



ISSN 0370-3908

REVISTA DE LA ACADEMIA COLOMBIANA de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Academia Colombiana de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales

Vol. 40 · Número 154 · Págs. 1-184 · Enero - Marzo de 2016 · Bogotá - Colombia





ISSN 0370-3908

REVISTA DE LA ACADEMIA COLOMBIANA de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Academia Colombiana de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales

Vol. 40 • Número 154 • Págs. 1-184 • Enero - Marzo de 2016 • Bogotá - Colombia

Comité editorial

Editora en jefe Elizabeth Castañeda
Instituto Nacional de Salud,
Bogotá, Colombia

Editores asociados

Ciencias físicas

Bernardo Gómez
Departamento de Física,
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Rubén Antonio Vargas Zapata
Universidad del Valle,
Cali, Colombia

Pedro Fernández de Córdoba
Universidad Politécnica de Valencia, España

Diógenes Campos Romero
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Román Eduardo Castañeda Sepúlveda
Universidad Nacional, Medellín, Colombia

Carlos Alberto Duque Echeverri
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

María Elena Gómez
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Gabriel Téllez
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Luis Álvaro Morales Aramburo
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Germán A. Pérez Alcázar
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Enrique Vera López
Universidad Politécnica, Tunja, Colombia

Jairo Roa-Rojas
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Hernando Ariza Calderón
Universidad del Quindío,
Armenia, Colombia

Rafael Baquero
Cinvestav, México

Ángela Stella Camacho Beltrán
Departamento de Física,
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Matemáticas

Victor Albis
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Jorge Ivan Cossio Betancur
Universidad Nacional de Colombia,
Medellín, Colombia

Luis Español González
Universidad de la Rioja, España

Jaime Ignacio Lesmes Camacho
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Luis Carlos Arboleda
Universidad del Valle, Cali, Colombia

José R. Quintero
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Ciencias químicas

Sonia Moreno Guaqueta
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Fanor Mondragón
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Moisés Wasserman Lerner
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Myriam Sánchez de Gómez
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Héctor Fabio Zuluaga Corrales
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Fernando Martínez
Universidad Industrial de Santander,
Bucaramanga, Colombia

Betty Lucy López Osorio
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Ciencias naturales

José Luis Fernández Alonso
Real Jardín Botánico, Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Madrid, España

Jaime Cantera
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Gabriel Roldán
Universidad Católica de Oriente,
Rionegro, Antioquia, Colombia

Juan Armando Sánchez Muñoz
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Patricia Chacón de Ulloa
Universidad del Valle, Cali, Colombia

Sandra Baena Garzón
Pontificia Universidad Javeriana,
Bogotá, Colombia

Néstor Hernando Campos Campos
Universidad Nacional de Colombia,
Sede Caribe, Colombia

Jorge Enrique Llorente
Universidad Nacional Autónoma
de México, México

Santiago Melo Gaviria
Universidad de Viena, Austria

Martha Patricia Ramírez Pinilla
Universidad Industrial de Santander,
Bucaramanga, Colombia

Carlos Daniel Cadena Ordoñez
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Santiago Madrián
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Ciencias de la tierra

José Ignacio Martínez
Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Germán Poveda Jaramillo
Universidad Nacional de Colombia,
Medellín, Colombia

Armando Espinosa
Universidad del Quindío,
Armenia, Colombia

Carlos Alberto Vargas
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Fabio Cediél Melo
Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

Jaime Ignacio Vélez Upegui
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Carlos Alberto Jaramillo Muñoz
Smithsonian Tropical Research Institute,
Panamá

Ciencias biomédicas

Luis Fernando García
Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Felipe Guhl
Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Leonardo Puerta Llerena
Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

Gustavo Adolfo Vallejo
Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

Luis Caraballo
Universidad de Cartagena, Colombia

Eduardo Alberto Egea Bermejo
Universidad del Norte,
Barranquilla, Colombia

Ciencias humanas

Rubén Ardila
Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, Colombia

Guillermo Páramo
Universidad Central, Bogotá, Colombia

Comité científico internacional

Ángela María Guzmán
University of Central Florida,
Orlando, Estados Unidos

Antoine M. Cleef
University of Amsterdam, Holanda

Carlos Jiménez
Universidad de La Coruña, España

Gioconda San Blas
Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas
y Naturales, Caracas, Venezuela

José Rubens Pirani
Universidade de São Paulo, Brasil

Wolfgang Gieren
Universidad de Concepción, Chile

Asistencia y coordinación editorial Carolina Acosta

Corrección de estilo y ortografía
Marta Renza

Diagramación
Johanna Morales

Impresión y acabados
Gente Nueva

Reseñada en los siguientes índices nacionales e internacionales:

Actualidad Iberoamericana

Agris

CIRS

Current Mathematical Publications

Dialnet

EBSCO

Historia Mathematica

Index Kewensis

Latindex

Mathematical Reviews

MathSciNet (on line data base)

OCLC (Online Computer Library Center)

PERIODICA

Publindex, Colciencias

RLG

SciELO

Zentralblatt für Mathematik

Zoological Record

Periodicidad: trimestral

Fecha de inicio: 1936

Tamaño: 21,5 x 28 cm

Papel: propalmate de 90 gr.

Solicitud de canje

Esta publicación se ha financiado mediante la transferencia de recursos del Gobierno Nacional a la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

La Academia no es responsable de las opiniones aquí expresadas.

Reservados todos los derechos. El contenido de la presente publicación no puede ser reproducido, ni transmitido por ningún procedimiento electrónico, mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética, ni registrado por ningún sistema de recuperación de información, en ninguna forma, ni por ningún medio, sin la previa autorización por escrito del titular de los derechos de explotación de la misma.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización previa de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.

Impreso en Colombia



Portada

Título: Provincias Unidas de la Nueva Granada. De orden del Gobierno General por el Con. Franciso José de Caldas, Coronel del Cuerpo Nacional de Yngenieros, lámina 13

Fuente número 32 del tomo de "Geografía en la Independencia" de la Colección Bicentenario. La fuente es una lámina que hace parte de un mapa general de las Provincias Unidas de la Nueva Granada en 1815, en particular de la Ciénaga de Santa Marta y el territorio circundante a esta. La fuente da una idea de la importancia de la cartografía en los tiempos de la primera República en la Nueva Granada.

Tomado de: <http://www.colombiaaprende.edu.co/html/mediateca/1607/article-239570.html>



ISSN 0370-3908

REVISTA DE LA ACADEMIA COLOMBIANA de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Academia Colombiana de Ciencias
Exactas, Físicas y Naturales

Vol. 40 • Número 154 • Págs. 1-184 • Enero - Marzo de 2016 • Bogotá - Colombia

Contenido - Contents

Editorial	Caldas, matematización de la naturaleza y sentimiento telúrico Caldas, Mathematization of Nature and Teluric Senses <i>Luis Carlos Arboleda</i> 6
	Heterogeneidad de las células B de memoria IgM humanas Heterogeneity of human IgM memory B cells <i>Juana Ángel</i> 8
Ciencias biomédicas Biomedical Sciences	Papel del TGF-β en la inmunidad contra los rotavirus Role of TGF- β in rotavirus immunity <i>Manuel Antonio Franco-Cortés</i> 18
	Desempeño de un sistema fotovoltaico autónomo frente a condiciones medioambientales de una región en particular Performance of an autonomous photovoltaic system due to environmental conditions of a particular region <i>Edgar Darío Obando-Paredes, Rubiel Vargas-Cañas</i> 27
Ciencias físicas Physical Sciences	Correlación difusiva de la corriente de espín y electrones itinerantes en sistemas magnéticos confinados Diffusive Correlation for Spin Current and Itinerant Electrons in Confined Magnetic Systems <i>Hernán Vivas-Calderón</i> 34
	Corrección topocéntrica de parámetros orbitales obtenidos mediante las integrales de Kepler para asteroides MBA y NEO Topocentric correction of orbital parameters obtained using the Kepler integrals for MBA and NEO asteroids <i>Santiago Jiménez-Villarraga, Edwin Andrés Quintero-Salazar</i> 43
	Análisis comparativo de seis lugares de interés para la ubicación de instrumentación astronómica en Colombia Comparative analysis of six interesting sites for astronomical instrumentation in Colombia <i>Giovanni Pinzón, Danilo González, Aura Ramírez</i> 53

Estudio de la actividad antimicrobiana de películas delgadas de dióxido de titanio modificado con plata	
Antimicrobial activity of silver-modified titanium dioxide thin films	
<i>William Vallejo, Carlos Díaz-Uribe, Karen Navarro, Roger Valle, Jorge William Arboleda, Eduard Romero</i>	69

Estructura estacional del ensamblaje de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en una parcela permanente de bosque seco tropical	
Seasonal structure of the assemblage of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) in a permanent plot of tropical dry forest	
<i>Jorge Ari Noriega, Willinton Barranco, José Hernández, Elkin Hernández, Stephanie Castillo, Daniel Monroy, Héctor García</i>	75

<i>Stenorhynchosaurus munozi</i>, gen. et sp. nov. a new pliosaurid from the Upper Barremian (Lower Cretaceous) of Villa de Leiva, Colombia, South America	
<i>Stenorhynchosaurus munozi</i> , gen. et sp. nov. un pliosaurido nuevo del barremiano superior (Cretácico Inferior) de Villa de Leiva, Colombia, Suramérica	
<i>María Eurídice Páramo-Fonseca, Marcela Gómez-Pérez, Leslie F. Noé, Fernando Etayo-Serna</i>	84

The genus <i>Plagiochila</i> (Marchantiophyta) in Colombia	
El género <i>Plagiochila</i> (Marchantiophyta) en Colombia	
<i>Robbert Gradstein</i>	104

Phytoliths produced by common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), achira (<i>Canna indica</i> L.), and squash (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché), crop species from Boyacá, Colombia	
Fitolitos producidos por el frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), la achira (<i>Canna indica</i> L.) y la calabaza (<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché), especies alimenticias estudiadas en Boyacá, Colombia	
<i>Nataly Poveda-Díaz, María Eugenia Morales-Puentes, Gregory Vaughan</i>	137

Evolutionary history of the group formerly known as protists using a phylogenomics approach	
Historia evolutiva del grupo previamente denominado protistas usando una aproximación filogenómica	
<i>Silvia Restrepo, Juan Enciso, Javier Tabima, Diego Mauricio Riaño-Pachón</i>	147

Microstructural characterization of pore types in unconventional gas reservoirs utilizing FEG-SEM: An example from the Galembó Member of the Cretaceous La Luna Formation, Middle Magdalena Valley Basin (Colombia)	
Caracterización microestructural de tipos de poros en reservorios no convencionales de gas utilizando MEB-FEC: Un ejemplo del Miembro Galembó de la Formación La Luna del Cretáceo, Cuenca del Valle Medio del Magdalena (Colombia)	
<i>Carlos A. Ríos, Oscar M. Castellanos, Efraín Casadiego Q</i>	161

Enfoque y alcance	
Focus and Scope	176

Caldas, matematización de la naturaleza y sentimiento telúrico

Con motivo de conmemorarse en el próximo mes de octubre el bicentenario de la muerte de Francisco José de Caldas (1768-1816), la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales ha venido adelantando desde el año pasado, en conjunto con universidades, bibliotecas, museos y otras instituciones académicas y científicas, distintas actividades tendientes a recordar aspectos de la vida y la obra del personaje histórico que sin duda alguna más contribuyó a la promoción de la cultura científica en los primeros momentos de instauración de nuestra República. A estas actividades se suma ahora la Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales al dedicar a la figura de Caldas el diseño de las portadas de los números publicados en el volumen 40 de este año.

Entre todos sus méritos, la posteridad le ha reconocido a Caldas la capacidad y el talento con los cuales adelantó sus mediciones y cálculos en la Nueva Granada. En este campo Caldas se destacó por aprovechar al máximo libros e instrumentos que él mismo se supo proporcionar después de ingentes dificultades. Humboldt se encuentra entre quienes más contribuyeron a proyectar esta imagen de Caldas. A su llegada a estas regiones de los Andes, Humboldt percibió el genio de Caldas y lo relacionó con el sentimiento telúrico que alentaba la preocupación de los eruditos criollos por el conocimiento del entorno natural y para ello aprovechó las observaciones científicas legadas por los expedicionarios europeos. Estas ideas se encuentran en el más conocido de los elogios de Humboldt a Caldas, en carta enviada a Mutis a su paso por Popayán el 10 de noviembre de 1801 (Hernández de Alba, 1983).

Poco después Caldas tendrá la oportunidad de conocer esta opinión de Humboldt cuando el prusiano le muestra algunos de los apartes de su diario en el encuentro que tienen en Quito. Caldas lo transcribe, lo traduce del original en francés y, por supuesto, lo divulga ampliamente a través de su red de amigos y corresponsales. Este es el texto según la versión francesa transcrita por el mismo Caldas (Carta a Mutis del 6 de abril de 1802, ver: (Caldas, 1978); comparar con la traducción castellana en p.151):

“Este Caldas es un prodigio en astronomía. Nacido en las tinieblas de Popayán y sin haber ido nunca más allá de Santafé, ha construido barómetros, un sector, un cuarto de ciclo en madera. Mide meridianos y latitudes mediante gnomones de 12 a 15 pies. ¡Qué no habría hecho este joven hombre en un país con más medios, en donde no hay que aprender todo por sí mismo! Las obras de Bouguer y de La Condamine han tenido una influencia singular sobre los americanos de Quito a Popayán. El territorio (sol) de este país ha llegado a ser clásico y podría decirse que esto tiene que ver con una característica telúrica (sol natal).”

En este texto de legitimación del talento científico de Caldas como miembro destacado de la élite científica criolla, Humboldt señala dos características de la práctica de esta misma élite a comienzos del siglo XIX. En primer, lugar la naturaleza peculiar de la empresa científica en las periferias dado su alejamiento de los centros metropolitanos. Si ser autodidacta era el recurso para superar las precariedades de la formación en las instituciones educativas del estado colonial, en todo caso su peso predominante en las prácticas científicas locales las ponía en riesgo de separarse de las redes internacionales de investigación y sanción del conocimiento. La *soledad del erudito criollo* hacía más meritorio su talento, pero al mismo tiempo era un obstáculo para desplegar a fondo la creatividad de manera razonable. La invención de Caldas del hipsómetro es, tal vez, el ejemplo más representativo. El modelo lineal empleado por Caldas para calcular las alturas de los lugares por medio de las correlaciones entre medidas del termómetro y del barómetro era anacrónico con respecto al modelo exponencial europeo (básicamente de Saussure y De Luc) que Humboldt ya conocía cuando Caldas le explicó el suyo en el encuentro de Quito en noviembre de 1801 (Arboleda, 2007).

La segunda característica del criollismo científico, según Humboldt, era un cierto *optimismo telúrico* que movía a los criollos a encontrar razones propias para la realización del saber en las condiciones del espacio geo-cultural local. En el contexto de la cita anterior, Humboldt se refiere a la gran influencia sobre “los americanos de Quito a Popayán” de las obras de Bouguer y La Condamine con los resultados de la expedición al Ecuador para medir un grado de meridiano y validar la teoría newtoniana de la figura de la tierra. Humboldt estaba impresionado por la manera como los criollos adecuaban e incorporaban las observaciones científicas de los misioneros europeos en la selección e investigación de problemas sobre el territorio de la Nueva Granada. En su paso por Popayán (si no con anterioridad en sus charlas con Mutis en Santafé), Humboldt recibió testimonios sobre las motivaciones, modalidades y resultados de los trabajos astronómicos de Caldas, en particular la fundamentación de sus actividades de reconocimiento científico del territorio en dos obras con las que estaba a todas luces familiarizado y a las cuales confería mucha autoridad y confianza: las *Observaciones astronómicas* (Juan & Ulloa, 1748), y la *Figure de la Terre* (Bouguer, 1744). Sus lecturas de las *Observaciones* fueron decisivas, por ejemplo, para que Caldas pudiera construir el cuadrante de círculo con el cual identificó el anillo de Saturno, los satélites de Júpiter y finalmente determinó la posición de Popayán.

En otro elogio de Caldas incluido en su *Diario* de 1810 (citado en: (Bateman, 1978; p. 85)), Humboldt retoma estos testimonios y destaca que el sentimiento telúrico o pulsión de conocimiento basado en la explicación de las propiedades del espacio geográfico local fue un motor de creatividad en Caldas. Ello le permitió, incluso, ir más allá de las descripciones

incompletas de las obras de este género que se esmeró en consultar. Refiere Humboldt la admirable competencia de Caldas en la apropiación del estado del arte en el conocimiento astronómico para la determinación de la latitud y longitud de las alturas de ciertos lugares de la Nueva Granada empleando para ello instrumentos construidos por él mismo:

“El señor Caldas, de quien no se elogiará bastante el celo por el progreso de la geografía (...) observó la latitud de Gigante con instrumentos construidos por él mismo, a saber un cuarto de círculo de 16 pulgadas, y un gnomon de cinco pies... Para fijar la longitud, el señor Caldas observó con cuidado extremo, el eclipse de luna del 3 de diciembre de 1797, se sirvió para esto de un anteojo acromático de treinta pulgadas y de un buen reloj.”

Humboldt hace mención de la circunstancia de que Caldas haya vinculado, con las mediciones de Gigante, la observación del eclipse total de luna del 3 al 4 de diciembre de 1797, un acontecimiento científico al cual los astrónomos europeos le habían conferido una especial importancia. Pero en las condiciones locales, esta observación tenía una significación adicional en términos geográficos, socioeconómicos y en la propia posición profesional de Caldas. En lo geográfico, era un medio para establecer la longitud de Gigante y poder determinar, a partir de allí, otras latitudes más importantes por medio de triangulaciones. Los cálculos de Gigante tenían igualmente una connotación social: hacían parte del trabajo de levantamiento de la carta de la provincia de Timaná, con el cual debía, finalmente, resolverse el contencioso de límites entre los cabildos de La Plata y Timaná. Era claro para Caldas y los cabildantes que tales disputas fronterizas no podían zanjarse consultando el género ya anacrónico de mapas descriptivos como el elaborado por Piedrahita en el siglo XVII.

En cuanto al interés personal de estas mediciones, hay que recordar que para Caldas y otros miembros de la élite de científicos criollos, la apropiación social del conocimiento astronómico y geográfico apuntaban al mismo tiempo a la búsqueda de legitimidad con respecto al Estado y a apuntalar sus roles en la categoría socio profesional emergente. El contrato para elaborar este mapa le brindaba la primera oportunidad de vender sus servicios profesionales como geógrafo a las administraciones locales, en una carrera que iba a conducirlo, a la muerte de Mutis, a ocupar la dirección del Observatorio Astronómico de Santafé. La figura de Caldas, el astrónomo cuyos méritos intelectuales y profesionales fueron elogiados por Humboldt, no podría comprenderse en su real dimensión histórica, si no se tuvieran en cuenta el propósito que caracterizó su práctica científica: ser útil en la ciencia y con la ciencia al doble proyecto social de la élite criolla (Arboleda, 1994). Esta idea se encuentra presente en varios de sus escritos. Por ejemplo, en el siguiente extracto del prefacio del almanaque de 1811, año I de la independencia de la Nueva Granada (Caldas, 1996):

“Observar el cielo por observarlo sería una ocupación honesta, pero no pasaría de ser una curiosidad estéril que llenase los momentos del hombre ocioso y acomodado. Este observador sería inútil, y la Patria lo miraría como un consumidor de quien no esperaba nada. Nosotros no queremos representar este papel en la sociedad: queremos que nuestros trabajos astronómicos mejoren nuestra geografía, nuestros caminos y nuestro comercio.”

Bibliografía

- Arboleda, L.C.** (1994). Ciencia y nacionalismo en la Nueva Granada en los albores de la revolución de independencia. En L. C. Arboleda & S. Díaz-Piedrahita (Eds.), Francisco Joseph de Caldas y Thenorio. 1768-1816 (pp. 139-145). Bogotá: Molinos-Velásquez editores.
- Arboleda, L. C.** (2007). Caldas y la Matematización de la Naturaleza. La querrela con Humboldt sobre el hipsómetro. En A. Escovar & M. S. Reyna (Eds.), Popayán: 470 años de historia y patrimonio (pp. 119-135). Bogotá: Letrarte Editores.
- Bateman, A.** (1978). Francisco José de Caldas. El hombre y el sabio. Su vida-Su obra. Cali: Biblioteca Banco Popular.
- Bouguer, P.** (1749). *La figure de la terre, déterminée par les observations de Messieurs Bouguer & de la Condamine*. Paris: Jombert.
- Caldas, F. J.** (1942). Semanario del Nuevo Reino de Granada. 3 vols. Biblioteca Popular de Cultura Colombiana. Bogotá: editorial Kelly.
- Caldas, F.J.** (1978). Cartas de Caldas. Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Caldas, F. J.** (1996). Obras completas de Francisco José de Caldas. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Hernández de Alba, G.** (1983). Archivo epistolar del sabio naturalista José Celestino Mutis. Bogotá: Instituto de Cultura Hispánica.
- Humboldt, A. von** (1982). Alexander von Humboldt en Colombia. Extractos de sus diarios. *Auswahl aus seinen Tagebuchern*. Edición bilingüe. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – Academia de Ciencias de la República Democrática Alemana. Bogotá: Publicismo ediciones.
- Juan J. & Ulloa A. de** (1748). Observaciones astronómicas y físicas hechas por orden de su magestad en los reynos del Perú de las cuales se deduce la figura y magnitud de la tierra y se aplica a la navegación. Madrid: Juan de Zúñiga.

Luis Carlos Arboleda

Coordinador

Grupo de Historia y Filosofía de la Ciencia

Académico correspondiente

Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Heterogeneidad de las células B de memoria IgM humanas

Juana Ángel

Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Resumen

El origen, la función y el repertorio de las células B de memoria IgM humanas (caracterizadas por ser positivas para CD27 IgM e IgD) son controvertidos, y se ha propuesto que esta población es heterogénea. Aunque algunas veces contradictorias, las evidencias actuales apuntan a la existencia de por lo menos dos subpoblaciones de dichas células en sangre: por un lado, células B circulantes de la zona marginal del bazo, con algunas características similares a las células innatas y probablemente responsables de las respuestas de activación independiente de los linfocitos T, que protegen contra bacterias encapsuladas como *Streptococcus* sp, y, por otro lado, células B con indicios de haber pasado por centros germinales que se asemejan a las células B de la respuesta adaptativa, y que serían un reservorio de células B de larga vida a partir del cual se reconstituirían continuamente las células B de memoria conmutadas. Aunque se ha propuesto que la expresión diferencial de IgM e IgD en las células B de memoria IgM serviría para distinguir estas dos subpoblaciones de células B, se requieren más estudios fenotípicos y funcionales para sustentar esta clasificación.

Palabras clave: células B de memoria, IgM, respuesta B innata, respuesta B adaptativa.

Heterogeneity of human IgM memory B cells

Abstract

The origin, function and repertoire of human IgM memory B cells (IgM mBc, characterized by the expression of CD27⁺ IgM⁺ IgD⁺) are controversial, and it has been proposed that this population is heterogeneous. Although contradictory in some cases, available evidence suggests that at least two subpopulations of IgM mBc circulate in blood. On the one hand, circulating B cells from the marginal zone of the spleen with innate-like characteristics, probably responsible for protective responses against encapsulated bacteria like *Streptococcus* sp. On the other hand, B cells with markers that suggest they have undergone transit in germinal centers, typical of adaptive immunity, and that may represent a reservoir of long-lived mBc capable of reconstituting switched mBc. It has been proposed that the differential expression of IgM and IgD on circulating IgM mBc may be useful to distinguish these subpopulations, but more phenotypic and functional studies are needed for this purpose.

Key words: Memory B cells, IgM, innate B cell response, adaptive B cell response.

Introducción

Ante una infección, las células B vírgenes (llamadas células B2 o linfocitos B2) se diferencian como células B de memoria (cBm) o en células secretoras de anticuerpos específicas del patógeno con ayuda de los linfocitos T (respuesta inmune dependiente de T). Las cBm que se generan durante esta respuesta adaptativa tienen varias características en común: larga vida, proliferación rápida y robusta en respuesta al antígeno, gran sensibilidad a bajas dosis de antígeno y diferenciación terminal rápida en células que secretan anticuerpos (Takemori, *et al.*, 2014). Sin embargo, una fracción de las células B, catalogadas como células B innatas, expresan receptores B que reconocen múltiples determinantes microbianos altamente conservados, se localizan en sitios anatómicos estratégicos que están en contacto con antígenos microbianos (Weller, *et al.*, 2004), responden contra ellos en forma más rápida

e independientemente de los linfocitos T (Cerutti, *et al.*, 2013), y secretan anticuerpos naturales. Los anticuerpos naturales son IgM (circulantes y del bazo) o IgA (mucosas), y su estudio se inició en los ratones libres de gérmenes que tienen anticuerpos en ausencia de microorganismos, por lo que se propuso que su producción debía estar regulada de manera diferente a la de los anticuerpos específicos de microorganismos (Baumgarth, 2011). En ratones, tanto las células B1 (o linfocitos B1) como las células B de la zona marginal (cBZM) del bazo han sido implicadas en este tipo de respuestas innatas. En contraste, en los humanos las células B innatas son motivo de controversia, puesto que las células B1 como tal están mal caracterizadas

Correspondencia:

Juana Ángel, jangel@javeriana.edu.co

Recibido: 25 de octubre de 2015

Aceptado: 1 de febrero de 2016

(Baumgarth, 2011; Reynaud & Weill, 2012; Rothstein & Quach, 2015), y las cBZM tienen algunas diferencias con las encontradas en los ratones. No obstante, Cerutti, et al. (2013) han propuesto que las cBZM humanas funcionan de forma similar a las innatas, o que sirven de puente entre la respuesta innata y la adquirida, en tanto que Weller, et al. (2004) han propuesto que constituyen la primera línea de defensa contra los microorganismos y que podrían secretar anticuerpos naturales.

Los conceptos en el campo de estudio de las cBm han evolucionado en la última década (Jackson, et al., 2008; Mroczek, et al., 2014). Comúnmente se ha aceptado que las cBm se originan con ayuda de los linfocitos T foliculares en los centros germinales, en los cuales se llevan a cabo cambios moleculares con el fin de optimizar la afinidad de las inmunoglobulinas por el antígeno. Estos cambios son el resultado de la activación de una enzima llamada desaminasa de citidina inducida por activación (*activation-induced cytidine deaminase*, AID), la cual participa en la generación de las hipermutaciones somáticas en las porciones variables del gen de las inmunoglobulinas (IgV) y en la conmutación de las inmunoglobulinas mismas. El concepto aceptado era que estos dos fenómenos ocurrían de forma secuencial (Pascual, et al., 1994) y solamente en el centro germinal, donde se encontraba la enzima activada. Actualmente se reconoce que existen cBm que probablemente no han pasado por el centro germinal y que no hacen conmutación de isotipo (Takemori, et al., 2014).

Teniendo en cuenta la expresión de CD27, IgD e IgM se han tipificado claramente cuatro subpoblaciones principales de cBm, (Lanzavecchia & Sallusto, 2009; Mroczek, et al., 2014; Wirths & Lanzavecchia, 2005) (Figura 1): 1) células CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻ (cBm conmutadas, IgG⁺, IgA⁺ o IgE⁺), que representan aproximadamente 20 % de las células B circulantes; 2) células CD27⁺ IgM⁺ IgD⁺ (cBm IgM), que constituyen aproximadamente 15 % de las células B circulantes; 3) células CD27⁺ IgM⁺ IgD⁻ (cBm solo IgM), que conforman aproximadamente 5 % de las células B circulantes, y 4) células CD27⁻ IgM⁻ IgD⁻ (cBm CD27⁻), que suman entre 1 y 5 % de las células B circulantes. En otros estudios se continuó el proceso de caracterización fina de estas células y actualmente se reconocen seis (Berkowska, et al., 2011b) o más poblaciones de cBm, porque se incluyen las poblaciones solo IgD⁺ (CD27⁺ IgM⁻ IgD⁺) (Chen & Cerutti, 2010) y se han encontrado diferencias para las células CD27⁺ IgG⁺, CD27⁺ IgA⁺, CD27⁻ IgG⁺ y CD27⁻ IgA⁺, particularmente en cuanto al número de veces que han pasado por el centro germinal y al número de mutaciones en las porciones génicas que codifican para IgV (Berkowska, et al., 2011a).

De particular interés es la población de cBm IgM circulante en humanos, pues los resultados de varios estudios sugieren que son una población heterogénea compuesta, probablemente, por al menos una población de células B con función adaptativa y con indicios de haber pasado

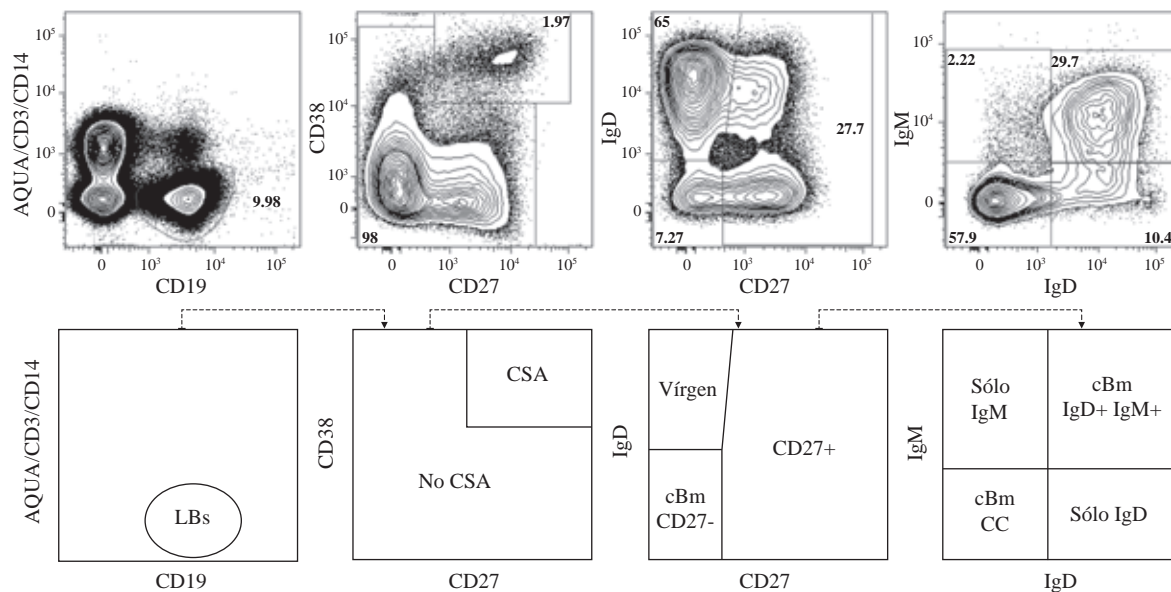


Figura 1. Estrategia de identificación de las células B humanas circulantes en adultos mediante citometría de flujo. Células mononucleares de sangre periférica purificadas con gradiente de densidad teñidas con anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos y analizadas mediante citometría de flujo. Las células B se caracterizan por ser CD19⁺ CD3⁻ CD14⁻; las células secretoras de anticuerpos (CSA CD38⁺⁺ CD27⁺⁺) se excluyeron del análisis; con la expresión de IgD y CD27 se determinan las células B vírgenes (CD27⁻ IgD⁺), las cBm CD27⁻ (CD27⁻ IgD⁻) y las cBm CD27⁺. Al analizar la expresión de IgM e IgD, únicamente en las CD27⁺, se identificaron las cBm solo IgM (CD27⁺ IgM⁺ IgD⁻), las cBm IgM (CD27⁺ IgM⁺ IgD⁺), las cBm solo IgD (CD27⁺ IgM⁻ IgD⁺) y las cBm conmutadas (CC, CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻). Los números en los recuadros representan los porcentajes de las poblaciones en cada ventana.

por el centro germinal (cBm IgM), y otra población que correspondería a células B de la zona marginal (cBZM) que circulan en sangre (**Berkowska, et al.**, 2011a; **Della Valle et al.**, 2014; **Martin, et al.**, 2015; **Reynaud, et al.**, 2012). Es importante diferenciar estas poblaciones tan disímiles no solo desde el punto de vista fundamental, para entender la ontogenia y la función de las células B, sino porque en infecciones como la de rotavirus se podrían correlacionar diferencialmente con la protección después de la infección natural o la vacunación (**Franco & Greenberg**, 2013).

Las cBm IgM humanas y las controversias que suscitan

El llegar a la conclusión de que las cBm IgM son una población heterogénea ha sido un proceso largo y complejo que se inició con su clasificación como cBm. Para la definición de cBm se han usado varias estrategias: inicialmente se llamó así a las células IgD⁺ de larga vida, lo cual implicaba que habían sufrido conmutación de isotipo. Posteriormente, se observó que la expresión de CD27 en la superficie se correlacionaba con la capacidad de las células B de secretar inmunoglobulinas después de la estimulación policlonal (**Agematsu, et al.**, 1997; **Maurer, et al.**, 1992). Debido a la detección de células CD27⁺ IgM⁺ capaces de secretar IgM bajo dichas condiciones, estos autores introdujeron, por primera vez, la noción de cBm IgM, la cual fue oficialmente propuesta con la identificación de hipermutaciones somáticas en los análisis moleculares de las porciones génicas que codifican para el IgV de células CD27⁺ IgM⁺ (**Klein, et al.**, 1997; **Klein, et al.**, 1998; **Tangye, et al.**, 1998). Además de la presencia de hipermutaciones somáticas, otros argumentos apoyan la noción de que las cBm IgM pertenecen a las subpoblaciones de memoria: 1) son raras en los niños, pero se acumulan con la edad (**Agematsu, et al.**, 1997); 2) tienen larga vida (**Richards, et al.**, 2000); 3) al igual que las cBm conmutadas, se diferencian como células secretoras de anticuerpos ante ciertos estímulos policlonales (**Agematsu, et al.**, 1997; **Himmelmann, et al.**, 2001; **Shi, et al.**, 2003); 4) responden *in vitro* a estímulos normalmente derivados de linfocitos T de forma parecida a las cBm conmutadas y distinta a las células B vírgenes (**Tangye, et al.**, 2003); 5) presentan mutaciones en el gen de la proteína 6 del linfoma de células B (Bcl6), lo que se considera una marca genética del paso por el centro germinal (**Della Valle, et al.**, 2014; **Seifert & Kuppers**, 2009), y 6) los análisis de los transcriptomas de cBm IgM, cBm con expresión solo de IgM y cBm conmutadas muestran que todas comparten un patrón de expresión génica global que refleja su función de células de memoria (aumento de la capacidad de respuesta al estímulo, del metabolismo, la proliferación y la diferenciación en plasmablastos), y que es diferente del patrón de las células B vírgenes (**Seifert, et al.**, 2015).

Paralelamente, varios hallazgos sugieren que algunas cBm IgM también se generan por fuera de los centros germinales; los principales son: 1) se pueden encontrar niveles bajos

de cBm IgM en humanos con inmunodeficiencias de CD40 o CD40L, en la cuales se considera que no hay formación de centros germinales (**Agematsu, et al.**, 1998; **Berkowska, et al.**, 2011a; **Weller, et al.**, 2004; **Weller, et al.**, 2001); 2) la AID también se ha identificado en células B extrafoliculares, lo que sugiere que el paso por el centro germinal no es una condición absoluta para la generación de hipermutaciones somáticas (**Cattoretti, et al.**, 2006). Teniendo en cuenta algunas de estas evidencias, otros autores propusieron que las cBm IgM humanas son cBZM circulantes que poseen un repertorio de inmunoglobulinas diversificado por hipermutación generado en ausencia de una respuesta inmunitaria ante un antígeno, como ocurre en pollos, ovejas y conejos (**Weller, et al.**, 2004; **Weller, et al.**, 2008). Este planteamiento se ha visto sustentado por el hallazgo de la diversificación por hipermutación de los genes de inmunoglobulina en cBZM del bazo de niños antes del desarrollo de respuestas independientes de T funcionales (**Bagnara, et al.**, 2015).

Durante varios años los hallazgos descritos parecieron contradictorios, pero recientemente diversos autores han propuesto que la población de cBm IgM circulante en humanos es una población heterogénea (**Della Valle, et al.**, 2014; **Martin, et al.**, 2015; **Reynaud, et al.**, 2012). Existen por lo menos dos subpoblaciones: una de cBZM circulantes (**Weller, et al.**, 2004), que como se dijo anteriormente tiene funciones similares a las innatas, y otra de cBm IgM con función adaptativa; ambas subpoblaciones pueden participar en respuestas inmunes dependientes e independientes de T (**Cerutti, et al.**, 2013). Este aporte reciente dificulta mucho la interpretación de la mayoría de los estudios publicados hasta ahora, en los cuales se asumía que las cBm IgM humanas constituían una población homogénea.

Las funciones de las cBm IgM

Los estudios más detallados en ratones indican que las cBm IgM poseen un componente independiente de T y uno dependiente y que podrían ser muy relevantes en el funcionamiento de las células B de memoria (**Dogan, et al.**, 2009; **Kaji, et al.**, 2012; **Link, et al.**, 2012; **Pape, et al.**, 2011; **Taylor, et al.**, 2012), porque se generan durante la respuesta inmunitaria primaria y durante la respuesta secundaria pueden reiniciar una reacción de centro germinal, dando origen a nuevas células IgG y posibilitando, así, el reaprovisionamiento del compartimiento de cBm IgM y de cBm IgG a partir de precursores que hayan tenido contacto previo con el antígeno (**Dogan, et al.**, 2009). De forma similar, en un modelo de transferencia celular en ratones se mostró que las cBm IgM se producen después de la inmunización con un antígeno dependiente de T y cuando los títulos en suero de IgG específica de dicho antígeno han decaído las cBm IgM regresan al centro germinal para generar nuevas células secretoras de anticuerpos IgG (**Pape, et al.**, 2011). Estos estudios señalan la existencia

de múltiples “rondas” de respuestas de cBm en los ratones y un probable rol de la cBm IgM como reservorio para la generación de cBm conmutadas.

La funcionalidad de las células B se demostró en un modelo murino de infección bacteriana que indujo una numerosa población de cBm IgM localizada en la zona marginal del bazo y con características de células B de la respuesta adaptativa. Al eliminar *in vivo* estas cBm IgM disminuyeron las respuestas de memoria IgG ante un reto, lo cual demuestra que dicha población es importante en la memoria humoral y que las cBm IgM pueden cambiar de isotipo ante el reencuentro con el antígeno (Yates, *et al.*, 2013).

Debido a la dificultad para estudiar ciertas repuestas inmunitarias en humanos, se ha recurrido a los modelos de ratones “humanizados”, en los cuales se trasplantan células inmunitarias humanas a ratones inmunodeficientes SCID/SCID y se los inmuniza con diferentes antígenos. Con uno de dichos modelos, se observó que cuando los ratones recibieron el trasplante de cBm IgM y fueron inmunizados con *Streptococcus pneumoniae* inactivado o con vacuna contra el neumococo, hubo incrementos en la IgM y en la IgG específicas de antígenos independientes de T, como el lipopolisacárido, o dependientes de T, como las proteínas de la bacteria (Moens, *et al.*, 2008). Con este mismo modelo, se demostró que las cBm IgM humanas trasplantadas conmutaron a IgG y disminuyeron la antigenemia y viremia por rotavirus en los ratones (Narváez, *et al.*, 2012).

En humanos las cBm IgM tienen un papel importante en la protección contra antígenos independientes de T de bacterias encapsuladas como *S. pneumoniae* (Capolunghi, *et al.*, 2008; Khaskheli, *et al.*, 2012; Krutzmann, *et al.*, 2003). Se ha reportado una correlación entre la ausencia de cBm IgM y la falta de respuesta inmunitaria a bacterias encapsuladas, no solo en pacientes con extirpación del bazo sino también con bazos intactos (Rosado, *et al.*, 2013). También se ha encontrado que la frecuencia de las cBm IgM disminuye con la edad y esto iría de la mano con el incremento en el riesgo de morbilidad y mortalidad debidas a neumonía por neumococo en los ancianos (Shi, *et al.*, 2005). No obstante, en otro estudio no se observó dicha disminución (Colonna-Romano, *et al.*, 2009).

Recientemente se reportaron cBm IgM humanas específicas de toxoide tetánico y del antígeno eritrocítico RhD con signos de paso por el centro germinal (genes Bcl-6 mutados) (Della Valle, *et al.*, 2014), lo que apoya la noción de que existen “rondas” de cBm en humanos y que las cBm IgM tienen larga vida y pueden reconformar el grupo de cBm conmutadas después de exposiciones repetidas al antígeno, como se ha descrito en ratones.

Hasta donde se sabe, existe poca evidencia directa del incremento de las cBm IgM en el curso de una infección humana (Kendall, *et al.*, 2010). Estos autores estudiaron

adultos con infección por *Vibrio cholerae* O1 y estimularon de forma policlonal células mononucleares de sangre periférica para inducir la transformación de las diferentes subpoblaciones de cBm en células secretoras de anticuerpos. En los sobrenadantes de cultivo encontraron un aumento significativo de las IgM específicas de un antígeno independiente de T, un lipopolisacárido, y un antígeno dependiente de T, la subunidad B de la toxina colérica, después de 30 días de infección (Kendall, *et al.*, 2010). Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales la IgM detectada puede provenir de cBm IgM o de cBm solo IgM.

En nuestro grupo de investigación se han venido estudiando las células B específicas de rotavirus (células B-RV) desde hace varios años con el ánimo de entender la respuesta de células B-RV y de proponer nuevos marcadores de protección después de la vacunación. Se han detectado frecuencias bajas de cBm IgM específicas de RV circulantes en lactantes que carecían de RV-IgA y que, por lo tanto, era improbable que hubieran sido infectados por el virus (Rojas, *et al.*, 2007). Esto sugiere que se desarrollaron en ausencia de estimulación antigénica y que, posiblemente, hacían parte de las cBm circulantes. En adultos sanos, probablemente infectados por RV en más de una ocasión, se evidenció que las células B-RV circulantes estaban enriquecidas en las cBm IgM (Herrera, *et al.*, 2014; Rojas, *et al.*, 2008). La antigenemia y la viremia podrían explicar el que las células B-RV estuvieran enriquecidas en cBm IgM originadas en el bazo, pero queda por establecer cuál sería el papel de las células semejantes a las cBm identificadas en el intestino de humanos (Spencer, *et al.*, 1985).

Al analizar las células IgM que unen el antígeno de RV se observó que las cBm IgM se podían subdividir con base en la expresión relativa de cada una de las inmunoglobulinas en dos poblaciones: las que expresaban altos niveles de IgM y bajos niveles de IgD (IgM⁺⁺ IgD⁺) y las que expresaban bajos niveles de IgM y altos niveles de IgD (IgM⁺ IgD⁺⁺) (Narváez, *et al.*, 2012). Recientemente se demostró que, comparadas con las cBm totales, las células B-RV estaban enriquecidas en todas las poblaciones de cBm IgM: solo IgM, IgM⁺⁺ IgD⁺ e IgM⁺ IgD⁺⁺ (Herrera, *et al.*, 2014). Además, se observó que al estimular *in vitro* la población de cBm IgM, aquellas células específicas de RV hicieron conmutación de isotipo en menor grado que la población total homóloga (Narváez, *et al.*, 2012). Por último, las inmunoglobulinas con componente secretor específicas de RV presentes en plasma de niños vacunados con RIX 4414, un precursor de la vacuna Rotarix®, se correlacionaron con la protección (Herrera, *et al.*, 2013). Parte de estas inmunoglobulinas con componente secretor son probablemente IgM (Herrera, *et al.*, 2013), lo que sugiere que las cBm IgM cumplirían un papel importante en la protección frente a RV. Faltaría por establecer si alguna de estas subpoblaciones es más relevante para la protección.

Características de las células B de la zona marginal

Las células B de la zona marginal (cBZM) del bazo de roedores se consideran un linaje separado que se diferencia de las células B transicionales T2 en precursores de zona marginal, entre otras razones por la influencia de NOTCH2, y que continúan la diferenciación hacia cBZM (Pillai & Cariappa, 2009). La gran mayoría son vírgenes, tienen muy pocas mutaciones en sus genes de inmunoglobulinas (Hendricks, *et al.*, 2011), están en un estado de pre-activación (Martin & Kearney, 2002), desarrollan una respuesta rápida de IgM e IgG3 contra patógenos independientes de T que ingresan al compartimento sanguíneo (Reynaud, *et al.*, 2012), y se las cataloga como células B de la respuesta inmunitaria innata. No obstante, son funcionalmente versátiles, pues responden a múltiples retos microbianos que incluyen también antígenos dependientes de T como las proteínas (Cerutti, *et al.*, 2013). En contraste, además de las que se encuentran en el bazo de los humanos, existen equivalentes de cBZM en el área subepitelial de las placas de Peyer (Spencer, *et al.*, 1985), en la pared interior de los senos subcapsulares de los nódulos linfáticos y en el epitelio de las criptas de las amígdalas (Cerutti, *et al.*, 2013), así como circulantes en sangre (Weller, *et al.*, 2004).

Las cBZM de bazos humanos comparten ciertas características con las cBZM de ratones: la localización en la periferia de los folículos B y el fenotipo: IgM⁺ IgD⁺ CD21⁺ CD23⁻ CD1c⁺ (Bagnara, *et al.*, 2015; Ettinger, *et al.*, 2007; Weller, *et al.*, 2004), pero tienen un receptor de inmunoglobulinas mutado (Dunn-Walters, *et al.*, 1995; Reynaud, *et al.*, 2012) y diversificado por hipermutación durante la ontogenia (Weller, *et al.*, 2004; Weller, *et al.*, 2008). En efecto, se han detectado células con fenotipo de cBm IgM con hipermutaciones somáticas durante el desarrollo fetal humano (Scheeren, *et al.*, 2008). En cuanto al origen de la diversificación por hipermutación de los genes de las inmunoglobulinas de cBZM, hay datos contradictorios sobre el papel de los neutrófilos en su inducción (Nagelkerke, *et al.*, 2014; Puga, *et al.*, 2012). En dos estudios, uno en ratones (Wesemann, *et al.*, 2013) y otro en humanos (Vossenkamper, *et al.*, 2013), se ha sugerido que las células B pueden desarrollarse en la lámina propia del intestino, bajo la influencia de los microorganismos intestinales, lo que indica que este podría ser un sitio de diversificación del repertorio de las cBZM.

Recientemente se reportó la detección de precursores de cBZM en los bazos de niños (Descatoire, *et al.*, 2014). Estos precursores se diferencian en células semejantes a cBZM ante el estímulo por la vía NOTCH2 y su ligando, DLL1. Además, el transcriptoma de cBZM difiere del de las células B vírgenes del bazo en la expresión génica de por lo menos 1.855 genes, mientras que los precursores parecen compartir la expresión común a las dos poblaciones.

En un estudio reciente se analizaron muestras pareadas de sangre y bazo de tres individuos y se compararon las secuencias V_HDJ_H de las cBZM del bazo y las cBm IgM circulantes (Bagnara, *et al.*, 2015). Los autores evidenciaron, como era de esperarse, un alto porcentaje de clones compartidos entre estas dos poblaciones. Más aún, encontraron que en la circulación se localiza solamente un subgrupo relacionado con las cBZM de bazo y que, por lo tanto, no todas las cBZM de bazo vuelven a circular de igual forma (Bagnara, *et al.*, 2015). Este hallazgo deja abierta la pregunta sobre el tipo de selección que se ejerce sobre las cBZM del bazo para que vuelvan a circular.

Cuando se contrastaron los transcriptomas de las cBm IgM⁺ humanas de sangre y cBZM del bazo se encontró que se asemejaban, pero que eran muy diferentes al de las cBm conmutadas (Descatoire, *et al.*, 2014). De los 50 genes con expresión más diferenciada entre las cBZM y las cBm conmutadas de bazo, solamente 35 también lo eran con respecto a las cBm IgM de sangre y las cBm conmutadas en sangre. Estos resultados indican que, aunque hay una gran homología entre las cBZM de bazo y las cBm IgM de sangre, existen diferencias entre ellas que podrían explicarse por la heterogeneidad de la población sanguínea y se deberían, en parte, a la presencia de cBm IgM de la respuesta adaptativa.

Comparadas con sus contrapartes conmutadas, los transcriptomas de las cBZM de bazo y las cBm IgM de sangre tienen una regulación positiva marcada del factor de transcripción SOX7 y una regulación negativa del gen *COCH* y de los factores de transcripción TOX y HOPX (Descatoire, *et al.*, 2014). Todas estas moléculas tienen funciones centrales en el sistema inmunitario; SOX7, particularmente, es un factor de transcripción con un papel importante en el desarrollo de los precursores de células sanguíneas (Seguin, *et al.*, 2008) y es el factor de transcripción que mejor discrimina las cBm conmutadas de las cBZM, por lo que se ha propuesto como el factor de transcripción clave en su desarrollo (Descatoire, *et al.*, 2014).

Por último, es importante resaltar que pacientes con el síndrome de Alagille, que tienen una deficiencia de NOTCH2, presentan una reducción en el número de cBm IgM, pero mantienen niveles de cBm conmutadas normales. Sin embargo, en la sangre de los pacientes permanece aproximadamente una tercera parte de las cBm IgM presentes en individuos sanos, lo que respalda la noción de la heterogeneidad de esta población (Descatoire, *et al.*, 2014).

Características de la subpoblación de cBm IgM dependiente de centro germinal

La existencia de un componente de cBm IgM dependiente de centro germinal en el seno de la población de cBm IgM humanas está respaldada por varios hallazgos. En dos estudios (Seifert & Kupperts, 2009; Wu, *et al.*, 2010) se compararon los patrones de mutaciones de los genes de las

inmunoglobulinas de las cBm IgM (sin incluir las cBm solo IgM) y de las cBm conmutadas circulantes en sangre: en un caso los resultados de la amplificación específica de CDR3 indicaron que ambas poblaciones se generaban en el centro germinal y se encontraron evidencias de que el desarrollo puede ser secuencial y que inicialmente se generan cBm IgM, las cuales pueden salir tempranamente del centro germinal o permanecer en él y generar cBm conmutadas; por lo tanto, la población de cBm IgM y la de cBm conmutadas estarían relacionadas (Seifert & Kupperts, 2009). En el otro caso, por el contrario, los patrones de mutaciones de los genes de las inmunoglobulinas de ambas poblaciones fueron muy distintos, lo que sugiere que en la mayoría de los casos las cBm IgM se desarrollan en respuesta a estímulos distintos a los que generan las cBm conmutadas (Wu, *et al.*, 2010), aunque hay que tener en cuenta que esta última aproximación metodológica es menos informativa que la amplificación de los CDR3. En el primero de estos trabajos también se identificaron mutaciones en el gen *Bcl6* en las cBm IgM humanas y, por lo tanto, se vio respaldada la noción de que algunas de estas son emigrantes tempranas del centro germinal de una respuesta clásica dependiente de linfocitos T (Seifert & Kupperts, 2009).

Los análisis de la capacidad de migración *in vitro* muestran que, comparadas con las cBm conmutadas, las cBm IgM tienen mayor capacidad de migración al folículo B por presentar mayor sensibilidad a la quimiotaxis dependiente de CXCR5 y CCR7, expresar moléculas de adhesión celular C (JAM-C) y tener mayor capacidad de diferenciarse en el centro germinal debido a su incrementada inducción de expresión del *Bcl-6 in vitro* (Seifert, *et al.*, 2015). Esto sugiere que tienen mayor propensión a volver a entrar en reacciones de centro germinal, y sustenta la existencia de “rondas” de respuestas de cBm humanas similares a las del ratón.

Al estudiar la historia de la replicación de las cBm IgM (Berkowska, *et al.*, 2011b), se ha detectado que las cBm solo IgM parecen haberse dividido en forma similar a las cBm conmutadas, pero más que las cBm IgM, por lo cual se espera que estas últimas tengan una mayor capacidad de replicación que las cBm solo IgM. Así mismo, el cocultivo con neutrófilos activados o estímulos como la terbutalina, la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 8 (CEACAM8) o anti-Ig (estímulos independientes de linfocitos T), inducen un mayor número de células que secretan anticuerpos en cBm IgM que en cBm conmutadas, en oposición a lo encontrado con los estímulos como el CD40 (estímulo dependiente de linfocitos T) (Seifert, *et al.*, 2015). Últimamente se ha observado que las cBm IgM humanas purificadas circulantes en adultos sanos (incluidas las cBm solo IgM), y estimuladas de forma policlonal semejando una respuesta independiente de T, proliferan rápidamente y generan células secretoras de anticuerpos IgG (Vásquez, *et al.*, 2015).

Al comparar los transcriptomas de las cBm IgM y las cBm conmutadas se identificaron 422 genes con expresión diferencial entre ellas y las proteínas codificadas en dichos genes explican algunos comportamientos biológicos de las cBm IgM *in vitro* (Seifert, *et al.*, 2015).

Un factor de confusión muy importante al analizar los resultados de los diversos estudios sobre las cBm IgM, es que en varios de ellos las cBm solo IgM (IgD⁻ IgM⁺) están contenidas en la población de las cBm IgM (IgD⁺ IgM⁺). Las cBm solo IgM, junto con las cBm conmutadas, se encuentran ausentes en pacientes con síndrome de hiper IgM ligada al cromosoma X, lo que indica que se desarrollan por vías de diferenciación distintas de las cBm IgM (Weller, *et al.*, 2001). Esta es una de las razones por las cuales las cBm solo IgM se han considerado como las “verdaderas” cBm con fenotipo de IgM (Lanzavecchia & Sallusto, 2009), y parecen generarse en centros germinales primarios (Berkowska, *et al.*, 2011a).

Varios autores han comparado las cBm IgM con las cBm solo IgM. Al contrastar los patrones de longitud de los CDR3 de las células B de sangre periférica humana se evidenció que mientras las células B vírgenes mostraban una gran diversidad en este parámetro, las cBm solo IgM y las cBm conmutadas presentaban una diversidad limitada que variaba según los individuos (Weill, *et al.*, 2009). Llamó la atención que las cBm IgM exhibieron un patrón intermedio entre los dos patrones de longitud. Más aún, las cBm IgM tienen un repertorio de genes *IGHV* (Martin, *et al.*, 2015) y de secuencias V_HDJ_H (Bagnara, *et al.*, 2015) diferente a las cBm solo IgM. Asimismo, al analizar las secuencias IGHJ se observó que las cBm IgM estaban más relacionadas con las cBm IgM CD27⁻ que con las cBm solo IgM (Martin, *et al.*, 2015). Además, las cBm solo IgM tienen mayor relación precursor-producto que las cBm conmutadas, lo que indica que representan células B derivadas del centro germinal (Bagnara, *et al.*, 2015). En contraste, el análisis de los transcriptomas de las cBm IgM y las solo IgM evidencia que el único gen expresado de forma estadísticamente diferente es el IgD, lo que sugiere que tienen capacidades funcionales similares (Seifert, *et al.*, 2015).

Propuesta de procedimiento de diferenciación fenotípica de las subpoblaciones de cBm IgM

Como ya se ha mencionado, en la mayoría de los estudios funcionales en humanos no es posible establecer cuál es el rol de cada una de las dos subpoblaciones de cBm IgM, para lo cual es necesario establecer su fenotipo. Muy recientemente, la subdivisión de las cBm IgM que unen el antígeno de RV en IgM⁺⁺ IgD⁺ e IgM⁺ IgD⁺⁺ propuesta por Narváez, *et al.*, 2012 fue retomada por un grupo inglés que analizó la expresión de diferentes marcadores en ambas poblaciones usando “citometría de masas” (Martin, *et al.*, 2015). Esta técnica combina la citometría de flujo con la espectrometría de masas y permite el análisis de un mayor

Tabla 1. Comparación de los marcadores expresados por las cBZM de bazo humanas y las dos subpoblaciones de cBm IgM circulantes en sangre periférica propuestas

Marcador	cBZM	IgM ⁺⁺ IgD ^{sa}	IgM ⁺⁺ IgD ^{sb}	IgM ⁺ IgD ^{++b}	Nombre/grupo
CD35			++	+	Receptor del complemento tipo 1, CR1
CD44	++		++	+	Antígeno Hermes, Pgp-1
CD74			++	+	Cadena invariante del CMH de clase II
CD24			+	-	Antígeno estable al calor, glicoproteína
CD40			-	+	Receptor de coestimulación de cB
CD23		-	-	+	FceRII
Beta7			-/+	+	Integrina
CD21	++		+	++	Receptor para C3d y EBV, forma el correceptor B con CD19 y CD81
CD38			-	+	NAD glicohidrolasa
CD95	+		+	-	Apo-1, Fas
CXCR4	-		-	-/+	Receptor para el factor derivado del estroma 1 (SDF-1)
TNF α			+	-	Citocina
CD69	-		-	+	Molécula inductora de activación (AIM)
CD27	++		++	+	Coestimulador de cB

^a (Ettinger, *et al.*, 2007); ^b (Martin, *et al.*, 2015)

número de parámetros celulares que la citometría de flujo convencional. Los autores encontraron que la frecuencia relativa de las células B IgM⁺ IgD⁺⁺ disminuía con la edad y, por el contrario, la frecuencia relativa de las células B IgM⁺⁺ IgD⁺ aumentaba con la edad (Martin, *et al.*, 2015). Detectaron, además, algunos marcadores que se expresaban diferencialmente en estas dos subpoblaciones (Tabla 1) y notaron que las células B IgM⁺⁺ IgD⁺ tuvieron más marcadores en común con las cBm solo IgM y con las cBm conmutadas que con las células B IgM⁺ IgD⁺⁺ (Martin, *et al.*, 2015). Por esta razón, los autores propusieron que las cBm IgM se pueden dividir en dos subpoblaciones: las células B IgM⁺⁺ IgD⁺ podrían ser la población más semejante a las cBm solo IgM, dependientes de T (de centro germinal), y las células B IgM⁺ IgD⁺⁺, la población responsable de la respuesta independiente de T contra los polisacáridos y, por consiguiente, correspondiente a cBZM (Martin, *et al.*, 2015). No obstante, esta interpretación es contraria al hecho de que las cBZM de bazo se han catalogado persistentemente como IgM⁺⁺ IgD⁺ y comparten algunos marcadores con las células B IgM⁺⁺ IgD⁺ (Tabla 1). Solo con más investigaciones, por ejemplo sobre el repertorio de genes de inmunoglobulinas, el transcriptoma y los estudios funcionales (proliferación y generación de células secretoras de anticuerpos), se podrá generar evidencia que respalde esta interpretación.

Conclusión

En la literatura científica reciente se comenzó a aceptar que los resultados aparentemente contradictorios del estudio de las cBm IgM circulantes en sangre se deben probablemente a que es una población heterogénea e importante para las respuestas de defensa de primera línea y para las de centro germinal. Aunque se ha propuesto que la expresión

diferencial de IgM e IgD en las cBm IgM serviría para distinguir estas subpoblaciones de células B, se requieren más estudios fenotípicos y funcionales para esclarecer sus características.

Agradecimientos

A los doctores Manuel A. Franco y Daniel Herrera, por la lectura crítica de este manuscrito; a Camilo Vásquez, por la elaboración de la figura, y a la Pontificia Universidad Javeriana por el apoyo durante la escritura del manuscrito.

Conflicto de intereses

Declaro no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

Agematsu, K., Nagumo, H., Shinozaki, K., Hokibara, S., Yasui, K., Terada, K., Kawamura, N., Toba, T., Nonoyama, S., Ochs, H.D., Komiyama, A. (1998). Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *J Clin Invest* 102 (4): 853-860.

Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F.C., Nakazawa, T., Fukushima, K., Ito, S., Sugita, K., Mori, T., Kobata, T., Morimoto, C., Komiyama, A. (1997). B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol.* 27 (8): 2073-2079.

Bagnara, D., Squillario, M., Kipling, D., Mora, T., Walczak, A.M., Da Silva, L., Weller, S., Dunn-Walters, D.K., Weill, J.C., Reynaud, C.A. (2015). A reassessment of IgM memory subsets in humans. *J Immunol.* 195 (8): 3716-3724.

Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol.* 11 (1): 34-46.

- Berkowska, M.A., Driessen, G.J., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., He, B., Biermann, K., Lange, J.F., van der Burg, M., van Dongen, J.J., van Zelm, M.C.** (2011a). Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood*. **118** (8): 2150-2158.
- Berkowska, M.A., van der Burg, M., van Dongen, J.J., van Zelm, M.C.** (2011b). Checkpoints of B cell differentiation: Visualizing Ig-centric processes. *Ann N Y Acad Sci*. **1246**: 11-25.
- Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., Quinti, I., Carsetti, R.** (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol*. **180** (2): 800-808.
- Cattoretti, G., Buttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., Niedobitek, G.** (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood*. **107** (10): 3967-3975.
- Cerutti, A., Cols, M., Puga, I.** (2013). Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. **13** (2): 118-132.
- Chen, K., Cerutti, A.** (2010). New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol Rev*. **237** (1): 160-179.
- Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Pellicano, M., Vitello, S., Lio, D., Candore, G., Caruso, C.** (2009). A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev*. **130** (10): 681-690.
- Della Valle, L., Dohmen, S.E., Verhagen, O.J., Berkowska, M.A., Vidarsson, G., Ellen van der Schoot, C.** (2014). The majority of human memory B cells recognizing RhD and tetanus resides in IgM+ B cells. *J Immunol*. **193** (3): 1071-1079.
- Descatoire, M., Weller, S., Irtan, S., Feuillard, J., Storck, S., Guiochon-Mantel, A., Bouligand, J., Morali, A., Cohen, J., Jacquemin, E., Iascone, M., Bole-Feysot, C., Cagnard, N., Weill, J.C., Reynaud, C.A.** (2014). Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *J Exp Med*. **211** (5): 987-1000.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., Reynaud, C.A., Weill, J.C.** (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol*. **10** (12): 1292-1299.
- Dunn-Walters, D.K., Isaacson, P.G., Spencer, J.** (1995). Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med*. **182** (2): 559-566.
- Ettinger, R., Sims, G.P., Robbins, R., Withers, D., Fischer, R.T., Grammer, A.C., Kuchen, S., Lipsky, P.E.** (2007). IL-21 and BAFF/BLYS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol*. **178** (5): 2872-2882.
- Fecteau, J.F. & Neron, S.** (2003). CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: Distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*. **171** (9): 4621-4629.
- Franco, M. & Greenberg, H.** (2013). Rotavirus. *Microbiol Spectrum*. **1** (2).
- Hendricks, J., Visser, A., Dammers, P.M., Burgerhof, J.G., Bos, N.A., Kroese, F.G.** (2011). Class-switched marginal zone B cells in spleen have relatively low numbers of somatic mutations. *Mol Immunol*. **48** (6-7): 874-882.
- Herrera, D., Rojas, O.L., Duarte-Rey, C., Mantilla, R.D., Ángel, J., Franco, M.A.** (2014). Simultaneous assessment of rotavirus-specific memory B cells and serological memory after B cell depletion therapy with rituximab. *PLoS One*. **9** (5): e97087.
- Herrera, D., Vásquez, C., Corthésy, B., Franco, M.A., Ángel, J.** (2013). Rotavirus specific plasma secretory immunoglobulin in children with acute gastroenteritis and children vaccinated with an attenuated human rotavirus vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. **9** (11): 2409-2417.
- Himmelman, A., Gautschi, O., Nawrath, M., Bolliger, U., Fehr, J., Stahel, R.A.** (2001). Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IgD(+) CD27(+) memory B cells. *Br J Haematol*. **114** (2): 400-405.
- Jackson, S.M., Wilson, P.C., James, J.A., Capra, J.D.** (2008). Human B cell subsets. *Adv Immunol*. **98**: 151-224.
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K., Takemori, T.** (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J Exp Med*. **209** (11): 2079-2097.
- Kendall, E.A., Tarique, A.A., Hossain, A., Alam, M.M., Arifuzzaman, M., Akhtar, N., Chowdhury, F., Khan, A.I., Larocque, R.C., Harris, J.B., Ryan, E.T., Qadri, F., Calderwood, S.B.** (2010). Development of immunoglobulin M memory to both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen following infection with *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *Infect Immun*. **78** (1): 253-259.
- Khaskhely, N., Mosakowski, J., Thompson, R.S., Khuder, S., Smithson, S.L., Westerink, M.A.** (2012). Phenotypic analysis of pneumococcal polysaccharide-specific B cells. *J Immunol*. **188** (5): 2455-2463.
- Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K.** (1997). Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood*. **89** (4): 1288-1298.
- Klein, U., Rajewsky, K., Kuppers, R.** (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*. **188** (9): 1679-1689.

- Kruetzmann, S., Rosado, M.M., Weber, H., Germing, U., Tournilhac, O., Peter, H.H., Berner, R., Peters, A., Boehm, T., Plebani, A., Quinti, I., Carsetti, R.** (2003). Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med.* **197** (7): 939-945.
- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F.** (2009). Human B cell memory. *Curr Opin Immunol.* **21** (3): 298-304.
- Link, A., Zabel, F., Schnetzler, Y., Titz, A., Brombacher, F., Bachmann, M.F.** (2012). Innate immunity mediates follicular transport of particulate but not soluble protein antigen. *J Immunol.* **188** (8): 3724-3733.
- Martin, F. & Kearney, J.F.** (2002). Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol.* **2** (5): 323-335.
- Martin, V., Wu, Y.C., Kipling, D., Dunn-Walters, D.K.** (2015). Age-related aspects of human IgM B cell heterogeneity. *Ann N Y Acad Sci.* **1361** (1): 153-163
- Maurer, D., Fischer, G.F., Fae, I., Majdic, O., Stuhlmeier, K., Von Jeney, N., Holter, W., Knapp, W.** (1992). IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol.* **148** (12): 3700-3705.
- Moens, L., Wuyts, G., Boon, L., den Hartog, M.T., Ceuppens, J.L., Bossuyt, X.** (2008). The human polysaccharide- and protein-specific immune response to *Streptococcus pneumoniae* is dependent on CD4(+) T lymphocytes, CD14(+) monocytes, and the CD40-CD40 ligand interaction. *The Journal of allergy and clinical immunology.* **122** (6): 1231-1233.
- Mroczek, E.S., Ippolito, G.C., Rogosch, T., Hoi, K.H., Hwangpo, T.A., Brand, M.G., Zhuang, Y., Liu, C.R., Schneider, D.A., Zemlin, M., Brown, E.E., Georgiou, G., Schroeder, H.W., Jr.** (2014). Differences in the composition of the human antibody repertoire by B cell subsets in the blood. *Frontiers in immunology.* **5**: 96.
- Nagelkerke, S.Q., aan de Kerk, D.J., Jansen, M.H., van den Berg, T.K., Kuijpers, T.W.** (2014). Failure to detect functional neutrophil B helper cells in the human spleen. *PLoS One.* **9** (2): e88377.
- Narváez, C.F., Feng, N., Vásquez, C., Sen, A., Ángel, J., Greenberg, H.B., Franco, M.A.** (2012). Human rotavirus-specific IgM Memory B cells have differential cloning efficiencies and switch capacities and play a role in antiviral immunity in vivo. *J Virol.* **86** (19): 10829-10840.
- Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., Jenkins, M.K.** (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science.* **331** (6021): 1203-1207.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J., Capra, J.D.** (1994). Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med.* **180** (1): 329-339.
- Pillai, S. & Cariappa, A.** (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol.* **9** (11): 767-777.
- Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D.M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J.B., Serrano, S., Lorente, J.A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., Alameda, F., Baro, T., de Heredia, C.D., Toran, N., Catala, A., Torreadell, M., Fortuny, C., Cusi, V., Carreras, C., Díaz, G.A., Blander, J.M., Farber, C.M., Silvestri, G., Cunningham-Rundles, C., Calvillo, M., Dufour, C., Notarangelo, L.D., Lougaris, V., Plebani, A., Casanova, J.L., Ganal, S.C., Diefenbach, A., Arostegui, J.I., Juan, M., Yague, J., Mahlaoui, N., Donadieu, J., Chen, K., Cerutti, A.** (2012). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol.* **13** (2): 170-180.
- Reynaud, C.A., Descatoire, M., Dogan, I., Huetz, F., Weller, S., Weill, J.C.** (2012). IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cell Mol Life Sci.* **69** (10): 1625-1634.
- Reynaud, C.A. & Weill, J.C.** (2012). Gene profiling of CD11b and CD11b B1 cell subsets reveals potential cell sorting artifacts. *J Exp Med.* **209** (3): 433-434; author reply: 434-436.
- Richards, S.J., Morgan, G.J., Hillmen, P.** (2000). Immunophenotypic analysis of B cells in PNH: Insights into the generation of circulating naive and memory B cells. *Blood.* **96** (10): 3522-3528.
- Rojas, O.L., Caicedo, L., Guzmán, C., Rodríguez, L.S., Castañeda, J., Uribe, L., Andrade, Y., Pinzón, R., Narváez, C.F., Lozano, J.M., De Vos, B., Franco, M.A., Ángel, J.** (2007). Evaluation of circulating intestinally committed memory B cells in children vaccinated with attenuated human rotavirus vaccine. *Viral Immunol.* **20** (2): 300-311.
- Rojas, O.L., Narváez, C.F., Greenberg, H.B., Ángel, J., Franco, M.A.** (2008). Characterization of rotavirus specific B cells and their relation with serological memory. *Virology.* **380** (2): 234-242.
- Rosado, M.M., Gesualdo, F., Marcellini, V., Di Sabatino, A., Corazza, G.R., Smacchia, M.P., Nobili, B., Baronci, C., Russo, L., Rossi, F., Vito, R.D., Nicolosi, L., Inserra, A., Locatelli, F., Tozzi, A.E., Carsetti, R.** (2013). Preserved antibody levels and loss of memory B cells against pneumococcus and tetanus after splenectomy: Tailoring better vaccination strategies. *Eur J Immunol.* **43** (10): 2659-2670.
- Rothstein, T.L. & Quach, T.D.** (2015). The human counterpart of mouse B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci.* **1362** (1): 143-162
- Scheeren, F.A., Nagasawa, M., Weijer, K., Cupedo, T., Kirberg, J., Legrand, N., Spits, H.** (2008). T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM+ IgD+ CD27+ B cells. *J Exp Med.* **205** (9): 2033-2042.
- Seguin, C.A., Draper, J.S., Nagy, A., Rossant, J.** (2008). Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* **3** (2): 182-195.
- Seifert, M. & Kupperts, R.** (2009). Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med.* **206** (12): 2659-2669.

- Seifert, M., Przekopowicz, M., Taudien, S., Lollies, A., Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B.B., Kuppers, R.** (2015). Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. **112** (6): E546-555.
- Shi, Y., Agematsu, K., Ochs, H.D., Sugane, K.** (2003). Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin Immunol*. **108** (2): 128-137.
- Shi, Y., Yamazaki, T., Okubo, Y., Uehara, Y., Sugane, K., Agematsu, K.** (2005). Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J Immunol*. **175** (5): 3262-3267.
- Spencer, J., Finn, T., Pulford, K.A., Mason, D.Y., Isaacson, P.G.** (1985). The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. *Clin Exp Immunol*. **62** (3): 607-612.
- Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., Rajewsky, K.** (2014). Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur J Immunol*. **44** (5): 1258-1264.
- Tangye, S.G., Avery, D.T., Deenick, E.K., Hodgkin, P.D.** (2003). Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol*. **170** (2): 686-694.
- Tangye, S.G. & Good, K.L.** (2007). Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or “memory” B cells? *J Immunol*. **179** (1): 13-19.
- Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., de Vries, J.E.** (1998). Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med*. **188** (9): 1691-1703.
- Taylor, J.J., Pape, K.A., Jenkins, M.K.** (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J Exp Med*. **209** (3): 597-606.
- Vásquez, C., Franco, M.A., Ángel, J.** (2015). Rapid proliferation and differentiation of a subset of circulating IgM memory B cells to a CpG/Cytokine stimulus in vitro. *PLoS One*. **10** (10): e0139718.
- Vossenkamper, A., Blair, P.A., Safinia, N., Fraser, L.D., Das, L., Sanders, T.J., Stagg, A.J., Sanderson, J.D., Taylor, K., Chang, F., Choong, L.M., D’Cruz, D.P., Macdonald, T.T., Lombardi, G., Spencer, J.** (2013). A role for gut-associated lymphoid tissue in shaping the human B cell repertoire. *J Exp Med*. **210** (9): 1665-1674.
- Weill, J.C., Weller, S., Reynaud, C.A.** (2009). Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol*. **27**: 267-285.
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., Tchernia, G., Steiniger, B., Staudt, L.M., Casanova, J.L., Reynaud, C.A., Weill, J.C.** (2004). Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. **104** (12): 3647-3654.
- Weller, S., Faili, A., Garcia, C., Braun, M.C., Le Deist, F.F., de Saint Basile, G.G., Hermine, O., Fischer, A., Reynaud, C.A., Weill, J.C.** (2001). CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98** (3): 1166-1170.
- Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoeuche, D., Gauthier, F., Weill, J.C., Reynaud, C.A.** (2008). Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J Exp Med*. **205** (6): 1331-1342.
- Wesemann, D.R., Portuguese, A.J., Meyers, R.M., Gallagher, M.P., Cluff-Jones, K., Magee, J.M., Panchakshari, R.A., Rodig, S.J., Kepler, T.B., Alt, F.W.** (2013). Microbial colonization influences early B-lineage development in the gut lamina propria. *Nature*. **501** (7465): 112-115.
- Wirths, S. & Lanzavecchia, A.** (2005). ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol*. **35** (12): 3433-3441.
- Wu, Y.C., Kipling, D., Leong, H.S., Martin, V., Ademokun, A.A., Dunn-Walters, D.K.** (2010). High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood*. **116** (7): 1070-1078.
- Yates, J.L., Racine, R., McBride, K.M., Winslow, G.M.** (2013). T cell-dependent IgM memory B cells generated during bacterial infection are required for IgG responses to antigen challenge. *J Immunol*. **191** (3): 1240-1249.

Papel del TGF- β en la inmunidad contra los rotavirus

Manuel Antonio Franco-Cortés

Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Resumen

La vía de entrada y el principal sitio de replicación de los rotavirus es el intestino delgado. En este órgano el TGF- β juega un papel muy importante para mantener la tolerancia a los alimentos y microorganismos comensales. Por esta razón, es probable que esta citocina juegue un papel modulador en esta infección. Experimentos *in vitro* de nuestro laboratorio han mostrado que células humanas epiteliales infectadas por rotavirus aumentan la secreción de TGF- β y promueven una baja respuesta de linfocitos T, la que es necesaria para la inmunidad antiviral. En este artículo de revisión se analiza en forma crítica la hipótesis que los rotavirus inducen la producción de TGF- β como mecanismo de evasión inmune.

Palabras clave: rotavirus, inmunidad intestinal, factor de crecimiento transformante Beta, tolerancia inmunológica, evasión inmunológica de virus.

Role of TGF- β in rotavirus immunity

Abstract

Rotavirus enter their host and predominantly replicates in the small intestine. In this organ, TGF- β plays an important role in maintaining tolerance to commensal microorganisms and food. For this reason, it is probable that this cytokine plays a role in modulating viral infection. Results from our laboratory have shown that *in vitro* human cells infected with rotavirus secrete increased levels of TGF- β and promote an attenuated T cell response, which is necessary for protective cellular immunity. In this review article, I will critically evaluate the hypothesis that rotavirus induce the production of TGF- β as an immune evasion mechanism.

Key words: Rotavirus, intestinal immunity, transforming growth factor beta, immunological tolerance, viral immune evasion.

Introducción

El desarrollo de vacunas contra los rotavirus es un importante logro de la medicina moderna (Angel, *et al.*, 2014). Sin embargo, las vacunas actualmente en uso son relativamente poco eficientes en los países en vías de desarrollo, donde son más útiles, y es importante entender mejor la inmunidad antiviral para mejorarlas (Angel, *et al.*, 2014). La inmunidad que inducen los rotavirus no es esterilizante y en muchos casos es de corta duración (Angel, *et al.*, 2012; Franco, *et al.*, 2006). Es probable que durante el desarrollo de la respuesta inmune contra estos virus entren en juego mecanismos que favorecen una respuesta protectora, elementos reguladores negativos de la respuesta inmune y, por último, las estrategias que ha desarrollado el virus para escapar a ésta (Angel, *et al.*, 2012). El sistema inmune cuenta, entre otros, con 3 poderosos reguladores negativos: La proteína “muerte programada 1” (PD-1), la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Freeman, *et al.*, 2014; Garidou, *et al.*, 2012). Dado que la principal puerta de entrada y sitio de replicación de los rotavirus es el intestino delgado, donde el TGF- β juega

un papel muy importante para mantener la tolerancia a los alimentos y microorganismos comensales (Travis and Sheppard, 2014), es muy probable que esta citocina juegue un papel modulador en esta infección (Angel, *et al.*, 2012). Nuestros resultados en modelos *in vitro* han mostrado que células humanas epiteliales infectadas por rotavirus aumentan la secreción de TGF- β y promueven una baja respuesta de linfocitos T (LT) necesaria para la inmunidad y protección antiviral (Barreto, *et al.*, 2010; Mesa, *et al.*, 2010; Rodríguez, *et al.*, 2009; Rodríguez, *et al.*, 2012). En este artículo revisaré en forma crítica la hipótesis que el rotavirus induce la producción de TGF- β como mecanismo de evasión inmune. Para poner en contexto la discusión, primero se revisarán aspectos generales de lo que se conoce acerca de cómo funciona el TGF- β en el sistema inmune, seguido de cómo los patógenos han explotado al TGF- β para evadir a este sistema. Finalmente, se revisará

Correspondencia:

Manuel Antonio Franco-Cortés, mafranco@javeriana.edu.co

Recibido: 25 de octubre de 2015

Aceptado: 15 de febrero de 2016

la literatura que ha implicado al TGF-β en la inmunidad contra rotavirus *in vitro* e *in vivo* en los modelos murino, porcino y humano.

El TGF-β en la respuesta inmune

El TGF-β es una citocina clave en la respuesta inmune y en particular en mantener el ambiente tolerogénico del intestino y en la inducción de tolerancia después de la administración oral de un antígeno (Lin, *et al.*, 2005; Travis and Sheppard, 2014; Weiner, *et al.*, 2011). En los mamíferos, la familia de proteínas del TGF-β incluye tres miembros: TGF-β 1, 2 y 3, con gran homología, pero diferencias en sus efectos y mecanismos de acción (Travis and Sheppard, 2014). Cada una de las isoformas es sintetizada como un precursor que incluye: un péptido señal, un gran fragmento N-terminal llamado el péptido asociado a latencia (latency-associated peptide, en inglés LAP) y un pequeño fragmento C-terminal que es la citocina propiamente dicha (Travis and Sheppard, 2014). Existen múltiples mecanismos (el sistema de la trombospondina, varias integrinas, etc) para retirar el LAP, lo cual hace que la citocina cobre actividad y que permiten regular su función de una forma diferencial y específica de órgano (Travis and Sheppard, 2014; Worthington, *et al.*, 2015).

El receptor del TGF-β está compuesto por dos subunidades del receptor de tipo I (TGF-bRI) y dos del receptor de tipo II (TGF-bRII). Las tres isoformas de la citocina inicialmente se unen al homodímero del TGF-bRII. Este complejo se une a un homodímero del TGF-bRI, lo que permite que el TGF-bRII fosforile el dominio citoplasmático de este último complejo e induzca la señalización celular a través de las proteínas de la familia SMAD (Travis and Sheppard, 2014).

El TGF-β es producido por un gran número de células y en particular macrófagos (Travis and Sheppard, 2014), y puede tener efectos muy diferentes dependiendo de la presencia de otros factores secretados o correceptores celulares. Por un lado, puede disminuir la respuesta inmune adaptativa por medio de la inducción y estabilización de la función de los LT reguladores (LTreg) o directamente suprimiendo a los LT CD4 Th1, Th2 y los LT CD8. Por otro lado, dependiendo del contexto, puede incrementar respuestas adaptativas mediante la inducción de células Th17, Th9 y LT CD4 con efecto citolítico (Travis and Sheppard, 2014). Por esta razón el TGF-β puede en ciertas circunstancias promover la persistencia de patógenos cuando su efecto neto es anti-inflamatorio o lo contrario cuando es proinflamatorio (Figura 1). El que ocurra uno u otro tipo de efecto esta determinado principalmente por las citocinas que existan concomitantemente (Figura 1). Recientemente se ha visto que el TGF-β promueve el desarrollo de Thf específicos del virus de la influenza (Marshall, *et al.*, 2015) y el desarrollo de los LT residentes en el intestino (Zhang and Bevan, 2013). Igualmente se ha descrito una nueva subpoblación de LTreg llamados LTr1 que son Foxp3-, IL-

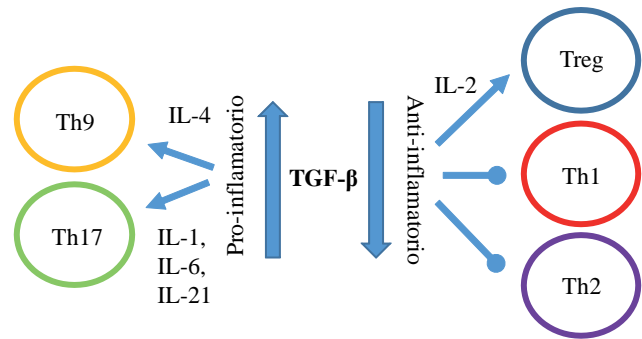


Figura 1. El TGF-β puede tener efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios al estimular o inhibir el desarrollo de subtipos de LT dependiendo del contexto de las citocinas que estén concomitantemente presentes. Los datos son tomados de (Travis and Sheppard, 2014). Las flechas indican un efecto estimulador. Las esferas un efecto inhibitorio.

10+ (Gagliani, *et al.*, 2015). Los LTr1 juegan un papel crítico en la resolución de la inflamación y tolerancia a nivel del intestino y su desarrollo es dependiente de TGF-β (Gagliani, *et al.*, 2015).

La principal isoforma expresada en el sistema inmune es el TGF-β1 y los ratones deficientes en ella mueren por un síndrome autoinmune inflamatorio multisistémico a las 3-4 semanas de edad. Al cruzar ratones deficientes de TGF-β1 con aquellos deficientes de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad la respuesta inflamatoria y autoinmune se ve disminuida (Travis and Sheppard, 2014). Más aún, ratones en los cuales se elimina el TGF-bRII exclusivamente en los LT, también desarrollan este síndrome autoinmune, lo que indica que la respuesta inmune adaptativa es un blanco fundamental para el TGF-β (Zhang and Bevan, 2012). Los ratones en los cuales se expresa una forma dominante-negativa del TGF-bRII (a partir de un promotor modificado del CD4, ratones CD4dnTGF-bRII) la señalización del TGF-β se ve atenuada tanto en LT CD4 como LT CD8. Además, debido a que el fenotipo autoinmune sólo aparece a los tres o cuatro meses de edad, estos ratones han sido útiles para estudiar el papel del TGF-β en el sistema inmune (Tinoco, *et al.*, 2009). Sin embargo como se discute mas extensamente abajo los resultados con estos ratones son difíciles de interpretar pues tienen una respuesta de LT exagerada dependiente del transgene ya que esta respuesta no se observa en los ratones a quienes se elimina el TGF-bRII (Ishigame, *et al.*, 2013a; Ishigame, *et al.*, 2013b). Más recientemente se han utilizado ratones en los cuales la delección del TGF-bRII se realiza a partir de un promotor distal del gen Lck, que sólo se expresa después de la selección positiva de los LT en el timo, y estos ratones no desarrollan autoinmunidad, pero sus LT si median autoinmunidad cuando se transfieren a individuos linfopénicos (Zhang and Bevan, 2012, 2013).

Uno de los principales mecanismos por los cuales el TGF- β media su efecto en el sistema inmune son los LTreg. Un subtipo de los LTreg Foxp3⁺ expresan en su membrana una forma madura del TGF- β con un efecto funcional que puede ser bloqueado con anticuerpos neutralizantes (Travis and Sheppard, 2014). Sin embargo, se ha visto que LT CD4 Foxp3⁻ pueden expresar otra forma de TGF- β que no es susceptible a estos anticuerpos neutralizantes, pero si a un nuevo grupo de anticuerpos específicos de LAP murino (da Cunha, et al., 2015; Oida and Weiner, 2011; Rezende, et al., 2013). El papel fisiológico de esa nueva forma de TGF- β no es muy claro, pero induce una vía de señalización idéntica al TGF- β clásico, inhibible con inhibidores específicos TGF-bRI (Oida and Weiner, 2011).

El TGF- β como mecanismo de evasión de la respuesta inmune

Múltiples patógenos parecen explotar la vía del TGF- β para mejorar su sobrevivencia: el parásito *Cryptosporidium parvum* induce la secreción de TGF- β 1 en células infectadas (Maillo, et al., 2000). También, los antígenos solubles de *Schistosoma mansoni* tienen la capacidad de estimular la producción de TGF- β en LT CD4 purificados e inducirles un fenotipo regulador (Zaccone, et al., 2009). Se ha implicado al TGF- β como un inmunomodulador importante para varios virus: por ejemplo, el virus sincitial respiratorio (RSV) induce la secreción de TGF- β en células epiteliales promoviendo su capacidad de replicación (Gibbs, et al., 2009). El virus de la influenza parece no sólo inducir la producción de TGF- β sino de activar al mismo (Li, et al., 2015). En el caso del virus de la Hepatitis B, se ha propuesto que la producción de TGF- β puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune y estar implicado en el desarrollo de infecciones crónicas (Karimi-Googheri, et al., 2014). Recientemente se han hecho observaciones para los norovirus y el virus del ébola que implican al TGF- β como un inmunomodulador relevante (Kindrachuk, et al., 2014; Kocher, et al., 2014).

Es importante anotar que los modelos mencionados anteriormente son *in vitro* o correlaciones clínicas en humanos. La evidencia directa del papel del TGF- β *in vivo* en una

infección requiere el uso de modelos animales en los cuales se añade o elimina el TGF- β durante la infección (Tabla 1). Experimentos en los cuales se añade TGF- β fueron realizados hace numerosos años y, en efecto, se evidenció que el TGF- β podía inhibir la respuesta inmune antiviral (Su, et al., 1993). Sin embargo, estos experimentos son difíciles de interpretar por aspectos como la vía y dosis de administración de la citocina. Por esta razón, la mayoría de experimentos recientes se han concentrado en usar ratones en los cuales se inhibe al TGF- β ya sea en forma directa o genéticamente. Con respecto a este último tipo de experimento, se ha visto que ratones CD4dnTGF-bRII presentan una respuesta de LT CD8 antiviral aumentada y son menos susceptibles al virus de la coriomeningitis linfocítica murina (LCMV), lo que implica mecanísticamente al TGF- β en la respuesta antiviral (Tinoco, et al., 2009). Con la misma cepa de ratones otro estudio mostró que una situación similar ocurre con el virus del Herpes (Allen, et al., 2011). No obstante, dos estudios posteriores evidenciaron que la resistencia antiviral de estos ratones estaba relacionada con la presencia de LT activados presentes en estos ratones en forma artificial dependiente del transgene (Boettler, et al., 2012; Garidou, et al., 2012). Además, estos últimos autores sugirieron que el TGF- β jugaba un rol menor en estos modelos virales, pues en ratones normales, en los cuales se inhibió la citocina con la administración de anticuerpos específicos del TGF- β , una forma recombinante del TGF-bRII-Fc o un inhibidor de TGF-bRI, no se mejoró su capacidad de eliminar una infección crónica, aunque si aumentó la respuesta inmune antiviral (Boettler, et al., 2012; Garidou, et al., 2012). Es importante anotar que en estos experimentos no se utilizaron anticuerpos contra el LAP murino y que por lo tanto la actividad de la nueva forma de TGF- β expresada por LT CD4 FoxP3⁻ (descrita en el aparte anterior) pudo no haber sido inhibida (da Cunha, et al., 2015; Oida and Weiner, 2011; Rezende, et al., 2013).

Para tratar de entender el papel del TGF- β en las células dendríticas (CD) y asesinas naturales (NK), algunos investigadores han recurrido a los ratones CD11c-dnTGF-bRII que expresan una forma constitutiva de la versión

Tabla 1. Cepas de ratones genéticamente modificados utilizados para estudiar el papel del TGF- β en la inmunidad contra virus

Cepa de ratón	Alteración Funcional	Hallazgos principales	Referencias
CD4dnTGF-bRII	Expresión constitutiva temprana de versión dominante negativa del TGF-bRII en LT	Se atenúa la infección por LCMV y el período de latencia virus del virus Herpes.	(Allen et al., 2011; Garidou et al., 2012; Tinoco et al., 2009)
CD11c-dnTGF-bRII	Expresión constitutiva temprana de versión dominante negativa del TGF-bRII en CD y NK	Disminución del número y función de las NK pero no de las CD. Se atenúa la eliminación del virus Herpes y el MCMV pero no la infección crónica con LCMV.	(Allen et al., 2011; Lewis et al., 2015; Marcoe et al., 2012)
dLck-TGF-bRII	Deleción constitutiva tardía del TGF-bRII en LT	Deficiencia en el desarrollo de LT intestinales específicos de LCMV y de LThf específicos de influenza en pulmón.	(Marshall et al., 2015; Sheridan et al., 2014; Zhang and Bevan, 2013)
ERcre-TGF-bRII	Deleción inducible del TGF-bRII en todas las células	La atenuación de la señalización del TGF- β no afecta las CD y NK y su capacidad par eliminar la infección aguda de MCMV y la crónica de LCMV.	(Lewis et al., 2015)

dominante negativa del TGF- β R2 en dichas células. En estos ratones se evidencia una disminución del número y función de las NK pero no de las CD y se atenúa la eliminación del virus Herpes y el citomegalovirus murino (MCMV), pero no la infección crónica con LCMV (Allen, *et al.*, 2011; Lewis, *et al.*, 2015; Marcoe, *et al.*, 2012). Sin embargo, de la misma manera que los ratones que expresan constitutivamente el dnTGF- β R2 bajo el promotor de CD4, este efecto podría deberse a alteraciones en el desarrollo de las células.

Así mismo, se han usado ratones dLck-TGF- β R2 que tienen delección constitutiva tardía (después de la selección positiva en el timo) del TGF- β R2 en LT (Marshall, *et al.*, 2015; Sheridan, *et al.*, 2014; Zhang and Bevan, 2013). Paradójicamente, en estos ratones el TGF- β parece ser “inmunoestimulante”, pues es necesario para el desarrollo de LT residentes en el intestino y Thf. Es posible que estos ratones también tengan el mismo inconveniente que los otros modelos en los cuales la deficiencia de TGF- β es constitutiva y, por lo tanto, las poblaciones celulares se vean alteradas en su desarrollo (Ishigame, *et al.*, 2013a; Ishigame, *et al.*, 2013b).

Para tratar de evitar el problema de la alteración celular que ocurre en los ratones genéticamente modificados constitutivamente, recientemente se recurrió a ratones ERcre-TGF- β R2 que al ser tratados con tamoxifeno tienen una delección inducible del TGF- β R2 en todas las células del organismo. Con estos ratones se mostró que la atenuación de la señalización del TGF- β no afecta la función de las CD ni de las NK y estas células parecen mediar la eficiente eliminación aguda de MCMV y la crónica de LCMV (Lewis, *et al.*, 2015). En forma coherente, se ha visto que estos ratones, con deficiencia en la señalización del TGF- β inducida en la vida adulta, no desarrollan autoinmunidad (Sledzinska, *et al.*, 2013). Estos modelos sugieren que el TGF- β no tiene un papel crítico en la inmunidad de los ratones. Sin embargo, esta conclusión hay que tomarla con precaución pues, entre otras alteraciones, el tratamiento con dosis de tamoxifeno similares a las que se usan para la eliminación genética del TGF- β R2 pueden tener efectos colaterales (Kim, *et al.*, 2014). Considerando toda la evidencia disponible, podemos decir que en ninguno modelo se ha establecido claramente un rol inmunomodulador importante del TGF- β en una infección viral *in vivo*.

El TGF- β en la inmunidad contra rotavirus

Modelos *in vitro*

La producción de TGF- β por células epiteliales intestinales (CEI) estimuladas con bacterias comensales se ha descrito como un mecanismo que induce la homeostasis intestinal y en particular el ambiente tolerogénico inmune del intestino (Mileti, *et al.*, 2009; Swiatczak and Rescigno, 2012; Zeuthen, *et al.*, 2008). A la fecha se desconoce cómo el sistema inmune intestinal diferencia microorganismos patógenos de los no patógenos (Niess and Reinecker,

2006; Swiatczak and Rescigno, 2012). Estudios con CEI y enterocitos han mostrado que la interacción de los microorganismos con estas células es crítica, ya que los patógenos, en contraste con los no patógenos, son capaces de estimular en ellas una respuesta inflamatoria que incluye TNF- α , IL-1 β e IL-8 (Jung, *et al.*, 1995; Niess and Reinecker, 2006).

Nuestros estudios sobre este tema mostraron que en CEI la infección por rotavirus induce la secreción de TGF- β , PGE₂ e IL-8 y se incrementa el ARNm de TGF- β (Rodríguez, *et al.*, 2009; Rodríguez, *et al.*, 2012). No detectamos IL-12, IL-6, IL-1 β , IL-10 o TNF- α en los sobrenadantes de CEI infectadas con rotavirus. La presencia del TGF- β y de la PGE₂ en conjunto con la falta de TNF- α e IL-1 β (citocinas claves en la modulación de la respuesta inmune intestinal), sugirieron que los sobrenadantes de células infectadas por rotavirus son tolerogénicos y deben promover que las CD adyacentes a los enterocitos infectados secreten citocinas no inflamatorias (no Th1). Esto fue evidenciado directamente en un modelo en que se estimularon CD con virus purificado o virus proveniente de los sobrenadantes de CEI infectadas y se cocultivaron con LT CD4 vírgenes alogénicos para estudiar su diferenciación (Rodríguez, *et al.*, 2012). Los LT con el primer estímulo se diferenciaron a LT Th1 pero con el segundo se observó una disminución de dicha respuesta. Este efecto se inhibió al pre-tratar a las CDs con anticuerpos contra el TGF- β .

Más aún, mostramos que los sobrenadantes de CIE infectadas con rotavirus liberan microvesículas capaces de inducir la muerte celular y de inhibir la proliferación de LT purificados estimulados policlonalmente (Barreto, *et al.*, 2010). Este efecto fue en parte debido al TGF- β presente en estas microvesículas, ya que su efecto se inhibió al tratar a las células con un inhibidor de la transducción de la señal del TGF- β R1, la molécula SB431542. Por estar asociado a estas microvesículas, el TGF- β puede ver potenciada su función logarítmicamente (Barreto, *et al.*, 2010).

Estos resultados deben interpretarse en el contexto del hecho que los rotavirus parecen haber desarrollado múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune (Angel, *et al.*, 2012). En particular, los rotavirus inhiben por múltiples vías (la mayoría dependiente de la proteína NSP1) al IFN de tipo I (Barro and Patton, 2005; Feng, *et al.*, 2009). Con experimentos *in vitro* se ha visto que los receptores intracelulares RIG-I y/o MDA-5 reconocen la infección viral y activan los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B. Estos factores de transcripción inducen expresión de IFN de tipo I y otros genes estimulados por IFN que promueven la inmunidad antiviral (Broquet, *et al.*, 2011; Sen, *et al.*, 2011). La proteína NSP1 de rotavirus induce la degradación de IRF3 e inhibe la actividad del NF- κ B, efecto que se ha postulado como un importante mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Arnold and Patton, 2011; Barro and Patton, 2005; Feng, *et al.*, 2009; Graff,

et al., 2009). Este mecanismo puede estar relacionado con el del TGF- β mencionado anteriormente, pues se ha visto que el IRF3 inhibe la secreción de TGF- β (Xu, *et al.*, 2014) y los rotavirus, al inhibir el IRF3 indirectamente, podrían estimular la producción del TGF- β .

El modelo en ratones

En nuestros estudios previos del modelo en ratones, encontramos que LT CD4 específicos de rotavirus (LTCD4-RV), aunque probablemente no tengan un efecto antiviral directo, son esenciales para el desarrollo de más del 90% de la respuesta intestinal IgA específica del virus (Franco and Greenberg, 1997). Más aún, la respuesta de anticuerpos parece ser el mecanismo principal que media la protección contra la reinfección viral. En cuanto a los LTCD8-RV, se ha mostrado que tienen un efecto antiviral directo y pueden mediar una inmunidad parcial contra la reinfección viral (Franco and Greenberg, 1995, 1997; McNeal, *et al.*, 1997). Un estudio de la respuesta T contra péptidos de las proteínas VP6 y VP7 de rotavirus en ratones inmunizados con virus murino (homólogo) y de simio (heterólogo) en las cepas de ratones C57BL/6 y Balb/c ilustra muy bien la respuesta inmune contra este virus (Jaimes, *et al.*, 2005). En este estudio, se comparó la respuesta en ratones lactantes y adultos, y se analizaron los LT específicos de rotavirus presentes en diferentes órganos (Jaimes, *et al.*, 2005). En la Tabla 2 se muestra el resumen de este trabajo con ratones adultos y del cual se puede concluir que: 1. Hay una falta de respuesta LTCD4-RV, pero relativamente buena respuesta de LTCD8-RV, después de infección con virus homólogo en ambas cepas de ratones. 2. Las respuestas de LT CD4 contra el virus heterólogo, que tiene una diseminación sistémica, parecen ser más fuertes. 3. Las respuestas a ambos virus alcanzan el pico al día 5 después de infección y fueron transitorias (desaparecen después de aproximadamente una semana). 4. Las respuestas en el hígado, y en algunos casos las placas de Peyer, parecen ser más abundantes que las observadas en el bazo. La respuesta en ratones lactantes fue incluso de menor intensidad que en los adultos

y confirma la pobre respuesta al virus. Un estudio que usó tetrámeros de clase I para caracterizar a los LTCD8-RV murinos (Masopust, *et al.*, 2004) permitió concluir que éstos parecen estar presentes en cantidades más bajas que los LT específicos del virus de Sendai, que infecta la mucosa respiratoria. En conjunto, de estos dos artículos se puede concluir que la respuesta de LT, especialmente los CD4 contra rotavirus homólogos, es atenuada y transitoria. Estos hallazgos apoyan el hecho que los rotavirus están ejerciendo mecanismos de supresión de la respuesta inmune.

Como se dijo antes, uno de los mayores efectos del TGF- β sobre el sistema inmune involucra a los LTreg (Travis and Sheppard, 2014). La infección de ratones neonatos y adultos con el virus homólogo EC indujo una población de LTreg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ que al ser eliminada con un anticuerpo contra CD25 incrementó la respuesta T total y específica del virus. Sin embargo, la eliminación de los LTreg no tuvo efecto en la diarrea, la cantidad de virus excretado o la respuesta de IgA antiviral (Kim, *et al.*, 2008). En otro estudio, más reciente, se reportaron hallazgos similares en ratones adultos en los cuales los LTreg que expresan Foxp3 fueron “suprimidos” (ratones que tienen el gen de Foxp3 con secuencias flox flanqueantes y una Cre recombinasa expresada en forma inducible con un promotor T) (Miller, *et al.*, 2014). Ambos estudios tienen como debilidad que los marcadores CD25 y FoxP3 se expresan en LT recientemente activados, lo que puede confundir el resultado. Probablemente por esta razón, en el segundo de los estudios, algunos de los ratones cuyas células no podían expresar FoxP3 excretaron antígeno viral por 2-3 días más que los controles, hallazgo que, en este modelo, es típico de la deficiencia de LTCD8. Una posibilidad es que las células suprimidas FoxP3⁺ fueran LTCD8 efectores. Alternativamente, puede ser que los LTreg tengan un papel en la eliminación viral en la fase aguda de la infección, como se ha visto con los virus del Herpes o West Nile (Lanteri, *et al.*, 2009; Lund, *et al.*, 2008). Además, es importante tener en cuenta que en el primer estudio la eliminación de células CD25⁺ fue bastante pobre (60-70%)

Tabla 2. Respuesta de LT de ratones adultos de dos cepas a las proteínas VP6 y VP7 en diversos órganos, cinco días después de infección oral con rotavirus murino (homólogo) o de simio (heterólogo).

Órgano estudiado/Proteína viral reconocida	Ratones C57BL/6				Ratones BALB/c			
	Rotavirus homólogo		Rotavirus heterólogo		Rotavirus homólogo		Rotavirus heterólogo	
	LT CD4+	LT CD8+	LT CD4+	LT CD8+	LT CD4+	LT CD8+	LT CD4+	LT CD8+
Bazo VP6	-	+	+	+	-	-	-	-
Bazo VP7	-	++	-	+++	-	-	-	-
P.Peyer VP6	NR	+++	NR	++	NR	NR	NR	NR
P. Peyer VP7	NR	++	NR	++	NR	NR	NR	NR
Hígado VP6	-	+++	++	+	-	+	++	++
Hígado VP7	-	+++	-	+++	-	+/-	+/-	+/-

El número de cruces indica la frecuencia relativa de LT específicos en cada órgano. NR: no reportado. Los datos son tomados de la referencia (Jaimes *et al.*, 2005).

y que en el segundo no se eliminaron LTreg que expresan LAP en su superficie, pero que son negativos para FoxP3 (Oida and Weiner, 2010; Weiner, *et al.*, 2011). Con estas salvedades, los resultados de los anteriores estudios sugieren que el efecto del TGF- β dependiente de LTreg puede ser menor. Sin embargo, puesto que el TGF- β tiene otros muchos efectos inmunomoduladores que no involucran a los LTreg, el impacto que su neutralización tenga en la severidad de la diarrea y cantidad de virus excretado continúa siendo una pregunta abierta.

El modelo porcino

En el modelo porcino de infección por rotavirus se ha estudiado la respuesta de citocinas intestinales y sistémicas inducidas por la infección (Azevedo, *et al.*, 2006; Azevedo, *et al.*, 2012; Chattha, *et al.*, 2013). Con respecto al TGF- β estos estudios son, en algunos casos, contradictorios y los niveles en cerdos no infectados parecen variar en forma significativa, sin una clara explicación. En el primer estudio no se pudo detectar TGF- β ni en el plasma ni en el contenido intestinal de cerdos infectados por rotavirus (Azevedo, *et al.*, 2006). En el segundo estudio se evidenció una disminución del TGF- β sérico entre los días 2 y 7 pos infección. Tanto en cerdos infectados como no infectados el tratamiento con probióticos aumentó los niveles de TGF- β en suero. A los 28 días pos infección, con o sin probióticos, el rotavirus indujo IFN- γ , IL-12, IL-4, TNF- α , IL-6, IL-10 y TGF- β en los contenidos intestinales, aunque sólo el TNF- α y la IL-10 fueron significativamente más altos. El número de células secretoras de TGF- β en el íleon y bazo de los cerdos infectados estaba incrementado a los 28 días pos infección (Azevedo, *et al.*, 2012).

En el tercer estudio se reprodujeron los cambios inducidos por la infección con rotavirus y probióticos en los niveles de TGF- β en suero (Chattha, *et al.*, 2013). En este estudio se evidenció que en el grupo de cerdos que recibieron probióticos la protección fue mayor y esto coincidió con la presencia de niveles aumentados de LTreg (caracterizados por la presencia de FoxP3) en el íleon (Chattha, *et al.*, 2013). Como se dijo anteriormente en el aparte sobre LTreg en ratones, este hallazgo puede ser explicado por el hecho de que los LTreg juegan un papel en la eliminación viral durante la fase aguda o que las células que se están detectando con fenotipo de LTreg son en realidad LT efectores, debido a la ausencia de marcador específico e inequívoco de LTreg.

En resumen, en cerdos, durante la fase aguda de la infección, el RV parece reducir los niveles séricos de TGF- β ; la producción del mismo a nivel intestinal no ha sido estudiada durante esta fase, aunque parece aumentar a las cuatro semanas post infección.

Los estudios en humanos

El estudio de la respuesta T proliferativa al rotavirus en niños de 3 a 7 años de edad mostró que estas respuestas son transitorias y están presentes solamente en 35% de los niños

estudiados (Makela, *et al.*, 2004; Makela, *et al.*, 2006). Además, al estimular células mononucleares de sangre periférica de estos niños con rotavirus se detectó aumento de mRNA para IFN- γ , IL-10 y también se sugirió un aumento del TGF- β (Makela, *et al.*, 2006). En nuestros estudios más recientes encontramos que niños con gastroenteritis por rotavirus tienen muy bajos o niveles inferiores al ruido de fondo de LT circulantes productores de IFN- γ , IL-13, IL-2, IL-10 o IL-17 (Mesa, *et al.*, 2010). Adultos infectados por rotavirus presentan bajas frecuencias de LT CD4 que producen IL-10 e IL-2 durante la fase aguda y convaleciente, respectivamente, y bajos niveles de IFN- γ en ambas fases (Mesa, *et al.*, 2010). En adultos sanos la mayoría de los LTCD4-RV producen sólo IFN- γ y una minoría IL-2, o IL-2 en combinación con IFN- γ . En células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos, al remover las células CD25⁺, bloquear el TGF- β con su inhibidor natural el LAP, o al inhibir la vía de señalización del TGF- β con el inhibidor SB431542, las frecuencias de LTCD4-RV identificadas aumentan. A pesar de que demostramos que los niños tenían frecuencias esperadas de LTreg, no detectamos en sus células el mismo efecto que en los adultos (Mesa, *et al.*, 2010). De acuerdo con estos resultados, muy recientemente mostramos que en adultos sanos, en comparación con LT CD4 específicos de toxoide tetánico y del virus de la influenza, LTCD4-RV parecen proliferar menos y estar enriquecidos en aquellos que sólo producen IFN- γ (Parra, *et al.*, 2014b). Esto está de acuerdo con un estudio complementario en que se mostró, con tetrameros de clase II, que los LT CD4 específicos de rotavirus expresan marcadores de migración intestinal y, por lo tanto, muy probablemente fueron estimulados en el intestino (Parra, *et al.*, 2014a). En conjunto, nuestros hallazgos muestran que los LTCD4-RV parecen ser predominantemente estimulados en el intestino y cualitativamente poco eficientes, lo que podría deberse al efecto del TGF- β como regulador negativo.

Conclusiones

El papel *in vivo* directo del TGF- β en la inmunidad contra patógenos y virus en particular ha sido muy difícil de evidenciar y a la fecha no existe ningún modelo en que se haya podido demostrar un rol decisivo para esta citocina. Por esta misma razón, a pesar de la amplia evidencia que lo sugiere, no hay ninguna prueba directa de que los patógenos utilicen a esta citocina para evadir la respuesta inmune *in vivo*. El conjunto de resultados disponibles de nuestro laboratorio y otros laboratorios sugiere que la infección por rotavirus aumenta los niveles, de por sí elevados, de TGF- β en el medio tolerogénico intestinal y promueve una baja respuesta de LT necesaria para la inmunidad protectora antiviral. La capacidad del rotavirus de inhibir al IRF3 (vía utilizada para evadir la respuesta del IFN de tipo I) parece ligada, y puede ser complementaria, a la capacidad del virus de inducir al TGF- β . El hecho de que el rotavirus tenga una replicación predominantemente intestinal lo presenta

como un modelo interesante para estudiar el papel de esta citocina en la inmunidad antiviral. Nuevos modelos de ratones transgénicos deficientes en TGF- β (Aghajani, *et al.*, 2012) y formas de inhibir a esta citocina (da Cunha, *et al.*, 2015) pueden ser útiles para este propósito.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Juana Angel por la lectura crítica de este manuscrito. Agradezco el soporte de la Pontificia Universidad Javeriana para la escritura del presente manuscrito.

Conflicto de intereses

Declaro no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Aghajani, K., Keerthivasan, S., Yu, Y., Gounari, F. 2012. Generation of CD4CreER(T2) transgenic mice to study development of peripheral CD4-T-cells. *Genesis* **50** (12): 908-913.
- Allen, S.J., Mott, K.R., Wechsler, S.L., Flavell, R.A., Town, T., Ghiasi, H. 2011. Adaptive and innate transforming growth factor beta signaling impact herpes simplex virus 1 latency and reactivation. *J Virol* **85** (21): 11448-11456.
- Angel, J., Franco, M.A., Greenberg, H.B. 2012. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr Opin Virol* **2** (4): 419-425.
- Angel, J., Steele, A.D., Franco, M.A. 2014. Correlates of protection for rotavirus vaccines: Possible alternative trial endpoints, opportunities, and challenges. *Hum Vaccin Immunother* **10** (12): 3659-3671.
- Arnold, M.M., Patton, J.T. 2011. Diversity of interferon antagonist activities mediated by NSP1 proteins of different rotavirus strains. *J Virol* **85** (5): 1970-1979.
- Azevedo, M.S., Yuan, L., Pouly, S., Gonzales, A.M., Jeong, K.I., Nguyen, T.V., Saif, L.J. 2006. Cytokine responses in gnotobiotic pigs after infection with virulent or attenuated human rotavirus. *J Virol* **80** (1): 372-382.
- Azevedo, M.S., Zhang, W., Wen, K., Gonzalez, A.M., Saif, L.J., Yousef, A.E., Yuan, L. 2012. Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus reuteri modulate cytokine responses in gnotobiotic pigs infected with human rotavirus. *Benef Microbes* **3** (1): 33-42.
- Barreto, A., Rodriguez, L.-S., Lucia Rojas, O., Wolf, M., Greenberg, H.B., Franco, M.A., Angel, J. 2010. Membrane Vesicles Released by Intestinal Epithelial Cells Infected with Rotavirus Inhibit T-Cell Function. *Viral Immunology* **23** (6): 595-608.
- Barro, M., Patton, J.T. 2005. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** (11): 4114-4119.
- Boettler, T., Cheng, Y., Ehrhardt, K., von Herrath, M. 2012. TGF-beta blockade does not improve control of an established persistent viral infection. *Viral Immunol* **25** (3): 232-238.
- Broquet, A.H., Hirata, Y., McAllister, C.S., Kagnoff, M.F. 2011. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J Immunol* **186** (3): 1618-1626.
- Chattha, K.S., Vlasova, A.N., Kandasamy, S., Rajashekara, G., Saif, L.J. 2013. Divergent immunomodulating effects of probiotics on T cell responses to oral attenuated human rotavirus vaccine and virulent human rotavirus infection in a neonatal gnotobiotic piglet disease model. *J Immunol* **191** (5): 2446-2456.
- da Cunha, A.P., Wu, H.Y., Rezende, R.M., Vandeventer, T., Weiner, H.L. 2015. In vivo anti-LAP mAb enhances IL-17/IFN-gamma responses and abrogates anti-CD3-induced oral tolerance. *Int Immunol* **27** (2): 73-82.
- Feng, N., Sen, A., Nguyen, H., Vo, P., Hoshino, Y., Deal, E.M., Greenberg, H.B. 2009. Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts. *J Virol* **83** (14): 6987-6994.
- Franco, M.A., Angel, J., Greenberg, H.B. 2006. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* **24** (15): 2718-2731.
- Franco, M.A., Greenberg, H.B. 1995. Role of B cells and cytotoxic T lymphocytes in clearance of and immunity to rotavirus infection in mice. *J Virol* **69** (12): 7800-7806.
- Franco, M.A., Greenberg, H.B. 1997. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* **238** (2): 169-179.
- Freeman, B.E., Meyer, C., Slifka, M.K. 2014. Anti-inflammatory cytokines directly inhibit innate but not adaptive CD8+ T cell functions. *J Virol* **88** (13): 7474-7484.
- Gagliani, N., Vesely, M.C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limon, P., Paiva, R.S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L.X., Cotton, M.J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., Esplugues, E., Huber, S., Flavell, R.A. 2015. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523** (7559): 221-5
- Garidou, L., Heydari, S., Gossa, S., McGavern, D.B. 2012. Therapeutic blockade of transforming growth factor beta fails to promote clearance of a persistent viral infection. *J Virol* **86** (13): 7060-7071.
- Gibbs, J.D., Orloff, D.M., Igo, H.A., Zeng, J.Y., Imani, F. 2009. Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 enhances replication of respiratory syncytial virus in lung epithelial cells. *J Virol* **83** (23): 12424-12431.
- Graff, J.W., Ettayebi, K., Hardy, M.E. 2009. Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism. *PLoS Pathog* **5** (1): e1000280.
- Ishigame, H., Mosaheb, M.M., Sanjabi, S., Flavell, R.A. 2013a. Truncated form of TGF-betaR2, but not its absence, induces memory CD8+ T cell expansion and lymphoproliferative disorder in mice. *J Immunol* **190** (12): 6340-6350.
- Ishigame, H., Zenewicz, L.A., Sanjabi, S., Licona-Limon, P., Nakayama, M., Leonard, W.J., Flavell, R.A. 2013b. Excessive Th1 responses due to the absence of TGF-beta

- signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (17): 6961-6966.
- Jaimes, M.C., Feng, N., Greenberg, H.B.** 2005. Characterization of homologous and heterologous rotavirus-specific T-cell responses in infant and adult mice. *J Virol* **79** (8): 4568-4579.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., Kagnoff, M.F.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* **95** (1): 55-65.
- Karimi-Googheri, M., Daneshvar, H., Nosratabadi, R., Zare-Bidaki, M., Hassanshahi, G., Ebrahim, M., Arababadi, M.K., Kennedy, D.** 2014. Important roles played by TGF-beta in hepatitis B infection. *J Med Virol* **86** (1): 102-108.
- Kim, B., Feng, N., Narvaez, C.F., He, X.S., Eo, S.K., Lim, C.W., Greenberg, H.B.** 2008. The influence of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells on the immune response to rotavirus infection. *Vaccine* **26** (44): 5601-5611.
- Kim, D., Lee, A.S., Jung, Y.J., Yang, K.H., Lee, S., Park, S.K., Kim, W., Kang, K.P.** 2014. Tamoxifen ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis by modulation of estrogen receptor alpha-mediated transforming growth factor-beta1/Smad signaling pathway. *Nephrol Dial Transplant* **29** (11): 2043-2053.
- Kindrachuk, J., Wahl-Jensen, V., Safronetz, D., Trost, B., Hoenen, T., Arsenault, R., Feldmann, F., Traynor, D., Postnikova, E., Kusalik, A., Napper, S., Blaney, J.E., Feldmann, H., Jahrling, P.B.** 2014. Ebola virus modulates transforming growth factor beta signaling and cellular markers of mesenchyme-like transition in hepatocytes. *J Virol* **88** (17): 9877-9892.
- Kocher, J., Bui, T., Giri-Rachman, E., Wen, K., Li, G., Yang, X., Liu, F., Tan, M., Xia, M., Zhong, W., Jiang, X., Yuan, L.** 2014. Intranasal P particle vaccine provided partial cross-variant protection against human GII.4 norovirus diarrhea in gnotobiotic pigs. *J Virol* **88** (17): 9728-9743.
- Lanteri, M.C., O'Brien, K.M., Purtha, W.E., Cameron, M.J., Lund, J.M., Owen, R.E., Heitman, J.W., Custer, B., Hirschhorn, D.F., Tobler, L.H., Kiely, N., Prince, H.E., Ndhlovu, L.C., Nixon, D.F., Kamel, H.T., Kelvin, D.J., Busch, M.P., Rudensky, A.Y., Diamond, M.S., Norris, P.J.** 2009. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J Clin Invest* **119** (11): 3266-3277.
- Lewis, G.M., Macal, M., Hesser, C., Zuniga, E.I.** 2015. Constitutive But Not Inducible Attenuation Of Transforming Growth Factor-beta Signaling Increases Natural Killer Cell Responses Without Directly Affecting Dendritic Cells Early After Chronic Viral Infection. *J Virol*.
- Li, N., Ren, A., Wang, X., Fan, X., Zhao, Y., Gao, G.F., Cleary, P., Wang, B.** 2015. Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection through TGF-beta-mediated expression of host cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112** (1): 238-243.
- Lin, A.H., Luo, J., Mondschein, L.H., ten Dijke, P., Vivien, D., Contag, C.H., Wyss-Coray, T.** 2005. Global analysis of Smad2/3-dependent TGF-beta signaling in living mice reveals prominent tissue-specific responses to injury. *J Immunol* **175** (1): 547-554.
- Lund, J.M., Hsing, L., Pham, T.T., Rudensky, A.Y.** 2008. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* **320** (5880): 1220-1224.
- Maillet, C., Gargala, G., Delaunay, A., Ducrotte, P., Bresseur, P., Ballet, J.J., Favennec, L.** 2000. Cryptosporidium parvum infection stimulates the secretion of TGF-beta, IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitol Res* **86** (12): 947-949.
- Makela, M., Marttila, J., Simell, O., Ilonen, J.** 2004. Rotavirus-specific T-cell responses in young prospectively followed-up children. *Clin Exp Immunol* **137** (1): 173-178.
- Makela, M., Oling, V., Marttila, J., Waris, M., Knip, M., Simell, O., Ilonen, J.** 2006. Rotavirus-specific T cell responses and cytokine mRNA expression in children with diabetes-associated autoantibodies and type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* **145** (2): 261-270.
- Marcoe, J.P., Lim, J.R., Schaubert, K.L., Fodil-Cornu, N., Matka, M., McCubbrey, A.L., Farr, A.R., Vidal, S.M., Laouar, Y.** 2012. TGF-beta is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat Immunol* **13** (9): 843-850.
- Marshall, H.D., Ray, J.P., Laidlaw, B.J., Zhang, N., Gawande, D., Staron, M.M., Craft, J., Kaech, S.M.** 2015. The transforming growth factor beta signaling pathway is critical for the formation of CD4 T follicular helper cells and isotype-switched antibody responses in the lung mucosa. *Elife* **4**e04851.
- Masopust, D., Vezys, V., Usherwood, E.J., Cauley, L.S., Olson, S., Marzo, A.L., Ward, R.L., Woodland, D.L., Lefrancois, L.** 2004. Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin. *J Immunol* **172** (8): 4875-4882.
- McNeal, M.M., Rae, M.N., Ward, R.L.** 1997. Evidence that resolution of rotavirus infection in mice is due to both CD4 and CD8 cell-dependent activities. *J Virol* **71** (11): 8735-8742.
- Mesa, M.C., Gutiérrez, L., Duarte-Rey, C., Angel, J., Franco, M.A.** 2010. A TGF- β mediated regulatory mechanism modulates the T cell immune response to rotavirus in adults but not in children. *Virology* **399** (1): 77-86.
- Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I.D., Rescigno, M.** 2009. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PLoS One* **4** (9): e7056.
- Miller, A.D., Blutt, S.E., Conner, M.E.** 2014. FoxP3+ regulatory T cells are not important for rotavirus clearance or the early antibody response to rotavirus. *Microbes Infect* **16** (1): 67-72.

- Niess, J.H., Reinecker, H.C.** 2006. Dendritic cells: the commanders-in-chief of mucosal immune defenses. *Curr Opin Gastroenterol* **22** (4): 354-360.
- Oida, T., Weiner, H.L.** 2010. TGF-beta induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS One* **5** (11): e15523.
- Oida, T., Weiner, H.L.** 2011. Murine CD4 T cells produce a new form of TGF-beta as measured by a newly developed TGF-beta bioassay. *PLoS One* **6** (4): e18365.
- Parra, M., Herrera, D., Calvo-Calle, J.M., Stern, L.J., Parra-López, C.A., Butcher, E., Franco, M., Angel, J.** 2014a. Circulating human rotavirus specific CD4 T cells identified with a class II tetramer express the intestinal homing receptors $\alpha 4\beta 7$ and CCR9. *Virology* 452-453: 191-201.
- Parra, M., Herrera, D., Jácome, M.F., Mesa, M.C., Rodríguez, L.S., Guzmán, C., Angel, J., Franco, M.A.** 2014b. Circulating rotavirus-specific T cells have a poor functional profile. *Virology* 468-470C: 340-350.
- Rezende, R.M., Oliveira, R.P., Medeiros, S.R., Gomes-Santos, A.C., Alves, A.C., Loli, F.G., Guimaraes, M.A., Amaral, S.S., da Cunha, A.P., Weiner, H.L., Azevedo, V., Miyoshi, A., Faria, A.M.** 2013. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory T cells. *J Autoimmun* 4045-57.
- Rodríguez, L.-S., Barreto, A., Franco, M.A., Angel, J.** 2009. Immunomodulators released during rotavirus infection of polarized Caco-2 cells. *Viral Immunology* **22** (3): 163-172.
- Rodríguez, L.S., Narvaez, C.F., Rojas, O.L., Franco, M.A., Angel, J.** 2012. Human myeloid dendritic cells treated with supernatants of rotavirus infected Caco-2 cells induce a poor Th1 response. *Cell Immunol* **272** (2): 154-161.
- Sen, A., Pruijssers, A.J., Dermody, T.S., Garcia-Sastre, A., Greenberg, H.B.** 2011. The early interferon response to rotavirus is regulated by PKR and depends on MAVS/IPS-1, RIG-I, MDA-5, and IRF3. *J Virol* **85** (8): 3717-3732.
- Sledzinska, A., Hemmers, S., Mair, F., Gorka, O., Ruland, J., Fairbairn, L., Nissler, A., Muller, W., Waisman, A., Becher, B., Buch, T.** 2013. TGF-beta signalling is required for CD4(+) T cell homeostasis but dispensable for regulatory T cell function. *PLoS biology* **11** (10): e1001674.
- Su, H.C., Ishikawa, R., Biron, C.A.** 1993. Transforming growth factor-beta expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. *J Immunol* **151** (9): 4874-4890.
- Swiatczak, B., Rescigno, M.** 2012. How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut. *Semin Immunol* **24** (1): 43-49.
- Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., Sauer, K., Zuniga, E.I.** 2009. Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity* **31** (1): 145-157.
- Travis, M.A., Sheppard, D.** 2014. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* 3251-82.
- Weiner, H.L., da Cunha, A.P., Quintana, F., Wu, H.** 2011. Oral tolerance. *Immunol Rev* **241** (1): 241-259.
- Worthington, J.J., Kelly, A., Smedley, C., Bauche, D., Campbell, S., Marie, J.C., Travis, M.A.** 2015. Integrin $\alpha v\beta 8$ -Mediated TGF-beta Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **42** (5): 903-915.
- Xu, P., Bailey-Bucktrout, S., Xi, Y., Xu, D., Du, D., Zhang, Q., Xiang, W., Liu, J., Melton, A., Sheppard, D., Chapman, H.A., Bluestone, J.A., Derynck, R.** 2014. Innate antiviral host defense attenuates TGF-beta function through IRF3-mediated suppression of Smad signaling. *Mol Cell* **56** (6): 723-737.
- Zaccane, P., Burton, O., Miller, N., Jones, F.M., Dunne, D.W., Cooke, A.** 2009. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *Eur J Immunol* **39** (4): 1098-1107.
- Zeuthen, L.H., Fink, L.N., Frokiaer, H.** 2008. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology* **123** (2): 197-208.
- Zhang, N., Bevan, M.J.** 2012. TGF-beta signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. *Nat Immunol* **13** (7): 667-673.
- Zhang, N., Bevan, M.J.** 2013. Transforming growth factor-beta signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity* **39** (4): 687-696.

Desempeño de un sistema fotovoltaico autónomo frente a condiciones medioambientales de una región en particular

Edgar Darío Obando-Paredes*, Rubiel Vargas-Cañas

Departamento de Física, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

Resumen

Este artículo presenta un método de modelado, simulación e implementación de un sistema fotovoltaico autónomo. El modelo está basado en un circuito equivalente del panel fotovoltaico; teniendo en cuenta la interacción de éste con los elementos que componen el sistema y con los parámetros medioambientales (radiación solar, velocidad del viento y temperatura ambiente) que influyen en su funcionamiento. Este circuito equivalente está descrito en términos de fotocorriente, un diodo, una resistencia en serie y una resistencia de juntura. La simulación del desempeño de este modelo se realiza teniendo en cuenta parámetros medioambientales recolectados en un periodo de un año y se valida comparando sus resultados con los de un modelo experimental. Los resultados obtenidos son comparables entre sí en términos de potencia.

Palabras Clave: panel fotovoltaico, radiación solar, Sistema Fotovoltaico, Modelo de sistema fotovoltaico.

Performance of an autonomous photovoltaic system due to environmental conditions of a particular region

Abstract

This paper presents a method of modelling, simulation and implementation of a stand-alone photovoltaic system. This model is based on the elements of an equivalent circuit of photovoltaic panel keeping in mind the interaction with elements of the system and environmental parameters (irradiation, temperature). The equivalent circuit is described in terms of photocurrent, a diode, a series resistor and a resistance shunt. The performance simulation this model are done taking into account environmental parameters collected over a period of one year and is validated with an experimental model which was built and comparable results were obtained in terms of power.

Key words: Photovoltaic panel, solar radiation, Stand-alone photovoltaic system, Matlab.

Introducción

El departamento del Cauca ocupa el primer lugar a nivel nacional en problemas de cobertura de energía eléctrica, representados en el número de viviendas sin electrificar; con un número aproximado de 47.955 viviendas sin servicio, le sigue La Guajira con 36.408, Córdoba con 34.173 y Antioquia con 30.599 (Colombia, Upme, 2014). Desde el punto de vista departamental, los municipios que presentan mayor número de viviendas que no pertenecen al Sistema Interconectado Nacional (SIN) son: Caldono con aproximadamente 4.214, El Tambo con 4.156, La Vega con 1.114, Bolívar con 2.882, mientras que en Popayán, su capital hay 114 viviendas sin el servicio de electricidad. Es en este punto donde el uso de fuentes no convencionales de energía renovables (FN CER) surge como una alternativa de conexión y generación de electricidad, planteando una nueva forma en el manejo, masificación e implementación de sistemas energéticos. Este es el caso de la energía solar fotovoltaica, donde se aprovecha directamente la radiación incidente del Sol para generar electricidad. Se prevé que con el estudio y apropiación de las técnicas de implementación

de sistemas basados en energía solar y en fuentes renovables de energía, éstas podrían proveer las tres quintas partes de mercado de la electricidad del mundo disminuyendo en dos quintas partes el mercado de los combustibles y reduciendo de la misma manera la huella de carbono (IRENA, 2011).

La energía solar fotovoltaica, ha sido ampliamente estudiada, países como Canadá, Brasil, Algeria, España, Alemania, India y Japón (Verma S, Verma H. K., Md. Mohiddin K, 2011; Semaoui S, Hadj Arab A, Bacha S. Azoui B, 2013; Krismadinata, N. Rahima H, Jeyraj Selvaraja, 2013; Cibira G, Koščová M, 2014; Salmi T, Bouzguenda M, Gastli A, Masmoudi, 2012; Qi Chen, Ming Zhu, 2012; I.H. Altas, and A.M. Sharaf, 2007), quienes han sido pioneros en el estudio de implementación de sistemas fotovoltaicos para producción de energía eléctrica. En estos estudios se ha llegado a modelos de desempeño entre los que cabe destacar:

*Correspondencia:

Edgar Darío Obando-Paredes, dariobando@unicauca.edu.co

Recibido: 12 de noviembre de 2015

Aceptado: 23 de noviembre de 2015

el modelo de desempeño Duffie & Beckman (Duffie J, Beckman W.A, 1980), modelo de desempeño King (D.L. King, W.E. Boyson, J.A. Kratochvill, 2004) y Modelo de desempeño Masters (Masters G, 2004), los que demuestran la relación directa entre variables medioambientales (radiación solar, temperatura ambiente, velocidad del viento) y la producción de electricidad en términos de índice de desempeño. En Colombia el grupo de Materiales Semiconductores y Energía Solar de la Universidad Nacional de Colombia ha estudiado e implementado sistemas fotovoltaicos midiendo la potencia entregada por estos en diferentes regiones del país, estudiando el desempeño en términos de electricidad en dichas regiones teniendo en cuenta variables propias, permitiendo y abriendo camino para la investigación aplicada en la validación de modelos físicos que representen el comportamiento real del panel fotovoltaico ante condiciones medioambientales específicas (Gordillo G & L Angulo, 1992). En contraparte, en este trabajo se muestra el desempeño de un sistema fotovoltaico teniendo en cuenta las variables medioambientales que definen una región (radiación solar, velocidad del viento y temperatura ambiente), en trabajos anteriores no se había considerado en el desempeño final el efecto de considerar la velocidad del viento. Hasta la fecha de revisión bibliográfica no se encontró estudio del comportamiento energético de sistemas fotovoltaicos en términos de potencia entregada en la ciudad de Popayán ni en el departamento del Cauca.

Este trabajo muestra un estudio de la generación de potencia eléctrica en base a un modelo matemático que describe las propiedades eléctricas (corriente, voltaje, resistencia) de un sistema fotovoltaico, dependiendo directamente de variables medio ambientales (radiación solar, temperatura ambiente y velocidad del viento) propias del municipio de Popayán. Este estudio se llevó a cabo en dos etapas: en la primera etapa se midieron, continuamente, la variables medioambientales y se simularon los resultados de potencia entregada por un sistema fotovoltaico basado en un modelo matemático; en la segunda etapa se validaron los resultados de la simulación implementando un prototipo experimental con miras a ajustar el modelo teórico.

El resto de este documento se organiza de la siguiente manera: en primer lugar, se realiza una breve revisión de los sistemas fotovoltaicos, clasificándolos teniendo en cuenta la etapa de almacenamiento, la región de implementación del sistema, las variables medioambientales que se adquirieron y los diferentes modelos matemáticos que se utilizan para evaluar el desempeño de un arreglo fotovoltaico en términos de potencia. Luego se presenta una descripción del diseño del prototipo instalado y su funcionamiento, la simulación del modelo teórico y su comparación con los resultados arrojados por el prototipo. Finalmente se realiza ajustes al modelo teórico, con el fin de minimizar el error obtenido y hacerlo más cercano a la realidad, al tener en cuenta variables medioambientales tales como la velocidad del viento la cual no es de uso común en los modelos matemáticos tradicionales.

Metodología

Con el fin de plantear un modelo matemático que pueda predecir el comportamiento energético de un sistema fotovoltaico a partir de las condiciones medioambientales específicas de un lugar se realizó un circuito equivalente en términos de variables eléctricas, teniendo en cuenta el modelado de un diodo. Paralelamente, se llevó a cabo la medición de las variables medioambientales como temperatura, radiación, y velocidad del viento. Posteriormente se simula el desempeño arrojado por el modelo matemático, después de realizada la simulación, se implementó un prototipo para validar los resultados obtenidos en la simulación y así ajustar el modelo al comportamiento real.

Región de implementación

El lugar de estudio fue la ciudad de Popayán, ubicada en el centro del departamento del Cauca (Suroccidente colombiano, 2° 26' 49" N, 76° 35' 49" W, 1750 m.s.n.m). Popayán es una ciudad histórica por excelencia con un clima templado y temperatura promedio de 20°C, condiciones meteorológicas variables entre clima seco y lluvias. La radiación solar en la zona oscila entre 4.0 y 4.5 Kwh/m² promedio multianual, como lo muestra la Figura 1S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSupFile/301/1268>.

Tipos de sistemas fotovoltaicos

El fundamento de esta metodología se consignó en la información suplementaria 1, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSupFile/301/1271>.

Modelos de desempeño

El fundamento de esta metodología se consignó en la información suplementaria 2, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSupFile/301/1272>. Figura 2S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSupFile/301/1269>.

Implementación del sistema fotovoltaico autónomo

Para el estudio de la potencia entregada por un sistema fotovoltaico bajo las características medioambientales propias de la ciudad de Popayán, se implementó un prototipo de sistema fotovoltaico autónomo. Teniendo contacto directo con variables medioambientales tales como temperatura ambiente, velocidad del viento y radiación incidente. Un diagrama de bloques del prototipo de sistema autónomo se muestra en la Figura 3S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSupFile/301/1270>.

El fundamento metodológico de componentes y funcionamiento del sistema de medición se consignó en la información suplementaria 3S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSupFile/301/1273>.

Resultados

Adquisición de datos meteorológicos

Las variables medioambientales (temperatura ambiente, radiación solar, velocidad del viento), fueron censadas durante un año en la estación meteorológica ubicada en la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad del Cauca. De este periodo un 70 % de los datos fueron usados para la simulación de potencia, y un 30% correspondiente al periodo de instalación del prototipo y su posterior evaluación de rendimiento energético. Las variables ambientales sensadas, promedio diario y mensual se muestran en las Figuras 1 y 2 respectivamente.

Resultados entregados por el prototipo

Para la medición de potencia se implementa el prototipo en el mismo lugar donde está ubicada la estación meteorológica. Los datos se obtuvieron mediante la medición indirecta de potencia, calculada mediante la resistencia de carga implementada y el voltaje que resulta cada media hora. Un periodo de muestreo diario desde las 8:00 hasta las 19:00 (GMT-5:00). Los resultados para potencia medida y potencia simulada (teórica) en el intervalo diario de muestreo, se muestran en la Figura 3; comparando los resultados se encuentra un error cuadrático medio del 17%, un valor bajo teniendo en cuenta que el sistema se sobredimensiona en su implementación y posterior cálculo de potencia total, para prevenir pérdidas inherentes al sistema producidas debido al cableado, dispositivos, estado de carga e intensidad de descarga de la batería.

En la Figura 4, se muestran los resultados de potencia medida y potencia simulada, en el intervalo horario de muestreo, en este caso el error cuadrático medio es del

1,8%, considerablemente menor que en el caso diario, debido principalmente a la tasa de toma de datos entre muestras. En general, para minimizar el error cuadrático medio existente, el prototipo debe censar datos en el mismo rango y tasa que la estación meteorológica.

Teniendo en cuenta las Figuras 3-4 y el modelo matemático de la Ecuación (6S), en el cálculo de la potencia entregada por un arreglo fotovoltaico se deben tener en cuenta características como: el número de celdas interconectadas, la temperatura en la celda y corriente de saturación; parámetros de manufactura y propios de cada técnica de producción de paneles fotovoltaicos. En la aplicación de este modelo, no se tienen en cuenta variables medioambientales tales como: velocidad del viento, pluviosidad en la región, entre otros. Debido al efecto Joule presente en los cables funcionando en corriente directa se deben tener en cuenta pérdidas energéticas existentes al interconectar los dispositivos, además del estado de carga y la intensidad de descarga de la batería; para minimizar estas pérdidas se hace necesario sobredimensionar el sistema (M.S. Mahmodian, R. Rahmani, E. Taslimi, S. Mekhilef, 2012).

Ajuste del modelo utilizado, teniendo en cuenta la velocidad del viento

Al realizar la instalación de sistemas fotovoltaicos en regiones donde existe un alto índice de radiación solar, está directamente relacionado con la velocidad del viento en esas regiones puesto que la acción de rayos solares, hace que masas de aire se transporten de un lugar a otro debido a un gradiente de temperatura. Es así como se realizaron ajustes al modelo utilizado, integrando la Ecuación (8S) al modelo eléctrico inicial, se llega a la expresión que

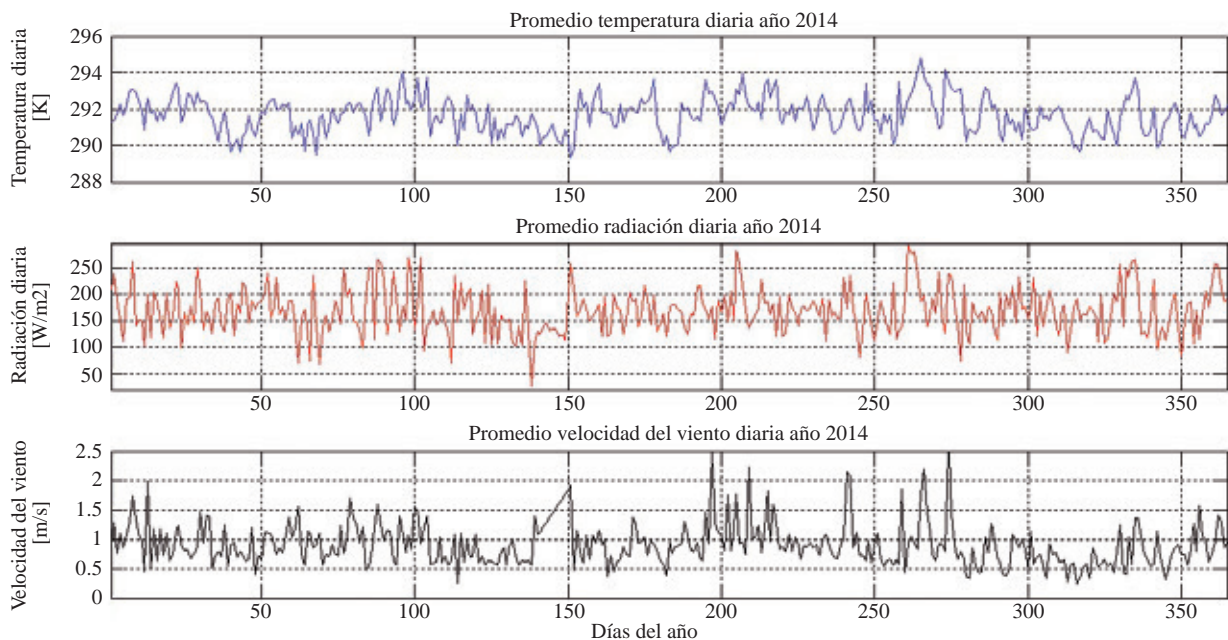


Figura 1. Variables medioambientales promedio diario año 2014 en la ciudad de Popayán.

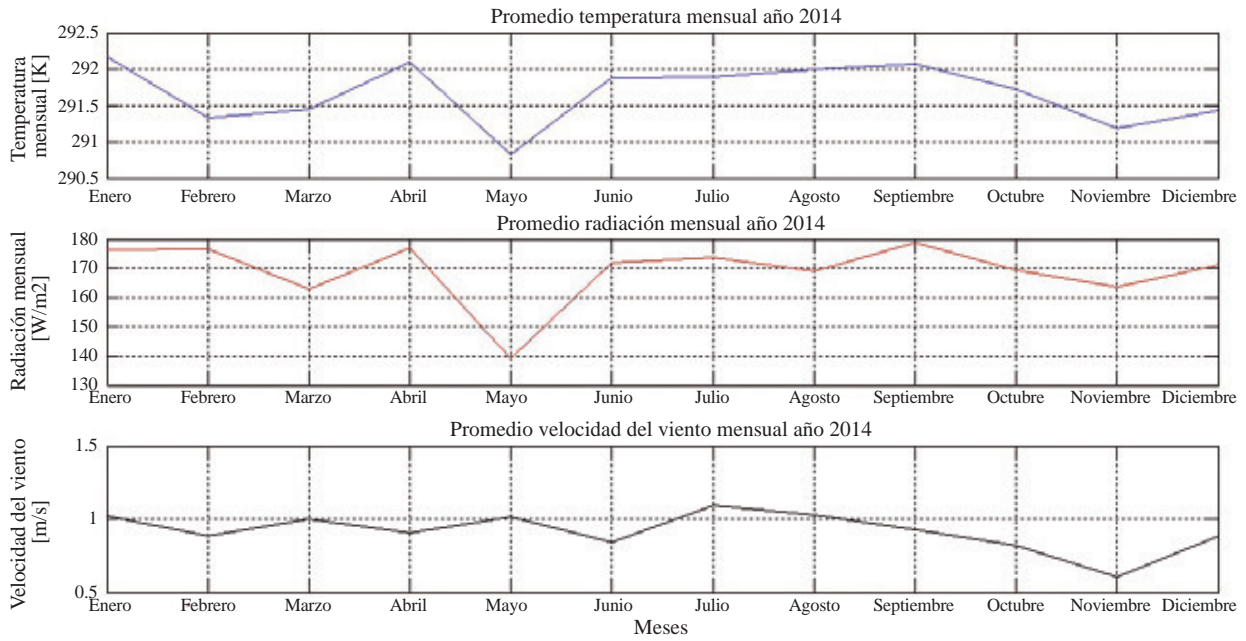


Figura 2. Variables medioambientales promedio mensual año 2014 en la ciudad de Popayán.

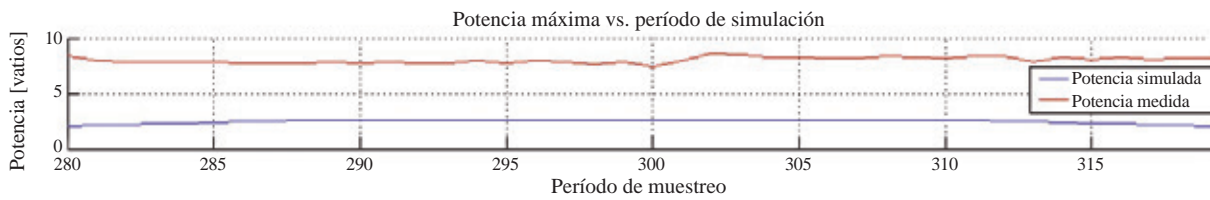


Figura 3. Potencia simulada vs Potencia medida para el periodo de muestreo.

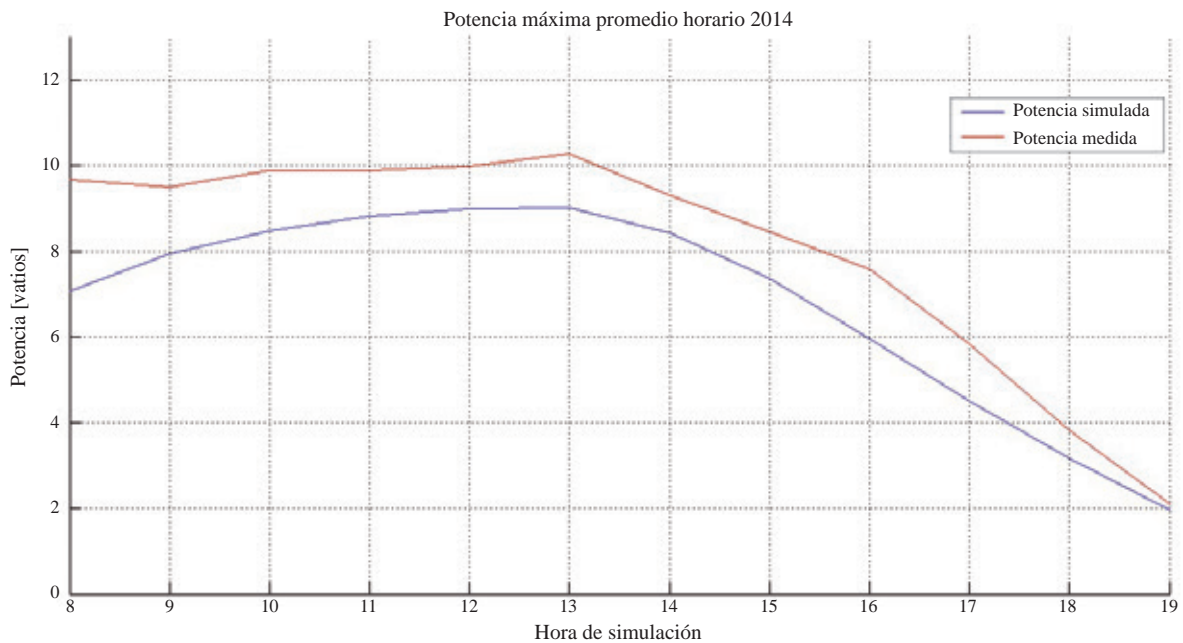


Figura 4. Potencia simulada vs Potencia medida por horas de muestreo.

relaciona las tres variables medioambientales: radiación solar G , velocidad del viento V y temperatura T , representado en la Ecuación 1, en aras de lograr un mejor desempeño en términos de potencia entregada por hora, presentado en la Figura 5. Este ajuste muestra aumento en el error cuadrático medio, pasando de 1.8% a 1.9%, el aumento de este error, se debe a la asignación de los coeficientes a y b en la Ecuación final, parámetros dados por el fabricante y que dependen exclusivamente de las condiciones en que se hayan efectuado las medidas (M.S. Mahmodian, et al., 2012). En cambio la potencia entregada final aumenta aproximadamente un 30% al integrar la velocidad del viento en el modelo utilizado, pasando en promedio de entregar 8.25 Vatios a entregar 11.04 vatios promedio máximo.

$$P = V \left[N_p * \left(\left((I_{scr} + K_i * (T_c - T_{ref})) * \frac{G}{1000} \right) - I_{rr} * \left(e^{\left(\frac{q * V}{N_s * k * (G_T * \{e^{a+b*V}\} + T_a) + \frac{G_T}{G_{ref}} \Delta T \right) * A} \right) - 1 \right) \right] \quad (1)$$

Los resultados de desempeño simulado y medido por días, presenta un comportamiento similar, teniendo un aumento de cerca del 37% si se considera la velocidad del viento; pasando de 3.97 vatios a 7.64 vatios en promedio máximo. La Figura 6, muestra la potencia teniendo en cuenta la velocidad del viento y las variables medioambientales consideradas anteriormente. En este punto cabe resaltar que el error cuadrático medio disminuyó a un 3,9%, que de acuerdo al modelo de desempeño King, et al., es aceptable, puesto que usando este modelo se presenta

una diferencia de exactitud en un intervalo de entre 2,4% y 5,4% (D.L. King, et al., 2004).

En las Figuras 7 y 8 se muestran la comparación de desempeño entre los modelos teóricos existentes para el periodo de muestreo, tanto horario como diario. De estas graficas se infiere que el desempeño aumenta al tener en cuenta la velocidad del viento en el modelo puesto que de acuerdo con la Ecuación (8S), existe una relación directa entre la temperatura de la celda, T_c , dependiente del viento y la radiación incidente. Hay que tener en cuenta la velocidad de recombinación electro-hueco que depende directamente de la temperatura a la que se encuentra el sustrato.

Conclusiones

En este artículo, se desarrolló un método para determinar la potencia entregada por un sistema fotovoltaico autónomo, instalado en la ciudad de Popayán. El modelo recomendado a utilizar para el cálculo de potencia, depende directamente de factores medioambientales y características propias de la manufactura y técnica de producción de los módulos fotovoltaicos. Este modelo fue simulado y validado experimentalmente, implementando un prototipo de sistema fotovoltaico autónomo. Como resultado de esta implementación y simulación se compararon los valores de potencia arrojados por el prototipo con los valores de potencia simulados, encontrando una relación existente entre algunas variables medioambientales y eléctricas que no se consideran en el modelo matemático, como la velocidad del viento, pero considerada indirectamente en la medida de potencia final por el prototipo. Para el cálculo de potencia se reajustó el modelo teniendo en cuenta la velocidad del viento,

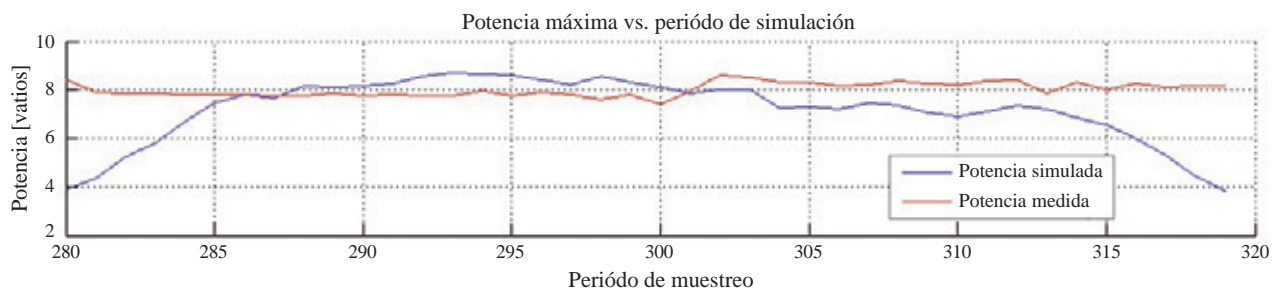


Figura 5. Potencia simulada vs Potencia medida por horas de muestreo, teniendo en cuenta la velocidad del viento.

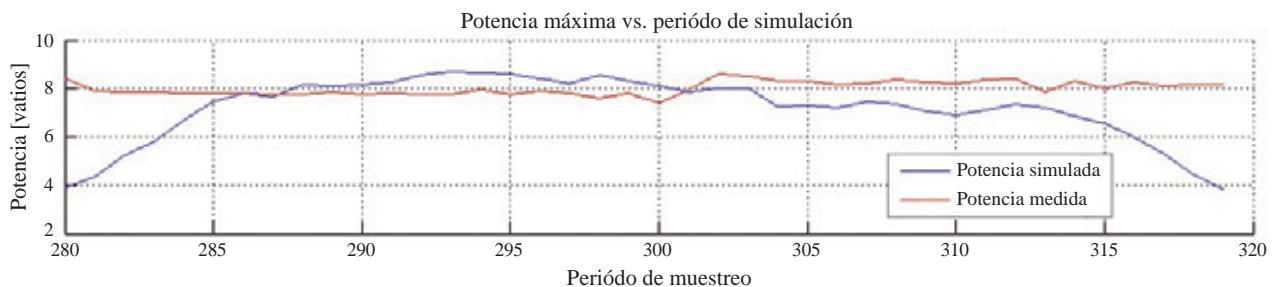


Figura 6. Potencia simulada vs Potencia medida para el periodo de muestreo, teniendo en cuenta la velocidad del viento.

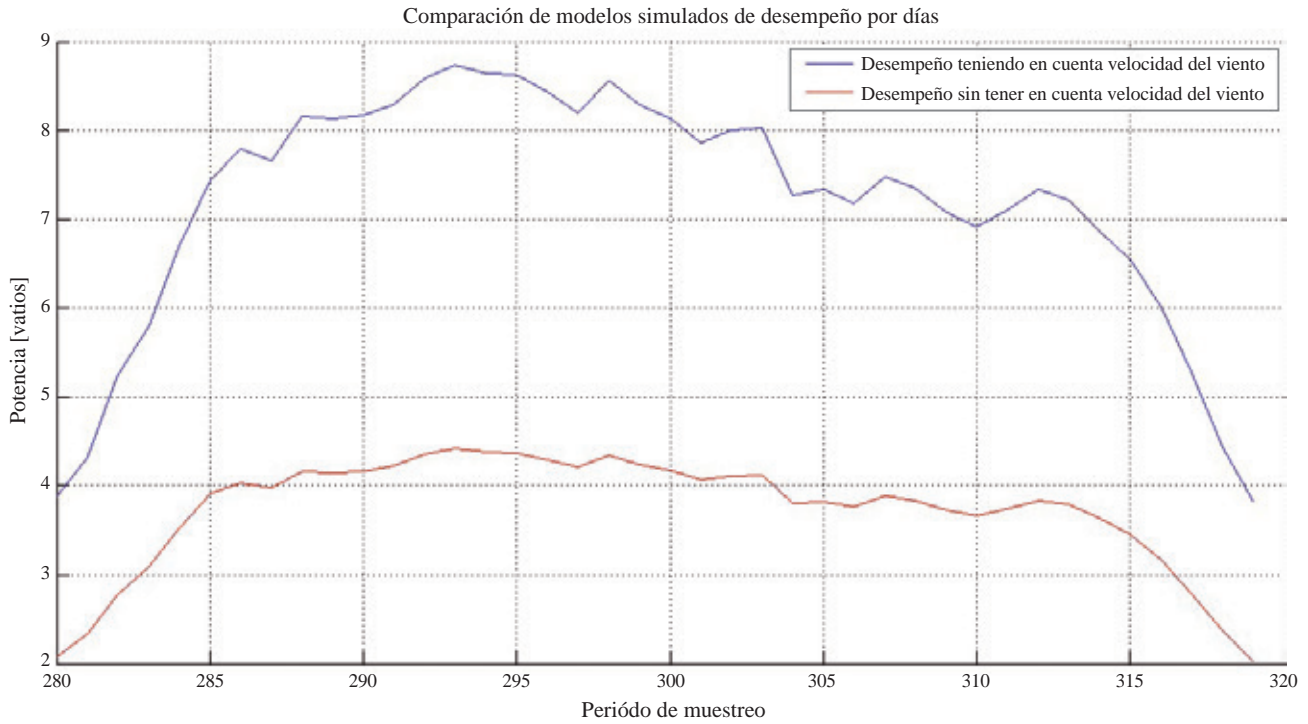


Figura 7. Comparación de desempeño al tener en cuenta velocidad del viento, en el periodo de muestreo.

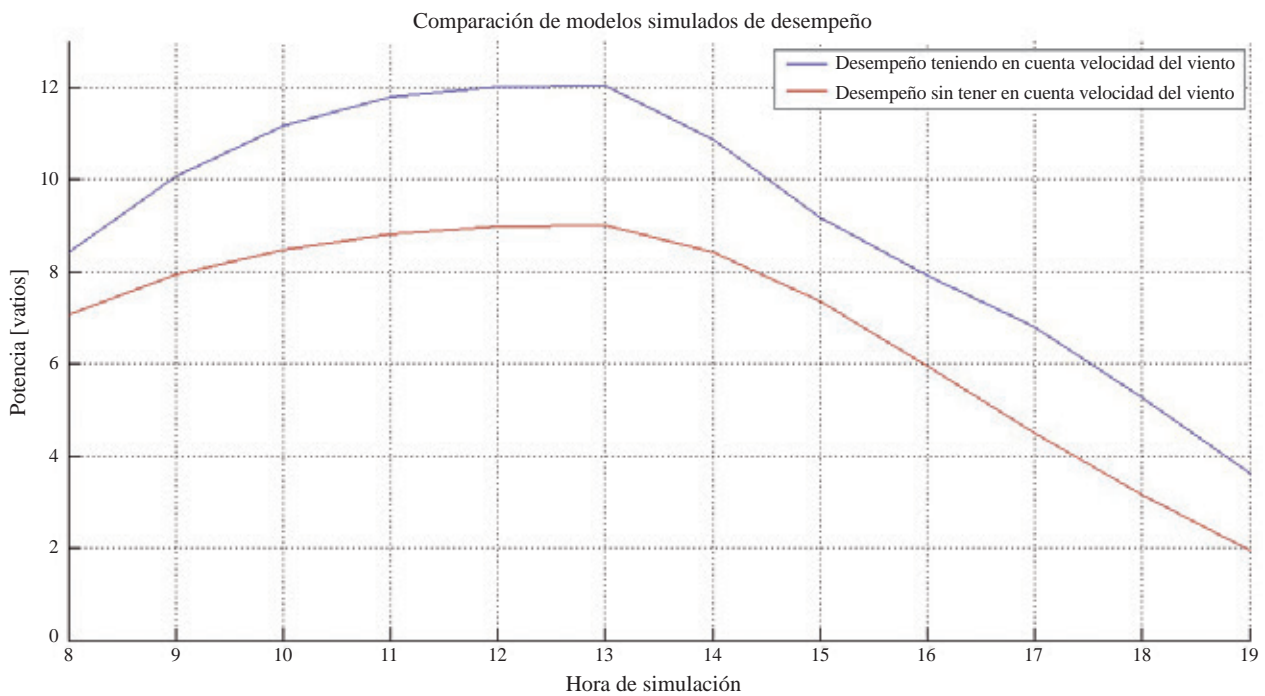


Figura 8. Comparación de desempeño al tener en cuenta velocidad del viento, por horas de muestreo.

puesto que trabajos anteriores solo consideran un modelo matemático dependiente de la temperatura y la radiación; en este trabajo se integra las tres variables medioambientales necesarias para definir una región geográfica en particular.

Para estudios posteriores se recomienda el modelado de fuentes no renovables de energía a gran escala debido a que proporciona herramientas para un óptimo diseño y procesos eficientes de gestión energética.

Información suplementaria

Información suplementaria 1: Tipos de sistemas fotovoltaicos.

Información suplementaria 2: Modelos de desempeño.

Información suplementaria 3: Componentes del prototipo implementado.

Figura 1S. Mapa radiación solar departamento del Cauca (Colombia, UPME, 2005).

Figura 2S. Circuito Equivalente celda solar

Figura 3S. Prototipo sistema fotovoltaico autónomo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Ingeniero Luis Jorge Gonzales por su infinita colaboración en el préstamo de las instalaciones de la estación meteorológica de la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad del Cauca, al señor Tirso Mazabuel, Jefe del laboratorio de Electrónica de la Facultad de Ingeniería Electrónica y Telecomunicaciones de la Universidad del Cauca, al Ingeniero Ricardo Muñoz y al Ingeniero Carlos Felipe Rengifo docente de la Facultad de Ingeniería Electrónica y Telecomunicaciones de la Universidad del Cauca.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Cibira G & Koščová M.** (2014). Photovoltaic module parameters acquisition model. *Applied Surface Science*. **312**: 74-80.
- Colombia. Ministerio de Minas y energía.** Ley 1715 de 2014 sobre integración de Fuentes no convencionales de energía renovable al sistema interconectado nacional.
- Colombia. Unidad de Planeación Minero Energética -UPME.** (2005). Atlas Radiación Solar. http://www.upme.gov.co/Docs/Atlas_Radiacion_Solar/1-Atlas_Radiacion_Solar.pdf.
- Colombia. Unidad de Planeación Minero Energética UPME.** (2014). Cobertura Energética Versión preliminar a 2014 en Colombia. www.upme.gov.co/Docs/PIEC/PIEC_UPME_2010_2014_Prelimar.pdf.
- Colombia. Unidad de Planeación minero energética-UPME.** (2014). Integración de las energías renovables no convencionales en Colombia, CONVENIO ATN/FM-12825-CO. La Imprenta Editores S.A. 2015 P:99-101.
- Duffie J, Beckman W.A.** (1980). *Solar Engineering of Thermal Processes*. Wisconsin. Jhon Willey & Sons.
- Gordillo G & L Angulo.** (1992). Desarrollo de un sistema de monitoreo de módulos fotovoltaicos. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- I.H. Altas, & A.M. Sharaf.** (2007). A photovoltaic array simulation model for Matlab-Simulink GUI environment, International Conference on Clean Electrical Power ICCEP'07, Capri, pp. 341-345.
- IRENA** (2011). Opportunities for Economic Value Creation along the Solar and Wind Value Chain, Multilateral Working Group on Solar and Wind Energy Technologies, MWG Solar & Wind.
- Jäger K, Isabella O, H.M. Smets A, Van Swaaij R & Zeman M.** (2014). *Solar Energy Fundamentals, Technology, and Systems*. (p.p.28-35) Delft: Delft University of Technology.
- Kalogirou, S.** (2009). *Solar energy engineering: processes and systems*. (3 ed.). United Kingdom: Elsevier Book AID International.
- King D.L, Boyson W.E & Kratochvill J.A.** (2004) Photovoltaic Array Performance Model, *Sandia report SAND2004-3535*.
- Krismadinata, N. Rahima H & Jeyraj Selvaraja.** (2013). Photovoltaic module modeling using simulink/matlab. *Procedia Environmental Sciences* (17): 537-546.
- Labouret, Viloz M.** (2009). *Solar Photovoltaic Energy*. The Institution of Engineering and Technology of United Kingdom.
- Mahmodian MS, Rahmani R, Taslimi E, Mekhilef S.** 2012. Step By Step Analyzing, Modeling and Simulation of Single and Double Array PV system in Different Environmental Variability. International Conference on Future Environment and Energy IPCBEE **28**: 37-42.
- Masters G.** *Renewable and Efficient Electric Power Systems* 2004 (4. Ed). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Qi Chen, Ming Zhu.** (2012). Photovoltaic Module Simulink Model for a Stand-alone PV System. *Physics Procedia* (24): 94-100.
- Salmi T, Bouzguenda M, Gastli A & Masmoudi A.** (2012). MATLAB/Simulink Based Modelling of Solar Photovoltaic Cell. *International Journal of Renewable Energy Research*, **2** (2): 213-218.
- Semaoui S, Hadj Arab A, Bacha S & Azoui B.** (2013). Optimal Sizing of a Standalone photovoltaic system with energy management in isolated areas. *Elsevier-Energy Procedia* **36**: 358-368.
- Verma S, Verma H. K & Md. Mohiddin K.** (2011). Modeling & analysis of standalone photovoltaic System. *Ijret: International Journal of Research in Engineering and Technology*. **02** (11): 259-265.

Correlación difusiva de la corriente de espín y electrones itinerantes en sistemas magnéticos confinados

Hernán Vivas-Calderón

Departamento de Física, Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Colombia

Resumen

La interacción de las ondas de espín y los portadores electrónicos en un medio magnético es descrita desde la aproximación semiclásica de Landau-Lifshitz-Gilbert-Bazaliy (LLGB), adaptando el formalismo del propagador de difusión en sistemas infinitamente extendidos y confinados. La corrección estática y termodinámica de las fluctuaciones transversales en la susceptibilidad magnética es obtenida en términos de la densidad de corriente de portadores de carga J_e y la intensidad del campo magnético externo H_{oz} , encontrándose una relación crítica del tipo $J_e \sim H_{oz}^{1/2}$ en sistemas unidimensionales. La respuesta de la distribución de la densidad de portadores de espín en función de J_e , así como su correlación con la corriente de espín (J_s) en estado estacionario, son discutidas para diferentes valores del campo aplicado y la diferencia de fase en la magnetización sobre las fronteras. El diagrama de fases asociado al tiempo de vida medio de la emisión de ondas de espín estimuladas térmicamente es calculado. El *rôle* del factor del Gilbert en la estabilidad térmica de los estados de ondas de espín es analizado cuantitativamente en este escenario.

Palabras claves: ondas de espín, densidad de corriente, propagador difusivo.

Diffusive Correlation for Spin Current and Itinerant Electrons in Confined Magnetic Systems

Abstract

Spin waves - electron carrier interaction in a magnetic medium is described from the Landau-Lifshitz-Gilbert-Bazaliy (LLGB) approximation, by adapting the diffusion propagator formalism on both infinitely extended and confined systems. The static and thermal correction due to the transverse fluctuations on the magnetic susceptibility are obtained in terms of the carrier density current J_e and the externally applied field H_{oz} , providing a critical relationship giving by $J_e \sim H_{oz}^{1/2}$, which is valid for 1D systems. The spin density distribution response as a function of J_e , as well as its correlation with the spin current (J_s) in steady state, are discussed for different values of the applied field and boundary magnetization phase difference. Average lifetime phase diagram for thermally stimulated spin waves is also calculated. The Gilbert factor *rôle* on the thermal stability for the spin waves states is also quantitatively analyzed in this scenario.

Key words: Spin waves, current density, diffusive propagator.

Introducción

La *espintrónica* puede considerarse como un área interdisciplinaria muy activa que estudia las características singulares en la transferencia, transporte y acumulación del flujo de electrones con espín polarizado (Žutić I. et-al, 2004). El estudio de la fenomenología asociada a la interacción de espines electrónicos itinerantes en un medio magnéticamente ordenado ha ganado especial relevancia en la última década, aunque existen desarrollos teóricos importantes reportados desde los años 60 (Kondo J., 1964), (Hertz J., 1973), (Berger L., 1996). La interacción mínima entre espines de diferentes especies es usualmente descrita a través del Hamiltoniano *s-d*, propuesto por Anderson (Anderson P., 1961) y definido por:

$$\hat{\mathcal{H}} = -\mathcal{A}\mathbf{s} \cdot \mathbf{S}, \quad (1)$$

en donde \mathbf{s} (\mathbf{S}) corresponde al operador de espín de los electrones itinerantes (localizados) en el sistema, y \mathcal{A} es una constante de acople. En el marco de la aproximación semiclásica, estos operadores toman los respectivos valores del momento de espín promedio (o densidad de

espín electrónico) $\bar{\mu} = \langle \mathbf{s} \rangle$ y $\bar{\mathbf{S}} \equiv \mathbf{SM}/M_0$, en donde M_0 es el máximo valor de la magnetización del sistema. En particular, el estudio de los fenómenos de contacto en la interfaz de una configuración de un metal no magnético (N) y un ferromagneto (F), bajo la acción de una corriente inducida de espín desde (F) hacia (N) en el régimen de microondas, ha captado la atención de los investigadores en años recientes, dado que este tipo de arreglo permite inferir la relación entre corrientes de diferente naturaleza: la de portadores de carga y la de portadores del espín. Mencionaremos algunos casos específicos. La distribución espacial de la corriente de espín inyectada desde un sistema (YIG) hacia un metal (Pt) puede medirse utilizando técnicas propias del efecto Hall de espín inverso (ISHE) (Maekawa S., et-al, 2013). La correlación entre la densidad de corriente de carga J_C y la corriente de espín inyectada en sistemas de tricapa del tipo Pd/Al/Ni₈₀Fe₂₀

Correspondencia:

Hernán Vivas-Calderón, hvivasc@unal.edu.co

Recibido: 12 de octubre de 2015

Aceptado: 15 de febrero de 2016

también ha sido confirmada (Kitamura Y., et-al, 2013). En este caso, la precesión del campo de magnetización en la película ferromagnética genera una densidad de corriente de espín J_S en el conductor metálico (Al). La densidad de corriente de portadores de carga medida en el Paladio (Pd) es producida por J_S vía ISHE. Ondas de espín inducidas en películas de CoFe/Pd-Cu han sido caracterizadas utilizando la técnica de dispersión de Brillouin μ -BLS (Madami M., et-al, 2011); y previamente, en un experimento de Resonancia del Espín Electrónico (ESR) en multicapas de (Co/Cu) $_N$, considerado en ese entonces como una demostración realizable de la generación controlada de ondas de espín por emisión de radiación (SWASER) en el rango de 40 a 60 GHz (Tsoi M., 2000). La observación directa del espectro de la radiación direccional del tipo BLS desde un arreglo de multicapas de CuPyCuCo₇₀Fe₃₀Au en el intervalo de 7 a 11 GHz, constituye otra evidencia experimental del fenómeno de emisión de radiación de magnones producida por nano-osciladores (STNO) (Demidov V. E., 2010). Estos resultados incentivan la construcción de una base teórica conducente al cálculo de la respuesta de la corriente de espín en arreglos de tricapas del tipo Py/Metal/Metal (PMM), configuración en la cual se ha detectado recientemente el efecto Hall de espín inverso (Saitoh E. et-al, 2013). En este artículo se desarrollan las ecuaciones de Landau-Lifshitz-Gilbert-Bazaliy (LLGB) utilizando el formalismo del propagador de difusión y considerando la coexistencia de los fenómenos de transporte en J_e y J_S (Sección II). En la Sección (III) se discuten las propiedades de los modos de las ondas de espín en un sistema volumétrico, su longitud de coherencia, el tiempo de vida termodinámico y el propagador propio de la dinámica de las excitaciones colectivas modificadas bajo la acción de una fuente externa de corriente de portadores electrónicos de carga. En la Sección (IV) se calcula la relación de criticidad entre la corriente y la magnitud del campo externo aplicado en sistemas unidimensionales. En el apéndice (I) se presenta una solución general utilizando el método de Dirichlet para condiciones de contorno arbitrarias en la densidad de espín.

Formalismo LLGB: análisis en estado estacionario

La ecuación generalizada de continuidad para la corriente de difusión del espín itinerante contiene una contribución del tipo torque $\mathbf{T} \propto \vec{\mu} \times \mathbf{M}$ sobre la evolución dinámica del campo \mathbf{M} en un ferromagneto. Esta evolución es descrita desde la ecuación de Landau modificada, introduciendo los efectos de la interacción de la densidad de espín electrónico $\vec{\mu}$ sobre \mathbf{M} (Zhang S., Li Z., 2010). Explícitamente:

$$\frac{\partial \mathbf{M}}{\partial t} = -\gamma \mathbf{M} \times \mathbf{H}_{eff} + \frac{\alpha}{M_0} \mathbf{M} \times \frac{\partial \mathbf{M}}{\partial t} + \mathbf{T}, \quad (2)$$

en donde \mathbf{H}_{eff} corresponde al campo magnético efectivo del tipo: $\mathbf{H}_{eff} \approx \mathbf{H}_0 + 2J\gamma^{-2} (\mathcal{K} + a_m^2 \nabla^2) \mathbf{M}$; \mathcal{K} como el número de sitios más cercanos al punto \mathbf{x} en donde se cal-

cula la magnetización instantánea $\mathbf{M}(\mathbf{x}, t)$, a_m es el valor medio del parámetro de red del sistema magnético y J define la interacción de intercambio entre primeros sitios (Phillips T. G., Rosemberg H. M., 1966). Estos términos son convenientemente normalizados a una constante de difusión del campo de magnetización $\mathcal{D}(J) = 2JM_0a_m^5/\hbar^2\gamma^2$. \mathbf{H}_0 denota el campo magnético externo aplicado. El término que contiene el factor α introduce el efecto de atenuación sobre $\mathbf{M}(\mathbf{x}, t)$ (Gilbert T. L., 2004). El torque inducido \mathbf{T} en la geometría particular ilustrada en la Figura (1) se reduce a (Bazaliy Ya et-al, 1998), (Li Z., 2006), (Zhang S., 2009):

$$\mathbf{T} = -\frac{b_{J_e}}{M_0^2} \mathbf{M} \times \left(\mathbf{M} \times \frac{\partial \mathbf{M}}{\partial z} \right) - \frac{c_{J_e}}{M_0} \mathbf{M} \times \frac{\partial \mathbf{M}}{\partial z}, \quad (3)$$

en donde los parámetros $b_{J_e} = \mu_B J_e / e M_0 D_0$ y $c_{J_e} = (\tau_{ex} / \tau_{SF}) b_{J_e}$ son directamente proporcionales a la magnitud de la densidad de corriente de conducción en la dirección Z: $\mathbf{J}_e = J_e \hat{\mathbf{z}}$. El factor τ_{SF} es tomado como el tiempo de relajación del espín localizado (*spin flip*), τ_{ex} es un parámetro característico del orden del inverso de la magnitud del acople entre los espines itinerantes y localizados \hbar / A [Ec. (1)], mientras que la densidad de corriente de espín J_S está relacionada con $\vec{\mu}$ a través de la ecuación de difusión de Fick: $\mathbf{J}_\mu^v = -D_0 \nabla \mu^v$. La solución para $\vec{\mu}$ en la representación de las coordenadas circulares $\mu^\pm = \mu^X \pm i\mu^Y$, puede obtenerse desde la expresión:

$$D_0 \nabla^2 \vec{\mu} - \frac{1}{\tau_{ex} M_0} \vec{\mu} \times \mathbf{M} - \frac{1}{\tau_{SF}} \vec{\mu} = -\frac{\mu_B}{e M_0} (\mathbf{J}_e \cdot \nabla) \mathbf{M},$$

y en el caso unidimensional:

$$\frac{\partial^2 \mu^\pm}{\partial z^2} + \kappa_{1,2}^2 \mu^\pm = D_0^{-1} H_{J_e}^\pm, \quad (4)$$

con $m^\pm = m^X \pm im^Y$,

$$H_{J_e}^\pm = \frac{n_0}{M_0} \frac{\partial m^\pm}{\partial t} - \frac{\mu_B J_e}{e M_0 D_0} \frac{\partial m^\pm}{\partial z}, \quad 0 < z < \ell, \quad (5)$$

y $\mathbf{M}(\mathbf{x}, t) = M_0 \hat{\mathbf{z}} + \mathbf{m}(\mathbf{x}, t)$. El parámetro n_0 corresponde a la densidad de electrones, mientras que los valores de los coeficientes κ_i están definidos por:

$$\kappa_{1,2} = \left[\pm i D_0^{-1} \left(\tau_{ex}^{-1} \pm i \tau_{SF}^{-1} \right) \right]^{1/2}. \quad (6)$$

El término $\partial^2 \mu^\pm / \partial z^2$ es relevante en el caso en el cual se considera la dimensión de la pared de dominio suficientemente pequeña comparada con la longitud de difusión κ^{-1} , o cuando existen cambios abruptos de la magnetización en las interfaces en un sistema de multicapas. Los dos términos en la ecuación (5) pueden reconocerse directamente: el primero corresponde a las fluctuaciones temporales del campo m^\pm y el segundo está asociado su variación espacial. Centraremos inicialmente nuestro

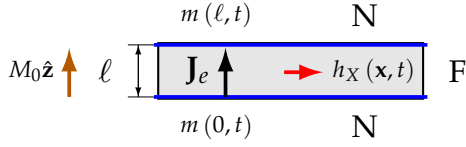


Figura 1. Sistema de una película ferromagnética (F) en contacto con electrodos metálicos no magnéticos (N). La dinámica del campo de magnetización en la región (F) inyecta corrientes de espín en (N) vía interacción del tipo $s - d$ en las interfaces.

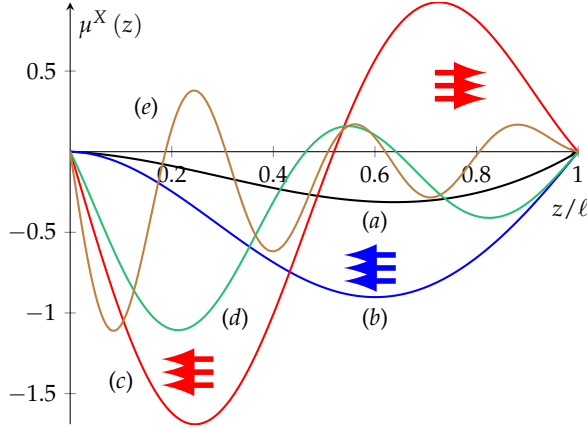


Figura 2. Distribución espacial de la densidad de espín electrónico $\mu^X \equiv \text{Re}\{\mu^+\}$ con J_e/J_{e0} dado por (a) 1, (b) 2, (c) 3.5, (d) 5 y (e) 10. El campo magnético aplicado se define por $h_0 = \tau_{SF}\gamma x^{-1}H_0 = 5$ y la diferencia de fase en los planos $z = 0$ y $z = \ell$ de la película es $\Delta\phi = \pi$. La densidad de espín en los planos de contacto es cero. El parámetro $x = m_0/M_0$ define la relación de las amplitudes de la magnetización en el plano XY y perpendicular al mismo.

análisis en la condición $\partial m^\pm / \partial t \rightarrow 0$, o en forma equivalente, bajo la consideración en la cual la dinámica de la magnetización es mucho más lenta que aquella asociada a la de los portadores electrónicos de transporte de carga. Las Figuras (2) y (3) ilustran las distribuciones de la densidad de espín para diferentes valores de la corriente de conducción J_e/J_{S0} y un valor fijo del campo magnético aplicado. El régimen de estado estacionario para el campo de magnetización puede interpretarse como la condición intrínseca de equilibrio que existe entre el torque magnético inducido por la corriente aplicada, \mathbf{T}_e , y el torque producido por la combinación del campo magnético externo y las fluctuaciones asociadas a la interacción de intercambio. En términos explícitos, $\mathbf{T}_e = \gamma \mathbf{M} \times \mathbf{H}_{eff}$. La acumulación de la densidad de portadores de espín μ^\pm en las superficies se toman iguales a cero en primera instancia, aunque generalizaciones basadas en el criterio de irreversibilidad termodinámica han sido desarrolladas para interfaces en contacto del tipo F/F, F/N y N/N (Sears M. R., 2012). Existe un valor crítico de la corriente aplicada entre $2.0 < J_e/J_{e0} < 3.5$ para el cual emerge un cambio en la orientación relativa de la densidad del es-

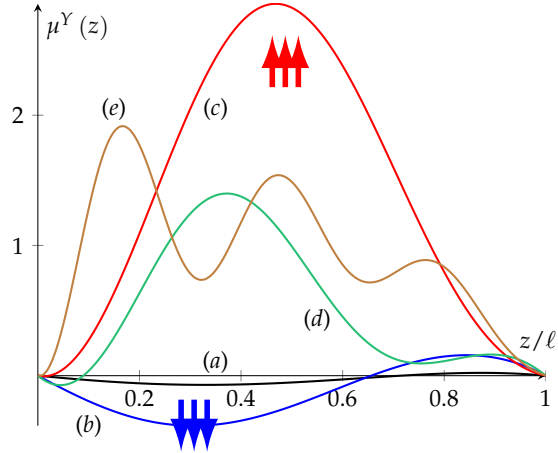


Figura 3. Distribución espacial de la densidad de espín electrónico $\mu^Y \equiv \text{Im}\{\mu^+\}$ con J_e/J_{e0} dado por (a) 1, (b) 2, (c) 3.5, (d) 5 y (e) 10. $h_0 = \tau_{SF}\gamma x^{-1}H_0 = 5$, $\Delta\phi = \pi$.

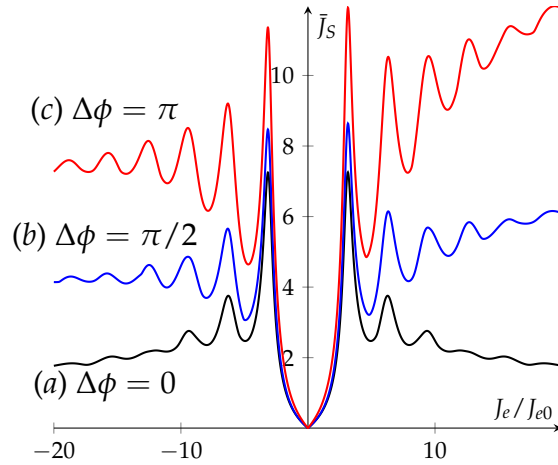


Figura 4. Valor medio de la corriente de espín \bar{J}_S en función de la corriente de carga J_e con $\mathcal{D}(J) \tau_{SF} / \ell^2 = 0.5$ y de fases relativas $\Delta\phi$. Las corrientes están normalizadas en los parámetros: $\bar{J}_S = J_S / J_{S0}$, $J_{S0} = D_0 n_0 / \ell$. El campo exterior se define por $h_0 = \tau_{SF}\gamma x^{-1}H_0 = 5$.

pín electrónico [curvas (c)], mientras que un incremento en J_e genera un patrón cuasiperiódico con longitud de onda $\lambda_\mu(J_e)$ el cual afecta el gradiente de la densidad del espín electrónico $\nabla \mu^\nu$, y a su vez, la corriente de espín J_μ^ν . En el rango valores de $J_e \rightarrow 0$, y con campo externo aplicado cero, predomina la contribución de intercambio cuántico $2J\gamma^{-2} (\mathcal{K} + a_m^2 \nabla^2) \mathbf{M}$, mientras que los efectos de transporte electrónico se reflejan en las perturbaciones del perfil de la corriente de espín J_S . La correlación $J_S(J_e)$ es esencialmente de carácter lineal para valores de $J_e/J_{e0} > 10$, excepto en el caso simétrico en el cual la diferencia de fase en las fronteras de la película es cero: $\Delta\phi = 0$ [Ver Figura (4)]. La densidad de corriente de referencia J_{e0} está definida por $J_{e0} = en_0 D_0^2 / \ell \mu_{BX}$. Las

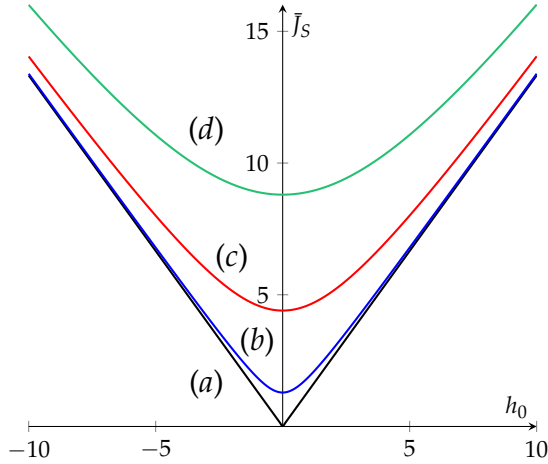


Figura 5. Corriente de espín en función del campo magnético aplicado con $J_e/J_{e0} = 3.3$ y (a) $\Delta\phi = 0$, (b) $\Delta\phi = \pi/4$, (c) $\Delta\phi = \pi/2$, (d) $\Delta\phi = \pi$.

variaciones de la oscilación en la corriente de espín en el régimen intermedio de valores de J_e/J_{e0} tienden a ser mayores para una diferencia de fase $\Delta\phi = \pi$, mientras que para valores pequeños de J_e/J_{e0} ($J_e/J_{e0} < 2$), \bar{J}_s exhibe un incremento monótono en su perfil hasta cierto valor crítico en donde la respuesta de la corriente de difusión presenta un carácter oscilatorio en su amplitud. La densidad de corriente de espín promedio en función del campo magnético transversal aplicado, con diferentes magnitudes de J_e/J_{e0} , es representada en la Figura (5). \bar{J}_s aumenta uniformemente con el incremento de h_0 y J_e/J_{e0} , observándose una fuerte dependencia del valor de la corriente de espín con la asimetría de la polarización de la magnetización en las superficies, y en ausencia del campo externo.

Ondas de espín: longitud de propagación y tiempo de vida

Una primera aproximación al cálculo de los modos de magnetización transversal puede obtenerse considerando que un campo magnético de prueba con polarización $\mathbf{h}(\mathbf{x}, t) = (h_{0X} \exp[i(q_X x + q_Z z - \omega t)], 0, H_{0Z})$ y frecuencia ω incide sobre el sistema generando una magnetización (m^X, m^Y, M_{0Z}) , definida a través de las componentes de la susceptibilidad χ_{ij} : $m^X = \chi_a h^X$; $m^Y = -\chi_b h^X$. Los campos varían temporalmente según $\exp[-i\omega t]$, y la solución físicamente plausible corresponde a la condición $\text{Im}\{\omega\} < 0$. Las ecuaciones extendidas para el caso tridimensional se modifican desde la relación

$$\hat{L}^\pm m^\pm = i\omega_M h^\pm, \quad (7)$$

con el operador \hat{L}^\pm definido por:

$$\hat{L}^\pm = \mp(1 \mp i\alpha) \frac{\partial}{\partial t} - iD(J) \nabla^2 - i(c_{J_e} \pm ib_{J_e}) \frac{\partial}{\partial z} + i\omega_H, \quad (8)$$

y $\omega_M = \gamma M_{0Z}$, $\omega_H = \gamma H_{0Z}$. Bajo la condición $\nabla \cdot (\mathbf{h} + \mathbf{m}) = 0$, se obtiene $(1 + \chi_a) q_X = 0$, el cual tiene una solución del tipo $\chi_a = -1$ (Cottam M., 1989)¹. El propagador asociado a la ecuación (8) toma la forma:

$$K_\infty^{3D\pm}(\mathbf{r}, \mathbf{r}'; t) = \frac{1}{8(\pi a_\pm^2)^{3/2}} \exp\left[-\frac{G^{\pm 3D}(\mathbf{r}, \mathbf{r}'; t)}{4a_\pm^2 t}\right]; \quad (9)$$

con

$$G^{3D\pm}(\mathbf{r}, \mathbf{r}'; t) = \left(|\mathbf{r} - \mathbf{r}'| + b_\pm t\right)^2 - 4a_\pm^2 t^2 \bar{\omega}_H^\pm, \quad (10)$$

$a_\pm^2 = \mp iD(J)/(1 \mp i\alpha)$, $b_\pm = (b_{J_e} \mp ic_{J_e})/(1 \mp i\alpha)$ y $\bar{\omega}_H = \pm i\omega_H^\pm/(1 \mp i\alpha)$. El cálculo de la expresión (9) es discutido en el Apéndice II. Las funciones $2\chi_a = \chi_q^+ + \chi_q^-$ y $-2i\chi_b = \chi_q^+ - \chi_q^-$ tienen la forma explícita en el dominio de la frecuencia y del momentum:

$$\chi_q^+ = \frac{i\omega_M}{\Delta_q^+}, \quad \chi_q^- = \frac{i\omega_M}{\Delta_q^-}; \quad (11)$$

con $\Delta_q^\pm = \pm i\omega(1 \mp i\alpha) + B_q \pm ib_{J_e} q_Z + i\omega_H$. La frecuencia de los modos de ondas de espín se obtiene desde la condición $\Delta_q^\pm = 0$ ($\alpha = 0$) y poseen una dependencia con la corriente aplicada J_e de la forma:

$$\omega_q = -b_{J_e} q_Z \pm \sqrt{\bar{\omega}_{Hq}(\bar{\omega}_{Hq} + \omega_M)}, \quad (12)$$

con $B_q = c_{J_e} q_Z + iD(J)(q_X^2 + q_Z^2)$ y $\bar{\omega}_{Hq} = \omega_H - iB_q$. En el límite de las excitaciones en el continuo ($q \rightarrow 0$) y en ausencia de una corriente externa, la expresión (12) se reduce al resultado clásico de Damon-Eshbach (DE) (Eshbach J. R., 1960): $\omega_{DE} = \sqrt{\omega_H(\omega_H + \omega_M)}$. La longitud de propagación de las ondas de espín es definida por $\ell_p^{-1} = 2k''$, con $k'' = \text{Im}\{\omega_q/v_g\}$, en donde v_g es la velocidad de grupo de las excitaciones colectivas: $\partial\omega_q/\partial q_Z$. Los procesos de relajación de los portadores de espín en medios conductores limitan la longitud de coherencia de las ondas de tipo SFW (Spin Flip Waves), afectando a su vez las propiedades de transporte o control de la información lógica. En consecuencia, es de interés identificar

¹ Desarrollando el operador divergencia $\nabla \cdot (\mathbf{h} + \mathbf{m}) = 0$, $(1 + \chi_a)(\partial_X h_X + \partial_Y h_Y) + \chi_b(\partial_X h_Y - \partial_Y h_X) = 0$. En el caso particular con $q_Y = 0$ y $h_Y = 0$, la solución de la ecuación anterior se reduce a $\chi_a = -1$.

los máximos de ℓ_p y sus posibles mecanismos de control vía campo externo (ω_H) o corriente aplicada (J_e). ℓ_p es calculado para modos no evanescentes ó $\text{Im}\{\omega_q\} = 0$ [Figura (6)]. La dependencia de la longitud de propagación de ondas de espín con el vector de onda $\ell_p(q_Z)$ está en concordancia con el resultado experimental obtenido desde la técnica de dispersión Raman electrónica resonante (ERRS), aplicada sobre un gas electrónico bidimensional de pozos cuánticos del tipo $\text{Cd}_{1-x}\text{Mn}_x\text{Te}/\text{Cd}_{0.8}\text{Mg}_{0.2}\text{Te}$ (Gómez J. et-al, 2011). Los efectos de la intensidad de la corriente de portadores y el campo aplicado en la estructura de bandas para ondas de espín transversales se muestra en la Figura (7). La región de las frecuencias permitidas para $J_e = 0$ se denota con (A) y su ancho de banda tiende a disminuir para valores de $\bar{q}_Z \rightarrow \pi/2$. Cuando la corriente es aplicada en dirección $+\mathbf{z}$ (banda B), las frecuencias límites de los modos permitidos yacen en un intervalo de menor valor comparadas con aquellas asociadas a la banda (A) con valores relativamente constantes en el régimen de grandes longitudes de onda. En el caso de corriente aplicada en dirección $-\mathbf{z}$ (banda C), emerge una región de frecuencias prohibidas de baja energía para $\bar{q}_Z \lesssim 0.5$, la cual puede interpretarse como la aniquilación de los estados de onda de espín producida por el incremento de la componente del torque de oposición \mathbf{T}^\pm sobre la magnetización transversal m^\pm (Eq. 3). Las componentes transversales de la susceptibilidad (11) pueden re-escribirse en el marco del formalismo de Dyson, en particular, desde el concepto de *autoenergía propia*: Σ_\pm^* .

$$\chi_q^\pm = \pm \omega_M \check{\mathbf{G}}_q^\pm = \pm \omega_M \left(\omega \pm \hbar^{-1} \varepsilon_q^0 - \Sigma_\pm^* \right)^{-1}, \quad (13)$$

con $\varepsilon_q^0 = \hbar \mathcal{D}(J) q^2$ y $\Sigma_\pm^* = \pm i \omega \alpha \pm i c_{J_e} q_Z \mp \omega_H - b_{J_e} q_Z$. Esta técnica permite calcular el tiempo característico de relajación de las excitaciones colectivas desde la prescripción:

$$\tau_q^{-1} = - \frac{2 \text{Im} \Sigma^*|_{\varepsilon_q/\hbar}}{1 - \frac{\partial}{\partial \omega} \text{Re} \Sigma^*|_{\varepsilon_q/\hbar}}, \quad (14)$$

en donde las componentes real e imaginaria de Σ^* deben evaluarse para valores de frecuencias definidos por la energía *renormalizada* $\varepsilon_q = \varepsilon_q^0 + \text{Re}\{\hbar \Sigma^*\}$ (Fetter A., 2002). El promedio del inverso del tiempo de vida relativo a la emisión de ondas de espín puede calcularse utilizando el resultado en el marco de la aproximación de Maxwell-Boltzmann (Chupis I. E., 1964), (Akhiezer I. A. et-al, 1961):

$$\langle \tau^{-1} \rangle = \frac{\Omega^{-1} \int \tau_q^{-1} \exp(-\beta \varepsilon_q) d^3 \mathbf{q}}{\Omega^{-1} \int \exp(-\beta \varepsilon_q) d^3 \mathbf{q}}, \quad (15)$$

con $\beta^{-1} = kT$. El denominador del lado derecho de la ecuación (15), con $\varepsilon_q = \varepsilon_q^0 + \hbar \omega_H - \hbar b_{J_e} q_Z$, corresponde al promedio termodinámico del número de estados excitados de ondas de espín $\langle n \rangle$ a temperatura T y volumen

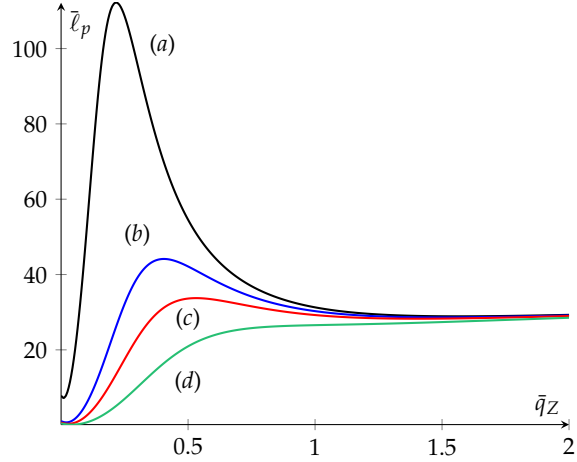


Figura 6. Longitud de propagación de las ondas de espín en función del vector de onda q_Z para diferentes valores de ω_h , con los valores normalizados $\ell_p = \ell_p/a_m$, $\omega_m/\omega_{DE} = 10$, $\mathcal{D}(J)/\omega_{DE} = 5$, $b_{J_e}/\omega_{DE} = 1$, $c_{J_e}/\omega_{DE} = 0.3$. (a) $\omega_h/\omega_{DE} = 0.01$, (b) $\omega_h/\omega_{DE} = 0.1$, (c) $\omega_h/\omega_{DE} = 0.2$, (d) $\omega_h/\omega_{DE} = 0.5$.

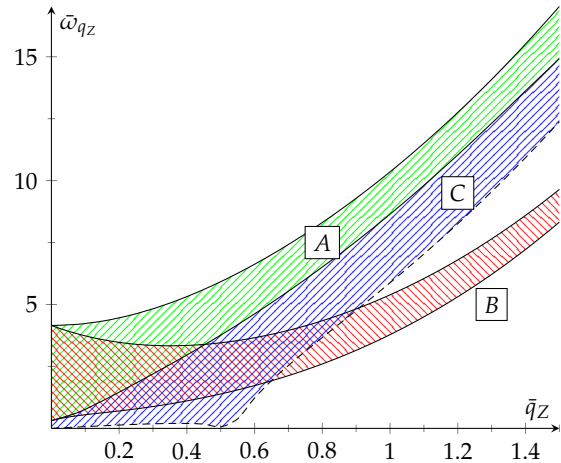


Figura 7. Estructura de bandas para los modos de propagación de las ondas de espín transversales en interacción con la corriente de portadores electrónicos. En todos los casos, $0.01 \leq \omega_h/\omega_{DE} \leq 1.5$ y (A) $b_{J_e}/\omega_{DE} = 0.0$, $c_{J_e}/\omega_{DE} = 0.0$; (B) $b_{J_e}/\omega_{DE} = 5$, $c_{J_e}/\omega_{DE} = 1.5$; (C) $b_{J_e}/\omega_{DE} = -5$, $c_{J_e}/\omega_{DE} = -1.5$.

unitario Ω^{-1} :

$$\langle n \rangle = \frac{\pi^{3/2}}{(\hbar \beta \mathcal{D}(J))^{3/2}} \exp \left[-\hbar \beta \left(\omega_H - \frac{b_{J_e}^2}{4 \mathcal{D}(J)} \right) \right], \quad (16)$$

el cual conduce a la relación clásica de Bloch $\langle n \rangle \sim T^{3/2}$ en el caso $J_e = 0$ y $\omega_H = 0$. El tiempo medio de emisión de ondas de espín en función de la temperatura es una relación lineal del tipo $\langle \tau^{-1} \rangle = \tau_0^{-1} + 3\alpha \hbar^{-1} kT$ y $\tau_0^{-1} = 2\alpha \omega_H + (2\tau_{ex}/\alpha \tau_{SF} - 1) \alpha b_{J_e}^2 / 2 \mathcal{D}(J)$. El diagrama

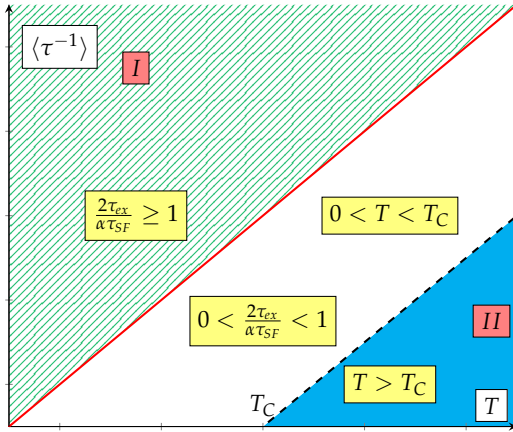


Figura 8. Diagrama de fases asociado al inverso del tiempo de vida promedio de las excitaciones de ondas de espín en función de la temperatura absoluta T y el parámetro característico $2\tau_{ex}/\alpha\tau_{SF}$.

ma de fases $[\langle \tau^{-1} \rangle, T]$ se describe en la Figura (8). El parámetro $2\tau_{ex}/\alpha\tau_{SF}$ define dos tipos de excitaciones: (I) ondas de espín inducidas (ISW) con tiempo de vida restringido a un valor de temperatura finito bajo la condición $2\tau_{ex}/\alpha\tau_{SF} \geq 1$, y (II) ondas de espín térmicamente generadas a temperaturas mayores que cierto valor crítico T_C , bajo la condición $0 < 2\tau_{ex}/\alpha\tau_{SF} < 1$. En este caso, el tiempo de emisión es mayor a temperatura fija comparado con los tiempos característicos asociados a la fase (I). Ondas coherentes de espín (CSW) con $\langle \tau^{-1} \rangle = 0$ surgen en este régimen bajo la condición: $kT_C = (1 - 2\tau_{ex}/\alpha\tau_{SF}) b_e^2 / 6\hbar^{-1} \mathcal{D}(J)$, con $\omega_H = 0$. Este diagrama de fases esquemático resalta el rôle del factor de Gilbert en la configuración de los modos de propagación, la estabilidad, el tiempo medio de vida de ondas emitidas y su correlación con la temperatura: el valor crítico de α es del orden de $2\tau_{ex}/\tau_{SF}$, el cual define la escala de prevalencia en los efectos de relajación de las fluctuaciones de la magnetización transversal (τ_{SF}), sobre el mecanismo de interacción entre los electrones itinerantes y electrones localizados (τ_{ex}). El diagrama de fases indica que no es posible la emisión de ondas transversales de espín en el rango $0 < T < T_C$ con $2\tau_{ex}/\alpha\tau_{SF} < 1$.

Condición de criticalidad en 1D

La ecuación (8) tiene una solución en términos del propagador compuesto $K_\infty^\pm(z, z'; t)$ (para un medio infinitamente extendido):

$$m^\pm(z, t) = \int_{-\infty}^{\infty} K_\infty^\pm(z, z'; t) m^\pm(z', 0) dz' + \int_0^t \int_{-\infty}^{\infty} K_\infty^\pm(z, z'; t - \tau) F^\pm(z', \tau) dz' d\tau, \quad (17)$$

con $K_\infty^\pm(z, z'; t)$ igual a:

$$K_\infty^\pm(z, z'; t) = \frac{1}{2\sqrt{\pi a_\pm^2 t}} \exp\left[-\frac{G^\pm(z, z'; t)}{4a_\pm^2 t}\right], \quad (18)$$

y $G^\pm(z, z'; t) = (z - z' + b_\pm t)^2 - 4a_\pm^2 t^2 \bar{\omega}_H^\pm$. La función K_∞^\pm reproduce la solución de la ecuación del calor en una dimensión, en ausencia de corriente externa aplicada ($b_\pm = 0$) y $\omega_H = 0^2$. En la representación del momentum y la frecuencia (en notación reducida), $K_\infty(iv, p)$ tiene la forma:

$$K_\infty(iv, p) = \frac{1}{2\pi} \frac{1}{2a^2\sigma(iv)} \frac{\sigma'(iv)}{(\sigma'^2(iv) + p^2)}, \quad (19)$$

con las funciones $\sigma'(iv) = \sigma(iv) + b/2a^2$, $a\sigma(iv) = \xi(iv - \bar{\omega}_H - ib^2/4a^2)^{1/2}$, $\xi = i^{1/2}$. En el caso $b = \bar{\omega}_H = 0$, la expresión (19) concuerda con la función de correlación de las fluctuaciones transversales de la magnetización $\langle m^\pm(p, iv) m^\pm(-p, -iv) \rangle$:

$$-iK_\infty(iv, p) \sim \frac{1}{\mathcal{D}(J) p^2 - iv'}, \quad (20)$$

demostrando el carácter estrictamente difusivo de estas perturbaciones. La presencia de una corriente externa modifica la naturaleza de la propagación de las fluctuaciones magnéticas hacia un régimen intermedio difusivo-ondulatorio, con una velocidad de arrastre proporcional a la magnitud de b_\pm , y a su vez asociada a las distorsiones de la pared de dominio (Yamaguchi A., 2004). Si se aplica un pulso magnético instantáneo $H(t) = H_0\delta(t)$ que da lugar a un campo espectral de ruido blanco $H(iv) = H_0$, la corrección en la susceptibilidad estática ($iv \rightarrow 0$) en una dimensión converge para $\sigma'(0)\sigma(0) \neq 0$, y está definida para todos los posibles valores del momentum de las ondas de espín por:

$$\Delta\chi(0) \propto \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dp}{2\pi} K_\infty(0, p) = \frac{1}{8\pi a^2 \sigma(0) \sigma'(0)}. \quad (21)$$

En el caso $\sigma(0) = 0$, $\omega_H = b_{J_e} c_{J_e} / 2\mathcal{D}(J)$ y $\sigma'(0) = 0$, $\omega_H = b_{J_e} c_{J_e} / \mathcal{D}(J)$ cuyas soluciones tienen la estructura $J_{eC} \sim H_{0Z}^{1/2}$. Para frecuencias diferentes de cero, la ecuación (21) se debe modificar como:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \frac{dp}{2\pi} K_\infty(iv, p) = \frac{1}{8\pi a^2 \sigma(iv)}. \quad (22)$$

² En este resultado deben considerarse las identidades, con $K_\infty \equiv K_\infty(z, z'; t - \tau)$:

$$\partial_\tau K_\infty + a^2 \partial_{z'}^2 K_\infty - b \partial_{z'} K_\infty + \bar{\omega}_H K_\infty = 0,$$

$$\text{y } K_\infty(z, z'; t - \tau \rightarrow 0) = \delta(z - z').$$

La suma sobre las frecuencias complejas de Matsubara iv (Bosónicas) permite obtener la dependencia térmica de la corrección de la susceptibilidad $\Delta\chi$:

$$\Delta\chi(T) \sim \frac{1}{8\pi a^2} \sum_{iv} \frac{1}{\sigma(iv)} = \frac{1}{8\pi a^2} \frac{1}{2\pi i} \oint_C \frac{n_{BE}(z)}{\sigma(z)} dz, \quad (23)$$

en donde $n_{BE}(z) = (\exp[\beta z] - 1)^{-1}$ es el factor estadístico de Bose-Einstein. El resultado de la integración conduce a (Lavrik A. F., 2011):

$$\Delta\chi(T) \sim \frac{\xi}{16\pi^2 a} \Gamma\left(\frac{1}{2}\right) \text{Li}_{\frac{1}{2}}\left(\exp(-\beta w)\right), \quad (24)$$

$w = \bar{\omega}_H + ib^2/4a^2$ y $\text{Li}_n(z)$ como la función Polilogarítmica de orden n con argumento z (Función Li_n). La componente real de $\text{Li}_{\frac{1}{2}}(z)$ es indefinida en $z = 1$ ($w = 0$) y en consecuencia, una relación crítica del tipo $|J_{eC}| \sim |H_{0Z}|^{1/2}$ surge bajo este criterio. Esta relación coincide en general con aquella obtenida en el régimen de frecuencia cero.

Resumen y conclusiones

En este artículo se presenta un análisis del efecto de la interacción de la corriente de portadores electrónicos sobre las ondas de espín en un medio metálico en fase ferromagnética. El término de acople entre la magnetización local y la corriente externa es del tipo *torque* inducido \mathbf{T} [Ec. (3)]. La solución a la ecuación LLGB resultante es estudiada utilizando una variante para el propagador de difusión en sistemas infinitamente extendidos en 1D y 3D, mientras que el efecto de las fronteras de contacto es analíticamente considerado en el caso más general posible en 1D y bajo la prescripción de una solución del tipo Dirichlet (Apéndice I). Diferentes resultados físicos son obtenidos y discutidos, en particular: (i) la variación de estructura de bandas asociadas a las energías de los modos colectivos del tipo Damon-Esbach bajo los efectos de la corriente de portadores, (ii) el tiempo de vida de las ondas de espín estimuladas vía fuente externa (campo magnético o corriente de portadores de carga), su dependencia con los tiempos característicos τ_{SF} , τ_{ex} y el factor de Gilbert α en la aproximación de la distribución de Boltzmann, y (iii) la relación de inestabilidad para las ondas de espín en términos de la densidad de corriente de portadores de carga y el campo magnético exterior desde la respuesta de susceptibilidad estática en sistemas 1D. Estos resultados permiten plantear problemas más específicos y de interés tecnológico relacionados por ejemplo con la emisión coherente de magnones en dispositivos híbridos de contacto del tipo grafito laminar/ferromagneto (Tang Z. et-al, 2013), considerando las funcionales de la acumulación de la densidad de portadores de espín en las superficies de frontera (tomadas como cero en este desarrollo), y diferentes estados de polarización de la corriente y el campo exterior en el rango de la radiación

de microondas. Es necesario resaltar que el tratamiento presentado en este artículo es de carácter semiclásico. Una derivación rigurosa y muy reciente de la naturaleza *gauge* del efecto Hall de espín (SHE) puede encontrarse en (Tan S. G. et-al, 2015).

Apéndice I: solución tipo Dirichlet en 1D

Introduciendo las definiciones $\mathbf{M} = (m^X, m^Y, M_0)$, $F^\pm = \mp i\gamma M_0 H_{0Z} / (1 \mp i\alpha)$, la ecuación (2) toma la forma:

$$\frac{\partial m^\pm}{\partial t} = a_\pm^2 \frac{\partial^2 m^\pm}{\partial z^2} + b_\pm \frac{\partial m^\pm}{\partial z} + \bar{\omega}_H^\pm m^\pm + F^\pm; \quad 0 < z < \ell, \quad (25)$$

con $m^\pm = m^X \pm im^Y$. La solución para las componentes m^\pm se obtienen desde la transformación:

$$m^\pm(z, t) = u^\pm(z, t) + \left(1 - \frac{z}{\ell}\right) m^\pm(0, t) + \frac{z}{\ell} m^\pm(\ell, t), \quad (26)$$

válida para $t > 0$, $0 < z < \ell$, en donde $m^\pm(0, t)$ y $m^\pm(\ell, t)$ corresponden a las condiciones de frontera en $z = 0$ y $z = \ell$ respectivamente, y $u^\pm(0, t) = u^\pm(\ell, t) = 0$. La ecuación (26) debe reescribirse como:

$$\frac{\partial u^\pm}{\partial t} = a_\pm^2 \frac{\partial^2 u^\pm}{\partial z^2} + b_\pm \frac{\partial u^\pm}{\partial z} + \bar{\omega}_H^\pm u + \bar{F}^\pm; \quad 0 < z < \ell, \quad (27)$$

$t > 0$. El término *fuerza* se escribe ahora como:

$$\begin{aligned} \bar{F}^\pm(z, t) = & F^\pm + \frac{b_\pm}{\ell} (m^\pm(\ell, t) - m^\pm(0, t)) \\ & - \left(1 - \frac{z}{\ell}\right) \left(\frac{\partial m^\pm(0, t)}{\partial t}\right) - \frac{z}{\ell} \left(\frac{\partial m^\pm(\ell, t)}{\partial t}\right) + \\ & \bar{\omega}_H^\pm \left[\left(1 - \frac{z}{\ell}\right) m^\pm(0, t) + \frac{z}{\ell} m^\pm(\ell, t) \right]. \end{aligned} \quad (28)$$

La solución completa para $u^\pm(z, t)$ puede escribirse en forma compacta como (Guenther R. B. and Lee J. W., 1988) (en notación reducida $a \equiv a_\pm$, $b \equiv b_\pm$, $F \equiv F^\pm$, $\bar{\omega}_H^\pm = \bar{\omega}_H$):

$$u(z, t) = \frac{2}{\ell} \int_0^\ell \sum_{n=1}^\infty U_n(z', t) \sin\left(\frac{n\pi z}{\ell}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{\ell}\right) dz', \quad (29)$$

con los coeficientes de $U_n(z', t)$ dados por:

$$U_n(z', t) = \exp\left[-Q_n(z - z', t)\right] u(z', 0) + \int_0^t \exp[-R_n(t - \tau)] \bar{F}(z', \tau) d\tau, \quad 0 < \tau < t. \quad (30)$$

Las funciones $Q_n(z, t)$ y $R_n(t)$ se definen como:

$$Q_n(z, t) = \left(\frac{a^2 \pi^2 n^2}{\ell^2} - \bar{\omega}_H \right) t + \frac{b}{2a^2} \left(z + \frac{b}{2} t \right),$$

$$R_n(t) = Q_n(z, t) - \frac{bz}{2a^2}. \quad (31)$$

El caso particular $b_{\pm} = \bar{F}^{\pm} = 0$, reduce (29) a la solución típica de la ecuación del calor en una dimensión y condiciones de Dirichlet:

$$u^0(z, t) = \frac{2}{\ell} \int_0^{\ell} \sum_{n=1}^{\infty} U_n^0(z', t) \sin\left(\frac{n\pi z}{\ell}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{\ell}\right) dz', \quad (32)$$

con $U_n^0(z', t) = u(z', 0) \exp[-a^2 \pi^2 n^2 t / \ell^2]$. Con un procedimiento similar, la solución para la densidad electrónica $\mu(z, t)$ puede expresarse como:

$$\mu(z, t) = v(z, t) + \left(1 - \frac{z}{\ell}\right) \mu_0(t) + \frac{z}{\ell} \mu_{\ell}(t); \quad (33)$$

$0 < z < \ell, v(0, t) = v(\ell, t) = 0$ y

$$v(z, t) = \frac{2}{\ell} \int_0^{\ell} \sum_{n=1}^{\infty} \bar{h}_n(z', t) \sin\left(\frac{n\pi z}{\ell}\right) \sin\left(\frac{n\pi z'}{\ell}\right) dz', \quad (34)$$

y el kernel \bar{h}_n definido explícitamente por:

$$\bar{h}_n(z, t) = \frac{D_0^{-1} H_{J_e}(z, t) - \kappa_i^2 [(1 - z/\ell) \mu_0(t) + z \mu_{\ell}(t) / \ell]}{\kappa_i^2 - n^2 \pi^2 / \ell^2}. \quad (35)$$

Las funciones $\mu_0(t), \mu_{\ell}(t)$ corresponden a las distribuciones de las densidades de espín electrónico en las superficies $z = 0$ y $z = \ell$ respectivamente. La función $H_{J_e}(z, t)$ en (35) es, en términos de $\vec{\mu}$:

$$H_{J_e}(z, t) = D_0 \nabla^2 \vec{\mu} - \frac{1}{\tau_{ex}} \vec{\mu} \times \hat{z} - \frac{\vec{\mu}}{\tau_{sf}}. \quad (36)$$

Las componentes de la proyección del campo $H_{J_e}(z, t)$ en el plano XY en la representación de onda de espín rotada (SWRR) son equivalentes a las definidas en la ecuación (5).

Apéndice II

En notación simplificada, la solución a la ecuación homogénea $\hat{L}^{\pm} m^{\pm} = 0$ [Cfr. Ec. (8)] toma la forma: $m^{\pm}(q, t) \sim \exp[-M_q t]$, con $M_q = a_{\pm}^2 q^2 - ib_{\pm} q \cos \theta - \bar{\omega}_H^{\pm}$. Integrando en el dominio del momentum, se obtiene el resultado (9), con $R = |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|$.

$$\int_0^{\pi} \int_0^{\infty} \exp[-M_q t + iqR \cos \theta] q^2 \sin \theta d\theta dq \sim K_{\infty}^{3D\pm}(\mathbf{r}, \mathbf{r}'; t). \quad (37)$$

Conflicto de intereses

El autor no reconoce conflicto de interés alguno en el proceso de escritura y publicación de este artículo.

Bibliografía

- Anderson P. W.** (1961). Localized Magnetic States in Metals, Phys. Rev. **124**: 41. doi: 10.1103/PhysRev.124.41
- Akhiezer I. A., Bar'yakhtar V. G. and Peletminskii S. V.** (1961). On the theory of low-temperature, high-frequency magnetic susceptibility of a ferroelectric, Soviet Physics JETP **13**: 249.
- Bazaliy Ya, B. Jones B. A. and Zhang S. -C.** (1998). Modification of the Landau-Lifshitz equation in the presence of a spin-polarized current in colossal- and giant-magnetoresistive materials, Phys. Rev. B **57**, R3213. doi: 10.1103/PhysRevB.57.R3213
- Berger L.** (1996). Emission of spin waves by a magnetic multilayer traversed by a current, Phys. Rev. B **54**, 9353. doi: 10.1103/PhysRevB.54.9353
- Chupis I. E.** (1964). Theory of Relaxation processes in a uniaxial antiferroelectric, Soviet Physics JETP **19**: 212. doi: http://www.jetp.ac.ru/cgi-bin/dn/e_019_01_0212.pdf.
- Cottam M. and Tilley M. R.** (1989). Introduction to Surface and Superlattice Excitations, Cambridge University Press, (1989).
- Demidov V. E., Urazhdin S. and Demokritov S. O.** (2010). Direct observation and mapping of spin waves emitted by spin-torque nanooscillators, Nature **9**: 984. doi: 0.1038/nmat2882
- Eshbach J. R. and Damon R. W.** (1960). Surface Magnetostatic Modes and Surface Spin Waves, Phys. Rev. **118**: 1208. doi: 10.1103/PhysRev.118.1208
- Fetter A. and Walecka J. D.** (2002). Quantum Theory of Many Particle Systems, Dover Publications.
- Función Lin (z)**, <http://functions.wolfram.com/10.08.02.0001.01>
- $$Li_n(z) = \sum_{k=1}^{\infty} \frac{z^k}{k^n}; \quad \Gamma\left(\frac{1}{2}\right) Li_{\frac{1}{2}}(e^{\mu}) = \int_0^{\infty} \frac{k^{-1/2} dk}{e^{(k-\mu)} - 1}.$$
- Gilbert T. L.** (2004). Classics in Magnetism: A Phenomenological Theory of Damping in Ferromagnetic Materials, IEEE Transactions on Magnetics, Vol. **40** (6): 3443. doi: 10.1109/TMAG.2004.836740
- Gómez J., Pérez F., Jusserand B., Karczewski K. and Wojtowicz T.** (2011). Propagation length of spin waves in a conducting system, Journal of Physics: Conference Series **334** 012055. doi: 10.1088/1742-6596/334/1/012055
- Guenther R. B. and Lee J.W.** (1988). Partial Differential Equations of Mathematical Physics and Integral Equations, Dover Publications.
- Hertz J. and Edwards D. M.** (1973). Electron-magnon interactions in itinerant ferromagnetism: Formal theory, J. Phys. F: Metal Phys., **3** 2174. doi: 10.1088/0305-4608/3/12/018

- Kitamura Y., Shikoh E., Ando Y., Shinjo T., Shiraishi M.** (2013). Vertical spin transport in Al with Pd/Al/Ni₈₀Fe₂₀ trilayer films at room temperature by spin pumping, *M. Sci. Rep.* 3, 1739; doi: 10.1038/srep01739
- Kondo J.** (1964). Resistance Minimum in Dilute Magnetic Alloys, *Prog. Theor. Phys.* 2 (1): 37-49. doi: 10.1143/PTP.32.37
- Lavrik A. F.** Complex integration, method of. A.F. Lavrik (originator), *Encyclopedia of Mathematics*. URL: <http://www.encyclopediaofmath.org>.
- Li Z., He J. and Zhang S.** (2006). Effects of spin current on ferromagnets, *Journal of Applied Physics* 99 08Q702. doi: 10.1063/1.2166590
- Maekawa S., Adachi H., Uchida K., Ieda J. and Saitoh E.** (2013). Spin Current: Experimental and Theoretical Aspects, *Journal of the Physical Society of Japan* 82 102002. doi: 10.7566/JPSJ.82.102002
- Madami M., Bonetti S., Consolo G., Tacchi S., Carlotti G., Gubbiotti G., Mancoff F. B., Yar M. A. and Akerman J.** (2011). Direct observation of a propagating spin wave induced by spin-transfer torque, *Nature Nanotechnology* 6: 635. doi: 10.1038/nnano.2011.140
- Phillips T. G.** and Rosenberg H. M. (1966). Spin Waves in Ferromagnets, *Rep. Prog. Phys.* 29 285. doi: 10.1088/0034-4885/29/1/307
- Saitoh, E., Ueda, M., Miyajima, H. and Tatara, G.** (2006). Conversion of spin current into charge current at room temperature: Inverse spin-Hall effect. *Appl. Phys. Lett.* 88, 182509. doi: 10.1063/1.2199473
- Sears M. R. and Saslow W. M.** (2012). Spin accumulation at ferromagnet/nonmagnetic material interfaces, *Phys. Rev. B* 85, 014404. doi: 10.1103/PhysRevB.85.014404
- Tan S. G. et al.**, (2015). Gauge Physics of Spin Hall Effect, *Sci. Rep.* 5, 18409. doi: 10.1038/srep18409
- Tang Z, Shikoh E., Ago H., Kawahara K., Ando Y., Shinjo T., and Shiraishi M.** (2013). *Phys. Rev. B* 87, 140401 (R). doi: 10.1103/PhysRevB.87.140401
- Tsoi M., Jansen A. G. M., Bass J., Chiang W. -C, Tsoi V. and Wyder P.** (2000). Generation and detection of phase-coherent current-driven magnons in magnetic multilayers, *Nature* 406, 46. doi: 10.1038/35017512
- Yamaguchi A.** (2004). Real-Space Observation of Current-Driven Domain Wall Motion in Submicron Magnetic Wires *Phys. Rev. Lett.* 92, 077205. doi: 10.1103/PhysRevLett.92.077205
- Zhang S. and Li Z.** (2010). Roles of Nonequilibrium Conduction Electrons on the Magnetization Dynamics of Ferromagnets, *Physical Review Letters* 93, 127204. doi: 10.1103/PhysRevLett.93.127204
- Zhang S. and Zhang S. S. -L.** (2009). Generalization of the Landau-Lifshitz-Gilbert Equation for Conducting Ferromagnets, *Physical Review Letters* 102, 086601. doi: 10.1103/PhysRevLett.102.086601
- Žutić I., Fabian J., Das Sarma S.** (2004). Spintronics: Fundamentals and Applications, *Review of Modern Physics* 76: 323-414, arXiv:cond-mat/0405528v1.

Corrección topocéntrica de parámetros orbitales obtenidos mediante las integrales de Kepler para asteroides MBA y NEO

Santiago Jiménez-Villarraga¹, Edwin Andrés Quintero-Salazar^{2,*}

¹ Observatorio Astronómico, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda, Colombia

² Observatorio Astronómico, Universidad Tecnológica de Pereira, Complejo Educativo La Julita, Pereira, Risaralda, Colombia

Resumen

En este estudio se exploró el problema que entraña calcular un conjunto preliminar de parámetros orbitales para asteroides a partir de la observación de sus posiciones relativas en la esfera celeste. Se implementó un método computacional basado en las integrales de Kepler en una variante geocéntrica y en una topocéntrica. El método se aplicó para cinco cuerpos pertenecientes a la familia de asteroides MBA (*main belt asteroids*) y cinco de la familia NEO (*near Earth object*). Además, se analizaron los resultados y los errores en ambas versiones del algoritmo. Los resultados mostraron que el método implementado es adecuado para obtener órbitas preliminares. En general, la versión más precisa para ambas familias de asteroides fue la topocéntrica. También se encontró que la corrección topocéntrica fue más notable para los NEO, puesto que la diferencia entre los errores geocéntricos y topocéntricos expresada como promedio casi dobló la diferencia para los MBA, lo que implica que en el caso de estos cuerpos, la versión del algoritmo utilizada debe ser la topocéntrica debido a la dificultad de hacerles seguimiento si existen incertidumbres muy altas.

Palabras clave: asteroides, astrometría, integrales de Kepler, inversión de órbitas.

Topocentric correction of orbital parameters obtained using the Kepler integrals for MBA and NEO asteroids

Abstract

This paper dealt with the problem of computing an initial set of orbital parameters for asteroids from observations of their relative positions on the celestial sphere. A method based on the two-body integrals was computationally implemented in a geocentric and a topocentric version. This method was applied to five MBA asteroids and five NEO asteroids. The results and errors obtained for both versions of the algorithm were analyzed. The results showed that for both asteroid families, generally the most precise version of the algorithm was the topocentric version. The topocentric correction appears to be better suited for estimating orbit parameters for NEO asteroids in our sample, as, in average, the difference between the geocentric and topocentric errors almost doubled the differences for the MBA asteroids. This means that for these objects the version of the algorithm used should be the topocentric version due to the difficulty of tracking these objects if the uncertainties are high.

Key words: Asteroids, astrometry, Kepler Integrals, orbit inversion.

Introducción

La determinación de los parámetros orbitales de asteroides y cometas es importante para establecer la probabilidad de impactos futuros contra la Tierra, así como las poblaciones de estos cuerpos y sus distribuciones, de tal forma que se puedan validar o generar teorías sobre la formación y evolución inicial del sistema solar. El problema de la inversión de órbitas consiste en obtener los parámetros orbitales que caracterizan el movimiento de cualquier cuerpo menor alrededor del Sol, o de la Tierra en el caso de los satélites, a partir de observaciones ópticas (astrometría) o de radar del cuerpo estudiado. El paso inicial en el proceso de inversión de órbitas se conoce como determinación inicial de órbitas (*Initial Orbit Determination - IOD*), y consiste en obtener una estimación preliminar de los parámetros

orbitales con unas pocas observaciones, de tal forma que se puedan calcular efemérides del cuerpo y, con esto, obtener observaciones futuras que permitan calcular los parámetros con mayor precisión.

Fueron **Gauss** (1809) y **Laplace** (1780) quienes resolvieron inicialmente este problema. Estos métodos clásicos aún se consideran apropiados para obtener una órbita preliminar a partir de información astrométrica (**Marsden**, 1985), aunque también es frecuente que produzcan resultados de poca calidad (**Knezevic & Milani**, 2005), lo cual se debe a

*Correspondencia:

Edwin Andrés Quintero Salazar, equintero@utp.edu.co

Recibido: 5 de octubre de 2015

Aceptado: 10 de febrero de 2016

dos razones fundamentales: primero, en la época de **Gauss** y de **Laplace** se conocía poco acerca de la estructura del Sistema Solar. Todos los asteroides observables en aquella época son parte de la familia MBA, y la suposición implícita en sus métodos, es decir, que las observaciones se hacen desde el centro de la Tierra (métodos geocéntricos), es válida para estos cuerpos. Sin embargo, existen otras familias de asteroides, como los NEO o los TNO (*trans-Neptunian objects*), para los cuales esta suposición produce errores importantes. Esto se debe a que los primeros son cuerpos tan cercanos a la Tierra que la posición relativa del observador sobre la superficie y la rotación del planeta se vuelven relevantes, y los segundos se mueven muy lentamente sobre la esfera celeste, lo que implica que las observaciones generalmente no son suficientes para obtener la convergencia de los métodos, (**Milani, et al., 2008**). La segunda razón consiste en que los métodos clásicos poseen una convergencia muy débil si la información utilizada representa una sección muy pequeña de la órbita (**Milani & Gronchi, 2010**) y, en general, esto es lo que ocurre normalmente: se detecta el movimiento del cuerpo usando una serie de imágenes de la región (usualmente entre tres y seis) en el lapso de una hora de observación y se espera poder utilizar toda la información proveniente de tales imágenes para obtener la órbita, lo cual, en principio, no puede hacerse directamente con los métodos clásicos. Este tren de observaciones se conoce en la literatura científica como un VSA (*very short arc*) si se puede obtener una buena órbita inicial, y como un TSA (*too short arc*) si esto no es posible (**Milani, et al. 2007**).

Lo anotado ha propiciado que en las últimas décadas este campo de estudio recobre importancia. En años recientes se han publicado muchos trabajos que presentan una mejora sustancial frente a los métodos clásicos, o que proponen una opción diferente para resolver el problema de la inversión de órbitas (**Karimi & Mortari, 2011; Mirtorabi, 2014; Celletti & Pinzari, 2006; Herrick, 1971**).

Marsden (1985) y **Milani, et al. (2008)** han estudiado las diferencias entre las aproximaciones geocéntrica y topocéntrica en los métodos de **Laplace** y **Gauss**. La aproximación geocéntrica supone que las observaciones se realizan desde el centro de la Tierra, mientras que la aproximación topocéntrica, por el contrario, plantea que estas se hacen desde la superficie de la Tierra y, además, considera el efecto de la rotación del planeta. En sus trabajos los autores analizan las razones por las cuales estos métodos presentan dificultades para los datos actuales y desarrollan versiones modernas que incluyen la corrección topocéntrica, pero no comparan los resultados con observaciones reales en las que se evidencien las diferencias entre ambas aproximaciones y, mucho menos estudian cuantitativamente la forma en que la corrección topocéntrica afecta la predicción de los parámetros orbitales de asteroides de diferentes familias.

Las comparaciones de dos órbitas es una tarea compleja, dado que existen muchas variables involucradas. **Schaepferkoetter (2011)**, por ejemplo, desarrolló un método de comparación que solo involucra dos parámetros independientes, lo que hace más sencillo el análisis de errores. Este tipo de herramienta es muy útil, ya que para garantizar el cálculo preciso y confiable del mayor número de órbitas, se deben utilizar los mejores métodos para cada situación en particular, lo cual solo es posible si se cuenta con un análisis comparativo de los diversos métodos, incluidos los más recientes.

El propósito de este trabajo es mostrar los resultados de la implementación computacional de un método de IOD basado en las integrales de Kepler (**Gronchi, et al., 2010**), y analizar las diferencias entre las aproximaciones geocéntrica y topocéntrica utilizando una interpolación de Poincaré para cuerpos de estudio pertenecientes a las familias MBA y NEO. En el artículo se introduce primero el fundamento teórico del método y las ecuaciones fundamentales del procedimiento. A continuación se expone la teoría requerida para resolver el problema matemático y luego se detalla la implementación computacional de estos algoritmos. Por último, se discuten los resultados obtenidos para los objetos de estudio seleccionados.

Materiales y métodos

Vectores atribuibles

El problema de la inversión de órbitas para asteroides se estudió a partir de datos astrométricos, los cuales, por lo general, se expresan de la siguiente forma:

$$(t_i, \alpha_i, \delta_i), \quad i = 1, \dots, m,$$

donde t es el tiempo de observación, α es la ascensión recta, δ es la declinación y $m \geq 2$ es el número total de observaciones. La dificultad para determinar una órbita parte del hecho de que con estos datos solo es posible obtener vectores unitarios que indican la dirección de la posición del cuerpo con respecto a la Tierra:

$$\hat{\rho} = (\cos \alpha \cos \delta, \sin \alpha \cos \delta, \sin \delta), \quad (1)$$

pero no su distancia, y para obtener una órbita se requiere determinar el vector de estado del cuerpo para un instante determinado (**Danby, 1988**). Estos vectores están dados por:

$$\vec{r} = \vec{R} + \rho \hat{\rho}, \quad \dot{\vec{r}} = \dot{\vec{R}} + \dot{\rho} \hat{\rho} + \rho (\hat{\rho}_\alpha \dot{\alpha} + \hat{\rho}_\delta \dot{\delta}), \quad (2)$$

donde $(\vec{R}, \dot{\vec{R}})$ es el vector de estado de la Tierra (que es un dato conocido), $\dot{\alpha}$, $\dot{\delta}$ son las derivadas con respecto al tiempo de las coordenadas angulares, y:

$$\hat{\rho}_\alpha = \frac{\partial \hat{\rho}}{\partial \alpha}, \quad \hat{\rho}_\delta = \frac{\partial \hat{\rho}}{\partial \delta}. \quad (3)$$

Nótese que si se pueden determinar los valores de $\dot{\alpha}$ y $\dot{\delta}$, las únicas incógnitas en (2) son la distancia entre la Tierra y el cuerpo (distancia topocéntrica), ρ , y la velocidad radial, $\dot{\rho}$, que no se pueden determinar directamente a partir de la información astrométrica.

Los valores $\dot{\alpha}$ y $\dot{\delta}$ se obtienen al calcular el vector atribuible al conjunto de datos, el cual se define como (Milani & Gronchi, 2010):

$$\Lambda = (\alpha, \delta, \dot{\alpha}, \dot{\delta}) \in [-\pi, \pi) \times (-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}) \times R^2, \quad (4)$$

y se obtiene numéricamente a partir de un arco de observaciones $(t_i, \alpha_i, \delta_i)$, $i = 1, \dots, m$ mediante una interpolación lineal (si $m = 2$) o cuadrática (si $m \geq 2$) para el tiempo medio \bar{t} . A cada vector atribuible se le asocia la matriz de covarianza Γ_Λ , que ofrece una estimación de los errores en su cálculo.

Interpolación de Poincaré

Como se dijo, $(\vec{R}, \dot{\vec{R}})$ es el vector de estado de la Tierra. Sin embargo, en este punto deben mencionarse dos formas diferentes de calcular dichos vectores. En la aproximación geocéntrica, estos representan el centro de la Tierra, puesto que se considera que las observaciones se realizan desde este punto. La perspectiva topocéntrica, por el contrario, asume que el vector de posición debe calcularse mediante la suma de la posición heliocéntrica del centro de la Tierra y la posición geocéntrica del observador:

$$\vec{R} = \vec{R}_T + \vec{R}_{obs}, \quad (5)$$

en el que \vec{R}_T es la posición heliocéntrica de la Tierra y \vec{R}_{obs} es la posición geocéntrica del observador. Para el vector de velocidad se procede de manera análoga, para lo cual es necesario conocer las constantes de paralaje del lugar de observación (el *Minor Planet Center* - MPC, de la *International Astronomical Union*, facilita el valor de estas constantes para cada observatorio registrado <http://www.minorplanetcenter.net/iau/lists/ObsCodesF.html>). Además, en 1909 Poincaré (1906) sugirió que la posición y la velocidad geocéntricas del observador deben obtenerse mediante la misma interpolación que se utiliza para obtener los vectores atribuibles y no recurriendo a fórmulas exactas. Estas aproximaciones entregan valores ligeramente diferentes del vector de estado de la Tierra y, dado que estos datos se utilizan en las ecuaciones posteriores, los parámetros orbitales también serán diferentes en cada caso. En la sección correspondiente se muestran los resultados obtenidos con ambas aproximaciones.

Método de las integrales de Kepler

Como ya se mencionó, si se utilizan los datos astrométricos para obtener el vector atribuible (4), solo aparecen como incógnitas en el vector de estado las variables ρ y $\dot{\rho}$. Por ello, Gronchi, et al. (2010) establecen un sistema de ecuaciones polinómicas basados en la conservación de la energía y el momento angular de la órbita (integrales de Kepler). La idea es calcular el par de vectores atribuibles $\Lambda_1 = (\alpha_1, \delta_1, \dot{\alpha}_1, \dot{\delta}_1)$ y $\Lambda_2 = (\alpha_2, \delta_2, \dot{\alpha}_2, \dot{\delta}_2)$ obtenidos en los tiempos medios \bar{t}_1 y \bar{t}_2 para dos conjuntos de observaciones en noches distintas. El hecho de utilizar solo observaciones de dos noches distintas ya es una ventaja con respecto a los métodos clásicos, los

cuales requieren de al menos tres observaciones distintas. Además, la posibilidad de utilizar toda la información disponible de una noche de observación también representa una ventaja adicional, puesto que el uso de estos datos en el proceso de determinación inicial de las órbitas le añade robustez a los métodos. Utilizando las integrales de Kepler se obtiene un sistema de dos ecuaciones polinómicas no lineales:

$$\vec{q} \equiv (\vec{D} \cdot \vec{E}_2) \rho_2^2 + (\vec{D} \cdot \vec{F}_2) \rho_2 - (\vec{D} \cdot \vec{E}_1) \rho_1^2 - (\vec{D} \cdot \vec{F}_1) \rho_1 + \vec{D} \cdot (\vec{G}_2 - \vec{G}_1) = 0 \quad (6)$$

$$y \quad p \equiv [(P_1 - P_2)^2 Q_1 Q_2 - 4k^4 (Q_1 + Q_2)]^2 - 64k^8 Q_1 Q_2 = 0. \quad (7)$$

Estas ecuaciones contienen las incógnitas ρ_1 y ρ_2 , en las que los coeficientes $\vec{D}, \vec{F}_i, \vec{G}_i$ en (6) solo dependen de los vectores atribuibles, en tanto que la ecuación (7) es un polinomio de orden 24 cuyos coeficientes también dependen únicamente de los vectores atribuibles. Al resolver numéricamente este sistema se pueden encontrar fácilmente los valores de $\dot{\rho}_1$ y $\dot{\rho}_2$, y con esto obtener estimaciones para el vector de estado en ambas épocas \bar{t}_1 y \bar{t}_2 , (Gronchi, et al., 2010).

Como este es un sistema de ecuaciones polinómicas, una forma efectiva de resolver el problema consiste en usar la teoría de eliminación algebraica (Cox, et al., 2013). Una herramienta elegante de la eliminación algebraica consiste en obtener el ideal de eliminación mediante el cálculo de la base de Gröbner para algún orden de eliminación (por ejemplo, el orden lexicográfico). No obstante, por la característica de las ecuaciones aquí estudiadas, esta opción no es viable por la complejidad computacional del procedimiento. Por tal motivo, la mejor estrategia es calcular el resultante de los dos polinomios (Gronchi, et al., 2010), con respecto a una de las variables, por ejemplo ρ_2 :

$$Res_{p,q}(\rho_2) = \begin{vmatrix} a_{20} & 0 & b_2 & 0 & \dots & \dots & 0 \\ a_{19} & a_{20} & b_1 & b_2 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & b_0 & b_1 & b_2 & \dots & \vdots \\ \vdots & \vdots & 0 & b_0 & b_1 & \dots & \vdots \\ a_0 & a_1 & \vdots & \vdots & \vdots & b_0 & b_1 \\ 0 & a_0 & 0 & 0 & 0 & 0 & b_0 \end{vmatrix}, \quad (8)$$

donde los $a_i = a_i(\rho_2)$ y $b_i = b_i(\rho_2)$ son los coeficientes de (6) y (7), respectivamente, si se consideran estos polinomios como polinomios en la variable ρ_1 .

El resultante es importante porque es un polinomio en una variable (en este caso, ρ_2), que pertenece al ideal de eliminación. Esto quiere decir que sus raíces son soluciones parciales del sistema completo. Una vez obtenidas, se utiliza la ecuación (6) para obtener los valores de ρ_1 y de esta manera se soluciona el problema completo.

Para el cálculo del resultante se utiliza un esquema numérico, puesto que hacerlo simbólicamente consumiría muchos recursos de memoria y tiempo de procesamiento. Para

obtener los coeficientes de este polinomio se lo evalúa en ciertos puntos y posteriormente se hace una interpolación, con lo que se obtiene un estimado de sus coeficientes. Para tal efecto, se emplea la transformada discreta de Fourier (DFT) y su inversa (IDFT), puesto que este método es mucho más eficiente que las evaluaciones e interpolaciones comunes (Bini & Pan, 2012).

Selección de las soluciones

Como ya se dijo, al resolver las ecuaciones (6) y (7) se produce un conjunto de pares (ρ_1, ρ_2) . Cada par de soluciones reales y positivas permite obtener $(\hat{\rho}_1, \hat{\rho}_2)$. En principio, estos datos bastan para obtener los parámetros orbitales. No obstante, al resolver estas ecuaciones se encuentran soluciones que no poseen significado físico alguno y que aparecen como consecuencia del proceso de manipulación algebraica. Por esta razón, se deben seleccionar como soluciones admisibles solo aquellos pares que satisfagan las ecuaciones de conservación de energía y momento angular. En realidad, como las soluciones se obtienen de manera aproximada, ninguna de ellas satisface de manera exacta las ecuaciones y se aceptan como posibles soluciones solo aquellos pares que satisfagan las ecuaciones con un grado muy elevado de exactitud. Sin embargo, existen muchos casos en los que dos o más de las soluciones pasan por este filtro, por lo tanto, es necesario establecer un criterio adicional para seleccionar la solución correcta. Se asume que siempre habrá solo una solución para los casos estudiados. Sin embargo, esta suposición no siempre es cierta (Gronchi, 2009).

Si se plantea $(\rho_1, \rho_2, \hat{\rho}_1, \hat{\rho}_2)$ como una solución, con estos datos se pueden determinar los parámetros orbitales para cualquiera de los dos tiempos promedios \bar{t}_1 o \bar{t}_2 de cada vector atribuible. Los parámetros orbitales en un problema de dos cuerpos son las seis constantes de movimiento que caracterizan el movimiento del cuerpo. Dichos parámetros son los siguientes: el semieje mayor a , la excentricidad e , que indican el tamaño y la forma de la elipse correspondiente (nótese que se asume *a priori* que la órbita es elíptica, aunque se puede modificar fácilmente la teoría para incluir los otros tipos de órbitas posibles), y el paso de tiempo por el perihelio t_0 , es decir, la época en la que el cuerpo está en su punto más cercano al centro (al Sol, en este caso). Los restantes parámetros fijan la orientación de la órbita en espacio tridimensional. Estos parámetros son la inclinación i , que es el ángulo existente entre el plano de la órbita y el plano fundamental, la longitud del nodo ascendente Ω , que es el ángulo medido sobre el plano fundamental entre el eje x y el nodo ascendente, y, por último, el argumento de latitud del perihelio ω , que es el ángulo medido sobre el plano de la órbita entre el nodo ascendente y el perihelio. Para una descripción más detallada de estos parámetros, en la que se muestre claramente su significado geométrico, se puede consultar a Danby (1988).

Como se utilizaron la conservación de la energía y el momento angular para obtener la solución, los parámetros a, e, i, Ω fueron los mismos para ambas épocas. Sin embargo, se presentaron divergencias en los parámetros ω y l :

$$\Delta_{1,2} = (\omega_1 - \omega_2, \Delta l),$$

donde

$$\Delta l = l_1 - [l_2 + n(\bar{t}_1 - \bar{t}_2)], n = ka^{-\frac{3}{2}}$$

$\Delta_{1,2}$ se conocen como las condiciones de compatibilidad (Gronchi, et al., 2010). Al definir $\vec{A} = (\Lambda_1, \Lambda_2)$ mediante la ley de propagación de covarianzas, se obtiene la matriz de covarianzas marginal para las condiciones de compatibilidad:

$$\Gamma_{\Delta_{1,2}} = \frac{\partial \Delta_{1,2}}{\partial \vec{A}} \Gamma_{\vec{A}} \left[\frac{\partial \Delta_{1,2}}{\partial \vec{A}} \right]^T. \tag{9}$$

Esta teoría permite estimar una matriz de covarianzas para el espacio de órbitas completo, lo cual proporciona intervalos de confianza para los parámetros orbitales obtenidos, cosa que no es posible con los métodos clásicos de determinación de órbitas.

Al tener $C = \Gamma^{-1} \Delta_{1,2}$, se define la norma de identificación como:

$$\|\Delta_{1,2}\|_*^2 = \Delta_{1,2} C \Delta_{1,2}^T. \tag{10}$$

El criterio adicional consiste en seleccionar la solución $(\rho_1, \rho_2, \hat{\rho}_1, \hat{\rho}_2)$ que arroje el valor más pequeño para la norma de identificación.

Implementación numérica

En las secciones anteriores se describió teóricamente el método basado en los planteamientos de Gronchi, et al. (2010) para resolver el problema de la inversión de órbitas. Con base en él se implementó un conjunto de subrutinas en Matlab® para obtener los parámetros orbitales a partir de datos de astrometría entre las cuales se incluyeron rutinas para el acondicionamiento de los datos, la transformación entre sistemas de coordenadas cartesianas y esféricas, la transformación del espacio de fases a los parámetros orbitales, el manejo algebraico de las ecuaciones polinómicas y una rutina principal con la que se implementa el procedimiento descrito en las secciones precedentes, cuyo diagrama de flujo se muestra en la Figura 1.

Si la convergencia se consigue, es decir, si el algoritmo llega hasta el último proceso de ejecución, este procedimiento permite obtener un conjunto de parámetros orbitales con base en la información suministrada como entrada. Sin embargo, se presentaron algunos problemas en las primeras pruebas de este código, asociados, por lo general, al hecho de que los coeficientes numéricos de los polinomios q (6) y p (7) son valores extremadamente pequeños. Además, no es adecuado hacer un escalamiento de las cantidades (mediante un cambio de unidades, por ejemplo), puesto que, como lo menciona Gronchi (comunicación personal, junio 5, 2015), el problema es que los coeficientes no son uniformemente pequeños.

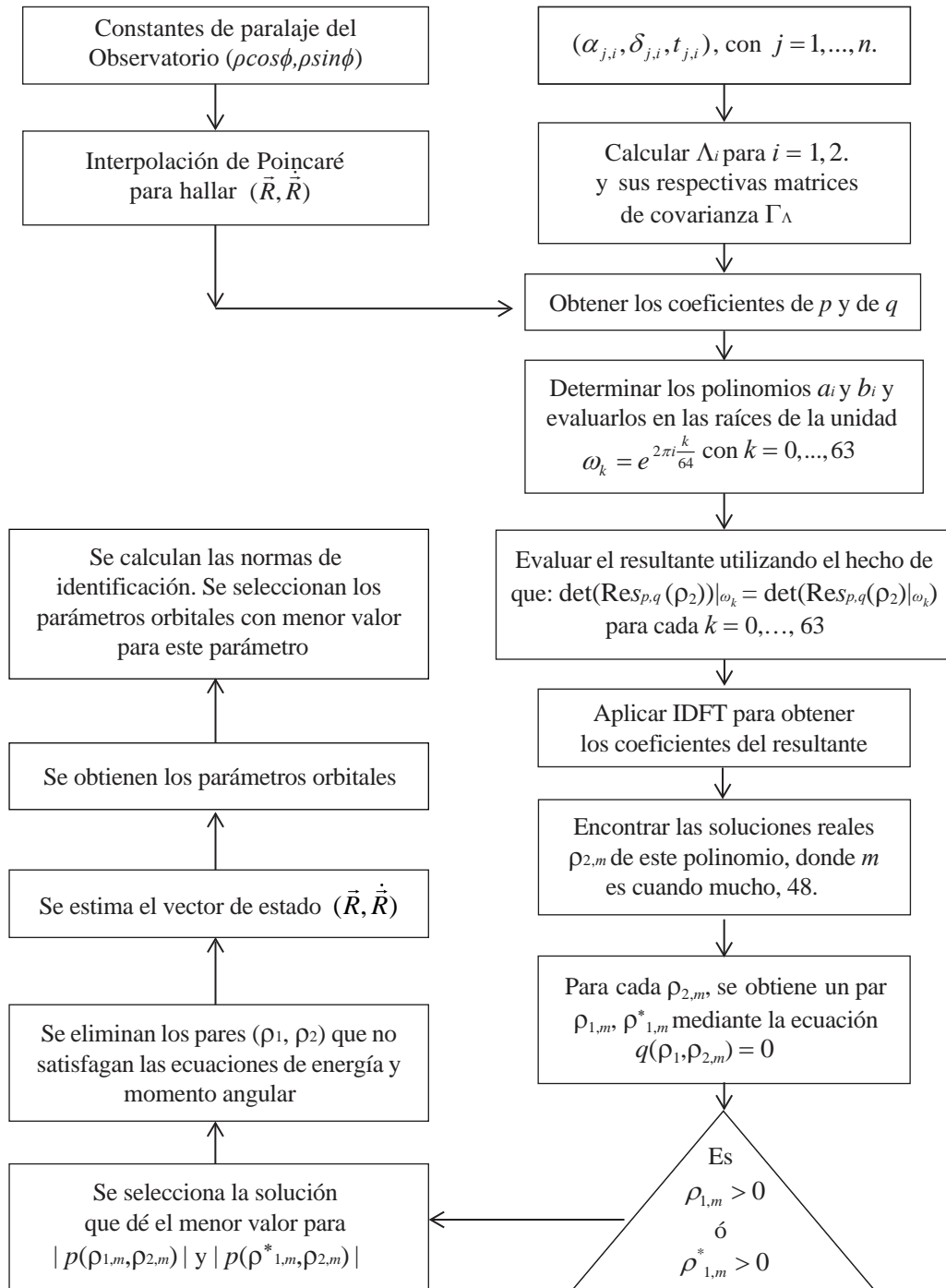


Figura 1. Diagrama de flujo del método principal.

Ante este panorama, se utilizaron las funciones de aritmética de alta precisión de la utilidad de matemática simbólica de Matlab (<http://www.mathworks.com/products/symbolic/features.html#variable-precision-arithmetic>) para obtener resultados confiables. En promedio, los tiempos de ejecución se situaron en alrededor de 6 segundos en un computador de escritorio con procesador Intel Core i5 a 3.2 Ghz. Todas las rutinas empleadas en este trabajo pueden solicitarse a los autores.

Resultados y discusión

Parámetros orbitales

El algoritmo se probó con cuerpos pertenecientes a las familias MBA y NEO. En la Tabla 1 se incluyen todos los asteroides utilizados como objetos de estudio y se muestra la procedencia de los datos empleados para calcular el par de atribuibles para cada cuerpo.

Tabla 1. Tiempos y lugares de observación de los asteroides utilizados como objeto de estudio. La información astrométrica se obtuvo del motor de búsqueda de observaciones del *Minor Planet Center* MPC (<http://www.minorplanetcenter.net/db\search>), en el cual se encuentran todos los datos tomados por los observatorios registrados en este centro. Con t_1 se indica el tiempo inicial del arco de observaciones medido por el observatorio correspondiente; t_2 representa el tiempo inicial del segundo conjunto de observaciones (ambos tiempos expresados en fecha juliana, FJ). Los primeros cinco asteroides pertenecen a la familia MBA y los cinco finales a la familia NEO. Para mayor claridad, los datos astrométricos utilizados en este trabajo pueden ser descargados de: observatorioastronomico.utp.edu.co/astrometria/datos-articulo-mba-y-neo.html

Asteroide	t_1 (FJ)	Observatorio	t_2 (FJ)	Observatorio
(101878) 2002 GL60	2454108,639	G96	2453999,035	568
675 Ludmilla	2456878,317	L33	2456901,726	703
914 Palisana	2451713,475	117	2451767,3883	196
1238 Predappia	2457022,016	G45	2457105,813	G45
1816 Liberia	2457127,788	703	2457187,76	703
99942 Apophis	2453175,67	695	2453357,923	E12
11500 Tomaiyowit	2451109,467	561	2451151,942	428
15745 Yuliya	2451716,432	610	2451747,683	739
(25330) 1999 KV4	2451907,585	704	2452007,846	649
(65679) 1989 UQ	2447872,547	675	2447828,769	010

El algoritmo se ejecutó para los datos presentados en la Tabla 1 y se obtuvo convergencia en todos los casos. En la Tabla 2 se presentan los parámetros orbitales nominales (entregados por el MPC), y se muestra el resultado de aplicar el algoritmo en la versión geocéntrica (Geoc.) y en la versión topocéntrica (Topo.). Además, en la Figura 2 se muestran las trayectorias obtenidas para los cuerpos MBA y en la Figura 3 las trayectorias para los objetos NEO, ambas gráficas en el sistema eclíptico heliocéntrico.

Es importante señalar que las razones por las que los resultados obtenidos en ambas versiones no coinciden con los parámetros del MPC consisten, primero, en que las órbitas presentadas aquí se calcularon con pocos datos, mientras que los parámetros del MPC son órbitas de mínimos cuadrados obtenidas con todos los datos disponibles, y, segundo, el modelo dinámico aquí empleado es el de los dos cuerpos, lo cual representa una simplificación importante de la situación real.

Ahora bien, como se mencionó previamente, el objetivo de la determinación inicial de órbitas es estimar las efemérides del cuerpo con la precisión suficiente para lograr observarlo en el futuro. Esto quiere decir que el error entre la posición real y la estimada debe ser, cuando mucho, del orden de minutos de arco, dependiendo del montaje experimental de cada lugar de observación (en general, el campo de visión para un observatorio astronómico que realice astrometría de asteroides debe ser de decenas de minutos de arco para garantizar la presencia de una buena cantidad de estrellas de referencia. Ver: <http://www.minorplanetcenter.net/iau/info/Astrometry.html>).

En la tabla 3 se muestran las posiciones para tres de los asteroides de prueba comparadas con las posiciones registradas por el MPC.

Los resultados obtenidos muestran que existen errores de pocos minutos de arco para las posiciones estimadas, lo cual, en principio, permite observar nuevamente estos cuerpos en estas épocas.

Comparación de los resultados topocéntricos y geocéntricos

Existen distintos métodos para analizar los errores en el proceso de determinación orbital. **Mortari, et al.** (2006) utilizan el hecho de que los parámetros orbitales se pueden clasificar en dos grupos que contienen información diferente sobre la órbita a, e , los cuales son parámetros que indican la forma de la órbita, mientras que (i, Ω, ω) dan información relativa sobre la orientación de la órbita en el sistema heliocéntrico eclíptico. Esto permite reducir el número de parámetros de error de 6 a 2, que son los parámetros de error en la forma de la órbita d y en la orientación de la órbita Φ (**Schaepferkoetter**, 2011).

Si los parámetros nominales son $(a, e, i, \Omega, \omega, \theta)$ y los aproximados son $(a^*, e^*, i^*, \Omega^*, \omega^*, \theta^*)$, los errores se estiman mediante:

$$d = \sqrt{(a - a^*)^2 + (b - b^*)^2}, \tag{11}$$

donde $b = a\sqrt{1 - e^2}$ es el semieje menor. El error en la orientación de la órbita Φ se define como:

$$\cos \Phi = \frac{1}{2} \left(\text{tr} [CC^{*T}] - 1 \right), \tag{12}$$

en la cual:

$$C = R(\omega + \theta)P(+i)R(+\Omega) = \begin{bmatrix} \hat{r} & \hat{h} \times \hat{r} & \hat{h} \end{bmatrix}^T, \tag{13}$$

Tabla 2. Resultados obtenidos al ejecutar el método. Se comparan los valores nominales de los parámetros orbitales (MPC) con respecto a los obtenidos en el caso geocéntrico (Geoc.) y topocéntrico (Topo.).

Asteroide	Datos a(UA)	Parámetros orbitales					
		<i>e</i>	<i>i</i> (°)	Ω (°)	ω (°)	<i>t</i> ₂ (FJ)	
101878	MPC	2,2381	0,1834	0,6022	156,269	145,115	2457504.32096
	Geoc.	2,2907	0,2137	0,6141	156,879	145,790	2457637.57945
	Topo.	2,2613	0,2007	0,6138	157,107	144,246	2457564.57179
675	MPC	2,7704	0,2008	9,7838	263,269	152,11	2457136.39573
	Geoc.	2,7933	0,2104	9,7729	263,218	151,595	2457131.91029
	Topo.	2,7751	0,2089	9,7811	263,288	151,506	2457132.93739
914	MPC	2,4577	0,2147	25,206	255,807	49,1642	2457322.21024
	Geoc.	2,4528	0,2106	25,215	255,816	48,5247	2457432.94940
	Topo.	2,4548	0,2111	25,223	255,837	48,4659	2457306.55467
1238	MPC	2,6658	0,1416	12,155	51,954	91,8659	2457002.47106
	Geoc.	2,6966	0,1616	12,076	51,186	139,734	2457167.80099
	Topo.	2,6498	0,1448	12,053	52,727	96,9764	2457022.58713
1816	MPC	2,3387	0,2179	26,139	153,36	340,785	2456938.28940
	Geoc.	2,2667	26,111	26,110	153,23	334,294	2456921.53315
	Topo.	2,3178	0,2103	26,197	153,68	339,608	2456935.04252
99942	MPC	0,9221	0,1912	3,3306	204,20	126,457	2457159.23350
	Geoc.	0,8919	0,1987	2,9489	209,75	115,033	2457265.63962
	Topo.	0,9219	0,1914	3,3399	204,53	126,274	2457155.94368
11500	MPC	1,0799	0,3558	10,309	234,46	289,420	2457363.36967
	Geoc.	0,9985	0,1717	4,6842	236,11	290,971	2457412.86261
	Topo.	1,0690	0,3327	9,6986	234,83	289,215	2457270.68610
15745	MPC	1,7198	0,2551	14,428	132,64	140,549	2457478.65349
	Geoc.	1,7461	0,2625	14,758	132,70	141,081	2457612.43210
	Topo.	1,7074	0,2519	14,243	132,85	139,857	2457416.61518
25330	MPC	1,5405	0,3708	14,328	50,619	85,978	2456858.07907
	Geoc.	1,6128	0,3936	14,531	50,163	89,452	2457208.65182
	Topo.	1,5679	0,3795	14,407	50,540	87,209	2456989.63222
65679	MPC	0,9150	0,2647	1,2995	178,238	14,892	2457230.22159
	Geoc.	0,8934	0,3619	1,8380	181,517	14,410	2457206.96211
	Topo.	0,9135	0,2760	1,3475	178,921	14,795	2457207.83307

donde P, R son las matrices de rotación directa sobre los ejes x y z, respectivamente, y los vectores en la matriz del lado derecho se entienden como vectores columna. Nótese que el ángulo Φ es el ángulo principal de la matriz correctiva entre las matrices C y C*, que físicamente puede interpretarse como el ángulo existente entre las direcciones del momento angular estimado y el verdadero, lo que indica que si este ángulo es pequeño se debe a que la órbita estimada se acerca mucho a la verdadera en cuanto a su posición y orientación en el espacio tridimensional.

Considerando los parámetros entregados por el MPC como valores exactos (por las razones expuestas anteriormente), la idea es utilizar el método descrito para calcular el error en la versión geocéntrica y en la topocéntrica para cada asteroide. Al aplicar estas ecuaciones a los resultados obtenidos, se estimaron los errores que se muestran en la Figura 4. Nótese en la gráfica de error en la forma (imagen superior) que, a excepción de los cuerpos 11500 y 25330, los errores son inferiores a 65×10^{-3} AU, que son valores esperados al usar el problema de los dos cuerpos como modelo dinámico (Gronchi, et al., 2010).

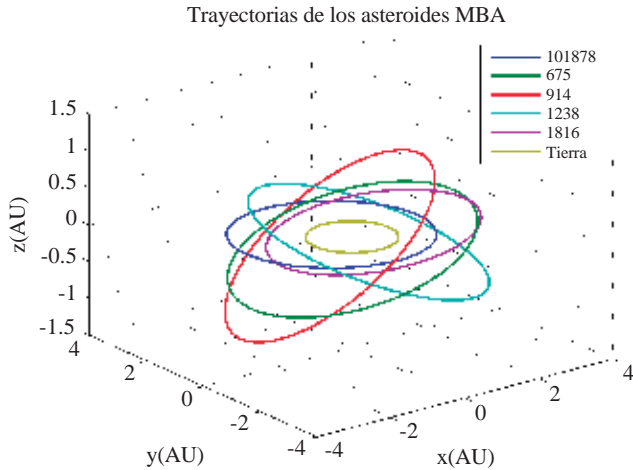


Figura 2. Trayectorias para los cuerpos de estudio pertenecientes a la familia MBA en el sistema heliocéntrico eclíptico.

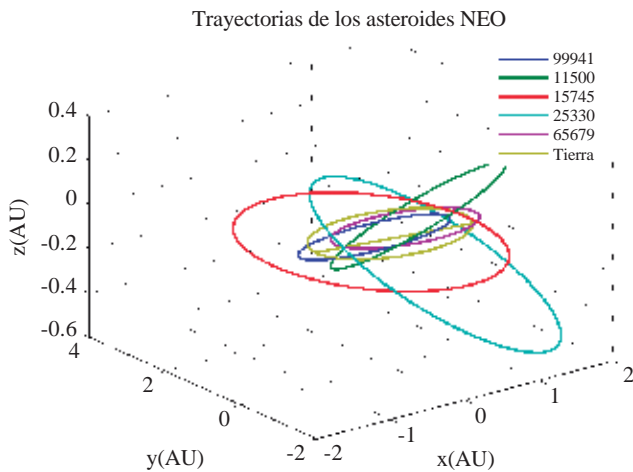


Figura 3. Trayectorias obtenidas para los cuerpos NEO en el sistema heliocéntrico eclíptico.

Otra observación importante al analizar esta gráfica es que, en general, tanto para el error de forma (imagen superior) como para el error de orientación (imagen inferior), el uso de la versión topocéntrica del algoritmo produjo errores inferiores a los de la geocéntrica, lo que se nota para los ejemplos de ambas familias de asteroides.

Sin embargo, también es importante notar que las diferencias entre ambas aproximaciones son mayores para los asteroides de la familia NEO. Por ejemplo, si se calcula el promedio de las diferencias entre los errores geocéntricos y topocéntricos, se obtiene un valor de 0.02711AU para los cuerpos MBA y de 0.04950AU para los NEO, el cual casi doble el de los primeros.

Lo anterior sugiere dos aspectos importantes: la primera es que como muchos autores han discutido en el pasado (Milani & Knezevic, 2005), para los cuerpos de la familia MBA la versión geocéntrica produce resultados aceptables que permiten hacer el seguimiento futuro al objeto y, por lo tanto, un refinamiento de la órbita. Esto también es cierto para los métodos clásicos de Laplace y Gauss. La segunda es que para los objetos pertenecientes a la familia NEO, los errores generados al usar la versión geocéntrica pueden ser muy superiores a los producidos por la versión topocéntrica, y esto puede llegar a ser determinante en la imposibilidad de hacer seguimiento al cuerpo o de efectuar un refinamiento de los parámetros orbitales mediante la corrección diferencial estándar (Danby, 1988). Ello se debe a que muchos objetos pertenecientes a esta familia son muy tenues y se mueven muy rápido (es decir, poseen un movimiento diario muy alto), lo cual demanda mayor precisión instrumental.

Conclusiones y trabajo futuro

Se implementó un algoritmo computacional (Gronchi, et al., 2010), con el fin de resolver el problema de la inversión de órbitas, el cual se basó en las integrales de Kepler para el problema de dos cuerpos. Se mostró la aplicación del algoritmo para cuerpos pertenecientes a las familias MBA y NEO en dos versiones: la geocéntrica y la topocéntrica. Se encontró que, en general, el algoritmo fue útil como método de determinación inicial de órbitas, puesto que los errores de las posiciones estimadas fueron de pocos minutos de arco comparadas con las posiciones reales, de tal forma que es factible observar estos cuerpos en estas épocas, lo cual es el objetivo de la determinación inicial.

Igualmente, se compararon los errores producidos con ambas versiones del algoritmo y se encontró que la variante topocéntrica producía errores inferiores. Para los cuerpos de la familia MBA, la diferencia no fue muy significativa para el propósito de hacer mediciones futuras. No obstante,

Tabla 3. Comparación entre la posición estimada y la verdadera para tres de los asteroides de prueba.

Asteroide	Tiempo (FJ)	Efeméride	α (h m s)	δ (° ' ")
675	2457400.91119	Estimada	09 37 41	+02 4 57.2
		MPC	09 35 46.93	+02 12 36.6
99942	2453175.67015	Estimada	09 44 39	+13 18 51.36
		MPC	09 44 30.10	+13 18 54.0
65679	2447871.60303	Estimada	23 32 33.47	-10 40 5.858
		MPC	23 32 42.45	-09 19 39.1

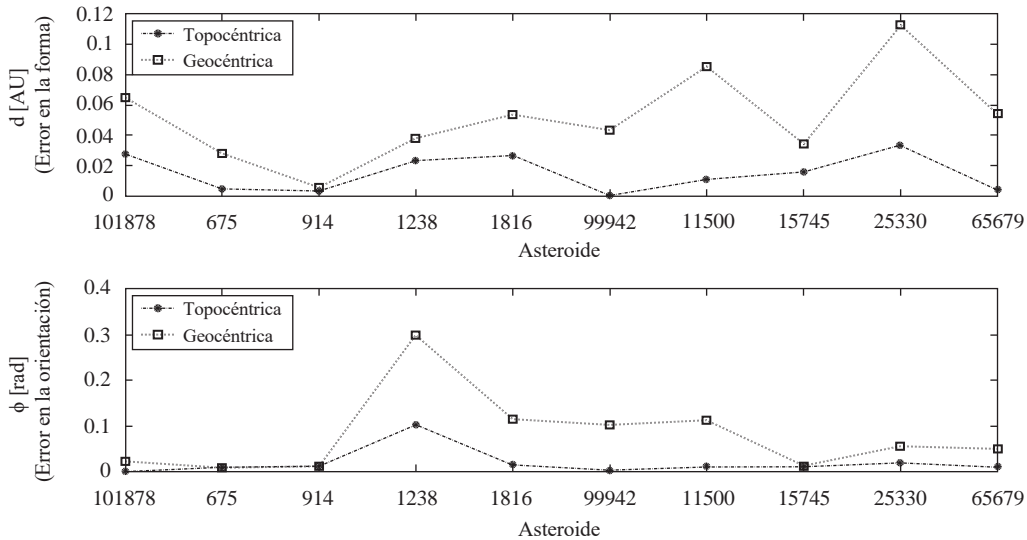


Figura 4. Errores obtenidos para cada cuerpo establecido como muestra. En la parte superior se muestra el error en la forma de la órbita, y en la inferior, el error en la orientación de la órbita.

esta diferencia es importante para los objetos NEO, puesto que estos cuerpos exigen mayor precisión en el proceso de medición.

Es importante adelantar pruebas de este algoritmo con una muestra mayor de cuerpos, para lo cual la estrategia más adecuada podría ser una simulación de observaciones (mediante el método de Monte Carlo, por ejemplo), en la que se pueda estudiar detalladamente el comportamiento del método cuando se utiliza un conjunto grande de datos. También es importante ahondar en el comportamiento del método cuando se varía el tiempo transcurrido entre ambos arcos de observaciones.

Por último, es importante señalar que la filosofía que sustenta el método implementado en este trabajo es completamente distinta a la de los métodos clásicos. En primer lugar, los métodos de Laplace y Gauss requieren al menos de tres observaciones distintas en noches diferentes. Antiguamente era muy difícil obtener más de una observación por noche, por lo que estos métodos se ajustaban perfectamente a las condiciones instrumentales. No obstante, con las cámaras CCD (con las cuales se cuenta en el Observatorio Astronómico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Fuente: <http://observatorioastronomico.utp.edu.co/instrumentacion.html>), hoy se pueden obtener rutinariamente varios datos de un cuerpo por cada hora de observación. Esto impone replantearse el uso de los métodos clásicos o proponer métodos alternativos que permitan el uso de la mayor cantidad de datos obtenidos por noche de observación. Esa es la idea del método implementado en este trabajo, cuyo propósito es agrupar las observaciones de solo dos noches de observaciones para estimar la órbita inicial. Si bien en este trabajo no se intentó hacerlo, la utilización

de más datos para la determinación inicial de las órbitas puede mejorar la convergencia del proceso y, así, lograr la reducción de “asteroides perdidos” debido a la inexactitud de la determinación inicial.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Bibliografía

Bini, D., & Pan, V. (2012). Polynomial and Matrix Computations: Fundamental Algorithms. Birkhäuser Boston.

Celletti, A., & Pinzari, G. (2006). Dependence on the observational time intervals and domain of convergence of orbital determination methods. En *Periodic, Quasi-Periodic and Chaotic Motions in Celestial Mechanics: Theory and Applications*. p. 327-344. Springer.

Cox, D., Little, J., O’Shea, D. (2013). *Using Algebraic Geometry*. New York: Springer.

Danby, J. (1988). *Fundamentals of Celestial Mechanics*. Willmann-Bell.

Gauss, C. F. (1809). *Theoria motus corporum coelestium in sectionibus conicis solem ambientium*. sumtibus Frid. Perthes et IH Besser.

Gronchi, G. F., Dimare, L., & Milani, A. (2010). Orbit determination with the two-body integrals. *Celestial Mechanics and Dynamical Astronomy*, **107** (3): 299-318.

Herrick, S. (1971). *Astrodynamic: Orbit determination, space navigation, celestial mechanics*. Van Nostrand Reinhold Co.

Karimi, R. R., & Mortari, D. (2011). Initial orbit determination using multiple observations. *Celestial Mechanics and Dynamical Astronomy*, **109** (2): 167-180.

Knezevic, Z., & Milani, A. (2005). From astrometry to celestial mechanics: orbit determination with very short arcs. *Celestial Mechanics and Dynamical Astronomy*, **92** (1-3), 1-18.

- Laplace, P.** (1780). Laplace's collected works. En *Mém. Acad. R. Sci. Paris* (págs. 93-146). Paris.
- Marsden, B. G.** (1985). Initial orbit determination-The pragmatist's point of view. *The Astronomical Journal*. **90**: 1541-1547.
- Milani, A., & Gronchi, G.** (2010). *Theory of Orbit Determination*. Cambridge University Press.
- Milani, A., & Knezevic, Z.** (2005). From astrometry to celestial mechanics: orbit determination with very short arcs. *Celestial Mechanics and Dynamical Astronomy*. **92**: 1-18.
- Milani, A., Gronchi, G., & Knezevic, Z.** (2007). New definition of discovery for solar system objects. *Earth, Moon, and Planets*. **100** (1-2): 83-116.
- Milani, A., Gronchi, G., Farnocchia, D., Knezevic, Z., Jedicke, R., Denneau, L., Pierfederici, F.** (2008). Topocentric orbit determination: algorithms for the next generation surveys. *Icarus*. **195** (1): 474-492.
- Mirtorabi, T.** (2014). A simple procedure to extend the Gauss method of determining orbital parameters from three to N points. *Astrophysics and Space Science*. **349** (1): 137-141.
- Mortari, D., Scuro, S. R., & Bruccoleri, C.** (2006). Attitude and orbit error in n-dimensional spaces. *The Journal of the Astronautical Sciences*, **54** (3-4): 467-484.
- Poincaré, H.** (1906). *Mémoires et observations. Sur la détermination des orbites par la méthode de Laplace*. *Bulletin Astronomique*, **23**: 161-187.
- Schaepkoetter, A. V.** (2011). A comprehensive comparison between angles-only initial orbit determination techniques. Texas A&M University: Phd thesis.

Análisis comparativo de seis lugares de interés para la ubicación de instrumentación astronómica en Colombia

Giovanni Pinzón^{1*}, Danilo González¹, Aura Ramírez²

¹ Observatorio Astronómico, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

² Departamento de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de una campaña observacional de tres años durante la cual se realizaron medidas de la calidad del cielo in-situ en seis sitios de interés astronómico en los departamentos de Santander, Boyacá, Tolima, Huila, Cesar y La Guajira. Se realizaron excursiones esporádicas y de corta duración a estos seis lugares con el fin de realizar mediciones de temperatura y humedad a lo largo de la noche, del nivel de turbulencia en la vecindad del telescopio ó *Seeing*, del brillo del cielo y de la extinción atmosférica. La metodología utilizada en las medidas del *Seeing* se validó a través del uso de imágenes satelitales simultáneas a nuestras visitas, obtenidas de la base de datos del satélite geostacionario GOES 13. El *Seeing* es altamente variable a lo largo de la noche en todos los sitios, con valores entre 1" y 4". Las difíciles condiciones climatológicas en especial la elevada humedad registrada durante la campaña, impidieron obtener una estadística mínima de datos fotométricos por lo que el análisis comparativo de los lugares visitados está basado en las medidas de *Seeing*. Una prueba de Kolmogorov-Smirnov confirma que los valores más bajos se registraron en los lugares de mayor altura en el Oriente colombiano, en particular en el sitio La Bricha, una vereda del municipio de Macaravita en Santander en donde la variabilidad registrada fué la menor con un $rms = 0,59''$. Este hecho sumado a la humedad inferior a 85% incluso durante la madrugada y el bajo nivel observado en el brillo de cielo sugieren que de los lugares visitados durante la campaña, La Bricha puede considerarse como un sitio apropiado para la ubicación de instrumentación astronómica en el rango óptico. No obstante, se recomienda realizar un monitoreo a largo plazo con el fin de caracterizar completamente el lugar.

Palabras clave: turbulencia atmosférica, búsqueda de sitio en Colombia, GOES 13.

Comparative analysis of six interesting sites for astronomical instrumentation in Colombia

Abstract

In this work we present the results obtained from an observational campaign aimed to conduct measurements in-situ of the quality of the sky at six sites with astronomical interest in Santander, Boyacá, Tolima, Huila, Cesar and La Guajira. Short and sporadic expeditions were done to those places with the main goal to conduct measurements of temperature, humidity during the night, the level of turbulence in the vicinity of the telescope, the *Seeing*, the sky brightness and the atmospheric extinction. The adopted methodology for the *Seeing* measurements was validated with satellite data simultaneous to our visits, obtained from the data archive of the geostationary satellite GOES 13. All sites present *Seeing* highly variable along the night with values between 1" and 4". The bad weather and specially, the high humidity registered during the campaign limited the quality of photometric data and subsequently, the comparative analysis of the visited sites is based on the *Seeing* measurements. An statistical Kolmogorov-Smirnov test confirm that the lowest values are observed in high altitude sites over the Eastern Andes in particular at La Bricha in Macaravita-Santander where we get the lowest variability with $rms = 0,59''$. This fact together with the low humidity, less than 85% even during the dawn and the low level of the sky brightness suggest that La Bricha is a suitable place for location of astronomical instrumentation in the visible range. However, it is highly recommended to conduct a long-term monitoring of the place with the aim to characterize the site properly.

Key words: Atmospheric turbulence, site testing in Colombia, GOES 13.

Introducción

La turbulencia en la atmósfera es una característica importante a tener en cuenta en el proceso de selección de lugares para la ubicación de instrumentación astronómica sobre todo en la región del óptico y del infrarrojo. En condiciones de cielo despejado, la turbulencia limita la resolución de los

telescopios y restringe el valor del umbral de detección y el intervalo de longitud de onda dentro del cual las observaciones son posibles. Si bien otros factores como bajos niveles de extinción atmosférica y de brillo del cielo son característicos de un buen lugar de observación, un bajo nivel de turbulencia atmosférica es fundamental para obtener imágenes y espectros ópticos de buena calidad. La

identificación de lugares dentro de una región de interés en donde el efecto de la turbulencia es mínimo, se realiza a través de medidas in-situ del nivel de degradación de la imagen de objetos puntuales a lo largo de la noche. Dicha metodología se aplicó en la selección del sitio para la ubicación del VLT (Very Large Telescope), del complejo astronómico de La Silla, ambos en el norte de Chile (Stock, 1964), del observatorio de Roque de los Muchachos en las Islas Canarias (Cavazzani, *et al.*, 2011; Della Valle, *et al.*, 2010) y en un estudio sobre búsqueda de sitio en Indonesia (Hidayat, *et al.*, 2012).

La identificación de posibles lugares para la ubicación de un telescopio óptico nacional con instrumentación encaminada a fortalecer actividades de investigación, formación y extensión en Universidades y Colegios principalmente, es una tarea compleja toda vez que Colombia se encuentra dentro de la Zona de Confluencia Intertropical (ZCIT) la cual se caracteriza por tener alta nubosidad. El clima en Colombia está gobernado por un ciclo bimodal anual con dos épocas secas y dos de lluvia durante el año (Poveda, 2011). No obstante, se espera que en la región visible del espectro electromagnético, existan algunos lugares con cielos claros durante las temporadas secas con características como calidad del cielo aceptable, horizonte despejado, ausencia de tormentas y velocidad del viento inferior a 20 km/h. Estos lugares aún no se han identificado ni monitoreado toda vez que los estudios previos sobre búsqueda de sitio en Colombia son muy escasos. Brieva (1985) realizó una campaña observacional con el fin de cuantificar el porcentaje de cielo cubierto durante la noche en cuatro lugares sobre las cordilleras Andinas. En su trabajo basado en datos de inspección visual del cielo se reportan entre 130 y 250 noches utilizables por año en El Otún ($4^{\circ}45'$, $72^{\circ}25'$), un sitio a 4000 de altura sobre la cordillera central.

En un trabajo reciente, Pinzón, *et al.* (2015) identificaron doce lugares potenciales en la región que comprende Colombia, el Oeste de Venezuela y el Norte de Ecuador, ocho de ellos en el territorio Colombiano. La metodología implementada en dicho estudio se basa en un algoritmo que predice el porcentaje de cielo claro en un lugar determinado. Este porcentaje se calcula tres veces durante cada una de las noches de los años 2008 a 2012 a través de la comparación entre la temperatura de brillo obtenida del análisis conjunto de imágenes satelitales de Colombia en el infrarrojo y registros históricos de temperatura proporcionados por estaciones meteorológicas en tierra. Adicionalmente se utilizan datos de temperatura de la alta tropósfera obtenidos de bases de datos de radio sondeos. La validación del algoritmo se realizó con registros diarios de cubrimiento del

cielo durante las noches de los mismos años, obtenidos en los reportes del Observatorio Nacional de Llano del Hato en Venezuela. La diferencia porcentual anual máxima entre los valores reportados y predichos por el algoritmo es inferior al 20%.

El mapa de número de noches despejadas por año (en adelante NDA) correspondiente al análisis de cinco años de imágenes en dos bandas infrarrojas del satélite GOES se encuentra en la Figura 1. Los mejores lugares se encuentran en Venezuela, principalmente en la región sobre los Andes, comprendida entre las ciudades de Timotes y Trujillo con 208 NDA. En Colombia, la región con mayor número de noches claras se localiza en la parte nororiental de la Sierra Nevada de Santa Marta con (126 ± 34) NDA, seguida de una zona amplia en la Serranía del Perijá, al oriente de Codazzi, cerca a la frontera con Venezuela con (111 ± 27) NDA. Lugares con número similar de noches claras se encuentran en los alrededores de Chitagá en Norte de Santander con (107 ± 23) NDA mientras que en el cañón del río Nevado, entre Macaravita y el Cocuy, en el norte de Boyacá se encuentran lugares con entre 90 y 100 NDA. La mayoría de regiones restantes sobre los Andes presentan valores inferiores a 60 NDA mientras que en lugares de baja altitud se obtienen del orden de 40 NDA (González, 2014).

En este trabajo se presentan los resultados de la campaña observacional asociada a los lugares identificados en el estudio mencionado. Durante tres años se realizaron excursiones esporádicas y de duración corta a cuatro de dichos sitios y a dos lugares con altitud inferior a 450

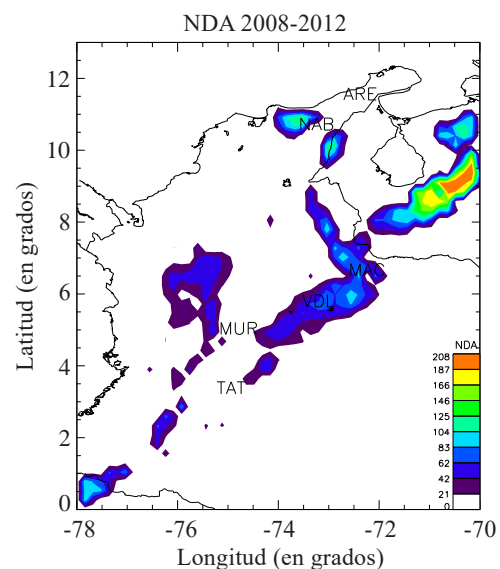


Figura 1. Mapa del número de noches despejadas por año (NDA) en Colombia para los años 2008-2012. Se indican los sitios analizados en este trabajo de la siguiente manera: ARE=Aremasain (La Guajira), NAB=Nabusimake (Cesár), MAC=Macaravita (Santander), VDL= Villa de Leyva (Boyacá), MUR=Murillo (Tolima) y TAT=Tatacoa (Huila).

***Correspondencia:**

Giovanni Pinzón, gapinzone@unal.edu.co

Recibido: 12 de octubre de 2015

Aceptado: 15 de febrero de 2016

metros sobre el nivel del mar, con el fin de medir la calidad del cielo in-situ. En particular, se efectuaron medidas de *Seeing*, del coeficiente de extinción atmosférico, de temperatura, de humedad relativa y del brillo del cielo a lo largo de la noche. Con base en estos registros y en un proceso cuidadoso de validación de las medidas de turbulencia atmosférica, se realizó un análisis comparativo tendiente a identificar el mejor lugar.

El proceso de adquisición y análisis de los datos obtenidos durante las visitas a los lugares de interés, en particular, las mediciones de *Seeing* y de coeficiente de extinción atmosférico se describen en la sección Metodología y Resultados.

Metodología y Resultados

Observaciones

Las medidas de calidad de cielo se obtuvieron durante visitas de corta duración a los sitios más cercanos a los reportados por Pinzón, et al. (2015). Se visitaron cuatro lugares situados en altitudes superiores a 2000 metros, localizados dentro de un radio de 20 kilómetros con centro en las coordenadas reportadas en dicho estudio y dos lugares de referencia en altitudes de 7 y 450 metros. La aproximación a lugares más cercanos a los reportados en el estudio previo, presentó dificultades relacionadas con falta de vías de acceso, seguridad y condiciones mínimas de trabajo durante la noche. La Tabla 1 contiene información sobre las coordenadas geográficas de cada lugar, el identificador (ID), la altura sobre el nivel del mar y en la última columna información sobre las fechas de la visita realizada a cada sitio.

El principal objetivo fue realizar en cada sitio medidas de *Seeing* utilizando un monitor diferencial de imagen ó DIMM, medidas del coeficiente de extinción atmosférica, del brillo del cielo y de las variables meteorológicas temperatura del aire y humedad relativa utilizando el siguiente equipo básico: 1) Estación meteorológica portátil, 2) DIMM

(Telescopio Celestron Nexstar-8 con una cámara de video DSLR), 3) Telescopio Celestron CGE-PRO 11 (27,94 cm) con una cámara CCD modelo SBIG ST-402ME con rueda de filtros fotométricos ópticos tipo Bessel BV I, destinado a medidas de extinción atmosférica y 4) Medidor de brillo del cielo (SQM por sus siglas en inglés). Adicional-mente, se descargaron 20 imágenes por noche en tres filtros, para cada lugar y en las fechas de nuestra visita de la base de datos del satélite GOES13, con el fin de realizar la validación de los datos obtenidos con el DIMM.

La rutina en cada lugar consistió en monitorear la temperatura y la humedad relativa a lo largo de cada una de las noches de la visita, monitorear el nivel de turbulencia obteniendo videos de corta duración (~15 s) con cadencia de media hora usando el DIMM y cuando la humedad lo permitía y el cielo estaba despejado, obtener imágenes CCD en tres filtros fotométricos de estrellas estándar antes y después del tránsito. El brillo del cielo se midió una vez por noche al comienzo o al final dependiendo de la presencia o no de la Luna, usando el SQM en los ocho valores de acimut siguientes: 0, 45, 90, 135, 180, 225, 270 y 315 grados. Para cada valor de acimut se obtuvieron tres medidas en 0, 45 y 90 grados de altura.

La nubosidad y la elevada humedad presente durante toda la campaña restringieron tanto el número como la calidad de las imágenes astronómicas. Con excepción del sitio Aremasain en La Guajira, la observación se redujo a las estrellas estándar de tipo A0 más brillantes en el firmamento. La baja humedad de Aremasain permitió un registro de 35 imágenes CCD en los tres filtros para todas las noches de la visita en contraste con Nabusimake y La Bricha en donde se lograron respectivamente 6 y 7 imágenes por noche, en los tres filtros. En los otros tres lugares la condensación de agua en los equipos hizo imposible la obtención de datos fotométricos de calidad aceptable.

Tabla 1. Lugares visitados durante la campaña observacional 2013-15. El identificador de cada sitio (ID) en la primera columna corresponde a la localidad más próxima a las coordenadas indicadas en las columnas 3 y 4. La altura de cada sitio se indica en la columna 5 y la columna 6 contiene información sobre parámetros usados en el proceso de validación de las medidas realizadas con el DIMM.

ID	Sitio	Lat.(N)	Lon.(O)	z(m)	$\Lambda(z)$	Noches
MAC	<i>Alto de los Rayos</i>	6°30'7"	72°36'32"	3000	...	5-8 enero 2014
	<i>La Bricha</i>	6°30'47"	72°33'22"	2600	2×10^{-8}	9-11 enero 2014
ARE	<i>Aremasain</i>	11°29'53"	72°41'49"	7	1×10^{-11}	29 julio - 5 agosto 2013
VDL	<i>El Infernito</i>	5°38'44"	73°33'32"	2100	...	9-11 agosto 2013
	<i>Museo Paleontológico</i>	5°38'37"	73°30'58"	2200	5×10^{-9}	6-8 agosto 2013
						18-22 febrero 2015
TAT	<i>La Tatacoa</i>	3°14'4"	75°10'12"	450	1×10^{-11}	12-16 marzo 2013
						18-21 febrero 2014
						1-3 noviembre 2014
MUR	<i>Murillo</i>	4°54'19"	75°13'33"	3500	...	15-17 febrero 2014
NAB	<i>Nabusimake</i>	10°34'9"	73°36'2"	2000	...	20-26 julio 2013

La campaña observacional consistió en excursiones esporádicas y de corta duración a cada lugar por lo que el hecho de obtener pocas imágenes por noche en todos ellos excepto en Aremasain, no es razón suficiente para concluir que el cielo sobre las cordilleras andinas es inapropiado para la astronomía en el óptico. La poca información fotométrica obtenida es una consecuencia de la enorme variabilidad meteorológica presente sobre las cordilleras andinas y en particular de la elevada humedad registrada en lugares a gran altura en comparación con el sitio Aremasain. En las Figuras 4, 5 y 6 se observa que Aremasain es el único sitio en donde se registran valores menores a 85% de humedad durante la campaña.

Determinación del Seeing atmosférico

Debido a la turbulencia de la atmósfera, el tamaño de los objetos puntuales se incrementa en comparación con aquel predicho por la teoría de la difracción. Antes de llegar al telescopio, la luz proveniente de una fuente puntual atraviesa distintas capas atmosféricas las cuales perturban su propagación. La imagen que se obtiene, se degrada y su tamaño aumenta de acuerdo con el grado de turbulencia en el entorno del telescopio. El *Seeing* se define como el diámetro expresado en segundos de arco, de la región circular que contiene la imagen de la fuente puntual degradada por la turbulencia atmosférica. Efectos como variación del brillo en escalas de tiempo del orden de los mili-segundos, aumento en el diámetro angular de las imágenes puntuales y movimiento de estas en el plano focal son consecuencias típicas de un lugar con alto *Seeing*. Valores menores a un segundo de arco son representativos de sitios a gran altura en el norte de Chile, Sur África, Hawái y las Islas Canarias en España.

La fuente del *Seeing* es la variación del índice de refracción en las capas atmosféricas. La descripción de la naturaleza de las perturbaciones del frente de onda inducidas por la atmósfera fue descrita por Kolmogorov y Tatarski (1971). La hipótesis principal consiste en considerar la interacción entre una onda plana y monocromática con una delgada capa de la tropósfera (altura inferior a ~12km), como un proceso estocástico y estacionario. Se asume que la capa es un medio inhomogéneo y variable, con índice de refracción aleatorio y en régimen turbulento toda vez que el número de Reynolds cerca a la superficie es mucho mayor que uno. Este número es igual a $Re = VL/\nu$ en donde V es el flujo de velocidades de las capas atmosféricas, el cual es del orden de ~ 0,3km/s, ν es la viscosidad cinemática la cual varía entre 0,132 cm²/s a $T = 0^\circ\text{C}$ y 0,104 cm²/s a $T = -40^\circ\text{C}$ y L es la longitud característica de las celda turbulenta cercana a la superficie, la cual es del orden de $L \sim 15\text{cm}$ (Roddier, 1981).

Consideremos una onda plana monocromática $\psi_0(\vec{r})$, que incide sobre una capa atmosférica con espesor dz como se indica en la Figura 2. El frente de onda una vez se cruza dicha capa es $\psi_p = [\psi_z e^{i\phi_z}] \psi_0$ en donde ψ_z y ϕ_z

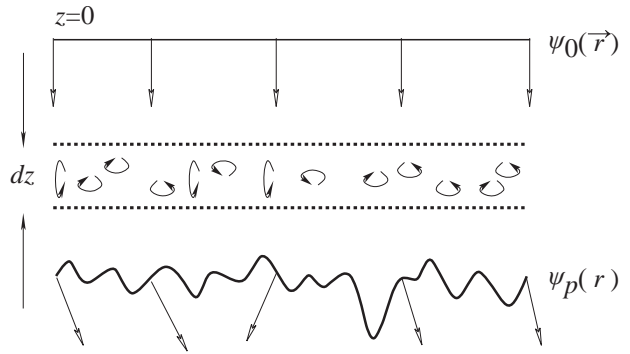


Figura 2. Esquema de la modificación del frente de onda debido a la presencia de una capa turbulenta en la atmósfera.

son respectivamente, la amplitud y la fase a la altura z . El cambio en la fase es consecuencia de las variaciones en el índice de refracción. Para una atmósfera infinita, la fase y el índice de refracción n se encuentran relacionados de la siguiente manera:

$$\phi_z(\vec{r}) = k \int_0^\infty n(\vec{r}, z) dz \tag{1}$$

en donde k es la magnitud del vector de onda de la onda plana incidente. En el modelo de Kolmogorov, la fase y por lo tanto n , se consideran como variables aleatorias con fluctuaciones que presentan una distribución normal, en el sentido estadístico. Por lo tanto, el segundo momento o covarianza espacial de las fluctuaciones en la fase se puede escribir como:

$$B_\phi(\vec{r}) = \langle \psi_z(\vec{r} + \vec{a}) \psi_z^*(\vec{a}) \rangle = \langle e^{i[\phi_z(\vec{r} + \vec{a}) - \phi_z(\vec{a})]} \rangle = e^{-\frac{1}{2} C_\phi^2} \tag{2}$$

en donde los vectores \vec{r} y \vec{a} representan la posición de dos puntos sobre el plano perpendicular a la vertical del lugar y C_ϕ^2 es la función de estructura en la fase $C_\phi^2(\vec{r}) = \langle |\phi_z(\vec{r} + \vec{a}) - \phi_z(\vec{a})|^2 \rangle$. Sarazin & Roddier (1990) utilizan en lugar de la fase como variable aleatoria, la derivada direccional del frente de onda perturbado a lo largo de dos direcciones mutuamente perpendiculares x y y sobre el plano del detector. Si $z(x, y)$ es la función que describe el frente de onda perturbado, la razón de cambio de z en la dirección x es $\alpha(x, y) = \frac{\partial}{\partial x} z(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{\partial}{\partial x} \phi(x, y)$ y la covarianza de las fluctuaciones en esta variable lo largo de x y y está dada por:

$$B_\alpha(x, y) = 0,145 \lambda^2 r_0^{-5/3} [(x^2 + y^2)^{-1/6} - \frac{1}{3} x^2 (x^2 + y^2)^{-7/6}] \tag{3}$$

$B_\alpha(0, y)$ y $B_\alpha(x, 0)$ corresponden a la covarianza longitudinal y transversal respectivamente. La divergencia para el caso $B_\alpha(0, 0)$ no tiene significado físico puesto que en la

práctica, la covarianza se mide a partir de la varianza del movimiento diferencial en el plano de la imagen (técnica DIMM), la cual usa un telescopio de apertura D . Esta varianza resulta igual a:

$$\sigma^2 = 2B_\alpha(0, 0) = 0,358\left(\frac{\lambda}{r_0}\right)^{5/3}\left(\frac{\lambda}{D}\right)^{1/3} \quad (4)$$

El parámetro de Fried r_0 en la ecuaciones (3) y (4) corresponde al tamaño de la región sobre la cual el valor cuadrático medio del frente de onda perturbado permanece coherente. Cuanto menor es la varianza del movimiento diferencial de la imagen dual, mayor es el tamaño de esta región. En el modelo de Kolmogorov, r_0 en unidades de metros, está definido de la manera siguiente (Lawson & Carrano, 2006):

$$r_0 = 0,185 \times (4\pi^2)^{3/5} \times \left[k^2 \int_0^L dz \left(\frac{L-z}{L} \right)^{5/3} C_n^2(z) \right]^{-3/5} \quad (5)$$

en donde k es la magnitud del vector de onda, L la altura de la atmósfera considerada y $C_n^2(z)$ la función de estructura para el índice de refracción. La determinación de r_0 requiere el previo conocimiento de la función de estructura como una función de la altura, sin embargo utilizando el DIMM es posible estimar un valor para r_0 usando la ecuación (4) y posteriormente el *Seeing* a través de:

$$FWHM = 0,98 \frac{\lambda}{r_0} \quad (6)$$

en donde $FWHM$ es el *Seeing* en radianes y λ es la longitud de onda para la cual el detector CMOS presenta la máxima eficiencia. Dicha eficiencia depende de la sensibilidad del ISO utilizado durante la adquisición de los videos. Las medidas realizadas por Sigernes (2009) confirman que para un ISO de 1600, la intensidad resultante es igual a 500 $R/\text{Å}$ para una longitud de onda $\lambda = 4000\text{Å}$, en donde R es la reflectancia direccional espectral, una medida del flujo monocromático registrado por el detector en el experimento realizado por el autor. Para el mismo ISO pero en $\lambda = 5800\text{Å}$, el flujo aumenta a 3300 $R/\text{Å}$ y finalmente en $\lambda = 7000\text{Å}$ el flujo es 1500 $R/\text{Å}$. Por otra parte, valores típicos de $r_0 = 10\text{ cm}$, conducen a una diferencia en el cálculo del *Seeing* usando la ecuación 6, igual a $0,1''$ para valores de longitud de onda de 5500 y 6000 Å . Este hecho sugiere una contribución muy pequeña al tamaño de la barra de error en las Figuras 4, 5 y 6, por lo tanto y para los objetivos de este trabajo se asume que en la longitud de onda 5500 Å el sensor presenta la máxima eficiencia.

Con el fin de validar los resultados obtenidos con el DIMM, en este trabajo implementamos una metodología alterna para la determinación del *Seeing* a partir del análisis conjunto de imágenes satelitales y medidas de variables meteorológicas en tierra para la evaluación de la integral en la ecuación (5) y consecuentemente el *Seeing* usando la ecuación (6).

La técnica Dimm

Una de las formas más utilizadas para medir el *Seeing* se basa en el registro continuo del movimiento diferencial de una imagen dual o DIMM por sus siglas en inglés, el cuál se describe en detalle en Sarazin & Roddier (1990). La idea básica consiste en colocar una máscara de Hartmann en la apertura del telescopio con el objetivo de hacer pasar la luz proveniente de una estrella brillante a través de dos aperturas circulares de diámetro D y separadas una distancia d . El resultado es una imagen dual de la estrella en el plano de la imagen. Para garantizar la coherencia se utiliza un prisma recto en una de las aperturas. La separación entre estos dos puntos brillantes varía en escala de tiempo de mili-segundos (ms) y se encuentra relacionada con la distorsión del frente de onda incidente, por lo que se utiliza como una medida indirecta del *Seeing*. La técnica DIMM consiste en determinar la desviación estándar de la distribución de separación entre dos puntos brillantes a lo largo de dos direcciones mutuamente perpendiculares una de ellas coincidente con la recta que une los centros de los dos orificios en la máscara.

Para el presente estudio se implementó una versión del DIMM levemente diferente sin usar el prisma y en lugar de ello ubicando la cámara de video detrás del foco Cassegrain con el fin de obtener la imagen dual. Si bien, las medidas sin el uso del prisma no pueden considerarse como absolutas, un análisis comparativo de valores relativos de *Seeing* en los cuatro lugares de la Tabla 1 resulta confiable aún sin el uso del prisma (Boumis, et al. 2001). La metodología consiste en obtener videos de corta duración (15 a 20 s) cada 30 minutos durante toda la noche utilizando un tamaño de fotograma de 1920×1080 pixel con una cadencia de 30 cuadros por segundo. Consecuentemente, se obtienen entre 450 y 600 imágenes por cada video, correspondiente a variaciones de 33 ms . Posteriormente, usamos nuestro propio código para cargar cada imagen y obtener las coordenadas de los dos puntos brillantes en el plano de la imagen y su separación en pixeles a través de un algoritmo de tipo *Flood Fill* que implementamos con librerías de Python. Se descartan imágenes con una razón señal a ruido baja debido a cielo parcialmente cubierto o a observaciones con masa de aire superior a dos. La Figura 3 corresponde a las distribuciones de las separaciones entre los dos puntos brillantes en 6 instantes de la noche del 17 de febrero de 2014 en la localidad de Murillo. Debido a la alta humedad en el lugar y con el fin de preservar el DIMM seco, este se mantuvo al aire libre solamente durante el registro de los videos por lo que cada vez la cámara se desenfocó a distancias levemente distintas. Por esta razón, las distribuciones de la figura presentan máximos entre 10 y 35 pixeles. Este hecho no afecta el cálculo del *Seeing* toda vez que el factor determinante es el ancho de dichas distribuciones y no la localización del máximo.

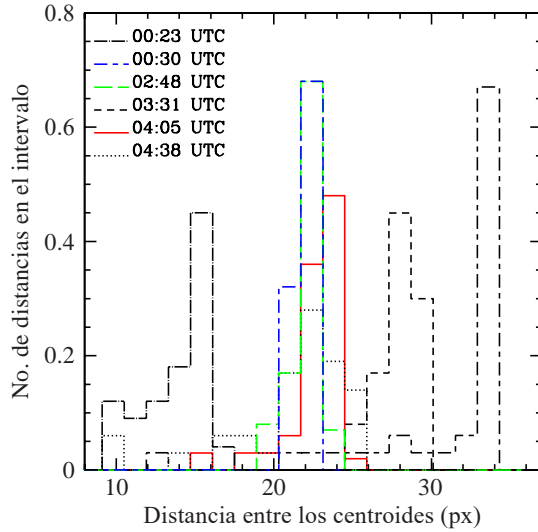


Figura 3. Distribución de la distancia entre las dos aperturas en distintos instantes durante la noche del 17 de febrero de 2014 en Murillo (MUR). La desviación estándar de cada distribución se utiliza para determinar el Seeing en el instante de observación usando las ecuaciones (4) y (6).

La desviación estándar del movimiento diferencial de la imagen a lo largo de las direcciones longitudinal y transversal en el plano de la imagen se denota con σ_l y σ_t y está dada por:

$$\sigma_l^2 = [1 - 0,541(\frac{d}{D})^{-1/3}]\sigma^2 \quad (7)$$

$$\sigma_t^2 = [1 - 0,811(\frac{d}{D})^{-1/3}]\sigma^2 \quad (8)$$

en donde $D = 4,5$ cm es el diámetro de las aperturas, $d = 14,5$ cm su separación y σ la desviación estándar total del movimiento diferencial de imagen dada por la ecuación (4). Usando esta ecuación y las expresiones (7) y (8) se obtienen sendos valores longitudinal y transversal para el parámetro de Fried. El Seeing a lo largo de cada una de las direcciones está dado por $FWHM_l = 0,98\lambda/r_0(t)$ y $FWHM_t = 0,98\lambda/r_0(t)$ en donde r_0 se calcula usando la ecuación (4). Una corrección adicional de los valores de Seeing al cenit se realiza a través de la distancia cenital s en el instante de observación, obtenida vía la ascensión recta (α), declinación (δ) y el instante de observación reportados por el programa de control del telescopio usando la siguiente relación:

$$s = \cos^{-1}(\cosh\cos\delta\cos\phi + \text{sen}\delta\text{sen}\phi) \quad (9)$$

en donde h es el ángulo horario de la estrella observada y ϕ la latitud del sitio de observación. El ángulo horario se obtiene a partir del tiempo sidéreo local el cual a su vez se calcula con base en la longitud geográfica y el tiempo sidéreo en Greenwich en el instante de observación. El valor corregido FWHMC dado por $FWHMC = FWHM \times \text{sec}(s)$ se indica en los paneles b) y e) de las Figuras 4, 5 y 6.

Función de correlación atmosférica

Las fluctuaciones de las variables índice de refracción y temperatura no son independientes. Si P_0 y T_0 son respectivamente, la presión y la temperatura en el sitio de observación y z es la altura medida sobre vertical de la atmósfera, las fluctuaciones en ambas variables se encuentran acopladas de la manera siguiente (Roddier, 1981):

$$C_n^2(z) = 77,6 \frac{P_0}{T_0^2} C_T^2(z) \quad (10)$$

por lo tanto, la integral en la ecuación (5) se puede evaluar si se conoce $C_T^2(z)$ y las variables meteorológicas de forma simultánea. Cavazzani, et al. (2012) han propuesto una metodología para el cálculo de la función de estructura $C_T^2(z)$ mediante el uso de imágenes satelitales en tres bandas del infrarrojo definiendo una función de correlación atmosférica sobre la vertical del lugar aprovechando que la radiación en cada banda proviene de un altura diferente. En este trabajo se implementa dicha metodología con el objetivo de estimar un Seeing satelital y validar las medidas obtenidas con el DIMM.

Utilizamos datos de archivo del satélite geoestacionario GOES 13 el cual está equipado con instrumentación capaz de capturar imágenes en varias bandas en el infrarrojo. Dado que nuestro propósito es estimar un valor del parámetro de Fried y por lo tanto del Seeing, focalizamos nuestra atención en las bandas B3, B4 y B6 centradas en 6,7, 10,7 y 13,3 μm , respectivamente (Erasmus & Sarazín, 2002). Las imágenes en B4 están afectadas por la emisión y absorción de vapor de agua localizado en nubes con altura del orden de 4 km mientras que el canal B3 presenta un máximo de transmitancia a una altura entre 8 y 10 km. Las imágenes en el canal B6 proporcionan información de neblina y otras características propias de alturas muy bajas, cercanas a la superficie (Erasmus & Sarazín, 2002).

La base de datos del satélite GOES es de libre acceso a través de la librería electrónica de NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) en un formato especial denominado GVAR. Para cada fecha de interés se selecciona una región de la imagen que contenga a Colombia y se descargan imágenes nocturnas en los tres filtros B3, B4 y B6, con una cadencia aproximada de media hora, comenzando a las 00:15:19 UTC y finalizando a las 09:45:19 UTC. Posteriormente usamos las librerías *idl* proporcionadas por NOAA con el fin de convertir radianza instrumental a temperatura de brillo para cada lugar de interés y en cada canal infrarrojo, asumiendo que la radiación es de cuerpo negro. Notamos estos valores de temperatura en cada banda y en el instante i , como $T_{B3,i}$, $T_{B4,i}$ y $T_{B6,i}$, respectivamente.

La resolución de las imágenes es de 4×4 km en las tres bandas pero en la Figura 1 hemos utilizado una interpolación de Delanuy del mapa de temperatura, reduciendo

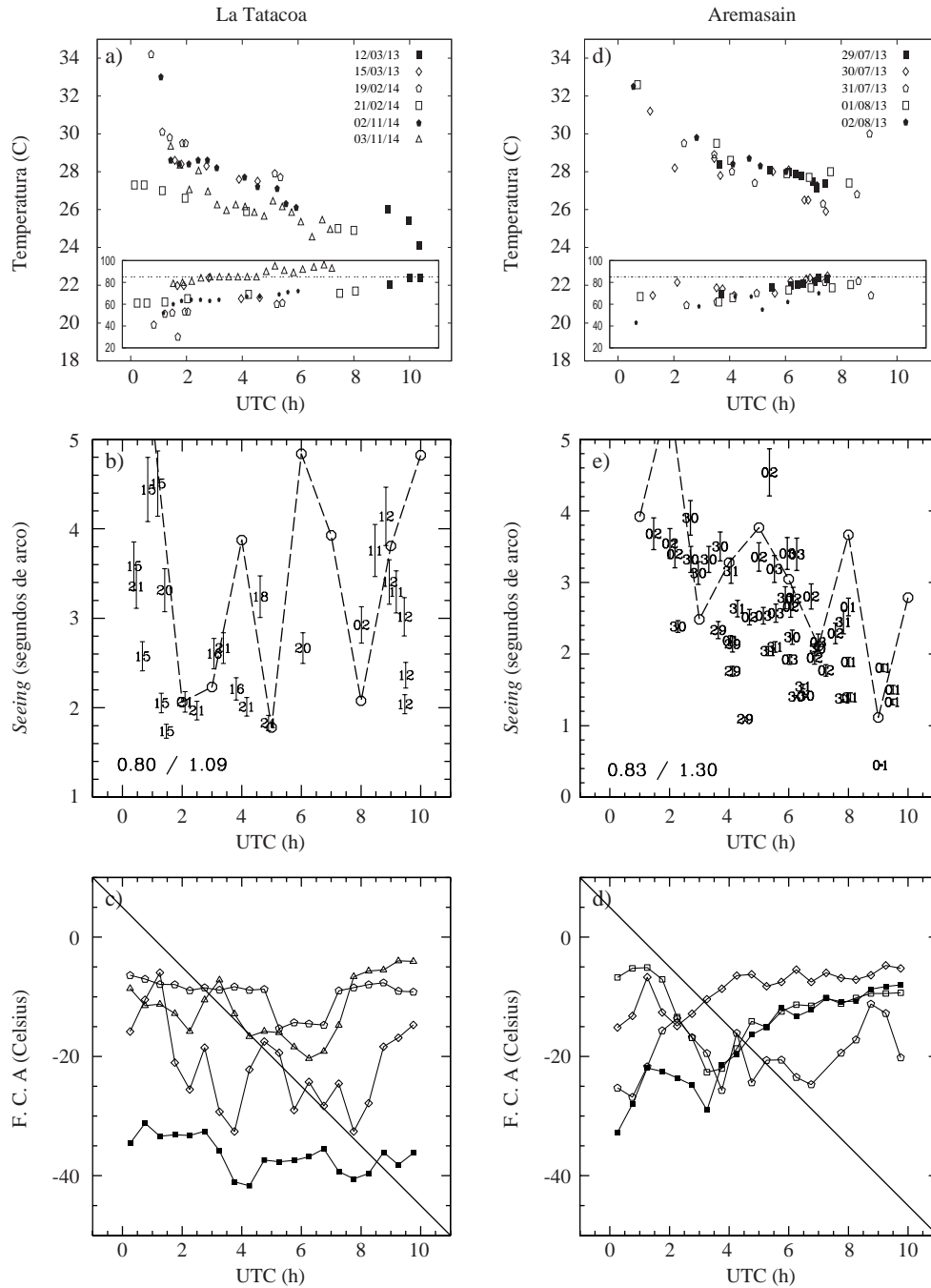


Figura 4. Medidas de la calidad del cielo en La Tatacoa (paneles a, b y c) y en Aremasain (paneles d, e y f). En a) y d) se muestran los valores de temperatura y humedad a lo largo de cada noche (la línea a trazos en la figura interior corresponde al 85% de humedad). Las medidas de *Seeing* en los paneles b) y e) se representan con símbolos numéricos asociados a la noche de observación indicada en a) y en d). Los paneles c) y f) corresponden a la función de correlación atmosférica $FCA = T_{B3} - (T_{B4} - T_{B6})$ en los mismos instantes durante la noche. En cada instante, el promedio de FCA se utiliza para la determinación del *Seeing* *satelital* el cual se indica con línea a trazos en los paneles b) y e). El *rms* de las dos distribuciones de *Seeing*, con la notación $rms_{DIMM} / rms_{Satelital}$ se encuentra indicado en el extremo inferior izquierdo de dichos paneles.

la resolución a $17 \times 25 \text{ km}$ por pixel. Esta interpolación permite calcular valores de temperatura de brillo en los tres canales en los lugares más cercanos a las coordenadas de los sitios en la Tabla 1 con una precisión inferior al 10%.

Siguiendo la metodología descrita en Cavazzani, *et al.* (2012), se define la Función de Correlación Atmosférica (*FCA*) en el instante *i* de la siguiente manera:

$$FCA_i \equiv T_{B3,i} - (T_{B6,i} - T_{B4,i}) \quad (11)$$

puesto que esta definición proporciona una temperatura de brillo en las tres bandas combinadas con la ventaja que permite registrar variaciones en la temperatura debido a efectos atmosféricos principalmente turbulencia en baja altura, cerca de la superficie. Los valores para FCA_i obtenidos en los lugares visitados se indican en los paneles c) y f) de las Figuras 4 y 5 con símbolos coincidentes con las fechas que aparecen en los paneles a) y d) de la misma figura.

Una vez se conoce el valor de FCA para cada instante durante la noche en cada una de las fechas indicadas en la última columna de la Tabla 1 se procede a evaluar el valor

medio $\langle FCA \rangle_i$ en cada instante usando los datos de todas la noches de manera conjunta. Posteriormente se obtiene la variación relativa calculando la cantidad $FCA - \langle FCA \rangle_i$ en donde $\langle FCA \rangle_i$ representa el valor medio de la función de correlación en el instante i . Finalmente se calcula el *Seeing* satelital en radianes, usando la siguiente ecuación (Cavazzani, et al. 2012):

$$FWHM_i = 0,58\lambda^{-1/5} \times \left(4\pi^2 \Lambda(z) \frac{|FCA_i - \langle FCA \rangle_i|}{z}\right)^{-3/5} \quad (12)$$

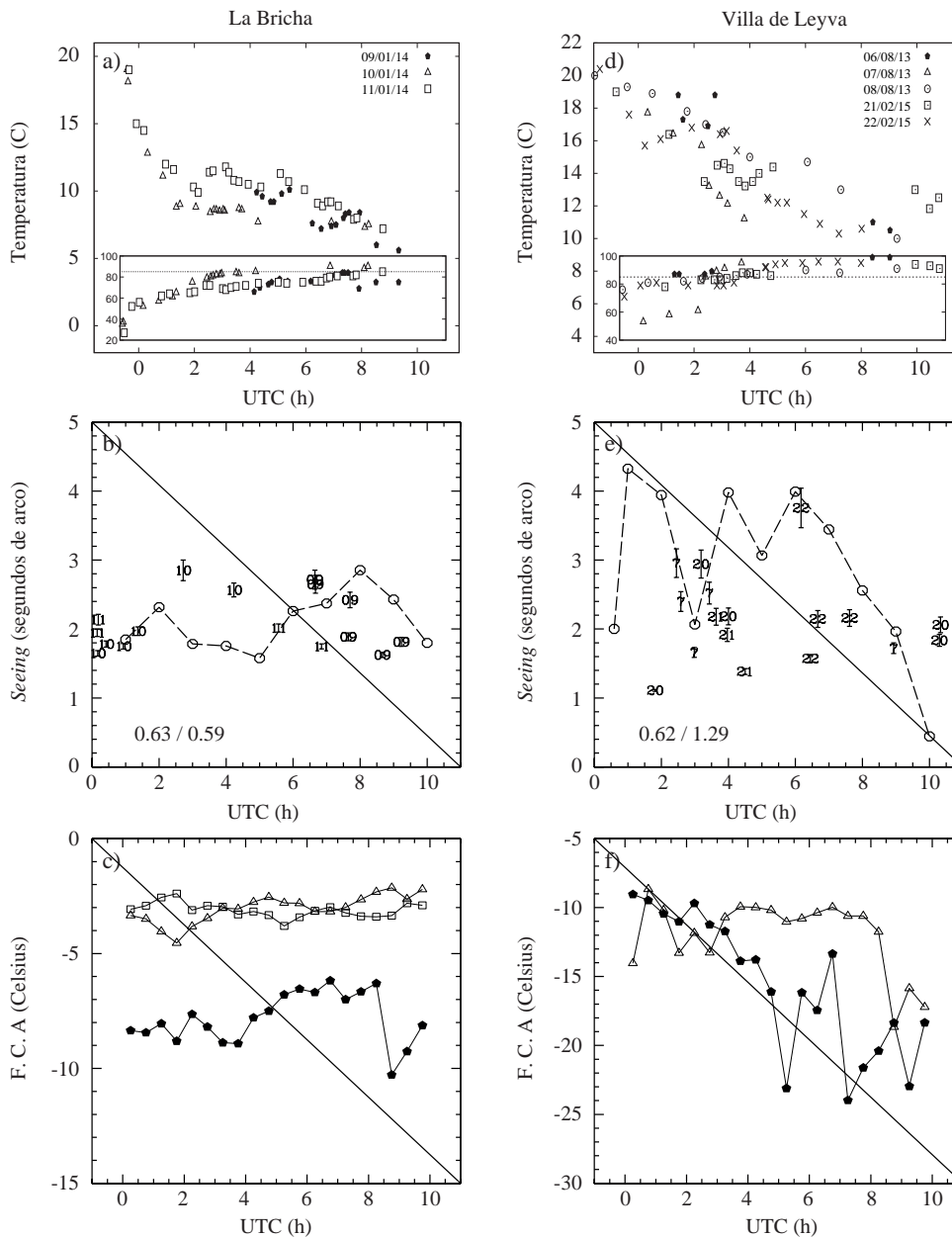


Figura 5. Medidas de la calidad del cielo en La Bricha (paneles a, b y c) y en Villa de Leyva (paneles d, e y f). Los símbolos son idénticos a los de la Figura 4.

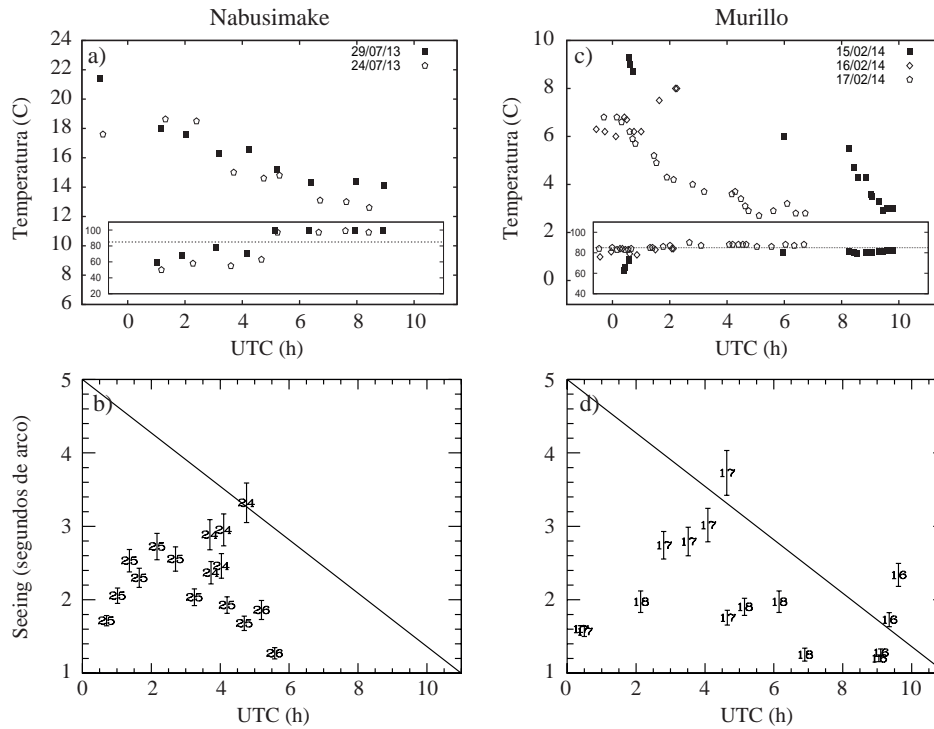


Figura 6. Medidas de la calidad del cielo en Nabusimake (paneles a y b) y en Murillo (paneles c y d).

en donde $\lambda(z)$ es un parámetro que depende de T_0 , P_0 , de la altura del sitio de observación y débilmente de la distancia cenital del satélite toda vez que GOES13 es geoestacionario. **Cavazzani, et al.** (2012) utilizan $\lambda(z) = 10^{-12}$ con el fin de minimizar las diferencias con datos simultáneos obtenidos en los observatorios Cerro Paranal en Chile y en Roque de los Muchachos en las Islas Canarias. Debido a la baja estadística de las medidas obtenidas con el DIMM, preferimos calcular este parámetro para Aremasain, La Tatacoa, La Bricha y Villa de Leyva, basados en nuestras medidas de temperatura in-situ y valores de presión obtenidos de la literatura para posteriormente realizar la comparación con los datos DIMM. En la columna 6 de la Tabla 1 se encuentran los valores obtenidos para $\lambda(z)$, los cuales están en el orden de magnitud de aquellos predichos por un modelo empírico para $C_n^2(z)$ desarrollado por **Parenti & Sasiela** (1994).

Los resultados obtenidos para el *Seeing* satelital utilizando esta metodología se representan con una línea a trazos en los paneles b) y c) de las Figuras 4 y 5. Se observan fluctuaciones hasta de 2'' en intervalos de tiempo inferiores a dos horas. Los datos obtenidos con el DIMM se encuentran por debajo de la predicción satelital, hecho que puede estar relacionado con la ausencia de prisma. Desenfocar genera mayor incertidumbre en el cálculo de los centroides en comparación al DIMM usual que involucra el prisma. Cuantificamos las diferencias entre las medidas DIMM con la predicción satelital, implementando un análisis χ^2 para cada lugar. Las diferencias son

menores en La Tatacoa ($\chi^2 = 0,54$) y en La Bricha ($\chi^2 = 0,70$), mientras que en Aremasain se obtiene $\chi^2 = 1,81$ y en Villa de Leyva $\chi^2 = 2,77$.

Si bien el número de medidas con el DIMM es extremadamente bajo en los cuatro lugares, la dispersión es similar a aquella observada en los datos obtenidos con imágenes satelitales. El valor medio cuadrático (*rms* en adelante) de ambas series, con la notación $rms_{DIMM}/rms_{Satelital}$, se encuentra en la parte inferior de los paneles b) y e) de las Figuras 4 y 5 y 6. Es particularmente interesante que para La Bricha se obtiene 0,63''/0,59'' equivalente a una diferencia del 5%.

En La Tatacoa se observa una mayor dispersión 0,80''/1,09'' correspondiente a una diferencia del 26%. Los datos de Aremasain 0,83''/1,30'' conducen a una diferencia del 36% y en Villa de Leyva se obtiene la máxima diferencia entre las predicciones satelitales y las medidas in-situ con 0,62''/1,29'' equivalente a una diferencia de 51%. Este hecho confirma la estabilidad atmosférica observada durante dos de las tres noches en la vereda La Bricha, situación particular única durante la campaña que permite inferir que los dos métodos son comparables.

Para los propósitos de comparación del presente trabajo, consideramos suficiente el hecho que en una atmósfera estable como en La Bricha el rms de ambos valores de *Seeing* difiera en un 5%. Por lo tanto, utilizamos las medidas realizadas con el DIMM en los diferentes lugares como la variable fundamental en el análisis comparativo.

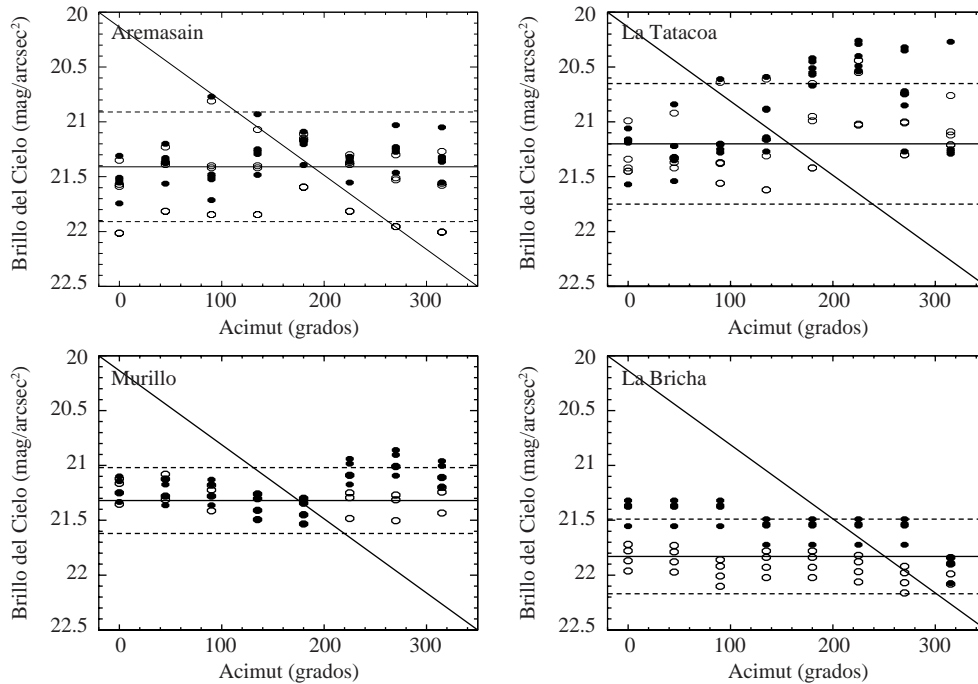


Figura 7. Brillo del cielo obtenido al apuntar el SQM sobre el horizonte (símbolos color blanco) y a una altura aproximada de 45 grados (símbolos color negro).

Descripción de los sitios

En esta sección se describen las propiedades de cada sitio. Es importante anotar que nuestras visitas fueron esporádicas y de corta duración por lo tanto no pueden considerarse como representativas del lugar. Sin embargo, la información recolectada en todos los lugares puede compararse puesto que el instrumental utilizado en todas las misiones fue el mismo y la metodología idéntica. Dicha comparación permite identificar el sitio con menos turbulencia integrada toda vez que un criterio basado en extinción atmosférica no es posible con los datos disponibles en este trabajo.

La Tatacoa

Es un bosque tropical seco localizado a 450 metros de altura entre las cordilleras Central y Oriental que se extiende sobre un área erosionada de 330 kilómetros cuadrados. Se realizaron 3 expediciones cortas en marzo de 2013, en febrero y noviembre de 2014 con cielo parcialmente cubierto la mayor parte del tiempo excepto durante el comienzo de la noche y con valores de humedad y temperatura al comienzo de la noche, del orden del 60% y 30°C respectivamente. La temperatura disminuye rápidamente hasta estabilizarse alrededor de los 26°C entre las 2:00 y 7:00 horas en UTC, para luego exhibir una fuerte disminución hacia el final de la noche como se observa en el panel a) de la Figura 4.

Debido a su baja altitud y a estar localizada en el valle entre dos cordilleras (ver Figura 8), La Tatacoa recibe durante la noche el aire seco y frío proveniente de las montañas. En

condiciones de cielo despejado, el aire seco en sitios vecinos con alturas entre 1000 y 2000 metros, sobre las cordilleras, no absorbe eficientemente la radiación térmica infrarroja emitida por la superficie por lo que se enfría, estimulando su descenso sobre las zonas planas del valle del Río Magdalena. La Tatacoa se llena de aire frío en la madrugada. De hecho los valores de humedad son superiores a 85% y la temperatura aproximadamente constante de 26°C entre 2:00 y 8:00 UTC.

Valores de *Seeing* obtenidos con el DIMM presentan una dispersión con un $rms = 0,80''$. La barra de error en el panel b) de la Figura 4 es 0,5'' para valores de *Seeing* superiores a 3'' pero disminuye a 0,2'' -0,3'' para valores de *Seeing* por debajo de esta cantidad. Este resultado se encuentra en concordancia con predicciones del modelo de Kolmogorov en el cual las variaciones longitudinales son del orden de 1,5 veces mayores que aquellas en la dirección transversal al tiempo que confirma el alto grado de turbulencia en la atmósfera del lugar, hecho relacionado con la baja altura. El brillo del cielo medido en regiones claras, sobre el cenit, a 45° de altura (círculos de color blanco) y sobre el horizonte (círculos de color negro). En la Figura 7 se muestran los resultados correspondientes al promedio de todas las noches. La línea sólida representa el valor medio de brillo del cielo en el cenit igual a 21,2 mag/arcsec² en tanto que la línea a trazos corresponde al valor 3σ alrededor del promedio. Se observa contaminación lumínica proveniente de Neiva en dirección sur con magnitudes por encima de este umbral.

La Tatacoa es un lugar de fácil acceso por ser un sitio turístico en el Departamento del Huila con un creciente interés en la Astronomía motivado por su clima cálido y seco durante el día. Si bien, las condiciones del lugar son apropiadas para la observación del cielo al comienzo de la noche, el cubrimiento de nubes y el porcentaje de humedad aumentan considerablemente durante la madrugada.

Aremasain

Este lugar localizado en el departamento de La Guajira, a 24 km en dirección sureste de Rioacha tiene como principal característica la baja humedad. Visitamos el sitio entre el 29 de julio y el 5 de agosto de 2013 y solamente registramos valores de humedad superiores a 80% durante el alba. El cubrimiento nocturno de nubes se presenta variable y modulado por fuertes ráfagas de viento de hasta 20 km/h especialmente durante la noche del 30 de julio en la cual el cielo estuvo completamente cubierto desde las 7:20 UTC. La medida del brillo del cielo se realizó al comienzo de las noches con el fin de evitar interferencia con la Luna. El promedio del brillo del cielo durante las ocho noches es $21,41 \text{ mag} \times \text{segundos de arco}^{-2}$, muy similar al registrado en La Tatacoa como se indica en la Figura 7.

El *Seeing* en Aremasain es altamente variable, con un $rms = 0,83''$. La baja humedad del sitio permitió realizar un mayor número de medidas de *Seeing* y de imágenes fotométricas en comparación con los otros lugares. Si bien, la fracción de cielo claro durante la noche es similar a otras regiones del país, la presencia de vientos y el relativo aislamiento de grandes cumbres, hacen de Aremasain el lugar con cielo más despejado comparativamente con los otros cinco sitios analizados en este estudio. El acceso a Aremasain es desde Rioacha. El lugar se ubica en una zona árida con muy poca contaminación lumínica pero con ocurrencia de ráfagas de viento periódicas e intensas ($> 20 \text{ km/h}$) las cuales incrementan los valores de turbulencia integrada y disminuyen el tiempo de vida del aluminizado de los espejos del telescopio.

Con el fin de determinar el coeficiente de extinción atmosférico se utilizaron entre 6 y 8 imágenes CCD por noche de la misma estrella estándar en tres filtros fotométricos. La metodología consistió en obtener la magnitud de la estrella en cada filtro y a masas de aire distintas. El procedimiento detallado se encuentra descrito en **Rufener** (1986). Brevemente, si m_0 denota la magnitud de la estrella obtenida antes de cruzar la atmósfera de la tierra y s la distancia cenital en el instante de observación la cual está relacionada con la masa de aire en dicho instante a través de $sec(s)$, entonces la magnitud observada m en la longitud de onda λ_0 está dada por la relación de Bouguer:

$$m = m_0 + k(\lambda_0) \times sec(s) \tag{13}$$

en donde $k(\lambda_0)$ es el coeficiente de extinción en unidades de magnitud/masa de aire. Los valores de λ_0 para B, V e I son 430, 520 y 800 nm respectivamente. Los filtros utilizados tienen un espesor de 1 mm, adecuados para el uso en la cámara SBIG ST-402, con una respuesta equivalente a la de los filtros Bessel fotométricos estándar (**Bessel**, 1990) con excepción al filtro I el cuál presenta un fuerte corte por encima de 1000 nm en comparación al filtro Bessel estándar lo que disminuye la razón señal a ruido de las imágenes en este filtro, como se observa en la Figura 8.

El detector Kodak KAF-0402ME de la cámara SBIG ST-402, consiste en una red de 765×510 pixeles cada uno con un tamaño de $9 \times 9 \mu\text{m}$, con una eficiencia cuántica máxima de 85% alrededor de $656,3 \text{ nm}$ y un ruido de lectura de 17 electrones RMS. El rango dinámico del detector es 76 dB y su temperatura se regula en pasos de $0,1^\circ\text{C}$ hasta -35°C por debajo de la temperatura ambiente.

El tratamiento de las imágenes se realizó en el paquete CCDPROC del programa IRAF usando la metodología estándar de sustracción de imagen de corriente en oscuro o Dark y división entre una imagen de campo plano o Flat obtenida esta última, a partir de la mediana de un conjunto de 20 imágenes del cielo libre de estrellas adquiridas al comienzo de la noche. Las imágenes de campo plano se

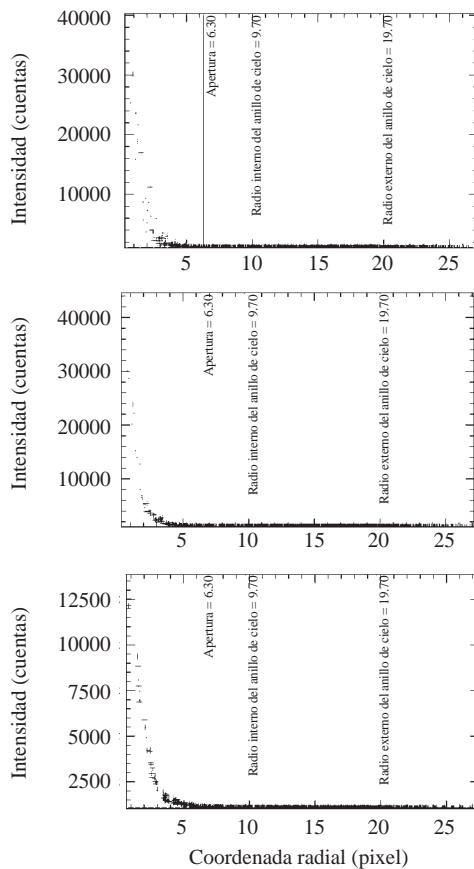


Figura 8. Intensidad instrumental (en ADUs) como función de la coordenada radial en los filtros B (panel superior), V (panel del medio) e I (panel inferior), para la estrella Vega la noche del 30 de julio de 2013 a las 06:54 UTC.

obtienen con tiempos de exposición de 10 segundos para el filtro *I*, 20 segundos para el filtro *V* y 60 segundos para el filtro *B*.

Las magnitudes instrumentales en cada uno de los filtros *B*, *V* e *I* fueron determinadas usando el paquete DAOPHOT del programa IRAF-Image Reduction and Analysis Facility (NOAO). Este valor instrumental junto con la masa de aire del instante de observación, permiten obtener el coeficiente de extinción usando la ecuación (13). El primer paso es definir un radio de apertura de acuerdo con el *Seeing* obtenido de las medidas hechas con el DIMM. Se utiliza una apertura igual 6,3 pixeles equivalente a 1,5FWHM, para todas las imágenes toda vez que con este valor se asegura que la mayor parte de la luz proveniente del objeto se ubique dentro de la apertura sin incluir en ella demasiado ruido del cielo de fondo. En la Figura 8 se ilustra la dependencia de la intensidad de la señal con la coordenada radial para la estrella Vega durante la noche del 29 de julio en Aremasain. La contribución del cielo se descontó de la señal restando de esta el flujo contenido en un anillo de cielo con centro en la estrella y con un radio interno del 10 pixeles y un espesor de 5 pixeles. La conversión de pixel a longitud de arco para la configuración SBIG-402 con el telescopio en F/10 es 0,66 "/pixel por lo que el radio interno del anillo de cielo mayor que el FWHM del instante de observación. Las magnitudes instrumentales se obtienen a través de la siguiente relación:

$$m = m_{pc} - 2,5 \times \log\left(\frac{F}{I}\right) \quad (14)$$

en donde *F* es igual al flujo instrumental aparente de la estrella, es decir sin la contribución del cielo, *t* es el tiempo de exposición y $m_{pc} = 18,0 \text{ mag}$ es la magnitud de referencia o punto cero de la escala instrumental. Los tiempos de exposición para una estrella A0 como Vega son 15 s en *I*, 25 s en *V* y 70 s en el filtro *B*.

Se calculan tres valores de masa de aire (*MA*) para cada imagen en tres instantes durante la observación, al comienzo, en la mitad y al final de la misma, usando la relación: $MA = \sqrt{s^2 + 2H} + 11$, en donde *s* es la distancia cenital, $H = 2,93 \times 10^{-2}T \text{ km}$ es un factor de escala atmosférico y *T* es la temperatura en el entorno del telescopio en el instante de observación (Allen, 1973). Con estos tres valores de masa de aire se obtiene un valor medio ponderado dando mayor peso a la observación hecha durante el instante medio (Stetson, 1988).

En la Figura 9 se observa el consolidado de las magnitudes instrumentales obtenidas en este lugar para la totalidad de las noches. Si bien existe un faltante de masa de aire en el intervalo 2.5-3.5, se observa una tendencia clara de disminución del brillo instrumental con el incremento de la masa de aire. Al realizar un ajuste por mínimos cuadrados, excluyendo observaciones con masa de aire superior a tres, se obtienen los valores para el coeficiente de extinción y para el punto cero instrumental en cada filtro que aparecen

en la Tabla 2. Los errores en ambos parámetros están dados por el ajuste lineal realizado. El valor cuadrático medio de los residuales obtenidos se indica en la cuarta columna y no supera el 30%. El error que se obtiene en el coeficiente de extinción está en el orden de la décima de magnitud por masa de aire y aquel para el punto cero instrumental es 0,22 magnitudes en el filtro *B* y levemente mayor para los filtros restantes.

Murillo

Murillo es un municipio del departamento de Tolima, localizado a una altura de 3600 metros sobre el nivel del mar y a 10 km en dirección sureste del Nevado del Ruíz (5321 m). Visitamos la Vereda la Cabaña, un sitio ubicado en la periferia del Parque Nacional de los Nevados a 25 km del Otún, durante las noches del 15, 16 y 17 de febrero de 2014. Durante las dos primeras noches las condiciones fueron de cielo parcialmente cubierto pero durante la última el cielo se despejó aunque con una elevada humedad, mayor a 97% durante toda la noche. Con el fin de evitar la condensación del vapor de agua sobre la óptica del DIMM, este se llevó a cielo descubierto solamente durante las mediciones de *Seeing*, las cuales se realizaron con una cadencia de media hora.

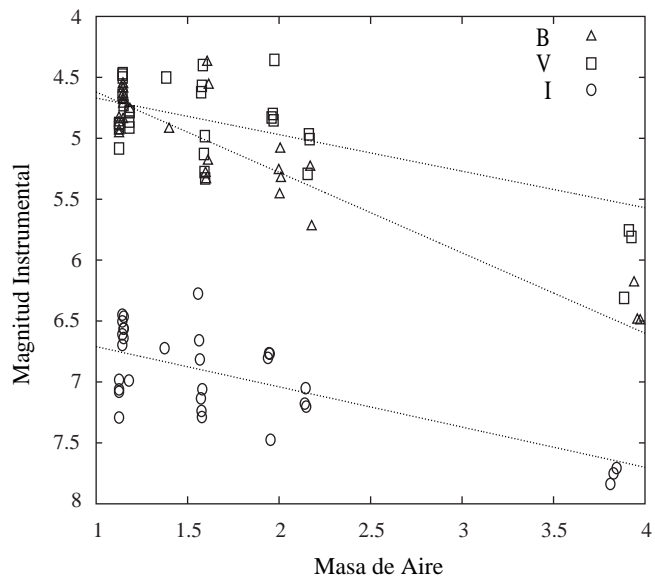


Figura 9. Magnitud instrumental en tres filtros fotométricos en función de la masa de aire de la estrella Vega, en el sitio Aremasain. Los datos corresponden a la totalidad de las noches en este lugar.

Tabla 2. Parámetros fotométricos en Aremasain.

Filtro	$k(\lambda_0)$	m_0	rms
B	$0,66 \pm 0,11$	$3,96 \pm 0,17$	0,22
V	$0,30 \pm 0,13$	$4,37 \pm 0,21$	0,26
I	$0,33 \pm 0,15$	$6,38 \pm 0,23$	0,29

Durante las noches del 17 y 18 de febrero de 2014 los valores del *Seeing* en Murillo se encuentran entre 1" y 4" con notable variabilidad sobre todo la noche del 17 cuando se observan las máximas diferencias entre las componentes transversal y longitudinal en el movimiento diferencial de imagen. La elevada humedad superior al 97% entre 2:00 y 6:00 UTC incrementa el tamaño de la fuente puntual por lo tanto, los valores se muestran particularmente altos.

El valor medio del brillo del cielo durante las cuatro noches es $21,32 \text{ mag} \times \text{segundos de arco}^{-2}$ con una dispersión menor a la observada en lugares de altura similar como Macaravita. A pesar de su localización en el sector rural del municipio de Murillo, la vereda la Cabaña es un sitio de fácil acceso a través de una vía terciaria. No obstante el lugar es bastante húmedo. La humedad es considerablemente alta superando el 90% con exceptuando la noche del 15 de febrero en donde registramos 67% al comienzo de la noche, pero con un aumento rápido hasta estabilizarse en 97% durante la madrugada y el alba. Por esta razón, instrumentación en el infrarrojo no es recomendable en este lugar.

Nabusimake

Es un resguardo indígena, centro importante de reuniones de la comunidad Arhuaca. Se encuentra localizado a 40 km al suroriente del pico Cristóbal Colón (5770 m) en la Sierra Nevada de Santa Marta. Visitamos el lugar las noches del 20 al 26 de julio de 2013 con el objetivo de realizar un ascenso a la cara Nororiental de la Sierra en donde se encuentran lugares con hasta 126 noches despejadas por año. Sin embargo, estos sitios son de gran relevancia espiritual para la comunidad indígena local y por lo tanto el acceso no es fácil. Por esta razón se realizaron las medidas de *Seeing* y de extinción en Nabusimake a una altitud de 2000 metros y distante 35 km del Sitio 1 reportado por **Pinzón, et al.** (2015). El lugar tiene horizonte oriental despejado a pesar de encontrarse en las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta.

La humedad máxima en Nabusimake oscila entre 59-68% al comienzo de la noche pero sube rápidamente y después de media noche supera el 85%. Se registran vientos esporádicos con velocidad de hasta 15 km/h. La observación de estrellas estándar a distintas masas de aire se realizó durante el comienzo de las noches en condiciones de elevada humedad, lo cual afectó considerablemente la calidad de los datos fotométricos. El *Seeing* presentó los máximos valores entre 3" y 4" durante la noche del 24 de julio de 2013, mientras que durante la noche del 25 de julio se registró un *Seeing* inferior a 2" después de las 03:00 UTC con diferencias entre las componentes longitudinal y transversal menores a 0,2".

Macaravita

Es un municipio localizado entre la frontera que divide los departamentos de Boyacá y Santander a una distancia de 50 km de los picos nevados de la Sierra Nevada del Cocuy,

Guicán y Chita. Visitamos dos sitios en Macaravita entre el 5 y el 11 de enero de 2014, La vereda la Bricha y el Alto de los Rayos. Este último a una altura de 3000 metros presentó unas condiciones extremas de humedad con un promedio diario de 62% y con valores de 92% desde el comienzo de la noche. Por esta razón, no se obtuvieron datos fotométricos para este lugar y se realizaron solamente dos medidas con el DIMM debido al mal tiempo. El valor medio de dichas medidas es 1,8". La visita tuvo lugar durante 3 noches, la primera con 13 horas de lluvia y las otras dos con cielo despejado pero con humedad de 97%.

Visitamos también la vereda La Bricha localizada 6 km hacia el este del Alto de los Rayos, en donde las condiciones de humedad fueron distintas. Este lugar se encuentra en una región más seca a 2600 de altura sobre el valle del río Nevado entre los departamentos de Boyacá y Santander (ver Figura 10). El comienzo de la noche estuvo marcado por una humedad de 60% como se indica en el panel a) de la Figura 6, con un posterior incremento hasta 82% alrededor de las 7:00 horas UTC. Durante las noches del 9 y 11 de enero de 2014, se registró una disminución de la humedad a las 9:00 UTC con valores de hasta 70%. Destacamos este comportamiento de la humedad toda vez que éste no fue observado en ningún otro lugar de los sitios analizados.

El *Seeing* en La Bricha presenta valores inferiores a 2" durante el comienzo y el final de la noche. Se observa un incremento hacia las 3:00 UTC cuando se registran valores cercanos a 3", especialmente para la noche del 10 de enero de 2014. La variabilidad es baja en comparación con los otros sitios visitados durante la campaña con un *rms* =



Figura 10. Región de Macaravita en Santander, divisada desde el Alto de los Rayos. Los picos nevados de la Sierra Nevada del Cocuy, Guicán y Chita en Boyacá, se encuentran al fondo, hacia el oriente, cubiertos parcialmente por nubes ligeras. La estrella indica la localización de la vereda La Bricha, el lugar más apropiado para la ubicación de instrumentación astronómica en el rango óptico, según el análisis comparativo presentado en este trabajo.

0,63". La validación de los datos del DIMM realizados con el método de imágenes satelitales conduce a la diferencia porcentual del 5%, la más baja registrada durante la campaña, sugiriendo mayor estabilidad en los parámetros atmosféricos, en comparación con los otros lugares que se visitaron. El valor promedio del brillo del cielo para las tres noches es $21.83 \text{ mag} \times \text{segundos de arco}^{-2}$ como se muestra en la Figura 7.

El acceso a La Bricha es por Macaravita a través una vía terciaria. La Bricha es un lugar poco poblado con un horizonte abierto y con humedad inferior a 85% la mayor parte de la noche. La comunidad gubernamental del municipio al cual pertenece la vereda, manifiesta interés en un proyecto de infraestructura astronómica en la región.

Villa de Leyva

Es un municipio de Boyacá localizado en la Provincia de Ricaurte a 40 km al oeste de Tunja. Visitamos el Museo Paleontológico de Villa de Leyva el cual se encuentra a 1.5 km del centro de la ciudad, las noches el 6 a 12 de agosto de 2013 y entre el 19 y el 22 de febrero de 2015. El cielo se presentó parcialmente cubierto de nubes durante nuestra visita y la humedad particularmente alta debido a la cercanía del lugar con sector de la Cuchilla de Morro Negro, una cadena montañosa que atraviesa el departamento de Boyacá en dirección nor-oriental y está localizada a 5 km de Villa de Leyva. Los valores de temperatura en el Museo Paleontológico son levemente mayores en promedio a los registrados en sitios de con altura similar como la vereda La Bricha. Sin embargo, el cubrimiento de nubes durante las noches de la visita al lugar, impidió el registro de datos fotométricos.

Las medidas de *Seeing* en el Museo Paleontológico presentan valores inferiores a 3" y elevada variabilidad toda vez que el $rms = 0,62''$. No obstante, el *Seeing* se presenta bajo y estable hacia el final de las noches del 20 y 22 de febrero de 2105 con valores alrededor de 2". La elevada nubosidad del lugar relacionada con su ubicación en la ladera de la montaña, impidió la adquisición de un número suficiente de datos de *Seeing*. Adicionalmente, la contaminación lumínica en el Museo Paleontológico es enorme toda vez que se encuentra en la periferia del municipio y rodeado por postes de alumbrado público a menos de treinta metros de distancia, viviendas y centros recreativos. No se recomienda este lugar para la ubicación de instrumentación astronómica en el óptico sin antes iniciar un programa de protección de los cielos oscuros en las inmediaciones del lugar.

Análisis comparativo

Con el objetivo de cuantificar las diferencias entre los valores de *Seeing* obtenidos con el DIMM, en los seis lugares de interés, es útil considerar la Función de Distribución Acumulada (FDA en adelante) de dichas medidas. En la Figura 11 se muestran las FDA asociadas a cada lugar visitado durante la campaña. En todos los casos, las FDA

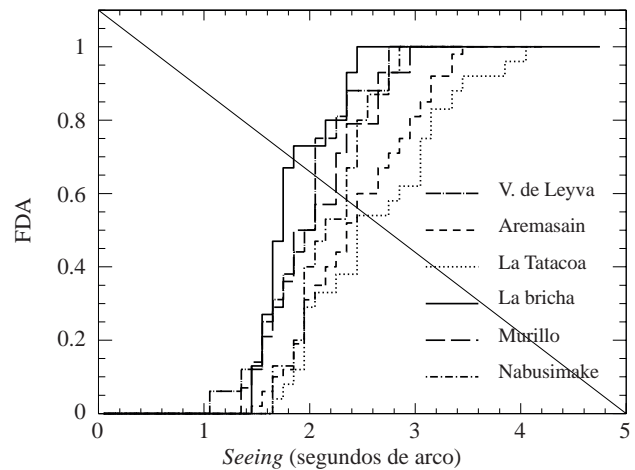


Figura 11. Función de distribución acumulada (FDA) de las medidas de Seeing en seis lugares en Colombia.

cubren el intervalo entre 1" y 4" con leves diferencias. La Bricha se destaca como el lugar con los valores de *Seeing* más bajos. La Tatacoa y Aremasain por el contrario presentan los valores más altos mientras que en Nabusimake, Villa de Leyva y Murillo se observan valores intermedios. El gráfico sugiere una dependencia con la altura del lugar, con *Seeing* mayores en La Tatacoa y en Aremasain mientras valores inferiores a 2" se observan en los cuatro lugares restantes.

Investigamos la significancia de las diferencias relativas entre los seis sitios aplicando una prueba de Kolmogorov-Smirnov (*KS*) a muestras de valores de *Seeing* por pares de sitios con el fin de evaluar la probabilidad que ambas provengan de la misma distribución estadística. Si las variaciones son significativas, la probabilidad *KS* será muy baja y lo contrario, si las muestras son parecidas, la probabilidad *KS* será alta. La probabilidad *KS* depende del valor de la máxima diferencia *D* entre dos FDA. La función que se usa para el cálculo de la probabilidad es (Press, et al. 2007):

$$Q_{KS}(x) = 2 \sum_{j=1}^{\infty} (-1)^{j-1} e^{-2j^2x^2} \tag{15}$$

en donde $Q_{KS}(0) = 1$ y $Q_{KS}(\infty) = 0$. Para dos muestras con un número de datos N_1 y N_2 , la probabilidad *KS* está dada por la siguiente relación:

$$P_{KS} \equiv P(D >) = Q_{KS}([\sqrt{n} + 0,12 + 0,11/\sqrt{n}]D) \tag{16}$$

$P(D >)$ es la probabilidad que la diferencia entre dos FDA sea mayor a *D* y $n = N_1N_2/(N_1 + N_2)$. Consideremos dos FDA asociadas a lugares con diferencias notorias en el *Seeing* como La Bricha y La Tatacoa. Para este caso, la máxima diferencia entre las FDA medida sobre la ordenada en la Figura 11, es igual a $D = 0,37$ correspondiente a una probabilidad $P_{KS} = 0,01$, confirmando variaciones significativas en el *Seeing* en estos dos lugares. Una

probabilidad similar $P_{KS} = 0,03$ se obtiene al comparar La Bricha con Aremasain sugiriendo que el *Seeing* en La Bricha es menor debido a que se encuentra a mayor altura.

La Tabla 3 contiene la probabilidad obtenida al hacer la comparación entre pares de sitios. Los lugares con valores de *Seeing* más parecidos son La Tatacoa y Aremasain con $P_{KS} = 0,97$, Murillo y Nabusimake con $P_{KS} = 0,96$, Nabusimake y Villa de Leyva con $P_{KS} = 0,95$, Murillo y Villa de Leyva con $P_{KS} = 0,93$ y Murillo y La Tatacoa con $P_{KS} = 0,92$. En este último caso, es importante anotar que las medidas hechas con el DIMM en Murillo se realizaron bajo condiciones de extrema humedad en las cuales la condensación de vapor de agua sobre la superficie del espejo del telescopio puede aumentar considerablemente el tamaño de las fuentes puntuales observadas. Notorias diferencias en las medidas realizadas con el DIMM se observan al comparar las FDA correspondientes a La Bricha y Murillo con $P_{KS} = 0,11$ y en el resto de lugares se obtienen probabilidades intermedias con valores entre 0,26 y 0,62. Las diferencias en lugares de altura similar no son significativas puesto que la probabilidad en general es mayor a 0,9 exceptuando el caso La Bricha y Nabusimake para el cual se obtiene $P_{KS} = 0,37$. Las medidas realizadas en Nabusimake no cubren toda la noche debido al mal tiempo, por lo que la comparación con este lugar está contaminada por incompletos de la muestra.

El valor cuadrático medio de las medidas de *Seeing* obtenidas en cada lugar es una medida de la variabilidad registrada en el sitio. En La Bricha se obtuvo el menor valor $rms = 0,63''$ y si adicionalmente se considera la uniformidad en las variables temperatura y humedad registradas durante la visita a sitio podemos concluir que de los sitios analizados en este estudio La Bricha es el lugar con mayor estabilidad atmosférica. No obstante, por lo menos tres aspectos deben mencionarse. En primer lugar, las medidas se efectuaron durante pocas noches lo que conduce a extrapolaciones erróneas del comportamiento histórico de la calidad de la noche en cada sitio. Además, las condiciones de observación estuvieron marcadas por una humedad elevada lo que impidió adquirir suficiente información sobre la extinción atmosférica y finalmente no todos los lugares visitados coincidieron exactamente con los lugares predichos en el estudio previo. De manera que la selección de La Bricha

Tabla 3. Probabilidad KS que las dos series de datos de *Seeing* realizadas con el DIMM en cada uno de los pares de lugares indicados, provengan de la misma distribución estadística.

	P_{KS}		P_{KS}
MAC-ARE	0,03	MUR-VDL	0,93
MAC-TAT	0,01	NAB-ARE	0,36
MAC-NAB	0,37	NAB-TAT	0,46
MAC-MUR	0,11	NAB-VDL	0,95
MAC-VDL	0,26	VDL-ARE	0,49
MUR-ARE	0,81	VDL-TAT	0,63
MUR-TAT	0,92	TAT-ARE	0,97
MUR-NAB	0,96		

como el mejor lugar para la ubicación de instrumentación astronómica debe considerarse con cautela toda vez que es fundamental realizar un monitoreo continuo y a largo plazo del lugar antes de comenzar cualquier proyecto que involucre la ubicación de instrumentación astronómica en este sitio.

Conclusiones

En este trabajo, presentamos los resultados de un estudio sobre calidad del cielo para observaciones astronómicas en los siguientes seis sitios del territorio colombiano: La Tatacoa (Huila), Macaravita (Santander), Murillo (Tolima), Aremasain (La Guajira), Villa de Leyva (Boyacá) y Nabusimake (Cesár). Se realizaron expediciones esporádicas y de corta duración a dichos lugares entre los años 2013 a 2015, durante las cuales se recopiló información in-situ sobre el comportamiento de la temperatura, la humedad, el *Seeing* y el brillo del cielo. La humedad registrada en todos los lugares con excepción de Aremasain fue superior al 85% después de media noche, hecho que afectó notablemente la obtención de medidas fotométricas confiables. Por esta razón el criterio de selección del lugar con condiciones de cielo medianamente óptimas se realizó con base en las medidas in-situ del *Seeing* atmosférico.

Utilizando la técnica DIMM, se realizó un monitoreo continuo durante cada una de las noches de nuestra visita a cada lugar, siempre que las condiciones de cubrimiento de nubes lo permitieron. Los resultados obtenidos para los lugares de Villa de Leyva, La Bricha, Aremasain y La Tatacoa, se validaron usando un conjunto de 20 imágenes satelitales diarias, en tres bandas en el infrarrojo y simultáneas con la estancia en el lugar, obtenidas de la base de datos del satélite geoestacionario GOES 13. Si bien, el método de validación es fuertemente dependiente de las condiciones de cielo despejado en el lugar, se registró una diferencia porcentual del 5% entre las medidas in-situ con la predicción satelital, en la vereda La Bricha, un corregimiento del municipio de Macaravita en Santander. En La Tatacoa, Aremasain y Villa de Leyva las diferencias porcentuales fueron respectivamente 26%, 36% y 51%.

La variabilidad de las medidas realizadas con el DIMM en estos cuatro sitios también fue considerada, con base en el valor cuadrático medio obtenido para la totalidad de las noches en el lugar. Se incluyeron todas las noches con el fin de obtener un valor para cada sitio. En Villa de Leyva y en La Bricha, dos lugares con altitud similar arriba de los 2000 metros sobre el nivel del mar, se obtienen $rms = 0,62''$ y $rms = 0,63''$ respectivamente. Variabilidad mayor se observa en lugares de baja altura como La Tatacoa con $rms = 0,80''$ y Aremasain, $rms = 0,83''$ confirmando la dependencia del *Seeing* con la altura del lugar.

La baja humedad de Aremasain permitió determinar parámetros fotométricos en el lugar. Se obtuvieron los valores del punto cero y del coeficiente de extinción atmosférica en los

filtros *B*, *V* e *I* a partir del análisis de imágenes de estrellas estándar observadas a masas de aire distintas. El valor promedio del coeficiente de extinción para 4 noches de observación es $(0,66 \pm 0,11)$ magnitudes por masa de aire en el filtro *B*, $(0,30 \pm 0,13)$ magnitudes por masa de aire en *V* y $(0,33 \pm 0,15)$ magnitudes por masa de aire en el filtro *I*. La elevada humedad en los otros sitios impidió obtener un número suficiente de imágenes en los tres filtros con señal ruido aceptable.

El brillo del cielo se evaluó en cuatro de los seis lugares visitados durante la campaña, a partir de mediciones diarias que cubren 360 grados en acimut y tres valores de altura: sobre el horizonte, a 45 grados y en el cenit. El brillo promedio en el cenit y expresado en magnitudes por segundo de arco al cuadrado igual a 21,83 en La Bricha, 21,41 en Aremasain, 21,32 en Murillo y 21,20 en La Tatacoa.

Este trabajo se constituye en el primer estudio realizado en Colombia con el objetivo de identificar sitios potenciales para la ubicación de instrumentación astronómica. A pesar de estar dentro la ZCIT, se logran identificar en el país, sitios con calidad aceptable para la el pleno desarrollo de proyectos que fortalecerán actividades de investigación y de extensión en las Universidades. Si bien, el análisis presentado aquí está lejos de ser completo, con seguridad fortalece la discusión de las distintas iniciativas surgidas de la naciente comunidad astronómica colombiana para la conformación de un observatorio profesional nacional.

Agradecimientos

El desarrollo de este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de COLCIENCIAS y de la Universidad Nacional de Colombia a través del proyecto No. 110152129320. Los autores agradecen los comentarios y sugerencias realizados por los jurados de la revista, los cuales permitieron mejorar considerablemente la versión final del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Bibliografía

- Allen, C. W.** (1973) Astrophysical Quantities. 3rd ed., *The Athlone Press, London*.
- Bessel, M.S.** (1990) UBVR passbands. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, **102**: 1181-1199.
- Boumis, P., Steiakaki, A., Mavromatakis, F., Paterakis, G. & Papamastorakis, I.** (2001), *Seeing* measurements at Skinakas Observatory using the DIMM method. *Memorias de 5th Hellenic Astronomical Conference*, **1**: 143-146
- Brieva, E.** (1985), Búsqueda de sitio para una estación astrofísica en Colombia: Resultados preliminares. *Revista Mexicana de Astronomía y Astrofísica*, **10**: 397-403.
- Cavazzani, S., Ortolani, S., Zitelli, V. and Maruccia, Y.** (2011), Fraction of clear skies above astronomical sites: a new analysis from the GOES12 satellite, *Monthly Notices of the Royal Academy Society*, **411**: 1271-1283.
- Cavazzani, S., Ortolani, S. and Zitelli, V.** (2012), Site testing at astronomical sites: evaluation of *seeing* using satellite-

based data. *Monthly Notices of the Royal Academy Society*, **419**: 3081-3091.

- Della Valle, A., Maruccia, Y., Ortolani, S. and Zitelli, V.** (2010), Analysis of the fraction of clear sky at the La Palma and Mt Graham sites, *Monthly Notices of the Royal Academy Society*, **401**: 1904-1916.
- Erasmus, D.A. and Sarazin, M.** (2002), Utilizing satellite data for evaluation and forecasting applications at astronomical sites. *ASP Conf. Ser.*, Ed. J. Vernin, Z. Benkhaldoun, and C. Muñoz-Tuñon, **266**: 310.
- González, D.** (2014), Estudio de la calidad del cielo para observaciones astronómicas en Colombia. *Tesis de grado Maestría en Ciencias: Astronomía, Observatorio Astronómico, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá*.
- Hidayat, T., Mahasena, P., Dermawan, B., Hadi, P. and Premadi, P. W.** (2012), Clear sky above Indonesia: an analysis for astronomical site selection, *Monthly Notices of the Royal Academy Society*, **427**: 1903-1917.
- Lawson, J. K. & Carrano, C. J.** (2006), Using historic models of Cn2 to predict r0 and regimes affected by atmospheric turbulence for horizontal, slant and topological paths. *Memorias del SPIE Optics and photonics, UCRL-CONF-222540, San Diego, CA*.
- Parenti, R. & Sasiela, R.** (1994), Laser guide star systems for astronomical applications. *J. Opt. Soc. Am.*, **11** (1): 288-30.
- Pinzón, G., González, D. & Hernández, J.** (2015), Identification of potential sites for astronomical observations in northern South America. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, **127** (952): 523-539.
- Poveda, G. & Álvarez, D.** (2011), Hydroclimatic variability over the Andes of Colombia associated with ENSO: A review of climatic processes and their impact on one of the Earth's most important biodiversity hotspots. *Climate Dynamics*, **36**: 2233.
- Press, W. H., Teulolsky, S. A., Vetterling, W. T. & Flannery, B. P.** (2007), Numerical Recipes, the art of scientific computation, *Cambridge University Press, 3a. edición*
- Ramírez, A.** (2014), Medidas de extinción atmosférica en los filtros *B*, *V*, e *I* en La Guajira, Huila, Santander y Cesar. *Tesis de grado Carrera de Física, Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá*.
- Roddiar, F.** (1981), The effect of atmospheric turbulence in optical astronomy. *Progress in Optics*, **19**: 281.
- Rufener, F.** (1986), The evolution of atmospheric extinction at La Silla. *Astronomy and Astrophysics*, **165**: 275-286.
- Sarazin, M. & Roddiar, F.** (1990), The ESO differential image motion monitor. *Astronomy and Astrophysics*, **227**: 294-300.
- Sigernes, F., Peters, N., Lorentzen, D.** (2009), The absolute sensitivity of digital colour cameras. *Optics Express*, **17**, 22: 20211-20220.
- Stetson, P.** (1988) Some Factors Affecting the Accuracy of Stellar Photometry with CCDs. *DAO preprint*.
- Stock, J.** (1964), Procedures for location of astronomical observatory sites. *IAU Bulletin*, **19**: 35.
- Tatarski, V.** (1971), The effect of turbulent atmosphere on wave propagation in a turbulent medium. *I:P:S:T., Jerusalén*.

Estudio de la actividad antimicrobiana de películas delgadas de dióxido de titanio modificado con plata

William Vallejo^{1*}, Carlos Díaz-Urbe¹, Karen Navarro¹, Roger Valle^{2,3}, Jorge William Arboleda², Eduard Romero⁴

¹ Grupo de Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia

² Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia

³ Programa de Doctorado en Medicina Tropical, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

⁴ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Resumen

Se estudió la actividad antimicrobiana de películas delgadas de dióxido de titanio (TiO₂) solo y modificado con plata. Las películas de TiO₂ solo se sintetizaron con el método Doctor Blade y las modificadas con plata con el método de fotorreducción química bajo irradiación UV. Las propiedades de las películas se midieron por espectroscopia Raman y microscopía electrónica de barrido; también se determinó el efecto de la incorporación de las partículas de plata en las propiedades antimicrobianas de las películas de TiO₂ frente a *Staphylococcus aureus*. Los resultados de la caracterización indicaron que las partículas de plata se aglomeraban sobre la superficie del TiO₂ generando agregados del orden de los 200 nm; en el análisis por espectroscopia Raman se vio que los agregados de plata depositados sobre las películas de TiO₂ podrían presentar el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales localizada. El ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana indicó que la modificación de las películas de TiO₂ con partículas de plata aumentó en 2,18 veces la eficiencia del proceso.

Palabras clave: dióxido de titanio, fotocatalisis, actividad antimicrobiana.

Antimicrobial activity of silver-modified titanium dioxide thin films

Abstract

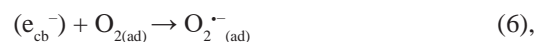
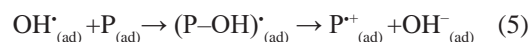
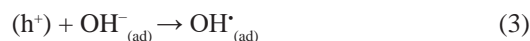
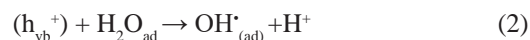
We studied titanium dioxide (TiO₂) thin films and silver-modified titanium dioxide thin films antimicrobial activity. The TiO₂ thin films were synthesized using Doctor Blade method. The synthesis of silver-modified films was done by chemical photoreduction under UV irradiation. Materials were characterized by Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM) measurements. We determined the antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* of the incorporation of silver particles on TiO₂. Results indicated silver particles agglomerated on the surface of TiO₂ generating aggregates of around 200 nm. Raman spectroscopy suggested that silver aggregates may present the plasmon resonance superficial phenomenon. The antimicrobial activity assay indicated that the TiO₂ films modification with silver increased by 2.18 times the efficiency of the process.

Key words: Titanium dioxide, photocatalysis, antimicrobial activity.

Introducción

La fotocatalisis heterogénea ha despertado considerable interés en la última década debido a sus aplicaciones en procesos de remediación ambiental (Park, et al., 2014). Muchos semiconductores sometidos a radiación UV y UV-vis se han utilizado para la degradación de compuestos orgánicos e inorgánicos contaminantes y la inactivación de bacterias y virus en diferentes tipos de ambientes (Dizaj, et al., 2014). Uno de los semiconductores más estudiados es el dióxido de titanio (TiO₂), material inocuo que presenta una elevada resistencia a la fotocorrosión, es estable en soluciones acuosas, no es costoso, abunda en la naturaleza y posee una buena actividad fotocatalítica bajo irradiación ultravioleta (Malliga, et al., 2014).

El proceso fotocatalítico que usa TiO₂ puede describirse de manera general como sigue:



donde CB corresponde a la banda de conducción y VB a la banda de valencia del TiO₂, y P es el contaminante (que en este trabajo fue *Staphylococcus aureus*). En los primeros

*Correspondencia:

William Vallejo, williamvallejo@mail.uniatlantico.edu.co

Recibido: 12 de octubre de 2015

Aceptado: 20 de enero de 2016

instantes la radiación electromagnética con mayor energía que la brecha de bandas del TiO_2 es absorbida sobre su superficie (ecuación 1) (Macwan, *et al.*, 2011), lo cual genera un electrón en la banda de conducción y un hueco en la banda de valencia; luego, las moléculas de agua adsorbidas sobre la superficie del TiO_2 generan radicales hidroxilo (ecuación 2). Los huecos también pueden generar radicales hidroxilo por la reacción directa con iones hidroxilos presentes en la solución (ecuación 3); al mismo tiempo, los electrones en la banda de valencia pueden generar radicales superóxido por la reacción con el oxígeno presente en la solución. Los radicales formados inician el proceso de degradación del contaminante (ecuaciones 5 y 6) (Peláez, *et al.*, 2012), en tanto que la presencia de oxígeno impide esta recombinación al atrapar electrones a través de la formación de aniones radicales superóxido (ecuación 6). La oxidación (ecuación 4) se ve favorecida por las moléculas que se absorben fácilmente en la fotocatalisis. Por otro lado, los radicales $\text{OH}^{\cdot(\text{ad})}$ son capaces de reaccionar en la interfaz o difundirse lejos de la partícula de TiO_2 (ecuación 5) con moléculas orgánicas en solución (Zhang, *et al.* 2013; Chorianoopoulos, *et al.*, 2011).

El TiO_2 se ha empleado para la degradación de varias bacterias, en especial las Gram positivas como *S. aureus* (Pham & Lee, 2015). Sin embargo, dos inconvenientes limitan la aplicación práctica de la tecnología basada en TiO_2 : (a) este material solo es fotoactivo bajo irradiación ultravioleta ($\lambda < 380$ nm), y (b) el proceso por lo general presenta poca eficiencia cuántica, con una rápida recombinación del par electrón-hueco fotogenerado. Para resolver estos inconvenientes se han explorado diferentes estrategias: (1) los métodos de síntesis del TiO_2 se pueden variar y optimizar, y (2) se puede modificar la superficie del TiO_2 . Se ha reportado que la modificación del TiO_2 con metales de transición (incluidos la plata, el platino, el rutenio y el paladio) disminuye el proceso de recombinación al formar heteroestructuras y nuevas interfaces que mejoran la eficiencia fotocatalítica (Gao & Yang, 2015; Rodríguez, *et al.*, 2010; Zhou, *et al.* 2011). Recientemente se ha encontrado que las partículas de plata tienen un amplio uso en el desarrollo de procesos biológicos y farmacéuticos, y se han usado como material de revestimiento para dispositivos médicos, materiales ortopédicos y ayudas tópicas para reparación de heridas, entre otros (Chen & Schluesener, 2008; Russell & Hugo, 1994; Mirzajani, *et al.*, 2011). Igualmente, se han hecho estudios sobre la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas en los que se han reportado buenos resultados (Shrivastava, *et al.*, 2007).

En este trabajo se determinó el efecto de la incorporación superficial de partículas de plata sobre películas de TiO_2 en sus propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus* resistente a metilicina (SARM).

Materiales y métodos

Síntesis de las películas delgadas de dióxido de titanio

Para fabricar las películas de TiO_2 se utilizó el método Doctor Blade. Se preparó una suspensión de dióxido de titanio mezclando 0,500 g de Degussa P-25 con 0,100 g de polietilenglicol macerados previamente en un mortero durante 15 minutos, a los que se añadieron 2 ml de isopropanol con agitación constante durante una hora. La suspensión obtenida se depositó sobre un sustrato de vidrio (sílice) usando la técnica Doctor Blade (Ruani, *et al.*, 2008; Wojcik, *et al.*, 2010). Las películas se precalentaron a 90 °C durante 30 minutos y luego se calentaron a 500 °C durante una hora.

Obtención de las películas de dióxido de titanio modificadas con plata

Para depositar las partículas de plata sobre las películas de TiO_2 , se utilizó el método de fotorreducción química (Gao, *et al.*, 2015). Para ello, las películas de TiO_2 se sumergieron en una solución acuosa de nitrato de plata (0,025 g de AgNO_3 en 5 ml de agua desionizada), y luego se irradió con una lámpara UV con un máximo de emisión de 260 nm y una intensidad de 30 W durante 30 minutos. Después del proceso de fotorreducción el color superficial de las películas de TiO_2 cambió de blanco a café grisáceo.

Caracterización de los materiales

Las propiedades de composición y morfología de los materiales se estudiaron mediante espectroscopia Raman en un equipo DXR 780 nm LASER y microscopía electrónica de barrido en un equipo SEM Tescan VEGA3 SB equipado para la espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS).

Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana

Para el ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de los materiales se empleó la metodología de unidades formadoras de colonia (UFC) (Shrivastava, *et al.*, 2007). Para ello se inocularon las cepas de SARM en 30 ml de caldo nutritivo estéril, y se dejaron en incubación y agitación durante más de 12 horas. Los cultivos de SARM se prepararon en tubos Falcon con una absorbancia conocida (0,05). Se introdujo en cada tubo un tratamiento, es decir, una película del respectivo material, lo cual se hizo por triplicado para cada tratamiento. Además, se usó gentamicina como control positivo y se dejó crecer un cultivo sin ningún tratamiento como control negativo. Se hizo una dilución de 10^{-7} y se usó la técnica de cuenta en placa. Luego se sometieron los tubos Falcon a irradiación UV durante 30 min con una lámpara de 360 nm de longitud de onda máxima. Los tubos se sometieron a incubación y agitación durante 12 horas y nuevamente se hizo la dilución y el conteo en placa. Por último, se hizo un conteo electrónico de las UFC encontradas en las placas. En la Figura 1 se muestra el esquema general de la metodología aquí descrita.

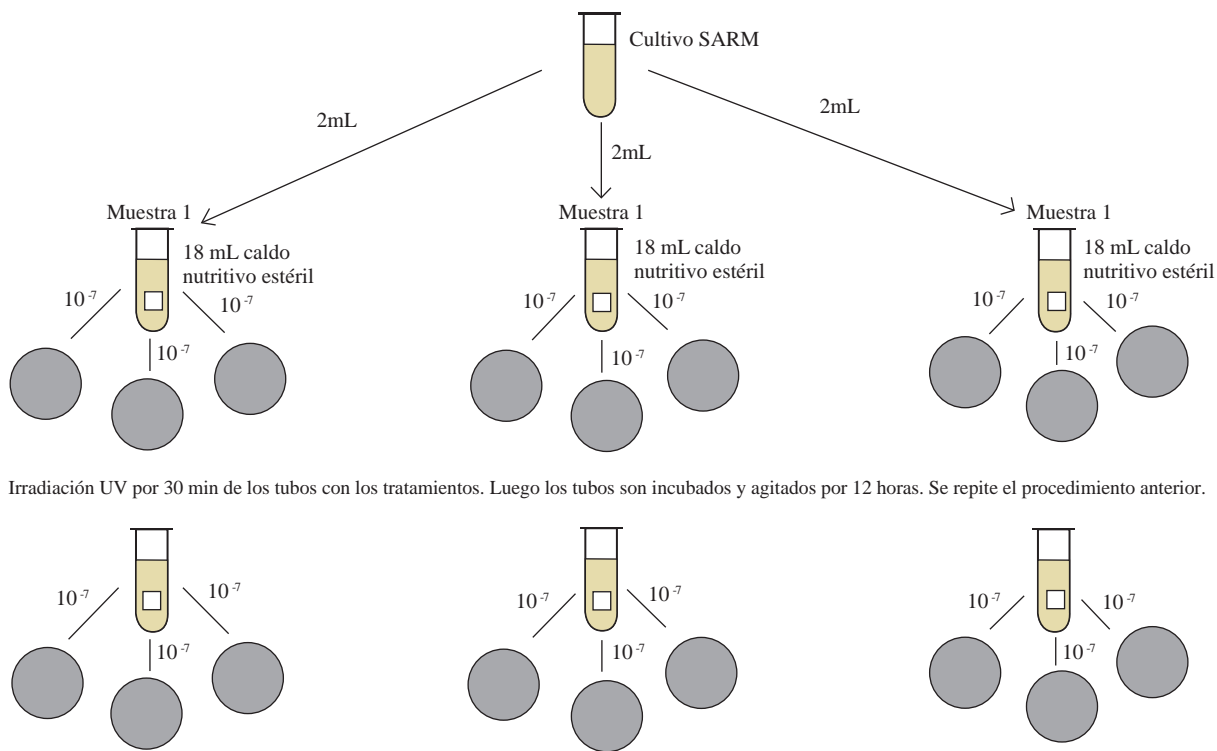


Figura 1. Esquema general de la metodología de unidades formadoras de colonia utilizada para los ensayos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* bajo irradiación UV

Resultados y discusión

Caracterización de los materiales mediante espectrometría Raman

En la Figura 2 se muestra el espectro Raman obtenido para las películas de TiO₂ y de este modificado con plata (TiO₂-Ag). Las películas de TiO₂ presentaron los picos Raman característicos de la fase anatasa y los modos de simetría de vibración para la fase anatasa indicados: E_{1g} para las señales localizadas a 144 cm⁻¹, 398 cm⁻¹ y 520 cm⁻¹, y E_{3g} para la señal localizada a 639 cm⁻¹, asignaciones que se corresponden con las reportadas en la literatura (Vishwas, et al., 2012; Liu, et al., 2001). En el espectro Raman de las películas modificadas de TiO₂-Ag se pudo observar que la intensidad de las señales aumentó en comparación con las películas de TiO₂ Degussa P25; este fenómeno se conoce como incremento superficial de espectroscopia Raman, y se caracteriza por el aumento en varios órdenes de magnitud de la intensidad de las señales en el espectro Raman por efecto de especies adsorbidas sobre la superficie del metal (Ma, et al., 2011); el fenómeno fisicoquímico indica que algunas nanopartículas de metales nobles (oro, plata, paladio y platino) pueden generar una intensa resonancia plasmónica superficial cuando son adsorbidas sobre semiconductores (Fang, et al., 2015). El incremento en la intensidad de las señales espectroscópicas Raman para las películas de TiO₂-Ag sugiere que es posible que las partículas de plata ‘fotoadsorbidas’ sobre la superficie

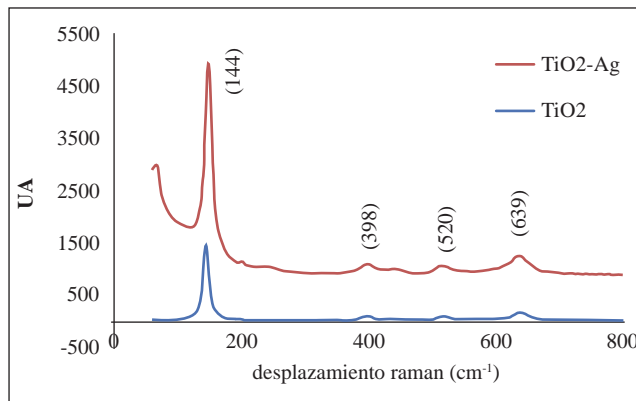


Figura 2. Espectro Raman de películas sintetizadas de dióxido de titanio solo y modificado con plata

del TiO₂ se presenten agrupadas a escala nanométrica, esta observación que se verifica mediante el análisis por microscopía electrónica de barrido.

Estudio de la morfología de los materiales

El estudio de la morfología y la composición química de los materiales obtenidos en esta investigación se hizo mediante microscopía electrónica de barrido y EDS. La Figura 3a muestra la imagen de microscopía electrónica de barrido de las películas de TiO₂ y TiO₂-Ag. La Figura 3a muestra que las películas de TiO₂ estaban conformadas por microagregados

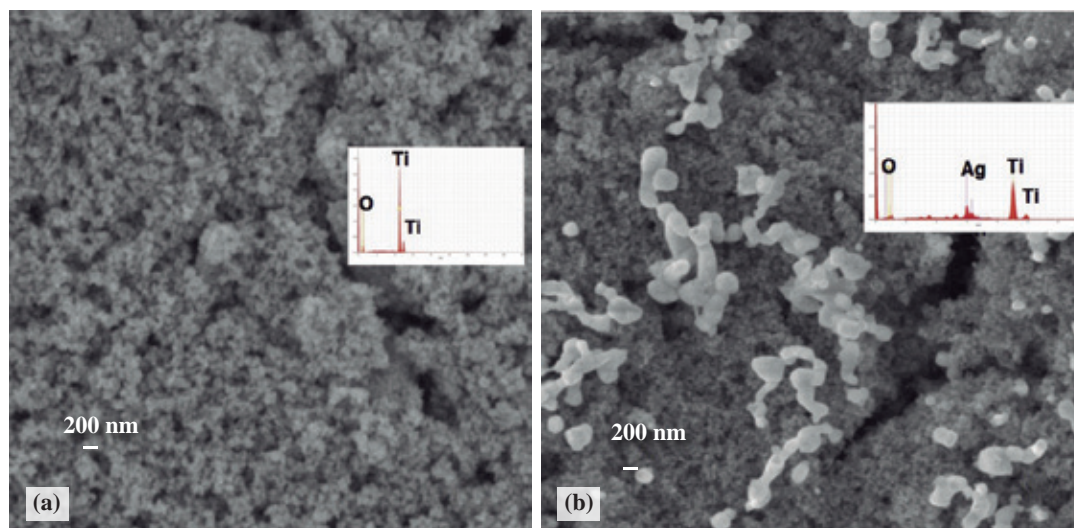


Figura 3. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de: (A) una película de dióxido de titanio, y (B) una película de dióxido de titanio modificado con plata. En cada imagen se muestra el análisis mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos X.

con un estrecho margen de tamaño del orden de los 50 nm; se observó la morfología típica del TiO₂ Degussa P25. Mediante el análisis por EDS se verificó la composición del material utilizado para la obtención de las películas. Las imágenes obtenidas evidencian baja uniformidad superficial en las películas (Clavijo, 2013).

En la Figura 3b se muestra el análisis morfológico de la película de TiO₂ con nanopartículas de plata. Se pudo observar un cambio significativo en la morfología de la superficie del TiO₂; la imagen SEM permitió diferenciar las partículas de plata depositadas (Cueto & Sánchez, 2010). El análisis SEM indicó que las partículas fotorreducidas se aglomeraron alcanzando tamaños del orden de los 200 nm. Mediante el análisis por EDS se verificó que los aglomerados observados en la superficie del TiO₂ correspondían a partículas de plata (Figura 3b).

Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana

Con el ánimo de verificar la posible aplicación de los materiales obtenidos, se hizo un ensayo de la actividad antimicrobiana contra *SARM* bajo irradiación UV. En la Figura 4 se muestra el porcentaje de inhibición de las películas de TiO₂ y de TiO₂-Ag. Se pudo observar que las películas de TiO₂-Ag presentaron un mayor porcentaje de inhibición (35 %) que las películas de TiO₂ sin modificar (16 %). Este resultado puede atribuirse a dos fenómenos: (a) los agregados de plata depositados sobre la superficie pueden acumular carga y aceptar electrones fotogenerados al interior del semiconductor, la acumulación de electrones puede disminuir la recombinación de portadores y favorecer su transferencia a otras especies para la generación de especies reactivas de oxígeno ó; (b) un aumento en la generación de portadores de carga, ya sea por influencia del campo magnético inducido por el metal incorporado o por

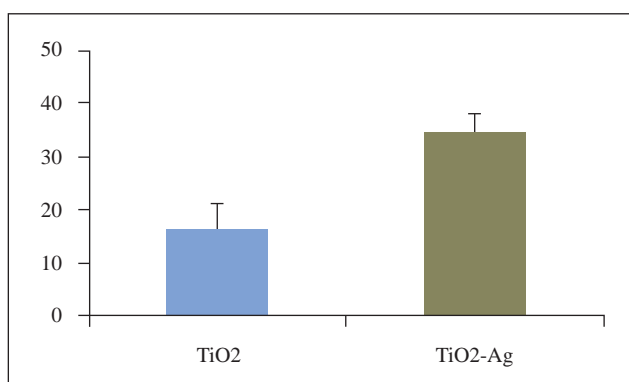


Figura 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* sobre películas de dióxido de titanio solo y modificado con plata bajo irradiación UV.

el calentamiento térmico ocasionado por la transferencia de carga desde el material adsorbido (Zielińska-Jurek, *et al.*, 2015; Stroyuk, *et al.*, 2010). La segunda de estas hipótesis cobra fuerza debido a los resultados obtenidos en la caracterización por Raman y por SEM; el efecto de incremento superficial de la espectroscopia Raman y la presencia de agregados del orden de los 200 nm sugieren que esta podría ser una de las razones del incremento de la actividad antimicrobiana.

Según André, *et al.* (2015), las partículas de plata exhiben oscilación colectiva de sus electrones en la banda de conducción, lo que se conoce como resonancia de plasmones superficiales localizada, y se sugiere que la asociación entre el semiconductor y el metal cambia la eficacia y el mecanismo de la actividad antimicrobiana de cada uno, lo que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

Conclusiones

En este trabajo se fabricaron películas delgadas de TiO₂ y de TiO₂-Ag usando la técnica Doctor Blade; las partículas de plata se depositaron mediante fotorreducción química. El análisis morfológico indicó que se formaron aglomerados de plata de un tamaño promedio de 200 nm en la superficie del semiconductor. Los resultados de la EDS demostraron la presencia de partículas de plata en la superficie del TiO₂. El análisis espectroscópico sugiere que las películas de TiO₂-Ag pueden presentar efectos de resonancia plasmónica superficial. Por último, los ensayos de inactividad antimicrobiana contra SARM indicaron que la modificación de las películas de TiO₂ con partículas de plata aumentó en 2,18 veces la eficiencia del proceso.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del Doctor Mikel Hurtado por su apoyo en la interpretación de los espectros Raman, así como el apoyo de la Universidad del Atlántico en la ejecución de este trabajo. Los resultados corresponden al proyecto presentado en la Convocatoria IMPACTO CARIBE 2014, convocado por la Universidad del Atlántico (Resolución 002627 del 3 de marzo de 2015 - Proyecto número 24).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Bibliografía

- André, R. S. Zamperini, C. A. Mima, E. G. Longo, V. M. Albuquerque, A. R. Sambrano, J. R. Machado, A. L. Vergani, C. E. Hernandez, A. C. Varela, J. A. & Longo, E. (2015). Antimicrobial activity of TiO₂: Ag nanocrystalline heterostructures: Experimental and theoretical insights, *Chemical Physics*. **459**: 87-95.
- Chorianopoulos, N. G. Tsoukleris, D. S. Panagou, E. Z. Falaras, P. & Nychas, G. J. (2011) Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. *Food Microbiology*. **28**: 164-170.
- Chen & Schluesener. (2008) Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*. **176**: 1-12.
- Clavijo, J. (2013) Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido. *Revista Elementos*. **3**: 134-146.
- Cueto, L. F. Sánchez, E. M. (2010). *Caracterización de películas delgadas de n-TiO₂ modificadas con nanopartículas de plata*. 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat, Campos do Jordão, SP, Brasil.
- Dizaj, S. M. Lotfipour, F. Barzegar-Jalali, M. Zarrintan, M. H. & Adibkia, K. (2014) Antimicrobial activity of the metals and metal oxides nanoparticles. *Materials Science & Engineering C*. **44**: 278-284.
- Fang, H. Xing, C. Liu, L. Zhao, Y. M. & Jun, H. (2015). Recyclable three-dimensional Ag nanoparticle-decorated TiO₂ nanorod arrays for surface-enhanced Raman scattering. *Biosensors and Bioelectronics*. **64**: 434-441.
- Gao, F. Yang, Y. & Wang, T. (2015). Preparation of porous TiO₂/Ag heterostructure films with enhanced photocatalytic activity. *Chemical Engineering Journal*. **270**: 418-427.
- Liu, Y. Liu, C. Zhang, Z. Y. & Wang, C. Y. (2001). The surface-enhanced Raman scattering effects of composite nanocrystals of Ag-TiO₂. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **57**: 35-39.
- Malliga, P. Pandiarajan, J. Prithivikumar, N. & Neyvasagam, K. (2014). Influence of film thickness on structural and optical properties of sol-gel spin coated TiO₂ thin film. *Journal Applied Physics*. **6**: 22-28.
- Macwan, D. P. Dave, P. N. & Chaturvedi, S. (2011). A review on nano-TiO₂ sol-gel type syntheses and its applications. *Journal of Materials Science*. **46**: 3669-3686.
- Mirzajani, F. Ghassempour, A. Aliahmadi, A. & Esmaeili, M. A. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Research in Microbiology*. **162**: 542-549.
- Ma, S. Livingstone, R. Zhao, B. & Lombardi, J. (2011). Enhanced Raman spectroscopy of nanostructured semiconductor phonon modes. *Journal Physical Chemistry Letters*. **2**: 671-674.
- Park, E. J. Jeong, B. Jeong, M. G. & Kim Y. D. (2014). Synergetic effects of hydrophilic surface modification and N-doping for visible light response on photocatalytic activity of TiO₂. *Current Applied Physics*. **14**: 300-305.
- Pelaez, M. Nolan, N. T. Pillai, S. C. Seery, M. K. Falaras, P. Kontos, A. G. Dunlop, P. Hamilton, J. Byrne, J. O'Shea, K. Entezari, M. H. & Dionysious D. (2012). A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. **125**: 331-349.
- Pham, T. D. & Lee, B. K. (2015). Disinfection of *Staphylococcus aureus* in indoor aerosols using Cu-TiO₂ deposited on glass fiber under visible light irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **307**: 16-22.
- Rodríguez, V. Algaro, S. O. Torres, L. M. Chod, S. H. & Lee, S. W. (2010). Silver-TiO₂ nanocomposites: Synthesis and harmful algae bloom UV-photoelimination. *Applied Catalysis B: Environmental*. **98**: 229-234.
- Russell, A. D. Path, F. R. Si, F. P. & Hugo, W. B. (1994). Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medicinal Chemistry*. **31**: 351-370.
- Ruani, G. Ancora, C. Corticelli, F. Dionigi, C. & Rossi C. (2008). Single-step preparation of inverse opal titania films by the Doctor Blade technique. *Solar Energy Materials & Solar Cells*. **92**: 537-542.
- Shrivastava, S. Bera, T. Roy, A. Singh, G. Ramachandrarao, P. & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*. **18**: 225103.

- Stroyuk, O. L., Kuchmiy, S. Y., Kryukov, A. I. & Pokhodenko V. D.** (2010). Semiconductor catalysis and photocatalysis on the nanoscale. Nova Science Publishers, Inc., New York. p.183.
- Vishwas, M. Rao, K. N. & Chakradhar, R. P. S.** (2012). Influence of annealing temperature on Raman and photoluminescence spectra of electron beam evaporated TiO₂ thin films. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **99**: 33-36.
- Wojcik, I., Senadeera, R., Wojcik, P. J., Silva, L. B., Doria, G., Baptista, P., Aguas, H., Fortunato, E. & Martins, R.** (2010). Inkjet printed and "doctor blade" TiO₂ photodetectors for DNA biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. **25**: 1229-1234.
- Zielińska-Jurek, A., Wei, Z., Wysocka, I., Szweida, P. & Kowalska, S.** (2015). The effect of nanoparticles size on photocatalytic and antimicrobial properties of Ag-Pt/TiO₂ photocatalysts. *Applied Surface Science*. **353**: 317-325.
- Zhou, W., Du, G., Hu, P., Yin, Y., Li, J., Yu, J., Wang, G., Wang, J., Liu, H., Wang, J. & Zhang, H.** (2011). Nanopaper based on Ag/TiO₂ nanobelts heterostructure for continuous-flow photocatalytic treatment of liquid and gas phase pollutants. *Journal of Hazardous Materials*. **197**: 19-25.
- Zhang, Y., Lee, M., An, S., Sinha-Ray, S., Khansari, S., Joshi, B., Hong, S., Hong, J., Kim, J., Pourdeyhimi, B., Yoon, S. & Yarin, A.** (2013). Antibacterial activity of photocatalytic electrospun titania nanofiber mats and solution-blown soy protein nanofiber mats decorated with silver nanoparticles. *Catalysis Communications*. **34**: 35-40.

Estructura estacional del ensamblaje de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en una parcela permanente de bosque seco tropical

Jorge Ari Noriega^{1,*}, Willinton Barranco², José Hernández³, Elkin Hernández⁴,
Stephanie Castillo⁵, Daniel Monroy¹, Héctor García⁵

¹Laboratorio de Zoología y Ecología Acuática - LAZOE, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia

²Vicerrectoría de Investigación, Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia

³Departamento Administrativo de Medio Ambiente - DADMA, Santa Marta, Colombia

⁴Parques Nacionales Naturales, Territorial Caribe - Parque Tayrona, Santa Marta, Colombia

⁵Herbario UTMC, Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia

Resumen

Los bosques secos tropicales en América del Sur son uno de los ecosistemas menos conocidos y presenta una de las mayores pérdidas de cobertura anual. Con el objetivo de entender la dinámica estacional de estos remanentes de bosque y generar herramientas de conservación, se ha propuesto la utilización de grupos indicadores como el de los escarabajos coprófagos. Durante las épocas de sequía y de lluvias en el 2012 se hizo un muestreo con el fin de conocer la estructura del ensamblaje de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en una parcela permanente de bosque seco tropical en la Universidad del Magdalena, distrito de Santa Marta (Magdalena, Colombia). Se instalaron tres transectos en la parcela con trampas de caída cebadas con excremento humano. Se registraron 5.001 individuos pertenecientes a 13 especies y siete géneros. Cabe resaltar la abundancia de la especie *Canthon variabilis* en las dos épocas. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia entre las dos épocas, pero sí en la riqueza. De las 13 especies encontradas, 11 se registraron en la época de sequía y ocho en la de lluvias, en tanto que siete se encontraron exclusivamente en una u otra de las dos épocas. No se registró la presencia de *Malagoniella astyanax* ni de *Digitonthophagus gazella*, lo cual indica que el fragmento tiene un grado intermedio de conservación. El número de especies y la estructura del ensamblaje concordaron con lo registrado para la región Caribe, y se evidenció una marcada dinámica estacional. Es necesario continuar con este tipo de estudios y analizar el efecto funcional de la fragmentación y el tamaño de los fragmentos en los procesos y servicios ecosistémicos.

Palabras clave: conservación, dinámica estacional, época de sequía, parcela permanente, Scarabaeidae.

Seasonal structure of the assemblage of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) in a permanent plot of tropical dry forest

Abstract

Tropical dry forests in South America are one of the less known ecosystems and they exhibit one of the biggest annual losses in forest cover. From a conservationist perspective, it has been proposed to use indicator groups such as dung beetles to try to understand the seasonal dynamics of the species community structure of these forest remnants. Sampling was performed during the dry and rainy seasons in 2012 to characterize the species composition of the dung beetle assemblage (Coleoptera: Scarabaeinae) in a permanent plot of dry forest located in the University of Magdalena, Santa Marta district (Magdalena – Colombia). Three sampling transects were set up in the parcel using pitfall traps baited with human dung. A total of 5,001 individuals, corresponding to 13 species and seven genera were registered. The abundance of the species *Canthon variabilis* during the two seasons was noteworthy. Although no significant differences in abundance between seasons were found, they were registered for species richness. Of the 13 species that we found, eight appeared exclusively in one season. The absence of *Malagoniella astyanax* and *Digitonthophagus gazella* indicates that the parcel has an intermediate degree of conservation. The number of species and the structure of the assemblage matched with values of other studies carried out in the Caribbean region showing a strong seasonal dynamic. Our results highlight that it is necessary to continue with this type of studies, analyzing the functional effects of fragmentation and fragment size in ecosystem services and processes.

Key words: Conservation, dry season, permanent plot, Scarabaeidae, seasonal dynamics.

Introducción

El bosque seco tropical (Bs-T) se define como aquella formación vegetal que presenta una cobertura boscosa continua y que se distribuye entre los 0 y los 1.000 m de altitud, en temperaturas superiores a los 24 °C, con precipitaciones entre los 500 y los 1.500 mm anuales y con uno o dos periodos de sequía al año (Pizano & García, 2014). Debido a sus características biogeográficas y climáticas se le considera como una importante reserva de diversidad biológica (Espinal, 1985; Murphy & Lugo, 1986; IAvH, 1998). Sin embargo, este tipo de bosque es uno de los ecosistemas más degradados, fragmentados y afectados por procesos antrópicos en América del Sur (Etter, 1993; IAvH, 1997; 1998; Fajardo, *et al.*, 2005; Miles, *et al.*, 2006). En Colombia solo persiste el 3 % de su cobertura original debido a la expansión de la frontera agrícola y al pastoreo excesivo, lo que ha disminuido drásticamente su extensión original (IAvH, 1998). La región con mayor cobertura de los bosques secos tropicales en Colombia corresponde a la llanura del Caribe (6.046.376 ha), sin embargo, solo el 0,67 % (41.000 ha) se encuentra dentro del sistema de protección de parques nacionales naturales (IAvH, 1998). Aunque mundialmente los bosques secos tropicales son uno de los ecosistemas que requieren mayor estudio, existen pocos trabajos detallados sobre su flora, fauna y ecología (Janzen, 1983; Murphy & Lugo, 1986; Janzen, 1987; Prado & Gibbs, 1993; Gentry, 1995; Prance, 2006; Pizano & García, 2014).

Uno de los grupos de insectos más frecuentemente usados como bioindicadores en estudios de impacto y vigilancia ambiental son los escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae), ya que responden de manera cualitativa y cuantitativa a la pérdida del hábitat y a los efectos de la fragmentación en diferentes ecosistemas (Davis, *et al.*, 2001; Estrada & Coates-Estrada, 2002; Halffter & Arellano, 2002; McGeoch, *et al.*, 2002; Boonrotpong, *et al.*, 2004; Horgan, 2005; Shahabuddin, *et al.*, 2005; Nichols, *et al.*, 2007; Otavo, *et al.*, 2013). Esta subfamilia contiene aproximadamente 6.000 especies a nivel mundial y en el territorio colombiano se han registrado cerca de 300 especies en 39 géneros (Medina, *et al.*, 2001; Noriega, *et al.*, 2007; Pulido, *et al.*, 2007; Noriega, *et al.*, 2008; Medina & Pulido, 2009; Noriega, *et al.*, 2011).

En el caso de los bosques secos tropicales, en varios trabajos se han utilizado los escarabajos coprófagos como bioindicadores de diferentes tipos de perturbaciones antrópicas (Escobar, 1997; 1998; Bustos-Gómez & Lopera, 2003; Andresen, 2005; 2007; Martínez, *et al.*, 2009; Barraza, *et al.*, 2010). Sin embargo, en la región del cinturón árido pericaribeño (Hernández-Camacho, *et al.*,

1992) se han hecho muy pocos estudios que hayan utilizado este grupo como indicador del estado de conservación, y la mayoría corresponden a reportes locales que no analizan la dinámica estacional (Noriega, *et al.*, 2007; Jiménez-Ferbans, *et al.*, 2008; Martínez, *et al.*, 2010; Navarro, *et al.*, 2011; Solís, *et al.*, 2011; Delgado-Gómez, *et al.*, 2012). Por todo lo anterior, es necesario abordar estudios que no solo utilicen a los escarabajos como indicadores del estado de los fragmentos de bosque seco tropical, sino que, además, incluyan la variación en la estructura del ensamblaje en relación con su estacionalidad. En este trabajo se presenta un análisis estacional de la estructura del ensamblaje de escarabajos coprófagos en una parcela permanente de bosque seco tropical ubicada en la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se hizo en una parcela de bosque seco tropical ubicada en el campus de la Universidad del Magdalena, en la ciudad de Santa Marta, departamento del Magdalena, Colombia (11°13'18,08" N - 74°11'11,25" O; 30 m). Desde el año 1800 hasta principios de 1950 dicho campus hizo parte de un cultivo de caña de azúcar, el cual era muy común en toda la región. En 1970 se construyó la Universidad del Magdalena y desde su creación los relictos de bosque dentro del campus han sido retirados a machete, con máquinas y utilizando quemadas controladas para establecer algunos monocultivos de algodón, maíz y hortalizas. A finales de los años 90 se suspendió el uso agrícola de estas áreas, y en 2007 se cedieron 3,5 hectáreas (parcela con 350.000 m² de forma rectangular) de bosque seco tropical (Figura 1) al Programa de Biología de la Facultad de Ciencias Básicas para su conservación, recuperación e investigación (Strewe, *et al.*, 2009).

La fisonomía y composición florística de la parcela permiten reconocer el zonobioma tropical alternohigróico (Hernández-Camacho, *et al.*, 1992), identificable por los vestigios de la cobertura vegetal original, que continúa hasta las estribaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta. Esta formación puede encontrarse hasta los 1.000 m de altitud y se conoce como bosque seco tropical (IAvH, 1998), es decir, los llamados bosques higrófiticos (Dugand, 1973), bosques secos tropicales de Holdridge (1979) y bosque tropical deciduo por la sequía de baja altitud según la clasificación de la UNESCO (1973). Torrijos & Cuadrado (2008) hicieron el inventario florístico de la Universidad del Magdalena y encontraron 84 especies distribuidas en 25 familias, incluidas las lianas, las herbáceas y los árboles. Posteriormente, en un par de trabajos de pregrado, Hernández-R (2012) y Rojano & España (2013) registraron un promedio de 250 individuos con un diámetro a la altura del pecho (DAP) de 2,5 cm o más, correspondientes a 22 especies y 11 familias de plantas. En la actualidad se evidencia un proceso de regeneración

*Correspondencia:

Jorge Ari Noriega, jnorieg@hotmail.com

Recibido: 2 de julio de 2015

Aceptado: 13 de enero de 2016



Figura 1. Ubicación de la parcela permanente de bosque seco tropical en la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia.

natural dominado por las familias Leguminosae, Malvaceae, Capparaceae, Euphorbiaceae, Poaceae y Apocynaceae, y se pueden encontrar elementos de la vegetación original, como los árboles olla de mono (*Lecythis minor* Jacq.), capote (*Machaerium milleflorum* Pittier), buche colorado (*Pithecellobium roseum* Spruce ex Benth.) y aruñagato (*Pisonia aculeata* L.), inmersos en rastrojos formados por lianas (*Paullinia macrophylla* Kunth, *Serjania* spp., *Fridericia pubescens* (L.) L.G.Lohmann, *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem.), y arbustos leñosos (*Capparis flexuosa* (L.) L., *Cordia alba* (Jacq.) Roem. & Schult., *Calliandra magdalenae* (DC.) Benth.) (E. Carbono, com. pers.)

La zona presenta un régimen de precipitación de tipo bimodal tetraestacional, con dos períodos de concentración de lluvias, uno de mayo a junio y otro de septiembre a noviembre, cuya mayor intensidad se registra en octubre, y dos períodos secos, de los cuales el más intenso va de

diciembre a abril, y un veranillo de julio a agosto (Strewe, *et al.*, 2009). La precipitación anual promedio es de 578 mm, la temperatura promedio anual es de 27 °C, con una máxima de 32,6 °C y una mínima de 23,3 °C, y una humedad relativa promedio de 74 % (Rangel & Garzón, 1995). Sobre la diversidad faunística en la parcela, los hallazgos de más de dos años de investigación incluyen 191 especies de aves (de las cuales 73 son migratorias), 15 especies de mamíferos, seis especies de anfibios y siete especies de reptiles (Strewe, *et al.*, 2009, Montes-Correa, *et al.*, 2015).

Muestreo de los escarabajos coprófagos

Se llevaron a cabo dos muestreos durante los meses de febrero y octubre de 2012, correspondientes a las dos épocas climáticas: sequía (baja pluviosidad) y lluvias (alta pluviosidad). El estudio consistió en establecer tres transectos separados 50 m entre sí; en cada transecto se colocaron durante 48 horas cinco trampas de caída con

30 m de distancia entre ellas y cebadas con excremento humano (Noriega & Fagua, 2009). El material recolectado se identificó según la especie en las instalaciones del Laboratorio de Entomología de la Universidad del Magdalena con base en diferentes claves taxonómicas (Howden & Young, 1981; Kohlmann & Solis, 1997; Medina & Lopera-Toro, 2000; Kohlmann & Solis, 2001; Solis & Kohlmann, 2002; 2004; Camero, 2010; Edmonds & Zidek, 2010; Vaz-De-Mello, et al., 2011; Solis & Kohlmann, 2013), así como en la comparación con material de la colección de referencia del primer autor (CJAN) y el apoyo de especialistas internacionales.

Análisis de los datos

Se hicieron curvas de acumulación de especies para cada una de las épocas climáticas utilizando el programa EstimateS v. 9.1 (Colwell, 2013), así como una prueba de normalidad con el test de Shapiro-Wilk y una prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de las varianzas. El análisis de los datos arrojó una distribución no normal, por lo que se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar la abundancia y la riqueza entre épocas. Todas las pruebas estadísticas se hicieron con el programa Statistix v. 8.1 empleando un nivel de confianza de $\alpha=0,05$.

Resultados

Las curvas de acumulación de especies demostraron que el muestreo fue eficiente para las dos épocas (de sequía y de lluvias), con un rango que osciló entre 80 y 93 %, y que las curvas de *singletons* y *doubletons* se cruzaban y disminuían (Figura 2).

Estructura del ensamblaje de escarabajos coprófagos

Se recolectaron 5.001 individuos correspondientes a 13 especies, siete géneros y cinco tribus (Tabla 1). El género con mayor número de especies fue *Canthon*, con cinco especies, seguido de *Onthophagus* y *Eurysternus*, con dos especies cada uno; el resto de géneros presentó solamente una especie. La especie más abundante en el muestreo fue *Canthon variabilis* (n=3.696, 73,8 %), seguida por *C. euchalceum* (n=534, 10,6 %), *C. juvenis* (n=308, 6,1 %) y *C. acutooides* (n=254, 5 %). El ensamblaje presentó la estructura típica de los tres gremios de relocalización: de las 13 especies recolectadas seis tienen hábitos paracópidos (cavadores), cinco telecópidos (rodadores) y dos son endocópidas (residentes) (Tabla 1).

Dinámica estacional del ensamblaje

El mayor número de especies se obtuvo en la época de sequía, con 11 registros, mientras que en la época de lluvias solo se registraron ocho especies (Tabla 1). La especie que presentó la mayor abundancia en las dos épocas fue *C. variabilis*. La época con el mayor número de individuos fue el periodo de lluvias (n=2.551) y el menor se registró en la época de sequía (n=2.450); aunque no se encontraron diferencias significativas en la abundancia entre las dos

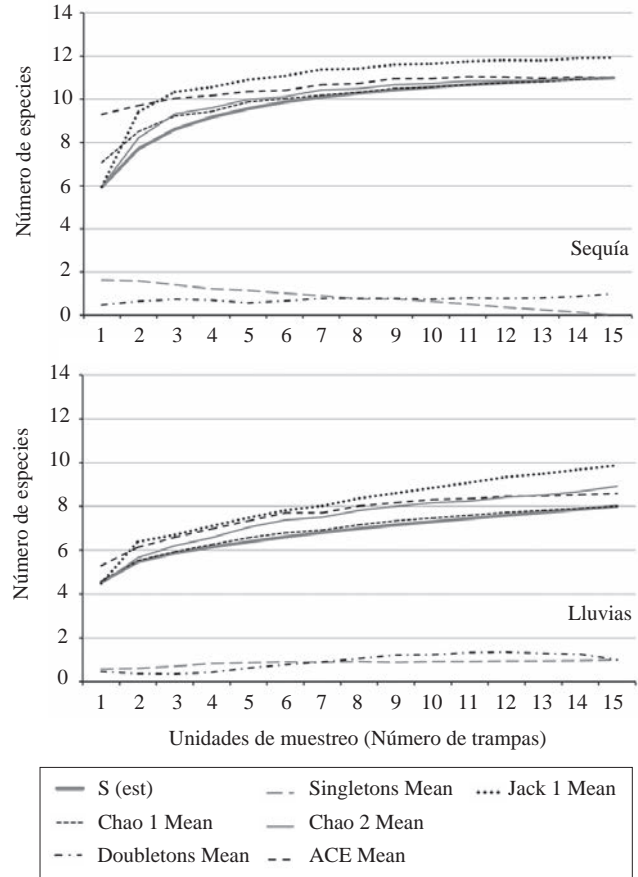


Figura 2. Curvas de acumulación de especies según las unidades de muestreo (número de trampas) para las dos épocas de muestreo (sequía y lluvias) en la parcela permanente de bosque seco tropical en la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia.

épocas (MW, W=125,0, p=0,6186, n=15, $\alpha=0,05$, Figura 3), sí se encontraron diferencias significativas en la riqueza (MW, W=53,5, p=0,0127, n=15, $\alpha=0,05$, Figura 4).

En cuanto a la especificidad por época climática (sequía y lluvias), se encontró que seis de las 13 especies eran generalistas, pues se presentaron en las dos épocas, mientras que dos especies (*Dichotomius belus* y *Coprophanæus corythus*) se registraron únicamente en la época de lluvias, y cinco especies (*Eurysternus impressicollis*, *Eurysternus plebejus*, *Onthophagus hirculus*, *Onthophagus marginicollis* y *Uroxys macrocularis*) en la época de sequía (Tabla 1). Los resultados evidenciaron que en esta localidad y fragmento de bosque seco tropical no se registró una relación entre los niveles de precipitación y la abundancia, pero sí se evidenció un efecto sobre la riqueza, así como un marcado recambio de especies entre épocas.

Discusión

Estructura del ensamblaje de escarabajos coprófagos

Teniendo en cuenta el tamaño reducido y la perturbación antrópica del fragmento, el número de especies registrado

Tabla 1. Listado de las especies de la subfamilia Scarabaeinae (Coleoptera) y número de individuos en cada temporada de muestreo (sequía y lluvias) presentes en la parcela permanente de bosque seco tropical en la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia. Gremio de relocalización alimenticio (GRA, C: Cavador - paracóprido, R: Rodador - telecóprido y E: Residente – endocóprido; Tamaño: S > 10 mm y s ≤ 10 mm).

Tribu	GRA	Especies	Número de individuos		Total
			Sequía	Lluvias	
Ateuchini	Cs	<i>Uroxys macrocularis</i> (Howden & Young, 1981)	11	0	11
Coprini	Cs	<i>Canthidium euchalceum</i> Balthasar, 1939	32	502	534
	CS	<i>Dichotomius belus</i> (Harold, 1880)	0	2	2
Deltotrichini	Rs	<i>Canthon acutooides</i> Schmidt, 1922	136	118	254
	Rs	<i>Canthon juvenicus</i> (Harold, 1868)	209	99	308
	Rs	<i>Canthon lituratus</i> (Germar, 1813)	18	3	21
	Rs	<i>Canthon mutabilis</i> Lucas, 1857	32	48	80
	Rs	<i>Canthon variabilis</i> (Martínez, 1948)	1.918	1.778	3.696
Oniticellini	Es	<i>Eurysternus impresicollis</i> Castelnau, 1840	2	0	2
	Es	<i>Eurysternus plebejus</i> Harold, 1880	4	0	4
Onthophagini	Cs	<i>Onthophagus hirculus</i> Mannerheim, 1829	14	0	14
	Cs	<i>Onthophagus marginicollis</i> Harold, 1880	74	0	74
Phanaeini	CS	<i>Coprophanaeus corythus</i> (Harold, 1863)	0	1	1
Total			2.450	2.551	5.001

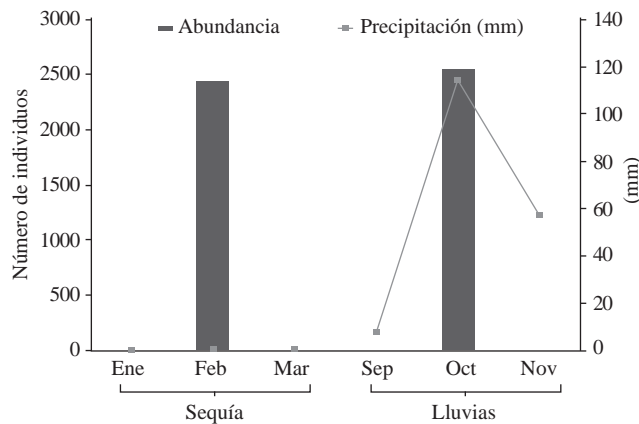


Figura 3. Variación de la abundancia de escarabajos coprófagos y de la precipitación durante las dos épocas de muestreo (sequía y lluvias) en la parcela permanente de bosque seco tropical en la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia.

para la zona fue representativo en comparación con otros estudios en el Caribe colombiano. Las especies capturadas correspondían a 22,8 % de las registradas por **Noriega, et al.** (2007) para la provincia de la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM), a 50 % de las reportadas por **Jiménez-Ferbans, et al.** (2008) en ambientes secos de la región de Santa Marta, a 44,8 % de las reportadas por **Martínez, et al.** (2009) para la cuenca del río Gaira (SNSM) y a 59 % de las especies reportadas por **Barraza, et al.** (2010) en Bahía Concha, lo cual indicaría que la zona mantiene una fauna típica de escarabajos coprófagos propia de los bosques secos tropicales de esta región del país (**Noriega, et al.** 2013).

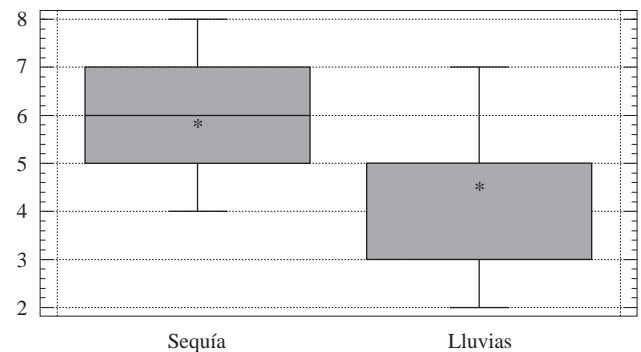


Figura 4. Diagrama de caja de la riqueza de especies de escarabajos coprófagos en las dos épocas de muestreo (sequía y lluvias) en la parcela permanente de bosque seco tropical en la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia.

El género *Canthon* se registró en las dos épocas, lo cual puede indicar su condición generalista y que potencialmente puede recurrir a estrategias que le permitan aprovechar los pocos recursos existentes (H. García, datos sin publicar). Estos datos coinciden con lo reportado por **Jiménez-Ferbans, et al.** (2008), **Martínez, et al.** (2009, 2010) y **Solís, et al.** (2011), y sugieren que este género es uno de los más característicos de la región Caribe. Entre las especies menos abundantes se registró *C. corythus*, de la cual se recolectó un solo individuo en época de lluvias, lo que concuerda con la información registrada por otros autores en cuanto a esta especie, la cual se encuentra asociada a hábitats muy conservados, y se recolecta más frecuentemente en carroña (**Gámez, et al.**, 2006; **Edmonds & Zidek**, 2010). Además,

el tamaño reducido del fragmento, su grado de perturbación y el hecho de que no se usó carroña como cebo en las trampas explicarían el bajo número de individuos de esta especie.

Es importante señalar la ausencia de una especie típica del bosque seco tropical como lo es *Malagoniella astyanax*, la que según los resultados de este estudio podría ser un excelente indicador de parches grandes de este tipo de bosque en la región. En contraste, la ausencia de la especie *Digitonthophagus gazella* es un indicador del buen nivel de recuperación de este fragmento de bosque, ya que aunque está reportada para la región (Rivera & Wolff, 2007; Martínez, *et al.*, 2009; Noriega, *et al.*, 2011), se trata de una especie asociada a zonas abiertas o bosques demasiado perturbados.

Dinámica estacional del ensamblaje

A pesar de no haberse registrado diferencias significativas en la abundancia entre épocas, con base en otros muestreos en la zona se sugiere que la abundancia debe disminuir entre la época de lluvias y la época de sequía, lo que concuerda con lo reportado para otras localidades a nivel mundial (Janzen, 1983; Montes De Oca & Halffter, 1995; Andresen, 2005; Quintero & Halffter, 2009). Este patrón se debe a que el aumento de la humedad del suelo permite que los adultos emerjan cuando la bola-nido se ha ablandado (Martínez & Montes de Oca, 1994). Igualmente, las precipitaciones ofrecen más recursos a nivel cualitativo y cuantitativo al proporcionar alimento a los vertebrados, con el consecuente aumento en la producción de excremento (Navarro, *et al.*, 2011).

La aparición exclusiva de grandes paracópridos (CS, Tabla 1) como *D. belus* y *C. corythus* en época de lluvias, probablemente se relaciona con el hecho de que estas especies necesitarían una mayor cantidad de recursos y en esta época es posible que sea más fácil la construcción de túneles en el suelo debido a su menor compactación y a un mejor aprovechamiento del recurso que permanece húmedo por más tiempo (Halffter & Favila, 1993). En este sentido, es probable que las especies asociadas a la época de sequía se hayan especializado en aprovechar pequeños recursos poco hidratados y en hacer nidos superficiales como lo hacen las especies rodadoras, pero comprobarlo requeriría estudios más profundos.

Escobar (2000) reconoce una estrecha relación entre los niveles de precipitación y la variación de las comunidades entre la época de sequía y la de lluvias en los bosques secos tropicales, en tanto que en los bosques de montaña los cambios en la abundancia de especies de escarabajos coprófagos no están relacionados con los niveles de precipitación. La segregación espacial entre las especies de escarabajos, documentada en otros estudios (Janzen, 1983; Bustos, *et al.*, 2003; Andresen, 2005; Horgan, 2005; Quintero & Halffter, 2009; Noriega, 2015), es un mecanismo que disminuye la competencia interespecífica y

la presión por el recurso alimenticio, lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio. De igual manera, las abundancias registradas fueron bajas y se mantuvieron en las dos épocas de muestreo debido al tamaño reducido de la parcela, a la escasez de recursos y a la baja conectividad espacial de la parcela con fragmentos cercanos que podrían permitir un flujo de individuos o de mamíferos que abastecieran de recurso a los escarabajos.

El presente trabajo representa un primer aporte al conocimiento de la fauna de Scarabaeinae de la región, y constituye un estudio de base para posteriores análisis de la dinámica temporal de pequeños fragmentos de bosque seco en el Caribe colombiano. A manera de sugerencia, sería fundamental continuar con esta línea de estudios en la región, incluida la evaluación de aspectos funcionales, lo que requeriría aumentar los esfuerzos de recolección para cubrir la totalidad del año, usar otros tipos de cebos como carroña y diplópodos, replicar el estudio en otros fragmentos cercanos con diferentes tamaños y priorizar las campañas de conservación y restauración de los pocos relictos de bosque que aún existen en la región.

Agradecimientos

Al Programa de Biología de la Facultad de Ciencias Básicas y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad del Magdalena. Al Laboratorio de Zoología y Ecología Acuática – LAZOE, de la Universidad de Los Andes. A Eduino Carbone por la información sobre la estructura de la vegetación de la parcela. A Darren Mann y a Fernando Vaz-De-Mello por su valiosa ayuda en la confirmación del material recolectado. A David Morris y Javier Santos por la revisión crítica del resumen en inglés.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Bibliografía

- Andresen, E. (2003). Effect of forest fragmentation on dung beetle communities and functional consequences for plant regeneration. *Ecography* **26**: 87-97.
- Andresen, E. (2005). Effects of season and vegetation type on community organization of dung beetles in a tropical dry forest. *Biotropica* **37**: 291-300.
- Andresen, E. (2007). Dung beetle assemblages in primary forest and disturbed habitats in a tropical dry forest landscape in western Mexico. *Journal of Insect Conservation* **12** (6): 639-650.
- Barraza, J., Montes, J., Martínez, N., Deloya, C. (2010). Ensamblaje de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) del bosque tropical seco, Bahía Concha, Santa Marta (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*. **36** (2): 285-291.
- Boonrotpong, S., Sothibandhu, S., Pholpunthin, C. (2004). Species composition of dung beetles in the primary and secondary forests at Ton Nga Chang Wildlife Sanctuary. *ScienceAsia*. **30**: 59-65.

- Bustos, F., Gómez, L., Lopera, A.** (2003). Preferencia por el cebo de los escarabajos coprófagos (Coleóptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de un remanente de bosque seco tropical al norte del Tolima (COLOMBIA). *Monografías Tercer Milenio, SEA, Zaragoza* **3**: 59-65.
- Camero, E.** (2010). Los escarabajos del género *Eurysternus* Dalman, 1824 (Coleoptera: Scarabaeidae) de Colombia. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.)* **46**: 147-179.
- Colwell, R. K.** (2013). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9.1. (Software and User's Guide). URL: purl.oclc.org/estimates.
- Davis, A. J., Holloway, J. D., Huijbregts, H., Krikken, J., Kirk-Springgs, A., H., Sutton, S. L.** (2001). Dung beetles as indicators of change in the forests of northern Borneo. *Journal of Applied Ecology* **38**: 593-616.
- Delgado-Gómez, P., Lopera, A., Rangel-Ch., J. O.** (2012). Variación espacial del ensamblaje de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en remanentes de bosque seco en Chimichagua (Cesar, Colombia). En: J.O. Rangel-Ch. (Ed.), *Colombia Diversidad Biótica XII: La región Caribe de Colombia*. Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá. p. 833-849.
- Dugand, A.** (1973). Elementos para un curso de geobotánica en Colombia. *Cespedesia* **2** (6-8): 137-479.
- Edmonds, W. & Zidek, J.** (2010). A taxonomic review of the Neotropical genus *Coprophanæus* Olsoufieff, 1924 (Coleoptera: Scarabaeidae, Scarabaeinae). *Insecta Mundi* **0129**: 1-111.
- Escobar, F.** (1997). Estudio de la comunidad de coleópteros coprófagos (Scarabaeidae) en un remanente de bosque seco al norte del Tolima, Colombia. *Caldasia* **19**: 419-430.
- Escobar, F.** (1998). Análisis regional de la comunidad de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de los bosques secos de la región Caribe de Colombia. En: Informe Nacional sobre el Estado de la Biodiversidad 1997- Colombia. María Elfi Chávez y Natalia Arango (Ed.). Instituto Humboldt, PNUMA, Ministerio del Medio Ambiente. Santafé de Bogotá: 1 vol. p. 72-75.
- Escobar, F.** (2000). Diversidad de coleópteros coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en un mosaico de hábitats en la Reserva Natural Nukak, Guaviare, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana* **79**: 103-121.
- Espinal, L. S.** (1985). Geografía ecológica del departamento de Antioquia. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía* **38** (1): 24-39.
- Estrada, A. & Coates-Estrada, R.** (2002). Dung beetles in continuous forest, forest fragments and in an agricultural mosaic habitat island at Los Tuxtlas, Mexico. *Biodiversity and Conservation* **11**: 1903-1918.
- Etter, A.** (1993). Diversidad ecosistémica en Colombia hoy. En: *Nuestra Diversidad Biológica*, CEREC (Ed.), Fundación Alejandro Ángel Escobar, Bogotá. p. 47-66.
- Fajardo, L., Gonzáles, V., Nassar, J., Lacabana, P., Portillo, C. A., Carrasquel, F., Rodríguez, J. P.** (2005). Tropical dry forests of Venezuela: Characterization and current conservation status. *Biotropica* **37**: 531-546.
- Gentry, A. H.** (1995). Diversity and floristic composition of neotropical dry forest. En: *Tropical deciduous forest ecosystem*. S. Bullock, E. Medina & H. A. Mooney (Eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 116-194.
- Halffter, G. & Favila, M.** (1993). The Scarabaeinae (insecta: Coleoptera), an animal group for analyzing, inventorying and monitoring biodiversity in tropical rainforest and modified landscapes. *Biology international* **27**: 15-21.
- Halffter, G. & Arellano, L.** (2002). Response of dung beetle diversity to human-induced changes in a tropical landscape. *Biotropica* **34** (1): 144-154.
- Hernández-Camacho, J., Hurtado, A., Ortiz, R., Walschburger, T.** (1992). Unidades biogeográficas de Colombia. En: Halffter, G. (Ed.) *La diversidad biológica de Iberoamérica I*. *Acta Zoológica Mexicana*. p. 55-151.
- Hernández-R., J.** (2012). Informe de las actividades de apoyo profesional para el levantamiento de la vegetación en la parcela permanente de bosque seco tropical del campus de la Universidad del Magdalena. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena. 45 p.
- Holdridge, L.** (1979). *Ecología basada en zonas de vida*. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas San José, Costa Rica. 159 p.
- Horgan, F. G.** (2005). Aggregated distribution of resources creates competition refuges for rainforest dung beetles. *Ecography* **28**: 603-618.
- Howden, H. F. & Young, O. P.** (1981). Panamian Scarabaeinae: Taxonomy, distribution, and habits (Coleoptera, Scarabaeidae). *Contributions of the American Entomological Institute* **18** (1): 1-204.
- Instituto Alexander von Humboldt (IAVH).** (1997). Caracterización ecológica de cuatro remanentes de bosque seco tropical de la región Caribe colombiana. Grupo de Exploraciones Ecológicas Rápidas, IAVH, Villa de Leyva. 76 p.
- Instituto Alexander von Humboldt (IAvH).** (1998). El bosque seco tropical (Bs-T) en Colombia. En: M. Chávez y N. Arango (Eds.) *Informe nacional sobre el estado de la biodiversidad de Colombia, 1997*. Programa de inventarios de la biodiversidad. Grupo de exploración y monitoreo, GEMA. Ministerio del Medio Ambiente-Naciones Unidas, Bogotá. 215 p.
- Janzen, D.** (1983). Seasonal changes in abundance of large nocturnal dung beetles (Scarabaeidae) in Costa Rica deciduous forest and adjacent horse pasture. *Oikos* **33**: 274-283.
- Janzen, D. H.** (1987). Insect diversity of a Costa Rican dry forest: Why keep it. *Biol. Journal of the Linn. Soc.* **30**: 343-356.
- Jiménez-Ferbans, L., Mendieta, W., García, H., Amat, G.** (2008). Notas sobre los escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en ambientes secos de la región de Santa Marta, Colombia. *Acta Biológica Colombiana* **13** (2): 203-208.

- Kohlmann, B. & Solís, A.** (1997). El género *Dichotomius* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Costa Rica. *Giornale Italiano di Entomologia*. **8**: 343-382.
- Kohlmann, B. & Solís, A.** (2001). El género *Onthophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Costa Rica. *Giornale Italiano di Entomologia*. **49** (9): 159-261.
- Martínez, I. & Montes de Oca, E.** (1994). Observaciones sobre algunos factores microambientales y el ciclo biológico de dos especies de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: *Canthon*). *Folia Entomológica Mexicana*. **91**: 47-59.
- Martínez, N. J., García, H., Pulido, L. A., Ospino, D. D., Narváez, J. C.** (2009). Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) de la vertiente noroccidental de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Neotropical Entomology*. **38** (6): 708-715.
- Martínez, N. J., Cañas, L. M., Rangel, J. L., Barraza, J. M., Montes, J. M., Blanco, O. R.** (2010a). Coleópteros coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en un fragmento de bosque seco tropical en el departamento del Atlántico, Colombia. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*. **11** (1): 21-30.
- Martínez, N. J., Cañas, L. M., Rangel, J. L., Blanco, O., Mendoza, J. D., Cohen, S.** (2010b). Coleópteros coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en la Reserva Natural Las Delicias (RND), Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM), Colombia. *Boletín Científico Museo de Historia Natural*. **14** (2): 187-200.
- McGeoch, M. A., Van rensburg, B. J., Botes, A.** (2002). The verification and application of bioindicators: A case study of dung beetles in a savanna ecosystem. *Journal of Applied Ecology*. **39**: 661-672.
- Medina, C. A. & Pulido, L. A.** (2009). Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) de la Orinoquía colombiana. *Biota Colombiana*. **10** (1 y 2): 55-62.
- Medina, C. A. & Lopera-Toro, A.** (2000). Clave ilustrada para la identificación de los géneros de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) de Colombia. *Caldasia*. **22** (2): 299-315.
- Medina, C. A., Lopera, A., Vitolo, A., Gill, B.** (2001). Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de Colombia. *Biota Colombiana*. **2** (2): 131-144.
- Miles, L., Newton, A. C., De Fries, R. S., Ravilious, C., May, I., Blyth, S., Kapos, V., Gordon, J. E.** (2006). A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography*. **33** (3): 491-505.
- Montes-Correa, A., Jiménez, J. D., Vergara, D., Ávila, Y., Saboyá, L., Renjifo, J. M.** (2015). Herpetofauna del campus de la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia. *Revista de Biodiversidad Neotropical*. **5** (1): 54-63.
- Montes De Oca, E. & Halffter, G.** (1995). Daily and seasonal activities of a guild of the coprophagous, burrowing beetle (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) in tropical grassland. *Tropical Zoology*. **8**: 159-180.
- Murphy, P. G. & Lugo, A. E.** (1986). Ecology of tropical dry forest. *Annals Review of Ecology and Systematics*. **17**: 67-68.
- Navarro, I. L., Roman, A. K., Gómez, F. H., Pérez, H. A.** (2011). Listado de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de la Serranía de Coraza, Sucre (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. **3** (2): 262-268.
- Nichols E., Larsen, T., Spector, S., Davis, A. L., Escobar, F., Favila, M., Vulinec, K., The Scarabaeinae Research Network.** (2007). Global dung beetle response to tropical forest modification and fragmentation: A quantitative literature review and meta-analysis. *Biological Conservation*. **137** (1): 1-19.
- Noriega, J. A.** (2015). How a locality can have so many species? A case study with dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) in a tropical rain forest in Colombia. 175-204 pp. In: *Beetles: Biodiversity, ecology and role in the environment*. C. Stack (Ed.), Nova Science Publishers, Inc. 264 p.
- Noriega, J. A. & Fagua, G.** (2009). Monitoreo de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) en la región neotropical. En: A. Acosta, G. Fagua, A.M. Zapata (Eds.). *Técnicas de campo en ambientes tropicales: Manual para el monitoreo en ecosistemas acuáticos y artrópodos terrestres*. Unidad de Ecología y Sistemática – UNESIS, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 215 p.
- Noriega, J. A., Solís, C., Escobar, F., Realpe, E.** (2007). Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) de la provincia de la Sierra Nevada de Santa Marta. *Biota Colombiana* **8** (1): 77-86.
- Noriega, J. A., Renjifo, J. M., Vaz-de-Mello, F.** (2008). First report of the genus *Tetramereia* Klages, 1907 (Coleoptera: Scarabaeidae: Phanaeini) in Colombia – notes to its distribution. *Biota Colombiana*. **9** (1): 131-133.
- Noriega, J. A., Moreno, J., Otavo, S.** (2011). Quince años del arribo del escarabajo coprófago *Digitonthophagus gazella* (Fabricius, 1787) (Coleoptera: Scarabaeidae) a Colombia: proceso de invasión y posibles efectos de su establecimiento. *Biota Colombiana*. **12** (2): 35-44.
- Noriega, J. A., Solís, C., García, H., Murillo-Ramos, L., Renjifo, J. M., Olarte, J. E.** (2013). Sinopsis de los escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) del Caribe colombiano. *Caldasia*. **35** (2): 465-477.
- Otavo, S., Parrado-Rosselli, A., Noriega, J. A.** (2013). Superfamilia Scarabaeoidea (Insecta: Coleoptera) como elemento bioindicador de perturbación antropogénica en un parque nacional amazónico. *Revista de Biología Tropical*. **61** (2): 735-752.
- Pizano, C. & García, H.** (2014). El bosque seco tropical en Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D.C., Colombia. 353 p.
- Prado, D. E. & Gibbs, P. E.** (1993). Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **80**: 902-927.

- Prance, G. T.** (2006). Tropical savannas and seasonally dry forests: An introduction. *Journal of Biogeography*. **33**: 385-386.
- Pulido, L. A., Medina, C. A., Riveros, R. A.** (2007). Nuevos registros de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) para la región Andina de Colombia. Parte I. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. **31** (119): 305-310.
- Quintero, I. & Halffter, G.** (2009). Temporal changes in a community of dung beetles (Insecta: Coleoptera: Scarabaeinae) resulting from the modification and fragmentation of tropical rain forest. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.). **25** (3): 625-649.
- Rangel, O. & Garzón, A.** (1995). Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia). Cap. 10. 155-170 pp. En: Rangel, O. (Ed.). *Colombia Diversidad Biótica I*. Instituto de Ciencias Naturales. 442 p.
- Rivera, C. & Wolff, M.** (2007). *Digitonthophagus gazella* (Coleoptera: Scarabaeidae): distribución en América y dos nuevos registros para Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. **33** (2): 190-192.
- Rojano, K. & España, C.** (2013). Composición y estructura vegetal presente en la parcela permanente del campus de la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia. Trabajo de grado. Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena.
- Shahabuddin, C., Shulze, H., Tschardtke, T.** (2005). Changes of dung beetle communities from rainforests towards agroforestry systems and annual cultures. *Biodiversity and Conservation*. **14**: 863-877.
- Solís, A. & Kohlmann, B.** (2002). El género *Canthon* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Costa Rica. *Giornale Italiano di Entomologia*. **10**: 1-68.
- Solís, A. & Kohlmann, B.** (2004). El género *Canthidium* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Costa Rica. *Giornale Italiano di Entomologia*. **52** (11): 1-73.
- Solís, A. & Kohlmann, B.** (2013). El género *Uroxys* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Costa Rica. *Giornale Italiano di Entomologia*. **13** (58): 289-340.
- Solís C., Noriega, J. A., Herrera, G.** (2011). Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en tres bosques secos del departamento del Atlántico-Colombia. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*. **12** (1): 33-41.
- Strewe R., Villa, C., Alzate, J., Beltrán, J., Moya, J., Navarro, C., Utría, G.** (2009). Las aves del campus de la Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia. *Revista Intropica*. **4**: 79-91.
- Torrijos, P. & Cuadrado, B.** (2008). Inventario florístico de la granja de la Universidad del Magdalena. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena. 18 p.
- UNESCO.** (1973). International classification and mapping of vegetation. Ecology and conservation publication, No. 6. Unesco, Paris. 93 p.
- Vaz-De-Mello, F. Z., Edmonds, W. D., Ocampo, F. C., Schoolmeesters P.** (2011). A multilingual key to the genera and subgenera of the subfamily Scarabaeinae of the New World (Coleoptera: Scarabaeidae). *Zootaxa*. **2854**: 1-73.

Stenorhynchosaurus munozi, gen. et sp. nov. a new pliosaurid from the Upper Barremian (Lower Cretaceous) of Villa de Leiva, Colombia, South America

María Eurídice Páramo-Fonseca^{1*}, Marcela Gómez-Pérez², Leslie F. Noé², Fernando Etayo-Serna³

¹Departamento de Geociencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

²Departamento de Geociencias, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

³Servicio Geológico Colombiano, Bogotá, Colombia

Abstract

From one of the most complete Lower Cretaceous rock sequences in the world (in Villa de Leiva region, central Colombia), we describe a new genus and species of pliosaurid plesiosaur *Stenorhynchosaurus munozi*. *Stenorhynchosaurus* displays a series of features which differentiate it from all the other Cretaceous pliosaurid genera: the anterior of the vomer, in ventral view, posterior of the palatal premaxilla-maxilla suture, contacting the posterior palatal process of the premaxilla level with the third maxillary alveoli; rostrum narrow and elongated with straight sides in dorsal view; lacrimal forming the anterior border and greater part of the ventral border of the orbit and broadly borders the maxilla anteriorly; anterior interpterygoid vacuity present; internal nares located between vomer and maxilla at the level of 13th-15th maxillary alveoli; anterior of rostrum and mandible without lateral expansion or marked increase in size of the functional alveoli; penultimate premaxillary alveolus slightly larger than adjacent premaxillary alveoli; homodont maxillary functional alveoli, with fourth tooth positions very slightly enlarged with respect to the neighboring alveoli; homodont dentary dentition; and epipodials extremely short. Based on morphological analysis of phylogenetic characters, *Stenorhynchosaurus* most likely nests within the increasingly inclusive Pliosauridae and Pliosauroidae, however, as currently defined, firm inference for referral of *Stenorhynchosaurus* to Thalassophonea is much more problematic, but ultimately seems likely based on characters shared with *Pliosaurus* and Brachaucheninae. However, this uncertainty indicates Thalassophonea requires rigorous redefinition. As to whether *Stenorhynchosaurus* is a member of the currently exclusively Jurassic genus *Pliosaurus*, or the Cretaceous sub-family Brachaucheninae, remains equivocal.

Key words: Pliosauridae, Barremian, Lower Cretaceous, Colombia.

***Stenorhynchosaurus munozi*, gen. et sp. nov. un pliosaurido nuevo del barremiano superior (Cretácico Inferior) de Villa de Leiva, Colombia, Suramérica**

Resumen

Se describe un nuevo género y especie de pliosáurido, *Stenorhynchosaurus munozi*, procedente de una de las secuencias de rocas del Cretácico Inferior más completas del mundo (en la región de Villa de Leiva, centro de Colombia). *Stenorhynchosaurus* exhibe una serie de características que lo diferencian de los demás géneros de pliosáuridos cretácicos: extremo anterior del vómer en vista ventral en posición posterior a la sutura palatal premaxilar-maxilar, contactando al proceso palatal del premaxilar al nivel del tercer alveolo maxilar; rostro angosto y alargado con lados rectos en vista dorsal; lagrimal formando el borde anterior y gran parte del borde ventral de la órbita y limitando ampliamente el maxilar anteriormente; cavidad inter-pterigoidea presente; narinas internas ubicadas entre el vómer y el maxilar, al nivel de los alvéolos 13 y 15; parte anterior del rostro y de la mandíbula sin expansión lateral o incremento marcado en el tamaño de los alvéolos funcionales; penúltimo alvéolo premaxilar ligeramente más grande que los adyacentes; alvéolos funcionales maxilares homodontes, el cuarto apenas más grande que los adyacentes; dentición dentaria homodonte; y epipodios extremadamente cortos. Con base en un análisis de caracteres filogenéticos, *Stenorhynchosaurus* corresponde con mayor seguridad a los cada vez más incluyentes Pliosauridae and Pliosauroidae, mientras la inferencia para referir *Stenorhynchosaurus* a Thalassophonea es más problemática, pero finalmente parece probable basada en caracteres compartidos con *Pliosaurus* y Brachaucheninae. Esta incertidumbre indica que Thalassophonea requiere de una redefinición rigurosa. Decir si *Stenorhynchosaurus* es un miembro del género *Pliosaurus*, por ahora exclusivamente jurásico, o de la subfamilia Brachaucheninae, es equívoco.

Palabras clave: pliosauridae, Barremiano, Cretácico Inferior, Colombia.

Introduction

Worldwide, pliosaurids from the Lower Cretaceous are poorly represented in the fossil record. The Lower Cretaceous Paja Formation of Colombia (Hauterivian to Upper Aptian (**Etayo-Serna**, 1968) preserves a diverse fauna including pliosaurid plesiosaurs. In particular, the region of central Colombia around the town of Villa de Leiva preserves an exceptionally rich vertebrate fauna (**Welles**, 1962; **Etayo Serna**, 1968; **Goñi y Gasparini**, 1983; **De la Fuente y Goñi**, 1983; **Hampe**, 1992; **Páramo**, 1997; **Cadena & Parham**, 2015), including the holotype of *Kronosaurus boyacensis* **Hampe**, 1992. A second pliosaurid specimen (**Hampe**, 2005), currently referred to *Brauchauchenius* sp., is the subject of this contribution. As detailed here, this second specimen (VL17052004-1) represents a new genus and species, for which the name *Stenorhynchosaurus munozi*, gen. et sp. nov. is here proposed. Additional pliosaurid specimens from the Paja Formation, some representing new genera and/or species, await formal description.

The aims of this study are to present a detailed description and comparative analysis of the principal morphological characteristics of *Stenorhynchosaurus*, which represents only the second Lower Cretaceous pliosaurid to be formerly described from the Villa de Leiva region of central Colombia. The holotype of *Stenorhynchosaurus* is well-preserved and substantially complete, and is thus of great significance for the global understanding of Lower Cretaceous pliosaurids, for the fossil heritage of northern South America, for our understanding of the fauna in the seas surrounding the dispersing continent of Gondwana, and for the Villa de Leiva region as a source of marine reptiles. This study indicates the Villa de Leiva region is a highly significant source area for marine vertebrate fossils, and a unique source of information for understanding the evolutionary history of Lower Cretaceous pliosaurids.

Discovery, geological setting and stratigraphy

In 2000, fragments of the anterior of a snout of a marine reptile were discovered in Barremian stage strata during excavation of a small dam on the property of Mr Jorge Muñoz, in the town of Villa de Leiva, central Colombia. The discovery was reported to the local authorities, who requested staff from the Museo Geológico José Royo y Gómez of the Colombian Geological Survey, INGEOMINAS (currently the Servicio Geológico Colombiano or SGC) to investigate. The excavation of the fossil was undertaken in 2004-2005, in collaboration with the Fundación Colombiana de Geobiología. During the excavation the skeleton was carefully documented *in situ*, and then extracted and transferred to the paleontological collections of the Servicio

Geológico Colombiano in Bogotá, and registered under the number VL17052004-1. Subsequently, the skull was chemically prepared by the Fundación Colombiana de Geobiología. The collection and preparation of VL17052004-1 revealed a substantially complete, articulated pliosaurid skeleton lacking only the anterior of the rostrum, elements of the left anterior paddle, the right posterior paddle and the tail.

The pliosaurid VL17052004-1 was found at Loma La Cabrera, west of the town of Villa de Leiva (Figure 1S, <http://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/239/1249>) where the Lower Cretaceous Paja Formation is well exposed. The skeletal remains were found in 'Segmento C' (**Etayo Serna**, 1968) of the Arcillolitas Abigarradas Member of the Paja Formation (Figure 2S, <http://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/239/1250>), which is interpreted to have been deposited in an intertidal marine complex (**Forero & Sarmiento**, 1985), an unusual depositional environment in which to find pliosaurid remains. The skeleton was found articulated in a variegated kaolinitic claystone (Light Brownish Gray 5YR6/1, Light Greenish Gray 5GY8/1 and Light Gray N7 (**Rock-Color Chart Committee**, 1963)) 0.6 m above a thin bed of argillaceous limestone with large, rusty-colored calcareous concretions (Moderate Reddish Brown 10R 4/6) that were up to 1 m in diameter and which show mud-cracked surfaces (Figure 3S, <http://www.racefyn.co/index.php/racefyn/article/downloadSuppFile/239/1251>). Several ammonites were recovered from one of these concretions (SGC registered numbers MP-110804/1 and MP-250604/2a, b, c). One additional ammonite body fossil (MP-110804/2), along with several ammonite impressions from which latex moulds were made (MP-171108/1-5), were recovered from within the pliosaurid skull which was partly filled with fine calcareous matrix. Ammonite specimens and moulds are preserved in the collections of the Servicio Geológico Colombiano (SGC), Bogotá, Colombia.

Biostratigraphic context

The taxonomic identification of ammonite genera and species within the family Pulchelliidae Douvillé, 1890 follows **Vermeulen** (2003). According to **Vermeulen** (2003), the genus *Gerhardtia* **Hyatt**, 1903 includes the species *G. sartousiana* (**D'Orbigny**, 1841), *G. provincialis* (**D'Orbigny**, 1850), and *G. galeatoides* (**Karsten**, 1856). Only the latter two species have been documented from the Villa de Leiva region under different specific names (**Vermeulen**, 2003; **Vermeulen & Klein**, 2006).

In the biostratigraphic zonation of the Barremian stage around Villa de Leiva, based on the family Pulchelliidae (**Bürgl**, 1956), *Gerhardtia* **Hyatt**, 1903 is treated as a subgenus of *Heinzia* **Sayn**, 1890. A similar taxonomic approach is followed by **Patarroyo** (2004). **Bürgl** stated: '*Heinzia* (*Gerhardtia*) is restricted in Colombia to the upper

*Corresponding author:

María Eurídice Páramo-Fonseca, meparamof@unal.edu.co

Received: June 5, 2015

Accepted: January 15, 2016

part of the middle Barremian' (translated from **Bürgl**, 1956). The Barremian ammonite zonation proposed by **Patarroyo** (2000, 2004) for the Villa de Leiva region includes the '*Heinzia* (*Gerhardtia*) *veleziensis* Zone' which represents the lowest zone of the Colombian upper Barremian. However, **Vermeulen** (2003) synonymized *Heinzia* (*Gerhardtia*) *veleziensis* (**Hyatt**, 1903) and *Heinzia* (*Heinzia*) *colleti* **Bürgl**, 1956 with *Gerhardtia galeatoides*, and considered *Carstenia lindigii* (**Karsten**, 1856) as a synonym of *Gerhardtia provincialis*.

In the '*Heinzia* (*Gerhardtia*) *veleziensis*-Zone', the ammonite assemblages recorded at Loma La Yesera and Loma de Monsalve in the Villa de Leiva region by **Patarroyo** (2000), contain the same species as those mentioned by **Etayo Serna** (1968), from a section in Loma la Cabrera, near where the pliosaurid was discovered. **Hampe** (2005: p. 38) referring to the pliosaurid discussed here wrote: "the age of the specimen [VL17052004-1] can be determined from numerous finds of the ammonite *Heinzia* sp. which are late Barremian in age (**Patarroyo**, 2000)".

In situ ammonites from the mudcracked argillaceous limestone 0.6 m below the pliosaurid skeleton are well-preserved internal moulds with rusty-colored weathering on their exposed surfaces; they are identified as *G. galeatoides* (**Karsten**, 1856) (MP-250604/2a, c) (Figure 4S a, b and c, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/239/1252>), and *G. provincialis* (**D'Orbigny**, 1850) (MP-110804/1, MP-110804/3, MP-250604/2b) (Figure 4S d, e, f and g). The ammonite body fossil (MP-110804/2), and specimens now preserved as latex casts (MP-171108/1, 2) (Figure 4S h, i and j) recovered from the calcareous infilling of the pliosaurid skull are identified as *G. galeatoides* (**Karsten**, 1856) [ammonite determinations undertaken by F.E.-S.].

The ammonite zonation of the French Barremian (**Vermeulen**, 2003) has in part has been adopted by the IUGS (**Reboulet & Hoedemaeker**, 2006; **Reboulet, et al.**, 2014), and was used here to estimate the age of the pliosaurid bearing beds. The two ammonite species *G. galeatoides* and *G. provincialis*, collected both below and within the skull of the pliosaurid, permits recognition of the *Gerhardtia provincialis* Subzone of the *Gerhardtia sartousiana* Zone of the lower part of the upper Barremian (i.e. early late Barremian) of the scheme adopted by the IUGS (**Reboulet & Hoedemaeker**, 2006; **Reboulet, et al.**, 2014).

Nomenclatural acts

This publication, including the electronic version, conforms to the requirements of the current International Code of Zoological Nomenclature (ICZN), with the new taxon available under the Code from the date of publication. This publication, and the nomenclatural act contained herein, has been registered in ZooBank, the ICZN online registration system for new taxa. The ZooBank Life Science

Identifier (LSID) for this publication is urn:lsid:zoobank.org:pub:7CBB6FCD-5242-4A49-B489-3425D54264AE and the LSIDs for the new taxon are given under the Systematic paleontology section (below); all LSIDs can be viewed online at <http://zoobank.org/>.

Systematic paleontology

SAUROPTERIGIA **Owen**, 1860

PLESIOSAURIA de **Blainville**, 1835

PLIOSAUROIDEA **Welles**, 1943

PLIOSAURIDAE **Seeley**, 1874

Stenorhynchosaurus gen. nov.

urn:lsid:zoobank.org:act:558CC1C6-D0EF-4E84-9A35-233B97A60E7A

Type and only species: *Stenorhynchosaurus munozi*, sp. nov.

Type Locality: Loma La Cabrera, Villa de Leiva, Boyacá, Colombia; global coordinates: 05° 39' 13" N 73° 33' 53" W (Figure 1S).

Stratigraphical horizon: Arcillolitas Abigarradas Member, Paja Formation. Lower part of the Upper Barremian, Lower Cretaceous (Figure 2S).

Derivation of name: Greek *Stenos*, narrow; *Rhyncho*, snout; and *Saurus*, lizard.

Diagnosis: As for type and only known species.

Stenorhynchosaurus munozi sp. nov.

urn:lsid:zoobank.org:act:361CC851-5B23-4D8B-8211-73D6F6BA941E

Holotype: VL17052004-1, a nearly complete pliosaurid skeleton, lacking fragments of the left anterior paddle, the right posterior paddle and the tail (Figure 1). The specimen repository is the paleontological collections of the Museo Geológico José Royo y Gómez, Servicio Geológico Colombiano (SGC).

Derivation of name: The specific name *S. munozi* is proposed in honor of Jorge Muñoz who discovered and reported the find of the pliosaurid on his land, and handed VL17052004-1 to the collections of the Museo Geológico José Royo y Gómez, Servicio Geológico Colombiano.

Diagnosis: The pliosaurid *Stenorhynchosaurus munozi* (VL17052004-1) distinguished from all other pliosaurids in having in ventral view the anterior end of the vomer posterior of the palatal premaxilla-maxilla suture (at the level of the second maxillary alveolus) and contacting ventrally the posterior palatal process of the premaxilla at the level of the third maxillary alveolus, together with the following unique combination of characters: narrow rostrum elongated, with practically straight sides in dorsal view; lacrimal forms the anterior border and greater part

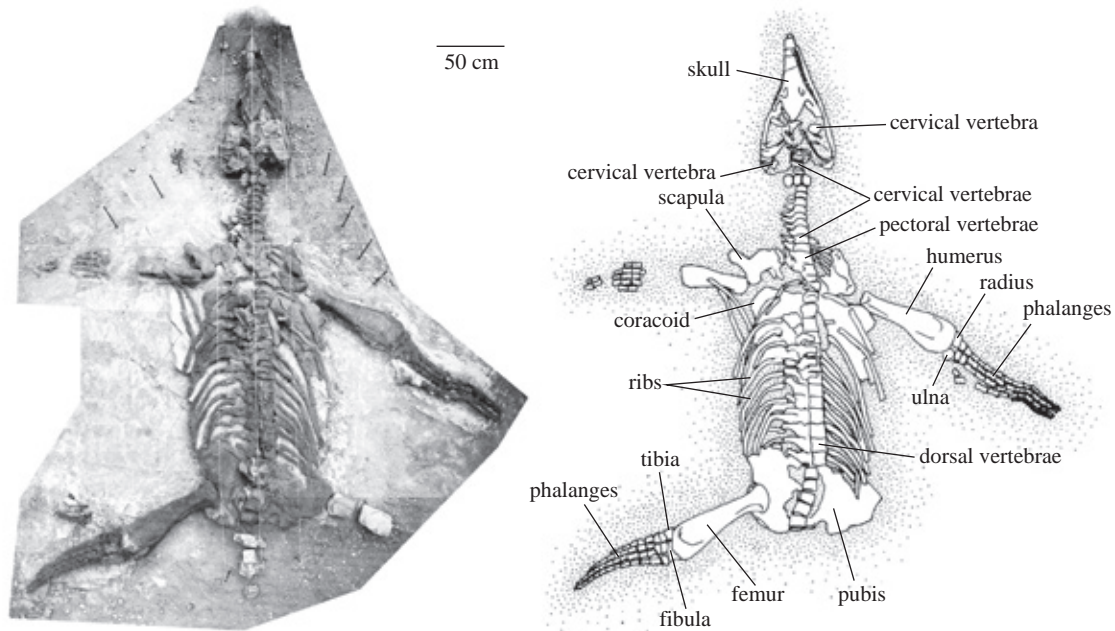


Figure 1. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. General view of the specimen in dorsal view. Photography in the field and interpretation of the skeleton.

of the ventral border of the orbit and broadly borders the maxilla anteriorly; anterior interpterygoid vacuity present; internal nares located between vomer and maxilla at the level of 13th-15th maxillary alveoli; anterior of rostrum and mandible without lateral expansion or marked increase in size of the functional alveoli; penultimate premaxillary alveolus slightly larger than adjacent premaxillary alveoli; at least 29, approximately homodont maxillary functional alveoli, with the fourth tooth positions very slightly enlarged with respect to the neighbouring alveoli; 32 to 34 approximately homodont dentary tooth positions; at least 17 cervical vertebrae, counting the absent atlas-axis complex as two vertebrae; cervical vertebrae with a single costal facet that extends anteroposteriorly almost along the full length of the vertebral body (but possibly an ontogenetic feature); epipodials extremely short.

Ontogenetic stage: We interpret *Stenorhynchosaurus munozi* (VL17052004-1) as a juvenile individual of the new pliosaurid genus *Stenorhynchosaurus*. The interpretation of juvenile characteristics is based on those proposed by **Brown** (1981) for plesiosaurian (long-necked) plesiosaurs as indicative of ontogenetic state, which include: the fully formed teeth that do not exhibit noticeable striations on the enamelled crown, whereas the crowns of replacement teeth exhibit enamel ridges which are not particularly prominent; articular facets of the vertebral centra gently concave, or almost flat; ribs on cervical centra unfused; ventral process of the scapulae separated; absence of a pectoral bar; undifferentiated capitulum and tuberosity or trochanter.

In addition, there are several additional traits that suggest a juvenile ontogenetic stage for *Stenorhynchosaurus*, which include an unsutured union between the majority of skull bones, including: the palatal union of the pterygoids between the anterior and posterior interpterygoid vacuities which is not sutured; the parasphenoid not sutured to the pterygoids anteriorly; the mandibular symphysis widely open, and with an especially large post symphyseal vacuity (see description). In addition, the neurocentral joint between cervical and dorsal vertebral centra and neural arches are not sutured; girdle bones articular facets are rounded and not well-marked.

Description

Preservation. The skeleton of *Stenorhynchosaurus munozi* (VL17052004-1) (Figure 1) is substantially complete, only lacking the anterior of the snout, elements of the left anterior paddle, the entire right posterior paddle and the tail; representative measurements of *Stenorhynchosaurus* are presented in Tables 1 and 2. The skeleton was found articulated, lying dorsal surface uppermost with the paddles laterally spread. The posterodorsal region of the cranium is crushed, some ribs are displaced from their original positions, and the neural arches are crushed down onto the vertebral column and adjacent elements. These taphonomic modifications to the skeleton seem to be the consequence of pre-burial (biostratinomic) processes. There is no evidence for predation or post-mortem scavenging of the carcass. Few elements of the right hind paddle and the tail were found separated from the skeleton by a short distance. On the base of the litological characteristics of the sediments,

Table 1. General measurements (in centimetres) taken on the preserved material.

General length of the specimen at the middle line	390
Total length of the skull at the middle line	113
Total length of the skull to the posterior border of quadrates	136
Width of the skull at the anterior border of the orbits	30
Width of the skull at the external borders of the base of quadrates	58
Width between the two orbits (at the anterior border of orbits)	18
Length between posterior border of the external naris and anterior border of the orbit	4
Length between internal naris and external naris	7.5
Width between external nares	9.5
Length of the external naris	9.5
Width of the external naris	4.5
Length of the anterior paddle	148
Length of the posterior paddle	157.5
Length of the humerus	66.5
Length of the femur	81
Maximal length of the coracoid	54
Maximal width of the coracoid	36
Maximal length of the pubis	55
Maximal width of the pubis	38

Table 2. Dimensions (in millimetres) of some vertebral centra from the articulated series.

Articulated centra	Length	Height	Width
1 st	44	70-74 (by deformation)	90
2 nd	45	75	100
6 th	42	72	92
11 th	44	73	95
Separated cervical centrum	40	75	95
Separated cervical centrum	45	?	90
18 th	70	75	98
27 th	73	?	100
30 th	80	?	100
36 th	70	83	100

a paleochannel is interpreted to have washed away these elements. The anterior of the snout was broken and lost when the fossil was discovered. Besides these taphonomic modifications previously described the bones generally exhibit a good state of preservation.

Skull (Figures 1 to 6 and figura 5S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/239/1253>) The skull lacks the anterior of the snout (i.e. both the upper and lower jaws) and most of the posterior skull roof. The pre-orbital rostrum of the cranium as preserved is considerably elongated and somewhat posteriorly expanded

producing a triangular shape to the cranium in dorsal view; the rostrum is straight sided in lateral and dorsal views. The total length of the skull as preserved is two and a half times the width between the quadrates. The external nares lie at approximately the middle (anteroposteriorly) of the skull, 470 mm from the occipital condyle, and 560 mm from the posterior borders of quadrates; they are large and situated closely anterior to the orbits. The bones of the posterodorsal region of the skull are broken and poorly preserved, so the outline of the orbits and temporal fenestrae cannot be established with certainty.

Each premaxilla is incomplete and runs posteriorly along the dorsal surface of the snout forming a narrow bar between the maxilla and frontal. Anteriorly, the premaxilla-maxilla suture interdigitates deeply as it rises up the lateral surface of the snout, and more posteriorly smooths to delineate the lateral border of the premaxilla facial process. The posterior limits of the premaxillae are unclear on both sides of the skull due to poor preservation. Various foramina open on the anterior, external surface of the premaxillae laterally. A diastema of 30 mm in length separates the third and fourth preserved functional alveoli; the diastema is crossed by the premaxilla-maxilla suture. On the palatal surface the premaxilla exhibits a long palatal process that extends posteriorly of the diastema, to level with the third maxillary functional alveoli. Dorsally, the palatal processes of premaxillae are separated ('deep') by an anterior prolongation of the vomers that runs anteriorly at least to the level of the second maxillary functional alveoli (Figures 4 c and d). The premaxilla palatal processes thereby anatomically underlap the ventral surface of the anterior of the vomers as in *Liopleurodon* (Noé, 2001) and most probably all pliosauids.

The maxilla forms the lateral surface of the pre-orbital rostrum dorsally; the anterior, ventral, and dorsal borders of the external naris, as is typical of the Brachaucheninae (Williston, 1907; Schumacher, *et al.*, 2013); and extends posteriorly to form the ventral border of the orbit. The maxilla exhibits various foramina on the lateral surface, with three larger foramina aligned over the alveolar border anterior of the orbit. Ventrally the maxilla houses the posterior upper dentition, with the alveolar row bounded medially by a longitudinal ridge. Between this ridge and the palate is a marked longitudinal groove which contained the dental lamina in life, and where the posteromedially positioned replacement teeth are lodged. Medial to the middle of the fifth pair of maxillary functional alveoli there is a small rounded pit bordering the maxilla-vomer suture (Figures 4 c and d).

The dorsal surface and sutural contacts of the frontal are not well-preserved (Figure 2). There is no possible to establish the presence of an independent nasal. Lateral to the frontal, there are distinct bone textures that suggest the presence of a prefrontal and postfrontal, the limits of which cannot be established with certainty. However, the frontal appears to

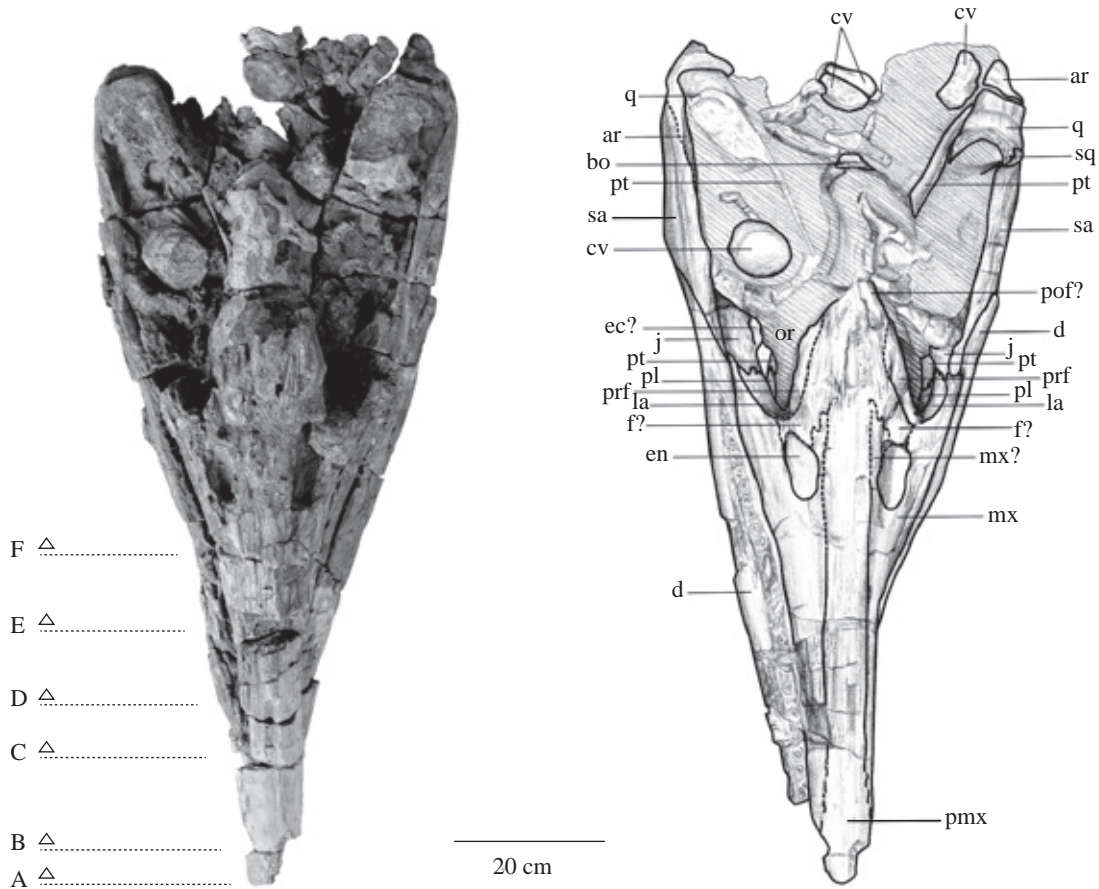


Figure 2. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. Skull, dorsal view; A to F: snout cross sections represented in Figure 5. Abbreviations: ar, articular; bo, basioccipital; cv, cervical vertebra; d, dentary; ec, ectopterygoid; en, external naris; f, frontal; j, jugal; la, lacrimal; mx, maxilla; or, orbit; pl, palatine; pmx, premaxilla; pof, postfrontal; prf, prefrontal; pt, pterygoid; q, quadrate; sq, squamosal.

be excluded from the orbital margin by the prefrontal and postfrontal. The posterior of the parietal and the majority of the squamosal are not preserved, and the pineal foramen cannot be identified. On the right of the skull the bones forming the anterior of the orbit are preserved. The lacrimal forms the anteroventral border of the orbit and the palatine the floor of the orbit (Figure 3). Along the posterior of the ventral margin of the orbit, the posterior of the lacrimal contacts the anterior of the jugal (Figure 3), however, the bones forming the remainder of the posterior of the orbital rim are broken and cannot be distinguished. The damage to this region of the skull does not allow confident reconstruction of the form of the rear of the orbit or the temporal fenestra.

The palate (Figure 4) is well exposed, although posteriorly it is partly obscured by the well-preserved hyoids. The palate exhibits two interpterygoid vacuities: the anterior interpterygoid vacuity is lanceolate with a pointed anterior and a more rounded posterior margin; the posterior interpterygoid vacuity is more rounded with a slightly pointed anterior end, and is divided longitudinally by the parasphenoid, as is usual in pliosaurids (Andrews, 1910,

1913). The two interpterygoid vacuities are connected by the unfused junction between the pterygoids, an indication of the juvenile status for *Stenorhynchosaurus*.

The conjoined vomers run medially between the premaxillae anteriorly and the maxillae posteriorly. In ventral view they extend from level with the second maxillary functional alveoli to form the anterior margins of the anterior interpterygoid vacuity posteriorly. In ventral view the anterior of the vomers lies posterior to the diastema, which is crossed by the premaxilla-maxilla suture. Anteriorly, the vomers are fused into an elongated bar that sends a very narrow process anterodorsally over the medial line of the premaxillae to a level with the ultimate premaxillary functional alveoli (Figure 5 b). Posterior of the ninth maxillary functional alveoli, the vomers widen and exhibit a clear median suture, an indication of the juvenile ontogenetic status of the specimen. The midline vomer suture runs for a short distance more anteriorly on the dorsal ('deep') surface than can be observed on the palatal surface (Figure 5 b). The lateral borders of the vomers, level with the 13th to 15th maxillary functional alveoli, form the medial margins of the

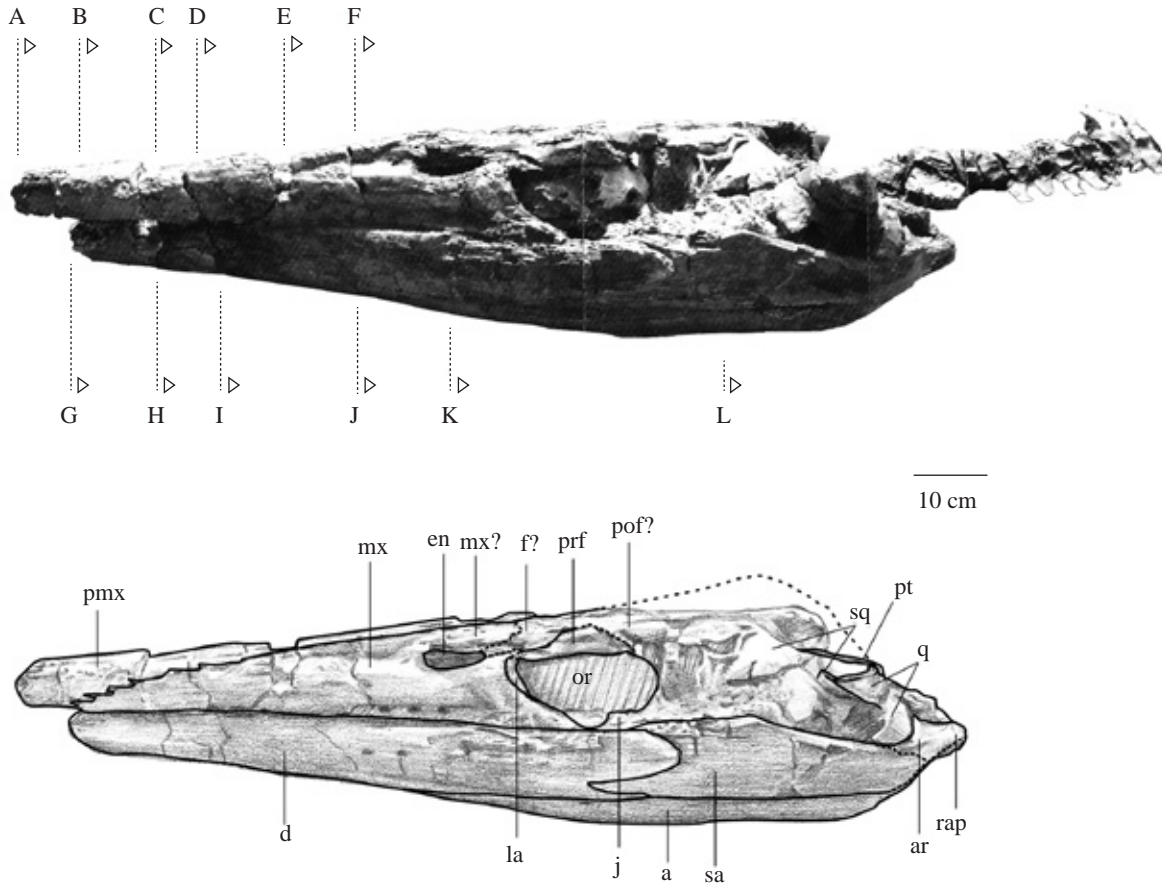


Figure 3. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. Skull in left lateral view; A to F: snout cross sections represented in Figure 5; G to L: mandible cross sections represented in Figure 6. Abbreviations: a, angular; ar, articular; d, dentary; en, external naris; f, frontal; j, jugal; la, lacrimal; mx, maxilla; pmx, premaxilla; pof, postfrontal; prf, prefrontal; pt, pterygoid; q, quadrate; rap, retroarticular process; sa, surangular; sq, squamosal.

internal nares, the lateral margins formed by the maxillae. The posterior of the vomers is separated medially by the pointed anterior margin of the interpterygoid vacuity, and more laterally are overlain by a pointed prolongation of the pterygoid. Still further laterally the vomer contacts the palatine in an interdigitating suture, with the posteriormost projection of the suture bordering a small palatine opening (Figures 4 b and c).

Several natural breaks across the snout of *Stenorhynchosaurus* show the internal morphology of the rostrum (Figure 5). A large rostral cavity can be observed similar to those in *Libonectes morgani* (Carpenter, 1997), *Rhomaleosaurus megacephalus* (now *Atychodracon megacephalus* Smith, 2015) (Cruickshank, 1994) and other pliosaurids (Buchy, et al., 2006). In *Stenorhynchosaurus*, immediately posterior to the internal nares, a dorsal vomeropalatine process is present (Figure 5 f), in agreement with Cruickshank, et al. (1991), but in contrast to Buchy, et al. (2006).

Both palatines are incomplete. The right palatine is well-exposed, but the posterior is not preserved (Figure 4 c). Each palatine exhibits an elongated rectangular shape,

bordered medially by the pterygoid, laterally by the maxilla and anteriorly by the vomer. The palatine does not reach the margin of the internal naris on the palatal surface. Anteromedially the palatine has a process contacting, and lying ventral to the vomer for a short distance. Two small foramina perforate the palatal surface of each palatine: one lying on the posteriormost extent of the vomer-palatine suture; the other located more posteromedially along the suture with the pterygoid level with the posterior of the anterior interpterygoid vacuity. The posteromedial contact of the palatine with the anterior ramus of the pterygoid runs in an arc laterally and interdigitates considerably. Laterally, the suture with the maxilla forms an almost straight, but continuously interdigitating line.

The pterygoids form a great proportion of the palatal surface (Figure 4 c). The anterior rami are triangular in shape, sharply-pointed anteriorly, and medially separated by the narrow anterior interpterygoid vacuity. The anterior ramus of the pterygoid contacts the vomer, excluding the palatines from contact along the ventral midline. Medially the pterygoids are united through a slightly open suture between

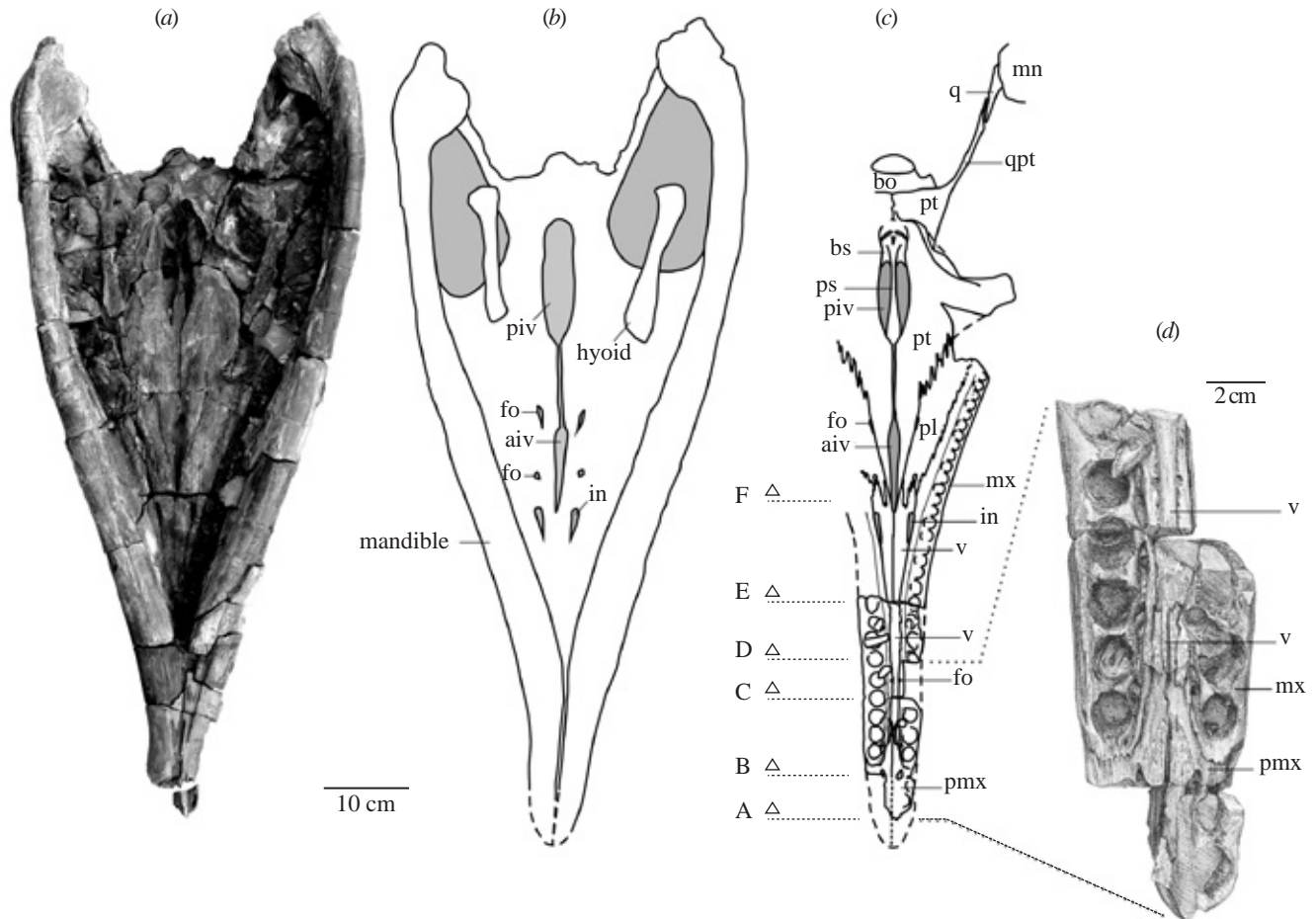


Figure 4. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. *a* and *b*: Skull in palatal view. *c* and *d*: details of the palate without mandibles; A to F: snout cross sections represented in Figure 5. Abbreviations: aiv, anterior interpterygoid vacancy; bo, basioccipital; bs, basisphenoid; fo, foramen; in, internal naris; mn, mandible; mx, maxilla; piv, posterior interpterygoid vacancy; pl, palatine; pmx, premaxilla; ps, parasphenoid; pt, pterygoid; q, quadrate; qpt, quadrate ramus of the pterygoid; v, vomer.

the anterior and posterior interpterygoid vacancies, but are well-sutured beneath the braincase, posterior of the posterior interpterygoid vacancy. Laterally each pterygoid contacts the palatine in an oblique suture that is straight anteriorly but interdigitates posteriorly. The straight anterior part of the pterygoid-palatine suture forms an elongated foramen immediately posterior of the level of the posterior border of the anterior interpterygoid vacancy.

The lateral ramus of the pterygoids is damaged and cannot be completely described. The contact between the pterygoid and ectopterygoid is covered by the hyoid elements on both sides of the palate. The anterior border of the lateral ramus of the pterygoid is broken on both sides of the cranium, suggesting a fragile condition in this region, and which precludes description of the morphology of the ectopterygoid. However, the lateral ramus does bear a prominent crest, the pterygoid flange, bordering its posterior edge that terminates near the midline of the skull just posterior of the posterior interpterygoid vacancies. The pterygoid flange is broken, although it reaches about 70

mm in height in the vicinity of the posterior interpterygoid vacancy. Laterally the ectopterygoid process of the pterygoid curves dorsally. Posterior of the posterior interpterygoid vacancy the pterygoids cover the basioccipital-basisphenoid junction ventrally. Posteriorly the occipital condyle and part of the body of the basioccipital are visible. Each quadrate ramus of the pterygoid is relatively wide beneath the braincase. Posteriorly, the quadrate ramus forms a sub-vertical lamina that extends obliquely laterally from a level anterior of the occipital condyle, the ventrolateral process of the basioccipital and terminates posteriorly in a contact with the medial edge of the quadrate laterally.

Within the posterior interpterygoid vacancy, the anterior of the basisphenoid and a part of the parasphenoid are visible (Figure 4 c). The anterior of the basisphenoid forms the posterior border of the posterior interpterygoid vacancy, which is divided longitudinally by the parasphenoid. The parasphenoid is a narrow, ventrally flattened bar that widens anteriorly. The ventral surface of the parasphenoid is covered anteriorly by the medial union of the pterygoids,

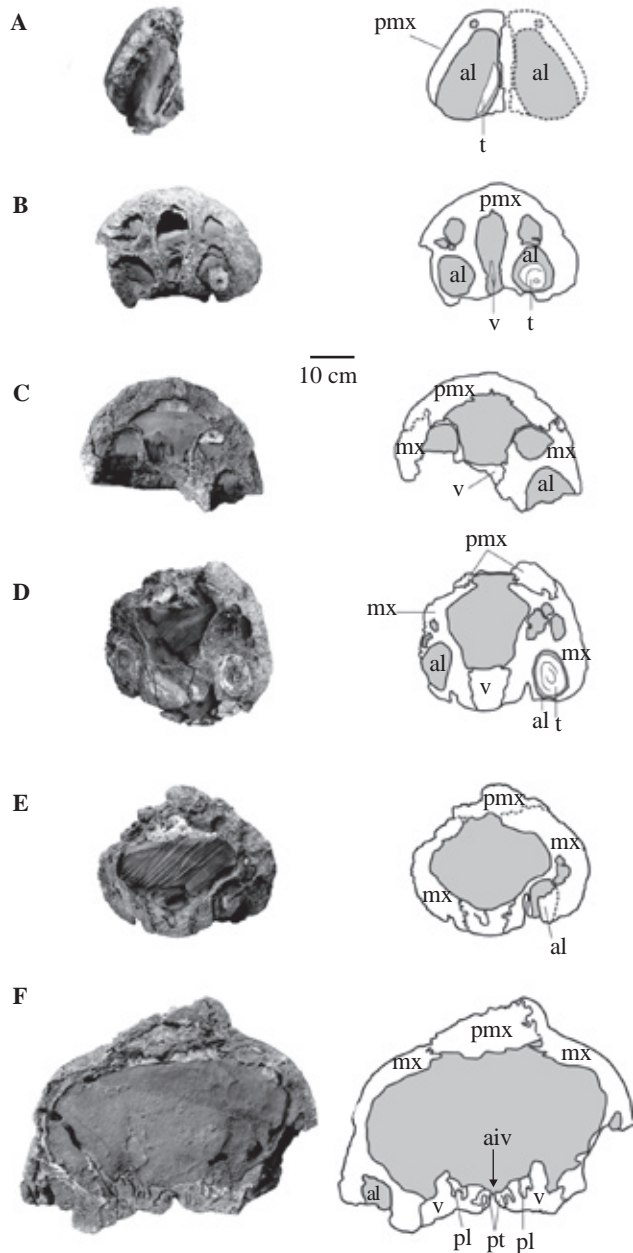


Figure 5. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. Snout cross sections indicated in Figures 2, 3 and 4, looking from anterior view. Abbreviations: aiv, anterior interpterygoid vacuity; al, alveolus; mx, maxilla; pmx, premaxilla; pl, palatine; pt, pterygoid; t, tooth; v, vomer.

however, there is no sutured contact visible between these bones. The basisphenoid-parasphenoid contact is also not visible. It is possible the parasphenoid runs posteriorly along the midline underlying the basisphenoid but without reaching the posterior ramus of the pterygoid. Posteriorly, at the contact with pterygoids, the basisphenoid bears a small median longitudinal crest ventrally. In occipital view the basioccipital exhibits a sub-circular condyle and one of the basioccipital basitubera, which is robust and long. The

dorsal surface of the basioccipital, normally forming the floor of the foramen magnum, and any ventral constricting ring and/or ventral plate are not preserved.

The quadrate has the form of an inclined slightly robust column with a posteriorly convex, semi-circular cross-section, terminating ventrally in a strong, transverse condyle. A few bone fragments found posterior of the basioccipital condyle are not clearly recognizable, but seem to be fragments of the squamosals, paraoccipital processes and atlas-axis complex, displaced from their original positions. One disarticulated and worn cervical centrum and a few cervical rib fragments can also be distinguished. Another poorly preserved cervical centrum is present inside the right temporal fenestra.

Ventrally overlying the palate, and extending slightly obliquely laterally, are two large, stout bones interpreted as hyoid elements. The preserved hyoids are both elongate, approximately 270 mm in length, and vaguely dumb-bell shaped.

Mandible (Figures 3, 4, 6 and 5S). The mandibular rami are preserved slightly offset from their original positions. The right ramus has moved laterally so the alveolar row is visible in dorsal view, and the left ramus has been displaced medially so the tooth row is covered by the rostrum. The mandible is slender in the anterior part and relatively high posteriorly. Anteriorly, along the midline, the two halves of the mandible are not in contact, but are separated by a space of approximately 10 mm dorsally and 3 mm ventrally (Figure 5S). However, the splenial (ventrally) and dentary (dorsally) lie adjacent to one another for a length of 230 mm. This parallel space is thus the unsutured mandibular symphysis, which is normally fused in pliosaurids (e.g. **Andrews, 1913; Noé, 2001; Sassoon, et al., 2012**), the open suture corroborating the inferred juvenile ontogenetic stage of *Stenorhynchosaurus*. Alternatively the unfused mandibular symphysis may be a feature of some or all members of the Brachaucheninae (e.g. **Schumacher, et al. 2013**).

Although the length of the mandibular symphysis remains conjectural, the narrow anterior of the mandible, the presence of the premaxilla-maxilla suture in the rostrum, and the anterior inclination of the first preserved premaxilla functional alveolus, all indicate proximity to the anterior of the snout. Level with the anterior of the splenial there is a slight lateral constriction, indicating a very slightly spatulate anterior termination to the mandible. Mandibular fragments from *Pliosaurus* indicate the symphysis is longer ventrally than dorsally, with a parallel space between the two mandibular rami on the dorsal surface (**Bardet, et al., 1993**), similar to a space observed in *Stenorhynchosaurus*. A large opening occurs in the lingual surface of each mandibular ramus between the splenial and coronoid, opening anteriorly into Meckel's canal (Figures 6 b and d). This opening was probably present in all plesiosaurs and in *Stenorhynchosaurus* is as long as nine dentary functional alveoli; however, the large size is probably an ontogenetic feature.

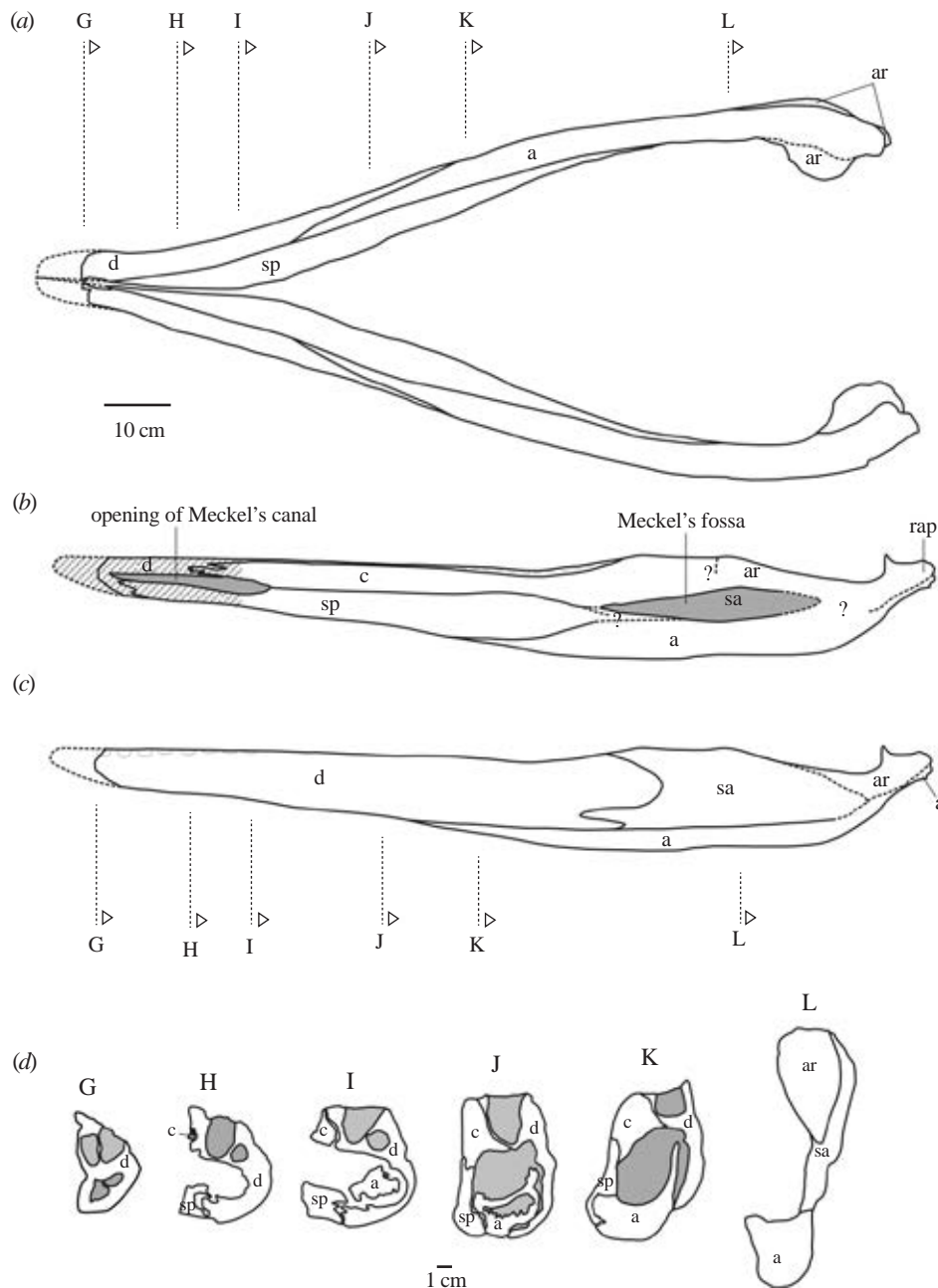


Figure 6. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. Mandible. *a*: in ventral view. *b*: in medial view of the right ramus. *c*: lateral view of the left ramus. *d*: cross sections of the right ramus indicated in *a*, *c* and Figure 3, looking from anterior view. Abbreviations: a, angular; ar, articular; d, dentary; c, coronoid; rap, retroarticular process; sa, surangular; sp, splenial.

The distribution of bones along the mandible, both internally and externally, is revealed by breaks occurring along the length of the mandible (Figure 6 d). These cross-sections illustrate the dentary forming the whole of the symphyseal area anteriorly, and the majority of the lateral surface of the mandible anterior of the coronoid eminence. Medially the splenial forms the floor of the mandibular symphysis posteriorly, and extends posteriorly to the opening of Meckel's canal, ventral to, and contacting the coronoid. Posteriorly, the angular forms progressively more of the

mandibular ramus ventrally, contacting the surangular laterally, and forming the floor of Meckel's canal dorsally (Figure 6 b). Laterally, just anterior of the coronoid process, the dentary joins the surangular posteriorly in a sinusoidal suture. The angular forms more than half of the ventral surface of the mandible posteriorly (Figure 6). The short and dorsally inclined retroarticular process is formed by the articular and angular, but the sutures are not entirely clear. The dorsal surface of the retroarticular process, for attachment of the jaw opening muscles, is rugose.

Teeth and dentition (Figure 5S). The preserved functional teeth are all broken but show a sub-circular cross-section at the level of the base ('root'). Both the maxillary and mandibular teeth diminish in size posteriorly, the anterior teeth measuring 20 to 25 mm in diameter, those at the posterior of the jaw somewhat smaller in diameter. In the premaxilla none of the teeth is completely preserved, however, the posterior tooth in the left premaxilla exhibits a small part of the base and the lowermost part the crown with enamel ridges; the surface of the base is smooth. The maxillae preserve few teeth in situ. In the right maxilla, the seventh functional alveolus contains a nearly complete tooth, lacking only its tip. This tooth has a high base, and marked longitudinal ridges concentrated on the lower part of the enamelled crown. A single, poorly-preserved but unbroken mandibular tooth lies on the dental row at the middle (anteroposteriorly) region of the right mandibular ramus horizontally displaced from its original position. This tooth is slender, 45 mm in length including base and crown, and has a circular cross-section. The crowns of replacement teeth can be seen in the more anterior mandibular and maxillary alveoli (Figure 5S). These tooth crowns are nearly conical having a flat anterior face limited by two slight longitudinal carinae (Figure 5S), one anterolateral the other anteromedial. An additional posterior longitudinal ridge appears toward the apex of the crown forming a trihedral tip of the tooth. The surface of the crown is ornamented with enamel ridges at the base, but smoother at the tip.

An incomplete count of three functional alveoli is preserved in the right premaxilla. The anteriormost functional alveolus preserves an original gentle anterior orientation, suggesting that each premaxilla may not have supported more than four teeth, although the total number of premaxillary teeth remains uncertain. The penultimate preserved functional alveolus, is slightly larger than the other two preserved alveoli. Each maxilla preserves at least 29 functional alveoli, with the fourth maxillary functional alveoli slightly larger. However, this fourth functional alveolus is not sufficiently large to be considered heterodont, so the tooth row can be classed as homodont in character, with slight variation in tooth size along the maxilla. The second functional alveolus is inclined anterolaterally.

In agreement with the form of the rostrum, the mandible exhibits neither lateral expansion nor marked increase in size of the functional alveoli in the anterior of the mandible. At least 10 pairs of functional alveoli are estimated to have lain adjacent to the mandibular symphysis, three anterior to a slight lateral constriction in the mandible (Figure 5S). These functional alveoli are 20 to 25 mm in diameter and are all inclined slightly anterolaterally. There are 28 functional alveoli preserved in the right dentary, although there were probably a total of 32 to 34 teeth in each mandibular ramus according to the missing part of the jaw, previously discussed. Based on the slight lateral inclination

of the functional alveoli, the mandibular teeth would have protruded laterally sufficiently for the tips of the tooth crowns to have passed the lateral margins of the maxillae in life.

Axial skeleton (Figures 1 and 7). The atlas-axis complex is not visible, and the first clear vertebral centrum is well-separated from the basioccipital condyle. The general form of the cervical vertebrae is similar along the neck, except for the positions of the costal facets which rise slightly dorsally up the lateral surface of the more posterior centra. There are thirteen articulated cervical vertebra preserved as three units; all slightly deformed by compression. The third to fifth vertebral centra as preserved lie perpendicular to the neck, with their long axes transverse to the neck suggesting that the neck was broken (Figure 7 a). Two other cervical centra were recovered, one on the left of the post-occipital region and the other inside the right temporal fenestra. Based on the articulated elements and the two isolated vertebrae, the neck of *Stenorhynchosaurus* must have contained at least seventeen cervical vertebrae, including the missing atlas-axis.

Due to lack of preservation, the cervical vertebrae lack their neural arches. The articular facets are slightly concave and wider than high; the cervical vertebrae are also wider than long (Table 2). The second cervical centrum in the first articulated series preserves the right cervical rib articulated, whilst the seventh, and ninth to twelfth centra preserve their left cervical ribs disarticulated and slightly displaced from their original positions. The cervical ribs are dorso-ventrally compressed; distally shorter than proximally; the posterior ones as long as the width of centra, and longer than anterior. The external surfaces of the cervical centra are smooth and show on each lateral surface as a single, trough-like costal facet extending almost the entire length of the vertebral body (Figure 7 b). The ventral surfaces of the cervical centra exhibit a poorly-defined, low ventral ridge on the anterior of the vertebral body without an anterior lip.

Twenty-three articulated post-cervical vertebrae are preserved. A further five post-cervical vertebrae were found separated from the posterior of the skeleton. The post-cervical vertebrae all have disarticulated neural arches suggesting that they were not originally fused to the centra. It is not possible to differentiate the pectoral series. The dorsal centra are not well preserved and are rotated to the left side. The anterior dorsal vertebrae have neural arches and spines lying to the right of the vertebral column whereas the posterior dorsal vertebrae have their neural arches reclined toward the left as a result of the disarticulation and compression of the carcass (Figure 1). The neural spines of the dorsal vertebrae are high laterally compressed, with the anterior border slightly convex and the posterior slightly concave. The dorsal ribs are slender, and separated from the articular facets of the vertebrae with which they articulated. The dimensions of some vertebral centra are given in Table 2.

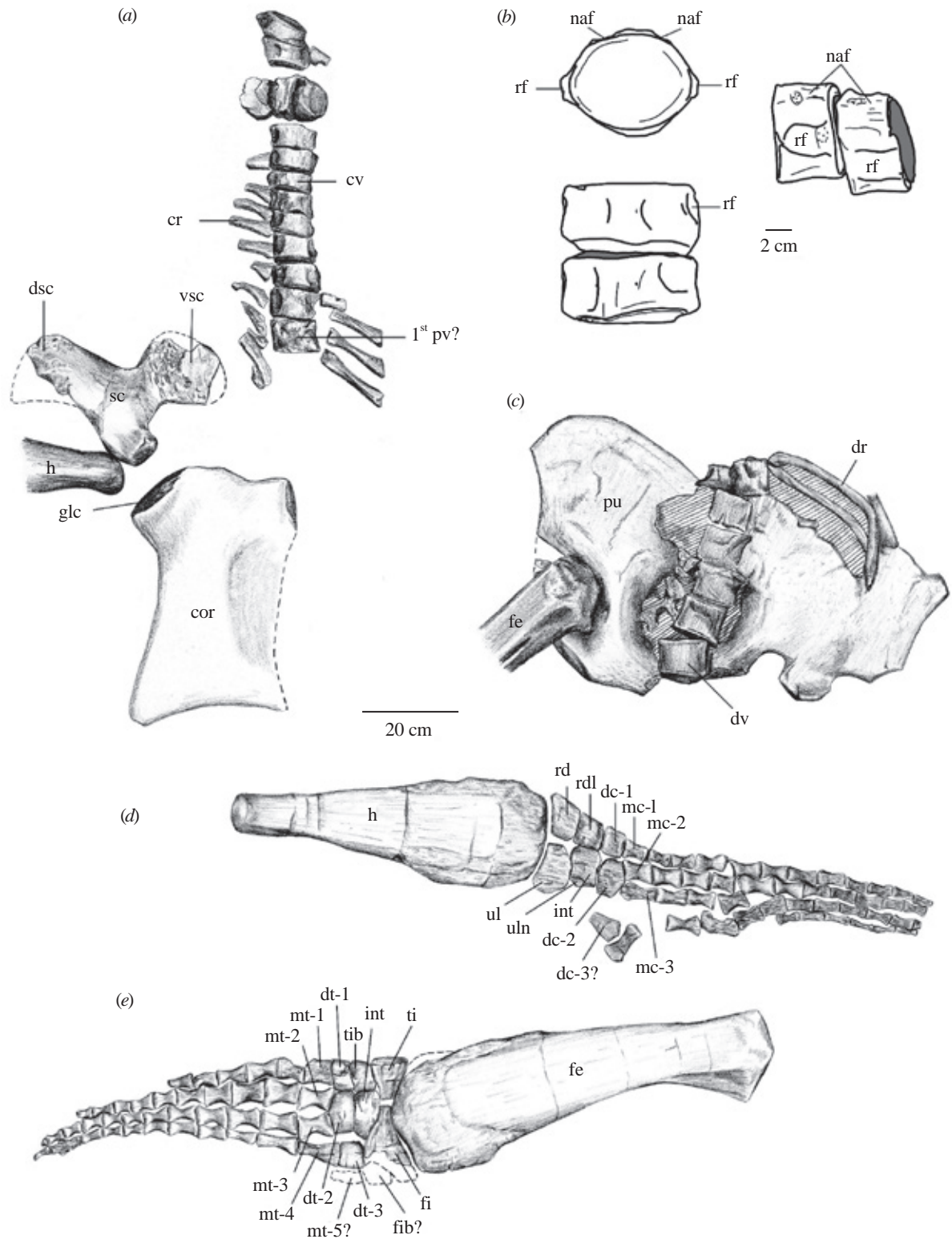


Figure 7. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. Post-cranial elements, *a*: neck and left scapula and coracoids in dorsal view. *b*: 8th and 9th cervical vertebrae in posterior (top), left lateral (right) and ventral views (bottom). *c*: pelvic region in dorsal view. *d*: right fore-limb in dorsal view. *e*: left hind limb in dorsal view. Abbreviations: cor, coracoid; cr, cervical rib; cv, cervical vertebra; dc-1 to 3, distal carpals; dr, dorsal rib; dsc, dorsal process of scapula; dt-1 and 2, distal tarsals; dv, dorsal vertebra; fe, femur; fi, fibula; fib, fibulare; glc, glenoid cavity; h, humerus; int, intermedium; mc-1 to 3, metacarpals; mt-1 to 4, metatarsals; naf, facet for neural arch; pu, pubis; pv, pectoral vertebra; rd, radius; rdl, radiale; rf, facet for rib; sc, scapula; ti, tibia; tib, tibiale; ul, ulna; uln, ulnare; vsc, ventral process of scapula.

Limb girdles (Figures 7 a and c). The pectoral and pelvic girdles are incompletely preserved and can only be observed in dorsal view, so much detail is obscured by the axial elements. From the pectoral girdle the left scapula and coracoid are the most complete. At the glenoid the bones are greatly separated indicating that they are not preserved in their original positions. The scapula is a triradiate bone with all surfaces preserved in a single plane. The scapula has a very well-developed dorsal process anterolaterally. Its ventral plate is relatively robust and does not join its counterpart on the right as preserved. The coracoid is a large, sub-rectangular bone, exhibiting the anterolateral glenoid cavity, a medial facet anteromedially for median symphysis with the right coracoid, and a slight somewhat rounded and pointed 'corner' posterolaterally representing the poorly developed posterolateral cornua. No anteromedial process appears to be present. The articular facets for the humerus and scapula are not clearly differentiated, with a single large, rounded articulating facet present, which suggests a juvenile ontogenetic stage for *Stenorhynchosaurus*

From the pelvic girdle, only the pubes are preserved substantially complete. The left pubis is the most complete but the midline union and its attachment to the ischium are not visible. The left pubis is in general relatively thick. Its medial border is covered by the vertebral column but its anterior border is convex anteriorly. The right pubis is fractured and displaced from its original position. The anterior border is damaged and the bone gently rotated clockwise, resulting in the acetabular facet lying under the vertebrae which are displaced to the left.

Appendicular skeleton (Figures 7 d and e). All limbs are somewhat incomplete with the forelimb smaller than the hindlimb. The left forelimb lacks the distal end of the humerus and the majority of the phalanges; the right fore-limb and the left hindlimb preserve only four digits limb; and the right hindlimb preserves just a few disarticulated fragments.

The humerus and femur are relatively long and narrow (Figure 7 d). The distal expansion of the humerus is weakly-developed, just a little wider than the shaft. The anterior border of the femur (Figure 7 e) is very slightly convex and the posterior border is slightly concave. The proximal articulations of the propodials show relatively continuous surfaces without differentiated capitulum and tuberosity; the trochanter is also undifferentiated. In both the humerus and femur, the distal epiphyses are poorly ossified and show rounded edges without marked articular surfaces for the epipodial elements. These rounded articulating surfaces once again suggest a juvenile ontogenetic stage.

The epipodials in both the fore- and hindlimbs are extremely short, as is typical for Cretaceous plesiosaur genera (Brown, 1981). The epipodials exhibit a clear separation between the two elements (Figures 7 d and e). The radius is smaller than the ulna, with approximately

straight borders. The proximal surface of the radius is flat for union with the humerus; the postaxial border is short and perpendicular to the proximal border, and the preaxial border is longer and inclined posterolaterally. Distally the radius bears a long facet at right angles to its longitudinal axis for union with the radiale, and a very short posterolaterally inclined facet for the intermedium. The ulna is wider than long; the preaxial border is short whereas the postaxial border is broken. Distally the ulna exhibits two inclined facets, one angled anterolaterally for the intermedium and a second for the ulnare. A third posterolaterally inclined facet was also present. Three proximal carpals are preserved, although the ulnare is incomplete. In the right forelimb only digits I to IV are preserved with the majority of the bones of the paddle slightly displaced posteriorly (Figure 7 d). Some of the phalanges of the fourth digit of the right forelimb are disarticulated, with a quadrangular bone (probably distal carpal 3) and several phalanges separated from the paddle. The first digit is the most complete preserving twelve phalanges, however, the distalmost phalanges are not preserved. In the left anterior paddle (Figure 1) only a section of the paddle with five phalanges is preserved indicating five digits were originally present.

Only the left hindlimb is preserved (Figure 7 e). The fibula is larger than the tibia, although both bones have a sub-triangular shape with very short inner ('deep') borders and much larger outer (anterior or posterior) borders; the facets for the proximal tarsals are not clearly marked. A quadrangular tibiale and a short but larger intermedium are present, although the fibula is not preserved. Three distal tarsal elements are present and show the usual shape in pliosaurids (Andrews, 1913; Welles, 1962). The greatest number of phalanges is preserved in the third digit, where twelve are present. As with the right forelimb, only four digits are preserved in the left hindlimb, although this is presumably a result of incomplete preservation.

Systematic discussion

Remains of Lower Cretaceous pliosaurids are scarce globally. In Colombia, one pliosauromorph taxon of a similar age to *Stenorhynchosaurus munozi* (Barremian) is known from the Hauterivian-Albian age Paja Formation close to Villa de Leiva: the Albian (Upper Cretaceous) *Kronosaurus boyacencis* Hampe, 1992 from Vereda Monquirá (Figure 1S). Other new taxa await formal description. *Kronosaurus* Longman 1924 was originally described from the Great Artesian Basin, Australia, where various Aptian-Albian specimens referred to *Kronosaurus queenslandicus* Longman 1924 have been described (Longman, 1932; White 1935; Romer & Lewis, 1959), including MCZ 1284 and QMF 51291 (McHenry, 2009). However, *Stenorhynchosaurus*, previously referred to *Brachauchenius* sp. (Hampe, 2005), is an important specimen, not only because it was recovered from the Lower Cretaceous, but

also because of the scarcity of Barremian pliosauromorph material generally. The substantially complete skeleton of *Stenorhynchosaurus*, preserving both skull and postcranial material, allows comparison of many phylogenetically important characters to previously described pliosauromorph taxa.

Phylogenetic context

Stenorhynchosaurus munozi is a pliosaurid plesiosaur as traditionally defined (e.g. **Tarlo**, 1960, **Brown**, 1981), preserving a large skull and a short neck. *Stenorhynchosaurus* superficially shares affinities with the Brachaucheninae **Benson and Druckenmiller**, 2014, preserving a long, relatively straight-sided snout with homodont dentition (**Hampe**, 2005; this work). In addition, the Brachaucheninae are the only group of pliosaurids known from the Lower Cretaceous (**Benson and Druckenmiller**, 2014). However, in the absence of a full cladistic investigation of the Colombian pliosaurids (outside the scope of this contribution), we evaluate the possible phylogenetic position of *Stenorhynchosaurus* by comparison to the diagnostic characteristics (summarized in Table 3) proposed in the most recent phylogenetic analyses (**Ketchum and Benson**, 2010; **Benson, et al.**, 2013; **Benson and Druckenmiller**, 2014). Hence below, we compare *Stenorhynchosaurus* to the ever more inclusive clades Pliosauroidae **Welles**, 1943; Pliosauridae **Seeley**, 1874 (both sensu **Ketchum and Benson**, 2010); Thalassophonea **Benson and Druckenmiller** 2014; and the two derived groups within Thalassophonea, the Jurassic *Pliosaurus* (**Benson, et al.**, 2013), and the Cretaceous sub-family Brachaucheninae **Benson & Druckenmiller**, 2014.

Of the synapomorphies proposed as diagnostic of the five clades (Pliosauroidae, Pliosauridae, Thalassophonea, *Pliosaurus*, and Brachaucheninae), a sub-set can be compared with *Stenorhynchosaurus*: those preserved in the new genus, and either shared or not shared with the groups above (highlighted in bold and italics respectively in Table 3). The remaining characters are either not applicable due to the nature of the analyses (the ‘bins’ used for continuously variable characters (**Ketchum & Benson**, 2010) depend on the addition or removal of taxa, and so are not comparable between analyses; see **Benson & Druckenmiller**, 2014: 5), or are not preserved in the new genus; these later characters are not discussed further. As diagnostic characters (synapomorphies) are derived from the cladistic analyses cited, characters and character states are shown as numbers in square brackets thus: [10.1], where the first number is the character, separated by a full stop from a second number that represents the character state; full descriptions of the characters and character states can be found in the works cited.

Pliosauroidae and Pliosauridae

Stenorhynchosaurus munozi shares four of 11 diagnostic characters with Pliosauroidae (Table 3). The palate of

Stenorhynchosaurus, posterior of the anterior interpterygoid vacuity is bordered by the pterygoid [60.0] as in *Peloneustes philarchus* (**Andrews**, 1913, **Ketchum and Benson**, 2011a), and the pterygoids form a midline suture posterior to the posterior interpterygoid vacuity [63.1] as in *Maresaurus coccai* (**Gasparini**, 1997). In the mandible the angular and prearticular form a rounded medial flange anterior to the glenoid fossa in dorsal view [102.0] as in *Peloneustes* (**Andrews**, 1913, **Ketchum and Benson**, 2010). The diastema at the premaxilla-maxilla suture [48.1] is present as in *Peloneustes philarchus* (**Andrews**, 1913, **Ketchum and Benson**, 2011a).

Stenorhynchosaurus shares eight of 28 diagnostic characters with Pliosauridae, with three characters not shared (Table 3). In the skull roof, *Stenorhynchosaurus* shares with Pliosauridae the premaxilla separated from the margin of the external naris [8.1] as in *Liopleurodon ferox* (**Andrews**, 1913, **Noè**, 2001), and on the palate the pterygoid forms a flange lateral and posterior to the posterior interpterygoid vacuities [64.1] as in *Kronosaurus queenslandicus* (**McHenry**, 2009). In the mandible *Stenorhynchosaurus* shares a coronoid with a long lingual process [90.1] as in ‘*Pliosaurus*’ *andrewsi* (**Tarlo**, 1960), and a weakly developed longitudinal medial crest ventral to the coronoid eminence and just ventral and anterior of the entrance to Meckel’s canal [97.1] as in *Simolestes vorax* (**Ketchum & Benson**, 2010). The cervical centra in *Stenorhynchosaurus* exhibit a flat or only slightly convex ventral surface [123.0] as in *Brauchauchenius lucasi* (**Albright, et al.**, 2007), and a gently convex articular face [124.1] as in *Marmornectes candrewi* (**Ketchum & Benson**, 2011b). In the postcranial skeleton, *Stenorhynchosaurus* shares the absence of postaxial ossicles in the epipodial row of the forelimb [161.0] as in *Peloneustes philarchus* (**Ketchum & Benson**, 2011a), and a radius with a pre-axial margin straight or slightly convex [163.1] as in *Liopleurodon ferox* (**Andrews**, 1913). All diagnostic characters of Pliosauridae not shared by *Stenorhynchosaurus* are postcranial, with the pre-glenoid extension of the coracoid relatively wide in *Stenorhynchosaurus*, but narrow in Pliosauridae [150.1], the preaxial margin of the humerus straight in *Stenorhynchosaurus* rather than concave in dorsal or ventral view in pliosaurids [157.1], and the convex pre-axial surface of the tibia in Pliosauridae [178.1] not present in *Stenorhynchosaurus* (**Ketchum & Benson**, 2010; this work). On balance, the evidence appears to suggest *Stenorhynchosaurus* is a member of Pliosauroidae, and most probably of Pliosauridae (with less character congruence and hence less certainly), although some characters contrary to this inference.

Thalassophonea

Comparison of *Stenorhynchosaurus* with Thalassophonea **Benson & Druckenmiller**, 2014, which is predominantly diagnosed on postcranial characteristics (Table 3), is more problematic. *Stenorhynchosaurus* shares just one

Table 3. Summary of diagnostic cladistic characters for clades Pliosauroida, Pliosauridae, Thalassophonea, genus *Pliosaurus*, and the sub-family Brachaucheninae abstracted from recent phylogenetic analyses, and organized by region of the body, highlighting characters shared (S, in bold), not shared (NS, in italics) together with those not preserved (NP) and not applicable (NA) to *Stenorhynchosaurus munozi* gen. et sp. nov.

	Pliosauroida	Pliosauridae	Thalassophonea	<i>Pliosaurus</i>	Brachaucheninae
Cranium	3.H, NA	1.8, NA	54.1, NP	24.1, S	1.0, S
	10.2, NP	2.L, NA		40.1, NP	4.2, S
		8.1, S		63.2, NP	13.0, S
		14.0, NP			29.2, S
		33.1, NP			<i>31.0, NS</i>
		34.1, NP			<i>35.1, NS</i>
		37.1, NP			42.1, NP
Palate					54.0, NP
					57.1, NP
	48.1, S	55.1, NP			84.1, NP
	60.0, S	64.1, S			86.0, S
	63.1, S				
	74.2, NP				
Mandible	102.0, S	90.1, S	114.1, NP	127.3, NP	10.1, S
		95.H, NA			113.0, NP
Teeth		97.1, S			123.1, S
		111.D, NA	<i>132.1, NS</i>	139.1, .2, S	132.0, NP
Vertebrae		112.A, 112.G, NA		140.1, NP	133.0, S
	118.B, NA	118.7, NA	142.1, NP		156.2, S
		123.0, S			162.1, NP
		124.1, S			163.1, NP
Appendicular					181.0, NP
	144.1, NP	143.0, NP	216.1, S	256.1, S	
	154.9, NA	<i>150.1, NS</i>	224.3, NP	259.1, S	
	177.B, NA	153.6, NA	<i>238.1, NS</i>		
		155.C, NA	<i>244.2, NS</i>		
		<i>157.1, NS</i>	<i>245.1, NS</i>		
		161.0, S	251.2, <i>NS</i>		
		162.5, 162.8, NA			
		163.1, S			
		168.2, NP			
	173.J, NA				
	177.7, NA				
	<i>178.1, NS</i>				

Source of characters: Pliosauroida and Pliosauridae Ketchum & Benson (2010); Thalassophonea and Brachaucheninae Benson & Druckenmiller (2013); and *Pliosaurus* Benson et al. (2014).

diagnostic synapomorphy with Thalassophonea, however, five diagnostic characters are not shared, out of a total of ten diagnostic characters proposed for the sub-family (Benson & Druckenmiller, 2014). The character shared between Thalassophonea and *Stenorhynchosaurus* is an absence on the coracoid of a low, mediolaterally oriented buttress connecting the glenoid to the median symphysis on the

ventral surface [216.1] as in *Peloneustes philarchus* (Andrews, 1913, Ketchum & Benson, 2011a) and *Liopleurodon ferox* (Andrews, 1913, Noé, 2001) but otherwise unknown in the taxa analysed by Benson & Druckenmiller (2014). However, *Stenorhynchosaurus* does not share the reduced distal-most alveolus in the posterior of the premaxilla [132.1] seen in a range of taxa

including ‘*Pliosaurus*’ *andrewsi*, *Liopleurodon ferox* and *Pliosaurus brachyspondylus* (Tarlo, 1960), but not present in *Megacephalosaurus eulerti* (Schumacher, et al., 2013) or *Brachauchenius lucasi* Williston, S.W. 1903 (Albright, et al., 2007). In addition, *Stenorhynchosaurus* does not share with Thalassophonea propodials with a weakly concave region that separates a central, convex portion from strongly tapering, flange-like pre- and post-axial margins [238.1] seen in *Peloneustes philarcus*, *Simolestes vorax* and *Liopleurodon ferox*, but reversed in *Pliosaurus* and Brauchaucheninae (Benson and Druckenmiller, 2014). The remaining three characters not shared between Thalassophonea and *Stenorhynchosaurus* are a humerus length width ratio of 1.7-2.2 (2.94 in *Stenorhynchosaurus*) [244.2] as in *Peloneustes philarcus*, *Simolestes vorax* and *Liopleurodon ferox*; a concave preaxial margin of the distal humerus in dorsal or ventral view, but with the anterior expansion relatively small, and substantially less than posterior expansion [245.1] seen in *Peloneustes philarcus*, *Simolestes vorax* and *Liopleurodon ferox* (as the distal humerus expands anteriorly in *Stenorhynchosaurus*); and a femoral length:width ratio of 1.55-2.0 [3.25 in *Stenorhynchosaurus*] [251.2] as in *Peloneustes philarcus* and *Simolestes vorax* (Benson and Druckenmiller, 2014: data matrix). However, none of these latter three characters are known in any of the Brauchaucheninae taxa analysed (Benson and Druckenmiller, 2014). Hence placement of *Stenorhynchosaurus* within the Thalassophonea is extremely problematic. However, congruence of characters with members of *Pliosaurus* and Brauchaucheninae (below) suggests *Stenorhynchosaurus* can be referred to one of the advanced members of the Thalassophonea, rather than being excluded and possibly requiring erection of a new supra-genus level taxonomic group within Pliosauroidae-Pliosauridae.

Pliosaurus

Stenorhynchosaurus shares half (four out of eight) of the diagnostic characters of *Pliosaurus*, with no diagnostic characters not shared ((Table 3). One character *Stenorhynchosaurus* shares with members of *Pliosaurus* is the presence of sub-trihedral teeth [139.2], as observed in *Pliosaurus kevani* Benson, et al., 2013 and the Cuban *Gallarodsaurus iturraldei* Gasparini, 2009. Trihedral [139.1] (or sub-trihedral) teeth were long seen as the defining character of *Pliosaurus* (e.g. Owen, 1841), or the Kimmeridgian pliosaurs [sic] (Tarlo, 1959; Tarlo, 1960); the full implications of trihedral teeth in Colombian Cretaceous pliosaurids will be explored elsewhere (Noe & Gómez in prep.). Other characters shared between *Stenorhynchosaurus* and *Pliosaurus* are a premaxilla-maxilla suture prominently interdigitating with a ‘zigzag’ appearance anterolaterally [24.1] as in *Pliosaurus kevani*, and considered a unique synapomorphy of *Pliosaurus* (Benson, et al. 2013) (although also present in *Liopleurodon ferox* and *Simolestes vorax* (Noè, 2001)); and the radius [256.1] and

tibia [259.1] with a straight or convex pre-axial margin: convex in *Pliosaurus carpenteri*, and a referred specimen of *Pliosaurus kevani*; flat in *Pliosaurus brachydeirus* and *Pliosaurus ? brachyspondylus*, but unknown in nine other *Pliosaurus* specimens studied (Benson, et al., 2013). The proximal surfaces of radius and tibia are only markedly convex in larger individuals of *Pliosaurus*, indicating this is an ontogenetic feature (Benson, et al., 2013), and the same is inferred to be the case for *Stenorhynchosaurus* (this work).

Brauchaucheninae

Stenorhynchosaurus shares nine out of 20 diagnostic characters of Brauchaucheninae with two diagnostic characters not shared (Table 3). Brauchaucheninae and *Stenorhynchosaurus* share four cranial characters: absence of a transverse constriction of the rostrum at the premaxilla-maxilla suture [1.0], a relatively long pre-orbital skull length to total skull length ratio (>0.56) dorsal view [4.2] (at least 0.567 in *Stenorhynchosaurus*); the alveolar margin of upper jaw approximately straight in lateral view [13.0]; and a maxilla that extends posteromedial to the external naris [29.2], all as in *Megacephalosaurus eulerti* and *Brachauchenius lucasi* (Benson & Druckenmiller, 2014). One character of the palate is shared between Brauchaucheninae and *Stenorhynchosaurus*, the antero-ventral surface of the parasphenoid ventrally covered by the pterygoids anterior to the posterior interpterygoid vacuity [86.0], as seen in *Kronosaurus queenslandicus*, *Megacephalosaurus eulerti* and *Brachauchenius lucasi* (Albright, et al., 2007; McHenry, 2009; Schumacher, et al., 2013). Two characters of the mandible, the mandibular glenoid fossa lying just posterior to the occipital condyle [10.1] as in *Megacephalosaurus eulerti* and *Brachauchenius lucasi* (although not shared with *Kronosaurus queenslandicus* MCZ 1284); and a retroarticular process inflected slightly posteromedially [123.1] as in *Kronosaurus queenslandicus* (MCZ 1284), *Megacephalosaurus eulerti* and *Brachauchenius lucasi* (Benson & Druckenmiller, 2014, and references therein), are shared, together with homodont and dentition [133.0], as in *Megacephalosaurus eulerti* (Schumacher, et al., 2013) and *Brachauchenius lucasi* (Williston, 1907). One cervical vertebral character, dorsal foramina present within the neural canal, but subcentral foramina very small or absent [156.2], as in *Brachauchenius lucasi* (Albright, et al., 2007), is also shared with *Stenorhynchosaurus*. Two skull roof characters are not shared by between Brauchaucheninae and *Stenorhynchosaurus*: the frontal does not participate in the rim of the external nares [31.0] in *Stenorhynchosaurus*, and the prefrontal does not participate in the rim of the external naris [35.1], both of which are present in *Megacephalosaurus eulerti*, *Brachauchenius lucasi* and *Kronosaurus queenslandicus* (QM 51291) (Williston, 1907; McHenry, 2009; Schumacher, et al., 2013). Hence

the balance of evidence indicates that *Stenorhynchosaurus* could be placed within the Brauchaucheninae, although not unambiguously.

Summarizing the foregoing, referral of *Stenorhynchosaurus* to Pliosauroidae and Pliosauridae, although not entirely supported by the available evidence, nonetheless seems likely. As currently defined, firm inference of referral of *Stenorhynchosaurus* to Thalassophonea is much more problematic, but ultimately seems highly likely based on characters shared with *Pliosaurus* and Brauchaucheninae; however, this uncertainty indicates Thalassophonea requires rigorous redefinition. As to whether *Stenorhynchosaurus* is a member of the currently exclusively Jurassic *Pliosaurus*, or the Cretaceous Brauchaucheninae, appears equivocal. However, referral *Stenorhynchosaurus* to both *Pliosaurus* and Brauchaucheninae is not possible as the two clades are mutually exclusive, based on current phylogenetic hypotheses (Ketchum & Benson, 2010; Benson, *et al.*, 2013; Benson & Druckenmiller, 2014). This leaves four possible hypotheses: (i) *Stenorhynchosaurus* belongs within Pliosauroidae and Pliosauridae but outside Thalassophonea, (ii) *Stenorhynchosaurus* is a member of Thalassophonea but separate from either *Pliosaurus* or Brauchaucheninae, (iii) *Stenorhynchosaurus* resides within *Pliosaurus*, or (iv) *Stenorhynchosaurus* is a member of sub-family Brauchaucheninae. However, all four possibilities represent problems for current phylogenetic hypotheses of Pliosauroidae.

Hypothesis (i) would place *Stenorhynchosaurus* close to *Thalassiodracon hawkinsi*, *Haufiosaurus*, *Attenborosaurus conybeari* and *Marmonectes candrewi* at the base of the Pliosauridae (Benson, *et al.*, 2013; Benson & Druckenmiller, 2014), which seems highly unlikely for a Cretaceous taxon. Hypothesis (ii) would indicate the need for considerable redefinition of Thalassophonea, and both hypotheses (i) and (ii) would imply (a) a ghost lineage within Pliosauroidae into the Lower Cretaceous, and (b) that a second lineage of pliosaurids crossed into the Cretaceous in addition to the Brauchaucheninae. Hypothesis (iii) would extend the temporal range of *Pliosaurus* from the Late Jurassic into the Lower Cretaceous, greatly increase morphological variability, as well as indicating two lines of pliosaurids crossed into the Cretaceous. This possibility would therefore indicate the need for a major revision of *Pliosaurus*, most likely including multiple genera (as previously suggested by Noé, *et al.*, 2004). Hypothesis (iv) would require redefinition of Brauchaucheninae to incorporate *Stenorhynchosaurus*. All hypotheses will be rigorously tested in future contributions following publication of specimens awaiting formal description. Hence *Stenorhynchosaurus* underlines the need for continuing exploration of the systematics of Pliosauridae and reinforces the need to eliminate remaining instability within the evolutionary tree of Plesiosauria.

Conclusions

The characteristics of *Stenorhynchosaurus munozii*, a new Lower Cretaceous pliosaurid from the Barremian Arcillolitas Abigarradas Member of the Paja Formation of Colombia, are sufficiently different from known taxa to permit erection of a new genus and species. *Stenorhynchosaurus* is characterized by the anterior of the vomer, in ventral view, posterior of the palatal premaxilla-maxilla suture contacting the posterior palatal process of the premaxilla level with the third maxillary alveolus; rostrum narrow and elongated with straight sides in dorsal view; lacrimal forming the anterior border and great part of the ventral border of the orbit and broadly borders the maxilla anteriorly; anterior interpterygoid vacuity present; internal nares located between vomer and maxilla at the level of 13th-15th maxillary alveoli; anterior of rostrum and mandible without lateral expansion or marked increase in size of the functional alveoli; penultimate premaxillary alveolus slightly larger than adjacent premaxillary alveoli; homodont maxillary functional alveoli, with fourth tooth positions very slightly enlarged with respect to the neighboring alveoli; homodont dentary dentition; and epipodials extremely short. Various features of the skeleton, including many clearly visible cranial sutures, an open mandibular symphysis, neural arches unfused to the associated centra, and articular facets on the limb girdles, propodials and radius and tibia rounded and incompletely formed, indicate that the individual was a juvenile (*sensu* Brown, 1981) at the time of death. Following death, the skeleton apparently remained largely undisturbed by predators, but was slightly affected by early physical biostratinomic (taphonomic) processes which removed elements of the right rear limb and tail.

Based on comparison to recent large-scale cladistic analyses of Plesiosauria (Ketchum & Benson, 2010; Benson, *et al.*, 2013; Benson & Druckenmiller, 2014) *Stenorhynchosaurus* shares a mosaic of characters found within Pliosauroidae, with perhaps with the greatest affinity with the sub-family Brauchaucheninae. However, analysis of diagnostic synapomorphic characters of Pliosauroidae, Pliosauridae, Thalassophonea, *Pliosaurus* and Brauchaucheninae indicates much instability within the phylogeny of Plesiosauria as currently understood. Considerable work thereby remains to be undertaken. Particular problems include definition of Thalassophonea to include new (and existing) specimens, the distribution of characters such as trihedral or sub-trihedral teeth within *Pliosaurus* (indicating the need for urgent revision), and greater exploration of the details of the evolutionary history of the Thalassophonean sub-family Brauchaucheninae. The apparently labile and homoplastic nature of characters employed in existing phylogenetic hypotheses need to be further explored, indicating a particular need to reevaluate relationships with Pliosauroidae, Thalassophonea, and included clades.

The recognition of *Stenorhynchosaurus* thereby further underlines the importance of southern continent pliosaurids, and in particular those from the Colombian, Paja Formation. These Lower Cretaceous Colombian pliosauromorphs are likely to prove critical for furthering our understanding of evolutionary relationships within Plesiosauria in general and Pliosauroida in particular. *Stenorhynchosaurus* reinforces the importance of Colombian pliosaurids in understanding global interrelationships between

pliosaurian taxa, particularly those within the Lower Cretaceous. The discovery of *Stenorhynchosaurus munozi* thereby increases the diversity of pliosaurids from the Lower Cretaceous, emphasizes the importance of the marine reptiles from Colombia (and in particular the Villa de Leiva region) as a rich source of morphological and phylogenetic information for understanding the poorly known evolutionary history of Lower Cretaceous Gap pliosaurids.

Información suplementaria

Figure 1S. Map of Villa de Leiva region with geographical location of the site from which *Stenorhynchosaurus munozi* gen. et sp. nov. (VL17052004-1) was recovered (marked by an arrow). A and B indicate the sites of the two other pliosaurids finds: A – *Kronosaurus boyacensis* Hampe, 1992 (Upper Aptian); B – UNDG R1000 (Lower Barremian).

Figure 2S. Generalized stratigraphic column of the Arcillolitas Abigarradas Member of the Paja Formation cropping out around Villa de Leiva, and showing pliosaurid occurrences. A and B indicate the occurrence of the two other pliosaurids finds: A – *Kronosaurus boyacensis* Hampe, 1992; B – UNDG R1000. Modified from Forero & Sarmiento, 1985.

Figure 3S. A close-up view of the bed with large rusty calcareous concretions, 60 cm below the *Stenorhynchosaurus munozi* gen. et sp. nov. (VL17052004-1) skeleton, showing an incomplete polygonal pattern interpreted as algal growth cracks developed in a muddy tidal flat. ‘Segment C’ of the Arcillolitas Abigarradas Member, Paja Formation. View is westward at N5°39’58”, W73°33’59”.

Figure 4S. a, b, c, h, i and j, *Gerhardtia galeatoides* (Karsten, 1856). a: MP-250604/2a (cf. Patarroyo, 2004, sub *Heinzia*

(*Gerhardtia*) *galeatoides* (Karsten, 1856)); corroded specimen from a calcareous concretion 60 cm below the skeleton of *Stenorhynchosaurus*. All specimens in lateral view. b, c: Lateral and ventral views of specimen MP-250604/2c (cf. Patarroyo, 2000, sub *Heinzia* (*Gerhardtia*) *veleziensis* (Hyatt)). h: MP-110804/2 (cf. Patarroyo, 2004, sub *Heinzia* (*Gerhardtia*) *galeatoides* (Karsten)), found inside the skull of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. et sp. nov. (VL17052004-1). i: MP-171108/1 (cf. Bürgl, 1956, sub *Heinzia* (*Gerhardtia*) *veleziensis* Hyatt); mold of impression of ammonite found inside the skull of *Stenorhynchosaurus*. j: MP-171108/2 (cf. Patarroyo, 2004, sub *Heinzia* (*Gerhardtia*) *galeatoides* (Karsten, 1856)). d, e, f and g, *Gerhardtia provincialis* (D’Orbigny, 1850). d: MP-110804/1, small specimen (cf. Vermeulen, 2003), from a calcareous concretion 60 cm below the skeleton of *Stenorhynchosaurus*. e: MP-110804/3, ventral view of large specimen in Figure d (cf. Vermeulen 2003). f, g: Lateral and ventral views of specimen MP-250604/2b (cf. Vermeulen, 2003, sub *Gerhardtia provincialis* (d’Orbigny, 1850)).

Figure 5S. VL17052004-1, holotype specimen of *Stenorhynchosaurus munozi* gen. and sp. nov. Symphyisial region of the mandible in dorsal view and details of replacement teeth.

Acknowledgements

We thank Mr. Jorge Muñoz for informing us about the find, and facilitating the excavation on his property. We also thank Mary Luz Parra for her significant contribution to the excavation and preparation of the fossil. We thank P. Druckenmiller and two anonymous reviewers for their valuable comments that much improved an earlier draft of this work, and Carlos Jaramillo for editorial advice and help. This study was made possible thanks to the support of the Servicio Geológico Colombiano, the Universidad Nacional de Colombia, the Fundación Colombiana de Geobiología, the local authorities of Villa de Leiva, and Universidad de los Andes, Bogotá.

Conflict of interests

The authors declare no having any conflict of interest in publishing this article.

Bibliography

- Albright, L.B., Gillette, D.D. & Titus, A.L.** 2007. Plesiosaurs from the Upper Cretaceous (Cenomanian-Turonian) Tropic Shale of Southern Utah, Part 1: new records of the pliosaur *Brachauchenius lucasi*. *Journal of Vertebrate Paleontology* **27** (1): 31-40.
- Andrews, C.W.** 1910. A descriptive catalogue of the marine reptiles of the Oxford Clay: part I. British Museum (Natural History), London, 206 pp.
- Andrews, C.W.** 1913. A descriptive catalogue of the marine reptiles of the Oxford Clay: part II. British Museum (Natural History), London, 206 pp.
- Bardet, N., Mazin, J.M. & Martin, M.** 1993. Une mandibule de *Pliosaurus brachyspondylus* (Reptilia, Sauropterygia) dans le Kimméridgien du Boulonnais (France). *Neues Jahrbuch fuer Geologie und Palaeontologie, Mh.* **7**: 385-392.

- Benson, R.B.J. & Druckenmiller, P.S.** 2014. Faunal turnover of marine tetrapods during the Jurassic-Cretaceous transition. - *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **89**: 1-23.
- Benson, R.B.J., Evans, M., Smith, A.S., Sassoon, J., Moorefaye, S., Ketchum, H.F. & Forrest, R.** 2013. A giant pliosaurid skull from the Late Jurassic of England. - *PLoS ONE* **8**: 1-34.
- Blainville, H.D.** 1835. Description de quelques espèces de reptiles de la Californie, précédée de l'analyse d'un système général d'Erpétologie et d'Amphibiologie. *Nouvelles Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Série 3* (4): 233-296.
- Brown, D.S.** 1981. The English Upper Jurassic Plesiosauroidea (Reptilia) and a review of the phylogeny and classification of the Plesiosauria. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Geology)* **35** (4): 253-347.
- Buchy, M.C., Frey, E. & Salisbury, S. W.** 2006. Internal cranial anatomy of Plesiosauria (Reptilia, Sauropterygia): evidence for a functional secondary palate. *Lethaia* **39**: 290-303.
- Bürgl, H.** 1956. Catálogo de las amonitas de Colombia, parte 1 Pulchelliidae. *Boletín Geológico* **4** (1): 1-119.
- Cadena, E.A., & Parham, J.F.** 2015. Oldest known marine turtle? A new protostegid from the Lower Cretaceous of Colombia. *PaleoBios* **32**: 1-42.
- Carpenter, K.** 1997. Comparative cranial anatomy of two North American Cretaceous plesiosaurs. In Callaway, J. M. and Nicholls, E. M. (eds). *Ancient Marine Reptiles*. Academic Press, San Diego. Chapter **7**: 191-216.
- Cohen, K.M., Finney, S.C., Gibbard, P.L. & Fan, J.-X.** (2013; updated 2015/01). The ICS International Chronostratigraphic Chart. *Episodes* **36**: 199-204.
- Cruikshank, A.R.I.** 1994. Cranial anatomy of the Lower Jurassic pliosaur *Rhomaleosaurus megacephalus* (Stutchbury) (Reptilia: Plesiosauria). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **343**: 247-260.
- Cruikshank, A.R.I., Small, P.G. & Taylor, M.A.** 1991. Dorsal nostrils and hydrodynamically driven underwater olfaction in plesiosaurs. *Nature* **352**: 62-64.
- De La Fuente, M., y Goñi, R.** 1983. Primeras tortugas cretácicas marinas de Colombia. *Geología Norandina* **7**: 43-48.
- D'Orbigny, A.** 1841. *Paléontologie française, Terrains Crétacés, I, Céphalopodes* : 121-456.
- D'Orbigny, A.** 1850. Note sur quelques nouvelles espèces remarquables d'Ammonites des étages Néocomien et Aptien de France. *Journ. Conchyl.* **I**: 196-201.
- Etayo Serna, F.** 1968. El Sistema Cretáceo en la región de Villa de Leiva y zonas próximas. *Geología Colombiana* **5**: 5-74, 1 mapa.
- Forero, H. & Sarmiento, L.F.** 1985. La facies evaporítica de la Formación Paja en la región de Villa de Leiva. Proyecto Cretácico-Contribuciones. Publicaciones Geológicas Especiales del INGEOMINAS. **16**: XVII-1-16.
- Gasparini, Z.** 1997. A new pliosaur from the Bajocian of the Neuquen Basin, Argentina. *Palaeontology*, **40** (1): 135-148.
- Gasparini, Z.** 2009. A new Oxfordian pliosaurid (Plesiosauria, Pliosauridae) in the Caribbean seaway. *Palaeontology*, **52** (3): 661-669.
- Goñi, R., y Gasparini, Z. B.** 1983. Nuevos restos de '*Alzadasaurus colombiensis*' (Reptilia, Plesiosauria) del Cretácico temprano de Colombia. *Geología Norandina* **7**: 49-54.
- Hampe, O.** 1992. Ein grosswüchsiger Pliosauride (Reptilia: Plesiosauria) aus der Unterkreide (oberes Aptium) von Kolumbien. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg* **145**: 1-32.
- Hampe, O.** 2005. Considerations on a Brachauchenius skeleton (Pliosauroida) from the lower Paja Formation (late Barremian) of Villa de Leyva area (Colombia). *Mitt. Mus. Nat.kd. Berl., Geowiss. Reihe* **8**: 37-51.
- Hyatt, A.** 1903. Pseudoceratites of the Cretaceous. *United States Geological Survey, Monographs*, **44**: 128-144.
- Karsten, H.** 1856. Über die geognostischen verhältnisse des westlichen Columbien, der heutigen Republiken Neu-Granada und Equador. *Versamm. Deutsch. Natur. Wien*, **1856**: 80-116.
- Ketchum, H.F & Benson, R.B.J.** 2010. Global interrelationships of Plesiosauria (Reptilia, Sauropterygia) and the pivotal role of taxon sampling in determining the outcome of phylogenetic analyses. *Biological Reviews*, **85**: 361-392.
- Ketchum, H.F & Benson, R.B.J.** 2011a. The cranial anatomy and taxonomy of *Peloneustes philarchus* (Sauropterygia, Pliosauridae) from the Peterborough Member (Callovian, Middle Jurassic) of the United Kingdom. *Palaeontology* **54** (3): 639-665.
- Ketchum, H.F & Benson, R.B.J.** 2011b. A new pliosaurid (Sauropterygia, Plesiosauria) from the Oxford Clay Formation (Middle Jurassic, Callovian) of England; evidence for a gracile, longirostrine grade of Early-Middle Jurassic pliosaurids. *Special Papers in Palaeontology* **86**: 109-129.
- Longman, H.A.** 1924. A new gigantic marine reptile from the Queensland Cretaceous. *Memoirs of the Queensland Museum*, **8**: 26-28
- Longman, H.A.** 1932. Restoration of *Kronosaurus queenslandicus*. *Memoirs of the Queensland Museum* **10**: 98.
- McHenry, C.R.** 2009. Devourer of gods: the palaeoecology of the Cretaceous pliosaur *Kronosaurus queenslandicus*. Doctorate, University of Newcastle, Faculty of Science & Information Technology, School of Environmental and Life Sciences, x + 616.
- Noé, L.F.** 2001. A Taxonomic and Functional Study of the Callovian (Middle Jurassic) Pliosauroida (Reptilia, Sauropterygia). Unpublished Ph.D. dissertation, University of Derby, Derby. Vol 1:354 pp., Vol 2: 182 pp.
- Noé, L.F., Smith, D.T.J. & Walton, D.I.** 2004. A new species of Kimmeridgian pliosaur (Reptilia; Sauropterygia) and its bearing on the nomenclature of *Liopleurodon macromeris*. - *Proceedings of the Geologists' Association* **115**: 13-24.

- Owen, R.** 1841. Odontography; or a treatise on the comparative anatomy of the teeth; their physiological relations, mode of development, and microscopic structure, in the vertebrate animals. - i-xl, 113-228, pls 151-189A (not 162A) pp.; Hippolyte Balliere, London.
- Owen, R.** 1860. On the orders of fossil and recent Reptilia, and their distribution in time. Report of the British Association for the Advancement of Science for 1859 **29**: 153-166.
- Páramo-Fonseca, M.E.** 1997. *Platypterygius sachicarum* (Reptilia, Ichthyosauria) nueva especie del Cretácico de Colombia. Revista Ingeominas **6**: 1-12.
- Patarroyo, P.** 2000. Distribución de amonitas del Barremiano de la Formación Paja en el sector de Villa de Leiva (Boyacá-Colombia). Bioestratigrafía. Geología Colombiana **25**: 149-162.
- Patarroyo, P.** 2004. Die Entwicklung der Ammoniten der Familie Pulchelliidae aus dem Barrême von Zentral-Kolumbien (Südamerika). Revue de Paléobiologie, Genève **23** (1): 1-65.
- Reboulet, S. & Hoedemaeker, P.J.** (Reporters). 2006. Report on the 2nd international meeting of the IUGS lower Cretaceous ammonite working group, the "Kilian Group" (Neuchâtel, Switzerland, 2 september 2005). Cretaceous Research **27**: 712-715.
- Rock Color Chart Committee.** 1963. Geological Rock Color Chart. Geological Society of America (GSA).
- Romer, A.S. & Lewis, A.D.** 1959. A mounted skeleton of the giant plesiosaur *Kronosaurus*. Breviora **112**: 1-15.
- Sassoon, J., Noè, L.F. & Benton, M.J.** 2012. Cranial anatomy, taxonomic implications and palaeopathology of an upper Jurassic pliosaur (Reptilia: Sauropterygia) from Westbury, Wiltshire, UK. Palaeontology **55** (4): 743-773.
- Schumacher, B.A., Carpenter, K. & Everhart, M.J.** 2013. A new Cretaceous pliosaurid (Reptilia, Plesiosauria) from the Carlile Shale (Middle Turonian) of Russell County, Kansas. Journal of Vertebrate Paleontology **33** (3): 613-628.
- Seeley, H.** 1874. Note on some generic modifications of the plesiosaurian pectoral arch. Quarterly Journal of the Geological Society of London **30**: 436-449.
- Smith, A. S.** 2015. Reassessment of '*Plesiosaurus megacephalus*' (Sauropterygia: Plesiosauria) from the Triassic-Jurassic boundary, UK. Palaeontologia Electronica **18.1.20A**: 1-19.
- Sayn, G.** 1890. Sur la faune d'Ammonites pyriteuses barrémiennes du Djebel-Ouach, province de Constantine. Extr. Comptes Rendues de l'Académie de Sciences, 1-2, Paris.
- Tarlo, L.B.** 1959. A review of pliosaurus. In (Hewer, H.R. & Riley, N.D. eds) Proceedings, XVth International Congress of Zoology, London, 16-23 July 1958. International Congress of Zoology, London.
- Tarlo, L.B.** 1960. A review of Upper Jurassic pliosaurus. Bulletin of the British Museum of Natural History (Geology) **14** (5): 145-198.
- Vermeulen, J.** 2003. Étude stratigraphique et paléontologique de la famille des Pulchelliidae (Ammonoidea, Ammonitina, Endemocerataceae). Géologie Alpine, Mémoire H.S. **42**: 1-333, 57pl.
- Vermeulen, J. & Klein J.** 2006. Lower Cretaceous Ammonites II: Endemocerataceae: Pulchelliidae, 188-255. In: Riegraf, W.(ed) Fossilium catalogus I: Animalia 141. Backhuys Publishers, Leiden.
- Welles, S.P.** 1943. Elasmosaurid plesiosaurus with a description of new material from California. Memoirs of the University of California **13**: 125-254.
- Welles, S.P.** 1962. A new species of elasmosaur from the Aptian of Colombia and a review of the Cretaceous plesiosaurus. University of California Publications in Geological Sciences **44** (1): 1-96, pls 1-4.
- White, T.E.** 1935. On the Skull of *Kronosaurus queenslandicus* Longman. Occasional Papers of the Boston Society of Natural History **8**: 219-228.
- Williston, S.W.** 1903. North American plesiosaurus, part 1. Publications of the Field Columbian Museum, Geological Series **2**: 3-77, pls. 1-29.
- Williston, S.W.** 1907. The skull of *Brachauchenius*, with observations on the relationships of the plesiosaurus. Proceedings of the United States National Museum **32**: 477-489.

The genus *Plagiochila* (Marchantiophyta) in Colombia

Robbert Gradstein

Museum National d'Histoire Naturelle, Dept. Systématique et Evolution, Paris, France

Abstract

Plagiochila is the largest genus of bryophytes of Colombia. A total of 175 species have been recorded from the country but the majority of these are synonyms. In this paper 57 species are accepted for Colombia. A key to the Colombian species of *Plagiochila* is provided and each species is briefly described, with data on types, synonyms, published illustrations, morphology, geographical distribution and habitat, as well as a brief discussion of differentiating characters and taxonomic affinity. Among the countries of tropical America, Colombia has the highest diversity of *Plagiochila* followed by Ecuador (53 species) and Costa Rica (50 species). More than half of the Colombian species are widely distributed throughout tropical America and seven of them occur also in Africa and/or Western Europe. About one fourth of the species are restricted to the northern Andes, which is the centre of diversity of *Plagiochila* in the New World. The majority of the species grow as epiphytes in humid Andean forests. Diversity peaks in the upper montane forest belt between 2000-3000 m. Sixteen species occur in the páramo belt and five are exclusive to páramo. Eighteen species occur in lowland rainforest. *Plagiochila eggersii*, recorded from lowland rainforest of the Chocó, is new to Colombia.

Key words: Andean forest, bryophytes, Colombia, elevational distribution, liverworts, páramo, *Plagiochila*, taxonomy.

El género *Plagiochila* (Marchantiophyta) en Colombia

Resumen

Plagiochila es el mayor género de briófitos de Colombia. Un total de 175 especies han sido registradas para el país, pero la mayoría de estos nombres son sinónimos. En este trabajo se aceptan 57 especies para Colombia. Se proporciona una clave para las especies colombianas de *Plagiochila* y cada especie se describe brevemente con datos sobre los tipos, sinónimos, ilustraciones publicadas, morfología, distribución y hábitat, así como un breve análisis de sus caracteres principales y afinidad taxonómica. Entre los países de la América tropical, Colombia tiene la mayor diversidad de *Plagiochila* seguido de Ecuador (53 especies) y Costa Rica (50 especies). Más de la mitad de las especies colombianas están ampliamente distribuidas en América tropical y siete de ellas se presentan también en África y / o Europa occidental. Alrededor de una cuarta parte de las especies están restringidas para los Andes del norte, que es el centro de diversidad de *Plagiochila* en el Nuevo Mundo. La mayoría de las especies crecen como epífitas en bosques húmedos andinos. La mayor diversidad se encuentra entre 2000-3000 m. Dieciséis especies se encuentran en los páramos y cinco son exclusivas de páramo. Dieciocho especies se encuentran en la selva tropical. *Plagiochila eggersii*, encontrada en la selva del Chocó, es nueva para Colombia.

Palabras claves: bosque Andino, briófitas, Colombia, distribución altitudinal, hepáticas, páramo, *Plagiochila*, taxonomía.

Introduction

Plagiochilaceae are a large family of the liverworts (Marchantiophyta) with an estimated 450 species in nine genera (Söderström, *et al.*, 2016; Gradstein, 2015a). The species grow mainly as epiphytes and are abundant in tropical montane forests where bryophyte layers are often dominated by Plagiochilaceae (e.g., Wolf, 1994). About 95% of the species of Plagiochilaceae belong to *Plagiochila* (Dumort.) Dumort., which has an almost worldwide distribution and is the only genus in the family occurring in tropical America. Gradstein, *et al.* (2001) recognized three further Neotropical genera, *Plagiochilion* S.Hatt.

with two Neotropical species and *Stereochila* Inoue and *Szweykowskia* Gradst. & E.Reiner with one species each. However, these four species are now included in *Plagiochila* and the genera *Stereochila* and *Szweykowskia* are no longer recognized (Heinrichs, 2002).

The genus *Plagiochila* is readily recognized by the rather firm, greenish or brownish plants with stiff stems - due to the presence of a thick-walled cortex - and succubous leaves with

*Corresponding author:

Robbert Gradstein, gradstein@mnhn.fr

Received: August 18, 2015

Accepted: January 20, 2016

a recurved dorsal margin and decurrent dorsal base (Fig. 1G). The leafy shoots usually arise from a rhizome-like, creeping stem and the branches always originate from the lateral side of the leafy stem, never from the ventral side; branching is “intercalary” or “terminal” (Gradstein, *et al.*, 2001, p. 6-7). The leaves may be transverse, obliquely spreading or widely spreading. In obliquely or widely spreading leaves, the leaf surface may be horizontal or “ventrad”; in the latter case the leaf surface is tilted towards the ventral side of the stem (Fig. 1E; the two leaves shown on the right-hand side of stem are “ventrad”). The leaf margins are usually toothed, especially at the apex and along the ventral margin; occasionally they

are entire. The ventral leaf bases are often “shouldered” (basal portion of ventral margin somewhat extended parallel to the stem before curving outwards) or expanded across and beyond the stem (“ampliate”; Fig. 1H,I). When strongly “ampliate”, the ventral leaf bases are concealing the stem and may curve downwards, forming a crest. Underleaves are absent or very small and rhizoids are usually few, originating scattered from the ventral stem surface. The plants are always dioicous. Androecia are typically arranged in long and narrow spikes, which are much narrower than the vegetative shoots. Gynoecia have a laterally flattened perianth with a wide, truncate mouth, which is usually fringed by numerous long

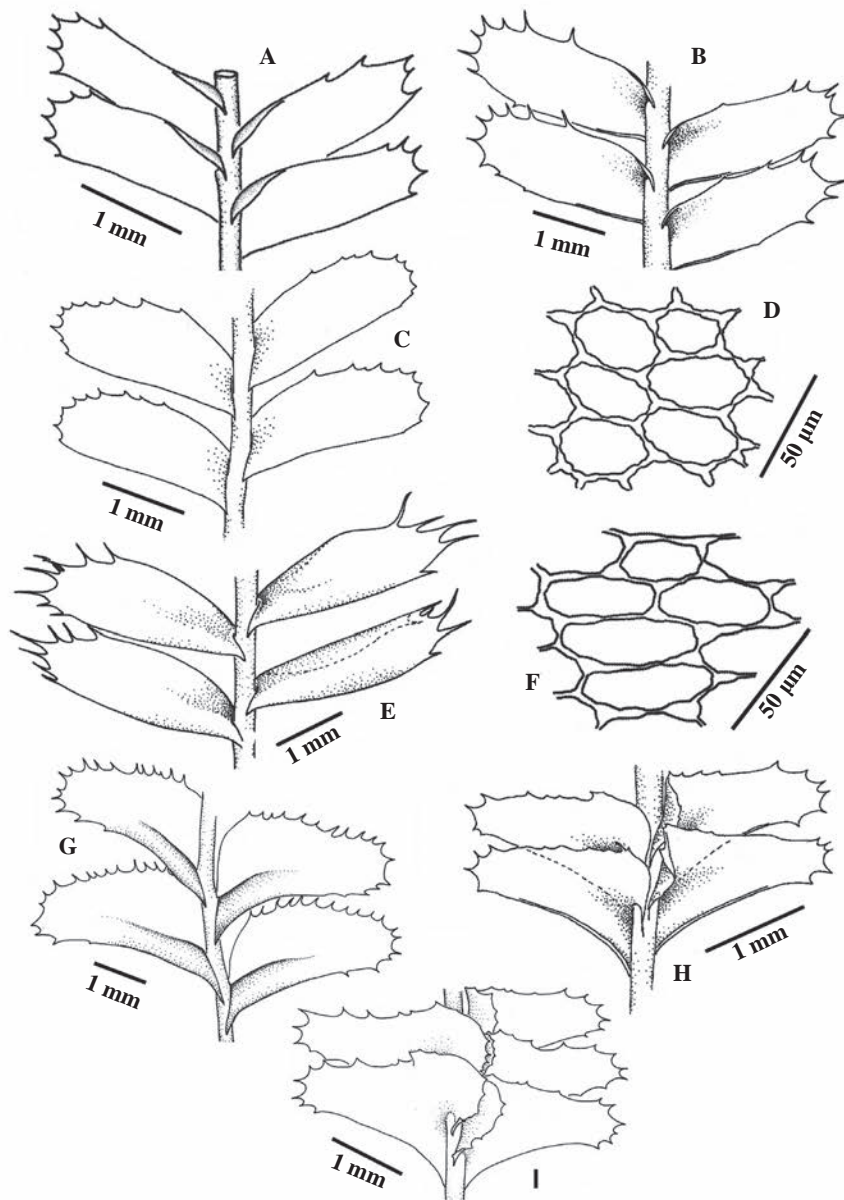


Figure 1. Selected *Plagiochila* species. A: *P. crispabilis*, portion of plant in ventral view; B: *P. subplana*, portion of plant in ventral view; C: *P. rutilans*, portion of plant in dorsal view; D: *P. rutilans*, midleaf cells; E: *P. aerea*, portion of plant in dorsal view; F: *P. aerea*, midleaf cells; G: *P. adianthoides*, portion of plant in dorsal view; H: *P. raddiana*, portion of plant in ventral view; I: *P. montagnei*, portion of plant in ventral view. All drawings by A.-L. Ilkiu-Borges.

teeth (rarely entire) (Fig. 2A). The sporophyte has a thick seta made up of numerous rows of cells and the capsule has a thick, 4-9-layered wall. Spores are unicellular or pluricellular due to endosporous germination and elaters have 1-2(-3) brown spirals. Vegetative reproduction is common, by small plantlets (propagula) originating from the ventral surface of leaves, by caducous leaves or by leaf fragmentation.

Plagiochila is the largest genus of bryophytes of Colombia, although the total number of species in the country has been exaggerated. About 175 species have been recorded (Uribe

& Gradstein, 1998) but almost two third of them are now considered synonyms or misidentifications (Heinrichs, 2002; Heinrichs & Gradstein, 2000; Heinrichs, *et al.*, 1998, 1999, 2000b, 2002a, 2002b, 2005a; Müller, *et al.*, 1999; Gradstein & Uribe, 2015; Gradstein, 2015a, this paper). In this paper 57 species are accepted for Colombia; a few further species remain doubtful taxa. Presumably the earliest *Plagiochila* record from Colombia appeared in the “Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada” directed by José Celestino Mutis, which contains an illustration of an unidentified species of *Plagiochila* (Aguirre & Calonge,

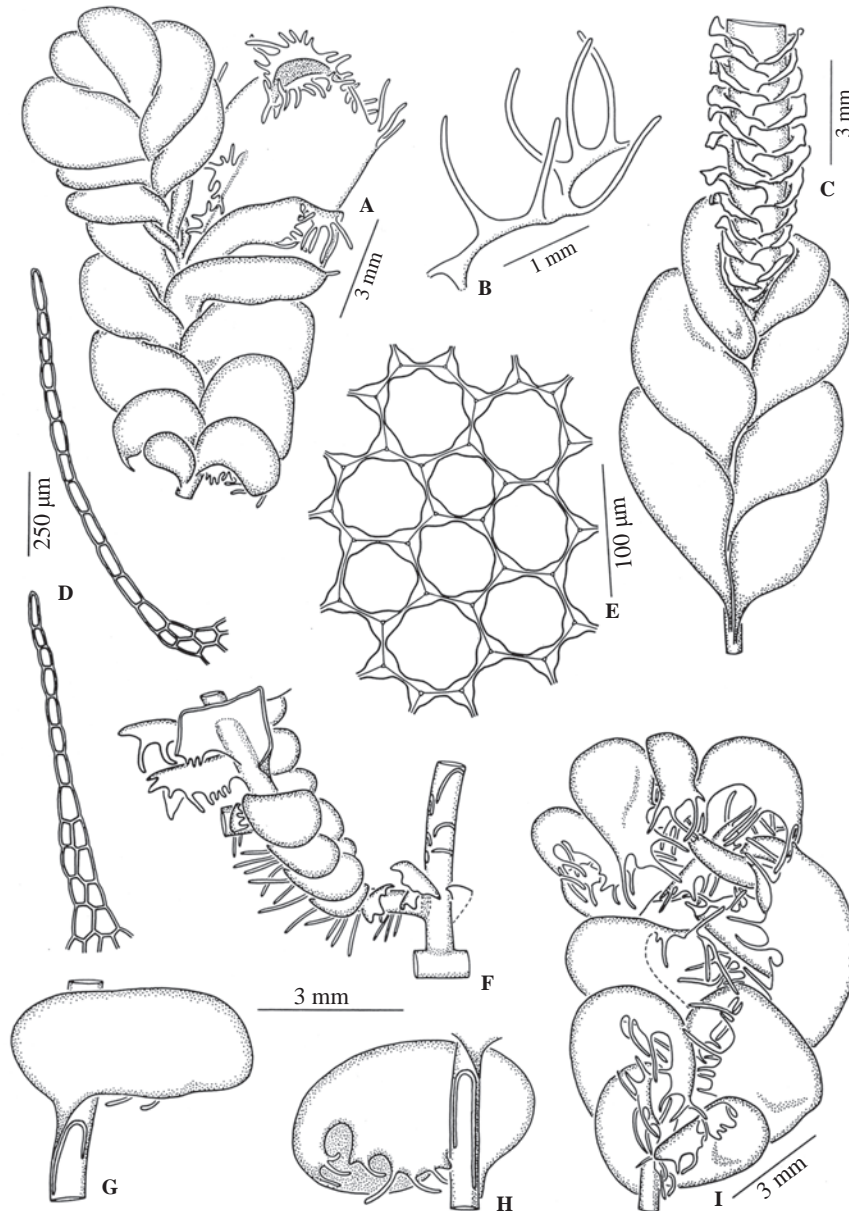


Figure 2. *Plagiochila cucullifolia* (= *Szweykowskia cucullifolia*). A: Portion of female plant in dorsal view, with mature perianth and one innovation; B: Portion of leaf margin with long-linear teeth; C: Portion of male plant in dorsal view, showing the basal part of the long male spike; D: Teeth of leaves; E: Midleaf cells; F: Base of stem showing lateral-intercalary branching (some leaves removed); G,H: Leaves in lateral view; I: Upper portion of plant in ventral view. All drawings by E.M. Reiner-Drehwald. Reproduced from *Fragmenta Floristica and Geobotanica* with permission of the copyright-holder.

1985: Lam. XII). Alexander von Humboldt and Aimée Bonpland collected *P. adianthoides* (Sw.) Lindenb. in Cauca (Kunth, 1822). The first major contribution to our knowledge of Colombian *Plagiochila* was by Gottsche (1864) who reported 25 *Plagiochila* species, many of them new to science, based on collections of Alexander Lindig and José Jerónimo Triana made mainly in Cundinamarca. Further species from Colombia were reported by Jack & Stephani (1892), Stephani (1901-1905), Herzog (1932, 1934, 1955), Robinson (1967), Winkler (1976) and others. In total, 44 species of *Plagiochila* were described as new to science based on specimens from Colombia. However, only eight of these are currently accepted (*P. amicta*, *P. cleefii*, *P. cuatrecasii*, *P. cucullifolia*, *P. grandicrista*, *P. guevarai*, *P. paraphyllina*, *P. trichostoma*), the rest are considered synonyms.

In this paper, keys and descriptions are provided for the *Plagiochila* species occurring in Colombia. It is the first modern treatment of the genus for Colombia, and the first one for any tropical Andean country. The text was written in the framework of the forthcoming “Guide to the Liverworts and Hornworts of Colombia and Ecuador” (in prep.). An important basis for this study were the recent publications on the taxonomy and phylogeny of neotropical *Plagiochila* by J. Heinrichs and his associates (e.g., Groth, et al., 2002; Heinrichs, 2002; Heinrichs & Gradstein, 2000; Heinrichs, et al., 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2001b, 2002a, 2004a, 2004b, 2005a, 2005b; Müller, et al., 1999). For each species a brief description is provided together with data on types, synonyms (names used for Colombia), published illustrations, geographical distribution, habitat as well as a brief discussion of differentiating characters and taxonomic affinity. The descriptions are based on examination of herbarium specimens and on recent literature, while the distribution data are taken from Gradstein & Uribe (2015) with updates. For specimen citations the cited literature may be consulted. Nomenclatural changes that have occurred since the appearance of the latest checklist of *Plagiochila* of Colombia (Gradstein & Uribe, 2015) are listed in Appendix 1, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/272/1267>.

Among neotropical countries, Colombia has the largest number of *Plagiochila* species followed by Ecuador (53 species), Costa Rica (50 species) and Brazil (34 species) (Table 1). The high *Plagiochila* richness of Colombia may be explained by the enormous eodiversity of the country, viz. the large tracts of humid tropical montane forest and páramo habitats on three different Andean cordilleras reaching to well over 5000 m. The much lower diversity in Brazil, a country eight times larger than Colombia, is probably due to the lower elevation of the mountains, reaching to maximally 2994 m (Pico da Neblina).

On a global basis, China has the highest *Plagiochila* diversity (ca. 80 species), followed by Colombia (Table

Table 1. Number of *Plagiochila* species in different countries/regions of the world. Some species numbers are updated here, taking account of new synonymy.

Country/region	Number of accepted species	Reference
Colombia	57	this paper
Ecuador	53	Léon-Yanez et al. (2006)
Costa Rica	50	Dauphin (2005)
Brazil	34	Gradstein (2015b)
Guianas	20	Gradstein (1997)
Jamaica	23	Söderström et al. (2011)
Guadeloupe	20	Lavocat & Schäfer-Verwimp (2013)
Eastern North America	21	Schuster (1980)
Europe (incl. Macaronesia)	16	Schumacker & Vána (2005)
Tropical Africa	ca. 40	Heinrichs et al. (2005c)
China	ca. 80	So (2001)
Malaysia	46	Chua-Petit (2011)
Java	31	Söderström et al. (2010)
New Zealand	25	Glenny (1998)
New Caledonia	23	Thouvenot et al. (2011)

1). Species richness generally decreases towards higher latitudes with 25 species being found in New Zealand, 21 in Eastern North America and 16 in Europe.

The distribution of the species of *Plagiochila* in Colombia is still incompletely known (Table 2). *Plagiochila adianthoides*, *P. aerea*, *P. fuscolutea* and *P. raddiana* are recorded from ten or more departments and may be considered the most common *Plagiochila* species of Colombia. In contrast, 21 species or about 35% are only known from one or two departments; these include *P. bryhnii*, *P. cleefii*, *P. cuneata*, *P. distinctifolia*, *P. eggersii*, *P. fastigiata*, *P. grandicrista*, *P. gymnocalycina*, *P. heterophylla*, *P. husnotii*, *P. lingua*, *P. loriloba*, *P. paraphyllina*, *P. patriciae*, *P. patula*, *P. revolvens*, *P. rudischusteri*, *P. stricta*, *P. subundulata*, *P. tenuis* and *P. trichostoma*. Many of these species may be more common in Colombia than is currently known. Hundreds of unidentified *Plagiochila* collections are housed in Colombian herbaria and it may be expected that specimens of these “rare” species are among them. It is hoped that the present paper will stimulate the identification of the unidentified materials, leading to further improvement of our knowledge of *Plagiochila* in Colombia.

In terms of elevation (Table 2), about 95% of the species are found in humid Andean forests of Colombia, above 1000 m. Species richness peaks in the upper montane forest belt, between 2000–3000 m, where more than two third of the species have been recorded. In contrast, only 18 species (30%) are found in lowland rainforests, below 500 m. Two

Table 2. Distribution of *Plagiochila* species of Colombia. Abbreviations: A = tropical Andes, Afr = tropical Africa, Br = Brazil, Ca = Caribbean, CA = Central America, CR = Costa Rica, Eur = Western Europe, Mac = Macaronesia, N = Neotropics, nA = northern Andes.

Species of <i>Plagiochila</i>	Occurrence in Colombia (number of departments)	Elevation (m) in Colombia	World range
<i>adanthoides</i>	10	300-3400	N
<i>aerea</i>	12	100-3300	N
<i>alternans</i>	9	2000-3300	N
<i>amicta</i>	3	1400-3100	N
<i>bifaria</i>	7	450-4000	N, Eur
<i>breuteliana</i>	9	200-2700	N
<i>bryhni</i>	2	2000-2600	A
<i>canelensis</i>	3	2500-4000	A
<i>cleefii</i>	1	3150-4300	nA
<i>crinata</i>	8	1500-2300	N
<i>cuatrecasii</i>	3	3600-4200	nA
<i>cucullifolia</i>	4	1300-3000	nA
<i>cuneata</i>	1	2600	A
<i>deflexirama</i>	5	900-2800	N
<i>dependula</i>	5	3150-4300	nA
<i>disticha</i>	6	100-2000	N
<i>distinctifolia</i>	1	100-2600	N
<i>diversifolia</i>	4	500-2600	N
<i>dominicensis</i>	3	200-2500	N
<i>eggersii</i>	1	30-400	Chocó, W Indies
<i>ensiformis</i>	8	2150-4000	nA
<i>exigua</i>	3	1800-3900	N, Afr, Eur
<i>fastigiata</i>	1	1680	CA, Colombia
<i>fuscolutea</i>	12	2200-4100	A
<i>grandicrista</i>	2	2000-2400	nA
<i>guevarai</i>	4	3300-3800	nA
<i>gymnocalycina</i>	2	300-1500	N
<i>heteromalla</i>	2	1200-3900	A
<i>heterophylla</i>	2	1150-3400	N, Eur
<i>husnotii</i>	1	30	N
<i>laetevirens</i>	4	800-3000	N
<i>lingua</i>	1	750	A, Br
<i>longispina</i>	8	2700-4050	A, Mac
<i>loriloba</i>	1	2900-3300	Colombia, CR
<i>macrostachya</i>	6	30-3000	N
<i>montagnei</i>	5	100-2600	N
<i>ovata</i>	5	3000-4000	A
<i>pachyloma</i>	6	2000-4100	nA
<i>papillifolia</i>	4	2000-3600	N, Mac

<i>paraphyllina</i>	2	3000-3700	nA
<i>patriciae</i>	1	3500	nA
<i>patula</i>	2	960-2800	N
<i>punctata</i>	4	1600-4300	N, Afr, Eur
<i>raddiana</i>	11	50-3300	N
<i>revolvens</i>	1	3150-4300	nA
<i>rudischusteri</i>	1	1500-1600	nA
<i>rutilans</i>	6	300-3200	N
<i>stricta</i>	2	100-2400	N, Afr, Mac
<i>subplana</i>	7	100-1900	N
<i>subundulata</i>	1	2040	Br, Colombia
<i>superba</i>	9	1000-3200	N
<i>tabinensis</i>	4	1500-3100	A
<i>tamariscina</i>	3	180-2000	N
<i>tenuis</i>	2	750-3500	N
<i>trichostoma</i>	2	1900-4000	A
<i>turgida</i>	3	1800-3500	nA
<i>vincentina</i>	8	80-2200	N

of these, *P. husnotii* and *P. eggersii*, are only known from the Chocó; the latter species is newly recorded here from Colombia. Sixteen species, finally, occur in the páramo belt and six of these, *P. cleefii*, *P. cuatrecasii*, *P. dependula*, *P. guevarai*, *P. paraphyllina* and *P. revolvens*, are largely exclusive to páramo.

Almost half of the Colombian *Plagiochila* species (25) are widely distributed in the Neotropics and seven species occur also in Africa and/or Western Europe. Most of the remaining species are Andean taxa (23); some of these are distributed from Bolivia to Mexico but the majority (14 species) are largely restricted to the northern Andes, which is the centre of diversity of *Plagiochila* in the New World. Three northern Andean species, *P. cleefii*, *P. cuatrecasii* and *P. revolvens*, are rare páramo taxa which are only known from a few collections from Colombia and Ecuador. Two species, *P. husnotii* and *P. eggersii*, occur at low elevations in the West Indies and along the Pacific coast of Colombia and Central America. Based on the present data, none of the *Plagiochila* species accepted here are endemic to the country.

The neotropical species of *Plagiochila* have been classified into nine sections based on morphological and molecular evidence (Heinrichs, 2002; Söderström, 2015). Based on this classification, the *Plagiochila* species of Colombia may be arranged as follows:

Section Adianthoideae Lindenb.: *P. adianthoides*, *P. cristata*, *P. grandicrista*.

Section Arrectae Carl: *P. bifaria*, *P. cleefii*, *P. cuatrecasii*, *P. eggersii*, *P. pachyloma*, *P. papillifolia*, *P. punctata*, *P. revolvens*, *P. stricta*, *P. subundulata*, *P. tenuis*.

Section Cucullatae Schiffn.: *P. subplana*.

Section Denticulatae Schiffn. (= section *Alternantes* Carl; fide Söderström, 2015): *P. alternans*, *P. ovata*.

Section Fuscoluteae Carl: *P. aerea*, *P. dependula*, *P. fuscolutea*, *P. heterophylla*, *P. paraphyllina*, *P. rudischusteri*, *P. tabinensis*.

Section Glaucescentes Carl: *P. diversifolia*, *P. longispina*.

Section Heteromallae Lindenb. (= *Plagiochila* section *Rutilantes* Carl, syn. nov.): *P. bryhnii*, *P. cuneata*, *P. exigua*, *P. gymnocalycina*, *P. heteromalla*, *P. loriloba*, *P. rutilans*, *P. trichostoma*.

Most authors use the name *Plagiochila* sect. *Rutilantes* (Type: *P. rutilans* Lindenb.) but the earliest name of this group is *Plagiochila* sect. *Heteromallae* (Type: *P. heteromalla* [Lehm. & Lindenb.] Lindenb.). This synonymy is supported by the conspecificity of *P. oreotropha* Spruce – a member of sect. *Rutilantes* (Heinrichs, 2002) – and *P. heteromalla* Lindenb. (Gradstein, 2015a).

Section Hylacoetes Carl: *P. amicta*, *P. breuteliana*, *P. canelensis*, *P. cucullifolia*, *P. dimorpha*, *P. dominicensis*, *P. ensiformis*, *P. guevarai*, *P. husnotii*, *P. macrostachya*, *P. patriciae*, *P. superba*, *P. turgida*, *P. vincentina*.

Section Vagae Lindenb.: *P. deflexirama*, *P. disticha*, *P. distinctifolia*, *P. fastigiata*, *P. laetevirens*, *P. lingua* Steph. (?), *P. montagnei*, *P. patula*, *P. raddiana*, *P. tamariscina*,

Taxonomic revisions have been carried out of the neotropical members of the sections *Adianthoideae*, *Cucullatae*, *Denticulatae*, *Fuscoluteae*, *Glaucescentes* and *Hylacoetes* (Heinrichs, 2002; Heinrichs, et al. 1999, 2002b; Müller, et al., 1999); the remaining sections are less studied and need more work. It is recommended that future taxonomic work should focus on the less well-known groups.

Key to species of *Plagiochila* from Colombia

A few species not known from Colombia but recorded from neighbouring areas have also been included in the key. Note: leaf characters should be examined on mature, vegetative stem leaves, not on branch leaves or on leaves near the gynoeceum. Branching type should not be studied on innovations (= branches originating below the perianth). Juvenile plants cannot be identified with certainty with this key.

- 1. Leaves modified into a swollen sac (Fig. 2). *P. cucullifolia*
- 1. Leaves not modified into a swollen sac. 2
- 2. Stem apex with conspicuous, yellowish-green clusters of flagelliform branchlets (resembling miniature cauliflower), producing numerous minute lanceolate caducous leaves. Ecuador and Costa Rica, not yet known from Colombia [*P. ecuadorica* (Inoue) L.Söderstr.]

- 2. Stem apex without yellowish-green clusters of flagelliform branchlets. 3
- 3. Ventral leaf margin strongly undulate to at least the middle of the leaf *P. fastigiata*
- 3. Ventral leaf margin not undulate or slightly undulate at the base only 4
- 4. Stems with many leaf fragments (except near apex), upper half of leaves usually broken off 5
- 4. Stems not with many leaf fragments 8
- 5. Plants robust, 5-7 mm wide. Branches predominantly terminal. Ventral leaf bases ampliate. Bolivia, Peru and Ecuador, not yet known from Colombia [*P. buchtiniana* Steph.]
- 5. Plants less than 5 mm wide. Branches intercalary or lacking. Ventral leaf bases not ampliate 6
- 6. Leaves ± transverse, widest in the lower half, margins with 5-20 teeth. Leaf base with a vitta. Cells with large trigones *P. bifaria*
- 6. Leaves obliquely to widely spreading, widest in the upper half, deeply 2-4-lobed, margins ± entire. Leaf base without vitta. Cells with small trigones 7
- 7. Leaves distant, 2-3-lobed. Leaf cells 20-32 µm wide in midleaf *P. cuneata*
- 7. Leaves imbricate, deeply 3-4-lobed. Leaf cells 25-43 µm wide in midleaf *P. loriloba*
- 8. Leaf margin with a brownish border of larger, thicker-walled cells and with numerous sharp, linear teeth. Leaves transverse, vitta present. Leaf cells small (except for the border and vitta cells), 15-25 µm, subisodiametric *P. pachyloma*
- 8. Leaf margin with brownish border of larger, thicker-walled cells. Plants different 9
- 9. Stems bluish near stem apex. (Leaves with long-ciliate teeth all around the margins) *P. longispina*
- 9. Stems green or brownish near apex, not bluish 10
- 10. Stem leaves of mature plants with 0-3 teeth 11
- 10. Stem leaves of mature plants mostly with more than 3 teeth 31
- 11. Stem leaves linear-lanceolate, 5-10× longer than wide *P. rudischusteri*
- 11. Stem leaves not linear-lanceolate, less than 5× longer than wide 12
- 12. Cuticle papillose 13
- 12. Cuticle smooth 15

13. Plants robust, stems 4-25 cm long. Leaves entire, transverse, wider than long *P. dependula*

13. Plants small, stems 1-2 cm long. Leaves bifid, obliquely to widely spreading, longer than wide 14

14. Leaves narrowly oblong, ca. 2× longer than wide, bifid ...
..... *P. tenuis*

14. Leaves ovate to ovate-oblong, 1-1.5(-1.7) × longer than wide, bifid and usually with a few additional small teeth
..... *P. papillifolia*

15. Leaves transverse to obliquely spreading. Leaf base with a vitta. In páramo 16

15. Leaves obliquely to widely spreading. Leaf base with or without vitta. In forests and páramo 17

16. Margin of leaf apex revolute. Leaves wider than long
..... *P. revolvens*

16. Margin of leaf apex ± plane. Leaves longer than wide
..... *P. cleefii*

17. Ventral leaf bases ampliate, usually forming a high crest. Leaves ovate-triangular. Plants robust, 5-10 mm wide 18

17. Ventral leaf bases not ampliate. Leaves ovate-oblong or lingulate. Plants smaller, 0.5-5(-6) mm wide 21

18. Leaf cells 20-35 µm wide in midleaf. Dorsal leaf bases very longly decurrent, concealing the stem 19

18. Leaf cells larger, 35-60 µm wide in midleaf. Dorsal leaf bases shortly or longly decurrent 20

19. Dorsal surface of stem with small, toothed paraphyllia near the dorsal leaf base *P. paraphyllina*

19. Dorsal surface of stem without paraphyllia
..... *P. fuscolutea*

20. Ventral leaf base shortly and narrowly decurrent, the decurrent part 1 cell wide *P. ensiformis*

20. Ventral leaf base longly and broadly decurrent, the decurrent part several cells wide *P. guevarai*

21. Plants 3-6 mm wide, leaves oblong 22

21. Plants smaller, 0.5-2(-2.5) mm wide, leaves ovate to oblong 25

22. Midleaf cells distinctly elongate, many cells at least 2× as long as wide. Leaf apex with 2-3 large teeth 75

22. Midleaf cells shorter, 1-1.7× as long as wide. Leaf apex entire or with a few small teeth, occasionally bifid 23

23. Branching intercalary. Leaf apex bifid *P. heterophylla*

23. Branching terminal. Leaf apex entire or with a few small teeth, not bifid 24

24. Leaves ovate-lingulate, horizontally spreading. Leaf bases longly decurrent. Ventral leaf base with a shoulder
..... *P. patula*

24. Leaves narrowly oblong, ventrad. Leaf bases shortly decurrent. Ventral leaf base without shoulder. Ecuador; not yet known from Colombia [*P. macrifolia* Taylor]

25. Leaf apex entire 26

25. Leaf apex bifid or trifid 27

26. Plants very small, less than 1 mm wide. Leaves ovate-orbicular or subquadrate. Leaf bases hardly decurrent. In páramo, above 3000 m *P. cuatrecasii*

26. Plants larger. Leaves ovate-oblong. Leaf bases distinctly decurrent. At low elevations (below 1500 m) *P. lingua*

27. Cuticle finely papillose. Leaves narrowly oblong, about 2× longer than wide *P. tenuis*

27. Cuticle smooth. Leaves ovate to obtusely to oblong ...
..... 28

28. Leaves fragmenting, part of the leaf lamina and/or teeth broken off *P. cuneata*

28. Leaves caducous or not caducous, but never fragmenting
..... 29

29. Leaves ovate, 1-1.5× longer than wide. Leaf bases ± not decurrent *P. exigua*

29. Leaves more elongate, 1.5-2.5× longer than wide. Leaf bases decurrent 30

30. Leaves caducous, apex bifid and ventral margin with one or more teeth. Leaf cells conspicuously elongate, many cells ca. 2× longer than wide Small form of *P. aerea*

30. Leaves not caducous, apex bifid and ventral margin entire. Leaf cells not or slightly elongate, 1-1.5× longer than wide. Central America and Venezuela, not yet known from Colombia [*P. bicuspidata* Gottsche]

31. Dorsal leaf margin toothed near the base (to be observed on vegetative leaves, not on leaves near the gynoecea). Plants robust 32

31. Dorsal leaf margin not toothed near the base. Plants small or robust 42

32. Leaves orbicular, with 100-250 small teeth all around ...
..... *P. ovata*

32. Leaves not orbicular, with less than 100 teeth 33

33. Branching mostly terminal. Teeth very long, to 15 cells long. Underleaves present *P. longispina*

33. Branching intercalary. Teeth short or long. Underleaves ± lacking 34

34. Dorsal surface of stem with small, toothed paraphyllia (sometimes only few) *P. paraphyllina*

34. Dorsal surface of stem completely smooth, without paraphyllia 35

35. Leaves 1-1.4× longer than wide 36

- 35. Leaves 1.4-2× longer than wide 36
- 36. Leaves subopposite. Dorsal and ventral leaf bases shortly decurrent *P. turgida*
- 36. Leaves alternate. Dorsal and ventral leaf bases longly decurrent *P. patriciae*
- 37. Ventral leaf base toothed 38
- 37. Ventral leaf base entire 40
- 38. Ventral leaf base longly decurrent 39
- 38. Ventral leaf base shortly decurrent *P. husnotii*
- 39. Leaf base with vitta *P. breuteliana*
- 39. Leaf base without vitta *P. vincentina*
- 40. Ventral leaf base ampliate *P. canelensis*
- 40. Ventral leaf base not ampliate 41
- 41. Leaves asymmetrical, elongate ovate-triangular. Androecia terminal, in a cluster of several male branches. Montane forests *P. dominicensis*
- 41. Leaves ± symmetrical, ovate-oblong to rectangular. Androecia terminal or intercalary, singly, not in a cluster. Lowland and submontane rainforests *P. subplana*
- 42. Branching predominantly terminal, especially in the upper parts of the plants (a few intercalary branches may be present in the lower parts of the plant). Asexual reproduction by small propagula from ventral leaf surfaces or absent (rarely by caducous leaves: couplet 52) 43
- 42. Branching predominantly intercalary, or branches lacking. Asexual reproduction by caducous leaves, by leaf fragmentation, or absent 58
- 43. Plants pinnately branched 44
- 43. Plants dichotomously branched 45
- 44. Leaves subimbricate to imbricate, 1.1-1.8× longer than wide, widest near the base (below 1/3 of leaf length). Ventral leaf base weakly to strongly ampliate *P. deflexirama*
- 44. Leaves distant, 1.8-2.5× longer than wide, widest at 1/3-1/2 of leaf length (not near the base). Ventral leaf base not ampliate *P. tamariscina*
- 45. Ventral leaf bases distinctly ampliate, ± concealing the stem 46
- 45. Ventral leaf bases not or weakly ampliate, not concealing the stem 50
- 46. Ventral leaf base ± entire, longly decurrent 47
- 46. Ventral leaf base toothed, shortly decurrent 48
- 47. Leaves 1-1.4× longer than wide, often fragmented. Underleaves present. Rare species from high Andean forest and páramo (above 3000 m). Bolivia, Peru and Ecuador, not yet known from Colombia [*P. buchtiniana* Steph.]
- 47. Leaves 1.5-2.5× longer than wide, not fragmented. Underleaves absent or present. Common in lowland and montane rainforest areas (up to 3300 m) *P. raddiana*
- 48. Leaf apex bifid by 2 large teeth. Leaves elongate triangular, strongly toothed, with 15-60 teeth *P. cristata*
- 48. Leaf apex not bifid. Leaves ovate-lingulate, with 10-30 teeth 49
- 49. Teeth on ventral leaf base linear (1 cell wide except at base). Underleaves conspicuous, 0.5-1.5 mm long, with many cilia *P. disticha*
- 49. Teeth on ventral leaf base at least in part triangular (more than 1 cell wide). Underleaves absent or vestigial, to 0.6 mm long, with few cilia *P. montagnei*
- 50. Ventral leaf base distinctly toothed, teeth linear *P. disticha*
- 50. Ventral leaf base entire 51
- 51. Leaves mostly 1-1.5× longer than wide, horizontally spreading 52
- 51. Leaves mostly 1.5-2.5× longer than wide, horizontally spreading or ventrad [when in doubt try both leads] 53
- 52. Ventral leaf base with a shoulder (basal portion of ventral margin somewhat extended parallel to the stem before curving outwards). Underleaves absent. Stems not turning blackish-brown. Leaves ovate. Leaf cells with distinct trigones. Oil bodies colorless *P. laetevirens*
- 52. Ventral leaf base without shoulder. Underleaves usually present (small, to 1 mm long). Stems turning blackish-brown. Leaves ovate-oblong. Leaf cells without or with very small trigones. Oil bodies brown *P. diversifolia*
- 53. Leaves ampliate or with a shoulder at the ventral base (basal portion of ventral margin somewhat extended parallel to the stem before curving outwards). Leaf bases ± longly decurrent. Plants rather robust, more than 4 mm wide 54
- 53. Leaves not ampliate, without shoulder. Leaf bases shortly decurrent. Plants more delicate, 3-4(-5) mm wide 55
- 54. Midleaf cells large, 35-55 µm wide. Teeth on leaf margins long-linear, to 10 cells long *P. superba*
- 54. Midleaf cells smaller. Teeth on leaf margins shorter, triangular *P. patula*
- 55. Leaves horizontally spreading, rectangular, margins conspicuously parallel (dorsal and ventral margins almost straight). Common in Eastern Brazil, not yet known from Colombia [*P. crispabilis* Lindenb.]
- 55. Leaves ± ventrad, narrowly oblong, margins not conspicuously parallel (dorsal margin ± straight, ventral margin curved) 56

56. Leaf margin bordered by thicker-walled cells. Asexual reproduction by propagula from ventral leaf surfaces *P. distinctifolia*

56. Leaf margin not bordered by thicker-walled cells. Asexual reproduction by caducous leaves 57

57. Leaves with 2 large teeth at apex and smaller teeth on the ventral margin. Midleaf cells about 2× as long as wide. Very common and variable species *P. aerea*

57. Leaves with a few small teeth near apex, ventral margin entire. Midleaf cells shorter, 1-1.7× as long as wide. Rare species, known from Ecuador [*P. macrifolia*]

58. Leaves (sub)opposite 59

58. Leaves alternate 61

59. Plants delicate, 2-3 mm wide. Ventral leaf base not ampliate. Leaf bases distinctly connate *P. bryhnii*

59. Plants more robust, 4-10 mm wide. Ventral leaf base ampliate. Leaf bases approximate but not distinctly connate 60

60. Midleaf cells 35–55 μm wide. Leaves distinctly longer than wide. Leaf margin not bordered by thicker-walled cells. Androecia in a cluster of 2–8 male branches *P. macrostachya*

60. Midleaf cells smaller, 25–35 μm wide. Leaves about as long as wide. Leaf margin frequently bordered by thicker-walled cells. Androecia not in a cluster *P. heteromalla*

61. Ventral leaf base ampliate, at least on older, mature leaves. Plants large, (3-)5-10 mm wide 62

61. Ventral leaf base not ampliate. Plants small or large 73

62. Midleaf cells large, ca. 35-55 μm wide. Androecia usually in a cluster of 2-8 male branches 63

62. Midleaf cells smaller, 15-35 μm wide. Androecia not in a cluster 67

63. Leaves with less than 7 teeth 20

63. Leaves usually with more than 7 teeth 64

64. Ventral leaf base longly decurrent *P. patriciae*

64. Ventral leaf base shortly decurrent 65

65. Leaves about as long as wide (0.9-1.2× longer than wide) *P. canelensis*

65. Leaves distinctly longer than wide (1.2-1.8× longer than wide) 66

66. Teeth on leaf margin narrowly triangular, mostly more than 1 cell wide. Leaves ovate-oblong, with a broad apex ... *P. amicta*

66. Teeth on leaf margin linear, mostly 1 cell wide (except at the base). Leaves usually ovate-triangular with a narrow

apex, rarely ovate-oblong with a broad apex (in *P. superba* var. *macrotricha*) *P. superba*

67. Leaves about as long as wide (1-1.2 : 1), ventrad. Leaf base with a vitta. *P. trichostoma*

67. Leaves distinctly longer than wide (1.2-2.5 : 1). Leaf base without vitta (vitta present in *P. deflexa*: couplet 71) 68

68. Leaves ovate-oblong, with a broad apex. Leaf margin with a yellowish border of thicker-walled cells. *P. adianthoides*

68. Leaves mostly ovate-triangular, with a rather narrow apex. Leaf margin without border of thicker-walled cells 69

69. Mature stem leaves 1.8–2.5× longer than wide, ventral leaf base toothed or entire 70

69. Mature stem leaves 1.2-1.8× longer than wide, ventral leaf base entire 71

70. Ventral leaf base toothed, scarcely decurrent. Leaf apex usually with 1-2 conspicuously larger teeth *P. cristata*

70. Ventral leaf base entire, longly decurrent. Leaf apex not with 1-2 conspicuously larger teeth (phenotype of *P. raddiana* with intercalary branching) *P. raddiana*

71. Ventral leaf bases weakly ampliate, not forming a crest. Leaf base with a vitta. Leaves contiguous or subimbricate, ventrad. Central America and Ecuador, not yet known from Colombia [*P. deflexa* Mitt.]

71. Ventral leaf bases strongly ampliate, forming a high crest. Leaf base without vitta. Leaves densely imbricate, horizontally spreading, not ventrad. 72

72. Dorsal leaf bases very longly decurrent, completely concealing the stem. Leaf apex bifid. Plants very robust, 5-11 mm wide. Common species of upper montane forest and páramo, 2500-4100 m *P. fuscolutea*

72. Dorsal leaf bases not very longly decurrent, not concealing the stem. Leaf apex not bifid. Plants less robust, 2.5-5 mm wide. Rare species of montane forest, usually below 2500 m *P. grandicrista*

73. Mature stem leaves conspicuously elongate, mostly more than 2× as long as wide 74

73. Mature stem leaves mostly less than 2× as long as wide [when in doubt try both leads] 78

74. Midleaf cells conspicuously elongate, many cells at least 2× longer than wide 75

74. Midleaf cells shorter, 1–1.5(–2)× as long as wide [when in doubt try both leads]. 76

75. Leaves widest at the base. Leaf apex deeply split into 2-4 long, ± linear teeth with a broad base, teeth 1/3-2/3 of leaf length, fragile. *P. tabinensis*

- 75. Leaves widest in the middle. Leaf apex with shorter teeth, the teeth not fragile *P. aerea*
- 76. Leaf cells finely papillose. Plants less than 2 mm wide ...
..... *P. tenuis*
- 76. Leaf cells smooth. Mature plants more than 2 mm wide ..
..... 77
- 77. Leaves horizontally spreading. Plants fresh with peppermint smell. Perianth base enveloped by bracts
..... *P. rutilans*
- 77. Leaves ventrad. Plants fresh without peppermint smell. Perianth base "naked", not covered by bracts
..... *P. gymnocalycina*
- 78. Leaf cells finely papillose 79
- 78. Leaf cells smooth 80
- 79. Plants 0.5-2 mm wide. Leaves less than 1 mm long, bifid and with 1-5 teeth on the ventral margin *P. papillifolia*
- 79. Plants larger, more than 2 mm wide. Leaves larger, not or slightly bifid, ventral margin with 5-16 teeth *P. stricta*
- 80. Leaves transverse to obliquely spreading, orbicular to ovate-oblong. Leaf base with a vitta 81
- 80. Leaves widely spreading. Leaf base with or without vitta 83

- 81. Leaves strongly caducous, parts of stems and branches without leaves *P. punctata*
- 81. Leaves not caducous, sometimes fragmented (teeth or upper half of leaf broken off) 82
- 82. Leaf cells thin-walled, with very small trigones. Leaves with 2-7 small teeth, the teeth only 1-2(-3) cells long. Very rare species *P. subundulata*
- 82. Leaf cells with large trigones. Leaves with 2-3 large teeth at apex and 2-15 usually smaller teeth on the ventral margin, the teeth 2-10(-15) cells long. Common species
..... *P. bifaria*
- 83. Leaves ventrad, often caducous or with fragile teeth (Fig. 3). Plants small, 1.5-3(-4) mm wide 84
- 83. Leaves horizontally spreading, not caducous, teeth not fragile. Plants larger, 3-10 mm wide 86
- 84. Leaves not caducous. Margins of young, apical leaves with simple to pinnately branched teeth, the teeth highly fragile, leaves below apex with broken teeth (Fig. 3). In lowland rainforest along the Pacific coast *P. eggersii*
- 84. Leaves caducous. Teeth simple, never pinnately branched, fragile or not. In montane forest 85
- 85. Leaf base with a vitta. Leaves strongly caducous, 0.9-1.2(-1.5)× longer than wide. *P. punctata*

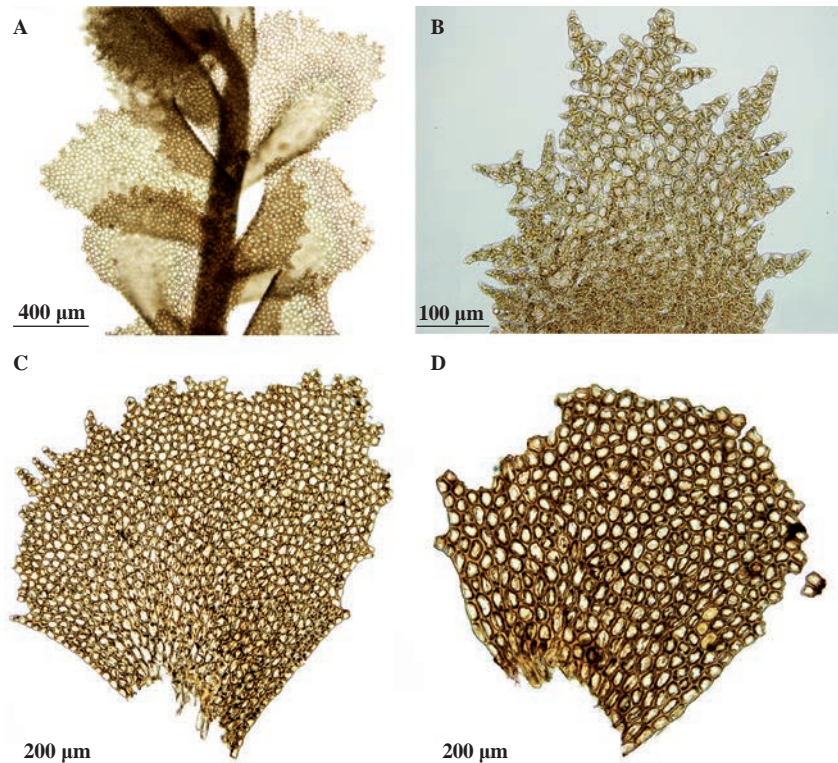


Figure 3. *Plagiochila eggersii*. A: Portion of plant in ventral view; B: Young leaf from shoot apex; C: Mature leaf from upper half of stem; D: Mature leaf from lower half of stem. Photographs by X.F. Cheng and R.L. Zhu.

85. Leaf base without vitta. Leaves caducous or not caducous, more than 1.2× as long as wide. Widespread in tropical America but not yet known with certainty from Colombia [*P. simplex* Lindenb.]
86. Leaf cells with large trigones. Leaves with 2-12 teeth, apex often bifid *P. heterophylla*
86. Leaf cells without or with very small trigones. Leaves usually with more than 12 teeth, apex not bifid 87
87. Ventral leaf base longly decurrent. Leaves ovate-oblong, with 20–100 teeth. In montane forests above 1800 m
..... *P. alternans*
87. Ventral leaf base not or shortly decurrent. Leaves rectangular to ovate-oblong, with (5–)10–40 teeth. In lowland and submontane forests, usually below 1000 m
..... *P. subplana*

Species descriptions

1. ***Plagiochila adianthoides*** (Sw.) Lindenb., Sp. Hepat. 2-4: 77. 1840; **Heinrichs** (2002). Fig. 1G

TYPE: Jamaica, leg. Browne (?) (S)

SYNONYMS: *P. esmeraldana* Steph., *P. densispina* Steph., *P. glomerulifera* Herzog, *P. keckiana* Steph., *P. procera* Lindenb.

ILLUSTRATIONS: **Heinrichs, et al.** (1998: Figs. 1-3), **Heinrichs** (2002: Plates 30-31), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 17).

HABITAT AND DISTRIBUTION: On bark, twigs and humic soil in montane forests, (300-)1500-3400 m. Recorded from Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Norte de Santander, Risaralda, Santander and Tolima. General distribution: widespread in tropical America but not known from Brazil.

Plants robust, 5-10 mm wide, branching scarce, intercalary. Leaves ovate-oblong with a broad apex, spreading or ± ventrad, ca. 1.2-1.8× longer than wide, shouldered or ampliate at the ventral base, margin usually with a yellowish border of elongate thicker-walled cells; with ca. 15-60 triangular to ciliate teeth along the ventral, apical and upper dorsal leaf margins, teeth to 10 cells long, not larger at apex; dorsal leaf base moderately decurrent, ventral base short decurrent. Leaf cells somewhat elongate, 15-35 µm wide in midleaf, with small to large, bluntly radiate trigones; leaf base without vitta; cuticle smooth. Androecia usually intercalary. Perianth base covered by bracts. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila adianthoides resembles *P. superba* and *P. amicta* but differs from the latter two species by smaller leaf cells, leaves usually with a border of thicker-walled cells and male branches not in a terminal cluster. Occasionally, the leaf border is only weakly developed or almost lacking. *Plagiochila adianthoides* may also be confused with *P. trichostoma*; for differences see under the latter species.

The epithet of *P. adianthoides* is often spelled “*adiantoides*” but the original spelling was “*adianthoides*” (**Gradstein**, 2015a).

2. ***Plagiochila aerea*** Taylor, London J. Bot. 5: 263. 1846; **Heinrichs** (2002). Fig. 1E,F

TYPE: Ecuador, leg. Jameson (E)

SYNONYMS: *P. alpina* Gottsche (incl. var. *grandis* Gottsche and var. *lindigiana* Gottsche), *P. bursata* (Desv.) Lindenb., *P. cobana* fo. *linearis* Herzog, *P. goethartii* Steph., *P. macvicarii* Steph.

ILLUSTRATIONS: **Heinrichs, et al.** (1998: Fig. 6), **Grolle & Heinrichs** (1999: Figs. 1-3), **Heinrichs** (2002: Plates 34-35), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 17).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark of trees, rock and soil in humid submontane and montane forests, also at forest margins and in scrubby vegetation, occasionally in wet lowland forest, 100-3300 m. Recorded from Amazonas, Antioquia, Arauca, Boyacá, Cauca, Chocó, Huila, Magdalena, Nariño, Quindío, Risaralda and Valle. General distribution: widespread in tropical America but not known with certainty from Brazil.

Plants small to medium-sized to rather large, (1-)3-6(-8) mm wide, pale green to brownish-green, branching usually intercalary, sometimes a few terminal branches present in the upper parts of the plant. Leaves wide-spreading, distant to imbricate, ventrad to almost horizontal, narrowly oblong, ca. 2.5-5× longer than wide, widest in the middle, apex usually with 1-2 rather long and narrow teeth, ventral margin with 0-5 smaller teeth mostly in the upper half; leaf bases shortly decurrent, ventral base not ampliate, entire. Leaf cells narrowly rectangular, (1-5-)2-2.5× longer than wide in midleaf, 30-60 x 15-30 µm, with radiate and often confluent trigones on longer walls; cuticle smooth to slightly rough by wax platelets (**Heinrichs**, 2002). Vegetative reproduction by caducous leaves.

Plagiochila aerea is a common and variable species, that is readily recognized by the narrowly oblong-rectangular, ventrad leaves with 1-2 large teeth at the apex and with several smaller teeth (sometimes only 1) on the ventral leaf margin, with elongate cells (ca. 1.5-2.5× longer than wide) and a ± smooth cuticle. The leaves are frequently caducous and the plants vary considerably size. Small, 1-2 mm wide plants with distant leaves and with only 2-3 teeth resemble *P. cuneata* but the latter species has fragmenting leaves with shorter cells. Larger plants resemble *P. distinctifolia*, *P. macrifolia* and *P. rutilans* but the latter three species have shorter leaf cells and shorter teeth at the apex. *Plagiochila aerea* is most closely related to *P. tabinensis* but the latter species is a more robust, brownish plant with leaves widest at the base and the apex more deeply split into long-linear, fragile lobe-like teeth.

3. ***Plagiochila alternans*** Lindenb. & Gottsche, in Gottsche, *et al.*, Syn. Hepat. 5: 648. 1847; **Müller, et al.** (1999).

TYPE: Mexico, leg. Liebmann (W)

SYNONYMY: *P. calomelanos* Spruce. *P. columbica* Gottsche, *P. grandifolia* Steph., *P. oblita* Steph., *P. semidentata* Steph.

ILLUSTRATION: **Robinson** (1967: Fig. 39 as *P. grandifolia*), **Müller, et al.** (1999: Figs. 3-4).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on humic soil and moist rock in humid montane forests, 2000-3300 m. Recorded from Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca, Magdalena, Nariño, Risaralda, Santander and Tolima. General distribution: mountains of tropical America.

Plants robust, 4-10 mm wide, with intercalary branching. Leaves widely and horizontally spreading, symmetrically ovate-oblong, ca. 1.2-2× longer than wide, not ampliate at the ventral base, with numerous, 20-70(-100) teeth in the upper half and sometimes along the whole ventral margin, lower half of dorsal margin entire; dorsal and ventral leaf bases rather longly and narrowly decurrent. Leaf cells isodiametric to elongate, ca. 25-40 µm wide in midleaf, thin-walled, without or with very small trigones; cuticle smooth. Capsules narrowly cylindrical, on a long seta (**Müller, et al.**, 1999). Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila alternans is somewhat similar to *P. subplana* but in the latter species the ventral leaf base is not or very shortly decurrent and the leaves are less densely toothed. Moreover, *P. subplana* is a lowland species, occurring usually below 1000 m. *Plagiochila alternans* is most closely related to *P. ovata* but leaves in *P. ovata* are orbicular (not ovate-oblong), distinctly ventrad and toothed all around by numerous small teeth (more than 100), and the leaf cells have large trigones. *Plagiochila ovata* occurs at somewhat higher elevation than *P. alternans*, above 3000 m.

4. ***Plagiochila amicta*** Steph., Bull. Herb. Boissier (sér. 2) 5: 895. 1905; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Colombia, leg. Wallis (G)

SYNONYM: *P. douinii* Steph., *P. subaequalis* Steph.

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plate 3).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark, rock or soil in montane forest and shrubby subpáramo, 1400-3100 m. Recorded from Antioquia, Cundinamarca and Magdalena. General distribution: mountains of tropical America.

Plants robust, 7-10 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves distant to imbricate, ovate-oblong with a broad apex, ca. 1.2-1.8× longer than wide, shouldered or ampliate at the ventral base, unbordered, with ca. 6-40 triangular teeth along the ventral, apical and upper dorsal margin, teeth rather short, to 6 cells long, more than one cell wide to near apex; dorsal leaf base moderately decurrent, ventral base shortly decurrent. Leaf cells large, ca. 35-55 µm wide

in midleaf, slightly elongate, with small radiate trigones; cuticle smooth. Androecia in a fan-shaped cluster at plant apex. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila amicta is very similar to *P. superba*, especially its var. *macrotricha*, but the teeth in *P. superba* are mostly linear (not triangular), of only 1 row of cells except near the base of the tooth.

5. ***Plagiochila bifaria*** (Sw.) Lindenb., Sp. Hepat. 5: 127. 1843; **Heinrichs, et al.** (1998, 2004a).

TYPE: Jamaica, leg. Swartz (S)

SYNONYMS: *P. arrecta* Gottsche, *P. centrifuga* Spruce, *P. echinella* Gottsche (?), *P. exesa* Lindenb. & Gottsche, *P. fragilis* Taylor, *P. horrida* Gottsche (*syn. nov.*), *P. increscentifolia* Spruce, *P. jaramilloi* H. Rob. (*syn. nov.*), *P. pinnatidens* Steph.

ILLUSTRATIONS: **Robinson** (1967: Figs. 56-58 as *P. "jaramillii"*), **Heinrichs, et al.** (1998: Fig. 8; 2004a: Figs. 3-5), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 78).

HABITAT AND DISTRIBUTION: common on bark, twigs, decaying wood, humic soil and rock in montane forests, scrub and páramo, 450-4200 m. Recorded from Amazonas, Boyacá, Cesar, Cundinamarca, Huila, Magdalena and Nariño. General distribution: mountains of tropical America, coast of Western Europe.

Plant small to medium-sized, 1-3 mm wide, stems long and almost unbranched, arising from a creeping rhizomatous base, stem apex curved, branches (when present) intercalary, sometimes flagelliform. Leaves distant to imbricate, transverse and laterally appressed to obliquely spreading, sometimes secund, asymmetrically ovate-suborbicular to ovate-oblong, 0.8-1.5× longer than wide, often fragmenting and upper part of leaf or teeth broken off, margin unbordered, dorsal margin usually recurved, ± straight and entire or with 1-2 teeth near apex, ventral margin arched and plane, ventral and apical margins with 3-20 short or long, linear to triangular to lobe-like teeth (to 10 cells long), leaf apex usually with 2-3 larger teeth; ventral and dorsal bases shortly to longly decurrent. Leaf cells subisodiametric in midleaf, ca. 15-30 µm wide, trigones conspicuous, often large; leaf base with a distinct vitta; cuticle ± smooth. Male plants smaller than female plants, male branches slender, singly or flabellate and in a fan-shaped cluster of up to ten male branches. Vegetative reproduction by leaf fragmentation.

Plagiochila bifaria is a common and highly variable species, which has been described under many different names. Characteristic are the transverse to obliquely spreading leaves with a ± entire, recurved dorsal margin, with 2-3 large apical teeth and with 2-15 linear to triangular to lobe-like teeth on the ventral margin, furthermore a distinct vitta, small cells (ca. 15-30 µm wide) with large trigones, and an almost smooth cuticle. The mature

perianth is cylindrical but immature perianths are typically shorter and broader, campanulate (**Heinrichs, et al.**, 1998). On the Galapagos Islands where only female plants occur (described as *P. spinifera* Taylor), the perianths are always campanulate.

Plagiochila bifaria resembles *P. retrorsa* Gottsche from Mexico and Central America but the leaves in *P. retrorsa* are more ovate-triangular in shape and more densely toothed, with teeth being present also along the dorsal margin (**Rycroft, et al.**, 2001). The latter species is not known from Colombia. The leaves in *P. bifaria* may be strongly fragmenting; *P. fragilis* Taylor is a phenotype of *P. bifaria* with broken leaves and *P. exesa* Lindenb. & Gottsche a phenotype with caducous teeth (**Gradstein**, 2015a).

Based on the original descriptions and illustrations, *P. horrida* Gottsche described from Mexico (**Gottsche**, 1963, p. 170, Tab. XIII) and *P. jaramilloi* H. Rob. described from Colombia (**Robinson**, 1967) are synonyms of *P. bifaria*. *Plagiochila echinella* Gottsche described from Colombia may be a further synonym of *P. bifaria*.

6. **Plagiochila breuteliana** Lindenb., Sp. Hepat. 5: 150. 1843; **Heinrichs** (2002).

TYPE: St. Kitts, leg. Breutel (W)

SYNONYMS: *P. breuteliana* var. *acutifolia* Herzog, *P. breuteliana* var. *novo-granatensis* Gottsche, *P. paucispinula* Herzog

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plates 6-7).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and soil in lowland and montane rainforest, 200-2700 m. Recorded from Antioquia, Boyacá, Caquetá, Chocó, Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Risaralda and Valle. General distribution: tropical America.

Plants rather robust, 5-8 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves elongate-triangular to oblong with a narrow or broad apex, ca. 1.4-2× longer than wide, shouldered to ampliate at the ventral base, unbordered, with ca. 20-80 triangular to ciliate teeth, the teeth to 10 cells long, dorsal and ventral leaf bases toothed and longly decurrent. Leaf cells large, ca. 35-55 µm wide in midleaf, slightly elongate, with small radiate trigones; leaf base with a vitta; cuticle smooth. Androecia usually intercalary on long branches (not in a fan-shaped cluster). Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila breuteliana is very similar to *P. vincentina*, both species have ampliate leaves with toothed and longly decurrent leaf bases (both dorsal and ventral). The two species differ mainly in the presence of a short vitta in the leaves of *P. breuteliana*.

7. **Plagiochila bryhnii** Steph., Biblioth. Bot. 87: 192. 1916.

TYPE: Bolivia, leg. Herzog (G)

SYNONYMS: *P. reclinata* Herzog, *Plagiochilion bryhnii* (Steph.) Inoue, *Plagiochilion reclinata* (Herzog) R.M.Schust.

ILLUSTRATION: **Herzog** (1932: Fig. 22 as *P. reclinata*), **Inoue** (1964: Fig. 6 as *Plagiochilion bryhnii*), **Gradstein, et al.** (2001: Fig. 63).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on moist earth banks in montane forest, 2000-2600 m. Recorded from Santander and Valle. General distribution: tropical Andes.

Plants delicate, 2-3 mm wide, branches scarce, lateral-intercalary. Leaves distant, secund, opposite and with connate dorsal and ventral bases, asymmetrically ovate, ca. 1.1-1.3× longer than wide, margin unbordered, with 7-14 teeth along the ventral and apical margin, often with 1-2 larger teeth at apex; dorsal leaf base longly decurrent, ventral leaf base shortly decurrent, not shouldered and not ampliate. Leaf cells rather small, 15-30 µm wide in midleaf, walls flexuose with small to somewhat swollen trigones, leaf border lacking, leaf base without vitta; cuticle smooth. Perianth base stalked and “naked”, not covered by bracts. Vegetative reproduction by caducous leaves.

Plagiochila bryhnii is the only neotropical species of *Plagiochila* with connate leaf bases. Opposite leaves are shared with *P. macrostachya* and *P. heteromalla* but in the latter two species the leaf bases are not connate, the plants are more robust (more than 4 mm wide) and the leaves are ± imbricate with a highly shouldered or ampliate ventral base and more strongly toothed margins (more than 15 teeth per leaf). In addition, *P. heteromalla* differs by bordered leaves and *P. macrostachya* by larger leaf cells.

Because of its opposite leaves, *P. bryhnii* was placed in *Plagiochilion* S.Hatt. by **Inoue** (1964). However, the latter genus differs by ventral branching (lateral in *Plagiochila*).

8. **Plagiochila canelensis** Steph., Bull. Herb. Boissier (sér. 2) 5: 926. 1905; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Ecuador, leg. Spruce (G)

SYNONYM: *P. axillaris* J.B.Jack & Steph.

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plates 8-9).

HABITAT AND DISTRIBUTION: On bark and soil in upper montane forest and páramo, 2500-4000 m. Recorded from Cauca, Chocó and Cundinamarca. General distribution: tropical Andes.

Plagiochila canelensis is similar to *P. superba* var. *superba* but differs in the leaves being hardly wider than long (ca. 1.2-1.6× longer than wide in *P. superba*). For a description of this taxon see **Heinrichs** (2002). *Plagiochila canelensis* is a rare species that has been collected a few times in upper montane forest and páramo.

9. **Plagiochila cleefii** Inoue, Stud. Cryptog. S. Peru: 95. 1987.

TYPE: Colombia, leg. Cleef (TNS)

ILLUSTRATION: **Inoue** (1987: Fig. 1).

HABITAT AND DISTRIBUTION: On soil and moist rock in humid páramo, 3200-4300 m. Recorded only from Meta (type). General distribution: northern Andes (Colombia, Ecuador).

Plants small to medium-sized, 1-2.5 mm wide, green to pale brown to dark-brown, stems long, not or little branched, apex curved, branches intercalary, creeping rhizomatous base lacking. Leaves distant to subimbricate, transverse to obliquely spreading, elongate-obovate, usually widest at or above the middle, 1.1-1.3× longer than wide, apex rounded to emarginate to short-bifid, ± plane, entire or with 1-2(-3) small teeth, dorsal and ventral margins entire, dorsal margin straight, slightly recurved, ventral margin curved, plane; dorsal base longly decurrent, ventral base shortly to longly decurrent. Leaf cells subisodiametric, 20-30 µm wide in midleaf, trigones small to large, not elongate along the cellwalls, cuticle smooth; leaf base with a short vitta. Perianth mouth finely toothed. Vegetative reproduction by caducous leaves.

Plagiochila cleefii is endemic to the páramo region of the northern Andes. In Colombia the species has only been recorded from Meta but may be more widespread. It approaches *P. revolvens* but the leaves in *P. revolvens* are wider than long and the margins more strongly recurved. Plants of *P. cleefii* with caducous leaves resemble *P. punctata* but the ventral leaf margin in *P. punctata* is toothed (usually entire in *P. cleefii*).

10. **Plagiochila cristata** (Sw.) Lindenb., Sp. Hepat. 1: 33. 1840; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Jamaica, leg. Swartz (S)

ILLUSTRATIONS: **Robinson** (1967: Fig. 28), **Heinrichs, et al.** (1998: Fig. 9), **Heinrichs** (2002: Plate 31), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 79).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and rock in humid montane forests, 1500-2300 m. Recorded from Antioquia, Chocó, Cundinamarca, Magdalena, Risaralda, Santander, Tolima and Valle. General distribution: mountains of tropical America.

Plants robust, 4-8 mm wide, branches scarce, intercalary, occasionally terminal. Leaves elongate-triangular to rectangular, conspicuously narrowed to a truncate and usually bifid apex, 1.8-2.5× longer than wide, ventral base strongly ampliate-cristate, forming a conspicuous crest, margin unbordered, with ca. 15-60 triangular to ciliate teeth along the ventral, apical and upper dorsal margin, teeth to 6 cells long, at apex with 1-2 or more larger teeth (to 15 cells long); dorsal leaf base moderately decurrent, ventral base not or shortly decurrent. Leaf cells ca. 18-25 µm wide in midleaf, somewhat elongate, with rather large, radiate trigones; cuticle smooth. Androecia usually intercalary. Vegetative reproduction not observed.

By its narrowly elongate-triangular leaves (more than 1.8× longer than wide) with 1-2 large, apical teeth and an ampliate ventral base, *P. cristata* is a very distinct species that can hardly be confused with any other species.

11. **P. cuatrecasii** H. Rob., The Bryologist 70: 47. 1967.

TYPE: Colombia, leg. Cuatrecasas (US)

ILLUSTRATION: **Robinson** (1967: Figs. 48-51).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on soil in humid páramo, 3600-4200 m. Recorded from Boyacá, Meta and Risaralda. General distribution: northern Andes.

Plants very small, usually less than 1 mm wide, stems to 3 cm long, hardly branched (branching intercalary), without rhizomatous base. Leaves distant, spreading, orbicular to ovate to subquadrate, apex rounded to retuse, margins entire, plane or dorsal margin slightly recurved; leaf bases hardly decurrent. Leaf cells ca. 20-25 µm wide in midleaf, trigones large, cuticle smooth. Perianth obovate to cylindrical, perianth mouth entire or with small teeth. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila cuatrecasii is endemic to páramo of the northern Andes and one of the smallest species in the genus. By its entire leaves *P. cuatrecasii* approaches *P. cleefii* and *P. revolvens*, which are also confined to páramo. The latter two species, however are readily separated from *P. cuatrecasii* by their larger size (plants more than 1 mm wide) and transverse leaves with recurved dorsal margin and longly decurrent dorsal base.

Plagiochila cuatrecasii is confusingly similar to *Leptoscyphus cuneifolius* (Hook.) Mitt. which occurs in the same habitat. However, *L. cuneifolius* has underleaves (lacking in *P. cuatrecasii*).

12. **Plagiochila cucullifolia** J.B. Jack & Steph., Hedwigia 31: 24. 1892; **Heinrichs** (2002). Fig. 2

TYPE: Colombia, leg. Wallis (G)

SYNONYM: *Szweykowskia cucullifolia* (J.B. Jack & Steph.) Gradst. & M.E. Reiner

ILLUSTRATION: **Gradstein & Reiner-Drehwald** (1995: Fig. 1 as *Szweykowskia cucullifolia*), **Gradstein, et al.** (2001: Fig. 63 as *S. cucullifolia*), **Heinrichs** (2002: Plate 10).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark of trees and shrubs in humid cloud forest areas and bogs, 1300-3000 m. The species usually grows in rather open habitats (exposed canopy branches, forest margins, road sides) in somewhat disturbed environments. Recorded from Antioquia, Chocó, Huila and Nariño. General distribution: northern Andes, Costa Rica.

Plants robust, 6-10 mm wide, swollen, pale yellowish-brown, ± unbranched. Leaves suborbicular, strongly convex and saccate, margins curved downwards, numerous (to 45)

long-linear teeth, the teeth 5-20 cells long and mostly 1 cell wide (except at the base). Leaf cells very large, ca. 50-80 μm wide in midleaf, cuticle smooth. Androecia terminal to intercalary, male branches not in a fan-shaped cluster. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila cucullifolia is a very distinct species that is immediately recognized by strongly swollen, yellowish-brown plants with leaves modified into a sac. The leaf margins bear numerous long-linear teeth and the leaf cells are very large. An unusual form with flattened leaves from southern Ecuador has been described as *P. cucullifolia* var. *anomala* Heinrichs & Gradst. (Heinrichs, et al., 2003).

13. **Plagiochila cuneata** Lindenb. & Gottsche, in Gottsche, et al., Syn. Hepat. 5: 632. 1847.

TYPE: Mexico, leg. Liebmann (C lectotype)

SYNONYM: *P. rara* Gottsche

ILLUSTRATION: Groth, et al. (2002: Fig. 2), Heinrichs, et al. (2004c: Fig. 1).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on exposed or shaded bark and rock in humid montane forest vegetation, ca. 2600 m (type of *P. rara*). Recorded once from Cundinamarca (as *P. rara*). General distribution: Mexico to Bolivia.

Plants small, 1-1.5 mm wide, with a strong peppermint smell, branches scarce, intercalary. Leaves rather distant, obliquely to widely spreading, elongate obtuse to narrowly oblong, deeply bifid to trifid to 1/4-1/3 of leaf length and with or without an additional tooth near the apex, leaves usually strongly fragmenting, upper part of leaves often broken, margins entire, bases shortly decurrent. Leaf cells isodiametrical to somewhat elongate, 1-1.5 \times longer than wide, 20-32 μm wide in midleaf, thin-walled with small trigones; cuticle smooth. Vegetative reproduction by leaf fragmentation. Female bracts slightly larger than leaves and more strongly toothed. Perianth base free, not covered by bracts.

Plagiochila cuneata is only known from Colombia based on a poorly developed specimen, collected near Choachi around 1860 by Lindig and described by Gottsche (1864) as *P. rara*. The latter species was reduced to synonym under *P. cuneata* by Heinrichs, et al. (2004c). No further collections of *P. cuneata* are known from Colombia. The species is recognized by the small plants with a strong peppermint smell (fresh material) and with \pm distant, elongate obtuse leaves, which are deeply 2-3-lobed (to 1/4-1/3 of leaf length) and strongly fragmenting. The upper part of the leaves is often broken.

Plagiochila cuneata may be confused with *P. aerea* but the leaves in the latter species are caducous, not fragmenting, the cells are more elongate in midleaf (1.5-2.5 \times longer than wide), and the plants lack a peppermint smell (Grolle & Heinrichs, 1999; Groth, et al., 2002).

Plagiochila cuneata is closely related to *P. loriloba*; both species have a strong peppermint smell and strongly fragmenting leaves. However, *P. loriloba* is a more robust plant (to 2.5 mm wide) with more imbricate, deeply 3-4-lobed leaves (2-3-lobed in *P. cuneata*) and larger leaf cells, 25-43 μm wide in midleaf (Groth, et al., 2002). Small forms of *P. cuneata* resemble *P. bicuspidata* Gottsche from Central America, Venezuela and Chile, but the leaves in latter species are bifid (never trifid) and are not fragmenting (and not caducous either). *Plagiochila bicuspidata* Gottsche is not yet known from Colombia but may be expected there.

14. **Plagiochila deflexirama** Taylor, London J. Bot. 5: 262. 1846.

TYPE: Ecuador ("Peru"), leg. Jameson (G isotype)

SYNONYMS: *P. bryopteroides* Spruce, *P. dilatata* Steph., *P. filicina* Herzog, *subdeflexiramea* Herzog, *P. trollii* Herzog

ILLUSTRATION: Heinrichs, et al. (2002c: Fig. 1).

On bark and rotten wood in montane rainforest and cloud forest, 900-2800 m. Recorded from Antioquia, Boyacá, Casanare, Huila and Tolima. General distribution: Mexico to Bolivia.

Plants medium-sized to large, 3-5 mm wide, to 15 cm long, upper part of shoot pinnate to bipinnate by terminal branches, lower part pinnate or sparsely branched and sometimes with a few intercalary branches. Leaves (sub)imbricate, \pm ventrad, ovate to oblong, 1.1-1.8 \times as long as wide, widest near the base, conspicuously narrowed to apex, weakly to strongly ampliate, concealing the stem or not, apical and ventral margin sharply toothed, with ca. 10-25 teeth; dorsal leaf base rather longly decurrent, swollen, ventral leaf base shortly to moderately decurrent. Leaf cells isodiametric to elongate, 15-28 μm wide in midleaf, trigones conspicuous, elongate, on longer walls often subconfluent; cuticle smooth. Underleaves lacking. Vegetative reproduction by propagula from ventral leaf surfaces.

Plagiochila deflexirama is recognized by (bi)pinnate terminal branching; all other neotropical *Plagiochilas* with terminal branching are dichotomous except *P. tamariscina*. The latter species is a more delicate plant than *P. deflexirama*, with distant, more narrowly elongate leaves that are not ampliate (but sometimes shouldered). *Plagiochila bryopteroides* Spruce, *P. filicina* Herzog, *P. subdeflexiramea* Herzog and *P. trollii* Herzog are phenotypes of *P. deflexirama* with subimbricate leaves and weakly ampliate ventral leaf bases (Gradstein, 2015a).

15. **Plagiochila dependula** Taylor, London J. Bot. 5: 265. 1846; Heinrichs, et al. (2005a).

TYPE: Ecuador, leg. Jameson (FH)

SYNONYM: *Jamesoniella dependula* (Taylor) Steph.

ILLUSTRATION: Heinrichs, et al. (2005a: Figs. 4-5).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on humic soil, rock and leaning trunks in very moist dwarf forests near the forest line and in wet páramo, 3150-4300 m. Recorded from Cauca, Huila, Meta, Nariño and Risaralda. General distribution: northern Andes.

Plants medium-sized to robust, stems very long (to 25 cm long), almost unbranched stems. Leaves transverse and laterally appressed, reniform, 1.5-2.5× longer wide, apex rounded, margins entire, flat. Leaf cells isodiametric to elongate, 30-40 µm wide in midleaf, trigones large and swollen, leaf base with a broad, ill-defined vitta; cuticle papillose. Perianth mouth entire. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila dependula is readily recognized by the transverse, reniform leaves with entire margins and rounded apex. By its leaf shape and lack of teeth, *P. dependula* was sometimes considered a member of *Jamesoniella* (Spruce) F. Lees but clearly differs from the latter genus by the flattened perianth.

16. *Plagiochila disticha* (Lehm. & Lindenb.) Lehm. & Lindenb., in Lindenberg, Sp. Hepat. 2-4: 107. 1840; **Heinrichs & Gradstein** (2000).

TYPE: Guyana, unknown collector (W)

SYNONYMS: *P. blepharobasis* Herzog, *P. falcatoserrata* Herzog, *P. juruensis* Steph., *P. serrata* (Roth) Lindenb.

ILLUSTRATIONS: **Heinrichs & Gradstein** (2000: Fig. 2), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 76), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 17).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and rock in lowland and lower montane rainforests, 100-2000 m. Recorded from Amazonas, Meta, Nariño, Putumayo, Risaralda and Valle. General distribution: tropical America.

Plants medium-sized, 3-5 mm wide, dichotomous by terminal branching. Leaves widely and horizontally spreading, ovate-lingulate with a broad and longly decurrent dorsal base, 1.5-2.5× longer than wide, apex subtruncate, ventral leaf margin plane or undulate, ventral base ampliate or not ampliate, concealing the stem or not; apex and basal part of ventral leaf margin toothed, with 10-30 teeth, ventral base with few to numerous linear teeth of 1 row of cells; dorsal leaf base longly and broadly decurrent parallel to the mid-line of the stem, the decurrent part strongly swollen, ventral base shortly decurrent. Leaf cells isodiametric to elongate, 20-30 µm wide in midleaf, trigones conspicuous but not swollen, triangular to elongate, sometimes confluent on longer walls; cuticle smooth. Underleaves often conspicuous, 0.5-1.5 mm long, margins strongly ciliate. Vegetative reproduction by small plantlets (propagula) on ventral leaf surfaces.

Plagiochila disticha is very similar to *P. montagnei*, both species have terminal branching, ovate-rectangular leaves with a long-decurrent dorsal base, and toothed ventral leaf

bases. However, in *P. montagnei* the ventral leaf bases are toothed by triangular teeth or a mixture of triangular and linear teeth, whereas in *P. disticha* the teeth on ventral leaf bases are always linear, of 1 row of cells. Moreover, *P. disticha* often has conspicuous, to 1.5 mm long underleaves with numerous cilia, whereas in *P. montagnei* underleaves are absent or rudimentary, less than 0.6 mm long and with few cilia.

Plagiochila blepharobasis Herzog is a phenotype of *P. disticha* with ± undulate ventral leaf margins, strongly ampliate-ciliate ventral leaf bases and conspicuous underleaves (**Gradstein**, 2015a).

17. *Plagiochila distinctifolia* Lindenb., Sp. Hepat. 1: 17. 1839.

TYPE: Jamaica, leg. Swartz (W)

SYNONYMS: *P. diffusa* Steph., *P. lindigiana* Gottsche (*syn. nov.*), *P. miqueliana* Lehm. & Lindenb.

ILLUSTRATION: **Schuster** (1980: Figs. 608-609 as *P. diffusa*).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in moist forests, 100-2700 m. Recorded from Cundinamarca and Magdalena. General distribution: tropical America.

Plants small to medium-sized, 2-4 mm wide, dichotomous to subpinnate with few branches, branches predominantly terminal, intercalary branches few on older or broken stem portions. Leaves mostly distant (some leaves may be slightly imbricate), ± ventrad, ovate-oblong to lingulate, ca. 1.5-2.5× longer than wide, subsymmetrical, dorsal margin straight, ventral margin slightly arched, margins bordered by elongate, somewhat thicker-walled cells, toothed in the upper half with 4-15 triangular teeth, often 2-3 larger teeth present at apex (especially in young leaves); dorsal leaf base rather longly decurrent, swollen, ventral leaf base shortly decurrent, not ampliate. Leaf cells subsodiametric, 15-30 µm wide in midleaf, with rather small trigones, margin cells elongate and thicker-walled, forming a border; cuticle smooth. Vegetative reproduction by small plantlets (propagula) on ventral leaf surfaces.

Plagiochila distinctifolia is recognized by the delicate, dichotomously-branched plants with somewhat distant, ventrad, oblong leaves with a border of elongate, thicker-walled cells. The species closely resembles *P. macrifolia* but the leaves in the latter species are unbordered and much less toothed. *Plagiochila distinctifolia* may also be confused with *P. rutilans* but the latter species has intercalary branching, horizontally spreading leaves (not ventrad) without border and a strong peppermint smell (fresh plants).

Based on the description in **Heinrichs, et al.** (1999), *P. lindigiana* Gottsche should be a synonym of *P. distinctifolia*.

18. *Plagiochila diversifolia* Lindenb. & Gottsche, in Gottsche *et al.*, Syn. Hepat. 5: 640. 1847; **Heinrichs, et al.**, (2000b).

TYPE: Mexico, leg. Liebmann (W)

SYNONYMS: *P. glaucescens* Steph., *P. subdentata* Steph.

ILLUSTRATION: **Heinrichs, et al.** (2000b: Fig. 3).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark of trees and shrubs, occasionally on rock or moist soil, in montane forests, (500) 1000-2600 m. Recorded from Antioquia, Cundinamarca, Magdalena and Risaralda. General distribution: mountains of Central and tropical South America.

Plants rather robust, 5-9 mm wide, green to brownish-green with dark brown stems, dichotomous in the upper half by terminal branches, older stem portions with a few intercalary branches; stems usually very dark brown in color. Leaves horizontally spreading, ovate-oblong, 1.1-1.5(-1.8)× longer than wide, apex broadly rounded, margins toothed in the upper half by about 8-30 small to large teeth, teeth sometimes extending downwards but ventral base ± entire, dorsal margin entire except in the upper half; dorsal leaf base rather longly narrowly decurrent, the decurrent part often conspicuously swollen, ventral leaf base shortly decurrent, not ampliate and without high shoulder, ventral surface of stem clearly visible. Leaf cells subisodiametrical, 20-45 µm wide in midleaf, without or with small trigones; cuticle smooth; oil bodies brown. Underleaves present, to 1 mm long, deeply bifid. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila diversifolia is somewhat similar to *P. laetevirens* but differs from the latter species by the more robust plants with darker brown stems, leaves more elongate, ovate-oblong, with a broadly rounded apex, longly decurrent bases and no high shoulder, leaf cells without distinct trigones and with brown oil bodies, presence of underleaves and absence of vegetative reproduction. *Plagiochila diversifolia* may also be confused with forms of *P. deflexirama* with scarcely ampliate ventral leaf bases, but branching in *P. diversifolia* is dichotomous while being pinnate in *P. deflexirama*. Moreover, *P. diversifolia* usually has small underleaves (lacking in *P. deflexirama*).

19. **Plagiochila dominicensis** Taylor, London J. Bot. 5: 270. 1846; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Dominica, unknown collector (FH)

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plate 14).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and soil in humid montane forests, (200-)600-2500 m. Recorded from Chocó, Magdalena and Risaralda. General distribution: tropical America.

Plants rather robust, 5-10 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves asymmetrically elongate-triangular to oblong, ca. 1.5-2× longer than wide, shouldered but not ampliate at the ventral base, unbordered, with 25-65 triangular to linear teeth, the teeth to 7 cells long; dorsal leaf base usually densely toothed, rather shortly decurrent,

ventral base shortly decurrent, entire. Leaf cells large, ca. 30-55 µm wide in midleaf, elongate, with conspicuous, radiate trigones; leaf base without vitta; cuticle smooth. Androecia in a fan-shaped cluster at stem apex. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila dominicensis resembles *P. breuteliana*, *P. vincentina* and *P. turgida* by the toothed dorsal leaf base but the latter three species have strongly ampliate ventral leaf bases. Moreover, in *P. breuteliana* and *P. vincentina* the ventral leaf bases are toothed and longly decurrent, and the male branches are not arranged in a fan-shaped cluster at the stem apex. *Plagiochila dominicensis* may also be confused with *P. subplana* but in the latter species the leaves are rather symmetrically ovate-oblong and leaf cells are (sub) isodiametrical, without or with very small trigones.

20. **Plagiochila eggersii** Inoue, Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo, ser. B, 14: 138. 1988. Fig. 3

TYPE: Dominica, leg. J. Eggers (TNS)

SYNONYM: *P. pinnatispina* Gradst. in sched.

ILLUSTRATION: **Inoue** (1988: Figs. 3-5).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark of living and dead trees in undisturbed and disturbed lowland rainforest, 30-400 m. New to Colombia, found in two localities in the Chocó Department: Cartegui, leg. Gradstein 8784 (COL, GOET); Nuqui, El Amargal, leg. Gradstein 8840 (COL, GOET). Also new to Panama, near the Colombian border: Cerro Pirre, leg. Salazar Allen & S. R. Gradstein 9239 as *P. exesa*, see **Gradstein & Salazar Allen** (1992) (GOET, PMA, U). General distribution: Dominica (type) and along the Pacific coast of northern South America (Colombia, Panama).

Plants delicate, leafy shoots 1-2 cm long and 1-2 mm wide, green when fresh, pale brown when dry, ascending to erect, arising from a monotropically branched, creeping rhizomatous shoot beset with rudimentary leaves, the leafy shoots flexuose and often curved when dry, sparsely and irregularly branched by intercalary branches, shoot apex curved downward to the ventral side. Stems yellowish-brown, becoming darker brown in older portions of shoot, rigid, epidermis cells in surface view narrowly elongate, thick-walled; stems 150-180 µm in diameter, 8-10 cells across, in cross section made up of 35-40 cortex cells in 2 layers and with thick, yellowish-brown walls, surrounding 16-25 slightly larger, colorless medullary cells with thin walls. Rhizoids lacking on leafy shoots, present on stoloniform shoots, scattered. Leaves distant to contiguous, obliquely to widely spreading, strongly ventrad and somewhat secund, asymmetrically ovate to obtusate, 0.4-1.2 mm long × 0.3-1.0 mm wide, 1.1-1.3× longer than wide, not ampliate, dorsal leaf margin almost straight and entire, weakly recurved, ventral leaf margin arched, recurved at the base, ventral leaf base not expanded, dorsal and ventral leaf bases shortly decurrent; leaf margins with 10-40 teeth in

the upper half of leaf or almost all around except at ventral and dorsal bases, teeth on young, apical leaves to 15 cells long and 1-2 cells wide, becoming progressively smaller towards the base of the leaf, made up of rows of subquadrate to suborbicular cells with thin walls, teeth simple or (bi) pinnately branched in two or three dimensions, with several, 2-10 cells long pinnae, margins of teeth conspicuously crenulate; teeth very fragile and soon breaking off partially (fragmenting), margins of leaves below apex and lower down the stem with broken teeth, the broken teeth 1-3(-5) cells long and 1-2 cells wide. Leaf cells slightly elongate, 35-55 μm long and 25-33 μm wide in midleaf, with rather small, radiate trigones, cells becoming more elongate and thicker-walled towards leaf base, forming an ill-defined vitta, cells at leaf margin slightly smaller, leaf border lacking; cuticle smooth; oil bodies not seen. Underleaves lacking. Androecia terminal, bracts in ca. 5 pairs, contiguous, small, opposite bracts dorsally not overlapping, distal margins of bracts with a few broken teeth, bract cells \pm similar to leaf cells; antheridia 1 per bract, antheridial stalk biserial. Gynoecia and sporophytes not seen. Vegetative reproduction by teeth fragmentation from leaf margins.

Plagiochila eggersii is a rare species that was thus far only known from the type of Dominica. The plants are quite delicate and readily recognized by the strongly ventrad and somewhat secund, ovate-obcuneate leaves with numerous highly fragile teeth that are simple to pinnately branched and to 15 cells long on young leaves at the stem apex, but are broken and only 1-3 cells long on older leaves further down the stem. The peculiar, pinnately branched teeth of young leaves of *P. eggersii* set this new species well apart from other members of *Plagiochila*, which usually have simple teeth. By its ventrad, ovate-obcuneate leaves, small plant size and fragile teeth, *P. eggersii* approaches *P. cuneata* but the latter species is readily separated from *P. eggersii* by trifid leaves (with or without additional teeth) and unbranched teeth. Fragile teeth occur also in *P. bifaria* (= *P. exesa*) and *P. gymnocalycina* var. *surinamensis* (= *P. wolfii*) but the teeth in the latter two are not pinnate.

21. ***Plagiochila ensiformis*** Taylor, London J. Bot. 5: 265. 1846; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Ecuador ("Columbia"), leg. Jameson (FH)

SYNONYM: *P. jamesonii* Taylor

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plate 15).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on soil and tree bases in humid montane forest environments and páramo, 2150-4000 m. Recorded from Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Putumayo, Risaralda, Santander, Tolima and Valle. General distribution: northern Andes.

Plants robust, 5-9 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves alternate (rarely subopposite), broadly ovate-triangular, 0.8-1.2 \times longer than wide, ventral base ampliate,

margin entire or with a few small teeth (1-6) at apex; dorsal and ventral leaf base shortly decurrent. Leaf cells large, ca. 35-60 μm wide in midleaf, somewhat elongate, with rather large trigones; cuticle smooth. Androecia intercalary or in a fan-shaped cluster at plant apex. Vegetative reproduction not observed.

By its broadly ovate-triangular, ampliate leaves with subentire margins *P. ensiformis* resembles *P. fuscolutea* and *P. guevarai*, but *P. fuscolutea* has smaller leaf cells and longly decurrent dorsal leaf bases while *P. guevarai* differs by very longly and broadly decurrent ventral leaf bases.

22. ***Plagiochila exigua*** (Taylor) Taylor, London J. Bot. 5: 264. 1846.

TYPE: Ireland, leg. Taylor (E isotype)

SYNONYM: *Plagiochila corniculata* auct.

ILLUSTRATIONS: **Inoue** (1980: Fig. 1 as *P. corniculata*), **Schuster** (1980: Fig. 562 as *P. corniculata*).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and soil in humid montane forests and páramo, 1800-4000 m. Recorded from Cundinamarca, Risaralda and Tolima. General distribution: mountains of tropical America and Africa, coast of Western Europe.

Plants small, 1-1.5 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves wide-spreading, caducous, distant to subimbricate, ventrad, ovate, 0.5-0.1 mm long, ca. 1-1.5 \times longer than wide, deeply bifid to 1/4-1/3; leaf bases not or scarcely decurrent, leaf margins entire or the ventral margin with an additional tooth. Leaf cells isodiametric to slightly elongate, 17-25 μm wide in midleaf, 1-1.5 \times longer than wide, trigones small to large, not elongate, vitta lacking; cuticle smooth. Androecia intercalary. Gynoecia very rare (not seen). Vegetative reproduction by caducous leaves.

Plagiochila exigua is readily recognized by the small plants with short-ovate, bifid leaves with entire margins or with a tooth on the ventral margin. *Plagiochila exigua* somewhat resembles *P. bicuspidata* Gottsche from Central America, Venezuela and Chile and *P. punctata*, however the latter two species have decurrent leaf bases. Moreover, the leaves in *P. bicuspidata* are not caducous while those of *P. punctata* have a vitta and more than one teeth on the ventral margin.

23. ***Plagiochila fastigiata*** Lindenb. & Gottsche, Syn. Hepat. 5: 657. 1847.

TYPE: Mexico, leg. Liebmann (W?)

HABITAT AND DISTRIBUTION: On tree trunk, 1680 m. Recorded from Cauca (**Gradstein & Feuillet Hurtado**, in press). General distribution: Mexico, Costa Rica, Colombia.

Plants medium-sized, 2-3 mm wide, leafy stems arising from a creeping stolon, unbranched or dichotomous branched in the upper portion, intercalary branches sometimes present

in lower parts. Leaves obliquely and horizontally spreading, imbricate, broadly ovate to ovate-oblong, ca. 1-1.3× longer than wide, apex rounded, with 5-13 teeth along the apical and ventral margin, ventral base entire, ventral leaf margin conspicuously undulate from the base to the middle of the leaf or beyond; dorsal base longly decurrent, the decurrent part conspicuously swollen, ventral base entire, broadly decurrent and somewhat ampliate, forming a low crest. Leaf cells isodiametric to elongate, 15-25 µm wide in midleaf, trigones conspicuous, slightly swollen; cuticle smooth. Underleaves relatively large, to 1 mm long, margins strongly ciliate. Vegetative reproduction by small plantlets (propagula) on ventral leaf surfaces.

Plagiochila fastigiata is a little known Central American species that has been recorded from one locality in Cauca. The species is readily recognized by the strongly undulate ventral leaf margin and entire ventral leaf base. The species may be confused with *P. raddiana* but in the latter species the leaves are more elongate (1.5-2.5× longer than wide) and the ventral leaf margin is not undulate or slightly undulate at the base only. *Plagiochila fastigiata* is closely related to *P. corrugata* (Nees) Mont. & Nees from Brazil and East Africa but in the latter species the ventral leaf base is toothed (Heinrichs *et al.*, 2004b).

24. ***Plagiochila fuscolutea*** Taylor, London J. Bot. 5: 263. 1846; Heinrichs (2002).

TYPE: Ecuador ("Peru"), leg. Jameson (FH)

SYNONYMS: *P. gymnostoma* J.B. Jack & Steph., *P. irmscheri* Steph. p.p. (Heinrichs 2002), *P. triangulifolia* Steph.

ILLUSTRATION: Robinson (1968: Fig. 36), Heinrichs (2002: Plates 36-38).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on humic soil and bark in upper montane and subalpine cloud forest and in páramo, often growing in large cushions, 2200-4100 m. Recorded from Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Chocó, Cundinamarca, Magdalena, Meta, Nariño, Risaralda, Tolima and Valle. General distribution: tropical Andes.

Plants robust, 5-11 mm wide when flattened, branches scarce, intercalary. Leaves alternate, spreading or transverse and laterally appressed, broadly ovate-triangular to elongate triangular, narrowed to the apex from a very broad base, 0.7-1.5× longer than wide, apex rounded to acute to 2-3-toothed by large teeth, ventral base shouldered or ampliate-cristate, margins entire with a few teeth on the ventral margin (to 10); dorsal leaf base very longly decurrent, ventral leaf base shortly to longly decurrent. Leaf cells ca. 20-35 µm wide in midleaf, somewhat elongate, with large, swollen trigones; cuticle covered by small wax platelets, appearing smooth or weakly rough in the light microscope. Perianth mouth entire or with a few teeth. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila fuscolutea is a common and characteristic species of upper montane forests and páramo. By its broadly

triangular, subentire leaves *P. fuscolutea* resembles *P. ensiformis* and *P. guevarai* but the latter two species have larger leaf cells (ca. 35-55 µm wide in midleaf) and less longly decurrent dorsal leaf bases. *Plagiochila fuscolutea* is closely related to *P. paraphyllina* and but the latter species has small paraphyllia on the dorsal stem surface (lacking in *P. fuscolutea*).

25. ***Plagiochila grandicrista*** Steph., Bull. Herb. Boissier (sér. 2) 5 (2): 931. 1905; Heinrichs (2002).

TYPE: Colombia, leg. Lindig (G)

ILLUSTRATION: Heinrichs (2002: Plate 32).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on tree trunks in humid montane forests, 2000-2400 m. Recorded from Cundinamarca and Valle. General distribution: northern Andes, Central America.

Plants medium-sized, 2.5-5 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves ovate-triangular, 1.3-1.8× longer than wide, apex truncate, ventral leaf bases strongly ampliate forming a high crest, margins toothed in the upper half with ca. 5-20 narrowly triangular teeth, ventral and dorsal leaf bases entire; dorsal base longly decurrent, the decurrent part swollen, ventral base shortly decurrent. Leaf cells ca. 25-35 µm wide in midleaf, somewhat elongate, with rather large, swollen trigones; cuticle smooth. Androecia usually intercalary. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila grandicrista is closely related to *P. adianthoides* but differs from the latter species by leaf shape (leaves ovate-triangular with a broad base and narrow apex), fewer teeth (5-20) mostly in the upper half of the leaf, and absence of a leaf border. *Plagiochila grandicrista* approaches *P. cristata* and *P. deflexa* Mitt. but *P. cristata* has much more elongate leaves (more than 1.8× longer than wide) with two large teeth at apex and a toothed ventral base, whereas *P. deflexa* (Central America and Ecuador; not yet known from Colombia) differs by leaves weakly ampliate without high ventral crest, presence of a vitta at leaf base and usual presence of two larger teeth at apex.

26. ***Plagiochila guevarai*** H. Rob. ("*guevarii*"), Bryologist 70: 48. 1967; Heinrichs (2002).

TYPE: Colombia, leg. King, Guevara & Forero (US)

ILLUSTRATION: Robinson (1968: Fig. 52 as *P. guevarii*), Heinrichs (2002: Plate 17 as *P. guevarii*).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and humic soil in páramo, 3300-3800 m. Recorded from Cundinamarca, Meta, Risaralda and Tolima. General distribution: northern Andes.

Plants robust, 5-9 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves alternate, ovate-triangular, narrowed to the apex from a very broad base, 0.8-1.2× longer than wide, ventral base strongly ampliate, forming a high crest, margins entire or with a few teeth (1-6) at apex; dorsal and ventral leaf bases longly decurrent. Leaf cells large, ca. 35-60 µm wide

in midleaf, somewhat elongate, with rather large, swollen trigones; cuticle smooth. Androecia usually intercalary. Vegetative reproduction not observed.

By its subentire leaves *P. guevarai* resembles *P. ensiformis* and *P. fuscolutea*; for differences see under *P. ensiformis*.

27. ***Plagiochila gymnocalycina*** Lindenb., in d'Orbigny, Voy. Amér. Mérid., Bot. 7: 81. 1839.

TYPE: Brazil, leg. Beyrich (W)

SYNONYMS: *P. polopolensis* Herzog, *P. wolfii* Inoue

ILLUSTRATIONS: **Heinrichs, et al.** (1998: Fig. 14), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 80), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 18).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in lowland and submontane rainforest, 300-2000 m. Recorded from Caquetá, Nariño and Santander. General distribution: tropical America.

Plants medium-sized, 4-5 mm wide, branches sparse, intercalary. Leaves distant to subimbricate, ventrad, asymmetrically oblong-rectangular, widest in the middle, 2.1-3.5× longer than wide, dorsal margin straight, ventral margin curved, with 6-18 teeth in the upper half, apex occasionally with 2 larger teeth; ventral leaf base not ampliate, slightly recurved; dorsal and ventral leaf base short-decurrent. Leaf cells isodiametrical to somewhat elongate, 18-30 µm wide in midleaf, with conspicuous radiate trigones, vitta lacking; cuticle smooth. Perianth "naked", base not enveloped by bracts. Vegetative reproduction by caducous leaves common.

Plagiochila gymnocalycina is a species of relatively low elevations, in lowland and lower montane forests below 2000 m. The species is very similar to *P. simplex* and may be a synonym of the latter; for differences see under *P. simplex*. *Plagiochila gymnocalycina* has sometimes been considered a synonym of *P. rutilans* but the latter species clearly differs by horizontally spreading leaves (not ventrad), perianths covered by bracts at the base, and by the characteristic peppermint smell of fresh plants.

Plants from the Caquetá river (Morrocroy I.) with caducous teeth described as *P. wolfii* Inoue (**Inoue**, 1989) belong to *P. gymnocalycina* var. *surinamensis* (Sande Lac.) **Heinrichs & Rycroft** (**Heinrichs, et al.**, 2006).

28. ***Plagiochila heteromalla*** (Lehm. & Lindenb.) Lindenb., Sp. Hepat. 2-4: 83. 1840.

TYPE: Peru, leg. Kunze (PC, isotype)

SYNONYMS: *P. oresitropa* Spruce, *P. ovifolia* Steph., *Plagiochilion heteromallum* (Lehm. & Lindenb.) **Hässel**

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in humid montane forests and páramo, 1200-3900 m. Recorded from Caldas, Magdalena and Risaralda. General distribution: tropical Andes, Costa Rica.

Plants medium-sized to rather robust, 4-7 mm wide, branches intercalary, rarely terminal. Leaves opposite, ventrad and secund or ± spreading, short-ovate, 1-1.2× longer than wide, shouldered to ampliate, margin frequently bordered by thicker-walled cells (by trigones and intermediate thickenings becoming confluent), toothed all around except on the lower half of the dorsal margin, with 16-44 short, narrowly triangular to ciliate teeth, the teeth to 6 cells long; dorsal and ventral leaf bases rather shortly and narrowly decurrent, opposite leaf bases approximate but not connected. Leaf cells 25-35 µm wide in midleaf, slightly elongate, with conspicuous, simple to radiate trigones and intermediate thickenings, thickenings usually larger and confluent on cells at leaf margin, forming a border, cells at leaf base more elongate, forming a short and ill-defined vitta; cuticle smooth; oil bodies homogeneous (**Heinrichs**, 2002, under *P. oresitropa*). Perianth elongate-cylindrical with a narrow stalk, perianth base covered by bracts or not. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila heteromalla is a little-known Andean species that is recognized by opposite and usually strongly secund leaves with leaf bases approximate (but not connate), leaf margins with a border of thicker-walled cells, and leaf bases with a short, ill-defined vitta. The species may be confused with *P. macrostachya* but the latter species has larger leaf cells and lacks a leaf border. *Plagiochila heteromalla* approaches *P. trichostoma* but the leaves in the latter species are not opposite (but sometimes almost), less strongly secund and without border.

Hässel de Menéndez (1983) transferred *P. heteromalla* to *Plagiochilion* S. Hatt. but the latter genus differs by ventral-intercalary branching.

29. ***Plagiochila heterophylla*** Lehm., Nov. Stirp. Pug. 10: 2. 1857; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Costa Rica, leg. Oersted (S)

SYNONYM: *P. abscedens* Gottsche (*syn. nov.*), *P. sparsifolia* Steph.

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plate 39).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark, rock and soil in humid montane forest areas and scrub and along rivers, 1150-3400 m. Recorded from Boyacá and Magdalena. General distribution: Mexico to Ecuador, Dominican Republic, coast of Western Europe.

Plants medium-sized, 3-6 mm wide, branches scarce, intercalary, rarely terminal. Leaves wide spreading, sometimes secund, not ventrad, ovate-oblong to ovate-triangular, ca. 1.3-2× longer than wide, not ampliate, with 2-12 teeth, apex usually bifid with two larger teeth, ventral margin with 0-10 smaller teeth in the upper half, dorsal margin usually entire; dorsal and ventral bases shortly to moderately longly decurrent. Leaf cells ca. 20-35 µm wide in midleaf,

somewhat elongate, with large, swollen trigones; leaf base without vitta; cuticle covered by small wax platelets, appearing smooth or slightly rough in the light microscope. Underleaves absent or very small and with 2-4 long-linear lobes. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila heterophylla has only been recorded from Boyacá and Magdalena but may be more widespread in Colombia. The species resembles *P. rutilans* but differs from the latter species by less strongly elongate leaves (usually less than 2× longer than wide), leaf apex often bifid with 2 larger teeth, and leaf cells with large, swollen trigones and with wax ornamentation on the cuticle. Fresh material is separated from *P. rutilans* by the lack of a peppermint smell.

A form with rather narrow leaves has been described as *P. heterophylla* var. *beauverdii* (Steph.) Heinrichs (= *P. sparsifolia* Steph.; fide Heinrichs, 2002). *Plagiochila abscedens* Gottsche (Type: Colombia, Tequendama, 2500 m, Aug. 1861, leg. Lindig 1710b, isotypes PC0098169, PC0098170) is a new synonym of *P. heterophylla*.

30. ***Plagiochila husnotii*** Steph., Bull. Herb. Boissier (sér. 2) 5: 178. 1905; Heinrichs (2002).

TYPE: Guadeloupe, leg. l'Herminier (G)

ILLUSTRATION: Heinrichs (2002: Plates 18, 19).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in everwet lowland rainforest along the pacific coast, 30 m. Recorded only from Chocó. General distribution: West Indies and coastal areas of northern South America.

Plants rather robust, 5-9 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves elongate-triangular to narrowly ovate-oblong, ca. 1.8-2.1× longer than wide, shouldered to weakly ampliate, with ca. 20-60 long triangular to linear teeth; dorsal and ventral leaf bases strongly toothed, shortly decurrent. Leaf cells large, ca. 30-55 µm wide in midleaf, slightly elongate, with small radiate trigones, leaf base without vitta; cuticle smooth. Androecia intercalary or in a fan-shaped cluster at stem apex. Vegetative reproduction not observed.

In Colombia, *Plagiochila husnotii* is a rare lowland species from rainforests of the Chocó. The species is very similar to *P. dominicensis* but the ventral leaf bases in the latter species are entire (strongly toothed in *P. husnotii*).

31. ***Plagiochila laetevirens*** Lindenb., Sp. Hepat. 2-4: 101. 1840.

TYPE: Ecuador ("Columbia"), leg. Jameson (W)

SYNONYMS: *P. bancroftii* Steph., *P. binominis* Gottsche, *P. cipaconensis* Steph., *P. contigua* Gottsche, *P. irmscheri* Steph. p.p. (Heinrichs, 2002), *P. micropteryx* Gottsche, *P. pachoenis* Steph., *P. tocarema* Gottsche

ILLUSTRATION: Inoue (1989: Fig. 2 as *P. micropteryx*), Heinrichs, et al. (2002c: Fig. 2).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark or rock in montane rainforests, usually in rather open places, also on isolated trees in meadows, 800-3000 m. Recorded from Boyacá, Cundinamarca, Risaralda and Tolima. General distribution: mountains of tropical America.

Plants soft-textured, medium-sized, 3-4 mm wide, dichotomous to irregularly pinnate, branches predominantly terminal, towards the shoot base sometimes with a few intercalary branches. Leaves obliquely to widely spreading, surface horizontal to slightly ventrad, short-ovate to ovate-oblong to ovate-triangular, 1-1.5× longer than wide, apex truncate, apical and ventral leaf margin with few to many, 5-25 coarse, triangular teeth; dorsal base shortly to longly decurrent, decurrent part swollen when long-decurrent, ventral leaf base recurved, shouldered to weakly ampliate, shortly decurrent. Leaf cells subsodiametrical, ca. 20-30 µm wide in midleaf, with rather small but conspicuous, triangular trigones; cuticle smooth. Underleaves lacking. Vegetative reproduction by numerous small plantlets (propagula) on ventral leaf surfaces.

Plagiochila laetevirens is a common and variable neotropical species that is recognized by terminal-dichotomous branching, rather short ovate-subrectangular leaves (1-1.5× longer than wide) with a shouldered ventral margin and coarsely toothed margins. The species seems to be restricted to submontane and montane environments, above 800 m. *Plagiochila laetevirens* is related to *P. distinctifolia* and *P. patula* but the latter species have more elongate leaves (more than 1.5× longer than wide). Moreover, *P. distinctifolia* is more delicate and has bordered leaves without a high shoulder. *Plagiochila laetevirens* may also be confused with *P. diversifolia* but the latter species is more robust and has larger leaf cells, brown oil bodies and small underleaves.

32. ***Plagiochila lingua*** Steph., Bull. Herb. Boissier (ser. 2) 2: 677. 1902.

TYPE: Brazil, leg. Puiggari, Icon. Steph. 11602 (G)

HABITAT AND DISTRIBUTION: on tree base along road, 750 m. Recorded from Magdalena (Gradstein, et al., 2016). General distribution: Colombia, Bolivia, southeastern Brazil.

Plants rather small, ca. 2 mm wide, to 2 cm long, green, leafy stems arising from a creeping stolon, unbranched or with a few short intercalary branches in the lower half; terminal branch lacking. Stems green, becoming brown in older parts. Leaves widely and horizontally spreading, subimbricate, plane, dorsal margin flat or slightly recurved, ovate-oblong, 1.2-1.4× longer than wide, apex rounded to truncate to retuse, without teeth or with a rudimentary tooth, margins fully entire; dorsal and ventral bases rather longly decurrent, ventral base subampliate, with a low shoulder. Leaf cells subsodiametric, ca. 25-30 µm wide in midleaf, towards margin slightly smaller, hardly larger towards

base, vitta lacking; cell walls thin, trigones lacking or very small, cuticle smooth. Underleaves absent. Plants sterile. Vegetative reproduction absent.

Plagiochila lingua is a rare neotropical species that is readily distinguished by entire leaves. The leaves are widely spreading, ovate-oblong (ca. 1.2-1.4× longer than wide), with a rounded to truncate to retuse apex, entire margins and thin-walled leaf cells without or with very small trigones. Branching is sparse, intercalary. The species approaches entire-leaved forms of *P. patula* but differs from the latter species by shorter leaves (less than 1.5× longer than wide), thin-walled leaf cells without or with very small trigones, and intercalary branching.

33. **Plagiochila longispina** Lindenb. & Gottsche, in Gottsche, *et al.*, Syn. Hepat. 5: 642. 1847; **Heinrichs, et al.** (2000b).

TYPE: Mexico, leg. Liebmann (W)

ILLUSTRATION: **Robinson** (1968: Fig. 42), **Heinrichs, et al.** (2000a: Fig. 1).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on humid rock, soil and trunk bases in very humid upper montane forest and páramo, 2700-4050 m. Recorded from Arauca, Boyacá, Caldas, Cundinamarca, Meta, Risaralda, Tolima and Valle. General distribution: tropical Andes, Costa Rica, Azores.

Plants rather robust, 5-7 mm wide, flaccid, stems in the upper part often bluish, irregularly pinnate to ± dichotomous, branching terminal and intercalary. Leaves horizontally spreading, ovate to ovate-oblong, strongly ciliate by numerous long-linear teeth (20-60) all around the leaf, the teeth to 15 cells long; dorsal leaf base rather longly and broadly decurrent, ventral leaf base not or rather longly and very narrowly decurrent, not ampliate. Leaf cells subisodiametrical, 25-40 µm wide in midleaf, with rather small, triangular trigones; cuticle smooth; oil bodies brown. Underleaves conspicuous, to 1 mm long, ciliate. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila longispina is a very distinct species that is readily recognized by the bluish stems (in upper part of shoot) and the strongly and longly ciliate leaves with linear teeth all around the margins. The species is related to *P. diversifolia* but in the latter species the stems are never bluish and the teeth are shorter and mainly restricted to the ventral and apical leaf margins.

34. **Plagiochila loriloba** Carl, Ann. Bryol. Suppl. 2: 47, 48. 1931.

TYPE: Colombia, leg. Killip (JE)

SYNONYM: *P. cuneata* var. *loriloba* (Carl) Herzog

ILLUSTRATION: **Herzog** (1932: Fig. 17 as *P. cuneata* var. *loriloba*), **Groth, et al.** (2002: Fig. 2).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on branches of shrubs in the understory of upper montane forest, 2900-3300 m (**Holz,**

et al. 2001). Recorded from Cauca (Puracé). General distribution: Colombia, Costa Rica.

Plants ca. 1.5-2.5 mm wide, with a strong peppermint smell, branches scarce, intercalary. Leaves subimbricate, obliquely to widely spreading, elongate obtuse, deeply 3-4-lobed to 1/3-1/2 of leaf length, leaf lobes often diverging and frequently broken off, margins usually entire, bases shortly decurrent. Leaf cells somewhat elongate, 23-43 µm wide in midleaf, with small but distinct trigones; cuticle smooth. Vegetative reproduction by leaf fragmentation. Female bracts slightly larger than leaves and more strongly toothed. Perianth base free, not covered by bracts.

Plagiochila loriloba is a little-known species that is known in Colombia from only one collection from the Puracé (the type). The species is recognized by the strong peppermint smell (fresh material) and deeply 3-4-lobed, strongly fragmenting leaves. *Plagiochila loriloba* is closely related to *P. cuneata*; for differences see under the latter species. The new combination *Plagiochila loriloba* "(Herzog) L.Söderstr." (**Söderström, et al.**, 2015) is superfluous, this name was already validly published by **Carl** (1931).

35. **Plagiochila macrostachya** Lindenb., Sp. Hepat. 2-4: 75. 1840; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Jamaica, unknown collector (W)

SYNONYMS: *P. contingens* Gottsche, *P. flaccida* Lindenb., *P. leptophylla* Spruce

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plate 20). The illustration of *P. macrostachya* in **Gradstein & Costa** (2003) shows a plant with alternate leaves and may have been based on misidentified material.

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark or rock in humid lowland and montane rainforest, 30-3000 m. Recorded from Antioquia, Boyacá, Casanare, Chocó, Cundinamarca and Risaralda. General distribution: tropical America.

Plants robust, 5-10 mm wide, branches scarce, purely intercalary. Leaves horizontally spreading or secund, (sub)opposite with the bases approximate, ovate-oblong or ovate-triangular, 1.2-1.6× longer than wide, margin unbordered, ventral base weakly or strongly ampliate concealing the stem or not; with 10-40 triangular to linear teeth along the ventral, apical and upper dorsal margins, teeth to 7 cells long; dorsal and ventral leaf bases ± shortly decurrent. Leaf cells large, ca. 35-55 µm wide in midleaf, slightly elongate, with small to large trigones; vitta lacking; cuticle smooth. Androecia intercalary or in fan-shaped clusters at plant apex; bracts dorsally not overlapping. Perianth base covered by bracts. Vegetative reproduction by caducous leaves.

By its opposite leaves *P. macrostachya* resembles *P. heteromalla* but the cells in the latter species are much smaller and the leaf margin is usually bordered.

36. **Plagiochila montagnei** Nees, in Nees & Montage, Ann. Sci. Nat. Bot. (sér. 2) 5: 53. 1836; Heinrichs & Gradstein (2000). Fig. 11

TYPE: French Guiana, leg. Leprieur (STR)

SYNONYMS: *P. bogotensis* Gottsche, *P. hypnoides* Lindenb.

ILLUSTRATION: **Heinrichs & Gradstein** (2000: Fig. 3), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 77), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: 18).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark or rock in lowland and lower montane rainforests, plantations and on isolated trees, 100-2600 m. Recorded from Antioquia, Caquetá, Cundinamarca, Magdalena and Meta. General distribution: tropical America.

Plants medium-sized, 3-5 mm wide, dichotomous by terminal branching. Leaves widely and horizontally spreading, ovate-lingulate with a broad and dorsally longly decurrent base, 1.5-2.5× longer than wide, apex subtruncate, ventral leaf margin plane or undulate, ventral base strongly ampliate, forming a high crest; apex and basal part of the ventral leaf margin toothed, with 10-30 teeth, ventral base with broad, triangular teeth; dorsal leaf base longly and broadly decurrent parallel to the midline of the stem, the decurrent part strongly swollen, ventral base shortly decurrent. Leaf cells isodiametric to elongate, 20-30 µm wide in midleaf, trigones conspicuous but not swollen, triangular to elongate, sometimes confluent on longer walls; cuticle smooth. Underleaves rudimentary, to maximally 0.6 mm long. Vegetative reproduction by small plantlets (propagula) on ventral leaf surfaces.

Plagiochila montagnei is very similar to *P. disticha*; for differences see under the latter species. *Plagiochila bogotensis* Gottsche is a phenotype of *P. montagnei* with subentire ventral leaf bases (**Gradstein, 2015a**).

37. **Plagiochila ovata** Lindenb. & Gottsche, in Gottsche *et al.*, Syn. Hepat. 5: 656. 1847; **Müller, et al.** (1999).

TYPE: Mexico, leg. Liebmann (W)

SYNONYM: *P. cordillera* Steph.

ILLUSTRATION: Robinson (1968; Fig. 47 as *P. oblita*), Müller, *et al.* (1999: Fig. 6).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on humic soil, rock and bark in upper montane and subalpine forest and in scrubby páramo, with *P. dependula*, *P. ensiformis*, *P. punctata* etc., ca. 3000-4000 m. Recorded from Boyacá, Casanare, Cundinamarca, Magdalena and Meta. General distribution: tropical Andes, Costa Rica.

Plants robust, 4.5-9 mm wide, branching intercalary. Leaves obliquely spreading, subtransverse and strongly ventrad, rounded in shape, margins with more than 100 (up to 250) small, sharp teeth all around the margin, the teeth 1-3(-4)

cells long; dorsal and ventral leaf bases rather longly and narrowly decurrent. Leaf cells isodiametric to elongate, 20-40 µm wide in midleaf, with large trigones; cuticle smooth. Capsules narrowly cylindrical, on a long seta (Müller, *et al.*, 2000). Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila ovata is easily recognized by the rounded leaves with numerous small teeth (100-250) all around the margin. No other neotropical species of *Plagiochila* has so many teeth on the leaves. *Plagiochila ovata* is related to *P. alternans* but leaves in the latter species are longer than wide and toothed only in the upper half (> 100 teeth), and the leaf cells are thin-walled with very small trigones. Moreover, *P. alternans* occurs at lower elevation (1900-3300 m).

38. **Plagiochila pachyloma** Taylor, London J. Bot. 5: 267. 1846.

TYPE: Ecuador, leg. Jameson (G isotype)

SYNONYMS: *P. cuervina* Gottsche, *P. wallisiana* Steph.

ILLUSTRATION: **Gradstein, et al.** (2001: Fig. 62).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in upper montane forest and páramo, 2000-4100 m. Recorded from Boyacá, Magdalena, Nariño, Risaralda, Santander and Tolima. General distribution: northern Andes, Costa Rica.

Plants medium-sized, 3-5 mm wide, stems long and almost unbranched, apex curved, branches intercalary. Leaves alternate, imbricate, transverse to obliquely spreading and ventrad, suborbicular to shortly ovate-triangular, 0.9-1.2× longer than wide, ventral base ± ampliate, margins conspicuously bordered, the border usually brown, and with numerous (to 50) long and sharp, linear teeth along the ventral and apical margin, the teeth usually brown, to 8 cells long (shorter to leaf base), 1 cell wide except at the base, cell linear in long teeth; dorsal leaf base longly decurrent, ventral leaf base usually shortly decurrent. Leaf cells subsodiametric, 15-25 µm in diameter, with small or large trigones, margin cells distinctly larger and thick-walled with confluent trigones, forming a brown (rarely colorless), 1-2 cells wide border, leaf with a conspicuous vitta of larger, thinner-walled cells from base to midleaf; cuticle finely papillose or smooth. Perianth base covered by bracts. Vegetative reproduction not observed.

This strikingly beautiful Andean species is readily recognized by the transverse to obliquely spreading, rounded to ovate-triangular leaves with a brownish border of larger, thicker-walled cells and with numerous sharp, linear, brownish teeth along the ventral and apical margin. The cuticle is finely papillose or smooth. A phenotype with colorless leaf border and colorless teeth was described as *P. homochroma* Spruce. *Plagiochila pachyloma* approaches *P. bifaria* but the latter species is more delicate, the leaves are not ampliate and lack a leaf border, and the teeth are

coloreous and at least in part narrowly triangular. Moreover, the leaves in *P. bifaria* are sometimes fragmenting (not fragmenting in *P. pachyloma*).

39. **Plagiochila papillifolia** Steph., in Herzog, Biblioth. Bot. 87: 207. 1916; **Heinrichs, et al.** (2002b).

TYPE: Bolivia, leg. Herzog (G)

SYNONYMS: *P. deciduifolia* Steph., *P. verruculosa* R. M. Schust.

ILLUSTRATION: **Heinrichs, et al.** (2002b: Fig. 1).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark or rock in montane cloud forest, ca. 2000-3600 m. Recorded from Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Risaralda and Santander. General distribution: tropical America, Azores.

Plants small, ca. 0.5-2 mm wide and 1-2.5 cm long, branching scarce, intercalary. Leaves spreading, ventrad, ovate to ovate-oblong and very small, usually less than 1 mm long and 1.1-1.7× longer than wide, bifid, with 2 large teeth at the apex and a few smaller teeth (1-10) on the ventral margin; leaf bases not or hardly decurrent. Leaf cells subisodiametric, 18-25 µm wide in midleaf, leaf base without vitta; cuticle finely papillose. Vegetative reproduction by caducous leaves common.

Plagiochila papillifolia is a delicate species with a bifid leaf apex, slightly toothed ventral leaf margin, hardly decurrent leaf bases and a papillose cuticle. The species may be confused with *P. tenuis* and *P. stricta*, which also have a papillose cuticle. However, *P. tenuis* has more elongate leaves (at least 2× longer than wide) whereas *P. stricta* is a more robust plant (> 2 mm wide) with distinctly decurrent, vittate leaves (vitta lacking in *P. papillifolia*).

40. **Plagiochila paraphyllina** Herzog, Hedwigia 74: 89. 1934; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Colombia, leg. Troll (JE)

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plate 42).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and soil in upper montane forest and páramo, 2500-3700 m. Recorded from Cundinamarca and Magdalena. General distribution: northern Andes.

Plagiochila paraphyllina is a rare species that resembles *P. fuscolutea* but differs from the latter by toothed dorsal leaf bases and the presence of small, toothed paraphyllia on the dorsal stem surface, near the bases of the leaves or scattered over the surface. For a full description of *P. paraphyllina* see **Heinrichs** (2002). The species is very similar to *P. longiramea* Steph. from Bolivia but in the latter species the paraphyllia and dorsal leaf bases are entire.

41. **Plagiochila patriciae** Heinrichs & H. Anton, in Heinrichs, Bryophyt. Biblioth. 58: 107. 2002.

TYPE: Costa Rica, leg. Heinrichs, et al. (GOET)

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plate 21).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in upper montane forest near the forest line, 3500 m. Recorded only from Antioquia. General distribution: Colombia and Costa Rica.

Plants robust, 5-7 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves alternate, ovate-triangular, 1-1.4× longer than wide, ventral bases strongly ampliate forming a high crest, ventral and apical margins and sometimes also the dorsal base toothed, with ca. 10-30 teeth; dorsal and ventral leaf bases longly decurrent, the decurrent ventral part toothed. Leaf cells large, ca. 30-50 µm wide in midleaf, somewhat elongate, with rather large, swollen trigones; cuticle smooth. Androecia in a fan-shaped cluster at stem apex. Vegetative reproduction not observed

Plagiochila patriciae is a rare species from high elevations in Colombia (Antioquia) and Costa Rica. By its rather short and broad, alternate leaves with longly decurrent bases the species resembles *P. guevarai*, which occurs in the same habitat. However, the leaves in *P. guevarai* have much fewer teeth (1-6) and the decurrent part of the ventral leaf base is entire.

42. **Plagiochila patula** (Sw.) Lindenb., Sp. Hepat. 1: 21. 1839; **Heinrichs, et al.** (1998).

TYPE: Jamaica, leg. Swartz (S)

SYNONYMS: *P. beskeana* Steph., *P. fallax* Lindenb. & Hampe, *P. martiana* (Nees) Lindenb.

ILLUSTRATION: **Heinrichs, et al.** (1998: Figs. 10-11), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 77).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and soil in lowland and montane rainforest areas, 250-2800 m. Recorded from Risaralda and Valle. General distribution: tropical America.

Plants rather robust, 4-6 mm wide, usually dichotomous by terminal branching. Leaves widely and horizontally spreading, ovate-lingulate, ca. 2-2.5× longer than wide, leaf apex broadly rounded to truncate, apical and ventral leaf margins with 0-15 teeth, ventral leaf base entire; leaf bases ± longly decurrent, ventral leaf base with a shoulder, not or slightly ampliate. Leaf cells isodiametric to elongate, 20-30 µm wide in midleaf, trigones absent or conspicuous but not swollen, triangular to elongate, sometimes confluent on longer walls; cuticle smooth. Underleaves absent or very small. Vegetative reproduction by numerous small plantlets (propagula) on ventral leaf surfaces.

Plagiochila patula resembles *P. raddiana* but differs from the latter species by the shouldered ventral leaf base which is not or only very slightly ampliate, leaving the ventral stem surface well-visible. In *P. raddiana* the ventral leaf bases are moderately to strongly ampliate, more or less concealing the ventral stem surface and often forming a crest. In both species the ventral leaf bases are entire and usually longly decurrent (exceptionally shortly decurrent).

43. **Plagiochila punctata** (Taylor) Taylor, London J. Bot. 5: 261. 1846; **Heinrichs, et al.** (2005a).

TYPE: Ireland, leg. Taylor (BM isosyntype)

SYNONYMS: *P. chinantlana* Gottsche, *P. choachina* Gottsche, *P. delapsa* Inoue (*syn. nov.*), *P. stolonifera* Lindenb. & Gottsche, *P. subrara* Herzog

ILLUSTRATION: **Inoue** (1988: Fig. 1 as *P. delapsa*), **Heinrichs, et al.** (2005a: Figs. 2-3).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on soil, bark and rock in exposed montane environments and páramo, 1600-4300 m. Recorded from Cundinamarca, Magdalena, Risaralda and Tolima. General distribution: tropical America, East Africa, Western Europe.

Plants rather small, 1-3 mm wide, branching intercalary, branches and parts of stem often leafless due to caducous leaves. Leaves distant to imbricate, obliquely to widely spreading, ovate, 0.9-1.2× longer than wide, not ampliate, strongly caducous; dorsal margin almost straight and entire, plane or narrowly recurved, ventral arched and toothed, with 1-14 teeth, apex often with 2 larger teeth or lobes; dorsal and ventral leaf bases not or very shortly decurrent. Leaf cells isodiametrical to somewhat elongate, ca. 20-30 µm wide in midleaf, usually with large trigones, leaf base with a short, ill-defined vitta; cuticle smooth. Underleaves reduced. Perianth base covered by leaves. Vegetative reproduction by caducous leaves abundant.

Plagiochila punctata is readily distinguished by the small plants with shortly (ob)ovate, ventrad leaves, which are toothed at apex and along the ventral margin and are abundantly caducous, leaving part of the stem and whole branches denuded (leafless). The species resembles *P. stricta* but in the latter species the leaves are not caducous and the cuticle is papillose.

Small phenotypes of *P. punctata* from páramo with only few teeth on the ventral leaf margin were described as *P. paramicola* Herzog and *P. subrara* Herzog. These plants approach *P. cleefii*; in the latter species, however, the ventral leaf margin is usually entire. Based on the original description and illustration, *Plagiochila delapsa* Inoue from Peru is a synonym of *P. punctata*.

44. **Plagiochila raddiana** Lindenb., Sp. Hepat. 1: 9. 1839; **Heinrichs & Gradstein** (2000). Fig. 1H

TYPE: Brazil, leg. Raddi (W)

SYNONYMS: *P. connivens* Gottsche, *P. crispatodecurrrens* Herzog, *P. funckiana* Steph., *P. guilleminiana* Mont., *P. ludoviciana* Sull., *P. schlimiana* Steph., *P. silvatica* Gottsche, *P. undulifolia* Herzog

ILLUSTRATIONS: **Schuster** (1980: Fig. 599 as *P. ludoviciana*), **Inoue & Gradstein** (1980: Fig. 3 as *P. guilleminiana*), **Heinrichs & Gradstein** (2000: Fig. 4), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 77), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 19).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and shaded rock (occasionally on soil or leaves) in lowland and montane rainforests, 50-3300 m. Recorded from Antioquia, Boyacá, Caquetá, Cesar, Chocó, Cundinamarca, Magdalena, Nariño, Putumayo, Risaralda and Tolima. General distribution: widespread in tropical America.

Plants medium-sized to rather robust, 4-6 mm wide, ± dichotomous by terminal branching, intercalary branches also present, especially in the lower parts of the stem. Leaves widely and horizontally spreading, ovate-oblong to ovate-lingulate with a broad and longly decurrent dorsal base, 1.5-2.5× longer than wide, apex broadly subtruncate, apical and ventral margin with ca. 4-25 teeth, ventral base entire or, very occasionally, with 1-2 small teeth, ventral leaf margin plane or slightly undulate at the base; dorsal base longly decurrent, the decurrent part conspicuously swollen, ventral base rather longly decurrent, moderately to strongly ampliate, ± concealing the stem, when strongly ampliate forming a high crest. Leaf cells isodiametric to elongate, 20-30 µm wide in midleaf, trigones conspicuous but not swollen, triangular to elongate, sometimes confluent on longer walls; cuticle smooth. Underleaves absent or present, when present very small, usually less than 1 mm long, margins ciliate. Vegetative reproduction by small plantlets (propagula) on ventral leaf surfaces.

Plagiochila raddiana is a very common and variable neotropical species that has been described under many different names. Characteristic of this species are the ventral leaf bases, which are entire, longly decurrent and usually conspicuously ampliate, concealing the stem. In some phenotypes, however, the ventral leaf base is only moderately ampliate and does not entirely conceal the stem. Such forms approach *P. patula*, which is very similar to *P. raddiana* but has not or only slightly ampliate ventral leaf bases. *Plagiochila raddiana* also approaches *P. disticha* and *P. montagnei* but in the latter species the ventral leaf bases are toothed and shortly decurrent. Branching in *P. raddiana* is normally mainly terminal but occasionally it is predominantly intercalary (e.g., Magdalena, leg. Gradstein *et al.* 12491, PC).

Plagiochila undulifolia Herzog is a phenotype of *P. raddiana* with 1-2 teeth on the ventral leaf base and *P. silvatica* Gottsche is a phenotype with subrectangular leaves (**Gradstein**, 2015a).

45. **Plagiochila revolvens** Mitt., Hooker's J. Bot. Kew Gard. Misc. 3: 358. 1851.

TYPE: Ecuador, leg. Jameson (NY)

HABITAT AND DISTRIBUTION: on moist rocky soil in superpáramo, 4000-4300 m. Recorded only from Meta. General distribution: northern Andes.

Plants medium-sized, 2-3 mm wide, green to dark-brown to blackish, stems long, ± unbranched, apex curved,

rhizomatous base lacking. Leaves imbricate, transverse, suborbicular, slightly wider than long (ca. 1.2× wider than long), apex rounded, ± recurved, margins entire, dorsal margins strongly revolute, dorsal and ventral leaf bases longly decurrent. Leaf cells subisodiametric, 20-30 µm wide in midleaf, trigones large, cuticle smooth; leaf base with a vitta. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila revolvens has only been recorded from superpáramo on the Nevada do Sumapaz but it may be more widespread; in Ecuador it is known from several localities. The species approaches *P. cleefii* and *P. dependula*, which also have transverse leaves with entire margins and are páramo plants. *Plagiochila dependula* differs from *P. revolvens* by the much larger plants with broadly reniform leaves, ± plane leaf margins and a papillose cuticle. *Plagiochila cleefii* is more close to *P. revolvens* but is separated from the latter by having longer than wide leaves with a plane apex and by the frequent presence of 1-2 small teeth at the leaf apex.

46. **Plagiochila rudischusteri** H. Rob., Beih. Nova Hedwigia 90: 199. 1988; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Venezuela, leg. Steyermark (US)

ILLUSTRATION: **Robinson** (1988: Figs. 1-5), **Heinrichs** (2002: Plate 43).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark of trees in coastal, lower montane rainforest, 1500-1600 m. Recorded only from Risaralda (Mistrato). General distribution: Costa Rica, Panama, Caribbean coast of Venezuela (Paria Peninsula), and the Pacific side of the Western Cordillera of Colombia.

Plants medium-sized, 3-5 mm wide, pale yellowish green to brownish, stems almost unbranched, branches intercalary. Leaves distant, transverse, linear-lanceolate, 5-10× longer than wide, the leaf margins entire or with 1-2 small teeth near apex, leaf bases not or hardly decurrent. Leaf cells narrowly elongate, 2-5× longer than wide in midleaf, 15-25 µm wide, with large, swollen trigones; cuticle smooth. Vegetative reproduction by caducous leaves.

Plagiochila rudischusteri is a very distinct species that is only known in Colombia from the Western Cordillera (Risaralda). The species is related to *P. aerea* and *P. tabinensis* but is readily separated from the latter two by the linear, transverse leaves without long teeth or lobes and leaf bases not decurrent.

47. **Plagiochila rutilans** Lindenb., Sp. Hepat. 2-4: 47. 1840; **Heinrichs, et al.** (2001b). Fig. 1C,D

TYPE: Brazil, leg. Raddi (W)

SYNONYMS: *P. cobana* Steph. (?), *P. divaricata* Lindenb., *P. harrisana* Steph., *P. perrottetiana* Mont. & Gottsche

ILLUSTRATIONS: **Heinrichs, et al.** (1998: Figs. 4-5 as *P. harrisana*), **Heinrichs, et al.** (2001b: Figs. 2-4), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 80), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 19).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark, rock, rotten wood and soil in lowland and montane forests and scrub, 300-3200 m. Recorded from Antioquia, Cauca, Cesar, Cundinamarca, Putumayo and Risaralda. General distribution: tropical America.

Plants medium-sized to large, 2-6 mm wide, when fresh with a strong peppermint odor, branching intercalary. Leaves distant to slightly imbricate, widely spreading horizontally, narrowly oblong-rectangular, (1.5-)2-4× longer than wide, with 5-20 teeth in the upper half, apex occasionally with 2 somewhat larger teeth; dorsal and ventral margins recurved near the leaf base, the ventral leaf base not amplified but often shouldered (with a hook-shaped curvature), shortly decurrent. Leaf cells isodiametric to somewhat elongate, 1-1.5× longer than wide in midleaf, 20-40 µm wide, with small to large trigones; cuticle smooth. Vegetative reproduction by caducous leaves.

Plagiochila rutilans is readily recognized by the horizontally spreading, narrowly oblong leaves, the subisodiametric leaf cells and the peppermint smell of fresh plants. Branching in *P. rutilans* is intercalary. In leaf shape *P. rutilans* resembles *P. aerea*, *P. distinctifolia*, *P. macrifolia* and *P. gymnocalycina* but the latter species have ventrad leaves and lack a peppermint smell. Moreover, *P. aerea* has more elongate leaf cells and *P. distinctifolia* and *P. macrifolia* have terminal branching.

Plagiochila cobana Steph. reported Cundinamarca and Valle (**Gradstein & Uribe**, 2015) resembles *P. rutilans* and may be a synonym of the latter. **Inoue & Gradstein** (1980) erroneously treated *P. cobana* as a synonym of *P. aerea* (see **Heinrichs, et al.**, 1999).

48. **Plagiochila stricta** Lindenb., Sp. Hepat. 1: 20. 1839; **Heinrichs, et al.** (1998).

TYPE: Jamaica, leg. Swartz (W)

SYNONYMS: *P. asperifolia* Steph. var. *columbica* Herzog, *P. elegantula* Herz., *P. oxyphylla* Spruce, *P. rutilans* fo. *foliicola* Herzog

ILLUSTRATIONS: **Heinrichs, et al.** (1998: Fig. 7), **Rycroft, et al.** (2002: Fig. 2).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in lowland and montane rainforest, ca. 100-2400 m. Recorded from Chocó and Cundinamarca. General distribution: tropical America, Madagascar, Macaronesia.

Plants small to medium-sized, 2-4 mm wide, branching intercalary. Leaves asymmetrically ovate to ovate-oblong, 1-2 mm long, 1.1-1.7× longer than wide, dorsal margin entire, ventral and apical margin with 5-18 teeth, the teeth ca. 2-6 cells long, often with two larger teeth at apex (to 11 cells long). Leaf cells isodiametric to somewhat elongate, 15-30(-35) µm wide in midleaf, with conspicuous trigones, leaf base with a short vitta; cuticle strongly and finely papillose. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila stricta is a common species that is probably more widespread in Colombia than is currently known. The species may be confused with *P. papillifolia* which shares a papillose cuticle; for differences see under the latter species.

49. **Plagiochila subplana** Lindenb., Sp. Hepat. 2-4: 73. 1840; **Heinrichs, et al.** (1999). Fig. 1B

TYPE: Brazil, leg. Martius (W)

SYNONYMS: *P. amazonica* Spruce, *P. hondurensis* Herzog, *P. kegeliana* Steph., *P. leptodictyon* Herzog

ILLUSTRATIONS: **Heinrichs, et al.** (1999: Figs. 1-2), **Gradstein & Costa** (2003: Fig. 80), **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 20).

HABITAT AND DISTRIBUTION: common on bark in shaded places in lowland and submontane rainforests and scrub, 100-1200(-1900) m. COLOMBIA: Amazonas, Boyacá, Chocó, Guanía, Magdalena, Risaralda and Valle. General distribution: widespread in tropical America.

Plants medium-sized, 2-8 mm wide, branches intercalary. Leaves ovate-oblong to rectangular, 1.3-2.5 as long as wide, horizontally spreading, with 5-40 teeth in the upper half or along the entire leaf margin; ventral leaf base not ampliate, slightly recurved, not or very shortly decurrent, dorsal leaf base shortly decurrent. Leaf cells subisodiametrical, 30-45 μm wide in midleaf, thin-walled with small, simple-triangular trigones, vitta lacking; cuticle smooth. Perianth covered by bracts. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila subplana is a characteristic species of low elevations, below 1200 m. The species may be confused with *P. alternans*, *P. breuteliana* and *P. simplex*. *Plagiochila breuteliana* differs by asymmetrically elongate-triangular leaves with elongate leaf cells and radiate trigones, *P. alternans* differs by the conspicuously decurrent ventral leaf bases and *P. simplex* by ventrad leaves with smaller cells, perianth base not covered by bracts and vegetative reproduction by caducous leaves.

50. **Plagiochila subundulata** Lindenb., Sp. Hepat. 5: 137. 1843.

TYPE: Brazil, leg. Beyrich (W?)

HABITAT AND DISTRIBUTION: on wet rock at the base of waterfall, 2040 m. Recorded from Magdalena (**Gradstein, et al.**, 2016). General distribution: southeastern Brazil, Colombia.

Plants rather small, 2 mm wide, to 2 cm long, bright to dark green, leafy stems upright, arising from a creeping stolon, little branched in the lower half by intercalary branching. Stems rigid, upper parts green, lower parts of stem blackish-brown. Leaves obliquely spreading, distant to contiguous, convex with recurved dorsal and ventral margins and \pm plane apex, strongly ventrad-secund, ovate to ovate-oblong

to subovate, 1.5-2 \times 1.25-1.45 mm, ca. 1.2-1.3 \times longer than wide, apex rounded, apical and upper ventral margin with 2-7 small triangular teeth, the teeth 1-2(-3) cells long, sometimes rudimentary or broken; dorsal margin recurved, dorsal base short decurrent, ventral base longly and very narrowly decurrent, not ampliate. Leaf cells isodiametric to somewhat elongate, ca. 25-40 μm wide in midleaf, towards margin smaller, quadrate to elongate, towards base elongate, forming an obscure vitta; cell walls thin, trigones minute, cuticle smooth. Underleaves absent. Plants sterile. Vegetative reproduction absent.

Plagiochila subundulata is a rare tropical South American species of wet rock in rivers and near waterfalls. Characteristic are the rather small plants with obliquely spreading and strongly ventrad, ovate to ovate-oblong leaves (ca. 1.2-1.3 \times longer than wide), slightly toothed leaf margins with 2-7 small, triangular teeth which are only 1-2(-3) cells long and sometimes broken, thin-walled leaf cells with a smooth cuticle, and a short vitta. The species seems to be related to *P. bifaria* but differs from the latter species by subentire leaves, without larger teeth at the apex, and thin-walled leaf cells.

51. **Plagiochila superba** (Spreng.) Mont. & Nees, in d'Orbigny, Voy. Amér. Mérid. 7, Bot.: 81. 1839; **Heinrichs, (2002).**

TYPE: West Indies, leg. Sieber (STR)

SYNONYMS: *P. conspicua* Taylor, *P. frontinensis* Steph., *P. pichinchensis* Taylor

ILLUSTRATION: **Heinrichs** (2002: Plates 22-26).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on trunk bases, rotten logs, rock and humic soil in humid montane forests and scrubby páramo, ca. 1000-3200 m. Recorded from Antioquia, Cauca, Cesar, Chocó, Magdalena, Nariño, Putumayo, Risaralda and Valle. General distribution: tropical America.

Plants robust, 5-11 mm wide, branches scarce, intercalary, rarely terminal. Leaves wide-spreading, imbricate, elongate ovate-triangular and tapering to a rather narrow, truncate apex (ovate-oblong with a broad apex in var. *macrotricha*), ca. 1.2-1.6 \times longer than wide, \pm ampliate at the ventral base, unbordered; with ca. 10-40 linear teeth along the ventral, apical and upper dorsal margins, the teeth mostly one cell wide except towards the base, to 11 cells long, ventral and dorsal bases without teeth; dorsal leaf base shortly to rather longly decurrent, ventral base shortly decurrent. Leaf cells large, ca. 35-55 μm wide in midleaf, slightly elongate, with conspicuous trigones, vitta lacking; cuticle smooth. Androecia in a fan-shaped cluster at plant apex. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila superba is a common and variable species that is readily recognized by the robust plants with ampliate, ovate-triangular leaves with a narrow apex, margins with

numerous linear teeth (to 11 cells long, mostly one cell wide except at base, rarely wider), lower half of dorsal leaf margin entire, and large leaf cells. The species may be confused with *P. amicta* and *P. canelensis*. *Plagiochila amicta* differs by narrowly triangular teeth (not linear) and *P. canelensis* by shorter, broader leaves that are hardly longer than wide, and by the frequent occurrence of teeth on the dorsal leaf base.

Plagiochila superba var. *macrotricha* (Spruce) Heinrichs, recorded from Risaralda, Tolima and Valle, is similar to *P. amicta* in leaf shape (ovate-oblong) but the teeth in var. *macrotricha* are \pm linear as in *P. superba*.

52. ***Plagiochila tabinensis*** Steph., Bull. Herb. Boissier (sér. 2) 2: 862. 1902; **Heinrichs** (2002).

TYPE: Peru, leg. Lechler (G)

SYNONYM: *Acrobolbus laceratus* R.M.Schust.

ILLUSTRATIONS: **Schuster** (2001: Fig. 18 as *Acrobolbus laceratus*), **Heinrichs, et al.** (2001a: Figs. 1-14), **Heinrichs** (2002: Plate 45).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on trunks and canopy branches in humid montane forest and in scrub, 1500-3100 m. Recorded from Boyacá, Cauca, Magdalena and Risaralda. General distribution: tropical Andes.

Plants robust, whitish green to brown, medium-sized to large, 4-10 mm wide, branching intercalary, occasionally terminal. Leaves contiguous to imbricate, horizontally spreading to weakly ventrad, 2-4 \times longer than wide, widest at the base, apex deeply split (to 1/3-2/3 of leaf length) into 2-4 fragile, narrowly lanceolate to linear, lobe-like teeth, ventral margin entire or with 1-3 teeth, dorsal margin \pm entire; dorsal leaf base shortly decurrent, ventral leaf base shortly decurrent (small plants) or longly decurrent (robust plants). Leaf cells distinctly elongate, (1.5-2-4 \times longer than wide, ca. 20-30 μ m wide in midleaf, with large, radiate to confluent trigones; cuticle covered by wax platelets. Vegetative reproduction by fragmenting teeth?

Plagiochila tabinensis is readily recognized by the leaf apex which is deeply split into several very long and fragile, narrowly lanceolate to linear, lobe-like teeth. *Plagiochila tabinensis* is related to *P. aerea* but the latter species is a more delicate plant with leaves widest in the middle and apical teeth usually shorter (to maximally 1/3 of leaf length) and not fragile.

53. ***Plagiochila tamariscina*** Steph., Bull. Herb. Boissier (sér. 2) 2: 685. 1902.

TYPE: Puerto Rico, leg. Sintenis (PC syntype)

HABITAT AND DISTRIBUTION: on tree trunks and rotten wood, 180-2000 m. Recorded from Boyacá, Cundinamarca, Magdalena and Valle. General distribution: tropical America.

Plants delicate, medium-sized, 2.5-5 mm wide, pale yellowish green, feather-like, (bi)pinnately branched by terminal branching. Leaves distant to subimbricate, obliquely spreading, oblong, ca. 1.8-2.5 \times longer than wide, widest in the lower third or middle, ventral and apical leaf margins sharply toothed, leaf bases shortly decurrent, ventral leaf base not expanded, with or without shoulder. Leaf cells elongate, 15-25 μ m wide in midleaf, cell walls with small trigones or \pm evenly thickened; cuticle smooth. Underleaves lacking. Vegetative reproduction by propagula from ventral leaf surfaces.

By its pinnate-terminal branching *Plagiochila tamariscina* is similar to *P. deflexirama*, but the latter species has broader, (sub)imbricate leaves that are widest near the base and weakly to strongly ampliate.

54. ***Plagiochila tenuis*** Lindenb., Sp. Hepat. 2-4: 50. 1840.

TYPE: St. Vincent, unknown collector (W)

SYNONYM: *P. bidens* Gottsche, *P. scabrifolia* Inoue

ILLUSTRATIONS: Inoue (1977: Fig. 4 as *P. scabrifolia*), **Groth, et al.** (2002: Fig. 2F,I as *P. bidens*). The illustration of *P. tenuis* in **Gradstein & Ilkiu-Borges** (2009: Fig. 20C-E) shows a plant with rather short leaves (ca. 1.5 \times longer than wide) and was presumably based on misidentified material.

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark and rock, 1600-3500 m, at lower elevation on Galapagos. Recorded from Magdalena and Risaralda. General distribution: tropical America.

Plants small, delicate, 1-2 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves narrowly oblong, 2-2.2 \times longer than wide, sometimes caducous, apex bifid to 1/5, ventral margin entire or with 1-3 small teeth. Leaf cells isodiametric to elongate, 1-2 \times longer than wide, ca. 18-28 μ m wide in midleaf, with small trigones; cuticle finely papillose. Vegetative reproduction by caducous leaves.

Plagiochila tenuis resembles *P. papillifolia* in the bifid leaves with a papillose cuticle. However, the leaves in *P. papillifolia* are shorter, less than 1.8 \times longer than wide, and more strongly toothed (up to 12 teeth). Small bifid leaves occur also in *P. aerea*, *P. cuneata*, *P. exigua* and in the Central American *P. bicuspidata*, but in the latter four species the cuticle is smooth.

55. ***Plagiochila trichostoma*** Gottsche, in Triana & Planchon, Ann. Sci. Nat., Bot. (sér. 5) 1: 113. 1864; **Heinrichs, et al.** (2002a).

TYPE: Colombia, leg. Lindig (G lectotype)

SYNONYMS: *P. granatensis* Gottsche, *P. hansmeyeri* Steph., *P. ovato-obconica* Steph., *P. permista* Spruce, *P. saltuensis* Steph.

ILLUSTRATION: **Heinrichs, et al.** (2002a: Fig. 3).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on soil, rock, rotten logs and trunk bases in humid upper montane forest and scrubby

páramo, 1900-4000 m. Recorded from Antioquia and Cundinamarca. General distribution: tropical Andes.

Plants rather robust, 4-7 mm wide, branches intercalary. Leaves alternate to subopposite, imbricate, ventrad, shortly ovate-triangular, 0.9-1.2× longer than wide, ventral base shouldered or ampliate, margins not or slightly bordered, toothed all around except on the lower half of the dorsal margin, with 16-44 narrowly triangular to linear teeth (2-6 cells long); dorsal and ventral leaf bases rather shortly and narrowly decurrent. Leaf cells subisodiametrical, 30-40 µm wide, with large swollen trigones becoming confluent near margin; leaf base with a short vitta; cuticle smooth; oil bodies homogeneous (Heinrichs, *et al.*, 2002). Perianth base covered by bracts. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila trichostoma approaches *P. adianthoides* but differs by the shorter and broader leaves (maximally 1.2× longer than wide), which are distinctly ventrad or secund and lack a distinct border of thicker-walled cells, and by homogeneous oil bodies. By leaf shape and the presence of a vitta *P. trichostoma* is also similar to *P. heteromalla*, but the leaves in the latter species are opposite and bordered.

56. ***Plagiochila turgida*** Herzog, *Hedwigia* 72: 196. 1932; Heinrichs (2002).

TYPE: Costa Rica, leg. Standley (JE)

SYNONYM: *P. longaeva* Herzog

ILLUSTRATION: Heinrichs (2002: Plate 27).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in humid montane forests up to the páramo, 1800-3500 m. Recorded from Cauca, Huila and Risaralda. General distribution: northern Andes, Centralamerica.

Plagiochila turgida is similar to *P. macrostachya* in having subopposite leaves and large leaf cells but differs from the latter species by toothed dorsal leaf bases (entire in *P. macrostachya*) and less elongate leaves, 1-1.4× longer than wide (1.2-1.6× longer than wide in *P. macrostachya*). For a full description of *P. turgida* see Heinrichs (2002).

57. ***Plagiochila vincentina*** Lindenb., *Sp. Hepat.* 2-4: 39. 1840; Heinrichs (2002).

TYPE: St. Vincent, unknown collector (W)

SYNONYMS: *P. diversispina* Steph., *P. hylacoetis* Spruce, *P. variifolia* Steph.

ILLUSTRATION: Heinrichs (2002: Plates 28-29).

HABITAT AND DISTRIBUTION: on bark in lowland and montane rainforest, 50-2200 m. Recorded from Antioquia, Boyacá, Caquetá, Chocó, Cundinamarca, Magdalena, Risaralda and Valle. General distribution: tropical America.

Plants rather robust, 5-8 mm wide, branches scarce, intercalary. Leaves elongate-triangular to oblong with a narrow or broad apex, ca. 1.4-2× longer than wide, ventral

base shouldered to ampliate, margins unbordered, with ca. 20-80 triangular to linear teeth, the teeth to 10 cells long, dorsal and ventral leaf bases longly decurrent and strongly toothed. Leaf cells large, ca. 35-55 µm wide in midleaf, slightly elongate, with small radiate trigones, leaf base without vitta; cuticle smooth. Androecia usually intercalary. Vegetative reproduction not observed.

Plagiochila vincentina is very similar to *P. breuteliana*, both species have ampliate leaves with toothed and longly decurrent leaf bases. However, the leaves in *P. breuteliana* have a short vitta (vitta lacking in *P. vincentina*).

Excluded species

Plagiochila crispabilis Lindenb. (= *P. jovoensis* Steph., *P. patentissima* Lindenb.) – This Brazilian species has been erroneously recorded from Valle (Herzog, 1955) and Magdalena (Winkler, 1976); the material from Valle (leg. Killip 11652, JE) belongs to *P. tamariscina*, that from Magdalena (leg. Winkler C178, COL) is *P. punctata*. *Plagiochila crispabilis* is recognized by the wide-spreading, narrowly rectangular leaves with almost parallel margins, shortly decurrent leaf bases and a narrowly recurved ventral leaf base, which is not ampliate and lacks a high shoulder (Fig. 1A); branching is terminal and dichotomous.

Plagiochila macrifolia Taylor – This rare Andean species has been erroneously recorded from Risaralda (see Uribe & Gradstein, 1998); the specimen (leg. Wolf 1317, COL) belongs to *P. alternans*. *Plagiochila macrifolia* is distinguished by narrowly oblong, distant, ventrad leaves with entire margins and a rounded to truncate apex with 2-4 small teeth; branching is terminal-dichotomous. It closely resembles *P. distinctifolia* but the latter species usually has a leaf border of thicker-walled cells and a toothed ventral leaf margin.

Plagiochila simplex (Sw.) Lindenb. – This widespread neotropical species is surprisingly rare in the Andes and not yet known from Colombia; the record from Magdalena (Winkler, 1976) belongs to *P. tamariscina*. The species closely resembles *P. gymnocalycina* and Heinrichs, *et al.* (1998) suggested that the two species might be conspecific. They differ, however, in the shape of the leaves which are unusually more than 2× longer than wide in *P. gymnocalycina* while being less than 2× longer than wide in *P. simplex*. Material of *P. simplex* with caducous leaves may be confused with *P. punctata* but the latter species has a vitta and leaves, only 1.9-1.2× longer than wide.

Further names

The following taxa recorded from Colombia have not been studied; many of them may be synonyms or misidentifications.

Plagiochila aspleniformis R.M.Schust. – North American species; recorded from Putumayo by Robinson (1967).

Plagiochila arcta S.Winkler – Type from Magdalena, San Lorenzo, 2180 m, *Winkler C44* (ULM?). Identity unclear, original description very poor.

Plagiochila choachina Gottsche var. *phyllobola* Gottsche – Type from Cundinamarca, *Lindig s.n. Plagiochila choachina* is a synonym of *P. punctata* but this variety has not been studied.

Plagiochila discreta Gottsche – Type from Aserradero near Bogotá, *Lindig 1729c*. **Inoue** (1989) considered this species a synonym of *P. raddiana* but according to **Heinrichs & Gradstein** (2000) it is not conspecific with *P. raddiana*.

Plagiochila horrida Gottsche var. *granatensis* Gottsche – Type from Cundinamarca, *Lindig s.n. Plagiochila horrida* is a synonym of *P. bifaria* but this variety has not been studied.

Plagiochila humboldtiana Gottsche – The type of this species (“Nova Granada”, *Humboldt & Bonpland s.n.*) seems to be lost (see **Stephani**, 1901-1905).

Plagiochila interjecta Gottsche – Type from Tocarema, 2200 m, *Lindig 1705g*. **Inoue** (1989) considered this species a synonym of *P. raddiana* but according to **Heinrichs & Gradstein** (2000) it is not conspecific with *P. raddiana*.

Plagiochila laetevirens Lindenb. var. *peruviana* Spruce – Peruvian taxon; recorded from Valle by **Herzog** (1955).

Plagiochila longiramea Steph.– This Bolivian endemic was recorded from Cundinamarca by Inoue (in **Gradstein & Hekking**, 1979) under the name *P. apicidens* Steph., which is a synonym (**Heinrichs**, 2002). The record needs verification.

Plagiochila longitexta Steph. – Syntype from Zipacón, *Lindig s.n. Inoue* (1989) considered this species a synonym of *P. raddiana* but according to **Heinrichs & Gradstein** (2000) it is not conspecific with *P. raddiana*.

Plagiochila oblongotrigona Steph. – This African species was recorded from Cundinamarca by **Irmischer** (1914). The record is presumably erroneous.

Plagiochila perrottetiana Mont. & Gottsche var. *minor* Gottsche – Type from Cundinamarca, *Lindig s.n. Plagiochila perrottetiana* is a synonym of *P. rutilans* but this variety has not been studied.

Plagiochila relictata Steph.– Type from Pacho, *Lindig s.n.*

Plagiochila rufoviridis Spruce – Bolivian species; recorded from Colombia by **Dugas** (1929). The type of this unresolved name could not be found in MANCH (L. Loughtman, in litt.).

Plagiochila saltuensis Spruce var. *spinossissima* Herzog– Type from Valle, *Killip 11399*. *Plagiochila saltuensis* is a synonym of *P. trichostoma* but this variety has not been studied.

Plagiochila tovarina Gottsche var. *trianae* Gottsche– Type from Nova Granada (Colombia?), *Triana s.n.*

Plagiochila trianae Gottsche– Type from Zipacón, *Lindig 1796*.

Acknowledgements

I express my gratitude to the curators of the herbaria C, COL, FH, G, GOET, JE, MANCH, S and W for making *Plagiochila* specimens available for study and to Dr. Michelle Price (Geneva), Dr. Marc Appelhans (Göttingen) and to Dr. Jaime Uribe (Bogotá) for their help during my herbarium visits. I am very grateful to Ms Xia-Fang Cheng and Dr. Rui-Liang Zhu (Shanghai) for the photographs of *Plagiochila eggersii* and to Ms Françoise Bouazzat (Paris) for assembling the plate of this species; to Dr. Elena M. Reiner-Drehwald (Göttingen) and Dr. Jan Wojtecki for the illustration of *Plagiochila cucullifolia* and to the copyright-holder for the permission to re-use this plate of this species; to Dr. Anna Luiza Ilkiu-Borges (Belém) for preparing Figure 1; and to Dr. Jaime Uribe and an anonymous reviewer for constructive comments on the manuscript.

Información suplementaria

Appendix 1. Nomenclatural changes in the catalogue of *Plagiochila* of Colombia (**Gradstein & Uribe**, 2015). Synonymy based on **Gradstein** (2015a) unless otherwise stated.

Conflict of interest

The author declares that he has no conflict of interest.

Bibliography

- Aguirre, J. & Calonge, F.D. (1985).** Algas, Líquenes, Hongos, Hepáticas y Musgos. En: Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada (1783-1816), Tomo II. Madrid: Instituto de Cultura Hispánica.
- Carl, H. (1931).** Die Artypen und die systematische Gliederung der Gattung *Plagiochila* Dum. Ann. Bryol., Suppl. **2**: 1-170.
- Chua-Petiot, M.S. (2011).** A checklist of Hepaticae and Anthocerotae of Malaysia. Polish Botanical Journal **56**: 1-44.
- Dauphin, C. (2005).** Catalogue of Costa Rican Hepaticae and Anthocerotae. Tropical Bryology **26**: 141-2018.
- Dugas, M. (1929).** Contribution à l'étude du genre «*Plagiochila*» Dum. Ann. Sci. Nat. Bot. sér. 10, **11**: 1-199.
- Glenny, D. (1998).** A revised checklist of New Zealand liverworts and hornworts. Tuhiinga **10**: 119-149.
- Gottsche, C.M. (1863).** De Mexikanske Levermosser. Copenhagen: Bianco Lunos.
- Gottsche, C.M. (1864).** Hepaticae. [In: Triana, J.J. & Planchon, J.E. Prodromus florae novo-granatensis]. Annales des Sciences Naturelles 5, Botanique **1**: 95-198.
- Gradstein, S.R. (1997).** Hepatophyta, Anthocerophyta. In: Boggan, J., Funk, V., Kelloff, C., Hoff, M., Cremers, G. & Feuillet, C. (eds.). Checklist of the Plants of the Guianas (pp. 9–15). Washington: Smithsonian Institution.

- Gradstein S.R. (2015a).** New synonyms and new lectotypifications in Neotropical *Plagiochila* (Marchantiophyta). *Cryptogamie, Bryologie* **36**: 369-379.
- Gradstein S.R. (2015b).** Annotated key to the species of *Plagiochila* from Brazil. *Pesquisas Botanica* **67**: 23-36.
- Gradstein, S.R. & Costa, D.P. (2003).** The Liverworts and Hornworts of Brazil. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **87**: 1-317.
- Gradstein, S.R. & Feuillet-Hurtado, C. (in press).** *Plagiochila fastigiata* Lindenb. & Gottsche. In: New national and regional bryophyte records. *Journal of Bryology*.
- Gradstein, S.R. & Hekking, W.H.A. (1979).** Studies on Colombian Cryptogams IV. A Catalogue of the Hepaticae of Colombia. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **45**: 93-144.
- Gradstein, S.R. & Ilkiu-Borges, A.L. (2009).** Guide to the Plants of Central French Guiana. Part IV. Liverworts and Hornworts. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **76, 4**: 1-140.
- Gradstein, S.R. & Reiner-Drehwald, M.E. (1995).** *Szweykowskia*, a new genus of Plagiochilaceae (Hepaticae) from tropical America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* **40**: 31-38.
- Gradstein, S.R. & Salazar Allen, N. (1992).** Bryophyte diversity along an altitudinal gradient in Darién National Park, Panama. *Tropical Bryology* **5**: 61-71.
- Gradstein, S.R. & Uribe, J. (2015).** Marchantiophyta. In: Bernal, R., Gradstein, S.R. & Celis, M. (eds.). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. <http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co/>
- Gradstein, S.R., Churchill, S.P. & Salazar Allen, N. (2001).** Guide to the Bryophytes of Tropical America. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **86**: 1-577.
- Gradstein, S.R., Morales, C., Negritto, M.A. & Duckett, J.G. (2016).** New records of liverworts and hornworts from the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Cryptogamie, Bryologie* **37** (in press).
- Grolle, R. & Heinrichs, J. (1999).** Redescription and synonymy of *Plagiochila aerea* Taylor 1846 (Hepaticae), first described as *Lycopodium pinnatum* by Lamarck 1792. *Nova Hedwigia* **68**: 511-525.
- Groth, H., Helms, G. & Heinrichs, J. (2002).** The systematic status of *Plagiochila* sects. *Bidentes* Carl and *Caducilobae* Inoue (Hepaticae) inferred from nrDNA ITS sequences. *Taxon* **51**: 675-684.
- Hässel de Menendez, G.G. (1983).** Informaciones nomenclaturales sobre las especies del genero *Plagiochila* (Hepaticae) de Argentina y Chile. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* **22**: 87-129.
- Heinrichs, J. (2002).** A taxonomic revision of *Plagiochila* sect. *Hylacoetes*, sect. *Adiantoideae* and sect. *Fuscoluteae* in the Neotropics with a preliminary subdivision of Neotropical Plagiochilaceae into nine lineages. *Bryophytorum Bibliotheca* **58**: 1-184.
- Heinrichs, J. & Gradstein, S.R. (1999).** On *Plagiochila longiramea* Steph. (Hepaticae), a poorly known species of Bolivia. *Candollea* **54**: 73-81.
- Heinrichs, J. & Gradstein, S.R. (2000).** A revision of *Plagiochila* sect. *Crispatae* and sect. *Hypnoides* (Hepaticae) in the Neotropics. I. *Plagiochila disticha*, *P. montagnei* and *P. raddiana*. *Nova Hedwigia* **70**: 161-184
- Heinrichs, J., Anton, H., Holz, I. & Gradstein, S.R. (2000a).** On the blue stem colour in *Plagiochila longispina* Lindenb. & Gottsche (Plagiochilaceae). *Cryptogamie, Bryologie* **21**: 109-111.
- Heinrichs, J., Anton, H., Gradstein, S.R. & Mues, R. (2000b).** Systematics of *Plagiochila* sect. *Glaucoscentes* Carl (Hepaticae) from tropical America: a morphological and chemotaxonomical approach. *Plant Systematics and Evolution* **220**: 115-138.
- Heinrichs, J., Anton, H., Holz, I. & Grolle, R. (2001a).** The andine *Plagiochila tabinensis* Steph. and the identity of *Acrobolbus laceratus* R.M. Schust. (Hepaticae). *Nova Hedwigia* **73**: 445-452.
- Heinrichs, J., Gradstein, S.R. & Grolle, R. (1998).** A revision of the neotropical species of *Plagiochila* (Dumort.) Dumort. (Hepaticae) described by Olof Swartz. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **85**: 1-32.
- Heinrichs, J., Gradstein, S.R., Groth, H. & Lindner, M. (2003).** *Plagiochila cucullifolia* var. *anomala* var. nov. from Ecuador, with notes on discordant molecular and morphological variation in bryophytes. *Plant Systematics and Evolution* **242**: 205-216.
- Heinrichs, J., Groth, H., Gradstein, S.R., Rycroft, D.S., Cole, W.J. & Anton, H. (2001b).** *Plagiochila rutilans* (Hepaticae): a poorly known species from tropical America. *The Bryologist* **104**: 350-361.
- Heinrichs, J., Groth, H., Holz, I., Rycroft, D.S., Renker, C. & Pröschold, T. (2002a).** The systematic position of *Plagiochila moritziana*, *P. trichostoma* and *P. deflexa*, based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA, morphology and lipophylic secondary metabolites. *The Bryologist* **105**: 189-203.
- Heinrichs, J., Groth, H., Lindner, M., Feldberg, K. & Rycroft, D.S. (2004a).** Molecular, morphological and phytochemical evidence for a broad species concept of *Plagiochila bifaria* (Sw.) Lindenb. (Hepaticae). *The Bryologist* **107**: 28-40.
- Heinrichs, J., Groth, H., Lindner, M., Renker, C., Pócs, T. & Pröschold, T. (2004b).** Intercontinental distribution of *Plagiochila corrugata* (Plagiochilaceae, Hepaticae) inferred from nrDNA ITS sequences and morphology. *Botanical Journal of the Linnean Society* **146**: 469-481.
- Heinrichs, J., Groth, M. & Sauer, M. (2004c).** New synonyms in *Plagiochila* (Hepaticae) III. *Cryptogamie, Bryologie* **25**: 35-37.
- Heinrichs, J., Lindner, M., Groth, H. & Renker, C. (2005a).** Distribution and synonymy of *Plagiochila punctata* (Taylor) Taylor, with hypotheses on the evolutionary history of *Plagiochila* sect. *Arrectae* (Plagiochilaceae, Hepaticae). *Plant Systematics and Evolution* **250**: 105-117.

- Heinrichs, J., Lindner, M., Gradstein, S.R., Groth, H., Buchbender, V., Solga, A. & Fischer, E. (2005c).** Origin and subdivision of *Plagiochila* (Jungermanniidae: Plagiochilaceae) in tropical Africa based on evidence from nuclear and chloroplast DNA sequences and morphology. *Taxon* **54**: 317-333.
- Heinrichs, J., Renker, C. & Gradstein, S.R. (1999).** A taxonomic revision of *Plagiochila subplana* Lindenb., a widespread liverwort of tropical America. *Haussknechtia Beiheft* **9**: 171-181.
- Heinrichs, J., Rycroft, D.S., Groth, H. & Cole, W.J. (2002b).** Morphological and phytochemical studies of *Plagiochila papillifolia* Steph., a neotropical liverwort new to Europe. *Journal of Bryology* **24**: 119-126.
- Heinrichs, J., Rycroft, D. S., Feldberg, K., Lindner, M. & Hartmann, F.A. (2006).** The systematic position of *Plagiochila surinamensis* inferred from nrDNA sequences, morphology and phytochemistry. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **100**: 135-142.
- Heinrichs, J., Sauer, M. & Grolle, R. (2002c).** Lectotypification and synonymy of *Plagiochila* sect. *Vagae* Lindenb. (Hepaticae). *Cryptogamie, Bryologie* **23**: 5-9.
- Heinrichs, J., Wilson, R., Feldberg, K., Hentschel, J., Schäfer-Verwimp, A., León-Yáñez, S. & Yandún, S. (2005b).** The systematic position of *Plagiochila (Jamesoniella) dependula* (Jungermanniopsida) inferred from nrITS sequences and morphology, with notes on its differentiation from *Plagiochila fuscolutea*. *Journal of Bryology* **27**: 319-327.
- Herzog, T. (1932).** Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Plagiochila* I. Neotropische Arten. *Hedwigia* **72**: 195-242.
- Herzog, T. (1934).** Die Bryophyten der Andenreisen von C. Troll (Bolivia, Columbia, Panama). *Hedwigia* **74**: 79-97.
- Herzog, T. (1955).** Hepaticae aus Colombia und Peru. *Feddes Repertorium* **57**: 156-203.
- Holz, I., Heinrichs, J., Schäfer-Verwimp, A. & Gradstein, S.R. (2001).** Additions to the hepatic flora of Costa Rica III. *Cryptogamie, Bryologie* **22**: 255-273.
- Inoue, H. (1964).** The Genus *Plagiochilon*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **27**: 52-72.
- Inoue, H. (1966).** A monograph of the hepatic genus *Syzygiella* Spruce. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **29**: 171-213.
- Inoue, H. (1977).** Four new species of the genus *Plagiochila* from the Galapagos Islands. *Bulletin of the National Science Museum (Tokyo) Ser. B*, **3**: 45-54.
- Inoue, H. (1987).** Notes on the Plagiochilaceae, XIV. New species of *Plagiochila* (Dum.) Dum. from Neotropics. In: Inoue, H. (ed.). *Studies on Cryptogams in Southern Peru* (pp. 95–105). Tokyo: Tokai University Press.
- Inoue, H. (1988).** Notes on the Plagiochilaceae, XV. The genus *Steereochila* Inoue and *Plagiochila eggersii*, sp. nov. *Bulletin of the National Science Museum (Tokyo) Ser. B*, **14**: 135-141.
- Inoue, H. (1989).** Notes on the Plagiochilaceae, XVI. Studies on some *Plagiochila* species in the Neotropics. *Bulletin of the National Science Museum (Tokyo) Ser. B*, **15**: 35-47.
- Inoue, H. & Gradstein, S.R. (1980).** Notes on the Plagiochilaceae, IX. A review of the genus *Plagiochila* (Dum.) Dum. in the Galapagos Islands. *Bulletin of the National Science Museum (Tokyo) Ser. B*, **6**: 7-22.
- Irmischer, E. 1914.** Beiträge zur Laubmoosflora von Kolumbien. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles* **5**: 994-997.
- Jack, J.B. & Stephani, F. (1892).** Hepaticae Wallisiana. *Hedwigia* **31**: 11-27.
- Kunth, C.S. (1822).** Synopsis Plantarum, quas in intere ad plagam aequinoctialem orbis novi collegerunt A. de Humboldt et Am. Bonpland. Tomus primus (pp. 40–45). Paris: Levrault.
- Lavocat Bernard, E. & Schäfer-Verwimp, A. (2011).** Checklist of the bryophytes of the Guadeloupe archipelago and Martinique (French West Indies). *Cryptogamie, Bryologie* **32**: 233-277.
- León-Yáñez, S., Gradstein, S.R. & Wegner, C. (2006).** Hepáticas y Antoceros del Ecuador. Quito: Herbario QCA.
- Mägdefrau, K. (1983).** The bryophyte vegetation of the forests and páramos of Venezuela and Colombia. *Nova Hedwigia* **38**: 1-63.
- Müller, J., Heinrichs, J. & Gradstein, S.R. (1999).** A revision of *Plagiochila* sect. *Plagiochila* in the Neotropics. *The Bryologist* **102**: 729-746.
- Robinson, H. (1967).** Preliminary studies on the bryophytes of Colombia. *The Bryologist* **70**: 1-61.
- Robinson, H. (1988).** *Plagiochila rudischusteri*, a new species from the Paria Peninsula of Venezuela. *Beiheft zur Nova Hedwigia* **90**: 199-202.
- Rycroft, D.S., Cole, W.J., Heinrichs, J., Groth, H., Renker, C. & Pröschold, T. (2002).** Phytochemical, morphological and molecular evidence for the occurrence of the neotropical liverwort *Plagiochila stricta* in the Canary Islands, new to Macaronesia. *The Bryologist* **105**: 363-372.
- Rycroft, D.S., Heinrichs, J., Cole, W.J. & Anton, H. (2001).** A phytochemical and morphological and molecular study of the liverwort *Plagiochila retrorsa* Gottsche, new to Europe. *Journal of Bryology* **23**: 23-34.
- Schumacker, R. & Váña, J. (2005).** Identification keys to the liverworts and hornworts of Europe and Macaronesia, 2nd ed. Poznań: Sorus.
- Schuster, R.M. (1980).** The Hepaticae and Anthocerotae of North America, Vol. IV. New York: Columbia University Press.
- So, M.L. (2001).** *Plagiochila* (Hepaticae, Plagiochilaceae) in China. *Systematic Botany Monographs* **60**: 1-214.
- Söderström, L. (2015).** Notes on Early Land Plants Today. 69. Circumscription of Plagiochilaceae (Marchantiophyta) with a preliminary infrageneric subdivision of *Plagiochila*. *Phytotaxa* **208**: 75-91.
- Söderström, L., Gradstein, S.R. & Hagborg, A. (2010).** A checklist of the hornworts and liverworts of Java. *Phytotaxa* **9**: 53-149.

- Söderström, L., Hagborg, A., von Konrat, M. and 38 co-authors (2016).** World checklist of hornworts and liverworts. *Phytokeys* **59**: 1-828.
- Söderström, L., Hagborg, A., Váña, J. & von Konrat, M. (2011).** Land of wood and water: A checklist of liverworts and hornworts of Jamaica. *The Bryologist* **114**: 67-91.
- Söderström, L., Pócs, T., Váña, J. & Hagborg, A. (2015).** Notes on Early Land Plants Today. 74. Validation of a few names in liverworts. *Phytotaxa* **220**: 199-200.
- Stephani, F. (1901–1905).** *Species Hepaticarum*, Vol. II. Genève: Georg & Cie.
- Stephani, F. (1916).** Hepaticae. In: Herzog, T. *Die Bryophyten meiner zweiten Reise durch Bolivia*. *Bibliotheca Botanica* **87**: 173-268.
- Thouvenot, L., Gradstein, S.R., Hagborg, A., Söderström, L. & Bardat, J. (2011).** Checklist of the liverworts and hornworts of New Caledonia. *Cryptogamic, Bryologie* **32**: 287-390.
- Uribe, J. & Gradstein, S.R. (1998).** Catalogue of the Hepaticae and Anthocerotae of Colombia. *Bryophytorum Bibliotheca* **53**: 1-99.
- Winkler, S. (1976).** Die Hepaticae der Sierra Nevada de Santa Marta, Kolumbien. I. Terrestrische, epixyle und epipetrische Arten. *Revue Bryologique et Lichénologique* **42**: 789-825.
- Wolf, J.H.D. (1994).** Epiphyte communities of tropical montane forests in the northern Andes. *Phytocoenologia* **22**: 1-103.

Phytoliths produced by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), achira (*Canna indica* L.), and squash (*Cucurbita ficifolia* Bouché), crop species from Boyacá, Colombia

Nataly Poveda-Díaz^{1,*}, María Eugenia Morales-Puentes¹, Gregory Vaughan²

¹ Grupo de Investigación SisBio, Herbario UPTC, Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Boyacá, Colombia

² Grupo Interdisciplinario de Investigaciones Arqueológicas e Históricas, UPTC, Escuela de Ciencias Sociales, Facultad de Ciencias de la Educación, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Boyacá, Colombia

Abstract

Silica structures were analyzed in three species used by both pre-Hispanic and present-day populations in central Colombia: squash, common bean, and achira. In squash (*Cucurbita ficifolia* Bouché), structures were found in leaves and fruit epidermis, with undulated scalloped phytoliths and trichome forms. In achira (*Canna indica* L.), globular phytoliths with circular ornamentation in the center were found in leaves and corresponded to the Globulolita morpho-tribe. In common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), elongated phytoliths with hooked ends were found on leaves and belonged to the Capilusita morpho-tribe. Through the standardization of the phytolith extraction protocol (dry ashing method), we established that leaves are the structures with the highest content of phytoliths in the species studied.

Key words: Silicophytoliths, morphotypes, Andean crops.

Fitolitos producidos por el fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), la achira (*Canna indica* L.) y la calabaza (*Cucurbita ficifolia* Bouché), especies alimenticias estudiadas en Boyacá, Colombia

Resumen

Se analizaron las estructuras silíceas en tres especies consideradas de uso prehispánico y actual en el centro de Colombia: calabaza, fríjol y achira. En la calabaza (*Cucurbita ficifolia* Bouché) se encontraron fitolitos festoneados, con ondulaciones, en forma de tricoma en hojas y epidermis del fruto. En las hojas de achira (*Canna indica* L.) se encontraron fitolitos globulares con ornamentación circular en el centro que correspondían a la morfotribu Globulolita. En las hojas de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) se encontraron fitolitos de cuerpos alargados con terminación en forma de gancho pertenecientes a la morfotribu Capilusita. Mediante la estandarización del protocolo de extracción de fitolitos (*dry ashing method*) se estableció que la hoja fue la estructura donde se encontró el mayor contenido de fitolitos en estas especies.

Palabras clave: silicofitolitos, morfotipos, cultivos andinos.

Introduction

Phytoliths are structures resulting from the accumulation of oxalate, carbonate, or silica inclusions in cell walls or in entire cells from different tissues. Silica phytoliths are frequent in the plant epidermis, where both epidermal cells and specialized cells (occlusive cells, trichomes, etc.) undergo this deposition process. This mineralization is the result of the basic plant function of water absorption from the soil (Bowdery, 1998).

Silicophytoliths are common in leaves, floral parts, wood, and bark, and vary in form and size. Phytolith morphology is species-specific. It is possible that phytoliths carry out functions of physical support, resistance, or defense (Piperno, 1988a).

There are several factors that affect phytolith production in a given plant, among them, taxonomic (genetic) predisposition of the plant, age, climate, and soil composition. The availability of large amounts of water and the organic matter content of the soil also favor biomineralization processes, and hence the production of phytoliths (Parry & Smith, 1958). These environmental conditions can influence phytolith production levels and, in rare cases, the pattern of phytolith deposition in the plant (Piperno, 1988b). This is the case, for example, of

*Corresponding author:

Nataly Poveda-Díaz, nataly.poveda@uptc.edu.co

Received: August 26, 2015

Accepted: January 20, 2016

leguminous plants, which always silicify the sclerenchyma tissue, regardless of whether phytolith production is high or low (Piperno, 1988b).

The interest on phytoliths studies has been rising due to their presence in numerous plant families and to the possibility of establishing whether a given taxon produces these structures or not (Piperno, 1988b). In this sense, Zurro (2006) mentions the presence of intracellular silica not only in angiosperms, but also in mosses, horsetails, ferns, and conifers, as well as the tendency of herbaceous plants to produce more phytoliths than woody taxa. It should be noted that most studies have centered on cereals given their socioeconomic, historic, and botanic importance (Zurro, 2006).

Numerous studies show that silicophytolith production is widely distributed in plants, though more in certain families than in others, for example, in the Poaceae, the Arecaceae, the Cyperaceae, and the Asteraceae (Simkiss & Wilbur, 1989). Afonso (2004) also detected phytoliths in the Lauraceae and the Boraginaceae, while Acosta, *et al.* (2011, 2013) described phytoliths in the Gunneraceae, and Fernández, *et al.* (2012) in the Ericaceae.

Since the pioneering studies of Ehrenberg (1854) and Douval-Jouve (1875), it has been known that not all plants are capable of absorbing and concentrating silica in their tissues, but in those plants that do possess this capacity, phytoliths acquire an indisputable taxonomic value (Bertoldi del Pomar, 1975). Furthermore, silicophytoliths remain in soils after plants die because of their chemical characteristics resistant to decomposition processes (Bertoldi de Pomar, 1975). The analysis of these structures is a new approach in paleoenvironmental reconstruction, as well as in paleoclimate and paleoethnobotany, i.e., the use of flora by prehistoric human communities (Piperno, 1988a). Pearsall (1988), Piperno (1988a), and Powers-Jones (1992) mention that analysis of phytoliths and silica skeletons has been applied to archeological materials and sediments for years now, with increasingly frequent published results.

The presence of silica in the soil is the consequence of processes of lixiviation of siliceous minerals (quartz, feldspar, etc.), as well as the dissolution of previously formed silica biominerals (phytoliths, diatoms, sponge spicules, among others). These processes are influenced by factors such as topography, climate, soil parent material, and moisture (Zurro, 2006).

Phytoliths are a tool to study ancient vegetation and landscape (Piperno, 2006), due to their specificity for certain plant taxa (Erra, *et al.*, 2006). Thus, phytolith analysis is currently used in paleobotany as one of the components in the reconstruction of past ecosystems as it offers a precise snapshot of the vegetation in a given moment in history (Erra, 2010). Phytoliths also allow

investigators to study paleo diet and the relationship of prehistoric peoples with their surroundings. Many studies have focused on the reconstruction of plant communities, offering information on the large-scale events that have affected their flora (Alexandre, *et al.*, 1997; Barboni, *et al.*, 1999, 2007; Scott, 2002; Abrantes, 2003; Bremond, *et al.*, 2008; Barboni & Bremond, 2009). Though most phytoliths are not a diagnostic tool for a single taxon, and can only be used to reconstruct large ecological groups, their analysis does enable the detection of some unique morphotypes, and, therefore, more precise taxonomic diagnostics and paleoecological interpretations (Eichorn, *et al.*, 1996; Acosta, *et al.*, 2011, 2013; Fernández, *et al.*, 2012).

Phytolith observation is a relatively new archeological tool, and methods have recently been developed for the analysis of these silica structures in the processing of coproliths, abdominal sediments, and dental calculus. Dental calculus serves as a direct tool to study part of the food, swallowed or not, consumed by human groups thanks to the microparticles that remain trapped in the process of calculus formation once the food product enters the mouth. Furthermore, dental calculus analysis offers a way to draw closer to the specific food choices of each individual. This individual choice becomes a key route to discover cultural practices and social identity expressed in daily life (Gil, 2011).

The present study was conducted in the framework of the project *Alimentos Prehispánicos, Alimentos Promisorios* that aimed at evaluating traditional indigenous crops of Boyacá, Colombia, in terms of their botanic, agronomical, and cultural significance. The project used bibliographic and field techniques to study crops that have been consumed in Boyacá for more than 8,000 years (Morcote, 1996).

Materials and methods

Area of study

Boyacá department, with a total area of 23,189 km², is located in the center of Colombia, on the Andean Eastern Cordillera bordering Santander and Norte de Santander departments to the north, Arauca and Casanare departments (and the Venezuelan border) to the east, Meta and Cundinamarca departments to the south, and Cundinamarca and Antioquia departments to the west (Figure 1).

Its economy is based on agriculture, mining, steel production, commerce, and tourism. The principal crops are potato, maize, onion, wheat, beans, and sugarcane.

Plant material for the present study was collected from different municipalities where the three species are found. Ethnobotanic visits were carried out to establish the traditional uses and practices surrounding these crops based on what peasant farmers reported, as well as to observe the fields in which they were being cultivated.

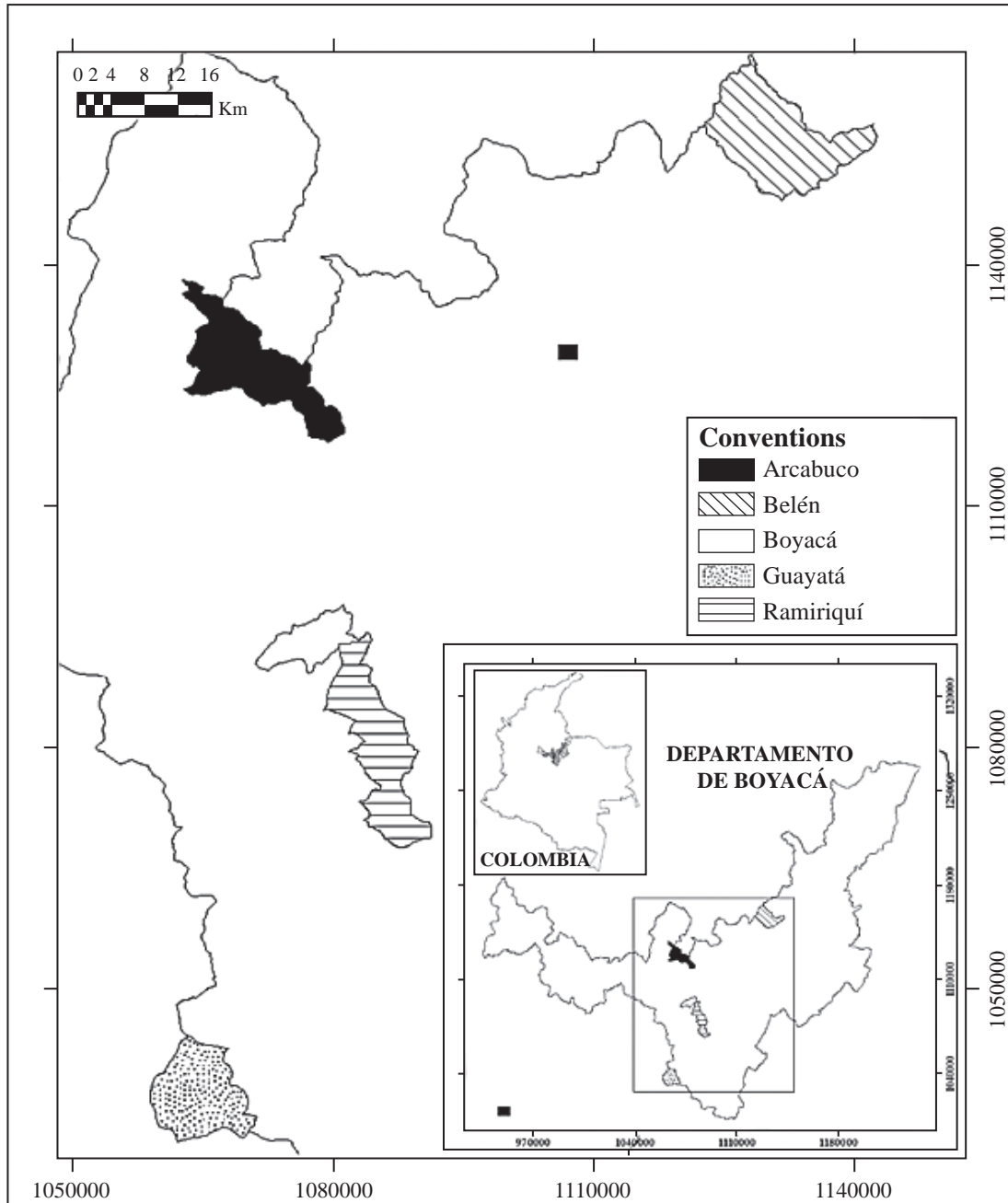





















Figure 1. Map of the places where plant samples were collected: Ramiriquí, Boyacá, Arcabuco, Belén, and Guayatá, all in Boyacá, Colombia

Fieldwork phase

Collection of specimens and processing for herbarium. Exemplars were collected from *Canna indica* (Cannaceae), *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae), and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) plant material, and each individual sample was placed between newspaper sheets. After pressing and drying, the material was managed according to standard herbarium procedures, and its identification confirmed by comparison with the reference collection,

and consultation with experts, as well as virtual herbaria (COL, MO, and NY), web pages (The Plant List 2010; www.ipni.org; systematicplants.org), and the COL, UPTC, and FMB herbaria. Exemplars were entered into the UPTC Herbarium, and phytoliths were extracted from them. Characterization of silicophytoliths was performed following Parra & Flórez (2001) methodology (Table 1), which is based strictly on morphological characteristics of phytoliths, thus allowing for their rapid identification and understanding.

Table 1. Morphological classification of phytoliths from the Colombian Andes (taken from **Parra & Flórez, 2001**).

Morphotribes	Scheme forms	Form-Genre
1) Flabellulita		1) Verrugoflabellulita, 2) Psiloflabellulita, 3) Undolaflabellulita, 4) Fovaoflabellulita
2) Aculeolita		1) Verrugoaculeolita, 2) Psiloaculeolita, 3) Fovaoflabellulita
3) Prismatolita		1) Psiloprismatolita, 2) Maculaprismatolita, 3) Faveoprismatolita, 4) Creteroprismatolita, 5) Catenoprismatolita, 6) Espinoprismatolita, 7) Dentinoprismatolita, 8) Undolaprismatolita
4) Estrobilolita		1) Psiloestrobilolita, 2) Faveoestrobilolita, 3) Undolaestrobilolita
5) Braquiolita		1) Faveobraquiolita, 2) Espinobraquiolita, 3) Verrugobraquiolita, 4) Psilobraquiolita, 5) Scultubraquiolita, 6) Reticulobraquiolita, 7) Undolabraquiolita, 8) Sulcabraquiolita
6) Elipsoidita		1) Unduloelipsoidita, 2) Psiloelipsoidita, 3) Creteroelipsoidita, 4) Alataelipsoidita, 5) Verrugoelipsoidita, 6) Foveoelipsoidita
7) Halteriolita		1) Psilohalteriolita, 2) Verrugohalteriolita
8) Bilobulita		1) Psilobilobulita, 2) Creterobilobulita, 3) Verrugobilobulita, 4) Foveobilobulita, 5) Macubilobulita, 6) Espinobilobulita
9) Doliolita		1) Psilodoliolita, 2) Creterodoliolita, 3) Foveodoliolita
10) Clavaelita		1) Psiloclavaelita, 2) Foveoclavaelita, 3) Undolaclavaelita, 5) Verrugoclavaelita
11) Petesusita		1) Psilopetesusita, 2) Foveopetesusita, 3) Maculapetesusita, 4) Crateropetesusita, 5) Undolapetesusita, 6) Verrugopetesusita
12) Globulolita		1) Psiloglobulolita, 2) Maculaglobulolita, 3) Verrugoglobulolita, 4) Foveoglobulolita, 5) Annuloglobulolita, 6) Undologlobulolita, 7) Alatoglobulolita
13) Longolita		1) Psilolongolita, 2) Undolalongolita, 3) Verrugolongolita, 4) Lanvalongolita, 5) Craterolongolita
14) Cymbaita		1) Psiloecymbaita, 2) Verrugocymbaita
15) Cylindrita		1) Verrugoyilindrita, 2) Esferocylindrita
16) Triangulita		1) Psilotriangulita, 2) Verrugotriangulita, 3) Foveotriangulita, 4) Craterotriangulita, 5) Reticutriangulita
17) Capilusita		1) Psilacapilusita, 2) Denticapilusita, 3) Estriacapilusita
18) Florisita		1) Psilofflorisita
19) Amorfolita		Unknown or unclear shape.

Laboratory phase

Phytolith extraction. Samples were taken from leaves and edible parts of the plants (fruits or rhizomes), with three replications per organ in each plant, and processed in the oven of the UPTC Herbarium. The botanical material was then washed with distilled water and allowed to air dry. Phytoliths were extracted following the protocols of **Piperno** (1998a) and **Zucol** (1999) known as the dry ashing method (**Morcote**, 2008).

Rhizome, leaf, and fruit samples were ground and placed in crucibles at 500°C for three hours, after which they were allowed to cool for 12-24 hours. These carbonized samples were then placed in Falcon tubes with 10 mL of 10% HCl solution to eliminate organic matter and calcareous structures. The tubes were then placed in a hot water bath at 70°C for 20 minutes, after which they were decanted. Samples were then washed with distilled water, centrifuged at 3500 rpm for five minutes, and decanted again. They were again washed with distilled water, centrifuged at 3500 rpm for five minutes, and decanted. After this, 50% H₂O₂ was added to the samples, they were heated in a water bath for 20 minutes, and once again centrifuged at 3500 rpm for five minutes.

The samples were decanted again, washed with distilled water, and centrifuged for five minutes at 3500 rpm. They were agitated in a vortex after adding 10 mL of 90% alcohol, and centrifuged at 3500 rpm for five minutes. This last step in the vortex was repeated a second time, after which the samples were transferred to Eppendorf tubes. A small sample was taken with a capillary tube and mounted in a circle on a slide. This slide was left on a hot plate for a few minutes to accelerate drying, and then two drops of Entelan were added to the sample which was subsequently covered with the slide cover and left like this for three days.

Results

We identified the samples analyzed. Silica was scarce in fruits and rhizomes. The samples with the highest number of silicophytoliths were leaves (Table 2), which coincides with **Zucol & Brea** findings (2005).

Diagnostic phytoliths for *C. indica* belong to the Globulolita morphotribe, Macula-globulolita morphogenus, according to the classification of **Parra & Flórez** (2001). Following the ICP international nomenclature code they are smooth or sometimes flattened globular structures. They normally occur together in groups of two to thirty globules (rarely alone), with transparent to brownish coloring. In the center they have a circular ornamentation (Figure 2).

Squash leaves present phytoliths in the form of solid and segmented trichomes with a wide base and a pointed end. They are classified in the Clavaelita morphotribe, Undolaclavaelita morphogenus. Both short and long phytoliths were found, some complete and some fragmented. They were abundant in the samples processed (Figure 3).

We found scalloped phytoliths diagnostic of the *Cucurbita* genus, belonging to the Globulita morphotribe and the Verrugo-globulita morphogenus (Figure 4).

Elongated structures terminating in acute angle hook forms were found in leaves of common bean *Phaseolus vulgaris* L. The general form corresponded to a trichome with smooth edges and without ornamentation. The color ranged from brown to transparent. These phytoliths belong to the Capilusita morphotribe, Psilocapilusita morphogenus (Figure 5).

Discussion

Phytoliths are produced by many plant families, and some of them are taxonomically diagnostic because they have unique morphological characteristics that arise from their

Table 2. Sample information including georeferenciation, plant part sampled, and phytolith classification according to **Parra & Flórez** (2001) and the ICP international nomenclature code.

Municipality	Rural subdivision	Species	Altitude (masl)	Georeference	Plant part	Phytolith morphotribe	Phytolith morphogenus
Arcabuco	Monte Suárez	Squash	2456	5°43'41.214"N 73°29'24.408"W	Leaf	Clavaelita	Undolaclavaelita
Arcabuco	Quirvaquirá	Achira	2937	5°41'55.4"N 73°22'10.3"W	Leaf	Globulolita	Maculaglobulolita
Belén	Centro	Common bean	1851	4°57.533'N 73°27.896'W	Leaf	Capilusita	Psilocapilusita
Ramiriquí	Caicedos	Common bean	2291	5°23'35.0" N 73°20'31.2"W	Leaf	Capilusita	Psilocapilusita
Guayatá	Ciavita 2	Achira	1861	4° 57.531'N 73° 27.850'W	Leaf	Globulolita	Maculaglobulolita
Boyacá	Soconzaque	Common bean	2458	5° 26'30.414" N 73° 23'24.822"W	Leaf	Capilusita	Psilocapilusita
Boyacá	Soconzaque	Squash	2458	5° 26'30.414" N 73° 23'24.822"W	Fruit	Globulolita	Verrugoglobulolita

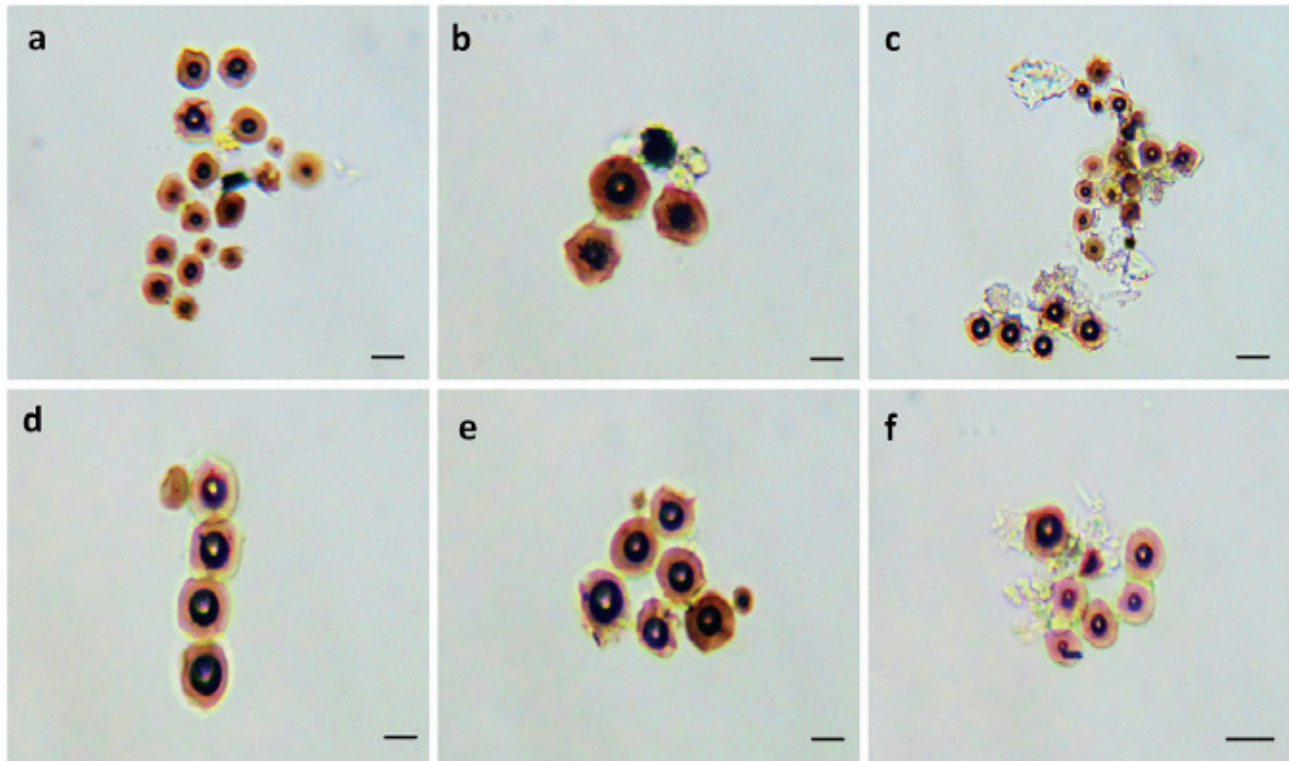


Figure 2. Phytoliths found in achira leaves (*Canna indica* L.). **a)** Major axis: 97.56 μm , minor axis: 82.44 μm ; **b)** 31.26 μm , 10.45 μm ; **c)** 36.1 μm , 9.99 μm ; **d)** 38.58 μm , 14.19 μm ; **e)** 25.53 μm , 24.91 μm ; **f)** 24.96 μm , 23.58 μm . Scale: 10 μm by 40X.

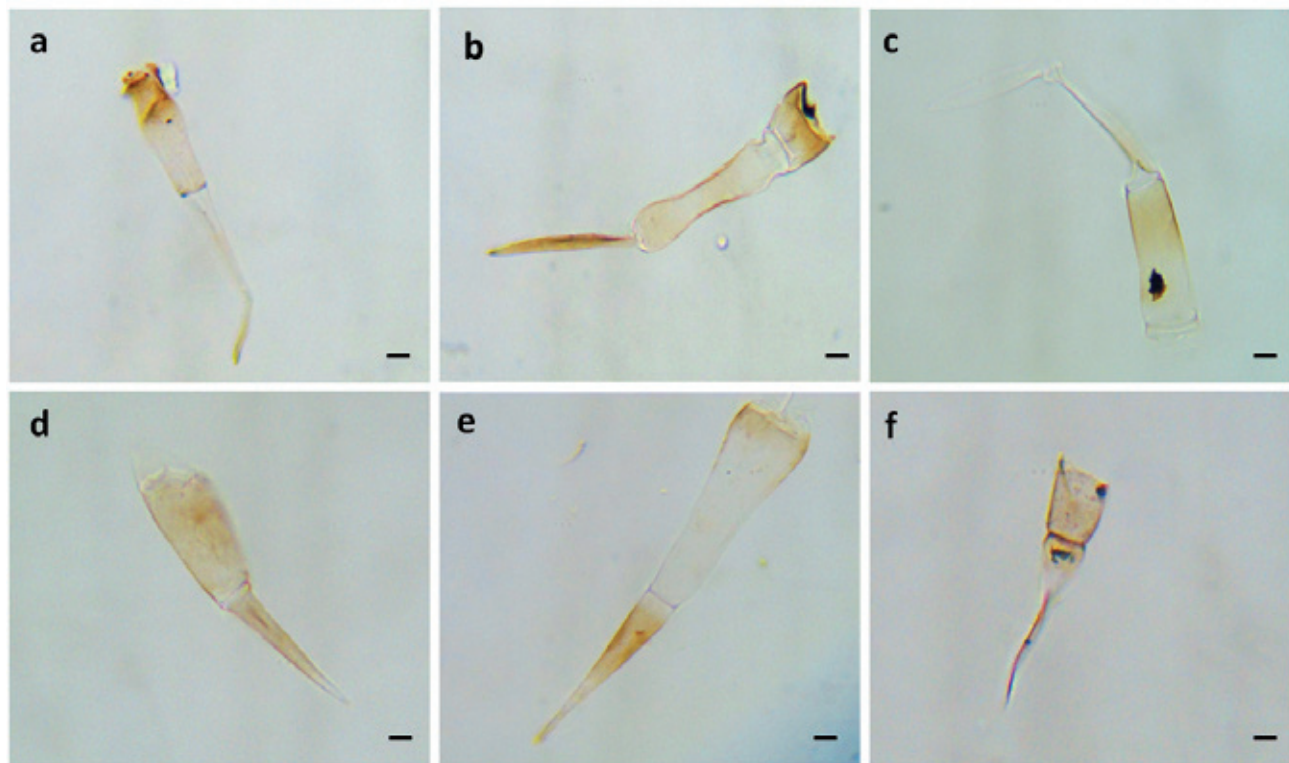


Figure 3. Squash leaf phytoliths (*Cucurbita ficifolia* Bouché). **a)** 137.97 μm , 20.58 μm ; **b)** 88.23 μm , 16.3 μm ; **c)** 123.78 μm , 23.78 μm ; **d)** 100.7 μm , 21.48 μm ; **e)** 93.6 μm , 18.54 μm ; **f)** 53.32 μm , 13.64 μm . Scale: 10 μm by 40X.

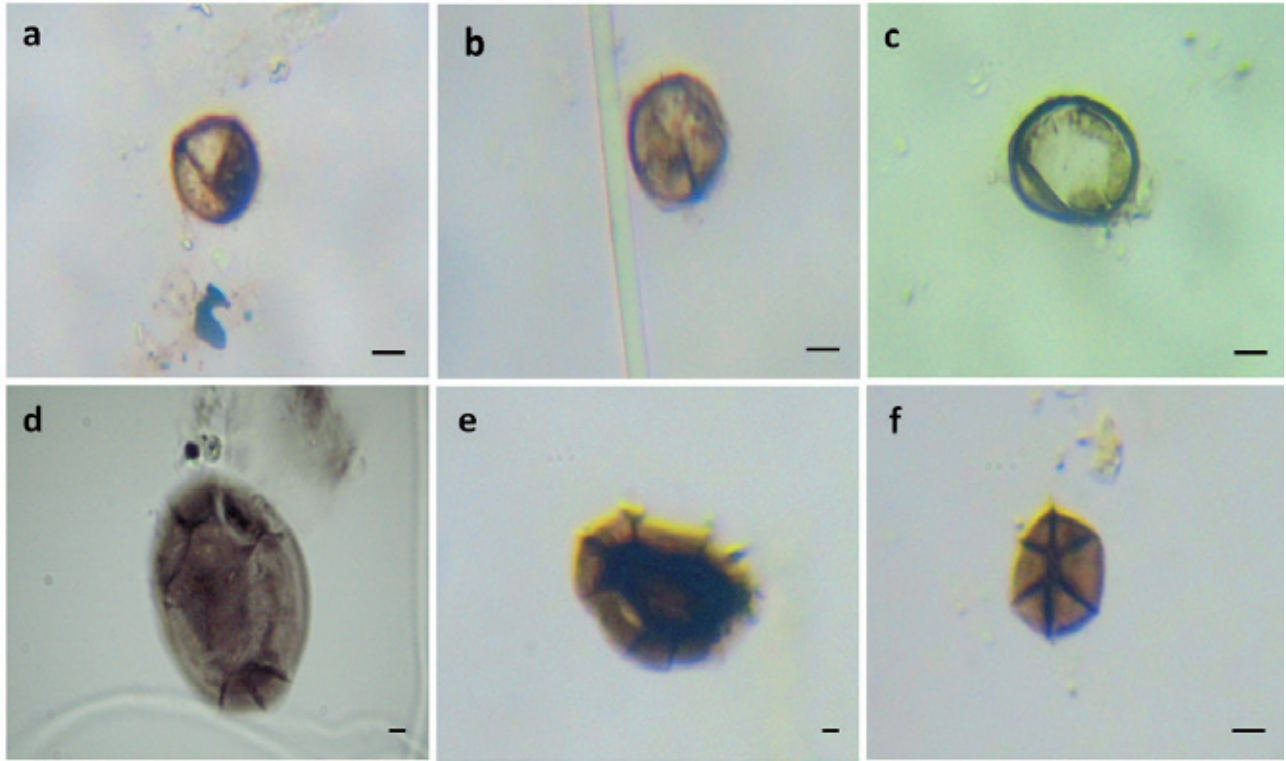


Figure 4. Phytoliths from the epidermis of squash fruit (*Cucurbita ficifolia* Bouché). **a)** 23.25µm, 21.63µm; **b)** 47.97µm, 28.62 µm; **c)** 38.7µm, 23.86µm; **d)** 21.63 µm, 16.88 µm; **e)** 22.24µm, 21.26µm; **f)** 32.93 µm, 21.14 µm. Scale: 10 µm by 40X.

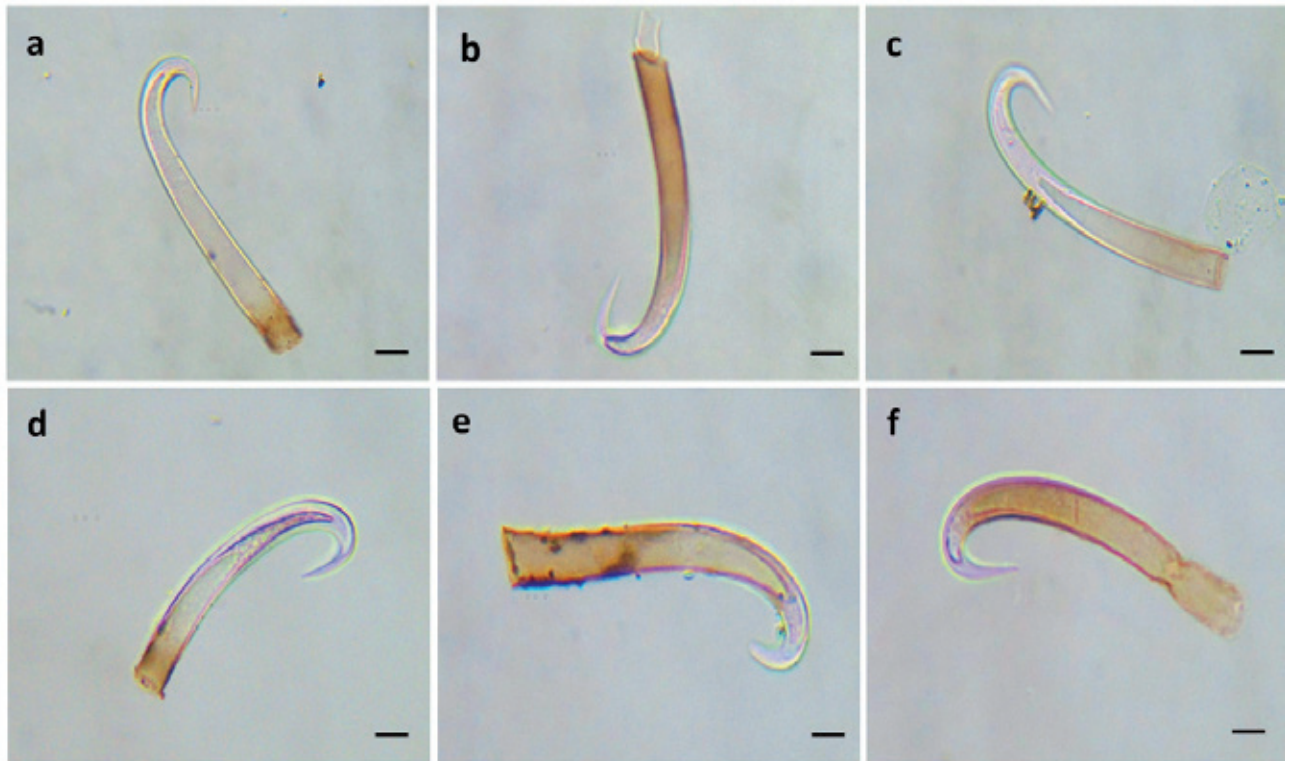


Figure 5. Phytoliths from leaves of common bean *Phaseolus vulgaris* L.; **a)** 92.4µm, 12.26µm; **b)** 78.2µm, 9µm; **c)** 88.64µm, 10.32µm; **d)** 102.96µm, 9.94µm; **e)** 57.37µm, 8.51µm; **f)** 93.5µm, 11.9µm. Scale: 10 µm by 40X.

genesis. There are limitations to the classification based on phytoliths, since there exist both redundancy (different plant species bearing phytoliths of similar morphology) and multiplicity (various phytolith morphologies in the same species). These limitations have led some authors to propose a non-taxonomic classification based on the form of the phytoliths themselves, with less emphasis on the form of the plants producing them, allowing a more general taxonomic classification for producer organisms at the sub-family, family, and order levels (**Rovner**, 1983; **Piperno**, 1988a).

Until a few years ago there was no consensus on how to attain a universal systematization of phytoliths. This topic has been addressed by several authors (**Zucol**, 1995, 1999; **Bowdery**, 1998), and in year 2000 a commission was formed that announced a protocol for naming phytoliths (**Madella, et al.**, 2002, 2005), in which the foundation was laid for morphotype nomenclature, but its application has had numerous problems, and it did not gain general acceptance among scientists dedicated to the study of these microremains (**Era**, 2010). It was necessary then, to establish classifying criteria for a phytolith systematization that may allow for a precise treatment and definition of categories (**Zucol & Brea**, 2005).

Phytoliths extracted from contemporary plants are used as a reference to assign botanical referents to phytolith morphotribes, since older specimens become harder to define taxonomically (**Zurro**, 2006).

The silicophytoliths found in present-day plants serve as a key to the fossil record, but not all plants produce them, and furthermore, phytoliths are not present at all stages of development, since silica is deposited gradually over the life of the plant. This means that the possibility of finding the structures in juvenile plants is low (as was confirmed in the present study in which phytoliths were scarce in younger plant material). Furthermore, the concentration of phytoliths in the plant and in the different plant parts varies according to the phenological stage (**Bertoldi de Pomar**, 1975; **Zurro**, 2006).

Such factors have negative repercussions for the realization of archeological studies based on dental calculus, because often the leaves, in which phytoliths are mostly present, are not the part of the plant that is consumed. Hence, there are few phytoliths found in dental calculus of human remains, and its analysis yields little information on prehistoric diets (**Zurro**, 2006). Consequently, for the study of paleo diet it may be more useful to analyze starch morphology in dental calculus.

The phytoliths we encountered in the fruit and leaves of squash coincided with those described by **Bozarth** (1987), who points out that *Cucurbita* sp. fruits produce large spherical phytoliths with undulated, deeply and regularly scalloped surfaces. To obtain these structures it was necessary to extract a piece of mature fruit skin, since the phytoliths

are located in the pericarp, as noted by **Holst & Piperno** (1998). It is not probable that these phytoliths are produced in other parts of the plant. Furthermore, **Parry & Smith** (1958) noted that the highest production of silicophytoliths occurs at the end of the plant's life cycle. No phytoliths were found in roots or rhizomes of the three plants studied due to the low or nonexistent accumulation of silica in these parts (**Chandler, et al.**, 2006), which confirms the tendency of plants to deposit silica in aerial parts for support purposes.

It can be that cell silicification in *Cucurbita ficifolia* fruits is a defensive response against herbivory. Phytoliths can constitute an imposing physical defense, especially if they are concentrated in external plant tissues. Silica is one of the few substances that are hard enough to grind and wear down tooth enamel, and in plants containing large quantities, it can also cause kidney damage and other urinary problems in primarily herbivorous animals (**Piperno, et al.**, 2000). A plant may benefit from defending its fruit from consumption by microherbivores (pests), while at the same time allowing consumption by birds and macroherbivores, which would help the plant to disperse its seeds.

According to some other studies, and seemingly confirmed by the present study, phytoliths differ in size between domesticated and wild species of the *Cucurbita* genus. The absence of large, solid phytoliths in many varieties of domesticated *Cucurbita* appears to be related to changes in the structure of the fruit epidermis, and the production of phytoliths in the pericarp zone becomes less differentiated or is lost entirely in these domesticated individuals (**Holst & Piperno**, 1998). These changes can result from the loss of herbivory pressure; **Johns** (1990) makes the analogy that the reduction of a physical defense in the process of squash domestication is similar to the reduction of the toxic chemical substances produced by other plant species when they are domesticated.

According to **Piperno, et al.** (2000), *Cucurbita ficifolia* has larger phytoliths than other known squash species. The explanation they offer is that cell size increases drastically under domestication, and that, therefore, phytoliths have more space to occupy in the plant tissue and thus increase considerably in size.

The same phytolith morphology may be produced by numerous species. This redundancy confirms the diagnostic shortcomings of phytoliths. In the present study there were similar phytoliths (in trichome form) in *P. vulgaris* and *C. ficifolia*, while *C. indica* presented distinctive globular phytoliths. When such similarities in form are found in the same botanical family, this permits the identification of a given morphogenus as emblematic of a certain family. But if similar phytoliths are found in species of different families, it is problematic to identify phytoliths with the plant generating them because of redundancy (**Rovner**, 1971).

Studies conducted by **Bozarth** (1987) demonstrated that the distinctive silicified hook-shaped hairs produced on seed pods of *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus lunatus* can be diagnostic for this genus. However, **Piperno** (1988a) informed that non-segmented, curved, thin hairs, similar to those of *Phaseolus*, may occur in certain Neotropical species of the Aristolochiaceae, Boraginaceae, Moraceae, Fabaceae, and Urticaceae families.

The present study found that the plant part containing the highest number of phytoliths among the species studied were the leaves. Studies such as that of **Ricci, et al.** (2015) show that the concentration of silicophytoliths in plant structures is affected by factors such as the taxon under study. In this sense, phytolith production is abundant in monocots but variable among different dicot families.

This work contributes valuable information to the study of food crops used by pre-Hispanic cultures in Boyacá. To wit, phytolith analysis is not a promising indicator of paleo diet in the study of dental calculus because the consumed portion of most crop plants is not the phytolith-rich leaf, but rather the fruit or subterranean parts, which produce few or no phytoliths. Starch analysis might be a more robust diagnostic tool for the study of paleo diet by means of dental calculus.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia and its Biology laboratories, as well as the institution's Incitema Institute, Archeology Museum, and Herbarium. The research underlying this article was financed by the *Alimentos Prehispánicos, Alimentos Promisorios* project running from 2011 to 2013 (Colciencias-UPTC, Agreement 521 of 2010 of the *Convocatoria del Banco de Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica*.) The authors especially wish to thank the peasant farmers of Arcabuco, Ramiriquí, Boyacá, Belén, and Guayatá for sharing their crops, their knowledge, and their experience. We also owe our thanks to the experts who shared their insights: G. Morcote, W. Posada, and A. Álvarez. Lastly, thanks go to H. Pradilla, E. Vera, D. Galindo, C.N. Díaz, P.A. Gil, J. Gil, C. Castro, W. Bravo, C. Cárdenas, D. Cárdenas, J. Tamayo, M. Cárdenas, L. Gutiérrez, S. Jiménez, and C. Fernández.

Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest of any kind.

Bibliography

- Acosta, Y.C., Fernández, M.G., Arriaga, M.O.** (2011). Descripción y cuantificación biomineral de *Gunnera magellanica* Lam. (Gunneraceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. **46**: 80.
- Acosta, Y.C., Fernández, M.G., Arriaga, M.O.** (2013). Comparación de la composición biomineral de cuatro especies del género *Gunnera*. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. **48**: 31.
- Acosta, Y.C., Fernández, M.G., Arriaga, M.O.** (2015) Estudio comparativo de la composición biomineral de cuatro especies del género *Gunnera* de la Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. **50** (4): 481-492.
- Alexandre, A., Meunier, J.D., Lezine, A.M., Vincens, A., Schwartz, D.** (1997). Phytoliths as indicators of grassland dynamics during the late Holocene in intertropical Africa. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. **136**: 213-229.
- Afonso, J.** (2004). Aportaciones del análisis de fitolitos, almidones y otros referentes microscópicos al estudio de la prehistoria y arqueología de las islas Canarias; resultados preliminares. Revista Rabona. **12**: 69-96.
- Barboni, D., Bonnefille, R., Alexandre, A., Meunier, J.D.** (1999). Phytoliths as paleoenvironmental indicators, west side middle Awash valley, Ethiopia. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. **152**: 87-100.
- Barboni, D. & Bremond L.** (2009). Phytoliths of East African grasses: An assessment of their environmental and taxonomic significance based on floristic data. Review of Palaeobotany and Palynology. **158**: 29-41.
- Bertoldi de Pomar, H.** (1975). Los silicofitolitos: sinopsis de conocimiento. Darwiniana **19** (2-4): 174-206.
- Bowdery, D.** (1998). Phytolith analysis applied to Pleistocene Holocene archaeological sites in the Australian arid zone. Bar International Series 695. Archaeopress, Oxford. p. 216.
- Bozarth, S.R.** (1987). Diagnostic opal phytoliths from rinds of selected *Cucurbita* species. American Antiquity. **52**: 607-615.
- Bremond, L., Alexandre, A., Peyron, O., Guiot, J.** (2008). Definition of grassland biomes from phytoliths in West Africa. Journal of Biogeography. **35**: 2039-2048.
- Chandler, E.K., Pearsall, D., Zeidler, J.** (2006). Root and tuber phytoliths and starch grains document manioc (*Manihot esculenta*), arrowroot (*Maranta arundinacea*) (*Calathea* sp.), at the Real Alto Site, Ecuador. Economic Botany. **60** (2): 103-120.
- Douval-Jouve, M.J.** (1875). Sur une forme de cellules épidermiques qui paraît propre aux Cypéracées. Comptes-Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, Series de Sciences Naturelles. **75**: 371-372.
- Ehrenberg, C.G.** (1854). Mikrogeologie. Leopold Voss, Leipzig. p. 354.
- Eichorn, B., Hahn, H.P., Müller-Haude, P.** (1996). Espace naturel, techniques agraires et végétation végétale en pays Kassena. Berichte des Sonderforschungsbereichs. **268** (7): 71-81.
- Erra, G.** (2010). Asignación sistemática y paleocomunidades inferidas a partir del estudio fitolítico de sedimentos cuaternarios de Entre Ríos, Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. **45** (3-4): 309-319.
- Erra, G., Zucol, A.F., Kröhling, D., Brea, M.** (2006). Análisis fitolíticos en el loess del Pleistoceno tardío-Holoceno temprano en la provincia de Entre Ríos: resultados preliminares. III Congreso Argentino de Cuaternario y Geomorfología, Actas de Trabajo. **2** (13): 691-699.

- Fernández, M.G., Arriaga, M.O., Zucol, A.F.** (2012). Leaf anatomy and biomineralization in *Empetrum rubrum* Valh ex Willd. (Ericaceae). *Botánica Complutensis*. **36**: 113-121.
- Gil, B.E.** (2011). Fitólitos en cálculo dental de poblaciones tempranas del valle geográfico del río Cauca (500 a.C.-500 d.C.). Aproximación a la paleodieta. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Humanas, Maestría en Antropología. Universidad Nacional de Colombia.
- Holst, I., & Piperno, D.** (1998). Rind tissue structure and phytolith presence and morphology in the Cucurbitaceae. Manuscript on file at the Smithsonian Tropical Research Institute.
- Johns, T.** (1990). With bitter herbs they shall eat it. Chemical ecology and the origins of human diet and medicine. Tucson: University of Arizona Press.
- Madella, M., Alexandre, A., Ball, T.** (2002). International Code for Phytolith Nomenclature. 4th International Meeting on Phytolith Research (Cambridge, England), Abstract: 8.
- Madella, M., Alexandre, A., Ball, T.** (2005). International Code for Phytolith Nomenclature. *Annals of Botany*. **96**: 253-260.
- Morcote, G.** (1996). Evidencia arqueobotánica de cultígenos presentes en grupos Muisca de la Sabana de Bogotá en los siglos VIII y XI. *Bioantropología de la Sabana de Bogotá, Siglos VIII al XVI D.C.* Instituto Colombiano de Antropología, Colcultura. p. 59-84.
- Morcote, G.** (2008). Antiguos habitantes en ríos de aguas negras. Ecosistemas y cultivos en el interfluvio Amazonas-Putumayo. Colombia-Brasil. En: Colombia 2008. Universidad Nacional de Colombia. **19**: 242.
- Parra, L.N., & Flórez, M.T.** (2001). Propuesta de clasificación morfológica para los fitólitos altoandinos colombianos. *Crónica Forestal y del Medio Ambiente*. **16**: 35-66.
- Parry, D.W., & Smith, F.** (1958). Techniques for studying opaline silica in grass leaves. *Annals of Botany*. **22** (88): 543-549.
- Pearsall, D.** (1988). Interpreting the meaning of macroremain abundance: The impact of source and context. p. 97-118. En CA Hastorf y Vs Popper (Eds.) *Current paleoethnobotany. Analytical methods and cultural interpretations of archaeological plant remains. Prehistoric Archeology and Ecology Series*. University of Chicago Press.
- Piperno, D.R.** (1988a). Phytolith analysis: An archaeological and geological perspective. Academic Press/Harcourt Brace Jovanovich, New York (US). p. 280.
- Piperno, D.R.** (1988b). Prehistoria temprana de la península de Santa Elena, Ecuador. *Cultura Las Vegas*. Primer informe sobre los fitólitos de las plantas del sitio OGSE-80 y la evidencia del cultivo del maíz en el Ecuador. En KE Stothert (Ed.) *Miscelánea Antropológica Ecuatoriana, serie monográfica*. **10**: 203-223.
- Piperno, D.R.** (2006). Phytoliths. A comprehensive guide for archeologists and paleoecologists. Altamira Press, Oxford.
- Piperno, D., Andres, D.C., Stothert, K.E.** (2000). Phytoliths in *Cucurbita* and other neotropical Cucurbitaceae and their occurrence in early archaeological sites from the lowland American tropics. *Journal of Archaeological Science*. **27**: 193-208.
- Powers-Jones, A.** (1992). Great expectations: A short historical review of European phytolith systematics. En G Rapp y S Mulholland (Eds.) *Phytolith systematics: Emerging issues. Advances in Archaeological and Museum Science*. **1**: 15-35.
- Rovner, I.** (1971). Potential of opal phytoliths for use in paleoecological reconstruction. *Quaternary Research*. **1**: 343-359.
- Rovner, I.** (1983). Plant opal phytolith analysis: major advances in archaeobotanical research. p. 225-260. In Schiffer M (Ed.) *Advances in archaeological method and theory*. New York: Academic Press.
- Scott, L.** (2002). Grassland development under glacial and interglacial conditions in southern Agrecia: Review of pollen, phytolith and isotope evidence. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. **177**: 45-57.
- Simkiss, K., & Wilbur, K.M.** (1989). Biomineralization. Cell biology and mineral deposition, Academic Press, USA. p. 337.
- The Plant List.** (2010). A working list of all plants species, www.theplantlist.org. Fecha de consulta: 18 de julio de 2013.
- Zucol, A.F.** (1995). Microfitólitos: II. Análisis de las clasificaciones. *Ameghiniana*. **32** (3): 243-248.
- Zucol, A.F.** (1999). Fitólitos: hacia un sistema clasificatorio. *Ameghiniana*. **36** (4): Suplementos-Resúmenes: 43R.
- Zucol, A.F., & Brea, M.** (2005). Sistemática de fitólitos, pautas para un sistema clasificatorio. Un caso en estudio en la formación Alvear (Pleistoceno inferior). *Ameghiniana*. **42** (4): 685-704.
- Zurro, D.** (2006). El análisis de fitólitos y su papel en el estudio del consumo de recursos vegetales en la prehistoria: bases para una propuesta metodológica materialista. *Trabajos de Prehistoria*. **63** (2): 35-54.

Evolutionary history of the group formerly known as protists using a phylogenomics approach

Silvia Restrepo^{1,*}, Juan Enciso², Javier Tabima³, Diego Mauricio Riaño-Pachón^{4,*}

¹Laboratorio de Micología y Fitopatología, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia

²Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

³Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, OR, USA

⁴Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brasil

Abstract

The lack of organisation of monophyletic lineages in the phylogeny and taxonomy of the group formerly known as protists has precluded the understanding of the group's evolutionary history and trait comparison among members of the group. We used a phylogenomic approach to establish phylogenetic hypotheses of this group of organisms. We used an automatic orthologous clustering (OrthoMCL)-based strategy to recover 72 clusters of orthologues from 73 eukaryotic species. A maximum likelihood tree was inferred from the supermatrix. Overall, we obtained consistent inferences with previous published ones, but some unexpected phylogenetic relationships were poorly supported. Despite the large quantity of genes from the Opisthokonta groups, this clade was recovered as polyphyletic. We failed to recover a monophyletic Excavata group, most likely because of long-branch attraction artefacts. A second dataset was constructed after removing the fast-evolving/saturated sites, and a Shimodaira-Hasegawa test was performed to verify whether our data allowed us to reject relationships in previous hypotheses. The results of these tests suggested that the competing tree topologies were not significantly better than our recovered topologies. Novel relationships were shown inside the Opisthokonta, for two species, *Thecamonas trahens* and *Capsaspora owczarzaki*. Additionally, some controversial phylogenetic positions among several eukaryotic groups were found. We discuss the relative positions of the Alveolata and Stramenopila groups, the latter being of special interest in our research group.

Key words: Phylogenomics, Markovian Ortholog Clustering, Opisthokonta, Stramenopila, Alveolata.

Historia evolutiva del grupo previamente denominado protistas usando una aproximación filogenómica

Resumen

La falta de organización en linajes discretos en la filogenia y la taxonomía del grupo anteriormente llamado protistas ha retrasado la comprensión de la historia evolutiva del grupo y la comparación de rasgos entre los miembros del mismo. En este estudio usamos una aproximación filogenómica para plantear hipótesis filogenéticas del grupo mencionado. Usamos una estrategia basada en el agrupamiento automático de ortólogos (OrthoMCL) para recuperar 72 grupos de ortólogos de 73 especies. Un árbol obtenido con el método de máxima verosimilitud fue estimado a partir de una supermatriz de datos. De manera general obtuvimos inferencias filogenéticas consistentes con publicaciones previas pero se observaron algunos patrones de ramificación inesperados con valores bajos de soporte. A pesar de la gran cantidad de genes de los grupos Opisthokonta, este clado aparece polifilético. No pudimos demostrar la monofilia de Excavata, muy probablemente debido a artefactos de atracción de ramas largas. Un segundo conjunto de datos fue construido luego de eliminar los sitios de rápida evolución/saturados. El test de Shimodaira-Hasegawa se calculó con el fin de verificar si nuestros datos e inferencias filogenéticas controvertían patrones de ramificación reportados previamente. Los resultados de los tests sugieren que las topologías propuestas en estudios previos no son significativamente mejores que las topologías propuestas en este estudio. Nuevas relaciones fueron encontradas dentro de los Opisthokonta, para dos especies, *Thecamonas trahens* y *Capsaspora owczarzaki*. Adicionalmente, algunas posiciones filogenéticas controversiales se encontraron para varios grupos eucariotas con nuestra aproximación filogenómica. En el estudio se discuten las relaciones de los grupos Alveolata y Stramenopila, siendo este último grupo de especial interés para nuestro grupo de investigación.

Palabras clave: Filogenómica, Markovian Ortholog Clustering, Opisthokonta, Stramenopila, Alveolata.

Introduction

The group of the organisms formerly known as protists is characterised by the great variety of organisms that are grouped within it. However, the lack of organisation into discrete lineages has been one of the main phylogenetic and taxonomic issues in this group. Protists were eukaryotic organisms with a high diversity in the levels of organisation, comprising unicellular organisms or parenchymatous aggregations. They lack vegetative tissue differentiation (except during reproduction) (Adl, *et al.*, 2007) and are regarded as the group from which multicellular organisms with true tissues differentiated (Adl, *et al.*, 2007; Ruiz-Trillo *et al.*, 2007). Because of the lack of specificity in how “protist” is defined, the taxonomy of the group has been difficult and controversial, raising several issues (Adl, *et al.*, 2005, 2012; Simpson & Roger, 2004).

The classification of the organism previously grouped as protists has always been troublesome because of a number of factors, e.g., random and systematic errors, ambiguous classification criteria and non-flexible systems of classification (Adl, *et al.*, 2007; Adl, *et al.*, 2005; Keeling, *et al.*, 2005; Simpson & Roger, 2004). Historically, the classification of these organisms has sometimes suffered from over-simplification, relying on criteria such as whether the organism was plant-like or animal-like (Keeling, *et al.*, 2005). As a consequence, several species were represented more than once in the classification system (Adl, *et al.*, 2007; Simpson & Roger, 2004). The introduction of a morpho-biochemical approach helped reduce some of these problems. It allowed for the coherent and consistent grouping of most taxa belonging to the group formerly known as protists. The relationships among species inside these groups, for example, within the Alveolata, were consistent with those later reconstructed by molecular methods. The problem, then, was that the evolutionary relationships among the supergroups (as defined in Adl, *et al.*, 2005) still remained unclear because of the lack of a phylogenetic signal in the characters that were used for classification (Adl, *et al.*, 2007; Keeling, *et al.*, 2005).

In the last 30 years, the amount of available molecular data for taxa previously classified as protists has increased, providing useful information from which to infer consistent relationships. Using these resources, scientists have been able to refute former schemes of protist classification and conclude that the rank system used before was inadequate and obsolete. As the amount of data grew, inconsistencies in the classification system became increasingly evident. These inconsistencies, such as the existence of an entire class inside a class (Adl, *et al.*, 2005), suggested that the criteria

for grouping and classifying eukaryotic diversity needed to be reconsidered. Thus, a system based on nameless ranked systematics has been proposed, which consists of somewhat abstract categories that are more flexible than ranks (Adl, *et al.*, 2005). Many molecular-based phylogenetic hypothesis including groups formerly classified as protist have been published, but the relationships that have been hypothesized remain controversial due to the inconsistencies between molecular phylogenetic studies (Keeling, *et al.*, 2005).

As mentioned above, difficulties in inferring reliable molecular phylogenies arise from two main sources: i) random error: too little information because of a reductionist approach in the case of single gene-based analyses and long timescales, which gradually deplete phylogenetic signal; ii) systematic error: failure of a phylogenetic method to yield the correct tree because of oversimplified models that are not able to manage the complexity of the evolutionary process of these organisms. When sufficient raw data are provided, it is possible to reliably infer ancient phylogenies (Keeling, *et al.*, 2005). Expressed sequence tags (ESTs) and whole genomes provide a great deal of information and can be used to build a robust phylogenetic matrix (Keeling, *et al.*, 2005).

Phylogenomics, or the use of whole-genome data to infer evolutionary relationships, allows the development of more robust phylogenetic hypotheses because it uses a greater amount of information, overcoming the problem of the lack of phylogenetic signal. Perhaps the strongest advantage of using whole genomes, when compared to the use of ESTs, is that absent markers in the EST dataset are generated because of a lack of data collection and in the genomes they reflect real gains or losses of loci because of evolutionary forces (Leigh, *et al.*, 2011). As databases improve and sequencing techniques become more accessible, the data available for phylogenomics approaches increases greatly, providing new elements for the study of the evolution, genetics and the biology and functionality of increasing number of organisms. We propose a phylogenomic approach to establish phylogenetic relationships among lineages previously classified as protists. To infer the evolutionary relationships among the groups of the organism formerly known as protists and other eukaryotes, such as fungi, animals and plants, we obtained several groups of orthologous genes using a Markov clustering algorithm and then used maximum-likelihood-based phylogenetic reconstruction. Of particular interest for our study group was the position of Chromista Kingdom, in particular the Stramenopila and its relationships within other Eukaryota lineages (Adl, *et al.*, 2005, 2012; Harper & Keeling, 2003; Simpson & Roger, 2004).

Materials and methods

Eukaryotic species considered

We downloaded publicly available deduced proteomes of 77 species to have as many representatives as possible of the major eukaryote groups. We developed a catalogue

*Corresponding authors:

Silvia Restrepo, srestrep@uniandes.edu.co

Diego Mauricio Riaño-Pachón, diego.riano@bioetanol.org.br

Received: September 3, 2015

Accepted: March 10, 2016

of the species considered in this study, with their current classification and the source of their proteomes to provide easy access to data. Organisms from the Eukaryota supergroups as defined by **Adl, et al.** (2005) were included. These supergroups are: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata and Excavata.

The species, their ID and the number of genes for each species were: *Eimeria tenella* (ETEN, 15), *Neospora caninum* (NCAN, 18), *Toxoplasma gondii* (TGON, 20), *Cryptosporidium muris* (CMUR, 13), *Cryptosporidium hominis* (CHOM, 12), *Cryptosporidium parvum* (CPAR, 11), *Giardia intestinalis* (GLAM, 8), *Babesia bovis* (BBOV, 18), *Theileria annulata* (TANN, 14), *Theileria parva* (TPAR, 14), *Plasmodium knowlesi* (PKNO, 17), *Plasmodium vivax* (PVIV, 16), *Plasmodium falciparum* (PFAL, 16), *Plasmodium chabaudi* (PCHA, 16), *Plasmodium berghei* (PBER, 16), *Plasmodium yoelii* (PYOE, 16), *Leishmania braziliensis* (LBRA, 16), *Leishmania mexicana* (LMEX, 16), *Leishmania infantum* (LINF, 16), *Leishmania major* (LMAJ, 16), *Trypanosoma cruzi* (TCRU, 12), *Trypanosoma vivax* (TVIV, 16), *Trypanosoma brucei* (TBRU, 15), *Trypanosoma congolense* (TCON, 14), *Selaginella moellendorffii* (SOME, 46), *Arabidopsis lyrata* (ALYR, 44), *Sorghum bicolor* (SBIC, 47), *Coccomyxa sp* (CSP, 37), *Chlorella vulgaris* (CVUL, 37), *Micromonas pusilla* (MPUS, 40), *Ostreococcus lucimarinus* (OLUC, 33), *Bigeloviella natans* (BNAT, 45), *Cyanidioschyzon merolae* (CMER, 19), *Guillardia theta* (GTHE, 44), *Emiliana huxleyi* (EHUX, 30), *Aureococcus anophagefferens* (AANO, 22), *Fragilariopsis cylindrus* (FCYL, 17), *Phaeodactylum tricornerutum* (PTRI, 24), *Phytophthora capsici* (PCAP, 46), *Phytophthora ramorum* (PRAM, 41), *Phytophthora sojae* (PSOJ, 46), *Naegleria gruberi* (NGRU, 41), *Dictyostelium purpureum* (DPUR, 47), *Entamoeba invadens* (EINV, 11), *Entamoeba dispar* (EDIS, 13), *Entamoeba histolytica* (EHIS, 12), *Enterocytozoon bienersi* (EBIE, 2), *Nosema ceranae* (NCER, 4), *Encephalitozoon cuniculi* (ECUN, 3), *Enterocytozoon hellem* (EHEL, 2), *Encephalitozoon intestinalis* (EINT, 4), *Thecamonas trahens* (TTRA, 43), *Trichomonas vaginalis* (TVAG, 13), *Allomyces macrogynus* (AMAC, 18), *Batrachochytrium dendrobatidis* (BDEN, 38), *Mucor circinelloides* (MCIR, 40), *Phycomyces blakesleeana* (PBLA, 36), *Auricularia delicata* (ADEL, 29), *Agaricus bisporus* (ABIS, 27), *Acremonium alcalophyllum* (AALC, 25), *Aspergillus niger* (ANIG, 26), *Sphaeroforma arctica* (SARC, 37), *Monosiga brevicolis* (MBRE, 43), *Salpingoeca roseta* (SROS, 50), *Capsaspora owczarzewski* (COWC, 44), *Trichoplax adhaerens* (TADH, 55), *Nematostella vectensis* (NVEC, 55), *Daphnia pulex* (DPUL, 54), *Capitella teleta* (CTEL, 58), *Lottia gigantea* (LGIG, 57), *Ciona intestinalis* (CINT, 47), *Canis familiaris* (CFAM, 47), *Homo sapiens* (HSAP, 45). The species' names are represented by an ID and encoded as following: The first letter corresponds to the first letter of the genus and the three remaining correspond to the three first letters of the specific epithet.

Phylogenomic workflow

Clustering of Orthologous genes. An all-versus-all BlastP search (**Altschul, et al.**, 1997) was performed on all of the protein sequences (cut-off E -value = 10^{-5}) to obtain prior similarity tables as input for the Markov cluster (MCL) algorithm. To construct orthologous groups, we used the OrthoMCL package because it provides a method of grouping orthologous genes across multiple eukaryotic taxa (**Li, Stoeckert, and Roos**, 2003) and because it has been shown to perform best in terms of the balance of sensitivity and the specificity of orthologous detection (**Chen, Mackey, Vermunt, and Roos**, 2007). The orthologous detection algorithm was run with three different inflation values ($I = 1.2, 1.5, 2.0$). Greater inflation values yield clusters with a lesser number of genes (tighter) and a greater number of these clusters (**Chen, et al.**, 2007). From the entire set of orthologous clusters, we kept only those containing unique copies of orthologous genes in each species. Phylogenetic analyses were performed only on clusters derived from the $I = 1.5$ run because this value yielded the most populated groups in terms of number of species.

Phylogenetic reconstruction. For each cluster of orthologous proteins, we performed multiple sequence alignments using MAFFT, parameters by default (**Katoh, Kuma, Toh, and Miyata**, 2005). The evolutionary model for every cluster was then determined using ProtTest (**Abascal, Zardoya, and Posada**, 2005). A supermatrix was built using FASconCAT that included all of the groups of detected orthologues (**Kuck & Meusemann**, 2010). Finally, phylogenetic inference was performed using the maximum likelihood method implemented in FastTree (**Price, Dehal, and Arkin**, 2009) using the only evolutionary model available in this package (WAG). We rooted the tree using the midpoint method because of the unavailability of a defined outgroup in our dataset (**Hess & De Moraes Russo**, 2007). We performed 1000 bootstrap replicates for statistical support, and the bootstrap support values are shown in a maximum scale of 1.

Phylogenetic trees and multiple sequence alignments are available at <http://bce.bioetanol.cnpm.br/protistphylogenomics>.

Taxonomical assessment of the monophyletic lineages in the group formerly known as protists

After revising the evolutionary lineages found in the phylogenetic reconstruction, we aimed to reconstruct the taxonomical ranks between the group of organisms formerly known as protists. We used the taxonomical ranks proposed by **Adl, et al.** (2005, 2012) and followed their guidelines in the organisation of those ranks. In the case of discrepancies between our reconstruction and the taxonomy proposed, we used the information in our tree to define new taxonomical ranks in which a monophyletic lineage with a clearly different phylogenetic relationship as previously published, should be considered a novel taxonomical category.

The procedure was initially performed with 73 species including the Microsporidia but excluding some oomycetes and green algae. A second procedure (77 species) was performed including the previously omitted species but excluding the Microsporidia and three species in which the long-branch attraction artefact was observed. A third procedure was performed excluding several species from taxa that do not belong to Stramenopila or the Alveolata while including a few representatives of each major supergroup to retain eukaryotic diversity in the dataset.

Functional identification of orthologous groups

To identify the functions of the genes contained in the clusters of orthologues, the PANTHERDB (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) database was used (Mi, *et al.*, 2005). A BlastP (cut-off *E*-value = 10^{-5}) was performed on our dataset against the PANTHER database to obtain a filtered table of possible hits. Then, we compared the PANTHER database with the BlastP results using the pantherScore tool, also obtained from the PANTHERDB website.

Hypothesis testing and removal of fast-evolving/saturated sites

The test proposed by Shimodaira and Hasegawa (1999) (SH), implemented in the RAxML 7.2.8 package (A. Stamatakis, Heidelberg, Germany), was used to compare our results with three different topologies resulting from two prior hypotheses: i) The Stramenopila is the sister group to the Alveolata, and ii) the genera *Giardia*, *Naegleria* and *Trichomonas* branch within the Excavata. Additionally, fast-evolving and saturated sites that might have been adding noise to our dataset were removed by using the Gblocks package (Castresana, 2000), adjusting the maximum number of non-conserved amino acid positions to 70 and the minimum block length to 10. This adjustment allowed for the conservation of all of the previous alignments' gaps. This latter tree was also compared against the same three topologies produced by the hypotheses mentioned above.

Construction of phylogenetic profiles

Phylogenetic profiles were constructed for each protein deduced from the Markovian clustering algorithm. Clusters of orthologous genes containing the species in which they are present were directly used to address the occurrence of a protein in certain species' proteome. "The phylogenetic tree and underlying alignment were deposited in TreeBase under the accession number [HYPERLINK "http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S18195"](http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S18195)".

Results

The orthologous genes found are spread across the 73 species, and not all of the species are equally represented in terms of the number of genes per species (see Materials and Methods). For example, Microsporidia clade had the fewest genes by contrast to the metazoans, which have the highest number of recovered genes per species.

Unexpected phylogenetic relationships inside the Opisthokonta

After obtaining the tree with bootstrap (BS) support for each clade (Figure 1), we mapped each species to its corresponding supergroup according to the classifications made by Adl, *et al.* (2005). Representatives of the 6 supergroups were obtained from our 73-species data set. Monophyletic groups were highlighted with blue lines, and non-monophyletic groups were highlighted with red lines. The BS values in red (< 0.7) were considered to be too weak to support the consistency of a clade. Three species are highlighted with a red star. These species belong to the supergroup Excavata according to Adl, *et al.* (2005), but our tree depicted them as being related to other eukaryotic groups far from the Excavata. They were not taken into account for defining groups whether they are included with highly supported branches or not.

As observed in figures 1 and 2, the clade that contains the metazoans, *Capsaspora owczarzi*, the choanozoans and the mesomycetozoans (MCCM clade) was recovered as monophyletic, and the relationships inside it were consistently supported. The closest group to the MCCM clade was the clade comprising all the fungi except the Microsporidia (FWM clade). The branch leading to these two groups had a high BS value indicating strong support of their relationship. Finally, the sister clade to these two clades was a clade containing two species, *Trichomonas vaginalis*, which belongs to the Excavata and *Thecamonas trahens*, the only representative of the Apusozoa in our analysis. This clade (*Thecamonas thraetens* + *Trichomonas vaginalis*) and the MCCM + FWM clade were not related, but the BS support value (0.667) was near the acceptable 0.7 threshold. The clade that comprises the Amoebozoa and the Microsporidia (AM) was the sister group to the previously mentioned TT + MCCM + FWM clade. Relationships between the Amoebozoa and the Microsporidia were also poorly supported, as were several relationships inside the Microsporidia. The Opisthokonta supergroup was composed of the clades TT+ MCCM + FWM plus the Microsporidia.

Stramenopiles are the closest relatives of Viridiplantae and other algae

Figures 1 and 2 show that the Stramenopila clade appears well-resolved, with strong support on all of its branches, and it is represented by four genera: *Phytophthora*, *Phaeodactylum*, *Fragilariopsis* and *Aureococcus*. This clade was most closely related to *Emiliania* (Haptophyta, 0.999 BS), and the Stramenopila + Haptophyta clade was most closely related to *Guillardia* (Cryptophyta, 0.978 BS), forming the Stramenopila + Haptophyta + Cryptophyta (SHC) clade. The Rhodophyta clade, represented by *Cyanidioschyzon merolae*, appeared as the sister group of the SHC clade but with poor support (0.561). Additionally, this entire clade was related to the Rhizaria supergroup,

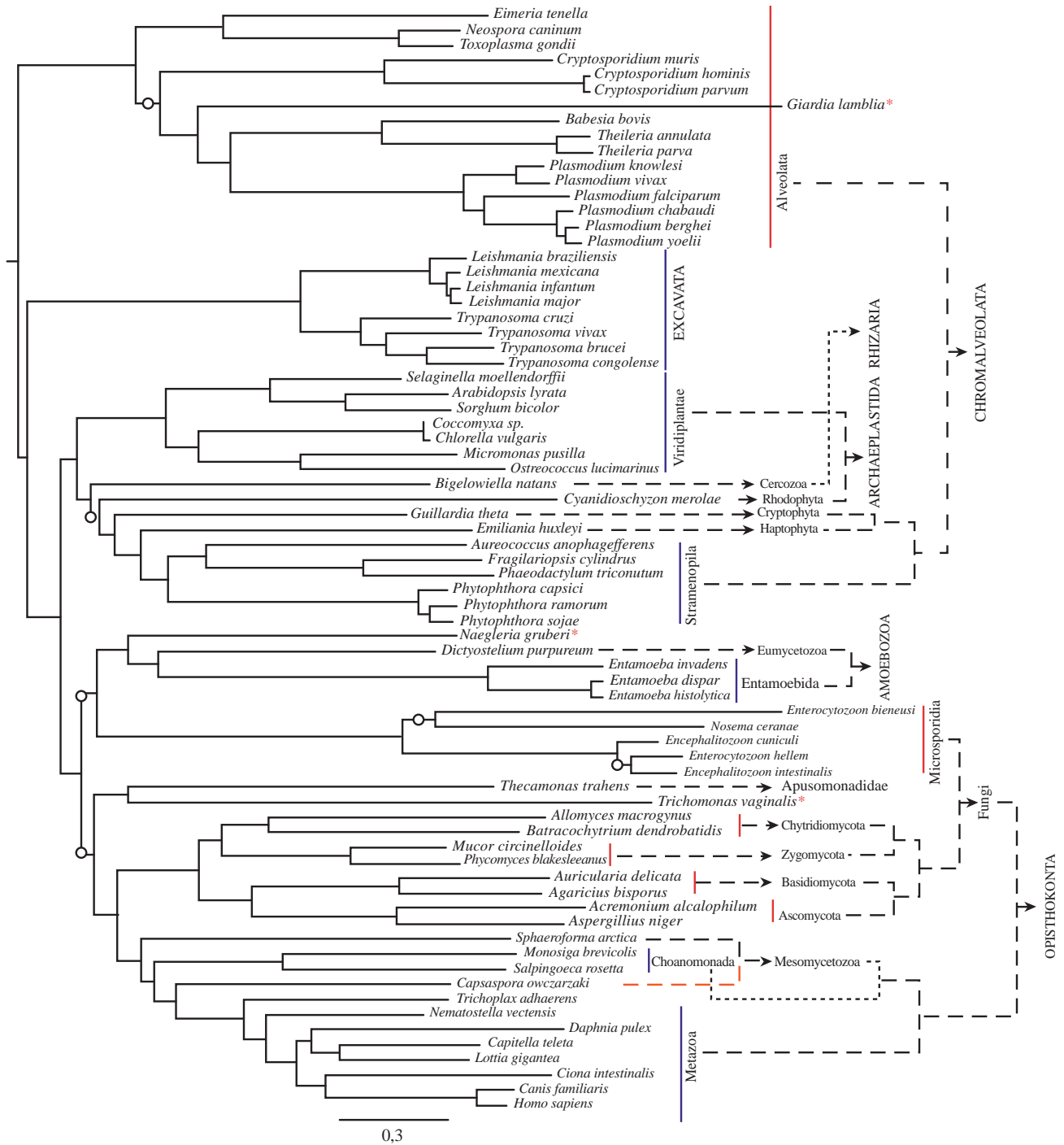


Figure 1. A tree estimated by the maximum likelihood method using the WAG model. Monophyletic clades were tagged with a blue line, and lineages involved in polyphyletic clades were tagged in red. Species' clustering is depicted with dashed lines, and the relationships shown correspond to the ones suggested by Adl (2005). Supergroups names are represented using capital letters. Open circles placed on some branches correspond to low bootstrap support (< 0.7). Species marked with a red star belong to the supergroup Excavata according to previous results and are reported as being involved in long-branch attraction phenomena (Hampl, et al., 2009) The bootstrap support values are shown in a maximum scale of 1.

represented only by the cercozoan *Bigelowiella natans*, with a relatively high support value (0.798 BS). The group that comprises the Stramenopila, the Haptophyta, the Cryptophyta, the Rhodophyta and the Cercozoa (Rhizaria)

was the sister group of the Viridiplantae clade (0.981 BS), and the monophyly of the Viridiplantae clade, as well as the relationships inside it, were all strongly supported (BS > 0.991). Our data revealed that the Alveolata and the

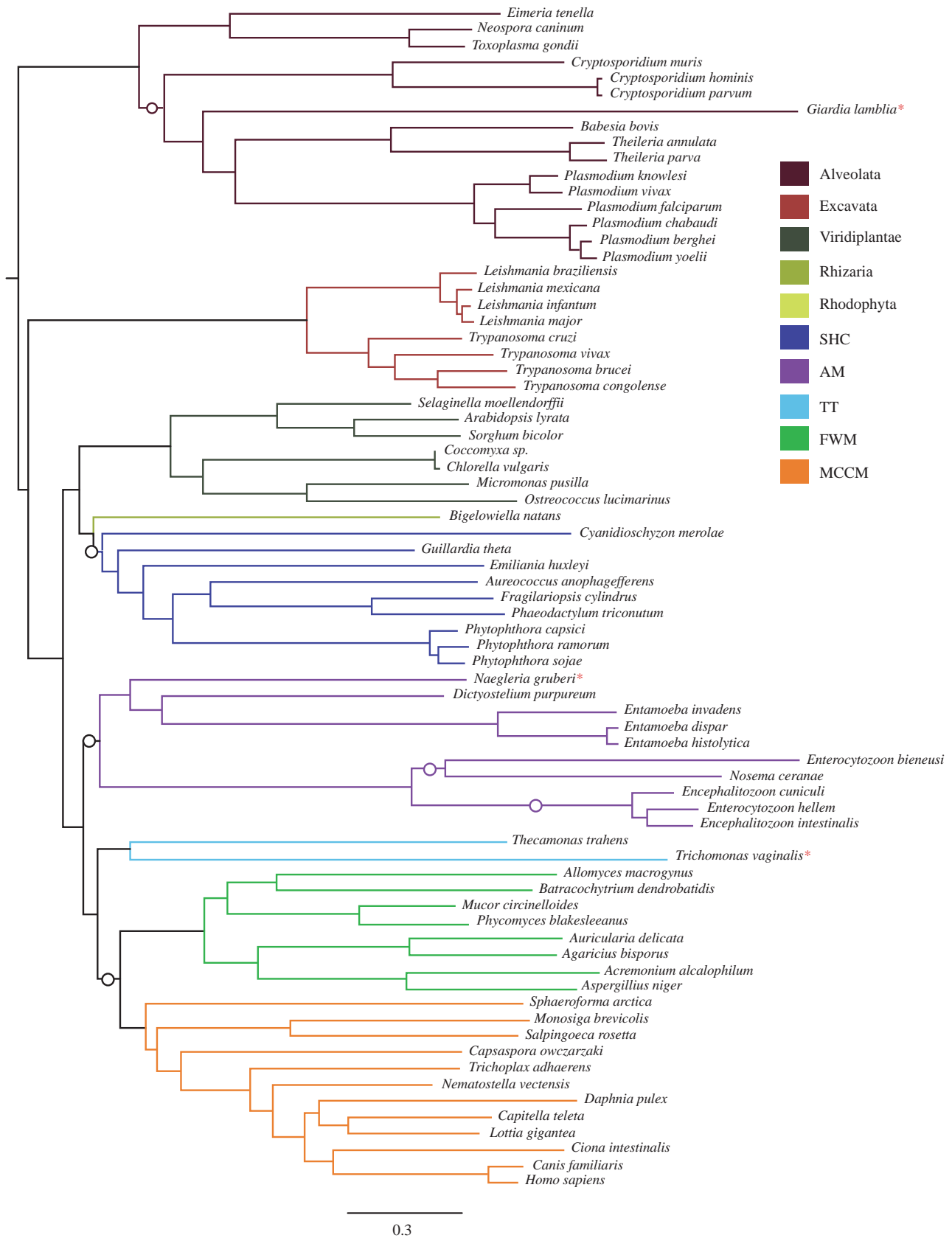


Figure 2. The same tree as in figure 1, but the colours here indicate the main clades obtained from our dataset and mentioned in the text. The bootstrap support values are shown in a maximum scale of 1.

species belonging to the Stramenopila group do not share a recent common ancestor. In fact, according to our data, the Alveolata is the earliest diverging eukaryotic lineage.

Excavata and the earliest diverging lineage, the Alveolata, a supergroup that appears in a controversial position

The Excavata, represented by the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*, was the sister group of the clade comprising the groups of the Rhizaria and the Archaeplastida and the smaller groups of the Cryptophyta, the Haptophyta and the Stramenopila. This relationship, and the relationships inside the Excavata, was strongly supported (BS > 0.999). The Excavata in the tree depicted in figure 1 (and figure 2) is paraphyletic because it does not include the three species denoted with a red star that other studies have placed in the Excavata (Adl, et al., 2005).

Finally, the Alveolata clade appeared as the first diverging lineage. This clade comprised the genera *Eimeria*, *Neospora*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Theileria* and *Plasmodium*. It also included *Giardia* as a member, attached as a sister group to the *Plasmodium* + *Theileria* + *Babesia* clade, with relatively high support (0.742 BS), but *Giardia*

was previously reported to belong to the Excavata cluster (Adl et al., 2005). All relationships inside this clade were well-supported (BS > 0.742), except the one between the clade containing the genus *Cryptosporidium* and the clade that comprises the genera *Giardia*, *Babesia*, *Theileria* and *Plasmodium* (0.509 BS).

Fast-evolving and saturated sites removed

The phylogenetic tree in figure 3 was built by removing fast-evolving and saturated sites. It depicts similar relationships to the first tree inside the major groups, however BS supports suffered slight changes, and one can find more poorly supported clades (< 0.7) in this new tree. Perhaps the major difference between the two tree topologies is that the earliest diverging group changes from one group in one tree to another group in the other tree. Whereas in the first tree (Figures 1 and 2) the Alveolata clade is the most external group, the second tree (figure 3) places the Microsporidia + *Trichomonas* + *Giardia* as the external group, which indicates that the alignment trimming placed several fast-evolving lineages together. Another major change found in this tree is that the genus *Thecamonas* was placed outside

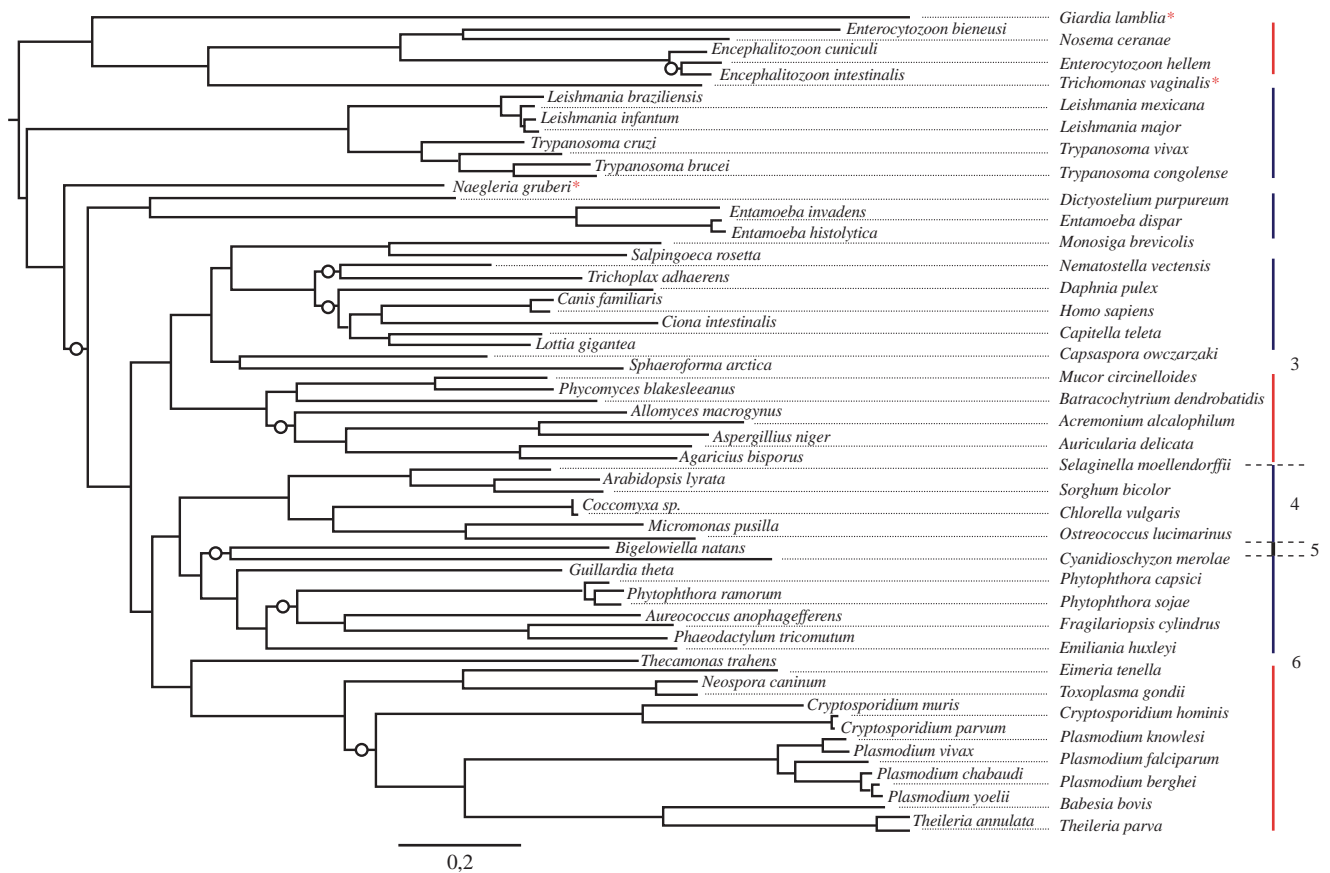


Figure 3. A tree estimated by the maximum likelihood method using the WAG model. This tree was computed from a matrix in which the sequences were trimmed using the GBLOCKS tool to remove fast-evolving and saturated sequences that might have added noise to the phylogenetic signal in our dataset. The highlighting of monophyletic/polyphyletic clades is the same as that in figure 1. Branch tip extensions were added to several species to improve the readability of the species' names.

the Opisthokonta and was grouped as a sister group to the Alveolata. Finally, the genus *Capsaspora* appears as a sister group to the genus *Sphaeroforma*, forming a monophyletic clade (Choanomonada).

Long-branch artefacts and the Chromalveolata hypothesis

We were particularly interested in: 1) the genera *Giardia*, *Trichomonas* and *Naegleria* because they have not been grouped near their Excavata relatives in any of the trees, and because they are known to produce long-branch attraction artefacts; 2) the Stramenopila and the Alveolata groups because their relationship was well-supported in previous reports (Hampl, *et al.*, 2009) and our reconstruction failed to group them; 3) the Microsporidia clade because of their low genomic representation in our study (4 genes in a species as a maximum), and because although several studies place them as a basal fungi group, our analysis failed to group them as expected, most likely because the few genes that we used may be in regions of fast evolution, as the branches of these species were relatively long. This finding gave rise to two *a priori* hypotheses to be compared with our results: one that includes the fast-evolving taxa (*Trichomonas*, *Giardia* and *Naegleria* belong to the Excavata, Microsporidia occurs within the fungi), and another that states that the Stramenopila and the Alveolata are more closely related to one another than to any other clade in the dataset. We decided to test whether the topologies associated with these hypotheses were significantly different from our resulting topologies, both in independent topologies and a combined topology of both hypotheses. The Shimodaira-Hasegawa test on the raw and Gblocks trimmed alignments and their corresponding tree topologies showed that none of these hypothetical topologies was significantly better than those obtained with our data set.

Functional identification of orthologous groups

As mentioned above, the number of orthologous genes were not the same in all species examined. This is also displayed as a phylogenetic profile (Figure 4) in which the presence/absence of a given gene in a determined species is coded by red/white.

Twenty-five protein families' biological functions were successfully identified by comparing our data against the PANTHER database using hidden Markov model-based tools. Proteins such as MYB transcription factors (PTHR13856:SF31), DNA polymerases (PTHR10133), elongation factors (PTHR23115:SF66) and DNA repair proteins (PTHR10799, PTHR22850:SF13), cell membrane proteins (PTHR10795), G proteins, Transferases (PTHR11135, PTHR32119:SF2, PTHR21329), Hydrolases (PTHR11820:SF77), DNA helicase (PTHR10799:SF213), Heat Shock proteins (PTHR11528), Transducin Beta-like protein (PTHR19854:SF15), a signal recognition particle 9kd protein (PTHR12834), a potassium voltage-gated channel protein (PTHR10217:SF376), SNRNA-activating

protein complex subunit 3 (PTHR13421), MUTS homolog 4, MSH4 (PTHR11361:SF36), Adapter-related protein complex, beta subunit (PTHR11134), Bartet-Biedl syndrome proteins (PTHR23083:SF389), kinase (PTHR12400), Tumour necrosis factor type 1 receptor associated protein (PTHR11528) and several other hypothetical and putative proteins (PTHR12895, PTHR15830:SF5, PTHR22957, PTHR15840:SF4) were found in our dataset.

Further analyses modifying the number of taxa also contribute evidence to refute the Chromalveolata hypothesis

Two additional trees were inferred from datasets that were built by varying the number of species included. The first included 77 species, including more species from the Archaeplastida and the Stramenopila than the previous dataset. Additionally, the microsporidian species, and those species previously reported to cause LBA were removed. The second dataset had only 53 species, retaining all of the taxa from the Stramenopila and the Alveolata but discarding several taxa from other supergroups, leaving only a few representatives of each group. The first of these datasets was built to improve taxon sampling, and the second one was built to improve gene clustering because it seems to be a compromise between species' divergence and performance of the MCL. With these new trees, we expected to obtain a more robust view of the Stramenopila + Alveolata hypothesis (the Chromalveolata hypothesis).

The first tree (Figure 5) yielded a topology in which the Alveolata appears as the earliest diverging lineage, and the Stramenopila (without *Guillardia theta*) + *Cyanidioschyzon merolae* appears as the closest relative to the Excavata + Entamoeba clade, but this relationship was poorly supported. This clade appeared as the sister group of the Rhizaria. It is also observed that Viridiplantae + *Guillardia theta* + *Thecamonas trahens* is most closely related to *Dictyostelium* + Opisthokonta. The second tree (Figure 6) yielded a topology that resembles that of figure 1. Again, the Alveolata, as in almost all of the previous trees, appeared as the earliest diverging lineage. The rest of the topology is similar to the figure 1 tree, except that the Rhizaria lineage diverges earlier, and *Entamoeba dispar* does not group with the genus *Dictyostelium* but appears on an early diverging branch.

Discussion

This study implements large datasets in complex computational algorithms for the reconstruction of the evolutionary history of the group formerly known as protists. Several studies have used different genes to reconstruct the phylogeny of this group of eukaryotes (Burki, *et al.* 2009; Cavalier-Smith & Chao, 2010), but here we implemented a Markov clustering method to optimise and debug the dataset of genes to develop a robust phylogeny. The use of this complex computational method and the use of a

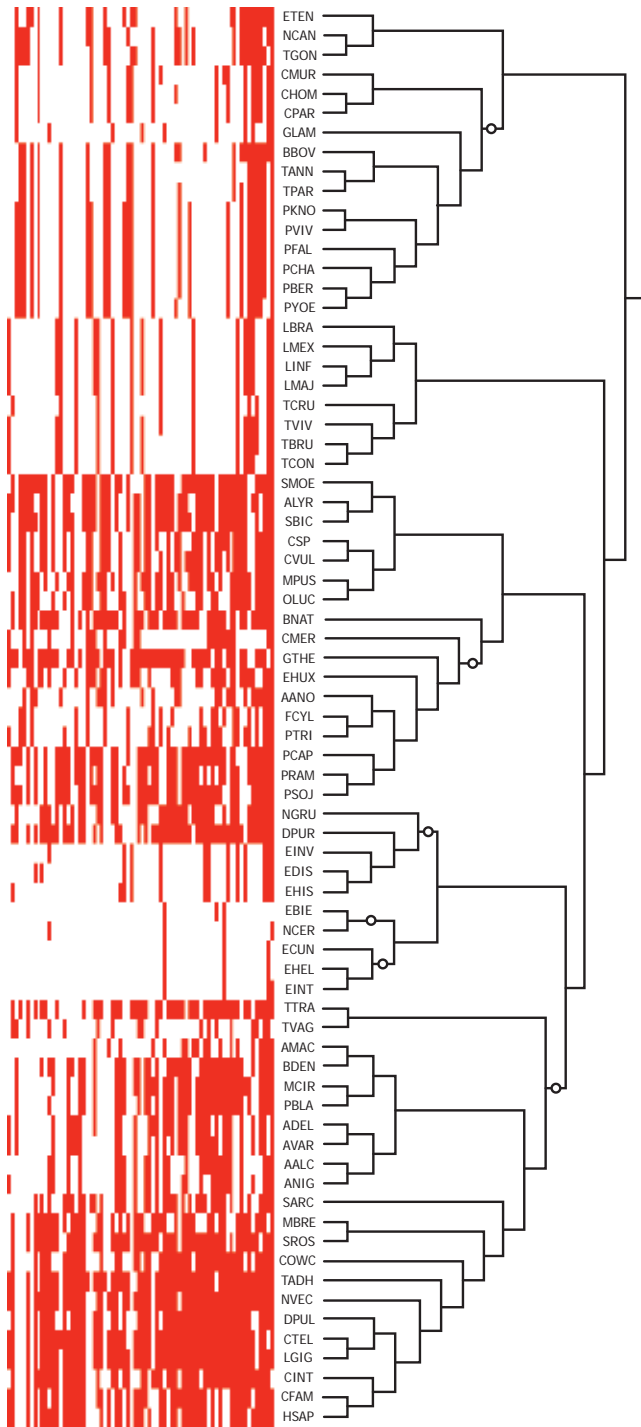


Figure 4. Phylogenetic profiles deduced for each protein indicating its presence/absence among the 73 proteomes. These profiles were calculated directly from the orthologous clustering by taking into account the species that were present in each cluster. The colour code depicts whether the protein is present in a given species; white represents absence and red represents presence. On the right, the evolutionary tree was manually reconstructed to depict relationships among species so that the branch lengths are not preserved and do not correspond to the original lengths. Open circles highlight the low-supported branches. This is a representation of the supermatrix in which gaps are shown as blank spaces.

number of eukaryotic complete proteomes that are publicly available allow this research to provide a deeper insight into the phylogeny and taxonomy of the organisms classified in this diverse and poorly understood group.

With our novel approach, the phylogenetic relationships of several species were resolved. The Opisthokonta was recovered as a polyphyletic group, and inside it, *Capsaspora sp.* was found to be the lineage closest to the metazoans. This is a novel phylogenetic hypothesis for metazoans and *Capsaspora sp.*, not previously observed in traditional taxonomies. The lineage represented by *Thecamonas sp.*, previously ranked as of uncertain origin, appears as the closest relative to the Opisthokonta. Our analysis also places the stramenopiles, haptophytes and cryptophytes inside a monophyletic lineage (Cavalier-Smith & Chao, 2006), going against the Chromalveolata hypothesis, and places the rhodophytes, rhizarians and Viridiplantae lineages as their closest relatives instead of the Alveolata group, which was previously reported to be the closest group to the Stramenopila (Adl, et al., 2005; Burki, et al., 2009). The only representatives of the Excavata that were grouped as a monophyletic clade were the *Leishmania* and *Trypanosoma* species (Kinetoplastids) (Adl, et al., 2005), whereas other Excavata members are dispersed throughout other clades in the tree.

Our analysis did not support the monophyly of almost any of the so-called traditional supergroups. The dashed lines in our tree (Figure 1) trace and indicate the supergroups to which each clade belongs according to the previously mentioned classification system. While we are aware that some of those placements may have occurred because of the limitations of our procedure, most of our results were well-supported and consistent, solving previously unclear relationships, and reaffirming formerly published relationships.

Apparent Opisthokont polyphyly and the position of the Microsporidia

The five microsporidian species are the only ones that group outside the Opisthokont clade, but they were expected to share a common ancestor with the fungi (Corradi & Keeling, 2009). We found that these species have the least number of representatives in our dataset because they had, at most, four orthologous genes that were recovered and included in the supermatrix. This can also be observed in the phylogenetic profile (Figure 4), in which the differences between the phylogenetic profile of microsporidian species and other fungi are remarkable. The microsporidia are obligate intracellular parasites of other eukaryote species, most frequently animals. They lack several cellular components, such as mitochondria, the Golgi apparatus, and centrioles, and this can be correlated to a reduced genome that might be a result of high levels of specialisation. In fact, it is reported that they have approximately 2000 genes that include several fast-evolving and divergent sequences that

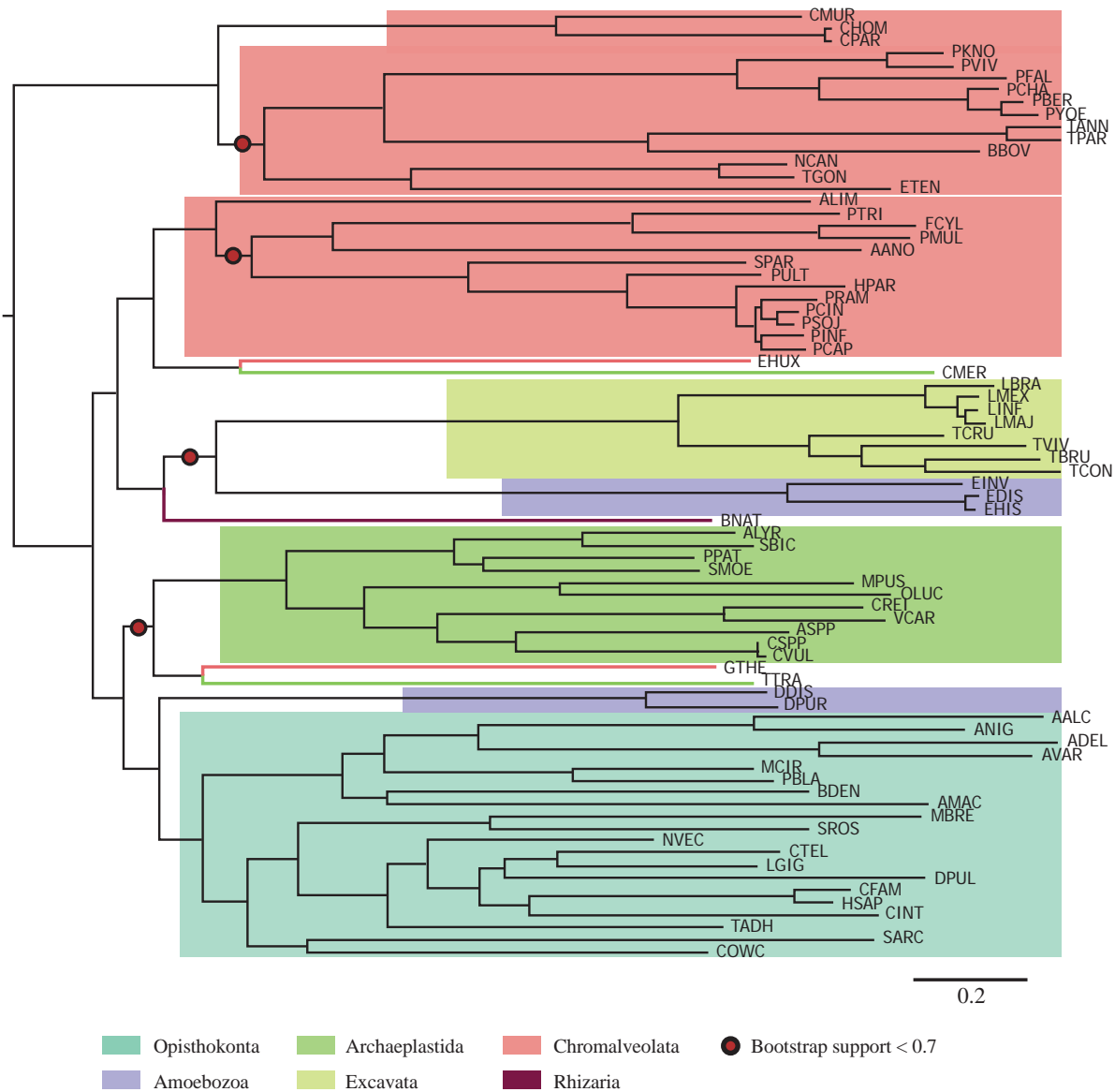


Figure 5. ML tree containing several species from the Stramenopila and the Archaeplastida, but excluding species in the Microsporidia and species in which LBA was previously observed. This tree has 77 species and shows several discrepancies in the position of some species with respect to former trees, but noticeably separates the Stramenopila and the Alveolata lineages as did former trees. The colour code shows the eukaryotic supergroup to which each species belongs, and red circles in the tree indicate low (< 0.7) bootstrap support.

might be causing long branch attraction artefacts in some analyses (Brinkmann, van der Giezen, Zhou, Poncelin de Raucourt, and Philippe, 2005; Corradi & Keeling, 2009). This could contribute to the high levels of noise in our dataset, producing misleading results. Moreover, three of the four amoebozoa are categorised as low-sampled species, which can add the effect of long-branch attraction to the few sequences obtained from the microsporidians. Despite the apparent polyphyly of the Opisthokonta, caused by LBA, as mentioned previously, our tree reveals and confirms the Amoebozoa as the closest relatives of the Opisthokonta, as found in previous analyses (Hampl, et al., 2009; Ruiz-Trillo, et al., 2007).

The positions of *Capsaspora owczarzaki* and *Thecamonas trahens*

Capsaspora was found to be included in 3 groups also including several metazoan species and in which the choanozoans (*Monosiga* and *Salpingoeca*) were not included. *Capsaspora* was reported to share more transcription factors with metazoans than with the genus *Monosiga* (Sebe-Pedros, de Mendoza, Lang, Degnan, and Ruiz-Trillo, 2011).

The genus *Thecamonas* was previously reported to belong to a group of uncertain origin (Apusomonadida) (Adl, et al., 2005). Our analysis placed it as a sister group of

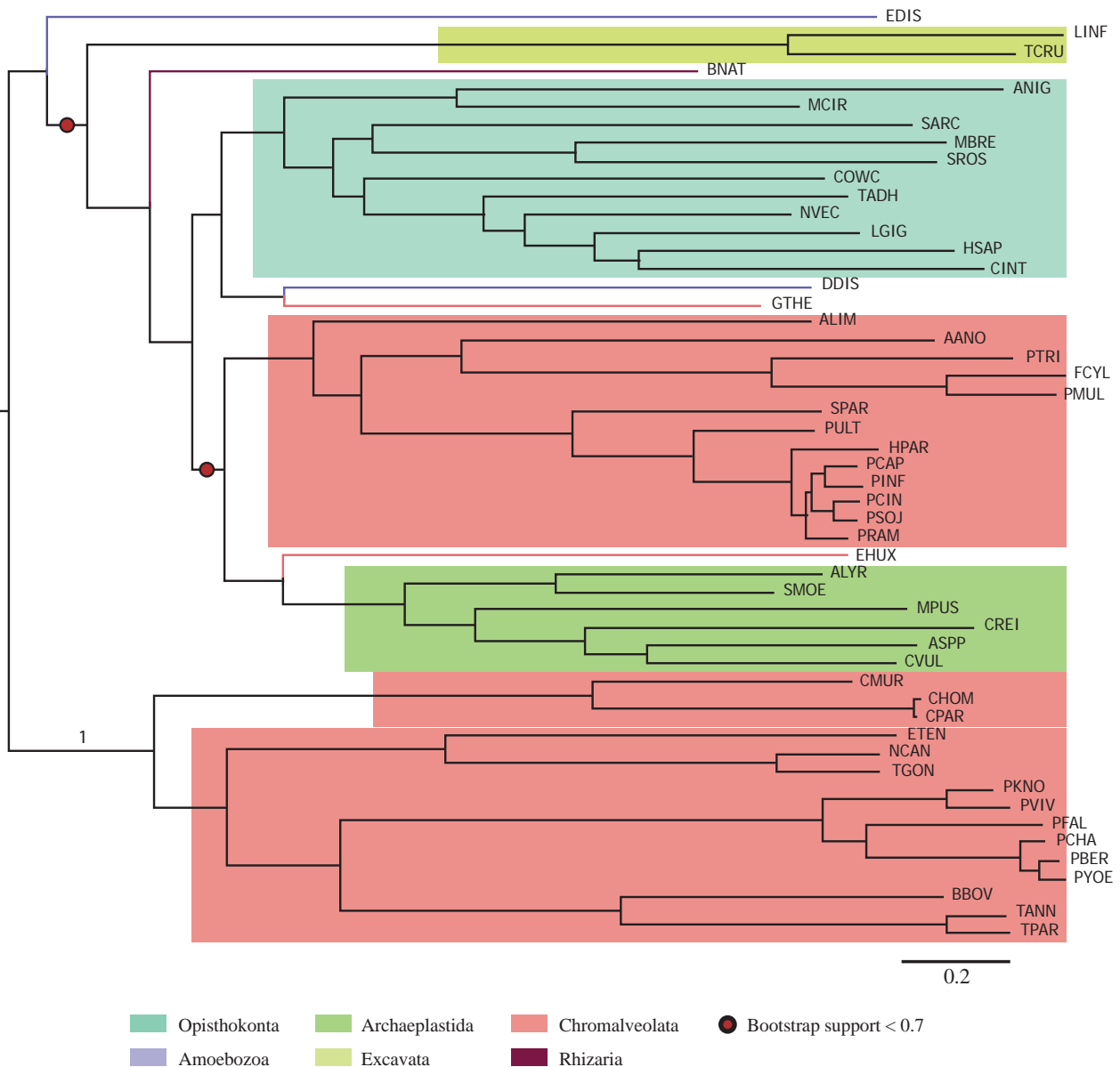


Figure 6. ML tree containing only a few representatives of the major eukaryotic lineages except for the Stramenopila and the Alveolata, in which the number of taxa was left invariant. This tree also shows that the Alveolata split from the Stramenopila as the earliest diverging lineage among eukaryotic taxa. The colour code is the same as in figure 5.

the Opisthokonta (excluding the Microsporidia), with a support value (0.667 BS), slightly below the acceptable 0.7 threshold, indicating that it shares a common origin with the Opisthokonta. This result is consistent with a previously reported classification of this organism and reinforces this classification because it had been only built based on a single gene (Cavalier-Smith & Chao, 2010).

Controversy regarding the monophyly of the Chromalveolata

The Stramenopila, the Cryptophyta, the Haptophyta and the Alveolata were previously reported to share a common ancestor and to constitute the Chromalveolata clade (Adl,

et al., 2005; Burki, *et al.*, 2009). However, our analysis contends such monophyly and places the Stramenopila, the Haptophyta and the Cryptophyta together. These three form the former group Chromista (Cavalier-Smith & Chao, 2006), and the immediate relatives of the Stramenopiles in our tree are the red algae *Cyanidioschyzon merolae*, the rhizarians and then the Viridiplantae. These results coincide with other phylogenomic analyses performed by different methods of evaluation of orthologous genes (Ocana & Davila, 2011). The genes recovered with the Markovian clustering for these lineages show that the Stramenopila and the Alveolata do not share a recent common ancestor that allows them to constitute a monophyletic group. We suggest

further revision of the phylogenetic relationships of the Stramenopila and the Alveolata, along with the addition of several Archaeplastida species.

The divergence of the Rhodophyta from the Viridiplantae, and the failure of the reconstruction of a monophyletic Archaeplastida, can also be attributed to the low number of genes in the genus *Cyanidioschyzon* and a possible retention of red algae nuclear genes by the cryptophytes (Brinkmann, *et al.*, 2005).

When evaluating the additional datasets that were generated and the trees associated with them (Figures 5 and 6), topologies consistent with those of the previous trees were found, suggesting that the Stramenopila and the Alveolata do not constitute a monophyletic group. Our trees also show that the Stramenopila and the Alveolata do not constitute a monophyletic group, a result that is opposed in several previously reported phylogenies (Baurain, *et al.*, 2010; Burki, *et al.*, 2009; Hampl, *et al.*, 2009; Hess & De Moraes Russo, 2007; Parfrey, *et al.*, 2010). This makes our results different from other studies and do not support the Chromalveolata hypothesis (Bodl, Stiller and Mackiewicz, 2009; Burki, *et al.*, 2009). The phylogenetic relationships that were found here link the stramenopiles with plants and green algae (Viridiplantae) more than with any other lineage, and they place the Alveolata as the earliest diverging lineage. Although we cannot reject the Chromalveolata hypothesis based on the result of the Shimodaira-Hasegawa test alone, the strong support obtained for most of the branches in our trees, and the consistent position of the Alveolata, even when the dataset was changed, allow us to state that the Stramenopila and the Alveolata are not sister groups. Figure 4 shows that the phylogenetic profiles of the Stramenopila and the Alveolata groups are quite dissimilar and that the Alveolata profile resembles the Excavata profile more than it resembles the Stramenopila profile. Additionally, the Stramenopila profile is similar to the Viridiplantae profile. The hypothesis that suggests that the Stramenopila and the Alveolata share a red algal common ancestor that originated by a single endosymbiotic event (Simpson & Roger, 2004) is not supported.

Giardia, Trichomonas and Naegleria

The Excavata also appear in Figure 4 as a group whose representatives are considered to be scarcely represented. Most of the Excavata organisms (6 species, 3 from the genus *Leishmania* and 3 belonging to the genus *Trypanosoma*) belong to a subgroup of the Euglenozoa called the Kinetoplastea, which are characterised, so far, by the presence of a mass of DNA associated with their flagellar bases (kinetoplast) (Adl, *et al.*, 2005). *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* are reported to be species with fast-evolving sites in their genomes (Hampl, *et al.*, 2009) that can contribute error to datasets in which they are included because fast-evolving sites are strongly associated with long

branch attraction artefacts (Philippe, *et al.*, 2000). Although no information relating species of *Naegleria* with these phenomena were found, we cannot discard the possibility that this phenomenon occurs in our dataset. Another contributing factor to the misplacement of *Naegleria gruberi* could be that the number of genes present in this species in our dataset (41) differs greatly from the number of genes recovered from the other members of the Excavata (16 or less). At this point, we cannot dismiss that these genera belong to the Excavata or that the Microsporidia belongs to the fungi. The latter confirms that the long-branch artefact might have affected the relationships of these and several other species.

Removing fast-evolving/saturated sites

The trimmed dataset produced some similar topologies and overall lower statistical support compared to our original dataset. This dataset was also compared to the three hypothesis-based topologies via SH test, yielding identical results as the comparison of the original one. This indicates that, in this case, trimming the gene alignments and concatenating them afterward produces additional gaps. Filling blank regions that are caused by the performance of the clustering algorithm did not result in a gain of phylogenetic signal. To yield an improved dataset so that the trimmed dataset would contain less additional gaps, it might be beneficial to manually complete the gene stock for several poorly represented species, taking into account several other sources of orthologous eukaryotic genes, such as ESTs, and then performing the removal of these noise-adding sites.

Initially, two eukaryotic supertrees were reconstructed based on an automatic orthologous clustering approach; one with no further supermatrix modifications, and one with the fast-evolving and saturated sites removed. It was shown that *Capsaspora owczarzaki* is the closest relative of the Metazoa clade. It was previously suggested that the origin of *Thecamonas trahens* was uncertain (Adl, *et al.*, 2005). Here we confirm that it shares a common ancestor with the Opisthokonta and suggest that they are placed in the same supergroup; these two results have not been previously reported. The Stramenopila and the Alveolata were not confirmed to be sister lineages as in previous analyses; thus, further revision of these clades' phylogenetic relationships are recommended. The Excavata was found to be monophyletic except for three species, two of them previously reported as generators of a long-branch attraction artefact. Despite the efforts of removing the saturated/fast-evolving blocks, their correct placement was not achieved. This is attributed to the difference in the amount of genes per species.

Automatic orthologue clustering was shown to be a remarkably efficient approach to recover homologous proteins and to build consistent datasets that yield enough

phylogenetic information to unravel several unclear relationships among supergroups of eukaryotic organisms. Problems found with this approach are attributed to the choice of species because their natural histories may have resulted in genome size reduction. This reduction affects the quality of the gene grouping and can be sorted using additional data, such as the recovery of ESTs and the completion of the genomic databases, which can provide valuable information for studying orthologous genes and the functionality and evolution of this intricate group of organisms.

Acknowledgements

We thank Dr. Andrew J. Crawford, Francisco Buitrago and David Urbina for their assistance and suggestions. We also thank the Department of Biological Sciences of the Universidad de Los Andes, Bogotá for providing technical resources to make this work possible.

Conflict of interests

The authors declare no having any conflict of interest in publishing this article.

Bibliography

- Abascal, F., Zardoya, R., and Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, **21**: 2104-2105.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., *et al.* (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.*, **52**: 399-451.
- Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., *et al.* (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol.* **56**: 684-689.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., *et al.* (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59**: 429-493
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402.
- Baurain, D., Brinkmann, H., Petersen, J., Rodríguez-Ezpeleta, N., Stechmann, A., Demoulin, V., *et al.* (2010). Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in cryptophytes, haptophytes, and stramenopiles. *Mol Biol Evol.*, **27**: 1698-1709.
- Bodyl, A., Stiller, J.W., and Mackiewicz, P. (2009). Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol Evol.*, **24**: 119-121; author reply 121-112.
- Brinkmann, H., van der Giezen, M., Zhou, Y., Poncelin de Raucourt, G., Philippe, H. (2005). An empirical assessment of long-branch attraction artefacts in deep eukaryotic phylogenomics. *Syst Biol.* **54**: 743-757.
- Burki, F., Inagaki, Y., Bråte, J., Archibald, J.M., Keeling, P.J., Cavalier-Smith, T., *et al.* (2009). Large-scale phylogenomic analyses reveal that two enigmatic protist lineages, telonemia and centroheliozoa, are related to photosynthetic chromalveolates. *Genome Biol Evol.*, **1**: 231-238.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.*, **17**: 540-552.
- Cavalier-Smith, T., & Chao, E.E. (2006). Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *J Mol Evol*, **62**: 388-420.
- Cavalier-Smith, T., & Chao, E.E. (2010). Phylogeny and evolution of apusomonadida (protozoa: apusozoa): new genera and species. *Protist*, **161**: 549-576.
- Chen, F., Mackey, A.J., Vermunt, J.K., and Roos, D.S. (2007). Assessing performance of orthology detection strategies applied to eukaryotic genomes. *PLoS ONE*, **2**: e383.
- Corradi, N., & Keeling, P.J. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biol Rev.*, **23**: 1-8.
- Hapl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G., *et al.* (2009). Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**: 3859-3864.
- Harper JT., & Keeling, P.J. (2003). Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol Biol Evol.*, **20**: 1730-1735.
- Hess, P.N., & De Moraes Russo, C.A. (2007). An empirical test of the midpoint rooting method. *Biol J Linn Soc Lond.*, **92**: 669-674.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.*, **33**: 511-518.
- Keeling, P.J., Burger, G., Durnford, D.G., Lang, B.F., Lee, R.W., Pearlman, R.E., *et al.* (2005). The tree of eukaryotes. *Trends Ecol Evol.* **20**: 670-676.
- Kuck, P., & Meusemann, K. (2010). FASconCAT: Convenient handling of data matrices. *Mol Phylogenet Evol.*, **56**: 1115-1118.
- Leigh, J.W., Lapointe, F.J., Lopez, P., and Baptiste, E. (2011). Evaluating phylogenetic congruence in the post-genomic era. *Genome Biol Evol.*, **3**: 571-587.
- Li, L., Stoeckert, C.J., Jr., Roos, D.S. (2003). OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.*, **13**: 2178-2189.
- Mi, H., Lazareva-Ulitsky, B., Loo, R., Kejariwal, A., Vandergriff, J., Rabkin, S., *et al.* (2005). The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res.*, **33**: D284-288.
- Nozaki, H., Maruyama, S., Matsuzaki, M., Nakada, T., Kato, S., and Misawa, K. (2009). Phylogenetic positions of Glaucophyta, green plants (Archaeplastida) and Haptophyta (Chromalveolata) as deduced from slowly evolving nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol.*, **53**: 872-880.

- Ocana, K.A., & Davila, A.M.** (2011). Phylogenomics-based reconstruction of protozoan species tree. *Evol Bioinform Online*, **7**: 107-121.
- Parfrey, L.W., Grant, J., Tekle, Y.I., Lasek-Nesselquist, E., Morrison, H.G., Sogin, M.L., et al.** (2010). Broadly sampled multigene analyses yield a well-resolved eukaryotic tree of life. *Syst Biol.*, **59**: 518-533.
- Philippe, H., Lopez, P., Brinkmann, H., Budin, K., Germot, A., Laurent, J., et al.** (2000). Early-branching or fast-evolving eukaryotes? An answer based on slowly evolving positions. *Proc Biol Sci.*, **267**: 1213-1221.
- Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P.** (2009). FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol.*, **26**: 1641-1650.
- Ruiz-Trillo, I., Burger, G., Holland, P.W., King, N., Lang, B.F., Roger, A.J., et al.** (2007). The origins of multicellularity: a multi-taxon genome initiative. *Trends Genet.*, **23**: 113-118.
- Sebe-Pedros, A., de Mendoza, A., Lang, B.F., Degnan, B.M., Ruiz-Trillo, I.** (2011). Unexpected repertoire of metazoan transcription factors in the unicellular holozoan *Capsaspora owczarzaki*. *Mol Biol Evol.*, **28**: 1241-1254.
- Shimodaira, H., Hasegawa, M.** (1999). Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol.*, **16**: 1114.
- Simpson, A.G.B., & Roger, A.J.** (2004). *The real 'kingdoms' of eukaryotes*. Cambridge, MA: Cell Press.

Microstructural characterization of pore types in unconventional gas reservoirs utilizing FEG-SEM: An example from the Galembó Member of the Cretaceous La Luna Formation, Middle Magdalena Valley Basin (Colombia)

Carlos A. Ríos^{1,*}, Oscar M. Castellanos², Efraín Casadiego Q¹

¹Grupo de Investigación en Geología Básica y Aplicada (GIGBA), Escuela de Geología, Universidad Industrial de Santander, Colombia

²Grupo de Investigación en Geofísica y Geología (PANGEA), Programa de Geología, Universidad de Pamplona, Colombia

Abstract

Mineralogy and microstructure are key variables defining the physical properties of a rock. Mudstones show inherently heterogeneous matrix pore-size distributions. They can show organic and inorganic pores and the transport mechanism through pores is different, and, therefore, it is necessary to describe their organic and inorganic porosity. This work uses Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy to characterize the Galembó Member mudstones, Cretaceous La Luna Formation, Middle Magdalena Valley Basin, Colombia. There are several pore types in mudstones, including interparticle pores due to flocculation of clay minerals, organoporosity due to burial and thermal maturity of organic matter, intraparticle pores from organisms, intraparticle pores within mineral grains, and microchannels and microfractures, including dissolution, fillings and interlayer fractures. The existence of interconnected pores in such complex fracture-pore system provides effective pathways for primary gas migration and it also provides a storage space for the residual petroleum in mudstones, which is important for the primary migration and storage for mudstone gas resources. The pore connectivity is high and increases towards the top of the Galembó Member.

Key words: Mudstones, microstructural, porosity, Galembó Member, La Luna Formation, Middle Magdalena Valley Basin, Colombia.

Caracterización microestructural de tipos de poros en reservorios no convencionales de gas utilizando MEB-FEC: Un ejemplo del Miembro Galembó de la Formación La Luna del Cretáceo, Cuenca del Valle Medio del Magdalena (Colombia)

Resumen

La mineralogía y la microestructura son variables claves que definen las propiedades físicas de una roca. Las lodolitas muestran distribuciones de tamaño de poro en la matriz inherentemente heterogéneas. Ellos pueden mostrar poros orgánicos e inorgánicos y el mecanismo de transporte a través de poros es diferente, y, por lo tanto, es necesario describir su porosidad orgánica e inorgánica. Este trabajo utiliza Microscopía Electrónica de Barrido de Fuente de Emisión de Campo para caracterizar las lodolitas del Miembro Galembó de la Formación La Luna del Cretáceo, Cuenca del Valle Medio del Magdalena, Colombia. Hay varios tipos de poros en las lodolitas, incluyendo poros interpartículas debido a la floculación de minerales de arcilla, porosidad orgánica debida al enterramiento y madurez térmica de la materia orgánica, poros intrapartículas de organismos, poros intrapartículas dentro de granos minerales, y microcanales y microfracturas, incluyendo disolución, relleno y fracturas entre capas. La existencia de poros interconectados en tal complejo sistema de poros-fracturas ofrece vías eficaces para la migración primaria de gas y también proporciona un espacio de almacenamiento para el petróleo residual en las lodolitas, lo cual es importante para la migración primaria y almacenamiento de los recursos de gas asociado a lodolitas. La conectividad entre poros es alta y aumenta hacia la parte superior del Miembro Galembó.

Palabras clave: lodolitas, microestructural, porosidad, Miembro Galembó, Formación La Luna, Cuenca del Valle Medio del Magdalena, Colombia.

Introduction

Recently, the energy industry is focusing on the unconventional resources, taking into account that they are an alternative promising source of hydrocarbon supply.

Traditionally, shale-gas systems have been considered as source rocks and seals of conventional reservoirs, are organically-rich, fine grained sedimentary rocks capable of producing commercially important quantities of

hydrocarbons upon hydraulic fracturing, although extraction is further complicated by the tight, thinly layered nature of these rocks. A shale-gas system is an unconventional petroleum system in which the shale acts as both the source of, and the reservoir for, hydrocarbon gases that are derived from the organic matter within the shales through biogenic and/or thermogenic processes (e.g., Hill *et al.*, 2007). The unconventional gas reservoirs are very important for the petroleum exploration, taking into account that their gas storage properties and potential as a recoverable resource. However, several factors governing whether a particular shale will become a shale-gas resource or not, include: (1) organic matter abundance, type and thermal maturity; (2) porosity-permeability relationships and pore size distribution; (3) brittleness and its relationship to mineralogy and rock fabric (Josh *et al.*, 2012). Gas storage in shales may occur in one or more of three forms: (1) free gas in pores and fractures, (2) adsorbed gas in organic matter and on inorganic minerals, and (3) dissolved gas in oil and water (Curtis, 2002; Zhang *et al.*, 2012). Gas is particularly difficult to extract because it is adsorbed on the shale mineral grains and trapped in isolated pores and fractures (e.g., Lee *et al.*, 2011). However, storage and migration of hydrocarbon molecules through shales is complex, slow and not fully understood, owing to the small pore size, low permeability and often isolated pores, and, therefore, it is for this reason that almost all shales require artificial fracturing to obtain commercial flow rates (Slatt and O'Brien, 2011). Taking into account that the conventional techniques are not applicable to unconventional reservoirs due to the complex properties of rocks in shale-gas systems, these low permeability rocks are very challenging to characterize due to their complex nano-metric scale pores and microstructure. Today, it is widely accepted that the presence of organic nanopores within most worldwide shale plays (e.g., Slatt and O'Brien, 2011; Loucks *et al.*, 2012; Curtis *et al.*, 2012a, 2012b; Chalmers *et al.*, 2012), which is likely to be involved in hydrocarbon retention processes in source rocks (e.g., Romero-Sarmiento *et al.*, 2013, 2014). The identification of porosity and pore size distribution in shale-gas has become a high research priority as they are key parameters for the commercial evaluation of a potential shale (Ross and Bustin, 2009; Loucks *et al.*, 2009). Organic porosity is mainly important in the gas generation window, thus limiting their importance mainly to storage of gas. Colombia is the third country in South America with the greatest potential for shale-gas, with 7 high prospectively basins, with the Catatumbo, Middle Magdalena Valley and Eastern Cordillera basins as the most important. According to the National Hydrocarbon Agency

(ANH), several shale plays have developed in Colombia, including the Cretaceous La Luna Formation in the Middle Magdalena Valley Basin (MMVB), which has been studied as a source rock for many years and has been studied by several researchers (e.g., Morales *et al.*, 1958; Schamel, 1991; Montgomery, 1992; Ramón *et al.*, 1997; Ramon and Dzou, 1999; Rangel *et al.*, 2000a, 2000b). Based on the increasing interest to looking at Latin America's shale potential, Colombia's shale plays could offer very attractive opportunities. La Luna Shale, a well-known major source rock in the MMVB, is emerging as one of the major gas plays of the region, and is among the top worldwide shale gas systems. The aim of this study is to evaluate several approaches for characterizing outcrop samples from the Galembó Member of the Cretaceous La Luna Formation in the MMVB using different analytical techniques to identify pore characteristics that would classify the shales as a potential resource for unconventional gas, taking into account the features that would influence its shale-gas potential and provide a better framework for future evaluation.

Geological setting

The MMVB is a roughly north-south oriented intermontane basin that separates the Central and Eastern Cordilleras of Colombia (Figure 1), which constitutes a poly-historic basin developed through different stages closely related with the tectonic events of the northwest corner of South America (Kingston, *et al.*, 1983). It is one of the most prolific petroleum basins in Colombia, which has produced most of the oil and gas in Colombia with over 40 discovered conventional oil fields, sourced out of Tertiary sandstone reservoirs (Rodríguez, 2013). Several papers about source rocks in the MMVB have been published (e.g., Zumberge, 1984; Schamel, 1991; Reyes, 1996; Ramon and Dzou, 1999; Rangel, *et al.*, 2000a; 2000b; Aguilera, *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2015). The organic-rich Cretaceous La Luna Formation has traditionally been recognized as the main hydrocarbon source rock in the MMVB (e.g., Zumberge, 1984; Rangel, *et al.*, 1996) and can be considered as a self-contained source and reservoir system and thus constitutes an unconventional shale play (e.g., Jensen *et al.*, 2013). It consists of calcareous black shales and limestones, with high foraminifera content and limestone concretions, and, based on the facial analyses, its depositional environment is believed to be shallow marine, middle to outer shelf, in a transgressing sea (Torres, 2013). Based on the integration of biomarker ratios, lithofacies and relative hydrocarbon potential, Torres, *et al.* (2015), suggest that the La Luna Formation was deposited under dysoxic/anoxic conditions and episodic periods of photic zone anoxia during major transgressive–regressive cycles in a restricted middle shelf to upper slope; these sea-level changes affected the redox conditions and the extent of anoxia. Previous workers (e.g., Garner, 1926; Hedberg and Sass, 1937; Hubach, 1957; Morales, 1958; Rangel, *et al.*, 2000a, 2000b) have divided

*Corresponding author:

Carlos A. Ríos, carios@uis.edu.co

Received: June 9, 2015

Accepted: February 6, 2016

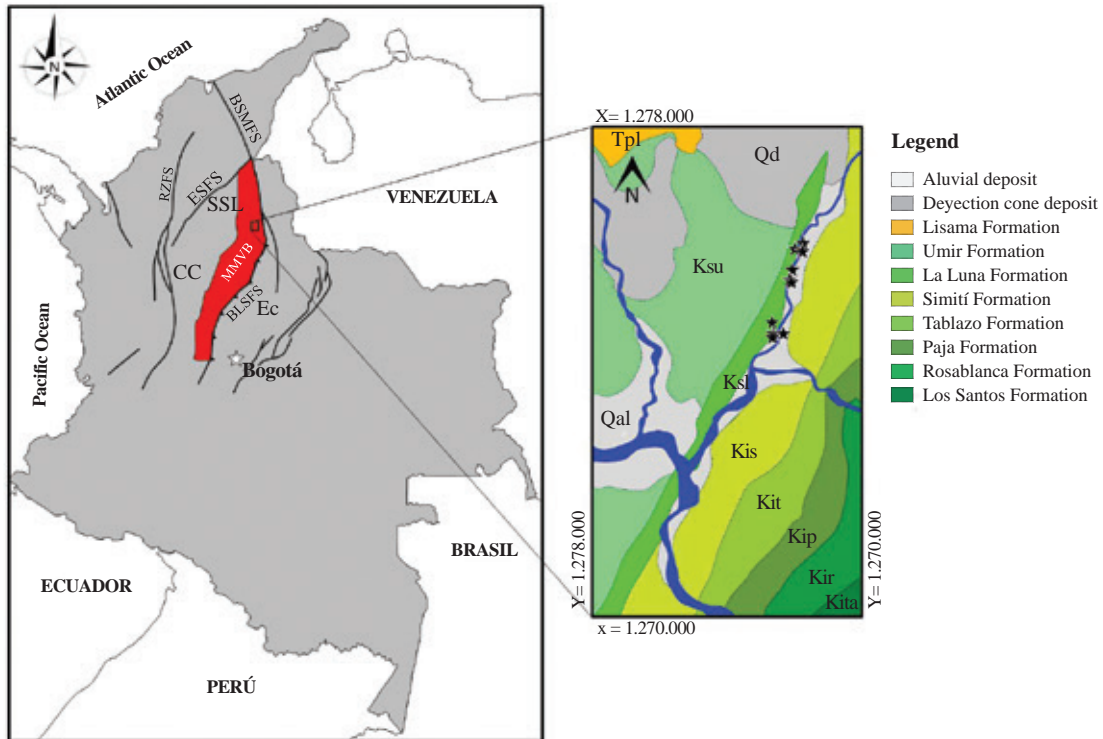


Figure 1. Left, location of the MMVB (red polygon) in Colombia. Figure notations: the Central Cordillera (CC); the Eastern Cordillera (EC); the Bituima and La Salina fault system (BLSFS); the Espiritu Santo fault system (ESFS); the Serranía de San Lucas (SSL); the Bucaramanga-Santa Marta fault system (BSMF) (adapted and modified from ANH, 2008). Right, generalized geological map adapted and modified after Ward, *et al.* (1969), with sampling localities indicated by black stars.

it into three members (Salada, Pujamana and Galembo) from base to top. **Zumberge** (1984) determined the thickness of the La Luna Formation between 150 and 600 m, describing it from the lithological point of view as consisting of calcareous black to dark grey shales, interbedded with mudstones and thin layers of chert with abundant presence of planktonic calcareous foraminifera and other pelagic organisms. The Salada Member of Lower Turonian age (**Morales, et al., 1958**) overlies the Aptian-Cenomanian Simiti Formation and its thickness ranges from 50 to 100 m. The lower part of the Salada Member consists of greenish-gray fine-grained limestones with observed laminae filled with bitumen intercalated with poorly laminated wackestones and calcareous black shales. The wackestones containing mainly planktonic foraminifera with some pyrite traces. The upper part of the Salada Member is composed of muddy laminated dark gray and thin bedded foraminiferal wackestones and calcareous shales with spherical (up to 50 cm in diameter) to oblate (up to 3 m in diameter) calcareous concretions, locally displaying a pyrite crust. However, most of the concretions are pyrite-rich. Calcite crystals are cemented and microfractures are filled with bitumen. Foraminifera and fecal pellets are usually oriented parallel to the bedding planes. According to **Torres, et al. (2015)**, these rocks range from clay-rich to diluted carbonate intervals. The Pujamana Member of Upper Turonian to Lower

Coniacian age (**Morales, et al., 1958**) is mainly composed of black to grey calcareous shales, with intercalations of sandstones in the bottom of this. Its thickness ranges from 50 to 225 m (**Allen, et al., 1993**). According **Ballesteros and Parra (2012)**, it represents a transition interval, which is characterized by the intercalation of laminated dark grey phosphatic and calcereous shales with foraminifera and thin layers of limestones, although the upper part consists of a monotonous sequence of laminated shales and calcareous mudstones. Locally, it shows pyrite-rich calcareous nodules (up to 60 cm in diameter). **Torres, et al. (2015)** describe these rocks as composed of intercalations of claystone, siliceous mudstone, chert, phosphate and thin bentonite (probably due to weathering of volcanic ashes) layers with abundant foraminifera, muddy laminated wackestones and calcareous dark grey shales at the top and phosphate layers at the bottom. Some of these layers can be filled with hydrocarbons. The Galembo Member of Upper Coniacian and probably Santonian age (**Morales, et al., 1958**) is discordantly overlaid by the Umir Formation. It consists of compacted black laminated calcareous mudstones and intercalated with dark packstones and phosphatic layers, the last of them with abundant rests of fish bones and teeth, and large calcareous cartwheel concretions of up to 8 m in diameter with ammonites in their centres (at the top), black shales with siliceous cherts, laminated claystones

and abundant calcareous nodules (at the middle part), and intercalations of micritic limestones and dark cherts (at the bottom). The thickness of the Galembó Member can range from 180 to 350 m (Morales, *et al.*, 1958). The lower part of the Galembó Member consists of phosphatic packstones and wackstones (e.g., Ramón and Dzou, 1999; Rangel, *et al.*, 2000a, 2000b; Bernal, 2009). Royero y Clavijo (2001), based on the occurrence of remains of fish, pellets and apatite, suggest that the La Luna Formation was deposited in a shallow marine environment, close to the outer edge of the platform. Several stratigraphic sections of the La Luna Formation in the MMVB have been studied in the La Sorda, La Azufrada, Agua Blanca and Agua Buena streams, the Tablazo sector and the Galembó Hill (e.g., Rangel, *et al.*, 2000a, 2000b; Bernal, 2009; Ballesteros and Parra, 2012; Casadiego, 2014; Torres, *et al.*, 2015), the last of them being the closest to the study area. Fractures are filled with calcite. Calcareous fossil shells characterize the limestones as micritic packstones. Based on biomarker analysis and reservoir characterization, Torres (2013) identified as good candidates for an unconventional shale gas plays the Salada and Galembó members of the La Luna Formation, with the transitional Pujamana Member probably representing a lithological barrier. Recently, the Colombian Government has considered encouraging the exploration for unconventional reservoirs in the MMVB, focusing on the study of several core and outcrop samples, which not only promises potential of shale-gas in this region but also indicates that the La Luna Formation emerges as a shale-gas play in South America.

Materials and methods

The investigated samples come from outcrops of the Galembó Member in the MMVB. Thin sections were prepared for petrographic analyses from offcuts of the rock samples with the plane of the section normal to the macroscopic lamination. All samples were impregnated with epoxic resin and stained for carbonates and feldspars and also to recognize the porosity. Petrographic analysis was performed using a trinocular Nikon (Labophot2-POL) transmitted light microscope equipped with an Olympus DP71 camera for image acquisition. Mineral abbreviations are after Kretz (1980). More detailed analyses followed by means of environmental scanning electron microscopy (ESEM) using a FEI QUANTA FEG-ESEM 650 instrument, under the following analytical conditions: magnification = 800-60000x, WD = 5.6-14.0 mm, HV = 10.0-20.0 kV, signal = ETD/Z CONT, detector = SE/BSED. Operational mode was mainly using secondary electrons (SE), although back scattered electrons (BSE), were also useful where contrasts in grey level in the images correspond to contrasts in atomic number and therefore chemical composition of the analyzed area. Particular areas of interest were analyzed to retrieve the chemical composition of the region via energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). EDS Detector EDAX

APOLO X with resolution of 126.1 eV (in. Mn K α). We started examining broken surfaces of sample chips. The thin section was carbon coated before analysis in order to avoid electrical charging. A selected sample was used to apply the FEI's QEMSCAN technology and iDiscover™ off-line image analysis software. The software package iDiscover consists of four software modules: Datastore Explorer (data management module), iMeasure (measurement module, SEM and EDS control), iExplorer (data processing and classification tools, mineral database management, reports), and SIP editor (phase identification protocol). Automated mineral analyses performed using the System QEMSCAN 650 FEG of the FEI's Center of Excellence for Natural Resources in Brisbane, Australia. A mineral list created to capture all the mineral phases in the sample. All data are reported in volume % (% by weight) per sample. The method of analysis used was Field Image with a resolution of 2x2 or 10x10 μm . However, some higher resolution measurements conducted to highlight some textural characteristics and compare the resolution vs. analysis time. Post-measurement processing of the frames performed to create mosaic images using iDiscover, which were used to extract quantitative mineral and petrological data, such as modal proportions (in volume %) and matrix density. Figure 1S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1257>, shows the main mineral list used for mineral maps and quantification for the analyzed mudstone sample by QEMSCAN through data processing and reporting. Most rock-forming minerals were identified. For each pixel size a total acquired X-ray data points of 6.285.575 for 10 μm and 2.342.991 for 2 μm were obtained to derivate mineralogical data. Ar-ion-milling was performed in a Fischione 1050 mill of Fishione Instruments for high resolution analysis using a FEI's Helios NanoLab™ 650 DualBeam™. All of the images were collected using backscattered electrons (BSE).

Results

Field occurrence

A generalized stratigraphic column of the Galembó Member of the La Luna Formation as part of the Cretaceous sequence outcropping at the MMVB is shown in Figure 2S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1258>. The Galembó Member is underlied by the Calizas del Salto and Simití formations and overlid by the Umir Formation. It is characterized by several lithofacies defined from descriptions of outcrops, which include nonlaminated to slightly laminated foraminifera wackstones, highly fossiliferous moderate- to well-laminated organic-rich mudstones, claystones with fossiliferous carbonate concretions with pyrite, nonlaminated siliceous and fossiliferous claystones, and volcanic ash falls. The analyzed samples show that the Galembó Member are composed dominantly of nonlaminated and slightly laminated foraminifera wackstones, highly fossiliferous moderate- to well-laminated organic-rich mudstones (sometimes with fossiliferous carbonate

concretions with pyrite), and nonlaminated siliceous and fossiliferous claystones, with interlayered thin layers of volcanic ash falls. Field occurrence of the Galembó Member sedimentary rocks is summarized in Figure 3S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1259>.

Petrography

The different grain sizes found in the Galembó Member mudstones correspond to carbonate and siliceous bioclasts, grains of quartz and intraclasts. Figure 4S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1260>, illustrates several microstructural and textural features of the Galembó Member mudstones, which are characterized by sample heterogeneity and black organic matter layers aligned to give the rock a strong anisotropy. Planktonic foraminiferal species are very common and abundant (25–45%) in organic matter rich-matrix, containing not only abundant microfossils but also non-segmented translucent filaments, which consist of elongated and thin structures that were released from non-determined skeletal allochemical (Figure 4Sa). Figure 4Sb shows a bivalve mold displaying several types of internal layers. An example of alternating organic matter rich- and foraminifera-rich layers is illustrated in Figure 4Sc. Note calcite vein filled with organic matter, which cuts across the rock lamination. Numerous veinlets of calcite cutting across the rock lamination are shown in Figure 4Sd. Bivalve shells are usually replaced by coarse neomorphic calcite (Figure 4Se). Calcite has pseudomorphed the original two layer structure of the shell. Figure 4Sf shows a drusy calcite filling a bivalve cast.

Figure 5S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1261>, shows microstructural and textural features of a typical mudstone of the Galembó Member. Figures 5Sa–5Sb are photomicrographs that illustrate numerous planktonic foraminifera that define a discontinuous lamination; note the occurrence of a plurilocular specimen, which is characterized by several chambers as well as the wall and septos. In general, the disposition of the chambers is spherical, although it sometimes is longitudinal

to an axis. The secondary electron (SE) image in Figure 5Sc reveals the pattern of distribution of planktonic foraminifera developing a discontinuous lamination. The secondary electron (SE) images in Figure 5Sd show the occurrence of several examples of plurilocular *Globigerina bulloides* with up to 5 chambers.

QEMSCAN mineral mapping

The imaging work conducted using a standard polished section a selected mudstone sample of the Galembó Member. SEM-based automated mineralogy analysis includes the use of both BSE and X-rays signals, in conjunction with advanced image and pattern recognition analysis to successfully provide quantitative mineralogical data. Figures 2a and 2b shows a QEMSCAN backscatter image and a mineral map, respectively, of the mudstone sample (10 μm pixel spacing), which reveal the QEMSCAN-derived host rock mineralogy, highlighting the main features of the analyzed sample. Note the pattern of distribution of fractures following the lamination structure of the rock and also the distribution of the rock-forming minerals.

The mineral map in the left part of Figure 6S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1262>, corresponds to a selected area in Figure 2b and shows the laminated fabric of the rock, where clay mineral (illite in green color) flakes display parallel alignment. Quartz (pink) and plagioclase (turquoise) occur in form of elongated grains. The larger particles within the microstructure of the La Luna Formation are planktonic foraminiferal species (*Globigerina*) as well as detrital quartz and plagioclase, whereas the fine-grained matrix is mainly composed of clay minerals (mainly illite and kaolinite, with minor chlorite) and calcite. Calcite (light purple) is also elongated although developing a lenticular character. Kaolinite (moderate brown) is observed as a replacement of foraminifera. The quantification of modal phase abundances (modal mineralogy) presented in the legend (right part of Figure 6S) represents a quantum leap in the currently employed mineralogical analysis of the analyzed mudstone sample. The lower part of Figure 6S

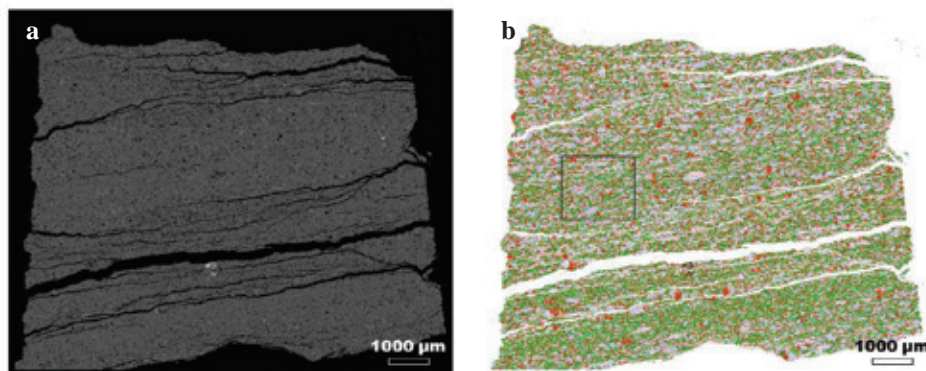


Figure 2. QEMSCAN (a) backscatter image and (b) mineral map of a mudstone sample of the Galembó Member (10 μm pixel spacing).

show the results of the modal analysis (in wt%), which reveals that the sample contains major kaolinite (24.34 wt%), illite (22.23 wt%), calcite (22.18 wt%), quartz (19.25 wt%), and minor plagioclase (4.59 wt%), apatite (2.22 wt%) and biotite (1.04 wt%). Trace amounts (< 1%) of siderite, smectite, muscovite, chlorite, epidote-group minerals, phosphates, rutile, sulfates and pyrite are also present. There is a portion of the scan that is not classified (referred to as Other). It does not mean that the elemental composition of these points is unknown, simply that there was no mineral definition in the Species Identification Protocol (SIP) that was consistent with the measured spectra.

FEG-SEM analysis

FEG-SEM analysis reveals that analyzed samples show an important porosity, with some differences. Porosity may be expressed in several types, which are described in detail

below. Figure 3 illustrates several interesting microstructural features of the Galembó Member of the La Luna Formation, particularly in fractured surfaces, such as bedding planes and crystal habits. According to Loucks, *et al.* (2012), the pores within gas mudstones can be grouped into three types: (1) mineral matrix pores between or within mineral particles; (2) pores within organic matter and (3) fracture pores that are not controlled by individual particles. However, we adopt the classification proposed by Slatt and O'Brien (2011), which includes interparticle pores produced by flocculation, organoporosity produced during burial and maturation, intraparticle pores from organisms (e.g., fecal pellets, fossil material), intraparticle pores within mineral grains, microchannels and microfractures, to describe the pore types that are present in the analyzed samples. Figure 3a shows a fractured surface looking parallel to bedding planes that does not reveal the best view of porosity. Clay

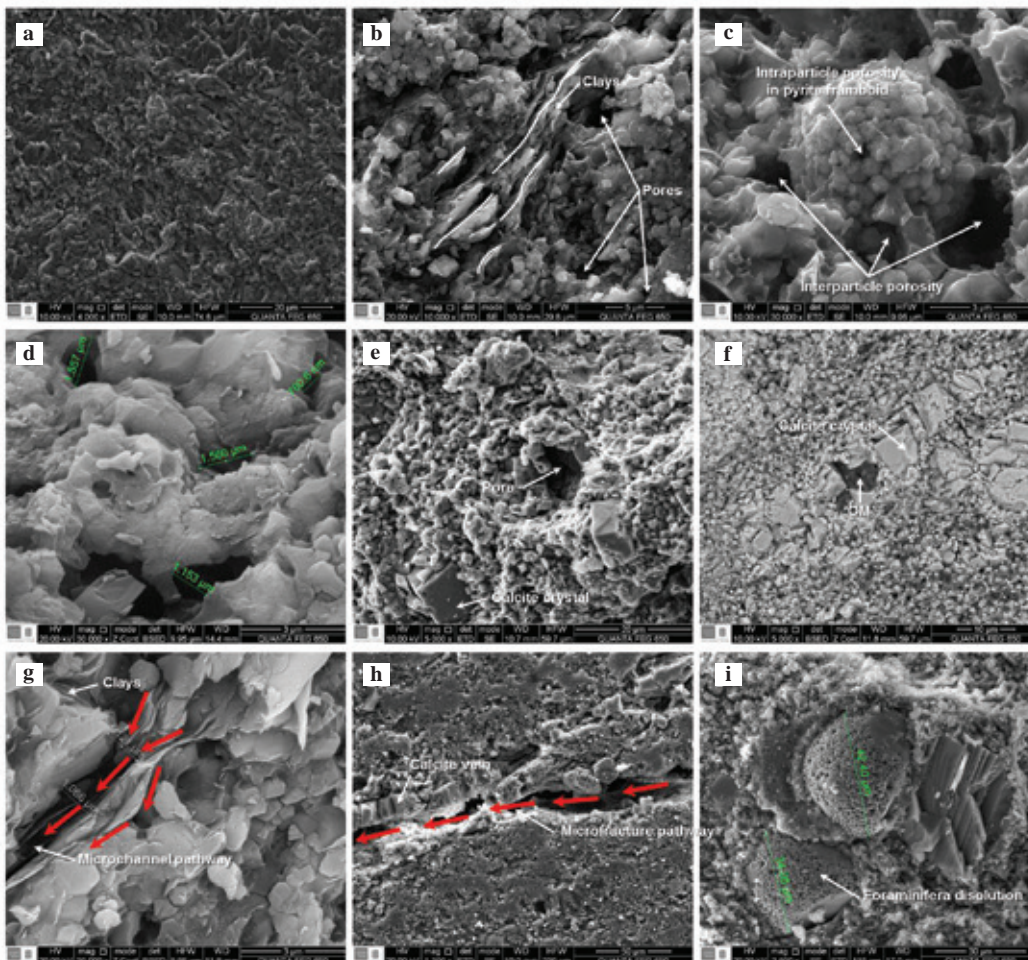


Figure 3. SEM images of fractured surface in the Galembó Member mudstones. (a) A fractured surface looking parallel to bedding planes. (b) A fractured surface looking perpendicular to bedding planes, which are easily visible. (c) Framboidal pyrite nearly invisible using secondary electrons; note the turning of clays around framboidal pyrite and porosity. (d) Fractured surface displaying several pores. (e) Fractured surface showing several crystals of calcite with a rhombohedral habit. (f) BSE image of atomic number contrast showing an organic matter-rich region. (g) Microchannels as permeability pathways. (h) Microfracture partially filled with calcite. (i) Foraminifera porosity due to carbonate dissolution.

particles are mainly present in highly fossiliferous moderate to well-laminated claystones rich in organic matter. In general, they form layers of open nano-metric flakes (Figures 3b, 9g). However, they also use to develop clay floccules, which can form a “cardhouse” structure of individual edge-face- or edge-edge-oriented flakes similar to what is reported by other authors (e.g., **O’Brien and Slatt**, 1990; **Bennett et al.**, 1991; **Slatt and O’Brien**, 2011). According to **Slatt and O’Brien** (2011). Organoporosity due to burial and thermal maturity of organic matter was first reported by **Loucks et al.** (2009), and according to **Jarvie et al.** (2007), these pores are generated during burial and maturation of organic matter. **Casadiago** (2014) reports the occurrence of organoporosity in nonlaminated to slight laminated foraminifera wackestones in two ways: (1) organic matter with a pendular morphology filling pore spaces between calcite crystals, with pores showing an elongated and angular shape, some of them interconnected; (2) laminar solid organic matter with low content of interconnected microporous space, with isolated pores, which according to **Loucks, et al.** (2012) can be associated to immature organic matter. The Galemba Member mudstones usually contain framboidal pyrite, which are composed of several small pyrite crystals between which intraparticle pores occur (Figure 3c). Organisms may produce intraparticle porosity by bioturbation of sediments, by generation of fecal pellets, and by the porous nature of their skeletons or shells (**Slatt and O’Brien**, 2011). These rocks contain abundant planktonic foraminiferal species, and rests of echinoderms spicules, broken gastropods and bivalves and fish bones and teeth. Figure 3d shows a fractured surface displaying interparticle pores between mineral grains, some of them interconnected and distributed along bedding planes (Figures 3b, 3d), developing permeability pathways for gas fluid (Figure 3g) as suggested by **Slatt, et al.** (2012). A fractured surface is also very useful to observe crystals or grains (Figure 3e). Figure 3f illustrates a BSE image of atomic number contrast showing a small organic matter-rich region within a calcite vein. They also can show several examples of microchannels, which occur within the mudstone matrix (Figure 3g). These microchannels, if abundant, they could provide significant permeability pathways, in addition to microporosity (**Slatt and O’Brien**, 2011). They show a sinuous and discontinuous shape and are following the stratification plane. According to **Slatt and O’Brien** (2011), the microchannels cannot be interpreted as artifacts produced by pressure release when fracturing the sample during handling and preparation, but represent original microchannel openings preserved in the undisturbed shale matrix. Microchannels are of millimeter scale in width, which is wide enough to provide a permeability passage for gas flow. On the other hand, microchannels also occur at the boundary between rigid bioclasts and mudstone matrix. Microfractures (Figure 3h) in mudstones occur at a variety of scales (e.g., **Gale and Holder**, 2010; **Slatt, et**

al., 2012) and are significant in any fabric investigation of mudstone properties, particularly those related to artificial fracture treatment (**Slatt and O’Brien**, 2011). In the Galemba Member mudstones, microfractures of may be filled with organic matter or partially open. Nonlaminated to slight laminated foraminifera wackestones shows few microfractures filled with calcite (<1%), possibly due to its high carbonate content (80-96%). The porosity is mainly associated to foraminiferal dissolution (Figure 3i).

However, fractured surfaces of mudstones hide the nature of pores. Ar-ion-milled surfaces can show us pore morphology, taking into account that ion milling removes polishing artifacts and gives us a very low relief surfaces. Figure 7S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1263>, Figure 4 and Figure 8S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1264>, illustrates examples of ion milled surfaces of the Galemba Member mudstones. The mineral matrix pores are mainly developed between and within calcite crystals, quartz grains, clay minerals and pyrite framboids. The organic matter usually contains pores of several shapes and sizes (micro-meter to nano-meter scale), which are sometimes connected by narrow throats. Microfractures can be observed particularly in the boundary between foraminifera and calcite matrix or in the brittle quartz- and calcite-rich matrix. However, they can be attributed to shrinking of clay minerals and/or decompression effect after the retrieval from subsurface (**Chalmers et al.**, 2012). Although FEG-SEM imaging provide a very useful qualitative information on the pore types in mudstones (e.g., **Loucks et al.**, 2009; **Slatt and O’Brien**, 2011; **Slatt, et al.**, 2012; **Curtis et al.**, 2012a, 2012b; **Milliken et al.**, 2013), the total porosity, which includes fluids associated with mudstones, is usually calculated by the difference between the bulk and grain densities (**Chalmers et al.**, 2012).

We illustrated several examples of a variety of pore types that are present in the La Luna Formation, using the classification proposed by **Slatt and O’Brien** (2011). The pores observed in the analyzed samples are enough not only to store hydrocarbon molecules but also to promote their flow through pathways. Porosity is associated to flocculation of clays probably with greatest potential, along with microfractures and organoporosity, to provide storage places as well as permeability pathways for migration of hydrocarbons. **Torres et al.** (2015) report in these rocks clay floccules and interparticle porosity, globigerina shell replacement with calcite and microchannel porosity in these rocks. The porosity obtained by depositional and diagenetic processes are influenced by several factors, such as compaction, cementation and dissolution of minerals. Claystones can show greater compaction and deformation, where it is possible to distinguish the deformation around bioclasts and discontinuous laminations of organic matter. Samples with high content of carbonates and phosphates

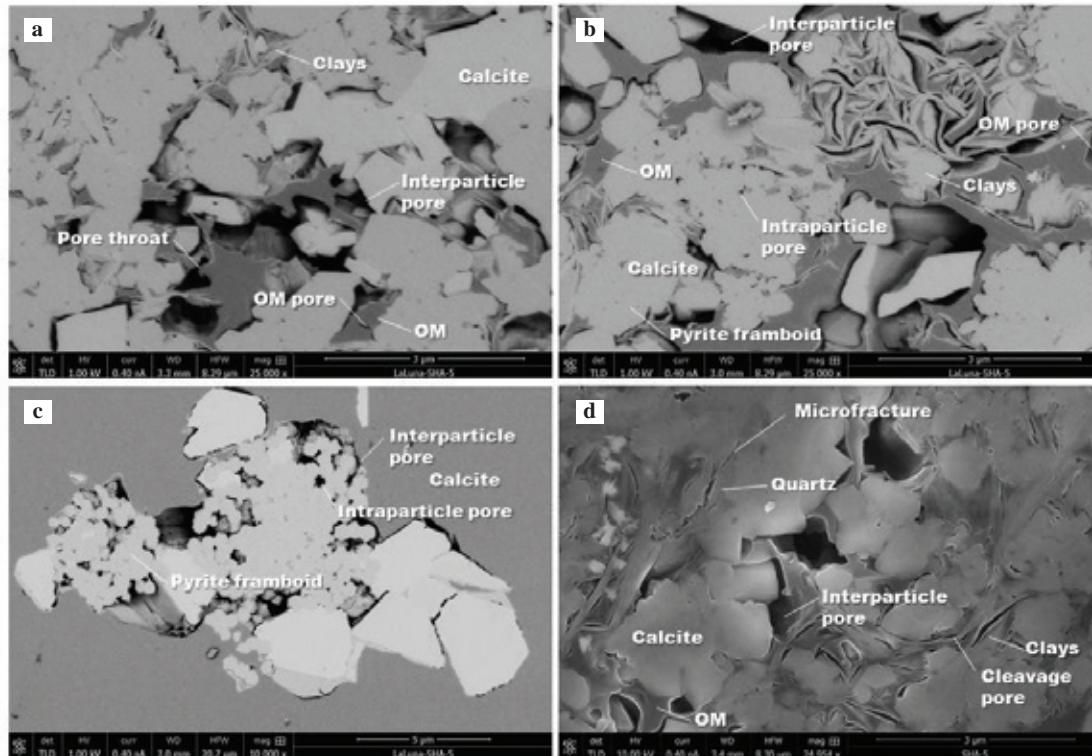


Figure 4. Porosity in ion milled surfaces of the Galembó Member mudstones.

have little compaction and moldic porosity (3%). Samples with high content of pyrite and quartz do not show dissolution and show very low compaction. Samples with the highest quartz content (> 40%) present fractures perpendicular to lamination, which are filled with organic matter or carbonates.

Discussion on microstructures and pores

According to Casadiego (2014), most of the Galembó Member rocks have T_{max} values ranging from 439 to 448 °C and Production Index (PI) values ranging from 0.02 to 0.1, indicating that these rocks are in the oil window, although with a low PI. He also reported high values of S_1 and PI, suggesting that the primary oil migration occurred in the upper part of the Galembó Member and coincides with a T_{max} indicating a low thermal maturity. Figure 9S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1265>, shows a Van Krevelan diagram, displaying the relationship between HI (mg HC/g TOC) vs. OI (mg CO_2 /g TOC), where the plotted data provides a very useful information on kerogen type. All the samples are relatively clay-poor, ranging from 6 to 27 wt%, and no apparent trend between TOC values and the total clay contents was observed. Pyrolysis Rock Eval data indicate that rocks of the Galembó Member contain a kerogen of type III, with foraminifera wackstones and siliceous and fossiliferous claystones showing lower and higher thermal maturity compared with highly fossiliferous claystone rich in organic matter.

At a low maturity phase (during deposition and shallow- to intermediate-burial), interparticle and intraparticle pores developed in the Galembó Member mudstones, whereas at a high maturity phase (during deep-burial and hydrocarbon-generation window), organic-matter pores are highly developed as suggested by Loucks *et al.* (2012). Organic porosity is mainly important in the gas generation window, thus limiting their importance mainly to storage of gas. Several studies have been performed on the role of the organic porosity (nature and distribution of pores in organic matter) and adsorption mechanisms of the gas storage in these shale and more precisely within the kerogen itself (e.g., Jarvie *et al.*, 2007; Ross and Bustin, 2009; Loucks *et al.*, 2009; Bernard *et al.*, 2011; Slatt and O'Brien, 2011; Curtis *et al.*, 2012a; Chalmers *et al.*, 2012; Loucks *et al.*, 2012). On the other hand, several parameters influence the hydrocarbon retention mechanisms, which include the relative solubility of petroleum compounds in kerogen (e.g., Ritter, 2003), solubility of light hydrocarbons in the gas phase (e.g., Meulbroek *et al.*, 1998) or in the water phase (e.g., Lafargue and Barker, 1988). Furthermore, gas adsorption can occur on mineral surfaces (e.g., Brothers *et al.*, 1991) as well as in organic matter (e.g., Ritter, 2003). Furthermore, gas adsorption can occur on mineral surfaces (e.g., Brothers *et al.*, 1991) as well as in organic matter (e.g., Ritter and Grover, 2005). Recently, it has been shown that organic matter can develop micro-meter to nano-meter scale porosity during its maturity evolution (e.g.,

Vermlyen, 2011; Bernard *et al.*, 2011; Curtis *et al.*, 2012a; Chalmers *et al.*, 2012; Loucks *et al.*, 2012). Curtis *et al.* (2012b) have demonstrated the change in porosity with increasing thermal maturity. According to them, the occurrence of non-uniform porosity in the organic matter suggests that something in addition to thermal maturity (e.g., type of organic matter) is controlling organic pore formation. We have observed in the La Luna Formation shales that not all organic matter regions show the same porosity at specific thermal maturity conditions, which confirms that other factors, such as organic matter type, complicate pore system development, and, therefore, thermal maturity alone is insufficient to predict porosity development in shales. On the other hand, La Luna Formation shales can show oil window samples without porosity in the organic matter (Figure 4 and figures 7S and 8S), which indicates that it is necessary to look for storage areas in the inorganic mineral phases (clays, quartz, calcite and pyrite) in the matrix. The pore morphology resulting from hydrocarbon generation can be mostly circular and elliptical (Yao *et al.*, 2011), which we have not defined in this study, taking into account that the morphology can change under the influence of several factors, in addition to thermal maturity (Jiao *et al.*, 2014). According to them, larger pores tend to have more complex cross-sections due to two reasons: (1) larger pores are commonly the result of a few smaller pores combining, which promotes the development of irregular cross-sections, and (2) larger pores are influenced by stress more easily than small pores, which tend to preserve their original shape. Therefore, taking into account the thermal maturity reached by the La Luna Formation, organic matter pores most likely resulted from the generation of hydrocarbons (Chalmers, *et al.*, 2012; Loucks, *et al.*, 2012). La Luna Formation presents a good potential for a shale-gas system, taking into account its high content of organic matter. According to geochemical data (e.g., Torres, 2013; Casadiego, 2014), it has reached maturity levels for hydrocarbon generation and has relatively high porosity for oil and/or gas storage. Torres (2013) attributes differences due to dramatic changes in maturity, from an oil window to a deep dry gas window. The evolution of the pore structure of the Galemba Member mudstones can be discussed by differentiating interparticle pores due to flocculation of clay minerals, organoporosity due to burial and thermal maturity of organic matter, intraparticle pores from organisms, intraparticle pores within mineral grains, and microchannels and microfractures, which is very useful to relate the porosity evolution to diagenesis. Interparticle pores usually are aligned along the boundaries of inorganic (quartz grains, calcite crystals and platelets of clay minerals) or organic particles, and dispersed within the mudstone matrix. They commonly have slit- or irregular shaped morphology and are larger than organic-matter pores. Bernard, *et al.* (2013) consider that they are highly sensitive to burial, with pores displaying an elongated spheroidal shape within immature mudstones, pronounced ellipsoidal

shape within mature mudstones, and almost totally closed in overmature shales. The evolution of this type of porosity can be related to compaction and cementation during burial, which cause interparticle pores to collapse (e.g., Milliken and Reed, 2010). Intraparticle pores in immature mudstones are observed within mineral grain boundaries and are generally polyhedral with straight margins and mostly associated with carbonate shells of microfossils, and with increasing maturity, they are progressively filled by diagenetic carbonate cements (Bernard, *et al.*, 2013). According to Bernard, *et al.* (2013), the number and size of intraparticle pores associated with framboidal pyrite increase with increasing maturity. On the other hand, most of these pores are filled with bitumen in overmature samples, indicating that they were once sufficiently interconnected to allow for bitumen to migrate (Bernard, *et al.*, 2013). We report also the occurrence of organic matter and/or clay minerals in pyrite framboids within the Galemba Member mudstones, which is indicative of anaerobic sulfur diagenesis (Slatt, *et al.*, 2012). On the other hand, this type of pores is also observed within calcite and clay minerals (cleavage pores), which can be related to organic matter thermal degradation by decarboxylation (Bernard, *et al.*, 2013). According to Moore (1997), this process has likely produced organic acids that partially dissolved calcite and clay minerals. Therefore, intraparticle pores are more sensitive to chemical diagenesis than to mechanical diagenesis compared with interparticle pores (Bernard, *et al.*, 2013). Organoporosity is not the most abundant pore type. However, it looks similar to what is reported in several studies from North America (e.g., Slatt and O'Brien, 1990, 2011; Bennett, *et al.*, 1991; Loucks, *et al.*, 2009; Curtis *et al.*, 2012a; Loucks, *et al.*, 2012), which leads the world in production of shale-gas. This type of porosity was probably developed during thermal maturity. According to Loucks, *et al.* (2009), the organoporosity is most likely a result of the exsolution of hydrocarbon gas during the thermal cracking of retained oil. Microfractures are usually related to quartz grains or calcite crystals. It is common to observe organic matter within microfractures filled with calcite. Microfracturing, which is a process resulting from increased fluid pressure, represents a primary mechanism for the circulation of fluids from deep basins where thick abnormally pressured sedimentary sections are present, which would be enhanced by clay diagenesis since H₂O supplied from smectite would cause the process to continue for longer periods of time and to extend to greater depths than could be attained if only remnants of the original pore H₂O were present in the section (Bruce, 1982). On the other hand, diagenetic H₂O present within microfractures could also act as a vehicle for primary hydrocarbon migration. Low porosity and permeability mudstones, rich in organic matter, with sufficient fractures or a significant fracture systems formed by microfractures and nano-pores/fissures (e.g., Curtis, 2002a; Warlick, 2006) may be an effective natural gas reservoir

(Sun, *et al.*, 2008). During diagenesis the transformation of smectite to illite occurred in the Galembó Member mudstones, which was accompanied by the expulsion of H₂O molecules from smectite to the pore system. H₂O may migrate out of the shale early or may be totally or partly trapped and released slowly through time (Bruce, 1982). The illitization of smectite is active in deeply buried sedimentary sequences (e.g., Bjorlykke, 2013). However, shallow, early growth of diagenetic phases has also been reported (e.g., Lash and Blood, 2004), and, therefore, their precipitation is considered an important factor in textural alteration and associated porosity and permeability reduction. According to Torres (2013), the deposition of organic carbon rich intervals of the La Luna Formation in the MMVB was governed by the development of paleobathymetric barriers, which enhanced the development of anoxia in the Cretaceous sea by causing poor circulation and limited ventilation, and also by high evaporation and low precipitation rates (high salinity bottom water) and high levels of marine algal productivity (high organic matter flux). From microstructural observation, it can be inferred that the post-depositional and diagenetic history of the La Luna Formation included episodes of calcite cementation, pyritization of organic matter and illitization of smectite. Calcite dissolution is also visible in the partially dissolved shells of foraminifera as well as precipitation of clay (kaolinite) in these shells. Quartz cementation was also part of the diagenetic history and may attribute to the transformation of smectite to illite, which is known to release not only H₂O but also SiO₂ under particular physicochemical conditions (Boles and Franks, 1979). Flocculation at the bottom of the sea usually produces a random particle distribution of clay minerals, which suggests that the strong particle alignment observed in the Galembó Member mudstones is the result of a mechanical rotation of the clay minerals during burial due to increasing overburden stress and possibly chemical transformation of the clay minerals. Previous studies suggested that to achieve a significant illite preferred orientation, reactions of diagenetic clays, such as the illitization of smectite, may be critical and produce abrupt increases in fabric intensity with depth (e.g., Ho, *et al.*, 1999; Day-Stirrat, *et al.*, 2008). The microstructure of the Galembó Member mudstones, itself a result of the original deposition environment and subsequent diagenesis, exerts a primary control on their physical properties; there is a good correlation between the degree of alignment of illite and the elastic anisotropy of the rock, as well as between the mineralogy and the strength and stiffness of the rock (Delle Piane, *et al.*, 2015), which is summarized in Figure 10S, <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/downloadSuppFile/243/1266>.

Gas reservoirs, such as the Galembó Member mudstones, are characterized of an organic-rich deposition with extremely low matrix permeability and clusters of mineral-filled

“natural” microfractures (Guo, *et al.*, 2013). According to Loucks, *et al.* (2009), shale-gas strata are composed of micro and nanopores, with the majority being nanopores. According to Guo, *et al.* (2013), these facts emphasize the importance of studying how gas flows in nanopores, which will be critical for shale-gas simulation and effective commercial production. Figure 5 illustrates an example on how gas distribution in the Galembó Member mudstones from macro-meter to micro-meter scale is. According to Chen, *et al.* (2011), the sorption capacity of a shale-gas reservoir increases with depth. On the other hand, previous works (e.g., Ross and Bustin, 2007; Chen, *et al.*, 2011) reveal that the organic matter was in part responsible for gas adsorption. There is no doubt that pore networks in the Galembó Member mudstones show an evolution during diagenesis and catagenesis. Recent studies (e.g., Loucks, *et al.*, 2009, 2012) reveal that organic porosity is visible at high thermal maturity level, which suggests that the organic porosity formation is probably not affected by compaction (Romero-Sarmiento, *et al.*, 2013). We consider that the porosity increases with the burial depth, which can affect the rocks in several aspects, taking into account changes in the pressure and temperature conditions and maturity during diagenesis. Romero-Sarmiento, *et al.* (2013) suppose that most of the overburden sediment pressure is grain supported (or compensated by the overpressures present in the formation) at the onset of the kerogen maturation, preserving the organic material from compression. In addition, there is probably, parallel to the kerogen, diagenetic evolution of the rock matrix which leads to cementation (quartz or carbonate formation) and then increases the mechanical resistance of the source rock to compaction (Mondol, *et al.*, 2007). At the beginning of the diagenesis, the La Luna Formation shales did show very low porosity, but with increasing depth and progression of diagenetic process, which include compaction, cementation and dissolution of minerals, porosity increased particularly associated to organic matter and gas can be easily injected in the pores. On the other hand, microfractures progressive develop along the contact between foraminifera and clays by difference in mechanical strength. Modica and Lapierre (2012) suggested that pores in organic matter do not compact because of their nono-metric scale. Therefore, Romero-Sarmiento, *et al.* (2013) assumed that organic matter porosity is mainly controlled by mass balances of the kerogen transformation. We observe clear differences due to dramatic changes in maturity, from an oil window to a deep dry gas window. In our case, gas retention can be associated to organic matter content, however, it is suggested to perform a detailed study to estimate the distribution.

Numerous studies have been developed on adsorption processes (e.g., Lu, *et al.*, 1995; Montgomery, *et al.*, 2005; Weniger, *et al.*, 2010). According to Romero-Sarmiento, *et al.* (2013), CH₄ adsorption takes place because of the surface reactivity of the carbon present in the solid organic matter

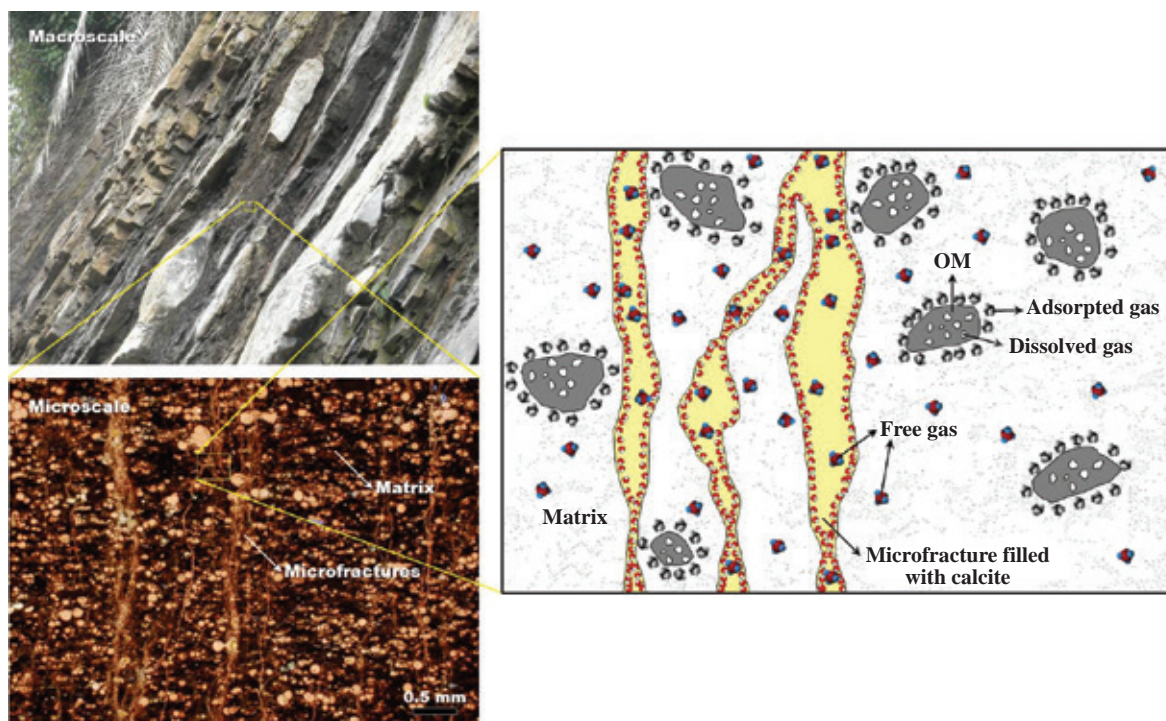


Figure 5. Conceptual model of gas distribution in the Galembó Member mudstones from macro-meter to micro-meter scale (adapted and modified from Guo, *et al.*, 2013).

within source rocks, which is therefore responsible for gas retention. However, it is necessary to take into account the effects of overpressure as well as the sorption competition between different gases, such as CH_4 , ethane, propane and CO_2 , and their impacts on CH_4 retention capacities in source rocks. Several authors (e.g., Zumberge, *et al.*, 2012) proposed that the gases produced from shales are derived from both primary kerogen cracking and secondary cracking of non-migrated hydrocarbons. However, a good understanding of both generation and retention mechanisms is absolutely necessary to estimate the amount of adsorbed and free gas within these complex source-rock systems (Romero-Sarmiento, *et al.*, 2013). Regarding expulsion efficiency and its effect on adsorption, it is probable that gas is first adsorbed on organics considering their closed reactive surface. Then, the remaining free gas (exceeding the adsorption capacity of the organic matter) only can move out of the source rock. However, we consider that in the pore system (including microfractures) not only free gas exist but also H_2O , which should be the transport agent for gas (CH_4) flow as shown in Figure 6. In the matrix free gas and adsorption gas co-exist, however, as suggested above, the role of H_2O during fluid flow should be also considered. Fluid flow in mudstones of a shale-gas system consists of two-phase (gas and H_2O) mechanism, which includes transport in extremely low permeability and high porosity media. The presence of hydrocarbons at different maturity levels within the pore system is also

characteristic. Therefore, consideration of hydrocarbon content and its maturation history should be very helpful in accurately modeling of fluid flow in mudstones.

Conclusions

In this work, we illustrate several examples of the pore types that are present in the Galembó Member of the La Luna Formation sedimentary rocks at the MMVB. Porosity is associated to interparticle and intraparticle (framboidal pyrite and cleavage pores within clay minerals) pores, organopores, microchannels and microfractures. Microchannels provide significant permeability pathways for gas flow. However, porosity due to connectivity of pores has perhaps the greatest potential, along with microfractures, to provide not only storage places of hydrocarbon molecules but also permeability pathways for their migration. The integration of several methods, including stereomicroscopy of hand-sample specimens, petrography of thin sections, SEM/EDS analysis, QEMSCAN mineral mapping, and FEG SEM analysis, was very useful for the characterization of pore types in the analyzed samples. The mineralogy of the Galembó Member mudstones has important effects on the storage of gas. We have identified at the bottom of the studied stratigraphic sequence, siliceous and fossiliferous claystones with higher quartz content of more than 65%, which represent appropriate geologic horizon for the exploration and development of shale-gas systems. The porosity increases with the burial depth. According to Chen,

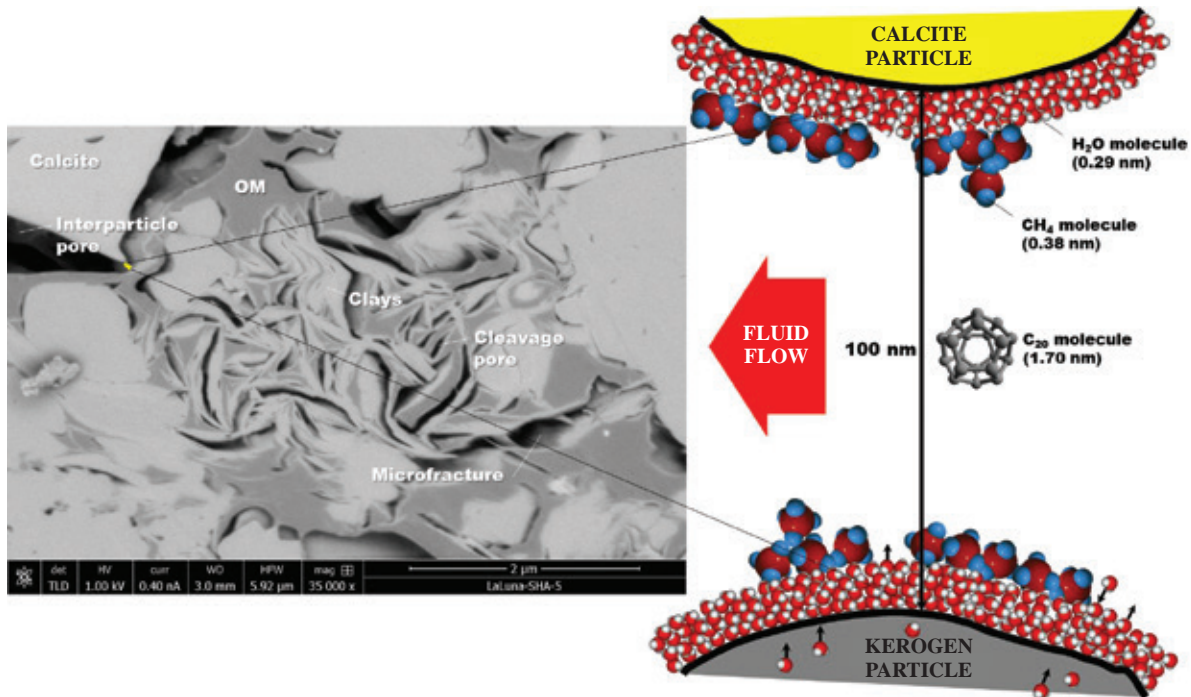


Figure 6. Conceptual model of flow mechanism along the pore system of the Galembó Member mudstones (adapted and modified from Williams, 2012).

et al. (2011), the porosity has a significant positive correlation with the brittle mineral content and a significant negative correlation with the clay mineral content. Casadiego (2014) reports a similar trend in the study area. We have followed a workflow, integrating data, to carry out a characterization of a shale gas (unconventional) reservoir, such as the Galembó Member mudstones of the La Luna Formation, which can

be applied in several sectors to produce an assessment of the potential in an area of interest that can reveal its characteristic vertical and lateral heterogeneity. However, it should be interesting to perform a more accurate and detailed study of this geological unit in order to provide evidences on its post-depositional diagenetic history and to develop a true integral evaluation of mudstones in shale-gas systems.

Información suplementaria

Figure 1S. Main mineral list used for mineral maps and quantification.

Figure 2S. Left, generalized stratigraphic column of the Cretaceous sequence at the MMVB (modified after Reyes, *et al.*, 2000; Barrero, *et al.*, 2007). Right, generalized stratigraphic column of the Upper Coniacian and probably Santonian Galembó Member of the La Luna Formation after Casadiego (2014).

Figure 3S. Photographs at outcrop scale of the occurrence of sedimentary rocks of the Galembó Member. (a) Well-laminated organic-rich claystone with carbonate concretions. (b) Carbonate concretions in organic-rich claystones; several broken concretions reveal the presence of rare fish bones and teeth (c) and common ammonites (d). (e) A typical outcrop of phosphoric rock.

Figure 4S. Microstructural and textural features of the Galembó Member mudstones, highlighting their sample heterogeneity and how black organic matter layers are aligned to give the rock a strong anisotropy.

Figure 5S. Microstructural and textural features of a typical mudstone of the Galembó Member, which contains numerous planktonic foraminifera.

Figure 6S. Left, QEMSCAN mineral map (0.7 μm pixel spacing) of the selected area in Figure 2b. Right, legend indicating the recognized mineral phases. Below, the calculated modal abundances in wt%.

Figure 7S. Porosity in ion milled surfaces of the Galembó Member mudstones.

Figure 8S. Organoporosity in nonlaminated to slight laminated foraminifera wackestones of the Galembó Member.

Figure 9S. Relationship between HI (mg HC/g TOC) vs. OI (mg CO₂/g TOC) of the Galembó Member mudstones (adapted and modified after Van Krevelan, 1950).

Figure 10S. Conceptual model summarizing the post depositional evolution of the Galembó Member mudstones (adapted and modified from Delle Piane, *et al.*, 2015).

Acknowledgments

This work formed part of the MSc Thesis carried out by E. Casadiego at the School of Geology of the Universidad Industrial de Santander. The authors thank to the Universidad Industrial de Santander for allowing us the use of its research facilities at the Guatiguará Technological Park: the Laboratory of Transmitted Light Microscopy of the Research Group in Basic and Applied Geology attached to the School of Geology, and the Laboratory of Microscopy attached to the Vicerrectoría de Investigación y Extensión and their professional staff for assistance with SEM data acquisition and analyses. We are indebted to D. Lattanzi, L. Salazar and P. Jaime from the FEI's Center of Excellence for Natural Resources in Brisbane (Australia) and to M. Curtis, J. Jernigen and Ch. Rai from the FEI-OU Pore Scale Characterization Laboratory of the Mewbourne School of Petroleum and Geological Engineering, University of Oklahoma (USA) for contributing us with the data acquisition by QEMSCAN technology and iDiscover™ off-line image analysis software, and ion milling for FESEM analysis imaging and analysis, respectively. The authors also acknowledge to the anonymous referees for their critical and insightful reading of the manuscript. We are most grateful to the above-named people and institutions for support.

Conflict of interest

The author declares that he has no conflict of interest.

References

- Allen R.B., Alfonso, C.A., Resselar, R., Salazar, A., Ballesteros, I., Cardozo, E., Laverde, F., Ramirez, C., Moreno, J.M., Rubiano, J. & Sarmiento, L.** (1993). The Cretaceous stratigraphy of the Western Cordillera Oriental, Colombia. University of South Carolina, Columbia, South Carolina, United States. *AAPG Bulletin* **02**, 77(2).
- ANH**, 2008. Colombian Sedimentary Basins: Nomenclature, boundaries and petroleum geology, a new proposal, 92p.
- Aguilera, R.C., Sotelo, V.A., Burgos, C.A., Arce, C., Gómez, C., Mojica, J., Castillo, H., Jiménez, D. & Osorno, J.** (2009). Organic Geochemistry Atlas of Colombia: An Exploration Tool for Mature and Frontier Basins. *Earth Sciences Research Journal* **13**, Special Edition 1-174.
- Ballesteros, C.A. & Parra, J.A.** (2012). Estudio estratigráfico secuencial para la Formación La Luna en el costado oriental de la Cueva del Valle Medio del Magdalena: Una visión exploratoria de hidrocarburos no convencionales. Tesis de Pregrado. Universidad Industrial de Santander.
- Barrero, D., Pardo, A., Vargas, C. & Martínez, J.** (2007). Colombian Sedimentary Basins: Nomenclature, Boundaries and Petroleum Geology. ANH and B&M Exploration Ltda 26-45.
- Bennett, R.H., O'Brien, N.R. & Hulbert, M.H.** (1991). Determinants of clay and shale microfabric signatures: processes and mechanisms, in *Microstructure of Fine Grained Sediments: From Mud to Shale*: Springer-Verlag, New York, p. 5-32.
- Bernal, L.A.** (2009). Caracterización estratigráfica y petrográfica de la Formación La Luna en el Sector de El Tablazo, Valle Medio Del Magdalena. 10th Simposio Bolivariano - Exploración Petrolera en las Cuencas Subandinas. Session: Aprendiendo del Pasado - Mirando Hacia El Futuro. ACGGP.
- Bernard, S., Wirth, R., Schreiber, A., Bowen, L., Aplin, A.C., Mathia, E.J., Schulz, H.M. & Horsfield, B.** (2013). FIB-SEM and TEM investigations of an organic-rich shale maturation series from the lower Toarcian Posidonia Shale, Germany: Nanoscale pore system and fluid-rock interactions. In: Camp, W., Diaz, E., Wawak, B. (Eds.), *Electron Microscopy of Shale Hydrocarbon Reservoirs*. AAPG Memoir **102**: 53-66.
- Bjorlykke, K.** (2013). *Petroleum Geoscience from Sedimentary Environments to Rock Physics*. Springer, p. 508.
- Boles, J.R. & Franks, S.G.** (1979). Clay diagenesis in Wilcox sandstones of southwest Texas: Implications of smectite diagenesis on sandstone cementation. *Journal of Sedimentary Petrology* **49**: 55-70.
- Brothers, L., Engel, M.H. & Krooss, B.M.** (1991). The effects of fluid flow through porous media on the distribution of organic compounds in a synthetic crude oil. *Organic Geochemistry* **17**: 11-24.
- Bruce, C.H.** (1982). Relation of Illite/Smectite Diagenesis and Development of Structure in the Northern Gulf of Mexico Basin. Abstract, AAPG Bulletin **66** (9), pp.1443.
- Casadiego, E.** (2014). Caracterización de reservorios de gas shale integrando datos multiescala: Caso estudio Miembro Galembo, Sección Aguablanca, Cuenca del Valle Medio del Magdalena. Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander, Colombia.
- Chalmers, G.R.L., Bustin, R.M. & Power, I.M.** (2012). Characterization of gas shale pore systems by porosimetry, pycnometry, surface area, and field emission scanning electron microscopy/transmission electron microscopy image analyses: examples from the Barnett, Woodford, Haynesville, Marcellus, and Doig units. *AAPG Bulletin* **96** (6): 1099-1119.
- Chen, Sh., Zhu, Y., Wang, H., Liu, H., Wei, W. & Fang, J.** (2011). Shale gas reservoir characterisation: A typical case in the southern Sichuan Basin of China. *Energy* **36**: 6609-6616.
- Curtis, J.B.** (2002). Fractured shale-gas systems. *AAPG Bulletin*, **86** (11): 1921-1938.
- Curtis, M.E., Ambrose, R.J., Sondergeld, C.H. & Rai, Ch.S.** (2012a). Microstructural investigation of gas shales in two and three dimensions using nanometer-scale resolution imaging. *AAPG Bulletin* **96** (4): 665-677.
- Curtis, M.E., Cardott, B.J., Sondergeld, C.H. & Rai, Ch.S.** (2012b). Development of organic porosity in the Woodford Shale with increasing thermal maturity. *International Journal of Coal Geology* **103**: 26-31.
- Day-Stirrat, R., Aplin, A., Śródoń, J. & Van der Pluijm, B.** (2008). Diagenetic reorientation of phyllosilicate minerals in Paleogene mudstones of the Podhale Basin, southern Poland. *Clays and Clay Minerals* **56**: 100-111.

- Delle Piane, C., Almqvist, B.S.G., MacRae, C.M., Torpy, A., Mory, A.J. & Dewhurst, D.N.** (2015). Texture and diagenesis of Ordovician shale from the Canning Basin, Western Australia: Implications for elastic anisotropy and geomechanical properties. *Marine and Petroleum Geology* **59**: 56-71.
- Gale, J.F.W. & Holder, J.** (2010). Natural fractures in some U.S. shales and their importance for gas production. Geological Society, London, Petroleum Geology Conference Series **7**: 1131-1140.
- Garner, A.H.** (1926). Suggested nomenclature and correlation of the geological formations in Venezuela. American Institute of Mining and Metallurgy Engineers Transactions **1**: 677-684.
- Guo, Ch., Bai, B., Wei, M., He, X. & Wu, Y.-S.** (2013). Study on Gas Permeability in Nano Pores of Shale Gas Reservoirs. Colorado School of Mines SPE 167179 (1-11).
- Hedberg, H.D. & Sass, L.C.** (1937). Sinopsis de las formaciones geológicas de la parte occidental de la Cuenca de Maracaibo, Venezuela. Servicio Técnico de Geología y Minería, Caracas, Boletín de Geología y Mineralogía (Venezuela) **2-4**: 83-84.
- Hill, R.J., Zhang, E., Katz, B.J. & Tang, Y.** (2007). Modeling of gas generation from the Barnett shale, Fort Worth Basin, Texas. AAPG Bulletin **91** (4): 501-521.
- Ho, N., Peacor, D. & Van der Pluijm, B.** (1999). Preferred orientation of phyllosilicates in Gulf Coast mudstones and relation to the smectite-illite transition. *Clays and Clay Minerals* **47**: 495-504.
- Hubach, E.** (1957). Estratigrafía de la Sabana de Bogotá y alrededores. Instituto Geológico Nacional, Boletín Geológico **5** (2): 93-112.
- Jarvie, D., Hill, R.J., Ruble, T.E. & Pollastro, R.M.** (2007). Unconventional shale-gas systems: The Mississippian Barnett Shale of north-central Texas as one model for thermogenic shale-gas assessment. AAPG Bulletin **91** (4): 475-499.
- Jensen, L.A., Sanchez-Ferrer, F., Pliego-Vidal, E., Goudy, C. & Kertzus, V.** (2013). Unconventional exploration potential of the Colombian basins: Perspectives from regional geology and structural evolution. AAPG International Conference (Cartagena, Colombia, 9/8-11/2013). Abstracts.
- Jiao, K., Yao, S., Liua, Ch., Gao, Y., Wua, H., Li, M. & Tang, Z.** (2014). The characterization and quantitative analysis of nanopores in unconventional gas reservoirs utilizing FESEM-FIB and image processing: An example from the lower Silurian Longmaxi Shale, upper Yangtze region, China. *International Journal of Coal Geology* **128-129**: 1-11.
- Josh, M., Esteban, L., Delle Piane, C., Sarout, J., Dewhurst, D.N. & Clennell M.B.** (2012). Laboratory characterisation of shale properties. *Journal of Petroleum Science and Engineering* **88-89**: 107-124.
- Kingston, D., Dishroon, C. & Williams, P.** (1983). Global basin classification system: AAPG Bulletin **67** (12): 2175-2213.
- Lafargue, E. & Barker, C.** (1988). Effect of water washing on crude oil compositions. AAPG Bulletin **72** (3): 263-276.
- Lash, G.G. & Blood, D.** (2004). Geochemical and textural evidence for Early (shallow) diagenetic growth of stratigraphically confined carbonate concretions, Upper Devonian Rhinestreet black shale, western New York. *Chemical Geology* **206** (3-4): 407-424.
- Lee, D., Herman, J.D., Elsworth, D., Kim, H.T. & Lee, H.S.** (2011). A critical evaluation of unconventional gas recovery from the Marcellus Shale, Northeastern United States. *KSCE Journal of Civil Engineering* **15** (4): 679-687.
- Loucks, R.G., Reed, R.M., Ruppel, S.C. & Jarvie, D.M.** (2009). Morphology, genesis, and distribution of nanometer-scale pores in siliceous mudstones of the Mississippian Barnett Shale. *Journal of Sedimentary Research* **79**: 848-861.
- Loucks, R.G., Reed, R.M., Ruppel, S.C. & Hammes, U.** (2012). Spectrum of pore types and networks in mudrocks and a descriptive classification for matrix-related mudrock pores. AAPG Bulletin **96** (6): 1071-1098.
- Lu, X.-C., Li, F.-C. & Watson, A.T.** (1995). Adsorption measurements in Devonian shales. *Fuel* **74**: 599-603.
- Meulbroek, P., Cathles, L.M. & Whelan, J.** (1998). Phase fractionation in South Eugene Island Block 330. *Organic Geochemistry* **29**: 223-239.
- Milliken, K.L. & Reed, R.M.** (2010). Multiple causes of diagenetic fabric anisotropy in weakly consolidated mud, Nankai Accretionary Prism, IODP Expedition 316: *Journal of Structural Geology* **32**: 1887-1898.
- Milliken, K.L., Rudnicki, M., Awwiller, D.N. & Zhang, T.** (2013). Organic matter-hosted pore system, Marcellus Formation (Devonian), Pennsylvania. AAPG Bulletin **97** (2): 177-200.
- Modica, C.J. & Lapierre, S.G.** (2012). Estimation of kerogen porosity in source rocks as a function of thermal transformation: example from the Mowry Shale in the Powder River Basin of Wyoming. AAPG Bulletin **96** (1): 87-108.
- Mondol, N.H., Bjorlykke, K., Jahren, J. & Hoeg, K.** (2007). Experimental mechanical compaction of clay mineral aggregates e changes in physical properties of mudstones during burial. *Marine and Petroleum Geology* **24**: 289-311.
- Montgomery, S.** (1992). Petroleum potential of Upper and Middle Magdalena basins, Colombia. *Petroleum Frontiers* **9** (3), 67p.
- Montgomery, S.L., Jarvie, D.M., Bowker, K.A. & Pollastro, R.M.** (2005). Mississippian Barnett Shale, FortWorth Basin, north-central Texas: gas-shale play with multitrillion cubic foot potential. AAPG Bulletin **89** (2): 155-175.
- Moore, C.H.** (1997). Carbonate diagenesis and porosity. *Developments in Sedimentology* **46**, 338p.
- Morales, L.G., Podesta, D.J., Hatfield, W.C., Tanner, H., Jones, S.H., Barker, M.H., O'Donoghue, D.J., Mohler, C.E., Dubois, E.P., Jacobs, C. & Goss, C.R.** (1958). General Geology and oil occurrences of the Middle Magdalena Valley, Colombia. In: Weeks, L.G. (Eds.), *Habitat of Oil Symposium*. AAPG **41**: 641-695.
- O'Brien, N.R. & Slatt, R.M.** (1990). The fabrics of shales and mudstone; an overview. In: Burst, J.F., Johns W.D. (chairs). *Clay Minerals Society, 27th annual meeting, program and abstracts: Clay Minerals Annual Conference* **27**, 99p.

- Rangel, A., Giraldo, B., Munar, R., Olaya, I., García, M., Gutiérrez, J., Parra, P. & Niño, Ch.** (2000^a). Estratigrafía química y facies orgánicas del Terciario Inferior y Cretácico Superior del Piedemonte Llanero y Valle Oriental del Magdalena. Internal Report ECOPEPETROL- ICP.
- Rangel, A., Parra, P. & Niño, C.** (2000b). The La Luna Formation: chemostratigraphy and organic facies in the Middle Magdalena Basin. *Organic Geochemistry* **31** (12): 1267-1284.
- Ramón, J.C., Dzou, L. & Giraldo, B.** (1997). Geochemical evaluation of the Middle Magdalena Basin, Colombia. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro* **1** (3): 47-66.
- Ramon, J.C. & Dzou, L.I.** (1999). Petroleum geochemistry of the Middle Magdalena Valley: Colombia. *Organic Geochemistry* **30** (4): 249-266.
- Reyes, J.P.** (1996). Oil potential of the Cretacic megasequence and associated oil families in the Middle Magdalena Valley, Colombia. *Memorias del V Congreso Latinoamericano de Geoquímica Orgánica*, Cancún, p.105.
- Reyes, J.P., Fajardo, A., Mantilla, M. & Barragán, M.** (2000). Secuencia Calcárea del Cretáceo del Valle Medio Del Magdalena, Colombia. Una Nueva Frontera Exploratoria ACGGP.
- Ritter, U.** (2003). Solubility of petroleum compounds in kerogen: implications for petroleum expulsion. *Organic Geochemistry* **34**: 319-326.
- Ritter, U. & Grover, A.** (2005). Adsorption of petroleum compounds in vitrinite: implications for petroleum expulsion from coal. *International Journal of Coal Geology* **62**: 183-191.
- Rodríguez, J.C.** (2013). Challenges and opportunities for the development of Shale resources in Colombia. MSc thesis, The University of Texas, Austin.
- Romero-Sarmiento, M.F., Ducros, M., Carpentier, B., Lorant, F., Cacas, M. Ch., Pegaz-Fiornet, S., Wolf, S., Rohais, S. & Moretti, I.** (2013). Quantitative evaluation of TOC, organic porosity and gas retention distribution in a gas shale play using petroleum system modeling: Application to the Mississippian Barnett Shale. *Marine and Petroleum Geology* **45**: 315-330.
- Romero-Sarmiento, M.F., Rouzaud, J.N., Bernard, S., Deldicque, D., Thomas, M. & Littke, R.** (2014). Evolution of Barnett Shale organic carbon structure and nanostructure with increasing maturation. *Organic Geochemistry* **71**: 7-16.
- Ross, D.J.K. & Bustin, R.M.** (2009). The importance of shale composition and pore structure upon gas storage potential of shale gas reservoirs. *Marine and Petroleum Geology* **26**: 916-927.
- Royero, J.M. & Clavijo, J.** (2001). Memoria Explicativa Mapa Geológico Generalizado Departamento de Santander, escala 1:400.00. INGEOMINAS, Bogotá.
- Schamel, S.** (1991). Middle and Upper Magdalena Basins, Colombia. In: Biddle, K.T. (Eds.), *Active Margin Basins*. AAPG Memoir **52**: 283-301.
- Slatt, R.M. & O'Brien, N.R.** (2011). Pore types in the Barnett and Woodford gas shales: contribution to understanding gas storage and migration pathways in fine grained rocks. *AAPG Bulletin* **95** (12): 2017-2030.
- Slatt, R.M., Philip, P., Abousleiman, Y., Singh, P., Perez, R., Portas, K., Marfurt, J., Madrid-Arroyo, N., O'Brien, E., Eslinger, V. & Baruch, E.** (2012). Pore-to-regional-scale, integrated characterization workflow for unconventional gas shales. In: Breyer, J. (Eds.), *Shale reservoirs-Giant resources for the 21st century*, AAPG Memoir **97**: 127-150.
- Sun, Y., Lu, X.C., Shu, L.S. & Liu, H.** (2008). Observation & determination of the nano-sized particle layer in rocks and its geological significance. *Journal of Geomechanics* **14** (1): 37-44.
- Torres, E.J.** (2013). Unconventional gas shale assessment of La Luna Formation in the central and south areas of the Middle Magdalena Valley Basin, Colombia. MSc thesis, University of Oklahoma, Norman.
- Torres, E.J., Slatt, R.M., Philp, P. Brien, N.R.O. & Rodríguez, H.L.** (2015). Unconventional resources assessment of La Luna Formation in the Middle Magdalena Valley Basin, Colombia. AAPG Annual Convention & Exhibition, Denver, Colorado, May 31-June 3, 2015.
- Vermlyen, J.P.** (2011). Geomechanical Studies of the Barnett Shale, Texas, USA. PhD thesis, Stanford University, Stanford.
- Ward D.E., Goldsmith R., Jimeno V., Cruz B.J., Restrepo H. & Gómez, R.** (1969). Mapa Geológico del Cuadrángulo H-12, Bucaramanga, Colombia. Ingeominas.
- Warlick, D.** (2006). Gas shale and CBM development in North America. *Oil and Gas Financial Journal* **3** (11): 1-5.
- Weniger, P., Kalkreuth, W., Busch, A. & Krooss, B.M.** (2010). High-pressure methane and carbon dioxide sorption on coal and shale samples from the Paraná Basin, Brazil. *International Journal of Coal Geology* **84**: 190-205.
- Williams, K.E.** (2012). The Permeability of Overpressure Shale Seals and of Source Rock Reservoirs is the Same. AAPG 2012 Annual Convention and Exhibition, Long Beach, California, 22-25 April.
- Yao, S.P., Jiao, K., Zhang, K., Hu, W.X., Ding, H., Li, M.Ch. & Pei, W.M.** (2011). An atomic force microscopy study of coal nanopore structure. *Chinese Science Bulletin* **56** (25): 2706-2712.
- Zhang, T.W., Ellis, G.S., Ruppel, S.C., Milliken, K. & Yang, R.** (2012). Effect of organic matter type and thermal maturity on methane adsorption in shale-gas systems. *Organic Geochemistry* **47**: 120-131.
- Zumberge, J.** (1984). Source Rocks of the La Luna Formation (Upper Cretaceous) in the Middle Magdalena Valley, Colombia. In: Palacas J. (Eds.), *Petroleum Geochemistry and Source Rock Potential of Carbonate Rocks*. AAPG Studies in Geology **18**: 127-133.
- Zumberge, J., Ferworn, K. & Brown, S.** (2012). Isotopic reversal ('rollover') in shale gases produced from the Mississippian Barnett and Fayetteville formations. *Marine and Petroleum Geology* **31**: 43-52.

Enfoque y alcance

La Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ACCEFYN) es una publicación periódica trimestral, multidisciplinaria, que tiene como objetivo dar a conocer artículos inéditos de investigación de alta calidad.

La Revista publica artículos científicos en las áreas de ciencias físicas (física, físico-química, materiales y matemáticas); ciencias naturales (biología, botánica, zoología, ecología, bioquímica, química); ciencias de la tierra (geología, medio ambiente); ciencias humanas (filosofía, sicología, antropología, sociología); ciencias biomédicas y ciencias químicas, está reseñada en varios índices nacionales e internacionales tales como Actualidad Iberoamericana, Agris, CIRS (International Center for Scientific Research), Current Mathematical Publications, EBSCO, Dialnet, Historia Mathematica, Index Kewensis, Latindex, Mathematical Reviews, MathSciNet (on line data base), PERIODICA, SciELO, Online Computer Library Center – OCLC, Zentralblatt für Mathematik, Zoological Record, RLG. Nacionalmente se encuentra reseñada en la base de datos Publindex de Colciencias.

La página web de la Revista (www.raccefyn.co) permite el acceso libre y abierto a los artículos con el fin de contribuir a la visibilidad, al acceso y a la difusión de la producción científica.

El primer número se publicó en diciembre de 1936, año de creación oficial de la Academia, bajo la dirección del doctor Jorge Álvarez Lleras y hasta el momento se han editado 37 volúmenes.

Criterios para publicar

Indicaciones a los autores

Los autores deben tener en cuenta las siguientes indicaciones:

1. Los trabajos presentados deberán ser originales en inglés o español y de alto nivel sobre aspectos relacionadas con las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Todos los trabajos aceptados quedan como propiedad permanente de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de manera que la misma podrá publicarlos en formato físico y electrónico, incluyendo internet (Ver transferencia de derechos de autor).
2. El autor de la correspondencia debe aceptar mediante comunicación escrita firmada que el manuscrito es un trabajo original y no ha sido publicado por ningún medio, ni está siendo evaluado por otra publicación impresa o electrónica y que ha sido aceptado por todos los autores para su publicación en la Revista y que los derechos de

autor no han sido cedidos a nadie con anterioridad (Ver formato declaración originalidad, conflicto de intereses y sesión de derechos de autor en la página web de la Revista: <http://www.raccefyn.co>).

3. La participación de los autores en el trabajo debe ser suficiente como para aceptar públicamente la responsabilidad de los aportes de cada uno. El orden de los autores en la publicación deberá ser una decisión compartida de los coautores, que deben ser capaces de explicar el orden en el que aparecen sus nombres.
4. De acuerdo con el ICMJE, todos los colaboradores que no cumplen los criterios de autoría o hayan realizado contribuciones menores deben aparecer en la sección de agradecimientos, pero no ser citados como autores. Las ayudas económicas y materiales deben aparecer en los agradecimientos.
5. La terminología física, química y bioquímica, debe seguir las normas del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC). Deben usarse las abreviaturas internacionales convencionales y las unidades del Sistema Internacional (SI). Los nombres científicos se deben escribir con la forma recomendada por “Internacional Code of Botanical Nomenclature”

Envío y presentación del manuscrito

Los artículos deben enviarse a través de <http://www.raccefyn.co>

El manuscrito, incluyendo además de la página del título, el resúmenes, las referencias, las tablas y sus títulos, las leyendas de figuras, deben estar escritos en procesador de palabras Word a doble espacio, usando la fuente Arial de tamaño 12, sin justificar el texto. No olvide usar la numeración en todo el manuscrito.

Los manuscritos deben incluir la siguiente información:

1. Una página en Word con los nombres y apellidos (nombre completo y apellido, si desea poner el segundo apellido, debe ir separado por un guion) de todos los autores (sin cargos, ni grado académico), filiaciones y correos electrónicos.
2. Título completo del manuscrito en español e inglés.
3. Título corto
4. Resumen en español y en inglés que no supere 250 palabras.
5. Palabras clave en español y en inglés que no superen en número a seis.

6. Nombre del autor responsable de la correspondencia con su dirección completa, número telefónico y dirección electrónica.
7. Direcciones electrónicas de todos los coautores.
8. Texto, referencias y tablas en un mismo archivo junto con las leyendas de las figuras.
9. Figuras en formato jpg o tiff.

Estructura del manuscrito

Introducción: se debe mostrar el marco teórico en el cual se inscribe el tema de la investigación, propósito del artículo y justificación del estudio, indicando además la delimitación de la pregunta problema.

Materiales y métodos: se describirán los sujetos de observación o experimentación, aparatos o dispositivos y la metodología empleada en el estudio.

Análisis estadístico: señalar los métodos estadísticos utilizados y cómo se han analizado los datos.

Resultados: deben presentarse en secuencia lógica, con las tablas y figuras acompañadas de una explicación y análisis de las mismas.

Discusión: debe hacerse énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio, contrastando los resultados con la información pertinente disponible en la literatura actualizada y relacionar las conclusiones con los objetivos propuestos. Se deben incluir las implicaciones y limitaciones de los hallazgos y comparar las observaciones relevantes con las de otros estudios.

Los resultados y la discusión pueden presentarse también en forma combinada. En cuyo caso la sección se denominará Resultados y Discusión.

Conclusiones: Resumen de la investigación y su estado actual. Aquí se pueden plantear objetivos futuros a seguir en la línea de investigación.

Citación: todas las referencias bibliográficas se insertarán en el texto y deberán llevar siempre el apellido del autor o autores y el año de publicación entre paréntesis. Si el apellido del autor o autores forma parte de la estructura formal de la frase, sólo se pondrá entre paréntesis la fecha; por ejemplo: Pérez y Ribas (1996). Si son tres, cuatro o cinco autores se pondrán los apellidos de todos los autores la primera vez que se referencian en el texto, y después sólo se pondrá el apellido del primer autor seguido de *et al.* Si son seis o más autores sólo se pondrá el apellido del primero añadiendo "*et al.*", desde la primera vez que se referencian. Si existieran varias referencias de un autor en un mismo año se consignarán con las letras a, b, c, etc., después del año.

Cita directa o textual

Si la cita textual tiene menos de 40 palabras se presenta entre comillas dentro del texto y al final se incluye entre paréntesis el apellido, año de publicación y la página de donde se extrajo.

Ejemplo:

El objetivo de los estudios explicativos es "responder a las causas de los eventos físicos o sociales" (Hernández, Fernández y Baptista, 1991, p.66).

Si la cita comprende más de 40 palabras se ubica en un bloque independiente del texto, sin comillas y dejando una sangría al lado izquierdo.

Ejemplo:

Las revistas científicas son sistemas contextuales de comunicación, de difusión académico investigativa y fortalecimiento de competencias científicas (escritura, investigación, evaluación, edición), en los cuales la comunidad académica comparte creencias, orientaciones y el compromiso de contribuir, utilizar y hacer avanzar el conocimiento de forma colaborativa y cooperativa. (Mesa & Sánchez, 2010, p.4).

Parfraseo o resumen

Se debe mencionar al autor y la fecha.

Ejemplo:

Según Sánchez (1991), el cemento es uno de los materiales más populares e indispensables en la construcción actual.

Existen dos tipos de aprendizaje: la recepción pasiva de conocimientos y el redescubrimiento de la realidad (Piaget, 1980).

Si se cita un documento escrito entre tres y cinco autores, deben escribirse los apellidos de todos la primera vez que se citen y después incluir el apellido del primer autor seguido de "*et al.*" (sin cursiva y con punto después del "al.").

Si se cita un documento escrito por seis o más autores, se presenta la primera cita con el apellido del primer autor seguido de "*et al.*". En la lista de referencias escriba las iniciales y apellidos de los primeros seis autores y para los restantes utilice "*et al.*"

Lista de referencia

Es el listado alfabético (según el primer apellido de los autores citados en negrilla) de las fuentes consultadas y citadas durante la redacción de un trabajo. La lista de referencias es obligatoria. Se deben citar de la siguiente manera:

Libros

Autor. Año. Título completo. Edición. Editorial, lugar de publicación, página

Ejemplo:

Ramírez J. E., S.J. 1975. Historia de los terremotos en Colombia. Segunda edición. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Bogotá, 250 pp.

Revista seriada

Autor, A.A., B.B. Año. Título del artículo. Título de la revista publicación seriada, volumen (número entre paréntesis), páginas del artículo.

Ejemplo:

Ríos, L., Riva, F., Canaquire, L. 2008. Reporte situacional del tráfico ilegal de fauna silvestre en la Rev. Acad. Colomb. Cienc. 38(147):218-22.

Artículo de revista electrónica

Ejemplo:

Sarabia A., Cifuentes H., Dimate M. 2006. Estudio macrosísmico del sismo ocurrido el 12 de julio de 1785. Ingeominas. Bogotá. Fecha de consulta. Disponible en: <http://aplicaciones1.ingeominas.gov.co/sicat/html/Metadato.aspx?CID=239714>

Artículo de periódico impreso:

Ejemplo:

Duque, J. G. 7 de junio de 2012. Antioquia reasume competencia para decidir futuro del túnel. El Colombiano, pp. 10.

Tesis

Ejemplo:

Gómez Capera A.A. 1998. *Atenuación de la intensidad sísmica para el territorio colombiano*. Tesis de grado en Física, Facultad de Ciencias, Departamento de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Congresos y simposios

Ejemplo:

Sánchez Upegui, A. A. Octubre 2010. *Aplicación de la lingüística textual en los criterios de evaluación de artículos académicos e investigativos*. En Simposio Nacional de Pedagogía y Currículo. Red Colombiana de Pedagogía, Medellín

Trabajos inéditos o publicaciones informales

Si el trabajo está disponible en un sitio web institucional o personal agregue el nombre de la institución y URL.

Ejemplo:

Jaramillo, G. 2012. El patrimonio arquitectónico. Manuscrito inédito. Departamento de Artes, Universidad Latinoamericana. Disponible en: <http://..>

Materiales legales

En cuanto a las citas en el texto se proporcionan los mismos datos de cualquier referencia, autor, año y en lo posible

número de página, si no hay un autor identificado, se anotan las primeras palabras del título y la fecha.

Ejemplo:

Colombia. Ministerio de Educación Nacional. Ley 23 de 1982 sobre derechos de autor.

Tablas y figuras

Las tablas y cuadros se denominan tablas y llevan numeración arábiga de acuerdo con el orden de aparición. El título correspondiente se coloca en la parte superior de la tabla y las notas en la inferior. Los símbolos para unidades deben aparecer en el encabezamiento de las columnas. Si es necesario exponer alguna información, utilice las letras minúsculas del alfabeto según orden de aparición en la respectiva tabla: a, b, c, d, e, etc.

Las fotografías, gráficos, dibujos y esquemas se denominan figuras, se enumeran según el orden de aparición y sus leyendas se escriben en hoja separada. Si se trata de micro fotografías debe indicarse el aumento utilizado. Las personas, o sus nombres, no deben ser identificables en las fotografías de lo contrario se requiere permiso escrito para su publicación.

Cuando las tablas y figuras hayan sido tomadas de revistas o libros, sean impresos o electrónicos, se debe especificar la fuente y adjuntar autorización de la respectiva publicación para su reproducción.

Agradecimientos

Podrán ser expresados a personas o entidades que hayan ayudado a la realización del trabajo. Se mencionarán las personas y el tipo de ayuda aportada, así como las entidades, instituciones o fundaciones que hayan financiado o suministrado materiales. En caso de proyectos de investigación financiados será suficiente con mencionar el código de registro y la entidad, institución o fundación que lo apoya económicamente.

Proceso de revisión por pares

Se recibirán solo los artículos que cumplan con todos los requisitos que se mencionan en las indicaciones a los autores. Los artículos serán evaluados en primera instancia por el Editor y el Comité Editorial de la Revista.

Cada manuscrito será enviado a dos especialistas en el tema, que evaluarán y enviarán sus recomendaciones. Este proceso de revisión tendrá una duración de 20 días.

El editor informará a cada uno de los autores el avance de su trabajo en el proceso de evaluación.

Los pares académicos adoptan tres opciones: a) aceptación sin modificaciones; b) aceptación con correcciones; c) no aceptación. En caso de desacuerdo de los pares, el original será enviado a una tercera evaluación.

En cualquiera de las opciones, el autor será informado y deberá realizar las modificaciones correspondientes en el manuscrito y enviarlo en las cuatro semanas siguientes. Además deberá enviar un documento en el que responda a todas las observaciones hechas por los evaluadores.

Cuando el autor demore más de 30 días en responder a las sugerencias de los evaluadores, el artículo no será considerado para publicación en el siguiente número de la revista. En caso de sobrepasar dicho plazo, se entenderá que los autores retiran el trabajo en su forma actual y, si se remite de nuevo, el Comité Editorial de la Revista podrá considerar que se trata de un nuevo trabajo.

Los trabajos aceptados son propiedad de la Revista ACCEFYN y podrán ser reproducidos total o parcialmente por la Revista.

La Revista no se hace responsable de los contenidos científicos ni de las implicaciones legales de los artículos publicados.

Corrección de estilo y publicación del manuscrito

Aceptados los artículos estos se enviarán a corrección ortotipográfica. Se usará la herramienta de control de cambios de Word, en la cual quedará registro de cada una de las sugerencias realizadas y los comentarios o dudas para que el autor o autores aprueben y contesten.

La versión corregida deberá ser enviada nuevamente para su aprobación definitiva en un plazo mínimo de 48 horas. El manuscrito deberá ir con una carta al editor, informando cuales correcciones fueron procesadas. El editor le informará al autor la fecha y el número del volumen en que será publicado.

Rectificaciones y correcciones de errores

Las rectificaciones sobre la información suministrada por parte de los autores, se harán en el número inmediatamente posterior al anuncio de las mismas y serán responsabilidad de los mismos autores. La Revista se encargará de publicar una nota aclaratoria a manera de erratas. En el caso que sean necesarias mejoras y corrección de errores ortotipográficos, de manejo visual de la información o imprecisiones involuntarias, el (los) autor(es) podrán comunicarse al correo de la Revista para que puedan realizarse en las versiones electrónicas de la Revista.

Falsificaciones de artículos

Si en el proceso editorial se encuentra falsificación, omisión de datos, duplicidad del artículo o plagio, se devolverá el original al autor con la debida notificación a su institución patrocinadora, centro de investigación o universidad.

Conflicto de intereses

Si los autores o coautores, editores o revisores (evaluadores) tienen algún conflicto de interés que pueda de alguna manera

influir en la transparencia u objetividad en el proceso de revisión por pares y publicación, éste debe ser declarado.

Los conflictos de interés más evidentes son los llamados conflictos financieros, resultado de relaciones entre empleador-empleado, financiaciones y patentes, así como también honorarios, consultorías, investigación pagada por compañías que dependen de los resultados investigativos, etc.

También existen los conflictos personales resultado de amistades o animadversiones, competencias académicas y pasiones en el campo intelectual o moral (por ej. parientes en una compañía que se beneficiaría de los resultados que se van a publicar, el uso de los resultados publicados para promoción inmediata basada en el artículo publicado, creencias religiosas que estén en conflicto directo con la investigación que se va a publicar, etc.

Transferencia de derechos de autor

En caso de que el artículo enviado sea aprobado para publicación, el autor principal en nombre propio y en el de los coautores o el autor principal y los coautores deben ceder los derechos de autor del artículo mencionado a la revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ACCEFYN), excepto en los siguientes casos:

a) Los autores y coautores retienen el derecho de revisar, adaptar, preparar trabajos derivados, presentaciones orales y distribuir a algunos colegas impresos de su propio trabajo publicado, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente a la revista de ACCEFYN. También pueden publicarse el título del trabajo, resumen, tablas y figuras del trabajo en los correspondientes sitios web de autores o de sus empleadores, también dando el crédito a la revista de ACCEFYN.

b) Si el trabajo ha sido realizado por contrato, el empleador del autor tiene el derecho de revisar, adaptar, preparar trabajos derivados, reproducir o distribuir en formato impreso el trabajo publicado, de una manera segura y para el uso exclusivo de sus empleados.

c) Si a la revista de ACCEFYN se le solicitara permiso individual por terceras personas para usar, imprimir o publicar específicamente artículos ya publicados, deberá obtenerse el permiso expreso del autor y coautores del trabajo y/o del empleador con excepción del uso en salones de clase, bibliotecas o reimpresos en un trabajo colectivo.

d) La revista ACCEFYN se reserva el posible uso en la portada de la revista, de figuras sometidas a revisión junto con los manuscritos.

e) Ningún otro derecho, además del de derechos de autor, debe ser reclamado por la revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ACCEFYN).

Criteria for publication

Information for Authors

The authors must adhere to the following requirements:

1. The works submitted must be original, in English or Spanish, and of high quality in an area related to the Exact, Physical or Natural Sciences. All works accepted will remain permanent property of the Colombian Academy of Exact, Physical and Natural Sciences so that such work can be published in hard copy or in electronic format, including web posting. (See transference of authors' rights).
2. The author submitting the work must confirm via written and signed communication that the manuscript represents original work and that it has not been published in any form, and that it is not under review by any other publisher for publication in hard copy or in electronic format and that publication in the Revista has been agreed by all authors, and the authors' rights have not been previously granted to a third party. (See form for declaration of originality, conflicts of interest, and authors' rights).
3. The participation of the authors in the submitted work must be materially sufficient so as to share in the public responsibility of its contents. The order of appearance of the each of the authors of the publication must reflect a decision shared by all the co-authors, each of whom must be prepared to justify the order in which his name appears.
4. In accordance with the ICMJE (www.raccefyn.co), all collaborators who do not comply with the criteria for authorship, or who have realized minor contributions must be included in the Acknowledgement Section, and must not be cited as authors. The Acknowledgement Section must also include reference to any financial and economic assistance.
5. The terminology must adhere to the International Code for Botanical Nomenclature. The physical, chemical or biochemical terminology norms of the Nomenclature Committee of International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC). The abbreviations must follow the international conventions as well as the units must conform to the International System (SI). The scientific names must be written in the format recommended by the "International Code of Botanical Nomenclature".

Submission and Presentation of manuscript

The manuscripts should be submitted using the website of the Academy: <http://www.accefyn.co>

The manuscript, including the title page, the abstract, tables with titles, graphics with descriptive legends, must be prepared in Microsoft WORD processor in double space. Use Areal font size 12 without justification. Do not forget to number the entire manuscript.

The manuscripts must contain the following information:

1. A page in Microsoft Word with the names and surnames (complete name , first and second family name separated by a hyphen) of all the authors (without positions, and without academic degrees), academic affiliations and email addresses.
2. Complete manuscript title in Spanish and English.
3. Short Title
4. Abstract in Spanish and English using 250 or less words
5. Key words in Spanish and English not containing more than 6 words.
6. Name of the author responsible for all correspondence, including his complete address, telephone number and email address.
7. Electronic addresses of all the co-authors.
8. Text, bibliographical references and tables in the same file together with the legends for all the figures.
9. Figures must be in jpg or tiff format.

Manuscript Structure

Introduction: there must be a clear description of the theoretical framework of the theme of the investigation, purpose of the article and justification of the study, indicating the limitation of the problem question.

Materials and methods: a description of the object of observation or experimentation, instruments or devices and the methodology employed in the study.

Statistical analysis: indicate the statistical methods used and the data analysis employed.

Results: these must be presented in a logical sequence, with the accompanying tables and figures with their respective explanations and analysis.

Discussion: emphasis must be given to those aspects of the study which are new and important, contrasting the results with the relevant information available in the recent literature and relate the conclusions with the proposed objectives. Mention must be made of the implications and limitations of the results found and a comparison of the relevant observations with that of other studies.

The results and the discussion may also be presented in a combined form.

Conclusion: an up to date survey of the investigation. Mention can be made here of future objectives of the same line of investigation.

Bibliography: these citations must be verifiable, enumerated and referred to in the body of the article enclosing each number with square brackets. When a citation is made, indicate in the text the author, the year and page in the following way:

Direct or textual quotation

If the textual citation has under 40 words it should be given in between quotation marks within the text and at the end it should include in parenthesis the surname, the year of publication and the page from which it was extracted.

Example:

The objective of the explicative studies is “to respond to the causes of the physical or social events” (Hernández, Fernández and Baptista, 1991, p.66)

If the citation goes over 40 or more words it must be placed in a separate block independent of the text, without quotation marks allowing for bleeding on the left margin.

Example:

The scientific journals are contextual system of communication, of academic or investigative diffusion and strengthening of scientific competence (writing, investigation, evaluation, editing), in which the academic community shares beliefs, orientation and the commitment to contribute, use and advance the formal knowledge of collaboration and cooperation. (Mesa & Sánchez, 2010, p.4)

Paraphrase or summary

Mention must be made of the author and the date.

Example:

According to Sánchez (1991), cement is one of the most popular and indispensable materials in today’s construction.

There exist two types of learning: the passive reception of knowledge and the rediscovery of reality (Piaget, 1980)

If a cited document has between three or five authors, the surnames of all the authors must be given the first time they are cited and afterwards include the surname of the first author followed by “et al.” (not in italics and with a period after the “al.”).

If a cited document has six or more authors, place the first citation with the surname of the first author followed by “et al.” In the bibliographical list write the initials and surnames of the first six authors and for the rest use “ et al.”

Bibliographical list

It is the list, in alphabetical order (according to the first surname of the cited authors, which should be in bold) of the sources consulted and cited in the text of the article. It is mandatory to include the bibliographical list. It should be cited in the following way:

Books

Author. Year of publication. Title of the book. Edition. Publisher, place of publication, page(s).

Example:

Ramírez J. E., S.J. 1975. Historia de los terremotos en Colombia. Segunda edición. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Bogotá, 250 pp.

Article from periodical journal

Author, A.A., Author, B.B. Year. Title of the article. Title of the journal, volume (number in parenthesis), pages.

Example:

Ríos, L., Riva, F., Canaquire, L. 2008. Reporte situacional del tráfico ilegal de fauna silvestre en la en la región nororiental del Perú. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 38(147):218-22.

On line periodical article

Example:

Sarabia A., Cifuentes H., Dimate M. 2006. Estudio macrosísmico del sismo ocurrido el 12 de julio de 1785. Ingeominas. Bogotá. Date of query: (day, month, year). Available at: <http://aplicaciones1.ingeominas.gov.co/sicat/html/Metadato.aspx?CID=239714>

Newspaper article

Example:

Duque, J. G. 7 de junio de 2012. Antioquia reasume competencia para decidir futuro del túnel. El Colombiano, pp. 10.

Thesis

Example:

Gómez Capera A.A. 1998. *Atenuación de la intensidad sísmica para el territorio colombiano*. Tesis de grado en Física, Facultad de Ciencias, Departamento de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Congresses and symposia

Example:

Sánchez Upegui, A. A. Octubre 2010. *Aplicación de la lingüística textual en los criterios de evaluación de artículos académicos e investigativos*. In: Simposio Nacional de Pedagogía y Currículo. Red Colombiana de Pedagogía, Medellín

Unpublished manuscript or informal publications

If the work is available at an institutional or personal web site, please add the name and URL of the institution.

Example:

Jaramillo, G. 2012. El patrimonio arquitectónico. Manuscrito inédito. Departamento de Artes, Universidad Latinoamericana. Recuperado de <http://...>

Legal documents

Regarding the citations in the text, the same data included in all other references should be provided (author, year, and if available, the same page number). If there is no identifiable author, the first words of the title should be noted, as well as the date.

Example:

Colombia. Ministerio de Educación Nacional. Ley 23 de 1982 sobre derechos de autor.

Tables and graphics

The tables and frames are called tables and carry an arabic numeration in accordance with the order in which they appear. The corresponding title is placed on the upper part of the table and notes are placed in the lower part. Symbols for unit measures must appear in the column headings.

If it is necessary to display some information, use lower case letters from the alphabet according to the appearance of the table: a, b, c, d, e, etc.

Photographs, graphics, pictures or sketches are named figures, are enumerated in order of appearance, and their legends must be written in a separate page. With respect to microfiches, indicate the size of the augmentation used. People or their names should not be identifiable in photographs, unless written permission for their publication has been obtained.

When tables and figures have been taken from magazines or books, published in hard copy or electronically, specify the source and include the authorization for its reproduction from the respective publication.

Acknowledgments

These can be expressed to persons or entities who have aided in the realization of the work. Mention is made of persons and their type of aid provided, as well as to entities or institutions which have provided financial and material assistance. In case of investigative projects with financial support it suffices to mention the registry code and the entity, institution or foundation which provided the economic support.

The peer-review process

Only articles which comply with the requirements mentioned in the information for authors will be accepted. The articles

will be given their first evaluation by the Editor and the Editorial Committee of the Revista.

Each manuscript will be sent to two experts on the topic who will provide recommendations after review and evaluation. This process of revision will have a duration of 30 days.

The editor will inform each of the authors of the status of the process of evaluation of their work.

The academic peers will adopt one of three options: a) acceptance without modifications; b) acceptance with corrections; c) Deny acceptance. In case of disagreement among the peers, the original manuscript will be sent out for a third evaluation.

Under any of the three options, the author will be informed and must follow the corresponding modifications of the manuscript and return it within the following four weeks. In addition, the author(s) must provide a written document with answers to all the peers observations.

If the author takes more than 30 days to respond to the suggestions from the reviewers, the article will not be considered for publication in the next issue of the Revista. In case the response from the author takes longer than the allocated time, it is understood that the authors will retrieve the work in its present form and, if a new submission is made, the Editorial Committee of the Revista may treat it as a new work.

The works accepted for publication become property of the Revista ACCEFYN and may be reproduced in their entirety or partially by the Revista.

The Revista does not assume responsibility for the scientific content, nor for the legal implications of any of the published articles.

Publication of the manuscript

Once the article has been accepted, it will undergo a style and format revision which will bring it to its definitive version. The authors will receive the galley proofs in PDF format for the correction of errors before its printing. The corrected version must be returned for final approval within a period of 48 hours. The manuscript must be accompanied with a letter to the editor informing him of the corrections that were carried out. The editor will inform the author of the date and volume number in which the publication will appear.

Conflicts of interest

If the authors or co-authors, the editors or reviewers (evaluators) have some conflict of interest which may in any way influence the transparency and objectivity of the peer review process and publication, it must be so declared.

The most obvious conflicts of interest are those referred to as financial conflicts, which result between, employer-employee, investments and patents, as well as honoraria, consulting, paid investigation by companies which depend on the investigative results, etc.

There also exist personal conflicts arising from friendships, animosity, academic competencies and passions in the moral or intellectual field (for example relatives in a company which will benefit from the results to be published, the use of the results for immediate promotion based on the published article, religious beliefs which are in direct conflict with the investigation that will be published, etc).

Transfer of author rights

In case the article is approved for publication, the main author in representation of himself and his co-authors or the main author and his co-authors must cede the author rights of the corresponding article to the Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ACCFYN), except in the following cases:

a) The authors and co-authors will retain the right to revise, adapt, prepare derived works, oral presentations and distribution to some colleagues of reprints of their

own published work, as long as the corresponding credit is given to the Revista of ACCEFYN. It is also permissible to publish the title of the work, summary, tables and figures of the work in the corresponding web sites of the authors or their employers, also giving credit to the Revista of ACCEFYN.

b) If the work has been realized under contract, the author's employer has the right to revise, adapt, prepare derivative works, reproduce or distribute in hard copy the published work, in a secure manner and for the exclusive use of his employees.

c) If the Revista of ACCEFYN were approached for permission by a third party for using, printing or publishing specifically articles already published, the Revista of ACCEFYN must obtain the express permission of the author and co-authors of the work and/or of the employer with the exception of use in classrooms, libraries, or reprinted in a collective work.

d) The Revista of ACCEFYN reserves the possible use in its front cover of figures submitted with the manuscripts.

e) No other right, other than the author's right, can be claimed by the Revista of ACCEFYN.

