



Ciencias Marinas

ISSN: 0185-3880

cmarinas@uabc.mx

Universidad Autónoma de Baja California  
México

Rivera, M.G.; Riosmena Rodríguez, R.; Foster, M.S.  
Edad y crecimiento de *Lithothamnion muelleri* (Corallinales, Rhodophyta) en el suroeste del Golfo de California, México  
Ciencias Marinas, vol. 30, núm. 1B, marzo, 2004, pp. 235-249  
Universidad Autónoma de Baja California  
Ensenada, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48003008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Edad y crecimiento de *Lithothamnion muelleri* (Corallinales, Rhodophyta) en el suroeste del Golfo de California, México

Age and growth of *Lithothamnion muelleri* (Corallinales, Rhodophyta) in the southwestern Gulf of California, Mexico

M.G. Rivera<sup>1</sup>  
R. Riosmena-Rodríguez<sup>1\*</sup>  
M.S. Foster<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa en Botánica Marina  
Departamento de Biología Marina  
Universidad Autónoma de Baja California Sur  
Apartado postal 19-B, La Paz, CP 23080, BCS, México  
\* E-mail: riosmena@uabcs.mx

<sup>2</sup> Moss Landing Marine Laboratories  
Moss Landing CA 95039, USA

Recibido en septiembre de 2002; aceptado en octubre de 2003

## Resumen

El alga coralina no geniculada *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff es comúnmente encontrada formando mantos de rodolitos en zonas someras expuestas al oleaje dentro del suroeste del Golfo de California. Esta especie tiene bandas de crecimiento a todo lo largo de las ramas principales del talo que sugieren un crecimiento periódico y que probablemente podrían ser utilizadas para determinar su tasa de crecimiento y edad. Como parte de la investigación que se está desarrollando sobre los mantos de rodolitos y su ecología, se desarrollaron observaciones sobre la naturaleza de esas bandas en la estructura de las plantas y en experimentos de crecimiento en campo y laboratorio. Se marcaron con alizarina plantas individuales de diferentes clases de talla en el campo y otro conjunto de plantas fue al laboratorio llevado para su análisis. La mitad de las plantas fueron muestreadas después de 6 meses y el resto recolectadas a los 12 meses. Los resultados muestran una tasa de crecimiento de 0.60 mm año<sup>-1</sup> en el campo y 0.87 mm año<sup>-1</sup> en el laboratorio. Los análisis estadísticos mostraron que no existen diferencias significativas entre las ramas de una planta, ni entre plantas de diferentes tamaños. El crecimiento fue estacional, con mayores tasas en invierno y primavera y menores en verano y otoño. Esto puede explicar la alternancia de bandas claras y oscuras (hasta 4) a lo largo de una rama principal. Las tasas de crecimiento sugieren que las plantas más grandes (p.ej. 15 cm de diámetro) podrían tener más de 100 años de antigüedad.

*Palabras clave:* edad, crecimiento, *Lithothamnion muelleri*, rodolitos, Corallinales.

## Abstract

The nongeniculate coralline alga *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff is commonly found as a free-living rhodolith in the wave-exposed shallow waters of the southwestern Gulf of California. This species has bands along the main branch axes suggesting that growth is periodic and that may be used to determine age and growth. As part of our ongoing research related to rhodoliths and their ecology, we have made observations on the nature of these bands based on their structure in entire plants and on field and laboratory growth experiments. Individual plants from different size classes were tagged, stained with alizarin and returned to the field, while another set was tested in the laboratory. Half of the plants were sampled after 6 months and the rest after 12 months. The data indicate that this species grew at a rate of 0.60 mm yr<sup>-1</sup> in the field and 0.87 mm yr<sup>-1</sup> in the laboratory. There were no significant differences among branches within a plant, or among plants of different size. Growth was seasonal, with high rates in winter and spring, and low rates in summer and fall. This may explain the observed alternating light-dark bands (up to 4) along branch axes. The growth rates suggest that larger plants (ca 15 cm diameter) may be over 100 years old.

*Key words:* age, growth, *Lithothamnion muelleri*, rhodoliths, Corallinales.

## Introducción

Las algas coralinas son importantes componentes ecológicos y geológicos de diversos ambientes, y se ha establecido que comparadas con las algas blandas, su producción primaria es baja pero son eficientes productoras de carbonato de calcio (Littler *et al.*, 1991). Existen pocos trabajos sobre su contribución a la producción de carbono orgánico y carbonato de calcio o acerca de su tasa de crecimiento, debido principalmente a problemas metodológicos y taxonómicos (Payri, 1997). Foster (2001) ha sugerido que no existen estudios sobre edad y crecimiento de muchas especies de rodolitos y lo que se conoce en este sentido se basa en métodos de validación dudosos. En función de la depositación diferencial, los rodolitos se consideran estructuras con potencial para caracterizar paleoambientes (Bosellini y Ginsburg, 1971; Prager y Ginsburg, 1989; Foster *et al.*, 1997). Wehrmann (1998) observó bandas claras y oscuras en *Lithothamnion corallioides* (P. & H. Crouan) P. & H. Crouan y *Phymatoliton calcareum* (Pallas) Adey y McKibbin, y determinó que éstas representan un ciclo anual con mayor densidad de magnesio en la banda clara y menor en la oscura, depositándose la primera en el verano y la última en el invierno. Además, indirectamente estimó para estas especies una tasa de crecimiento de 0.310 a 0.620 mm año<sup>-1</sup>. Adey y Macintyre (1973), asumiendo un crecimiento continuo, dedujeron edades de hasta 800 años para rodolitos de zonas profundas. Bosence (1983), basado en el mismo método, estimó edades de 600 años para rodolitos de 20 cm, suponiendo un crecimiento continuo con una tasa de 0.02 mm mes<sup>-1</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado claramente si existe una relación estrecha entre la forma del crecimiento con respecto de la edad de las plantas.

Particularmente *Lithothamnion muelleri* presenta bandas diferenciales de carbonato de calcio que podrían utilizarse como indicadores de edad, sin embargo para ello se requieren estudios de validación, que consisten en establecer el periodo de formación de la marca y la regularidad con la que esta se forma (Mathews y Bawazeer, 1987; Stanton y Hurley, 1991). La validación puede realizarse mediante diversos métodos, entre los que se encuentran el seguimiento periódico de las bandas (Mathews y Bawazeer, 1987) y los experimentos mediante marcado de organismos (Andrake y Johansen, 1980; Agegian, 1981). Para el Golfo de California, Franz *et al.* (2000) calcularon una tasa de crecimiento en 0.6 mm año<sup>-1</sup> basados en datos de C<sup>14</sup>. Halfar *et al.* (1998) observaron bandas claras y oscuras en *Lithothamnion* sp. y determinaron una proporción Mg/Ca de 0.17–0.3 (14–25 mol% MgCO<sub>3</sub>). Luego, correlacionando estas determinaciones con las bandas claras y oscuras, respectivamente, concluyeron que cuatro bandas corresponden a un ciclo anual de crecimiento. Sin embargo, la periodicidad de las bandas de crecimiento no ha sido validada para ninguna especie, y dicha validación puede ser de gran utilidad para futuros estudios paleoambientales dado que en diversos estudios se ha sugerido que los rodolitos pueden ser utilizados con este fin (Foster *et al.*, 1997). Por lo anterior, los

## Introduction

Coralline algae are important ecological and geological components of diverse environments. Compared to soft algae, their primary productivity is low, but they are efficient producers of calcium carbonate (Littler *et al.*, 1991). Few studies have been published on their contribution to the production of organic carbon and calcium carbonate or on their growth rate, mainly because of methodological and taxonomical problems (Payri, 1997). Foster (2001) mentions that research on the age and growth of rhodolith species is lacking, and that what is known is based on doubtful methods of difficult validation. Regarding differential deposition, rhodoliths are considered structures for the potential characterization of paleoenvironments (Bosellini and Ginsburg, 1971; Prager and Ginsburg, 1989; Foster *et al.*, 1997). Wehrman (1998) observed light and dark bands in *Lithothamnion corallioides* (P. & H. Crouan) P. & H. Crouan and in *Phymatoliton calcareum* (Pallas) Adey & McKibbin, and determined that they represent an annual cycle with higher density of magnesium in the light band and lower in the dark one, the former being deposited in summer and the latter in winter; also, a growth rate of 0.310–0.620 mm yr<sup>-1</sup> was indirectly estimated for these species. Adey and Macintyre (1973), assuming continuous growth, determined ages of up to 800 years for rhodoliths from deep zones; Bosence (1983) estimated ages of 600 years for 20-cm rhodoliths, assuming continuous growth at a rate of 0.02 mm month<sup>-1</sup> based on the same method. However, whether a relationship exists between the form of growth and the age of the plants has still not been clearly determined.

*Lithothamnion muelleri* presents differential bands of calcium carbonate that may be used as indicators of age. To use a structure for such a purpose, validation studies are necessary in which the period of band formation and the regularity of its formation are established (Mathews and Bawazeer, 1987; Stanton and Hurley, 1991). Several methods can be used for age validation, such as the periodic monitoring of the bands (Mathews and Bawazeer, 1987) and the marking of organisms (Andrake and Johansen, 1980; Agegian, 1981). For the Gulf of California, Franz *et al.* (2000) calculated a growth rate of 0.6 mm yr<sup>-1</sup> based on C<sup>14</sup> data. Halfar *et al.* (1998) observed light and dark bands for *Lithothamnion* sp. and determined a Mg/Ca ratio of 0.17–0.3 (14–25 mol% MgCO<sub>3</sub>); after correlating these determinations with the light and dark bands respectively, they concluded that four bands correspond to one annual cycle. However, the periodicity of growth bands has not been validated for any species and as several studies have suggested that these organisms could be used in paleoenvironmental interpretations, this validation should prove useful (Foster *et al.*, 1997). Thus, the objectives of this study are: (1) to estimate the growth rate of *L. muelleri* using data obtained in field and laboratory experiments, (2) to validate the differential deposition bands as age structures, and (3) to estimate the age of the specimens based on the number of bands.

objetivos del presente estudio fueron: (1) estimar la tasa de crecimiento de *L. muelleri* por medio de datos provenientes de experimentos de campo y laboratorio, (2) validar las bandas de depositación diferencial como estructuras de edad, y (3) estimar la edad de los especímenes con base en las bandas que presentan.

## Material y métodos

### Estudio piloto

Debido a que no hay antecedentes sobre si los individuos de diferentes tallas crecen diferencialmente se decidió trabajar utilizando grupos específicos de tallas, por lo que fue necesario conocer su distribución en la población. De los mantos de rodolitos conocidos en el Golfo de California (Foster *et al.*, 1997), se ha determinado que *L. muelleri* representa 100% del de Punta Galeras (Riosmena-Rodríguez, datos no publicados). Se realizó una visita a la localidad y se midieron todos los organismos que se encontraron en la población en un recorrido de una hora (500 m<sup>2</sup>). Las mediciones se realizaron por dos personas y usando equipo de buceo autónomo; una localizaba los individuos y otra los medía y apuntaba la información en tablas de acrílico. Se midió el largo total (eje más largo) a cada individuo usando un vernier con una precisión de 0.1 mm. Las determinaciones a nivel de especie se realizaron con cortes histológicos y de acuerdo con las características anatómicas definidas por Riosmena-Rodríguez (2002).

### Preparación de muestras

Debido a que las bandas de crecimiento se presentan a todo lo largo de las ramas se consideró necesario realizar un corte longitudinal de los rodolitos para poder observar las bandas. Dado que no existe una técnica formal para hacerlo se diseñó una para realizar secciones delgadas de rodolitos utilizando como base la técnica petrográfica para secciones delgadas. La técnica modificada se describe a continuación:

- Si el organismo es frágil se le debe dar un baño en resina epóxica (Epo-Kwick® Fast Cure Epoxy) para evitar la fragmentación durante el corte.
- El rodolito se corta siguiendo su eje más largo y por el centro, usando un disco con punta de diamante como los usualmente utilizados en trabajos petrográficos.
- Se elige cualquiera de las dos secciones y se pule utilizando primero un disco giratorio y polvo abrasivo de 400 µm, y posteriormente un cristal como base y polvo abrasivo de 800 µm.
- Una vez pulida la sección elegida, se lava perfectamente, se seca, se pega a un cristal usando resina epóxica (Epo-Kwick®) y se deja secar durante 24 h.
- Se corta el sobrante de rodolito pegado utilizando un disco diamantado, después de lo cual debe quedar una lámina de aproximadamente 3 mm, que luego se desbasta hasta un grosor de 2 mm.

## Material and methods

### Pilot study

There are no antecedents on whether different-sized individuals grow differentially, so we decided to use specific size groups, for which it was necessary to determine their distribution in the population. Of the known rhodolith beds in the Gulf of California (Foster *et al.*, 1997), *L. muelleri* constitutes 100% at Punta Galeras (Riosmena-Rodríguez, unpublished data). The site was visited and the organisms found in the population were measured in a one-hour survey (500 m<sup>2</sup>). The sampling was conducted by two people using SCUBA; one located the individuals and the other measured the total length (longest axis) with a vernier caliper of 0.1-mm precision and recorded the information on acrylic sheets. Determinations to species level were based on histological sections and the anatomical characteristics defined by Riosmena-Rodríguez (2002).

### Preparation of samples

This species has growth bands along the branch axes, so a longitudinal cut was made to be able to observe the bands. As no formal technique exists for this, we designed the following method based on the petrographic technique for preparing thin sections:

- If the organism is fragile, it should be bathed in epoxy resin (Epo-Kwick® Fast Cure Epoxy) to prevent fragmentation during the cut.
- The rhodolith is cut following the longest axis and through the middle with a diamond saw commonly used in petrographic work.
- Whichever of the two parts is chosen and polished using first a rotary disc and 400-µm abrasive powder, and then a crystal as base and 800-µm abrasive powder.
- After polishing the selected side, it is thoroughly washed and dried, and then adhered to a glass plate using epoxy resin (Epo-Kwick®) and allowed to dry for 24 h.
- The adhered rhodolith is then cut using a diamond saw to obtain an approximately 3-mm thick lamina, which is then smoothed down to 2 mm.
- Finally, the lamina is polished using a crystal and 800-µm abrasive powder.

Once the thin sections have been obtained, the following experiments were conducted to determine how the bands are best observed:

- Alizarin red staining: Three solutions were prepared consisting of 0.005, 0.01 and 0.1 mg of alizarin red diluted in 5 mL of ethyl alcohol and gauged with 500 mL of distilled water.
- Burning: Laminae and rhodoliths, cut in half, were exposed to temperatures of 100–110°C, 120–130°C, 140–150°C,

- Una vez cortado se da el acabado final puliendo la lamina sobre un cristal, con polvo abrasivo de 800  $\mu\text{m}$ .

Una vez que se tuvieron las secciones delgadas, se realizaron diferentes experimentos para determinar la forma en que se observan mejor las bandas:

- Tinción con rojo de alizarina. Se prepararon tres soluciones de la siguiente manera: 0.005, 0.01 y 0.1 mg de rojo de alizarina diluidos en 5 mL de alcohol etílico y aforados con 500 mL de agua destilada.
- Quemado. Se realizaron experimentos de quemado de las láminas y de rodolitos cortados a la mitad a diferentes temperaturas. Los tiempos fueron de 1, 2, 3, 5, 10 y 15 min, mientras que las temperaturas de exposición fueron de 100–110°C, 120–130°C, 140–150°C, 200–210°C, 250–260°C y 300–310°C.
- Rayos X. Se tomaron radiografías de láminas y de rodolitos partidos a la mitad para determinar si es posible contar las bandas sobre una placa de rayos X.
- Pulido. Se pulieron láminas con polvo abrasivo de diferentes tamaños (400, 600 y 800  $\mu\text{m}$ ), y se observaron constantemente con un estereoscopio con luz transmitida, para determinar con qué tamaño de grano y a qué grosor de la lámina se observaban mejor las bandas.

#### Método de marcado

Para la validación de las bandas como estructuras de edad y para la determinación de la tasa de incremento longitudinal se utilizó una técnica de captura-marcaje-recaptura. Se usaron dos tipos de marca: una metálica y una de rojo de alizarina. En el caso de la marca metálica se hizo una incisión en el organismo utilizando un taladro y se insertó un alambre inoxidable de 1 cm de largo que se fijó con resina marina quedando un extremo sobre la superficie del organismo. Para la segunda marca, fue necesario determinar previamente la concentración adecuada de rojo de alizarina con la que se forma una marca reconocible, para lo que se experimentó con cuatro concentraciones de esa substancia (0.25, 0.50, 0.75 y 1 g L<sup>-1</sup>), siendo la primera la más utilizada para teñir algas coralinas geniculadas (Andrake y Johansen, 1980). Los experimentos a mayores concentraciones se realizaron debido a que *L. muelleri* es de mayor tamaño y grosor que las coralinas con las que se ha utilizado anteriormente. Se recolectaron 10 organismos; 8 fueron sumergidos por pares en cada concentración durante 24 h y dos funcionaron como control. Una vez teñidos se colocaron en un acuario de 40 L con un fotoperiodo similar al que se presentaba en esa época del año (12/12) y se mantuvieron así durante todo el experimento. Se realizaron recambios de agua cada 15 días. El experimento tuvo una duración de dos meses (octubre a noviembre), tiempo que se consideró el mínimo indispensable para observar si se marcaban los organismos con el colorante.

200–210°C, 250–260°C and 300–310°C for 1, 2, 3, 5, 10 or 15 min.

- X-rays: Radiographs of laminae and rhodoliths, cut in half, were taken to determine whether it is possible to count the bands on a X-ray plate.
- Polishing: Laminae were polished with abrasive powders of 400, 600 and 800  $\mu\text{m}$ , and constantly observed using a stereoscope with transmitted light to determine with which grain size and at what lamina thickness the bands are best observed.

#### Marking method

A capture-mark-recapture method was used to validate the bands as age structures and determine the rate of length increase, employing two types of markers: metallic and alizarin red. In the case of the metallic marker, an incision was made in the organism with a drill, into which a 1-cm-long rustless wire was inserted and affixed with Z-spar marine resin, one end remaining on the organism's surface. For the second, it was necessary to previously determine the appropriate concentration of alizarin red with which a recognizable mark is formed. For this, four concentrations of alizarin red were used: 0.25, 0.50, 0.75 and 1 g L<sup>-1</sup>; the first is the one most used to stain geniculate coralline algae (Andrake and Johansen, 1980), while the higher concentrations were selected because *L. muelleri* is larger and wider than other coralline algae used in previous experiments. Ten organisms were collected; eight were submerged in pairs in each concentration for 24 h and two served as control. Once stained, they were placed in a 40-L aquarium under a photoperiod corresponding to that time of year (12/12), which was maintained throughout the experiment. Water was exchanged every 15 days. The experiment lasted for two months (October to November) as this was considered the minimum time required to observe if the organisms were marked by the dye.

#### Field and laboratory experiments

To validate the bands and determine the rate of length increase, field and laboratory experiments were conducted based on the pilot study. During the field work, the rate of growth of the organisms was estimated *in situ*. At Punta Galeras, an area of approximately 4 × 4 m and 3 m depth was chosen. Three size classes were determined from the pilot study: small (<5 cm), medium (5–10 cm), and large (>10 cm). Three groups of six organisms of each size class were collected, measured and tagged by attaching with resin a small plastic marker to each individual in order to facilitate its identification. A group of 18 organisms (6 of each size) was stained with alizarin red, using the following procedure: the dye (0.25 mL L<sup>-1</sup>) was placed in a corner of 5-L plastic bags and secured with a rubber band; then, under water, 2–3 organisms were placed inside the bag, the bag was filled with water and closed, and the dye was released. After 24 h, the bags were

### *Experimentos de campo y laboratorio*

Para validar las bandas y determinar la tasa de incremento longitudinal se realizaron experimentos de campo y de laboratorio con base en los resultados del estudio piloto. Durante la fase de campo se estimó la tasa de crecimiento de los organismos *in situ*. En Punta Galeras se eligió un área aproximada de 4 × 4 m de superficie a 3 m de profundidad. Se trabajó con tres clases de talla que se determinaron a partir del estudio piloto: chica (<5 cm), mediana (5–10 cm) y grande (>10 cm). Se recolectaron tres grupos de seis organismos de cada clase de talla, se midieron y se marcaron fijando con resina una pequeña marca de plástico a cada individuo para facilitar su posterior localización. Se tiñó un grupo de 18 organismos (6 de cada talla) con rojo de alizarina, usando el siguiente procedimiento: utilizando bolsas de plástico con capacidad de 5 L se colocó el colorante en una esquina sujetándolo con una liga (0.25 mL L<sup>-1</sup>); después, bajo el agua, se pusieron de dos a tres organismos dentro de cada bolsa y, llenando la bolsa con agua, se cerró ésta y se soltó el colorante. Transcurridas 24 h se retiraron las bolsas, se quitó el exceso de colorante sacudiendo los organismos y se colocaron dentro del cuadrante. Adicionalmente, a otro grupo con un número similar de organismos (18) se les colocó una marca metálica haciéndoles una incisión con un taladro dentro de la que se colocó un alambre inoxidable y que se rellenó con resina marina Z-spar, cuidando que quedara la marca justo en el borde del individuo. Finalmente a otro grupo (18 individuos) se les aplicó tanto la marca metálica como el colorante.

El experimento tuvo una duración de un año (noviembre de 1996 a noviembre de 1997), a lo largo del cual se realizaron visitas cada tres meses para medir el largo, ancho y alto de los organismos. A los seis meses se realizó una recolección y seis meses después la última; los organismos se transportaron al laboratorio en donde fueron procesados. El experimento de laboratorio se realizó en la Unidad Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Se recolectaron 6 organismos de cada clase de talla en Punta Galeras y se transportaron a laboratorio donde se distribuyeron homogéneamente en tanques de 1.40 m de largo por 0.70 m de ancho y 20.5 cm de altura, con una capacidad máxima de 200 L. Se mantuvo flujo constante y directo de agua de mar depurada primero por decantación y posteriormente filtrada con filtro Voltrex. El control de la luz se realizó mediante pantallas de malla, que permiten el paso de aproximadamente el 50% de la luz. Esta pantalla se eligió después de experimentar con pantallas de 1, 2 y 3 mallas siendo la segunda la que funcionó mejor para evitar la proliferación de algas verdes.

Los organismos se marcaron, midieron y tiñeron siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el campo. Como control se colocó en los tanques el mismo número de organismos sin teñir. Los rodolitos se distribuyeron homogéneamente en dos tanques, en donde permanecieron por un periodo de ocho

retrieved, the excess dye was removed by shaking the organisms and they were placed in the quadrant. Additionally, a metallic marker was inserted (as previously described) into another group of 18 organisms. Finally, another 18 organisms were both stained with alizarin red and had the metallic marker inserted.

The experiment lasted for one year (November 1996 to November 1997). Visits were made to Punta Galeras every three months to measure the length, width and height of the organisms. One collection was made after six months and another six months after that. Six organisms of each size class were transported to the laboratory at Pichilingue of the University of Baja California Sur and homogeneously distributed in 200-L tanks (1.40 m long × 0.70 m wide × 20.5 cm high). There was a constant and direct flow of seawater, purified first by decantation and then filtered through a Voltrex filter. Light was controlled using mesh screens that allowed approximately 50% of the light to pass. This screen was chosen after experimenting with 1, 2 and 3 meshes, the second being the one that had no proliferation of green algae.

The organisms were tagged, measured and stained following the same procedure as for the field experiments. An equal number of organisms were not stained and they served as control. The rhodoliths were homogeneously distributed in two tanks, where they remained for a period of eight months (March 1997 to November 1997). During this time, once a week the organisms were washed to remove epiphytes and the tanks were emptied and cleaned to remove sediments and the invertebrates attached to the walls. Three tanks were used by rotation throughout the experiments; two contained the organisms and the third was exposed to the sun for one week to prevent the proliferation of invertebrates.

### *Growth rate*

Survival was expressed as the percentage of live organisms at the end of the experiment relative to the beginning, differentiating among the three treatments (tagged and stained, only tagged, and controls). Paired comparisons were made of the proportion of survivors, using a difference in proportions test to determine whether the marker or dye affected the survival of the organisms.

Thin sections were made of each individual, and readings were taken of the increase in length (distance between the stain and the edge), the number of bands formed during the experiment, and the total number of bands. For faster and more precise readings, the laminae were digitalized with a Scan Jet 4C/T® scanner, using a resolution of 500 points per inch (pixels), and then analyzed with the Sigma Scan Pro® program for image measurements.

The increase in length was measured from the stain mark to the edge; this measurement corresponded to net growth during the time of the experiment, from which the annual growth rate was determined. To estimate whether the growth rate differed among the size classes and among the individuals, a nested

meses (marzo de 1997 a noviembre de 1997). Durante este lapso de tiempo los organismos y los tanques fueron limpiados una vez por semana para retirar sedimentos y epifitos. Durante todo el experimento se contó con tres tanques, dos se usaban para los organismos y el tercero de apoyo en las operaciones de limpieza, exponiéndolos alternadamente al sol durante una semana para evitar proliferación de invertebrados. Los tanques eran vaciados y lavados para quitar el polvo acumulado en el fondo y los invertebrados que se pegaban en la pared.

#### *Tasa de crecimiento*

Una vez terminados los experimentos se determinó la supervivencia de los organismos, expresada ésta como el porcentaje de organismos vivos al final del experimento con respecto al número inicial, distinguiendo entre los tres tratamientos (marcados y teñidos, sólo marcados y controles). Se realizaron comparaciones pareadas de la proporción de sobrevivientes, mediante una prueba de diferencia de proporciones para determinar si la marca o el colorante afectan la supervivencia de los organismos.

Se hicieron secciones delgadas de cada individuo y se realizaron las lecturas de aumento en longitud (distancia entre la marca del colorante y el borde), número de bandas formadas en el tiempo del experimento y número total de bandas. Para mayor rapidez y precisión en la lecturas, las láminas fueron digitalizadas con un Scanner Scan Jet 4C/T<sup>MR</sup> usando una resolución de 500 puntos por pulgada (pixels), y posteriormente fueron analizadas en el programa de medición de imágenes Sigma Scan Pro<sup>MR</sup>.

Se midió el incremento en longitud a partir de la marca y hasta el borde obteniendo de esta manera el crecimiento neto durante el tiempo de experimentación y con base en éste se determinó la tasa de crecimiento anual. Para estimar si la tasa de crecimiento fue diferente entre las clases de talla y entre los individuos se realizó un análisis de variancia anidado (Zar, 1996), en donde los individuos se encuentran anidados en las tallas. Dado que este análisis requiere homogeneidad en el tamaño de la muestra se eligieron azarosamente dos individuos de cada talla con seis ramas cada uno. Se determinó si hubo diferencia en las medias del crecimiento con respecto a la época del año (verano *vs.* invierno) mediante una prueba de diferencia de medias (Zar, 1996).

#### *Determinación de la edad*

Inicialmente se determinó en qué consiste una banda; esto se llevó a cabo mediante observaciones de varias ramas realizadas por dos personas. Posteriormente se hicieron conteos de bandas en una distancia conocida para 40 ramas y se compararon las lecturas de las dos personas mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, la cual permite evaluar si las tendencias de los lectores pueden ser consideradas iguales. Para determinar la periodicidad de las bandas, indicativas de la

analysis of variance (Zar, 1996) was performed, in which the individuals are nested in the sizes. As this analysis requires homogeneity in the size of the sample, two individuals of each size with six branches each were randomly selected. A difference of means test (Zar, 1996) was applied to determine if there was any difference in the growth means relative to the season (summer *vs* winter).

#### *Age determination*

Initially, two people observed several branches to determine what constituted a band. Both then counted the bands in a known distance of 40 branches and the readings were compared using the non-parametric Mann-Whitney U test, which evaluates whether the tendencies of the two readers are the same. To determine the periodicity of the bands, which indicate age, their formation time (number of bands formed in a known time) was analyzed in order to associate the banding pattern with a chronological scale. For this, the stain mark was taken to be the initial chronological point from which the bands were counted. The mean and mode of the bands formed during the experiment were then estimated. The age of each individual was determined by counting the number of bands along the main axis of each branch and dividing this value by the number of bands formed annually (previously determined).

## **Results**

#### *Pilot study*

A total of 117 individuals were measured with a total length (longest axis) ranging from 2 to 15 cm (fig. 1). As it was not possible to establish whether the sizes presented differential growth, we decided to arbitrarily separate the population into three groups: small individuals, 0–5 cm; medium, 5–10 cm; and large, 10–15 cm.

Clear and dark bands are visible on the smooth surface of a polished branch and part of the initial work was to find a method that would best allow the observation of these bands. A petrographic technique was therefore adapted to obtain thin rhodolith sections, and the following results were obtained when they were treated with diverse methods (see above):

- Staining: All the laminae treated with the different concentrations of alizarin red (0.005, 0.01, and 0.1 mg) stained uniformly and it was not possible to observe the bands.
- Burning: In this experiment the laminae also burned uniformly, impeding the observation of the bands.
- X-rays: The radiographs presented a homogeneous coloration and it was not possible to distinguish the growth bands.
- Polishing: This method produced the clearest bands. The bands were best observed when the laminae were polished with a fine abrasive (800  $\mu\text{m}$ ), because the scratches produced when the laminae are cut and smoothed are removed with the fine abrasive.

edad, se analizó su tiempo de formación (número de bandas formadas en un tiempo conocido) para poder así asociar el patrón de bandeo a una escala cronológica. Para esto se utilizó como punto cronológico inicial la marca del colorante, a partir de la cual se contaron las bandas. Posteriormente se estimó la media y la moda de bandas formadas en el tiempo de experimentación. La edad de cada individuo se determinó contando el número de bandas a lo largo del eje principal de cada rama y dividiendo este valor entre el número de bandas formadas anualmente (previamente determinado).

## Resultados

### *Estudio piloto*

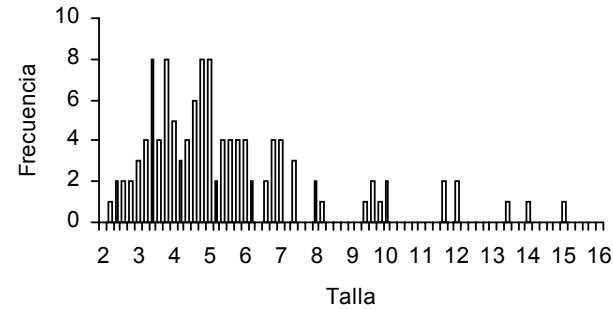
Se midieron en total 117 individuos cuya longitud total (eje más largo) fue de 2 a 15 cm (fig. 1). Debido a que no se logró saber si había un crecimiento diferencial por tallas, se decidió arbitrariamente separar a la población en tres grupos, considerando individuos pequeños a los de 0 a 5 cm, medianos a los de 5 a 10 cm y grandes a los de 10 a 15 cm de longitud.

Al lijar una rama hasta obtener una superficie plana aparecieron las bandas claras y oscuras. Parte del trabajo previo consistió en encontrar la mejor forma en que dichas bandas pueden ser observadas, para lo que para hacer la láminas de rodolitos se adaptó una técnica petrográfica. Una vez obtenida la lámina delgada, ésta se trató con diversos métodos cuyos resultados se muestran a continuación:

- Tinción: Teñir las láminas con diferentes concentraciones de rojo de alizarina (0.005, 0.01 y 0.1 mg) no permitió observar mejor las bandas. En todos los casos la lámina se tiñó uniformemente y las bandas no se podían observar.
- Quemado: En el experimento de quemado no se lograron buenas observaciones ya que produjo un quemado también uniforme, donde no se lograron resaltar las bandas.
- Rayos X: En las radiografías obtenidas apareció una coloración homogénea y tampoco fue posible apreciar las bandas de crecimiento.
- Pulido: Pulir las láminas resultó el mejor método para observar las bandas. El pulido con abrasivo fino (800  $\mu\text{m}$ ) fue el que permitió observar las bandas más claramente, dado que cuando se cortan y desbastan las láminas quedan rayones que pueden ser desvanecidos con el abrasivo fino.

### *Método de marcado*

Los organismos sometidos a cuatro concentraciones de rojo de alizarina se retiraron del experimento a los dos meses y se procesaron para observar las puntas. No se pudo medir crecimiento en este lapso de tiempo, pero el colorante fue asimilado por los organismos en todas las concentraciones. En la concentración de 0.25 mg L<sup>-1</sup> la marca se mostró más homogénea



**Figura 1.** Estructura de tallas de la población de *Lithothamnion muelleri* de Punta Galeras, Golfo de California (México)

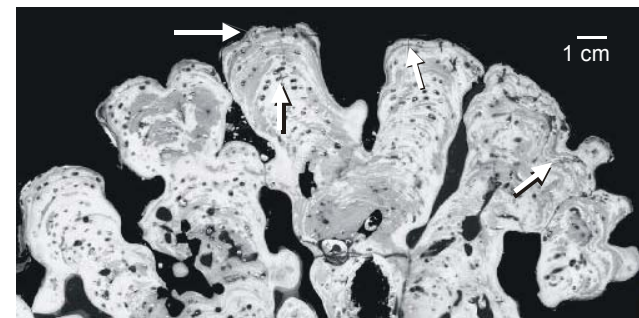
**Figure 1.** Size structure of the *Lithothamnion muelleri* population at Punta Galeras, Gulf of California (Mexico).

### *Marking method*

Organisms treated with four concentrations of alizarin red were removed from the experiment after two months and their tips observed. Growth could not be measured at this time, but the dye was assimilated by the organisms at all concentrations; however, the stain was more homogeneous with the concentration of 0.25 mg L<sup>-1</sup> (fig. 2), so we decided to work with this concentration as it is also the one most commonly used for other coralline algae.

### *Field and laboratory experiments*

Only 22 of the 56 individuals tagged (40%) were recaptured at Punta Galeras (table 1). Visits were made in February, May and August to corroborate the presence of the individuals (table 1), and to estimate their increase in length. After two surveys it was apparent that it was not possible to measure the increase in size directly with the vernier caliper because of the irregular shape of the organisms and their slow growth rate.



**Figura 2.** Organismos marcados (flecha) con rojo de alizarina (0.25 mg L<sup>-1</sup>) donde se observan las marcas del colorante (flechas) y las bandas a lo largo de los ejes de la planta (cabezas de flecha).

**Figure 2.** Organisms stained (arrow) with alizarin red (0.25 mg L<sup>-1</sup>), showing the dye stains (arrows) and the bands along the plant's axes (arrow heads).



**Tabla 1.** Porcentaje de recaptura de plantas marcadas y puestas a crecer en el campo a lo largo del año de trabajo.  
**Table 1.** Percentage of recapture of plants tagged and left to grow in the field throughout the work year.

	Noviembre	Febrero	Mayo	Agosto	Noviembre
	1996	1997			
Tinción	22	7-1	7	7	6
Recaptura (Tinc)		33%	33%	33%	28%
Marca-Tinción (M.T)	16	7-1	6	2	4
Recaptura (M.T)		43%	40%	13%	26%
Marca (M)	18	13	15	12	11
Recaptura (M)		72%	83%	75%	68%
Total	56	27	28	21	21
Total recaptura		48%	50%	37%	37%
Marcas desprendidas	0	1	1	2	2
%		1.7%	1.8%	3.7%	3.7%
Total	6, 10.7%				

(fig. 2) por lo que se decidió trabajar con esta concentración, además de ser la más utilizada para otras algas coralinas.

#### Experimentos de campo y laboratorio

En los estudios de campo se obtuvo un porcentaje de recaptura del 40%; de los 56 individuos marcados solamente se recolectaron 22 (tabla 1). Se realizaron visitas en febrero, mayo y agosto, en las que se corroboró la presencia de los individuos (tabla 1). Además, en estas visitas se tomaron medidas de los individuos para detectar su incremento en longitud. Después de dos salidas se corroboró que no fue posible medir el incremento de talla directamente con el vernier debido a la forma irregular de los organismos y a la lenta tasa de crecimiento que presentan.

Con respecto a los dos tipos de marcas (rojo de alizarina y marca metálica), una vez recolectados y cortados los individuos, no fue posible encontrar la marca metálica ya que ésta quedó inmersa dentro del organismo y, a pesar de que se colocaron en una posición reconocible, no fue posible encontrarlas. En el caso de la marca de alizarina, ésta fue clara y homogénea en una gran cantidad de ramas de los individuos (fig. 2) y, por lo tanto, fue usada para marcar los organismos y poder medir posteriormente el crecimiento y determinar el número de bandas formadas en el tiempo del experimento.

Durante los experimentos de laboratorio de las 16 plantas marcadas y teñidas sobrevivieron 11; de las 18 que sólo se marcaron sobrevivieron 15 y de las 10 usadas como control sobrevivieron 8. No se encontró diferencia significativa en la supervivencia entre los tres tratamientos ( $2 \times 3$ ,  $\chi^2 = 0.41$ ,  $P = 0.93$ ), indicando que las formas de marcado usadas no afectan significativamente la mortalidad.

Regarding the two types of markers used (metallic and alizarin red), even though the metallic marker had been placed in a recognizable position, we were unable to find it after collecting and cutting the individuals as it remained immersed within the organisms. On the other hand, the alizarin red stain was clear and homogeneous in many of the branches (fig. 2) and was therefore used to mark the organisms for subsequent growth measurements and to determine the number of bands formed during the experiment.

In the laboratory experiments, of the 16 plants tagged and stained, 11 survived; of the 18 plants only tagged, 15 survived; and 8 of the 10 control plants survived. No significant differences in survival were found between the three treatments ( $2 \times 3$ ,  $\chi^2 = 0.41$ ,  $P = 0.93$ ), indicating that the marking methods used did not significantly affect survival.

**Tabla 2.** Incremento neto y tasa de crecimiento anual de *Lithothamnium muelleri* en conjunto, para experimentos de campo y laboratorio. 1. Noviembre de 1996 a noviembre de 1997. 2. Noviembre de 1996 a mayo de 1997. 3. Mayo de 1997 a noviembre de 1997 (estimado). 4. Marzo de 1997 a noviembre de 1997.

**Table 2.** Net increase and annual growth rate of *Lithothamnium muelleri*, for field and laboratory experiments. 1. November 1996 to November 1997. 2. November 1996 to May 1997. 3. May 1997 to November 1997 (estimated). 4. March 1997 to November 1997.

Tratamiento	Incremento neto	Tasa de crecimiento
1. Campo (anual)	0.68 mm	0.60 mm/año
2. Campo (invierno)	0.46 mm	1.02 mm/año
3. Campo (verano)	0.22 mm	0.40 mm/año
4. Laboratorio (verano)	0.42 mm	0.84 mm/año

*Tasa de crecimiento*

Se procesaron un total de 43 organismos, 23 de campo y 18 de laboratorio, de los que se obtuvieron un total de 250 ramas para analizar (tablas 2, 3). Del grupo de individuos procesados, sólo en 18 (12 en campo y 6 en laboratorio) fue posible medir el crecimiento, teniéndose en total 137 ramas distribuidas en diferentes clases de talla (tablas 2, 3). A partir de estas observaciones se determinó un incremento neto promedio de 0.68 mm con una tasa de crecimiento de 0.60 mm año<sup>-1</sup> (tabla 2). A la mitad del experimento (en marzo) se realizó una colecta en el campo, lo que represento el crecimiento en invierno (octubre a marzo, tabla 2). El resto de los organismos se recolectaron en noviembre, lo que representó una tasa de crecimiento anual. La tasa de crecimiento de verano resulta de restar el crecimiento de invierno de los valores de crecimiento anual (tabla 2). Los resultados indican que en los organismos de campo se presentó un crecimiento rápido en invierno y lento en verano. Durante el verano, el crecimiento en laboratorio fue mayor que en el campo; aun así, fue menor al crecimiento invernal en el campo (tabla 3). Al comparar las medias del crecimiento en invierno y verano se encontraron diferencias significativas ( $t = 8.47$ ,  $P < 0.001$ ).

Se utilizó el incremento en longitud como un indicador de la tasa de crecimiento y ésta se comparó entre las diferentes clases de edad para determinar si los organismos crecían diferencialmente. El análisis de variancia anidado indicó que no

*Growth rate*

A total of 43 organisms were processed, 23 from the field and 18 from the laboratory, obtaining a total of 250 branches to analyze (tables 2, 3). Of these individuals, it was only possible to measure the growth of 18 (12 from the field and 6 from the laboratory), for a total of 137 branches distributed in different size classes (tables 2, 3). From these observation a mean net increase was determined of 0.68 mm, for a growth rate 0.60 mm year<sup>-1</sup> (tabla 2). A field collection was made half way through the experiment (in March) and these organisms represented growth in winter (October to March, table 2). The rest of the organisms were collected in November, which represented the annual growth rate. The summer growth rate results from deducing the winter growth from the annual growth values (table 2). The results show that the organisms had rapid growth in winter and slow in summer. In the laboratory, summer growth was greater than in the field during the same season, but less than that of winter in the field (table 3). Significant differences were found when the summer and winter growth means were compared ( $t = 8.47$ ,  $P < 0.001$ ).

The increase in length was used as an indicator of growth rate and the data obtained for the different size classes were compared to determine whether the organisms presented differential growth. The nested analysis of variance indicated that there were no differences between the size classes

**Tabla 3.** Incremento neto ( $\pm$ EE) y tasa de crecimiento anual ( $\pm$ EE) de *Lithothamnium muelleri*, en verano e invierno para campo y laboratorio por clase de talla. PB = número de plantas y ramas analizadas. ND = No disponible.  
**Table 3.** Net increase ( $\pm$ SE) and annual growth rate ( $\pm$ SE) of *Lithothamnium muelleri* in summer and winter, for field and laboratory experiments, per size class. PB = number of plants and branches analyzed. ND = not available.

Tratamiento	Incremento neto	Tasa de crecimiento	PB	
			Individuos	Ramas
<b>Campo anual</b>				
Chico	0.69 mm $\pm$ 0.05	0.61 mm/año $\pm$ 0.04	4	7, 7, 10, 10
Mediano	0.73 mm $\pm$ 0.09	0.63 mm/año $\pm$ 0.08	2	10
Grande	0.658 mm $\pm$ 0.06	0.57 mm/año $\pm$ 0.05	3	10, 10, 7
<b>Campo invierno</b>				
Chico	0.50 mm $\pm$ 0.05	0.87 mm/año $\pm$ 0.08	2	10, 5
Mediano	0.43 mm $\pm$ 0.06	1.17 mm/año $\pm$ 0.26	1	7
Grande	ND	ND		
<b>Laboratorio</b>				
Chico	0.47 mm $\pm$ 0.04	0.94 mm/año $\pm$ 0.08	2	5,5
Mediano	0.37 mm $\pm$ 0.02	0.75 mm/año $\pm$ 0.05	4	7, 6, 5, 12
Grande	ND	ND		
<b>Total</b>			<b>18</b>	<b>137</b>

hubo diferencias entre las clases de talla ( $F = 955, P = 0.52$ ), ni entre los individuos de la misma talla ( $F_{0.05(1) 3,30} = 2.92, P = 0.57$ ).

#### Determinación de la edad

Al comparar mediante una prueba  $U$  de Mann Whitney el número de bandas encontradas por dos lectores en una distancia conocida, se encontró que la tendencia en las lecturas de las dos personas fueron semejantes ( $U = 781, P = 0.85$ ). Por lo tanto, era indiferente quién realizara la lectura, y en lo sucesivo se trabajó con un solo lector. El número de bandas encontradas se relacionó linealmente con la longitud del individuo, considerándose ésta la segunda prueba de validación de las bandas como estructuras para la determinación de edad. Con respecto al tiempo de formación de las bandas, al contar el número de bandas formadas después del marcaje con alizarina, se encontraron variaciones entre las diferentes ramas. Al calcular los intervalos de confianza se encontró que, al 95%, los individuos forman en promedio entre dos y tres bandas en un año. Además, el número de bandas formadas en un año fue mayor en laboratorio que en campo ( $t_{0.05,107} = 3.16, P = 0.001$ ).

#### Edad y crecimiento

Para estimar la edad de los individuos se contaron las bandas a lo largo de las ramas en la distancia que fueran visibles (sin interrupciones) y su número se extrapoló a la longitud total de la rama. Posteriormente se estimó la edad del individuo dividiendo entre dos, que son las bandas que se forman anualmente; de esta manera se determinó la edad para cada rama siendo la edad total del rodolito la que corresponde a la rama más larga. Posteriormente se analizó cómo crecen estos organismos. Dado que no se encontraron diferencias en crecimiento entre las clases de talla, se ajustó un modelo lineal, obteniendo un coeficiente de correlación de 86% (fig. 3). Este modelo puede ser utilizado para estimar la edad de los rodolitos conociendo únicamente la talla de los mismos (fig. 4); ésta

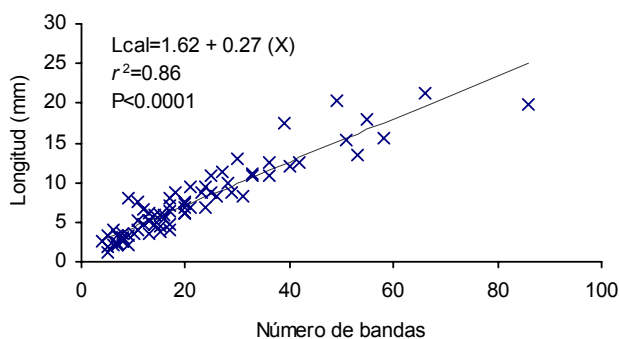


Figura 3. Relación longitud vs. número de bandas por rama de *Lithothamnion muelleri*.

Figure 3. Length vs number of bands per branch of *Lithothamnion muelleri*.

( $F = 955, P = 0.52$ ), or between the individuals of the same size ( $F_{0.05(1) 3,30} = 2.92, P = 0.57$ ).

#### Age determination

The comparison (with the Mann Whitney  $U$  test) of the number of bands found in a known distance by two people indicated that the readings of both were similar ( $U = 781, P = 0.85$ ); therefore, it did not matter who did the readings and only one person continued to do so. The number of bands found was linearly related to the length of the individual, this being considered the second validation test of the bands as structures for age determination. With regard to the time taken for the bands to form, the number of bands formed in the time elapsed after staining with alizarin red varied in different branches. The calculation of the confidence intervals revealed that at 95% confidence level, the individuals formed on average two or three bands in one year. Further, the number of bands observed in one year was greater in the laboratory than in the field ( $t_{0.05,107} = 3.16, P = 0.001$ ).

#### Age and growth

To estimate the age of the individuals, we counted the visible (without interruptions) bands along the branch axes, extrapolating to the total length of the branch, and the number of total bands was divided by two, assuming two bands are formed per year. The age of each branch was determined and the rhodolith as a whole was assigned the age corresponding to the longest branch. We then analyzed how these organisms grow. As the size classes did not present differences in growth, a linear model was fitted and a correlation coefficient of 86% was obtained (fig. 3). This model can be used to estimate the age of the rhodolith knowing only its size (fig. 4), obtained by measuring from the nucleus to the tip of the longest branch. Data used for the backcalculation of age for the individuals processed using the model proposed and based on only the growth rate are shown in Rivera (1999) and their plot shows

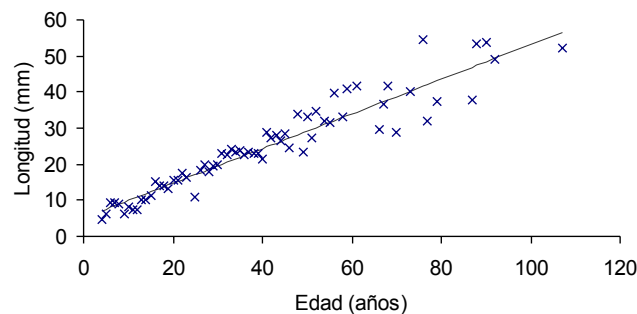


Figura 4. Modelo Lineal representando la relación entre la edad y la longitud de *Lithothamnion muelleri*.

Figure 4. Linear model representing the relation between age and length of *Lithothamnion muelleri*.

debe determinarse midiendo a partir del núcleo, y hasta la punta, la rama más larga del rodolito. Los datos que se utilizaron para el retrocálculo de la edad para los individuos procesados a partir del modelo propuesto y a partir únicamente de la tasa de crecimiento se muestran en Rivera (1999) y su representación gráfica muestra que individuos de aproximadamente 60 mm de largo pueden corresponder a una edad de casi 110 años (fig. 4). Durante el desarrollo del retrocálculo se evidencia que en los organismos pequeños las edades calculadas a partir de la tasa de crecimiento tienden a ser mayores que las calculadas a partir de la edad por número de bandas, mientras que en los organismos grandes sucede lo contrario, siendo la edad calculada a partir de la tasa de crecimiento la que tiende a ser menor que la obtenida a partir del número de bandas.

### Discusión

La separación por tallas para el experimento fue muy útil, dado que era imposible saber si los organismos crecían diferencialmente dependiendo de la talla; de no haber probado que el crecimiento era diferencial, no hubiera sido válido tratar a todos los organismos como un solo grupo. La tinción de las láminas con rojo de alizarina para resaltar las bandas de crecimiento no fue exitosa, aun cuando este método es usado con éxito para observar bandas de crecimiento en otras estructuras calcáreas (Monaghan, 1993). Su uso en los rodolitos resultó infructuoso debido a que la alizarina es afín al carbonato de calcio y el esqueleto que se analizó está constituido en su mayoría por este material, a diferencia de otras estructuras calcáreas que están compuestas de dos tipos de sustancias principalmente, la otolina y el carbonato de calcio (Blacker, 1974). Dado que el calcio es el componente principal de la estructura de los rodolitos, las ramas se tiñeron uniformemente.

Entre las algas no geniculadas formadoras de rodolitos encontramos tasas de crecimiento muy bajas, como por ejemplo  $0.4 \text{ mm año}^{-1}$  en los rodolitos (no identificados) de las Bermudas (Bosellini and Ginsburg, 1971) y  $0.01$  a  $0.05 \text{ mm año}^{-1}$  para *Lithophyllum* sp. (Littler *et al.*, 1991). Éstas son aún más bajas que la determinada en el trabajo presente ( $0.6 \text{ mm año}^{-1}$ ). Pero es difícil realizar comparaciones dados que en aquellos trabajos no se especificó el método por el cual se determinó la tasa de crecimiento. Sin embargo, el presente trabajo verificó de manera independiente la tasa presentada por Franz *et al.* (2000) mostrando que la técnica del marcado con alizarina es eficiente en los estudios de edad y crecimiento.

La elevada tasa de crecimiento mostrada por *L. muelleri* puede deberse a que estos organismos viven en un área subtropical con temperaturas medias de  $26^\circ\text{C}$  y apenas 3 m de profundidad, en donde hay suficiente luz para la actividad fotosintética. Para las algas geniculadas, el intervalo de tasa de crecimiento conocido es mucho mayor, desde  $1.92$  hasta  $60 \text{ mm año}^{-1}$ . En este caso es de considerar que las geniculadas tienen una forma de crecimiento diferente, presentando una alternancia de zonas calcificadas y no calcificadas (la genícula) y viven sujetas al substrato como la mayoría de las macroalgas,

that individuals around 60-mm-long can be almost 110 years old (fig. 4). It can be seen during the retrocalculation that the age calculated for small organisms based on growth rate tends to be higher than that calculated based on the number of bands, whereas for large organisms, the age calculated based on growth rate is more likely to be lower than that obtained from the number of bands.

### Discussion

Separating the organisms into different size classes proved very useful as it was important to determine whether or not they presented differential growth depending on size; to have treated the organisms as a single group could have introduced uncertainty. The results obtained from staining the laminae with alizarin red to enhance the growth bands were not good, even though this method has been successfully used to observe growth bands in other calcareous structures (Monaghan, 1993). In rhodoliths it failed because alizarin is similar to calcium carbonate and the skeleton analyzed consists mainly of this matter, as opposed to other calcareous structures that are principally composed of two types of substances: calcium carbonate and otoline (Blacker, 1974). As calcium is the main component of the rhodolith's structure, the branches stained uniformly.

An analysis of data for nongeniculate algae revealed very low growth rates, such as  $0.4 \text{ mm yr}^{-1}$  for rhodoliths (not identified) from Bermuda (Bosellini and Ginsburg, 1971) and  $0.01$ – $0.05 \text{ mm yr}^{-1}$  for *Lithophyllum* sp. (Littler *et al.*, 1991). These values are even lower than the one obtained in this study ( $0.6 \text{ mm yr}^{-1}$ ), but as the above studies do not mention the method used to determine the growth rate, any comparison would be difficult. However, we were able to independently verify the rate reported by Franz *et al.* (2000), showing that the alizarin staining method is efficient in age and growth studies.

The high growth rate obtained for *L. muelleri* could be explained by the fact that it lives in a subtropical area, with an average temperature of  $26^\circ\text{C}$ , and at only 3 m depth, where there is sufficient light for photosynthetic activity. For geniculate algae, the known growth rate ranges from  $1.92$  to  $60 \text{ mm yr}^{-1}$ , but it should be noted that they have a different form of growth, alternating calcified and uncalcified (geniculate) segments, and live attached to the substrate like most macroalgae, whereas rhodoliths live unattached in sandy and rocky-sandy habitats (Foster *et al.*, 1997).

In sandy areas there is less competition for space among macroalgae, so a spore may generate (depending on the conditions) a crust or a rhodolith. The crust strategy requires a shorter residence time (1–12 years; Edyvean and Ford, 1987). Algae face diverse negative environmental factors, such as competition. Unattached algae are able to explore other environments, such as sandy substrates, thus increasing their probability of survival; however, constant movement and epiphytism may result in a decrease in net growth, because organisms may bump into each other or against rocks, or they

mientras que los rodolitos viven no sujetos en habitats arenosos y arenoso-rocosos (Foster *et al.*, 1997).

Entre las macroalgas existe una menor competencia por espacio en las zonas arenosas, lo que podría propiciar que una espора pueda generar, dependiendo de las condiciones, una costra o un rodolito. La estrategia de la costra conlleva un tiempo de residencia menor (1 a 12 años; Edyvean y Ford, 1987). Al considerar que en el ambiente el alga se va a enfrentar a diversos factores negativos, uno de ellos la competencia; la existencia de dos formas (sujeta y libre) permite explorar ambientes como el arenoso, aumentando así la probabilidad de los individuos de sobrevivir. El constante movimiento y epifitismo pueden resultar en una disminución del crecimiento neto debido a que el movimiento provoca que los organismos se golpeen entre sí o contra las rocas, así como que se friccionen con el fondo arenoso y se entierren. Además, se presenta la bioerosión debida al ramoneo de herbívoros que consumen las nuevas capas de células, así como la ocasionada por organismos horadores que destruyen partes calcificadas (Wehrmann, 1998).

No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre tallas e individuos, es decir, no hay diferencias en el crecimiento entre las diferentes clases de talla ni entre los individuos de una misma talla. El no encontrar diferencias en la tasa de crecimiento entre tallas se puede deber a que únicamente la capa externa del rodolito está viva (Foster *et al.*, 1997), por lo que el tener un tamaño grande no tiene implicaciones fisiológicas de gasto energético excesivo. Ya sea un individuo de 2 o 15 cm de diámetro, el costo energético es proporcional a la superficie del organismo, ya que la masa interna está constituida de material muerto.

Considerando lo anterior, las limitaciones para aumentar indefinidamente el tamaño de los rodolitos son mecánicas, ya que estos organismos están sujetos a movimientos involuntarios provocados por el medio que los rodea y que generan abrasión. Además, movimientos bruscos pueden resultar en fragmentación de los organismos, principalmente de los organismos grandes, debido a su peso y a que con el tiempo pueden hacerse más porosos tanto por la acción del medio ambiente como por la de organismos crípticos, de tal manera que para esta especie encontramos un límite de talla a los 15 cm de longitud.

Acerca de la temporalidad del crecimiento, se encontraron diferencias significativas entre invierno y verano (1.02 y 0.40 mm año<sup>-1</sup>, respectivamente, tabla 2). Inicialmente los resultados parecerían contradictorios ya que en el verano, dada la tasa de calcificación directamente proporcional a la tasa fotosintética (Borowitzca, 1981), el crecimiento debería ser mayor. Para explicar esto, es necesario considerar que 1997 fue un año anómalo en que el fenómeno de El Niño se presentó desde el mes de mayo, prolongándose hasta mayo de 1998. Así, quizá el comportamiento del crecimiento se deba a que a temperaturas superiores a la óptima la fotosíntesis puede inhibirse o disminuir, con lo que la tasa de calcificación también

may rub against the sandy bottom and become buried. In addition, bioerosion can occur because of grazing herbivores that consume new cell layers and boring organisms that destroy calcified parts (Wehrmann, 1998).

Significant differences in growth were not found either between the different size classes or between the individuals of the same size. An explanation for this may be that only the external layer of the rhodolith is alive (Foster *et al.*, 1997), so a large size does not imply excessive energy expenditure. The energetic cost is proportional to the surface of the organism, regardless of whether it is 2 or 15 cm in diameter, since the internal mass consists of dead matter.

Limitations to the indefinite increase in size are mechanical, since rhodoliths are subject to involuntary movements generated by their environmental conditions that produce abrasion. Sudden movements may cause fragmentation of the organisms, and the larger organisms will be more liable to break because of their weight and to become more porous in time as a result of their environmental conditions and cryptic organisms. Hence, we found a size limit for *L. muelleri* of 15 cm in length.

Significant differences in growth were found for winter and summer (1.02 and 0.40 mm yr<sup>-1</sup>, respectively, table 2). The results would initially seem to be contradictory, as growth should be greater in summer because the rate of calcification is directly proportional to the rate of photosynthesis (Borowitzca, 1981). To explain this it is necessary to consider that 1997 was an anomalous year due to the occurrence of El Niño (May 1997 to May 1998), and at higher than optimum temperatures photosynthesis can be inhibited or decreased, with the consequent decrease in the rate of calcification. The optimum temperature for photosynthesis is not known for *L. muelleri*, but that temperature is assumed to have been exceeded during the study period, as El Niño 97/98 was a very strong event, with temperatures 5°C above normal at the maximum point of the phenomenon in June (Alatorre-Mendieta, 2001).

The growth rate determined in the laboratory was greater than that for Punta Galeras. This may have occurred because in the laboratory (summer) the organisms were partially protected from the light, and as it was not possible to measure the exact amount of light passing through the laboratory, it was kept the same throughout the experiment. Light intensity may have been higher in the field, resulting in a decrease in net growth due to photoinhibition.

Formation of the growth bands in *L. muelleri* may be the result of differential deposition of magnesium. Borowitzca (1981) determined that the content of magnesium in coralline algae is directly proportional to the photosynthetic rate, more magnesium being deposited during rapid growth. Also important is the density of calcium deposition, which is greater during slow growth (Wehrmann, 1998). The number of bands found per branch in *L. muelleri* is linearly related to the length of the branch; this is one criterion for the validation of an age structure, indicating that the structure is related to the variable

disminuye. No se conoce la temperatura óptima de fotosíntesis para *L. muelleri*, pero se asume que ésta pudo ser rebasada durante el periodo de estudio dado que El Niño 1997/98 fue una anomalía muy fuerte en la que se registraron hasta 5°C por encima de la temperatura normal durante su punto máximo ocurrido en el mes de junio (Alatorre-Mendieta, 2001).

La tasa de crecimiento encontrada en laboratorio fue mayor a la observada en el campo. Esto puede deberse a que en el laboratorio (verano) los organismos estuvieron protegidos parcialmente de la intensidad luminosa pero, debido a que no fue posible medir la cantidad exacta de luz incidente tanto en el laboratorio como en el campo para igualarlas, ésta se mantuvo igual durante todo el experimento. En el campo la intensidad pudo ser mayor, resultando en una disminución del crecimiento neto debida a la fotoinhibición.

La formación de las bandas de crecimiento en *L. muelleri* puede ser producto de la depositación diferencial de magnesio. Borowitzca (1981) determinó que el contenido de magnesio en las algas coralinas es directamente proporcional a la tasa fotosintética, depositándose más magnesio durante el crecimiento rápido. Además, la densidad de depositación de calcio es de gran importancia, y ésta es mayor durante el crecimiento lento (Wehrmann, 1998). El número de bandas por rama encontradas en *L. muelleri* se relacionó linealmente con la longitud de la rama, lo que constituye uno de los criterios de validación de una estructura de edad y nos indica que la estructura está relacionada con la variable utilizada (Mathews y Bawazeer, 1987; Stanton y Hurley, 1991), en este caso la longitud. Otro método de validación es el tiempo de formación de la banda, y en este trabajo se encontró que, en promedio, se forman dos bandas oscuras observables con 40 aumentos al estereoscopio, así como en computadora con 80× y 100× de aumento. La edad se calculó suponiendo la formación de dos bandas por año, ya que ésta es la media encontrada en los experimentos de campo y se considera representativa; así, la estimación de la edad se obtuvo al contar el número total de bandas en una rama y dividirlo entre dos. Además se corroboró que dos personas observaban aproximadamente el mismo número de bandas en una longitud determinada, de tal manera que dos bandas oscuras representan un año de vida del organismo.

El número de bandas encontradas en un año (de dos a tres), y las diferencias en la tasa de crecimiento, indican que, en general, se registraron dos condiciones de crecimiento: una en el invierno, con temperaturas bajas y tasa de crecimiento alta, y otra en el verano, con temperaturas altas y tasa de crecimiento baja. Es probable que el organismo registre variaciones en su crecimiento (por ejemplo, durante los cambios de marea) entre estas dos épocas, pero en este estudio no se identifican debido a las técnicas utilizadas. Para *Lithothamnium* sp., en el sur del Golfo de California, Halfar *et al.* (1998) mencionan cuatro bandas anuales, obtenidas al analizar la proporción Mg/Ca, y relacionan las mayores concentraciones de calcio con las bandas oscuras y las menores con las claras. En ese trabajo los autores no especifican si fueron cuatro bandas oscuras en un año o dos oscuras y dos claras, además de que no realizaron el

used (Mathews and Bawazeer, 1987; Stanton and Hurley, 1991), in this case length. Another validation method is the time it takes the band to form. In this study we found that two dark bands are formed on average, observable with a stereoscope (40×) and computer (magnified 80× and 100×). Age was calculated assuming two bands per year, as it was the mean obtained in the field experiments and is considered representative; hence, the number of total bands in a branch was divided by two for the age estimate. We also corroborated that two people observed approximately the same number of bands in a certain length. Therefore, two dark bands represent one year of life.

The number of bands found in one year (2–3) and the differences in growth rate indicate two variations in growth conditions: one in winter, with low temperatures and high growth rate, and another in summer, with high temperatures and low growth rate. Organisms probably register variations (e.g., tidal changes) within these two periods, but they were not identified in this study due to the techniques used. For *Lithothamnium* sp. in the southern Gulf of California, Halfar *et al.* (1998) mention four annual bands after analyzing the proportion of Mg/Ca, and associated the higher concentrations of calcium with the dark bands and the lower with the light bands. These authors did not specify whether there were four dark bands or two dark and two light bands in one year; furthermore, they did not undertake a validation study, because to obtain reliable results the process should be followed over at least one year, which they did not do.

Wehrmann (1988) also analyzed the proportion of Mg/Ca in *L. corallioides* and *Phymatolithon calcareum*, and concluded that two bands form in one year (one clear and one dark); however, a validation was not done and the marking was assumed to be annual similarly to that of the corals, i.e., one dark band and one clear band form in one year. Care should be taken in this respect because it is not known for sure whether all the organisms form annual bands or if they are related to a certain period. For example, here we found two dark and two clear bands, and Félix-Uraga and Ramírez (1989) reported two dark annual bands for the Pacific sardine, when previous works had assumed the formation of one band each year.

The rhodoliths' form of growth can be appropriately explained by a linear model, obtained by estimating age based on the number of bands. The use of this model is more recommendable than retrocalculating age based on growth rate, which is a quick and easy method to estimate age when the growth rate is known. However, as these organisms have a long life span (>100 years), variations in growth rate probably occur in such a long period, whereas the number of bands formed in one year is more likely to remain stable, and they can be small or large depending on the prevailing conditions in a certain year.

Once a model has been established for *L. muelleri*, based on the number of bands it is possible to determine the age of the organisms knowing only their length. Due to the round shape of the rhodoliths it is important to consider the age of the

estudio de validación, con por lo menos un año de seguimiento, el cual es necesario para que estas determinaciones sean confiables.

Por otro lado, al analizar también la proporción Mg/Ca, Wehrmann (1998) concluyó que en *L. corallioides* y *Phymatolithon calcareum* se forman dos bandas en un año (una clara y una oscura), pero su trabajo tampoco contó con una validación, y únicamente asume que el marcado es anual de manera similar a los corales, es decir, que se forman una banda oscura y una clara en un año. Sin embargo, se deben tener precauciones al respecto dado que no existe la seguridad de que todos los organismos formen bandas anuales, o incluso que éstas estén relacionadas con un período determinado. Por ejemplo, en este trabajo se encontraron dos bandas oscuras y dos claras, y Félix-Uraga y Ramírez (1989) reportan la formación de dos bandas oscuras anuales para la sardina monterrey, cuando los trabajos anteriores asumían que se formaba una cada año.

La forma de crecimiento de los rodolitos puede ser explicada adecuadamente por un modelo lineal. El utilizar este modelo resultante de la estimación de la edad por número de bandas para explicar el crecimiento es más recomendable que utilizar un retrocálculo de la edad usando la tasa de crecimiento. El retrocálculo de la edad a partir de la tasa de crecimiento es un método fácil y rápido para estimar la edad cuando se conoce la tasa de crecimiento. Debido a que los rodolitos son organismos muy longevos (>100 años de edad) es factible que, en períodos tan largos, la tasa de crecimiento presente variaciones, mientras que es más probable que el número de bandas formadas en un año se mantenga estable aunque éstas sean pequeñas o grandes dependiendo de las condiciones que imperen en un año determinado.

Una vez establecido el modelo para esta especie, es factible determinar la edad de los organismos a partir del número de bandas conociendo únicamente su longitud. Debido a la forma redonda de los rodolitos es importante considerar la edad de la rama más larga como la edad mínima que puede tener cada organismo, ya que al medir la rama más larga estamos seguros de que al menos tiene la edad que le corresponde a esta rama. Por otro lado, si sólo medimos el eje más largo del rodolito no estamos considerando si el núcleo era pequeño o grande, o si creció más en una dirección que en otra.

### Agradecimientos

El presente estudio fue realizado bajo los auspicios de la CONABIO proyecto B086 financiado a RRR. Se agradece a Alejandra Ángeles-Pérez la elaboración de las láminas histológicas y su apoyo durante la realización de este trabajo. MSF agradece el apoyo de la Comisión Fulbright que apoyó su año sabático en México. MGR fue técnico del proyecto CONABIO y el presente estudio constituye su tesis de licenciatura. Agradecemos los comentarios de dos revisores anónimos.

longest branch as the minimum age of the organism, because by measuring the longest branch we are sure that it has at least that age. On the other hand, if only the longest axis of the individual is measured, we are not taking into consideration whether the nucleus was small or large, or if it grew more in one direction than another.

### Acknowledgements

This study received financial support from CONABIO (project B086 granted to RRR). Thanks to Alejandra Ángeles-Pérez for the elaboration of the histological slides and her continued support. MSF acknowledges the Fulbright Commission for support during the sabbatical year in Mexico. This work represents the B.Sc. thesis of MGR. The comments of two anonymous reviewers are appreciated.

English translation by Christine Harris.

### Referencias

- Adey, W.H. and Macintyre, I.G. (1973). Crustose coralline algae: A re-evaluation in the geological sciences. *Geol. Soc. Am. Bull.*, 84: 833–904.
- Aegean, C.R. (1981). Growth of the branched coralline alga, *Porolithon gardineri* (Foslie) in the Hawaiian Archipelago. Fourth International Coral Reef Symp., Manila, 2: 419–423.
- Alatorre-Mendieta, M.A. (2001). El Niño en el Golfo de California. En: E. Escobar, M. Bonilla, A. Badan, M. Caballero y A. Winckell (eds.), *Los Efectos del Fenómeno El Niño en México 1997–8*, CONACYT, México, pp. 50–54.
- Andrake, W. and Johansen, H.W. (1980). Alizarin red dye as a marker for measuring growth in *Corallina officinalis* (Corallinaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.*, 16: 620–622.
- Blaker, R.W. (1974). Recent advances in oolith studies. In: F.R. Harden-Jones (ed.), *Sea Fisheries Research*, John Wiley, New York, pp. 67–90.
- Borowitzca, M.A. (1981). Calcification in algae: Mechanisms and the role of metabolism. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 6(1): 1–45
- Bosellini, A. and Ginsburg, R.N. (1971). Form and internal structure of recent algal nodules (Rhodolites) from Bermuda. *J. Geol.*, 79: 669–682.
- Bosence, D.W. (1983). The occurrence and ecology of recent rhodoliths (rodoids, rhodolites). In: T.M. Peryt (ed.), *Coated Grains*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 225–242.
- Edyvean, R.G.J. and Ford, H. (1987). Growth rates of *Lithophyllum incrustans* (Corallinales, Rhodophyta) from southwest Wales. *J. Phycol.*, 22: 139–146.
- Félix-Uraga y Ramírez (1989). Verificación en las determinaciones de edad de *Sardinops sagax caerulea* basadas en la lectura de otolitos. *Invest. Mar. CICIMAR*, 4(1):59–64.
- Foster, M.S. (2001). Rhodolith beds: between hard and soft places. *J. Phycol.*, 37: 639–667.
- Foster, M.S., Riosmena-Rodríguez, R., Steller, D.L. and Woelkerling, W.J. (1997). Living rhodolith beds in the Gulf of California and their implications for paleoenvironmental interpretations. In: M.E. Johnson and J. Ledesma-Vázquez (eds.), *Pliocene Carbonates and Related Facies Flanking the Gulf of California, Baja California Sur, Mexico*. *Bull. Am. Geol. Soc. Spec. Pap.*, 318: 127–139.

- Franz, B.R., Kashgarian, M., Coale K.H. and Foster, M.S. (2000). Growth rate and potential climate record from a rhodolith using  $^{14}\text{C}$  accelerator mass spectrometry. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 1773–1777.
- Halfar, J., Zack, T., Kronz, A. and Zachos, J.C. (1998). Paleoenvironmental signals and growth rates of rhodoliths: A geochemical approach. *Mineral. Mag.*, 62(1–3): 559–560.
- Littler, M.M., Littler, D.S. and Hanisak, M.D. (1991). Deep-water rhodolith distribution, productivity, and growth history at sites of formation and subsequent degradation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 150: 163–182.
- Mathews, M.S. and Bawazeer, A.S. (1987). Age and validation of age from fishes from the Arabian Gulf. In: R.C. Summerfelt and E.H. Gordon (eds.), *The Age and Growth of Fish*. Iowa State Univ. Press, Iowa, pp. 253–265.
- Monaghan, J.P. (1993). Comparison of calcein and tetracycline as chemical markers in summer flounder. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 122: 298–301.
- Payri, C.E. (1997). *Hidrolithon reinboldii* rhodolith distribution, growth and carbon production of a French Polynesian reef. *Proc. 8th International Coral Reef Symp.*, 1: 755–760.
- Prager, E.J. and Ginsburg, R.N. (1989). Carbonate nodule growth on Florida's outer shelf and its implications for fossil interpretations. *Palaios*, 4: 310–317.
- Riosmena-Rodríguez, R. (2002). Taxonomy of the order Corallinales (Rhodophyta) for the Gulf of California, Mexico. Ph.D. thesis, La Trobe University, xvi + 200 pp + 89 plates.
- Rivera, M.G. (1999). Edad y crecimiento de *Lithothamnion crassiusculum* (Foslie) Mason 1943 (Corallinales, Rhodophyta) en el suroeste del Golfo de California, México. Departamento de Biología Marina, UABCS, 65 pp.
- Stanton, L.H. and Hurley, D.H. (1991). Validation of daily increment formation in the otoliths of juvenile silver perch, *Bairdiella chrysoura*. *Estuaries*, 14(2): 199–206.
- Wehrmann, A. (1998). Modern cool-water carbonates on a coastal platform of northern Brittany, France: Carbonate production in a macrophytic system and sedimentary dynamics of bioclastic facies. *Senckenb. Marit.*, 2(4/6): 151–166.
- Zar, J.H. (1996). *Bioestadistical Analysis*. Prentice Hall, USA, 662 pp.