

Agar from two coexisting species of *Gracilaria* (Gracilariaceae)
from the Mexican Caribbean

Agar de dos especies coexistentes de *Gracilaria* (Gracilariaceae)
del Caribe mexicano

Julio Espinoza-Avalos¹
Enrique Hernández-Garibay²
José A. Zertuche-González³
Ma. Esther Meave del Castillo⁴

¹ ECOSUR
Apartado postal 424
Chetumal, CP 77000, Quintana Roo, México
E-mail: jespino@ecosur-qroo.mx

² Centro Regional de Investigación Pesquera
Instituto Nacional de la Pesca
Apartado postal 1306
Ensenada, CP 22800, Baja California, México

³ Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada, CP 22800, Baja California, México

⁴ Departamento de Hidrobiología
Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa
Apartado postal 55-535
México, DF, CP 09340, México

Recibido en marzo de 2002; aceptado en febrero de 2003

Abstract

Gracilaria cornea and *G. crassissima* are similar species that coexist at Bajo Pepito in the Mexican Caribbean. Differences in agar properties from both species were determined for two reproductive categories: carposporic and undetermined, the latter mainly composed of tetrasporophytes. Agar yield (AY), agar gel strength (GS), 3,6-anhydrogalactose content (AG) and sulfate content (S) of native and alkali-treated agar were determined for both reproductive categories. Significant differences in native and alkali-treated agar between the reproductive categories were recorded for AY, GS and S from *G. cornea* and *G. crassissima*, as well as for AG of native agar from the latter species. Our results, and previous studies, demonstrate that neither reproductive stage was predominant over the other(s) in terms of having greater or lower values of agar properties. The potential economic use of agar differences from plants of different reproductive stage remains very limited. Lower AY and GS were found for *G. cornea* from the Caribbean side of the Yucatan peninsula (this study), in comparison to agar values reported for the Gulf of Mexico side of the peninsula. Warmer and nutrient-poorer waters on the Caribbean side could cause those differences. No pattern for GS or S was found when these two and other tropical species of Gracilariaceae were compared to temperate species. When plants of both reproductive categories were pooled together for each *Gracilaria* species, significant differences were found in all agar properties. Interspecific and intraspecific differences between and within species of Gracilariaceae have also been found for phenological events. We suggest that the coexistence of *G. cornea* and *G. crassissima* requires different phenological responses by each species to the environment at Bajo Pepito, which in turn could be reflected in differences in the agar properties we measured, both at the interspecific and intraspecific levels.

Key words: *Gracilaria* spp., agar, reproductive phases, seasonal changes, Yucatan Peninsula.

Resumen

Gracilaria cornea y *G. crassissima* son especies muy similares que coexisten en el Bajo Pepito, Caribe mexicano. Para ambas especies se determinaron propiedades del agar de dos categorías reproductivas: carpospórica e indeterminada, la última compuesta principalmente por tetrasporofitos. Las propiedades del agar medidas fueron el rendimiento de agar (RA), fuerza de gel (FG), contenido de 3,6-anhidrogalaactosa (AG) y sulfatos (S) de agar nativo y con tratamiento alcalino. Para agar nativo y alcalino se registraron diferencias significativas de RA, FG y S entre las categorías reproductivas de *G. cornea* y *G. crassissima*, lo mismo que para AG del agar nativo de la segunda especie. Nuestros resultados y estudios previos demuestran que ninguna fase reproductiva predomina sobre otra(s), con relación a tener valores mayores o menores en las propiedades del agar. El valor económico potencial de las diferencias del agar de plantas en distinta fase reproductiva permanece muy limitado. Encontramos valores menores de RA y FG para *G. cornea* del litoral Caribe de la Península de Yucatán, en comparación con aquellos reportados para el litoral del Golfo de México de la península. Aguas más cálidas y oligotróficas en el litoral del Caribe pueden causar estas diferencias. No se encontró un patrón en la FG y el S cuando estas dos y otras especies tropicales se compararon con especies de Gracilariaceae templadas. Se registraron diferencias significativas entre especies en todas las propiedades del agar, cuando se juntaron plantas de las dos categorías reproductivas de cada especie de *Gracilaria*. También se han encontrado diferencias interespecíficas e intraespecíficas en especies de Gracilariaceae en eventos fenológicos. Se sugiere que la coexistencia de *G. cornea* y *G. crassissima* requiere que éstas posean respuestas fenológicas diferentes al ambiente de el Bajo Pepito, lo que a su vez se refleja en diferencias del agar, a niveles interespecífico e intraespecífico.

Palabras clave: *Gracilaria* spp., agar, fases reproductivas, cambios estacionales, Península de Yucatán.

Introduction

Gracilaria cornea J. Agardh and *G. crassissima* P. Crouan et H. Crouan in Schramm et Mazé, the two species we investigated, coexist in the study area, sometimes using the same rock as substrate (fig. 1). The anatomic and reproductive similarities in these species suggest that the first species could be merely a rough-water ecad of the second (Bird *et al.*, 1986). However, *G. crassissima* has been found in relatively calm waters near Cuba, Puerto Rico, and in various localities in Quintana Roo (Díaz-Piferrer, 1964; Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez, 1964; J. Espinoza-Avalos, pers. obs.). Both species have similar reproductive features, such as the development and form of the spermatangia, cystocarp and tetrasporangia (as *Polycavernosa* species; Fredericq and Norris, 1985). Nonetheless, the species are dissimilar in other external characteristics. The thallus of *G. cornea* is erect, generally terete (occasionally flattened in some parts), attached to a single disc-like holdfast, without anastomosis of branches. The color of the plants of this species from the study area is a very uniform, pale yellow (fig. 1). In contrast, the thallus of *G. crassissima* is prostrate, semiprostrate, decumbent to assurgent, with branches cylindrical or somewhat flattened and broad (fig. 1). Larger plants are sometimes attached to the substratum by more than one point of the thallus, with the presence of anastomosis between branches. The color of the plants of *G. crassissima* from the study zone is variable, from almost colorless to dark red (as *Gracilaria*, *Polycavernosa* or *Hydropuntia* species; *G. cornea* also as *G. debilis*; Taylor, 1960; Chapman, 1963; Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez, 1964; Norris, 1985; Littler *et al.*, 1989; Littler and Littler, 1997; J. Espinoza-Avalos, pers. obs.).

The agar properties of *G. cornea* and *G. crassissima* (*G. cornea* also as *G. debilis*) have been studied by Humm and Williams (1948), Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez (1964), Hong *et al.* (1969), Durairatnam (1980), Rincones-León (1990) and Marinho-Soriano *et al.* (2001), and by Díaz-Piferrer and

Introducción

Las dos especies que investigamos, *Gracilaria cornea* J. Agardh y *G. crassissima* P. Crouan et H. Crouan in Schramm et Mazé coexisten en el área de estudio, usando en algunas ocasiones la misma roca como sustrato (fig. 1). La similitud anatómica y reproductiva de las dos especies originó que Bird



Figure 1. Photomontage of *Gracilaria crassissima* (upper left), *G. cornea* (upper right) and both species growing on a same rock (bottom). Note the presence of cystocarps (dark points) in *G. cornea*. Photos by Humberto Bahena-Basave.

Figura 1. Fotomontaje de *Gracilaria crassissima* (arriba izquierda), *G. cornea* (arriba derecha) y ambas especies creciendo sobre una misma roca (abajo). Notar la presencia de cistocarpos (puntos oscuros) en *G. cornea*. Fotos por Humberto Bahena-Basave.

Caballer-de-Pérez (1964) and Lahaye *et al.* (1988), respectively. In those studies, both *Gracilaria* species were sampled separately. In contrast, we have investigated two coexisting species collected from the same site at the same time. Freile-Pelegrín and Robledo (1997a, 1997b) have also studied agar characteristics of *G. cornea* from the Gulf of Mexico side of the Yucatan peninsula. Agarophytes exhibit different agar properties depending on the origin of the seaweeds (Armisen and Galatas, 1987). Thus, we expected to find different agar properties in our population, since our study site is located on the Caribbean Sea side of that peninsula, where contrasting oceanographic and biotic features are present (Díaz-Martín and Espinoza-Avalos, 2000).

The studies carried out to date with *G. cornea* and *G. crassissima* have not described the agar characteristics of plants from different reproductive phases. It has been a matter of controversy whether or not plants of Gracilariaceae in different stages of reproduction have differences in agar characteristics. Hoyle (1978) did not find differences in the yield or in the gel strength of the agar from male, female and tetrasporic plants of *Gracilaria bursapastoris* (Gmelin) Silva and *G. coronopifolia* J. Agardh (names as in the original paper). Similar findings were reported by Yao *et al.* (1984) and Minghou *et al.* (1985) for tetrasporic vs cystocarpic plants of *G. verrucosa* (Hudson) Papenfuss, and by Durairatnam and Nascimento (1985) for *Gelidiopsis sjoestedtii* Kylin. Neither Yao *et al.* (1984) nor Minghou *et al.* (1985) reported major differences in 3,6-anhydrogalactose and sulfate contents of the agar extracted from reproductive phases of *Gracilaria* species. However, Kim and Henríquez (1979) registered differences in agar yield from cystocarpic and tetrasporic plants of *G. verrucosa*, while Whyte *et al.* (1981) found a lack of synchrony between seasonal fluctuations in the chemical composition of the agar from *G. verrucosa*-type depending on the reproductive stage of the plants. Durairatnam and Nascimento (1985) recorded that carposporic and tetrasporic plants of *G. cylindrica* Børgesen yielded comparable amounts of agar, but with unequal gel strength.

Perhaps the contrasting results of these studies up to the first half of the 1980s led McLachlan and Bird (1986) to judge that the evidence for differences in agar composition between nuclear phases within the Gracilariaceae was equivocal. In more recent studies, Pickering *et al.* (1990), Gerung *et al.* (1997) and Marinho-Soriano *et al.* (1999) reported differences in yield and/or gel strength of the agar from life stages of three *Gracilaria* species. Penniman and Mathieson (1987) and Brito-L. and Lemus-C. (1996) showed that the reproductive stages of two *Gracilaria* species did not differ in agar yield and gel strength.

The objective of this study was to determine the differences in agar characteristics of two coexisting *Gracilaria* species, and the agar differences of both species at the intraspecific level. Also, to compare agar properties of *G. cornea* from both (Gulf of Mexico and Caribbean) sides of the Yucatan peninsula. Because alkali treatment increases the gel strength

et al. (1986) sugirieran que la primera pudiera ser una época (de aguas turbulentas) de la segunda. Sin embargo, *G. crassissima* se ha encontrado en aguas relativamente tranquilas de Cuba, Puerto Rico y en varias localidades de Quintana Roo (Díaz-Piferrer, 1964; Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez, 1964; J. Espinoza-Avalos, obs. pers.). Entre sus características reproductivas similares se encuentran las formas de espermatangio, cistocarpio y tetrasporangio (como especies de *Polycavernosa*; Fredericq y Norris, 1985); sin embargo, difieren en sus características externas. El talo de *G. cornea* es erecto, generalmente terete (ocasionalmente aplanado en algunas partes), y se adhiere con una estructura en forma de disco, sin anastomosis de ramas. Su color, en el área de estudio, es un amarillo pálido muy uniforme (fig. 1). En contraste, el talo de *G. crassissima* es postrado, semipostrado, con ramas cilíndricas o algo aplanadas y anchas (fig. 1). Las plantas más grandes se adhieren en ocasiones al sustrato en más de un punto del talo, con anastomosis de ramas. Su color, en el área de estudio, es variable, de casi sin color hasta rojo oscuro (como especies de *Gracilaria*, *Polycavernosa* o *Hydropuntia*; *G. cornea* también como *G. debilis*; Taylor, 1960; Chapman, 1963; Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez, 1964; Norris, 1985; Littler *et al.*, 1989; Littler y Littler, 1997; J. Espinoza-Avalos, obs. pers.).

Las propiedades del agar de *G. cornea* y *G. crassissima* (*G. cornea* también como *G. debilis*) han sido estudiadas por Humm y Williams (1948), Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez (1964), Hong *et al.* (1969), Durairatnam (1980), Rincones-León (1990) y Marinho-Soriano *et al.* (2001), y por Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez (1964) y Lahaye *et al.* (1988), respectivamente. En esos estudios, ambas especies de *Gracilaria* fueron recolectadas por separado. En contraste, nosotros investigamos dos especies coexistentes recolectadas del mismo sitio, al mismo tiempo. Freile-Pelegrín y Robledo (1997a, 1997b) también han estudiado las características del agar de *G. cornea* del litoral del Golfo de México de la Península de Yucatán. Las agarofitas muestran diferencias de agar, dependiendo del lugar de origen de las plantas (Armisen y Galatas, 1987). Así, en nuestra población esperábamos encontrar diferencias de agar, puesto que nuestro sitio de estudio se encuentra en el litoral del Mar Caribe de la península, donde existen condiciones oceanográficas y bióticas contrastantes (Díaz-Martín y Espinoza-Avalos, 2000).

En los estudios de *G. cornea* y *G. crassissima* llevados a cabo hasta la fecha, no se han descrito características del agar de plantas en diferentes fases reproductivas. Ha existido controversia con respecto a si plantas Gracilariaceae en distinta fase reproductiva tienen agar con diferentes características. Hoyle (1978) no encontró diferencias en el rendimiento ni en la fuerza de gel entre el agar de plantas masculinas, femeninas y tetraspóricas de *Gracilaria bursapastoris* (Gmelin) Silva y de *G. coronopifolia* J. Agardh (nombres como en la publicación original). Yao *et al.* (1984) y Minghou *et al.* (1985) reportaron resultados similares para plantas

(and the economic importance) of the agar (Armisen and Galatas, 1987), native and alkali-treated agar from *G. cornea* and *G. crassissima* were compared.

Materials and methods

Study area

The study site, Bajo Pepito, is located in northeastern Quintana Roo, in the Mexican Caribbean, approximately 2 km west of Isla Mujeres (fig. 2). This tropical site is part of the National Marine Park "Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc". The sea bottom is very regular, 3–4 m in depth, with coarse sand and calcareous rocks usually less than 50 cm in diameter. Bajo Pepito is located within the Yucatan Strait, where there are strong northward currents (4 knots $\approx 2 \text{ m s}^{-1}$) (Merino-Ibarra, 1992). The water is clear, oligotrophic, with mean nitrate + nitrite and phosphate concentrations less than $0.7 \mu\text{M}$ year round (data not shown).

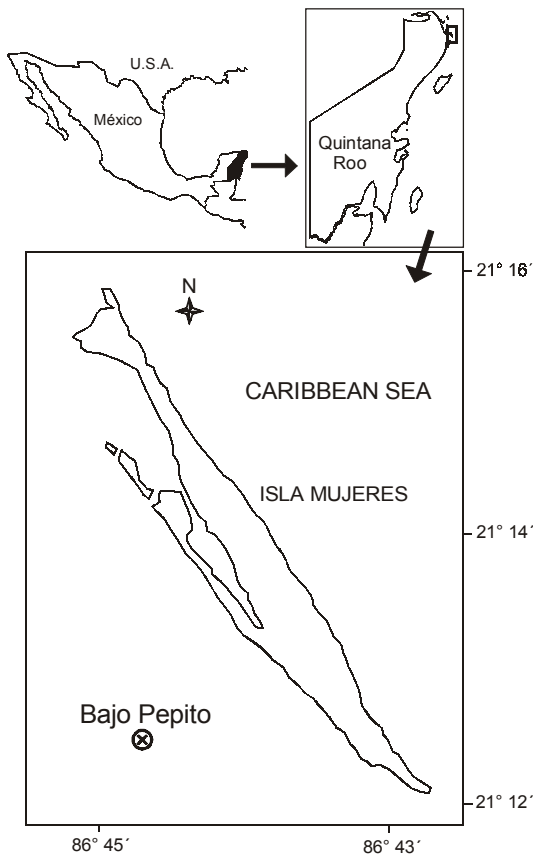


Figure 2. Geographic location of Bajo Pepito, Quintana Roo, Mexico. Dotted lines depict part of the National Marine Park Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc.

Figura 2. Ubicación geográfica de Bajo Pepito, Quintana Roo, México. Las líneas punteadas representan parte del Parque Marino Nacional Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc.

tetraspóricas vs. cistocárpicas de *G. verrucosa* (Hudson) Papenfuss, lo mismo que Durairatnam y Nascimento (1985) para *Gelidiopsis sjoestedtii* Kylin. Tampoco Yao *et al.* (1984) ni Minghou *et al.* (1985) registraron diferencias mayores en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa y sulfatos del agar extraído de fases reproductivas de especies de *Gracilaria*. Sin embargo, Kim y Henríquez (1979) reportaron diferencias en el rendimiento de agar de plantas cistocárpicas y tetraspóricas de *G. verrucosa*, mientras que Whyte *et al.* (1981) encontraron falta de sincronía en fluctuaciones estacionales en la composición química del agar de *G. tipo verrucosa*, dependiendo del estadio reproductivo de las plantas. Durairatnam y Nascimento (1985) registraron que las plantas carpospóricas y las tetraspóricas de *G. cylindrica* Børgesen produjeron cantidades comparables de agar, pero con fuerza de gel diferente.

Quizá la incertidumbre causada por los resultados anteriores condujo a McLachlan y Bird (1986) a opinar que la evidencia de diferencias en la composición de agar entre fases nucleares dentro de las Gracilariaceae era dudosa. En estudios más recientes, Pickering *et al.* (1990), Gerung *et al.* (1997) y Marinho-Soriano *et al.* (1999) reportaron diferencias en rendimiento y/o fuerza de gel del agar de fases reproductivas de tres especies de *Gracilaria*. Por su parte, Penniman y Mathieson (1987) y Brito-L. y Lemus-C. (1996) mostraron que los estadios reproductivos de dos especies de *Gracilaria* no fueron diferentes en su rendimiento de agar y fuerza de gel.

El objetivo de este estudio fue determinar la diferencia en características del agar de dos especies coexistentes de *Gracilaria* y las diferencias de su agar a nivel intraespecífico de ambas especies; asimismo, comparar las propiedades del agar de *G. cornea* de ambos litorales (Golfo de México y Caribe) de la Península de Yucatán. Tomando en cuenta que un tratamiento alcalino incrementa la fuerza de gel del agar, y su importancia económica (Armisen y Galatas, 1987), se comparan datos de agares nativo y alcalino de *G. cornea* y *G. crassissima*.

Materiales y métodos

Área de estudio

El sitio de estudio, Bajo Pepito, se localiza al noreste de Quintana Roo, en el Caribe mexicano, aproximadamente 2 km al oeste de Isla Mujeres (fig. 2). Este sitio tropical es parte del Parque Marino Nacional Costa Occidental de Isla Mujeres, Punta Cancún y Punta Nizuc. El fondo del mar es irregular, con 3–4 m de profundidad, de arena gruesa y rocas calcáreas usualmente menores a 50 cm de diámetro. Bajo Pepito está localizado en el Canal de Yucatán, donde existen corrientes fuertes (4 nudos $\approx 2 \text{ m s}^{-1}$) con dirección norte (Merino-Ibarra, 1992). El agua es clara, oligotrófica, y con concentraciones medias de nitratos + nitritos y fosfatos menores a $0.7 \mu\text{M}$ a lo largo del año (datos no publicados).

Collection of algal material

The study site was visited on February 7, March 10, April 14, May 16, June 20, August 29, October 7 and November 25, 1997, and January 14, 1998. On each visit, all *Gracilaria* spp. plants found along a 25 m long transect were collected using an aluminum 1 m² quadrat. The monthly samples (25 quadrats) were also used to measure algal biomass, reported elsewhere. The transects were prefixed and oriented (NW) at the sea bottom with metal stakes and a plastic chain. Plants of both species were sorted into two reproductive categories underwater: carposporic, recognized by the presence of cystocarps, and undetermined (other than carposporic) plants. Plants of each reproductive category and species were introduced underwater into plastic bags. The collected material was sun-dried in the field, then dried at 60°C for three days in a convection oven. Dried tissue was ground using a Thomas-Wiley® mill and sieved through a 0.355-mm sieve. In order to use uniform samples, only the algal particles that did not pass through the sieve were used for agar analysis. The limited number of carposporic plants of *G. crassissima* only permitted the analysis of agar for this reproductive stage from May to August 1997. For the same reason, data are not provided for *G. cornea* carposporic plants from October 1997 and January 1998. The proportion of nuclear phases was determined from independent plant samples for a phenological study, using 32 to 50 (mean = 47) fragments of adult plants collected monthly in the same area, but outside of the above-mentioned transects. Observation under a microscope of these plants revealed that the undetermined reproductive category (URC) was mainly composed of tetrasporophytes: a large percentage (mean 74.3%, $n = 752$) of the reproductive plants of both species analyzed during the study period corresponded to that reproductive stage (data not shown).

Agar extraction (native)

Triplicate samples of dry and milled algal tissue (4 g) were soaked in 40 mL of HCl 0.05 N for 3 min, thoroughly washed with distilled water, placed in 45 mL of distilled water and the pH adjusted to 6.5–7.0 with 0.1 N NaOH. Extraction was performed by autoclaving at 90°C for 1 h, and completed on a hot plate stirrer until all algal tissue (mixed with ~3 g of Celite) had disintegrated. The extracted agar was vacuum-filtered through Whatman® 40 filters. Agar solution was collected in aluminum trays and kept at room temperature (approximately 23°C) until gel formation. Agar gel was frozen and thawed two to three times, then transferred to 30 mL of ethanol 96% for 30 min and washed twice in 70% ethanol (v/v) and once in 96% ethanol. Agar was subsequently dried at 60°C for three days in a convection oven. Dried agar was weighed and yield calculated from the original dried sample weight. The procedure was a modification of that described by Roleda *et al.* (1997).

Recolección de material algal

El sitio de estudio se visitó en febrero 7, marzo 10, abril 14, mayo 16, junio 20, agosto 29, octubre 7 y noviembre 25 de 1997, y enero 14 de 1998. En cada visita se recolectaron todas las plantas de *Gracilaria* spp. que se encontraron a lo largo de un transecto de 25 m, utilizando un cuadrante de aluminio de 1 m². Las muestras mensuales (25 cuadrantes) también se usaron para medir la biomasa, que se reporta aparte. Los transectos se prefijaron y orientaron (NW) en el fondo con estacas metálicas y una cadena plástica. Las plantas de ambas especies se separaron bajo el agua en dos categorías reproductivas: carpospórica, reconocida por la presencia de cistocarpos, e indeterminada (el resto de plantas). Las plantas de cada especie y categoría se introdujeron bajo el agua en bolsas de plástico. El material recolectado se secó primero al sol y luego, por tres días, a 60°C en una estufa de convección. El tejido seco se molió con un molino Thomas-Wiley® y se cribó a través de un tamiz con apertura de 0.355 mm. Con el fin de tener muestras uniformes en los análisis de agar, sólo se usaron las partículas retenidas en el tamiz. El número limitado de plantas carpospóricas de *G. crassissima* sólo permitió el análisis de su agar de mayo a agosto de 1997. Por la misma razón, no se proporcionan datos de plantas carpospóricas de *G. cornea* para octubre de 1997 y enero de 1998. La proporción de fases reproductivas se determinó a partir de muestras de plantas independientes, para un estudio fenológico, usando de 32 a 50 (promedio = 47) fragmentos de plantas adultas recolectadas mensualmente fuera de los transectos mencionados. Las observaciones al microscopio revelaron que la categoría reproductiva indeterminada estuvo compuesta principalmente por tetrasporofitos: el gran porcentaje (promedio 74.3%, $n = 752$) de las plantas analizadas de ambas especies durante el periodo de estudio correspondió a esa fase reproductiva (datos no publicados).

Extracción de agar (nativo)

Se sumergieron muestras secas y molidas de tejido algal (4 g, por triplicado) por 3 min en 40 mL de HCl 0.05 N; se enjuagaron con agua destilada abundante y se pusieron en 45 mL de agua destilada, ajustando el pH a 6.5–7.0 con NaOH 0.1 N. La extracción se llevó a cabo en una autoclave a 90°C por 1 h, y se concluyó sobre una plancha de calentamiento con rotación, hasta que todo el tejido (mezclado con ~3 g de Celite) se desintegró. El agar extraído se filtró a través de filtros Whatman® 40. La solución de agar se recolectó en recipientes de aluminio y se mantuvo a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), hasta que se formó el gel. Los geles fueron congelados y descongelados dos o tres veces, transferidos a 30 mL de etanol 96% (v/v) por 30 min, lavados dos veces en etanol 70% y, una vez, en etanol 96%. El agar se secó a 60°C por tres días; luego se pesó y el rendimiento se calculó usando el peso original de la muestra. El procedimiento fue una modificación del descrito por Roleda *et al.* (1997).

Alkali treatment (modified from Freile-Peegrín and Robledo, 1997a)

Algal samples of 3 g were soaked overnight (in triplicate) in 60 mL of 3% NaOH (w/v) at room temperature. The next day samples were placed in a water bath at 85°C for 2 h. Algal particles were removed from the bath, cooled, and thoroughly washed with running tap water and then with distilled water. Samples were washed with 60 mL 0.025% H₂SO₄ for 10 min, and then placed in 90 mL of phosphate buffer solution at pH 6.3. Extraction was carried out just as for the native agar. Data on alkali-treated agar of both species are not presented for February and March 1997, because unknown conditions of alkali treatment did not allow an efficient recovery of the agar in those months.

Gel strength (modified from Miller and Furneaux, 1987)

Agar gels (1.0%, w/w) were prepared by dissolving 0.1 g of the dried agar in 9.9 g of distilled water. The 1.0% solution was selected for analysis (i.e., not 1.5%), in order to use the most number of samples of (the few) carposporic plants. Agar solutions were heated at 100°C for 15 min, and then more water was added to compensate for evaporation. Hot solution (5 mL) was poured into two transparent cylindrical polycarbonate jars of 2 cm diameter and 5 cm height. The agar was allowed to gel overnight at room temperature (approximately 23°C), with the jars placed upside down to prevent surface gel drying. Gel strength (g cm⁻²) was determined using a two-plate balance and a 0.196 cm² plunger. A loading digital balance was placed on one side of the two-plate balance. Weight was added as distilled water (~40 g min⁻¹) using a burette. Determination of 1.5% (w/w) agar strength was also performed for alkali-treated agar, only for those months when the highest gel strengths at 1.0% were registered. These gels were prepared by dissolving 0.15 g of the dried agar in 9.85 g of distilled water.

3,6-anhydrogalactose content

Percent 3,6-anhydrogalactose was determined by the resorcinol-acetal method of Yaphe and Arsenault (1965), as modified by Craigie and Leigh (1978), using D-fructose standards. Standards were prepared every time samples were analyzed. Absorbance was read at 555 nm.

Sulfate content

Percent sulfate was determined by the BaCl₂ method of Tabatabai (1974), as modified by Craigie *et al.* (1984). Hydrolysis of 15–20 mg of agar was carried out for 2 h at 100°C in four drops of 95% ethanol (to moisten the agar) and 0.5 mL 2 M HCl, using sealed Ependorf tubes. Standard K₂SO₄ solutions were used as reference.

Tratamiento alcalino (modificado de Freile-Peegrín y Robledo, 1997a)

Las muestras algales, de aproximadamente 3 g, se colocaron por triplicado en 60 mL de NaOH 3% (p/v) a temperatura ambiente. El día siguiente se colocaron en agua de calentamiento a 85°C por 2 h. Enseguida se retiraron del baño, se dejaron a enfriar, y se enjuagaron abundantemente con agua potable y luego con agua destilada. Las muestras se lavaron con 60 mL de H₂SO₄ 0.025% por 10 min y se colocaron en 90 mL de una solución buffer a pH 6.3. La extracción se efectuó igual que la del agar nativo. No se presentan datos de agar alcalino de ninguna de las especies para febrero y marzo de 1997, ya que condiciones desconocidas del tratamiento no permitieron una recuperación eficiente del agar en esos meses.

Fuerza de gel (modificado de Miller y Furneaux, 1987)

Se prepararon geles de agar (1.0%, p/p), disolviendo 0.1 g de agar seco en 9.9 g de agua destilada. Se seleccionó 1.0% como solución de análisis (i.e., no 1.5%), con el fin de usar el mayor número de muestras de (las escasas) plantas carpospóricas. Las soluciones de agar se calentaron a 100°C por 15 min; luego se agregó más agua para compensar la evaporación. La solución caliente (5 mL) se vació en dos frascos cilíndricos transparentes de policarbonato, de 2 cm de diámetro y 5 cm de altura. El agar se gelificó por un día a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), colocando los frascos al revés para evitar que se secase la superficie del gel. La fuerza de gel (g cm⁻²) se determinó usando una balanza de dos platos y un pistón de 0.196 cm². Se colocó una balanza digital en uno de los platos de la balanza. Como peso se agregó (~40 g min⁻¹) agua destilada usando una bureta. También se determinó la fuerza de gel en soluciones de agar alcalino 1.5% (p/p), sólo para los meses cuando se registró la fuerza de gel mayor del agar al 1.0%. Esos geles se prepararon disolviendo 0.15 g de agar seco en 9.85 g de agua destilada.

Contenido de 3,6-anhidrogalactosa

El porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa se determinó por el método resorcinol-acetal de Yaphe y Arsenault (1965), modificado por Craigie y Leigh (1978), usando D-fructosa como estándar. Los estándares se prepararon cada vez que se analizaron muestras. La absorbancia se leyó a 555 nm.

Contenido de sulfatos

El porcentaje de grupos sulfato se determinó por el método BaCl₂ de Tabatabai (1974), modificado por Craigie *et al.* (1984). La hidrólisis de 15–20 mg de agar se llevó a cabo por 2 h a 100°C en cuatro gotas de etanol 95% (para humedecer el agar) y 0.5 mL HCl 2 M, usando tubos Ependorf. Se usaron como referencia soluciones estándar de K₂SO₄.

Statistical analyses

Data were tested for normality (Kolmogorov-Smirnov) and subjected to Bartlett's test for homogeneity of group variances. Two-way analyses of variance (factors = reproductive category and time) for each species data were performed using the software Statistica, release 4.3, for Windows (Statsoft, Inc., Tulsa, USA). Three-way analyses of variance (third factor = species) were not carried out because carposporic plant material of *G. crassissima* was collected only in three out of nine sampling months. Therefore, two-way analyses of variance were performed to compare the agar properties at the species level by considering together all the data obtained within each species regardless of reproductive categories. Heterogeneous data groups were transformed using $\log(x + 1)$ and arcsin square root of x . Pearson's product moment correlation test was used to determine the linear relationship between agar properties.

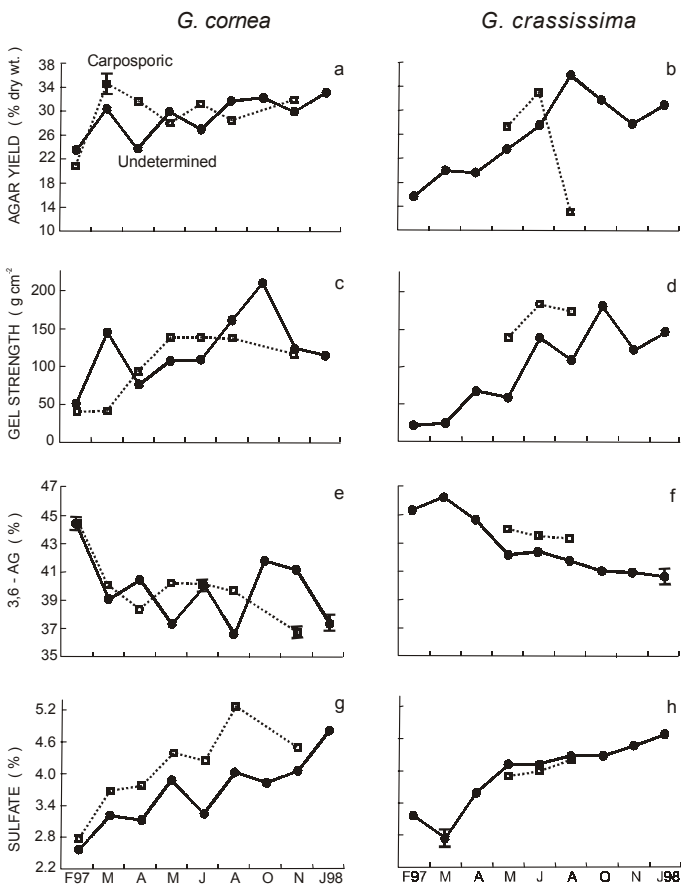


Figure 3. Agar yield (% dry weight), gel strength (g cm⁻²) of 1.0% agar solution, 3,6-anhydrogalactose content (%) and sulfate content (%) of native agar from *Gracilaria cornea* and *G. crassissima*. Mean values \pm standard error are provided for two reproductive categories: carposporic (\square) and undetermined (\bullet).

Figura 3. Rendimiento de agar (% de peso seco), fuerza de gel (g cm⁻²) de agar 1.0%, y contenido de 3,6-anhidrogalactosa (%) y sulfatos (%) de agar nativo de *Gracilaria cornea* y *G. crassissima*. Se incluyen valores promedio \pm error estándar de dos categorías reproductivas: carpospórica (\square) e indeterminada (\bullet).

Análisis estadísticos

Se probó la normalidad de los datos (Kolmogorov-Smirnov) y éstos se sometieron a la prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett. Se efectuaron análisis de varianza de dos vías (factores = categoría reproductiva y tiempo) para los datos de ambas especies, usando el programa Statistica, versión 4.3, para Windows (Statsoft, Inc., Tulsa, EUA). No se efectuaron análisis de varianza de tres vías (tercer factor = especie) porque sólo en tres de los nueve meses se recolectaron plantas carpospóricas de *G. crassissima*. Por ello, se aplicaron análisis de varianza de dos vías para comparar las propiedades del agar a nivel de especie, considerando todos los datos obtenidos de cada especie en conjunto, sin considerar la categoría reproductiva. Datos sin homogeneidad de varianzas se transformaron usando $\log(x + 1)$ y raíz cuadrada de arco seno de x . La prueba de correlación de Pearson se usó para determinar la relación lineal entre las propiedades del agar.

Resultados

Rendimiento de agar (RA)

Las plantas carpospóricas y de categoría reproductiva indeterminada (CRI) de *G. cornea* y *G. crassissima* fueron significativamente diferentes en RA nativo y con tratamiento alcalino (figs. 3a, b, 4a, b; tablas 1, 2). Los RA nativo y alcalino fueron significativamente diferentes entre *G. cornea* y *G. crassissima* cuando se juntaron plantas carpospóricas y CRI de cada especie (fig. 5a, b; tabla 3). No se registró interacción significativa del tiempo con el RA alcalino de las dos especies (tabla 3).

Fuerza de gel (FG)

La FG de agar 1.0% nativo y con tratamiento alcalino de *G. cornea* y *G. crassissima* fue significativamente diferente a nivel intraespecífico (figs. 3c, d, 4c, d; tablas 1, 2). La FG de agar 1.5% se determinó en agar alcalino de plantas de CRI de *G. cornea* recolectadas en agosto, y carpospóricas y de CRI de *G. crassissima* recolectadas en junio y agosto, cuando se registraron los valores más altos de FG de agar 1.0% nativo (fig. 4c, d). Los valores medios de FG de agar 1.5% alcalino de plantas carpospóricas y de CRI de *G. crassissima*, y de CRI de *G. cornea* fueron 1281, 1266 y 1020 g cm⁻², respectivamente. La FG de agar 1.0% fue significativamente diferente entre *G. cornea* y *G. crassissima* cuando se juntaron las dos categorías reproductivas de cada especie (fig. 5c, d; tabla 3).

Contenido de 3,6-anhidrogalactosa (AG)

El porcentaje de AG de agar nativo fue significativamente diferente entre plantas carpospóricas y de CRI de *G. crassissima*, no así para el agar con tratamiento alcalino de esta especie, ni para los dos tipos de agar de *G. cornea* (figs. 3e, f, 4e, f; tablas 1, 2). Sin embargo, cuando se analizaron en

Table 1. Analysis of variance and significance values for the yield and properties of native and alkali-treated agar from *Gracilaria cornea*. A = reproductive category, B = time and A × B = interaction.

Tabla 1. Análisis de varianza y valores de significancia del rendimiento y propiedades del agar nativo y con tratamiento alcalino de *Gracilaria cornea*. A = categoría reproductiva, B = tiempo y A × B = interacción.

Source of variation	Native agar			Alkali-treated agar		
	df	F	P	df	F	P
Agar yield						
A	1	8.37	0.006**	1	15.30	0.001**
B	6	29.70	0.000**	4	45.79	0.000**
A × B	6	10.23	0.000**	4	18.42	0.000**
Gel strength						
A	1	22.76	0.000**	1	60.84	0.000**
B	6	187.24	0.000**	4	284.45	0.000**
A × B	6	70.95	0.000**	4	24.77	0.000**
3,6-anhydrogalactose						
A	1	0.36	0.553ns	1	1.87	0.180ns
B	6	63.17	0.000**	4	6.49	0.001**
A × B	6	20.53	0.000**	4	77.71	0.000**
Sulfate content						
A	1	334.65	0.000**	1	105.30	0.000**
B	6	195.41	0.000**	4	155.54	0.000**
A × B	6	12.71	0.000**	4	103.00	0.000**

** Highly significant ($P < 0.01$), * significant ($P < 0.05$), ns = not significant.

Table 2. Analysis of variance and significance values for the yield and properties of native and alkali-treated agar from *Gracilaria crassissima*. A = reproductive category, B = time and A × B = interaction.

Tabla 2. Análisis de varianza y valores de significancia del rendimiento y propiedades del agar nativo y con tratamiento alcalino de *Gracilaria crassissima*. A = categoría reproductiva, B = tiempo y A × B = interacción.

Source of variation	Native agar			Alkali-treated agar		
	df	F	P	df	F	P
Agar yield						
A	1	159.79	0.000**	1	5.03	0.042*
B	2	98.81	0.000**	2	6.27	0.011*
A × B	2	623.64	0.000**	2	12.57	0.001**
Gel strength						
A	1	251.33	0.000**	1	28.00	0.000**
B	2	80.74	0.000**	2	189.05	0.000**
A × B	2	6.68	0.006**	2	22.21	0.000**
3,6-anhydrogalactose						
A	1	79.44	0.000**	1	0.19	0.667ns
B	2	4.62	0.021*	2	4.47	0.024*
A × B	2	1.61	0.222ns	2	4.62	0.022*
Sulfate content						
A	1	10.18	0.004**	1	431.35	0.000**
B	2	9.10	0.001**	2	136.75	0.000**
A × B	2	0.93	0.410ns	2	114.16	0.000**

** Highly significant ($P < 0.01$), * significant ($P < 0.05$), ns = not significant.

Results

Agar yield (AY)

Carposporic and URC plants of *G. cornea* and *G. crassissima* were significantly different in native and alkali-treated AY (figs. 3a, b, 4a, b; tables 1, 2). Significant differences in native and alkali-treated AY existed between *G. cornea* and *G. crassissima* when carposporic and URC plants were pooled together within each species (fig. 5a, b; table 3). No significant interaction was registered in alkali-treated AY of the two species through time (table 3).

Gel strength (GS)

Significant differences were found in GS of native and alkali-treated agar 1.0% of *G. cornea* and *G. crassissima* at the intraspecific level (figs. 3c, d, 4c, d; tables 1, 2). GS for 1.5% gels was also performed for alkali-treated agar of undetermined plants of *G. cornea* collected in August, and carposporic and undetermined plants of *G. crassissima* collected in June and August, when the highest gel strengths at 1.0% were registered (fig. 4c, d). Mean gel strength values of 1.5% alkali-treated agar solutions were 1281 and 1266 g cm⁻² for carposporic and URC plants, respectively, of *G. crassissima*, and 1020 g cm⁻² for the latter category of plants of *G. cornea*. Significant differences in GS for 1.0% gels occurred between *G. cornea* and *G. crassissima* when plants of the two reproductive categories were pooled together within each species (fig. 5c, d; table 3).

3,6-anhydrogalactose content (AG)

Percent AG was significantly different between carposporic and URC plants for native agar of *G. crassissima*, not for alkali-treated agar of this species or the two types of agar from *G. cornea* (figs. 3e, f, 4e, f; tables 1, 2). However, when carposporic and URC plants were pooled together within each species, AG content of both native and alkali-treated agar was significantly different between *G. cornea* and *G. crassissima* (fig. 5e, f; table 3).

Sulfate content (S)

Percent S of native and alkali-treated agar from carposporic and URC plants of *G. cornea* and *G. crassissima* exhibited significant differences (figs. 3g, h, 4g, h; tables 1, 2). Interspecific significant differences, however, were only recorded for alkali-treated agar, not for native agar (fig. 5g, h; table 3).

In general, differences in properties of native and alkali-treated agar between reproductive categories (figs. 3, 4) were not a result of values that were consistently larger or smaller in one reproductive category than in the other, since significant

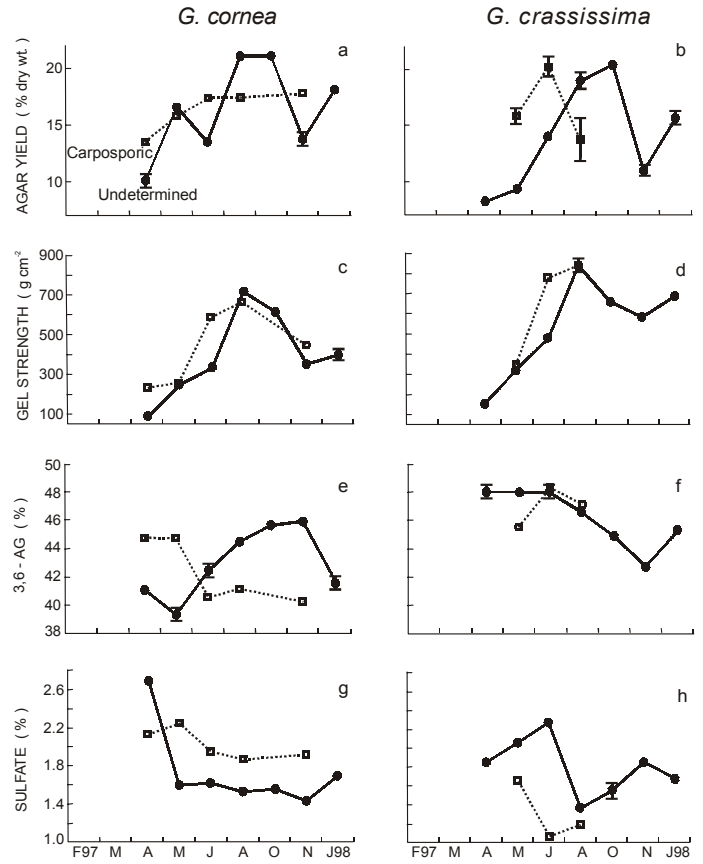


Figure 4. Agar yield (% dry weight), gel strength (g cm⁻²) of 1.0% agar solution, 3,6-anhydrogalactose content (%) and sulfate content (%) of alkali-treated agar from *Gracilaria cornea* and *G. crassissima*. Mean values \pm standard error are provided for two reproductive categories: carposporic (squares) and undetermined (filled circles).

Figura 4. Rendimiento de agar (% de peso seco), fuerza de gel (g cm⁻²) de agar 1.0%, y contenido de 3,6-anhidrogalaactosa (%) y sulfatos (%) de agar con tratamiento alcalino de *Gracilaria cornea* y *G. crassissima*. Se incluyen valores promedio \pm error estándar de dos categorías reproductivas: carpospórica (cuadrados) e indeterminada (círculos).

conjunto plantas de las dos categorías reproductivas de cada especie, el porcentaje de AG del agar nativo y del alcalino fue significativamente diferente entre *G. cornea* y *G. crassissima* (fig. 5e, f; tabla 3).

Contenido de sulfatos (S)

El porcentaje de S del agar nativo y con tratamiento alcalino de plantas carpospóricas y de CRI de *G. cornea* y *G. crassissima* fue significativamente diferente (figs. 3g, h, 4g, h; tablas 1, 2). Sin embargo, sólo se registraron diferencias significativas interespecíficas, para el agar alcalino y no para el nativo (fig. 5g, h; tabla 3).

En general, las diferencias en las propiedades del agar nativo y con tratamiento alcalino entre las categorías reproductivas (figs. 3, 4) no fueron causadas porque en una de las categorías las propiedades fueran consistentemente menores o

interactions through time occurred in most agar-property values (tables 1, 2). The only exception was in S of native agar from *G. cornea*, where carposporic plants always contained more sulfate than plants from the URC group (fig. 3g). Nonetheless, in this case the range values were comparable in both reproductive categories. Larger GS for native agar (fig. 3) and smaller S for alkali-treated agar (fig. 4) from carposporic plants of *G. crassissima* were also registered. However, only three pairs of data were included on which to base these two comparisons.

Relationships between properties of native and alkali-treated agar of reproductive categories from *G. cornea* and *G. crassissima* did not follow consistent patterns (table 4). For example, a significant positive correlation between AG and S was found for alkali-treated agar from carposporic plants of *G. cornea*, but a negative one was found between the same properties for native agar from URC plants of *G. crassissima* (table 4). High correlation values found between agar properties of carposporic plants of *G. crassissima* (table 4) were not significant because of the small number of pairs (three) of the data that were analyzed. Relationships between agar properties of pooled reproductive categories within each species also varied depending on the factor being evaluated (table 5).

mayores que en la otra, puesto que ocurrieron interacciones significativas a lo largo del tiempo en la mayoría de los valores de tales propiedades (tablas 1, 2). La única excepción fue en el contenido de S del agar nativo de *G. cornea*, en el que las plantas carpospóricas siempre tuvieron más S que las de CRI (fig. 3g). Sin embargo, en este caso el rango de valores fue comparable en ambas categorías reproductivas. También se registraron valores mayores de FG en el agar nativo (fig. 3) y menor contenido de S para el agar alcalino (fig. 4) de plantas carpospóricas de *G. crassissima*. Sin embargo, en esas comparaciones sólo se usaron tres pares de datos.

Las relaciones lineales entre las propiedades del agar nativo y del alcalino no presentaron un patrón consistente en las categorías reproductivas de *G. cornea* y *G. crassissima* (tabla 4). Por ejemplo, se encontró una correlación positiva significativa entre AG y S para el agar alcalino de plantas carpospóricas de *G. cornea*, pero la correlación fue negativa entre las mismas propiedades para el agar nativo de plantas de CRI de *G. crassissima* (tabla 4). Los valores de correlación altos que se encontraron entre propiedades del agar de plantas carpospóricas de *G. crassissima* (tabla 4) no fueron significativos, debido al reducido número de pares de muestra (tres) analizados. Las relaciones lineales entre especies (con categorías reproductivas analizadas en conjunto) también variaron, dependiendo de los factores evaluados (tabla 5).

Table 3. Analysis of variance and significance values for the yield and properties of native and alkali-treated agar from *Gracilaria cornea* and *G. crassissima*. A = species, B = time and A × B = interaction. The two reproductive categories recognized in this study were analyzed together.

Tabla 3. Análisis de varianza y valores de significancia del rendimiento y propiedades del agar nativo y con tratamiento alcalino de *Gracilaria cornea* y *G. crassissima*. A = especie, B = tiempo y A × B = interacción. Las dos categorías reproductivas reconocidas en este estudio se analizaron en conjunto.

Source of variation	Native agar			Alkali-treated agar		
	df	F	P	df	F	P
Agar yield						
A	1	27.06	0.000**	1	16.76	0.000**
B	8	9.10	0.000**	6	15.58	0.000**
A × B	8	2.94	0.006**	6	1.76	0.125ns
Gel strength						
A	1	6.06	0.015*	1	45.69	0.000**
B	8	55.81	0.000**	6	75.71	0.000**
A × B	8	6.98	0.000**	6	3.46	0.005**
3,6-anhydrogalactose						
A	1	189.58	0.000**	1	52.44	0.000**
B	8	23.16	0.000**	6	1.61	0.153ns
A × B	8	10.73	0.000**	6	5.57	0.000**
Sulfate content						
A	1	1.68	0.197ns	1	5.67	0.020*
B	8	47.40	0.000**	6	6.72	0.000**
A × B	8	5.77	0.000**	6	2.67	0.021*

** Highly significant ($P < 0.01$), * significant ($P < 0.05$), ns = not significant.

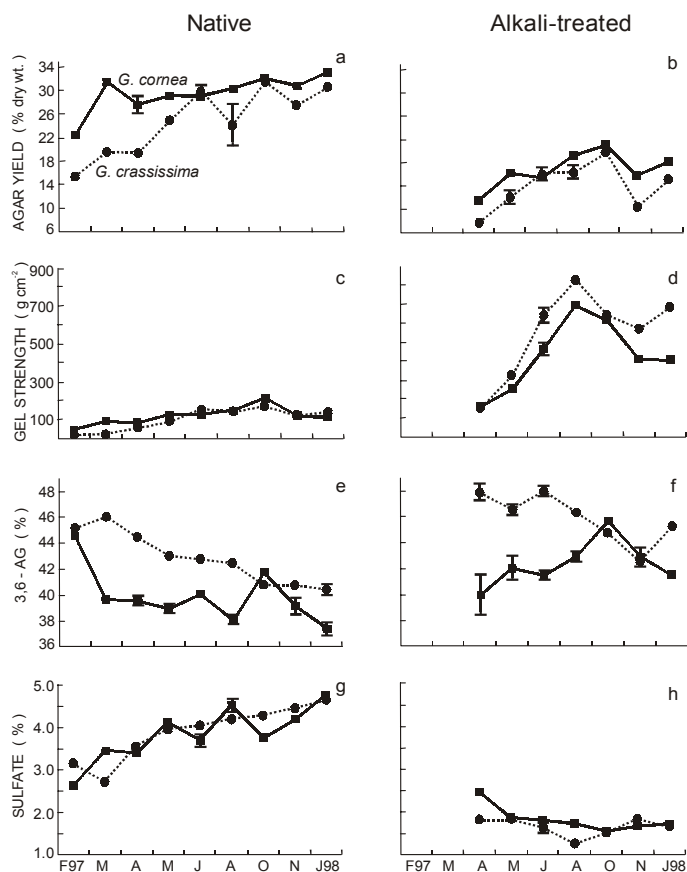


Figure 5. Agar yield (% dry weight), gel strength (g cm^{-2}) of 1.0% agar solution, 3,6-anhydrogalactose content (%) and sulfate content (%) of native and alkali-treated agar from *Gracilaria cornea* (filled squares) and *G. crassissima* (filled circles). Mean values \pm standard error of pooled agar determination of two reproductive categories.

Figura 5. Rendimiento de agar (% de peso seco), fuerza de gel (g cm^{-2}) de agar 1.0%, y contenido de 3,6-anhidrogalaactosa (%) y sulfatos (%) de agar nativo y con tratamiento alcalino de *Gracilaria cornea* (cuadrados) y *G. crassissima* (círculos). Valores promedio \pm error estándar de determinaciones agrupadas en cada especie del agar de dos fases reproductivas.

Discussion

Agar yield

In the following paragraphs, agar properties are discussed separately, when possible. Our results on native (20.8–34.6%) and alkali-treated (10.1–21.2%) AY from *G. cornea* (20.8–34.6%) were comparable to the ranges of native (17.6–42.1%) and alkali-treated (14.5–31.6%) values of AY reported by other authors (Humm and Williams, 1948; Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez, 1964; Hong *et al.*, 1969; Rincones-León, 1990; Freile-Peigrín and Robledo, 1997b; Marinho-Soriano *et al.*, 2001). However, those values are much lower than the 50.2%, 52.0% and 75.7% values of AY reported by Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez (1964), Durairatnam (1980) and Garza-Barrientos and González-Alanís (1981), respectively. The 50.2% and 52.0% AY figures

Discusión

Rendimiento de agar

Las propiedades del agar se discutieron por separado, cuando fue posible. Nuestros resultados de RA nativo (20.8–34.6%) y con tratamiento alcalino (10.1–21.2%) de *G. cornea* fueron comparables a los rangos de valores (17.6–42.1% y 14.5–31.6%, respectivamente) reportados por otros autores (Humm y Williams, 1948; Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez, 1964; Hong *et al.*, 1969; Rincones-León, 1990; Freile-Peigrín y Robledo, 1997b; Marinho-Soriano *et al.*, 2001). Sin embargo, estos valores son mucho menores que los valores de RA reportados por Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez (1964), Durairatnam (1980) y Garza-Barrientos y González-Alanís (1981), de 50.2%, 52.0% y 75.7%, respectivamente. Los dos primeros valores se obtuvieron de plantas que se enjuagaron y secaron repetidamente antes de la extracción. El último valor (75.7%) parece ser irregular, puesto que las otras mediciones difieren mucho de ese valor solitario. Los valores medios de RA nativo de plantas de *G. crassissima* obtenidos en nuestro estudio (13.2–35.7%) fueron comparables a los valores (28.2–44.6%) registrados por Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez (1964) y Lahaye *et al.* (1988).

Las correlaciones positivas significativas que se encontraron en este estudio entre RA y FG a niveles intraespecífico e interespecífico de agar nativo y con tratamiento alcalino fueron similares al estudio de Friedlander (1991). En cuatro ocasiones se encontraron correlaciones positivas entre RA y S, a niveles intraespecífico e interespecífico, similar a lo reportado por Sasikumar *et al.* (1997). Sin embargo, también se encontró una correlación negativa significativa entre las dos últimas características del agar a nivel interespecífico (tabla 5).

Fuerza de gel

Los registros de FG del agar 1.5% nativo (13–130 g cm^{-2}) y algunos del agar con tratamiento alcalino (335–447 g cm^{-2}) de *G. cornea* encontrados por otros autores (Humm y Williams, 1948; Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez, 1964; Hong *et al.*, 1969; Durairatnam, 1980; Rincones-León, 1990; Freile-Peigrín y Robledo, 1997a) se encuentran dentro del rango o son menores a nuestros resultados de FG del agar 1.0%, nativo (40–213 g cm^{-2}) y con tratamiento alcalino (97–722 g cm^{-2}), indicando que el agar de *G. cornea* del Caribe mexicano es más resistente. Además, Freile-Peigrín y Robledo (1997a, 1997b) reportaron valores máximos de FG del agar 1.5% de 1653 y 1758 g cm^{-2} , respectivamente, los cuales son mayores que el valor máximo medio registrado en el presente estudio, para el agar 1.5% (1020 g cm^{-2}). Freile-Peigrín y Robledo (1997a) también encontraron valores más altos de RA (35.6–42.1%) que los nuestros. Su sitio de trabajo y el nuestro se encuentran en la Península de Yucatán, pero uno en el litoral del Golfo de México y el otro en el del Caribe, respectivamente. Las aguas frías de surgencia, ricas en nutrientes, en

Table 4. Correlation coefficient matrix of the native (top diagonal) and alkali-treated (bottom diagonal) agar yield, gel strength (GS), 3,6-anhydrogalactose content (3,6-AG) and sulfate content (SO₄) from carposporic and undetermined reproductive category plants of *Gracilaria cornea* and *G. crassissima*.

Tabla 4. Matriz de coeficientes de correlación entre el rendimiento, fuerza de gel (GS), y contenido de 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AG) y sulfatos (SO₄) de agar nativo (diagonal superior) y con tratamiento alcalino (diagonal inferior), de plantas carpospóricas y categoría reproductiva indeterminada de *Gracilaria cornea* y *G. crassissima*.

	Carposporic				Undetermined			
	Yield	GS	3,6-AG	SO ₄	Yield	GS	3,6-AG	SO ₄
<i>Gracilaria cornea</i>								
Yield	–	0.20	–0.80*	0.40	–	0.78*	–0.61	0.84**
GS	0.78	–	–0.49	0.85*	0.90**	–	–0.27	0.45
3,6-AG	–0.88*	–0.85	–	–0.63	0.32	0.64	–	–0.66
SO ₄	–0.71	–0.88*	0.91*	–	–0.64	–0.65	–0.37	–
<i>Gracilaria crassissima</i>								
Yield	–	–0.01	0.53	–0.81	–	0.83**	–0.85**	0.81**
GS	0.11	–	–0.85	0.59	0.85*	–	–0.86**	0.83**
3,6-AG	0.61	0.86	–	–0.93	–0.34	–0.61	–	–0.98**
SO ₄	–0.40	–0.95	–0.97	–	–0.65	–0.65	0.48	–

** Highly significant ($P < 0.01$), * significant ($P < 0.05$).

were obtained when plant material was repeatedly rinsed and dried prior to extraction. The latter value (75.7%) seems irregular since the other measurements differ greatly from this solitary value. Mean values of AY from native *G. crassissima* plants obtained in our study (13.2–35.7%) were comparable to the values (28.2–44.6%) registered by Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez (1964) and Lahaye *et al.* (1988).

Significant positive correlations found in this study between AY and GS at the intraspecific and interspecific levels for native and alkali-treated agar were similar to the results of Friedlander (1991). On four occasions, AY and S were also positively correlated at the intraspecific and interspecific levels, similar to that reported by Sasikumar *et al.* (1997). However, in contrast, a significant negative correlation was also found between the last two agar properties at the inter-specific level (table 5).

Gel strength

Gel strength records for native (13–130 g cm⁻²) and some alkali-treated (335–447 g cm⁻²) 1.5% agar solutions from *G. cornea* found by other authors (Humm and Williams, 1948; Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez, 1964; Hong *et al.*, 1969; Durairatnam, 1980; Rincones-León, 1990; Freile-Pelegrín and Robledo, 1997a), are within the range or lower than our 1.0% agar solution, native (40–213 g cm⁻²) and alkali-treated (97–722 g cm⁻²), indicating that agar from *G. cornea* from the Mexican Caribbean is stronger. In addition, using 1.5% agar solutions, Freile-Pelegrín and Robledo (1997a, 1997b) reported maximum mean GS values of 1653 and 1758 g cm⁻²,

el litoral del Golfo de México de la península (Merino, 1997) pueden incrementar el nitrógeno en el tejido de *G. cornea*, con un concomitante incremento en la FG del agar (Patwary y van der Meer, 1983a; Craigie *et al.*, 1984; Bird, 1988; Martínez y Buschmann, 1996). Por el contrario, las aguas relativamente más cálidas en el litoral del Caribe de la península pudieron causar en el agar de las plantas de nuestro sitio de estudio una disminución en la FG (Craigie y Wen, 1984) y en el RA (Christiaen *et al.*, 1987; Bird, 1988; Castro, 1996).

Díaz-Piferrer y Caballer-de-Pérez (1964) reportaron valores de FG de *G. crassissima* comparables (103–132 g cm⁻²) a nuestros resultados para el agar 1.0% (22–185 g cm⁻²). También registramos valores medios de FG del agar 1.5% de *G. crassissima* entre 1266 y 1281 g cm⁻², los cuales son mayores ($P < 0.006$) que el valor medio (1020 g cm⁻²) obtenido para *G. cornea*. Lahaye *et al.* (1988) mencionaron que la FG de *G. crassissima*, que midieron en N cm⁻², era comparable o mejor que la del agar comercial o agarosa. De esta manera, los valores de FG encontrados en este estudio indican que las dos especies de *Gracilaria* son una fuente potencial de agar para uso comercial.

En dos ocasiones se encontró una correlación negativa común entre FG y S (Yaphe y Duckworth, 1972) a niveles intraespecífico e interespecífico. Sin embargo, también se encontraron correlaciones positivas entre esas propiedades del agar en tres ocasiones, de manera similar a lo reportado por Bird *et al.* (1981) y Castro (1996). Al igual que Bird *et al.* (1981), nosotros también encontramos correlaciones negativas entre FG y AG para *G. crassissima*.

respectively. These values are higher than the mean maximum value recorded in the present study for 1.5% solutions (1020 g cm⁻²). Freile-Pelegrín and Robledo (1997a) also found higher native AY values (35.6–42.1%) than we did. Both studies were carried out in the Yucatan peninsula, but on the Gulf of Mexico and the Caribbean sides, respectively. Upwelled cold and nutrient-rich waters on the Gulf of Mexico side of the peninsula (Merino, 1997) could have increased tissue nitrogen of *G. cornea* with concomitant higher agar GS (Patwary and van der Meer, 1983a; Craigie *et al.*, 1984; Bird, 1988; Martínez and Buschmann, 1996). Conversely, relatively warmer waters along the Caribbean side of the peninsula could have caused lower agar GS (Craigie and Wen, 1984), as well as lower AY (Christiaen *et al.*, 1987; Bird, 1988; Castro, 1996) values for the plants of our study site.

Díaz-Piferrer and Caballer-de-Pérez (1964) reported GS values from native agar of *G. crassissima* comparable (103–132 g cm⁻²) to that of our 1.0% agar gel (22–185 g cm⁻²). Also, we registered mean GS values for 1.5% agar solutions of *G. crassissima* between 1266 and 1281 g cm⁻², which are higher ($P < 0.006$) than the mean value (1020 g cm⁻²) obtained for *G. cornea*. Lahaye *et al.* (1988) mentioned that the GS of *G. crassissima* they measured (in N cm⁻²) was comparable or better than that of commercial agar or agarose. Thus, the GS values reported herein indicate that the two species are a potential source for commercial use.

A common negative correlation between GS and S (Yaphe and Duckworth, 1972) was found twice in this study at the

Contenido de 3,6-anhidrogalaactosa y sulfatos

Los rangos de los registros de contenido de AG (Hong *et al.*, 1969; Garza-Barrientos y González-Alanís, 1981; Freile-Pelegrín y Robledo, 1997a) del agar nativo (31.6–40.0%) y con tratamiento alcalino (32.6–47.3%), al igual que el S del agar nativo (2.9–5.5%) y del alcalino (1.2–4.25%) de *G. cornea*, son comparables a nuestros resultados (AG de 36.6–44.7% y 39.2–45.9%, y S de 2.6–5.2% y 1.4–2.8%, para agar nativo y con tratamiento alcalino, respectivamente). Sin embargo, registramos uno de los valores más altos de S, de agar nativo (5.2%), conocido para especies tropicales de Gracilariaceae (entre 1.5% y 5.5%; Sasikumar *et al.*, 1997, y Freile-Pelegrín y Robledo, 1997a, respectivamente). Oyieke (1994) sugirió que el agar de especies de Gracilariaceae tropicales generalmente contenía más S que el de las especies de aguas templadas. Esta hipótesis no se sostiene para el agar nativo, del cual se ha medido uno de los valores mayores de S (10.0%) en una especie templada (Whyte *et al.*, 1981). Por su parte, Rebello *et al.* (1997) infirieron que la FG del agar de especies de Gracilariaceae tropicales sería menor que la de especies templadas. Sin embargo, especies tropicales particulares pueden tener agar con FG mayores que especies templadas particulares. Por ejemplo, uno de los valores más altos de FG del agar alcalino de una especie tropical (1758 g cm⁻²), reportado por Freile-Pelegrín y Robledo (1997b), no fue alcanzado por el agar extraído de especies templadas (Abbott, 1980; Christeller y Laing, 1989; Matsuhira y Urzúa, 1990; Martínez y Buschmann, 1996).

La falta de patrones consistentes y las correlaciones contrastantes encontradas en este estudio entre las propiedades del agar nativo y del alcalino a niveles intraespecífico e interespecífico no tienen explicaciones sencillas (Bird *et al.*, 1981; Ekman y Pedersen, 1990) y están fuera de los objetivos de este estudio.

Diferencias intraespecíficas de agar

El agar nativo y el sujeto a tratamiento alcalino de plantas carpospóricas vs. plantas de CRI de *G. cornea* y *G. crassissima* fueron significativamente diferentes en RA, FG y S. El contenido de AG del agar nativo de ambas categorías reproductivas de *G. crassissima* también fue diferente. Sin considerar que las plantas de CRI están compuestas principalmente de plantas tetraspóricas, nuestros resultados indican claramente que las propiedades del agar de las plantas carpospóricas fueron diferentes a las del resto de las fases reproductivas. Así, existieron diferencias intraespecíficas en el agar de *G. cornea* y en el de *G. crassissima*. Sin embargo, las diferencias en la segunda especie deben tomarse con precaución, ya que se basaron sólo en comparaciones de tres pares de valores medios. En la mayoría de los factores existieron interacciones significativas, indicando que las diferencias se debieron a ciclos desacoplados en las propiedades del agar, más que a los rangos de valores. En otras palabras, los rangos de valores en las propiedades del agar de ambas categorías reproductivas fueron equivalentes,

Table 5. Correlation coefficient matrix of the native (top diagonal) and alkali-treated (bottom diagonal) agar yield, gel strength (GS), 3,6-anhydrogalactose content (3,6-AG) and sulfate content (SO₄) of *Gracilaria cornea* and *G. crassissima*. The two reproductive categories recognized in this study were analyzed together.

Tabla 5. Matriz de coeficientes de correlación entre el rendimiento, fuerza de gel (GS), y contenido de 3,6-anhidrogalaactosa (3,6-AG) y sulfatos (SO₄) de agar nativo (diagonal superior) y con tratamiento alcalino (diagonal inferior) de *Gracilaria cornea* y *G. crassissima*. Las dos categorías reproductivas reconocidas en este estudio se analizaron en conjunto.

	Yield	GS	3,6-AG	SO ₄
<i>Gracilaria cornea</i>				
Yield	–	0.67	–0.71*	0.76*
GS	0.84*	–	–0.25	0.51
3,6-AG	0.85*	0.73	–	–0.87**
SO ₄	–0.86*	–0.74	–0.76*	–
<i>Gracilaria crassissima</i>				
Yield	–	0.93**	–0.88**	0.84**
GS	0.77*	–	–0.87**	0.87**
3,6-AG	–0.08	–0.34	–	–0.97**
SO ₄	–0.71	–0.79*	–0.07	–

** Highly significant ($P < 0.01$), * significant ($P < 0.05$).

intraspecific and interspecific levels. However, positive correlations between those agar properties were also found on three occasions, as also reported by Bird *et al.* (1981) and Castro (1996). Like Bird *et al.* (1981), we also found negative correlations between GS and AG for *G. crassissima*.

3,6-anhydrogalactose and sulfate content

Ranges of recorded AG (Hong *et al.*, 1969; Garza-Barrientos and González-Alanís, 1981; Freile-Pelegrín and Robledo, 1997a) from native (31.6–40.0%) and alkali-treated (32.6–47.3%) agar, as well as S from native (2.9–5.5%) and alkali-treated (1.2–4.25%) agar of *G. cornea*, are comparable to our results (AG of 36.6–44.7% and 39.2–45.9%, and S of 2.6–5.2% and 1.4–2.8%, for native and alkali-treated agar, respectively). Nonetheless, we measured one of the highest S values from native agar (5.2%) known for a tropical species of Gracilariaceae (ranging from 1.5% to 5.5%; Sasikumar *et al.*, 1997, and Freile-Pelegrín and Robledo, 1997a, respectively). Oyieke (1994) suggested that agar from tropical Gracilariaceae generally contained more sulfates than species from temperate waters. This hypothesis was not supported for native agar, for which one of the largest values of S (10.0%) has been measured for a temperate species (Whyte *et al.*, 1981). Rebello *et al.* (1997) inferred that agar GS from tropical Gracilariaceae would be lower than those from temperate species. However, particular tropical species may contain stronger agar gels than particular temperate ones. Thus, one of the largest GS values for alkali-treated agar from a tropical species (1758 g cm⁻²), reported by Freile-Pelegrín and Robledo (1997b), was not equaled by agars extracted from temperate species (Abbott, 1980; Christeller and Laing, 1989; Matsuhira and Urzúa, 1990; Martínez and Buschmann, 1996).

The lack of consistent patterns and the contrasting correlations found in the present study within the native and alkali-treated agar properties at the intraspecific and interspecific levels have no simple explanations (Bird *et al.*, 1981; Ekman and Pedersen, 1990) and are beyond the aims of this study.

Intraspecific agar differences

Native and alkali-treated agar of carposporic vs URC plants of *G. cornea* and *G. crassissima* were significantly different in AY, GS and S. Native AG was also different between the reproductive category plants of *G. crassissima*. Despite the fact that URC plants were mainly composed of tetrasporic plants, our results clearly indicate that the agar properties from carposporic plants were different from the rest of the reproductive phases. Thus, intraspecific agar differences existed within *G. cornea* and *G. crassissima*. The difference for the second species must be taken with caution since it was based only on three pairs of mean value comparisons. Significant interactions existed in most factors, indicating that the differences were more a matter of uncoupled cycles in agar properties rather than in the range values. In other words, range values of agar properties of both reproductive categories were equivalent, but

pero sus valores menores y mayores no coincidieron necesariamente. Estos resultados son similares a los de Whyte *et al.* (1981), quienes reportaron diferencias en las características del agar entre fases reproductivas, las cuales dependieron de fluctuaciones estacionales, no en los valores absolutos. También se encontraron diferencias intraespecíficas en crecimiento y biomasa en *G. cornea* y *G. crassissima* (datos no publicados), lo mismo que en otras especies de Gracilariaceae (Whyte *et al.*, 1981; Pickering *et al.*, 1990; Gerung *et al.*, 1997). De esa manera, las diferencias en la biología propia del nivel intraespecífico pudieron originar diferencias en las propiedades del agar a ese nivel.

Nuestros resultados indican que no es apropiado atribuir valores mayores o menores de todas las propiedades del agar a una fase reproductiva particular. Por ejemplo, las plantas carpospóricas de una especie de Gracilariaceae pueden tener contenido de S mayor (fig. 3g) o menor (Marinho-Soriano *et al.*, 1999), mientras que las plantas tetraspóricas pueden tener agar con FG mayor (Kim y Henríquez, 1979) o igual (Pickering *et al.*, 1990) que otras fases reproductivas. También, el número de propiedades del agar que es diferente entre fases nucleares depende de la especie. Por ejemplo, algunas especies presentan diferencias en RA y/o FG (tablas 1, 2), mientras que otras no las presentan (Yao *et al.*, 1984; Marinho-Soriano *et al.*, 1999). En consecuencia, no existe un patrón general aparente en cuanto a las diferencias en las propiedades del agar entre fases reproductivas de especies Gracilariaceae.

El potencial de uso comercial de las fases reproductivas de especies Gracilariaceae, dependiendo de las propiedades de su agar, es muy limitado: cuando se han reportado diferencias, los rangos de valores son comparables. En mutantes, se han obtenido diferencias mayores que las registradas entre fases reproductivas. Los valores de FG para el agar nativo y el alcalino del mutante MP40 fueron un orden de magnitud mayores que los de otros mutantes y tipos silvestres de *Gracilaria tikvahiae* (Patwary y van der Meer, 1983b). Por ello, hasta ahora el beneficio comercial de las diferencias de agar puede buscarse más bien examinando especies diferentes o mutantes, que entre fases reproductivas de especies Gracilariaceae. Por otro lado, las diferencias en las mediciones de agar (y biológicas) entre fases reproductivas, cuando se presenten, pueden tener una relevancia más ecológica que económica.

Diferencias interespecíficas de agar

Gracilaria cornea y *G. crassissima* tuvieron diferencias significativas en RA, FG y AG en su agar nativo y con tratamiento alcalino. También el contenido de S de agar alcalino fue diferente entre las dos especies. Diferencias interespecíficas similares en características del agar se han reportado entre otras especies Gracilariaceae coexistentes (Pondevida y Hurtado-Ponce, 1996; Falshaw *et al.*, 1999). Como ya se mencionó, las dos especies de *Gracilaria* incluidas en este trabajo igualmente presentaron diferencias en aspectos fenológicos y ecológicos (Espinoza-Avalos, no publicado). De manera

their low and high values were not necessarily coincident. These findings are similar to those of Whyte *et al.* (1981), who reported differences in agar properties between life stages depending upon seasonal fluctuations, but not in absolute values. Growth and biomass differences at the intraspecific level have been found between *G. cornea* and *G. crassissima* (data not shown), as has also been found for several species of Gracilariaceae (Whyte *et al.*, 1981; Pickering *et al.*, 1990; Gerung *et al.*, 1997). Thus, differences in underlying biology at the intraspecific level may have led to inequalities in agar properties at this level.

Our results indicate that it is not appropriate to attribute generally higher or lower values for all agar properties of a particular reproductive stage. For example, carposporic plants of a given Gracilariaceae species may have higher (fig. 3g) or lower S (Marinho-Soriano *et al.*, 1999), while tetrasporic plants may have harder (Kim and Henríquez, 1979) or equal strength (Pickering *et al.*, 1990) agar gels than other life stages. Also, the number of agar properties that is different between nuclear phases depends on the particular species. For example, some species present differences in AY and/or GS (tables 1, 2), but not other species (Yao *et al.*, 1984; Marinho-Soriano *et al.*, 1999). Thus, no general pattern is apparent for agar property differences between reproductive stages of Gracilariaceae species.

The potential for economic use of different reproductive stages of Gracilariaceae species depending on its agar properties is very limited. When differences have been reported, range values have been comparable. Larger differences than those registered between reproductive phases have been obtained from particular mutants. Values from both native and alkali-treated agar GS from the MP40 mutant were one order of magnitude greater than those from other mutants and wild types of *G. tikvahiae* (Patwary and van der Meer, 1983b). Therefore, up to now, commercially meaningful agar differences can better be researched by examining different species or various mutants rather than within the various reproductive stages of Gracilariaceae. Thus, differences in agar (and biological) measurements between reproductive phases, when present, may have more ecological than economic relevance.

Interspecific agar differences

Native and alkali-treated agar of *G. cornea* and *G. crassissima* were significantly different in AY, GS and AG. Sulfate in alkali-treated agar was also different between the two species. Similar interspecific differences in agar characteristics have also been reported for other coexisting Gracilariaceae species (Pondevida and Hurtado-Ponce, 1996; Falshaw *et al.*, 1999). As mentioned above, the two *Gracilaria* species included in this study also exhibited differences in phenological and ecological aspects (Espinoza-Avalos, unpublished). Similarly, Marinho-Soriano *et al.* (1998) reported different phenologies for two coexisting Gracilariaceae species from the Mediterranean. Thus, biological differences reflect unequal

similar, Marinho-Soriano *et al.* (1998) reportaron diferencias fenológicas de dos especies de Gracilariaceae coexistentes en el Mediterráneo. De esta manera, diferencias biológicas reflejan respuestas fisiológicas desiguales, las que pueden ayudar a explicar las divergencias en la cantidad y calidad del agar entre ambas especies de *Gracilaria* medidas aquí. Bengtsson *et al.* (1994) sugirieron que las diferencias fenológicas entre especies de plantas terrestres pudieran explicar su habilidad de coexistir en simpatria (Huntly *et al.*, 1996; Pickering *et al.*, 1996). Esta hipótesis se ha fortalecido con especies de plantas congénéricas terrestres (Pyke, 1990; Shibata y Nakashizuka, 1995). Así, las dos especies congénéricas de *Gracilaria* analizadas aquí pueden coexistir debido a sus respuestas fenológicas y ecológicas diferentes al ambiente de Bajo Pepito. Eventualmente, esas diferencias fenológicas se registran como diferencias en las propiedades del agar, ambas a nivel interespecífico e intraespecífico. Se concluye que las divergencias en las propiedades del agar entre *G. cornea* y *G. crassissima* son consecuencia de divergencias biológicas entre los dos taxones.

Agradecimientos

Agradecemos a M.A. Díaz-Martín, L.I. Quan-Young y R.A. Herrera-Solís su ayuda en el trabajo de campo, y a H. Bahena-Basave por proporcionar el fotomontaje. Isaí Pacheco-Ruiz, Alberto Gálvez y José Guzmán brindaron su hospitalidad a uno de nosotros (J.E.A.) en su estancia en Ensenada, Baja California. Oscar Pedrín-Osuna facilitó la participación de E.H.G. Un agradecimiento especial a Scott Monks por sus valiosos comentarios a dos versiones preliminares del manuscrito y por su revisión del inglés. Este trabajo forma parte de los requisitos doctorales de J.E.A. en la Universidad Autónoma Metropolitana. El estudio fue posible gracias al apoyo financiero de CONACYT, a través del proyecto 0418P-T.

Traducido al español por los autores.

physiological responses, which may explain the divergences in quantity and quality of agar between both species of *Gracilaria* measured herein. Bengtsson *et al.* (1994) suggested that different phenological and demographic processes between terrestrial plant species could explain their ability to coexist in sympatry (Huntly *et al.*, 1996; Pickering *et al.*, 1996). This hypothesis has been supported for some congeneric terrestrial plant species (Pyke, 1990; Shibata and Nakashizuka, 1995). Thus, the two congeneric species of *Gracilaria* examined herein may be able to coexist because of species-specific differences in phenological and ecological responses to the environment at Bajo Pepito. In turn, those phenological differences are registered as differences in agar properties, both at the interspecific and the intraspecific level. We conclude that divergences in agar properties between *G. cornea* and *G. crassissima* are a consequence of biological divergence of the two taxa.

Acknowledgements

We thank M.A. Díaz-Martín, L.I. Quan-Young and R.A. Herrera-Solis for their help with the field work, and H. Bahena-Basave for providing the photomontage. Isai Pacheco-Ruiz, Alberto Gálvez and José Guzmán provided warm hospitality to one of us (J.E.A.) while staying at Ensenada, Baja California. Oscar Pedrín-Osuna facilitated the participation of E.H.G. Very special thanks to Scott Monks for his valuable comments on two drafts of the manuscript and for correcting the English. This work is part of a Ph.D. thesis (J.E.A.) at the Universidad Autónoma Metropolitana. This study was made possible with financial support from CONACYT, project 0418P-T.

References

- Abbott, I.A. (1980). Some field and laboratory studies on colloid-producing red algae in central California. *Aquat. Bot.*, 8: 255–266.
- Armisen, R. and Galatas, F. (1987). Production, properties and uses of agar. *FAO Fish. Tech. Paper*, 288: 1–57.
- Bengtsson, J., Fagerström, T. and Rydin, H. (1994). Competition and coexistence in plant communities. *TREE*, 9: 246–250.
- Bird, C.J., de Oliveira, E.C. and McLachlan, J. (1986). *Gracilaria cornea*, the correct name for the western Atlantic alga hitherto known as *G. debilis* (Rhodophyta, Gigartinales). *Can. J. Bot.*, 64: 2045–2051.
- Bird, K.T. (1988). Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: Effects of environmental factors. *Bot. Mar.*, 31: 33–39.
- Bird, K.T., Hanisak, M.D. and Ryther, J. (1981). Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions. *Bot. Mar.*, 24: 441–444.
- Brito-L., L. and Lemus-C., A.J. (1996). Rendimiento y consistencia del agar de *Gracilaria damaecornis* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*, 35: 57–62.
- Castro, T.R. (1996). Agar yield, gel strength and sulfate content in *Gracilariopsis heteroclada* farmed in brackishwater canals. *Israeli J. Aquacul. Bamidgeh*, 48: 94–98.
- Chapman, V.J. (1963). The marine algae of Jamaica. Part 2. Phaeophyceae and Rhodophyceae. *Bull. Inst. Jamaica*, 12: 1–201.
- Christeller, J.T. and Laing, W.A. (1989). The effect of environment on the agar yield and gel characteristics of *Gracilaria sordida* Nelson (Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 32: 447–455.
- Christiaen, D., Stadler, T., Ondarza, M. and Verdus, M.C. (1987). Structures and functions of the polysaccharides from the cell wall of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Hydrobiologia*, 151/152: 139–146.
- Craigie, J.S. and Leigh, C. (1978). Carrageenans and agars. In: J.A. Hellebust and J.S. Craigie (eds.), *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge Univ. Press, London, pp. 109–131.
- Craigie, J.S. and Wen, Z.C. (1984). Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). *Can. J. Bot.*, 62: 1665–1670.
- Craigie, J.S., Wen, Z.C. and van der Meer, J.P. (1984). Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. *Bot. Mar.*, 27: 55–61.
- Díaz-Martín, M.A. and Espinoza-Avalos, J. (2000). Distribution of brown seaweeds (Phaeophyta) in the Yucatán peninsula, Mexico. *Bull. Mar. Sci.*, 66: 279–289.
- Díaz-Piferrer, M. (1964). Adiciones a la flora marina de Cuba. *Carib. J. Sci.*, 4: 353–371.
- Díaz-Piferrer, M. and Caballer-de-Pérez, C. (1964). Taxonomía, Ecología y Valor Nutritional de Algas Marinas de Puerto Rico. *Inst. Biol. Mar., CAAM, Univ. Puerto Rico, Mayaguez, Puerto Rico*, 145 pp.
- Durairatnam, M. (1980). Studies on the agar producing seaweeds and their distribution in northeast Brazil. *Cienc. Cult. (Brazil)*, 32: 1358–1372.
- Durairatnam, M. and Nascimento, H.C. (1985). Agar-agar from vegetative, cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria sjoestedtii* Kylin and *Gracilaria cylindrica* Boergesen. *Seaweed Res. Utiln.*, 8: 19–22.
- Ekman, P. and Pedersen, M. (1990). The influence of photon irradiance, day length, dark treatment, temperature, and growth rate on the agar composition of *Gracilaria sordida* W. Nelson and *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (Gigartinales, Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 33: 483–495.
- Falshaw, R., Furneaux, R.H., Pickering, T.D. and Stevenson, D.E. (1999). Agars from three Fijian *Gracilaria* species. *Bot. Mar.*, 42: 51–59.
- Fredericq, S. and Norris, J.N. (1985). Morphological studies on some tropical species of *Gracilaria* Grev. (Gracilariaceae, Rhodophyta): Taxonomic concepts based on reproductive morphology. *Taxon. Econ. Seaweeds*, 1: 137–155.
- Freile-Pelegrín, Y. and Robledo, D. (1997a). Effects of season on the agar content and chemical characteristics of *Gracilaria cornea* from Yucatán, Mexico. *Bot. Mar.*, 40: 285–290.
- Freile-Pelegrín, Y. and Robledo, D. (1997b). Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatán, Mexico. *J. Appl. Phycol.*, 9: 533–539.
- Friedlander, M. (1991). Growth rate, epiphyte biomass and agar yield of *Gracilaria conferta* in an annual outdoor experiment. I. Irradiance and nitrogen. *Biores. Tech.*, 38: 203–208.
- Garza-Barrientos, M.A. y González-Alanís, R. (1981). Agar procesado de la planta agarofita *Gracilaria debilis* (Forsskål) Boergesen, de Yucatán, México. VII Simposio Latinoamericano de Oceanografía Biológica. Instituto de Biología, UNAM, México, p. 87.
- Gerung, G.S., Kamura, S. and Ohno, M. (1997). Phenology and agar yield of *Gracilaria blodgettii* in the tropical water, Okinawa, Japan. *Bull. Mar. Sci. Fish., Kochi Univ.*, 17: 23–28.
- Hong, K.C., Goldstein, M.E. and Yaphe, W. (1969). A chemical and enzymic analysis of the polysaccharides from *Gracilaria*. *Int. Seaweed Symp.*, 6: 473–482.
- Hoyle, M.D. (1978). Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapastoris* (Gmelin) Silva and *G. coronopifolia* J. Ag.) from Hawaii. I. Yield and gel strength in the gametophyte and tetrasporophyte generations. *Bot. Mar.*, 21: 343–345.
- Humm, H.J. and Williams, L.G. (1948). A study of agar from two Brazilian seaweeds. *Am. J. Bot.*, 35: 287–292.
- Huntly, N., Chesson, P. and Pickering, C.M. (1996). Germination phenology and the coexistence of desert annual plants. *Bull. Ecol. Soc. Am.*, 77: 209.
- Kim, D.H. and Henríquez, N.P. (1979). Yields and gel strengths of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa* (Florideophyceae). *Int. Seaweed Symp.*, 9: 257–262.
- Lahaye, M., Revol, J.F., Rochas, C., McLachlan, J. and Yaphe, W. (1988). The chemical structure of *Gracilaria crassissima* (P. et H. Crouan in Schramm et Mazé) P. et H. Crouan in Schramm et Mazé

- and *G. tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) cell-wall polysaccharides. *Bot. Mar.*, 31: 491–501.
- Littler, D.S. and Littler, M.M. (1997). An illustrated marine flora of the Pelican Cays, Belize. *Bull. Biol. Soc. Wash.*, 9: 1–149.
- Littler, D.S., Littler, M.M., Bucher, K.E. and Norris, J.N. (1989). Marine Plants of the Caribbean. A Field Guide from Florida to Brazil. Airlife, England, 263 pp.
- Marinho-Soriano, E., Laugier, T. and de Casabianca, M.L. (1998). Reproductive strategy of two *Gracilaria* species, *G. bursa-pastoris* and *G. gracilis*, in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Bot. Mar.*, 41: 559–564.
- Marinho-Soriano, E., Bourret, E., de Casabianca, M.L. and Maury, L. (1999). Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastoris*. *Biores. Technol.*, 67: 1–5.
- Marinho-Soriano, E., Silva, T.S.F. and Moreira, W.S.C. (2001). Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicornis* and *Hydropuntia cornea* from Brazil. *Biores. Technol.*, 717: 115–120.
- Martínez, L.A. and Buschmann, A.H. (1996). Agar yield and quality of *Gracilaria chilensis* (Gigartinales, Rhodophyta) in tank culture using fish effluents. *Hydrobiologia*, 326/327: 341–345.
- Matsuhira, B. and Urzúa, C.C. (1990). Agars from *Gelidium rex* (Gelidiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204/205: 545–549.
- McLachlan, J. and Bird, C.J. (1986). *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. *Aquat. Bot.*, 26: 27–49.
- Merino, M. (1997). Upwelling on the Yucatan Shelf: Hydrographic evidence. *J. Mar. Syst.*, 13: 101–121.
- Merino-Ibarra, M. (1992). Afloramiento en la plataforma de Yucatán: Estructura y fertilización. Tesis de doctorado, UNAM, Inst. Cien. Mar Limnol., México, 255 pp.
- Miller, I.J. and Furneaux, R.H. (1987). Chemical characteristics of the galactans from the forms of *Gracilaria secundata* from New Zealand. *Bot. Mar.*, 30: 427–435.
- Minghou, J., Lahaye, M. and Yaphe, W. (1985). Structure of agar from *Gracilaria* spp. (Rhodophyta) collected in the People's Republic of China. *Bot. Mar.*, 28: 521–528.
- Norris, J.N. (1985). *Gracilaria* and *Polycavernosa* from the Caribbean and Florida: Key and list of the species of economic potential. *Taxon. Econ. Seaweeds*, 1: 101–113.
- Oyieke, H.A. (1994). The effect of phenotypic plasticity on agar from *Gracilaria salicornia* (J. Ag.) Dawson (Gracilariales, Rhodophyta) in Kenya. *Biores. Technol.*, 49: 267–271.
- Patwary, M.U. and van der Meer, J.P. (1983a). Growth experiments on morphological mutants of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). *Can. J. Bot.*, 61: 1654–1659.
- Patwary, M.U. and van der Meer, J.P. (1983b). Genetics of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). IX. Some properties of agars extracted from morphological mutants. *Bot. Mar.*, 26: 295–299.
- Penniman, C.A. and Mathieson, A.C. (1987). Variation in chemical composition of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. *Bot. Mar.*, 30: 525–534.
- Pickering, T.D., Gordon, M.E. and Tong, L.J. (1990). Seasonal growth, density, reproductive phenology and agar quality of *Gracilaria sordida* (Gracilariales, Rhodophyta) at Mokomoko Inlet, New Zealand. *Hydrobiologia*, 204/205: 253–262.
- Pickering, C.M., Huntly, N. and Chesson, P. (1996). Variation found in the growth phenology of desert winter annual plants indicates that temporal environmental variation within a growing season contributes to species coexistence. *Bull. Ecol. Soc. Am.*, 77: 353.
- Pondevida, H.B. and Hurtado-Ponce, A.Q. (1996). Assessment of some agarophytes from the coastal areas of Iloilo, Philippines. II. Seasonal variations in the agar quality of *Gracilaria changii*, *Gracilaria manilaensis* and *Gracilariopsis bailinae* (Gracilariales, Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 39: 123–127.
- Pyke, D.A. (1990). Comparative demography of co-occurring introduced and native tussock grasses: Persistence and potential expansion. *Oecologia*, 82: 537–543.
- Rebello, J., Ohno, M., Ukeda, H. and Sawamura, M. (1997). Agar quality of commercial agarophytes from different geographical origins. I. Physical and rheological properties. *J. Appl. Phycol.*, 8: 517–521.
- Rincones-León, R.E. (1990). Experimental cultivation of an agarophyte alga: *Gracilaria cornea* in the northwest coast of Venezuela. In: E.C. Oliveira and N. Kautsky (eds.), *Cultivation of Seaweeds in Latin America*. Univ. São Paulo, Brazil, pp. 65–67.
- Roleda, M.Y., Montañó, N.E., Ganzón-Fortes, E.T. and Villanueva, R.D. (1997). Acetic acid pretreatment in agar extraction of Philippine *Gelidiella acerosa* (Forsskaal) Feldmann et Hamel (Rhodophyta, Gelidiales). *Bot. Mar.*, 40: 63–69.
- Sasikumar, C., Rao, V.N.R. and Rengasamy, R. (1997). Effect of alkali treatment of red algae *Gracilaria blodgettii* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta) on agar quality. *Ind. J. Mar. Sci.*, 26: 191–194.
- Shibata, M. and Nakashizuka, T. (1995). Seed and seedling demography of four co-occurring *Carpinus* species in a temperate deciduous forest. *Ecology*, 76: 1099–1108.
- Tabatabai, M.A. (1974). Determination of sulphate in water samples. *Sulphur Inst. J.*, 10: 11–13.
- Taylor, W.R. (1960). *Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coast of the Americas*. Univ. Michigan Press, Ann Arbor, 870 pp.
- Whyte, J.N.C., Englar, J.R., Saunders, R.G. and Lindsay, J.C. (1981). Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria* (verrucosa type). *Bot. Mar.*, 24: 493–501.
- Yao, S.S., Xia, Z.Y., En, L.Z. and Qing, L.W. (1984). The yield and properties of agar extracted from different life stages of *Gracilaria verrucosa*. *Hydrobiologia*, 116/117: 551–553.
- Yaphe, W. and Arsenault, G.P. (1965). Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal. Biochem.*, 13: 143–148.
- Yaphe, W. and Duckworth, M. (1972). The relationship between structures and biological properties of agars. *Int. Seaweed Symp.*, 7: 15–22.