Boltovskoy, A., 1995
Taxonomía y morfología de los dinoflagelados: Métodos de trabajo.
In: *Manual de métodos ficológicos.*
Ed.: K. Alveal, M. E. Ferrario, E. C. Oliveira & E. Sar.
Univ. de Concepción, Concepción. pp. 55-82.

TAXONOMY AND MORPHOLOGY OF DINOFLAGELLATES: WORKING METHODS

CONTENTS

INTRODUCTION 56
COLLECTION AND CULTURE 58
Collection. 58
Culture. 58
Temporary cultures. 58
FIXATION 59
Formaldehyde. 59
Ethanol. 60
Lugol solution. 60
Osmium tetroxide. 61
Glutaraldehyde. 61
LIGHT MICROSCOPY: METHODOLOGICAL REVIEW 62
Micromanipulation. 62
LIGHT MICROSCOPY: TOOLS, MATERIALS AND METHODS 63
Pipettes. 63
Micropipettes (manufacturing and using capillary pipettes). 64
Glass rods. 65
Handled needles 65
Wet cameras 66
Temporary and permanent slides. 66
Reactives instillation 67
Sodium hypochloryte 67
Glycerin-gelly. 68
Staining. 69
Obtaining emptied thecae. 70
Plates dissociation. 71
Measuring. 72
Drawing. 72
Photography. 72
Contrast microscopy. 73
Fluorescence microscopy. 73
Membrane filters. 73
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY 74
Drying thecae. 75
Arrangement of the specimens. 75
Preparing disjointed plates 75
DINOFLAGELLATE CYSTS 76
Cyst collection. 77
Screening 77
Organic cysts. 77
Calcareous cysts. 78
Slides and staining of the cysts. 79
CONCLUSSIONS 79
LITERATURE CITED 80

Manual de Métodos Ficológicos, 1995.
K. Alveal, M.E. Ferrario,
E.C. Oliveira y E. Sar (eds.)
Universidad de Concepción
Concepción - Chile

TAXONOMIA Y MORFOLOGIA DE LOS DINOFLAGELADOS: METODOS DE TRABAJO

ANDRES BOLTOVSKOY

Instituto de Limnología "Dr. R. A. Ringuelet" y
Departamento Científico Ficología
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Paseo del Bosque s/n
1900 La Plata, Argentina

INTRODUCCION 56

RECOLECCION Y CULTIVO 58
Recolección 58
Cultivo 58
Cultivos temporarios 58

FIJACION 59
Formol 59
Etanol 60
Lugol 60
Tetróxido de osmio 61
Glutaraldehído 61

MICROSCOPIA OPTICA: RESEÑA METODOLOGICA 62
Micromanipulación 62

MICROSCOPIA OPTICA: HERRAMIENTAS, MATERIALES Y METODOLOGIAS . 63
Pipetas 63
Micropipetas (preparación y empleo de pipetas capilares) 64
Varillas de vidrio 65
Agujas enmangadas 65
Cámara húmeda 66
Preparados temporarios y permanentes 66
Instilación de reactivos 67
Hipoclorito de sodio 67
Gelatina glicerinada 68
Tinciones 69
Obtención de tecas vacías 70
Disociación de placas 71
Mediciones 72
Dibujo 72
Fotografía 72
Microscopía de contraste 73
Microscopía de fluorescencia 73
Filtros de membrana 73

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO 74
Secado de tecas 75
Orientación de los especímenes 75
Preparación de placas desarticuladas 75

QUISTES DE DINOFLAGELADOS 76
Recolección de quistes 77
Tamizado para la recuperación de quistes 77
Quistes orgánicos 77
Quistes calcáreos 78
Preparados y tinción de quistes 79

CONCLUSION 79

REFERENCIAS 80

INTRODUCCION

La taxonomía de los dinoflagelados se basa principalmente en el estudio de sus cubiertas. Actualmente se sabe que no hay un límite neto entre los dinoflagelados con tecas bien desarrolladas y aquellos que no las poseen, existiendo entre ellos toda una gama de variación. Aún los dinoflagelados gimnodinioides, antes considerados como "desnudos", presentan un complejo cortical compuesto por numerosos campos o celdillas poligonales, homologable a una verdadera tabulación. Los campos, que en en algunas especies incluyen placas muy sutiles, están formados por vesículas ectoplásmicas contiguas. Su cantidad es sumamente variable: por ejemplo, 59 a 63 en *Zooxantella microadriatica*, 47 a 360 en diferentes especies de *Woloszynskia*, 700 a 1099 en *Gyrodinium* y 4810 en *Polykrikos schwartzii* (Netzel & Dürr, 1984). Tanto la numerosidad y la variabilidad numérica de los campos, como su escasa variación morfológica, hacen que no puedan emplearse en la caracterización taxonómica de las especies con el mismo rigor con el que se utilizan las placas en los dinoflagelados típicamente tecados. En estos últimos la tabulación se compone de piezas mucho más diferenciadas una de otra por su tamaño y su forma, y el número máximo de placas oscila alrededor de 40. A ellos está dedicado principalmente este capítulo.

En el estudio de la taxonomía y morfología de los dinoflagelados, en general, es deseable comenzar por la observación de los organismos vivos al microscopio óptico (MO), notando el movimiento, color, forma general, posición del núcleo y de la mancha ocular, etc. En el caso de los dinoflagelados con tecas bien desarrolladas la observación en vivo no es tan importante, puesto que su sistemática se basa en la cantidad, la forma y la disposición de sus placas. Si bien para las identificaciones de rutina a veces es suficiente con observar la forma general y el

tamaño del organismo, tal como sucede con muchos Ceratiaceae (existen intentos recientes de discernimiento por computadora basados en programas de reconocimiento de modelos ópticos; Steidinger *et al.*, 1990), en la mayor parte de los casos no es posible la determinación específica sin el conocimiento de la tabulación, como en muchas Peridiniales y Gonyaulacales, donde especies diferentes suelen tener forma y tamaño similares. En todo caso, para la taxonomía crítica, se requiere el conocimiento de la tabulación completa.

La teca de un dinoflagelado se asemeja a un rompecabezas tridimensional donde cada una de las piezas encaja perfectamente con las vecinas. Para estudiar en detalle la tabulación (número, distribución y forma de las placas), el procedimiento más recomendable es observar, medir y dibujar las tecas desde diferentes ángulos, y por último desarmar el rompecabezas para determinar con mayor precisión la forma y las interrelaciones de las placas. Son de particular interés aquellas que se visualizan con mayor dificultad, como las del cingulum y el sulcus, algunas de las cuales miden unos pocos micrómetros. Al mismo tiempo, en las placas aisladas es posible observar con mayor nitidez detalles de la ornamentación superficial, porosidad, y del lugar de nacimiento preciso de las espinas, aletas y membranas. Como estas últimas son estructuras tabulares marginales, en los ejemplares enteros es muy difícil ver a cuál de dos placas contiguas pertenecen.

Una herramienta extraordinaria para el estudio de las tecas es el microscopio electrónico de barrido (MEB) que posee una profundidad de foco 300 veces mayor que el microscopio óptico (MO) y supera en decenas de veces su capacidad de resolución y aumento. Esto implica que con el MEB se puede ver y fotografiar con gran detalle la superficie de ejemplares enteros, mientras que con el MO sólo es posible recomponer imágenes de tecas en base a cortes ópticos. Las fotomicrografías de tecas obtenidas con el MEB son de enorme utilidad, pero deben ser correlacionadas con estudios al MO, puesto que en estos últimos se basa en gran medida nuestro conocimiento de las tecas. Además, el MEB presenta algunas limitaciones que serán analizadas más adelante.

Por su parte, el microscopio electrónico de transmisión es útil en el estudio de cortes que pueden aclarar, por ejemplo, la manera en que se imbrican las placas contiguas o en el estudio de las membranas celulares asociadas a las placas (Dodge & Crawford, 1970). Ocasionalmente también ha sido utilizado para investigar los detalles finos de la superficie de placas aisladas mediante la preparación de réplicas (Loeblich, 1969) o por medio de la técnica del sombreado (Dodge & Crawford, op. cit.), pero actualmente es mucho más simple y práctico recurrir para ello al MEB.

En este capítulo se desarrolla la metodología de trabajo requerida para el análisis de las cubiertas de dinoflagelados con el microscopio óptico, aplicada a estudios de morfología y taxonomía. Se describen asimismo algunas de las particularidades referidas a la investigación de las tecas al microscopio electrónico de barrido, mientras que el grueso de la metodología de trabajo con esta herramienta está desarrollado en otro capítulo del presente manual (ver Boltovskoy en este texto). Finalmente, se agregan normas generales sobre recolección, cultivos, fijación y sobre el trabajo con los quistes.

RECOLECCION Y CULTIVO

Recolección

Aunque existen formas psammofilas (Faust & Balech, 1993), parásitas (Cachon & Cachon, 1987), cocoides, palmeloides, ameboides y filamentosas, la gran mayoría de los dinoflagelados son formas planctónicas. Su recolección se lleva a cabo según los métodos clásicos para cosechar plancton, con red, botellas o trampas de agua y desde la costa o desde una embarcación, tanto en el mar como en aguas continentales. Cuando la recolección se realiza desde la costa o en bajas profundidades, debe evitarse remover el fondo, ya que la arena o el limo resultan sumamente molestos para el trabajo microscópico.

Cultivo

En el tema de los cultivos se ha hecho mucho durante las últimas dos décadas. El establecimiento de cultivos es una tarea que exige mucha paciencia y un laboratorio bien equipado, con servicios impecables: un corte imprevisto de energía eléctrica puede echar a perder el trabajo de meses. El análisis del establecimiento, purificación y mantenimiento de cultivos permanentes de dinoflagelados excede los alcances de este artículo. Guillard & Keller (1984) presentan una revisión muy completa sobre el tema, así como más de 20 medios de cultivo con variedad de sustratos, desarrollados para dinoflagelados dulceacuícolas y marinos, con diferentes tipos de nutrición y distintos hábitats. Más recientemente, Popovsky & Pfiester (1990) reseñan los medios más usados para el cultivo de los dinoflagelados de agua dulce.

Cultivos temporarios

La forma más simple de cultivo es la de mantener material vivo durante un tiempo luego de la recolección. Sin la necesidad de un laboratorio montado para aislamiento y cultivo de dinoflagelados, es posible realizar observaciones en vivo sobre el movimiento, sobre diferentes tipos de dehiscencia en las tecas que son abandonadas por el protoplasto (Boltovskoy, 1973) y, con suerte, sobre el enquistamiento. Un requisito importante para que este tipo de cultivo no se degrade rápidamente debido a los metabolitos producidos por los organismos, es evitar la concentración excesiva de los mismos. Diluir una muestra con agua filtrada de su lugar de origen favorece el mantenimiento en vivo durante un tiempo más prolongado. Aun a los medios de cultivo artificiales suele agregarse agua del lugar de recolección. En muchos casos el desarrollo de los organismos está supeditado a cantidades ínfimas de algún microelemento no detectados químicamente, que se encuentra en el ambiente natural y no en el medio artificial (Lindström, 1991). También es importante evitar los cambios térmicos bruscos que normalmente ocurren en un recipiente chico que responde rápido a las variaciones de la temperatu-

ra del aire. Dadas las reducidas dimensiones de muchos ambientes acuáticos continentales, por lo general los organismos de agua dulce están mejor adaptados a soportar estas variaciones que los de origen marino. Si no se dispone de un termostato, pueden suavizarse los saltos de temperatura manteniendo los frascos de cultivo sobre una bandeja en un baño de agua de canilla corriendo lentamente. Otra manera de conservar material vivo por tiempo más prolongado, es bajar el metabolismo de los organismos manteniendo las muestras en un refrigerador a temperaturas de 4-5°C.

FIJACION

No existe un fijador universal y tanto la elección del mismo, como la de la forma de emplearlo, dependen de la finalidad del estudio. Con frecuencia tampoco se puede escoger el método de fijación más apropiado para determinado organismo puesto que, salvo en casos especiales, las muestras de plancton son tomadas para el estudio de más de un grupo taxonómico. En términos generales, en el caso de los dinoflagelados de tecas bien desarrolladas debería utilizarse formol para el estudio de las tecas al MO y al MEB; el Lugol puede resultar útil para la conservación y recuento de los organismos más pequeños y delicados. El tetróxido de osmio, en microscopía óptica, puede ser necesario para fijar las formas más frágiles, y el glutaraldehído, a veces combinado con el tetróxido de osmio, en estudios de cortes al microscopio electrónico de transmisión. Salvo casos excepcionales, el etanol debe descartarse como fijador o conservador. Un profundo análisis de los métodos de fijación para microscopía óptica y electrónica se puede encontrar en Langeron (1949) y en Hayat (1981), respectivamente.

Formol

La concentración de formol comercial (solución acuosa de formaldehído al 40 %) que se recomienda para fijar una muestra de plancton es de 2 a 5 %, pero puede ser algo más baja o bastante más alta. Sin embargo, empleando concentraciones muy bajas, con el tiempo pueden llegar a desarrollarse colonias de hongos o bacterias, capaces de deteriorar o destruir tanto al material biológico, como a las etiquetas (Balech, 1977). Por su parte, el exceso de formol puede resultar agresivo para el olfato y la vista cuando se trabaja con la muestra bajo el microscopio. Para la fijación no hace falta diluirlo de antemano. Como la cantidad de formol puro que se emplea no necesita ser muy exacta, es posible medir sólo una vez el volumen necesario para llevar una muestra a la concentración de formol deseada, y luego emplear esa cantidad a ojo. En mi experiencia se obtiene una fijación mejor vertiendo en el frasco primero la cantidad especificada de formol y luego la muestra, y no al revés, como es la costumbre. De este modo se obtiene una fijación casi instantánea, con menor probabilidad de deformaciones o desintegración de los materiales más sensibles. Por ejemplo, los delicados individuos de *Fragilidium*

heterolobatum se deforman y sus tecas se desarticulan al ser fijados de la manera tradicional, pero conservan su forma y sus placas si se los introduce dentro de una gota de formol puro (Balech, 1959).

Para la correcta conservación de algunos grupos de microalgas en particular, hace falta que el formol tenga una reacción ligeramente ácida (organismos silíceos) o ligeramente básica (organismos calcáreos), pero en el caso de los dinoflagelados el pH del formol resulta indiferente (Balech, 1977; Throndsen, 1978a). Este es el fijador y conservador de uso más frecuente para los estudios de taxonomía y morfología de dinoflagelados tecados al MO. También es apropiado para fijar tecas destinadas a ser examinadas mediante el MEB (Taylor, 1973; Gocht & Netzel, 1974; Dodge & Hermes, 1981; Boltovskoy, 1989), dando resultados similares a los que se obtienen con el glutaraldehído y el tetróxido de osmio.

Si bien el formol no es el fijador-conservador ideal, es el preferido por las siguientes razones: a) Bajo costo, manejo sumamente sencillo, peligro potencial de intoxicación mucho menor que con el tetróxido de osmio o el glutaraldehído. b) No necesita mantenimiento: las muestras fijadas pueden conservarse en recipientes herméticos casi indefinidamente. c) Al fijar endurece el protoplasma, lo cual es ventajoso en la preparación de los ejemplares para el MEB y también ayuda a la separación de la teca del protoplasma durante la micromanipulación.

Los inconvenientes del formol son: a) Es mal fijador para fines de la citológicos. b) Los dinoflagelados generalmente pierden sus flagelos y las formas más delicadas pueden deformarse hasta hacerse irreconocibles o desintegrarse. c) Las inclusiones protoplasmáticas son decoloradas de modo que en las muestras fijadas no se pueden diferenciar las formas autótrofas de las heterótrofas. d) Los vapores del formol son irritantes, atacan mucosas y ojos preparando el terreno para infecciones varias, y son potencialmente cancerígenos (Perera & Petito, 1982). Sin embargo, si se trabaja con precaución, y en las concentraciones especificadas, es más o menos inofensivo.

Etanol

Sólo sirve como fijador en su estado de alcohol absoluto o, al menos de 95-96°. Las soluciones de concentraciones más bajas deshidratan, pero no fijan, sino más bien sirven como conservadoras. Tampoco se lo recomienda como conservador, puesto que siendo volátil las muestras requieren mantenimiento. Además, el trabajo de selección de material bajo microscopio, mediante micropipeta en una gota de una muestra con alcohol es casi imposible por que al evaporarse éste produce corrientes y remolinos que arrastran a los espécimenes e impiden cualquier tipo de micromanipulación.

Lugol

Este fijador se prepara mezclando una solución de 10 g de yoduro de potasio neutro en 100 ml de agua destilada, con otra de 5 g de yodo cristalino disuelto en

10 ml de ácido acético glacial. Debe conservarse en frasco oscuro de vidrio neutro, hermético. Se agregan a la muestra de agua 2-3 gotas de la solución (0,4 a 0,8 ml para una muestra de 200 ml), dándole una coloración parecida a la del coñac, pero las cantidades especificadas no son efectivas para fijar muestras concentradas mediante una red. El yodo fija, conserva y colorea a los organismos y el ácido acético preserva bien los flagelos.

El lugol es un fijador apropiado para los dinoflagelados pequeños, atecados o con tecas muy delicadas, por las siguientes razones: a) Mantiene mejor que el formol la forma de las células y preserva los flagelos. Sin embargo también con este fijador algunos de los dinoflagelados más delicados suelen hincharse, quedando menos acentuadas sus características morfológicas, inclusive los surcos (Taylor, 1978). b) Al almacenar yodo los organismos, se colorean y se hacen más pesados, características que facilitan su detección durante los recuentos y la rápida decantación cuando estos se realizan en cámaras de sedimentación.

Las desventajas del lugol son: a) El yodo puede oscurecer demasiado al protoplasma de los dinoflagelados, haciendo irreconocibles sus estructuras externas; en estos casos puede usarse tiosulfato de sodio como decolorante. b) Las muestras fijadas con lugol requieren mantenimiento: como el yodo se oxida fácilmente perdiendo sus cualidades, el material debe ser obligatoriamente mantenido en la oscuridad, pero aún así, su efecto dura entre uno y varios años, debiendo renovárselo periódicamente. c) No puede usarse con recipientes de plástico, pues éste retira el yodo de la solución.

Tetróxido de osmio

Llamado también ácido ósmico a pesar de que no posee las propiedades de un ácido. Se presenta en cristales amarillos, es muy volátil y sus vapores son sumamente tóxicos e irritantes. En microscopía óptica se utilizan los vapores del tetróxido de osmio en solución al 2 %, para fijaciones a pequeña escala, en recipientes cerrados donde se introduce el preparado por 30 segundos a un minuto, o en gota pendiente sobre un frasco con la solución. También se lo emplea sumergiendo al material en soluciones al 1-2 %, sobre todo en microscopía electrónica, donde se lo suele utilizar en combinación con el glutaraldehído (ver más adelante) o mezclado con cloruro de mercurio (Kelley & Pfiester, 1989). Se lo recomienda para las formas más delicadas y como buen conservador de los flagelos.

Las virtudes del tetróxido de osmio son: a) Fija instantáneamente. b) Confiere a los espécimenes mayor dureza y conductividad eléctrica, características que resultan útiles durante el examen con el MEB.

El tetróxido de osmio presenta los siguientes inconvenientes: a) Es muy costoso. b) Sus vapores son muy tóxicos. c) Tiñe demasiado fuerte las gotas de aceite del protoplasma de los dinoflagelados, dificultando la observación de las estructuras tecales en el MO.

Glutaraldehído

Es un fijador caro, tóxico, y de olor desagradable, lo que lo hace no apto para trabajos en microscopía óptica. Por otra parte es un muy buen fijador del protoplasma. Por consiguiente su empleo en dinoflagelados tecados debería limitarse a la investigación de la ultraestructura interna de las células con el microscopio electrónico de transmisión. Aunque no parece ser necesario para la mejor conservación de las tecas, varios autores lo han empleado también como fijador para estudios de la ultraestructura tecal superficial con el MEB (Dürr & Netzel, 1974; Loeblich, 1976; Dürr, 1979). Al igual que el formol y el tetróxido de osmio, el glutaraldehído endurece al protoplasma. Los procedimientos de fijación varian según los objetivos y las preferencias de cada autor, en cuanto a la concentración del fijador, al tampón empleado, a la exposición a la luz, al tiempo y la temperatura de fijación, al tipo de lavados y al requerimiento o no de una postfijación con tetróxido de osmio (Dodge & Crawford, 1970; Bibbi & Dodge, 1972; Tomas & Cox, 1973; Dürr & Netzel, 1974; Gocht & Netzel 1974; Loeblich, 1976; Dürr, 1979; Spector & Triemer, 1979). Cáceres en este manual describe con detalle los procedimientos más corrientes para el empleo de este fijador.

MICROSCOPIA OPTICA: RESEÑA METODOLOGICA

El estudio de las tecas al MO se realiza en preparados temporarios de un único ejemplar. Gran parte de la metodología propia de ese trabajo fue descrita por Balech (1977), de quién la he aprendido, y aquí se desarrolla, con algunos agregados de mi propia experiencia, con el máximo detalle para que pueda llevarla a cabo aún un microscopista con escasa experiencia. En resumen, el procedimiento corriente es, partiendo de una muestra mixta ya fijada, entresacar los individuos de la especie en estudio para tener una pequeña reserva. De esta se toma un sólo ejemplar por vez y se lo analiza en un preparado temporario, recurriendo a la micromanipulación y a la instilación de diferentes reactivos entre porta y cubreobjeto. El procedimiento habitual es trabajar directamente con hipoclorito de sodio que sirve tanto para aclarar el protoplasma, como para disociar la teca. Para destacar algunos detalles de las placas, distinguir mejor las suturas o detectar los campos en los organismos de cubiertas más delicadas, se recurre a tinciones y a la impregnación argéntica.

Micromanipulación

Aquí se describen paso a paso los procedimientos generales del trabajo de micromanipulación de espécimenes. Las técnicas que se mencionan, así como los materiales empleados y el modo de prepararlos, se puntualizan en detalle en la siguiente sección.

1) Por medio de una pipeta se toma una alícuota de muestra fijada y se coloca sobre un portaobjeto. Tanto la selección como la extracción de los espécimenes se facilita si los organismos no están encimados, pero tampoco conviene que se encuentren tan dispersos que la búsqueda de ejemplares exija recorrer demasiados campos del microscopio.

2) Mediante una micropipeta se entresacan los organismos de interés y se almacenan en una gota de agua destilada sobre un portaobjeto, dentro de una cámara húmeda. Si en la gota hay demasiadas partículas extrañas, se repite el mismo procedimiento. Estos ejemplares constituirán la reserva o "stock".

3) De la reserva se toma un ejemplar por vez para su análisis. Es preferible trabajar con tecas desprovistas de protoplasma, pero esto no siempre es posible.

4) Para el estudio de la teca desde diferentes ángulos el ejemplar se monta sobre un portaobjeto, ya sea en gelatina glicerinada (sin cubreobjeto) o en preparados en agua.

5) Se efectúan las mediciones típicas para cada especie o género.

6) Se registran la tabulación y otros detalles de la teca sin disociar por intermedio de dibujos. La fotografía por lo general es poco útil en este caso. Para mejorar la visibilidad de las placas y las suturas en preparados montados en agua, el protoplasma puede transparentarse con hipoclorito de sodio o se puede recurrir a tinciones, siguiendo la técnica de instilación de reactivos entre portaobjeto y cubreobjeto. El tratamiento de las tecas con fluorocromos puede ayudar a discernir las placas bajo el microscopio de fluorescencia. El hipoclorito de sodio no puede usarse simultáneamente con los colorantes.

7) Una vez registrados los datos de la teca *in toto* se procede a su disociación para determinar con mayor exactitud la forma y las interrelaciones de las placas, incluyendo las de ambos surcos. Para la mejor visibilidad de las placas, particularmente de las más tenues, es posible recurrir a la microscopía de contraste o a las tinciones, previa eliminación del hipoclorito de sodio mediante instilación de agua destilada en el preparado. Aquí la fotografía puede ser de mucha utilidad, porque además de su valor como documentación objetiva, a veces las configuraciones de placas se disocian con tanta rapidez, que no dan tiempo para realizar el dibujo.

MICROSCOPIA OPTICA: HERRAMIENTAS, MATERIALES Y METODOLOGIAS

Pipetas

Se emplean para transportar alícuotas de muestras a un preparado. Pueden ser simplemente cilíndricas, de unos 5 mm de diámetro (de vidrio similar al recomendado para la fabricación de las micropipetas), un tercio más largas que la altura de los frascos en que se almacenan las muestras. Estas pipetas, que no son tan frágiles como las pipetas Pasteur, se cortan marcando el tubo de vidrio mediante una punta de diamante o de vidia y luego se quiebran. Generalmente la sección resulta

perpendicular al eje del tubo. Para evitar los bordes cortantes se funden los extremos a la llama de un mechero. Se emplean introduciéndolas, con el extremo superior tapado con un dedo, hasta el fondo del frasco en el que se encuentra la muestra sedimentada. Destapando y tapando el extremo superior del tubo se controla la cantidad de material que se introduce en la pipeta. El material extraído se deposita sobre el portaobjeto cuidando que la densidad de organismos sea la adecuada para que el examen y el entresacado de espécimenes no resulte dificultoso. En caso de una muestra muy abundante, se la puede resuspender antes de pipetear o colocar poca cantidad de material en el portaobjeto y luego diluir con agua limpia. Cuando se revisan muestras en forma consecutiva es conveniente usar varias pipetas, una por muestra, para evitar la contaminación entre ellas. La contaminación puede traer serias confusiones en cuanto a la real distribución de las especies. Las pipetas usadas deben ser dejadas en un recipiente con agua, y luego lavadas cuidadosamente. También pueden emplearse tubos descartables de plástico transparente.

Micropipetas (preparación y empleo de pipetas capilares)

Son una herramienta imprescindible en la manipulación de las tecas de dinoflagelados y aún de placas tecales aisladas. Estas presentan el aspecto de las pipetas Pasteur, pero de tamaño más pequeño. Se usan sin tetina ni boquilla, puesto que uno de sus extremos es capilar, siendo suficiente acercarlo a un ejemplar dentro de una gota de agua para que éste se introduzca en la pipeta, siguiendo la corriente del líquido que entra por capilaridad. Las pipetas capilares pueden prepararse fácilmente en laboratorio calentando y estirando un tubo de vidrio de unos 20 cm de largo, sobre la llama de un mechero Bunsen. El tubo se toma por sus extremos, se calienta al rojo en su parte media y se estira fuera de la llama, con un movimiento rápido. De este modo se obtienen dos pipetas unidas por un hilo de vidrio de hasta unos 30 centímetros, cuya parte intermedia se desecha quebrándolo en dos lugares en la zona en que su diámetro aún es uniforme. Es importante la correcta elección del tipo de vidrio y del diámetro del tubo que se empleará para la fabricación de estas pipetas. Por un lado, los vidrios de muy baja calidad no permiten la elaboración de un buen capilar y, por el otro, el vidrio templado no es maleable. Un tubo de vidrio de diámetro muy grande difícilmente permita elaborar una buena micropipeta, pero aún siendo de diámetro apropiado, si sus paredes son muy gruesas, el capilar también tendrá paredes gruesas resultando poco útil para el trabajo. A modo de ejemplo se presentan algunas medidas de pipetas apropiadas para el trabajo con los dinoflagelados.

TUBO DE VIDRIO	EXTREMO CAPILAR
Diámetro externo: 4,7 mm	Diámetro externo: 150-400 µm
Diámetro interno: 3,7 mm	Diámetro interno: 100-300 µm
Espesor del vidrio 0,5 mm	Espesor del vidrio: 10-60 µm

Si bien el tamaño de los dinoflagelados oscila entre los 10 µm y los 2 mm (Steidinger, 1979), en las formas tecadas rara vez se requerirán capilares de diámetro interno mayor de 300 µm. Esto puede suceder en el caso de algunos *Ceratium* de cuernos muy extendidos.

Si se trabaja con organismos suficientemente grandes, la separación del material mediante micropipetas puede realizarse bajo un microscopio binocular estereoscópico. En el caso de organismos más pequeños, hay que entresacar los ejemplares directamente bajo el microscopio compuesto. Dado que éste invierte la imagen, y nuestro cerebro está acostumbrado a que la misma coincida con los movimientos musculares, requiere algo de tiempo acostumbrarse a coordinar el desplazamiento de la micropipeta. La práctica hace que el trabajo con la imagen invertida se automatice. El acostumbramiento llega a ser tal que ante la necesidad de trabajar bajo un microscopio binocular estereoscópico (que da una imagen derecha) se tiende a hacer los movimientos inversos. Pero el éxito en la tentativa de manejarse con una micropipeta bajo el microscopio depende no sólo de la paciencia en el aprendizaje, sino también del pulso del operador, porque los movimientos de su mano también se magnifican. En caso de dificultades en el manejo manual de las pipetas capilares puede recurrirse a micromanipuladores de diverso grado de complejidad (Throndsen, 1978b).

Una pipeta con el extremo capilar sucio por dentro o por fuera, con restos orgánicos o engrasada, jamás funciona bien: la solución es limpiarla con alcohol o quebrar el extremo empastado. También hay que acostumbrarse al tamaño y la forma que debe tener una gota de la muestra que se coloca sobre el portaobjeto. Una muy abultada, que es consecuencia de un portaobjeto engrasado, hace que el líquido entre con demasiada velocidad en el capilar perdiéndose el control de la operación, puesto que resulta imposible impedir que la corriente arrastre consigo partículas no deseadas. Si la altura de la gota llega a ser inferior a la altura de los especímenes, el trabajo con el capilar se hace impracticable. Una gota demasiado chata o extendida puede ser consecuencia de un portaobjeto con restos de detergente, el que disminuye la tensión superficial del agua.

Varillas de vidrio

Serán utilizadas para transportar sobre sus extremos pequeñas cantidades de reactivos a ser instilados en un preparado. Se cortan de la misma manera que los tubos de vidrio. Para obtenerlas con extremos de diferentes diámetros se pueden estirar sobre la llama de un mechero varillas del doble del largo definitivo, que luego se quiebran por la mitad. Los extremos se exponen a la llama hasta que el vidrio fundido forme una bolita.

Agujas enmangadas

Se emplean para las micromanipulaciones. Se las puede fabricar con mangos de 8-12 cm de largo, de madera o material plástico (que por ser más livianos son más

cómodos que los de metal para el trabajo delicado). Las agujas empleadas son de dos tipos: de acero, con extremos de unos 40-80 µm de diámetro (por ejemplo: alfileres entomológicos o las agujas llamadas "minucias"), cuyo extremo romo va clavado en la madera o fundido con el plástico, y las constituidas por una fibra de lana de vidrio montada sobre la punta de una aguja de acero, con un extremo libre de 3 mm. Estas últimas son muy delgadas (10-25 µm) y se utilizan para los trabajos más delicados.

Cámara húmeda

Puesto que se necesitan varios ejemplares para realizar las mediciones y determinar la tabulación completa de una especie, resulta poco eficiente en tiempo y trabajo recurrir a la muestra original para la obtención de cada nuevo especímen. Por ello es conveniente entresacar varios ejemplares manteniéndolos en cámara húmeda para que no se sequen. La cámara húmeda se prepara con una caja de Petri dentro de la cual se coloca un portaobjeto con la gota de agua que contiene la reserva de los ejemplares en estudio. A ambos costados del portaobjeto, sobre los bordes de la caja, se colocan sendos rollitos de algodón húmedos. Hay que evitar el exceso de humedad, porque el agua evaporada puede condensarse sobre el portaobjetos o sobre el techo de la caja del cual pueden caer gotas que lleven a la pérdida del material. Si éste se mantiene en cámara húmeda por varios días, conviene agregar al algodón una pequeña cantidad de ácido fénico (o de formol), lo cual evitará el crecimiento de hongos y bacterias no sólo sobre el algodón, sino también dentro de la gota con la reserva.

Preparados temporarios y permanentes

La forma de trabajar en la desarticulación de un único ejemplar es en preparados con agua. Si se usa agua destilada se evitará que durante la evaporación se formen cristales de sales que interfieran en las observaciones. Un solo ejemplar debe ser colocado en el centro de una gota de agua del volumen apropiado para que el espécimen no quede aplastado (insuficiente cantidad de agua) ni sea arrastrado hacia el borde o fuera del cubreobjeto (exceso de agua). Son más cómodos los cubreobjetos chicos, que facilitan el rastreo de los especímenes por abarcar un área menor y ser más livianos por estar confeccionados de vidrio más delgado. Si el preparado tiene la cantidad justa de líquido, el ejemplar puede reubicarse mediante toques suaves de una aguja enmangada de acero sobre el cubreobjeto o mediante leves desplazamientos del mismo en la dirección deseada, empujándolo con la aguja. Para el dibujo de tecas enteras vistas desde diferentes caras, en algunos casos puede ayudar un tratamiento previo de las células con xileno. Este elimina las gotas de aceite del protoplasma (Graham, 1942), las que por ser muy refringentes no permiten distinguir la tabulación. Los preparados montados en agua son bastante inestables y se necesita práctica para mantener al ejemplar en una posición dada. Cuando se presentan dificultades en la orientación de los

especímenes para los dibujos *in toto*, los ejemplares pueden ser montados en preparados con gelatina glicerinada, medio que hace posible orientar e inmovilizar las tecas en las posiciones deseadas.

La necesidad de disociar las tecas para la determinación de los dinoflagelados hace que rara vez se recurra a preparados permanentes, salvo para fines didácticos. El bálsamo de Canadá no es apropiado para el caso por tener un índice de refracción cercano al de las tecas (1,53 y 1,21, respectivamente; Reid, F. M. H., 1978). La gelatina glicerinada, que posee un índice de refracción similar al del bálsamo de Canadá (1,5), se emplea sólo para determinados fines (ver Gelatina glicerinada). Los medios de montaje recomendados son los mismos que se emplean para las diatomeas, por ejemplo Pleurax (i.r. = 1,75) que es soluble en alcohol, o Hyrax (i.r. = 1,63), soluble en xileno, benceno o tolueno, y mucho más caro que el anterior. Una forma de destacar las estructuras superficiales de tecas enteras (y también de quistes) en los preparados para el MO es mediante la cobertura de una fina capa metálica como la que se usa en la preparación de especímenes para el MEB. Capas 10 a 30 nm de carbón/platino u oro/paladio son transparentes a la luz y facilitan la observación de las estructuras en preparados montados en aceite de inmersión (Taylor, 1978), Pleurax (MacAdam, 1971) o Elvacite (Dupont) (Zippi, 1991). El metalizado puede llevarse a cabo sobre cubreobjetos que luego son montados directamente para la observación con el MO. Zippi (*op. cit.*) describe el procedimiento para realizar estudios al MO de especímenes previamente examinados con el MEB. En todos los casos debe cuidarse que los especímenes no queden con burbujas de aire en su interior.

Instilación de reactivos

Un ejemplar en un preparado en agua puede ser sometido a diferentes reactivos (colorantes, hipoclorito de sodio, etc.) instilándolos entre porta y cubreobjeto. Para ello, una pequeña gota del reactivo transportada por medio de una varilla de vidrio, es colocada sobre uno de los costados del cubreobjeto, en contacto con el agua del preparado. Para que el reactivo penetre, se lo hace correr absorbiendo líquido con una tira de papel de filtro desde el borde opuesto del cubreobjeto. Con este fin se recortan tiras de 5 a 10 mm de ancho y unos 25 mm de largo, que pueden ser manipuladas mediante pinzas cortas de puntas afiladas o aplanadas. La capacidad de absorción del papel de filtro puede aprovecharse también para eliminar los excesos de agua o de reactivos de los bordes de los preparados temporarios.

Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es el reactivo usado para aclarar el protoplasma y disociar las tecas de dinoflagelados. Se trata del blanqueador de ropa y desinfectante doméstico más común (eau de Javel, "Clorox", lavandina) que se comercializa generalmente con un 60 % de cloro activo. Su composición está basada en el equilibrio:

$$Cl_2 + 2NaOH <====> NaCl + NaClO + H_2O,$$

o sea que en la práctica se trata de una combinación de sustancias, cuya acción sobre las tecas de los dinoflagelados aún no está del todo explicada. Básicamente el hipoclorito de sodio es un oxidante que blanquea el protoplasma y desarticula las placas, probablemente como consecuencia de la degradación de las membranas celulares, pero no debe descartarse la acción del NaOH como agente hidrolizante. La instilación del hipoclorito de sodio debe realizarse con sumo cuidado si lo que se pretende en un principio es sólo aclarar el protoplasma sin que la teca se desarme. La rapidez con la que este reactivo actúa es proporcional a su concentración, por lo que debe comenzar a instilarse en pequeñas cantidades o diluido. El efecto del hipoclorito de sodio sobre las tecas no es el mismo en todos los casos. Por ejemplo en *Peridiniopsis cristatum* este reactivo degrada rápidamente el alveolado de las placas y las crestas (Balech, 1961) y en algunas especies pequeñas de agua dulce las placas se disuelven con facilidad al poco tiempo de ser desarticuladas.

Gelatina glicerinada

También llamada glicero-gelatina (GG), es un medio de montaje de consistencia gelatinosa que funde a 50°C y endurece con el tiempo, por lo que se emplea para hacer preparados semipermanentes o para el dibujo de varias vistas de una misma teca, sin cubreobjeto, puesto que al volver a fundirse permite la reorientación de los espécimenes. También es apropiado para la inclusión de quistes de dinoflagelados. Los preparados definitivos deben ser sellados en sus bordes con parafina o esmalte para uñas, lo que asegura que la GG no se reseque y que los cubreobjetos no se deslicen en días de mucho calor. La gran ventaja de este medio de montaje es su compatibilidad con el agua, por lo que el material a ser montado no necesita deshidratación. Precauciones: la GG no es compatible con el etanol, que produce su coagulación inmediata en forma de nódulos blancos. Este medio puede adquirirse en forma comercial (Merck) o ser elaborado. En la preparación se pueden variar las concentraciones de sus componentes para obtener medios de menor o mayor viscosidad. Aquí se ofrecen dos opciones, según Langeron (1949) y según J. C. Gamerro (com. pers.).

7 (10) g de gelatina
42 (35) cm^3 de agua destilada
50 (30) cm^3 de glicerina concentrada
1 (1,5) g de cristales de fenol

1) Puede emplearse gelatina en polvo o en láminas. En el segundo caso cortar en trozos chicos evitando los bordes endurecidos de la lámina y dejar varias horas en remojo.

2) Calentar en baño-maría por separado la glicerina y la gelatina (que se licúa) a no más de 50-60°C.

3) Agregar la glicerina a la gelatina y revolver lentamente para evitar la formación de burbujas, las que luego son muy difíciles de eliminar.

4) Aún en baño-maría agregar el fenol (que evitará el desarrollo de hongos y bacterias) y revolver un poco más.

5) Filtrar con lana de vidrio humedecida, en un embudo de vidrio caliente, para eliminar posibles cuerpos extraños de la gelatina.

6) Guardar en un pote, que en verano debe ser almacenado en un refrigerador.

Graham (1942) recomienda este medio para el dibujo de tecas enteras desde diferentes ángulos, según el siguiente procedimiento. Se coloca un trocito de GG sobre un portaobjeto, se lo funde apoyando a este último sobre una platina térmica de temperatura regulable o, en su defecto, mediante pasajes rápidos por encima de la llama de un mechero (la GG funde a 50°C). Hay que tener cuidado de no recalentar el vidrio, puesto que con la evaporación la GG se espesa y el calor excesivo la desnaturaliza. En el centro de la GG fundida, mediante una micropipeta, se coloca el espécimen junto con una microgota de agua. El ejemplar se orienta bajo microscopio mediante una fibra de lana de vidrio enmangada, se deja enfriar el preparado y se procede a dibujarlo, sin cubreobjeto, utilizando una cámara de dibujo. Fundiendo nuevamente a la GG el ejemplar se puede reorientar para ser dibujado en diferentes posiciones. Aunque en este medio la superficie de las placas no se destaca demasiado, el protoplasma de los dinoflagelados se transparenta algo y las suturas generalmente se vuelven más refringentes, lo cual mejora su visibilidad.

Tinciones

La tinción no es el procedimiento más frecuente en el estudio de las tecas enteras de dinoflagelados, porque en muchos casos esta es innecesaria y sobre todo porque no existen técnicas sencillas que permitan teñir la teca sin que el protoplasma también tome color. Donde la tinción puede ser de mayor utilidad es en tecas vacías, placas o grupos de placas aisladas.

El procedimiento de tinción más simple es la instilación del colorante entre porta y cubreobjeto. Para resaltar las suturas se ha utilizado el azul brillante de cresilo (Balech & Oliveira Soares, 1966; Balech, 1990) o el azul tripano (Lebour, 1925; Graham, 1942; Sousa e Silva, 1969). Stosch (1974) describe una técnica de coloración con azul tripano combinada con montaje en preparados permanentes con Pleurax. En algunos casos también puede emplearse el rojo neutro o el rojo congo, pero por lo general el protoplasma también se colorea, enmascarando los detalles de la teca. El ácido yodhídrico (HI), propuesto por Biecheler (1952) también colorea fuertemente a todo el organismo. Sin embargo, puede resultar muy útil en tecas vacías, donde las suturas quedan resaltadas, oscureciéndose en las tecas con áreas suturales engrosadas o mostrando una coloración más clara cuando estas son más delgadas. También puede ser empleado en placas aisladas, con lo cual éstas se destacan del fondo del preparado, facilitando la observación y la fotografía de los detalles de la ornamentación y la distribución de poros

(Boltovskoy, 1989). El HI y el hipoclorito de sodio no pueden ser usados simultáneamente porque forman cristales al mezclarse. Sin embargo el ácido puede lavarse por instilación de agua destilada (las placas se decoloran) y de ese modo emplearse alternadamente con el hipoclorito de sodio. De todas maneras, según mi experiencia, el IH debilita la unión entre las placas, facilitando la desarticulación aún sin hipoclorito de sodio.

Stosch (1969) propone una técnica que empleando HI evita la coloración del protoplasma. Para ello se prepara en caliente una mezcla de 1 ml de HI (el que normalmente contiene una proporción de yodo libre) con 3,5 g de hidrato de cloral. Esta solución base, que dura unas pocas semanas en refrigerador, se utiliza agregándole distintas proporciones de HI (1:0,2; 1:0,4; 1:0,6 etc.), por que para cada caso en particular hay que buscar la mezcla ideal. Los ejemplares en alcohol se extienden sobre un portaobjeto y, una vez secos, se cubren con el colorante y se aplastan con un cubreobjeto a través de un pañuelo de papel ("squashing") que absorbe el excedente del colorante. Las placas de cada teca quedan en dos planos separados por una almohadilla de protoplasma. La observación se realiza con un filtro de interferencia verde de 536 nm que diluye el color marrón del protoplasma y destaca el rojo violeta de las placas. Los preparados, sellados con vaselina, se conservan unos pocos días. Esta técnica tiene la desventaja de que no admite material fijado con formol. Da resultado con organismos frescos, fijados con etanol y ácido acético glacial (3:1), metanol y ácido fórmico (3:1), o con el líquido de Bouin (mezcla de una solución saturada de ácido pícrico, formol y ácido acético, 30:10:2) fijando sólo durante 10-40 minutos para evitar los efectos indeseables del formol. Una modificación de esta técnica puede encontrarse en Schmidt *et al.* (1978). Otras formas de mejorar la visión de las placas al MO es utilizando la microscopía de fluorescencia y sobre todo la de contraste.

Hay especies de cubiertas muy tenues, cuyas suturas son poco visibles. En algunas de ellas la acción del hipoclorito de sodio destruye a las placas rápidamente, sin dar tiempo para registrar la tabulación. En estos casos, así como para revelar los campos poligonales de las cubiertas en las Gymnodiniales, etc., puede emplearse la técnica de impregnación argéntica de Chatton-Lwoff, resumida por Corliss (1952) (ver también: Biecheler, 1952; Chatton, 1952). Con la misma finalidad, la tinción con yodo (Lugol) fue utilizada por Bursa (1958) en ejemplares de *Woloszynskia* desprovistos de protoplasma.

Obtención de tecas vacías

La visibilidad de las placas al MO es mucho mejor en las tecas sin protoplasma que en los organismos completos. Por lo tanto, la posibilidad de trabajar con tecas sin su contenido facilita los estudios morfológicos y las determinaciones taxonómicas. Si se cuenta con material vivo, es posible obtener tecas vacías en cantidades más o menos grandes manteniendo sin fijar alícuotas de muestras concentradas de plancton recién colectado, por períodos relativamente cortos (12 a 48 horas). Al empeorar las condiciones de la muestra, el protoplasto de muchos individuos abandona su teca (Kiselev, 1950; Boltovskoy, 1973). Cuando se recurre a

este método, es importante tener en cuenta las recomendaciones dadas en cultivos temporarios, sobre todo en las muestras de origen marino, para evitar la muerte prematura de los organismos. También hay que asegurarse de fijar la muestra antes de que comience a descomponerse. En menor escala, lo mismo se puede lograr con ejemplares en una gota de agua sobre un portaobjeto (Balech, 1959).

Si no se cuenta con material vivo, a veces es posible eliminar el protoplasma haciendo rodar un ejemplar entre porta y cubreobjeto. En un preparado con la cantidad de agua justa, empujando al cubreobjeto de costado o presionándolo por medio de una aguja, algunas suturas se abren y el protoplasma es forzado a salir de la teca, la que recobra su forma original una vez que cesa la presión o al agregar un poco de agua al costado del portaobjetos. En materiales fijados con formol el protoplasto se vuelve más compacto y adquiere cierta elasticidad, facilitando esta operación.

En el caso particular de *Woloszynskia limnetica* se ha logrado la expulsión del protoplasma hirviendo los espécimenes en una solución al 10 % de cloruro de mercurio (Bursa, 1958). Queda por verificarse si este método puede ser aplicado a otras especies.

Disociación de placas

Se realiza en preparados en agua por instilación de hipoclorito de sodio. Luego de la acción de este reactivo las tecas se desmembran con mucha facilidad, espontáneamente o con un leve movimiento lateral del cubreobjeto o un suave toque con la aguja sobre el mismo. El preparado no debe tener líquido en exceso, porque en ese caso, las placas desarticuladas se dispersarán haciendo difícil tanto su búsqueda como la determinación de su emplazamiento original, y el rompecabezas de placas no podrá ser reconstruido en el papel. En un caso ideal, si se parte de una teca en vista ventral que es sometida a la acción de hipoclorito de sodio y luego levemente aplastada, esta presentará sus placas desarticuladas manteniendo su posición relativa original. Las placas quedarán distribuidas en dos planos, uno superior donde se encontrarán el grupo de placas ventrales. Las primeras presentarán su cara externa (generalmente ornamentada) dirigida hacia el observador, mientras que las dorsales, en un foco inferior, mantendrán su cara interna (lisa) hacia arriba. Como esto casi nunca resulta tan perfecto, con frecuencia hay que determinar la presentación de una placa dada, mediante ligeros cambios de foco. Hay que tener en cuenta que una placa con su cara externa dirigida hacia el portaobjeto presentará la imagen de su contorno invertida y, por lo tanto, no comparable con el contorno de las placas de una teca entera. (El investigador no necesita tener en cuenta que el microscopio, a su vez, invierte la imagen porque en el trabajo con los dinoflagelados, por convención, la imagen invertida es considerada como si fuera la real). En la práctica, después de la disociación, casi siempre se trabaja con fracciones de tecas, pues algunas de las placas suelen perderse. La tarea más difícil, y muy importante desde el punto de vista de la taxonomía crítica, es el registro de la forma y de las interrelaciones de la placas del sulcus. Dos ejemplos clásicos de los resultados que se obtienen con este tipo de trabajo son los

estudios de Balech (1974) y de Abé (1981). El número y disposición de las placas del cingulum, que en muchos casos tiene valor diagnóstico a nivel genérico, se determina con mayor facilidad.

Mediciones

Las medidas más comunes que se toman en los dinoflagelados son la longitud, el transdiámetro y el espesor, siendo más importantes las dos primeras, salvo en Dinophysiales, donde lo son la longitud y el espesor. La longitud se mide con el ejemplar ubicado de manera que el plano que pasa por el ápice y por las bases de los cuernos antapicales (o la recta que pasa por el apex y el antapex) se encuentren paralelos al plano del preparado. La medición de la longitud incluye los cuernos (proyecciones huecas), pero no las espinas (proyecciones macizas). Al incluirse las espinas se habla de longitud total. El transdiámetro o diámetro transverso es tomado con el ejemplar en vista ventral o dorsal, midiendo en la parte más profunda del cingulum. El espesor también corresponde al diámetro del cingulum, pero tomando en vista lateral. Hay otras medidas que pueden ser importantes según el caso, como el largo de los cuernos y las espinas o el desplazamiento de los extremos del cingulum en las Peridiniales y Gonyaulacales, o la distancia entre las costillas de sostén de la aleta sulcal izquierda en Dinophysiales. Una descripción escrupulosa puede ser complementada con la determinación de algunas proporciones y la medición de ciertos ángulos. Mayores detalles al respecto pueden encontrarse en Graham (1942) y Balech (1977).

Dibujo

Los dibujos de tecas enteras y de placas disociadas deben realizarse mediante una cámara de dibujo o un ocular con cuadrícula, puesto que no sólo la forma sino también las proporciones tienen importancia en la caracterización de las especies. Conviene no olvidar de dibujar la escala correspondiente a cada bosquejo que se realice. Las ilustraciones pueden ser esquemáticas si luego se obtienen fotomicrografías de los detalles de la escultura superficial, porosidad, etc., de las placas aisladas, o si algunos ejemplares son fotografiados mediante el MEB. Teniendo en cuenta que pueden presentarse ejemplares anómalos o poblaciones con variaciones tabulares, la tabulación de una especie siempre tiene que ser determinada en base a más de un ejemplar, pero no es conveniente presentar dibujos de tecas reconstruidas en base a varios espécimenes.

Fotografía

Las fotomicrografías pueden ayudar mucho en el registro de la tabulación durante el proceso de disociación de placas. Para obtener imágenes más nítidas es preciso optimizar las condiciones de iluminación del microscopio y utilizar películas de

buen contraste. También pueden ayudar las tinciones o la microscopía de contraste. Las fotografías de tecas enteras obtenidas con el MO no suelen resultar muy informativas (aún aquellas desprovistas de protoplasma), ya que salvo en ejemplares muy pequeños o muy aplanados, parte de la imagen queda fuera de foco.

Microscopía de contraste

Con las placas de los dinoflagelados muchas veces se trabaja en el límite de resolución del MO de modo que es sumamente importante que el microscopista sepa cómo lograr las mejores condiciones de operación mediante la iluminación Köhler, o sea regulando correctamente el centrado y la altura del condensador, y la apertura del diafragma de campo. Los microscopios equipados con dispositivos de contraste (objetivos y condensadores especiales) pueden resultar de gran ayuda. Con el contraste de fases se consigue mayor contraste entre el objeto y el medio que lo rodea, con lo que se distinguen mejor objetos no coloreados. Más útil que el anterior es el contraste de interferencia, que se logra mediante el desdoblamiento del haz luminoso en dos, uno que atraviesa el objeto y el otro que lo sortea; cuando ambos se juntan en las condiciones apropiadas se produce una interferencia que da una imagen con variaciones de intensidad luminosa en estructuras transparentes no coloreadas como lo son las placas de los dinoflagelados.

Microscopía de fluorescencia

Su empleo se basa en que algunas sustancias orgánicas emiten luz por fluorescencia al incidir en ellas la luz ultravioleta. Las tecas de dinoflagelados adquieren fluorescencia azul con el fluorocromo "Calcofluor white M2R" (Polysciences, Fulka, Sigma), quedando destacadas las suturas. Esta técnica puede aplicarse a material fijado o sin fijar, pero no a los organismos vivos, cuyas tecas no toman el fluorocromo. Se emplea una solución base de 10-20 mg de esta sustancia en un litro de agua destilada, que debe ser guardada en frío. Se ha ensayado con buenos resultados en tecas de *Protoperidinium* y *Alexandrium* (Fritz & Triemer, 1985).

Filtros de membrana

Los filtros de membrana se usan con frecuencia para la concentración de organismos planctónicos provenientes de ambientes naturales o de cultivo. Pueden ser empleados tanto para el examen directo (observación o recuentos) al MO y al MEB y en la etapa preliminar de preparación de materiales para el microscopio electrónico de transmisión (Fournier, 1978). Pero estos filtros no facilitan la identificación de los dinoflagelados al MO por la dificultad que se presenta para la manipulación física de los organismos retenidos. Durante el proceso del filtrado es posible la fijación y el lavado del material sobre el mismo filtro, y aún el proceso de deshidratación y secado según el método del punto crítico puede llevarse a

cabo sobre el mismo filtro, empleando la técnica del sandwich (Boltovskoy, en este manual). Para el filtrado se requieren aparatos de filtración conectados a una trompa o bomba de vacío con una presión residual no mayor de 1/6 a 1/15 de atmósfera (Fournier, *op. cit.*) para evitar que las células se deformen. Los filtros de membrana empleados para este fin son los compuestos de nitrato o acetato de celulosa (Millipore, Sartorius, Gelman), y los de film de policarbonato (Nucleopore). Poseen gran variedad de tamaños de poro que se adaptan a diferentes necesidades. Las membranas del tipo Nucleopore poseen menor capacidad de filtración pero una superficie lisa y poros cilíndricos muy regulares, lo que los hace más aptos como soporte definitivo para observaciones con el MEB (Boltovskoy, *op. cit.*). Los filtros compuestos de ésteres de celulosa son de superficie y tamaño de poro irregulares, de modo que resulta más difícil la resuspensión de los organismos filtrados. En el estudio de los dinoflagelados al MO este tipo de filtros tal vez sólo resulte cómodo para la realización de recuentos en el caso de células teñidas de cultivos o de floraciones. La técnica usada en los recuentos al MO es la de embeber en aceite de inmersión el filtro con los espécimenes ya depositados sobre él. El aceite tiene el mismo punto de refracción que las fibras de que está compuesto el filtro por lo cual éste se hace transparente, pero también las tecas de los dinoflagelados pierden definición, de allí la necesidad de la tinción.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

El MEB es de una enorme utilidad en el estudio de los dinoflagelados, pues permite ver y fotografiar con gran detalle la superficie de las tecas y de los quistes. Indudablemente ha contribuido mucho en el avance de su estudio y seguirá utilizándose como una excelente herramienta que hace posible dilucidar e ilustrar estructuras que se encuentran en el límite o por debajo del límite de resolución del MO. Se agrega a esto la posibilidad de obtener fotomicrografías en forma de pares estereográficos (Navarro, en este manual), técnica difundida en el estudio de las diatomeas y hasta ahora casi inexplotada en los dinoflagelados. Sin embargo, la mayoría de las especies de dinoflagelados aún no han sido investigadas mediante el MEB, de modo que no es posible prescindir del MO por la necesidad de comparar resultados con aquellos de los trabajos anteriores. Además, el MEB presenta algunas limitaciones con respecto al MO: 1) Se trata de una herramienta cara, no siempre accesible para los trabajos de rutina. 2) Posee movimientos de inclinación de su platina, pero no permite micromanipulaciones (en determinadas posiciones de las tecas no es posible determinar la especie a que pertenecen). 3) Las placas de los surcos por lo general quedan ocultas en las tecas enteras, debiendo ser estudiadas en preparados de placas previamente desarticuladas bajo el MO o en macerados de tecas (ver más adelante), lo cual requiere mucha experiencia del investigador y conocimiento previo de las estructuras al MO.

Si bien la mayor parte de las técnicas de preparación de algas microscópicas

para su examen con el MEB se desarrolla en otra parte de este manual (Boltovskoy), el trabajo con los dinoflagelados merece algunas consideraciones especiales.

Secado de tecas

Como se sabe, el material a ser estudiado con el MEB debe estar completamente seco. El secado espontáneo de las tecas (previamente lavadas con agua destilada) puede dar buenos resultados en algunos casos, pero en muchos otros estas sufren daños (resquebrajamiento, deformación o colapso) debido a las fuerzas de tensión superficial que se producen en las cavidades microscópicas cuando existe la interfase líquido-gas. La mayor o menor resistencia de una teca depende de su forma, de su espesor y de sus estructuras de refuerzo (ornamentación superficial, crestas, etc.). Aún dentro de una misma especie hay grandes variaciones en cuanto a la resistencia de las tecas, dependiendo del tamaño, del área geográfica y del tipo de ambiente de donde proviene cada población. Los fijadores como el formol, el glutaraldehído o el tetróxido de osmio endurecen al protoplasma, el que de esta manera ofrece cierta resistencia al colapso de la teca. Por todas estas razones, el primer intento de secado puede ser por evaporación a partir de una gota de agua destilada. Si luego de este procedimiento las tecas quedan dañadas, se deberá recurrir a técnicas de secado especiales que eviten las fuerzas de tensión superficial (secado por punto crítico o por sublimación; Boltovskoy, *op. cit.*). En el "Atlas of dinoflagellates" de Dodge (1985) se puede encontrar una variedad de ejemplos de imágenes de tecas de dinoflagelados tomadas con el MEB (incluyendo unos pocos casos de tecas deformadas o resquebrajadas como probable consecuencia de un secado deficiente).

Orientación de los especímenes

El material de dinoflagelados puede ser secado directamente sobre el portaespecímenes elegido para el MEB, pero en muchas especies la mayor parte de los individuos quedarán en posiciones similares, de acuerdo a sus caras de apoyo normales, lo que impedirá obtener imágenes en determinadas vistas. Para subsanar esto es conveniente secar los ejemplares sobre una superficie lisa (vidrio) y luego transportarlos uno por uno al portaespecímenes definitivo (taco) mediante una fina aguja enmangada o un "pelo" de lana de vidrio, bajo microscopio binocular estereoscópico. Debido al tamaño de la mayoría de los dinoflagelados, es muy difícil orientarlos a voluntad, pero al ser montados de este modo quedarán en posiciones variadas.

Preparación de placas desarticuladas

Componentes aislados de tecas de dinoflagelados pueden ser examinados con el MEB. Las placas se pueden preparar en forma controlada (Boltovskoy, 1975),

realizando la desarticulación de una teca al MO, de la manera acostumbrada. Cuando se logra la configuración de placas deseada, el preparado se lava por instilación de agua destilada y se deja secar. La ubicación de las placas se señala rodeando el área con un círculo de marcador de punta fina, tanto sobre el cubreobjeto como debajo del portaobjeto. Luego ambos se separan, se verifica a cuál de los dos vidrios quedaron adheridas las placas, se recorta la zona correspondiente dejando un amplio margen para no dañar la preparación y se monta sobre un taco del MEB. Una nueva marca rodeando el material a ser examinado, esta vez sobre la cara del vidrio donde éste se encuentra, servirá como referencia para su más rápida ubicación, puesto que se verá en el MEB con cierto relieve.

Placas aisladas en grandes cantidades pueden prepararse a partir de muestras con predominio de una sola especie, provenientes de cultivos o floraciones. Las placas se desprenden mezclando una alícuota de la muestra con hipoclorito de sodio en un tubo de ensayo o de centrífuga y agitando enérgicamente. Antes de montar este material es necesario lavarlo con agua destilada, mediante centrifugados o sobre filtros, para que el hipoclorito de sodio no siga actuando ni deje residuos al secarse la muestra. Los filtros de membrana más indicados para esto son los Nucleopore de un tamaño de poro cercano a los 2 µm. En la mayoría de los casos las placas aisladas mantienen su forma dejándolas secar sobre el mismo filtro o sobre un taco apropiado para el MEB, sin necesidad de recurrir a técnicas de secado especiales. Para interpretar este tipo de preparados hay que conocer de antemano la tabulación de la especie en estudio. Otra técnica para la preparación de placas sueltas es la maceración de las células durante varias horas en una mezcla de ácido acético glacial y agua oxigenada (Dodge & Crawford, 1970). En el MEB se pueden observar en relieve ambas caras de las placas aisladas, lo que permite hacer inferencias sobre su morfología funcional, ubicación exacta de los poros flagelares, estructura de las áreas articulares, etc. (Boltovskoy, 1975; Gocht & Netzel, 1974). Los procedimientos enunciados no son recomendables en el caso de una muestra mixta. Aquí los ejemplares de interés deben ser aislados uno por uno mediante micropipeta y las tecas disociadas en una gota de hipoclorito de sodio sobre un portaobjeto. El lavado se efectúa mediante pasajes de gota en gota de agua destilada con una micropipeta lo cual, debido al tamaño diminuto de las placas, seguramente acarreará una perdida de parte del material. La tarea puede simplificarse realizando el tratamiento con hipoclorito y el lavado sobre un filtro de membrana Nucleopore de tamaño de poro apropiado, que luego será montado directamente para su examen con el MEB.

QUISTES DE DINOFLAGELADOS

Los quistes temporarios de los dinoflagelados, que se producen en circunstancias adversas momentáneas y que germinan apenas mejoran las condiciones ambientales, no presentan características útiles para la identificación de los taxa. Los que presentan mayor interés desde el punto de vista biológico y paleontológico son los quistes de reposo, que en realidad son cigotas, producto de la fusión de gametos

cuya formación es generalmente inducida por el agotamiento de nutrientes. Su período de reposo es más prolongado y difiere según la especie de que se trate. Como regla, su concentración es tan baja que para estudiarlos hay que recurrir a técnicas de reducción del material circundante. Salvo en el caso de los quistes calcáreos, poseen cubiertas orgánicas (esporopolenina) sumamente resistentes a los ácidos.

Recolección de quistes

Los quistes de dinoflagelados pueden hallarse en los sedimentos superficiales de los ambientes acuáticos. Los de formación reciente, que aún no han alcanzado a sedimentar, también suelen encontrarse en muestras de plancton, tanto marino (Reid, P. C., 1978) como de agua dulce. Por lo general se hallan suficientemente dispersos como para que se necesite aplicar técnicas de concentración, apelando al tamizado, la flotación en líquidos de alta densidad o a tratamientos químicos de reducción de materiales. Las técnicas no difieren mucho de las que se emplean para la recuperación de los quistes de dinoflageados fósiles (Sarjeant, 1974: 128) y que desde hace tiempo están siendo utilizadas por los palinólogos. El trabajo de recuperación de quistes orgánicos de los sedimentos recientes se describe en Matsuoka *et al.* (1989) y Wall & Dale (1968) presentan algunos detalles para la concentración de los quistes calcáreos.

Tamizado para la recuperación de quistes

Se recurre al tamizado para descartar las partículas cuyo tamaño se encuentra por encima o por debajo del rango de variación de las medidas de los quistes. Pueden emplearse tamices de 125 a 250 μm de abertura de malla para retener el material más grueso y recoger los quistes sobre una malla de 20 μm. El material así tratado aún no queda limpio y se pueden separar las partículas más pesadas mediante movimientos giratorios de un vidrio de reloj con la muestra en agua ("spanning"): la fracción más liviana, junto con los quistes, quedará en el centro del recipiente y la más pesada (silicatos) en la periferia. También se puede emplear la centrifugación en líquidos con gradientes de densidad (Blanco, 1986). Estos procedimientos son los indicados para el caso de los quistes calcáreos o cuando se buscan quistes vivos para incubación, pero también son útiles como paso previo a los tratamientos químicos empleados para la recuperación de las cubiertas de los quistes orgánicos.

Quistes orgánicos

Para su concentración las muestras se someten a la acción de reactivos que destruyen gran parte de los materiales que los rodean. En el caso de los sedimentos conviene realizar un tamizado previo, tratamiento que no es imprescindible para

las muestras de plancton. Los reactivos que se emplean en este tratamiento son muy peligrosos. El ácido fluorhídrico es sumamente tóxico y corrosivo, y sus quemaduras, aún las más leves, son muy dolorosas. Corroe el vidrio de modo que deben emplearse recipientes de polipropileno. El ácido sulfúrico y el anhídrido acético reaccionan violentamente al entrar en contacto con el agua. Es muy recomendable trabajar bajo campana de gases, protegido con guantes, delantal y anteojos o máscara transparente provista de respirador con filtro para vapores de ácidos (Sarjeant, 1974). El procedimiento se describe a continuación.

1) Eliminación de carbonatos (en solución o de restos de organismos calcáreos): Los carbonatos forman compuestos no eliminables durante el tratamiento ulterior con ácido fluorhídrico . Comprobar si la muestra contiene carbonatos con unas gotas de ácido clorhídrico; si hay burbujeo, seguir agregando HCl hasta que éste cese.

2) Eliminación de silicatos (minerales, diatomeas): Centrifugar en tubos de centrífuga de polipropileno, descartar el sobrenadante y agregar en húmedo dos partes de HF por una parte de la muestra. Dejar tapado de un día para otro, revolviendo ocasionalmente mediante una varilla de polipropileno. Se puede acelerar la reacción calentando en baño-maría (revolviendo) o sobre una platina calentable con magneto. Centrifugar, descartar el sobrenadante (el residuo de HF puede neutralizarse con carbonato de sodio anhidro en un recipiente de plástico y bajo campana de gases). Lavar centrifugando con HCl al 30 % en caliente, 2-3 veces, hasta quitar el color amarillento del líquido.

3) Acetólisis (eliminación de la celulosa): Preparar una mezcla fresca de anhídrido acético y ácido sulfúrico puro (9:1), agregando el H_2SO_4 gota a gota (la reacción es exotérmica). Trabajar en recipientes bien secos. Centrifugar, escurrir y secar el material (o lavarlo con ácido acético glacial y escurrir). En un tubo de centrífuga de 15 ml, a 1 ml de muestra se agregan 5 ml de la mezcla acetolítica. Mezclar con una varilla de vidrio y mantener revolviendo en baño-maría a ebullición durante 3-5 minutos. (Precaución: si el tubo se rompe, la mezcla puede proyectarse). Enfriar, centrifugar, volcar el sobrenadante (evitando las superficies mojadas), lavar dos veces con agua y alcohol (2:1), mezclando bien cada vez. Si se han utilizado muestras fijadas, dentro de los quistes quedará algo de protoplasma. Para eliminarlo usar carbonato de sodio al 5 % en baño-maría a ebullición durante 10 minutos.

Quistes calcáreos

Los quistes calcáreos (familia Calciodinellaceae) se destruyen con los tratamientos químicos empleados para concentrar quistes orgánicos. Debido a su pequeño tamaño, generalmente menor de 50 μm, estos quistes tampoco suelen encontrarse en las muestras procesadas para el estudio de otros organismos calcáreos (foraminíferos), a menos que se utilicen tamices de malla apropiada como para retener las partículas de entre 37 y 64 μm (Wall & Dale, 1968).

Preparados y tinción de quistes

Los quistes se montan en glicerina y agua (1:1), gelatina glicerinada o en aceite de siliconas. En el último caso hay que deshidratar el material en la serie alcohol 96 % - alcohol absoluto - benceno. Se monta en una mezcla de aceite de siliconas y benceno y se deja evaporar el benceno durante unas 24 horas. En el transcurso del secado conviene mantener los preparados invertidos para que los quistes queden cerca del cubreobjeto una vez solidificado el medio. Sarjeant (1974) recomienda para el caso los medios de montaje comerciales "Clearcol" o "Cellucize". Los quistes orgánicos acetolizados quedan transparentes o de color amarillento. Se tiñen bien centrifugando con pequeñas cantidades de zafranina en polvo. El exceso de colorante es eliminado luego mediante centrifugaciones con agua destilada. La técnica del metalizado también puede resultar útil para destacar las estructuras superficiales de los quistes en el MO.

CONCLUSION

Aquí se han descrito los métodos utilizados en la taxonomía clásica de los dinoflagelados, basada en la morfología tecal. Los intentos aislados de basar la clasificación en otros caracteres, como los quistes, las secuencias de ADN y otras caracterizaciones químicas (pigmentos, toxinas, enzimas) se encuentran en sus etapas preliminares y no representan una solución para las determinaciones taxonómicas y, al menos por el momento, poco aportan a la taxonomía crítica (Balech, *in litt.*). La práctica de la metodología clásica presupone un entrenamiento previo sobre las técnicas aquí descriptas, que a pesar de no ser muy dificultosas difieren de las que se emplean en otros grupos taxonómicos. Como, por lo general, ni los ficólogos ni los protozoólogos dedicados a otros grupos de organismos poseen este entrenamiento, está muy difundida la presunción de que la taxonomía de los dinoflagelados es demasiado complicada. Pero la realidad es que el éxito en la práctica de la metodología empleada con mayor frecuencia (manipulación y desmembramiento de las tecas) reside en la habilidad manual del taxónomo, la que en la mayoría de los casos se adquiere con un poco de ejercitación.

Cabría agregar que además del interés que despiertan los dinoflagelados como uno de los principales productores del plancton marino, en las últimas dos décadas se les ha prestado cada vez mayor atención en relación a los crecientes fenómenos de marea roja en todo el mundo y al empleo de sus fósiles (quistes) como indicadores estratigráficos. Esto influyó notablemente en el rápido avance de las investigaciones, dando como resultado la aparición de numerosas obras con estudios originales y con revisiones críticas sobre diferentes aspectos del conocimiento de los dinoflagelados. Vale la pena mencionar algunas de las más importantes que no han sido citadas hasta ahora, y que podrán servir de referencia para el investigador interesado en el tema: Taylor & Seliger (1979), Bujak & Davies (1983), Dale (1983), Spector (1984), Anderson *et al.* (1985), Evitt (1985), Taylor (1987), Okaichi *et al.* (1989), Graneli *et al.* (1990), Fensome *et al.*, (1993). En Sournia

(1978: 156) se puede encontrar una guía básica de la literatura para la identificación de los dinoflagelados. A esta podría agregarse la reimpresión revisada de Huber-Pestalozzi (1968) dedicada sólo a las especies de aguas continentales.

REFERENCIAS

Abé, T. H., 1981. Studies on the family Peridiniinae. An unfinished monograph of the armoured dinoflagellata. Academia Sci. Books, Tokio, 412 pp.

Anderson, D. M., A. W. White & D. G. Baden (ed.), 1985. Toxic dinoflagellates. Elsevier, New York, 561 pp.

Balech, E., 1959. Two new genera of dinoflagellates from California. Biol. Bull. 116: 195-203.

Balech, E., 1961. *Glenodinium cristatum* sp. nov. Neotropica 7: 45-51.

Balech, E., 1974. El género *Protoperidinium* Bergh 1881 (*Peridinium* Ehr., 1831, partim.). Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat. "B. Rivadavia", Hidrob. 4: 1-79.

Balech, E., 1977. Introducción al fitoplancton marino. EUDEBA, Buenos Aires, 211 pp.

Balech, E., 1990. Four new dinoflagellates. Helgol. Meersunters. 44: 387-396.

Balech, E. & L. de Oliveira Soares, 1966. Dos dinoflagelados de la bahía de Guanabara y proximidades (Brasil). Neotropica 12: 103-109.

Bibby, B. T. & J. D. Dodge, 1972. The encystement of a freshwater dinoflagellate: a light and electron-microscopical study. Br. Phycol. J. 7: 85-100.

Biecheler, B., 1952. Recherches sur les Péridiniens. Bull. Biol. Fr. Belg., Suppl. 36: 1-149.

Blanco, J., 1986. Separación de quistes de dinoflagelados en gradiente de densidad. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 3: 81-84.

Boltovskoy, A., 1973. Formación del arqueopilo en tecas de dinoflagelados recientes. Rev. Espa. Micropal. 5: 81-98.

Boltovskoy, A., 1975. Estructura y estéreoul traestructura tecal de dinoflagelados. II. *Peridinium cinctum* (Müller) Ehrenberg. Physis B 34: 73-84.

Boltovskoy, A., 1989. Thecal morphology of the dinoflagellate *Peridinium gutwinskii*. Nova Hedwigia 49: 369-380.

Bujak, J. P. & E. H. Davies, 1983. Modern and fossil Peridiniinae. AASP Contr. Ser. no. 13: 1-204.

Bursa, A., 1958. The freshwater dinoflagellate *Woloszynnskia limnetica* n. sp. Membrane and protoplasmic structures. J. Protozool. 5: 299-304.

Cachon, J. & M. Cachon, 1987. Parasitic dinoflagellates. In F. J. R. Taylor (ed.), The biology of dinoflagellates. Blackewell, Oxford: 571-610.

Chatton, E., 1952. Classe des dinoflagellès on Pèridiniens. In P. -P. Grassé (ed.), Traité de zoologie, Vol. 1, Fasc. 1. Masson, Paris: 209-406.

Corliss, J. O., 1952. Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton-Lwoff technic. Stain Technol. 28: 97-101.

Dale, B., 1983. Dinoflagellate resting cysts "Benthic plankton". In G. A. Fryxell (ed.), Survival strategies of algae. Cambridge Univ. press, Cambridge: 69-136.

Dodge, J. D., 1985. Atlas of dinoflagellates. Farrand, London, 119 pp.

Dodge, J. D. & R. M. Crawford, 1970. A survey of thecal fine structure in the Dinophyceae. Bot. J. Linn. Soc. 63: 55-67.

Dodge, J. D. & H. B. Hermes, 1981. A scannig electron microscopical study of the apical pores of marine dinoflagellates (Dinophyceae). Phycologia 20: 424-430.

Dürr, G., 1979. Elektronmikroscopische Untersuchungen an Panzer von Dinoflagellaten. I. *Gonyaulax polyedra*. Arch. Protistenk. 122: 55-87.

Dürr, G. & H. Netzel, 1974. Fine structure of the cell surface in *Gonyaulax polyedra* (Dinoflagellata). Cell Tiss. Res. 150: 21-421.

Evitt, W. R., 1985. Sporopollenin dinoflagellate cysts (Their morphology and interpretation). Amer. Assoc. Stratigr. Palyn. Found., Dallas, 334 pp.

Faust, M.A. & E. Balech, 1993. A further SEM study of marine benthic dinoflagellates from a mangrove island, Twin Cays, Belize, including *Plagiodinium belizeanum* gen. et sp. nov. J. Phycol. 29: 826-832.

Fensome, R. A., F. J. R. Taylor, G. Norris, W. A. S. Sarjeant, D. I. Wharton & G. L. Williams, 1993. A classification of living and fossil dinoflagellates. Micropaleontology, Special publ. 7, 334 pp.

Fournier, R. O., 1978. Membrane filtering. In A. Sournia (ed.), Phytoplankton manual. UNESCO, Paris: 108-112.

Fritz, L. & R. E. Triemer, 1985. A rapid simple technique utilizing Calcofluor White M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates. J. Phycol. 21: 662-664.

Gocht, H. & H. Netzel, 1974. Rasterelektronmikroscopische Untersuchungen am Panzer von *Peridinium* (Dinoflagellata). Arch. Protistenk. 116: 381-410.

Graham, H. W., 1942. Studies on the morphology, taxonomy and ecology of the Peridiniales. Carnegie Inst. Washington, Publication 542, 129 pp.

Graneli, E., B. Sundstroem, L. Edler & D. M. Anderson (ed.), 1990. Toxic marine phytoplankon. Elsevier, New York, 480 pp.

Guillard, R. R. L. & M. D. Keller, 1984. Culturing dinoflagellates. In D. L. Spector (ed.), Dinoflagellates. Academic Press, Orlando: 391-442.

Hayat, M. A., 1981. Fixation for electron microscopy. Academic Press, New York, 501 pp.

Huber-Pestalozzi, G., 1968. Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae. In H. -J. Elster & W. Ohle (ed.), Die Binnengewässer. XVI. Das Phytoplankton des Süsswassers. Systematik un Biologie. Shweizerbart'sche Verlag., Stuttgart: 332 pp.

Kelley, I. & L. A. Pfiester, 1989. Vegetative reproduction of the freshwater dinoflagellate *Gloeodinium montanum*. J. Phycol. 25: 241-247.

Kiselev, I. A., 1950. Pantzyrnye zhgutikonostsy (Dinoflagellata) morey i presnovodnykh vod SSSR. [Dinoflagelados de los mares y aguas dulces de la URSS]. In Opredelitel po faune SSSR 33. Akad. Nauk SSSR, Moscú-Leningrado, 278 pp.

Langeron, M., 1949. Précis de microscopie. Masson, Paris, 1430 pp.

Lebour, V. M., 1925. The dinoflagellates of northern seas. Mar. Biol. Assoc., Plymouth, 250 pp.

Lindström, K., 1991. Nutrient requirements of the dinoflagellate *Peridinium gatunense*. J. Phycol. 27: 207-219.

Loeblich, A. R. III, 1969. The aphiesma or Dinoflagellate cell covering. Proc. N. Amer. Paleont. Conv. Pt. G: 867-929.

Loeblich, A. R. III, 1976. Dinoflagellate evolution: Speculation and evidence. J. Protozool. 23: 13-28.

MacAdam, R. B., 1971. Preservation of organic walled microfossil types studied by scanning electron microscopy. J. Paleontol. 45: 140.

Matsuoka, K., Y. Fukuyo & D. M. Anderson, 1989. Methods for modern dinoflagellate cyst studies. In T. Okaichi, D. M. Anderson & T. Nemoto (ed.), Red tides: Biology, environmental science, and toxicology. Elsevier, New York: 461-469.

Netzel, H. & G. Dürr, 1984. Dinoflagellates cell cortex. In D. L. Spector (ed.), Dinoflagellates. Academic Press, Orlando: 43-105.

Okaichi, T., Anderson, D. M. & Nemoto, T. (ed.), 1989. Red tides: Biology, environmental science,and txicology. Elsevier, New York: 1-489.

Perera, F. & C. Petito, 1982. Formaldehyde: a question of cancer policy. Science 216: 1285-1291.

Popovsky, J. & Pfiester, L. A., 1990. Süsswasserflora von Mitteleuropas. 6. Dinophyceae (Dinoflagellida). Gustav Fischer, Stuttgart, 272 pp.

Reid, F. M. H., 1978. Permanent slides. In A. Sournia (ed.), Phytopankton manual. UNESCO, Paris: 115-118.

Reid, P. C., 1978. Dinoflagellate cysts in plankton. New Phytol. 80: 219-229.

Sarjeant, W. A. S., 1974. Fossil and living dinoflagellates. Academic Press, London, 182 pp.

Schmidt, R. J., V. D. Gooch, A. R. Loeblich III & J. Woodland Hastings, 1978. Comparative study of luminiscent and non luminiscent strains of *Gonyaulax excavata* (Pyrrophyta). J. Phycol. 14: 5-9.

Sournia, A., 1978. Phytoplankton manual A. Sournia (ed.). UNESCO, Paris, 337 pp.

Sousa e Silva, E., 1969. Cytological aspects on multiplication of *Goniodoma* sp. Bot. Mar. 12: 233-243.

Spector, D. L., 1984. Dinoflagellates. In: D.L. Spector (ed.) Academic Press, Orlando, 545 pp.

Spector, D. L. & R. E. Triemer, 1979. Ultrastructure of the dinoflagellate *Peridinium cinctum* f. *ovoplanatum*. I. Vegetative cell ultrastructure. Amer. J. Bot. 66: 845-850.

Steidinger, K. A., 1979. Collection, enumeration and identification of free-living marine dinoflagellates. In D. L. Taylor & H. H. Seliger (eds), Toxic dinoflagellate blooms. Elsevier, Amsterdam: 485-442.

Steidinger, K. A., C. Chase, J. Garret, B. Mahmoudi, B. Roberts, C. Tomas & E. Truby, 1990. The use of optical pattern recognition in dinoflagellate taxonomy. In E. Graneli, B. Sundstroem, L. Edler & D. M. Anderson (ed.), Toxic marine phytoplancton. Elsevier, New York: 88-89.

Stosch, H. A. von., 1969. Dinoflagellaten aus der Nordsee. I. Über der *Cachonina niei* Loeblich (1968), *Gonyaulax grindleyi* Reinecke (1967) und eine Methode zur darstellung von Peridiniumpanzern. Helgol. Meersunters. 19: 558-568.

Stosch, H. A. von., 1974. Pleurax, seine Synthese und seine Vervendung zur einbettung 8nd Darstellung der Zellwände von Diatomeen, Peridineen, und anderen Algen, sowie für eine neue Methode zur Elelektivfärbung von Dinoflagellaten-Panzern. Arch. Protistenk. 16: 132-141.

Taylor D. L. & H. H. Seliger (ed.), 1979. Toxic dinoflagellate blooms. Elsevier, Amsterdam, 534 pp.

Taylor, F. J. R., 1973. Topography of cell division in the structurally complex dinoflagellate genus *Ornithocercus*. J. Phycol. 9: 1-10.

Taylor, F. J. R., 1978. Dinoflagellates. In A. Sournia (ed.), Phytoplankton manual. UNESCO, Paris: 143-147.

Taylor, F. J. R., 1987. The biology of dinoflagellates. In: F.J. Taylor (ed.) Botanical Monographs, vol. 21. Blackwell, Oxford, 785 pp.

Throndsen, J., 1978. Preservation and storage. In A. Sournia (ed.), Phytoplankton manual. UNESCO, Paris: 69-74.

Throndsen, J., 1978b. Isolation of single cells. In A. Sournia (ed.), Phytoplankton manual. UNESCO, Paris: 132-135.

Tomas, R. N. & E. R. Cox, 1973. *Peridinium balticum* (Levander) Lemmermann, an unusual dinoflagellate with a mesocaryotic and an eucaryotic nucleus. J. Phycol. 9: 91-98.

Wall, D. & B. Dale, 1968. Quaternary calcareous dinoflagellates (Calciodinellidae) and their natural affinities. J. Paleontol. 42: 1395-1408.

Zippi, P. A., 1991. SEM and light microscope mounting and specimen location technique for same-specimen study of palynological strew mounts. Micropaleontology 37: 407-413.