydrophytes* es un alga verde que habita en aguas oligotróficas, mide entre 10–15 cm, presenta un fuerte olor característico similar a cebolla el cual puede atribuirse como mecanismo de defensa contra los ataques de herbívoros, de microorganismos o de zooplancton, que al final podrían afectar su existencia en el agua.

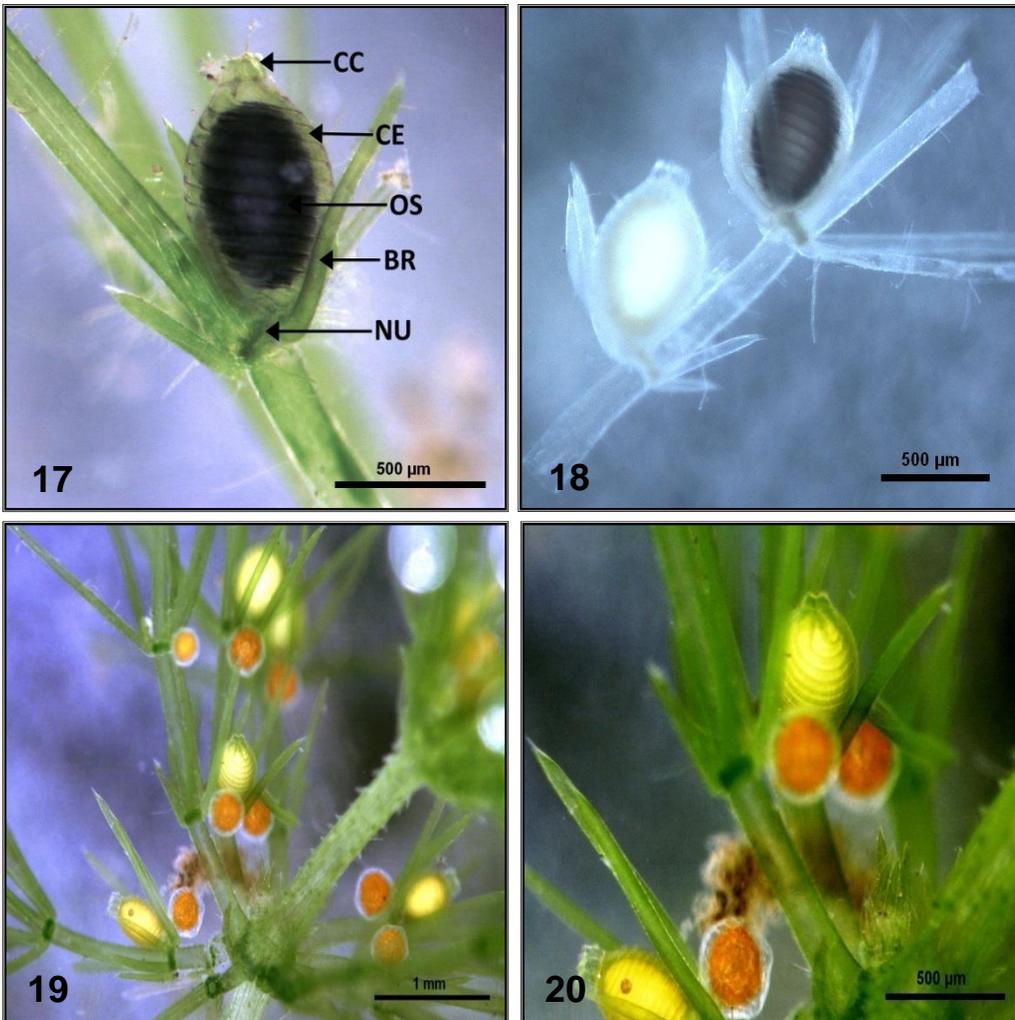
Su morfología vegetativa se caracteriza por tener un talo constituido de nudos (complejo celular), entrenudos (células largas), ramas de crecimiento ilimitado que a su vez contienen entre 9-12 ramas de crecimiento limitado dispuestas en forma de verticilio sobre el nudo; el talo tiene cortex triplástico, las ramificaciones son corticadas exceptuando el segmento basal y apical que es ecorticado. Las células espiniformes se encuentran solitarias sobre el talo; presenta cuatro brácteas que se disponen sobre los nudos, los estipuloides son displotefanos dispuestos en el nudo hacia la parte superior e inferior y finalmente los rizoides (figs.14-17).

*C. hydrophytes* es un alga monoica, que presenta en los nudos de las ramas apicales gran número de gametangios masculinos y femeninos, mientras que se encuentran en menor proporción en los nudos de las ramas de crecimiento limitado e ilimitado. El oosporangio es una estructura de tamaño pequeño (Longitud: 575.164  $\mu\text{m}$  - 776.015  $\mu\text{m}$   $\pm$  56,451  $\mu\text{m}$ ; Diámetro: 404.461  $\mu\text{m}$  - 543.833  $\mu\text{m}$   $\pm$  37,851  $\mu\text{m}$ ); con forma ovalada, esta conformado por las células espirales que se disponen de forma helicoidal alrededor de la oosfera hasta la zona apical donde se encuentran con las células coronulares.

Tanto las células espirales como las células coronulares son translúcidas, con pocos cloroplastos si se comparan con el resto de las células del talo. Por el contrario la oosfera es de color amarillo-naranja en estado inmaduro, volviéndose negra cuando la alcanza la madurez y es fecundada. Los oosporangios se ubican en la parte superior del nudo y son protegidos por 4 brácteas (figs. 18-19). Generalmente cada oosporangio se encuentra acompañado por uno o dos anteridios que se reconocen por su color naranja, y se sitúan inmediatamente bajo el oosporangio (fig. 20).



FIGURAS 13 – 16. Características vegetativas de *C. hypopitys* observadas *in vivo* bajo estereoscopio y microscopio óptico. Fig. 13. Tallo diferenciado en nudos (NU) y entrenudos (ENT), nudos con oosporangios (OOS). Fig. 14. Nudo con ramificaciones (RAM), cuyo segmento basal es ecorticado (SBE). Fig. 15. Sección del talo que permite reconocer el cortex (COR) y las células espiniformes (CES). Fig. 16. Estipuloides diplostefanos (EST).



FIGURAS 17 – 20. Gametangios femeninos y masculinos de *C. hydropitys* observados *in vivo* al estereoscopio y microscopio óptico. Fig. 17. Oosporangio en el cual se diferencian las células coronulares (CC), células espirales (CE) y oospora (OS); se distinguen también las brácteas (BR) y el nudo (NU). Fig. 18. Oosporangio inmaduro (amarillo pálido) y maduro (café oscuro - negro) dispuestos sobre los nudos de una rama. Fig. 19-20. Ramificaciones con oosporangios inmaduros acompañados de anteridios.

## 7.2 DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL DEL OOSPORANGIO DE *Chara hydropitys*

El oosporangio de *C. hydropitys* es una estructura pequeña con forma ovalada, cuya longitud y diámetro promedio son  $681.742 \mu\text{m} \pm 56.451 \mu\text{m}$  y  $470.301 \mu\text{m} \pm 37.851 \mu\text{m}$  respectivamente. Se encuentra constituido por cinco células espirales que miden en diámetro promedio  $62.195 \mu\text{m} \pm 5.81 \mu\text{m}$ , y en fracción de longitud promedio  $59.418 \mu\text{m} \pm 5.22 \mu\text{m}$ ; las células espirales se originan de un complejo nodal formado por una célula central y cinco células periféricas. Las células espirales se elongan y ascienden dextrógicamente desde la zona basal hasta la zona apical de la oosfera, y se disponen de esta manera para brindar protección a la oosfera, célula que garantiza la reproducción sexual y conservación de la especie (figs. 21-22).

En la zona apical las células espirales se dividen para formar cinco células coronulares cuyo valor en longitud y diámetro promedio es de  $89.652 \pm 13.694$   $80.125 \pm 6.25 \mu\text{m}$  respectivamente. Las células coronulares tienen ápices divergentes. Las células espirales y coronulares presentan una enorme vacuola central rodeada por citoplasma granular, este se caracteriza por tener varios cloroplastos discoidales en cuyo interior se encuentra un gránulo de almidón (fig. 23). Cuando el oosporangio alcanza la madurez las células espirales y las células coronulares comienzan a separarse levemente, produciendo aberturas por las cuáles los anterozoides entran a la oosfera para fecundarla.

La oosfera es una célula con forma ovada que se ubica en la zona central del oosporangio; mide en longitud y diámetro promedio  $484.199 \pm 40.702 \mu\text{m}$ ;  $347.759 \pm 27,215 \mu\text{m}$ , ocupa un gran espacio con respecto a las demás células que conforman el oosporangio, su núcleo se localiza en la parte inferior rodeado por un gran cantidad de gránulos de almidón que la oosfera acumula (fig. 24).

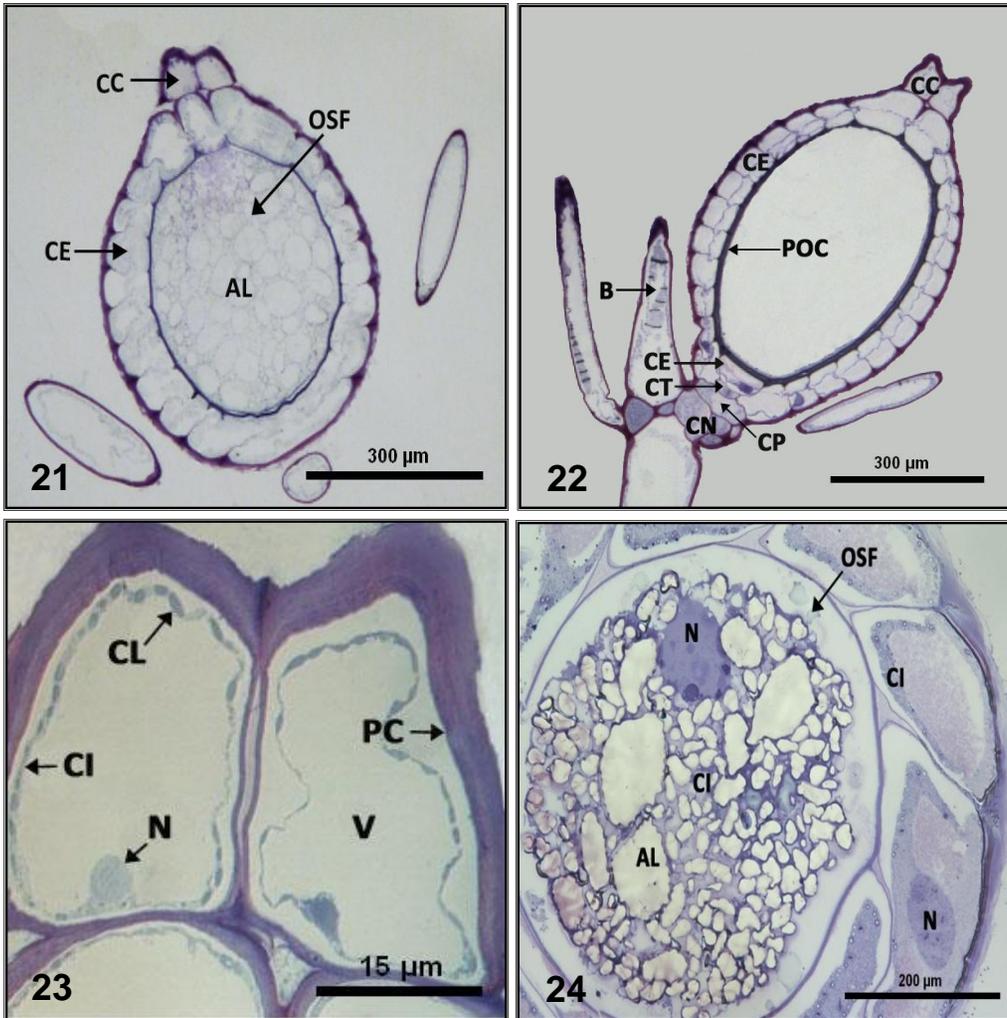
El oosporangio cuenta además con tres células dispuestas en la parte inferior; la primera situada inmediatamente debajo de la oosfera es la célula estéril, que junto con las células espirales se conocen como células escuderas. Seguida a ella se tiene la célula central, y por último la célula pedicelar encargada de formar el pedicelo para que el oosporangio pueda permanecer firme sobre la parte adaxial del nudo, en esta última célula se observa su núcleo con varios nucléolos (fig. 25). Los valores de longitud y diámetro correspondientes a cada una de las células que constituyen el oosporangio, se encuentran relacionados en la Tabla 1.

Antes de la fertilización la oosfera solo se encuentra recubierta por dos paredes primarias, una derivada de la misma oosfera y la otra proveniente de las células escuderas (fig. 26). Posteriormente con la fecundación de la oosfera ahora llamada oospora, se genera una pared oosporongial compuesta (POC) constituida por ocho capas, cuatro de ellas se originan por las células escuderas y las otras cuatro se forman por la oospora (figs. 27-28).

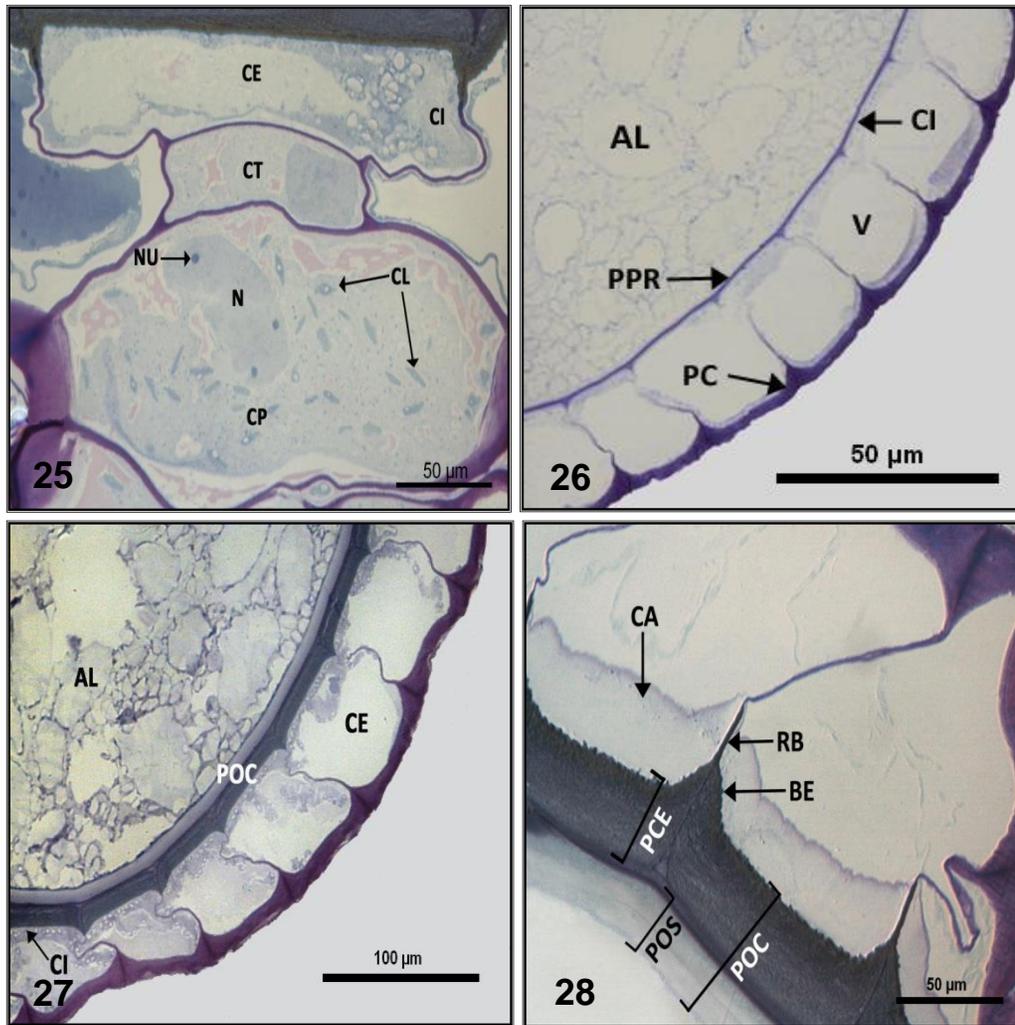
Posterior a la formación de la POC, las células escuderas comienzan a formar una capa calcificada, mediante la fijación progresiva de carbonato de calcio que se deposita en la POC, particularmente sobre la capa de microornamentación. La capa calcificada inicialmente adopta una forma cóncava hasta que finalmente se vuelve convexa; en la formación de esta capa se produce un desplazamiento del citoplasma de las células escuderas, por consiguiente reduce su volumen celular (figs. 29-31).

Tabla 1. Características morfométricas del oosporangio de *Chara hydrophytis*.

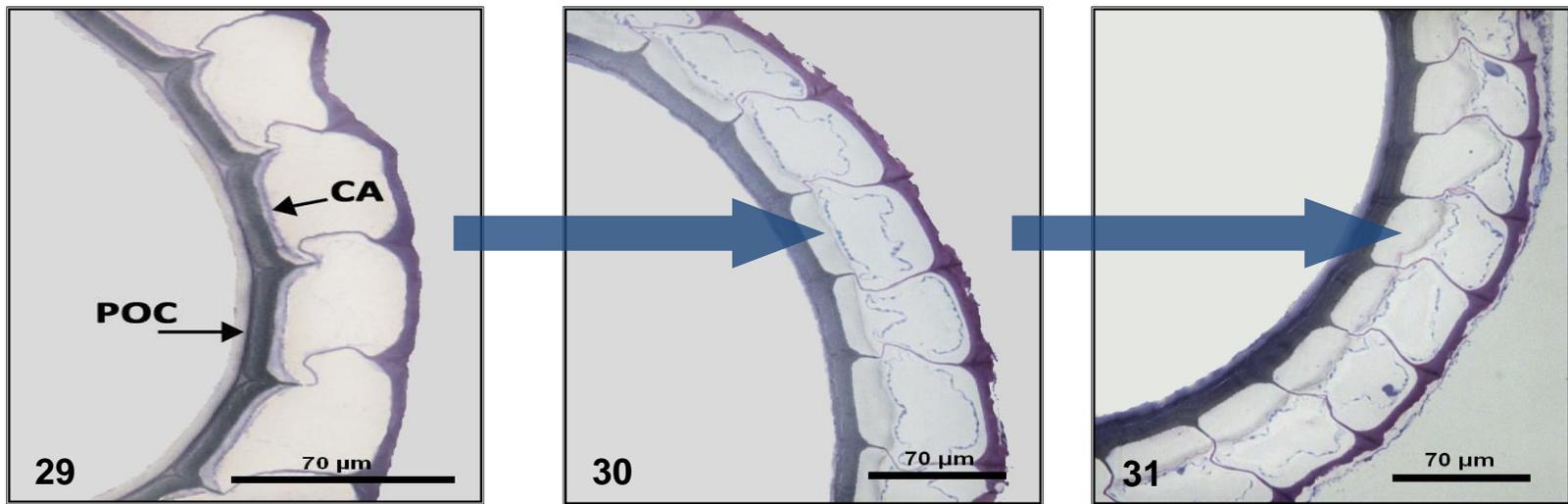
Medidas Morfométricas	Longitud ( $\mu\text{m}$ )				Diámetro ( $\mu\text{m}$ )			
	Valor mínimo	Valor máximo	Promedio	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo	Promedio	Desviación estándar
<b>Oosporangio</b>	575.164	776.015	681,142	$\pm 56,451$	404.461	543.833	470,301	$\pm 37,851$
<b>Oosfera</b>	402.226	558.921	484,199	$\pm 40,702$	300.247	410.743	347,759	$\pm 27,215$
<b>Célula coronular</b>	67.010	89.451	80,125	$\pm 6,25$	16.274	39.949	27,244	$\pm 8,33$
<b>Célula Pedicelar</b>	113.123	139.928	129,741	$\pm 7,48$	50.792	71.833	62,195	$\pm 5,81$
<b>Célula Estéril</b>	42.593	64.751	52,641	$\pm 6,20$	34.603	58.464	44,758	$\pm 6,25$
<b>Célula Central</b>	90.030	118.094	105,364	$\pm 7,96$	10.294	22.622	15,54	$\pm 3,12$
<b>Fracción longitudinal de la célula espiral</b>	50.792	71.833	62,195	$\pm 5,81$	50.639	70.479	59,418	$\pm 5,22$



FIGURAS 21 – 24 Oosporangios maduros y fecundados, coloreados con Azul de Toluidina. Figs. 21-22. Secciones longitudinales del oosporangio, se distinguen las células coronulares (CC); células espirales (CE); oosfera (OSF); célula estéril (CE); célula central (CT); célula pedicelar (CP); se resalta la pared oosporangial compuesta (POC); células nodales (CN) y brácteas (B). Fig. 23. Células coronulares con vacuola central (V) rodeada por citoplasma (CI) que contiene cloroplastos (CL); pared celular (PC) y núcleo (N). Fig. 24. Sección transversal del oosporangio, se reconoce el núcleo (N), gránulos de almidón (AL) y citoplasma (CI) en la oosfera; así como el (N) y (CI) de las células espirales.



FIGURAS 25 – 28. Secciones longitudinales de oosporangio maduro y fecundado. Fig. 25. Célula estéril (CE); célula central (CT); y célula pedicelar (CP), en esta última se observa citoplasma granular con varios cloroplastos (CL) y núcleo (N) con nucléolos (NU). Fig. 26. Pared primaria de la oosfera (PPO) y células espirales (PPC). Figs. 27-28. Oosporangio fecundado, se observan las diferentes capas de la pared oosporongial compuesta (POC) depositadas por la oospora (PO) y por las células escuderas (PCE); bordes espirales (BE), ribbon (RB) y capa calcificada (CA).



FIGURAS 29 – 31. Depósito progresivo del carbonato de calcio (CA) sobre la Pared Oosporongial compuesta (POC). Fig. 29. Etapa inicial de la fijación. Fig. 30. Etapa intermedia. Fig. 31. Etapa avanzada en la fijación de la capa calcificada.

## 7.2 DESCRIPCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL OOSPORANGIO DE *Chara hydropitys* MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Después de la fecundación de la oosfera ahora conocida como oospora, inicia la formación de una pared oosporangial múltiple que se origina por la deposición simultánea de capas, realizada por las células escuderas (células espirales y célula estéril) y por la oospora, sobre las paredes primarias de cada una de ellas; estas paredes se encuentran en contacto antes y después de la fertilización.

La pared oosporangial compuesta (POC) se encuentra constituida por ocho capas, cuatro de ellas se forman a partir de las células escuderas y las otras cuatro se forman a partir de la oospora. Las capas formadas a partir de las células escuderas en orden de deposición son: pared primaria de las células espirales, capa cristalina, capa helicoidal pigmentada y capa de microornamentación; las capas formadas a partir de la oospora son: pared primaria de la oospora, capa amorfa, capa helicoidal de la oospora y capa microfibrilar (figs. 32-33).

La capa de microornamentación mide en promedio 0.23  $\mu\text{m}$ , es una capa electrodensa que se caracteriza por tener ornamentos en diferente etapa, los más desarrollados se reconocen por ser papilas pustuliformes con forma cónica que miden cerca de 0.5  $\mu\text{m}$  de longitud y tienen un poro apical central que se extiende hasta la base de la papila; los menos desarrollados son papilas de distinta altura que no tienen poro y algunas se encuentran fusionadas.

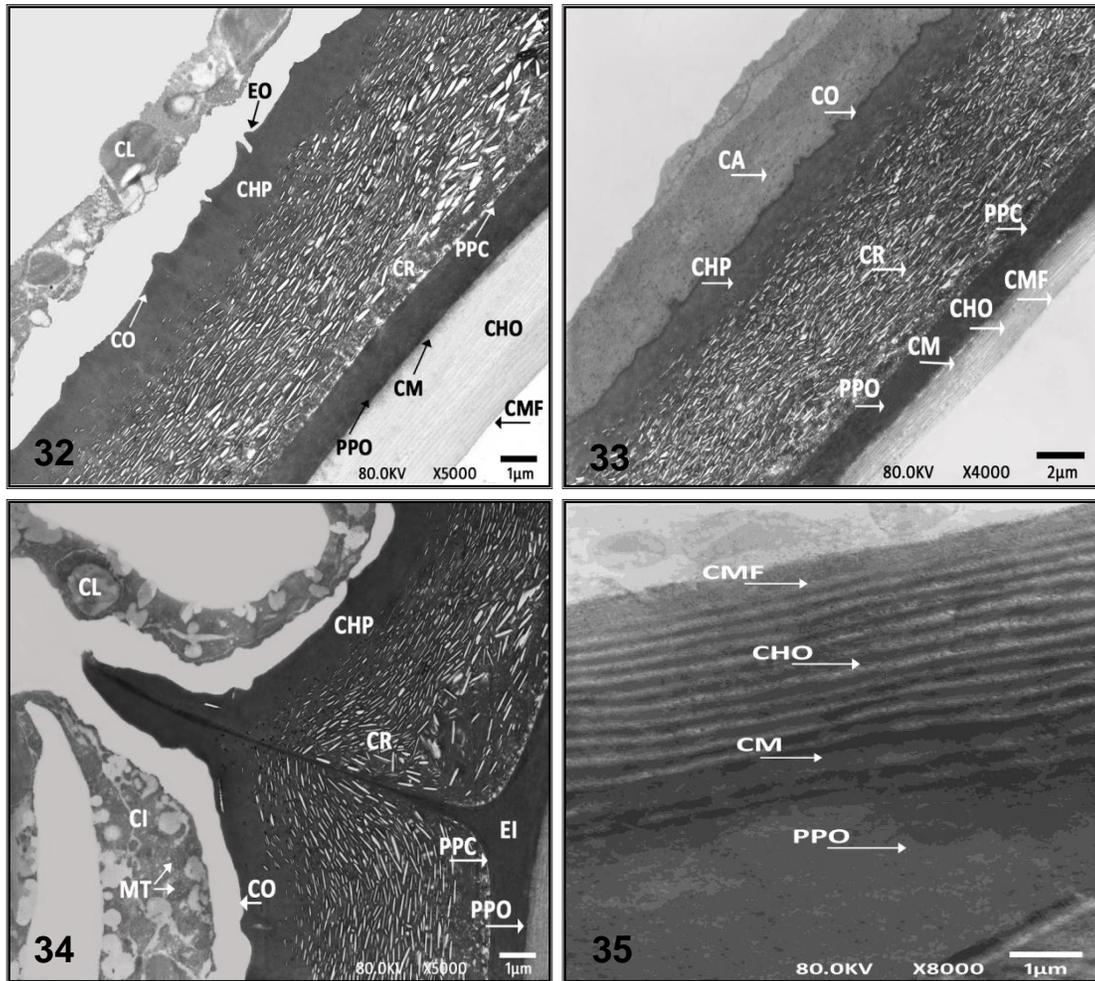
La capa helicoidal pigmentada tiene en promedio 1.23  $\mu\text{m}$ , es una capa electrodensa de mayor grosor que la capa de microornamentación; de acuerdo a Leitch (1989) esta capa presenta microfibrillas orientadas en forma helicoidal pero en las fotomicrografías obtenidas en este estudio no se alcanzan a reconocer.

La capa cristalina mide en promedio 4.9  $\mu\text{m}$ , igual que las mencionadas anteriormente es una capa electrodensa que contiene cristales de forma aplanada, alargada y de diferente tamaño que se orientan en forma paralela unas con otras; en su parte inferior se observa una matriz donde se encuentran cristales de forma más irregular, de menor tamaño y en disposición menos organizada.

La pared primaria de las células espirales esta inmediatamente bajo la capa cristalina mide en promedio 0.38  $\mu\text{m}$ , presenta limites bien definidos y es más electrodensa que la anterior, homogénea y de menor grosor; se encuentra formada antes de la fertilización. Entre la pared primaria de las células escuderas, y la pared primaria de la oospora se forman espacios intercelulares que se llenan de material electrodensos durante el desarrollo de la pared oosporangial compuesta, se caracterizan por ser de forma triangular; estos espacios son más visibles en etapas tempranas de la maduración del oosporangio (Fig. 34).

La pared primaria de la oospora mide en promedio 0.73  $\mu\text{m}$ ; es una capa homogénea y electrodensa de mayor grosor que la pared primaria de las células escuderas. Seguida a la pared primaria de la oospora se encuentra la capa amorfa que mide en promedio 0.39  $\mu\text{m}$ , es de menor grosor que la pared primaria de la oospora, es menos electrodensa que las mencionadas anteriormente y de apariencia poco homogénea, debido a que muestra un aspecto granulado.

Yuxtapuesta a la capa amorfa se observa la capa helicoidal de la oospora, la cual mide en promedio 1.35  $\mu\text{m}$ , se diferencia porque presenta microfibrillas que corren de manera ondulada y son paralelas a las capas. Finalmente la última capa derivada de la oospora es la capa microfibrilar que mide en promedio 0.33  $\mu\text{m}$ , es la de menor grosor; de acuerdo a Leitch (1989) tiene microfibrillas que corren paralelamente, aunque en las fotomicrografías no se evidencian muy bien. Esta última capa se encuentra en contacto con el citoplasma de la oosfera (fig. 35).

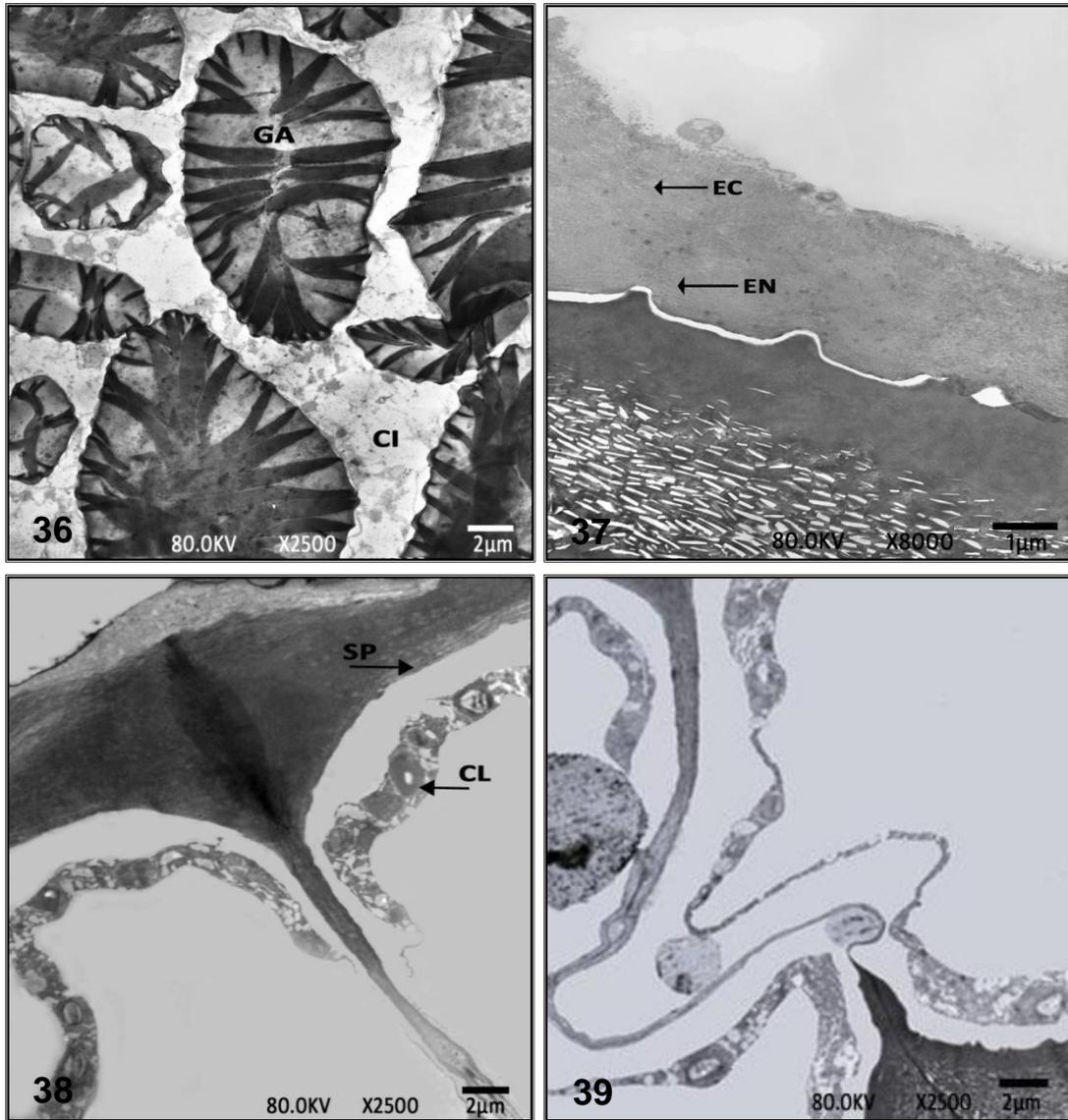


FIGURAS 32 – 35. Fotomicrográficas electrónicas de la pared oosporongial compuesta (POC). Fig. 32-33. Capa de ornamentación (CO), capa helicoidal pigmentada (CHP), capa cristalina (CR), pared primaria de las células espirales (PPC), pared primaria de la oospora (PPO), capa amorfa (CM), capa helicoidal de la oospora (CHO) y capa microfibrilar (CMF). Se aprecian las papilas pustuliformes con poro (EO). Se observa la deposición de carbonato de calcio (CA) sobre la CO. Fig. 34. Capas de la POC derivadas de las células espirales. Se observa el espacio intercelular (EI) entre las células espirales y la oospora, así como la presencia de cloroplastos (CL) y mitocondrias (MIT) en el citoplasma de las células espirales. Fig. 35. Capas de la POC derivadas de la oospora.

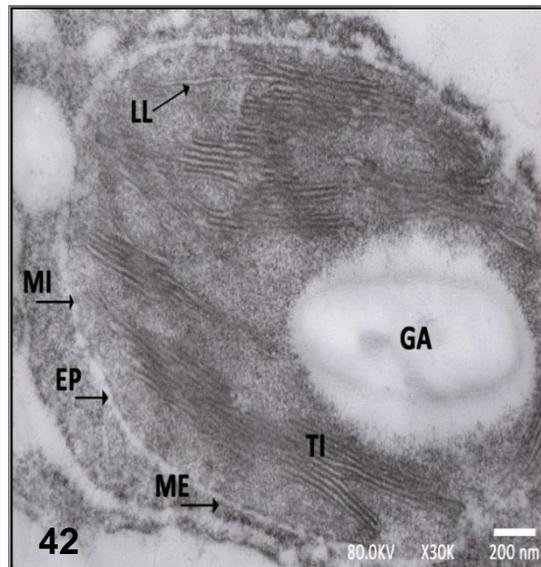
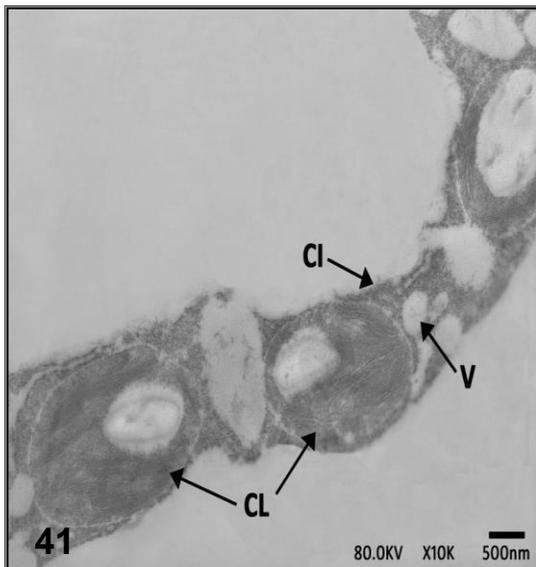
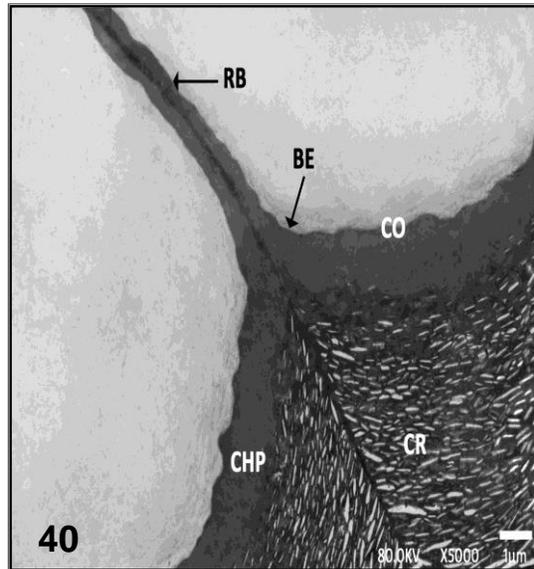
La oosfera es una enorme célula que contiene un citoplasma con gran cantidad de gránulos de almidón de diferente tamaño, se reconocen por los múltiples pliegues que se forman a lo largo de cada uno de ellos (fig. 36). Después de que la oosfera es fecundada y desarrolla la pared oosporongial compuesta, las células escuderas comienzan la formación de la capa calcificada, la cuál se deposita por la fijación gradual de carbonato de calcio en esta pared oosporongial compuesta; especialmente sobre la capa de microornamentación, desplazando el citoplasma y reduciendo el volumen celular de las células escuderas. La capa calcificada se distingue en endocalcina y ectocalcina, la primera por presentar microfibrillas de forma paralela y ser más electrodensa que la segunda (fig. 37).

Por otro lado la pared abaxial de las células espirales y coronulares presenta un sistema con cinco pliegues, seguido por una pared homogénea de aspecto liso. Esta pared se extiende hacia el interior celular mediante una prolongación que se vuelve cada vez más delgada y termina por unirse con el borde espiral o *ribbon*; además esta prolongación puede presentar espacios durante su recorrido (figs. 38-40).

Las células espirales y coronulares que conforman el oosporangio presentan un citoplasma granular periférico que contiene varias vacuolas, además rodea la gran vacuola que se encuentra en el centro de la célula; el citoplasma de estas células contiene entre 20 – 23 cloroplastos de forma ovoide que miden cerca de 2.3  $\mu\text{m}$ . Los cloroplastos presentan la constitución típica, tienen doble membrana (interna y externa) entre las cuales se observa el espacio periplástico y contienen un gránulo de almidón que puede variar de tamaño, los tilacoides están formados por más de 5 laminillas apiladas y laminillas libres (figs. 41-42).



FIGURAS 36 – 39. Fotomicrografías electrónicas del oosporangio y oospora. Fig. 36. Sección longitudinal de la oosfera, se aprecian los gránulos de almidón (GA) en el citoplasma de la oosfera (CI). Fig. 37. Capa calcificada sobre la POC generada por la fijación de carbonato de calcio. Se diferencia en endocalcina (EN) y ectocalcina (EC). Figs. 41 – 42. Pared abaxial de las células espirales, se distingue el sistema de pliegues (SP) y cloroplastos (CL) en el citoplasma de las células espirales.

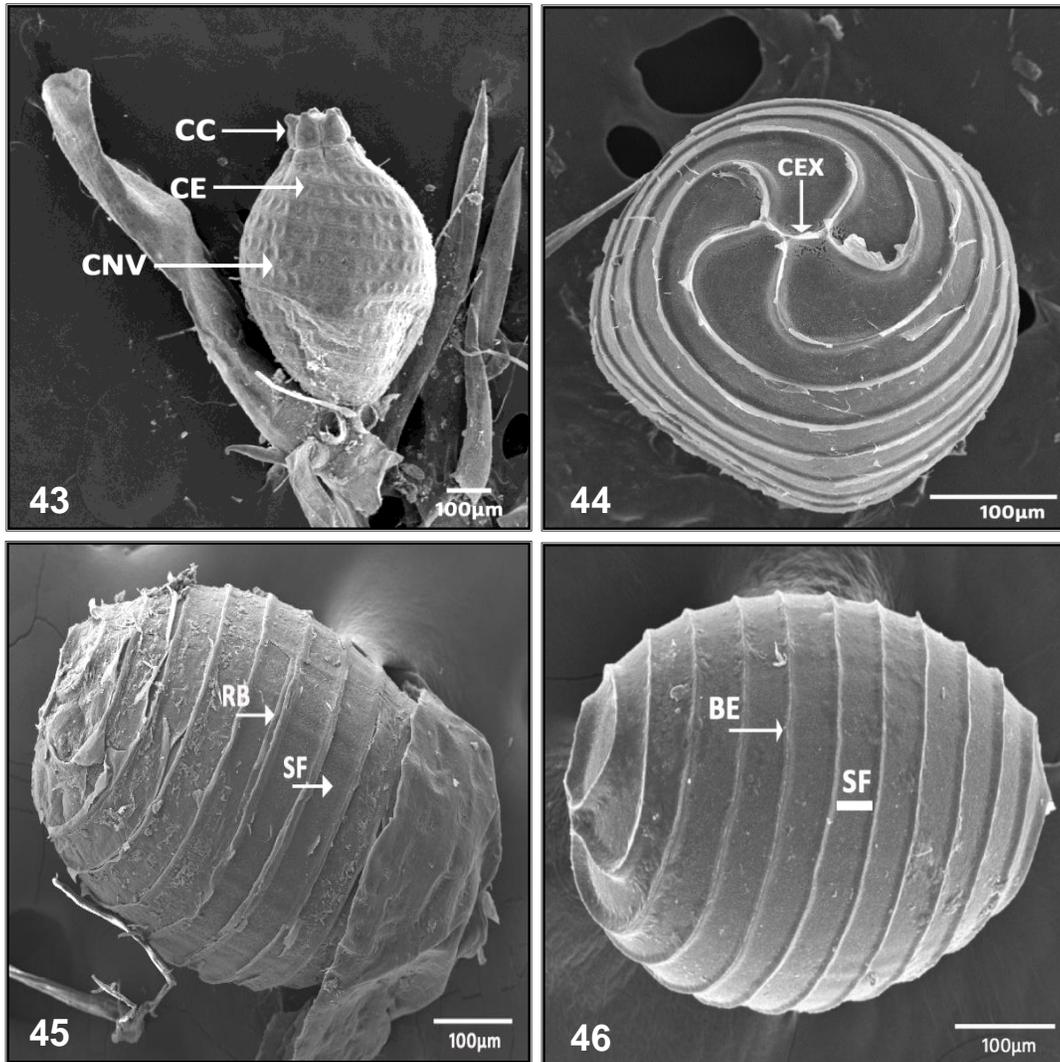


FIGURAS 39 – 42. Fotomicrografías electrónicas mostrando detalles del borde espiral, *ribbon* y cloroplastos. Fig. 40. Se aprecia el borde espiral (BE) y *ribbon* (RB). Fig. 41. Citoplasma de la célula espiral (CI) donde se aprecian vacuolas (V) y cloroplastos (CL) Fig. 42. Detalles ultraestructurales del cloroplasto. Se observa espacio periplástico (EP), gránulo de almidón (GA), laminillas libres (LL), membrana externa (ME), membrana interna (MI) y tilacoides (TI).

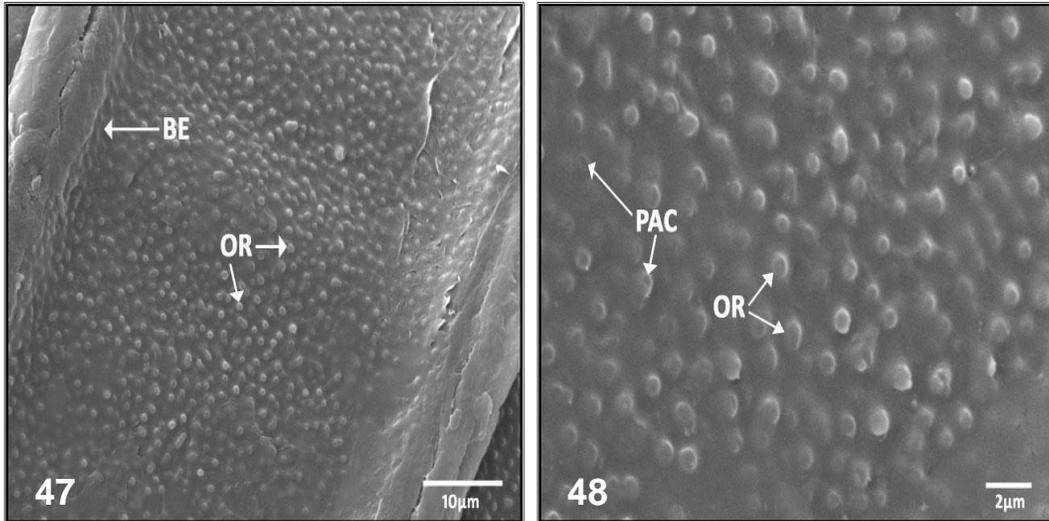
### 7.3 DESCRIPCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL OOSPORANGIO Y OOSPORA DE *Chara hydropitys* MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El oosporangio de *Chara hydropitys* presenta 11-12 circunvoluciones, que inician en la base del oosporangio y finalizan en la parte superior, debajo de la coronula. Las células coronulares presentan ápices divergentes (fig. 43). La longitud y diámetro promedio de la oospora es 484.199  $\mu\text{m}$  y 347.759  $\mu\text{m}$  respectivamente; además posee entre 10 - 11 bordes espirales poco prolongados que surgen de un polígono formado por las células escuderas en la parte inferior del oosporangio, posteriormente ascienden en sentido dextrógiro hasta encontrarse en la parte superior donde se origina un centro excéntrico. La superficie de los bordes espirales es irregular e indica la presencia de *ribbon* (figs. 44-46).

La fosa es el espacio que se encuentra entre cada borde espiral y mide en promedio 46  $\mu\text{m}$ . La superficie de la fosa de la oospora presenta una microornamentación verrucada, se caracteriza porque sus ornamentos son papilas pustuliformes presentes en diferente etapa de formación; las papilas más desarrolladas tienen un poro apical central, mientras que las otras se encuentran fusionadas o solitarias y sin poro. Las papilas pustuliformes tienen una longitud y diámetro promedio de 0.5  $\mu\text{m}$  y 0.9  $\mu\text{m}$  respectivamente; estas papilas son de forma cónica por lo cual el ápice tiene un diámetro menor (0.5 $\mu\text{m}$ ). El diámetro promedio del poro es de 0.15  $\mu\text{m}$  (figs. 47– 48). Se encuentran entre 30 – 34 papilas que atraviesan la fosa, es decir entre cada borde espiral distribuidas de manera irregular; además su microornamentación se extiende hasta los bordes espirales. El *ribbon* aunque poco visible en las micrografías de barrido, permite establecer una microornamentación con papilas pustuliformes más pequeñas que las encontradas en la fosa.



FIGURAS 43-46. Micrografía electrónica de barrido del oosporangio y oospora de *Chara hydrophytis*. Fig. 43. Oosporangio que presenta 11 circunvoluciones (CNV) que ascienden dextrógiramente. Se observa la coronula (CC) y las células espirales (CE). Fig. 44. Vista apical de la oospora mostrando la formación del centro excéntrico (CEX) y algunas aperturas. Figs. 44– 45. Desprendimiento de las células escuderas y coronulares para permitir la vista lateral de la oospora. Se aprecian los bordes espirales (BE), *ribbon* (RB) y fosa (SF).



FIGURAS 47 – 48. Detalles de la microornamentación de la fosa. Fig. 47. Fosa mostrando un tipo de microornamentación verrucada que se extiende hasta los bordes espirales. Fig. 48. Detalles de los ornamentos (OR). Se aprecia un poro apical central (PAC) en los ornamentos más desarrollados.

#### 7.4 AUTOFLUORESCENCIA DEL OOSPORANGIO DE *Chara hydrophytis*

La clorofila es el principal pigmento fotosintético de las Chlorophytas, y tiene propiedades autofluorescentes cuando se observa con filtro azul. Esta autofluorescencia se aprecia de color rojo y se destaca principalmente en los talos vegetativos y células coronulares. Sin embargo, la mayor parte del oosporangio presenta una autofluorescencia verde-amarillenta, debido posiblemente a la presencia de materiales minerales incrustados en la pared oosporangial compuesta, como el carbonato de calcio.



FIGURA 49. Autofluorescencia del oosporangio (filtro B-2, filtro de excitación 450 – 490nm y filtro barrera 515nm). Se observa autofluorescencia roja de la clorofila y autofluorescencia verde-amarillenta, posiblemente para la presencia de carbonato de calcio.

## 8. DISCUSIÓN

La identificación taxonómica de las especies de Charophyta han sido particularmente conflictivas dado que los caracteres morfológicos han demostrado ser insuficientes para la circunscripción de algunas especies. Debido a esto, estudios genéticos, moleculares y de ultraestructura de la pared de la oospora han permitido contribuir a la determinación de estos organismos (Leitch 1989, John *et al.* 1990, Casanova 1991, 1997, Sakayama *et al.* 2002, 2005, Mandal & Ray 2004, Sakayama 2008).

En este sentido, *Chara hydropitys* fue considerada por Wood & Imahori (1965) como una variedad de la especie *Chara fibrosa* Agardh. (*Chara fibrosa* var. *hydropitys*); sin embargo, otros autores la circunscriben como una especie independiente (Zaneveld 1940, Sundaralingam 1959, Proctor 1971, Grant & Proctor 1980, John *et al.* 1990). Posteriormente, Krishnan (2006) valiéndose de análisis en isoenzimas, características morfológicas y ultraestructura de la pared de la oospora y Bueno *et al.* (2011) empleando caracteres morfológicos la consideran como *C. hydropitys*; por consiguiente, la identificación del material de trabajo se fundamenta en lo propuesto por estos autores.

El oosporangio de *C. hydropitys* es una estructura multicelular constituida por 14 células: la célula pedicelar encargada de mantener el oosporangio en el talo, un complejo nodal constituido por una célula central y cinco células espirales. Estas últimas se elongan en forma helicoidal alrededor de la oosfera y en la zona apical, cada una de ellas origina una célula coronular. La célula estéril junto con las células espirales se encargan de proteger la oosfera, en cuyo interior se encuentra el núcleo rodeado por gran cantidad de almidón y se localiza en la parte central del oosporangio. Estas características morfológicas del oosporangio son similares para los seis géneros de Charophyta; aunque, los géneros *Tolypella* y *Nitella* presentan diez células coronulares en lugar de las cinco encontradas para los

otros géneros (Leitch 1989, Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den *et al.* 1995, Sakayama *et al.* 2002, 2005, 2009, Gallardo *et al.* 2004, Graham *et al.* 2008, Sakayama 2008, Caisová & Gąbka 2009).

Las células espirales que constituyen el oosporangio de Charophyta se caracterizan por presentar una vacuola grande central, por lo que el citoplasma queda relegado en posición parietal formando una delgada capa, donde son evidentes el núcleo, los cloroplastos y las mitocondrias. Así mismo, estas características se comparten con las células internodales del talo (Leitch *et al.* 1990, Hoek, van den *et al.* 1995, Picelli *et al.* 2004). Esta condición es similar para las células espirales y coronulares de *C. hydropitys*; pero difieren de las células que se encuentran en la base del oosporangio, ya que estas últimas no poseen una vacuola grande en posición central, por lo tanto, el citoplasma ocupa toda el área celular.

En *Nitella* (Leitch *et al.* 1990) se ha encontrado que en el citoplasma de la oosfera madura se acumulan abundantes gránulos de almidón y que al parecer son importantes durante el periodo de latencia o germinación. Graham *et al.* (2008) indican que esta característica es común para otras especies de algas como *Coleochaete* Bréb. Las características presentes en la oosfera madura de *C. hydropitys* concuerdan con lo descrito anteriormente, y es posible que la función de estas reservas de almidón tengan el mismo objetivo.

En *C. hydropitys* después de la fertilización, la oospora o cigoto comienza a formar una gruesa pared, conocida como pared oosporongial compuesta (POC); la cual se origina por la deposición simultánea de capas secundarias sobre las capas primarias ya existentes de la oospora y células escuderas. Esta condición es similar a la registrada para otras especies de Charophyta (Leitch 1989, Leitch *et al.* 1990).

La ultraestructura de la POC encontrada en *C. hydropitys* es similar a la registrada para *Chara hispida*, *C. delicatula* y *Lamprothamnium papulosum* (Leitch 1989, Leitch *et al.* 1990). Sin embargo, *Nitella* se diferencia por tener una mayor complejidad en la capa de microornamentación (John & Moore 1987), además en algunas especies como *Nitella opaca* (Agardh ex Bruzelius) Agardh. y *N. flexilis* Linnaeus. la capa cristalina es reemplazada por una capa orgánica (Leitch 1986). Según lo anterior, la ultraestructura de la POC en las especies de *Chara* y *Lamprothamnium* guardan cierto grado de similaridad ontogenética y difieren de las especies de *Nitella*; aunque serían necesarios estudios adicionales que incluyan mayor número de especies de estos géneros para dar mayor soporte a esta afirmación; y adicionalmente incluir especies de *Nitellopsis*, *Tolypella* y *Lychnothamnus* que no han sido estudiadas en este sentido.

Groves & Bullock-Webster (1920), Leitch (1989) y Leitch *et al.* (1990) indican que probablemente la función de la POC es servir como protección contra la desecación y/o consumo por parte de la fauna acuática, asegurando la supervivencia especialmente donde los hábitats son estacionalmente inestables. Según lo anterior y teniendo en cuenta la uniformidad de la POC en las charophytas es posible que en *C. hydropitys* la función de esta pared sea similar.

En *Chara* y *Lamprothamnium* las células escuderas depositan hacia su parte interna una capa calcificada, conocida como calcina que se observa sobre la POC; y la cual se identifica como depósitos de material electrodenso; esta situación fue registrada para *C. hydropitys*. En contraste, algunas especies de *Tolypella* pueden o no presentar calcina, mientras que en *Nitella* se han observado estos mismos depósitos de material calcáreo dispuestos de manera más laxa; aunque la deposición de este material depende de las condiciones ambientales y fisiológicas del alga (Leitch 1989, Leitch *et al.* 1990, Julia 1991, Lee 2008).

Leitch *et al.* (1990), Julia (1991) y Graham *et al.* (2008) señalan que una vez el oosporangio ha sido fecundado y desprendido del talo; la función de la calcina se relaciona con la protección de la oospora cuando las condiciones medio ambientales no son las apropiadas para la germinación; ya sea que su permanencia sea en el fondo del medio acuático o en la superficie terrestre si este se seca. Según lo anterior es posible que en *C. hydropitys* la calcina cumpla una función similar.

La microornamentación en la pared de la oospora de *C. hydropitys* es verrucada con papilas cortas y poro apical, tal como lo documenta Krishnan (2006) para esta misma especie hallada en la India. En *Nitella cristata* A. Braun., se ha registrado un patrón de microornamentación parecido (Casanova 1991); sin embargo, difieren en la presencia de poro apical sobre las papilas que se observan en *C. hydropitys*. A pesar de la importancia taxonómica de los caracteres morfológicos, es claro que los detalles ultraestructurales son importantes en la delimitación de las especies de Charophyta.

Varios autores (John *et al.* 1990, Haas 1994, Casanova 1991, Sakayama *et al.* 2002, Mandal & Ray 2004, Sakayama 2008, Bueno 2011) han demostrado que las características morfológicas y morfométricas del oosporangio y oospora tienen importancia en la identificación de diferentes especies de Charophytas. Comparando las medidas morfométricas obtenidas en el presente estudio con los realizados por Krishnan (2006) y Bueno *et al.* (2011) para *C. hydropitys* (tabla 2); se aprecia, que los valores obtenidos en este trabajo concuerdan en mayor grado con los registrados por Bueno *et al.* (2011), con la excepción que el diámetro de los oosporangios medidos por estos autores son menores y presentan un mayor rango de variabilidad. En contraste, las medidas morfométricas registradas por Krishnan (2006) siempre se encuentran por debajo de los valores mínimos y máximos a los presentados aquí.

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que a pesar de la estabilidad morfológica de las estructuras reproductivas femeninas, existe un grado de variabilidad morfológica que se encuentra entre los límites de la especie, sin dejar de lado el grado de variación impartido por los factores ambientales como la velocidad de la corriente, profundidad y estacionalidad del cuerpo de agua (Ray *et al.* 2001, Vieira & Necchi 2002, Mandal & Ray 2004, Boszke *et al.* 2008, Blume *et al.* 2009). Debido a esto Ray *et al.* (2001) señala que las características morfológicas vegetativas y reproductivas se deben considerar de manera simultánea para la correcta identificación de los diferentes taxa.

Tabla 2. Comparación de características morfométricas del oosporangio y oospora de *Chara hydropitys* en diferentes estudios.

Característica morfológica	Krishnan 2006 (India)	Bueno <i>et al.</i> 2011 (Brasil)	Datos del presente estudio (Colombia)
Longitud Oosporangio (µm)	406 – 574	450 – 690	575 – 776
Diámetro Oosporangio (µm)	238 – 322	180 – 420	404 – 543
Longitud Oospora (µm)	280 – 350	450 – 480.5	402 – 558
Diámetro Oospora (µm)	168 – 238	250 – 300	300 – 410
Amplio de la fosa (µm)	28	40 – 50	46
Número de Convoluciones	8 – 10	11 – 12	11 – 12
Número de bordes espirales	-----	10 – 11	10 – 11

Por último, la autofluorescencia roja que se evidencia en las células coronulares del oosporangio, las células del talo y brácteas de *C. hydropitys*, cuando se observa con microscopio de fluorescencia empleando filtro azul, corresponde a la fluorescencia intrínseca de la clorofila (Küpper *et al.* 1998). Sin embargo, Pouneva (1997), Ariosa *et al.* (2004) y Roshchina *et al.* (2004) indican que la clorofila presenta este mismo patrón de autofluorescencia cuando se utilizan otros filtros como el UV y violeta.

Por otra parte, la autofluorescencia verde-amarillenta registrada en el oosporangio de *C. hydropitys*, cuando se observa bajo estas mismas condiciones; se debe probablemente a los componentes minerales que se impregnan en la POC como el carbonato de calcio presente en la calcina. En este sentido, Ariosa *et al.* (2004) determinó que el carbonato de calcio impregnado sobre la superficie del talo y ramificaciones de *Chara vulgaris* presenta autofluorescencia verde-amarillenta cuando utiliza filtro violeta.

## 9. CONCLUSIONES

- El oosporangio de *Chara hydropitys* es una estructura multicelular, donde la mayoría de sus células contienen una enorme vacuola central rodeada por citoplasma periférico granular el cual contiene núcleo, mitocondrias y múltiples cloroplastos discoidales.
- La oosfera se caracteriza por ser la célula de mayor tamaño y presentar citoplasma poco electrodense en el cual se encuentra gran cantidad de gránulos de almidón, utilizado como material de reserva para la germinación.
- La pared oosporangial compuesta se encuentra constituida de ocho capas depositadas en forma secuencial, de las cuales seis se originan después de la fertilización, de ellas la capa cristalina que mide entre 4.2 – 6.0  $\mu\text{m}$  se reconoce por ser la de mayor grosor, mientras las demás tienen un valor aproximado a 0.1– 2.4  $\mu\text{m}$ . La ultraestructura de esta pared es similar a la reportada para otras charophytas del género *Lamprothamnium* y *Nitella*.
- Se evidencia una fijación gradual de carbonato de calcio sobre la capa de microornamentación de la pared oosporangial compuesta, provocada por las células escuderas y cuya finalidad se atribuye a la conservación de la oospora una vez que ha caído al sedimento hasta el momento de la germinación.
- El análisis mediante microscopia electrónica de barrido reveló que la microornamentación presente en la fosa de la oospora es verrucada, sus ornamentos son papilas pustuliformes, las cuales en su mayoría tienen un poro apical central y se distribuyen de manera irregular.

- El *ribbon* presenta la misma microornamentación de la fosa en la oospora, con la diferencia de tener papilas más pequeñas y sin poro apical evidente.
- La microornamentación que presenta la fosa de la oospora de *Chara hydrophytis* es similar a la reportada para *Nitella cristata*, sin embargo los detalles ultraestructurales de los ornamentos son diferentes para cada una de las especies.
- Las características morfométricas registradas para el oosporangio de *C. hydrophytis* fueron longitud y diámetro promedio de 681.142  $\mu\text{m}$  y 470.301  $\mu\text{m}$  respectivamente, y entre 10 - 12 circunvoluciones; para la oospora se encontró longitud y diámetro promedio de 484.199  $\mu\text{m}$  y 347,759  $\mu\text{m}$  respectivamente, con 10 - 11 bordes espirales.
- Las características morfométricas de la oospora tales como: longitud, diámetro, número de bordes espirales y ancho de la fosa en diferentes investigaciones han logrado obtener importancia taxonómica por considerarse de mayor fiabilidad, debido a que son menos variables que las características morfológicas vegetativas cuando ocurren cambios en las condiciones ambientales.
- La observación directa del oosporangio mediante microscopía de fluorescencia permitió atribuir la autofluorescencia roja a la clorofila presente en la coronula, mientras que la autofluorescencia verde-amarillenta posiblemente se debe al carbonato de calcio depositado sobre la pared oosporangial compuesta.

## 10. RECOMENDACIONES

Es necesario desarrollar estudios sobre los detalles ultraestructurales de la pared oosporongial compuesta de los géneros *Nitellopsis*, *Tolypella* y *Lychnothamnus*; ya que no se encuentran referencias sobre estos y serian importantes para establecer diferencias o similitudes entre las múltiples capas de la POC para los géneros de Charophyta.

Realizar un estudio detallado sobre la espermatogénesis y espermiogénesis de *Chara hydrophytes*, características morfológicas y ultraestructura del órgano reproductor masculino, debido a que brinda características diagnosticas que permiten realizar análisis filogenéticos para el género *Chara*.

Encaminar investigaciones hacia el comportamiento de esta especie en el medio acuático, porque es de conocimiento que este género funciona como biomonitor de la calidad del agua y en diferentes casos algunas de las especies de *Chara* han ayudado en la recuperación y conservación de cuerpos de agua con estados eutróficos.

## 11. LITERATURA CITADA

ANDREWS, M., DAVISON, I., ANDREWS, M. & J. RAVEN. 1984. Growth of *Chara hispida*: I. Apical Growth and Basal Decay. *Journal of Ecology* 72 (3): 873-884.

ARIOSIA, Y., QUESADA, A., ABURTO, J., CARRASCO, D., CARRERES, R., LEGANÉS, F. & E. FERNÁNDEZ. 2004. Epiphytic cyanobacteria on *Chara vulgaris* are the main contributors to N<sub>2</sub> fixation in rice fields. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (9): 5391-5397.

BLINDOW, I. 1992. Decline of charophytes during eutrophication: comparison with angiosperms. *Freshwater Biology* 28: 9-14.

BLINDOW, I. & A. LANGANGEN. 1995. *Lamprothamnium papulosum* (Wallr.) J. Groves, a threatened charophyte in Scandinavia. *Cryptogamie Algologie* 16: 47-55.

BLINDOW, I., HARGEBY, A. & G. ANDERSSON. 2002. Seasonal changes of mechanisms maintaining clear water in a shallow lake with abundant *Chara* vegetation. *Aquatic Botany* 72: 315-334.

BLUME, M., BLINDOW, I., DAHLKE, S. & F. VEDDER. 2009. Oospore variation in closely related *Chara* taxa. *Journal Phycology* 45: 995-1002.

BOEGLE, M., SCHENEIDER, S., MANNSCHRECK, B. & A. MELZER. 2007. Differentiation of *Chara intermedia* and *C. baltica* compared to *C. hispida* based on morphology and amplified fragment length polymorphism. *Hydrobiologia* 586: 155-166.

BONIS, A. & P. GRILLAS. 2002. Deposition, germination and spatio-temporal patterns of charophyte propagule banks: a review. *Aquatic Botany* 72: 235-248.

BOSZKE, P. & K. BOCIĄG. 2008. Morphological variation of oospores in the population of *Chara rudis* A. Braun in a mesotrophic lake. *Polish Journal of Ecology* 56: 139-147.

BOZZOLA, J. & I. RUSSELL. 1998. Electron microscopy: principles and techniques for Biologists. Second edition. Jones y Bartlett Publishers, Inc. USA. Chapter 2: Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy. pp 16-46.

BUENO, N., De MATTOS, C., BIOLO, E. & T. MEURER. 2009. Levantamento florístico das Characeae (Chlorophyta) de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil: *Chara*. *Revista Brasileira de Botânica* 32 (4): 759-774.

BUENO, N., PRADO, J., MEURER, T. & C. De MATTOS. 2011. New records of *Chara* (Chlorophyta, Characeae) for subtropical southern Brazil. *Systematic Botany* 36 (3): 523-541.

CABALLERO, A. 1922. Las especies larvicidas del género *Chara*. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia natural* 22: 418-421.

CAISOVÁ, L. & M. GABKA. 2009. Charophytes (Characeae, Charophyta) in the Czech Republic: taxonomy, autecology and distribution. *Fottea* 9 (1): 1-43.

CAISOVÁ, L., HUSÁK, S & J. KOMÁREK. 2008. *Nitella mucronata* (BR.) MIQUEL (Charophyta) in the Czech Republic. *Fottea* 8 (2): 105-107.

CASANOVA, M. & M. BROCK. 1990. Charophyte germination and establishment from the seed bank of an Australian temporary lake. *Aquatic Botany* 36: 247-254.

CASANOVA, M. 1991. An SEM study of developmental variation in oospore wall ornamentation of three *Nitella* species (Charophyta) in Australia. *Phycologia* 30 (3): 237-242.

CASANOVA, M. 1997. Oospore variation in three species of *Chara* (Charales, Chlorophyta). *Phycologia* 36 (4): 274-280.

CASANOVA, M., De WINTON, M., KAROL, K. & J. CLAYTON. 2007. *Nitella hookeri* A. Braun (Characeae, Charophyceae) in New Zealand and Australia: implications for endemism, speciation and biogeography. *Charophytes* 1 (1): 2-18.

CHAMBERS, P., BARKO, J. & C. SMITH. 1993. Evaluation of invasions and declines of submersed aquatic macrophytes. *Journal Aquatic Plant Management* 31: 218-221.

CHOU, J., WANG, W. & J. CHANG. 2007. Three new members of Characeae (Charales, Chlorophyta) from Taiwan, including one endangered monospecific genus. *Botanical Studies* 48: 117-126.

CIRUJANO, S., MEDINA, L. & M. CHIRINO. 2002. Plantas acuáticas de las lagunas y humedales de Castilla-La Mancha. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha-CSIC. Madrid.

CIRUJANO, S., MURILLO, P., MECO, A. & R. FERNÁNDEZ. 2007. Los Carófitos Ibéricos. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 64 (1): 87-102.

COOK, M., GRAHAM, L., BOTHA, C. & C. LAVIN. 1997. Comparative ultrastructure of plasmodesmata of *Chara* and selected bryophytes: toward an elucidation of the evolutionary origin of plant plasmodesmata. *American Journal of Botany* 84 (9): 1169-1178.

COOPS, H. 2002. Ecology of charophytes: an introduction. *Aquatic Botany* 72: 205-208.

CUBAS, P. 2008. Algas eucariotas. Extraído el 07 de Octubre del 2011 desde <http://www.aulados.net/Botanica/CursoBotánica/Algas/4Algastexto.pdf>.

DAILY, F. 1964. Oospore variation in culture as applied to the taxonomy of *Chara*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 91 (4): 281-283.

De WINTON, M. & J. CLAYTON. 1996. The impact of invasive submerged weed species on seed banks in lake sediments. *Aquatic Botany* 53, 31-45.

De WINTON, M. & J. CLAYTON. 2000. Seedling emergence from seed banks of 15 New Zealand lakes with contrasting vegetation histories. *Aquatic Botany* 66: 181-194.

De WINTON, M., DUGDALE, T. & J. CLAYTON. 2007. An identification key for oospores of the extant charophytes of New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 45: 463-476.

DOMOZYCH, D., SØRENSEN, I., PETTOLINO, F., BACIC, A. & G. WILLATS. 2010. The cell wall polymers of the charophycean green alga *Chara corallina*: immunobinding and biochemical screening. *International Journal of Plant Sciences* 171 (4): 345-361.

DUARTE, C., KALFF, J. & R. PETERS. 1986. Patterns in biomass and cover of aquatic macrophytes in lakes. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 43: 1900-1908.

DYCK, L. 1970. Morphological, chemical and developmental studies on *Chara* oosporongial walls. Ph.D.Thesis.Washington University, USA.

GALLARDO, T., IZCO, J., BARRENO, E., BRUGUÉS, M., COSTA, M., DEVESA, J., FERNÁNDEZ, F., LLIMONA, X., PRADA, C., TALAVERA, S. & B. VALDÉS. 2004. Botánica. Cap 10: Algas. Segunda edición. Ed. McGraw Hill-Interamericana. Madrid. pp. 321 - 331, 358-372.

GÓMEZ, L. 1970. Una nota sobre caráceas de Costa Rica. *Ceiba* 16 (2): 45-49.

GRAHAM, J., WILCOX, L. & L. GRAHAM. 2008. Algae. Cap 20: Green Algae V. Second edition. Ed. Pearson. Londres. pp. 476-484.

GRAMBAST, L. 1974. Phylogeny of the Charophyta. *Taxon* 23: 463-481.

GRANT, M. & V. PROCTOR. 1980. Electrophoretic analysis of genetic variation in the Charophyta I. Gene duplication via polyploidy. *Phycologia* 16: 109-115.

GRIFFIN, D. 1963. Variation in oospores of six species of *Chara*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 90 (6): 400-402.

GRIFFIN, D. & R. RHODES. 1965. Oospore wall ornamentation in *Chara zeylanica*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 92 (3): 182-184.

- GROVES, J. & G. BULLOCK-WEBSTER. 1920. The British Charophyta. Royal Society, London. In SAKAYAMA, H., MIYAJI, K., NAGUMO, T., KATO, M., HARA, Y. & H. NOZAKI. 2005. Taxonomic reexamination of 17 species of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) based on internal morphology of the oospore wall and multiple DNA marker sequences. *Phycology* 41: 195-211.
- GUHA, P. 1995. Exploring ecological control of *Chara*. *Crop Protection* 14: 527-528.
- HAAS, J. 1994. First identification key for charophyte oospore from central Europe. *European Journal of Phycology* 29: 227-235.
- HANSON, J. 1990. Macroinvertebrate size-distributions of two contrasting freshwater macrophyte communities. *Freshwater Biology* 24: 481-491.
- HARGEBY, A., ANDERSSON, G., BLINDOW, I. & S. JOHANSSON. 1994. Trophic web structure in a shallow eutrophic lake during a dominance shift from phytoplankton to submerged macrophytes. *Hydrobiologia* 279/280: 83-90.
- HOEK, C. van den., MANN, D. & H. JAHNS, 1995. *Algae: an Introduction to phycology*. Cap 19: Chlorophyta; Cap 30: Charophyceae; Cap 31: Reflections on the phylogeny of the Chlorophyta. First edition. Ed. Cambridge University Press. Gran Bretaña. pp. 10, 300-341, 474-482.
- HORN AF RANTZIEN, H. 1956. Morphological terminology relating to female charophyte gametangio and fructifications. *Botaniska Notiser* 109: 212-259.
- HUTCHINSON, G. 1975. The lower rooted vegetation. *A Treatise on Limnology*. *Limnological Botany* 3: 1-77.

JOHN, D. & J. MOORE. 1987. An SEM study of the oospore of some *Nitella* species (Chlorophyta, Charales) with descriptions of wall ornamentation and an assessment of its taxonomic importance. *Phycologia* 26: 334-355.

JOHN, D., MOORE, J. & D. GREEN. 1990. Preliminary observations on the structure and ornamentation of oosporangial wall in *Chara* (Charales, Chlorophyta). *British Phycological Journal* 25: 1-24.

JOHNSTONE, I. & P. ROBINSON. 1987. Light level variation in Lake Tutira after transient sediment in flow and its effect on the submerged vegetation. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21: 47-54.

JONES, T., FORTIER, S., PENTECOST, A. & M. COLLINSON. 1996. Stable carbon and oxygen isotopic compositions of Recent charophyte oosporangia and water from Malham Tarn, U.K.: palaeontological implications. *Biogeochemistry* 34: 99-112.

JULIA De AGAR, J. 1991. Coloquios de paleontología. Contribución al estudio de carófitos fósiles de la cuenca Terciaria de Loranca (provincia de Cuenca, España). Ed. Complutense, Universidad Complutense de Madrid. 43: 57-78.

KALIN, M. & M. SMITH. 2007. Germination of *Chara vulgaris* and *Nitella flexilis* oospores: What are the relevant factors triggering germination? *Aquatic Botany* 87: 235-241.

KAROL, K., McCOURT, R., CIMINO, M. & C. DELWICHE. 2001. The closest living relatives of land plants. *Science* 294: 2351-2353.

KRAUSE, W. 1981. Characeen als Bioindikatoren für den Gewässerzustand. *Limnologica* 13: 399-418.

KRISHNAN, U. 2006. Differentiation of *Chara gymnopitys* A. Br. and *Chara hydrophytis* Reich. by morphological characters, isozyme analysis and oospore wall ornamentation. *Cryptogamie Algologie* 27 (4): 473-490.

KUFEL, L. & T. OZIMEK. 1994. Can *Chara* control phosphorus cycling in Lake Łuknajno (Poland)? *Hydrobiologia* 275-276 (1): 277-283.

KUFEL, L. & I. KUFEL. 2002. *Chara* beds acting as nutrient sinks in shallow lakes - a review. *Aquatic Botany* 72: 249-260.

KÜPPER, H., KÜPPER, F. & M. SPILLER. 1998. *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research* 58: 123-133.

KUSTER, A., SCHAIBLE, R. & H. SCHUBERT. 2005. Sex-specific light acclimation of *Chara canescens* (Charophyta). *Aquatic Botany* 83: 129-140.

LEE, R. 2008. *Phycology*. Cap 5: Chlorophyta. Fourth edition. Ed. Cambridge University Press. New York. pp. 139-236.

LEITCH, A. 1986. Studies on living and fossil charophyte oosporangia. Ph.D. Thesis, Bristol University, England.

LEITCH, A. 1989. Formation and ultrastructure of a complex, multilayered wall around the oospore of *Chara* and *Lamprothamnium* (Characeae). *European Journal of Phycology* 24: 229-236.

LEITCH, A. JOHN, D. & J. MOORE. 1990. The oosporangium of the Characeae (Chlorophyta, Charales). *Progress in phycological research* pp. 213-268.

LEWIS, L. & R. McCOURT. 2004. Green algae and the origin of land plants. *American Journal of Botany* 91 (10): 1535-1556.

LUCAS W., BRECHIGNAC F., MIMURA T. & J. OROSS. 1989. Charasomes are not essential for photosynthetic utilization of exogenous  $\text{HCO}_3^-$  in *Chara corallina*. *Protoplasma* 151 (2/3): 106-114.

MANDAL, D., BLAŽENČIĆ, J. & S. RAY. 2002. SEM study of compound oospore wall ornamentation of some members of *Charales* from Yugoslavia, Croatia and Slovenia. *Archives of Biological Science Belgrade* 54 (1-2): 29-34.

MANDAL, D. & S. RAY. 2004. Taxonomic significance of micromorphology and dimensions of oospores in the genus *Chara* L. (Charales, Chlorophyta). *Archives of Biological Science Belgrade* 56 (3-4), 131-138.

MANDAL, D. OJHA, S. & S. RAY. 2008. Species-specificity of oospore dimensions in three ecorticate species of *Chara* (Charales, Charophyceae). *Aquatic Botany* 88: 181-183.

MARTÍN-CLOSAS, C. 2003. The fossil record and evolution of freshwater plants: A review. *Acta Geológica* 1:315-338.

MATHESON, R. 1930. The utilization of aquatic plants as aids in mosquito control. *The American Naturalist* 64 (690): 56-86.

MATTOX, K. & K. STEWART. 1984. Classification of the Green Algae: A concept based on comparative cytology. *In* SAKAYAMA, H. 2008. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and

multiple DNA marker phylogeny using cultured material. *Phycological Research* 56: 202-215.

McCOURT, R., DELWICHE, C. & K. KAROL, 2004. Charophyte algae and land plant origins. *Trends in Ecology and Evolution* 19 (12): 661-666.

McCOURT, R. M. 1995. Green algal phylogeny. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 159-163.

McCOURT, R., KAROL, K., GUERLESQUIN, M. & M. FEIST. 1996. Phylogeny of extant genera in the family Characeae (Charales, Charophyceae) based on rbcL sequences and morphology. *American Journal of Botany* 83:125-131.

MELKONIAN, M. & B. SUREK. 1995. Phylogeny of the Chlorophyta: Congruence between ultrastructural and molecular evidence. *Bulletin de la Societe Zoologique de France* 120: 191-208.

MISHLER, B. & S. CHURCHILL. 1985. Transition to a land flora: phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *Cladistics* 1:305-328.

MOSS, B. 1990. Engineering and biological approaches to the restoration from eutrophication of shallow lakes in which aquatic plant communities are important components. *Hydrobiologia* 200/201: 367-377.

NOZAKI, H., KODO, M., MIYAJI, K., KATO, M., WATANABE, M. & H. KASAKI. 1998. Observations on the morphology and oospore wall ornamentation in culture of the rediscovered Japanese endemic *Nitella gracilens* (Charales, Chlorophyta). *European Journal of Phycology* 33: 357-359.

PAL, B., KUNDU, B., SUNDARALINGAM V. & VENKATARAMAN G. 1962. Charophyta. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. *In* Sharma O. 2007. Textbook of Algae. Ed. Tata McGraw-Hill. pp. 246-259.

PEREYRA-RAMOS, E. 1981. The ecological role of Characeae in the lake littoral. *Ekologia Polska: Polish Journal of Ecology* 29, 167-209.

PHILLIPS, G., EMINSON, D. & B. MOSS. 1978. A mechanism to account for macrophyte decline in progressively eutrophicated freshwaters. *Aquatic Botany* 4: 103-126.

PICELLI, M., BICUDO, C. & N. BUENO. 2004. Flora ficológica do estado de Sao Paulo. *Charophyceae* 5: 1-88.

PIECYNSKA, E., OZIMEK, T. & J. RYBAK, 1988. Long-term changes in littoral habitats and communities in Lake Mikolajskie (Poland). *Internationale Revue der Gesamtem Hydrobiologie* 73: 361-378.

POUNEVA, I. 1997. Evaluation of algal culture viability and physiological state by fluorescent microscopic methods. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 23 (1-2): 67-76.

PROCTOR, V. 1967. Storage and germination of *Chara* oospores. *Journal Phycology* 3: 90-92.

PROCTOR, V. 1971. Taxonomic significance of monoecism and dioecism in the genus *Chara*. *Phycologia* 10: 299-305.

PROCTOR, V. 1975. Phycological reviews II. The nature of charophytes species. *Phycologia* 14: 97-113.

RAY, S., PEKKARI, S. & P. SNOEIJIS. 2001. Oospore dimensions and wall ornamentation patterns in Swedish charophytes. *Nordic Journal of Botany* 21: 207-224.

RODRIGO, M., ALONSO, J., CIRUJANO, S. & I. SOULIE-MÄRSCHÉ. 2009. Aproximación a las comunidades de carófitos que existieron en la Albufera de Valencia a partir del estudio de las oósporas del sedimento. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 66(2): 195-208.

ROSHCHINA, V., YASHIN, V. & A. KONONOV. 2004. Autofluorescence of developing plant vegetative microspores studied by confocal microscopy and microspectrofluorimetry. *Journal of Fluorescence* 14 (6): 745-750.

SAKAYAMA, H., NOZAKI, H., KASAKI, H. & Y. HARA, 2002. Taxonomic re-examination of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Japan, based on microscopical studies of oospore wall ornamentation and *rbcL* gene sequences. *Phycologia* 41 (4): 397-408.

SAKAYAMA, H., HARA, Y. & H. NOZAKI. 2004. Taxonomic re-examination of six species of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Asia, and phylogenetic relationships within the genus based on *rbcL* and *atpB* gene sequences. *Phycologia* 43: 91-104.

SAKAYAMA, H., MIYAJI, K., NAGUMO, T., KATO, M., HARA, Y. & H. NOZAKI. 2005. Taxonomic reexamination of 17 species of *Nitella* subgenus *Tieffallenia* (Charales, Charophyceae) based on internal morphology of the oospore wall and multiple DNA marker sequences. *Phycology* 41: 195-211.

SAKAYAMA, H., ARAI, S., NOZAKI, H., KASAI, F. & M. WATANABE. 2006. Morphology, molecular and taxonomy of *Nitella comptonii* (Charales, Characeae). *Phycologia* 45 (4): 417-421.

SAKAYAMA, H. 2008. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and multiple DNA marker phylogeny using cultured material. *Phycological Research* 56: 202-215.

SAKAYAMA, H., KASAI, F., NOZAKI, H., WATANABE, M., KAWACHI, M., SHIGYO, M., JUN, I., KRIENITZ, L. & M. ITO. 2009. Taxonomic reexamination of *Chara globularis* (charales, charophyceae) from japan based on oospore morphology and rbcL gene sequences, and the description of *C. Leptospora* sp. nov. *Journal Phycology* 45: 917-927.

SCHEFFER, M. 1990. Multiplicity of stable states in freshwater systems. *Hydrobiologia* 200/201: 475-486.

SCHEFFER, M., HOSPER, S., MEIJER, M., MOSS, B. & E. JEPPESEN. 1993. Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 275-279.

SCHEFFER, M. 1998. *Ecology of Shallow Lakes*. Ed. Chapman and Hall, London. pp. 357.

SCHNEIDER, S. 2007. Macrophyte trophic indicator values from a European perspective. *Limnologica* 37: 281-289.

SEDERIAS, J. & B. COLMAN. 2007. The interaction of light and low temperature on breaking the dormancy of *Chara vulgaris* oospores. *Aquatic Botany* 87: 229-234.

SHARMA, O. 2007. Textbook of Algae. Ed. Tata McGraw-Hill. pp. 246-260.

SOSNOVSKY, A., CIRUJANO, S., ÁLVAREZ, M., MORENO, M. & E. PIÑA. 2005. Efectos antrópicos sobre las praderas sumergidas de carófitos en una laguna cárstica. *Anales del jardín Botánico de Madrid* 62 (1): 47-52.

SOULIÉ-MÄRSCHÉ, I. 1989. Etude compare de gyrogonites de charophytes actuelles et fossiles et phylogénie des genres actuels. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier. In JULIA De AGAR, J. 1991. Coloquios de paleontología. Contribución al estudio de carófitos fósiles de la cuenca Terciaria de Lorca (provincia de Cuenca, España). Ed. Complutense, Universidad Complutense de Madrid. 43: 57-78. pp. 65

SPENCE, D. 1982. The zonation of plants in freshwater lakes. *Advances in Ecological Research* 12: 37-125.

SPURR, A. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for Electron Microscopy. *Journal Ultrastructure Research* 26: 31-43.

SUNDARALINGAM V. 1959. A systematic account of the South Indian Characeae. *Proceedings of the Indian academy of science* 49: 7-51.

SUREK, B., BEEMELMANN, U., MELKONIAN, M. & D. BHATTACHARYA. 1993. Ribosomal RNA sequence comparisons demonstrate an evolutionary relationship between Zygnematales and Charophytes. *Plant Systems and Evolution* 191: 171-181.

TANNER, C., CLAYTON, J. & D. WELLS. 1993. Effects of suspended solids on the establishment and growth of *Egeria densa*. *Aquatic Botany* 45: 299-310.

UNDERWOOD, G., THOMAS, J. & BAKER, J. 1992. An experimental investigation of interactions in snail-macrophyte–epiphyte systems. *Oecologia* 91: 587-595.

URBANIAK, J. 2009. Oospore variation in *Nitella gracilis* and *Nitella mucronata* (Charales, Charophyceae) from Poland. *Biologia* 64(2): 252-260.

Van den BERG, M., COOPS, G., MEIJER, M., SCHEFFER, M. & J. SIMONS. 1998. Clear water associated with a dense *Chara* vegetation in the shallow and turbid Lake Veluwemmer, The Netherlands. In JEPPESEN, E., SÖNDERGAARD, M., SÖNDERGAARD, M. & CHRISTOFFERSEN, K. (Eds.). 1998. The Structuring Role of Submerged Macrophytes in Lakes. Ed. Springer, USA.

Van den BERG, M., SCHEFFER, M., Van Nes, E. & H. COOPS. 1999. Dynamics and stability of *Chara* sp. and *Potamogeton pectinatus* in a shallow lake changing in eutrophication level. *Hydrobiologia* 408/409: 335-342.

Van DIJK, G. & W. van VIERSSEN. 1991. Survival of *Potamogeton pectinatus* population under various light conditions in a shallow eutrophic lake (Lake Veluwe) in The Netherlands. *Aquatic Botany* 39: 121-130.

Van NES, E., van den BERG, M., CLAYTON, J., COOPS, H. & M. SCHEFFER. 1999. A simple model for evaluating the costs and benefits of aquatic macrophytes. *Hydrobiology* 415: 335-339.

VANT, W. 1987. Lake Whangape--muddy waters and macrophytes. *Soil Water Miscellaneous Publications*. 23: 20-24.

VIEIRA, J. & O. NECCHI. 2002. Microhabitat and plant structure of Characeae (Chlorophyta) populations in streams of southeastern Brazil. *Cryptogamie Algologie* 23: 51-63.

VIEIRA, J. & O. NECCHI. 2003. Photosynthetic characteristics of charophytes from tropical lotic ecosystems. *Phycological Research* 51: 51-60

WETZEL, R. 2001. Limnology. *In* SOSNOVSKY, A., CIRUJANO, S., ÁLVAREZ, M., MORENO, M. & PIÑA E. 2005. Efectos antrópicos sobre las praderas sumergidas de carófitos en una laguna cárstica. *Anales del jardín Botánico de Madrid* 62 (1): 47-52.

WOOD, R. 1952. The Characeae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 18 (5): 317-353.

WOOD, R. 1964. A synopsis of the Characeae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 91 (1): 35-46.

WOOD, R. 1965. Monograph of the Characeae, Vol.1. *In* R. Wood & K. Imahori (Eds.), *A Revision of the Characeae*. J. Cramer, Weinheim.

WOOD, R. & L. IMAHORI, 1965. A revision of the Characeae. I. Monograph of the Characeae, Vol. 2. *Iconograph of the Characeae*. J. Cramer, Weinheim.

ZANEVELD, J. 1940. The Charophyta of Malaysia and adjacent countries. *Blumea* 4: 1-224.

ZATOŃ, M., PIECHOTA, A. & E. SIENKIEWICZ. 2005. Late triassic charophytes around the bone bearing bed at Krasiejów (SW Poland) palaeoecological and environmental remarks. *Acta Geologica Polonica* 55: 283-293.

## ANEXOS

### Morfometría del oosporangio de *Chara hydrophytes*

No. Individuo	Oosporangio		Oosfera		Célula coronular	
	Longitud	diametro	Longitud	diametro	Longitud	diametro
1	730,577	404,461	491,664	302,061	88,246	69,408
2	598,412	412,698	487,301	314,285	91,062	76,497
3	636,974	418,771	485,937	333,416	91,858	76,784
4	672,27	523,193	507,986	410,743	87,97	85,273
5	628,864	489,352	492,925	356,362	114,021	87,14
6	725,48	514,699	488,228	300,247	117,46	86,954
7	741,467	433,205	498,748	303,54	94,528	77,477
8	682,392	470,966	502,162	380,836	69,472	74,691
9	600,398	409,748	402,226	352,195	69,302	67,01
10	575,164	506,287	414,297	407,046	91,721	73,689
11	647,591	476,542	404,59	326,266	96,28	89,451
12	719,851	495,614	513,275	365,372	69,345	72,727
13	654,899	437,902	531,862	341,269	74,872	79,721
14	645,305	464,103	498,617	352,556	88,577	86,428
15	776,015	505,861	490,62	346,646	91,521	88,452
16	718,225	543,833	500,39	372,694	65,777	75,714
17	589,16	462,373	406,349	331,749	94,118	71,835
18	667,778	506,846	465,802	364,077	84,829	78,447
19	621,979	418,668	445,5	341,184	80,266	77,131
20	666,562	421,723	436,695	336,87	98,285	84,609
21	672,321	488,241	512,029	359,14	117,257	76,857
22	739,485	521,302	558,921	376,979	95,634	77,299
23	728,984	471,92	507,028	333,575	87,305	87,231
24	637,348	492,058	474,627	346,472	98,899	86,508
25	769,572	493,068	535,713	361,462	87,85	76,497
26	725,299	465,991	501,911	338,169	93,558	86,661
27	737,603	460,99	510,896	340,327	94,976	85,259
28	764,047	482,907	540,662	358,954	80,277	83,073
29	671,09	472,314	458,798	364,077	68,19	86,908
30	689,152	443,414	460,229	314,209	106,115	78,036

No. Individuo	Célula espiral		Célula estéril		Célula central		Célula pedicelar	
	Longitud	diametro	Longitud	diametro	Longitud	diametro	Longitud	diametro
1	71,833	65,659	16,404	103,989	17,068	43,12	36,074	123,797
2	60,864	61,603	16,274	106,774	17,958	52,239	47,701	124,127
3	59,841	56,601	38,75	118,094	13,979	58,892	52,411	130,538
4	66,28	54,444	29,474	100,119	20,577	49,666	47,428	113,123
5	69,103	70,479	31,306	90,03	14,974	50,719	34,603	114,319
6	52,142	63,504	21,031	109,173	12,307	55,624	55,363	139,145
7	62,403	58,892	39,183	98,343	16,952	48,626	36,03	127,086
8	64,993	53,254	19,002	93,345	10,294	51,864	51,824	137,421
9	54,724	63,025	16,361	110,126	22,108	64,751	46,012	139,928
10	57,142	50,639	39,949	109,951	17,464	64,32	52,38	137,592
11	63,523	65,736	36,996	115,509	16,657	52,957	58,464	130,635
12	60,05	64,692	37,85	99,432	13,888	58,236	39,539	138,403
13	52,025	63,503	24,105	109,903	17,821	47,942	44,29	124,423
14	67,875	58,624	22,619	90,55	14,682	47,561	45,239	130,516
15	70,22	55,845	35,178	113,05	13,775	50,807	48,563	125,151
16	64,306	53,718	20,581	113,928	16,666	55,399	44,677	120,301
17	53,911	58,496	21,825	105,678	17,46	57,606	45,411	136,962
18	64,993	64,188	24,426	115,944	12,46	62,028	39,85	126,427
19	50,792	62,381	23,479	108,971	17,577	53,458	45,853	137,693
20	54,977	65,707	19,641	93,766	12,907	44,909	34,794	125,768
21	67,576	56,35	16,835	100,51	10,794	44,254	38,08	121,081
22	66,913	60,798	34,457	116,583	13,683	42,593	43,477	126,716
23	58,473	52,021	37,867	105,663	14,291	50,059	46,582	131,387
24	67,666	59,126	24,313	109,069	16,07	63,666	50,551	137,549
25	60,942	59,318	35,158	102,639	15,435	49,091	38,657	135,324
26	65,217	66,784	39,682	115,276	18,382	58,57	48,316	138,968
27	64,799	55,192	30,962	99,641	22,622	52,626	49,883	129,98
28	67,027	57,013	24,683	105,308	14,682	52,021	38,155	131,349
29	59,552	50,747	19,749	96,187	11,054	45,939	42,155	135,154