

CICLO DE VIDA, DESARROLLO Y CARIOLOGÍA DE *KLEBSORMIDIUM NITENS* (KLEBSORMIDIALES, CHAROPHYTA)

MARÍA VIRGINIA SÁNCHEZ PUERTA¹ & PATRICIA INÉS LEONARDI^{1,2}

¹Laboratorio de Ficología y Micología, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina. E-mail: mlsanpue@criba.edu.ar

ABSTRACT: Sánchez Puerta, M. V. & Leonardi, P. I. 2001. Life history, development and karyology of *Klebsormidium nitens* (Klebsormidiales, Charophyta). *Darwiniana* 39(3-4): 223-230.

This research is focused on the study of *Klebsormidium nitens* vegetative and reproductive cells. The following aspects have been considered for the identification of this species, which is a new record for Argentina: morphological characters, growth habits, aperture of zoosporangial cells, zoospore germination patterns and types of reproduction. As regards its life cycle, vegetative multiplication through an easy fragmentation of the thallus into short filaments was the prevailing mode of reproduction. Under adverse conditions, false (or pseudo) branches were formed from which new filaments were born. Asexual reproduction was induced "in vitro". Biflagellate zoospores with subapically inserted flagella came out from a pore in the lateral wall of sporangial cells. After swimming for a few minutes, zoospores withdrew the flagella, and germination was strictly unipolar. The basal cell presented a rudimentary holdfast with a fine mucilaginous attaching disc. After successive mitosis and cytokinesis a filament was formed which became planctonic after an eight-celled stage. The absence of a holdfast has so far been considered a diagnostic character of the genus, and for this reason the reconsideration of this feature at the generic level has been proposed. Sexual reproduction was not observed. The chromosome number found in *K. nitens* was $n=6$. A comparison among chromosome number, nucleus size and filament width with other species of *Klebsormidium* suggests a basic chromosome number $x=6$ and polyploidy as one of the processes involved in the evolution of *Klebsormidium* species.

Key words: *Klebsormidium*, *K. nitens*, Karyology, Life history, Charophyta.

RESUMEN: Sánchez Puerta, M. V. & Leonardi, P. I. 2001. Ciclo de vida, desarrollo y cariólogía de *Klebsormidium nitens* (Klebsormidiales, Charophyta). *Darwiniana* 39(3-4): 223-230.

Se estudiaron las células vegetativas y reproductivas de *Klebsormidium nitens*, primera cita para la República Argentina. La identificación de la especie se realizó utilizando caracteres morfológicos, hábito de crecimiento, la forma de apertura de los zoosporangios, forma de germinación de las zoósporas y el modo de reproducción. Con respecto a su ciclo de vida, la forma de reproducción más frecuente fue la vegetativa, por simple fragmentación del talo en filamentos cortos. Bajo condiciones adversas se produjeron pseudoramificaciones, a partir de las cuales se originaron nuevos filamentos. La reproducción asexual fue inducida "in vitro". Zoósporas biflageladas con inserción subapical de los flagelos salieron por un poro lateral. Las zoósporas después de nadar unos minutos retrajeron los flagelos y la germinación fue estrictamente unipolar. La célula basal presentó un rudimentario pie de fijación acompañado de un delicado disco de fijación mucilaginoso; sucesivas mitosis y citocinesis originaron un filamento, el cual pasó a vida planctónica al superar las ocho células. La ausencia de un pie de fijación ha sido considerada hasta el momento un carácter diagnóstico del género; la presencia de dicho pie en *K. nitens* sugiere que la validez de este carácter para definir el género debería ser revisada. No se verificó reproducción sexual. El número cromosómico hallado en *K. nitens* fue $n = 6$. Comparaciones entre el número cromosómico, el tamaño del núcleo y el ancho del filamento con otras especies de *Klebsormidium* sugiere un número básico $x = 6$ y a la poliploidía como uno de los procesos involucrados en la evolución de las especies del género.

Palabras clave: *Klebsormidium*, *K. nitens*, Cariología, Ciclo de vida, Charophyta.

² Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET

INTRODUCCIÓN

En el año 1843 Kützing creó el género *Hormidium* incluyendo varias especies de algas verdes filamentosas. Posteriormente, estudios comparados revelaron la heterogeneidad del género y así la constitución específica de *Hormidium* fue variando (Kützing, 1845; Römer, 1845; Nägeli, 1847). En 1849 Kützing incluyó a *Hormidium* como una sección dentro del género *Ulothrix* Kützing. Posteriormente, las especies de esa sección fueron transferidas a distintos géneros de Schizogoniales (Gay, 1888). Allí concluye una línea de la historia de *Hormidium*. Sin embargo, Klebs (1896) continuó utilizando erróneamente el nombre *Hormidium* para designar otras especies de algas verdes filamentosas. A su vez, Fott (1960) descubrió que el nombre *Hormidium* existía para un género de orquídeas tropicales, que tenía prioridad de acuerdo al Art. 53.1 del Código de Nomenclatura Botánica (Greuter et al., 2000). Por ello, Silva et al. (1972) propusieron el nombre genérico *Klebsormidium* Silva, Mattox & Blackwell para reemplazar al de *Hormidium* en el sentido aplicado por Klebs. El nuevo género comprende algas filamentosas con células con un plástido que envuelve de forma incompleta el lumen celular, con margen no lobulado y con un solo pirenoide; zoósporas biflageladas y sin estigma, que germinan sin la producción de un pie de fijación. El género *Klebsormidium* incluye mayoritariamente organismos terrestres, que viven en sustratos húmedos; también se conocen algunas especies dulceacuícolas y una especie marina (Lokhorst, 1991).

Primeramente, y basándose en estudios con microscopía óptica, se relacionó al género *Klebsormidium* con *Ulothrix* (Lokhorst, 1974). Sin embargo, estudios ultraestructurales y moleculares revelaron diferencias notables entre ambos géneros, siendo clasificado *Ulothrix* en la clase Ulvophyceae (Lokhorst, 1984, 1985) y *Klebsormidium* en la clase Charophyceae (Mattox & Stewart, 1984; Zechman et al., 1990). La clase Charophyceae presenta células móviles con inserción lateral de los flagelos, un sistema de raicillas microtubulares de disposición lateral y sin rizoplasto, mitosis abierta con huso persistente en telofase y división celular mediante un fragmoplasto (Bold & Wynne, 1985; van den Hoek et al., 1995; Lee, 1999).

Recientemente, Lokhorst (1996) realizó un estudio comparado de las especies de *Klebsormidium* de Europa, fundamentalmente sobre la base del há-

bito de crecimiento, las características morfológicas de las células vegetativas, la forma de apertura de los zoosporangios, la forma de germinación de las zoósporas fijadas y el modo de reproducción, precisando los límites del género.

Los estudios cariológicos en el género que preceden al presente trabajo fueron realizados en un reducido número de especies: *K. crenulatum* (Kütz.) Lokhorst, *H. barlowi* Pringsh., *K. flaccidum* (Kütz.) Silva, Mattox & Blackwell y *H. rivulare* Kütz. (Sarma, 1963; Sarma & Chaudhary, 1978).

En la Argentina el género *Klebsormidium* es poco conocido; anteriormente sólo había sido citado *K. subtile* (Kütz.) Heering (Tell, 1976). El hallazgo por primera vez de *K. nitens* (Menegh. in Kütz.) Lokhorst en nuestro país, permitió realizar un aporte más amplio al conocimiento de la biología de esta especie, poniendo énfasis en la morfología, ciclo de vida, cariolología y taxonomía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Filamentos de *K. nitens* fueron recolectados del Arroyo del Loro en Villa Ventana, centro-sur de la provincia de Buenos Aires (Argentina). Los cultivos unialgales crecieron en medio basal de Bold (Stein, 1973). Los cultivos de stock se mantuvieron a 4° C, con un fotoperíodo de 12:12 h, luz:oscuridad.

Para inducir la zoosporogénesis, se colocaron filamentos del alga en una caja de Petri con un pequeño volumen de medio de cultivo, a 5° C y en oscuridad durante 9 días. Luego se agregó medio de cultivo fresco y se mantuvieron a la misma temperatura y un ciclo de 8:16 h, luz:oscuridad. Las zoósporas se liberaron después de 48-72 h. Para observar el disco de fijación mucilaginoso con microscopio óptico se aplicó tinta china a material fresco.

Para inducir la reproducción sexual, se colocaron filamentos en medio de cultivo carente de nitrógeno y en agua destilada.

Para el estudio cariológico, filamentos cultivados a 25° C, con un fotoperíodo de 12:12 h, luz:oscuridad, se fijaron a intervalos de 30 min a partir del inicio del período lumínico, obteniéndose los mejores resultados luego de una hora. El material se fijó con Carnoy y la tinción de los cromosomas se realizó con hematoxilina aceto-férrica con hidrato de cloral (Wittmann, 1965). Los núcleos también se tiñeron con el fluorocromo DAPI (4',6 diamidina-2-fenilindol), siguiendo el protocolo

descripto por Coleman (1985).

Las observaciones se documentaron con microscopios Leitz SMLux y Carl Zeiss Axiolab con contraste de fases y fluorescencia.

RESULTADOS

Klebsormidium nitens se cita por primera vez para la República Argentina. Dicha especie presenta las características que se detallan a continuación:

Filamentos uniseriados, no ramificados (Fig. 1 C), aunque bajo condiciones adversas (medio de cultivo agotado y alta temperatura) se observan pseudoramificaciones (Fig. 1 H-J). Largo máximo de los filamentos entre 100-150 células. Células cilíndricas, cloroplasto único parietal, con forma de plato, ocupando $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ del lumen celular, un pirenoide central (Fig. 1 C). Pared celular no conformada por piezas con forma de H. Zoósporas ovoides a piriformes, con dos flagelos de inserción subapical, sin estigma (Fig. 2 E). Dimensiones: células vegetativas entre 4,7-5,6 (6,5) μm de ancho y 5,6-14 (25) μm de largo, siendo mayores en filamentos cultivados, 6,2-9,4 (10,9) μm de ancho y 7,8-15,6 (24) μm de largo. Zoósporas entre 5,5-6,2 μm de ancho por 6,2-7,8 μm de largo.

En cultivo se observan dos tipos de hábitos de crecimiento: filamentos no sumergidos, cubriendo la película superficial de manera homogénea, paralelos entre sí (Fig. 1 A), de color verde brillante, y filamentos sumergidos relativamente largos, entrecruzados, formando un manojo (Fig. 1 B) y de color verde más oscuro.

La multiplicación vegetativa consiste en la fragmentación de los filamentos en otros nuevos de reducido número de células y sin polaridad distinguible (Fig. 1 E). Esta fragmentación se lleva a cabo en distintos lugares a lo largo del filamento entre dos células muertas, sin contenido citoplasmático (Fig. 1 D). Un proceso similar de fragmentación ocurre a la altura de los zoosporangios vacíos, presentes en forma discontinua en el filamento (Fig. 1 F).

En filamentos viejos, con medio de cultivo agotado, en los cuales las células se vuelven doliiformes, la fragmentación también se produce por la muerte de una o más células intercalares (Fig. 1 G). El contenido citoplasmático de estas células se presenta sumamente desorganizado y con una coloración verde oscura, adquiriendo la apariencia de los discos bicóncavos separadores de las cianofíceas, debido probablemente a la presión lateral ejercida por

las células vecinas.

También en filamentos viejos, con escaso medio de cultivo y en condiciones de alta temperatura (35- 40° C), se forman pseudoramificaciones (Fig. 1 H-J), verificándose otra forma de propagación vegetativa. Las pseudoramificaciones se originan cuando una, o dos células adyacentes de un filamento (Fig. 1 H, J, respectivamente), se ensanchan y protruyen, continuando su crecimiento en esa dirección sin cambiar su plano de división (Fig. 1 I). Una envoltura translúcida, amorfa y mucilaginosa envuelve dichos ensanchamientos (Fig. 1 H-J). Con frecuencia, a la altura de estas pseudoramificaciones se produce una ruptura del filamento, originando dos filamentos relativamente largos.

Durante la reproducción asexual cada célula (1 o varias células no distinguibles morfológicamente de las vegetativas) forma una (Fig. 2 A-B) o excepcionalmente dos (Fig. 2 A) zoósporas que salen al exterior (Fig. 2 C) por un poro lateral, visible en las células vacías como una abertura circular regular (Fig. 2 D). Las zoósporas nadan aproximadamente 5-10 min, luego se detienen (Fig. 2 E), se hacen esféricas y retraen sus flagelos (Fig. 2 F). La germinación es estrictamente unipolar y un rudimentario pie de fijación preanuncia el lugar por donde las mismas se van a fijar (Fig. 2 G). Las zoósporas sufren una elongación (Fig. 2 H) y un delicado disco hialino y mucilaginoso acompaña al pie de fijación (Fig. 2 I). Dicha estructura, en los primeros estados sólo es claramente distinguible con tinta china (Fig. 2 I). Sucesivas mitosis y citocinesis originan un filamento (Fig. 2 J-K), el cual permanece fijo al sustrato por el pie de fijación (Fig. 2 I-K) y pasa a vida planctónica al superar las 8-9 células de longitud. No se verifica reproducción sexual.

Una representación diagramática del ciclo de vida de *K. nitens* se presenta en la figura 3 A-L.

El núcleo presenta 1,25 a 1,5 μm de diámetro en interfase. Se ubica en posición media en la célula y próximo a una de las paredes longitudinales (Fig. 4 A). El estudio cariológico reveló un número cromosómico $n=6$ (Fig. 4 B).

DISCUSIÓN

La presencia de *Klebsormidium nitens* hasta el momento fue detectada en el oeste y centro de Europa (Lokhorst, 1996). Ahora, dicha especie se cita por primera vez, en el presente trabajo, para la

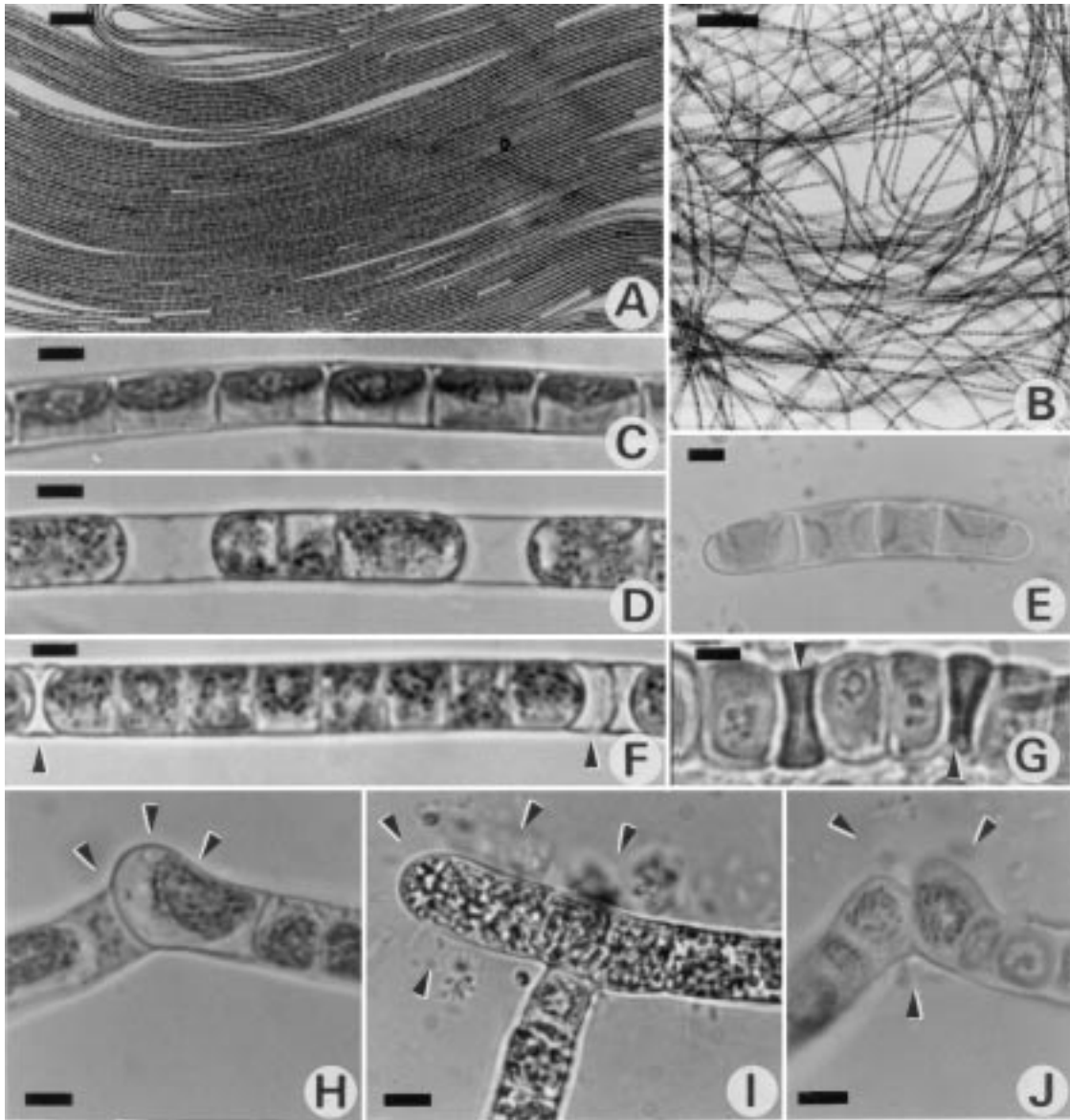


Fig. 1.- *Klebsormidium nitens*. A-B: hábito de crecimiento. A: filamentos no sumergidos, dispuestos aproximadamente paralelos unos con otros. B: filamentos sumergidos, entrecruzados. C: detalle de una porción de un filamento adulto. D-J: propagación vegetativa. D: filamento con grupos de células separadas por células muertas. E: fragmento de reducido número de células. F: filamento con zoosporangios vacíos (puntas de flecha), a partir de los cuales ocurrirá la fragmentación del mismo. G: filamento con células doliiformes y células muertas o “discos bicóncavos separadores” (puntas de flecha) entre ellas. H-J: pseudoramificaciones, las puntas de flecha indican la envoltura translúcida mucilaginosa que rodea a una célula (H-I) o a dos células (J) en la pseudoramificación. Escalas: A, B = 100 μ m, C, D, E, F, G, H, I, J = 5 μ m

República Argentina.

La determinación a nivel específico del material estudiado se realizó teniendo en cuenta fundamentalmente el hábito de crecimiento, las características morfológicas de las células vegetativas, la forma de

apertura de los zoosporangios, la forma de germinación de las zoósporas fijadas y el modo de reproducción, características éstas utilizadas por Lokhorst (1996) para delimitar las especies del género.

K. nitens se caracteriza por desarrollar en el me-

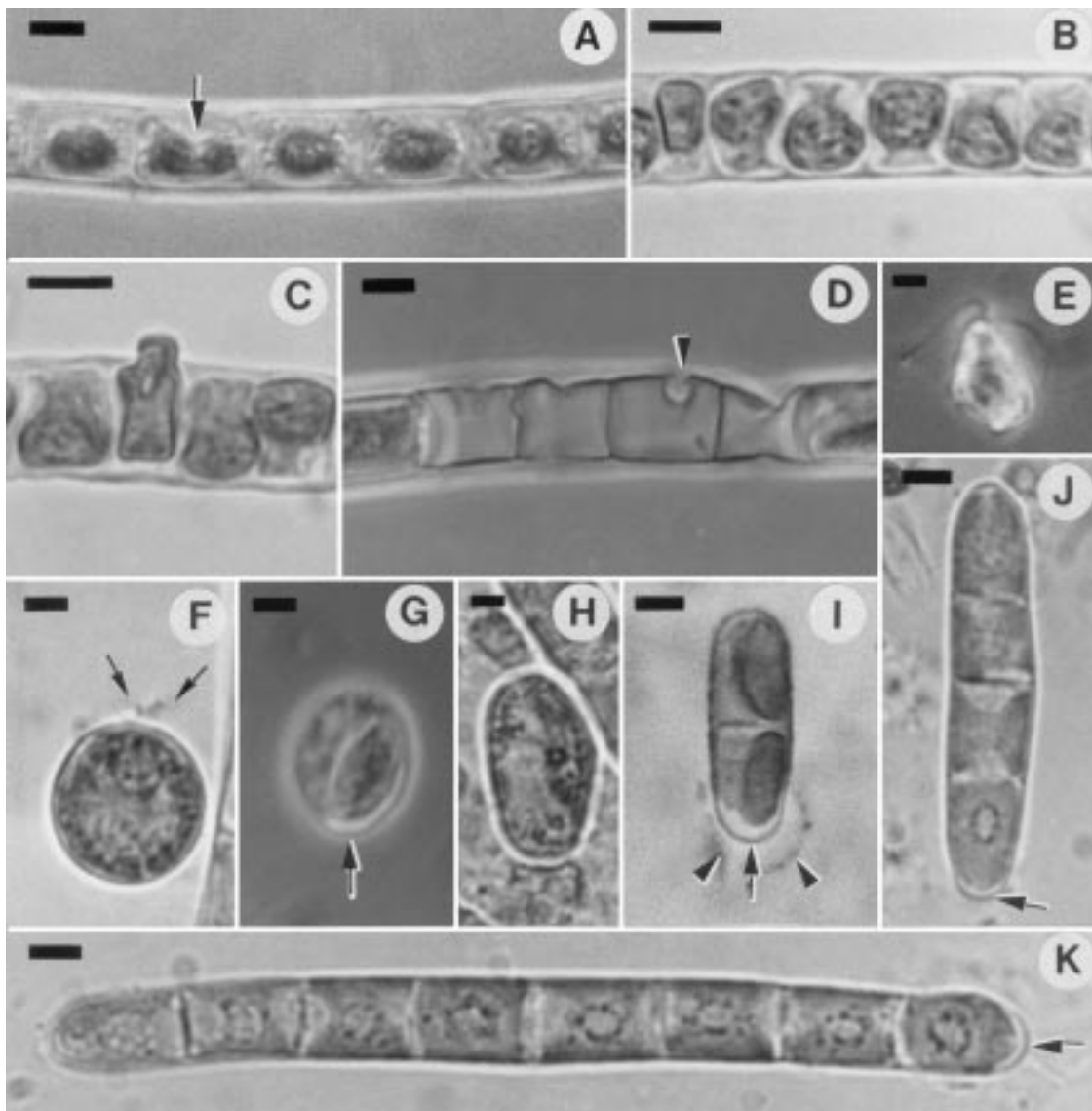


Fig. 2.- Reproducción asexual en *Klebsormidium nitens*. A-B: zoósporas en distinto grado de desarrollo. A: la flecha indica dos zoósporas en el interior de un zoosporangio. C: zoóspora saliendo por un poro lateral. D: zoosporangio vacío, nótese que la abertura circular permanece bien discernible (punta de flecha). E: zoóspora liberada, con inserción lateral de los flagelos. F-H: germinación de las zoósporas. F: las flechas indican la reabsorción de los flagelos. G: se observa un rudimentario pie de fijación (flecha). H: zoóspora recientemente fijada. I: estadio bicelular, nótese el disco de fijación mucilaginoso, visible con tinta china (puntas de flecha) y el rudimentario pie de fijación (flecha). J: talo tetra-celular; la flecha indica el rudimentario pie de fijación. K: talo octocelular fijo al sustrato por el rudimentario pie de fijación (flecha). Escalas: A, B, C, D, I, J, K = 5 μ m; E, F, G, H = 2 μ m.

dio de cultivo líquido utilizado dos hábitos de crecimiento morfológicamente distintos, uno sumergido y otro flotante. La forma cilíndrica de las células, la ausencia de piezas con forma de H y la reproducción asexual fácilmente inducible, son características que comparte con *K. flaccidum*

(Lokhorst, 1996). Sin embargo, *K. nitens* se diferencia claramente de esta especie por poseer filamentos muy fácilmente dissociables constituidos por un número menor de células (50-100), por la apertura del zoosporangio a través de un poro circular, en lugar de un poro irregular, y por la

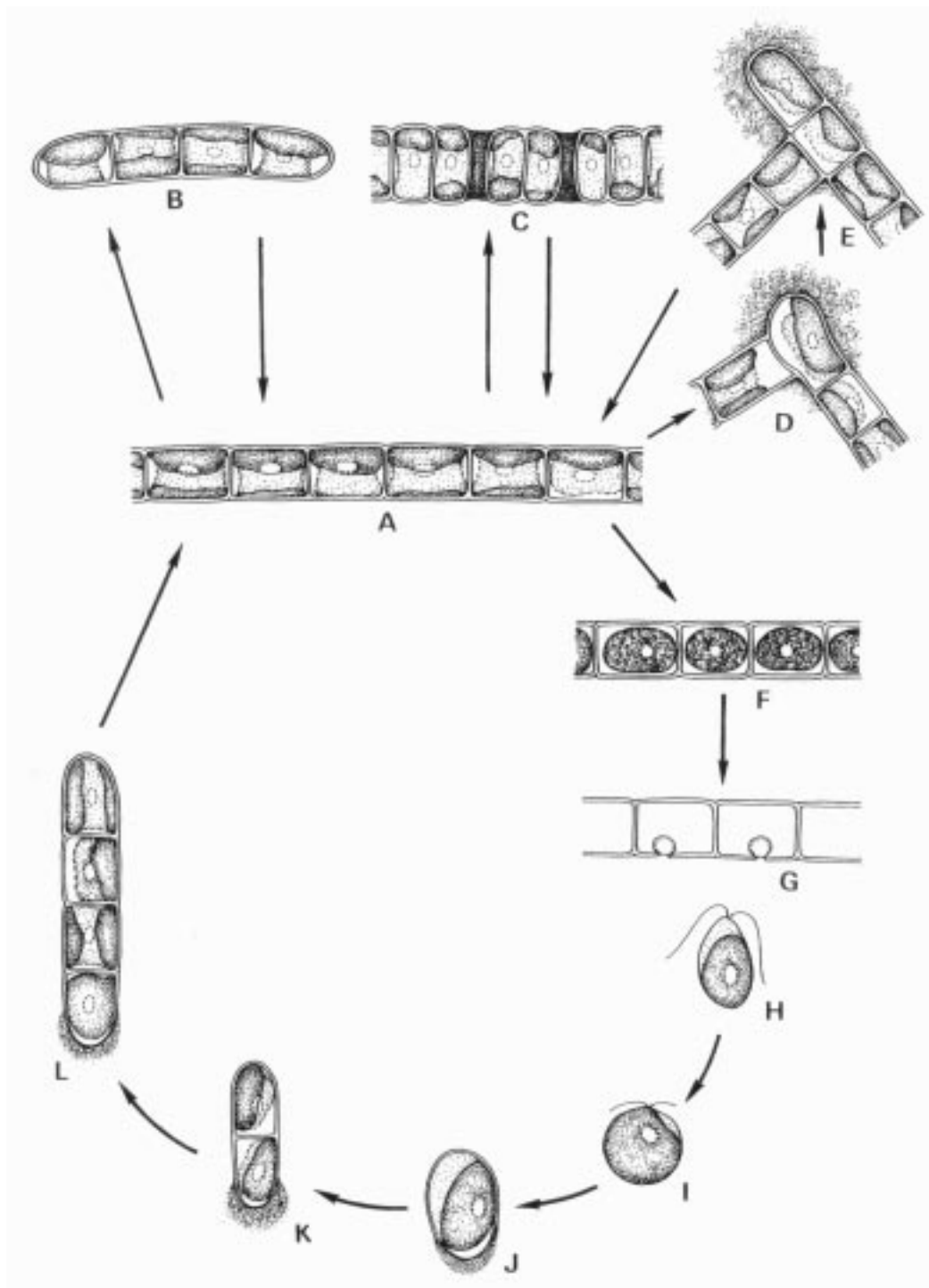


Fig. 3.- *Klebsormidium nitens*. A-L: representación diagramática del ciclo de vida. A-E: propagación vegetativa. A: filamento adulto. B: fragmento de reducido número de células. C: filamento con células doliiformes y células muertas o "discos bicóncavos separadores" entre ellas. D-E: formación de pseudoramificaciones. F-L: reproducción asexual. F: formación de zoósporas. G: zoosporangio vacío. H: zoóspora biflagelada. I: reabsorción de flagelos. J: germinación. K: talo bicelular. L: talo tetracelular.

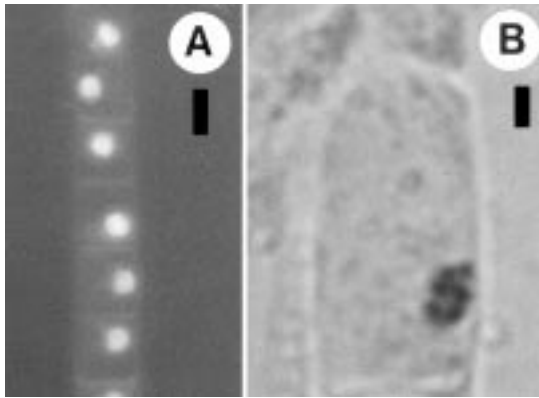


Fig. 4.- Cariología en *Klebsormidium nitens*. A: tinción con DAPI para evidenciar la posición de los núcleos; B: tinción con hematoxilina, número cromosómico $n=6$. Escalas: A = 5 μm ; B = 2 μm .

germinación de las zoósporas estrictamente unipolar, en lugar de germinación uni o bipolar.

La forma más común de propagación de *K. nitens* en las condiciones de este estudio fue la multiplicación vegetativa a partir de la fragmentación de filamentos en porciones con un reducido número de células. En la mayoría de los casos la fragmentación del filamento se produjo a la altura de células que perdieron su contenido o células zoosporogénicas vacías.

Resulta novedoso para el género, la formación en *K. nitens* de nuevos talos a partir de fragmentos provenientes de entre dos discos separadores. Quizás estos discos sean comparables con las piezas con forma de H presentes en varias especies de *Klebsormidium*, como por ejemplo *K. fluitans* (Gay) Lokhorst, *K. dissectum* (Gay) Lokhorst, *K. bilatum* Lokhorst, *K. elegans* Lokhorst, *K. crenulatum* y *K. mucosum* (Boye Petersen) Lokhorst (Lokhorst, 1996) pero que están ausentes en *K. nitens*.

Las pseudoramificaciones observadas en *K. nitens* pueden ser consideradas pasos intermedios que derivarán en una ruptura compleja y definitiva

del filamento. Esta forma de propagación vegetativa también ha sido descrita en *K. flaccidum* y *K. fluitans* (Lokhorst, 1996).

K. nitens exhibió una profusa producción de zoósporas. La zoosporogénesis ya había sido mencionada para la misma especie (Lokhorst, 1996). También fue descrita en *K. flaccidum* (Cain et al., 1973; Lokhorst, 1996), *K. marinum* (Deason) Silva, Mattox & Blackwell (Cain et al., 1973), *K. fluitans* (Lokhorst, 1996), *K. bilatum* (Lokhorst, 1996), *K. crenulatum* (Lokhorst, 1996) y no se conoce en *K. sterile* (Deason & Bold) Silva, Mattox & Blackwell (Cain et al., 1973).

En los primeros estados del desarrollo de las zoósporas de *K. nitens* se observó un disco de fijación mucilaginoso y extracelular que fue discernible únicamente en presencia de tinta china. Las zoósporas poseyeron germinación estrictamente unipolar, aunque en algunos casos el desarrollo del disco mucilaginoso se ubicó lateralmente. A su vez, se observó en estados tempranos de la germinación un rudimentario pie de fijación, el cual persistió en estados más avanzados. Es importante destacar que la ausencia de un pie de fijación ha sido considerada hasta el momento un carácter diagnóstico del género (Lokhorst, 1991). Sin embargo, con la aparición de un reducido pie en *K. nitens*, el uso de este carácter a nivel genérico debería ser revisado.

El número cromosómico hallado en *K. nitens* fue $n=6$, mientras que los números cromosómicos de otras especies del género estudiados fueron mayores y generalmente múltiplos de 6 (ver Tabla 1). Asimismo se observó cierta correlación entre el aumento del número cromosómico y el aumento del tamaño del núcleo; esa relación se extendió también al aumento en ancho del filamento (ver Tabla 1). Esto nos permite postular la posible existencia de poliploidía en la evolución del género, así como ha sido reconocida en distintos órdenes de la clase

Tabla 1.- Estudios cariológicos y citológicos en el género *Klebsormidium*. [1] *H. rivulare* fue considerada por Lokhorst (1996) como perteneciente al género *Ulothrix*.

Especie	Tamaño del núcleo	Número cromosómico	Ancho del filamento	Autores
<i>K. crenulatum</i>	3-4 μm	44-48	9-18 μm ^a	Sarma (1963) ^a Lokhorst (1996)
<i>K. flaccidum</i>	2,5-3,5 μm	22	5,7-8,5 μm	Sarma & Chaudary (1978)
<i>H. barlowi</i>	1,5-2 μm	22-24	No se conoce	Sarma (1963)
<i>H. rivulare</i> [1]	2-3 μm	26	6,5-10 μm	Sarma & Chaudary (1978)
<i>K. nitens</i>	1,25-1,5 μm	6	4,7-5,6 μm	Presente trabajo

Charophyceae (Sarma, 1982). Como el número cromosómico de *K. nitens* es el más bajo de las especies estudiadas hasta el momento, éste sería muy probablemente el número básico.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a G. M. Lokhorst por la información brindada y por sus sugerencias. Al Comité Editorial y revisores anónimos que contribuyeron con sus observaciones a mejorar la versión final de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bold, H. C. & Wynne, M. J. 1985. *Introduction to the algae. Structure and reproduction*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New York.
- Cain, J. R., Mattox, K. R. & Stewart, K. D. 1973. The cytology of zoosporogenesis in the filamentous green algal genus *Klebsormidium*. *Trans. Amer. Microscop. Soc.* 92: 398-404.
- Coleman, A. 1985. Diversity of plastid DNA configuration among classes of eukaryote algae. *J. Phycol.* 21: 1-16.
- Fott, B. 1960. Taxonomische Übertragungen und Namensänderungen unter den Algen. *Preslia* 32: 142-157.
- Gay, F. 1888. Sur les *Ulothrix* aériens. *Bull. Soc. France* 35: 65-75.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F. R., Burdett, H. M., Demoulin, V., Filgueiras, T. S., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Skog, J. E., Trechane, P., Turland, N. J. & Hawksworth, D. L. 2000. *International Code of Botanical Nomenclature (St. Louis Code). Regnum Vegetabile*. Koeltz Scientific Books. Königstein.
- Klebs, G. 1896. *Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen*. Gustav. Fischer, Jena.
- Kützing, F. T. 1843. *Phycologia generalis*. Brockhaus, Leipzig.
- . 1845. *Phycologia germanica*. Köhne, Nordhausen.
- . 1849. *Species algarum*. Brockhaus, Leipzig.
- Lee, R. E. 1999. *Phycology*. 3rd edition. Cambridge University Press. Cambridge.
- Lokhorst, G. M. 1974. *Taxonomic studies on the freshwater species of Ulothrix in the Netherlands*. Thesis, Free University, Amsterdam.
- . 1984. Current ideas on classification of the Ulotrichales Borzi, pp. 179-206, en D. E. G. Irvine & D. M. John (eds.), *Systematics of the green algae*. Academic Press, London, Orlando.
- . 1985. The concept of the genus *Ulothrix* (Chlorophyta) strengthened by comparative cytology. *BioSystems* 18: 357-368.
- . 1991. Synopsis of genera of Klebsormidiales and Ulotrichales. *Cryptog. Bot.* 2/3: 274-288.
- . 1996. Comparative taxonomic studies on the genus *Klebsormidium* (Charophyceae) in Europe. *Cryptogamic Studies* Vol. 5. En W. Jülich (ed.), Gustav Fischer Verlag Stuttgart-Jena-New York..
- Mattox, K. R. & Stewart, K. D. 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology, pp 29-72, en D. E. G. Irvine & D. M. John (eds.), *Systematics of the green algae*. Academic Press, London, Orlando.
- Nägeli, C. 1847. *Die neuern Algensysteme und Versuch zur Begründung eines eigenen Systems der Algen und Florideen*. Schulthess, Zürich.
- Römer, F. A. 1845. *Die Algen Deutschlands*. Hahn, Hannover.
- Sarma, Y. S. R. K. 1963. Contributions to the kariology of the Ulotrichales 2. *Uronema* Lagh. and *Hormidium* Klebs. *Caryologia* 16: 513-519.
- . 1982. Chromosome number in algae. *Nucleus* 25: 66-108.
- & Chaudary, B. R. 1978. Observations on certain aspects of reproduction and kariology of *Hormidium rivulare* Kützing and *Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) Silva et al. *J. Indian Bot. Soc.* 58: 185-191.
- Silva, P., Mattox, K. R., & Blackwell, W. 1972. The generic name *Hormidium* as applied to green algae. *Taxon* 21: 639-645.
- Stein, J. 1973. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press.
- Tell, G. 1976. Algas del suelo de los alrededores de Buenos Aires. *Darwiniana* 20: 491-548.
- van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H. M. 1995. *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Wittmann, W. 1965. Aceto-Iron-Haematoxylin-Chloral Hydrate for chromosome staining. *Stain Technol.* 40: 161-164.
- Zechman, F. W., Theriot, E. C., Zimmer, E. A. & Chapman, R. L. 1990. Phylogeny of the Ulvophyceae (Chlorophyta): Cladistic analysis of nuclear-encoded rRNA sequence data. *J. Phycol.* 26: 700-710.

Original recibido el 16 de abril de 2001; aceptado el 26 de septiembre de 2001.