

Tesi doctoral presentada per En/Na

**Noemi SALVADOR SOLER**

amb el títol

**"El gènere *Bonnemaisonia* (Bonnemaisoniales,  
Rhodophyta) a la Península Ibèrica i les illes Balears:  
taxonomia, cicles vitals, corologia i aplicacions"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

FARMÀCIA

Barcelona, 23 d'octubre de 2009.

**Facultat de Farmàcia  
Departament de Productes Naturals,  
Biologia Vegetal i Edafologia**



UNIVERSITAT DE BARCELONA





## ***RESULTATS I DISCUSSIÓ***



# RESULTATS I DISCUSSIÓ

## 1. Revisió taxonòmica del gènere *Bonnemaisonia* a la península Ibèrica

### 1.1. Estudi morfoanatòmic comparatiu de *B. asparagoides* i *B. clavata*

*Bonnemaisonia asparagoides* i *B. clavata* són dues espècies de gran semblança morfològica, tant pel que fa al seus gametòfits com a les seves generacions tipus “Hymenoclonium”, que presenten a més unes distribucions mundials que se solapen. Aquests fets, juntament amb l'escassa informació sobre l'estructura vegetativa de *B. clavata* present a la bibliografia, han fet que ambdues espècies sovint s'hagin confós en absència de les seves estructures reproductores i, fins i tot, que alguns autors les hagin considerat indistingibles en aquest estat (Dixon & Irvine 1977).

D'altra banda, els principals caràcters taxonòmics relacionats amb l'hàbit dels gametòfits (color, mida i tipus de ramificació) utilitzats per autors anteriors per separar les dues espècies han resultat ser molt variables i, per tant, de poc valor taxonòmic. Pel que fa al color dels gametòfits, les nostres observacions estan d'acord amb les de Dixon & Irvine (1977), atès que a la península Ibèrica *B. asparagoides* també presenta un color més vermell que *B. clavata*, que és més rosada. No obstant això, aquest caràcter només és clar quan l'alga es troba al seu medi natural o n'acaba de ser extreta, mentre que els espècimens d'herbari perden ràpidament la coloració. Pel que fa a la mida, Dixon & Irvine (1977) reportaren una mida més gran de *B. asparagoides* (fins a 40 cm) en comparació amb *B. clavata* (fins a 15 cm). Contràriament, els nostres espècimens de *B. clavata* (fins a 19 cm) presentaren una mida més gran que els de *B. asparagoides* (fins a 12 cm). Respecte al patró de ramificació d'acord amb Feldmann & Feldmann (1942), *B. asparagoides* presenta una ramificació dística, mentre que la de *B. clavata* és irregularment dística. No obstant això, les nostres observacions demostren que aquest caràcter pot variar amb la profunditat.

Dixon & Irvine (1977) també proposaren per distingir *B. asparagoides* de *B. clavata* els caràcters anatòmics següents: el diàmetre del filament principal (800 µm a *B. asparagoides* i 500 µm a *B. clavata*), la longitud del ràmul llarg (fins a 3 i 15 mm, respectivament) i l'angle entre els ràmuls i el filament principal (45-60° i 80-100°,

respectivament). Malgrat això, aquests caràcters tampoc no van resultar útils per separar els nostres espècimens.

L'estudi morfoanatòmic comparatiu fet entre *B. asparagoides* i *B. clavata* durant aquesta tesi va proporcionar nous caràcters taxonòmics per distingir ambdues espècies, tant pel que fa a l'hàbit i anatomia dels seus gametòfits com a les seves generacions "Hymenoclonium" corresponents.

Respecte al gametòfit, els caràcters taxonòmics nous que es presenten en aquesta tesi són l'estructura i la forma del tal·lus (*B. asparagoides* és d'estructura simpòdica i forma palmada, mentre que *B. clavata* és d'estructura monopòdica i forma triangular), la relació longitud/amplada de les cèl·lules axials dels filaments principals (6-11 vegades més llarga que ampla a *B. asparagoides* i entre 15-30 a *B. clavata*), la forma de les cèl·lules corticals internes (esfèriques a *B. asparagoides* i ovoides a *B. clavata*), el tipus de tricògina (recta a *B. asparagoides* i espiralada a *B. clavata*), la forma del pericarpí (simètrica a *B. asparagoides* i asimètrica a *B. clavata*) i, finalment, el nombre de carposporangis per cistocarp (menys de 35 a *B. asparagoides* i més de 60 a *B. clavata*).

Els processos de fixació, segmentació i germinació de les carpòspores en cultiu també van presentar diferències en aquestes dues espècies, i tots ells van ser més ràpids en *B. clavata* que en *B. asparagoides*. Comparativament, les carpòspores de *B. clavata* es fixen abans que les de *B. asparagoides* (12 hores i 24 hores, respectivament) i també completen el seu procés de segmentació abans (24 hores i 48 hores, respectivament). El patró de desenvolupament de l' "Hymenoclonium" també va ser diferent entre les dues espècies, tant des d'un punt de vista morfològic com fisiològic. En primer lloc, les carpòspores de *B. asparagoides* germinen mitjançant 4-10 protuberàncies distribuïdes radialment que es convertiran en els filaments principals del tal·lus (patró estrellat). En canvi, les de *B. clavata* germinen mitjançant un nombre menor de protuberàncies (2-6) encara que només dues de les situades en sentit oposat es convertiran en els filaments principals del tal·lus (patró bipolar). En conseqüència, la generació "Hymenoclonium" de *B. asparagoides* és una crosta amb forma de disc mentre que la de *B. clavata* és una crosta allargada irregular. Finalment, també constatarem diferències en la taxa de creixement d' "Hymenoclonium" de *B. clavata* i *B. asparagoides*, que van ser de 24  $\mu\text{m dia}^{-1}$  i 11  $\mu\text{m dia}^{-1}$  respectivament durant la tercera setmana, i de 27  $\mu\text{m dia}^{-1}$  i 8  $\mu\text{m dia}^{-1}$  durant la quarta setmana de cultiu.

Quant a la generació “Hymenoclonium”, es presenten com a caràcters inèdits distintius els següents: la forma del tal·lus (discoïdal a *B. asparagoides* i allargada a *B. clavata*), el tipus de ramificació primària (ramificacions de longitud similar a *B. clavata* i desigual a *B. asparagoides*), la presència de rizoides ( presents a *B. asparagoides* i absents a *B. clavata*) i, finalment, la forma i/o les dimensions de les cèl·lules. Les cèl·lules de primer ordre tenen forma de tonell a *B. asparagoides* i, per tant, són més amples (20-24 µm) que les de *B. clavata*, que són allargades i estretes (10-14 µm); les de segon ordre també són més amples a *B. asparagoides* (26-45 µm) que a *B. clavata* (14-20 µm) i les de tercer ordre són hemisfèriques a *B. asparagoides* i esfèriques a *B. clavata*.

Finalment, en aquest estudi comparatiu es descriuen per primera vegada per a *B. clavata* algunes estructures que havien estat descrites prèviament per a *B. asparagoides*, com ara la presència de pèls unicel·lulars hialins (Rueness & Åsen 1982), la germinació *in situ* de carposporangis dins del cistocarp (Feldmann & Feldmann 1942, De Valera & Falan 1964) i la presència de cèl·lules allargades semblants a rizoides cobrint parts malmeses del còrtex o bé intricadament unides a altres algues o a restes de matèria inorgànica (Svedelius 1933).

## **1.2. Confirmació de la validesa taxonòmica de *B. clavata***

Durant molt de temps, alguns autors consideraren que *B. asparagoides* era dioica (Derbès & Solier 1856, Crouan & Crouan 1867) o, fins i tot, que presentava espècimens anòmals amb un gran desenvolupament de les branques espermatangials (Chemin 1928). Finalment, Hamel (1930) va concloure que fins aleshores s’havien confós dues espècies diferents del gènere *Bonnemaisonia*: *B. asparagoides* (monoica i amb branques espermatangials petites) i *B. clavata* (dioica amb branques espermatangials grans i espècimens femenins desconeguts). Posteriorment, la hipòtesi de Hamel va ser corroborada amb la trobada d’espècimens femenins de *B. clavata* a la costa d’Algèria (Feldmann & Feldmann 1942).

Per tal de confirmar la validesa taxonòmica de les observacions comentades anteriorment per a *B. clavata* i *B. asparagoides*, vam calcular el percentatge de

divergència entre les seqüències del gen *rbcL* d'aquestes espècies. Aquest gen, que codifica per a la subunitat llarga de la Rubisco, es caracteritza per la seva bona resolució a nivell d'espècies (Harper & Saunders 2001, Saunders & Lehmkuhl 2005, Wilkes *et al.* 2005, 2006).

Les seqüències parcials del gen *rbcL* (més de 1.200 pb) que es van obtenir de *B. asparagoides* i *B. clavata* van ser un 7,66 % diferents. Aquest percentatge de divergència es troba dins el rang observat en les diferents *Bonnemaisoniaceae* incloses a l'estudi, que va d'un 5,28 % (*Delisea flaccida* vs. *Delisea pulchra*) fins a un 12,54 % (*D. pulchra* vs. *B. hamifera*). S'han observat rangs similars de divergència genètica en altres famílies d'algues vermelles, com ara les *Halymeniaceae* (Wang *et al.* 2000, De Clerck *et al.* 2005) i les *Rhodymeniaceae* (Wilkes *et al.* 2006).

Les nombroses diferències observades entre *B. clavata* i *B. asparagoides* exposades anteriorment, juntament amb la divergència genètica d'aquestes espècies, demostren la validesa taxonòmica de l'espècie *B. clavata*, i refuten, per tant, la proposta de Guiry (2002), que considerà el caràcter monoic/dioic com l'única diferència observable entre *B. clavata* i *B. asparagoides*. Segons aquest autor, *B. clavata* i *B. asparagoides* podrien ser diferents entitats d'una mateixa espècie, com succeeix a *Mastocarpus stellatus*, espècie que presenta una entitat monoica amb un cicle vital directe sense tetrasporòfit i una entitat dioica amb un tetrasporòfit heteromòrfic.

### **1.3. Estudi de la posició sistemàtica de *B. hamifera* dins la família *Bonnemaisoniaceae***

Des que es va descriure l'espècie *B. hamifera*, la seva posició taxonòmica ha estat variable. Descrita com una *Bonnemaisonia* per Hariot, més tard Okamura (1921) la va transferir al gènere *Asparagopsis* per la disposició helicoïdal dels ràmul·ls curts i la forma penicil·lada i filiforme de les branques (Feldmann & Feldmann 1942, Chihara 1961). Posteriorment, Feldmann & Feldmann (1942) la van incloure novament al gènere *Bonnemaisonia* basant-se en el fet que els ràmul·ls curts no presenten tres cèl·lules pericentrals, que la presència d'hams no és exclusiva d'aquesta espècie, en el contingut refringent i incolor de les cèl·lules vesiculars així com la seva posició, en la disposició

de les estructures reproductores, en la formació de cèl·lules nutritives només a partir de la cèl·lula hipògina i en el reduït nombre de carpòspores. No obstant això, Chihara & Yoshizaki (1972) destacaren novament altres similituds de *B. hamifera* amb el gènere *Asparagopsis* basant-se en la petita mida de les carpòspores i en la seva germinació tipus bipolar, així com en la presència comuna d'un tetrasporòfit filamentós tipus "Trailliella". Finalment, quan aquests autors dividiren les *Bonnemaisoniaceae* en dos grups, *B. hamifera* es va ajuntar amb les espècies del gènere *Asparagopsis*, mentre que *B. asparagoides* va quedar amb una *Delisea* i una *Ptilonia*. Segons Chihara & Yoshizaki (1972), la diversitat del gènere *Bonnemaisonia* els feia considerar la possibilitat de dividir-lo en dos gèneres diferents. No obstant això, van decidir postergar aquesta decisió perquè no disposaven d'informació sobre el cicle vital de *Bonnemaisonia geniculata* i el seu tipus de germinació (Chihara & Yoshizaki 1972). Més tard, Shevlin & Polanshek (1978) van descriure el cicle de *B. geniculata*. El seu estudi va posar de manifest que de les cinc espècies de *Bonnemaisonia* amb cicle conegut dues presentaven un tetrasporòfit tipus "Trailliella" (*B. hamifera* i *B. nootkana*), en altres dues (*B. asparagoides* i *B. clavata*) aquest era de tipus "Hymenoclonium" mentre que el de *B. geniculata* no corresponia a cap d'aquests (Shevlin & Polanshek 1978). Aquestes observacions junt amb el diferent tipus de germinació de la carpòspora (*double bipolar*) observada a *B. geniculata* demostra una diversitat del gènere més gran que la suggerida per Chihara & Yoshizaki (1972).

L'estudi de l'estructura vegetativa i reproductora de *B. hamifera* que es va fer en aquesta tesi doctoral proporcionà característiques inèdites per a aquesta espècie, una que és exclusiva d'ella, unes altres que aproximen *B. hamifera* al gènere *Bonnemaisonia*, però també vam trobar característiques que l'aproximen novament al gènere *Asparagopsis*.

*Bonnemaisonia hamifera* presenta en comú amb el gènere *Bonnemaisonia* una tricògina llarga ( $97 \pm 34 \mu\text{m}$ ) —en comparació amb les observades a *Asparagopsis armata* per Svedelius (1933) i a *Asparagopsis taxiformis* per Kumar *et al.* (1999, 2000)—, i la forma de les cèl·lules axials, que són completament cilíndriques, a diferència de les d'*Asparagopsis*, que tenen la part apical rodona (Børgesen 1916).

Els caràcters que *B. hamifera* comparteix amb *Asparagopsis* són la disposició en grups (i no en roseta) de les cèl·lules corticals externes, la presència de sinapsis secundàries a



les cèl·lules corticals internes, la longitud de les cèl·lules axials, la presència de filaments medul·lars en disposició paral·lela a l'eix central, la presència d'una branca carpogonial envoltada per una papil·la mucilaginosa i d'un pericarpí que es comença a desenvolupar abans de la fecundació del carpogoni i, finalment, un cicle amb una generació diploide erecta i que produeix tetràspores (vegeu Salvador *et al.* 2005, pàg. 51). Algunes d'aquestes característiques s'han descrit prèviament en el gènere *Asparagopsis*, com ara la presència de filaments medul·lars que discorren al llarg de l'espai que queda entre el filament axial i les cèl·lules corticals internes observada a *A. taxiformis* per Børgesen (1916) i posteriorment per Jha & Vijayaraghavan (1998), així com a *A. armata* per Bonin & Hawkes (1987). La papil·la mucilaginosa i el pericarpí de prefecundació han estat descrits a *A. taxiformis* per Kumar *et al.* (1999, 2000). També en el treball de Kumar *et al.* (1999) se suggereix la presència de sinapsis secundàries a *A. taxiformis*.

Finalment, l'única característica nova exclusiva de *B. hamifera* i que, per tant, no comparteix amb cap de les espècies d'*Asparagopsis* ni de *Bonnemaisonia* presents a la península Ibèrica seria que les cèl·lules corticals internes són plurinucleades.

L'estudi de la sistemàtica molecular de la família *Bonnemaisoniaceae* fet amb l'objectiu de determinar la posició taxonòmica de *B. hamifera* mitjançant la seqüenciació de dues regions de DNA, una regió cloroplàstica (*rbcL*) i una de nuclear ribosòmica (*SSU*), va mostrar l'estreta relació entre els gèneres *Asparagopsis* i *Bonnemaisonia*, mencionada anteriorment, a la majoria de les anàlisis moleculars agrupats en la mateixa clada encara que amb poc suport.

No obstant això, les filogènies obtingudes en aquest treball no van permetre resoldre la posició taxonòmica de *B. hamifera*. Els arbres filogenètics generats (NJ/MP/IB) a partir de l'anàlisi del gen *SSU* no van agrupar les espècies del gènere *Bonnemaisonia* i, fins i tot, va aparèixer *B. asparagoides* com a espècie germana a la clada dels *Asparagopsis* (68/-/0,87). Es van provar dues hipòtesis diferents mitjançant el test Shimodaira-Hasegawa: d'una banda, la possible monofília del gènere *Bonnemaisonia* i, de l'altra, la inclusió de l'espècie *B. hamifera* a la clada dels *Asparagopsis*. En els dos casos, els resultats dels tests no van permetre refutar aquestes hipòtesis. Contràriament, les tres espècies de *Bonnemaisonia* van ser clarament resoltes als arbres del gen *rbcL* i *B. asparagoides* s'agrupà fortament amb *B. clavata* (100/88/1,00). Aquests resultats

corroboren la consideració de *B. asparagoides* i *B. clavata* com a espècies diferents, com es demostrà anteriorment mitjançant la taxonomia clàssica (vegeu Salvador *et al.* 2008, pàg. 31). La confusió generalitzada d'aquests dos tàxons va quedar novament reflectida en el fet que dues seqüències dipositades al GenBank com a *B. asparagoides* (AF212188, U26813) diferiren de la nostra seqüència de *B. asparagoides* per uns 84-86 nt (6,81-6,97%), una diferència prou gran per ser considerades espècies diferents, mentre que amb la seqüència de *B. clavata* només van ser diferents per uns 9-11 nt (0,73-0,89%). Aquests resultats suggereixen que els espècimens d'on provenen les seqüències AF212188 i U26813 correspondrien en realitat a l'espècie *B. clavata*.

Respecte a la família *Bonnemaisoniaceae*, en els arbres ML i MP del gen *rbcL* aquesta família va quedar agrupada majoritàriament en dos clades germanes, la clada *Bonnemaisonia/Asparagopsis* i la clada *Delisea/Ptilonia*, amb cert suport estadístic (77/76/1,00). En canvi, l'arbre filogenètic obtingut a partir de les anàlisis bayesianes va mostrar que les espècies del gènere *Bonnemaisonia* formen un grup monofilètic amb la clada *Delisea/Ptilonia* (69/-/0,52) i que la clada dels *Asparagopsis* és germana a les altres bonnemaisoniales. Finalment, les anàlisis de distància van diferir amb totes les altres en el fet de no resoldre el gènere *Asparagopsis* com a monofilètic. No obstant això, encara que els arbres filogenètics generats a partir de l'anàlisi del gen *SSU* també mostraren una clada *Delisea/Ptilonia*, aquesta en canvi és germana però amb suport dèbil (52/81/-) a una clada formada per dues espècies de la família *Naccariaceae* (*Naccaria wiggii* (Turner) Endlicher, *Reticulocaulis mucosissimus* Abbott) i *Delisea hypneoides* Harvey, aquesta última agrupada amb *R. mucosissimus* (99/94/0,92) en comptes d'estar-ho amb l'altra *Delisea* inclosa dins l'anàlisi. Per contra, l'estudi molecular de Ní Chualáin *et al.* (2004) també mostrà una clada *Delisea/Ptilonia* que en canvi es va agrupar a la clada *Bonnemaisonia/Asparagopsis*, però sense suport.

Respecte al gènere *Delisea*, en les filogènies obtingudes del gen *rbcL* va ser parafilètic amb *Ptilonia magellanica* (Montagne) Agardh o monofilètic, depenent de les anàlisis, i en les del gen *SSU* polifilètic. No obstant això, l'associació inesperada entre les espècies de *Delisea* i *Ptilonia* podria ser un artefacte produït per l'escassa representació d'aquests gèneres al GenBank.

Les bonnemaisoniales com a ordre van ser clarament resoltes en una clada amb un suport entre total i moderat segons les anàlisis (77/76/1,00) del gen *rbcL*. Tots els gèneres van

ser no resolts almenys en una anàlisi o generalment resolts amb poc suport. En canvi, en el context del gen *SSU* l'ordre *Bonnemaisoniales* no va constituir un grup monofilètic en cap anàlisi a causa de la seqüència d'*Atractophora hypnoides* Crouan et Crouan procedent d'un espècimen del nord de Gal·les (AY772728, Ní Chualáin et al. 2004). Aquesta espècie s'agrupà en totes les anàlisis amb les gigartinals, encara que amb un suport variable [-/-/0,85 amb *Peyssonnelia* sp., 65/-/0,99 amb *Peyssonnelia* sp. i *Solieria robusta* (Greville) Kylin]. Sense considerar *Atractophora*, les bonnemaisoniales van formar una clada amb poc suport o total segons les anàlisis (84/66/1,00) amb tres llinatges reconeixibles, un grup que incloïa les espècies de *Bonnemaisonia* i *Asparagopsis* (83/-/1,00) amb una clada de llargues branques del gènere *Asparagopsis* amb un bon suport estadístic (100/100/1,00) i un gènere *Bonnemaisonia* parafilètic, una segona clada que incloïa *Delisea pulchra* (Greville) Montagne i *Ptilonia australasica* Harvey amb poc suport (56/64/0,67) i una tercera clada (100/98/1,00) que incloïa les espècies *N. wiggii* i *R. mucosissimus* (ambdues *Naccariaceae*) juntament amb *D. hypnoides*.

Aquests resultats confirmen, d'una banda, el manteniment de les bonnemaisoniales com un ordre dins la classe *Florideophyceae*, tal com van demostrar prèviament Freshwater et al. (1994) i Le Gall & Saunders (2007), i, de l'altra, la integració dins d'aquest ordre de les famílies *Naccariaceae* i *Bonnemaisoniaceae*, tal com proposaren Feldmann & Feldmann l'any 1942. Aquests autors transferiren les *Naccariaceae* de les nemalionals a les bonnemaisoniales basant-se en un desenvolupament gonimoblàstic similar i especialment en la presència de filaments nutritius. No obstant això, encara que les relacions entre els tres llinatges (*Bonnemaisonia/Asparagopsis*, *Delisea/Ptilonia* i *Naccariaceae/Delisea hypnoides*) no són prou clares, aquest estudi representa la primera estimació de les relacions filogenètiques dins la família *Bonnemaisoniaceae*. Finalment, respecte a la posició taxonòmica de *B. hamifera*, els nostres resultats no permeten descartar si aquesta espècie en realitat pertany al gènere *Asparagopsis* o bé si el gènere *Bonnemaisonia* s'hauria de dividir.

#### 1.4. Determinació de la distribució de les tres espècies a la península Ibèrica

Com hem comentat anteriorment, *B. asparagoïdes* i *B. clavata* sovint s'han confós a causa fonamentalment de la seva similitud morfològica, de la dificultat de determinar-les en absència de les estructures reproductores i del fet que presenten una distribució mundial molt semblant.

L'estudi morfoanatòmic portat a terme en aquesta tesi doctoral va posar de manifest nous caràcters taxonòmics per permetre determinar amb exactitud les dues espècies. Seguint aquests nous criteris d'identificació vam revisar els espècimens d'aquestes espècies dels herbaris nacionals i europeus més importants.

Les nostres observacions mostren que a la península Ibèrica, *B. asparagoïdes* està àmpliament distribuïda a les costes atlàntiques (Guipúscoa, Biscaia, Lugo, A Coruña, Pontevedra i Baixo Alentejo) i mediterrànies (Alacant, illes Columbrets, Girona i illes Balears). Encara que *B. asparagoïdes* estava citada en diverses províncies de la costa andalusa, la revisió dels exemplars d'herbari d'aquesta costa va permetre esmenar un conjunt de plecs determinats incorrectament com a *B. asparagoïdes* i que en realitat corresponien a *B. clavata*. Així doncs, encara que de moment s'anul·len les cites de *B. asparagoïdes* a les costes andaluses, estem segurs que noves prospeccions permetran confirmar la presència d'aquesta espècie en aquesta zona.

Els plecs d'herbari de *B. asparagoïdes* anteriors a l'any 1950 (Menorca, cap a Canutells, 28-09-1889, cistocarps, J. J. Rodríguez, MA-Algae 4132; Menorca, 28-09-1891, cistocarps, J. J. Rodríguez, PC 72714; Ibíd., 18-09-1891, cistocarps, J. J. Rodríguez, PC 72715; Gijón, 16-09-1895/05-10-1895, cistocarps, PC 72712) no s'han utilitzat per a l'elaboració dels mapes de distribució.

*Bonnemaisonia clavata* està present tant a les costes atlàntiques com a les mediterrànies de la península Ibèrica. No obstant això, a diferència de *B. asparagoïdes*, aquesta espècie es troba escassament distribuïda al litoral atlàntic (Biscaia, A Coruña i Cadis) i ben representada al llarg del litoral mediterrani (Almeria, Alacant, illes Columbrets, Girona i illes Balears).

La revisió del material d'herbari va permetre demostrar la confusió freqüent entre *B. asparagoïdes* i *B. clavata*. Tots els herbaris revisats presentaren espècimens identificats

incorrectament, set dels quals, determinats com a *B. clavata*, van ser esmenats com a *B. asparagoides* (PC 72806, PC 72807, PC 72810, PC 72811, PC 72812, PC 72813, VAL-Algae 1242) i dinou que havien estat determinats com a *B. asparagoides* van ser esmenats com a *B. clavata* (Guétary, 29/07/1928, Herbarium H. Kylin, GB; Banyuls-sur-mer, 11/08/1955, Herbarium T. Levring, GB; PC 0072776; HGI-A 3197; HGI-A 3198; HGI-A 2541; HGI-A 3202; HGI-A 3203; HGI-A 3204; HGI-A 3205; HGI-A 3206; BCN-Phyc. 1626; BCN-Phyc. 1628; BCN-Phyc. 1630; MGC-Phyc. 1478; MGC-Phyc. 3745; VAL-Algae 40; VAL-Algae 45; SANT-Algae 7398). El nombre elevat d'espècimens femenins de *B. clavata* d'herbari determinats incorrectament suggereix que l'error prové de confondre els ràmuls curts amb les petites branques espermatangials de *B. asparagoides*. Finalment, un plec determinat com a *Plocamium asparagoides* (PC 0072775) va ser esmenat com a *B. asparagoides*.

El nostre material recol·lectat i els espècimens d'herbari revisats han proporcionat un millor coneixement de la distribució d'aquestes espècies a la península Ibèrica i les illes Balears. Se cita per primera vegada *B. clavata* a Andalusia i a les illes Balears (vegeu Salvador *et al.* 2006, pàg. 83). D'altra banda, un plec d'herbari citat com a *B. asparagoides* (VAL-Algae 1242) de les illes Chafarinas (no incloses en els nostres mapes) també va correspondre a *B. clavata*.

Pel que fa a la generació tipus “Hymenoclonium” de les dues espècies, l'escassetat de cites a la costa ibèrica (Soto Moreno 1987, Rull *et al.* 1987, Barceló 1990) i de plecs d'herbaris existents pot ser deguda probablement al fet que hagin passat desapercbudes per la seva mida petita i pel poc coneixement de la seva morfoanatomia. L'únic plec d'*Hymenoclonium serpens* present als herbaris revisats (SANT-Algae 7569) no va correspondre ni a *B. asparagoides* ni a *B. clavata*. Encara que amb una morfologia similar als “Hymenoclonium” d'aquestes espècies —pel fet de presentar un tal·lus crostós—, aquest espècimen no presenta els caràcters taxonòmics descrits en aquesta tesi doctoral per a les generacions prostrades de *B. asparagoides* i *B. clavata* i mostra a més tetrasporangis.

Respecte a la distribució mundial de *B. asparagoides* i *B. clavata*, els dos tàxons presenten una distribució similar a l'Atlàntic, des d'Europa (Regne Unit, França, Portugal i Espanya) fins al Marroc, i a la conca mediterrània (França, Grècia, Itàlia, Espanya, Algèria i Tunísia). No obstant això, *B. asparagoides* presenta una distribució

més àmplia que *B. clavata* ja que està present a latituds elevades, com ara Noruega, Suècia i Irlanda (Hamel 1930, South & Tittley 1986, Perret-Boudouresque *et al.* 1989, Benhissoune *et al.* 2002, Furnari *et al.* 2003, Guiry & Guiry 2009).

L'àmplia distribució mundial de *B. hamifera* contrastà amb la seva escassa presència a la península Ibèrica, restringida a les costes de Guipúscoa i Biscaia. No obstant, segons Ignacio Bárbara (comunicació personal) també ha estat trobada recentment a Lugo. Respecte a la costa mediterrània, el gametòfit d'aquesta espècie va ser citat per Conde *et al.* (1996) a Màlaga i posteriorment per Furnari *et al.* (2003) a Sicília i a la costa italiana peninsular. No obstant això, posteriorment Francisco Conde rectificà la seva cita (comunicació personal) i Cormaci *et al.* (2004) van fer el mateix en la seva revisió de les espècies exòtiques del Mediterrani, i van indicar finalment que aquesta espècie al Mediterrani només es trobava representada pel seu esporòfit (tipus "Trailliella"). A la península Ibèrica l'esporòfit va ser citat només a Almeria (Ballesteros & Catalán 1984, Soto & Conde 1989).

No obstant això, durant l'estudi de la comunitat de coral·ligen de *Lithophyllum stictaeforme* de les costes de Catalunya, portat a terme al nostre laboratori per José António Morais e Silva i dirigit pel Dr. Jordi Rull, es va posar de manifest la presència d'un espècimen gametofític de *B. hamifera* de petites dimensions amb un cistocarp sense carposporangis en una mostra de 28 m de profunditat (l'Hospitalet de l'Infant, Tarragona, 06/06/2007, BCN-Phyc 3234). Aquesta observació constitueix, per tant, la primera cita del gametòfit d'aquesta espècie al Mediterrani (vegeu annex, pàg. 199).

Dels plecs revisats de *B. hamifera*, dos de l'herbari del Museu Britànic estaven determinats incorrectament, un corresponia a *B. asparagoides* (Lundy, 06/08/1969, BM 000774643) i l'altre a *Hypnea musciformis* (Escòcia, juny 1852, BM 000774634).

Per tant, en total es van esmenar trenta plecs d'herbari del gènere *Bonnemaisonia*, dels quals vint-i-sis van correspondre a confusions entre els tàxons *B. asparagoides* i *B. clavata*. Dues cites d'aquesta última espècie van ampliar la seva distribució a la península Ibèrica i la cita de *B. hamifera* va representar la primera per al Mediterrani.

## 2. Descripció del cicle vital de *B. asparagoides* i *B. clavata*

### 2.1. El desenvolupament del gametòfit a partir d' "Hymenoclonium"

Els cultius de carpòspores de *B. asparagoides* i *B. clavata* realitzats en cambres de cultiu sota condicions controlades van donar lloc al seus corresponents "Hymenoclonium", els quals van desenvolupar joves gametòfits. Aquests gametòfits van aparèixer al cap de dos mesos de cultiu en *B. clavata*, mentre que en *B. asparagoides* van aparèixer al cap de quatre mesos de cultiu. Només en *B. clavata*, i després de tres mesos de cultiu, els gametòfits van formar estructures reproductores, que van ser sempre masculines.

En cap cas es van observar tetràspores sinó que els gametòfits van créixer directament sobre el tal·lus de l' "Hymenoclonium". Els estadis inicials de desenvolupament dels gametòfits només es van poder observar en *B. asparagoides*. No obstant això, com que els dos tàxons van mostrar el mateix tipus de desenvolupament del gametòfit, es pot deduir que les dues espècies presenten els mateixos estadis inicials de desenvolupament del gametòfit. Els gametòfits es desenvoluparen directament a partir de cèl·lules apicals dels filaments de tota l'extensió de l' "Hymenoclonium". Les cèl·lules apicals que donaren lloc a gametòfits eren de color rosat i estaven cobertes per una capa mucilaginosa gruixuda, i es distingien clarament de les cèl·lules apicals normals, que eren de color vermell i amb la coberta mucilaginosa fina. Les observacions de Feldmann & Feldmann (1942) van ser similars a les descrites anteriorment tenint en compte els dibuixos que van fer (figura 1a, pàg. 21). Les cèl·lules que iniciaren els joves gametòfits es dividiren ràpidament per formar unes protuberàncies amb quatre cèl·lules uninucleades semblants a tetrasporangis. De fet, aquestes estructures recorden les considerades com a tetrasporangis (figura 1a, pàg. 21) per Feldmann & Feldmann (1942). En canvi, Kylin (1945) va obtenir les mateixes estructures però observà sinapsis entre les seves cèl·lules (figura 1b, pàg. 21), cosa que descartava que aquestes estructures fossin tetrasporangis. En els nostres cultius tampoc es va observar una alliberació d'espores a partir d'aquestes estructures, sinó que una cèl·lula de la protuberància originà el nou gametòfit, mentre que les altres tres cèl·lules van romandre lateralment sense dividir-se. Després d'unes quantes divisions, es començà a diferenciar un petit gametòfit amb la característica cèl·lula apical de les espècies de *Bonnemaisonia*

tal com va reflectir Kylin (1945) en els seus dibuixos (figura 1b, pàg. 21). Posteriorment, els joves gametòfits començaren a formar les seves primeres cèl·lules secretores, els primers rizoides basals i s'insinuà la seva característica ramificació dística. En les dues espècies els gametòfits assoliren com a màxim una longitud d'1,5 cm. Aquesta longitud també va ser la màxima que assoliren els gametòfits obtinguts en els cultius de Chihara (1962) amb altres *Bonnemaisoniales*.

Les nostres observacions confirmen, d'una banda, que la generació tipus "Hymenoclonium" de *B. asparagoides* no forma tetrasporangis, contràriament al que van opinar Feldmann & Feldmann (1942, 1946) i Magne (1960), i, de l'altra, que els joves gametòfits creixen directament sobre el tal·lus de l' "Hymenoclonium" tal com observaren altres autors (Chemin 1937, Feldmann & Mazoyer 1937, Feldmann 1966, Cortel-Breeman 1975). De fet, aquest tipus de creixement directe també s'ha observat en diverses espècies de l'ordre *Bonnemaisoniales*, com ara *A. hypnoides*, *Delisea compressa* Levring, *D. pulchra* [com a *Delisea fimbriata* (Lamouroux) Montagne], *N. wiggii*, *P. magellanica* (com a *Ptilonia okadai* Yamada) i *Ptilonia mooreana* Levring (Chihara 1962, Boillot 1967, Bonin & Hawkes 1988a, 1988b). Chihara (1962) va suggerir que el cicle vital d'aquests tàxons corresponia al tipus "Nemalion", cicle vital on s'alternava un gametòfit haploide amb un carposporòfit haploide. Les nostres observacions, però, com s'explica en l'apartat 2.3, suggereixen que el cicle vital de *B. asparagoides* i *B. clavata* correspon al tipus "Lemanea".

## **2.2. Demostració de l'existència de la divisió meiòtica i la seva localització en el cicle vital d'aquestes espècies**

L'anàlisi d'imatges mitjançant la mesura de l'àrea de fluorescència relativa (rfa) ens va permetre estimar el contingut de DNA nuclear dins les diferents generacions del cicle vital tant de *B. clavata* com de *B. asparagoides*, així com dels seus diferents tipus de cèl·lules.

L'estudi del contingut de DNA als espermacis i a les cèl·lules apicals gametofítiques, que d'acord amb Goff & Coleman (1990) presenten un genoma haploide replicat (2C), va ser fonamental per establir una relació entre els valors C i els valors rfa obtinguts per



anàlisi d'imatges. Aquesta relació entre valors rfa obtinguts i valors C estimats en els diferents tipus de cèl·lules de *B. asparagoides* i *B. clavata* estan resumits en les taules 1 i 2 (vegeu Salvador *et al.* 2009a, pàg. 91).

Els gametòfits de les dues espècies van mostrar nivells de ploïdia similars en cèl·lules homòlogues. Els espermacis i les cèl·lules apicals van mostrar valors de 3-6  $\mu\text{m}^2$  (rfa) que corresponien als nivells 1-2C i als estadis  $G_1$ - $G_2$ , respectivament. Respecte a les altres cèl·lules vegetatives, les cèl·lules corticals generalment mostraren valors 2-4C i les cèl·lules axials van ser les que van mostrar els nivells més alts de ploïdia registrats (fins a 96C). Aquest fet és degut que els gametòfits de *B. asparagoides* i *B. clavata* creixen a partir d'una cèl·lula apical uninucleada, que en dividir-se forma una cèl·lula axial que augmenta gradualment el nivell de ploïdia a la vegada que creix, especialment en longitud, al llarg de l'eix.

Els valors mínims observats als carposporangis de *B. asparagoides* (4C) i *B. clavata* (3C) representaren valors diploides. Aquest fet confirma, per tant, l'existència de fecundació en el cicle vital d'aquestes espècies i descarta que l' "Hymenoclonium" sigui un protonema, tal com van creure nombrosos autors (Chemin 1937, Feldmann & Mazoyer 1937, Kylin 1945, Feldmann 1966, Cortel-Breeman 1975), i que el desenvolupament directe del gametòfit sigui el resultat d'una apomeiosi (Hawkes 1990).

Encara que els carposporangis i les carpòspores de *B. asparagoides* i *B. clavata* presentaren el mateix comportament en les dues espècies, els nivells de ploïdia registrats per a *B. asparagoides* van ser sempre superiors als registrats per a *B. clavata*. Aquesta diferència en el contingut de DNA entre les espècies estudiades podria estar relacionada amb la diferent grandària dels seus carposporangis i carpòspores descrita en aquesta tesi doctoral (vegeu Salvador *et al.* 2008, pàg 31).

En les dues espècies, en els carposporangis es va observar un increment gradual del contingut de DNA nuclear durant la seva maduració i allargament, amb valors de 4, 8 i 16C a *B. asparagoides* i de 3 i 6C a *B. clavata*, mentre que a les carpòspores s'observà una disminució progressiva de DNA durant les primeres divisions de la carpòspora fixada (taules 1-2, Salvador *et al.* 2009a, pàg 91). Les carpòspores fixades, després d'alliberar-se i abans de dividir-se, van ser les que van presentar els nivells més alts de ploïdia (32C a *B. asparagoides* i 12C a *B. clavata*), mentre que després de la primera

divisió es van registrar valors de 8-16C a *B. asparagoides* i de 8C a *B. clavata*. El valor mínim de la generació diploide (2C) es va registrar per a les carpòspores amb més de quatre nuclis en les dues espècies.

Respecte a la generació “Hymenoclonium”, els nivells de ploïdia mínims registrats per a les cèl·lules vegetatives van ser els valors 2-4C a *B. asparagoides* i 2-3C a *B. clavata*. També les cèl·lules apicals dels filaments principals i dels secundaris presentaren valors diferents per a aquestes espècies. A *B. asparagoides* les apicals principals i secundàries mostraren valors semblants (8C), cosa que reflecteix el creixement uniforme de tots els filaments i que li proporciona el característic patró de desenvolupament estrellat. En canvi, a *B. clavata* les cèl·lules apicals principals presentaren nivells més alts de ploïdia que les apicals secundàries, possiblement perquè només els filaments principals presenten un creixement continu que proporcionarà a aquest tal·lus el seu característic desenvolupament bipolar.

Els nivells de ploïdia obtinguts en l'estudi del contingut del DNA nuclear dels diferents tipus de cèl·lules de les generacions gametòfit i “Hymenoclonium” confirmaren les observacions obtingudes a partir dels cultius. Encara que es van observar valors de 2-4C tant als gametòfits com a les generacions “Hymenoclonium” de les dues espècies, els nivells mínims de ploïdia registrats per al gametòfit (1-2C) i per a l’ “Hymenoclonium” (2-4C) demostren l'alternança de fases nuclears existent entre aquestes generacions.

La localització de les protuberàncies que originen els gametòfits i el seu posterior aïllament van permetre estimar el seu contingut de DNA per primera vegada. La reducció completa del nivell de ploïdia (1C) registrat per a les protuberàncies de l’ “Hymenoclonium” que originen els nous gametòfits demostrà citològicament l'existència d'una meiosi somàtica, dins d'aquestes protuberàncies, en el cicle de *B. asparagoides* i *B. clavata*.

D'altra banda, la mesura i la posterior comparació de l'àrea de fluorescència relativa (rfa) en diferents tipus de cèl·lules va posar en evidència els patrons de variació del contingut de DNA en el gametòfit i en l’ “Hymenoclonium” de cada espècie i com aquesta variació es pot relacionar amb el tipus de creixement i la morfologia de la planta (Goff & Coleman 1990). Aquest estudi mostrà que el creixement dels gametòfits de *B. asparagoides* i *B. clavata* és fruit de la divisió d'una cèl·lula apical amb un nucli no

poliploide (1-2C). Posteriorment, aquesta cèl·lula donarà lloc a cèl·lules axials amb nuclis poliploides i aniran augmentant de mida a la vegada que incrementaran el seu contingut de DNA. Per contra, encara que la generació “Hymenoclonium” també presenta un creixement apical, aquest, en canvi, s’inicia a partir d’una cèl·lula apical amb un nucli poliploide (4-8C) que donarà lloc a una cèl·lula filla que anirà disminuint el contingut de DNA fins a assolir els valors 2-4C a *B. asparagoides* i 2-3C a *B. clavata*. Per tant, es pot dir que mentre que el gametòfit creix mitjançant un augment progressiu del seu contingut de DNA, l’ “Hymenoclonium” ho fa mitjançant una reducció en cascada del seu contingut de DNA.

Goff & Coleman (1986) foren els primers a estudiar el patró de variació del contingut de DNA al tal·lus d’algunes espècies del gènere *Polysiphonia*. Posteriorment, aquests autors definiren cinc patrons de variació nuclear (*major nuclear patterns*) per a les florideofícies (Goff & Coleman 1990). Dels dos patrons observats a *B. asparagoides* i *B. clavata*, el del gametòfit seria el que Goff & Coleman (1990) van descriure per a les espècies dels gèneres *Microcladia*, *Antithamnion* i *Wrangelia*, entre d’altres. El de l’ “Hymenoclonium”, en canvi, no es recull en el treball mencionat, encara que aquests autors sí que van descriure el procés de reducció del contingut de DNA, que nosaltres observàrem a l’ “Hymenoclonium”, en el gènere *Polysiphonia* durant la formació de les cèl·lules pericentrals a partir d’una cèl·lula apical poliploide (Goff & Coleman 1990). Segons Garbary & Clarke (2002), aquest procés es podria explicar per l’absència de replicació de DNA al llarg de mitosis successives.

### **2.3. Definició del cicle vital d’aquestes espècies**

Inicialment, el cicle vital tipus “Bonnemaisonia” va ser definit com tipus “Asparagopsis” per Segawa & Chihara (1954) en el seu estudi sobre *Asparagopsis hamifera* (Hariot) Okamura. Més tard, Dixon (1973) va passar a anomenar-ho tipus “Bonnemaisonia” per tal de reflectir la reassignació d’*A. hamifera* al gènere *Bonnemaisonia* (Feldmann & Feldmann 1942). No obstant això, ni *B. clavata* ni tampoc *B. asparagoides* (espècie tipus del gènere) presenten el cicle vital descrit per Segawa & Chihara (1954). Per aquest fet, proposem el restabliment del nom anterior, tipus “Asparagopsis”, per descriure el cicle vital que inclou una seqüència de generacions

gametòfit, carposporòfit i tetrasporòfit morfològicament diferents, com seria el cas de *B. hamifera*, *A. armata* i *A. taxiformis*.

Tant les observacions obtingudes a partir dels cultius com les de l'estudi del contingut de DNA confirmen que el cicle vital de *B. asparagoides* i de *B. clavata* es caracteritza perquè presenta un sol tipus d'espores (les carpòspores), per la presència de meiosi somàtica en algunes cèl·lules apicals de la generació "Hymenoclonium" que donen lloc a unes protuberàncies semblants a tetrasporangis, i pel desenvolupament del gametòfit a partir d'una de les quatre cèl·lules originades. Per aquestes característiques podem dir que el cicle d'aquestes espècies correspon al tipus "Lemanea" (Magne 1967, Necchi & Carmona Jiménez 2002). Bonin & Hawkes (1988a, 1988b), en els seus estudis per a algunes espècies de *Delisea* i *Ptilonia*, també bonnemaisoniales, van suggerir aquesta possibilitat però sense arribar a demostrar-ho. La nostra conclusió representa, per tant, la primera referència del cicle "Lemanea" per a les rodofícies marines i, per tant, posa de manifest que la presència d'una meiosi somàtica no és exclusiva de l'ordre *Batrachospermales* (Necchi & Carmona Jiménez 2002).

### 3. Quantificació del DNA nuclear

#### 3.1. El contingut de DNA nuclear dins les *Bonnemaisoniales*

El nostre treball representa la primera aproximació a l'estudi del contingut del DNA nuclear a l'ordre *Bonnemaisoniales*. A més, ha permès incloure quatre gèneres i set espècies (*Asparagopsis armata*, *A. taxiformis*, *Bonnemaisonia clavata*, *B. asparagoides*, *B. hamifera*, *Ptilonia willana* Lindauer, *Delisea plumosa* Levring) a la base de dades de DNA de les algues del Dr. Kapraun (<http://people.uncw.edu/kapraund/DNA/>).

L'estimació de la grandària del genoma nuclear es va fer mesurant la intensitat de fluorescència (If) dels nuclis. En aquest treball la relació entre els valors C i els valors d'If obtinguts per anàlisi d'imatges i espectrofluorimetria es va establir mitjançant la mesura del contingut de DNA dels espermacis, els quals presenten valors 2C propis d'un genoma haploide replicat (Goff & Coleman 1990). La utilització dels eritròcits de pollastre (RBC) com a patró estàndard (2,4 pg) ens va permetre convertir els valors d'If obtinguts pels espècimens analitzats a picograms (pg). Els valors C estimats als diferents tipus de cèl·lules de les bonnemaisoniales emprades en aquest estudi estan resumits en les taules 1 i 2 (vegeu Salvador *et al.* 2009c, pàg. 109). Totes les mostres examinades presentaren poblacions de nuclis en fase de síntesi.

El contingut de DNA observat als espermacis madurs (2C) va oscil·lar entre 0,5-0,8 pg, i es va obtenir un rang de variació similar (0,6-0,85 pg) en extrapolar el nivell 2C a partir dels valors 4C obtinguts en les generacions esporofítiques o prostrades dels mateixos espècimens (taula 2, Salvador *et al.* 2009c, pàg. 109).

Les espècies del mateix gènere, d'una banda *A. armata* i *A. taxiformis* i de l'altra *B. clavata* i *B. asparagoides*, presentaren valors 2C similars. Només *B. hamifera* mostrà en les cèl·lules vegetatives valors 2C superiors (0,8 pg) als obtinguts en les altres dues espècies de *Bonnemaisonia* (0,6 pg).

La gran quantitat de material examinat dels tàxons de la península Ibèrica va permetre registrar una àmplia variació en el contingut del DNA dins una mateixa planta. La majoria dels gametòfits mostraren valors d'aproximadament el doble dels valors 2C obtinguts als espermacis. Aquests valors, que correspondrien a nivells 4C amb un rang

de 0,9-1,8 pg, van ser registrats tant per a les cèl·lules vegetatives com per als espermacis. Els carposporangis presentaren els continguts més grans de DNA observats (2,2 pg a *B. clavata*; 2,3 pg a *B. asparagoides*; 3,2 pg a *A. armata*) corresponents a valors 8C. Respecte a les generacions prostrades/espòrits, els espècimens examinats també presentaren una variació en el contingut de DNA en observar-se valors corresponents als nivells de ploïdia 4C i 8C a les cèl·lules vegetatives d'*A. armata*, *B. clavata* i *B. asparagoides*. Es va observar també una variació similar del contingut del DNA en el tal·lus dels espècimens examinats en el nostre estudi sobre la posició de la meiosi en el cicle de *B. clavata* i *B. asparagoides* mitjançant la mesura de l'àrea nuclear fluorescent (vegeu Salvador *et al.* 2009a, pàg. 91). S'han registrat variacions del DNA nuclear de més de dos ordres de magnitud en el mateix espècimen en els rodòfits (Goff & Coleman 1990, Kapraun 2005), augment que generalment s'associa amb un augment en la mida cel·lular tant a les algues verdes (Kapraun & Nguyen 1994) com a les vermelles (Kapraun 2005).

La mida del genoma nuclear de les bonnemaisoniales examinades va presentar un rang de 0,5-0,8 pg de valors 2C, mida genòmica que quedaria dins el rang descrit (0,22-2,85 pg) per les florideofícies (Kapraun 2005).

La superposició del contingut de DNA de les espècies examinades sobre un arbre filogenètic hipotètic, basat tant en filogènies de categories taxonòmiques superiors (Freshwater *et al.* 1994, Ní Chualáin *et al.* 2004, Le Gall & Saunders 2007) com en les obtingudes en aquesta tesi doctoral per a les bonnemaisoniales (vegeu Salvador *et al.* 2009b, pàg. 59), va permetre determinar la tendència evolutiva de la mida del genoma nuclear de les bonnemaisoniales.

La tendència evolutiva de la mida del genoma nuclear en aquest grup queda reflectida en la figura 1 (vegeu Salvador *et al.* 2009c, pàg. 109). Si es comparen els valors 2C (dels gametòfits) amb els 4C (que corresponen als valors de les generacions prostrades/espòrits en les espècies de la península Ibèrica) s'observa que, mentre que els gametòfits presenten una variabilitat reduïda (0,6-0,8 pg), les generacions prostrades/espòrits mostren, en canvi, una variabilitat més àmplia (1,2-1,7 pg). Una tendència evolutiva a incrementar la mida del genoma nuclear en les generacions prostrades/espòrits queda reflectida en la figura 1 i la taula 2 (Salvador *et al.* 2009c, pàg. 109), en què les espècies del gènere *Asparagopsis* són les que presenten els valors

4C més elevats (1,6 pg a *A. armata* i 1,7 pg a *A. taxiformis*) entre les generacions prostrades/espòrofits examinats. Les nostres observacions estarien d'acord amb Shevlin & Polanshek (1978) els quals suggeriren que si les espècies del gènere *Bonnemaisonia* tenen un ancestre comú, aleshores la generació tetrasporofítica hauria patit una extremada divergència evolutiva. Aquest alt contingut de DNA a la generació tipus "Falkenbergia" podria estar relacionat amb la seva major resiliència en comparació amb els seus gametòfits descrita per Andreakis *et al.* (2004). D'altra banda, la generació tipus "Falkenbergia" seria el principal sistema de propagació d'aquestes espècies (Ní Chualáin *et al.* 2004) considerades introduïdes i invasores (Cronk & Fuller 1995, Boudouresque & Verlaque 2002, Ribera Siguan 2002, Altamirano *et al.*, 2009). Aquesta relació entre espècies competitives o agressives i poliploidia o un elevat contingut de DNA nuclear s'ha descrit prèviament tant a les plantes amb flors (Stebbins 1971, Jackson 1976) com a les algues verdes (Kapraun & Martin 1987).

A les algues vermelles, el nucleotip basal (ancestral) es caracteritza tant per mides genòmiques petites com per complements cromosòmics petits (Kapraun 2005). Els estudis cariològics publicats fins ara només inclouen tres espècies dels gèneres *Asparagopsis* i *Bonnemaisonia*, les quals mostren un nombre cromosòmic  $1n$  d'entre 18-25 (Cole 1990). Complementos cromosòmics superiors a  $1n = 10$  podrien reflectir una poliploidia ancestral (Cole 1990, Kapraun *et al.* 2007). Altres valors com el complement cromosòmic d' $1n = 10$  a *A. armata* descrit per Svedelius (1933) s'hauria de tornar a investigar, mentre que l' $1n \approx 30$  d'un espècimen de *B. asparagoïdes* d'Escandinàvia podria representar una població aneuploide.

A les bonnemaisoniales, el comptatge cromosòmics publicats fins ara, així com les estimacions del contingut de DNA nuclear obtingudes en aquest estudi, suggereixen que aquest ordre hauria presentat un procés de poliploidia ancestral seguit per un cas d'aneuploidia o més (Kapraun & Bailey 1992, Kapraun & Buratti 1998). S'ha descrit una seqüència de modificacions cariològiques similar per a les *Gelidiales* (Kapraun *et al.* 1993), ordre que es caracteritza perquè presenta un reduït rang de mides de genoma nuclear ( $2C = 0,35-0,45$  pg). Probablement tant a les gelidials com a les bonnemaisoniales l'especiació no va anar acompanyada exclusivament d'una pèrdua o un guany de cromosomes a causa d'una no-disjunció d'aquests cromosomes, sinó que més aviat hauria involucrat translocacions i processos de fusió i/o fissió que produeixen

canvis en el nombre cromosòmic independentment del contingut del DNA nuclear (Kapraun 1993).

### **3.2. Alternança de fases haploides i diploides en el cicle nuclear de les *Bonnemaisoniaceae* de la península Ibèrica**

La espectrofluorimetria, mitjançant l'ús del fluorocrom DAPI com a localitzador de DNA, ha estat la metodologia utilitzada per demostrar les variacions del DNA nuclear relacionada amb una alternança de fases haploides (2C) i diploides (4C) en les algues vermelles associada amb un cicle sexual (Kapraun 1994, Kapraun *et al.* 1992, 2007).

El cicle vital de les espècies de l'ordre *Bonnemaisoniales* generalment inclou un gametòfit, un carposporòfit i un tetrasporòfit (Chihara 1962). No obstant això, diversos autors han citat una variació considerable en el tipus de cicle (Dixon 1982, Rueness & Åsen 1982, Hawkes 1990). A *Delisea pulchra* els estudis en cultius de Bonin & Hawkes (1988) suggeriren una variabilitat intraespecífica en el seu desenvolupament. A *Atractophora hypnoides* i a *Naccaria wiggii*, els gametòfits es desenvolupen directament a partir d'un protonema prostrat produït per les carpòspores (Boillot 1967). *Bonnemaisonia asparagoides* (monoica) i *B. clavata* (dioica) presenten una alternança de generacions heteromòrfica amb una generació tipus "Hymenoclonium" que desenvolupa directament joves gametòfits (Rueness & Åsen 1982, Salvador *et al.* 2009a, pàg. 91), mentre que *B. hamifera* és una espècie dioica que presenta una generació esporofítica tipus "Trailliella" (Chen *et al.* 1970). En canvi, a *Bonnemaisonia geniculata*, Shevlin & Polanshek (1978) van descriure un tipus de tetrasporòfit heteromòrfic diferent als coneguts a les bonnemaisoniales. *Asparagopsis taxiformis* i *A. armata* mostren una alternança de generacions amb una generació esporofítica tipus "Falkenbergia" (Feldmann & Feldmann 1942, Dixon 1964, Dixon & Irvine 1977, Andreakis *et al.* 2004, Ni Chualáin *et al.* 2004). Malgrat els nombrosos estudis que s'han fet sobre el cicle vital de les *Bonnemaisoniales*, fins ara la seqüència de fases nuclears només s'ha demostrat a *B. asparagoides* i a *B. clavata* (vegeu Salvador *et al.* 2009a, pàg. 91).



La comparació dels valors obtinguts en els gametòfits i en les seves corresponents generacions prostrades/espòrits ha permès confirmar l'alternança entre les fases nuclears. Els gametòfits van presentar un rang de valors 2C entre 0,6-0,8 pg, mentre que a les generacions "Hymenoclonium", "Trailliella" i "Falkenbergia" d'aquestes espècies els valors mínims de ploïdia obtinguts van correspondre a valors 4C amb un rang d'entre 1,2-1,7 pg (taula 2, vegeu Salvador *et al.* 2009c, pàg. 109). Aquests resultats confirmen l'alternança de fases haploides i diploides prèviament suggerida en algunes espècies de l'ordre *Bonnemaisoniales* mitjançant estudis citològics (Magne 1960, 1964; Rueness & Åsen 1982) i de cultius (Chihara 1961, 1962; Chen *et al.* 1970; Rueness & Åsen 1982; vegeu Salvador *et al.* 2009a, pàg. 91).

D'altra banda, els valors 2C obtinguts als espermacis de les espècies *A. armata*, *A. taxiformis*, *B. asparagoides* i *B. clavata* van ser similars al 50 % dels valors 4C obtinguts en les cèl·lules vegetatives de les generacions prostrades/espòrits. Aquestes observacions són consistents amb la presència d'una fecundació en el cicle vital d'aquestes espècies, tant en els tàxons que presenten tetrasporogènesi (*A. armata* i *A. taxiformis*), com en els tàxons amb creixement directe del gametòfit (*B. asparagoides* i *B. clavata*) a partir de la generació prostrada (Rueness & Åsen 1982, vegeu Salvador *et al.* 2009a, pàg. 91).