



*In memoriam* profesor Jan Bonarski de quien tanto aprendí...

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Io Almagro Padilla  
ISBN: 978-84-9163-029-6  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44569>







**Universidad de Granada**

**CRISTALOGRAFÍA Y ULTRAESTRUCTURA  
DE CAPAS LAMELARES CRUZADAS EN EL FILO MOLLUSCA.  
INFERENCIAS EVOLUTIVAS**

---

**Abril 2016**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Biología, Ío Almagro Padilla, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada, dentro del programa de doctorado “Ciencias de la Tierra”.



Directores:

Prof. Dr. D. Antonio Gerardo Checa González y Dr. D. Claro Ignacio Sainz Díaz



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a todas las personas que han hecho posible que este trabajo vea finalmente la luz. Empezando por mis dos directores de tesis. En primer lugar, agradecer a mi profesor Antonio Checa su ejemplo de la constancia y el trabajo que requiere toda investigación. Gracias por saber dedicarme tiempo siempre en los momentos más críticos. En segundo lugar, y no menos importante a mi segundo director, el Dr. Ignacio Sainz-Díaz, nuestro Iñaki, sin quién ésta tesis jamás habría sido posible. Agradecer al profesor Alejandro Rodríguez-Navarro del Departamento de Mineralogía de la Universidad de Granada, que me guiara en mis primeros pasos con la difracción de rayos X, además de ser creador de parte del software utilizado en este trabajo. A todo el equipo de Marc Willinger en Berlín, por su asesoramiento al microscopio. A Kasia y a Piotr, por su constante colaboración. Al resto de estudiantes y técnicos en el equipo del profesor Jan Bonarski por su gran acogida. A Daniel Welsch, por inspirarme y ser de gran ayuda en las partes de este manuscrito escritas en inglés. A mis compañeros más cercanos, Saturnina, Elena, Tay, Casto. A Michael, Julyan y a todos los demás amigos y colaboradores en este camino, estudiantes y profesores, técnicos de laboratorio y personal administrativo tanto en la Universidad de Granada como en todos los centros extranjeros donde he realizado estancias todos estos años, y de quienes tanto he aprendido. Cambridge, Berlín, Cracovia...a todos y a todas, gracias.

No olvidar a mi familia y a quienes han confiado en mí desde el principio. A Vicent por su ayuda y apoyo durante tanto tiempo de doctorado. A mi madre, mi hermana y mi abuela, todas ellas importantes. A mi inseparable Milko, mi perro, no mencionarle en esta dedicatoria diría muy poco de mí.



El presente trabajo se ha desarrollado en el Departamento de Estratigrafía y Paleontología de la Universidad de Granada y el Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La investigación desarrollada ha sido financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), mediante la concesión de una beca pre-doctoral FPI (BES-2011-048038) asociada al proyecto "Biomineralización en invertebrados con énfasis en moluscos. Organización, génesis y evolución de microestructuras" (CGL2010-20748-CO2-01). Además se han realizado varias estancias breves en otros laboratorios europeos: Museo Sedgwick (Cambridge), Instituto Fritz Haber (Berlín) e Instituto de Metalurgia y Ciencias de los Materiales (Cracovia) como beneficio del programa de estancias breves adjuntas a la beca FPI concedida.

Gran parte de los resultados han sido presentados en congresos internacionales:

- COST Action TD0903 Meeting in Aarhus, Denmark (2012)“ Mechanical properties of some bivalve shells related to their environment" . Ío Almagro, Claro Ignacio Sainz-Díaz, Antonio Checa, M. E. Harper y Michael Carpenter.
- COST ACTION TD9093 Meeting in Granada, Spain (2014). "Crystallography of the crossed-lamellar materials within the Phylum Mollusca". Ío Almagro; Sylwia Pawlak; Marc Willinger; Claro Ignacio Sainz-Díaz; Jan Bonarski; Antonio Checa Gonzalez.
- BIOMIN XIII "Crystallography of the crossed-lamellar microstructures in molluscs". Ío Almagro, Antonio G. Checa, Piotr Drzymała, Katarzyna Berent C. Ignacio Sainz-Díaz, Jan Bonarski.

Publicaciones científicas asociadas a esta tesis doctoral:

- Ío Almagro; Piotr Dryzmała; Alejandro Rodríguez-Navarro; C. Ignacio Sainz-Díaz; Marc Georg Willinger; Jan Bonarski; Antonio Checa; 2016. ***Crystallography and textural aspects of crossed-lamellar layers in Arcidae (Bivalvia, Mollusca) shells.*** In *Biom mineralization: From Fundamentals to Biomaterials & Environmental Issues. Key Engineering Materials.* Frédéric Marin, Franz Brümmer, Antonio Checa, Gabriel Furtos, Isidoro Giorgio Lesci and Lidija Šiller. (eds.) 672, 60-70. Trans Tech Publications. ISBN-13: 978-3-03835-591-5.
- Ío Almagro, Piotr Drzymała, Katarzyna Berent, Claro Ignacio Sainz-Díaz, Marc Georg Willinger, Jan Bonarski, and Antonio G. Checa, 2016. ***New crystallographic relationships in biogenic aragonite: the crossed-lamellar microstructures of mollusks.*** *Crystal Growth & Design.* 16, 2083-2093. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01775.

La doctoranda, Ío Almagro Padilla, y los directores de la tesis, Antonio G. Checa y Claro Ignacio Sainz-Díaz, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada a 20 de Abril de 2016

Director/es de la Tesis

Doctoranda

Antonio G. Checa y Claro Ignacio Sainz-Díaz

Ío Almagro Padilla

Fdo.:

Fdo.:





## ÍNDICE

• Índice de figuras	IX
• Índice de tablas	XI
• Abreviaturas	XII
• RESUMEN/ABSTRACT	1
• 1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Los moluscos y sus conchas. Microestructuras	9
1.2. Cristalización del carbonato cálcico y biomineralización. Maclas	12
1.3. Microestructuras lamelares cruzadas (MLCs)	15
1.3.1. Distribución y origen de las MLCs en el Filo Mollusca	15
1.3.2. Organización general de las MLCs. Lamelas de 1 <sup>er</sup> , 2 <sup>o</sup> y 3 <sup>er</sup> orden	16
1.3.3. Estudios cristalográficos previos	18
1.4. Importancia de las MLCs	24
1.4.1. Propiedades mecánicas	24
• 2. OBJETIVOS	27
• 3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	29
• 4. METODOLOGÍA	31
4.1. Listado de especies	32
4.2. Técnicas empleadas	33
4.2.1. Microscopía óptica, electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)	34
4.2.2. Métodos de difracción y figuras de polos: Difracción de rayos X. EBSD	38
5. RESULTADOS	45
5.1. Estructura jerárquica de las MLCs	46
5.2. Ultraestructura de las lamelas de 3 <sup>er</sup> orden. Maclas	47
5.3. Difracción de rayos X y figuras de polos	49
5.3.1. Patrones texturales $a/b/1$	51
5.3.2. Patrones texturales $a/b/2$	52
5.3.3. Mapas de orientaciones cristalográficas	53
5.3.4. Ángulo entre los máximos 001 en patrones $a/b/2$	55

• 6. DISCUSIÓN	57
6.1. Comparación de los resultados con el conocimiento previo	58
6.2. Interpretación cristalográfica y equivalencias entre patrones texturales. Modelos	60
6.3. Relaciones entre modelos cristalográficos	64
6.4. Modelos cristalográficos presentes en Bivalvia y Gastropoda	65
6.5. Modelos cristalográficos presentes en Scaphopoda y Polyplacophora	65
6.6. Cambios cristalográficos a lo largo de capas con MLCs en una misma concha	66
6.7. Inferencias filogenéticas, convergencia y evolución	66
• 7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	70
• 8. REFERENCIAS	75
• ANEXOS	85
• Anexo 1. Material complementario	86
• Anexo 2. Publicaciones	108

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Principales hipótesis en relaciones de parentesco entre las ocho clases actuales de moluscos. Extraído de Sigwart & Lindberg (2015) 10
- Figura 2.** Esquema general de las partes implicadas en el proceso de formación de una concha prismato-nacarada y vista de la sección de la microestructura nacarada al SEM 14
- Figura 3.** Modelo jerarquizado en lamelas de 3<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 1<sup>er</sup> orden de las MLCs. Modificado de Rodríguez-Navarro *et al.* (2012) 18
- Figura 4.** Clasificación de estructuras lamelares cruzadas según criterios morfológicos. Modificado de Carter & Clark (1985) 19
- Figura 5.** Modelos cristalográficos previos para las MLCs descritos hasta la fecha en distintos taxones. *Oliva sayana* y *Littorina littorea* (Wilmot *et al.* 1992), Polyplacophora (Haas, 1981), *Conus marmoreus* (Rodríguez-Navarro *et al.* 2012) y *Meretrix lusoria* (Hayashi *et al.* 2010) 21
- Figura 6.** Lamela de 3<sup>er</sup> orden con maclas polisintéticas (A) y lamela de 3<sup>er</sup> orden con maclas policíclicas (B). Fuente: Kogure *et al.* 2014 21
- Figura 7.** Maclas cristalográficas de unos pocos nanómetros de espesor en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden de *Arca noae* 34
- Figura 8.** Superficie interna pulida de *Semicassis granulata*. Se observan una serie de bandas claras y oscuras que se corresponden con las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. 35
- Figura 9.** Vista al microscopio óptico de un corte ultra fino de una capa con MLC en *Spondylus sinensis* tras el bombardeo de iones en el adelgazador iónico. Se observa en el centro el agujero dejado por los iones y un borde de playa alrededor, indicado con flechas, que se corresponden con las zonas de espesor nanométrico que se observarán bajo el TEM. 37
- Figura 10.** Izquierda: Ejemplo de cristal con simetría ortorrómbica y plano cristalográfico  $(hkl) = (112)$  expresado en índices de Miller. El vector  $n$  (en rojo) representa la normal al plano  $(112)$  (polo). Derecha: proyección estereográfica del vector normal  $n$  en el plano x-y (punto azul). La posición angular del vector  $n$   $(\alpha, \beta)$

se corresponde con la posición ( $\chi$ ,  $\phi$ ) en las medidas con goniómetro de geometría euleriana 39

**Figura 11.** Esquema de arquitectura básica de un goniómetro de cuatro círculos de geometría euleriana. El eje de la fuente de rayos X, eje del detector y vector de difracción S a lo largo del plano horizontal son definidos por los ángulos  $\theta$  y  $2\theta$ . La posición de la muestra con respecto al vector de difracción S se describe mediante el ángulo de inclinación  $\chi$  y el ángulo de rotación  $\phi$  40

**Figura 12.** Esquema de arquitectura básica de un goniómetro de cuatro círculos de geometría Kappa. En la geometría Kappa no existe el anillo cerrado  $\chi$  pero su función es sustituida por los ejes K y  $\omega k$ . Los movimientos según los ejes  $\phi$  y  $2\theta$  son idénticos a los de la geometría euleriana 40

**Figura 13.** Proceso de análisis por reflexión de rayos X. De izquierda a derecha: Esquema de los anillos de Debye registrados en un detector de área, distribución de polos para un anillo  $hkl$  de un ángulo  $\phi$  dado y proyección de los polos que contribuyen a un anillo  $hkl$  en una figura de polos 42

**Figura 14.** Bandas de Kikuchi en aragonito y calcita biológica 44

**Figura 15.** Imágenes de SEM de las fracturas de la concha de gasterópodos A) *Oliva reticulata* (Neogastropoda), B) *Naticarius hebraeus* (Littorinimorpha), C) *Semicassis bisulcata* (Littorinimorpha). En C se indican los ángulos entre lamelas de 3<sup>er</sup> orden en distintos puntos 46

**Figura 16.** a) Vistas al TEM de maclas polisintéticas en una lamela de 3<sup>er</sup> orden aislada procedente de una muestra en polvo de la MLC de *Arca noae* (Bivalvia), b) maclas policíclicas en una lamela de 3<sup>er</sup> orden aislada procedente de una muestra en polvo de la MLC de *Achatina fulica* (Gastropoda) 48

**Figura 17.** Espectros para la MLC mediante DRX con Mo (izquierda) y Co (derecha). Los picos de las intensidades obtenidas con molibdeno presentan mayor solapamiento 49

**Figura 18.** Ejemplos de conjuntos de figuras de polos representativas de los diez patrones encontrados para las MLCs. A) *Chaetopleura angulata* (IL), B) *Lima lima* (IL), C) *Pholas dactylus* (IL), D) *Eucrassatella decipiens* (IL), E) *Ryssota otaheiana* (ML), F) *Semicassis bisulcata* (IL), G) *Diodora graeca* (IL), H) *Diodora graeca*

(IL)<sub>EBSD</sub>, I) *Fissurella crassa* (IL), J) *Arca noae* (EL). Todos los datos provienen de DRX excepto H) donde se han calculado con EBSD. Los números en las figuras de polos indican la correspondencia entre máximos. IL, capa interna; ML, capa media; EL, capa externa. Las barras negras indican la orientación de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden.

50

**Figura 19.** Distribución de las distintas orientaciones cristalográficas en la capa interna con MLC de *Fissurella crassa*, donde cada una de las dos orientaciones para el eje *c* se localiza en una lamela de 1<sup>er</sup> orden (selección de área)

54

**Figura 20.** Figuras de polos sintéticas para cada uno de los diez patrones texturales encontrados de manera experimental

61

**Figura 21.** : Figuras de polos sintéticas para todos los patrones texturales [a excepción de (1/1/1) que corresponde a una única orientación cristalográfica] encontrados en las MLCs de moluscos, junto a sus correspondientes interpretaciones cristalográficas. Estos patrones se clasifican en cinco grupos como según sus relaciones cristalográficas

63

**Figura 22.** Relaciones filogenéticas entre los principales grupos de bivalvos (árbol parte superior, modificado de González & Giribet 2015+Sharma *et al.* 2012) y gasterópodos (árbol inferior, modificado de Zapata *et al.* 204 + Hedegaard, 1997 + Colgan *et al.* 2007) y los patrones texturales característicos de cada grupo

69

## Índice de Tablas

**Tabla 1.** Datos previos del tipo de macla en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden. PS: macla polisintética con el plano de macla paralelo al eje de elongación de la lamela de 3<sup>er</sup> orden. PC: macla policíclica con un plano de macla paralelo al eje de elongación de la lamela de 3er orden y el resto formando ángulos de 60°-120° con este

23

**Tabla 2.** Lista de especies estudiadas. B: Bivalvia, G: Gastropoda, P: Polyplacophora, S: Scaphopoda

32

**Tabla 3.** A°: Ángulo, expresado en grados, entre las lamelas de 3<sup>er</sup> orden en dos lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes

46

**Tabla 4.** Tipo de macla en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden en distintas especies estudiadas. B: Bivalvia, G: Gastropoda, P: Polyplacophora, S: Scaphopoda, PS: Polisintética, PC: Policíclica

48

**Tabla 5.** Ángulos entre máximos 001 medidos en las FPs (C°) y los ángulos entre las lamelas de 3<sup>er</sup> orden, medidos en imágenes de SEM (A°) 55

### Abreviaturas

CaCO<sub>3</sub>. Carbonato de calcio

Ca. Calcio

CO<sub>3</sub>. Trióxido de carbono

NaClO. Hipoclorito de sodio (lejía)

SiC. Carburo de silicio

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

EL. *External layer* (Capa externa)

IL. *Internal layer* (Capa interna)

ML. *Middle layer* (Capa media)

MLC. Microestructura lamelar cruzada

MLCs. Microestructuras lamelares cruzadas

Lamelas de 1<sup>er</sup> orden. Lamelas de primer orden

Lamelas de 2<sup>o</sup> orden. Lamelas de segundo orden

Lamelas de 3<sup>er</sup> orden. Lamelas de tercer orden

SEM. *Scanning electron microscopy*. Microscopía de barrido

TEM. *Transmission electron microscopy*. Microscopía de transmisión

SAED. Difracción de área seleccionada

DRX. Difracción de rayos X

EBSA. *Electron backscattered diffraction*. Difracción de electrones retrodispersados

SEM-EBSD. Difracción de electrones retrodispersados en microscopía de barrido

TEM-SAED. Difracción de área seleccionada en microscopía de transmisión

FP. Figura de polos

FPS. Figuras de polos

PC. Macla policíclica

PS. Macla polisintética

ESEM. Environmental Scanning electron microscopy

FESEM. Field emission scanning electron microscopy

CIC. Centro de Instrumentación Científica

UGR. Universidad de Granada

FHI, Friz Haber Institute

IMIM. Instituto de Metalurgia y Ciencias de los Materiales

AGH. Universidad de Ciencia y Tecnología, Cracovia

CCD. Charge Coupled Device

ADC. Arbitrarily Defined Cells

Jn. Índice textural

ACMiN (AGH). Centro Académico de Materiales y Nanotecnología, Universidad de Ciencia y Tecnología, Cracovia.





# RESUMEN/ABSTRACT

## RESUMEN

Las conchas de los moluscos están formadas por entre 2 y 5 capas policristalinas. Cada capa consiste en un agregado de cristalitos de carbonato cálcico embebidos en una matriz orgánica que segrega el propio animal. Las distintas maneras en que pueden agregarse los cristalitos y la matriz orgánica para formar capas dentro de las conchas de los moluscos, se denominan *microestructuras*. Existe un amplio número de microestructuras en las conchas de los moluscos, que se repiten de manera recurrente en distintas especies. Las *microestructuras lamelares cruzadas* (MLCs) son las más frecuentes y se caracterizan por presentar fibras cristalinas de aragonito (lamelas de 3<sup>er</sup> orden) que se cruzan en, al menos, dos direcciones principales. Un número de lamelas de 3<sup>er</sup> orden inclinadas en la misma dirección, se agrupa formando unidades de mayor tamaño (lamelas de 2<sup>o</sup> y 1<sup>er</sup> orden). Por esta razón, se dice que las microestructuras lamelares cruzadas presentan una organización jerárquica en unidades de 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> orden. En esta disposición, las lamelas de 1<sup>er</sup> orden forman bloques paralelos más o menos irregulares. En el interior de dos lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes hay innumerables fibras o lamelas de 3<sup>er</sup> orden inclinadas en direcciones opuestas, que además forman láminas, que son las lamelas de 2<sup>o</sup> orden. Este patrón se repite a lo largo de la estructura.

En el siglo XIX, la morfología de las lamelas de 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> orden era utilizada como criterio para clasificar las microestructuras lamelares cruzadas en distintas categorías. Estas clasificaciones continúan en uso, pese a no tener en cuenta un aspecto esencial en materiales policristalinos, que es, la textura cristalográfica. La textura cristalográfica se refiere a las orientaciones que presentan los distintos ejes cristalográficos en la estructura y sus relaciones mutuas. La textura cristalográfica en las microestructuras lamelares cruzadas se suponía relativamente homogénea, habiendo sido estudiada en un número muy reducido de especies sin prestársele mayor consideración. Posteriormente, estudios más actuales basados en difracción de rayos X, mostraron una diversidad en la textura cristalográfica de las microestructuras lamelares cruzadas bastante considerable, planteando incluso su aplicación como herramienta filogenética. Pese a ello, los estudios cristalográficos sobre las microestructuras lamelares cruzadas siguen siendo muy escasos y están concentrados en unas pocas especies.

En esta tesis doctoral se realiza un estudio cristalográfico en 50 capas con microestructuras lamelares cruzadas contenidas en 44 conchas pertenecientes a distintas especies de moluscos. Las especies estudiadas han sido elegidas con criterios filogenéticos, a fin de incluir el mayor número de clados posibles dentro del Filo Mollusca. Las técnicas utilizadas son difracción de rayos X (DRX) y difracción de electrones retrodispersados (EBSD), en combinación con microscopía electrónica de alta resolución [*Scanning electron microscopy* (SEM) y *Transmission electron microscopy* (TEM)].

Los resultados muestran figuras de polos (FPs) agrupables en diez patrones texturales de acuerdo a la distribución y las relaciones de sus máximos. Estos diez patrones que se repiten en capas analizadas en especies distintas, e incluso filogenéticamente alejadas, se pueden clasificar en cinco grupos de modelos cristalográficos. Dichos grupos podrían haber derivado unos de otros de acuerdo con sus equivalencias cristalográficas. Básicamente existen dos categorías principales: modelos *a/b/1*, donde las orientaciones cristalográficas para los ejes *c* son comunes (a modo de simplificación se tratará como un único eje *c* común) y modelos *a/b/2*, con dos orientaciones para los ejes cristalográficos *c* (dos ejes *c*). En el último caso, cada uno de los dos ejes *c* está recogido en un conjunto de lamelas de 1<sup>er</sup> orden alternas en la estructura. Es decir, aquellas que incluyen lamelas de 3<sup>er</sup> orden inclinadas en la misma dirección. Los modelos *a/b/2* parecen haber derivado de los modelos *a/b/1*, mediante rotación de las orientaciones cristalográficas dentro del plano de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden en torno un eje *a* o un eje *b* común. Estas últimas relaciones cristalográficas son completamente desconocidas hasta el momento tanto en aragonito inorgánico como orgánico, por lo que probablemente son producidas por la acción de proteínas particulares.

De las cuatro clases taxonómicas que presentan capas con microestructuras lamelares cruzadas (Polyplacophora, Scaphopoda, Bivalvia y Gastropoda), los gasterópodos parecen haber alcanzado la mayor diversidad textural comprendiendo nueve de los diez patrones descritos. Existen grupos de gasterópodos en que la textura cristalográfica varía a lo largo de las distintas capas con microestructuras lamelares cruzadas que forman la concha (Littorinimorpha), y otros en que se mantiene (Heterobranchia y Neogastropoda). Curiosamente, el patrón textural presente en los

neogasterópodos es el más extendido entre las especies estudiadas de bivalvos, mientras que el patrón textural presente en Heterobranchia no aparece en absoluto en bivalvos. En una de las dos capas con microestructura lamelar cruzada analizadas en el escafópodo *Fissidentalium metivieri*, aparece el mismo patrón textural que en la familia Fissurellidae (Vetigastropoda), mientras que la otra capa presenta una textura típica de otras superfamilias de Vetigastropoda (Trochoidea, Phasianelloidea) y de bivalvos (Limoidea, Veneroidea). Estas coincidencias en la textura cristalográfica de las microestructuras lamelares cruzadas en grupos tan alejados filogenéticamente constituyen sorprendentes convergencias evolutivas. Por el contrario, dentro de cada clase, a nivel de orden o familia existen similitudes cristalográficas que podrían indicar relaciones de parentesco y, aunque no todos, algunos patrones texturales podrían definir clados particulares.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral, podrán servir de referencia para clasificar las distintas microestructuras lamelares cruzadas en Filo Mollusca, ayudando a esclarecer determinadas relaciones de parentesco entre grupos de posición dudosa. Además, pueden facilitar la comprensión de los mecanismos evolutivos de este tipo de microestructuras donde el papel de la materia orgánica parece ser clave. Por ello abre una línea de investigación que merece la pena continuar.

## ABSTRACT

Mollusc shells are made of between 2 and 5 polycrystalline layers. Each layer consists of an aggregate of calcium carbonate crystals embedded in an organic matrix, which is produced by the animal. The different ways in which crystals and organic matrix are arranged to build the layers are called microstructures. There is a large number of microstructures in mollusc shells, which are recurrent among different species. *Crossed-lamellar microstructures* (CLMs) are the most frequent and they are characterized by aragonite crystalline fibres (3<sup>rd</sup> order lamellae) crossing in at least two main directions. A number of 3<sup>rd</sup> order lamellae dipping in the same direction, group together in bigger units (2<sup>nd</sup> and 1<sup>st</sup> order lamellae). For that reason, crossed-lamellar microstructures are said to have a hierarchical organization into 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> order lamellae. In such organization, 1<sup>st</sup> order lamellae constitute parallel and more or less irregular blocks, and inside two adjacent 1<sup>st</sup> order lamellae there is a countless number of fibres or 3<sup>rd</sup> order lamellae dipping in opposite directions, and arranged into sheets of fibres (2<sup>nd</sup> order lamellae). This pattern is repeated throughout the structure.

In the 19<sup>th</sup> century, 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> order lamellae morphology was used as a criteria to classify crossed-lamellar microstructures into a range of categories. Such classifications are still in use; despite the fact that they do not consider another essential aspect in polycrystalline materials, which is their crystallographic texture. The crystallographic texture refers to the crystallographic axes' orientations in the structure and their relationships, and it has been supposed to be very homogeneous within the crossed-lamellar microstructures, and so it was very poorly studied. However, later studies based on X-ray diffraction, have revealed a wide diversity in the crystallographic texture of the crossed-lamellar microstructures. These studies also proposed that the crystallographic texture can be a reliable phylogenetic tool. Despite the textural variability, the crystallographic studies on crossed-lamellar microstructures are scarce today and focused on few species.

In this thesis, a crystallographic study on 50 crossed-lamellar layers from 44 shells of different species is performed. The studied species have been chosen with phylogenetic criteria, in order to include as many clades as possible within the Phylum

Mollusca. The techniques used are X-ray diffraction (XRD) and electron backscattered diffraction (EBSD), combined with high resolution electron microscopy [Scanning electron microscopy (SEM) and Transmission electron microscopy (TEM)].

The results show that pole figures (PFs) can be grouped into ten different textural patterns depending on the maxima distribution and relationships. These ten patterns are recurrent within the studied species and they can be classified into five groups of crystallographic models. Some of them may derive from others. There are basically two main categories: *a/b/1* models where the crystal orientations share a common *c*-axis orientation (simplified as one *c*-axis) and *a/b/2* models, with two *c*-axes orientations (two *c*-axes). In the latter, each *c*-axis is contained in one of the two sets of alternated 1<sup>st</sup> order lamellae in the structure. Each set is composed of 3<sup>rd</sup> order lamellae dipping in the same direction. *a/b/2* models seem to derive from *a/b/1* models by the splitting and rotation of the crystallographic orientations within the 1<sup>st</sup> order lamellae plane around an *a*- or *b*- common axis. *a/b/2* models are completely unknown crystallographic relationships so far, either for inorganic and organic aragonite and thus probably a consequence of the action of some protein pools.

Between the four classes having crossed-lamellar microstructures, (Polyplacophora, Scaphopoda, Bivalvia and Gastropoda), gastropods present the highest textural diversity, having nine out of the ten patterns recognized. There are some gastropods where the textures differ from one layer to another (Littorinimorpha), and others where it remains constant (Heterobranchia y Neogastropoda). Surprisingly, the textural pattern present in neogastropods is the most widespread in bivalves, while the pattern recognized in Heterobranchia is completely absent in bivalves. In one of the two analysed layers in *Fissidentalium metivieri* (Scaphopoda), the result is the same as in the family Fissurellidae (Vetigastropoda), while the other layer has the texture typical of Vetigastropoda (Trochoidea, Phasianelloidea) and bivalves (Limoida, Veneroida). Those coincidences in the crossed-lamellar crystallography between such distant groups must be explained by evolutionary convergence. On the other hand, within each class, at the level of order or family, there are some crystallographic relationships which may define particular clades. The results presented in this thesis will constitute a reference to classify the different types of crossed-lamellar microstructures in the Phylum Mollusca and will help to solve some uncertain kinship relationships. Furthermore, these results

may help to understand the evolutionary mechanisms of these microstructures where the role of the organic matrix is a key point. A research line worthy of continuing is opened here.





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Los moluscos y sus conchas. Microestructuras

Los moluscos constituyen uno de los Filos más importantes del Reino Animalia, siendo el segundo en número de especies por detrás de los artrópodos (Bouchet, 2006). El Filo Mollusca forma un clado monofilético (Dunn *et al.* 2008) dividido en ocho clases actuales, también monofiléticas (Sigwart & Lindberg, 2015). Estas ocho clases, Caudofoveata, Solenogastres, Polyplacophora, Bivalvia, Gastropoda, Scaphopoda, Cephalopoda y Monoplacophora, contienen organismos con una gran diversidad de planes corporales (*bauplans*). Entre las características más destacables de los moluscos, se encuentra la presencia de partes duras de carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ) segregadas por el tejido blando del animal y que lo protegen del medio externo. Las especies de las clases Caudofoveata y Solenogastres poseen espículas, mientras que las especies de la clase Polyplacophora presentan ocho placas calcáreas. Las cinco clases restantes tienen una concha o exoesqueleto completo, que en algunos grupos se ha interiorizado secundariamente, como en los decapodiformes pertenecientes a la clase Cephalopoda. O incluso, ha desaparecido completamente como en los opistobranquios y en varios grupos de pulmonados (clase Gastropoda).

En cuanto a las relaciones evolutivas entre las distintas clases taxonómicas, los últimos estudios moleculares (Kocot *et al.* 2011; Smith *et al.* 2011; Vinther *et al.* 2012), han mostrado una relación estrecha entre las clases vermiformes y morfológicamente más simples, Caudofoveata y Solenogastres, con la clase Polyplacophora. Estos resultados rechazan las hipótesis morfológicas previas donde las formas vermiformes sin concha formaban un clado independiente (Aplacophora), y los chitones (Polyplacophora) quedaban relacionados con el resto de clases en el grupo Testaria (Haszprunar, 2000; Salvini-Plawen, 2006; Salvini-Plawen & Steiner, 1996). El nuevo clado (Caudofoveata + Solenogastres + Polyplacophora) resultante de los estudios moleculares que rechazan la hipótesis Aplacophora-Testaria, se denomina Aculifera. Pero además, algunos de estos estudios, revelan que la condición ancestral de los moluscos estaría más próxima a la forma de los polioplacóforos que a los Aplacophora, habiendo existido una tendencia evolutiva hacia la pérdida de placas calcáreas (Sutton & Sigwart, 2012; Vinther *et al.* 2012). Como grupo hermano de Aculifera, se encuentra el grupo Conchifera formado por las clases Bivalvia, Gastropoda, Scaphopoda,

Monoplacophora y Cephalopoda. Conchifera es considerado un clado monofilético por varios autores, al compartir la presencia de una concha dura (Nielsen, 2012; Vinther, 2015) y otros caracteres moleculares (Kocot *et al.* 2011; Osca *et al.* 2014; Smith *et al.* 2011). Dentro de Conchífera, las relaciones de parentesco entre las distintas clases, siguen en debate. Por ejemplo, la clase Cephalopoda se agrupa con Monoplacophora en un grupo hermano del resto de Conchifera (Kocot *et al.* 2011; Kocot, 2013; Smith *et al.* 2011), o se relaciona evolutivamente con Aculifera (Vinther *et al.* 2012). El resto de clases, Gastropoda, Bivalvia y Scaphopoda se consideran grupos emparentados (Smith *et al.* 2013), existiendo estudios que relacionan más estrechamente Gastropoda y Bivalvia (Kocot *et al.* 2011). La Figura 1 muestra las relaciones evolutivas entre las principales clases descritas.

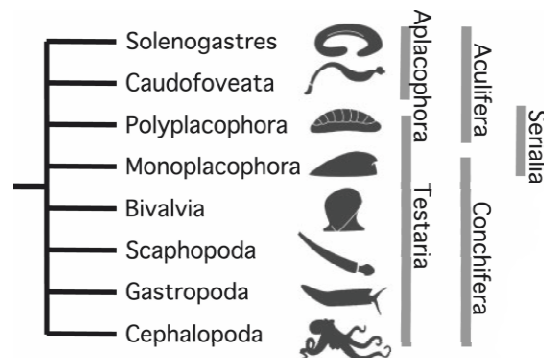


Figura 1. Principales hipótesis en relaciones de parentesco entre las ocho clases actuales de moluscos. Modificado de Sigwart & Lindberg (2015).

Centrándonos en las conchas de los moluscos, su arquitectura varía enormemente existiendo una diversidad morfológica increíble. Esto, junto con su capacidad de preservación las ha convertido en preciados objeto de coleccionismo, decoración y ornamento desde tiempos prehistóricos. Las conchas de algunas especies, incluso, han sido utilizadas como moneda de cambio o divisa por antiguas civilizaciones; como es el caso de *Monetaria moneta* (Linnaeus, 1758). Otros organismos como los cangrejos ermitaños (superfamilias Paguroidea y Anomura), aprovechan esta capacidad de perdurabilidad de algunas conchas de gasterópodos para, tras la muerte del "propietario" o molusco que las originó, utilizarlas como el exoesqueleto de gran dureza que ellos no son capaces de segregar; protegiendo así sus partes blandas.

Por otra parte, los caracteres externos visibles en las conchas de moluscos se han utilizado con criterios de clasificación taxonómica desde tiempos de Linnaeus en el siglo XVIII. Su coloración, forma, relieves, y las marcas que dejan los músculos que fijan el cuerpo blando del animal a la concha (impresiones musculares), son utilizados en las clasificaciones tradicionales del Filo Mollusca.

Internamente, las conchas de moluscos se componen de un número variable de capas cristalinas (normalmente 2-3, hasta 5) dispuestas una encima de otra. Cada capa está formada por diminutos cristales de un polimorfo de carbonato cálcico, que puede ser calcita o aragonito, y hasta un 7% de materia orgánica (matriz orgánica) entremezclada con los cristales (materia orgánica intercristalina) o incluso, secuestrada en el interior de los mismos (materia orgánica intracristalina) (Osuna-Mascaró *et al.* 2015). Como consecuencia de esta composición orgánica y mineral, las conchas de moluscos y sus capas, se consideran materiales híbridos y son referidas con frecuencia como "biominerales" o "*biocomposites*".

Una única concha puede presentar una combinación de capas de calcita y capas de aragonito, donde, las primeras se situarían siempre hacia el exterior. Además, la forma en que cristalizan los cristales de carbonato cálcico, así como la manera en que se agregan y la disposición de la materia orgánica pueden variar de unas capas a otras. Este hecho fue ya observado en el siglo XIX, cuando Moynier de Villepoix (1892) describió cómo la concha de un molusco bivalvo (*Anodonta*) estaba formada por varias capas de diferentes características. Dentro de esta variabilidad existe un número determinado de posibilidades que se repiten en distintas capas de especies diferentes, y a cada una de estas posibilidades se la denomina *microestructura*. El término microestructura, se refiere a la manera en que se agregan los cristalitos y la materia orgánica para formar capas en las conchas de moluscos. En una misma concha, cada capa puede presentar distinta composición mineralógica y distinta microestructura. Las diferentes combinaciones de capas presentes en una misma concha, han sido utilizadas con criterios taxonómicos y evolutivos (Kobayashi, 1969; Shimamoto, 1986; Taylor, 1973) ya que son específicas de cada especie. Esto tiene sentido, ya que tanto el tipo de polimorfo segregado (mineralogía) como la forma en que cristaliza (morfología) están, en última instancia, controladas por determinados genes del animal (Jackson *et al.* 2010).

## 1.2. Cristalización del carbonato cálcico y biomineralización. Maclas.

El carbonato cálcico en las conchas de los moluscos puede cristalizar en forma de calcita y/o de aragonito. Ambos minerales son frecuentes en formaciones geológicas (calcita y aragonito inorgánico), donde no presentan materia orgánica, al contrario que ocurre en las conchas.

Durante la cristalización de la calcita y el aragonito inorgánico, se produce una primera etapa de *nucleación*, donde se genera un pequeño volumen de fase cristalina (núcleo cristalino), seguida de una etapa de crecimiento cristalino donde se van añadiendo átomos y moléculas en la superficie de dicho núcleo, creciendo así el cristal. En el mineral formado, los átomos de calcio y carbonato adoptan posiciones altamente ordenadas en la estructura, formando enlaces químicos estables.

Es frecuente, tanto en calcita como en aragonito inorgánico, la presencia de cristales maclados o maclas cristalinas. Los cristales maclados son aquellos que están relacionados de alguna manera por una operación de simetría. Esta puede ser una operación de reflexión por un plano especular (plano de macla), la rotación alrededor de una dirección cristalina común a ambos cristales (eje de macla) o la inversión respecto a un punto (centro de macla). El origen de los cristales maclados puede ser el propio crecimiento cristalino, pero también cambios en las condiciones físicas y/o químicas del medio, que fuerzan a la estructura a buscar un nuevo estado de equilibrio minimizando la energía de enlace químico. Los planos de macla típicos en la calcita geológica son de tipo (001), (012), (104) y (018). Igualmente, en el aragonito inorgánico siempre aparecen múltiples maclas en el plano (110). Este puede situarse paralelo entre los distintas unidades que la forman (poli-sintéticas) o formando un cierto ángulo (poli-cíclicas).

Se ha comprobado que la adsorción selectiva de distintas sustancias (iones, biomoléculas) durante el crecimiento cristalino puede modificar el hábito y la morfología cristalina de la calcita o del aragonito geológico (Fernández-González *et al.* 1996). En calcita y aragonito de origen biológico, la adsorción de determinadas proteínas durante la biomineralización, puede también modificar la incidencia y el tipo de maclas cristalinas. Así, Pokroy *et al.* (2007) describieron una nueva macla cristalina para la calcita originada por la presencia de una proteína concreta. Massaro *et al.* (2014)

atribuyeron la ausencia de maclas cristalinas en microestructuras aragoníticas como el nácar, a la adsorción de partículas orgánicas en las superficies cristalinas durante el crecimiento. Tales biomoléculas podrían inhibir el crecimiento de ciertas caras cristalinas, resultando energéticamente desfavorable la formación de maclas en la estructura. Por otro lado, Cartwright & Checa (2007) y Checa *et al.* (2008) plantearon la hipótesis de que el nácar se forma a partir de un cristal líquido, precursor de una red cristalina de quitina, donde los átomos muestran bastante orden pero también conservan cierto grado de libertad dentro de la estructura (como en un líquido). En muchos casos las membranas orgánicas podrían actuar como guías evitando el desorden cristalino.

En el caso de las MLCs, al contrario que en el nácar, se ha descrito la presencia de numerosas maclas {110} (Suzuki *et al.* 2012; Kogure *et al.* 2014). En este aspecto las MLCs son más parecidas al aragonito geológico, además al igual que este, sus cristales forman prismas o fibras alargadas. Se sabe muy poco sobre la formación de las MLCs. Nakahara *et al.* (1979) presentaron evidencia de que, al igual que en el nácar la MLC comenzaba a formarse a través de la condensación de materia sólida en un espacio relleno de líquido entre la concha existente y el manto. Posteriormente esta estructura sólida se mineralizaba.

Recientemente, ha aumentado el interés por conocer qué biomoléculas (proteínas, polisacáridos, lípidos) son las que influyen y cómo en los procesos de cristalización de las distintas microestructuras, y por identificar los genes involucrados en la transcripción de las proteínas encargadas del proceso de biomineralización (Jackson *et al.* 2010; Shi *et al.* 2013). La dificultad en esta línea de investigación radica en el hecho de que las proteínas actúan sinérgicamente y, muy posiblemente, junto a otros compuestos en un proceso emergente como es la biomineralización, donde además influyen determinados procesos físicos (Checa *et al.* 2006) y algunos factores externos (Carter, 1980) por lo que resulta extremadamente complejo aislar la función de moléculas u otros factores específicos.

Lo que sí es bien sabido es, que el *manto*, un epitelio especializado que tapiza interiormente la concha, es el encargado principal en el proceso de biomineralización (Figura 2). El manto emite iones o nano-agregados y moléculas orgánicas a una película de líquido intermedia (líquido extrapaleal), creándose las condiciones necesarias para la nucleación y el crecimiento de cristalitos de calcita o aragonito que formarán la concha.

Interviene en el proceso una película orgánica denominada *periostraco*, que se encarga de sellar el compartimento donde se encuentra el líquido extrapaleal (espacio extrapaleal), creando la cámara de biomineralización. De la segregación del periostraco se encarga un grupo de células concretas del borde del manto (entre los lóbulos externo y medio) situadas dentro del surco periostracal. El periostraco, aunque no siempre, puede servir como sustrato para la fijación de los cristalitas que se van formando, los cuales se ensamblan de manera auto-organizada guiados por una matriz orgánica.

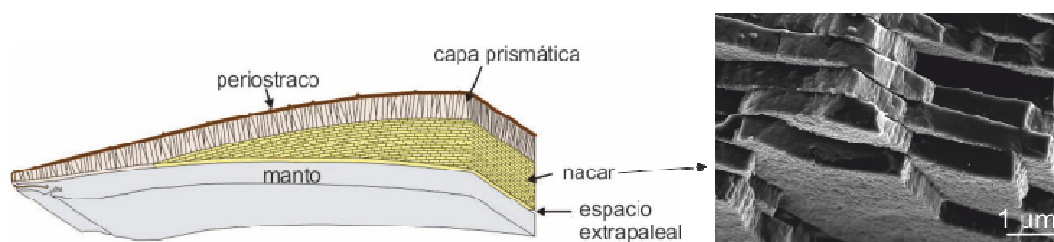


Figura 2. Izquierda: esquema general de las partes implicadas en el proceso de formación de una concha prismato-nacarada. Derecha: vista de la sección de la microestructura nacarada al SEM.

El resultado final del proceso de biomineralización son capas con una determinada microestructura, es decir capas de agregados de cristalitas con ordenaciones cristalográficas altamente controladas. Así pues, afinando la definición, el término **microestructura** se refiere a *un conjunto de cristales y materia orgánica segregados por el propio animal, que se agregan en una configuración determinada a través de procesos físicos y biológicos formando capas continuas dentro de la concha de un molusco.*

El número de microestructuras que forman capas en las conchas de los moluscos es determinado. Se han descrito y clasificado diversas categorías o grupos de microestructuras en base a su composición mineral (calcita o aragonito) y a la morfología de sus cristales (prismas, fibras, agujas, placas, etc.), existiendo así microestructuras calcíticas prismáticas, fibrosas, foliadas, granulares, lamelares, o aragoníticas prismáticas, fibrosas, foliadas, granulares, lamelares y nacaradas, etc. que se encuentran repetidamente en especies diferentes. Bøggild (1930), fue el primero que describió en detalle las distintas microestructuras presentes en los moluscos y mencionó ocho categorías (homogénea, prismática, foliada, nacarada, granulada, lamelar cruzada, lamelar cruzada compleja y miostraco). Aún hoy, el trabajo de Bøggild (1930)



constituye una referencia obligada en la clasificación de microestructuras. Dentro de las distintas categorías, el grupo más conocido debido a su interés económico es el de las microestructuras nacaradas. En las microestructuras nacaradas, el aragonito cristaliza formando placas embebidas en membranas orgánicas. Esta estructura vista en sección al microscopio electrónico presenta un aspecto de muro donde las placas de aragonito se ven como ladrillos (Figura 2).

Sin embargo, pese a ser el grupo de las microestructuras nacaradas el más conocido, el que más éxito evolutivo ha tenido a lo largo de la historia de los moluscos y hoy en día es el más abundante, es el grupo de las **microestructuras lamelares cruzadas (MLCs)**, objeto de esta tesis doctoral.

### **1.3. Microestructuras lamelares cruzadas (MLCs)**

#### **1.3.1. Distribución y origen de las microestructuras lamelares cruzadas en el Filo Mollusca**

Las MLCs son las más extendidas entre los moluscos actuales. Solamente bivalvos y gasterópodos constituyen casi el 90% de todos los representantes del Filo Mollusca y en ellos las MLCs son las más frecuentes, estando únicamente ausentes en cefalópodos y monoplacóforos. Forman el hipostraco de las placas calcáreas de los poliplacóforos, cuya estructura de la concha podría representar la condición plesiomórfica (Haas, 1981; Vinther, 2015). Las MLCs son las únicas microestructuras que forman las conchas de los escafópodos (Carter, 1990). Aparecen en casi todos los grupos de gasterópodos, siendo la única microestructura formadora de conchas en especies terrestres (Heterobranquia). La concurrencia de nácar y MLCs es bastante rara, pareciendo excluirse mutuamente (Carter, 1990; Osuna-Mascaró *et al.* 2014), excepto en la subclase Vetigastropoda (Hedegaard, 1997), en que, si bien el nácar es la microestructura más abundante, las MLCs aparecen formando las capas externas de algunos grupos como Trochoidea, superfamilia en la que el nácar forma capas internas. Dentro de Vetigastropoda, las MLCs también aparecen formando capas internas en Fissurelloidea o incluso conchas completas como en Phasianellidae (Hedegaard, 1997). En bivalvos, las MLCs son predominantes en la subclase Heterodonta, que es la más numerosa; pero también tienen presencia en grupos relativamente alejados de esta

subclase, como Pteriomorpha, Anomalodesmata y Protobranchia, estando sólo ausentes en Paleoheterodonta (Taylor *et al.* 1969; 1973).

En cuanto al origen de las MLCs, sabemos que la radiación de los moluscos se produjo a principios del Cámbrico, apareciendo los principales linajes muy rápida y simultáneamente (Vinther, 2015). Tradicionalmente, el nácar ha sido considerado como carácter plesiomórfico (Salvini-Plawen & Steiner, 1996). Sin embargo, al menos en gasterópodos, las MLCs han sido consideradas ancestrales (Hedegaard, 1997). Estudios más recientes sugieren que la microestructura más primitiva es el aragonito foliado (Vendrasco *et al.* 2011), por lo que es muy probable que, las MLCs hayan aparecido en las distintas clases por evolución convergente. Taylor (1973) también consideró que las MLCs habrían surgido de manera independiente en grupos de bivalvos no relacionados, como Arcoidea y Heterodonta o Limoida-Pectinoida y Myoida.

Por otro lado, existen estudios que correlacionan los tipos de microestructuras presentes en las conchas de moluscos con el ambiente en el que viven, siendo las MLCs típicas de moluscos litorales perforadores y excavadores (Robert & Chamley 1990; Taylor & Layman 1972; Taylor, 1973). Sin embargo, la razón del éxito de las MLCs podría no deberse tanto a las propiedades mecánicas de las MLCs, ya que en esto son superadas por las nacaradas, como a su escaso coste metabólico. El coste metabólico de una microestructura radica principalmente en la cantidad de materia orgánica presente en la microestructura, siendo el gasto en la secreción de CaCO<sub>3</sub> mucho menor (Palmer, 1992). Las MLCs parecen ser las que menor cantidad de materia orgánica presentan (Osuna-Mascaró *et al.* 2014), por lo que el animal necesitaría un consumo menor de energía para su síntesis.

### **1.3.2. Organización general de las MLCs. Lamelas de 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> orden**

Las microestructuras lamelares cruzadas (MLCs) se caracterizan porque sus diminutos cristales de aragonito, que tienen forma de fibras alargadas, se disponen, o incluso se cruzan, en al menos dos inclinaciones opuestas, dejando un cierto ángulo entre ellas. Desde la primera descripción aceptada (Bøggild, 1930), basada únicamente en estudios de microscopía óptica, todos los demás autores que han descrito las MLCs (Dauphin *et al.* 2003; Kobayashi, 1971; Omori *et al.* 1976; Taylor *et al.* 1969; Uozumi *et al.* 1972; Wilmot *et al.* 1992; Wise & Hay, 1968) han mostrado acuerdo en que las

MLCs presentan una estructura jerarquizada (Figura 3). Este tipo de estructura jerarquizada consiste en una serie de bloques paralelos (siempre perpendiculares a las superficies externa e interna de la concha), conocidos en la literatura como *lamelas de 1<sup>er</sup> orden*, que están constituidos por cristalitas con formas de fibras o agujas de unos 500 nm de anchura y longitud variable (decenas de  $\mu\text{m}$ ), conocidos como *lamelas de 3<sup>er</sup> orden*. Las lamelas de 3<sup>er</sup> orden se apilan de tal manera que entre dos lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes, las lamelas de 3<sup>er</sup> orden se disponen a un ángulo de entre 90° y 130°. Entre 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> orden existe un *2<sup>o</sup> orden*, que se corresponde con el conjunto de lamelas de 3<sup>er</sup> orden contenidos en un plano perpendicular a las lamelas de 1<sup>er</sup> orden y paralelo a las superficies mayores de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden. En realidad, las lamelas de 2<sup>o</sup> orden fueron identificadas con anterioridad a las de 3<sup>er</sup> orden ya que su mayor tamaño las hace visibles a menor resolución. Kobayashi (1964) fue quién se percató de que las lamelas de 2<sup>o</sup> orden eran láminas de fibras (lamelas de 3<sup>er</sup> orden) paralelas y posteriormente sugirió que las lamelas de 3<sup>er</sup> orden tenían una ultraestructura policristalina (Kobayashi, 1971). La estructura policristalina de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden ha sido confirmado por diversos autores que han descrito la presencia de maclas cristalinas en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden de distintas especies (Uozumi *et al.* 1972; Kobayashi & Akai, 1994; Kogure *et al.* 2014; Suzuki *et al.* 2010; Wilmot *et al.* 1992)

Existen trabajos donde además de lamelas de 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> orden se incluyen subunidades menores de organización, mencionando un 4<sup>o</sup> y hasta un 5<sup>o</sup> orden. Este es el caso de los cuatro niveles de organización en la MLC de *Strombus decorus persicus* (Pokroy & Zolotoyabko 2003), o los cinco en los gasterópodos *Concholepas concholepas* (Dauphin *et al.* 2003) y *Murex troscheli* (Younis *et al.* 2012). En el último caso, los autores atribuyen niveles de organización por debajo del 3<sup>er</sup> orden a la existencia de maclas cristalinas.

En relación a la distribución de la matriz orgánica se han descrito membranas orgánicas simples únicamente alrededor de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden (Uozumi *et al.* 1972; Nakahara *et al.* 1981). Algunos autores, han mencionado la existencia de materia orgánica alrededor de las lamelas de 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> orden (Kobayashi, 1969; Kobayashi & Samata, 2006). Hayashi *et al.* (2011) no encontraron membranas orgánicas alrededor de las lamelas de 2<sup>o</sup> orden en *Meretrix lamarkii*. Suzuki *et al.* (2010) sugirieron que la distribución de la matriz orgánica podría depender de la especie al no encontrar

membranas alrededor de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden en *Lottia kogamogai* (Patellogastropoda).

Además de la distribución de la matriz orgánica en capas con MLC, su composición es poco conocida. Se ha discutido mucho la existencia de quitina, como en el caso del nácar, o si, en su lugar, las MLCs utilizan colágeno en su formación. Los últimos estudios muestran la existencia de quitina (Suzuki, comunicación oral en BIOMINXIII, septiembre 2015). El trabajo reciente de Osuna-Mascaró *et al.* (2014) describe la presencia de elevadas cantidades de manosa en la MLC del gasterópodo *Strombus gigas*, además de proteínas y polisacáridos.

Cabe mencionar que existe un grupo particular de capas con una estructura lamelar cruzada que fue descrita por Bøggild (1930) y otros autores (Carter & Clark 1985; Taylor, 1973) como capas con microestructura lamelar cruzada compleja donde las lamelas de 3<sup>er</sup> orden se disponen inclinadas en más de dos direcciones. Las lamelas de 1<sup>er</sup> orden son difíciles de identificar ya que presentan formas muy irregulares donde distintos agregados de lamelas de 3<sup>er</sup> orden (lamelas de 2<sup>o</sup> orden) se cruzan en varias direcciones.

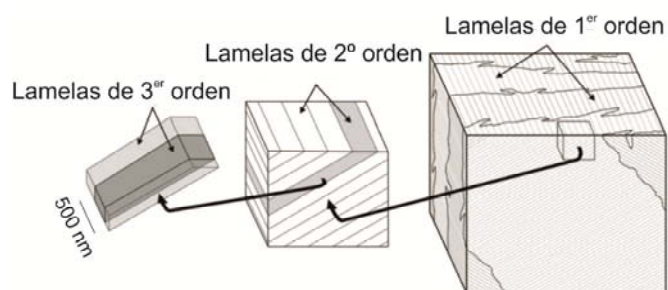


Figura 3. Modelo jerarquizado en lamelas de 3<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 1<sup>er</sup> orden de las MLCs. Modificado de Rodríguez-Navarro *et al.* (2012).

### 1.3.3. Estudios cristalográficos previos

Schmidt (1924) fue el primero que mencionó las MLCs, a las que incluyó junto con las microestructuras homogéneas en un grupo heterogéneo al que denominó estructuras porcelánicas. A continuación, Bøggild (1930) describió ocho categorías microestructurales en moluscos, incluyendo la microestructura lamelar cruzada y la microestructura lamelar cruzada compleja. Bøggild (1930) sirvió de referente para otros

autores (Carter & Clark, 1985; Kennedy *et al.* 1969; Kobayashi, 1964; Kobayashi, 1971; MacClintock, 1967; Taylor *et al.* 1969, 1973) que ampliaron la clasificación de las microestructuras tras la aplicación de técnicas de microscopía electrónica. De entre ellos, la clasificación de Carter & Clark (1985), basada en la composición mineralógica y la morfología de las lamelas de 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> orden, y que recoge hasta 15 subgrupos para las MLCs (Figura 4), es la más extendida actualmente.

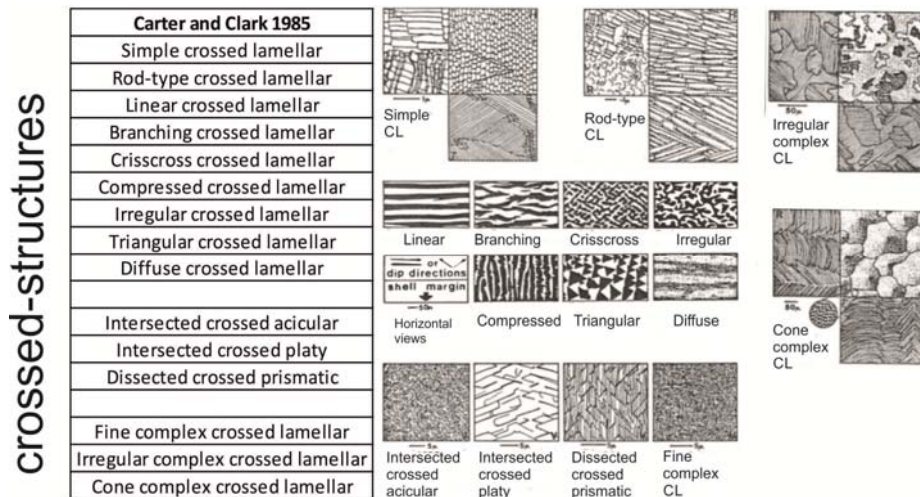


Figura 4. Clasificación de estructuras lamelares cruzadas según criterios morfológicos. Modificado de Carter & Clark (1985).

Sin embargo, para la correcta caracterización de materiales policristalinos, la mineralogía y la morfología no son características suficientes. Existe otro aspecto cristalográfico fundamental, que es la *textura cristalográfica* del material. La textura cristalográfica se puede definir como el grado de ordenación u orientaciones preferentes que presentan los ejes cristalográficos de los distintos granos (orientaciones cristalográficas) en la estructura. La textura cristalina de un material únicamente puede analizarse mediante técnicas de difracción de electrones o/y de rayos X.

Los estudios de difracción realizados sobre MLCs son escasos debido a que durante mucho tiempo se pensó, que la textura cristalográfica de las MLCs era algo homogéneo y sin variabilidad que no merecía demasiada atención. Uozumi *et al.* (1972) aplicaron difracción de área seleccionada a través de microscopía electrónica de transmisión (SAED-TEM) en lamelas de 3<sup>er</sup> orden aisladas (muestras en polvo) de varias especies pertenecientes al orden Arcoida, confirmando la presencia de maclas cristalinas que había sugerido anteriormente Kobayashi (Kobayashi, 1964). Wilmot *et*

al. (1992) realizaron el primer estudio de difracción sobre cortes ultra-finos con MLCs, y concluyeron que dos especies de gasterópodos distintos (*Oliva sayana* y *Littorina littorea*) mostraban diferencias cristalográficas. En la primera especie, las lamelas de 3<sup>er</sup> orden inclinadas en direcciones opuestas se encontraban a ángulos de 45° siendo sus superficies principales caras (001) y las superficies entre lamelas de 1<sup>er</sup> orden, planos (1 $\bar{1}$ 0) (Figura 5). En *Littorina littorea*, las lamelas de 3<sup>er</sup> orden ubicadas en dos lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes están rotadas alrededor de un eje *a* común aproximadamente 50°, siendo sus superficies principales caras (001) (Figura 5). Estos dos modelos fueron obtenidos por (SAED-TEM), con el inconveniente de que esta técnica da información muy local, abarcando unas pocas lamelas de 3<sup>er</sup> orden, por lo que su extrapolación a toda la estructura es arriesgada. Wilmot *et al.* (1992), al igual que Uozumi *et al.* (1972), también estudiaron las lamelas de 3<sup>er</sup> orden aisladas a partir de muestras en polvo tanto en *Oliva sayana* como en *Littorina littorea*, y concluyeron que presentaban maclas cristalinas de distinto tipo: maclas paralelas en *Oliva sayana* y planos de macla en al menos dos direcciones en *Littorina littorea*. Posteriormente Kobayashi & Akai (1994), caracterizaron como plano de macla el {110}, típico de aragonito. También mediante SAED-TEM, Suzuki *et al.* (2010), analizaron la estructura cristalográfica de la MLC de *Lottia kogamogai* (Patellogastropoda) y describieron cómo los ejes *c* de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden se disponen perpendiculares al eje longitudinal de la lamela, esto es, paralelos al plano de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden, pero presentando una inclinación de unos 15°. Además, Suzuki *et al.* (2010) describieron maclas cristalinas {110} paralelas al eje longitudinal de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden de esa especie. Hayashi *et al.* (2011), encontraron maclas cristalinas {110} en tres direcciones diferentes formando unos 60° entre sí en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden de *Meretrix lamarckii* (Bivalvia), y apuntaron a que son diferentes a las descritas por Kobayashi & Akai (1994) o Suzuki *et al.* (2010). Kogure *et al.* (2014), estudiaron la cristalografía interna de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden aisladas en dos especies de gasterópodos, un poliplacóforo y un escafópodo. Estos autores volvieron a describir los dos tipos de maclas en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden. Un tipo de macla donde los planos de macla son paralelos entre sí y al eje más largo de la lamela de 3<sup>er</sup> orden (macla polisintética), y otro que presenta planos de macla en dos o tres direcciones diferentes formando cierto ángulo con el eje principal de la lamela (macla policíclica) (Figura 6). La Tabla 1 recoge los tipos de maclas cristalinas descritas en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden de distintas especies hasta la fecha.

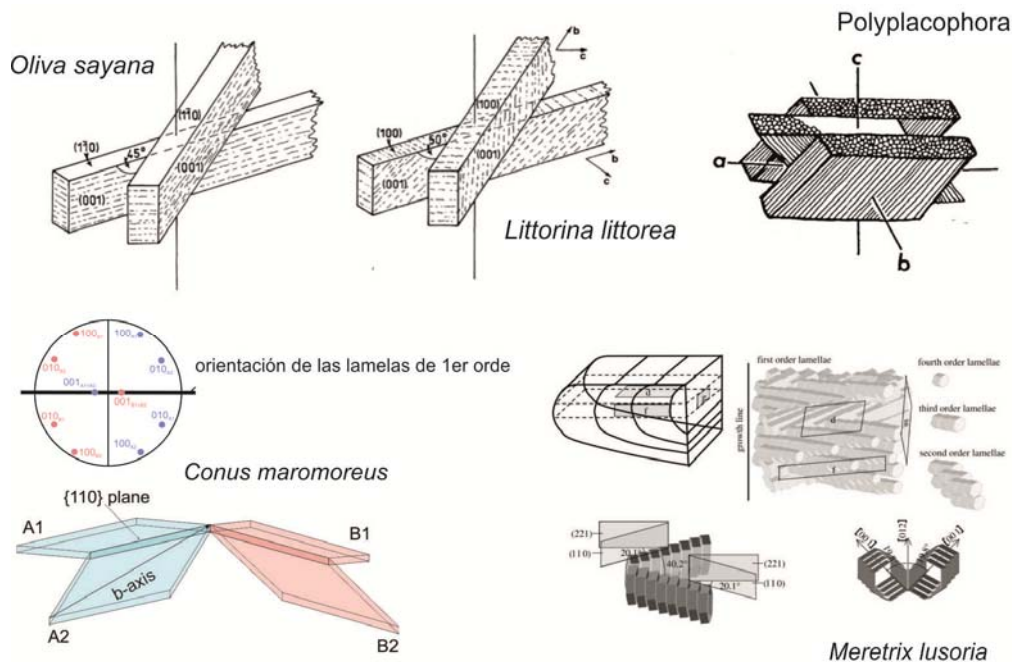


Figura 5. Modelos cristalográficos previos para las MLCs descritos hasta la fecha en distintos taxones. *Oliva sayana* y *Littorina littorea* (Wilmot *et al.* 1992), Polyplacophora (Haas, 1981), *Conus marmoreus* (Rodríguez-Navarro *et al.* 2012) y *Meretrix lusoria* (Hayashi *et al.* 2010).

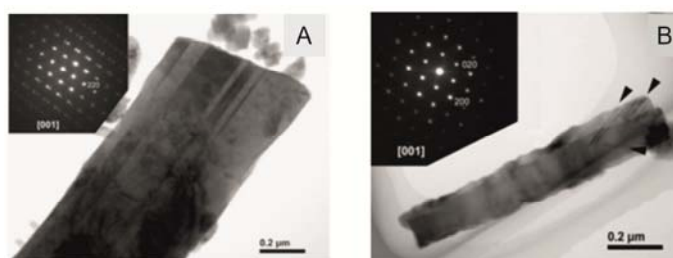


Figura 6. Lamela de 3<sup>er</sup> orden con maclas polisintéticas (A) y con maclas policíclicas (B). Fuente: Kogure *et al.* (2014).

Hedegaard & Wenk (1998) estudiaron la textura cristalográfica de capas con MLCs en una especie de gasterópodo (*Scutellastra tabularis*) y una especie de bivalvo (*Fragum fragum*) mediante difracción de rayos X (DRX). La DRX abarca áreas mucho más extensas que la SAED-TEM, además de resultar mucho más rápida y sencilla la preparación de la muestra. Posteriormente, los mismos autores junto a Chateigner estudiaron la textura cristalográfica en todas las capas con MLCs que forman la concha de un Littorinimorpha, *Cypraea testudinaria* (Chateigner *et al.* 1996) y de las distintas microestructuras presentes en las capas de un alto número de especies de bivalvos y gasterópodos también mediante difracción de rayos X (DRX) (Chateigner *et al.* 1999,

2000, 2010). De igual modo, Ouhenia *et al.* (2008) utilizan DRX para analizar la textura cristalográfica de todas las capas con MLCs en la concha de otro Littorinimopha, *Charonia lampas*. La manera de representar las orientaciones cristalográficas en todos los trabajos mencionados en este párrafo es mediante *figuras de polos* (FPs). Las FPs son proyecciones que muestran las distribuciones tridimensionales de direcciones cristalográficas específicas presentes en toda el área estudiada. Las FPs obtenidas demostraron, que en las MLCs, los ejes cristalográficos de los distintos granos u orientaciones cristalográficas aparecen alineados en orientaciones concretas, presentando lo que se conoce como una textura fuerte con orientaciones preferentes marcadas. Además, las FPs 001 contenían uno o dos máximos más o menos alargados, mientras que las FPs 100 se caracterizaban por tener un máximo (textura de cristal único), dos máximos (macla simple), tres máximos (doble macla), o una distribución de máximos en anillo (textura de fibra). Se encontró casi cualquier combinación de entre las posibles descritas para las FPs 100 y 001 entre las especies analizadas, lo que demostró una diversidad textural considerable. Adicionalmente, los trabajos en los que se analizó más de una capa con MLC dentro de la misma concha (Chateigner *et al.* 1996; Ouhenia *et al.* 2008), demostraron que distintas capas en un mismo individuo podían presentar distinta textura. Aunque los trabajos mencionados analizaron la textura cristalográfica de un número bastante elevado de especies, en ninguno se propuso un modelo cristalográfico.

El primer modelo cristalográfico para la MLC a través de la interpretación de las FPs 100 y 001 obtenidas mediante el análisis por DRX, fue el propuesto para el neogasterópodo *Conus marmoreus* (Rodríguez-Navarro *et al.* 2012). Este modelo (Figura 5) consiste en dos parejas simétricas de cristales maclados (macla simple), según  $\{110\}$ , típico de aragonito. Ambos pares de cristales maclados están inclinados uno con respecto a otro alrededor de un eje perpendicular al plano de macla.

En bivalvos, Hayashi *et al.* (2010), analizaron mediante DRX muestras en polvo, y mediante TEM-SAED las unidades básicas de la MLC en *Meretrix lusoria*. Estos autores describieron un modelo cristalográfico a base de unidades de 4<sup>o</sup> orden que, apiladas por sus caras 001, forman las lamelas de 3<sup>er</sup> orden (Figura 5). Más adelante, Hayashi *et al.* (2011), estudiaron la MLC de la capa externa en *Meretrix lamarckii* a través de SEM-EBSD y TEM-SAED. Los resultados concluyeron que los ejes *c* de las



unidades básicas se encontraban más o menos alineados en la dirección paralela a las lamelas de 1<sup>er</sup> orden mostrando oscilaciones de entre 0° y 50°. Estos autores interpretaron este dato como consecuencia de una cierta oscilación del eje *c* a lo largo de la estructura. La distribución de los ejes *a* y *b* se comenta en el trabajo como aleatoria.

En poliplaceforos se ha descrito, una cristalografía de cristal único con una orientación para cada uno de los ejes cristalográficos (*a*, *b*, *c*) del aragonito (Haas, 1981). Las lamelas de 2° orden no existirían, y los ejes *c* se orientarían en la bisectriz del ángulo entre las dos direcciones de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden (Figura 5). El trabajo de Haas (1981) también postuló que la cristalografía de la concha de los chitones debe considerarse como carácter ancestral en relación con el grupo "Conchifera".

Para escafópodos no existen datos cristalográficos hasta la fecha.

Tabla 1. Datos previos del tipo de macla en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden. PS: macla polisintética con el plano de macla paralelo al eje de elongación de la lamela de 3<sup>er</sup> orden. PC: macla policíclica con un plano de macla paralelo al eje de elongación de la lamela de 3<sup>er</sup> orden y el resto formando ángulos de 60°-120° con este.

Clase	Subclase	Orden/SF	Especie	PS	PC
B	Pterimorphia	Arcoida	<i>Anadara broughtonii</i> (Uozumi et al. 1972)	x	
B	Pterimorphia	Arcoida	<i>Glycymeris yessoensis</i> (Uozumi et al. 1972)	x	
B	Pterimorphia	Arcoida	<i>Glycymeris albolineata</i> (Uozumi et al. 1972)	x	
B	Pterimorphia	Arcoida	<i>Glycymeris kyushuensi</i> (Uozumi et al. 1972)	x	
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Meretrix lusoria</i> (Haysahi et al. 2011)		x
G	Patellogastropoda	<u>Lottioidea</u>	<i>Lottia kogamogai</i> (Suzuki et al. 2010)	x	
G	Caenogastropoda	Neogastropoda	<i>Oliva sayana</i> (Wilmot et al. 1992)		
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Littorina littorea</i> (Wilmot et al. 1992)		x
G	Caenogastropoda	Neogastropoda	<i>Conus betulinus</i> (Kogure et al. 2014)	x	
G	Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Coniglobus mercatorius</i> (Kogure et al. 2014)		x
S	Scaphopoda	Dentaliida	<i>Fissidentalium metivieri</i> (Kogure et al. 2014)		
P	Neoloricata	Chitinoida	<i>Acanthopleura japonica</i> (Kogure et al. 2014)		x

## 1.4. Importancia de las microestructuras lamelares cruzadas

Con lo expuesto en el apartado 1.2.1. Queda claro que las MLCs son las más abundantes entre los moluscos actuales y por tanto las que mayor éxito evolutivo han mostrado. Como se ha comentado la razón principal del gran éxito evolutivo de las MLCs puede ser su escaso coste metabólico, el cual es consecuencia del mínimo porcentaje en materia orgánica de las MLCs si las comparamos con otras microestructuras, como las nacaradas (Palmer, 1992).

Currey & Kohn (1976) concluyeron que las MLCs eran las más adecuadas en conchas que necesitaban crecer rápidamente, pese a que el nácar presenta propiedades mecánicas de dureza y resistencia a la fractura superiores a ellas. Las MLCs aparecen así en conchas de tamaño extraordinario, como *Tridacna gigas* o *Strombus gigas*. Además, son las únicas microestructuras presentes en algunos grupos como los escafópodos o en gasterópodos terrestres moluscos.

### 1.4.1. Propiedades mecánicas

Existen bastantes trabajos que estudian las propiedades mecánicas de MLCs. Estos, se han centrado principalmente en conchas de cónidos (Currey & Kohn, 1976) o de estrómbidos (Hou *et al.* 2004; Kamat *et al.* 2000; Kamat *et al.* 2004; Kuhn-Spearing *et al.* 1996), y recientemente se ha publicado un trabajo que examina las propiedades mecánicas en una especie de bivalvo, *Saxidomus purpurata* (Veneroidea, Heterodonta) (Jiao *et al.* 2016).

De modo general, los cristales de aragonito que forman las MLCs cristalizan formando agujas o fibras de longitud variable (lamelas de 3<sup>er</sup> orden) que se entrecruzan en dos direcciones principales formando un ángulo determinado. Además, estas fibras se organizan de manera jerárquica en unidades de mayor tamaño (lamelas de 2<sup>o</sup> y 1<sup>er</sup> orden) que presentan formas diferentes y contienen un número variable de fibras. Esto convierte a las MLCs en materiales altamente anisotrópicos, en que cualquier fractura encontrará serias dificultades en su propagación.

Las MLCs, como el resto de microestructuras, son materiales compuestos de una parte mineral y una parte orgánica (*biocomposites*). Los materiales compuestos presentan propiedades mecánicas que resultan muy por encima de la suma de las

propiedades mecánicas de las partes que lo forman de manera individual. Sin embargo, parece ser que las propiedades mecánicas de las MLCs no se deben tanto a su composición órgano-mineral como a la disposición organizada de sus componentes, es decir, a la ultraestructura del material. El aragonito que forma las MLCs cristaliza con hábito ortorrómbico y normalmente con una pequeña cantidad de carbonato de estroncio ( $\text{SrCO}_3$ ), dado que los metales alcalinotérreos de tamaño algo mayor que el calcio se introducen fácilmente en la red ortorrómbica del aragonito. Las sales de calcio, como el aragonito, forman cristales anisotrópicos que pueden organizarse en maneras muy diversas. Los átomos de calcio (Ca) y trióxido de carbono ( $\text{CO}_3$ ) se disponen en el aragonito ocupando menos espacio que en la calcita, dado que a cada  $\text{CO}_3$  se unen 3 átomos de Ca en lugar de 2 como ocurre en la calcita, pudiendo empaquetarse más densamente. Esto aumenta la gravedad específica del aragonito y lo hace más resistente a altas presiones (Runnegar, 1989). Otra manera de aumentar la resistencia de un mineral es crecerlo en forma de fibras finas y largas de  $10^2$ - $10^3$  nm de espesor y más de  $10^5$  nm de longitud, evitando así dislocaciones que los haría más débiles (Gordon, 1964). Las lamelas de 3<sup>er</sup> orden que constituyen las unidades básicas de las MLCs crecen formando fibras que además se inclinan de manera opuesta creando resistencia en diferentes direcciones. La presencia de una cierta cantidad de materia orgánica en la estructura la hace más resistente a la deformación plástica y/o fractura que lo que serían sus correspondientes inorgánicos. La particular disposición de las membranas orgánicas contribuye a la resistencia del material (Kamat *et al.* 2000). Con todo esto, para fracturar una concha con MLC se necesita un trabajo de hasta tres órdenes de magnitud mayor que para romper un agregado inorgánico de cristales de aragonito inorgánico (Kamat *et al.* 2000; Kuhn-Spearing *et al.* 1996). Como hemos visto la resistencia de las MLCs se debe tanto a la disposición jerárquica de sus cristales, como a sus orientaciones y a la distribución específica de la materia orgánica. Todo esto produce la disipación de la energía del impacto mediante dos mecanismos principales. Por un lado, en las primeras capas con MLCs, es decir, las que reciben el impacto, aparecen, en lugar de una única fractura, múltiples fracturas que disipan la energía del golpe. Esto ocurre gracias a la organización en agregados de pequeñas lamelas de 3<sup>er</sup> ya que la fractura encuentra más facilidad de propagación entre que a través de ellas. Además, los cambios de dirección de estas lamelas frenan la propagación de las fracturas a través de barreras minerales impuestas por los cambios de orientaciones cristalográficas. Esto además ocurre entre los límites de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes, y a mayor escala

en las transiciones de capa (Kamat *et al.* 2000; Kamat *et al.* 2004). La disposición jerarquizada y en listones que alternan su orientación en las MLCs recuerda a la madera contrachapada (*plywood*), frecuentemente usada en construcción para aumentar la resistencia a la fractura.

Hoy en día existe una importante línea de investigación en torno a las propiedades mecánicas de las MLCs y a la síntesis artificial de materiales con las mismas propiedades.



## 2. OBJETIVOS

## **2. OBJETIVOS**

1. Avanzar en el conocimiento cristalográfico de las MLCs en moluscos profundizando en un aspecto relevante como es la textura cristalográfica. Este primer objetivo se dividirá en tres puntos clave: A, Puesta a punto de la metodología. B, Determinación y clasificación de los distintos grupos texturales. C, Creación de modelos cristalográficos susceptibles de servir como herramienta de identificación y clasificación.
2. Añadir la información obtenida a los últimos árboles evolutivos publicados y comprobar su potencial como herramienta de resolución filogenética.

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO



### 3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

*En primer lugar*, las MLCs, pese a ser las más abundantes dentro de los moluscos actuales y, por tanto, las que han mostrado un mayor éxito evolutivo; son también el grupo peor conocido a nivel cristalográfico. La disposición jerarquizada de sus fibras cristalinas muestra una complejidad tridimensional tan grande que su caracterización en base a imágenes bidimensionales puede resultar confusa, lo que convierte el conocimiento y la descripción de las relaciones entre los cristales (aspecto cristalográfico) en un dato imprescindible.

*En segundo lugar* las *propiedades mecánicas* de resistencia y frenado de la fractura de las MLCs superan enormemente en diferentes aspectos a otros tipos de compuestos inorgánicos. Estas propiedades, han llamado la atención de numerosos grupos de trabajo dedicados a la síntesis y diseño biomimético de este tipo de materiales. Estas propiedades son consecuencia tanto de la composición híbrida del material (órgano-mineral) como de las orientaciones y nuevas relaciones cristalográficas que se dan en la estructura como consecuencia de la porción orgánica. El entendimiento de la cristalografía de este tipo de materiales es básico a la hora de plantearse su síntesis en laboratorio. Además, si se tratase de materiales auto ensamblados, como el nácar, (Cartwright & Checa, 2007), su síntesis no produciría contaminación, por lo que se les considera respetuosos con el medio ambiente.

*En tercer lugar*, el estudio las MLCs puede ayudar a *resolver relaciones de parentesco* dentro de distintos grupos de moluscos ya que son las más abundantes en grupos tan diversos como los gasterópodos y bivalvos pero también aparecen en grupos clave por su posición en los árboles filogenéticos como los escafópodos y poliplacóforos.

## 4. METODOLOGÍA

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Listado de especies

Las **especies elegidas** para este estudio (Tabla 2) se han seleccionado en base a su posición filogenética, intentando en la medida de lo posible, incluir representantes de los principales grupos de moluscos (órdenes y superfamilias) que presentan capas de MLCs dentro de sus conchas. Las muestras analizadas provienen de la colección del grupo de investigación con sede en el Área de Paleontología de la Universidad de Granada (UGR), excepto *Tridacna gigas* y *Cuspidaria nobilis*, aportadas por la colección del proyecto BIVAToL de la Universidad de Cambridge (Reino Unido).

Para referirnos a capas concretas dentro de una concha, se ha tomado en cuenta su posición en la misma. Se ha denominado EL (*external layer*) e IL (*internal layer*), a las capas con MLC que se encuentran en posiciones cercanas al medio externo o en cercanas al cuerpo del animal respectivamente. La designación EL e IL se ha seguido en conchas con más de una capa con MLC. De este modo, si aparecen dos capas con MLC en una misma concha, la más externa se ha nombrado como EL y la más interna como IL. En casos donde aparecen tres o más capas con MLC en una misma concha, las capas intermedias de interés para el estudio, es decir con MLC, se designan como ML (*middle layers*) seguido de números cardinales, siendo la 1 la más próxima a la capa externa (EL). Así podrán existir capas designadas como ML1, ML2 o ML3. Esta notación se tiene en cuenta a la hora de presentar los resultados.

Tabla 2. Lista de especies estudiadas. B: Bivalvia, G: Gastropoda, P: Poliplacophora, S: Scaphopoda.

Clase	Subclase	Orden/SF	Especies
B	Protobranchia	Nuculanoida	<i>Megayoldia thraciaeformis</i> (Storer, 1838)
B	Pteriomorphia	Arcoida	<i>Arca noae</i> (Linnaeus, 1758)
B	Pteriomorphia	Arcoida	<i>Glycymeris glycymeris</i> (Linnaeus, 1758)
B	Pteriomorphia	Arcoida	<i>Glycymeris nummaria</i> (Linnaeus, 1758)
B	Pteriomorphia	Limoida	<i>Lima lima</i> (Linnaeus, 1758)
B	Pteriomorphia	Pectinoida	<i>Plicatula muricata</i> (G. B. Sowerby II, 1873)
B	Pteriomorphia	Pectinoida	<i>Propeamussium sibagai</i> (Dautzenberg & Bavay, 1904)
B	Pteriomorphia	Pectinoida	<i>Spondylus sinensis</i> (Schreibers, 1793)
B	Heterodonta	Carditoida	<i>Eucrassatella decipiens</i> (Reeve, 1842)
B	Heterodonta	Anomalodesmata	<i>Cuspidaria nobilis</i> (A. Adams, 1864)

B	Heterodonta	Lucinoidea	<i>Phacoides pectinatus</i> (Gmelin, 1791)
B	Heterodonta	Myoidea	<i>Pholas dactylus</i> (Linnaeus, 1758)
B	Heterodonta	Myoidea	<i>Corbula sinensis</i> (Bernard, Cai & Morton, 1993)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Laevicardium oblongum</i> (Gmelin, 1791)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Tridacna gigas</i> (Linnaeus, 1758)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Donax deltoides</i> (Lamarck, 1818)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Lioconcha castrensis</i> (Linnaeus, 1758)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Periglypta albocancellata</i> (Huber, 2010)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Circe rivularis</i> (Born, 1778)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Callista chione</i> (Linnaeus, 1758)
B	Heterodonta	Veneroidea	<i>Tellina foliacea</i> (Linnaeus, 1758)
G	Patellogastropoda	Patelloidea	<i>Cymbula saftiana</i> (Lamarck, 1819)
G	Neritimorpha	Cycloneritimorpha	<i>Nerita undata</i> (Linnaeus, 1758)
G	Vetigastropoda	Fissurelloidea	<i>Diodora graeca</i> (Linnaeus, 1758)
G	Vetigastropoda	Fissurelloidea	<i>Fissurella crassa</i> (Lamarck, 1822)
G	Vetigastropoda	Phasianelloidea	<i>Tricolia capensis</i> (Dunker, 1846)
G	Vetigastropoda	Trochoidea	<i>Cittarium pica</i> (Linnaeus, 1758)
G	Vetigastropoda	Trochoidea	<i>Tectus pyramis</i> (Born, 1778)
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Semicassis bisulcata</i> (Schubert & Wagner, 1829)
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Semicassis granulata</i> (Born, 1778)
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Littorina littorea</i> (Linnaeus, 1758)
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Naticarius hebraeus</i> (Martyn, 1786)
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	Naticidae sp.
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Lobatus gigas</i> (Linnaeus, 1758)
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Strombus pugilis</i> (Linnaeus, 1758)
G	Caenogastropoda	Cerithioidea	<i>Turritella duplicata</i> (Linnaeus, 1758)
G	Caenogastropoda	Neogastropoda	<i>Conus marmoreus</i> (Linnaeus, 1758)
G	Caenogastropoda	Neogastropoda	<i>Oliva reticulata</i> (Röding, 1798)
G	Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Achatina fulica</i> (Bowdich, 1822)
G	Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Eobania vermiculata</i> (Müller, 1774)
G	Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Ryssota otaheiana</i> (Férussac, 1821)
P	Neoloricata	Chitonida	<i>Chaetopleura angulata</i> (Spengler, 1797)
P	Neoloricata	Chitonida	<i>Lepidozona pectinulata</i> (Carpenter in Pilsbry, 1893)
S		Dentaliida	<i>Fissidentalium metivieri</i> (Scarabino, 1995)

## 4.2. Técnicas empleadas

Los aspectos a tener en cuenta a la hora de estudiar la cristalografía de materiales policristalinos son fundamentalmente la *forma*, el *tamaño*, las *orientaciones* y las

*relaciones estructurales* de unos cristales con otros. La forma y tamaño de los cristales pueden ser evaluados a través de técnicas de *microscopía* de resolución adecuada. Sin embargo, el estudio de las orientaciones cristalográficas únicamente puede ser abordado a través de técnicas de *difracción*. Por tanto, las técnicas de microscopía y de difracción nos darán información cristalográfica complementaria.

Por lo que sabemos, los cristalitas que forman las MLCs presentan formas de agujas, fibras aplanadas o listones, y tienen un espesor de tamaño sub-micrométrico (unos 500 nm de ancho y 200-300 nm de alto), pudiendo alcanzar decenas de micras de longitud. Estos cristalitas o unidades básicas se agrupan en niveles mayores que pueden llegar a ser visibles a simple vista (lamelas de 1<sup>er</sup> orden), pero también sabemos que presentan una ultraestructura de maclas cristalinas de tamaño nanométrico (Kobayashi & Akai, 1994; Kogure *et al.* 2014). De tal manera que el tamaño del cristalito pueda ser de unos pocos nanómetros de anchura (Figura 7).

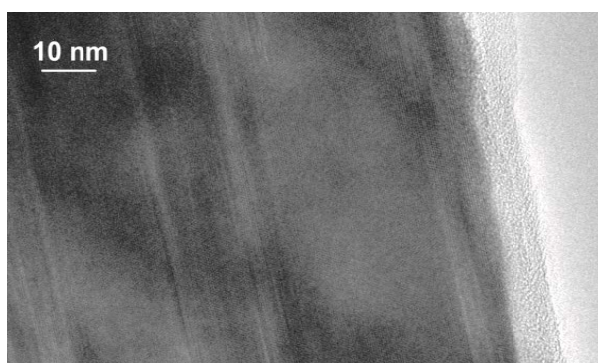


Figura 7. Maclas cristalográficas de menos de 5 nm de espesor en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden de *Arca noae*.

#### **4.2.1. Microscopía óptica, electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)**

##### Microscopía óptica

En primer lugar, se ha utilizado un microscopio binocular Nikon SMZ1000 para determinar la orientación de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. Las lamelas de 1<sup>er</sup> orden se aprecian fácilmente debido a la diferencia de contraste que se produce por un cambio en la difracción de la luz, como consecuencia de los cambios de orientación entre las lamelas de 3<sup>er</sup> orden que componen dos lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes. Así pues, se observan una serie de bandas oscuras y claras que se alternan (Figura 8).

La dirección en que se alargan las lamelas de 1<sup>er</sup> orden es un dato importante, pues nos permitirá tener una referencia útil a la hora de analizar las orientaciones cristalográficas de las subunidades más pequeñas (las lamelas de 3<sup>er</sup> orden). Por tanto, la microscopía óptica nos será útil a la hora de preparar las muestras que analizaremos con DRX.

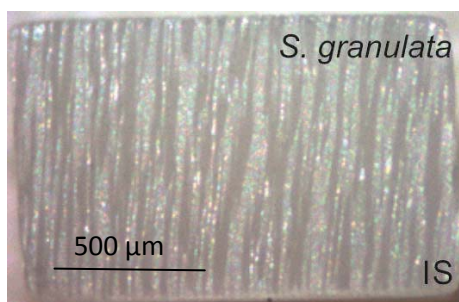


Figura 8. Superficie interna pulida de *Semicassis granulata*. Se observan una serie de bandas claras y oscuras que se corresponden con las lamelas de 1<sup>er</sup> orden.

#### Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) nos permite identificar morfologías y tamaños con alta resolución, pudiendo funcionar acopladas a técnicas de difracción de electrones (*Electron backscattered diffraction*: EBSD), que permitan determinar las orientaciones cristalográficas.

- *Preparación de muestras para SEM*

*Fracturas en fresco y pulidas*: Con una herramienta *Dremel Multi-max* equipada con un disco de corte se han realizado incisiones a modo de guía para dirigir la fractura en las direcciones deseadas; ya que debido a la anisotropía de la estructura, el corte sin dirigir resulta altamente impredecible pudiendo no contener el área de interés para el estudio. Las zonas de interés son aquellas que contienen la totalidad de las capas de cada concha a fin de establecer la posición correcta de las capas con MLCs. En conchas enrolladas en espiral como las de gasterópodos se han seleccionado fracturas provenientes de la última vuelta de la espira, mientras que en conchas de bivalvos se han seleccionado fracturas de la parte interior a la línea paleal, por contener ésta tanto capas internas como externas. En poliplacóforos y escafópodos se han seleccionado zonas de concha que incluyeran todas las capas presentes. La materia orgánica que

podiera dificultar la observación se ha eliminado por inmersión en lejía comercial ( $\text{NaClO}$  4%) durante dos minutos. El resultado son trocitos de concha de alrededor de  $1\text{ cm}^2$ , con al menos un lado mostrando la fractura en fresco sin cantidades de materia orgánica que dificulte la observación. Algunas de estas superficies fracturadas se han pulido para su observación utilizando carburo de silicio ( $\text{SiC}$ ) en polvo de grano 1000. Las rayas en la superficie resultantes tras el pulido, se han eliminado con EDTA al 4%, pH 7.3, a temperatura ambiente.

- *Observación de las muestras en SEM*

Se han observado todas las fracturas de manera preliminar con un microscopio electrónico de barrido de sobremesa Phenom Pro, con voltaje de aceleración 15 kV, ubicado en el Departamento de Paleontología de la UGR. Para observaciones con mayor detalle y resolución se han usado microscopios ambientales (ESEMs) FEI Quanta 400, uno ubicado en el Instituto Fritz-Haber (FHI) de la Sociedad Max Planck (Berlín, Alemania) y otro en el Centro de Instrumentación Científica (CIC, UGR). Algunas fracturas se han cubierto con carbón (evaporador Hitachi UHS) para su observación en el microscopio SEM de emisión de campo (FESEM) Zeiss AURIGA Crossbeam Station ubicado en el CIC de la UGR.

#### *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)*

El TEM es la única herramienta de resolución suficiente para la observación de maclas cristalinas presentes en la estructura. Estas son visibles por transparencia en muestras de espesor ultra fino (normalmente entre 50-100 nm). Pero además también permite aplicar difracción de electrones sobre la muestra (SAED-TEM) permitiendo obtener información de las orientaciones cristalográficas.

- *Preparación de muestras para TEM*

*Muestras en polvo:* Algunos fragmentos de concha que contenían capas con MLCs fueron reducidos a polvo con un mortero de ágata a fin de evitar posibles contaminaciones. Después se eliminó la materia orgánica con  $\text{NaClO}$  al 1% durante 1 minuto y seguidamente se efectuaron múltiples lavados con agua destilada para eliminar cualquier resto de  $\text{NaClO}$ . El polvo resultante se sometió a un baño de ultrasonidos en etanol absoluto durante 40 s para dispersar por la superficie del líquido los diminutos

granos, que se presupone son lamelas de 3<sup>er</sup> orden aisladas o en pequeños agregados, y que flotan por tensión superficial. Estos granos se pescaron en una rejilla de cobre dotada con película de carbono para microscopía electrónica de transmisión que posteriormente fue cubierta con carbono para dotar la muestra de estabilidad, utilizando el mismo evaporador antes mencionado, ubicado en el CIC de la UGR, o un Cressington Coater, que se encuentra en el FHI de Berlín.

*Secciones ultra finas:* Para la preparación de secciones ultra-finas, las zonas y capas de interés fueron aisladas y posteriormente embebidas entre dos moldes de sílice que actúan como guía durante el pulido a 10  $\mu\text{m}$  mediante *lapping* films de diamante de hasta 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de grano. Para pulir la muestra es necesario pegar con una resina soluble en acetona el trocito de concha que contiene la MLC embebido a modo de "sandwich" entre los moldes de sílice en un porta muestras que deje pasar la luz. De esta manera puede seguirse la evolución del pulido hasta que los moldes de sílice empiezan a adquirir transparencia de manera uniforme. En ese momento con otra resina no soluble en acetona se pega un disco hueco y plano de aluminio que servirá para manejar la sección ultra-fina durante los análisis. Una vez pegado el disco, se sumerge el porta-muestras transparente que contiene la muestra ultra-fina con el disco pegado en la superficie en acetona, de manera que el disco con el corte se separan. El disco con la sección ultra fina se introduce el adelgazador iónico PIPS 691 (2x) del FHI (Berlín) hasta que alcanza un espesor nano-métrico. Esto ocurre en los bordes que quedan a modo de "playa" alrededor del agujero que produce el bombardeo iónico y que al microscopio se ven como bandas de colores debido a la difracción de la luz (Figura 9). Este espesor es necesario para la observación bajo el TEM.

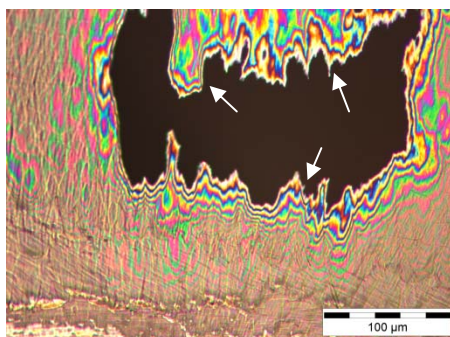


Figura 9. Vista al microscopio óptico de un corte ultra fino de una capa con MLC en *Spondylus sinensis* tras el bombardeo de iones en el adelgazador iónico. Se observa en el centro el agujero dejado por los



iones y un borde de playa alrededor, indicado con flechas, que se corresponden con las zonas de espesor nano-métrico que se observarán bajo el TEM.

- *Observación de las muestras en TEM*

El examen de las rejillas que contenían los cristalitos se llevó a cabo en un TEM Zeiss Libra 120 plus SMT (CIC, UGR), con un voltaje de aceleración de 80 kV, o en un TEM-FEG Phillips CM200 (FHI, Berlín) con un voltaje de aceleración de 200 kV.

Los cortes ultra finos se observaron en el FHI de Berlín utilizando un TEM Philips CM200 LaB6 o un TEM-FEG Phillips CM200, ambos con una aceleración de voltaje de 200 kV.

#### **4.2.2. Métodos de difracción y figuras de polos. Difracción de rayos X. EBSD**

En cuanto a las orientaciones de los cristales individuales, al ser un material poli-cristalino, podrían estar distribuidas aleatoriamente o estar agrupados en mayor o menor grado en una serie de orientaciones preferentes. Esto último es lo que ocurre en las MLCs (Chateigner *et al.* 1999; Chateigner *et al.* 2010; Rodríguez-Navarro *et al.* 2012). Como ya se ha dicho, en estos casos se dice que el agregado cristalino presenta orientaciones preferentes o textura, es decir, las orientaciones cristalográficas no son al azar.

La mejor manera de ilustrar y describir las orientaciones preferentes en un material poli-cristalino es a través de FPs. Éstas fueron utilizadas por primera vez en 1924 por el alemán Weber en el estudio de metales. Como se mencionó en el apartado 1.2.3, las FPs son proyecciones donde se representan las distribuciones tridimensionales de direcciones cristalográficas (*hkl*) específicas o polos, en dos dimensiones (Figura 10). Las FPs que presentan una acumulación de intensidades en direcciones específicas (máximos en la figura de polos), se corresponden con materiales de los que se dice, presentan textura.

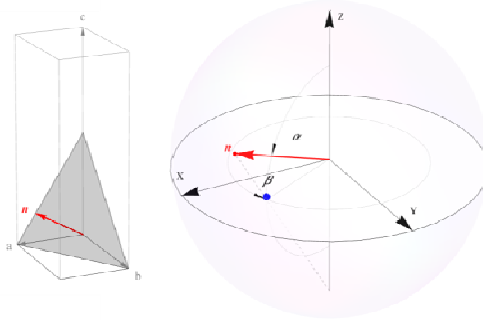


Figura 10. Izquierda: Ejemplo de cristal con simetría ortorrómbica y plano cristalográfico  $(hkl) = (112)$  expresado en índices de Miller. El vector  $n$  (en rojo) representa la normal al plano  $(112)$  (polo). Derecha: proyección estereográfica del vector normal  $n$  en el plano  $x$ - $y$  (punto azul). La posición angular del vector  $n$   $(\alpha, \beta)$  se corresponde con la posición  $(\chi, \phi)$  en las medidas con goniómetro de geometría euleriana.

Las FPs obtenidas por difracción son necesarias para caracterizar las orientaciones cristalográficas preferentes y su influencia en la anisotropía y propiedades mecánicas de materiales con un índice textural alto (Rodríguez-Navarro, 2007), así como para entender el desarrollo de materiales policristalinos altamente organizados como son las microestructuras (Checa & Rodríguez-Navarro, 2005) y, entre ellos, las MLCs.

El registro de las figuras de polos puede hacerse de manera eficiente utilizando un detector de área, disponible en la mayoría de difractómetros de cristal único modernos. Este tipo de detector puede registrar la variación de intensidad a lo largo de varios anillos de Debye–Scherrer asociados con diferentes reflexiones de Bragg (Figura 11) (Rodríguez-Navarro, 2007). También existen difractómetros específicos para muestras poli-cristalinas que miden la variación de intensidad de una reflexión  $hkl$  dada en todas las orientaciones posibles de la muestra (Klug & Alexander 1974; Snyder *et al.* 1999), como es el caso de los difractómetros de geometría euleriana (Figura 12). Asimismo, es posible recalcular FPs a través de los datos obtenidos mediante EBSD que se verá más adelante.

Casi todas las FPs calculadas en este estudio lo han sido mediante DRX excepto en *Tricolia capensis* y *Tectus pyramis*, en los que se han utilizado técnicas de EBSD debido al poco grosor de sus capas con MLCs. En cuatro especies (*Achatina fulica*, *Diodora graeca*, *Fissurella crassa* y *Fissidentalium metivieri*) se han calculado las FPs por ambos métodos (DRX y EBSD).

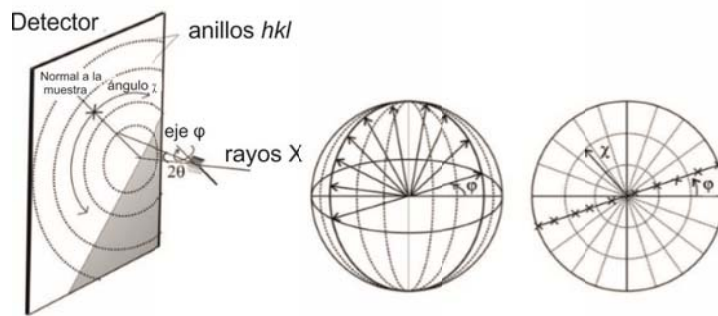


Figura 11. Proceso de análisis por reflexión de rayos X. De izquierda a derecha: Esquema de los anillos de Debye registrados en un detector de área, distribución de polos para un anillo  $hkl$  de un ángulo  $\varphi$  dado y proyección de los polos que contribuyen a un anillo  $hkl$  en una figura de polos.

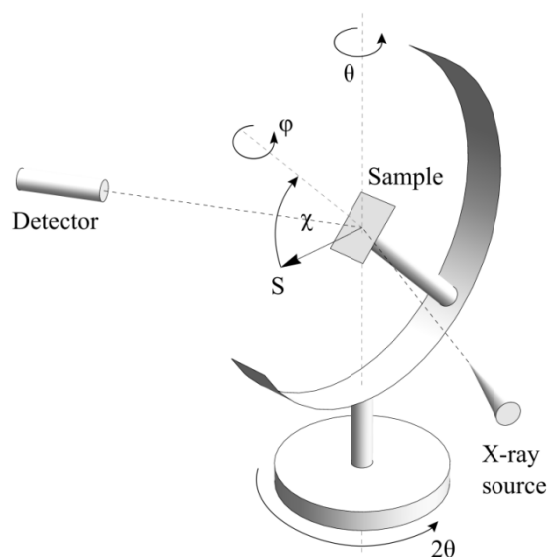


Figura 12. Esquema de arquitectura básica de un goniómetro de cuatro círculos de geometría euleriana. El eje de la fuente de rayos X, eje del detector y vector de difracción  $S$  a lo largo del plano horizontal son definidos por los ángulos  $\theta$  y  $2\theta$ . La posición de la muestra con respecto al vector de difracción  $S$  se describe mediante el ángulo de inclinación  $\chi$  y el ángulo de rotación  $\varphi$ .

### Difracción de rayos X (DRX)

Los análisis de DRX se han llevado a cabo tanto en el CIC (UGR) como en el Instituto de Metalurgia y Ciencias de los Materiales (IMIM) de Cracovia (Polonia).

- *Preparación de la muestra para DRX*

El tamaño de las muestras requerido es diferente según el aparato utilizado, unos 4 mm de diámetro en el caso del difractómetro utilizado en el CIC, y 1 cm<sup>2</sup>, en el de las muestras analizadas en el IMIM. La superficie a analizar debe estar perfectamente pulida a fin de evitar absorciones indeseadas del haz de rayos X y es conveniente que no tenga bordes que puedan ensombrecer el análisis. A este fin se ha utilizado papel de lija de grano de 2 μm. Para favorecer el deslizamiento de la muestra en el papel de lija se ha pasado previamente por la zona donde se pasará el trocito de concha una pastilla de jabón comercial natural. En *Tridacna gigas*, *Strombus pugilis*, *Lobatus gigas*, *Oliva reticulata*, *Fissidentalium metivieri* y *Semicassis bisulcata* se han medido varias capas con MLCs presentes en la misma concha utilizando el mismo método de pulido exponiéndose las capas subyacentes tras analizar las superiores.

- *Parámetros empleados en los análisis por DRX*

El equipo del CIC es un difractómetro Bruker Smart Apex con detector de área de tipo CCD (Charge-Coupled Device). Se trata de un difractómetro de cristal único con goniómetro de cuatro círculos de geometría Kappa (Figura 13) con ángulo K fijo (54,74°). La radiación utilizada en este caso fue Mo Kα ( $\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$ ) con un voltaje de aceleración de 50 kV y una corriente del filamento de 30 mA. Las muestras se colocaron sobre círculos de vidrio de 1 cm de diámetro adosados al porta-muestras con la superficie de interés perpendicular al eje de giro ( $\varphi$ ) y orientadas de forma que la dirección de crecimiento coincidiera con  $\varphi = 0$ . Todo el proceso de adquisición de datos se automatiza mediante una serie de comandos (SMART software) que indica al goniómetro la posición de los cuatro ángulos ( $\varphi$ ,  $\omega$ K,  $2\theta$  y K) en cada momento (Figura 10). Los ángulos  $\omega$ K,  $2\theta$  y K permanecen constantes mientras que  $\varphi$  avanza desde 0° 180° en pasos de 5°. El resultado es una colección ordenada de 36 patrones de difracción (*frames*), uno para cada valor de  $\varphi$  considerado, que usualmente contiene las posiciones de las reflexiones más intensas del aragonito (111, 021, 012, 221, 113). Una vez que tenemos los patrones de difracción, estos son procesados por el programa informático XRD2DScan diseñado a tal efecto por A. B. Rodríguez-Navarro (Depto. Mineralogía y Petrología, UGR) (Rodríguez-Navarro 2007). El primer paso para procesar los datos consiste en localizar el centro y la posición de los anillos de Debye-Scherrer en los patrones de difracción. Una vez definido el centro que mejor se adapta a los anillos de difracción, el programa genera un difractograma similar a otro realizado con el método

de polvo, integrando la intensidad de los píxeles equidistantes del centro y representándola frente al ángulo  $2\theta$  (calculado a partir de la distancia del anillo al centro). A partir de estas medidas, el software es capaz de calcular las figuras de polos correspondientes con la intensidad medida, aunque no de generar figuras de polos adicionales. Por ello, la posibilidad de calcular las figuras de polos 100, 010 y 001, que son las más fáciles de relacionar directamente con los ejes  $a$ ,  $b$  y  $c$  del aragonito queda en función de la calidad de dichas intensidades  $hkl$  en el espectro experimental.

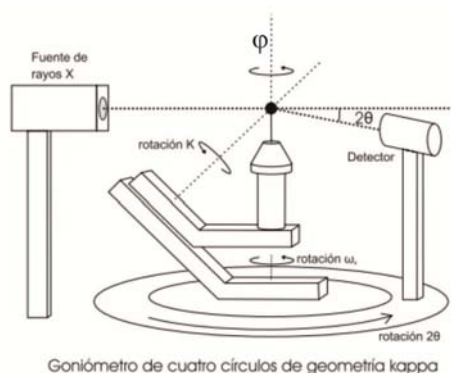


Figura 13. Esquema de arquitectura básica de un goniómetro de cuatro círculos de geometría Kappa. En la geometría Kappa no existe el anillo cerrado  $\chi$  como en el de geometría euleriana, pero su función es sustituida por los ejes  $K$  y  $\omega$ . Los movimientos según los ejes  $\varphi$  y  $2\theta$  son idénticos a los de la geometría euleriana.

El equipo utilizado en el IMIM (Cracovia) ha sido un D8 Bruker, específico para materiales policristalinos. Este aparato está equipado con goniómetro de cuatro círculos de geometría euleriana, con haz paralelo del tipo PolyCap y un portamuestras especial que desplaza la muestra a lo largo de x-y-z (Figura 12). En este caso la radiación utilizada fue  $\text{CoK}\alpha$  ( $\lambda = 1.7902\text{\AA}$ ). Todas las orientaciones cristalográficas fueron analizadas utilizando los parámetros de la red ortorrómbica del aragonito biogénico de Caspi *et al.* (2005) ( $a_0 = 4.96183\text{\AA}$ ,  $b_0 = 7.96914\text{\AA}$ ,  $c_0 = 5.74285\text{\AA}$ ). La radiación empleada requiere una anchura de muestra de 0,1 mm para producir un espectro con resolución suficiente y sin intensidades superpuestas. Las reflexiones registradas más intensas fueron las correspondientes a los picos 031, 112, 021 y 111 tras 642 posiciones medidas. Estas reflexiones se transformaron en figuras de polos a fin de analizar las orientaciones cristalográficas en la estructura con el software LaboTex package y el método *Arbitrarily Defined Cells* (ADC) (Pawlik, 1986). Se calcularon las figuras de polos completas 001, 010, 100 por ser las más fácilmente relacionables con los ejes

cristalográficos del aragonito. El índice de textura ( $J_n$ ) también se ha calculado al ser un indicador de la magnitud en las orientaciones preferentes. Un valor de  $J_n = 1$  corresponde a un cristal individual ideal, mientras que un valor  $J_n = 0$  corresponde a una distribución completamente aleatoria de orientaciones cristalográficas (Bonarski, 2006).

### Difracción de electrones retrodispersados (EBSD)

El EBSD (*Electron Back-Scattered Diffraction*) también se conoce como difracción retrodispersada de Kikuchi (*Backscattered Kikuchi Diffraction, BKD*) ya que se basa en formación, recogida y análisis de líneas de Kikuchi. En el análisis por EBSD, un haz de electrones estático interactúa con la muestra poli-cristalina que se coloca inclinada  $70^\circ$  con respecto a la horizontal. Estos electrones son detectados por una pantalla de fósforo a la que son fluorescentes, produciendo un patrón de difracción característico (líneas o bandas de Kikuchi) en cada punto medido. Del análisis de estas bandas de Kikuchi se extrae información relativa a la naturaleza del punto analizado (identificación de fase y orientación tridimensional). Esto se consigue mediante la indexación del patrón a través de un software específico. Lo que se obtiene finalmente es un mapa donde las orientaciones cristalográficas similares se muestran con colores parecidos. Se llaman granos a las regiones de la muestra que presentan prácticamente la misma orientación cristalográfica y aparecen separados por bordes en el mapa de calidad. Estos granos pueden utilizarse para estudiar las orientaciones cristalográficas preferentes o textura de la muestra calculando las correspondientes figuras de polos. Los detectores EBSD suelen montarse sobre un SEM, que proporciona el haz de electrones necesario para el funcionamiento del sistema. Esta técnica permite caracterizar materiales poli-cristalinos uniendo directamente datos morfológicos de la microestructura (imágenes de electrones secundarios o retro-dispersados) con las orientaciones cristalográficas o textura. Asimismo se pueden analizar capas de espesor muy fino, que no son posibles de analizar mediante DRX debido a los requerimientos en la preparación de la muestra.

- *Preparación de la muestra para EBSD*

Las fracturas de interés para EBSD, fueron embebidas en resina epoxi y pulidas en el CIC. Las observaciones se realizaron bajo el microscopio electrónico de barrido

FEI Versa 3D FEG SEM equipado con una cámara Hikari EBSD camera detector de alta sensibilidad que se encuentra en el Centro de Nuevos Materiales (ACMiN) perteneciente a la Universidad de Ciencia y Tecnología (AGH) de Cracovia (Polonia).

- *Parámetros empleados en el análisis por EBSD*

Los análisis de EBSD se realizaron en bajo vacío, bajo una atmósfera de vapor de agua. Seleccionamos un voltaje de aceleración  $\sim 10$  kV, y una presión de gas de menos de 40 Pa, ya que estos parámetros dieron los mejores resultados. Debido a la gran frecuencia de maclas en la estructura, el tamaño de grano es  $< 100$  nm (a veces  $< 10$  nm) y esto dificulta la adquisición de patrones de calidad (indexables) al difractarse muy poca cantidad de electrones o abarcar el haz ( $\sim 50$  nm) más de una orientación cristalográfica (Figura 14). Consecuentemente se han utilizado índices de confianza más bajos de lo habitual; entre 0.04 y 0.06. El software utilizado para la adquisición de datos y su posterior análisis fue TSL OIM 7.0 software. Las mismas figuras de polos que las calculadas mediante DRX, fueron calculadas con EBSD, esto es 100, 010 y 001 por su relación directa con los principales ejes cristalográficos del aragonito.

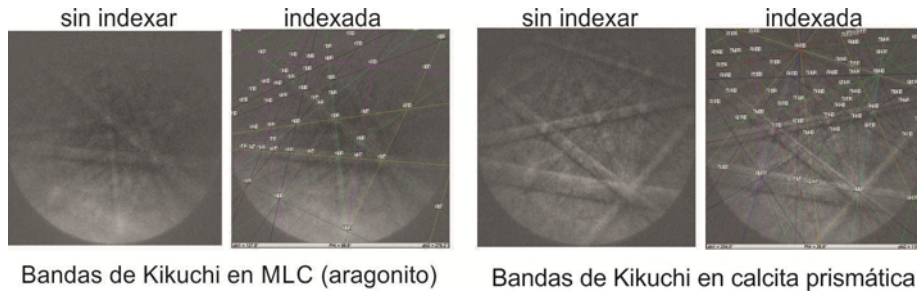


Figura 14. Bandas de Kikuchi en aragonito y calcita biológica

## 5. RESULTADOS



## 5. RESULTADOS

### 5. 1. Estructura jerárquica de las MLCs

Las fracturas que se generan durante la preparación de la muestra, tienden a producirse a lo largo de las fronteras entre lamelas de 1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> orden. Morfológicamente, el aspecto de estas fracturas al SEM resulta muy similar en las distintas especies (Ver Figura 15 y todas las imágenes en páginas A1-A4, excepto I-L en A2, del Anexo 1). En todos los casos, las lamelas de 1<sup>er</sup> orden son perpendiculares a la superficie de la concha y las transiciones entre capas (del exterior al interior de la concha) se caracterizan por cambios de orientación de unos 90°, pasando las lamelas comarginales (perpendiculares a la dirección de crecimiento de la concha) a radiales (paralelas a la dirección de crecimiento de la concha) y viceversa. La estructura general típica de las MLCs en varios niveles de organización (lamelas de 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>er</sup> orden), es visible en casi la totalidad de los casos. Los ángulos que forman las lamelas de 3<sup>er</sup> orden en dos lamelas de 1<sup>er</sup> orden alternas han sido medidos, y están comprendidos entre 90° y 150° (Tabla 3). Estos ángulos pueden variar en las distintas capas con MLC de una misma concha, e incluso, dentro de una misma capa (Figura 15.C).

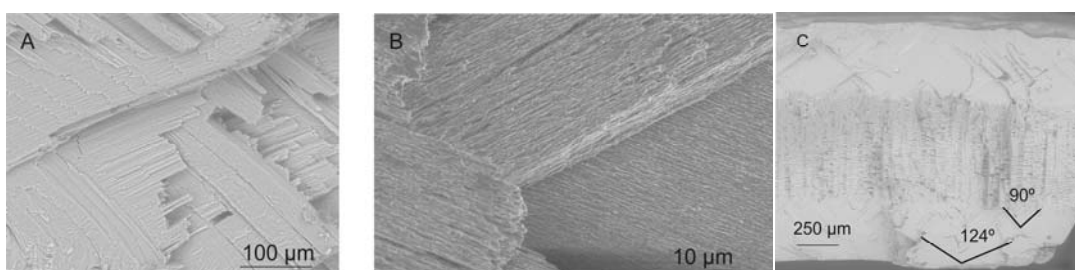


Figura 15. Imágenes de SEM de las fracturas de la concha de gasterópodos A) *Oliva reticulata* (Neogastropoda), B) *Naticarius hebraeus* (Littorinimorpha), C) *Semicassis bisulcata* (Littorinimorpha). En C se indican los ángulos entre lamelas de 3<sup>er</sup> orden en distintos puntos.

Tabla 3. Ángulo (A°): Ángulo, expresado en grados, entre las lamelas de 3<sup>er</sup> orden en dos lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes.

Especie (capa)	Ángulo (A°)	Especie (capa)	Ángulo (A°)
<i>Glycymeris glycymeris</i> (IL)	106°	<i>Turritella duplicata</i> (IL)	110°
<i>Arca noae</i> (EL)	123°	<i>Littorina littorea</i>	139°
<i>Glycymeris nummaria</i> (EL)	95°	<i>Diodora graeca</i> (IL)	135°

<i>Pholas dactylus</i> (IL)	126°	<i>Diodora graeca</i> (IL) EBSD	92°
<i>Lima lima</i> (IL)	130°	<i>Fissurella crassa</i> (IL)	119°
<i>Laevicardium oblongum</i> (IL)	106°	<i>Fissurella crassa</i> (IL) EBSD	102°
<i>Lioconcha castrensis</i> (EL)	107°	<i>Cymbula safiana</i> (IL)	148°
<i>Circe rivularis</i> (EL)	108°	<i>Conus marmoreus</i> (IL)	117°
<i>Semicassis bisulcata</i> (3ML)	106°	<i>Oliva reticulata</i> (EL)	111°
<i>Semicassis bisulcata</i> (IL)	131°	<i>Fissidentalium metivieri</i> (EL/IL)	107°/130°
<i>Semicassis granulata</i> (ML)	96°	<i>Fissidentalium metivieri</i> (eL) EBSD	100°
<i>Naticarius hebraeus</i> (IL)	124°	<i>Cittarium pica</i> (EL)	97°
<i>Achatina fulica</i> (EL)	120°	<i>Tectus pyramis</i> (EL)	144°
<i>Ryssota otaheiana</i> (ML)	120°	Naticidae sp. (EL)	98°
<i>Eovania vermiculata</i> (2ML)	117°		

## 5.2. Ultra-estructura de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden. Maclas

En las imágenes de TEM (Figura 16 y páginas A2, A12, A13 y A16 del Anexo 1), tanto de lamelas de 3<sup>er</sup> orden aisladas como de cortes ultrafinos, se aprecia la presencia de abundantes maclas cristalinas en las MLCs. Concretamente, se han encontrado los dos tipos de maclas ya descritos en la literatura las cuales se clasifican dependiendo de si los planos de macla {110} son paralelos entre sí y al eje más largo de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden (maclas polisintéticas; Figura 16.a), o forman ángulos entre sí y con el eje de la lamela de 3<sup>er</sup> orden de unos 60° o 120° (macla policíclicas; Figura 16.b). La Tabla 4 recoge una lista de especies examinadas con TEM y el tipo de macla presente. Los tipos de maclas descritas por otros autores en algunas especies se recogen en la Tabla. 1 del capítulo 1. Comparando estos resultados con los de la presente tesis doctoral, se aprecia que aparece el mismo tipo de macla dentro de las especies pertenecientes al mismo orden. Adicionalmente, destaca la presencia de ambos tipos de maclas de manera simultánea (dentro de la misma concha) en Heterodonta, Vetigastropoda, Littorinimorpha y Heterobranquia.

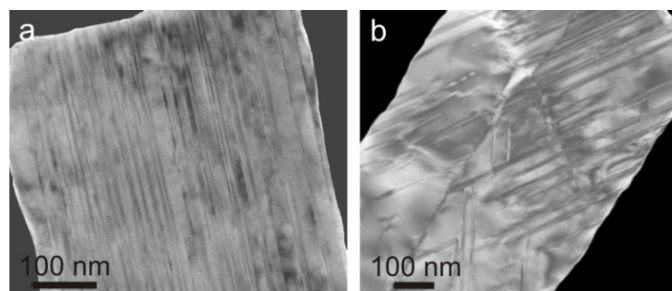


Figura 16. a) Vistas al TEM de maclas polisintéticas en una lamela de 3<sup>er</sup> orden aislada procedente de una muestra en polvo de la MLC de *Arca noae* (Bivalvia), b) maclas policíclicas en una lamela de 3<sup>er</sup> orden aislada, procedente de una muestra en polvo de la MLC de *Achatina fulica* (Gastropoda).

Tabla 4. Tipo de macla en las lamelas de 3<sup>er</sup> orden en distintas especies estudiadas. B: Bivalvia, G: Gastropoda, P: Polyplacophora, S: Scaphopoda, PS: Polisintética, PC: Policíclica.

Clase	Subcalse	Orden/SF	Especie	PS	PC
B	Pterimorphia	Arcoida	<i>Arca noae</i>	x	
B	Pterimorphia	Arcoida	<i>Glycymeris glycymeris</i>	x	
B	Pterimorphia	Arcoida	<i>Glycymeris nummaria</i>	x	
B	Pterimorphia	Limoida	<i>Lima lima</i>	x	
B	Pterimorphia	Pectinoida	<i>Plicatula muricata</i>	x	
B	Pterimorphia	Pectinoida	<i>Propeamussium sibogai</i>	x	
B	Pterimorphia	Pectinoida	<i>Spondylus siniensis</i>	x	
B	Heterodonta	Carditoida	<i>Eucrassatella decipiens</i>		x
B	Heterodonta	Anomalodesmata	<i>Luzonia chilensis</i>	x	
B	Heterodonta	Lucinoida	<i>Phacoides pectinatus</i>	x	x
B	Heterodonta	Myoida	<i>Pholas dactylus</i>		x
B	Heterodonta	Veneroida	<i>Donax deltoides</i>		x
B	Heterodonta	Veneroida	<i>Lioconcha castrensis</i>	x	x
B	Heterodonta	Veneroida	<i>Callista chione</i>	x	
G	Neritimorpha	Cycloneritimorpha	<i>Nerita peloronta</i>	x	
G	Vetigastropoda	Phasianelloidea	<i>Tricolia capensis</i>	x	x
G	Vetigastropoda	Trochoidea	<i>Cittarium pica</i>		x
G	Vetigastropoda	Trochoidea	<i>Tectus pyramis</i>	x	x
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Semicassis granulata</i>	x	
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Littorina littorea</i>		x
G	Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Tudorella ferruginea</i>		x
G	Caenogastropoda	Cerithioidea	<i>Turritella communis</i>	x	
G	Caenogastropoda	Cerithioidea	<i>Naticarius hebraeus</i>	x	x
G	Caenogastropoda	Neogastropoda	<i>Conus marmoreus</i>	x	

G	Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Achatina fulica</i>	x	x
G	Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Eobania vermiculata</i>		x
G	Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Ryssota otaheiana</i>		x
P	Neoloricata	Chitinoida	<i>Chaetopleura angulata</i>		x
P	Neoloricata	Chitinoida	<i>Lepidozona pectinulata</i>		x
S		Dentaliida	<i>Fissidentalium metivieri</i>	x	

### 5.3. Difracción de rayos X y figuras de polos

Durante la fase experimental se ha comprobado que el tipo de radiación utilizada para generar los rayos X influye notablemente en la calidad del espectro de difracción obtenido y en la calidad de los resultados. En este estudio se han utilizado Molibdeno y Cobalto, comprobándose que el espectro de aragonito resultante tras la radiación con Molibdeno aparece más comprimido. Esto genera solapamientos entre las intensidades (picos) y dificulta las medidas necesarias para la generación de figuras de polos con el correspondiente software. La razón de este solapamiento podría deberse a que la longitud de onda del Molibdeno es menor que la del Cobalto, lo que genera una mayor penetración del haz provocando solapamiento de reflexiones al variar la cristalografía en el rango de penetración del haz. En el espectro obtenido con Co las intensidades aparecen mejor separadas y resulta más sencillo medir las intensidades de manera aislada a la hora de generar las figuras de polos. La Figura 17 muestra las distintas reflexiones *hkl* obtenidas con ambos metales.

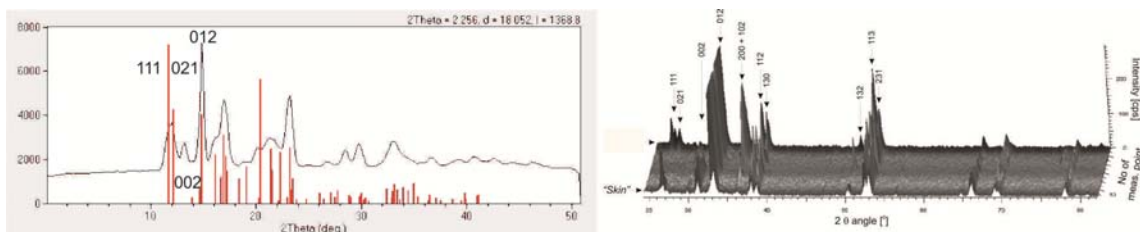


Figura 17. Espectros para la MLC mediante DRX con Mo (izquierda) y Co (derecha). Los picos de las intensidades obtenidas con molibdeno presentan mayor solapamiento.

Otra conclusión importante a la que se ha llegado durante la fase experimental es que para la correcta interpretación de los modelos cristalográficos, es importante contar con información referente a los tres ejes principales del aragonito, *a/b/c*. En el único estudio previo que propone un modelo cristalográfico para las MLCs (Rodríguez-Navarro *et al.* 2012) únicamente se tuvieron en consideración las figuras de polos 100 y

001. Estas figuras aportan información cristalográfica referida a los ejes *a* y *c* del aragonito sin contar por tanto con la información experimental para el eje *b*. En esta tesis doctoral, se han calculado también las figuras de polos 010 para todas las especies estudiadas incluyendo la misma especie (*Conus marmorus*) estudiada por Rodríguez-Navarro *et al.* (2012). Los resultados han permitido reinterpretar y completar la información obtenida por Rodríguez-Navarro *et al.* (2012) resultando en un modelo netamente diferente (Almagro *et al.* 2015).

Consecuentemente, y como se acaba de mencionar, para cada capa de MLC estudiada se han calculado las figuras de polos 100, 010 y 001, obteniéndose 50 conjuntos de figuras de polos (100, 010, 001) (páginas A5-A9 del Anexo 1). En todos los casos el índice textural (*J<sub>n</sub>*) está próximo a 1 (Anexo 1, A5-A9), lo que es indicativo de una fuerte textura, con un alto grado de orientaciones cristalográficas preferentes. Además, estos 50 conjuntos se pueden clasificar en diez grupos (Figura 18) según la distribución y relaciones entre los máximos. A cada uno de los diez patrones o texturas obtenidas, se le ha asignado un código *a/b/c*, donde *a*, *b* y *c* se corresponden con el número de orientaciones preferentes para los ejes del aragonito *a*, *b* y *c*. Estas orientaciones se calculan a partir del número de máximos *hkl*.

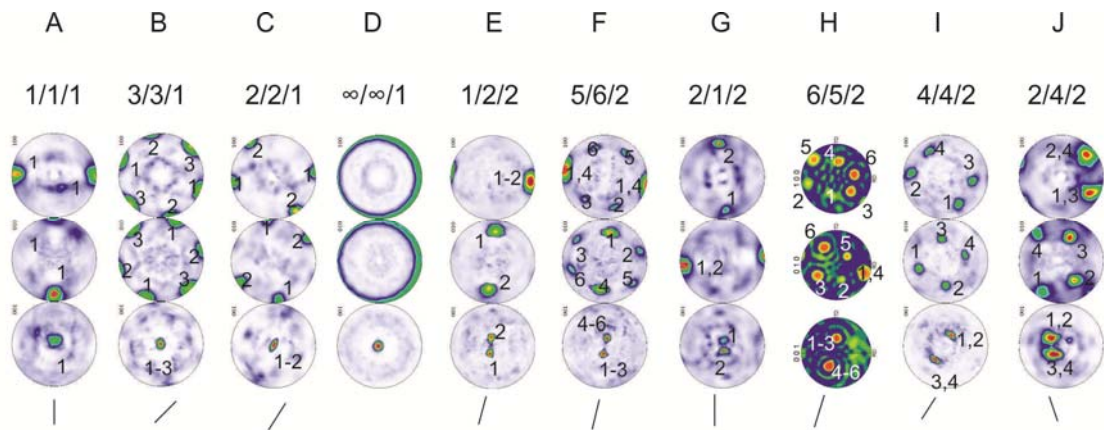


Figura 18. Ejemplos de conjuntos de figuras de polos representativas de los diez patrones encontrados para las MLCs. A) *Chaetopleura angulata* (IL), B) *Lima lima* (IL), C) *Pholas dactylus* (IL), D) *Eucrassatella decipiens* (IL), E) *Ryssota otaheiaata* (ML), F) *Semicassis bisulcata* (IL), G) *Diodora graeca* (IL), H) *Diodora graeca* (IL), I) *Fissurella crassa* (IL), J) *Arca noae* (EL). Todos los datos provienen de DRX excepto H) donde se han calculado con EBSD. Los números sobre las figuras de polos indican la correspondencia entre máximos. EL, capa externa, IL, capa interna; ML, capa media. Las barras negras indican la orientación de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden.

Existen dos grupos principales de patrones texturales, diferenciados en función de si presentan uno o dos máximos 001, que se interpretan como una o dos orientaciones cristalográficas preferentes para el eje  $c$  del aragonito, respectivamente. Se hablará de patrones texturales  $a/b/1$  cuando haya un solo máximo 001, y de patrones texturales  $a/b/2$  cuando haya dos máximos 001. De igual manera, del número y posición de los máximos 100 y 010 se deduce el número de orientaciones cristalográficas para los ejes  $a$  y  $b$  del aragonito.

### 5.3.1. Patrones texturales $a/b/1$

**Textura 1/1/1** (Figura 18 A). Este patrón es el más sencillo y presenta sólo un máximo en cada una de las tres FPs calculadas (100, 010 y 001). Esta distribución indica una única orientación cristalográfica para cada uno de los ejes cristalográficos del aragonito ( $a/b/c$ ), lo que se conoce como cristalografía de cristal único.

**Textura 3/3/1** (Figura 18 B). Aparece un único máximo en la FP 001 mientras que tanto las FPs 100 como la 010 muestran tres máximos situados en la periferia de la FP, que están separados a una distancia angular de unos  $60^\circ$ . Según esta distribución, existe una sola orientación cristalográfica para el eje  $c$  y tres orientaciones cristalográficas principales para los ejes  $a$  y  $b$ . Las lamelas de 1<sup>er</sup> orden se orientan paralelas a uno de los máximos 100. Cabe destacar que en el caso concreto de *Tectus pyramis* (Anexo 1, A6), el único máximo 001 parece estar en proceso de división.

**Textura 2/2/1** (Figura 18 C). Este caso es similar a 3/3/1, con la diferencia de que el máximo 100 que está alineado con el plano de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden, no aparece. En algunos casos, como *Pholas dactylus* (IL), *Tellina foliacea* (IL), y *Semicassis bisulcata* (EL) (Anexo 1, A6), el máximo 001 se alarga en dirección paralela al plano de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. Esto indica que existe un cierto balanceo de los ejes  $c$ - dentro del plano de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden.

**Textura  $\infty/\infty/1$**  (Figura 18 D). Este patrón se corresponde con la típica textura de fibra. En este caso los máximos 100 y 010 se muestran como un anillo continuo, que indicando desorientaciones para los ejes  $a$  y  $b$ , alrededor de un eje  $c$  común (un único máximo 001).

### 5.3.2. Patrones texturales $a/b/2$

En todos los patrones del tipo  $a/b/2$ , los dos máximos 001 aparecen alineados con el plano de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden.

**Textura 1/2/2** (Figura 18 E). Aparecen dos máximos en la figura de polos 001 que se encuentran a una distancia angular de entre 25°-50°. En la figura 100 aparecen dos mitades complementarias de máximo en posiciones opuestas, que se corresponden con una única orientación cristalográfica para el eje  $a$ . La figura 010 presenta dos máximos que indican dos orientaciones cristalográficas para el eje  $b$ .

**Textura 5/6/2** (Figura 18 F). Este patrón es básicamente el mismo que el anterior pero con cuatro máximos adicionales para las figuras de polos 100 y 010. Esto implica que hay cinco orientaciones cristalográficas para el eje  $a$ , seis para el eje  $b$  y dos para el eje  $c$ . Los máximos 001 y 010 se distribuyen en dos arcos relacionados con cada uno de los máximos 001. Dentro de cada arco los máximos se sitúan a unos 60° de distancia angular. Este patrón aparece en *Achatina fulica* (EL) analizada con EBSD (Anexo 1, A7). Esta misma muestra analizada con DRX mostró el patrón 1/2/2, lo que sugiere que las diferencias entre ambos patrones podrían deberse a variaciones de resolución.

**Textura 2/1/2** (Figura 18 G). Este patrón puede describirse fácilmente como el patrón 1/2/2 con la diferencia de que los máximos 100 y 010 están intercambiados. Esto es, aparece sólo un máximo 010, mientras que en este caso hay dos 100. Este patrón se ha encontrado únicamente en la especie *Diodora graeca* a través de DRX (Anexo 1, A8).

**Textura 6/5/2** (Figura 18 H). El patrón 6/5/2 presenta cuatro máximos adicionales con respecto al patrón 2/1/2 en las figuras de polos 100 y 010, que se distribuyen en dos arcos que se relacionan con cada máximo 001. Los máximos se encuentran separados uno con respecto a otro unos 60°. Este patrón se ha obtenido únicamente mediante EBSD en dos especies de la familia Fissurelidae (*Diodora graeca* y *Fissurella crasa*) (Anexo 1, A8). El análisis con DRX de las mismas capas en las mismas especies ha resultado en patrones diferentes: 2/1/2 en el caso de *Diodora graeca*, y 4/4/2, descrito a continuación en *Fissurella crassa* (ver Anexo 1, A8). Esto

sugiere que las diferencias entre estos tres patrones podrían deberse también a diferencias de resolución de las técnicas de análisis.

**Textura 4/4/2** (Figura 18 I). Este patrón presenta cuatro máximos 100 y 010 que se relacionan dos a dos con cada uno de los dos máximos 001. Este patrón puede describirse como un patrón 6/5/2 en que los máximos 100 situados en la dirección de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden y el máximo 010 con el que se relacionan no aparecen. Es decir, habrían desaparecido las dos orientaciones cristalográficas para el eje *a*, que comparten la orientación del eje *b*, que, asimismo, estaría ausente. En los casos en que se ha encontrado este patrón: *Fissurella crassa* (IL), *Diodora graeca* (IL), *Glycymeris glycymeris* (EL) y *Fissidentalium metivieri* (EL); las distancias entre los dos máximos 001 son relativamente grandes (70-75°) (ver Anexo 1, A8).

**Textura 2/4/2** (Figura 18 J). Este patrón es el más frecuente en las especies de bivalvos y gasterópodos estudiadas. Los dos máximos 001 se sitúan a distancias angulares de entre 20° y 45° y se alinean paralelos a los planos de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. Hay casos en que cada uno de los dos máximos individuales se alarga perpendicularmente a las lamelas de 1<sup>er</sup> orden como en *Arca noae* (EL), *Spondylus sinensis* (IL) (ver en Anexo 1, A9). En algunos casos los dos máximos 001 no están claramente diferenciados y llegan a fundirse en uno alargado. Al igual que en el patrón 4/4/2, existen cuatro máximos 010, que indican cuatro orientaciones cristalográficas para el eje *b*, distribuidos en dos pares, a 60°. Por otro lado hay solamente dos máximos 100 que se sitúan en la periferia de la figura, e indican dos orientaciones cristalográficas para el eje *a*. Cada uno de los dos máximos 001 se relaciona con dos de los cuatro máximos 010 (al igual que en el patrón 4/4/2) y con los dos máximos 100 al mismo tiempo (ver Figura 16).

### 5.3.3. Mapas de orientaciones cristalográficas mediante EBSD

Las capas analizadas mediante EBSD son: *Arca noae* (EL), *Tectus pyramis* (EL), *Tricolia capensis* (EL), *Achatina fulica* (EL), *Fissurella crassa* (IL), *Diodora graeca* (IL) y *Fissidentalium metivieri* (EL-IL). Los mapas de orientación y las figuras de polos obtenidas por EBSD se muestran en la Figura 19 y Anexo 1, A10 y A11.



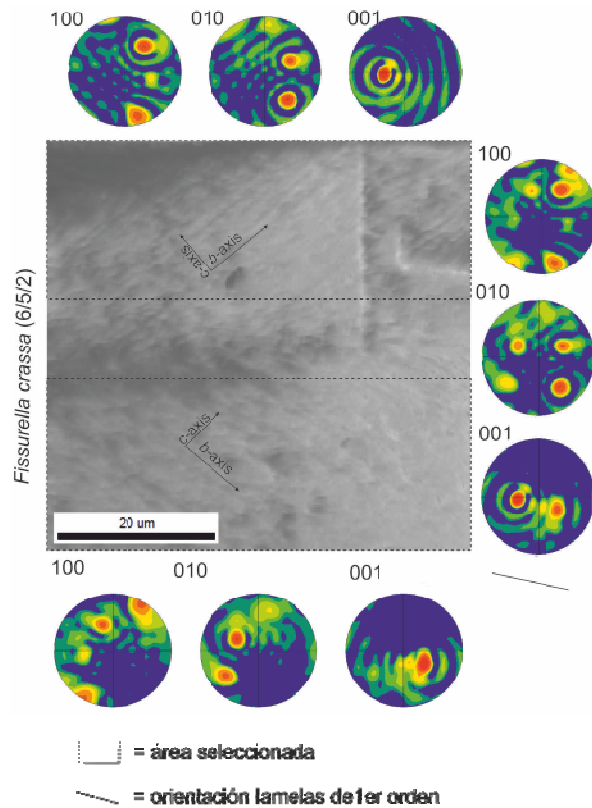


Figura 19. Distribución de las distintas orientaciones cristalográficas en la capa interna con MLC de *Fissurella crassa*, donde cada una de las dos orientaciones para el eje *c* se localiza en una lamela de 1<sup>er</sup> orden (selección de área).

Durante los análisis de EBSD, se han tenido enormes dificultades a la hora de obtener patrones de difracción suficientemente definidos e intensos para ser indexados. Esto es consecuencia de la gran densidad de maclas cristalinas y, por ende, del pequeño tamaño de los cristales (normalmente entre 50-100 nm, existiendo incluso maclas cristalinas de tan sólo 5 nm de anchura; Figura 7). Por ello, se han tenido que ajustar los parámetros concienzudamente (consultar en apartado 4 de este manuscrito). De este modo, se han conseguido mapas en pequeñas regiones de la muestra que han permitido el registro de figuras de polos viables y acordes con los resultados obtenidos por DRX. Si comparamos las figuras de polos obtenidas con EBSD con las obtenidas en las mismas capas con DRX puede observarse que en el primer caso existe un mayor número de máximos. Esto es atribuible a la mayor resolución de la técnica de EBSD que opera a escala sub-micrométrica frente a la milimétrica de la DRX.

Los resultados de EBSD permiten localizar en la estructura las orientaciones cristalográficas particulares al relacionarse las figuras de polos con las imágenes de

SEM. Se ha comprobado así, que cada uno de los dos máximos para la FP 001 que aparecen en los patrones  $a/b/2$  se corresponde con las orientaciones cristalográficas localizadas en lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes (Figura 19). Esto es, cada una de las dos orientaciones para el eje  $c$  corresponde al conjunto de lamelas de 3<sup>er</sup> orden comprendidas en una lamela de 1<sup>er</sup> orden. Se ha obtenido este resultado en todas las especies con dos máximos 001 estudiados a través de EBSD.

La capa con MLC del bivalvo (*Arca noae*) ha dado la textura 3/3/1 mediante EBSD frente a la textura 2/4/2 obtenida para la misma especie mediante DRX (ver Anexo 1, A6).

#### 5.3.4. Ángulo entre los máximos 001 en patrones $a/b/2$

Las distancias entre los máximos 001 en capas que han presentado texturas del tipo  $a/b/2$  han sido medidas y se recogen en el Anexo. La Tabla 5 contiene los ángulos entre máximos 001 y los ángulos entre las lamelas de 3<sup>er</sup> orden (también en Tabla 3), medidos en imágenes de SEM.

Sabiendo que los ejes cristalográficos  $c$  son perpendiculares a los planos cristalográficos 001, si como postularon Wilmot *et al.* (1992) los máximos se correspondiesen con caras cristalográficas, debería cumplirse que el ángulo formado con las lamelas de 3<sup>er</sup> orden y el ángulo formado por los máximos 001 son suplementarios, es decir, sumarían 180°.

Tabla 5. Ángulos entre máximos 001 medidos en las FPs (C°) y los ángulos entre las lamelas de 3<sup>er</sup> orden, medidos en imágenes de SEM (A°).

Especie (capa)	A°	C°
<i>Glycymeris glycymeris</i> (IL)	106	70
<i>Arca noae</i> (EL)	123	40
<i>Glycymeris nummaria</i> (EL)	96	45
<i>Laevicardium oblongum</i> (IL)	106	45
<i>Lioconcha castrensis</i> (EL)	107	40
<i>Circe rivularis</i> (EL)	108	20
<i>Semicassis bisulcata</i> (3ML)	106	40
<i>Semicassis bisulcata</i> (IL)	131	45
<i>Semicassis granulata</i> (ML)	96	40

<i>Naticarius hebraeus</i> (IL)	124	45
<i>Achatina fulica</i> (EL)	120	50
<i>Ryssota otaheiana</i> (ML)	120	40
<i>Eovania vermiculata</i> (2ML)	117	40
<i>Turritella duplicata</i> (IL)	110	40
<i>Littorina littorea</i> (IL)	140	25
<i>Diodora graeca</i> (IL)	135	30
<i>Diodora graeca</i> (IL) EBSD	89	88
<i>Fissurella crassa</i> (IL)	119	75
<i>Fissurella crassa</i> (IL) EBSD	102	80
<i>Cymbula safiana</i> (IL)	148	25
<i>Conus marmoreus</i> (IL)	117	30
<i>Oliva reticulata</i> (EL)	111	30
<i>Fissidentalium metivieri</i> (EL)	107/130	75
<i>Fissidentalium metivieri</i> (EL) EBSD	79	70
A°= ángulo entre lamelas 3 <sup>er</sup> orden		
C°= ángulo entre máximos 001		

## 6. DISCUSIÓN

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Comparación de los resultados con el conocimiento previo

Algunas de las texturas obtenidas en este estudio presentan similitudes con determinadas texturas descritas con anterioridad para algunas capas con MLCs en estudios realizados por otros autores. Por ejemplo, los resultados obtenidos aquí para las distintas capas con MLCs que forman la concha de *Semicassis bisulcata*, son muy parecidos a los resultados que obtuvieron Chateigner *et al.* (1996) para las capas con MLCs que forman la concha de *Cypraea testudinaria*, o los datos aportados por Ouhenia *et al.* (2008) para la concha de *Charonia lampas*, también constituida por varias capas con MLCs. Cabe destacar tanto *Semicassis bisulcata* como *Cypraea testudinaria* y *Charonia lampas* pertenecen al orden Littorinimorpha (Gastropoda). Las distintas capas con MLCs en especies pertenecientes al orden Littorinimorpha presentan texturas diferentes, al contrario que las conchas de especies pertenecientes al orden Neogastropoda como pueden verse en los resultados obtenidos aquí para distintas capas con MLCs en la concha de *Oliva reticulata* o para en el estudio completo de la concha de *Conus marmoreus* (Rodríguez-Navarro *et al.* 2012). Ambas especies, *Oliva reticulata* y *Conus marmoreus* son neogasterópodos. Volviendo a los Littorinimorpha, son evidentes los cambios cristalográficos que se observan a lo largo de las distintas capas con MLCs que forman sus conchas. Estos cambios, parecen tener similitudes en las tres especies mencionadas (*Semicassis bisulcata*, *Cypraea testudinaria* y *Charonia lampas*). La IL con MLC de *Semicassis bisulcata* ha mostrado, en este estudio, textura del tipo 5/6/2 al igual que la capa interna con MLC de *Charonia lampas* estudiada por Ouhenia *et al.* (2008). La capa interna con MLC en la concha de *Cypraea testudinaria* (Chateigner *et al.* 1996) mostró textura del tipo 1/2/2. Como se ha descrito en el apartado 5.3.2, ambas texturas muestran una relación cristalográfica muy estrecha diferenciándose en la densidad de maclas cristalinas o incluso en la resolución de la técnica empleada en el estudio. En las tres especies, la capa media con MLC ha dado textura del tipo 2/4/2. En el caso de la capa externa, para *Semicassis bisulcata* se ha obtenido en este trabajo, el patrón textural 2/2/1. Esta textura es muy parecida a la textura 3/3/1 que obtuvieron en *Cypraea testudinaria* Chateigner *et al.* (1996) tal y como se discute en el apartado 6.2. En el caso de *Charonia lampas*, Ouhenia *et al.*

(2008) obtuvieron textura de fibra o patrón  $\infty/\infty/1$ , también perteneciente a la categoría de texturas con un solo eje  $c$ .

Wilmot *et al.* (1992) propusieron un modelo cristalográfico para la MLC de una especie de Littorinimorpha (*Littorina littorea*) y otro para un Neogastropoda (*Oliva sayana*). La primera especie, *Littorina littorea*, es estudiada en esta tesis doctoral, y el resultado obtenido es consistente con el de Wilmot *et al.* (1992). El patrón textural obtenido para la capa interna con MLC de *Littorina littorea* en esta tesis, es del tipo 1/2/2. Este resultado podría encajar con la interpretación de un eje  $a$  común para la especie establecida en el trabajo de Wilmot *et al.* (1992). La segunda especie estudiada por Wilmot *et al.* (1992), *Oliva sayana*, no es estudiada en esta tesis, pero sí otra perteneciente al mismo género (*Oliva reticulata*). El patrón textural obtenido aquí para *Oliva reticulata* es el 2/4/2, siendo este resultado consistente con lo propuesto por Wilmot *et al.* (1992) para la MLC de *Oliva sayana*. En ambos casos, las lamelas de 1<sup>er</sup> orden estarían relacionadas por maclas ( $1\bar{1}0$ ). Sin embargo, a diferencia de Wilmot *et al.* (1992), que interpretaron las superficies principales de lamelas de 3<sup>er</sup> orden como caras cristalinas, los resultados presentados en esta tesis doctoral no apoyan esta hipótesis, ya que los ángulos entre lamelas de 3<sup>er</sup> orden y los ángulos entre máximos 001 ( $A^\circ$  y  $C^\circ$  respectivamente en Tabla 5) no son suplementarios. Este es un requisito fundamental para que se cumpla la hipótesis de Wilmot *et al.* (1992) ya que los ejes  $c$  son por definición perpendiculares a los planos 001.

La textura obtenida para la capa interna con MLC de *Cymbula safiana* (Patellogastropoda) es diferente a la que reportaron (Chateigner *et al.* (2000) para otra especie perteneciente a la misma subclase (*Scutellastra tabularis*). Estas especies presentan texturas del tipo 3/3/1 y 2/4/2 respectivamente.

La textura 1/1/1, en este estudio ha sido únicamente reconocida en Polyplacophora. Sin embargo, fue descrita en las especies de gasterópodos terrestres *Euglandina* sp., *Cyclophorus woodianus* y *Helix aspersa* (Chateigner *et al.* 2000; 2009). A diferencia de estos resultados que obtuvieron Chateigner y sus colaboradores (Chateigner *et al.* 2000; 2009) todas las capas con MLCs estudiadas aquí en gasterópodos terrestres han proporcionado, sin excepción, texturas del tipo 1/2/2.

Chateigner *et al.* (2000) también describieron en *Fragum fragum* (Heterodonta, Bivalvia) una textura que muy posiblemente (a falta de la FPs 010) es la 2/4/2. Dicha textura o patrón es el más extendido entre las especies de bivalvos estudiadas en esta tesis doctoral.

En cuanto a la ultraestructura de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden, los dos tipos de maclas descritos con anterioridad (polisintéticas y policíclicas) aparecen en este estudio y parecen conservarse dentro de los distintos órdenes. La novedad de esta tesis doctoral es que se han encontrado los dos tipos de maclas dentro de la misma especie, aunque no podemos afirmar si en capas diferentes o en la misma.

## **6.2. Interpretación cristalográfica y equivalencias entre patrones texturales**

En este trabajo se propone un modelo cristalográfico para cada uno de los patrones texturales o texturas obtenidas entre todas las especies analizadas. Para la interpretación de las distintas texturas y la creación tales modelos cristalográficos, se han generado *modelos sintéticos* donde cada uno de los máximos representados en las FPs 100, 010 y 001, se toma como una orientación cristalográfica individual para cada uno de los ejes *a*, *b* y *c* respectivamente.

En primer lugar, se ha esquematizado una *FP sintética*. Una FP sintética resulta de la suma de las FPs 100, 010 y 001, para cada modelo (Figura 20). Los puntos que comparten el mismo color representan las orientaciones de los tres ejes cristalográficos para un cristal ideal. Cuando las orientaciones de los ejes cristalográficos de dos cristales distintos coinciden se ha indicado con un color diferente. Además de un color diferente, a cada cristal se le ha dado un nombre (A1, A2, B1, B2...). Las orientaciones compartidas por cristales diferentes se indican como la suma de los cristales que la presentan, por ejemplo (A1+A2) y un color que resulta de la combinación de los colores individuales de los cristales que la comparten. Se ha señalado la dirección de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden, a fin de relacionar los resultados con el conjunto de la estructura. A cada uno de los modelos así dibujados, se le ha dado el mismo código *a/b/c* que al patrón textural que le corresponde.

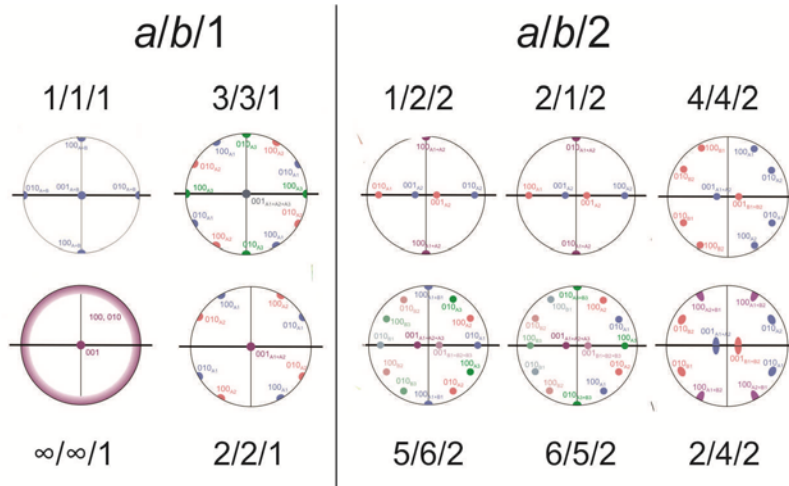


Figura 20. Figuras de polos sintéticas para cada uno de los diez patrones texturales encontrados de manera experimental. Cada color representa una orientación cristalográfica indicada además con un código (A1, A2, B1, etc.).

### Modelos cristalográficos $a/b/1$

El más sencillo de estos modelos es el 1/1/1, que se interpreta como una única orientación cristalográfica (Figura 5). Los modelos 2/2/1 y 3/3/1 (Figura 21) corresponden claramente a la macla {110} simple y doble del aragonito respectivamente. En el primer caso, el plano de macla es paralelo a la elongación de las lamelas de 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> orden (macla polisintética). En el segundo caso, las maclas son del tipo policíclico, con uno de los planos de macla paralelos al plano principal de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. La orientación cristalográfica ausente en 2/2/1 con respecto a 3/3/1 es la que se corresponde con los cristalitos que tienen sus ejes  $a$  orientados dentro del plano de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden, el cual contiene además la dirección de crecimiento de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden. El modelo cristalográfico  $\infty/\infty/1$  (Figura 21) contiene múltiples orientaciones para los ejes  $a$  y  $b$ , que se disponen aleatoriamente alrededor de una única orientación común para el eje  $c$ .

### Modelos cristalográficos $a/b/2$

En todos los modelos de este tipo, cada uno de los ejes  $c$  está incluido en uno de los dos conjuntos de lamelas de 1<sup>er</sup> orden, donde la inclinación de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden común, siendo la inclinación opuesta a la de las lamelas de 3<sup>er</sup> orden contenidas en las lamelas de 1<sup>er</sup> orden adyacentes, como han mostrado los resultados de EBSD.



Los modelos 1/2/2 y 5/6/2 (Figura 21) se caracterizan porque los dos conjuntos de lamelas de 1<sup>er</sup> orden comparten un eje  $a$  común. El segundo modelo además se caracteriza por presentar maclas {110}. Sin embargo dado que las texturas 1/2/2 y 5/6/2 han aparecido en la misma capa dependiendo de la técnica utilizada ha sido DRX o EBSD (Anexo 1, A7), podría ser que ambos modelos fueran equivalentes y la diferencia fuera resultado de la resolución de la técnica.

Los modelos 2/1/2 y 6/5/2 (Figura 21) se caracterizan por lamelas de 1<sup>er</sup> orden que comparten el eje  $b$ , existiendo en el segundo modelo además maclas {110}. Las texturas 2/1/2 y 6/5/2 han aparecido también en la misma capa en función de la técnica empleada (Anexo 1, A8) por lo que también podría ser consecuencia de la resolución de la técnica.

El modelo 4/4/2 (Figura 21) implica la existencia de dos maclas {110}. Sin embargo, la capa interna de *Fissurella crassa* que mediante DRX ha dado la textura 4/4/2, analizada con EBSD ha proporcionado textura 6/5/2 (Anexo 1, A8). Por tanto, el modelo 4/4/2 podría ser similar al 6/5/2 pero con menor incidencia de orientaciones comunes del eje  $b$ .

El modelo cristalográfico de la textura 2/4/2 (Figura 21) es el más complejo, ya que la distribución de máximos implica la existencia de cuatro orientaciones principales para el eje  $b$ , pero sólo dos para el eje  $a$ . Si se tienen en cuenta únicamente las FPs 001 y 010 el modelo resultante sería muy similar a 4/4/2. Sin embargo, si se miran las correspondencias entre los máximos de las FPs 100 y 010, existen dos orientaciones cristalográficas para el eje  $a$ , sirviendo, cada una, como eje de rotación común para las dos orientaciones correspondientes al eje  $b$  (esto es, dos patrones texturales 1/2/2 superpuestos y rotados unos 60° dentro del plano de la figura de polos). El modelo 4/4/2 implicaría la existencia de cuatro máximos 100, pero sólo encontramos dos, mientras que dos modelos 1/2/2 superpuestos requerirían la presencia de cuatro máximos 001, de los que sólo hay dos. Debido a la forma alargada de los máximos 100 y 001 en comparación con los máximos 010 en los resultados experimentales, se interpreta la posibilidad de que un modelo 4/4/2 más dos veces el modelo 1/1/2 (girados estos últimos 60° uno respecto al otro) puedan aparecer superpuestos, dándose todas las posiciones intermedias. En la Figura 21 se han representado dos conjuntos de orientaciones (*upper set* y *lower set*). El *upper set* se correspondería con el modelo 4/4/2



### 6.3. Relaciones entre modelos cristalográficos

Los diez modelos cristalográficos descritos pueden agruparse en cinco grupos en función de sus similitudes (Figura 21). Comparando las figuras de polos sintéticas (Figura 20) se deduce que unas figuras podrían derivar de otras.

*Grupo 1* (Figura 21): Formado por las texturas 1/1/1, 2/2/1 y 3/3/1, que también se encuentran en aragonito inorgánico (Massaro *et al.* 2014). Los ejes *c* de todas las orientaciones cristalográficas presentes están co-orientados.

*Grupo 2* (Figura 21): abarca los patrones con textura de fibra.

A partir de las texturas del grupo 1 pueden derivarse los pertenecientes a la categoría *a/b/2* mediante la separación de los máximos 001 de los cristales que forman las lamelas de 3<sup>er</sup> orden inclinadas en direcciones opuestas. La transición de uno a dos máximos 001 puede apreciarse en algunos casos en que el máximo 001 aparece bilobulado, lo que podría corresponder con el inicio de la separación, como es el caso de *Tectus pyramis* (EL) (Anexo 1, A6). La división del único máximo 001 puede ocurrir de distintas formas, y según estos encontramos los siguientes grupos:

*Grupo 3* (Figura 21): Surgen por rotación en direcciones opuestas de los ejes *b* y *c* alrededor de un eje *a* común, que es perpendicular a la dirección de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. Contiene los modelos 1/2/2 y 5/6/2.

*Grupo 4* (Figura 21): Derivaría por rotación, en direcciones opuestas, de las orientaciones cristalográficas alrededor del eje cristalográfico *b* común, que es perpendicular a la orientación de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. Abarca los modelos 2/1/2, 6/5/2 y 4/4/2.

*Grupo 5* (Figura 21): Incluye el modelo 2/4/2 que resulta de la suma de un patrón 4/4/2 con otro patrón hipotético (no observado) de tipo 2/4/4, que podría ser el resultado de la superposición de dos patrones 1/2/2 rotados una con respecto a otra 60° aproximadamente dentro del plano de la figura de polos. Consecuentemente, el modelo 2/4/2 podría derivar de los grupos 2 y 3, mencionados anteriormente.

#### 6.4. Modelos cristalográficos presentes en Bivalvia y Gastropoda

Un total de nueve de entre los diez modelos cristalográficos encontrados entre las capas con MLCs estudiadas, aparecen entre los gasterópodos analizados (Anexo 1, A14-A16). El único modelo que no aparece es el 1/1/1 presente únicamente en Polyplacophora. Además, los patrones pertenecientes al grupo 3 son exclusivos de la clase Gastropoda, no apareciendo en el resto de clases de Filo Mollusca. El orden Neogastropoda contiene especies cuyas conchas están formadas por distintas capas con MLCs, sin embargo todas las capas muestran el modelo cristalográfico 2/4/2. Por contraposición, el orden Littorinimorphia que también contiene especies cuyas conchas están compuestas por varias capas con MLCs, es el grupo con mayor diversidad cristalográfica, pudiendo aparecer distintos modelos cristalográficos en las distintas capas de una misma concha. Los modelos cristalográficos presentes en Littorinimorphia son los modelos 2/2/1, 2/4/2, 1/2/2 y 5/6/2 (ver Anexo, página A15). El modelo 3/3/1 en gasterópodos aparece sólo en Vetigastropoda; y dentro de este grupo, el modelo 2/1/2 es exclusivo de la superfamilia Fissurelloidea (Anexo 1, A14).

En bivalvos (Anexo 1, A12 y A13), el modelo que más se repite es el 2/4/2. Este modelo cristalográfico está particularmente extendido en Pteriomorphia, donde también aparecen los modelos 3/3/1 (Limoida) y 2/2/1 (Arcoida). En Heterodonta, donde las MLCs son las microestructuras más abundantes, aparece sobre todo el modelo 2/2/1 (Lucinoida, Myoida, Veneroida), encontrándose también el modelo  $\infty/\infty/1$  en grupos basales como Carditoida y Anomalodesmata.

#### 6.5. Modelos cristalográficos presentes en Scaphopoda y Polyplacophora

La cristalografía de la concha del escafópodo *Fissidentalium metivieri*, muestra similitudes tanto con la cristalografía de las conchas de bivalvos como con la cristalografía de las conchas de gasterópodos. La capa externa en la concha de *Fissidentalium metivieri* ha mostrado una textura del tipo 6/5/2 según el análisis de SEM-EBSD. Sin embargo, la misma capa, analizada mediante DRX, ha presentado la textura 4/4/2 (Anexo 1, A17). Al igual que en el resto de especies con textura del tipo  $a/b/2$ , cada uno de los ejes  $c$  se localiza en un conjunto de lamelas de 1<sup>er</sup> orden cuyas lamelas de 3<sup>er</sup> orden se inclinan en la misma dirección (Anexo 1, A17). El mayor número de máximos en las FPs obtenidas por EBSD posiblemente sea consecuencia de

la mayor resolución del EBSD. La capa interna, por otro lado, ha mostrado una textura 2/4/2 mediante DRX, pero del tipo 3/3/1 mediante SEM-EBSD (Anexo 1, A17).

Varios especímenes de la única especie de poliplacóforo analizada, *Chaetopleura angulata*, han mostrado la textura 1/1/1 (Anexo 1, A18). Este patrón es el más sencillo y corresponde a una única orientación cristalográfica para cada uno de los ejes cristalográficos del aragonito (Figura 5). Esta textura sólo ha sido obtenida en chitones y coincide con lo que expuso Haas (1981).

### **6.6. Cambios cristalográficos a lo largo de capas con MLCs en una misma concha**

En las especies *Strombus pugilis*, *Semicassis bisulcata*, *Fissidentalium metivieri*, *Oliva reticulata* y *Tridacna gigas*, cuyas conchas consisten en varias capas con MLCs superpuestas, se han medido varias o la totalidad de las capas con MLCs presentes. Los resultados (Anexo 1, A5-A9, A15 y A17) muestran que la textura de cada capa puede ser diferente, como ocurre en los littorinimorfos, o no variar en absoluto, como es caso de los neogasterópodos. La textura cristalográfica parece variar entre las distintas capas de especies pertenecientes al orden Littorinimorpha (Anexo 1, A15). Por ejemplo la cristalografía resulta ser diferente en las dos capas analizadas de *Strombus pugilis* [Anexo 1, A6 (F) y A9 (M)], o en las capas con MLCs de *Semicassis bisulcata* (Anexo 1, A15). La cristalografía también varía en las distintas capas del escafópodo *Fissidentalium metivieri* (Anexo 1, A17). Ocurre lo contrario en Neogastropoda como *Oliva reticulata* (Anexo 1, A15), o *Conus marmoreus* (Rodríguez-Navarro *et al.* 2012), donde la cristalografía parece mantenerse a lo largo de las distintas capas con MLCs. La misma invariabilidad cristalográfica ocurre en el bivalvo *Tridacna gigas* (Anexo 1, A5).

### **6. 7. Inferencias filogenéticas, convergencia y evolución**

Se han añadido los distintos patrones obtenidos en bivalvos y gasterópodos a los árboles filogenéticos más recientes basados en caracteres moleculares (Anexo 1, A19-A21). Los árboles filogenéticos obtenidos de la adición de las distintas hipótesis se representan en la Figura 22 (Ver también Anexo 1, A21).

En bivalvos, la textura  $\infty/\infty/1$ , conocida como textura de fibra, es la única que aparece en taxones tan antiguos como Protobranchia. Por otro lado, los patrones 4/4/2 y 2/4/2, presentes en Pterimorphia y Heterodonta, podrían haber derivado de los patrones

3/3/1 y 2/2/1 observados en los mismos grupos, siguiendo las equivalencias cristalográficas que se comentan en el apartado 6.3.

En cuanto al origen de las MLCs en bivalvos, Taylor (1973) propuso que las MLCs habrían surgido de manera independiente en grupos no relacionados como Arcoidea y Heterodonta o Limoida-Pectinoidea y Myoidea. Si esto fuese cierto, el hecho de que la textura cristalográfica de las MLCs sea muy similar en diferentes taxones pertenecientes a Pteriomorpha y Heterodonta, no puede ser más que consecuencia de una convergencia evolutiva.

Además, curiosamente, en la clase Gastropoda aparecen, entre otros, los mismos patrones descritos en Bivalvia. Si se tiene en cuenta que las MLCs no son la condición ancestral en los moluscos y que otras microestructuras, como el nácar, han evolucionado de manera independiente en las distintas clases de moluscos (Vendrasco *et al.* 2011); el hecho de que la cristalografía de las MLCs en grupos tan dispares de gasterópodos y bivalvos sea tan similar, podría ser resultado de una llamativa convergencia cristalográfica entre clases.

Por otro lado, la clase Gastropoda es la única que presentan modelos cristalográficos del grupo 3, que además son característicos de Eupulmonata o especies terrestres. Los modelos del grupo 3 también aparecen en Littorinimorpha, orden que presenta la mayor variabilidad textural a lo largo de sus capas con MLCs (Anexo 1, A15). Todos los Trochoidea presentan el modelo 3/3/1 (Grupo 1), mientras que 2/1/2 y 6/5/2 (Grupo 4) son característicos de Fissurellidae. Todos los Neogastropoda se definen por el modelo 2/4/2 (Grupo 5). Con todo esto, dentro de la clase Gastropoda, pueden perfilarse algunas tendencias cristalográficas dentro de algunos grupos. Por ejemplo: Neogastropoda: Grupo 5, Heterobranquia: Grupo 3, Littorinimorpha: Grupos 1, 3 y 5 y Vetigastropoda: Grupos 1 (Trochoidea y Phasianelloidea) y 4 (Fissurellidae). Los modelos cristalográficos del grupo 4 aparecen tanto en gasterópodos como en escafópodos, destacando de nuevo la convergencia evolutiva en la cristalografía de las MLCs.

Las causas de esta convergencia cristalográfica son un punto interesante a debatir. Como ya ha sido mencionado, las distintas microestructuras y combinaciones de microestructuras presentes en las conchas, están influenciadas tanto por razones

biológicas, como los genes, (Jackson *et al.* 2009) como por otra serie de factores ambientales que van desde cuestiones químicas, como la adición de distintos compuestos o moléculas, hasta barreras físicas, como el espacio entre cristales (Checa *et al.* 2006 ). Taylor & Layman (1972) propusieron una correlación entre el tipo de microestructura presente en las conchas de distintas familias de bivalvos y su modo de vida, atribuyendo las MLCs a organismos perforadores o aquellos que se enterraban en la arena debido a su particular resistencia a la abrasión.

En esta tesis doctoral se diferencian al menos diez tipos distintos de texturas cristalográficas, siendo algunos (no estrictamente) característicos de algunos clados, y otros presentando convergencias entre grupos muy dispares. Por ejemplo, la textura del tipo 1/2/2 parece estar presente en especies de litoral (*Littorina littorea*) que sufren el constante bateo de las olas, en especies que viven enterradas en la arena a gran profundidad (*Semicassis bisulcata*) y en todas las especies de gasterópodos terrestres. Por otro lado, la textura del tipo 2/4/2 es más frecuente en especies que viven posadas sobre el fondo marino o entre praderas de fanerógamas marinas (*Conus marmoreus*, *Lobatus gigas*, etc.) y no sufren de abrasión de la arena o las embestidas de las olas.

Sin embargo, para no caer en la especulación, es recomendable un estudio más exhaustivo, donde se evalúen las propiedades mecánicas de cada modelo cristalográfico en particular. Este punto sería interesante para correlacionar y evaluar, de manera consistente, las casusas tanto biológicas como ambientales que afectan en la aparición de una u otra textura cristalográfica en función de las propiedades mecánicas particulares de cada patrón y las ventajas adaptativas que pudieran derivarse de estas.



Figura 22. Relaciones filogenéticas entre los principales grupos de bivalvos (árbol parte superior, modificado de González & Giribet 2015+Sharma *et al.* 2012) y gasterópodos (árbol inferior, modificado de Zapata *et al.* 204 + Hedegaard, 1997 + Colgan *et al.* 2000).





## 7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

## 7. CONCLUSIONES

- La textura cristalográfica es un dato esencial en la caracterización de las MLCs, ya que las imágenes de SEM tienden a ser muy parecidas.
- Las imágenes de TEM han mostrado por transparencia que las lamelas de 3<sup>er</sup> orden pueden presentar maclas policíclicas o polisintéticas y que además una misma especie puede presentar los dos tipos de maclas.
- Para una interpretación cristalográfica precisa, las figuras de polos 100, 010 y 001 son obligatorias debido a su correlación con los principales ejes del aragonito.
- Todas las capas con MLCs analizadas han mostrado figuras de polos con orientaciones preferentes claras, es decir, texturas fuertes.
- Un total de diez texturas diferentes han sido interpretadas en diez modelos cristalográficos para las MLCs. Estos diez modelos se han agrupado en cinco grupos con cristalografías significativamente diferentes:
  - Grupo 1)  $[1/1/1+3/3/3+2/2/1]$ : Son las texturas más simples, y consisten en un cristal simple  $1/1/1$ , o dos,  $2/2/1$ , o tres cristales maclados,  $3/3/1$ , que comparten el eje  $c$ . Los tres ejes cristalográficos del aragonito se mantienen a lo largo de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden.
  - Grupo 2)  $\infty/\infty/1$ : Es igual que el grupo 1 pero en este caso los cristales del agregado presentan desorientaciones en el plano  $a-b$ .
  - Grupo 3)  $[1/2/2+5/6/2]$ : Las orientaciones cristalográficas se mantienen sólo dentro de las lamelas de 1<sup>er</sup> orden. Sólo los ejes  $a$  se conservan entre ellas.
  - Grupo 4)  $[2/1/2+4/4/2+6/5/2]$ : Las únicas orientaciones cristalográficas que se mantienen entre las distintas lamelas de 1<sup>er</sup> orden son las de los ejes  $b$ .
  - Grupo 5)  $2/4/2$ : Las orientaciones cristalográficas cambian entre dos configuraciones extremas o finales, una es la  $4/4/2$  (grupo 4) y otra consiste en una doble textura de tipo  $1/2/2$  (perteneciente al grupo 3). En la primera configuración se mantiene la orientación del eje  $b$  entre las lamelas de 1<sup>er</sup> orden, mientras que en la segunda se mantienen las de los ejes  $a$ .
- Los grupos 3, 4 y 5 representan relaciones cristalográficas completamente nuevas, que no habían sido descritas ni para aragonito inorgánico ni para aragonito biológico.

- Las figuras de polos 001 en los grupos 3 y 4 presentan dos máximos y cada uno de ellos está localizado en un conjunto de lamelas de 1<sup>er</sup> orden alternantes en la estructura.
- Ciertos grupos texturales están restringidos, aunque no estrictamente, a determinados grupos taxonómicos. Los grupos 3 y 4 aparecen sólo en gasterópodos. El grupo 3 es típico de Littorinimorpha y único en Heterobranquia, mientras que el grupo 4 aparece en una familia de vetigastropodos (Fissurellidae). El grupo 1 aparecen también en algunos vetigastropodos (Tegulidae y Phasianellidae). El grupo 5 se encuentran en otros grupos derivados de los littorinimorfos como estromboideos y neogasterópodos.
- En conchas formadas por varias capas con MLCs, la cristalografía puede mantenerse entre las distintas capas sin variación como ocurre en los neogasterópodos, o variar entre las distintas capas como es el caso de Littorinimorpha ó Scaphopoda.
- Los resultados de esta tesis doctoral confirman que las MLCs son el grupo de microestructuras de entre todas las conocidas en moluscos con la mayor diversidad cristalográfica existente.
- La incorporación de los datos cristalográficos a los estudios filogenéticos podría arrojar luz sobre las relaciones de determinados grupos de posición dudosa.

## 7. CONCLUSIONS

- Crystallographic texture is an essential data for CLMs characterization, due the similarity of the SEM images.
- TEM images have shown trough transparency both, polycyclic and polysynthetic twins in the 3<sup>rd</sup> order lamella and both may appear within the same species.
- For an accurate crystallographic interpretation, 100, 010 and 001 pole figures are mandatory due their correlation with the main axes of the aragonite.
- All the CLM layers analyzed have shown pole figures with a high degree of preferred orientations, that is, a strong texture.
- Up to ten different patterns have been differentiated within the CLMs in mollusks. These may be grouped into five crystallographic groups depending on their crystallography:
  - ✓ Group 1) [1/1/1+3/3/3+2/2/1]: These are the simplest patterns, consisting of either one single crystal (1/1/1), or two (2/2/1) or three (3/3/1) twinned crystals, sharing the *c*-axis. There is full continuity of the three crystallographic axes of aragonite across 1<sup>st</sup> order lamellae.
  - ✓ Group 2) ∞/∞/1: As group 1, except that the crystal aggregate is disoriented in the *a-b* plane.
  - ✓ Group 3) [1/2/2+5/6/2]: There is full crystallographic continuity within each 1<sup>st</sup> order lamellae, but only the *a*-axis goes across the boundaries between 1<sup>st</sup> order lamellae.
  - ✓ Group 4) [2/1/2+4/4/2+6/5/2]: The crystallographic continuity becomes interrupted at the boundaries between 1<sup>st</sup> order lamellae, where the *b*-axis is the only one which continues across.
  - ✓ Group 5) 2/4/2: Orientation shifts between two end configurations, one of the 4/4/2 type (group 4) and another consisting on a double 1/2/2 pattern (which belong to group 3). Depending on the configuration, either the *a*- or the *b*-axis is the one which continues across 1<sup>st</sup> order lamellae.
- Groups 3, 4 and 5 represent crystallographic relationships so far unknown in inorganic or other biogenic aragonites like nacre.

- 001 pole figures in groups 3 and 4 present two maxima and each one is located in a set of alternating 1<sup>st</sup> order lamella in the whole structure.
- Some crystallographic groups are restricted, though not strictly, to certain taxonomic groups. Groups 3 and 4 are present in some gastropods. Group 3 is typical of the Littorinimorpha and the only group in Heterobranquia, while group 4 occurs in a family of vetogastropods (Fissurellidae). Group 1 occurs in some vetigastropods as well, (Tegulidae y Phasianellidae), while group 4 occurs in others (Fissurellidae). Group 5 appears in some derived littorinomorphs, like stromboideans and neogastropods.
- In shells made of several CLMs layers, the crystallography may be constant through the shell like in neogastropods or it may change along the different layers like in Littorinimorpha or Scaphopoda.
- The results of this PhD study confirm that CLMs are a group of microstructures with a huge crystallographic diversity.
- The addition of crystallographic data to phylogenetic studies may help in solving some kinship relationships among mollusks.



## 8. REFERENCIAS



## 8. REFERENCIAS

Almagro, Í., Drzymala, P., Rodríguez-Navarro, A. B., Sainz-Díaz, C. I., Willinger, M. G., Bonarski, J., Checa, A. G., 2015. Crystallography and textural aspects of crossed lamellar layers in Arcidae (Bivalvia, Mollusca) shells. *Key Engineer. Mat.* 672, 60-70.

Bøggild, O., B., K., 1930. The shell structure of mollusks. *Dan. Vidensk. Skr.* 2, 231-326.

Bonarski, J.T., 2006. X-ray texture tomography of near-surface areas. *Prog. Mater. Sci.* 51, 61-149.

Bouchet, P., 2006. The magnitude of marine biodiversity. In: *The exploration of the Marine Biodiversity. Scientific and technological challenges.* Carlos M. Duarte (ed.). 31-64. Bilbao, Fundación BBVA.

Carter, J. G., 1980. Environmental and biological controls of bivalve shell mineralogy and microstructure. In: *Skeletal Growth of Aquatic Organisms* Rhoads, D. C. & Lutz, R. A. (ed.). 69-113. New York, Plenum Press.

Carter, J. G., 1990. *Skeletal Biomineralization: Patterns, processes and evolutionary trends.* London, Chapman & Hall.

Carter, J. G., Clark, G. R., 1985. Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure. In: *Mollusks-Notes for a Short Course, Studies in Geology*, Broadhead, T.W. (ed.). 13, 50-71. USA.

Cartwright, J. H. E., Checa, A. J., 2007. The dynamics of nacre self-assembly. *J. R. Soc. Interface.* 4, 491-504.

Caspi, E. N., Pokroy, B., Lee, P. L., Quintana, J. P., Zolotoyabko, E., 2005. On the structure of aragonite. *Acta Cryst. B.* 61, 129-132.

Chateigner, D., Hedegaard, C. and Wenk, H. R., 1996. Texture analysis of a gastropod shell: *Cypraea testudinaria*. *Text. Mater.* 2, 1070-1075.

Chateigner, D., Hedegaard, C. and Wenk, H. R., 1999. Quantitative characterization of mollusc shell textures. Proceedings of the twelfth international conference on textures of materials. 1495-4500.

Chateigner, D., Hedegaard, C. and Wenk, H.-R., 2000. Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *J. Struct. Geol.* 22, 1723-1735.

Chateigner, D., Kaptein, R., and Dupont-Nivet, M., 2009. X-ray quantitative texture analysis on *Helix aspersa aspersa* (Pulmonata) shells selected or not for increased weight. *Amer. Malacol. Bull.* 27, 157-165.

Chateigner, D., Ouhenia, S., Krauss, C., Hedegaard, C., Gil, O., Morales, M., Lutterotti, L., Rousseau, M., Lopez, E., 2010. Voyaging around nacre with the X-ray shuttle: From bio-mineralisation to prosthetics via mollusc phylogeny. *Mater. Sci. Eng. A* 528, 37–51.

Checa, A. G. and Rodríguez-Navarro, A. B., 2005. Self-organisation of nacre in the shells of Pterioida (Bivalvia: Mollusca). *Biomaterials* 26, 1071–1079.

Checa, A. G., Cartwright, J. H. E., Escribano, B., Sainz-Díaz, I., 2008. Nacre: A unique biomaterial patterned by liquid crystals. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 1094.

Checa, A. G., Okamoto, T. and Ramírez, J., 2006. Organization pattern of nacre in Pteriidae (Bivalvia: Mollusca) explained by crystal competition. *Proc. R. Soc. B.* 273, 1329-1337.

Colgan, D. J., Ponder, W. F., Beacham, E. and Macaranas, J., 2007., Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). *Mol. Phylog. Evol.* 42, 717-737.

Currey J. D., Kohn A. J., 1976. Fracture in the crossed lamellar structure of *Conus* shells. *J. Mater. Sci.* 11, 1615-1623.

Dauphin Y., Denis A., Guzman N., Ortlieb L., 2003. The paradoxal crossed lamellar layer of mollusc shells. Contribution of the PNEDC CONCHAS project. *ALR* 16, 95-103.

Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe G. D., Sørensen, M. V., Haddock, S. H. D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen R., M., Wheeler, W. C., Martindale, M. Q., Giribet, G., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745-750.

Fernández-González. L., Putnis, A., Prieto, M., Putnis, C. V., 1996. The role of magnesium in the crystallization of calcite and aragonite in a porous medium. *J. Sediment. Res.* 66, 482-491.

González, V. L., Giribet, G., 2015. A multilocus phylogeny of archiheterodont bivalves (Mollusca, Bivalvia, Archiheterodonta). *Zool. Scripta* 44, 41-58.

Gordon, J. E., 1964. Whiskers. *Endeavour* 23, 8-12.

Gregóire, C., 1972. Chapter 2: Structure on the molluscan shell. In: *Chemical zoology VII, Mollusca*. Forkin, M. and Scheer, B. T (ed.) 45-101.

Haas W., 1981. Evolution of calcareous hardparts in primitive molluscs. *Malacologia*. 21, 403-418.

Haszprunar, G., 2000. Is the Aplacophora monophyletic? A cladistic point of view. *Am. Malacol. Bull.* 15, 115-130.

Hayashi, A., Watanabe, T., Nakamura, T., 2010. Crystalline arrangement and nanostructure of aragonitic crossed lamellar layers of the *Meretrix lusoria* shell. *Zoology*. 113, 125-130.

Hayashi, A., Yokko, N., Nakamura, T., Watanabe, T., Nagasawa, H., Kogure, T., 2011. Crystallographic characterization of the crossed lamellar structure in the bivalve *Meretrix lamarekii* using electron beam techniques. *J. Struct. Biol.* 176, 91-96.

Hedegaard, C., 1997. Shell structures of the recent Vetigastropoda. *J. Moll. Stud.* 63, 369-377.

Hedegaard, C., Lindberg, D., R., Bandel, K., 1997. Shell microstructure of a Triassic patellogastropod limpet. *Lethaia*. 30, 335-336.

Hedegaard, C., Wenk, H-R., 1998. Microstructure and texture patterns of mollusc shells. *J. Moll. Stud.* 64, 133-136.

Hou D. F., Zhou G. S., Zheng M., 2004. Conch shell structure and its effect on mechanical behaviours. *Biomaterials* 25, 751-756.

Jackson, D. J., McDougall C.; Woodcroft B., Moase, P., Rose, R. A., Kube, M., Reinhardt, R., Rokhsar, D., S., Montagnani, C., Joubert, C., Piquemal, D., Degnan, B. M., 2010. Parallel evolution of nacre building gene sets in molluscs. *Mol. Biol. Evol.* 3, 591-608.

Jiao, D., Liu, Z. Q., Qu, R. T., Zhang, Z. F., 2016. Anisotropic mechanical behaviors and their structural dependences of crossed-lamellar structure in a bivalve shell. *Mater. Sci. Eng. C* 59, 828-837.

Kamat S. Kessler H., Ballarini R., Nassirou, A., Heuer, A. H., 2004. Fracture mechanisms of the *Strombus gigas* conch shell: II-micromechanics analyses of multiple cracking and large-scale crack bridging. *Acta Mater.* 52, 2395-2406.

Kamat S., Su X., Ballarini R., Heuer A. H., 2000. Structural basis for the fracture toughness of the shell of the conch *Strombus gigas*. *Nature* 405, 1036-1039.

Kennedy, W. J., Taylor, J. D and Hall, A., 1969. Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy. *Biol. Rev.* 44, 499-530.

Klug, H. P. & Alexander, L. E., 1974. X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials. New York. John Wiley.

Kobayashi I., Samata T., 2006. Bivalve shell structure and organic matrix. *Mater. Sci. Eng. C* 26, 692–698.

Kobayashi, I., 1964. Introduction to the shell structure of bivalved mollusks. *Earth Sci.* 73, 1-12.

Kobayashi, I., 1964. Microscopical observations on the shell structure of bivalvia, Part 1 *Barbatia obtusoides* (NYST), Scientific Reports Tokyo Koiku Daigaku. D. 8, 295-301.

Kobayashi, I., 1969. Internal microstructure of the shell of bivalve molluscs. *Am. Zoolog.* 9, 663-672.

Kobayashi, I., 1971. Internal shell microstructure of recent bivalvian molluscs. *Niigata Univ. Sci. Rep. Ser E.* 2, 27-50.

Kobayashi, I., Akai, J., 1994. Twinned aragonite crystals found in the bivalvian crossed lamellar shell structure. *Jour. Geol. Soc. Japan.* 100, 177-180.

Kocot, K. M., 2013. Recent Advances and Unanswered Questions in Deep Molluscan Phylogenetics. *Am. Malacol. Bull.* 31, 195-208.

Kocot, K. M., Cannon, J. T., Todt, C., Citarella, M. R., Kohn, A. B., Meyer, A., Santos, S. R., Schander, C., Moroz, L. L., Lieb, B., Halanych, K., M., 2011. Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature* 477, 452-457.

Kogure, T., Suzuki, M., Kim, H., Mukai, H., Checa, A. G., sasaki, T., Nagasawa, H., 2014. Twin density of aragonite in molluscan shells characterized using X-ray diffraction and transmission electron microscopy. *J. Cryst. Growth* 397, 39–46.

Kuhn-Spearing L. T, Kessler H., Chateau E. Ballarini, R., Heuer, A.H., 1996. Fracture mechanisms of the *Strombus gigas* conch shell: implications for the design of brittle laminates. *J. Mater. Sci.* 31, 6583-6594.

LaboTex, 2010. The Texture Analysis Software, by LaboSoft s.c.

MacClintock, C., 1967. Shell structure of patelloid and bellerophontoid gastropods (Molluska). *Bull. Peabody Mus. Nat. Hist.* 22, 1-140.

Massaro, F. R, Bruno, M and Rubbo, M. 2014., Surface structure, morphology and (110) twin of aragonite. *Cryst. Eng. Comm. RSC.* 16, 627-635.

Moynier de Villepoix, R., 1892. Note sur le mode de production des formations calcaires du test des Mollusques: *Mem. Soc. Biol.* 4, 35-42.

Nakahara H., Kakei M., Bevelander G., 1981. Studies on the formation of the crossed lamellar structure in the shell of *Strombus gigas*. *The veliger* 23, 207-211.

Nielsen, C., 2012. Animal evolution: interrelationships of the living phyla. New York, Oxford University Press.

Omori, M., Kobayashi, I., Shibata, M., Mano, K., Kamiya, H. 1976. On some problems concerning calcification and fossilization of taxodontid bivalves. In: The mechanism of mineralization in invertebrates and plants. Watabe N., & Wilbur, K., M. (eds.), 403-426. Columbia, South Carolina, University of South Carolina Press.

Osca, D., Irisarri, I., Todt, C. Grande, C. and Zardoya, R., 2014. The complete mitochondrial genome of *Scutopus ventrolineatus* (Mollusca: Chaetodermomorpha) supports the Aculifera hypothesis. BMC Evol Biol. 14, 197.

Osuna-Mascaró, A. J., Cruz-Bustos, T. Marin, F. and Checa, A. G., 2015. Ultrastructure of the interlamellar membranes of the nacre of the bivalve *Pteria hirundo*, determined by immunolabelling. PLoS ONE 10, 1-12.

Osuna-Mascaró, A., Cruz-Bustos, T., Benhamada S., Guichard, N., Marie, B., Plasseraud, L., Corneillat, M., Alcaraz, G., Checa, A., Marin, F., 2014. The shell organic matrix of the crossed-lamellar queen conch shell (*Strombus gigas*). Comp. Biochem. Physiol. Part. B 168, 76-85.

Ouhenia, S., Chateigner, D., Belkhir, M. A., and Guilmeau, E., 2008. Microstructure and crystallographic texture of *Charonia lampas lampas* shell. J. Struct. Biol. 163,175-184.

Palmer A. R., 1992. Calcification in marine molluscs: how costly is it?. PNAS 89, 1379-1382.

Pawlik, K., 1986. Determination of the orientation distribution from pole figures in arbitrarily defined cells, Physica Status Solidi. B. 134, 477-483.

Pokroy , B., Zolotoyabko, E., 2003. Microstructure of natural plywood-like ceramics: a study by high-resolution electron microscopy and energy-variable X-ray diffraction. J. Mater. Chem. 13, 682-688.

Pokroy, B., Kapon, M., Marin, F., Adir, N. and Zolotoyabko, E., 2007. Protein-induced, previously unidentified twin form of calcite. PNAS 104, 7337-7341.

Robert, C., Chamley, H., 1990. Paleoenvironmental significance of clay mineral associations at the Cretaceous-Tertiary passage. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 79, 205-219.

Rodríguez-Navarro A. B., 2007. Registering pole figures using an X-ray single-crystal diffractometer equipped with an area detector. *J. Appl. Crystal.* 40, 631–634.

Rodríguez-Navarro, A.B., Checa, A., Willinger, A. G., Bolmaro, R., Bonarski, J., 2012. Crystallographic relationships in the crossed lamellar microstructure of the shell of the gastropod *Conus marmoreus*. *Acta Biomater.* 8, 830-835.

Runnegar B., 1989. The evolution of mineral skeletons. In: Origin, evolution and modern aspect of biomineralization in plants and animals. Crick R. E. (ed.). 75-94. New York, Springer Science + Business Media.

Runnegar, B. and Pojeta, J. JR., 1974. Molluscan phylogeny: the paleontological viewpoint. *Science* 186, 311-317.

Salvini-Plawen, L. and Steiner, G., 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. In: Origin and evolutionary radiation of the Mollusca. Taylor, J. D. (ed.). 29-52. Oxford University Press, New York.

Salvini-Plawen, L., 2006. The significance of Placophora for molluscan phylogeny. *Venus* 65, 1-17.

Schmidt, W., J., 1924. Die bausteine des tierkörpers in polarisiertem lichte. Bonn, Verlag von Friedrich Cohen Bonn.

Sharma, P. P., González, V. L., Kawauchi, G. Y. Andrade, S. C. S., Guzmán, A., Collins, T. M., Glover, E. A., Harper, E. M., Healy, J. M., Mikkelsen P. M., Taylor, J. D., Bieler, R., Giribet, G., 2012. Phylogenetic analysis of four nuclear protein-encoding genes largely corroborates the traditional classification of Bivalvia (Mollusca). *Mol. Phylog. Evol.* 65, 64-74.

Shi, Y., Yu, C., Gu, Z., Zhan, X., Wang, Y., Wang, A., 2013. Characterization of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) mantle transcriptome unravels biomineralization genes. *Mar. Biotechnol.* 15, 175-187.

- Shimamoto, M., 1986. Shell microstructure of the Veneridae (Bivalvia) and its phylogenetic implications. *Tohoku Univ., Sci. Rep., 2nd ser. (Geol.)*. 56, 1-39.
- Sigwart, J. D., Lindberg, D. R., 2015. Consensus and confusion in molluscan trees: evaluating morphological and molecular phylogenies. *Syst. Biol.* 64, 384-395.
- Smith, S. A., Wilson, N. G., Goetz, F. E., Feehery, C., Andrade S. C. S., Rouse, G. W., Giribet, G., Dunn, C. W., 2011. Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature* 480, 364-367.
- Smith, S., A., Wilson, N., G., Goetz, F. E., Feehery, C., Andrade S. C. S., Rouse, G. W., Giribet, G., Dunn, C., 2013. Corrigendum: Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature* 493, 708.
- Snyder, R. L., Fiala, J. & Bunge, H. J., 1999. *Defect and Microstructure Analysis by Diffraction*, IUCr Monographs on Crystallography, 10. Oxford University Press.
- Sutton, M. D., Sigwart, J. D., 2012. A chiton without a foot. *Paleontology* 55, 401-411.
- Suzuki, M., Kameda, J., Sasaki, T., Saruwatari, K. Nagasawa, H., Kogure, T., 2010. Characterization of the multilayered shell of a limpet, *Lottia kogamogai* (Mollusca: Patellogastropoda), using SEM-EBSD and FIB-TEM techniques. *J. Struct. Biol.* 171, 223-230.
- Suzuki, M., 2015. Study on the chitinases in the shell of *Lymnaea stagnalis*. 13th Int. Symp. Biomineralization (Biomin XIII). September, Granada, Spain.
- Taylor, J. D., 1973. The structural evolution of the bivalve shell. *Palaeontology* 16, 519-534.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J., Hall, A., 1969. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction. Nuculacea-Trigonacea. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.* 3, 1-125.
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J., Hall, A., 1973. The shell structure and mineralogy of the Bivalvia II. Lucinacea-Clavegellacea. Conclusions. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.* 22, 253-294.



Taylor, J. D., Layman, M., 1972. The mechanical properties of bivalve (mollusca) shell structures. *Palaeontology* 15, 73-87.

Uozumi, S., Iwata, K., Togo, Y., 1972. The ultrastructure of the mineral in and the construction of the crossed-lamellar layer in molluscan shell. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Ser. 4, Geol. Mineral.* 15, 447-477.

Vendrasco, M. J., Checa, A. G.; Kouchinsky, A. V., 2011. Shell microstructure of the early bivalve *Pojetaia* and the independent origin of nacre within the mollusca. *Palaeontology* 54, 825-850.

Vinther, J., 2015. The origins of Molluscs. *Palaeontology* 58, 19-34.

Vinther, J., Sperling, E. A., Briggs, D. E. G., Peterson, K. J., 2012. A molecular paleobiological hypothesis for the origin of aplacophoran molluscs and their derivation from chiton-like ancestors. *Proc. R. Soc. London, B.* 279, 1259-1268.

Wilmot N. V, Barber D. J., Taylor J. D., Graham A. L., 1992. Electron microscopy of molluscan crossed-lamellar microstructure. *Philos. Trans. Biol. Sci.* 337, 21-35.

Wise, S. W. Jr., Hay, W. W., 1968. Scanning Electron Microscopy of Molluscan Shell Ultrastructures II, Observations of Growth Surfaces, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 87, 419-430.

Younis, S., Kauffmann, Y., Pokroy, B. and Zolotoyabko, E., 2012. Atomic structure and ultrastructure of *Murex troscheli* shell. *J. Struct.l Biol.* 180, 539-545.

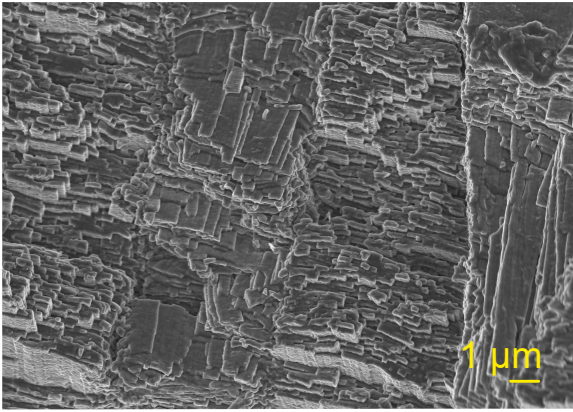
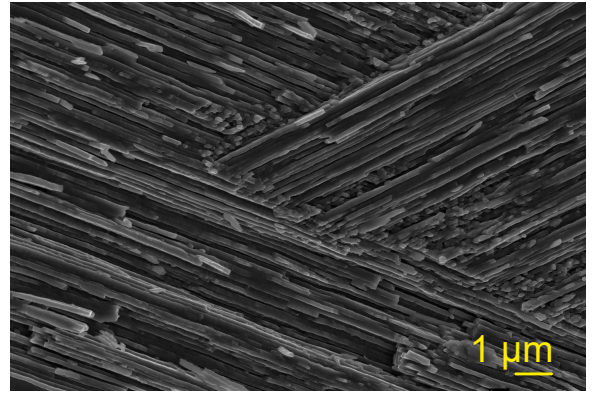
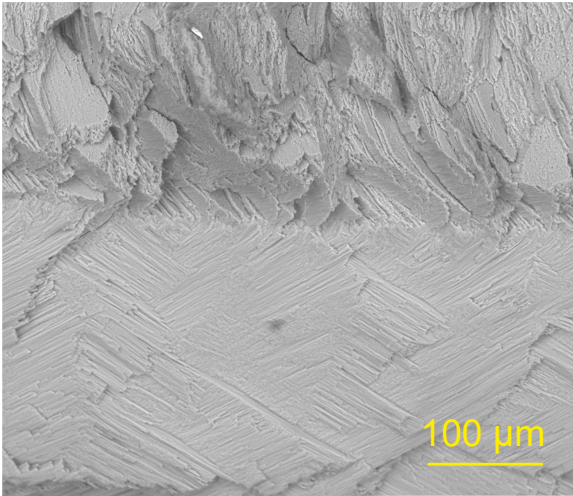
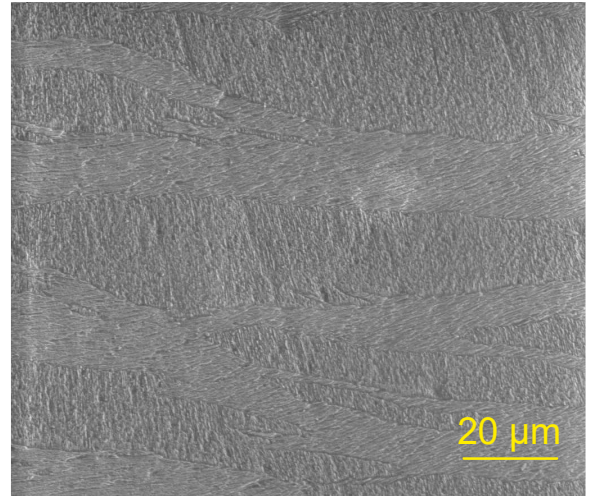
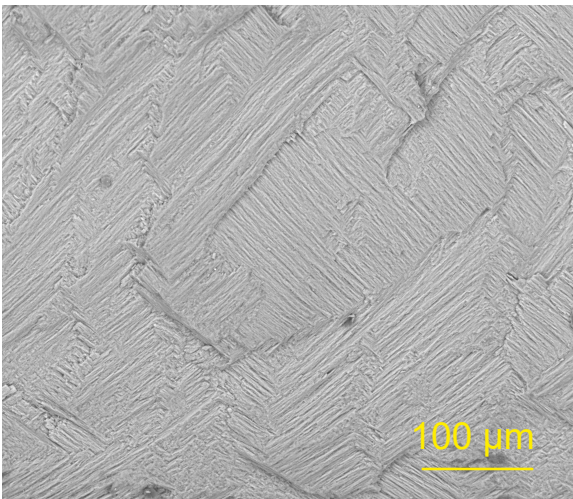
Zapata, F., Wilson, N. G., Howison, M. Andrade, S. C. S., Jörger, K.M., Schrödl, M., Goetz, F. E., Giribet, G., Dunn, C W., 2014. Phylogenomic analyses of deep gastropod relationships reject Orthogastropoda. *Proc. R. Soc. B.* 281.

# ANEXOS



## ANEXO 1. MATERIAL COMPLEMENTARIO

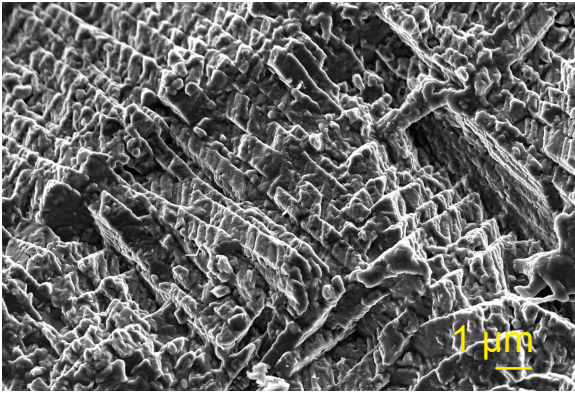


**A****B****C****D****E****F**

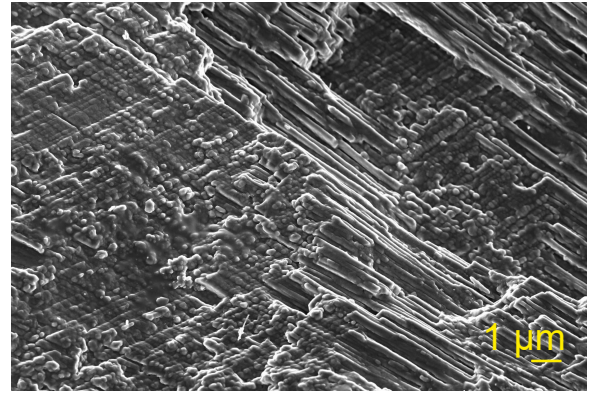
Imágenes de SEM de fracturas comarginales en A) *Arca noae*, B) *Propeamusium sibogai*, C) *Lima lima*, D) *Glycymeris nummaria* (superficie externa pulida), E) *Laevicardium oblongum*, F) *Tridacna gigas*



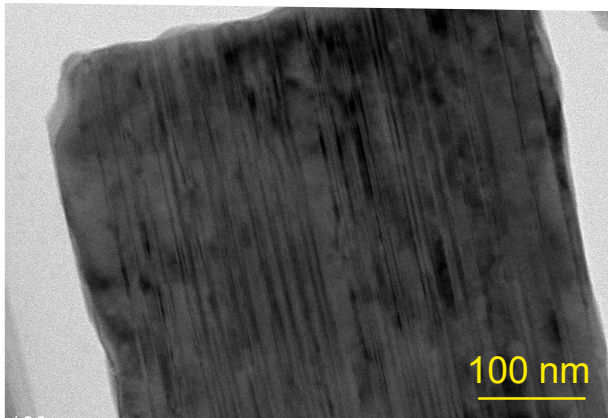
G



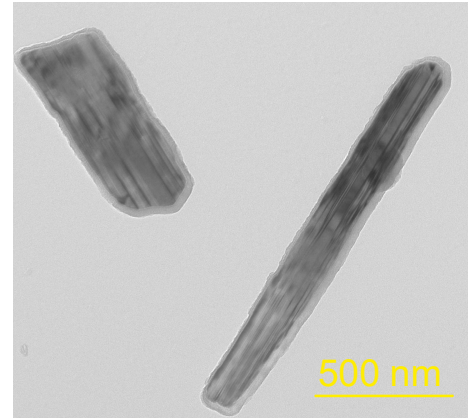
H



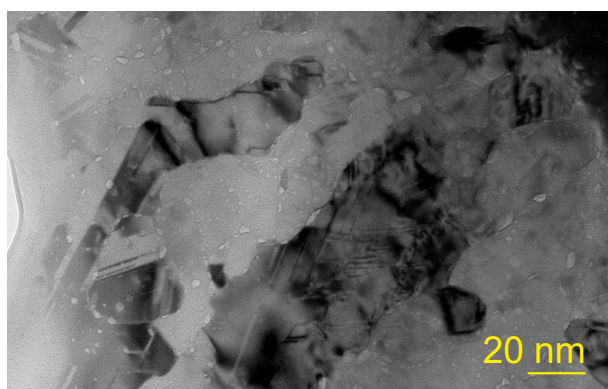
I



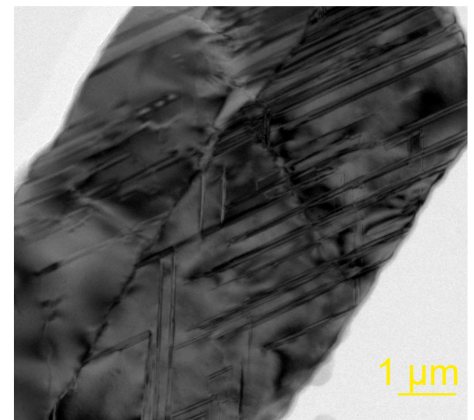
J



K



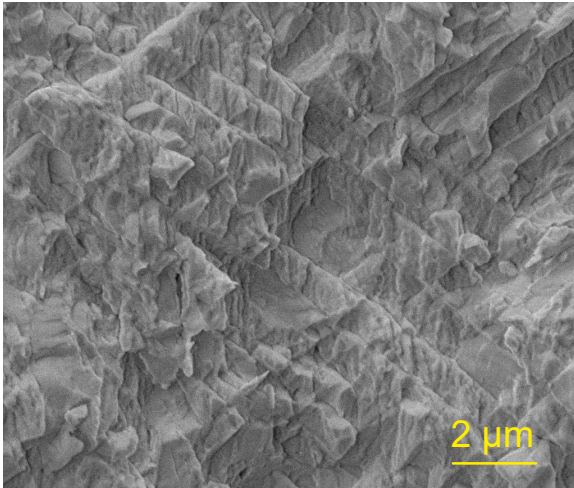
L



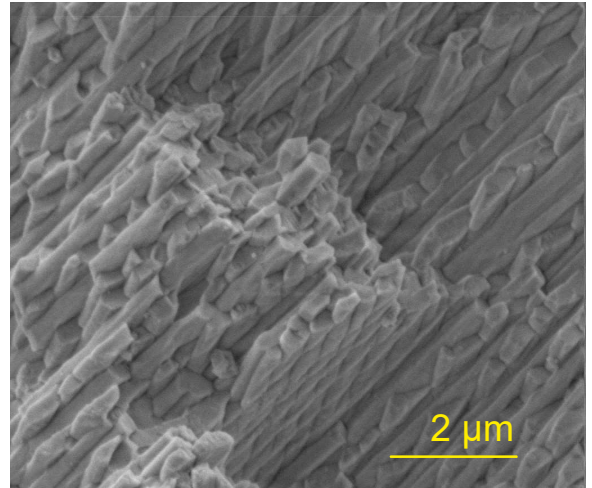
Fracturas comarginales vistas al SEM de G) *Eucrassatella decipiens* y H) *Tellina foleacea*.  
 Vista en TEM de una lamela de 3er orden aislada con presencia de maclas polisintéticas  
 proveniente de una muestra en polvo de I) la capa externa de *Arca noae*, J) La capa interna de  
*Lima lima*. K) Sección ultrafina vista en TEM con maclas policíclicas en la concha de  
*Achatina fulica* y L) Vista en TEM de una lamela de 3er orden aislada mostrando maclas policíclicas  
 proveniente de muestra en polvo de la concha de *Achatina fulica*.



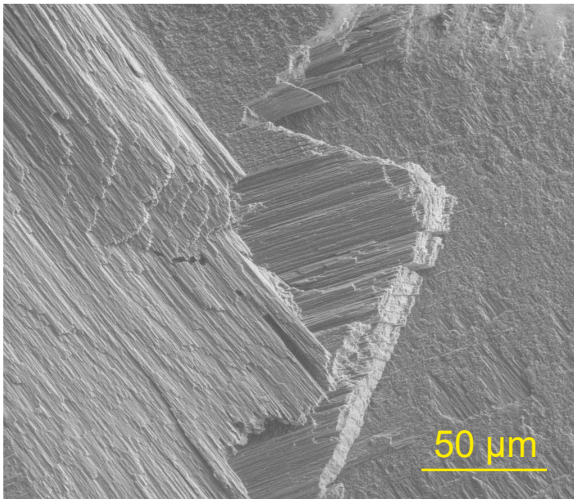
M



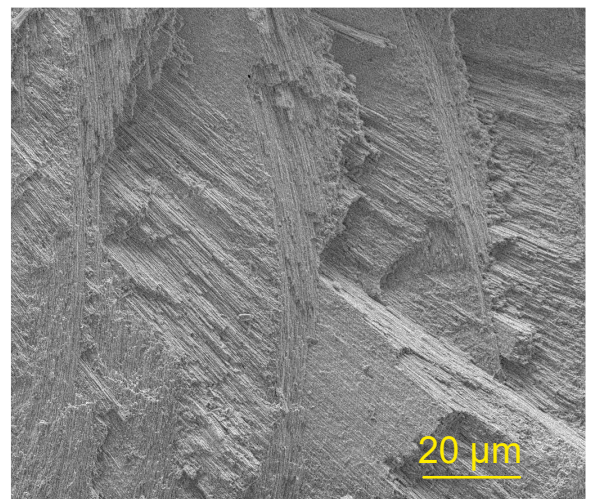
N



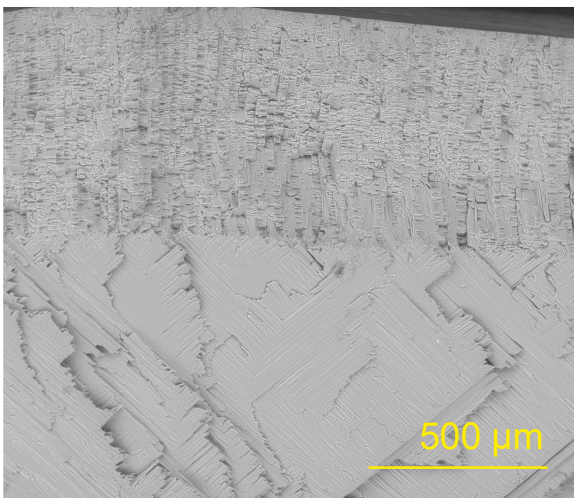
O



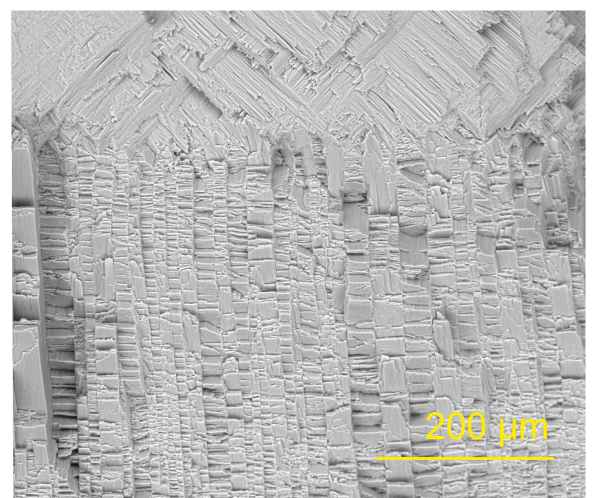
P



Q



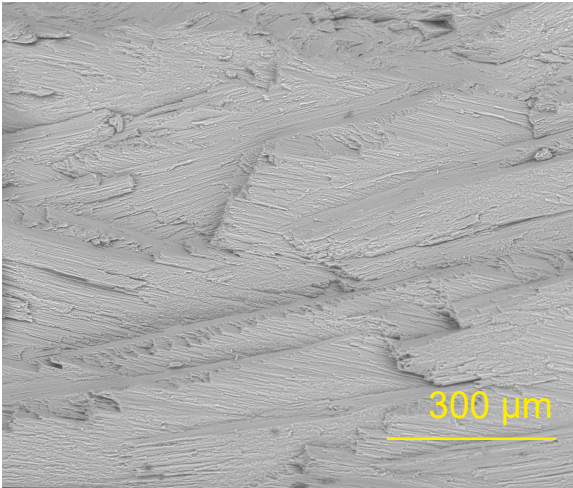
R



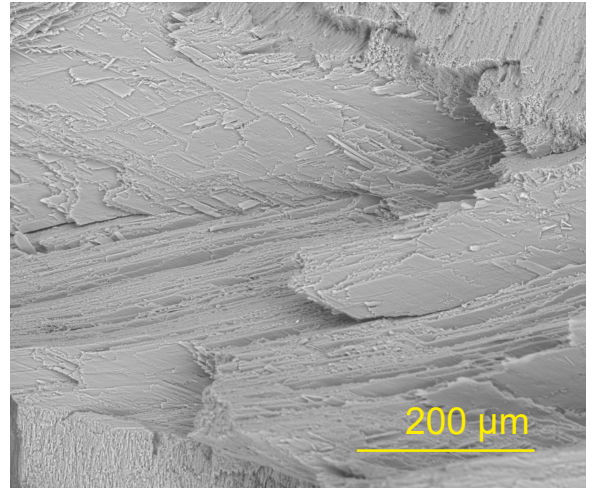
Imágenes de SEM de M) *Cittarium pica* (fractura comarginal), N) *Lepidozona pectinulata* (fractura radial), O) *Turritella duplicata* (fractura comarginal), P) *Diodora graeca* (fractura comarginal), Q) *Strombus pugilis* (fractura comarginal), R) *Semicassis bisulcata* (fractura comarginal)



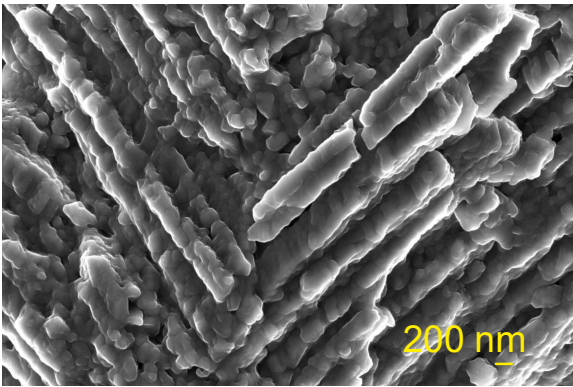
S



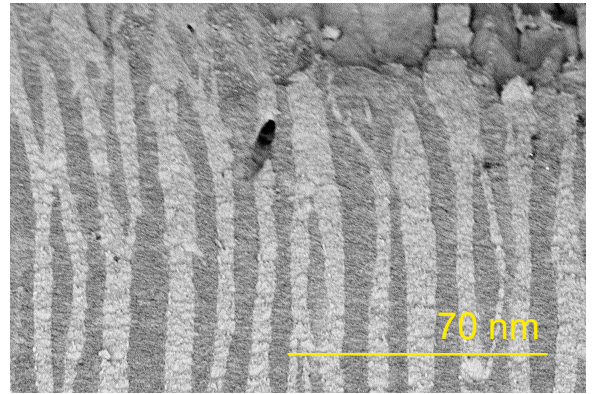
T



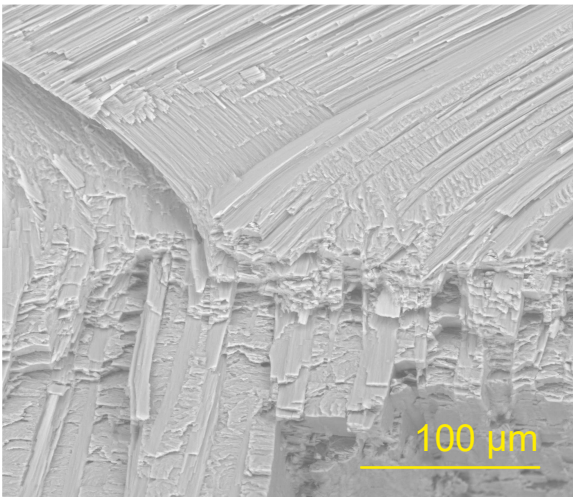
U



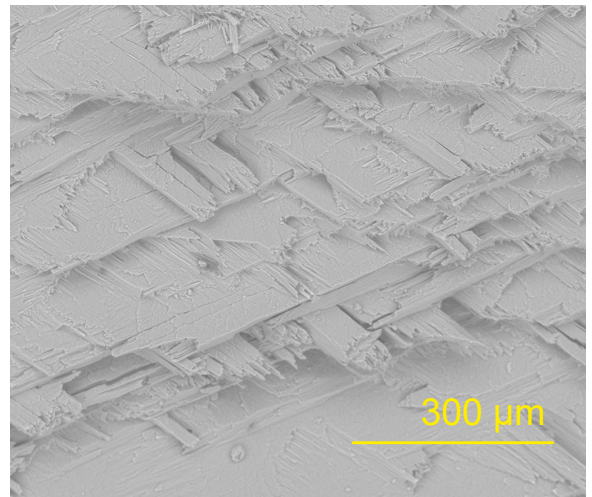
V



W

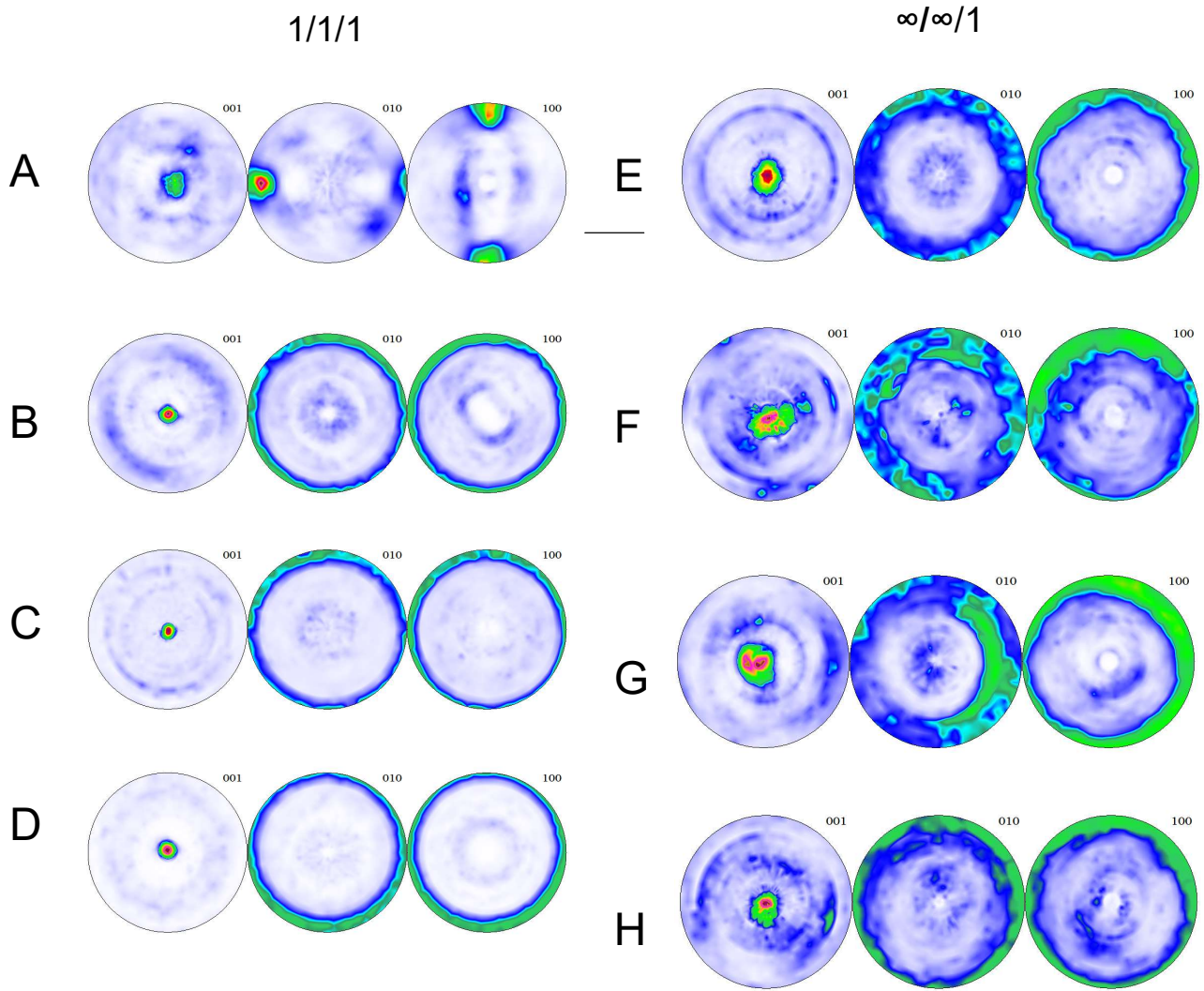


X



Fracturas vistas en SEM de S) *Cymbula safiana* (comarginal), T) *Chaetopleura angulata* (radial), U) *Fissidentalium metivieri* (comarginal), V) *Yoldia* sp. (pulida), W) *Oliva reticulata* (comarginal), X) *Rissota otaheziata* (radial)

# TEXTURAS Ó PATRONES

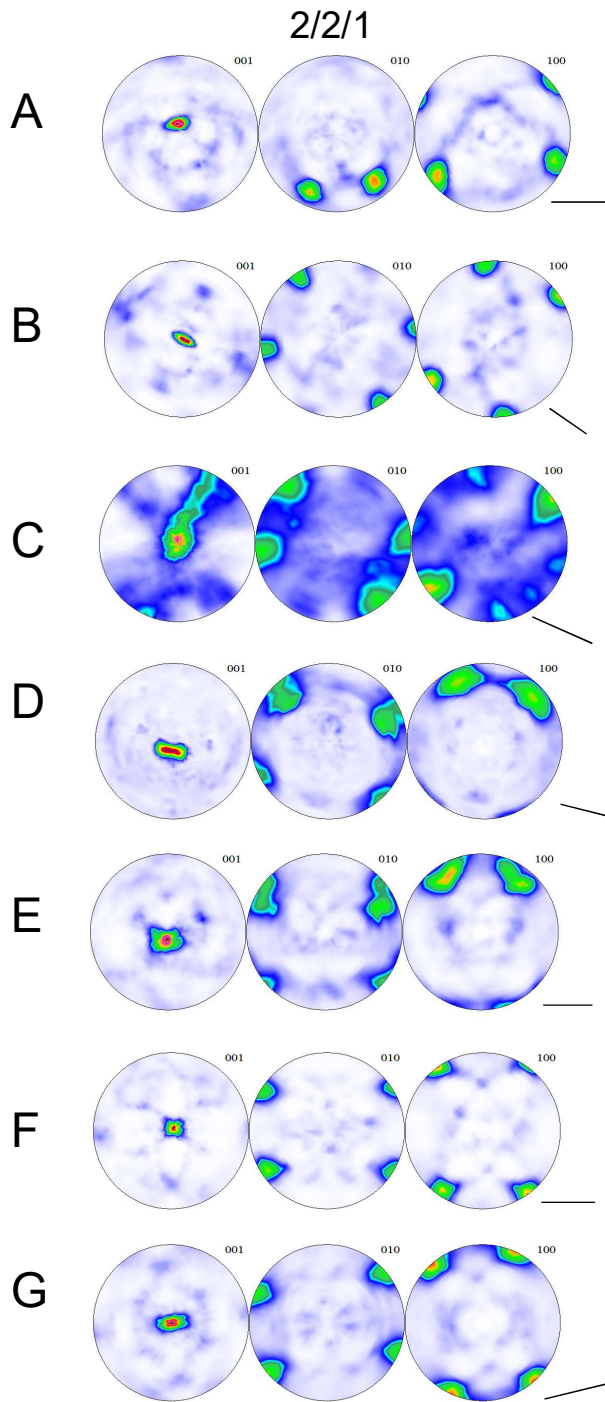


Capa	$J_n$
<b>A)</b> <i>Chaetopleura angulata</i> (IL)	
<b>B)</b> <i>Megayoldia thraciaeformis</i> (IL)	0,94
<b>C)</b> <i>Cuspidaria nobilis</i> (IL)	0,96
<b>D)</b> <i>Eucrassatella decipiens</i> (IL)	0,97
<b>E)</b> <i>Corbula sinensis</i> (IL)	0,86
<b>F)</b> <i>Tridacna gigas</i> (EL)	0,75
<b>G)</b> <i>Tridacna gigas</i> (IL)	0,86
<b>H)</b> <i>Nerita undata</i> (EL)	0,5

$J_n$ : Índice textural

————— orientación lamelas de 1er orden

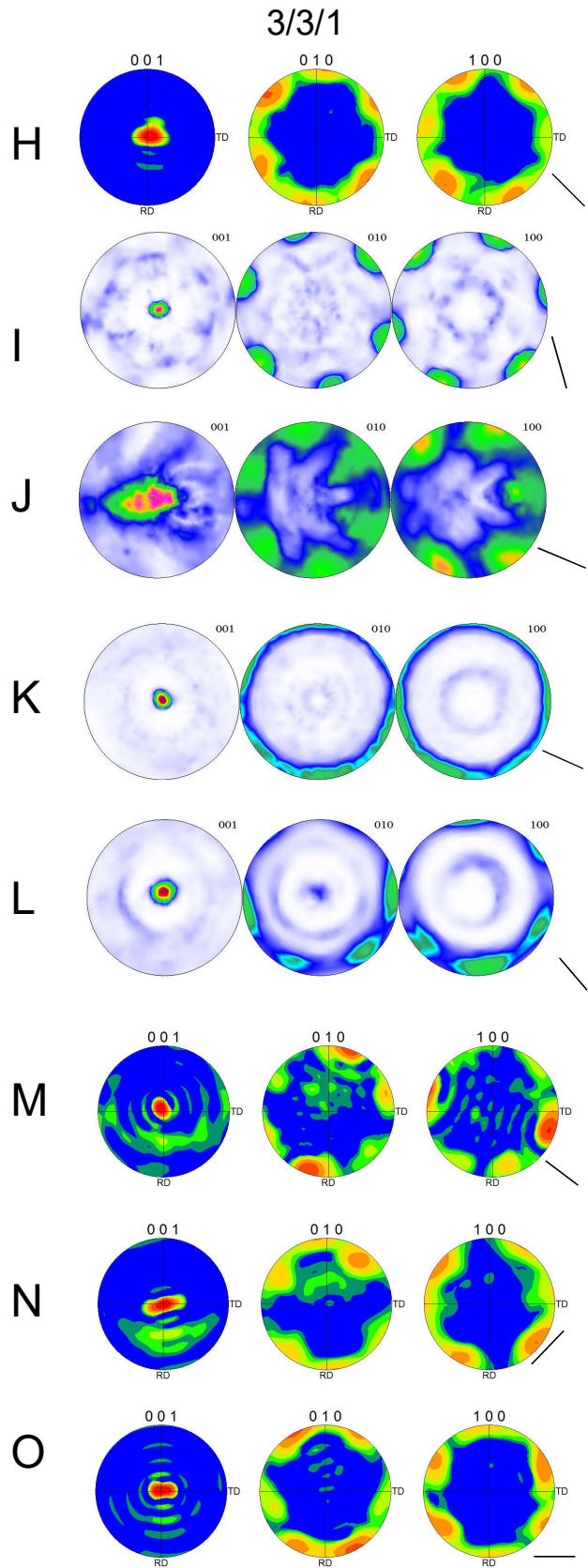




<i>Capa</i>	<i>Jn</i>
<b>A) <i>Arca noae</i> (IL)</b>	
<b>B) <i>Pholas dactylus</i> (IL)</b>	0,95
<b>C) <i>Periglypta albocancellata</i> (IL)</b>	0,5
<b>D) <i>Tellina foleacea</i> (IL)</b>	0,94
<b>E) <i>Naticiade sp.</i> (EL)</b>	0,92
<b>F) <i>Strombus pugilis</i> (IL)</b>	0,98
<b>G) <i>Semicassis bisulcata</i> (EL)</b>	0,86

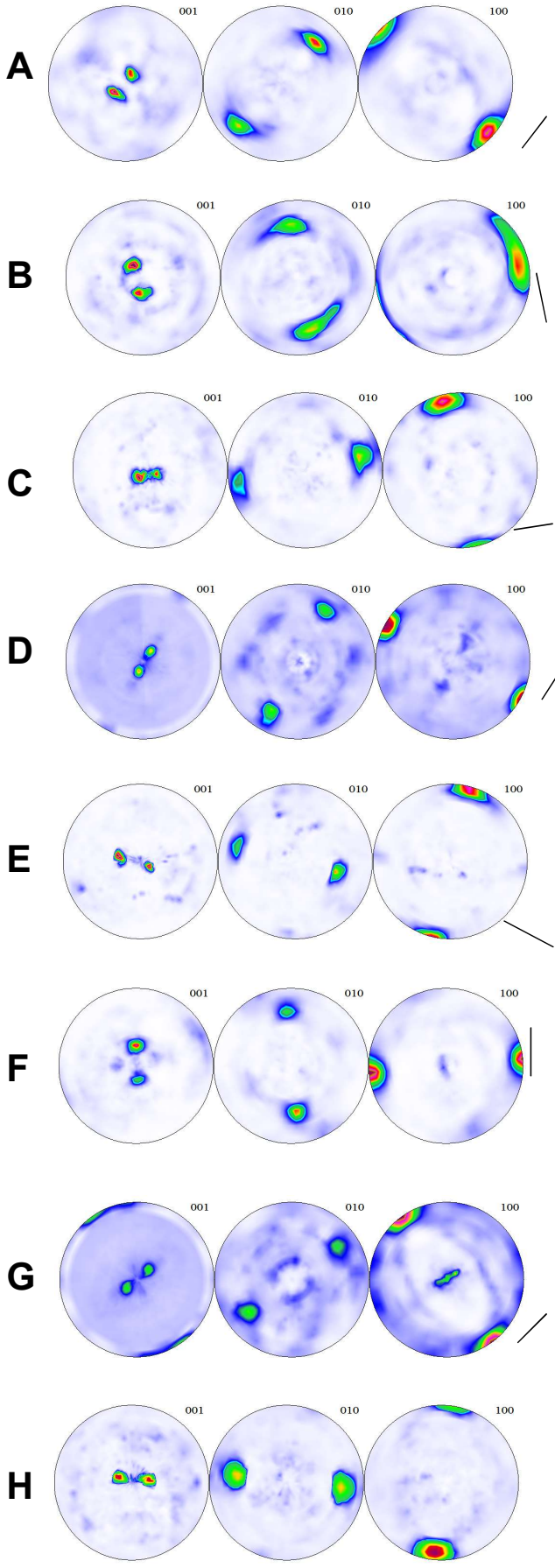
*Jn*: Índice textural

————— orientación lamelas de 1er orden



<i>Capa</i>	<i>Jn</i>
<b>H) <i>Arca noae</i> (EL)<sub>EBS</sub>D</b>	
<b>I) <i>Lima lima</i> (IL)</b>	0,99
<b>J) <i>Donax deltoides</i> (IL)</b>	0,6
<b>K) <i>Callista chione</i> (ML)</b>	0,96
<b>L) <i>Cittarium pica</i> (EL)</b>	0,92
<b>M) <i>Tricolia capensis</i> (EL)<sub>EBS</sub>D</b>	0,89
<b>N) <i>Fissidentalium metivieri</i> (IL)<sub>EBS</sub>D</b>	
<b>O) <i>Tectus pyramis</i> (EL)<sub>EBS</sub>D</b>	0,86

1/2/2

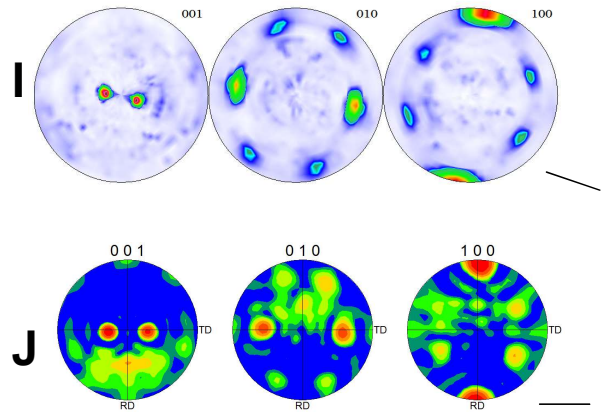


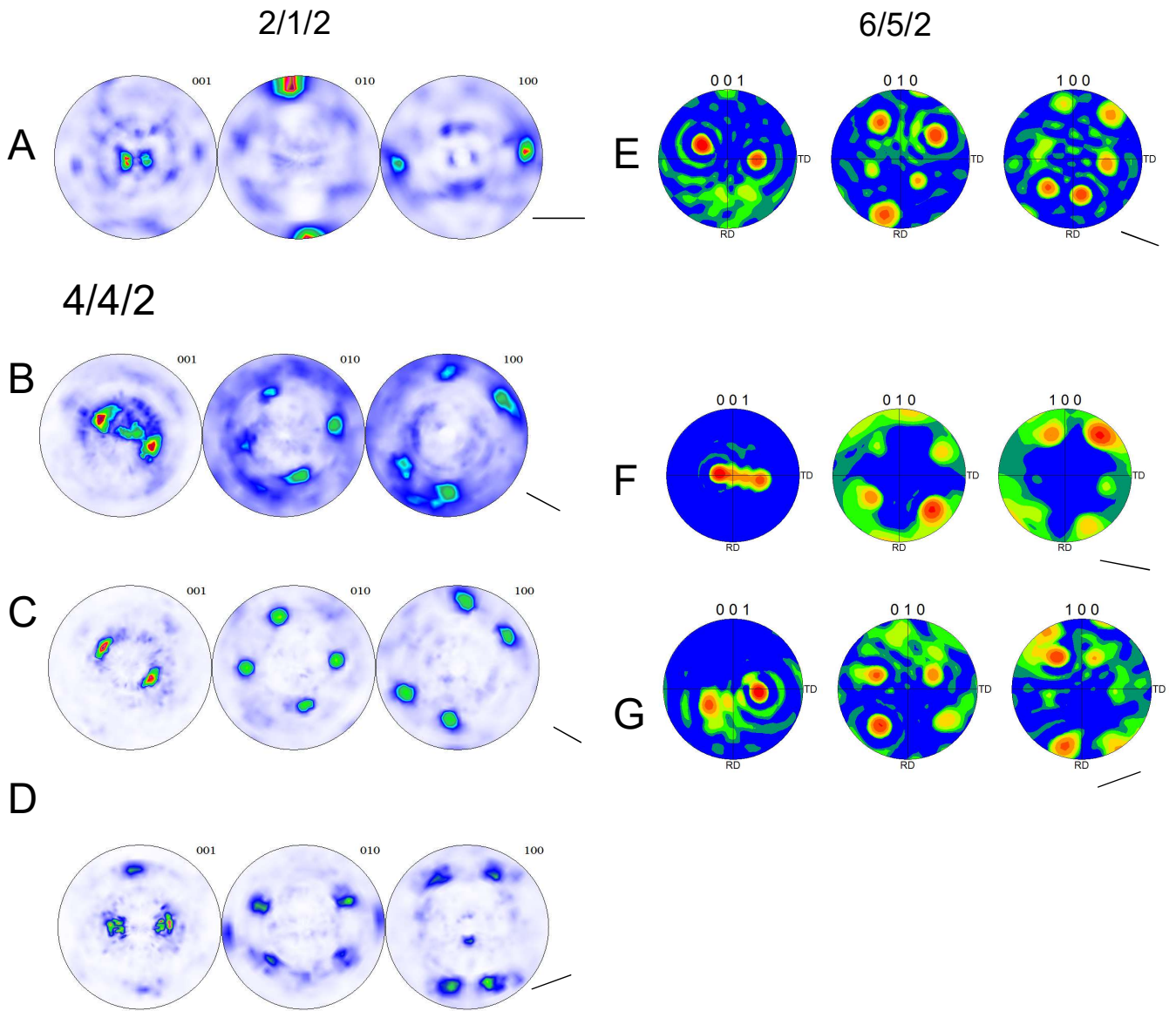
Capa	$J_n$	ángulo 001
A) <i>Turritella duplicata</i> (1L)	0,96	40°
B) <i>Naticarius hebraeus</i> (1L)	0,98	45°
C) <i>Littorina littorea</i> (1L)	0,97	25°
D) <i>Semicassis granulata</i> (ML)	0,86	40°
E) <i>Semicassis bisulcata</i> (3ML)	0,99	40°
F) <i>Achatina fulica</i> (EL)	0,96	50°
G) <i>E. vermiculata</i> (2ML)	0,85	40°
H) <i>Ryssota otahejata</i> (ML)	0,99	40°
I) <i>Semicassis bisulcata</i> (1L)	0,98	45°
J) <i>Achatina fulica</i> (EL) <sub>EBS</sub> D	0,83	63°

$J_n$ : Índice textural, ángulo 001: ángulo entre máximos 001

— orientación lamelas de 1er orden

5/6/2



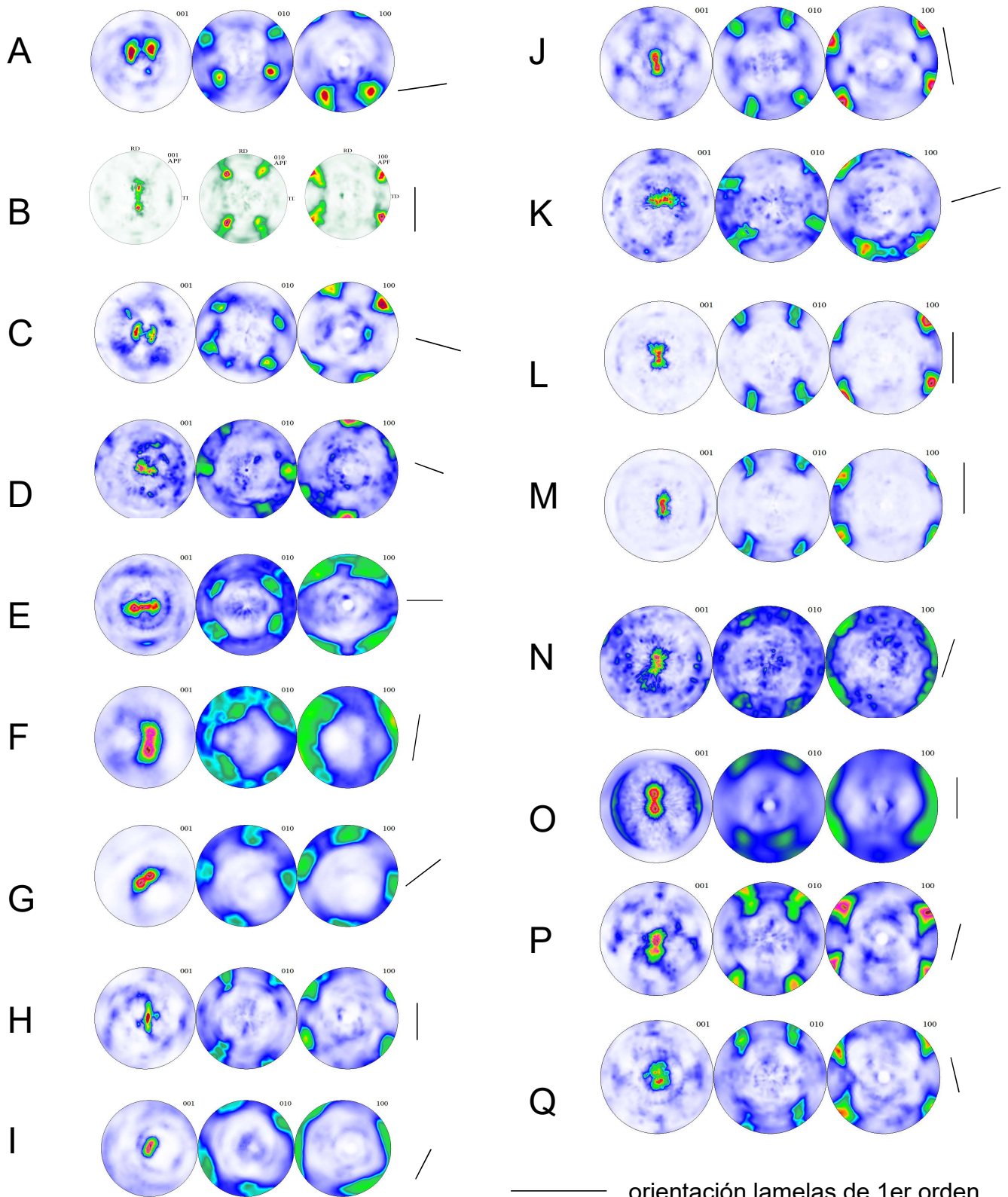


<i>Capa</i>	<i>J<sub>n</sub></i>	ángulo 001
<b>A)</b> <i>Diodora graeca</i> (IL)	0,77	30°
<b>B)</b> <i>Fissidentalium metivieri</i> (EL)	0,89	75°
<b>C)</b> <i>Fissurella crassa</i> (IL)	0,97	75°
<b>D)</b> <i>Glycymeris glycymeris</i> (IL)	0,8	70°
<b>E)</b> <i>Diodora graeca</i> (IL) <sub>EBS</sub>	0,86	88°
<b>F)</b> <i>Fissidentalium metivieri</i> (EL) <sub>EBS</sub>	0,88	70°
<b>G)</b> <i>Fissurella crassa</i> (IL) <sub>EBS</sub>	0,82	80°

*J<sub>n</sub>*: Índice textural, ángulo 001: ángulo entre máximos 001

— orientación lamelas de 1er orden

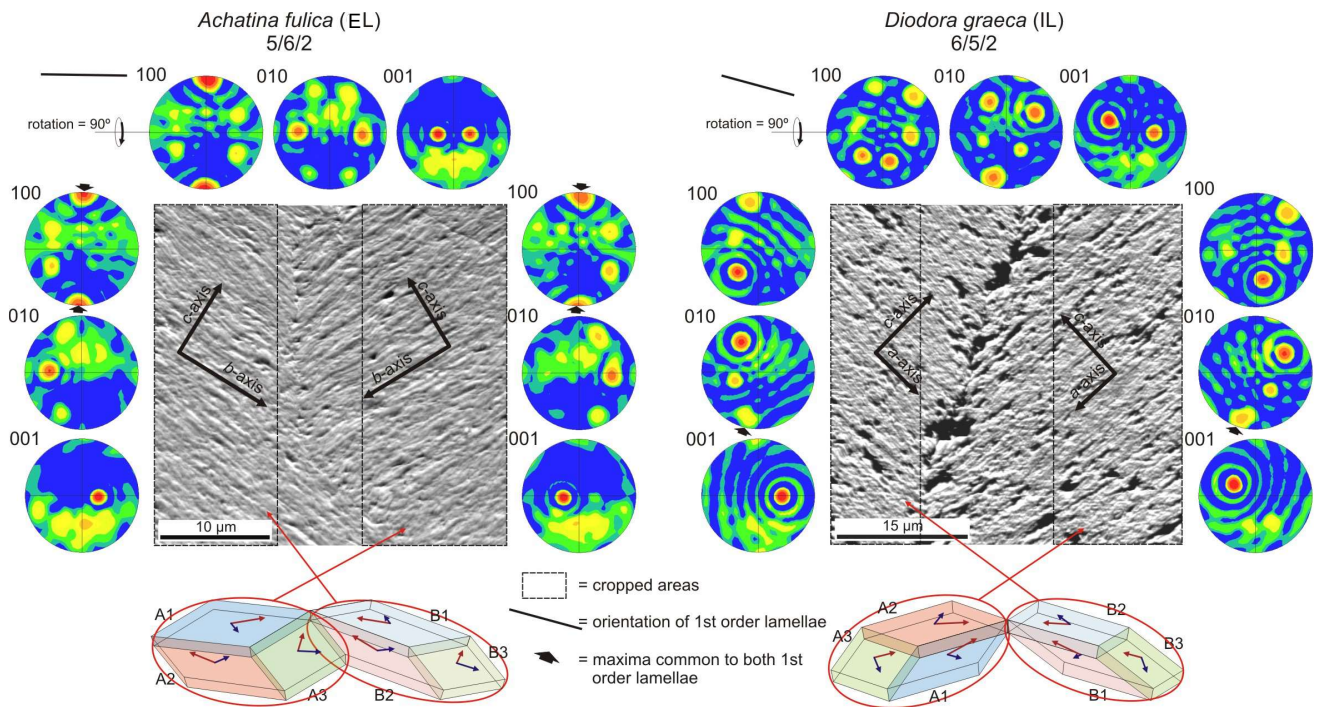




Capa	$J_n$	ángulo 001	Capa	$J_n$	ángulo 001
A) <i>Arca noae</i> (EL)	0,86	40°	J) <i>Semicassis bisulcata</i> (2ML)	0,9	20°
B) <i>Glycymeris nummaria</i> (EL)	0,92	45°	K) <i>Lobatus gigas</i> (2ML)	0,96	20°
C) <i>Spondylus sinensis</i> (IL)	0,89	40°	L) <i>Lobatus gigas</i> (1L)	0,89	25°
D) <i>Plicatula muricata</i> (1L)	0,88	25°	M) <i>Strombus pugilis</i> (EL)	0,96	20°
E) <i>Laevicardium oblongum</i> (1L)	0,82	45°	N) <i>Cimbula safiana</i> (1L)	0,5	25°
F) <i>Lioconcha castrensis</i> (EL)	0,75	40°	O) <i>Conus marmoreus</i> (1L)	0,5	30°
G) <i>Circe rivularis</i> (EL)	0,75	20°	P) <i>Oliva reticulata</i> (EL)	0,96	30°
H) <i>Fissidentalium metivieri</i> (1L)	0,88	30°	Q) <i>Oliva reiculata</i> (1L)	0,88	25°
I) <i>Phacoides pectinatus</i> (1L)	0,75	20°			

$J_n$ : Índice textural, ángulo 001: ángulo entre máximos 001

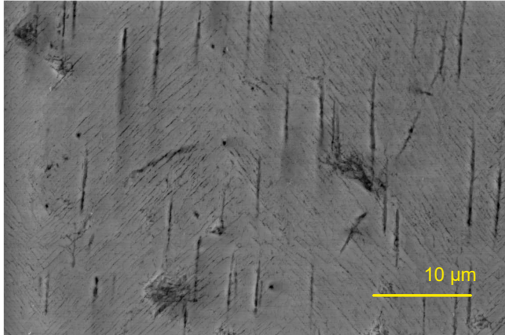
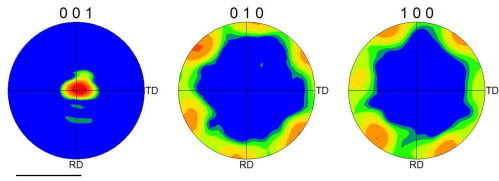
# EBSD



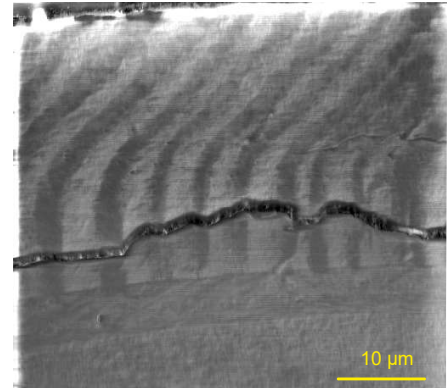
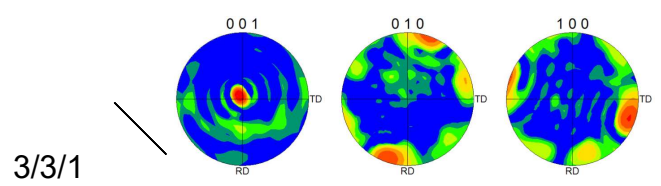
Resultados de EBSD para la capa externa con MLC de *Achatina fulica* (izquierda) y *Diodora graeca* (derecha).



*Arca noae* (EL)



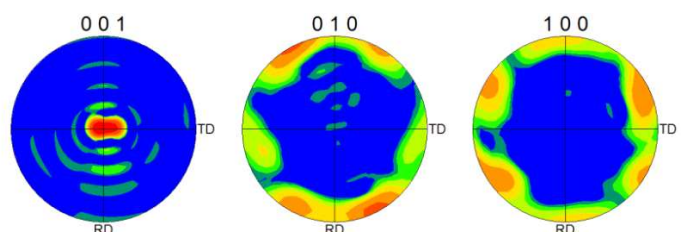
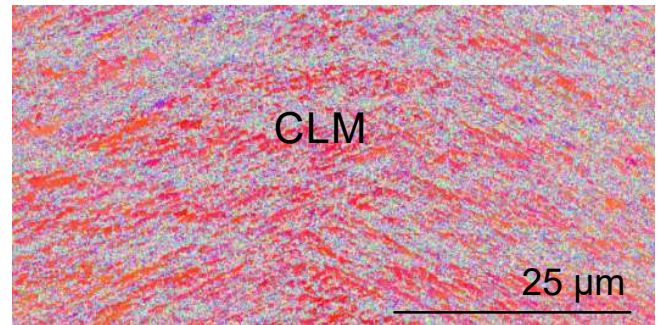
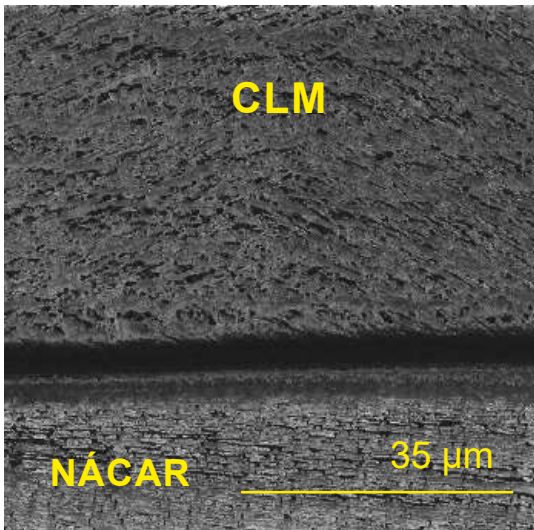
*Tricolia capensis* (EL)



————— orientación lamelas de 1er orden

*Tectus pyramis* (EL)

3/3/1

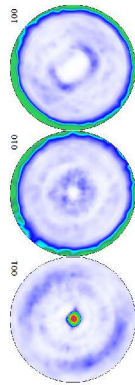
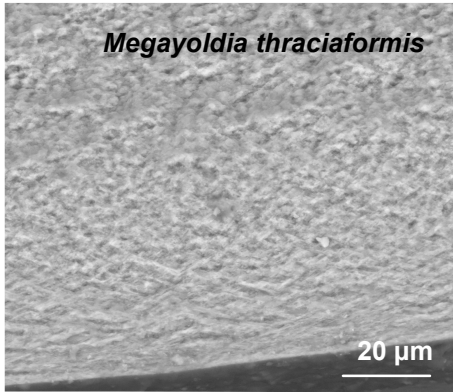


Resultados de EBSD para la capa con MLC en *Arca noae*, *Tricolia capensis* y *Tectus pyramis*.

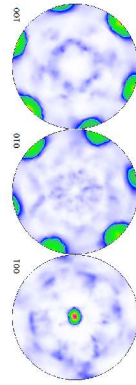


# PATRONES TEXTURALES PRESENTES EN BIVALVIA

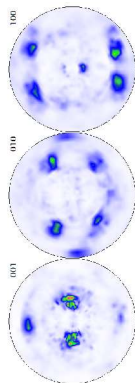
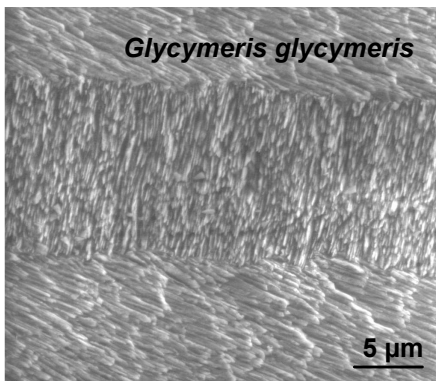
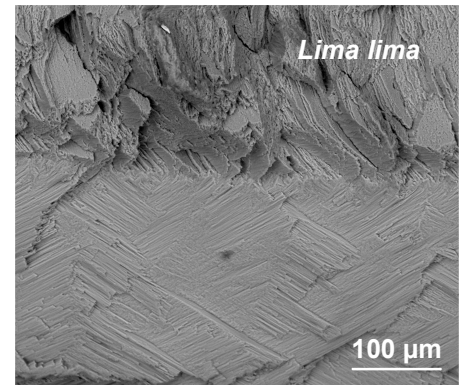
## PROTOBRANCHIA



Limoida

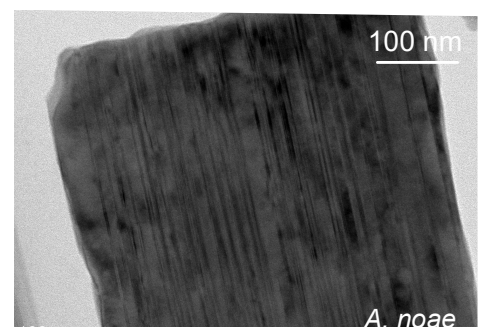
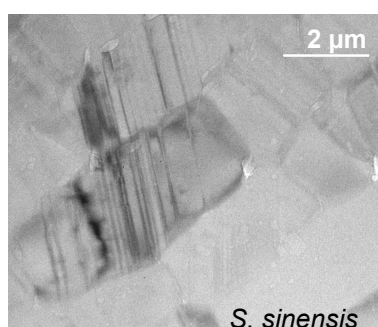
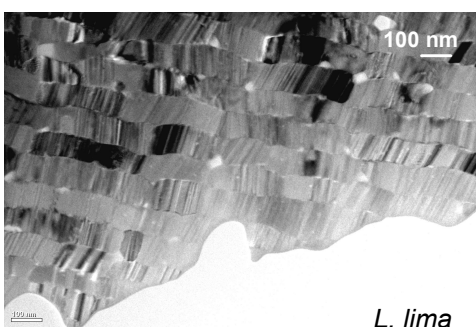
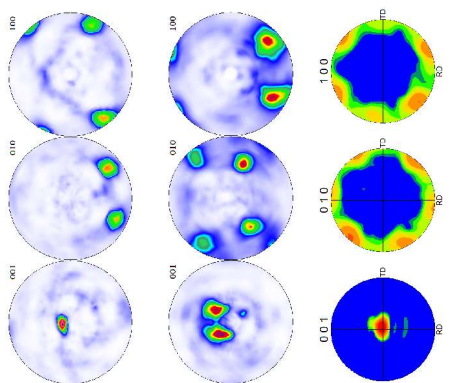
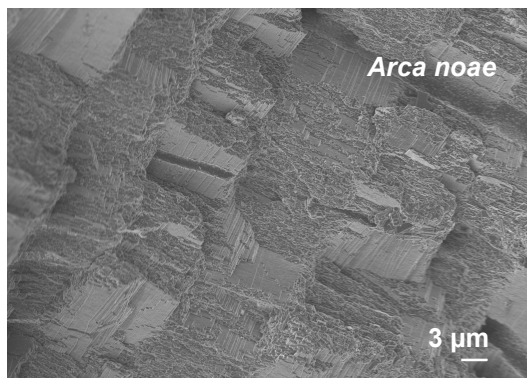
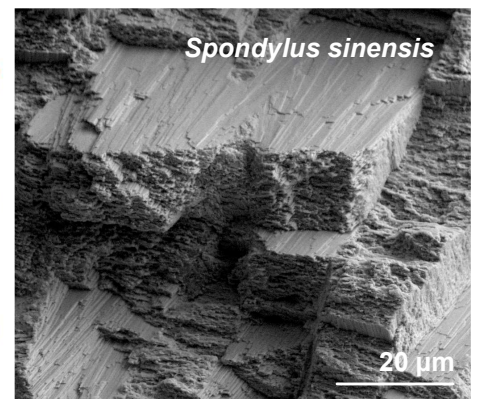
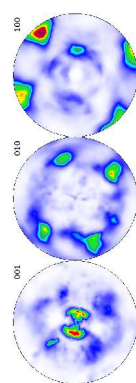


## PTERIOMORPHIA



Arcoïda

Pectinoida

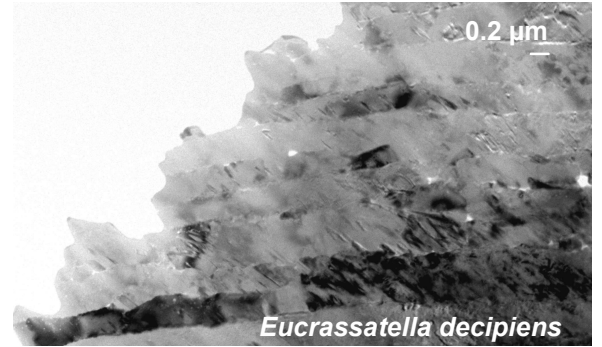
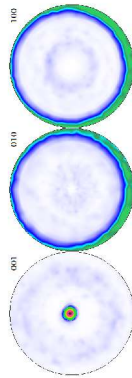
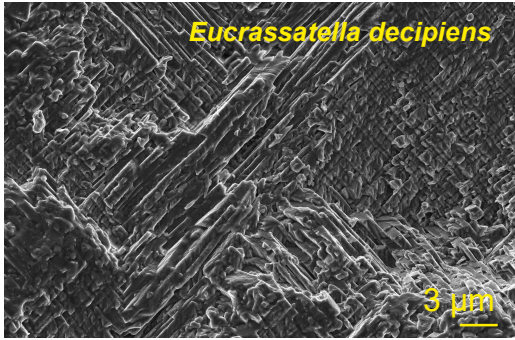




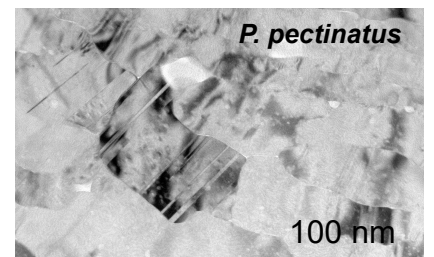
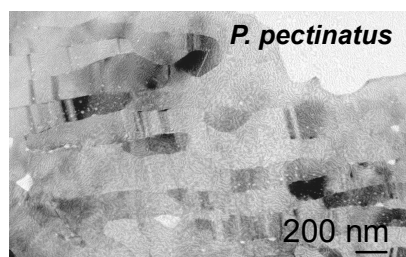
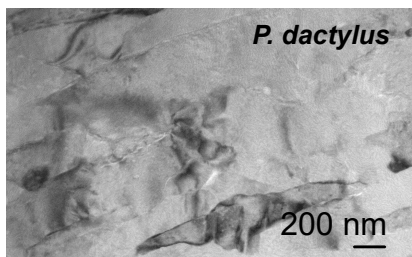
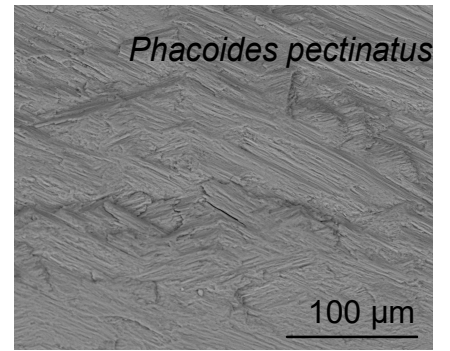
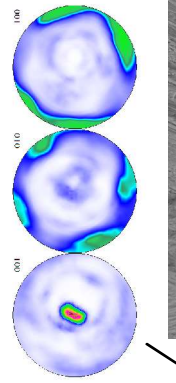
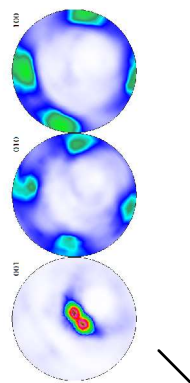
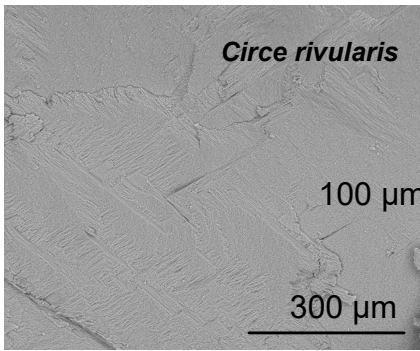
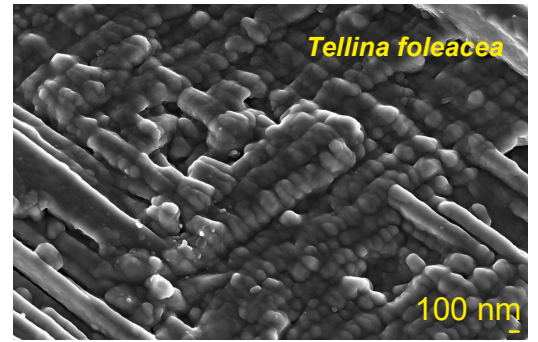
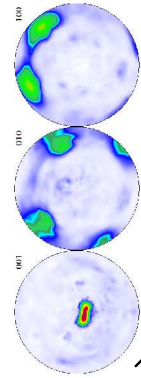
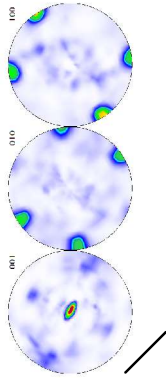
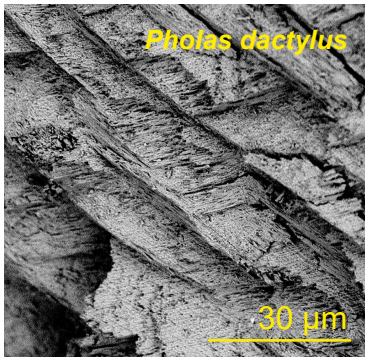
# PATRONES TEXTURALES PRESENTES EN BIVALVIA

## HETERODONTA

Archiheterodonta



Euheterodonta

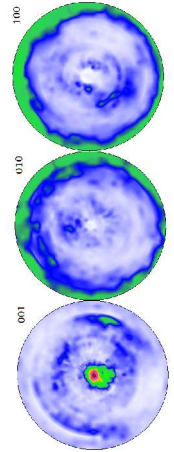
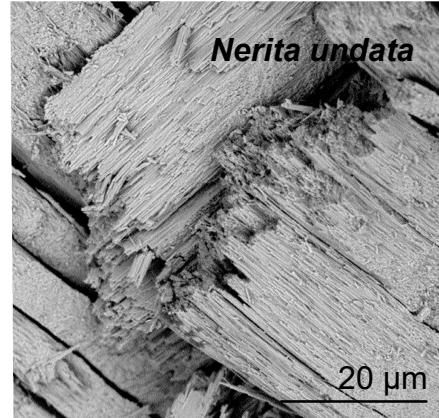
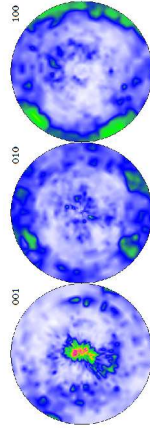
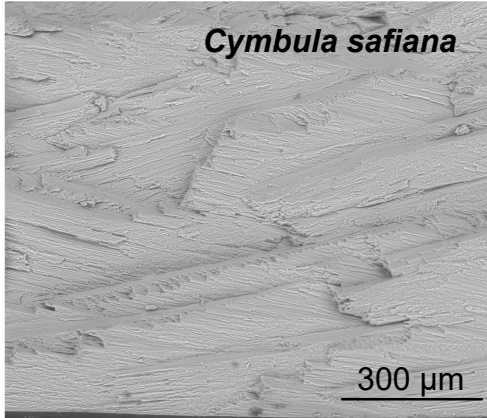




# PATRONES TEXTURALES PRESENTES EN GASTROPODA

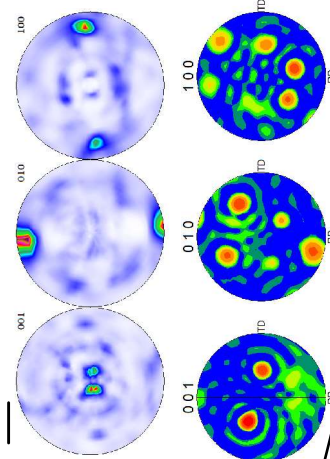
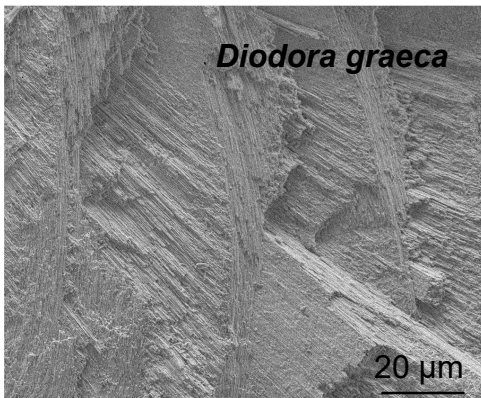
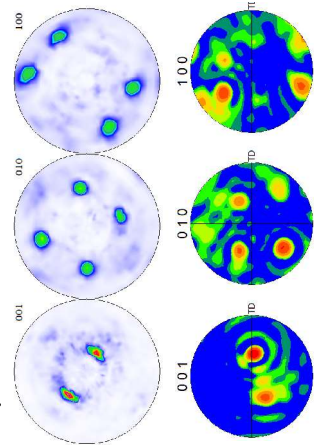
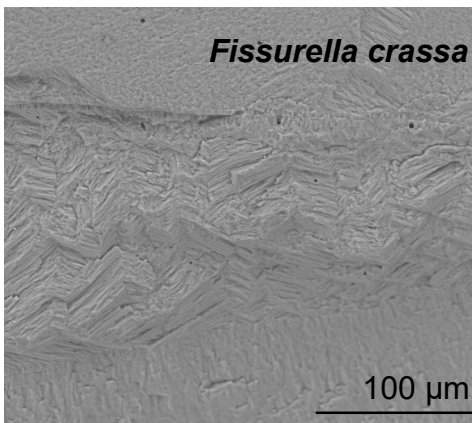
## PATELLOGASTROPODA

## NERITOMORPHA

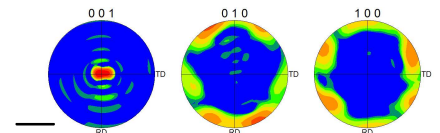
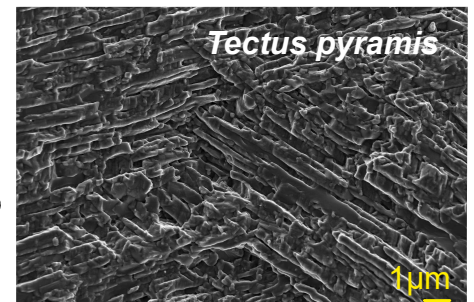


## VETIGASTROPODA

Fissurellidae



Tegulidae

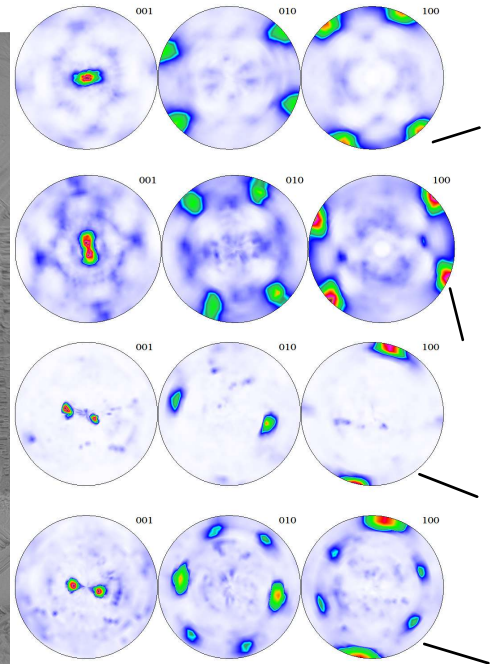
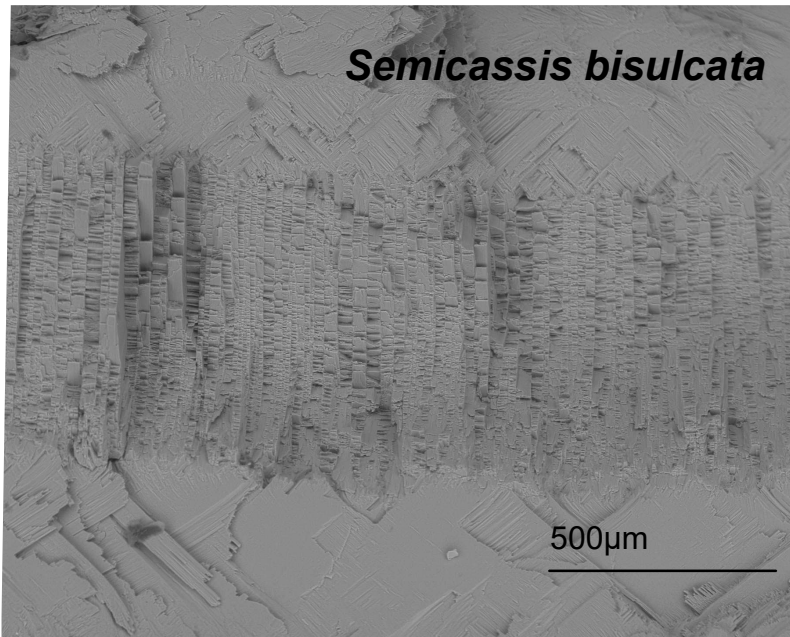




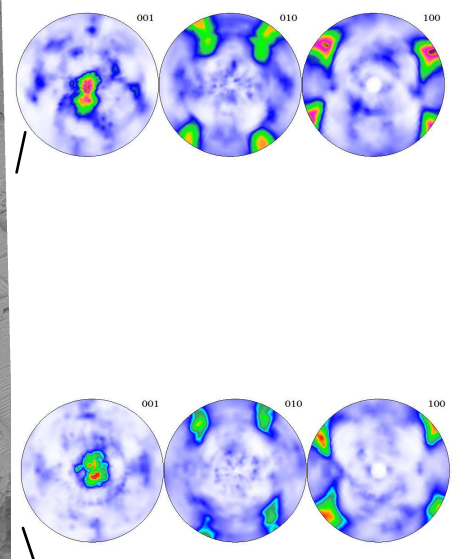
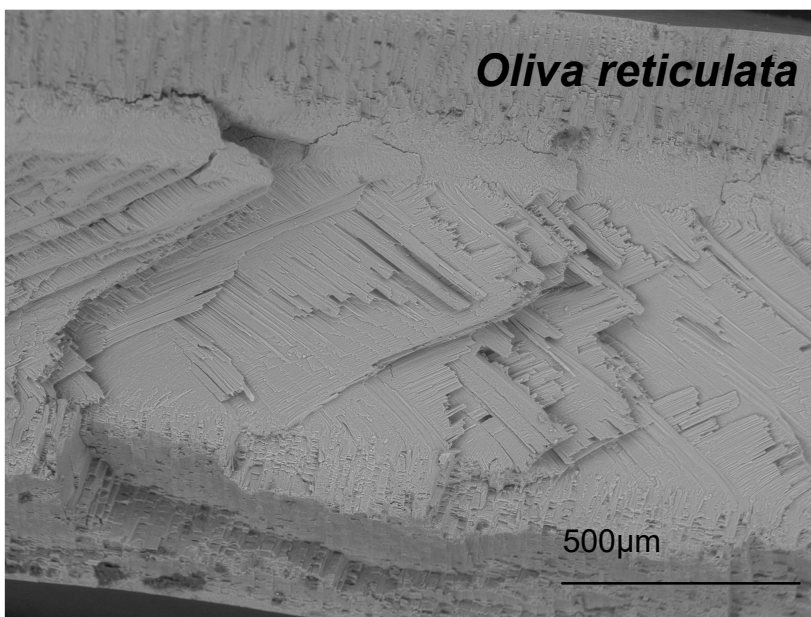
# PATRONES TEXTURALES PRESENTES EN GASTROPODA

## CAENOGASTROPODA

### Littorinomorpha



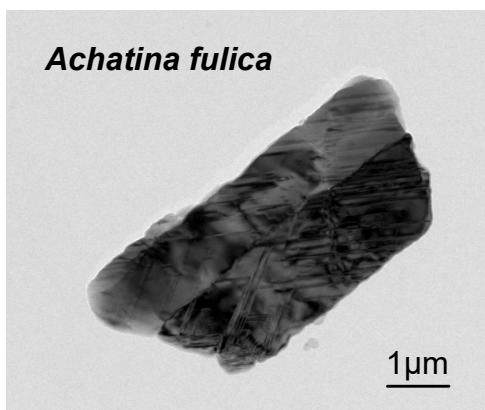
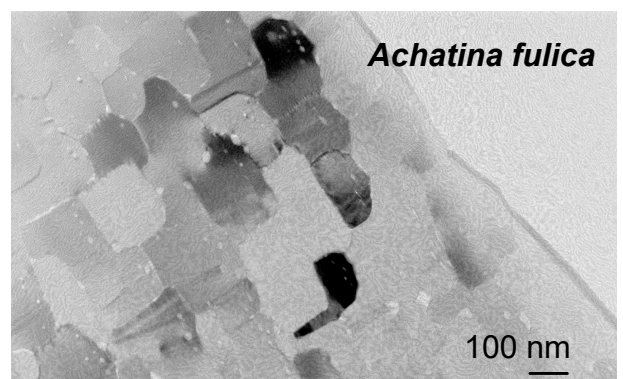
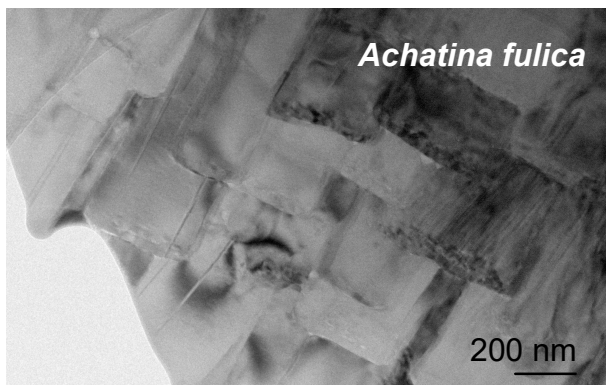
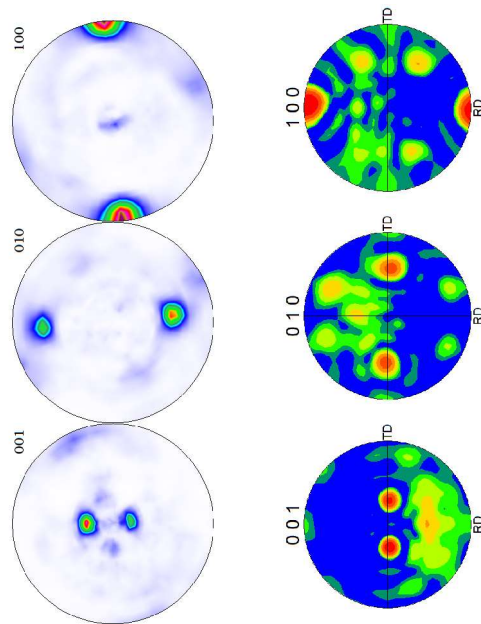
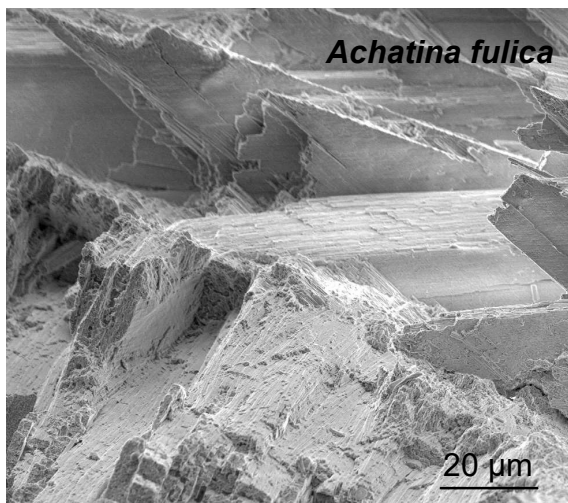
### Neogastropoda



# PATRONES TEXTURALES PRESENTES EN GASTROPODA

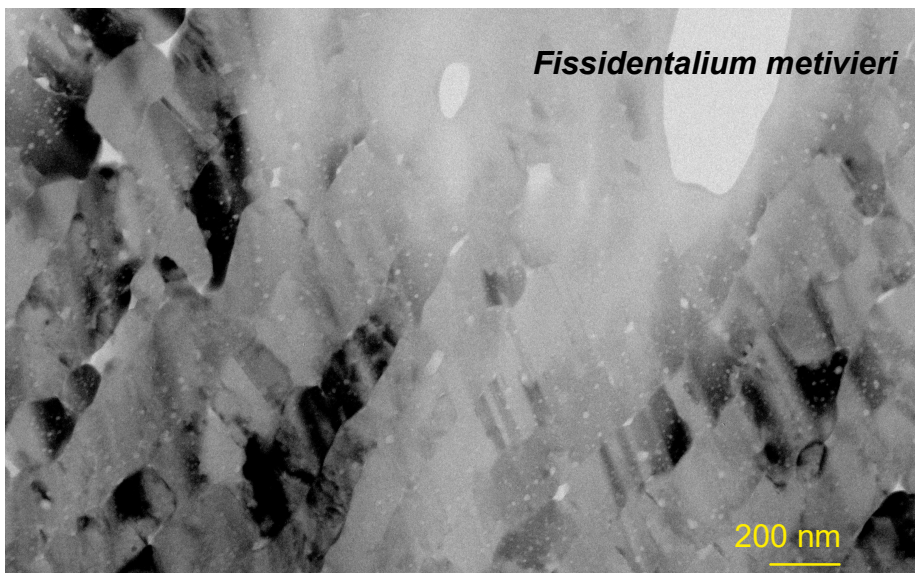
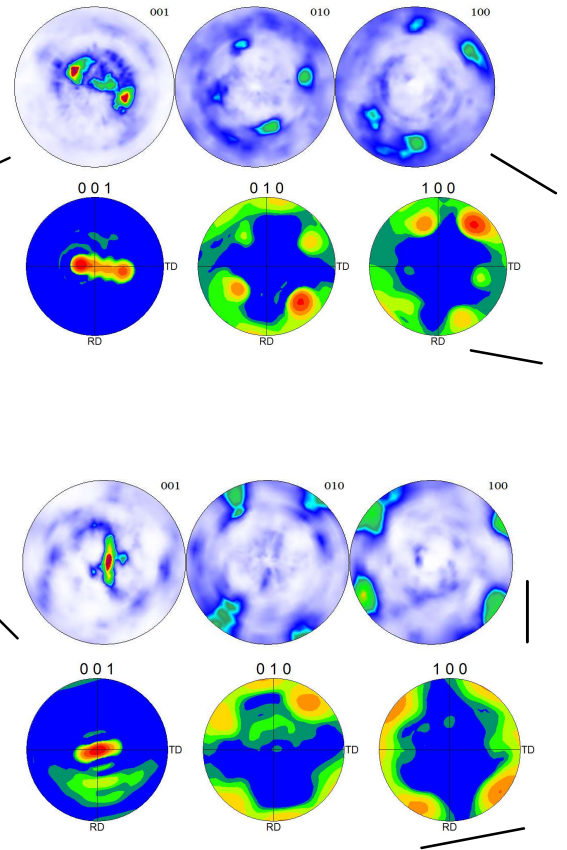
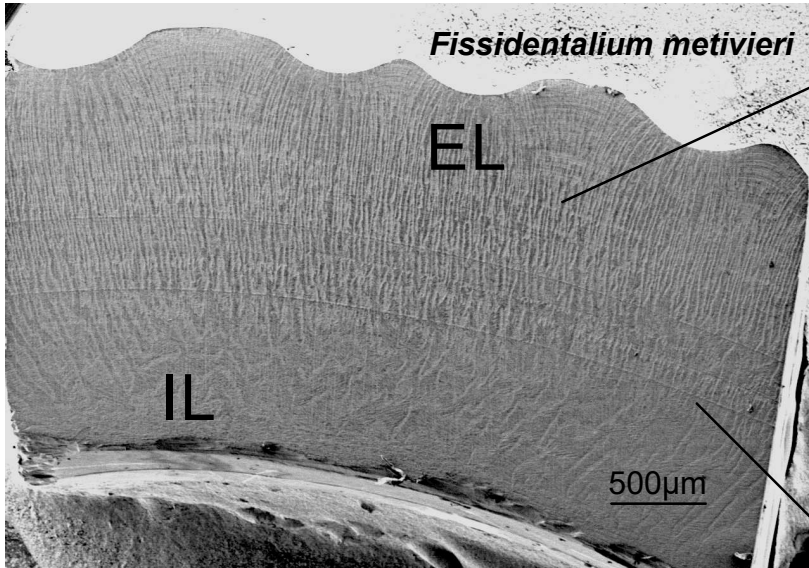
## CAENOGASTROPODA

### Heterobranquia

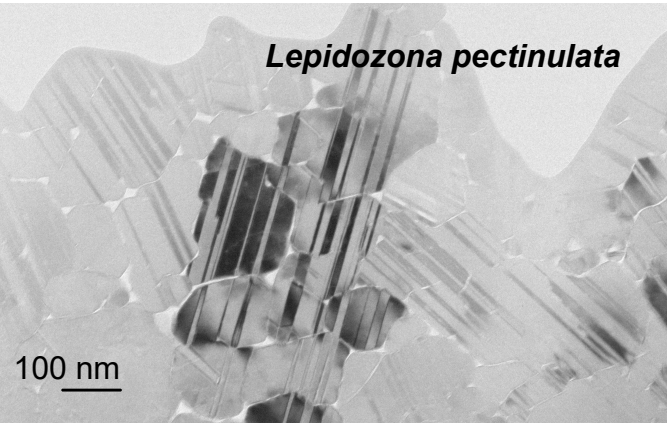
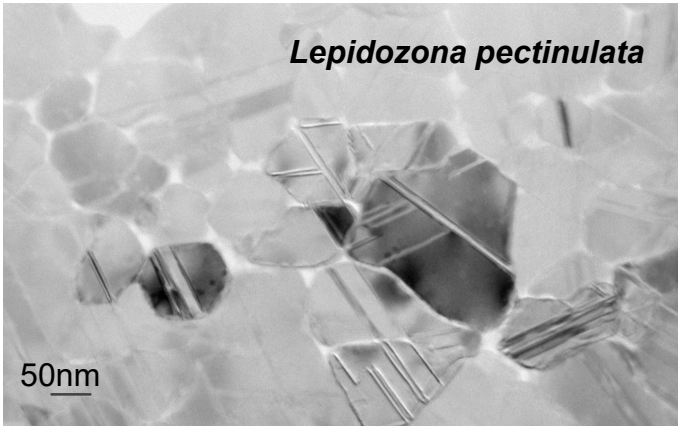
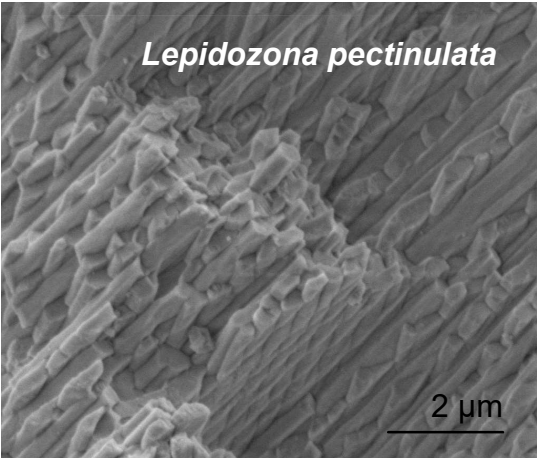
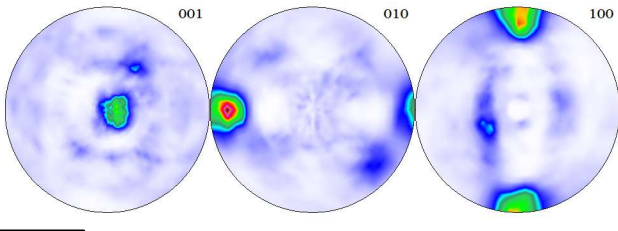
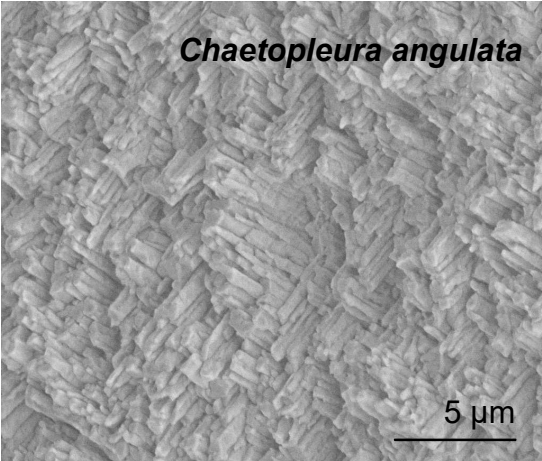




# PATRONES TEXTURALES PRESENTES EN SCAPHOPODA

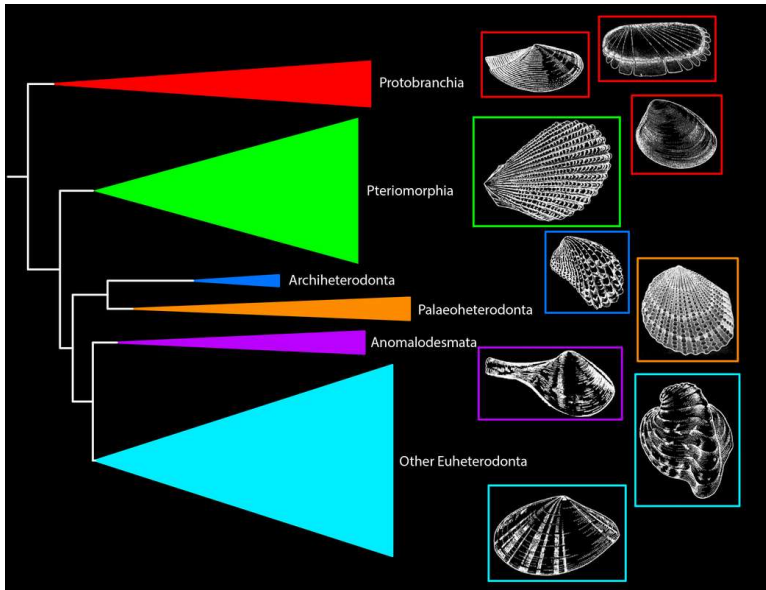


# PATRONES TEXTURALES PRESENTES EN POLYPLACOPHORA

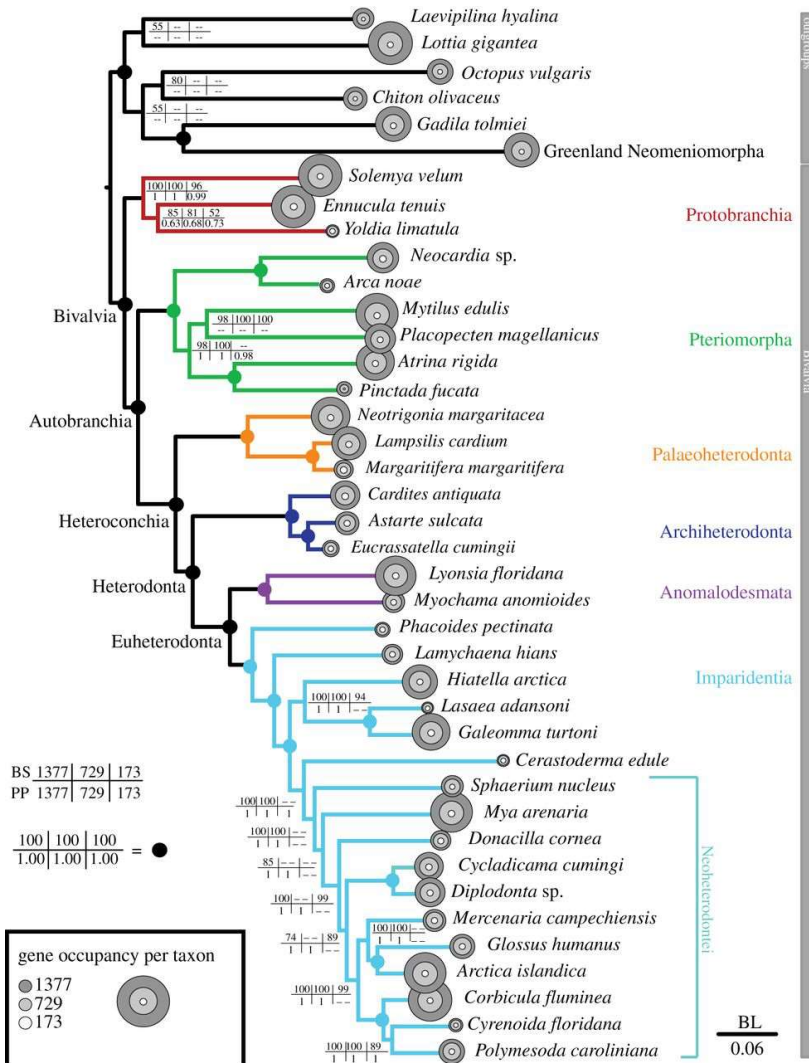


# ULTIMAS FILOGENIAS MOLECULARES PARA LA CLASE BIVALVIA

Sharma *et al.* 2012



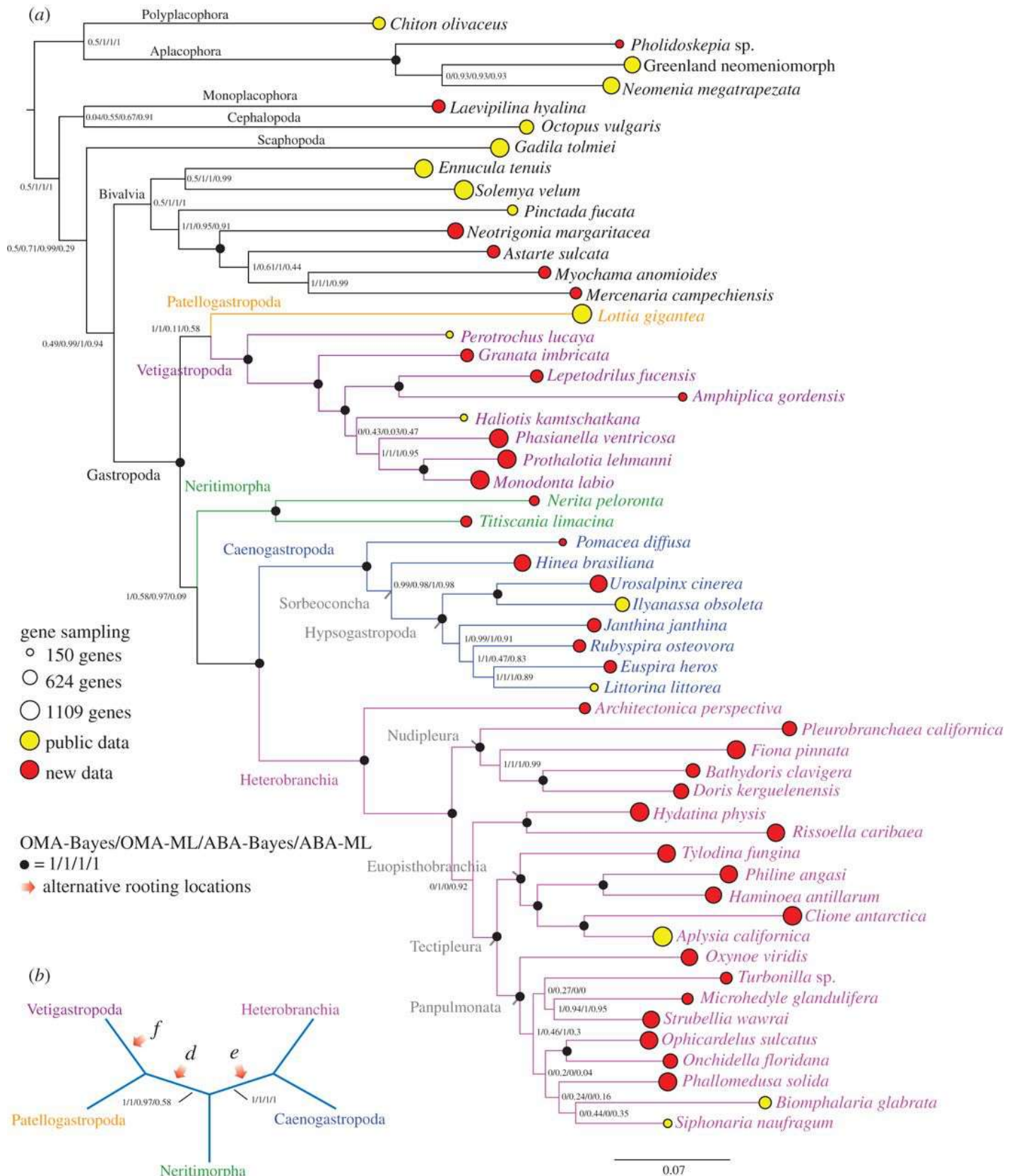
González *et al.* 2015



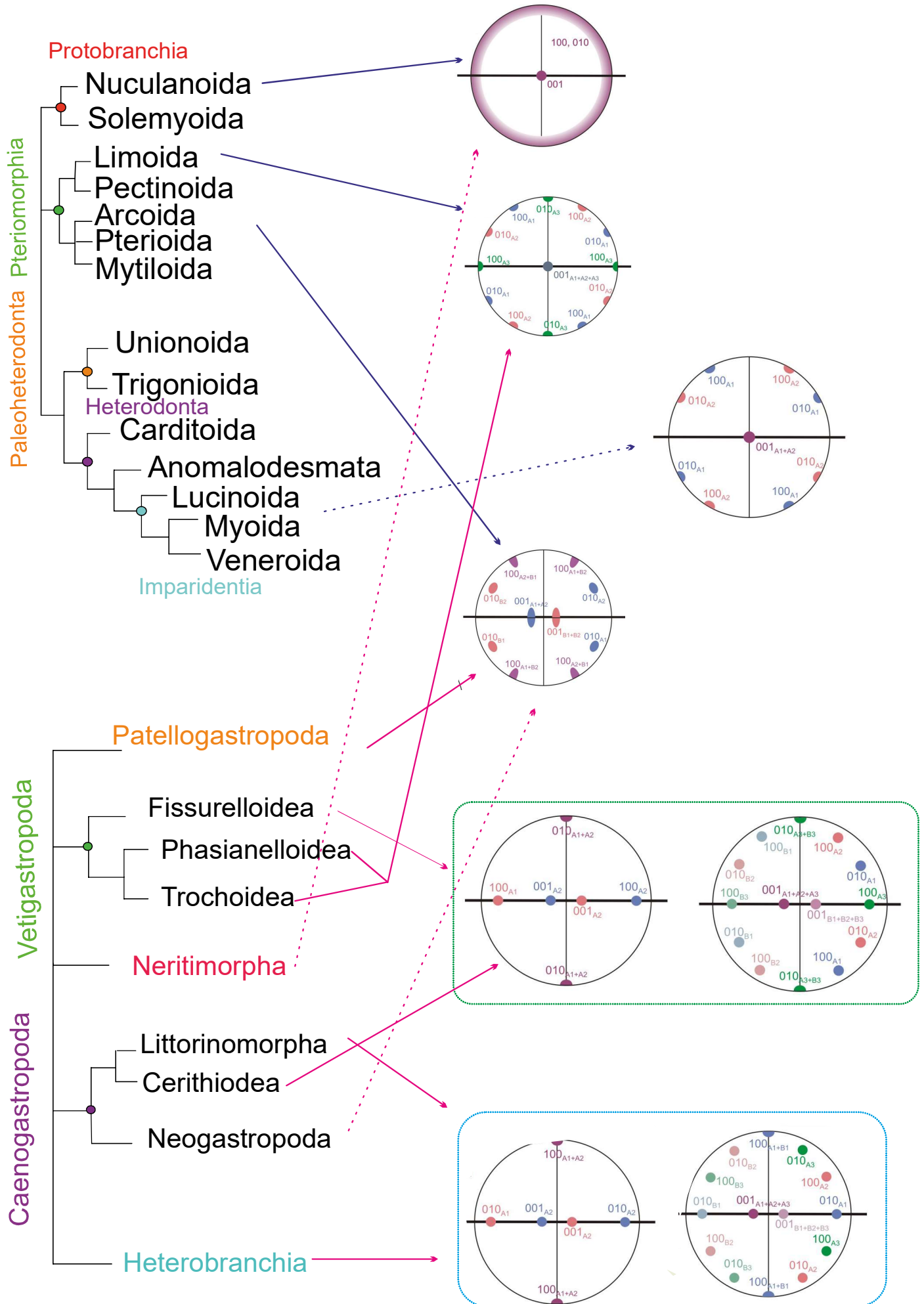


# ULTIMAS FILOGENIAS MOLECULARES PARA LA CLASE GASTROPODA

Zapata et al. 2014



# CONVERGENCIAS EVOLUTIVAS EN LA TEXTURA CRISTALOGRÁFICA





## ANEXO 2. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

## Crystallography and textural aspects of crossed lamellar layers in Arcidae (Bivalvia, Mollusca) shells

ALMAGRO Ío<sup>1,3, a \*</sup>, DRZYMAŁA Piotr<sup>2,b</sup>,  
RODRÍGUEZ-NAVARRO Alejandro B.<sup>1,c</sup>, SAINZ-DÍAZ C. Ignacio<sup>3,d</sup>,  
WILLINGER Marc G.<sup>4,e</sup>, BONARSKI Jan<sup>2,f</sup> and CHECA Antonio G.<sup>1,g</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Institute of Metallurgy and Materials Science of the Polish Academy of Sciences, 25 Reymonta Str., 30-059 Krakow, Poland

<sup>3</sup>Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC), Avda. de Las Palmeras nº 4, 18100. Armilla, Granada, Spain

<sup>4</sup>Fritz Haber Institute of the Max-Planck-Society, Department of Inorganic Chemistry. Faradayweg 4-614195 Berlin, Germany

<sup>a\*</sup>io@ugr.es, <sup>b</sup>pdrzymala@imim.pl, <sup>c</sup>anava@ugr.es, <sup>d</sup>ignacio.sainz@iact.ugr-csic.es,  
<sup>e</sup>willinger@fhi-berlin.mpg.de, <sup>f</sup>j.bonarski@imim.pl, <sup>g</sup>acheca@ugr.es

**Keywords:** Aragonite, microstructure, crossed lamellar, texture, preferred orientations, mollusc shell

**Abstract.** Bivalve shell microstructures are important traits that can be used for evolutionary and phylogenetic studies. Here we examine the crossed lamellar layers forming the shells of the arcoids, *Arca noae*, *Glycymeris glycymeris* and *Glycymeris nummaria* in order to better understand the crystallography of this complex biomaterial. Textural aspects and crystallography of the outer crossed lamellar layer of these species have been clarified using high-resolution electron microscopy and X-ray diffraction (XRD) techniques. These shells are made of aragonite crystals in a crossed lamellar arrangement with a high preferred crystal orientation (texture). The distribution of maxima in the pole figures implies that there is not a single crystallographic pattern within the measured area, but a continuous variation between two classes of distinct patterns. In the first of these, there is a set of four crystal orientations (referred to as upper set). These four crystal orientations are distributed in two pairs (which are coplanar), with the crystals of each pair being twinned on {110}. The pairs are tilted with respect to each other by approximately 20-40° around an axis perpendicular to the {110} common twinning plane. In the second pattern (referred to as lower set), the crystal orientations of each pair are rotated around a  $\langle\bar{1}10\rangle$  direction until the *a*-axes of the diametrically opposing crystal orientations of two different twinned pairs become parallel. As a result of this rotation, in the lower set the crystal orientations no longer form pairs twinned on {110}. These crystallographic relationships are unknown in inorganic aragonite. Our results are similar to those reported for the neogastropod *Conus marmoreus*. Thus, the common crossed lamellar crystallography in the arcoid bivalves and in *C. marmoreus* is a striking example of convergence in the development of crossed lamellar microstructures.

### Introduction

Bivalve shells are biocomposites of calcium carbonate (either calcite or aragonite) crystals and a certain amount of intra- or intercrystalline organic matrix (between 1-5 mass %) [1]. This minor proportion of organic matter provides the shell structure with unique mechanical properties, far superior to its inorganic aragonite or calcite counterparts. For example, nacre, or mother of pearl, which is one of the best known and the strongest of these arrangements, is almost 3000 times stronger than inorganic aragonite [2]. In bivalve shells there are up to five superposed calcium carbonate layers. Calcite or aragonite crystals, which rarely mix within the same layer, are organized in different crystallographic arrangements called microstructures. These microstructures

are very diverse across the phylum Mollusca. Bøggild [3] was the first to define mollusc microstructures 85 years ago, followed by many other researchers [4-11]. The most common microstructures among molluscs are the crossed lamellar microstructures (CLMs), whose principal advantage is their ability to dissipate and stop cracks [12].

The unique mechanical properties of CLMs have ignited interest in building this biomaterial *in vitro* in order to elucidate how the biomineralisation process occurs in these materials [13]. However, CLMs are not only important for their mechanical properties. They have also been used, along with other microstructures, as phylogenetic tools by several authors [7,10,14-17]. CLMs in the Phylum Mollusca are the most widely distributed microstructures within the two most diverse classes, the Bivalvia and the Gastropoda. CLMs also appear in Polyplacophora and Scaphopoda, being absent only in two Conchifera classes, Monoplacophora and Cephalopoda. CLMs emerge in both marine and continental species, thus showing a great adaptive potential and evolutionary success. Furthermore, the good preservation of shell microstructures in fossils allows researchers to include both, extant and extinct specimens' data set in systematic analyses.

**CLM architecture.** CLMs are a group of aragonitic shell microstructures exclusive to molluscs, with a general organization which is reminiscent of plywood materials. CLM structural elements are arranged in a hierarchical distribution. This hierarchical distribution was accurately described by Kobayashi (1971) [8]. In CLMs, 1<sup>st</sup> order lamellae are the encompassing elements and contain 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> order lamellae. The general patterns of CLMs consist of a certain number of parallel blocks (1<sup>st</sup> order lamellae), which can extend perpendicularly (radial) or parallel (co-marginal) to the shell margin and which usually have interdigitating margins. Inside these 1<sup>st</sup> order lamellae there are laths (2<sup>nd</sup> order lamellae) arranged parallel, one on top of another. 2<sup>nd</sup> order lamellae are made up of impinging aragonite rods (3<sup>rd</sup> order lamellae) arranged parallel to each other. 2<sup>nd</sup> order lamellae dip in opposite directions in alternating 1<sup>st</sup> order lamellae, at an angle between 90-120° (Fig.1). Despite this general model, there is a high amount of ultrastructural variability seen within CLMs.

**CLMs in bivalves.** As mentioned above, the class Bivalvia is one of the most diverse classes within the molluscs secreting CLMs. There is an increasing body of information on bivalve CLMs since Schmidt [18] placed CLMs into a group of structures called porcellaneous. Bøggild [3] split the porcellaneous group into crossed lamellar, complex crossed lamellar and homogeneous microstructures. Many other authors have analysed the CLMs in bivalves using electron microscopy techniques [7,9,13,19-25] and have divided the CLMs into different subgroups. Carter and Clark [10] defined many types of CLMs mainly depending on the shape of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> order lamellae; their classification scheme is frequently used by other researchers. Following Carter and Clark's classification, CLMs are found to be widespread within the Heterodonta, in which the 1<sup>st</sup> order lamellae present a very variable shape. This differs from the rectilinear and well-defined 1<sup>st</sup> order lamellae shape in the Pteriomorphia groups with CLMs (Arcoida, Limoida, and Pectinoida). In Paleotaxodonta, CLM only appears in its complex crossed variety, in which 1<sup>st</sup> order lamellae display a conical shape. CLMs are not present in the Paleoheterodonta. Kobayashi [8] studied the microstructure distribution (including CLMs) within the bivalves. He remarked that the possible combinations of layers with different crystallographic arrangements in these animals are limited. These microstructural combinations appear repeatedly within the main bivalve groups and are in good concordance with the bivalve classification based on other characters.

Preferred orientations in molluscs microstructures (CLMs included) have been used, as well, to provide phylogenetic information [17,26]. Chateigner *et al.* [26] demonstrated that the preferred crystallographic orientations in two species with the same microstructure morphology can be different. Thus, texture and morphology provide complementary information for the accurate description of microstructures. The textural patterns observed by these authors for the CLMs of molluscs (including five bivalves) show a high variability in their preferred orientations.

**CLM in Arcoida.** Contrary to other Pteriomorphia, the shells of the species of the order Arcoida are made entirely of aragonite. Below a fibrous prismatic outer layer, which is not always present, there are CLM layers. This was defined by Wise [27] and by Carter and Clark [10] as the typical and simple CLM, having a well-defined rectilinear shape of its 1<sup>st</sup> order lamellae and laminar 2<sup>nd</sup>



order lamellae. This type of CLM appears frequently in gastropods [7,10]. One example of this kind of CLM in gastropods is that of *Conus marmoreus*, which was analyzed by Rodríguez-Navarro *et al.* [28] using XRD and for which they proposed a crystallographic model. It is important to note that the inner layers in arcoids are usually complex CLMs, although we have not analyzed them in our study. A peculiar feature in some bivalve groups with CLMs, including Arcoida, is the presence of microscopic canals, which are referred to as microtubules (see arrows in Fig.1A). They run across the microstructure and are filled with organic material [29,30].

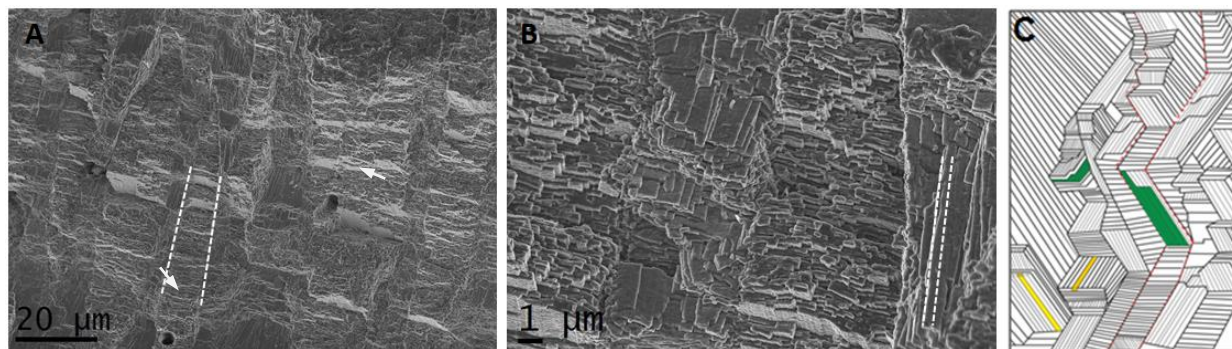


Fig.1: (A). Co-marginal section in *Arca noae*. A first-order lamella has been outlined with dashed lines and microtubules are marked with arrows. (B). Detail of A, with third-order lamella outlined. (C). CLM diagram: Outlines of 1<sup>st</sup> order lamellae are marked with red lines; 2<sup>nd</sup> order lamellae are in green and 3<sup>rd</sup> order lamellae in yellow.

## Materials and methods

**Samples.** Three species of Arcoida were studied: *Arca noae* (Linnaeus, 1758), *Glycymeris nummaria* (Linnaeus, 1758) and *G. glycymeris* (Linnaeus, 1758). Shell valves were taken from our research group's collection housed in the Area of Paleontology, at the Granada University. Small pieces of about 1 cm<sup>2</sup> were extracted from the area exterior to the pallial line, which is the boundary between the outer and inner layer. Consequently, only outer layers were studied.

**Scanning Electron Microscopy (SEM).** Observations of the CLM were carried out on both fractured and polished sections of the shell. Samples were usually observed intact, although in some cases we removed the organic matter (with commercial bleach, NaClO 2%) or, in the case of polished sections, the surface was slightly etched using 4% EDTA, pH 7.3, at room temperature. Samples were preliminarily checked using a Phenom Pro desktop SEM (acceleration voltage 15 kV). Shell pieces of interest were carbon coated (Hitachi UHS evaporator) for field emission SEM (FESEM, Zeiss AURIGA Crossbeam Station) observation at the University of Granada or directly observed without coating in an environmental SEM (ESEM) (FEI Quanta 400) at the Fritz-Haber Institute of the Max Planck Society in Berlin, Germany.

**X-Ray Diffraction (XRD).** Samples for texture analysis need to be small and as flat as possible, as curved samples cause defocusing and uncontrolled absorption of the X-ray beam.

Given the lamellar nature of the CLM, an essential reference is the orientation of the first order lamellae with which to relate the crystal orientation. During the diffraction measurements we noted the first order lamella orientation using a standard binocular optical microscope. Intermediate layers were exposed by grinding and etching a surface area measuring several square millimetres.

Since biogenic aragonite is the exclusive mineral component of the examined shell, the texture analysis was performed under the assumption of an orthorhombic lattice (symmetry 2/m2/m2/m) and the parameters of pure aragonite:  $a_0 = 4.9623 \text{ \AA}$ ,  $b_0 = 7.9680 \text{ \AA}$ ,  $c_0 = 5.7439 \text{ \AA}$  (ICDD 2010). The alternative use of the slightly different aragonite parameters ( $a_0 = 4.96183 \text{ \AA}$ ,  $b_0 = 7.96914 \text{ \AA}$ ,  $c_0 = 5.74285 \text{ \AA}$ ) determined by Caspi *et al.* [31] would not alter our results significantly. The X-ray analyses were carried out using a D8 Bruker diffractometer equipped with an Euler cradle, parallel beam optics of PolyCap type and a special sample holder attached to the x–y–z sample stage

(housed at the Institute of Metallurgy and Material Sciences, Krakow, Poland). The change in the orientation of crystals across the shell thickness was assessed by three-dimensional (3-D) texture analysis and samples were radiated with CoK $\alpha$  wavelength. For this kind of radiation, samples had to be thick enough ( $\geq 0.1$  mm). Incomplete back-reflection 031, 112, 021 and 111 pole figures were registered at each of the 642 measurement positions. We chose these reflections because they showed the highest intensity and do not overlap with other reflections. The experimental pole figures allowed us to determine the spatial orientation of the crystallites in selected sub-areas of the shell microstructure with regards to the shell surface planes (outer and inner). The LaboTex package (Labosoft) [32] allowed us to calculate the orientation distribution function (ODF) and the complete pole figures, by using the discrete Arbitrarily Defined Cells (ADC) method [33]. The experimental pole figures allowed us to determine the spatial orientation of the crystallites in selected sub-areas of the shell microstructure, in relation to the shell system. To facilitate the interpretation of the identified texture, the X-ray pole figures were related to the first order lamella orientation noted during the analyses, and complete 001, 010, 100 pole figures were recalculated (Fig.6). We used these three pole figures for CLM crystallographic interpretation because they can easily be related to the three crystallographic axes of aragonite.

**Transmission Electron Microscopy (TEM).** Ultrathin section preparation and analysis were performed at the Fritz-Haber Institute of the Max-Planck Society in Berlin, Germany. Cross sections for TEM analyses were made for specimens of *Arca noae* and *Glycymeris nummaria*. Selected areas of the shell samples were first mechanically polished and subsequently thinned down to electron transparency with a GATAN precision ion polishing system (PIPS). TEM analysis was carried out using a Phillips CM200 instrument with a field emission gun (FEG). The acceleration voltage was set at 200 kV. In order to isolate 3<sup>rd</sup> order lamellae, shell pieces were crushed in an agate mortar and fragments were ultrasonicated in absolute ethanol. Some fragments were then collected on copper TEM grids and coated with carbon using a Hitachi Coater at University of Granada or a Cressington Coater at the Fritz-Haber Institute in Berlin. They were studied in a TEM (Zeiss Libra 120 Plus SMT, Univ. Granada) with an accelerating voltage of up to 80 kV or in a TEM-FEG (Phillips CM200 with an acceleration voltage up to 200 kV, Fritz-Haber Inst. Berlin).

## Results and discussion

**SEM.** CLMs of the studied species, *Arca noae*, *Glycymeris nummaria* and *Glycymeris glycymeris* present rectilinear 1<sup>st</sup> order lamellae and laminar and well-defined 2<sup>nd</sup> order lamellae. The angle between the 2<sup>nd</sup> order lamellae located within two adjacent 1<sup>st</sup> order lamellae is about 90-120° (Fig.2).

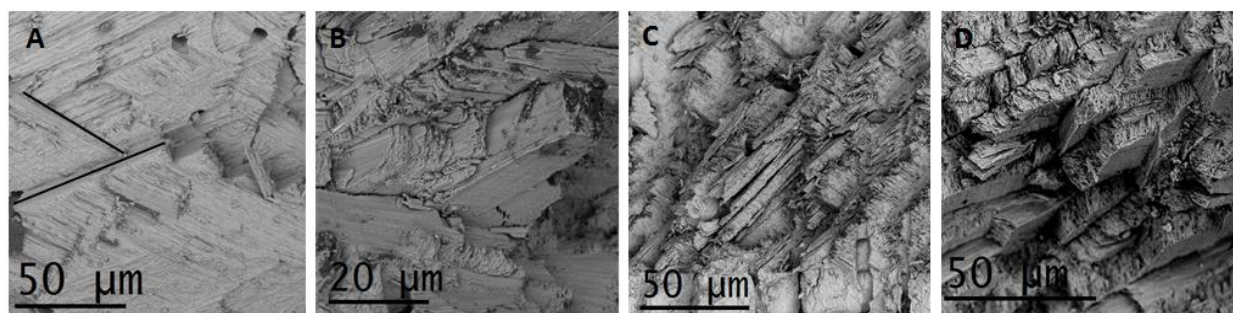


Fig.2: SEM images of 1<sup>st</sup> order lamellae in fractured shells. The intersection angle between the 2<sup>nd</sup> order lamellae in two neighbouring 1<sup>st</sup> order lamellae is marked with black lines in A. (A). Longitudinal lamellae fracture in *Arca noae*. (B). Oblique lamellae fracture in *Arca noae*. (C). Longitudinal lamellae fracture in *Glycymeris glycymeris*. (D). Oblique lamellae in *Glycymeris nummaria*.



**TEM.** The basic building units of the CLM in the studied specimens are long aragonite crystals or rods ( $3^{\text{rd}}$  order lamellae). These rods are 0.3-0.5  $\mu\text{m}$  in width, 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  in height and have an undetermined length (Fig.3A). Each  $3^{\text{rd}}$  order lamella displays an internal structure consisting of straight nanometric bands with parallel boundaries which are perpendicular to the shell surface (Fig.3A). TEM surface views of isolated lamellae (Fig.3B) show the banded structures, which, based on their contrast, are indicative of the existence of polysynthetic twins of aragonite, with the twinning planes being parallel to the long axis of the lamellae and perpendicular to their wide surfaces. Diffraction patterns of selected areas (Fig.3C) show two sets of diffraction spots correlated one to another by a twin operation which is similar to the one shown by Bragg (1924) [34] and is indicative of polysynthetic twins on  $\{110\}$ . These results agree with those of Uozumi [35] and Kobayashi [36] who described similar twins in fossil specimens of *Glycymeris yessoensis* and *Barbatia virescens* using TEM.

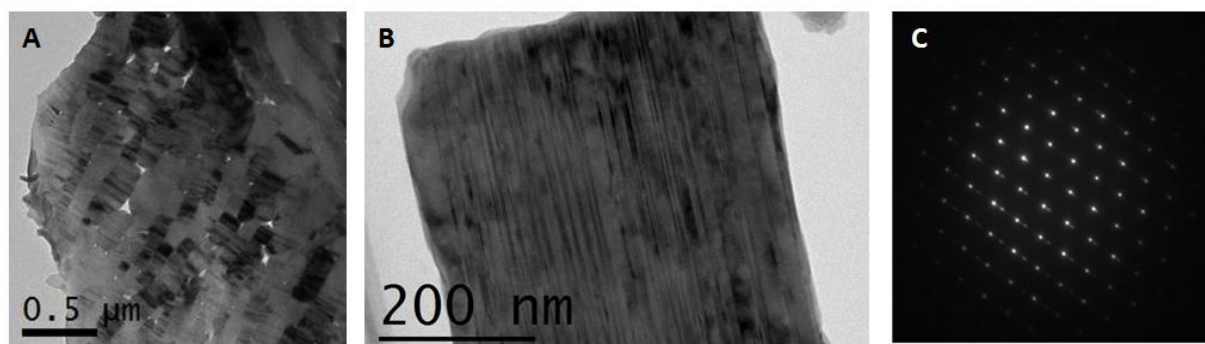


Fig.3: (A): TEM of the section perpendicular to the longest axis of  $3^{\text{rd}}$  order lamellae in *Glycymeris nummaria*. Twins in the  $3^{\text{rd}}$  order lamellae are visible due to their alternating diffraction contrast. (B): TEM image of an isolated  $3^{\text{rd}}$  order lamella (from a powdered sample) in *Arca noae*. The banded structures due to the presence of polysynthetic twins are clearly visible. (C): Diffraction pattern of the area in B. The two sets of diffraction spots are typical of polysynthetic twinning.

**XRD.** Recalculated completed pole figures 100, 010, and 001 for *G. nummaria*, *G. glycymeris* and *A. noae* are shown in Fig.4. These three pole figures are related to the three crystallographic axes of aragonite,  $a$ -,  $b$ - and  $c$ - respectively. The results indicate a strong texture in all the studied species. In all cases the 001 pole figure has two maxima at an angular distance of approximately 20-40° that are aligned and contained within the  $1^{\text{st}}$  order lamella plane. Furthermore, these maxima appear diffuse and very wide, especially in the case of *G. glycymeris*, (Fig.4B) in which they display an elongated shape perpendicular to the  $1^{\text{st}}$  order lamellae plane. Each maximum in the 001 pole figure is related to two of the four maxima in the 010 pole figure and to both of the widely spread 100 maxima, which are clearly placed at the edges of the 100 pole figure. The occurrence of four distinct 010 maxima implies the existence of four  $b$ -axis orientations. Thus, four different crystal orientations coexist. Fig.4D is a synthetic sketch showing the correspondence between maxima. The angular distances between the two 010 maxima located either in the upper or lower halves of the 010 pole figure is about 60°, and relate to the 001 maximum located in the opposite half of the 001 pole figure. The information extracted by comparing only the 010 and 001 pole figures implies the existence of two pairs of crystal orientations with crystals of each pair being twinned on  $\{110\}$ , in agreement with our TEM observations (Fig.3). Furthermore, the fact that each pair of 010 maxima (upper and lower halves) is connected to the two 100 maxima, suggests the existence of four crystal orientations which share their  $a$ -axes two by two. As a result, comparing the three pole figures, the main incongruence is that according to the 100 and 001 pole figures there are only two crystal orientations (two  $a$ - and  $c$ - continuous maxima respectively), but if we look at the 010 pole figure there are four crystal orientations (four different  $b$ -axis orientations). The only reasonable crystallographic explanation is that each of the elongated 100 and 001 maximum does not result from single crystallographic pattern but from multiple orientations. The fact that the 001

maxima elongate perpendicularly to the orientation of the 1<sup>st</sup> order lamellae, implies similar changes in tilting of the *c*-axis (Fig.4C). In this way, we interpret that there are four crystal orientations with relatively stationary *b*-axes (low spread 010 maxima), but for which the *a*- and *c*- axes fluctuate widely (elongated 001 and 100 maxima).

Our crystallographic model is shown in Fig.5 (central part). There are two classes of distinct crystallographic patterns (here called upper and lower sets). In the first pattern (Fig.5: upper set), there are two pairs of crystal orientations (crystal A1+ crystal A2 and crystal B1+crystal B2) twinned on {110}. The two pairs are inclined with respect to each other by 20-40° and their two *c*-axes are contained within the plane of the first order lamellae. The idealized combined pole figure for this configuration can be seen in Fig.5 (top). The second configuration or crystallographic arrangement (Fig.5: lower set) is obtained from the first one by rotation of the crystal pairs A1-A2 and B1-B2 around the  $\langle\bar{1}10\rangle$  axis, which is contained within the {110} planes of each axis until the *a*-axes of the crystals, which are diametrically opposed in different sets (crystals A1-B2 and crystals A2-B1), become parallel. In this way, the *c*-axes of the crystals A1 and A2 are no longer parallel but differ by the angle of rotation around  $\langle\bar{1}10\rangle$ , and the same applies to the crystals B1-B2. Accordingly, both crystal pairs A1-A2 and B1-B2 are no longer related by a {110} twin plane. The idealized distribution of maxima for this configuration is sketched in Fig.5 (bottom). A synthetic model can be obtained by simply superposing the pole figures corresponding to the two sets (upper and lower). This synthetic model is represented in Fig.5 (right). As can be seen, the continuous variation from one set of orientations to the other explains the elongated spreads of the 100 and 001 maxima, whereas the 010 maxima become slightly elongated, but never fuse.

Texture of the CLM layer of another arcoid, *Glycymeris gigantea*, was analysed by Chateigner *et al.* [26]. Their results show that there are two 001 maxima situated at 15° to each other and four 100 maxima which the authors interpreted as a single twin on {110} planes. However, the authors did not relate the pole figure maxima and provide no record at all of the 1<sup>st</sup> order lamellae orientation which may relate the crystallography of the CLM to the structure. The arcoid model we describe here can only be derived if the three pole figures are examined. The crystallographic model provided in the literature for the neogastropod *Conus marmoreus* [29] agrees with the crystallographic arrangement we described for the upper set in our model. The *Conus marmoreus* crystallographic model was made using only the 100 and 001 pole figures [29]. We have recalculated the 010 completed pole figure for *Conus marmoreus* from previous data of Rodríguez-Navarro *et al.* [29]. One example of the 100, 010 and 100 pole figures is displayed in Fig.6. By comparing these results to the ones in the studied arcoids, we conclude that the crystallography of the CLMs of both *Conus marmoreus* and the Arcoida are the same.

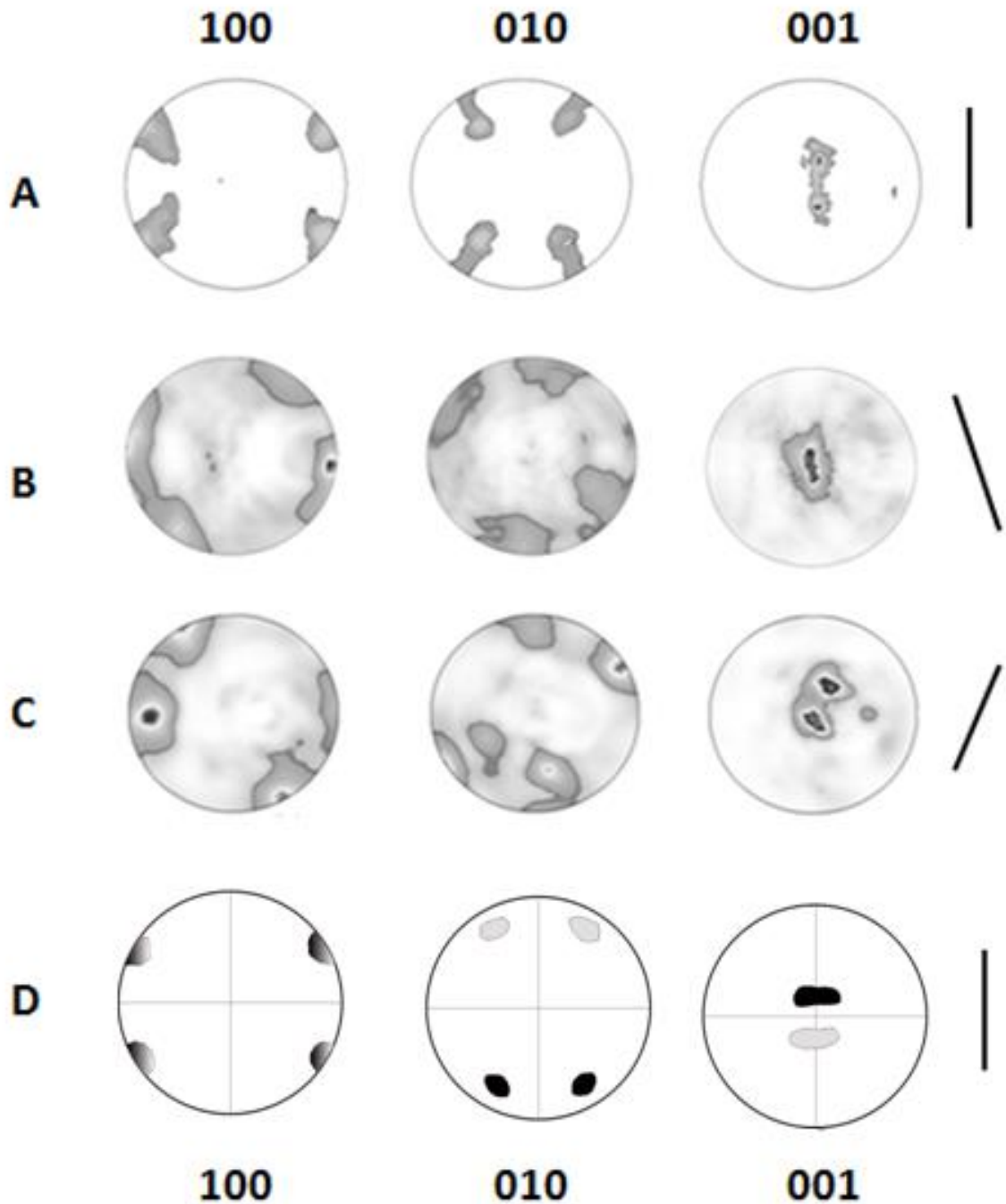


Fig.4: XRD 100, 010 and 001 pole figures of the CL outer layer in Glycymeris nummaria (A), Glycymeris glycymeris (B), and Arca noae (C). The lines at the right side indicate the first order lamellae orientation (D). Sketches show correspondences of maxima between the three pole figures. Black maxima in 010 are related to the black elongated maximum in the 001 pole figure.

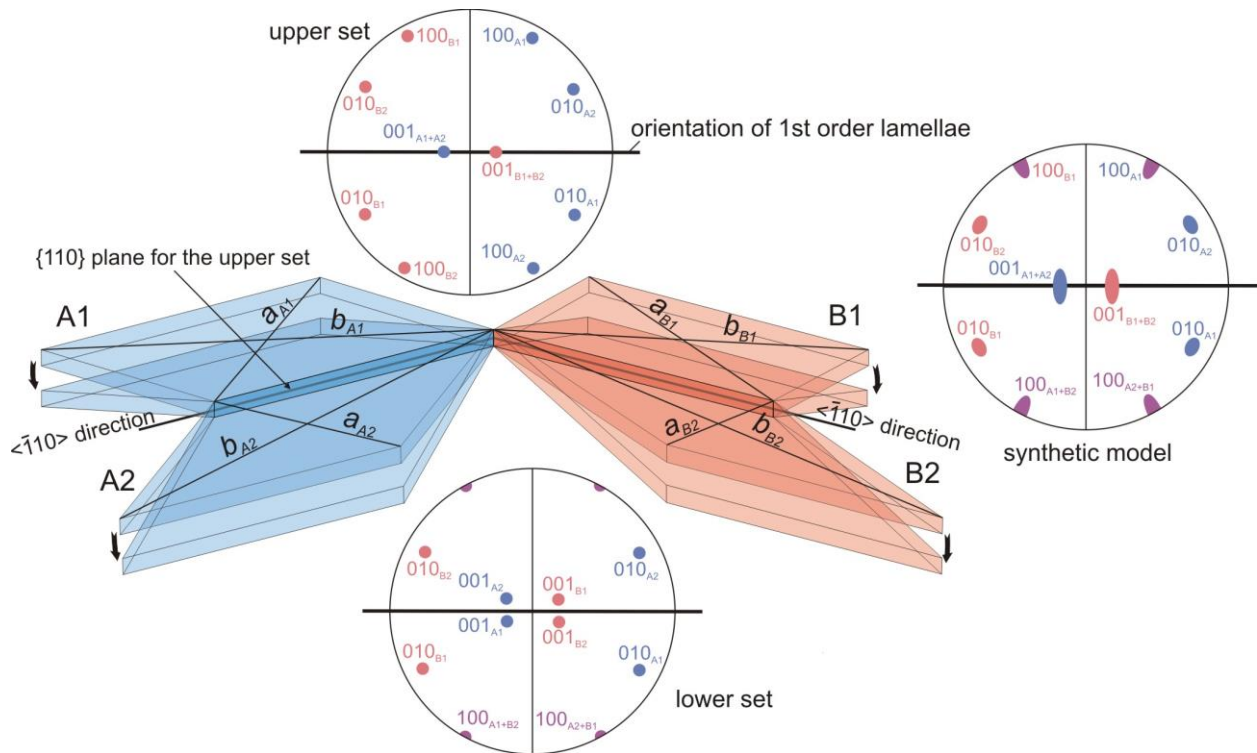


Fig.5: Model for the relationships between crystals in the CLM in Arcoida. Centre diagram: 3-D reconstruction of the two sets of crystals (A and B) with the two end orientations (upper set and lower set). The upper set consists of two pairs of crystal orientations (pair A1-A2 and pair B1-B2), the crystals of each pair being twinned on  $\{110\}$ . These two pairs are tilted with respect to each other by 20-40° in such a way that their c-axes remain within the plane of the first order lamellae. The ideal pole figure for such configuration is shown at the top. The change from the upper to the lower orientation is obtained by a rotation of each pair (either A1-A2 or B1-B2) around an  $\langle\bar{1}10\rangle$  axis (contained within the  $\{110\}$  plane) until the a-axes of A1 and B2, and A2 and B1 become parallel. The pole figure for such orientation distribution is shown at the bottom. By superposing the pole figure for the upper and lower distributions, a synthetic model is obtained (left), which matches the experimental results.

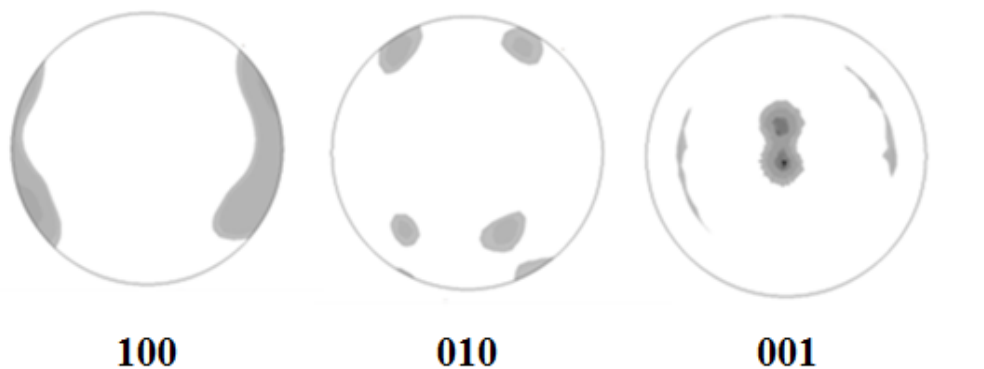


Fig.6: XRD 100, 010 and 001 pole figures of the CLM of Conus marmoreus. The line to the right indicates the first order lamella orientation.

## Conclusions

In this work the CL outer layers in three species of arcoid bivalves are studied using XRD and EM techniques.

Our motivation to study CLM in arcoids (Pteriomorphia) lies in the fact that CLMs within the bivalves are present in Heterodonta and in a few groups of Pteriomorphia, including Arcoida. The

crystallographic characterization of the CLMs in these groups is important for a better understanding of the evolution and formation of such microstructures within the molluscs.

From TEM observations (ours and from the literature) we conclude that 3<sup>rd</sup> order lamellae in Arcoida display an internal structure consisting of straight nanometric bands with parallel boundaries of a few nanometers in width. These banded structures result from polysynthetic twins of aragonite and have been found previously in mollusc shells [37].

Due to the reported variability in CLMs texture within different molluscs [26,29], we analysed the texture in Arcoida by means of XRD with the aim to characterize CLM crystallography. For the first time a new crystallographic model for the Arcoida is described here. The crystallographic model implies that there is a fluctuation between two classes of distinct crystallographic configurations, which involves a continuous variation of the *a*- and *c*- axes and a more reduced change in the *b*-axes. This model cannot be arrived at unless the 001, 100 and 010 pole figures are concomitantly used. In a previous study on *Conus marmoreus* by Rodríguez-Navarro *et al* [29], the authors assumed an equivalence in maxima distribution between the 010 and 100 pole figures. However, re-examination of data by including the 010 pole figures, has allowed us to conclude that the crystallography of the CLMs of *Conus marmoreus* and of the Arcoida are identical. Vendrasco *et al.* [38] showed that early bivalves lacked any CLM. Thus, such microstructures most likely evolved independently in at least gastropods and bivalves. Additionally, Taylor *et al.* [14] described how CLMs evolved individually in the Pectinacea-Limacea-Anomiacea, Myacea-Pholadacea-Gastrochaenacea and Arcoida-Heterodonta groups. In conclusion, the coincidence in crystallography between the CLMs of Arcoida and the neogastropod *Conus marmoreus* constitutes a strong case of convergence.

The two classes of crystallographic configurations found in the Arcoida (i.e. the recurrent presence of twinned pairs forming an angle, as well as the existence of crystals with a common *a*-axis) are completely unknown in geological aragonite. Somehow, they must be produced by the interference of organic molecules with particular crystal faces. This shows the important role of the organic components in biomineralisation.

**Acknowledgments.** This research was funded by projects CGL2010-20748-CO2-01 and CGL2013-48247-P of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and from the Research Groups RNM363 and RNM6433 of the Andalusian Consejería de Innovación, Ciencia y Tecnología. IA supported by a PhD Grant of the FPI program of the MINECO (BES-2011-048038) and two associated short stays at FHI in Berlin (EEBB-I-13-07744 and EEBB-I-14-08187). AGC benefited from Short Term Scientific Missions of the European COST Action (COST-STSM-TD0903-15438). We acknowledge technical support from the Microscopy group in the Fritz Haber Institute (Berlin) and the Institute of Metallurgy and Materials Science of the Polish Academy of Sciences in Kraków. We also are very thankful to Julyan Cartwright and Emma Berdan for their significant support improving this manuscript and English grammar corrections.

## References

- [1] L. Addadi, D. Joester, F. Nudelman and S. Weiner, Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes, *Chemistry-A European Journal* 12 (2006) 980–987.
- [2] A. P. Jackson, J. F. V. Vincent, and R. M Turner, The mechanical design of nacre, *Proceedings of the Royal Society B* 234 (1988) 415–440.
- [3] O.B. Bøggild, The shell structure of the molluscs, *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab (Naturvidensk og mathem)* 9/2 (2) (1930) 231-326.
- [4] C. MacClintock, Shell structure of patelloid and bellerophonoid gastropods (Molluska), *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History* 22 (1967) 1-140.

- [5] W. J. Kennedy and D. Taylor, Environmental and Biological Controls on Bivalve shell mineralogy, *Biological Reviews* 44 (1969) 499-530.
- [6] C. Grégoire, Structure of the Molluscan shell, in: M. Florkin and B.T. Scheer (Eds.), *Chemical Zoology, Volume VII: Mollusca*. Academic Press New York and London, 1972, pp 74-113.
- [7] J. G. Carter, Glossary of skeletal biomineralization, in: J.G. Carter (Ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*, 1. VanNostrand Reinhold, 1990, pp 609-661.
- [8] I. Kobayashi, Internal shell microstructure of recent Bivalvian Molluscs, *Science Reports of Niigata University Series E, N° 2*. (1971) 27-50 and tables.
- [9] S. Uozumi and S. Suzuki, The evolution of shell structures in Bivalvia, in: Habe, T., Omori, M (Eds.), *Study of Molluscan Paleobiology, Professor Masae Omori Memorial Volume* (1981) 63-77.
- [10] J.G. Carter and G.R. II. Clark, Classification and phylogenetic significance of molluscan shell microstructure, in: Broadhead, T.W. (Ed), *Mollusks-Notes for a Short Course, Studies in Geology* 13 (1985) 50-71.
- [11] J. G. Carter, P. J. Harries, N. Malchus, A. F. Sartori, L. C. Anderson, R. Bieler, A. E. Bogan, E. V. Coan, J. C. W. Cope, S. M. Cragg, J. R. García-March, J. Hylleberg, P. Kelley, K. Kleemann, J. Kříž, C. McRoberts, P. M. Mikkelsen, J. Jr Pojeta, I. Tëmkin, T. Yancey and A. Zieritz, Illustrated Glossary of Bivalvia Part N, Revised, Volume 1, Chapter 3, in: *Treatise Online number 48 KU, Paleontological Institute* (2012) 1-211.
- [12] J.D. Currey and A.J. Khon, Fracture in the crossed-lamellar structure of *Conus* shells, *Journal of Materials Sciences* 11 (1976) 1615-1623.
- [13] M. Suzuki, T. Kogure, S. Weiner, and L. Addadi, Formation of Aragonite Crystals in the Crossed Lamellar Microstructure of Limpet Shells, *Crystal Growth and Design* 11 (2011) 4850-4859.
- [14] J.D. Taylor, W.J. Kennedy and A. Hall, The shell structure and mineralogy of the Bivalvia II Lucinacea, Clavagellacea, conclusions, *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.* 22 (9) (1973) 255-294.
- [15] C. Hedegaard, Shell Structures of the recent Archaeogastropoda, *Doctoral Thesis University of Aarhus, Denmark* (1990).
- [16] C. Hedegaard, Shell structures of recent Vetigastropoda, *The Malacological Society of London, Journal of Molluscan Studies* 63 (1997) 369-377.
- [17] D. Chateigner, S. Ouhenia, C. Krauss, C. Hedegaard, O. Gil, M. Morales, L. Lutterott, M. Rousseau and E. Lopez, Voyaging around nacre with the X-ray shuttle: From bio-mineralisation to prosthetics via mollusc phylogeny, *Materials Science and Engineering A* 528 (2010) 37-51.
- [18] W.J., Schmidt, Bau und Bildung der Prismen in den Muschel-schalen, *Eine Anleitung zu ihrer Untersuchung Mikrokosmos* 18 (1924) 49-54.
- [19] I. Kobayashi, Microscopical observations on the shell structure of bivalvia, Part 1 *Barbatia obtusoides* (NYST), *Scientific Reports Tokyo Koiku Daigaku D* 8 (1964) 295-301.
- [20] I. Kobayashi, Introduction to the shell structure of bivalvian molluscs, *Earth Science* 73 (1964) 1-12.
- [21] I. Kobayashi, Submicroscopic observation on the shell structure of bivalvia, Part 2 *Dosinia (Phacosoma) japonica* REVEE. *Scientific Reports Tokyo Koiku Daigaku C* 9 (1966) 189-210.
- [22] I. Kobayashi and H. Kamiya, Submicroscopic observations on the shell structure os bivalvia, Part 3 Genus *Anadara*, *Journal of the Geology Society of Japan* 74 (1968) 351-362.

- [23] I. Kobayashi, Internal microstructure of the shell of bivalve molluscs, *American Zoologist* 9 (1969) 663-672.
- [24] L.R. Cox, General features of bivalvia, in: Ed. MOORE, R.C., *Treatise on invertebrate paleontology*, part N. Mollusca 6 Bivalvia (1969) 2-129.
- [25] A. Hayashi, N. Yokoo, T. Nakamura, T. Watanabe, H. Nagasawa and T. Kogure, Crystallographic characterization of the crossed lamellar structure in the bivalve *Meretrix lamarckii* using electron beam techniques, *Journal of Structural Biology* 176 (2011) 91-96.
- [26] D. Chateigner, C. Hedegaard and H. R. Wenk, Mollusc shell microstructures and crystallographic textures, *Journal of Structural Geology* 22 (2000) 1723-1735.
- [27] S.W. Wise, Jr. and W. W. Hay, Scanning Electron Microscopy of Molluscan Shell Ultrastructures II, Observations of Growth Surfaces, *Transactions of the American Microscopical Society* 87 (4) (1968) 419-430.
- [28] A. B. Rodriguez-Navarro, A. Checa, M. G. Willinger, R. Bolmaro and Jan Bonarski, Crystallographic relationships in the crossed lamellar microstructure of the shell of the gastropod *Conus marmoreus*, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 830-835.
- [29] I. Shinji, Fine Structure of the Organic Content in the Shell Tubules of *Sphaerium japonicum* Venus *Japanese Journal of Malacology* 56 (3) (1997) 24-248.
- [30] R. Araujo, M.A. Ramos and J. Bedoya, Microtubules in the shell of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) (Bivalvia, Heterodonta), *The Malacological Society of London, Journal of Molluscan Studies* 60 (1994) 405-413.
- [31] E. N. Caspi, B. Pokroy, P. L. Lee, J. P. Quintana, E. Zolotoyabko, On the structure of aragonite. *Acta Crystallographica. Section B.* 61 (2005) 129-132.
- [32] LaboTex, *The Texture Analysis Software*, by LaboSoft s.c. (2010).
- [33] K. Pawlik, Determination of the orientation distribution from pole figures in arbitrarily defined cells, *Physica Status Solidi B* 134 (1986) 477-483.
- [34] W. L. Bragg, The Structure of Aragonite, *Proceedings of the Royal Society of London A* (1924) 15-39.
- [35] S. Uozumi and K. Iwata, The ultrastructure of the mineral in and the construction of the crossed lamellar layer in the molluscan shell, *Contributions from the Department of Geology and Mineralogy, Faculty of Science, Hollaido University* , N° 1236 (1972) 447-477.
- [36] I. Kobayashi and J. Akai, Twinned aragonite crystals found in the bivalvian crossed lamellar shell structure, *Journal of the Geology Society of Japan* 100, N° 2 (1994) 177-180.
- [37] T. Kogure, M. Suzuki , H. Kim, H. Mukai, A. G. Checa, T. Sasaki and H. Nagasawa, Twin density of aragonite in molluscan shells characterized using X-ray diffraction and transmission electron microscopy, *Journal of Crystal Growth* 397 (2014) 39-46.
- [38] M. J. Vendrasco, A. G. Checa and A. V. Kouchinsky, Shell microstructure of the early bivalve *Pojetaia* and the independent origin of nacre within the mollusca, *Palaeontology* 54 (Part 4) (2011) 825-850.



# New Crystallographic Relationships in Biogenic Aragonite: The Crossed-Lamellar Microstructures of Mollusks

Io Almagro,<sup>†,‡</sup> Piotr Drzymała,<sup>‡</sup> Katarzyna Berent,<sup>§</sup> Claro Ignacio Sainz-Díaz,<sup>‡</sup> Marc Georg Willinger,<sup>||</sup> Jan Bonarski,<sup>‡,¶</sup> and Antonio G. Checa<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>†</sup>Department of Stratigraphy and Paleontology, Faculty of Science, University of Granada, Avenida Fuentenuueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>‡</sup>Andalusian Institute of Earth Sciences (CSIC-UGR), Avda. de Las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada, Spain

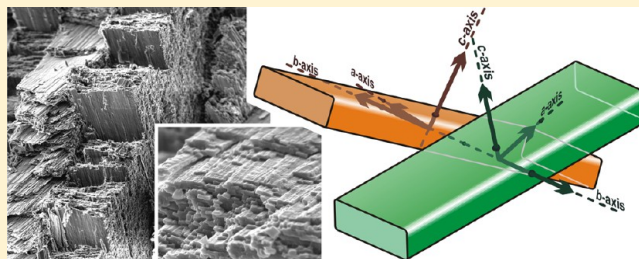
<sup>‡</sup>Institute of Metallurgy and Materials Science of the Polish Academy of Sciences, 25 Reymonta Str., 30-059 Krakow, Poland

<sup>§</sup>AGH University of Science and Technology, Academic Centre for Materials and Nanotechnology, 30 Mickiewicza Str., 30-059 Kraków, Poland

<sup>||</sup>Fritz Haber Institute of the Max-Planck-Society, Department of Inorganic Chemistry, Faradayweg 4, 614195 Berlin, Germany

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Crossed-lamellar microstructures are the most common shell-forming biomaterials in mollusks. Because of their complex hierarchical 3D arrangement and small crystallite size, previous crystallographic studies are scarce and have centered on particular species with no comprehensive analysis available. To evaluate the crystallographic diversity of the crossed-lamellar microstructures, we have studied a large set of bivalve and gastropod species with crossed-lamellar layers using X-ray diffraction and electron backscatter diffraction. From the number, distribution, and relationships of maxima, we have classified pole figures into nine different recurring crystallographic patterns. According to their crystallographic equivalences, these patterns can be grouped into five groups. A first division is established according to whether there is one or two main orientations for the *c*-axis of aragonite. In the latter case, each orientation corresponds to one of the two sets of alternating first-order lamellae. The two main orientations of the *c*-axis diverge by rotation within the plane of the first-order lamellae around either a common *a*- or *b*-axis. We also show how some patterns may derive from others. Patterns with two *c*-axis orientations represent crystal relationships until now completely unknown in biogenic and abiogenic aragonite and are most likely produced by particular proteomic pools.



## INTRODUCTION

Mollusk shells are made up of a certain number of superposed layers (usually 2–3, up to 5). Each layer is composed of a countless number of calcite or aragonite crystals, which are the only shell-forming calcium carbonate polymorphs known. When both polymorphs are present within the same shell, the calcite layers are always external. These minerals are mixed with a very small amount of organic material, from 1 to <7% of the total layer weight, which is known as the organic matrix.<sup>1</sup> Because of the mixture of the mineral and organic components, mollusk shells are usually termed biominerals, biocomposites, or hybrid materials. Within shell layers, the grains and organic matrices have precise and recurrent arrangements known as microstructures for which Bøggild<sup>2</sup> provided the first detailed account in the phylum Mollusca. He described eight different groups of microstructures: homogeneous, prismatic, foliated, nacreous, grained, crossed-lamellar, complex crossed-lamellar, and myostracum. Later, other authors<sup>3–7</sup> considerably increased Bøggild's division in extant and extinct species. However, not all of the shell microstructures described have

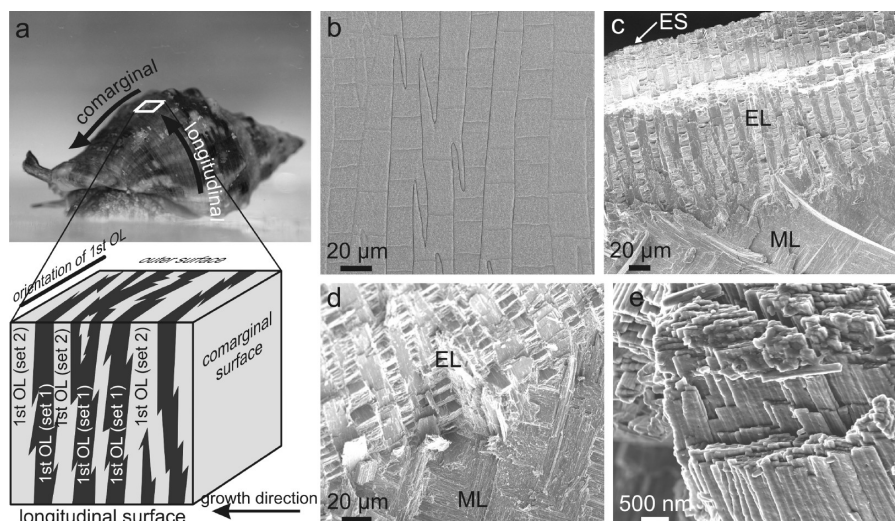
been studied equally with nacre (or mother-of-pearl) being the best known due to its economic importance and high biomechanical performance. On the other hand, the so-called crossed-lamellar microstructure (CLM), characterized by fiberlike crystals crossing at an angle, has been much less studied, probably as a consequence of their very complex hierarchical organization. This is remarkable because this microstructure is prevalent in Mollusca with more than 90% of the species within the phylum having some CLM layers within their shells. CLM forms the bulk of the shells of gastropods, with the exception of the subclass Vetigastropoda (Figure S1), in which it combines with nacre in some families<sup>8</sup> and is absent in a few others. In bivalves (the second largest molluscan group after gastropods), CLMs are also the majority, being characteristic of the largest subclass Heterodonta (except for the order Anomalodesmata), and are also present in

Received: December 15, 2015

Revised: February 8, 2016

Published: February 12, 2016



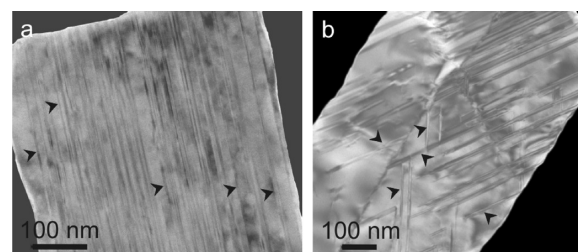


**Figure 1.** Aspects of the CLM. (a) View of a living specimen of the gastropod *Stramonita hemeastoma*, indicating (lower sketch) the main directions of the shell. (b) Polished and etched view of the external shell layer parallel to the external shell surface of the gastropod *Semicassis granulata*. Some boundaries between the 1st OL are outlined. (c) Comarginal fracture through the external (EL) and middle (ML) shell layers of the neogastropod *Conus omaria*. The 1st OL of the EL are perpendicular to the outer shell surface (ES) and to the plane of view. The 1st OL of the ML are also perpendicular to both ES and the lamellae of the EL and parallel to the plane of view. (d) Details of the transition between the EL and ML of the same specimen of *Conus omaria*. The orientation of the 1st OL changes from longitudinal (EL) to comarginal (ML) at the transition. (e) Close-up of a 1st OL in a longitudinal fracture of the external layer of the shell of *Semicassis granulata*. The 2nd and 3rd OL are easily discernible at this magnification.

representatives of the subclasses Pteriomophia and Protobranchia (Figure S1). The concurrence of CLMs and nacre within the same bivalve in extant species is unknown, but this combination has been described in fossils.<sup>9</sup> CLMs also constitute the hypostracum in the Polyplacophora<sup>10</sup> and are the only microstructure found in Scaphopoda.<sup>5</sup> CLMs are absent only in the mostly nacro-prismatic Monoplacophora and Cephalopoda among the shell-bearing mollusks or the “Conchifera” clade. Because the earliest mollusks had microstructures other than the CLM,<sup>11</sup> this had to evolve independently in the different classes and may have appeared repeatedly within each of them.<sup>4</sup> With the aforementioned distribution, it is clear that the CLM is by far the most successful of all molluscan microstructures. This enormous success may come from the fact that the CLMs combine uncostly production, due to their low organic content,<sup>12</sup> with excellent biomechanical properties based on their plywood-like structure.<sup>13</sup>

Since the earliest description based on light-microscopy techniques,<sup>2</sup> subsequent authors<sup>3,14–19</sup> have agreed that the CLM has a hierarchical architecture composed of first-order lamellae (1st OL), which are serial parallel blocks of approximately 20  $\mu\text{m}$  in thickness made of stacked sheets (second-order lamellae, 2nd OL) of parallel nanometer-sized fibers (third-order lamellae, 3rd OL) (Figure 1a–d). In two adjacent 1st OL, the 2nd and 3rd OL dip in opposite directions in alternating 1st OL (Figure 1c–e),<sup>14</sup> the change in orientation being between  $<90^\circ$  and  $>140^\circ$  (our own data). The 1st OL are invariably perpendicular to the shell surface and may be either parallel (comarginal) or perpendicular (longitudinal) to the shell-growth margin (Figure 1a, c). At the transition between CL layers, the 1st OL rotate by  $90^\circ$  around an axis perpendicular to the shell surface, thus changing from comarginal to longitudinal or vice versa (Figure 1c, d). Moreover, some bands parallel or at an angle to the longitudinal axis of the 3rd OL have been consistently

interpreted as either polysynthetic or polycyclic twins, respectively<sup>16,18,20–22</sup> (Figure 2). With regard to the distribu-



**Figure 2.** TEM views of loose 3rd OL from their top surfaces, showing the high incidence of polysynthetic (a) and polycyclic (b) twins. Some twins are indicated with arrows. (a) *Arca noae* (bivalve), single 3rd OL. (b) *Achatina fulica* (gastropod), double 3rd OL.

tion of the organic matrix, simple organic envelopes or membranes have been described surrounding the fibers or 3rd OL but not around the 1st or 2nd OL.<sup>16,23</sup> Another type of crossed-lamellar structure is one in which the 3rd OL are organized in more than two dipping directions relative to the depositional surface with the 1st OL sometimes forming cones or being more irregularly shaped. This is the so-called complex crossed-lamellar microstructure (CCLM) type and is usually encountered in the internal layers of bivalves having more external CLM layers.<sup>2–6</sup> CCLM is not treated in this study.

Crystallographic studies on the CLM are relatively limited. The first detailed study concluded that the crystallography of the CLM of two different gastropods, *Oliva sayana* and *Littorina littorea*, was substantially different.<sup>18</sup> In the former species, the differently inclined 3rd OL were at an angle of  $45^\circ$ , with their main surfaces being (001) planes, and the surfaces between 1st OL being (110) planes. In the latter species, the 3rd OL of two adjacent 1st OL are rotated around a common  $a$ -axis by approximately  $50^\circ$  with their main surfaces again

being (001) faces. These two models are based on transmission electron microscopy (TEM) and selected area electron diffraction (SAED) data, which give only very local information from areas that encompass only a few 3rd OL. Texture and crystal-preferred orientations using X-ray diffraction (XRD) (which provide information on much larger areas) were performed on different microstructures, including CLM, of a large set of bivalves and gastropods<sup>24–28</sup> and showed considerable diversity of textural patterns. In the case of CLM, the 001 pole figures (PFs) may contain one or two maxima, whereas the 100 PFs are characterized by either one (“single crystal-like”), two (“single twin”), or three (“double twin”) maxima or a ring-like distribution (“fiber”) of poles. Almost any combination of both the 001 and 010 patterns can be found in single layers (Table 2 in ref 26). Also on the basis of XRD, a crystallographic model was formally proposed for the neogastropod *Conus marmoreus*,<sup>29</sup> suggesting that there are two sets of single {110} twinned crystals that share the twinning plane and which are inclined with respect to each other around an axis perpendicular to the twinning plane. The recent study on the crystallography of the CLM of arcoid bivalves<sup>30</sup> found a similar though more complex pattern, consisting of a continuous transition between the *C. marmoreus* pattern and another pattern in which crystals of each twin rotate around a  $\langle 110 \rangle$  direction until the *a*-axes of two crystals in different twins become parallel. Upon reexamination of previous data,<sup>29</sup> the authors concluded that this is also the pattern in *C. marmoreus* despite its phylogenetic distance with arcoid bivalves. All of the above-mentioned studies conclude that the CLM has more than one crystallographic configuration and is not a single microstructure but rather is a family of microstructures in agreement with the multiple origin of the CLM discussed above. We will call them CLMs from here on.

Other authors have also analyzed crossed-lamellar materials by means of X-ray diffraction,<sup>31</sup> TEM diffraction,<sup>21,32–34</sup> and SEM and TEM electron backscatter diffraction (EBSD)<sup>33,35</sup> but have not proposed general crystallographic models.

To compile a detailed account of the crystallographic diversity of the CLMs, we analyzed a large set of representatives of the two most diverse classes of mollusks: Bivalvia and Gastropoda. CLMs, as well as all molluscan microstructures, are crystalline aggregates in which the crystallographic axes of the grains display some kind of alignment and are thus said to have a crystallographic texture. The crystallographic texture patterns have been consistently determined by means of XRD, which besides its power of resolution is a reasonably easy and fast technique. EBSD has been used in some selected cases to gain insight at the submicron level. The crystallographic information derived from both methods is compiled in the form of pole figures (see below), which offers crucial information on the degree and mode of the ordering of the material. Our results demonstrate that the CLM texture patterns may be classified into nine types, which group into four main categories, most of which have a complex crystallography hitherto unknown in abiogenic aragonite.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Samples.** Shells either fully made of or containing CLM layers of 20 species of Bivalvia and another 20 of Gastropoda were studied, trying to include representatives of the main groups (orders and superfamilies). The taxonomic lists for both groups are provided in Tables S1 and S2. We chose shells thick enough ( $>200 \mu\text{m}$ ) for XRD analysis. Most specimens came from our research group's collection

housed in the Area of Paleontology at the University of Granada (Spain). The specimens of *Tridacna gigas* and *Cuspidaria nobilis* were supplied by the BIVAToL project collection from the University of Cambridge (UK).

**Nomenclature.** We named the CLM layers depending on their position within the shell. EL and IL refer to the external and the internal CLM layers, respectively. All of the CLM layers between these two were called middle layers (ML) with additional serial numbers from the exterior to the interior (ML1, ML2, ML3) when more than one middle layer was present.

**Optical Microscopy.** Reflected light microscopy (Nikon SMZ1000 binocular microscope) was used to determine the orientations of the 1st OL (Figure 1a). This datum is essential to orient the PFs with respect to the shell.<sup>29</sup>

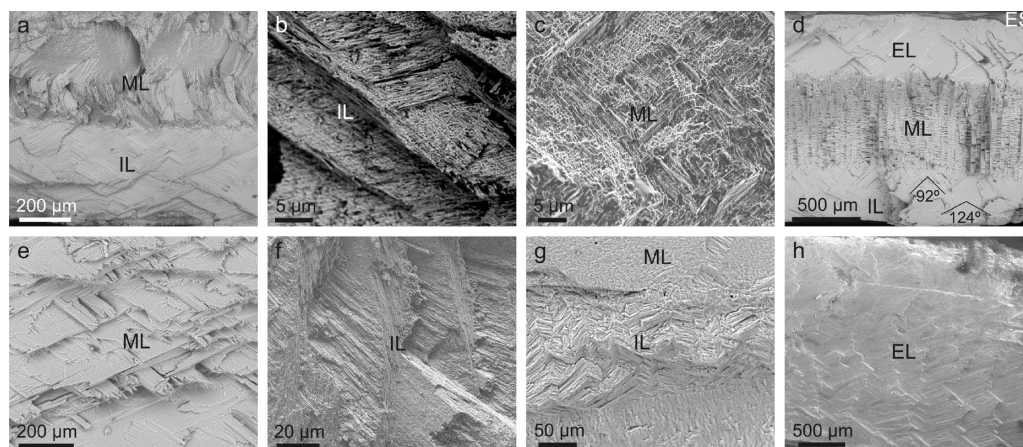
**Scanning Electron Microscopy (SEM).** We used a Dremel Multimax drill equipped with a rotating disc to make shallow incisions to guide the subsequent fractures in the desired directions. Shell pieces of approximately  $1 \text{ cm}^2$  in area were taken from the last whorl in gastropods or from the interior of the pallial line in bivalves, which includes both the external and internal layers. For a preliminary check, the organic matter was removed with commercial bleach (4% NaClO) for 2 min. For better viewing, some sections were polished and slightly etched with 4% EDTA, pH 7.3, at room temperature to remove surface scratches. A Phenom Pro desktop SEM (acceleration voltage of 15 kV) located in the Area of Paleontology of the University of Granada (UGR) was used for preliminary inspection. Detailed examinations were made in two environmental SEM microscopes (ESEMs) FEI Quanta 400, one located at the Fritz-Haber Institute (FHI) of the Max Planck Society (Berlin, Germany) and the other at the Centro de Instrumentación Científica (CIC, UGR). Some shell pieces were carbon coated (Hitachi UHS evaporator) and inspected with the field emission SEM (FESEM) Zeiss AURIGA Crossbeam Station at the CIC (UGR).

**Transmission Electron Microscopy (TEM).** Shell fragments were reduced to powder with an agate mortar. After immersion in 1% NaClO to remove organic matter, the fragments were generously washed with distilled water. Samples were later ultrasonicated in absolute ethanol for 40 s, and floating flakes were placed on copper TEM grids. The flakes were small enough to consist of a few or even individual 3rd OL. The grids were carbon coated for stabilization using either a Hitachi Coater, located at the CIC (UGR), or a Cressington Coater at the FHI (Berlin). Samples were examined in a TEM Zeiss Libra 120 plus SMT (CIC, UGR), with an accelerating voltage of 80 kV, or in a TEM-FEG Phillips CM200 (FHI, Berlin) with an acceleration voltage of 200 kV.

**X-ray Diffraction (XRD).** This is our preferred method of measurement because of the easiness of sample preparation and analysis. The apparatus used is known as a four-angle diffractometer or a Eulerian cradle (Figure S2a). We carried out the diffraction in such a way that the X-rays are reflected from the surface of the sample. The source of the X-rays and the detector are oriented such that a particular value of  $\theta-2\theta$  angles is specified. This allows for a single Bragg reflection to be measured. The stage of the cradle is tilted by an angle  $\chi$  and rotated by  $\varphi$  systematically, so that most angular orientations of the sample can be investigated (up to  $\chi = 70^\circ$ ). When the lattice plane of a crystallite fulfills the Bragg condition (i.e., the normal to a given hkl plane vector is parallel to the diffraction vector *S*; Figure S2), the detector records that reflection. For crystalline aggregates, the intensity of detected X-rays for a given orientation is proportional to the volume fraction of crystallites with that orientation. Preferred orientations will thus appear as areas of high intensity at given  $\chi$  and  $\varphi$  values.

Shell samples of  $\sim 1 \text{ cm}^2$  were polished using a  $2 \mu\text{m}$  grit size polishing paper until they were as flat as possible to avoid defocusing and uncontrolled absorption of the X-ray beam. Intermediate CLMs layers were exposed with the same technique. The overall orientations of crystals across the shell thickness was assessed by texture analysis under the assumption of an orthorhombic lattice (symmetry  $2/m \ 2/m \ 2/m$ ) and the parameters of biogenic aragonite ( $a_0 = 4.96183 \text{ \AA}$ ,  $b_0 = 7.96914 \text{ \AA}$ ,  $c_0 = 5.74285 \text{ \AA}$ ).<sup>36</sup> Samples were irradiated from the top





**Figure 3.** Examples of CLM layers seen in fracture for (a) *Lima lima*, (b) *Pholas dactylus*, (c) *Eucrassatella decipiens*, (d) *Semicassis bisulcata*, (e) *Ryssoata otaheitana*, (f) *Diodora graeca*, (g) *Fissurella crassa*, and (h) *Arca noae*. EL, external layer; ES, external surface of the shell; IL, internal layer; ML, middle layer. Same species as in Figure 4.

with Co K $\alpha$  wavelength. This kind of radiation requires a sample thickness of more than 0.1 mm to produce a spectrum with enough resolution and no peak overlap coming from underlying layers. Incomplete back-reflection 031, 112, 021, and 111 PFs were registered at each of the 642 measurement positions by using a D8 Bruker diffractometer (housed at the Institute of Metallurgy and Material Sciences, IMIM, Krakow, Poland) equipped with an Euler cradle, parallel beam optics of PolyCap type, and a special sample holder attached to the x–y–z sample stage. These reflections were chosen because of their high intensity and lack of overlap with other reflections. We transformed experimental diffraction data into the corresponding experimental PFs to determine crystal orientations in the structure. Orientation distribution functions (ODF) and PFs were calculated with the LaboTex package<sup>37</sup> by using the discrete arbitrarily defined cells (ADC) method.<sup>38</sup> Complete 001, 010, 100 PFs were recalculated because these PFs can easily be related to the three crystallographic axes of aragonite, and their combined inspection is mandatory for an accurate assessment of the crystallographic pattern of the CLM.<sup>30</sup> For facilitating texture interpretation, the orientation of the 1st OL was plotted on the PFs. The normalized texture index ( $J_n$ )<sup>39,40</sup> was also calculated to determine textural sharpness. A value of  $J_n = 1$  corresponds to an ideal single crystal, whereas  $J_n = 0$  would correspond to a completely random distribution of crystallographic orientations.<sup>40</sup>

**Electron Backscatter Diffraction (EBSD).** In this method, the electron beam is focused onto the surface of a single grain. Upon interaction with the crystalline material under low-angle incidence (close to the Bragg angle), electrons are diffracted to form a set of paired large-angle cones corresponding to each diffracting plane, which are registered on a phosphor screen where the fluorescent patterns are detected by a charge coupled device (CCD) camera as a series of lines (Kikuchi lines), forming what is known as a backscatter Kikuchi pattern. Indexation of the pattern provides information on both the orientation of the crystal lattice and the crystalline phase. Using the scanning capabilities of an SEM (to which the EBSD detector is coupled), data from different positions can be integrated into a two-dimensional map of the orientation of grains on the surface of a polycrystalline material. Accordingly, EBSD allows us to relate crystallographic texture and morphology. We used this technique to complement XRD observations at the submicron scale by either identifying the exact position in the structure of particular crystal orientations or analyzing very thin shell layers that are not suitable for XRD analysis. Shell fractures of five gastropods (underlined species names in Table S2) were embedded in resin and polished at the CIC (UGR, Spain). All samples were examined with an FEI Versa 3D FEG SEM equipped with a high sensitivity Hikari EBSD camera detector housed at the Academic Centre for Materials and Nanotechnology of the AGH University of Science and Technology (Krakow, Poland).

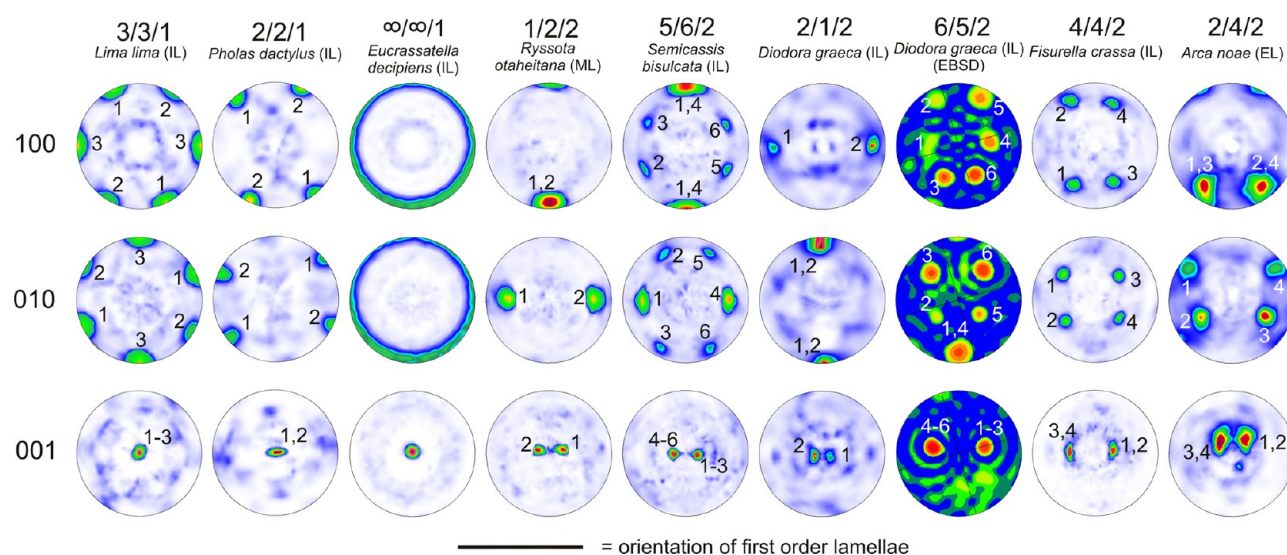
Analyses were performed in low-vacuum mode in a water-vapor atmosphere. We selected an acceleration voltage of  $\sim 10$  kV and gas pressure of less than 40 Pa because these parameters provided the best-quality orientation maps. Data acquisition and analysis were carried out using TSL OIM 7.0 software. Because of the high incidence of twins (Figure 2), the effective crystallite size was exceedingly small ( $< 100$  nm), causing the percentage of correctly indexed patterns to be relatively low. Accordingly, we used a confidence index (CI) lower than usual to eliminate nonsignificant patterns: 0.04 for *Achatina fulica*, *Tricolia capensis*, and *Tectus pyramis* and 0.06 for *Diodora graeca* and *Fissurella crassa*. As with XRD, we calculated 100, 010, and 001 PFs.

**Pole Figures.** Both XRD and EBSD methods provide reliable data on crystallographic textures in the form of pole figures, which are simply stereograms with their axes defined by a sample frame of reference with particular hkl poles plotted onto it (Figure S2b) from all of the crystallites in the polycrystal. If the material shows a degree of texture, the resulting pole figure will show the accumulation of poles around specific directions (pole maxima). A perfect monocrystal has the highest degree of texture, whereas a perfect powder sample has the lowest degree of texture. Some textured materials show preferential orientations along a single crystallographic axis (with the other axes randomly rotated around it), in which case they are said to have a fiber texture (e.g., pattern  $\infty/\infty/1$  below). Alternatively, there may be a common orientation for all axes, thus producing a sheet texture (e.g., patterns 3/3/1 and 2/2/1).

## RESULTS

**SEM and TEM.** The aspect in SEM of the crossed-lamellar layers is very similar across the different species with the only apparent difference that the angle toward the external shell surface between the 3rd OL of alternating 1st OL ranges from  $90^\circ$  to  $150^\circ$  (Figure 3). The change in angle can be appreciable even within a single layer (Figure 3d). The 1st OL are always perpendicular to the shell surfaces, and the transition between layers is marked by a sudden change in orientation ( $90^\circ$  rotation) from comarginal to longitudinal or vice versa (Figure 1c, d).

TEM images of isolated 3rd OL (Figure 2) shows the high incidence of  $\{110\}$  twinning planes, which extend perpendicular to the major surfaces of the 3rd OL. These twins may be of either the polysynthetic (Figure 2a) or polycyclic (Figure 2b) types depending on whether the twinning planes are parallel to each other and to the long axis of the 3rd OL (polysynthetic) or make a certain angle between them ( $\sim 60^\circ$  or  $120^\circ$ ) and with the fiber axis (polycyclic).<sup>18,21</sup>



**Figure 4.** Examples of PFs representative of the nine patterns recognized. Numbers indicate the correspondence between maxima in the different PFs. All are XRD data except where indicated. EL, external layer; IL, internal layer; ML, middle layer.

**XRD and EBSD Texture Patterns.** A total of 49 sets of 100, 010, and 001 PFs were calculated (Figures S3–S7). Most sets (44 of them) were determined by XRD. For *Tricolia capensis* and *Tectus pyramis* (Figure S3), PFs were calculated only by EBSD due to the small thickness of their CLM layers. For *Achatina fulica* (Figure S5) and *Diodora graeca* and *Fissurella crassa* (Figure S6), PFs from the same layers were calculated both from XRD and EBSD data. We measured two different shell layers for the species *Tridacna gigas*, *Strombus pugilis*, *Lobatus gigas*, and *Oliva reticulata* and three for *Semicassis bisulcata*.

Most patterns had a strong sheet texture with a minority having a fiber texture. This fits in with the high normalized texture index values of all the patterns, which were  $>0.5$  in all of the species studied and  $\leq 0.75$  in most of the cases. We assigned the resulting patterns a three-digit code (a/b/c), indicating the number of preferential orientations for the *a*-, *b*-, and *c*-axes as deduced from the arrangement and relationships between PF maxima. We distinguished nine patterns (Figure 4), which initially could be separated depending on whether they presented one (a/b/1 patterns) or two (a/b/2 patterns) 001 maxima on the upper hemisphere, thus indicating the existence of one or two preferential *c*-axis orientations, respectively. Likewise, the 100 and 010 number of maxima and their situation indicated the number of the *a*- and *b*- axes. A representative example of each pattern is displayed in Figure 4 with the indication of the correspondences between maxima (numbers).

**a/b/1 Patterns. Pattern 3/3/1 (Figure 4; Figure S3).** The 001 PF has only one central maximum and six peripheral half-maxima in both the 010 and 100 PFs, which are separated by angular distances of  $\sim 60^\circ$ . Diametrically opposed half maxima are evidently complementary. This indicates the existence of a single *c*-axis perpendicular to the shell surface and three main orientations for the *a*- and *b*- axes. The 1st OL are oriented parallel to one of the *a*-axes. In *Tectus pyramis* (EL) (Figure S3), the 001 maximum appears to be in the process of splitting into two smaller maxima.

**Pattern 2/2/1 (Figure 4; Figure S3).** This texture pattern is similar to the previous one, the only difference being that the 100 maximum that is aligned with the plane of the 1st OL in

the 3/3/1 pattern is the one absent in the 2/2/1 patterns in the cases recorded. In *Pholas dactylus* (IL), *Tellina foliacea* (IL), and *Semicassis bisulcata* (EL) (Figure S3), the 001 maximum elongates in parallel to the 1st OL plane, indicating a small tilting of the *c*-axes within the 1st OL plane.

**Pattern  $\infty/\infty/1$  (Figure 4; Figure S4).** The 100 and 010 maxima show a continuous ringlike distribution with a common 001 maximum. This distribution, typically called fiber texture, indicates that the *a*- and *b*-axes are randomly distributed.

**a/b/2 Patterns.** In all cases, the two 001 maxima are aligned with the plane of the 1st OL.

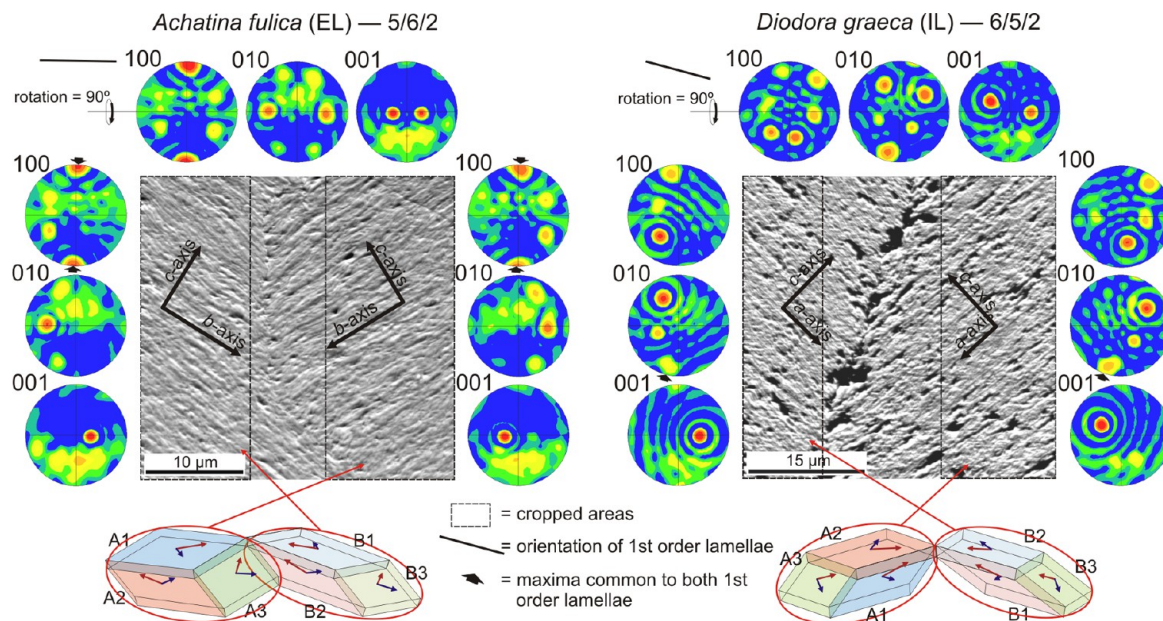
**Pattern 1/2/2 (Figure 4; Figure S5).** In the cases studied, the two 001 maxima (two *c*-axis orientations) are at angular distances of  $25\text{--}50^\circ$ . In the 100 PF, there are two peripheral half-maxima that correspond to a single *a*-axis orientation. The two 010 maxima indicate the existence of two *b*-axis orientations.

**Pattern 5/6/2 (Figure 4; Figure S5).** This pattern is basically the same as the previous one but with four additional 001 and 100 maxima of a lower intensity. This implies a total of five main orientations for the *a*-axis, six for the *b*-axis, and two for the *c*-axis. The 001 and 010 maxima are distributed into two arches each related to one of the 001 maxima. Within each arch, the maxima are at  $\sim 60^\circ$ . This pattern has been found with EBSD in the same layer of the same species (*Achatina fulica*) in which a 1/2/2 pattern was found with XRD, suggesting that the difference between the two might be related to differences in sensitivity of the method. Compared to XRD, the EBSD measurements record a somewhat greater angular distance between 001 maxima.

**Pattern 2/1/2 (Figure 4; Figure S6).** It can easily be described as the 1/2/2 pattern except that the 100 and the 010 maxima are permuted. It has been recorded only in the fissurellid gastropod *Diodora graeca* by XRD.

**Pattern 6/5/2 (Figure 4; Figure S6).** In parallel with the 1/2/2 pattern with respect to 5/6/2, this pattern is a 2/1/2 pattern with four additional 100 and 010 maxima split into two arches each related to one of the 001 maxima and separated from each other by  $\sim 60^\circ$ . The fact that it is found only with EBSD in particular layers of species that otherwise yield XRD patterns of 2/1/2 (*Diodora graeca*) and 4/4/2 (*Fissurella crassa*) again





**Figure 5.** EBSD PFs of the two cases indicated. The upper set of PFs is for the whole mapped surface, whereas the lower vertical sets correspond to the left and right cropped areas on both surfaces. Note the different distribution of PFs in the cropped areas. Arrows indicate the only maxima encountered in both the right and left sets of PFs. The mapped surfaces are approximately parallel to the 1st OL and perpendicular to the external shell surface. PFs are rotated with respect to the surfaces as indicated, such that they represent views from the external shell surface. The lower sketches indicate the sets of crystals of the theoretical synthetic models (see Figure 7) that correspond to alternating 1st OL.

suggests that the differences between the three patterns may result from differences in resolution. The substantial difference in angular distance between 001 maxima of *Diodora graeca* with the two techniques is striking.

**Pattern 4/4/2 (Figure 4; Figure S6).** This pattern can be described as a 6/5/2 pattern in which the 010 maxima corresponding to the unpaired *a*-axis main orientation (as well as the 010 maxima related to it) are absent. In the two instances recorded, the angular distances are relatively high (70–75°).

**Pattern 2/4/2 (Figure 4; Figure S7).** This pattern is the most widespread both in bivalves and in gastropods. The two 001 maxima are at an angle between 20° and 45° and, as usual, align with the planes of the 1st OL. In some cases (*Arca noae*, *Spondylus sinensis*), individual maxima elongate perpendicular to the 1st OL plane. Sometimes, they are not clearly delineated and merge with each other, this being particularly true when the angular distance between the maxima is small. As in the above pattern (4/4/2), there are four 010 maxima, indicative of four preferential *b*-axis orientations distributed into two pairs with the maxima of each pair at ~60°. There are nevertheless only two particularly wide 100 maxima (or four half maxima, if peripheral), which correspond to two preferential *a*-axis orientations at ~60°. Each 001 maximum is related to two of the four 010 maxima (as in the 4/4/2 pattern) and to the two big 100 maxima. Each 100 maximum also groups with two of the 010 maxima (Figure 4).

**SEM-EBSD Maps.** Maps and corresponding PFs were drawn in five gastropods: *Tectus pyramis*, *Tricolia capensis*, *Achatina fulica*, *Fissurella crassa*, and *Diodora graeca*. The mapped surfaces were approximately parallel to the planes of the 1st OL, such that it was easy to find regions of convergence of differently inclined 3rd OL cut in plane (Figure 5). The first two species belong in the 3/3/1 pattern (Figure S3) with the *c*-axis parallel to the bisector of the angle between differently inclined 3rd OL, as deduced also from XRD data of species

having the same texture pattern. In the three latter cases, EBSD data indicate a 5/6/2 pattern for *A. fulica* (Figure S5), and 6/5/2 patterns for both *F. crassa* and *D. graeca* (Figure S6). For each species, the EBSD-calculated PFs agree with the equivalent XRD-calculated PFs, although as commented on above the number of maxima increased with respect to the XRD patterns. When the areas corresponding to the different 1st OL in contact are cropped out, it becomes clear that each 001 maximum and its associated 100 and 010 maxima correspond exclusively to one of the adjacent 1st OL (Figure 5). In all three cases, the position of the 001 maximum implies that the predominant orientation of the *c*-axis is at a high angle (75°–90°) to the long axes of the 3rd OL. The only maxima that appears in the PFs corresponding to the cropped areas are the unpaired 100 in *A. fulica* and the unpaired 010 in *D. graeca* and *F. crassa* (Figure 5), implying that the corresponding predominant crystallographic directions (the *a*-axis in the first case and the *b*-axis in the latter cases) are common to both lamellae.

## DISCUSSION

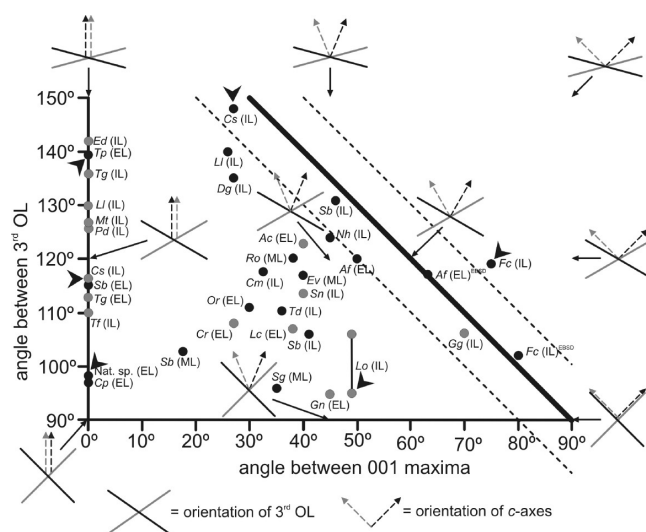
**Previous Knowledge on Patterns.** Some previous authors identified textural patterns that can sometimes resemble the patterns we define here. The first published XRD patterns were those of the littorinimorph gastropod *Cypraea testudinaria* (currently *Chelycypraea testudinaria*),<sup>24</sup> which according to the PFs changes from a possible 3/3/1 pattern (EL and ML1) to an uncertain 2/4/2 (ML2) to 1/2/2 (IL). These results are consistent with those subsequently reported for another littorinimorph, *Charonia lampas* [with ∞/∞/1 (EL), 4/4/2 (ML), and a possible 5/6/2 (IL)], by the same research team<sup>27</sup> and with our results on other gastropods from the same group (e.g., *Semicassis bisulcata*, *S. granulata*, *Strombus pugilis*, and *Lobatus gigas*; Figures S5 and S7). Later research on the limpet *Scutellastra tabularis* and the heterodont

bivalve *Fragum fragum*<sup>25</sup> provided a 2/4/2 type for the former (consistent with the same patterns recognized here in the only other limpet studied, *Cymbula safiana*; Figure S7) and 3/3/1 for the latter (as is also the case of the heterodonts *Donax deltooides* and *Callista Chione*; Figure S3). In a set of papers by Chateigner et al.,<sup>26–28</sup> some examples for which PFs provide enough information (*Euglandina* sp., *Cyclophorus woodianus*, *Helix aspersa*) correspond to a 1/1/1 pattern, which we did not recognize. All of these are terrestrial gastropods, a group which in our analyses invariably provided 1/2/2 or 5/6/2 patterns. In their Table 1, Chateigner et al.<sup>26</sup> attributed the same pattern to several other species of the same group. They also provided evidence of the existence of two 001 maxima (patterns a/b/2), but without additional information, which could enable us to identify particular patterns. The only other significant evidence was provided with TEM.<sup>18</sup> These authors found that 3rd OL of adjacent 1st OL share the *a*-axis in *Littorina littorea*, which fits in with the 1/2/2 pattern found in this same species (Figure S5). They also found that the planes separating the 1st OL in the neogastropod *Oliva sayana* are (110) surfaces, which is consistent with, although not defining, the 2/4/2 pattern we have recognized in other species of the same genus and in other neogastropods (*Oliva reticulata*, *Conus marmoreus*; Figure S7).

**Crystallography of 3rd OL.** With EBSD, we also resolved the crystallography of the CLMs at the submicrometer scale. In particular, it is worth noting that alternating 1st OL have different orientations for the *c*-axis in a/b/2 patterns (Figure 5). Wilmot et al.<sup>18</sup> concluded that the upper main surfaces of 3rd OL in the two species they studied (see above) were (001) surfaces (i.e., with the *c*-axes perpendicular to them). If this was the case, the angle between 3rd OL of adjacent 1st OL and the angle between their corresponding *c*-axes would be supplementary. We have plotted the two angles for those cases of both a/b/1 and a/b/2 patterns in which the angle between the 3rd OL is known from in-plane fractures of the 1st OL (Figure 6; Figure S8). The condition of complementarity (thick black line to the top right of the plot) is clearly not fulfilled when there is only one 001 maximum (a/b/1 patterns), but neither is it for those cases of the a/b/2 type (see also Figure S8). The few exceptions can be taken as coincidental. Our measurements directly on Figure 14 of Wilmot et al.<sup>18</sup> also imply that, although the *c*-axes are at high angle ( $\sim 75$ – $78^\circ$ ) to the long axis of the 3rd OL, they are not strictly perpendicular. In conclusion, the main surfaces of the 3rd OL are not crystallographic surfaces.

**Crystallographic Interpretation and Equivalences between Patterns.** As explained above, we differentiated between nine different textural patterns on the basis of the number, distribution, and relationships between PF maxima (Figure 4). By interpreting the maxima as single crystallographic directions, we determined the ideal PF maxima distribution. From these, we can derive synthetic crystallographic models in which we represent the minimum number of crystals and their relations, which are necessary to establish such a pattern. This allows us to further group together those patterns and their associated models that are crystallographically equivalent (Figure 7).

**a/b/1 Textural Patterns. 2/2/1 and 3/3/1 Patterns.** These two patterns clearly correspond to a single and double {110} twin, respectively. In the first case, the twinning plane is parallel to the elongation of the 1st and 3rd OL, this matching with the high incidence of polysynthetic twins observed in the CLMs (Figure 2a).<sup>18–22</sup> In the second case, the twins are of the



**Figure 6.** Plot of the angle between 3rd OL (in plane views) and the angular distance between 001 XRD and EBSD (indicated as superscripts) pole maxima. Small sketches indicate the theoretical orientations of 3rd OL and *c*-axes (correspondences indicated by gray tones) in the positions indicated by the arrows. Abbreviations correspond to species in Tables S1 and S2. The thick line to the top right indicates the condition of complementarity (angle between 3rd OL + angle between 001 maxima =  $180^\circ$ ). Broken lines indicate  $\pm 10^\circ$  values for both parameters. Black dots, gastropods; gray dots, bivalves. Dots joined by a line are values calculated on the same layer. Arrows point to the specimens illustrated in Figure S8 for reference. EL, external layer; IL, internal layer; ML, middle layer.

polycyclic type<sup>21,41</sup> with one of the twinning planes parallel to the main planes of the 1st OL (e.g., Figure 2b). The orientation lacking in the 2/2/1 pattern is the one corresponding to crystallites with their *a*-axes oriented within the planes of the 1st OL, which also contain the growth direction of the 3rd OL (Figure 1d, e). We hypothesize that the crystal competition imposed by the growth of aragonitic fibers (3rd OL) may inhibit the development of those crystallites with their shortest axis (the *a*-axis) in this direction if this direction was also the one with the lowest growth rate. This 3/3/1 pattern is the only one found in vetigastropods and has also been reported from the nacles of bivalves and *Nautilus*.<sup>25,26,42</sup>

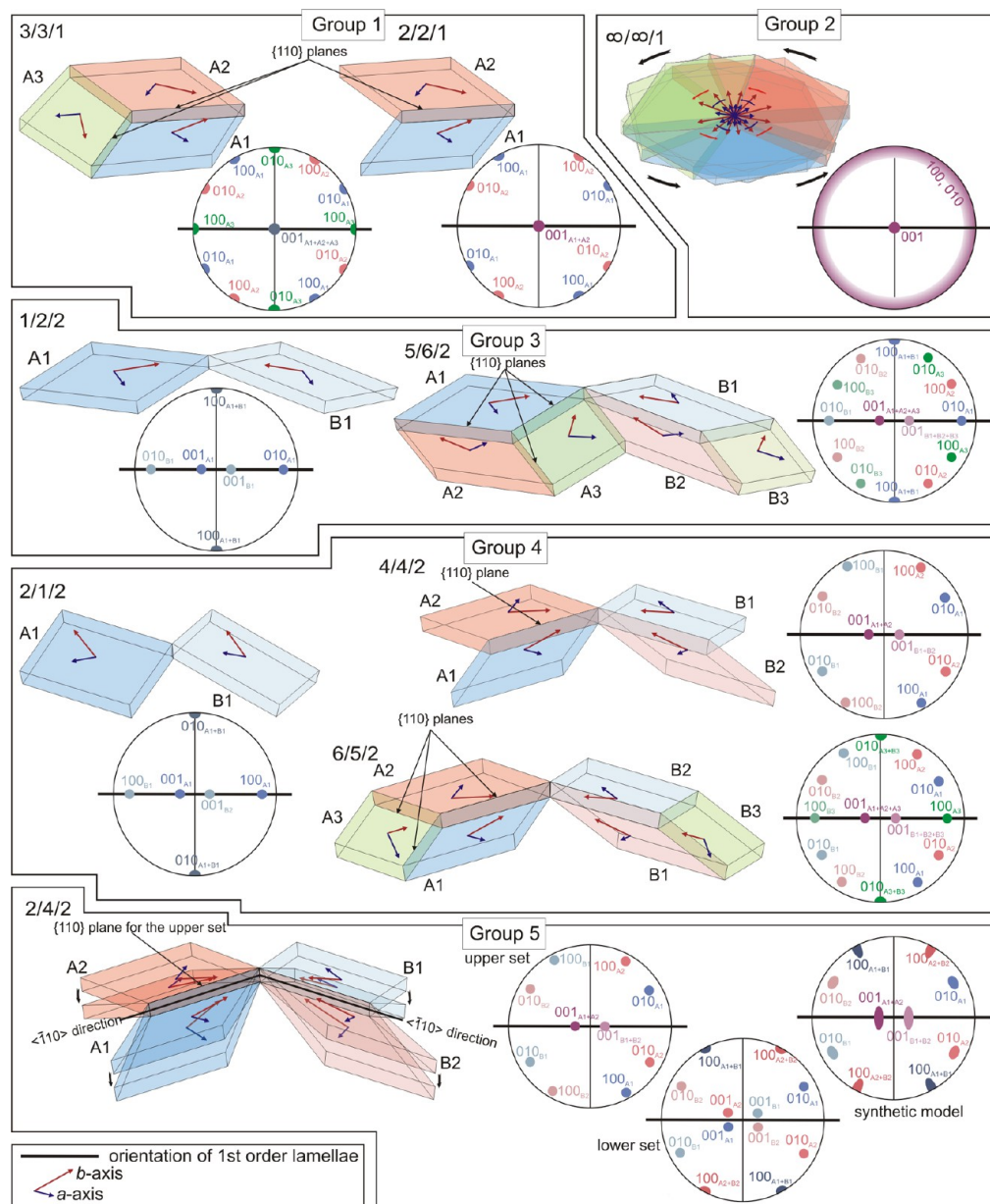
**( $\infty/\infty/1$ ) Pattern.** The multiple *a*- and *b*-axis orientations are randomly oriented around a common *c*-axis orientation typical of a fiber texture. This pattern is particularly abundant in bivalves as compared to gastropods. This texture is also found in gastropod nacre.<sup>25,26</sup>

**a/b/2 Textural Patterns.** In all of these patterns, as confirmed by the EBSD analyses, each of the two sets of 1st OL (characterized by evenly dipping 3rd OL) provides a single 001 maximum (Figure 5).

**1/2/2 and 5/6/2 Patterns.** The two patterns are characterized by the two sets of 1st OL sharing a common *a*-axis, as revealed by EBSD (Figure 5), the only difference being the absence (1/2/2) or presence (5/6/2) of {110} twins. The difference between the two patterns probably also depend on the resolution of the method, as discussed above. These patterns have been recognized only in littorinimorph and pulmonate gastropods.

**2/1/2, 6/5/2, and 4/4/2 Patterns.** In the first two patterns, the 1st OL share a common *b*-axis (Figure 5), and in parallel with the above commentary on patterns, the difference lies in

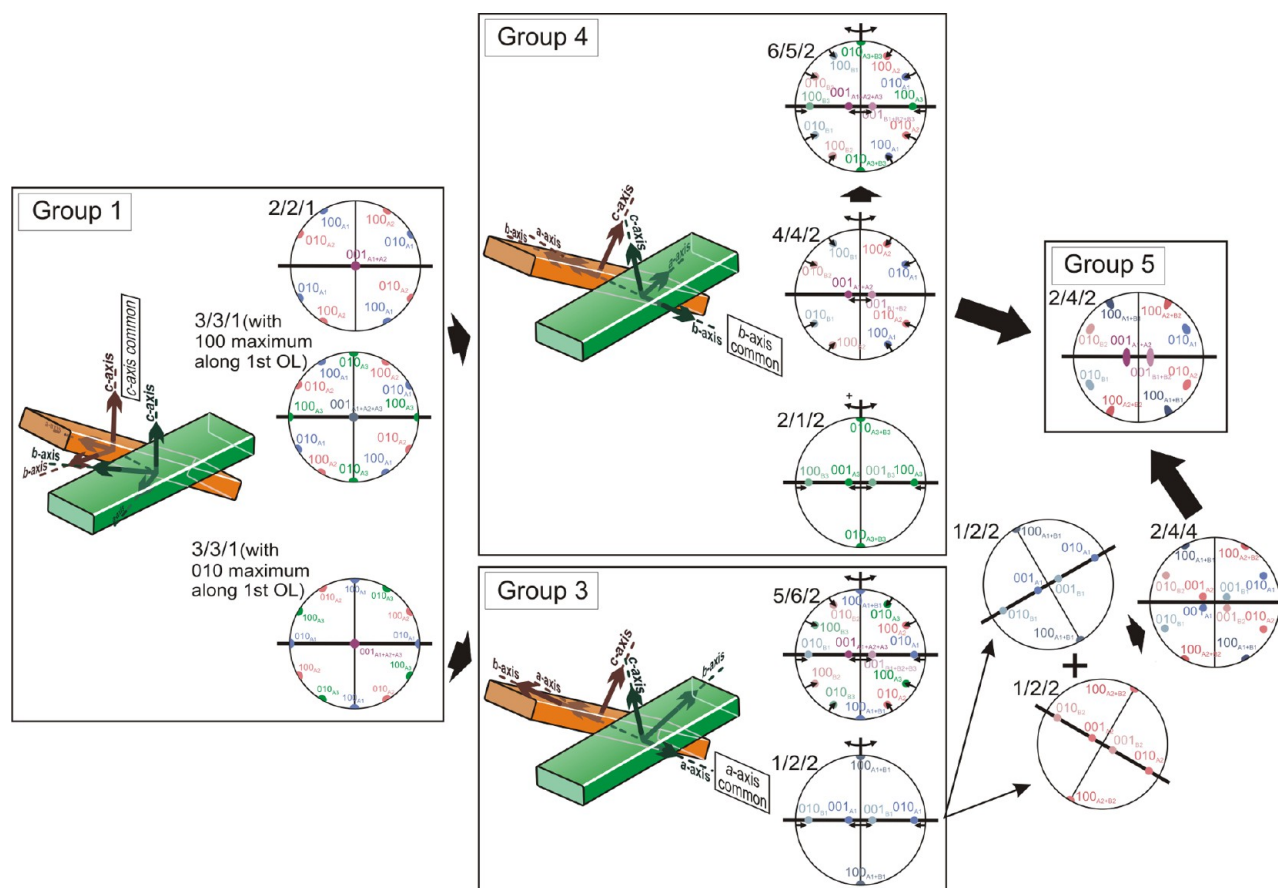




**Figure 7.** Idealized PFs and crystallographic interpretation of the nine patterns differentiated in the CLMs of mollusks. They are classified into five groups according to their crystallographic equivalence. Crystal shapes are ideal. To gain an idea of their actual shapes and sizes, the reader is referred to Figure 2.

the incidence of twins and/or the resolution. The 4/4/2 pattern, in which the crystallites providing the common  $b$ -axis are apparently lacking, was recorded only with XRD in *Fissurella crassa*; the same layer of the same species shows a 6/5/2 pattern when examined with EBSD, although with a low development of the 010 maximum common to the two sets of 1st OL (Figure S6). The only case recorded in bivalves (*Glycymeris glycymeris*; Figure S6) displays a very faint common 010 maximum. All this implies that this pattern is in fact a 6/5/2 with a low incidence of the common  $b$ -axis orientations. As commented above for the 2/2/1 pattern, the growth of crystallites with this orientation (i.e., with their  $a$ -axes oriented within the planes of the 1st OL) might be inhibited by competition between the growing fibers (3rd OL). Why this growth axis orientation is not inhibited in the 2/1/2 and 5/6/2 patterns is not easy to explain unless we attribute it to the action of particular organic molecules.

**(2/4/2) Pattern.** This is by far the most complex pattern because the distribution of maxima implies the existence of four main orientations for the  $b$ -axis but only two for the  $a$ -axis. If we look only at the relationship between the 001 and 010 maxima, the pattern is similar to the 4/4/2 pattern (Figure 4). On the other hand, the correspondences between the 100 and 010 maxima implies the existence of two main orientations of the  $a$ -axis, each serving as a common rotation axis for the two corresponding orientations of the  $b$ -axis (i.e., two superposed 1/2/2 patterns rotated by  $\sim 60^\circ$  within the PF plane). The 4/4/2 pattern would imply the existence of four 100 maxima (whereas there are actually only two), whereas two superposed 1/2/2 patterns requires the existence of four 001 maxima (only two present). However, the wide spreads shown by the 100 and 001 maxima, as compared to the 010 maxima, implies that it is indeed possible that the two aforementioned patterns (4/4/2 plus double 1/2/2) appear superimposed (upper and lower sets



**Figure 8.** Proposed relationships between groups of patterns. The left sketches illustrate the main crystallographic features that characterize groups 1, 3, and 4. See text for explanation.

in Figure 7) and that all the intermediate orientations between the two are present. This in fact fits in with the elongation of the 100 and 001 maxima in perpendicular to the elongation of the 1st OL (see PFs for *Arca noae* (EL), *Spondylus sinensis* (IL), *Lobatus gigas* (IL), and *Oliva reticulata* (IL) in Figure S7), which is essentially the movement required to shift from one pattern to the other (see synthetic model in Figure 7). This pattern was previously found in the bivalve family Arcidae,<sup>27</sup> and we have recorded it in a large number of bivalves (arcoids, pectinoids, and veneroids) and gastropods (derived littorinimorphs and neogastropods).

**Relationships between Groups of Patterns.** According to the above comments, it is clear that there are five groups of patterns characterized by significant crystallographic differences. Within each group, the crystallography is much the same with the differences between patterns being of minor significance. By comparing the synthetic PFs and their associated crystallographic models, it is easy to infer the way in which some patterns may derive from others.

The simplest patterns, also found in inorganic aragonite, are those of group (1) in which the *c*-axes of crystals are co-oriented (Figure 8, left). From this group, patterns of the *a/b/2* type are found by separating the 001 maxima of the crystals belonging to each of the two sets of 1st OL in opposite directions within the plane of the 1st OL. This transition is visible even in some cases in which the 001 maximum is bilobated (e.g., *Tectus pyramis*; Figure S3), as if in an incipient splitting process. The 001 maxima can separate by rotating in the opposite direction around either the *a*-axis [patterns of

group (3)] or the *b*-axis [patterns of group (4)] (Figure 8). In either case, the only common axis that remains between different 1st OL is the rotation axis. Patterns of group (3) would hypothetically derive from a nondetected 3/3/1 pattern in which the 010 maximum would be contained within the plane of the 1st OL (Figure 8, bottom of left panel). Patterns of group (4) may derive from a 3/3/1 pattern in which a 100 maximum is oriented in the direction of the 1st OL (i.e., the common *b*-axis is perpendicular to the plane of the 1st OL) (Figure 8, top of left panel), which is the kind we have detected (Figure 4; Figure 7, top left). The only pattern within group (5), (2/4/2), results from the merging of a 4/4/2 pattern ("upper set" in Figure 7, bottom) belonging to group (4) and another pattern having two common *a*-axes ("lower set" in Figure 7, bottom). The latter pattern can hypothetically result from the superimposition of two 1/2/2 patterns [group (3)] rotated with respect to each other by  $\sim 60^\circ$ , thus producing a hypothetical 2/4/4 pattern (Figure 8, right). Accordingly, the 2/4/2 pattern could derive from both groups (3) and (4).

## CONCLUSIONS

This is the first time that such a comprehensive study has been conducted on the crystallographic textures of the CLMs. All patterns recorded with XRD and, to a lesser extent EBSD, imply that the CLMs are highly textured materials with a high degree of crystallographic ordering. We have distinguished up to nine textural patterns in the CLMs of gastropod and bivalve mollusks, which can be grouped into five main groups with significantly different crystallographies:



(1)  $3/3/1 + 2/2/1$ . These are the simplest patterns consisting of two ( $2/2/1$ ) or three ( $3/3/1$ ) twinned crystals sharing the *c*-axis. There is full continuity of the three crystallographic axes of aragonite across the 1st OL.

(2)  $\infty/\infty/1$ . As in (1) except that the crystal aggregate is disoriented on the *a*-*b* plane.

(3)  $1/2/2 + 5/6/2$ . There is full crystallographic continuity within each 1st OL but only the *a*-axis goes across the boundaries between 1st OL.

(4)  $2/1/2 + 4/4/2 + 6/5/2$ . The crystallographic continuity becomes interrupted at the boundaries between 1st OL, where the *b*-axis is the only one that continues across.

(5)  $2/4/2$ . Orientation shifts between two end configurations, one of the  $4/4/2$  type [group (4)] and another consisting on a double  $1/2/2$  pattern [which belongs to group (3)]. Depending on the configuration, either the *a*- or the *b*-axis is the one that continues across the 1st OL.

Groups (3–5) represent crystallographic relationships so far unknown in abiogenic or other biogenic aragonites (e.g., nacre or prismatic aragonite). It has been shown how organic macromolecules occluded or absorbed on particular surfaces of calcite crystals may influence the development of twins.<sup>43</sup> This might also be the case with the different crystallographic patterns recognized in the CLMs: specific biomolecules would interrupt the continuity of crystals along particular crystallographic directions but not along others at the boundaries between 1st OL. This contention is supported by the fact that the groups of patterns bear, though not strictly, some systematic restriction (see phylogenetic trees in Figure S1). For example, patterns of group (1) are the only ones recorded in vetigastropods except for the fissurelloideans, which are the only gastropods with patterns of group (4). Group (3) patterns are typical of littorinimorph gastropods, whereas the  $2/4/2$  patterns [group (5)] appear in derived littorinimorphs (tonnoideans, stromboideans) and neogastropods. This implies that different proteomes, due to the action of specific proteins that interfere with forming crystals, may give rise to particular, unexpected crystal relationships.

Previous findings<sup>21,24–30,33–35</sup> and our own results make it clear that the CL is not a single microstructure but rather a family of homeomorphic microstructures with complex and varied crystallographies. The views of CLMs in Figure 3 come from exactly the same species from which the patterns in Figure 4 have been taken. Despite the differences between patterns, the aspect under SEM of the corresponding CLMs is strikingly similar, indicating their high degree of homeomorphy. This multicrystallographic character does not apply to other microstructures (e.g., nacre, prismatic calcite or aragonite, foliated calcite) for which the only difference can be between a fiber or sheet texture (e.g., ref 26). Our study concerns both the micrometer (XRD) and submicrometer (EBSD) levels. Future efforts will be devoted to ascertaining the differences between patterns at the nano (TEM) level.

Also, given the widespread nature of the CLMs within the mollusks (Figure S1), the potential of CLM textural patterns for phylogenetic purposes is worth exploring.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01775.

Lists of bivalve and gastropod species examined, phylogenetic diagrams of the main groups of bivalves and gastropods, X-ray diffraction and associated pole figures, pole figures of the molluscan species classified according to their crystallographic patterns, and SEM views of selected shell fractures (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [acheca@ugr.es](mailto:acheca@ugr.es).

### Author Contributions

I.A. participated in design of the study and carried out sample preparation and analysis as well as data acquisition and interpretation. P.Z. helped and participated in the XRD analysis. K.B. carried out the EBSD analysis. J.B. coordinated both the XRD and EBSD analyses. A.G.C. conceived, designed, and coordinated the study and participated in data interpretation. I.A. and A.G.C. drafted the manuscript. J.B. and C.I.S.-D. critically revised the draft for important intellectual content. All authors checked the draft manuscript and gave final approval for publication.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

<sup>†</sup>Deceased January 5th, 2016.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by projects CGL2010-20748-CO2-01, CGL2013-48247-P (Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO, and Fondo Europeo de Desarrollo Regional, FEDER), RNM-2010-6433, and the Research Group RNM363 (Andalusian Consejería de Innovación, Ciencia y Tecnología). I.A. is supported by a PhD Grant of the FPI program of the MINECO-FEDER (BES-2011-048038) and associated short stays at the FHI in Berlin (EEBB-I-13-07744 and EEBB-I-14-08187) and at the IMIM in Krakow (EEBB-I-15-09406). We thank Liz Harper (University of Cambridge, UK) and the BIVAToL project for supplying some of the shells studied. The image of Figure 1A was kindly provided by Dr. Luis Sánchez-Tocino (Department of Zoology, University of Granada).

## ■ ABBREVIATIONS

1st, 2nd, 3rd OL, first-, second-, third-order lamellae; CLM, crossed-lamellar layer; EL, IL, ML, external, internal, middle shell layer; PF, pole figure

## ■ REFERENCES

- (1) Osuna-Mascaró, A. J.; Cruz-Bustos, T.; Marin, F.; Checa, A. G. *PLoS One* **2015**, *10*, e0122934.
- (2) Bøggild, O. B. D. *Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skr., Naturvidensk. Mathem. Afd.* **1930**, *9*, 231–326.
- (3) Taylor, J. D.; Kennedy, W. J.; Hall, A. *Bull. British Mus. Nat. Hist. Zool.* **1969**, *Suppl.* *3*, 1–125.
- (4) Taylor, J. D.; Kennedy, W. J.; Hall, A. *Bull. British Mus. Nat. Hist. Zool.* **1973**, *22*, 253–294.
- (5) Carter, J. G. In *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*; Carter, J. G., Ed.; Van Nostrand Reinhold: New York, 1990; Vol. 1, pp 609–661.
- (6) Carter, J. G.; Clark, G. R., II In *Mollusks-Notes for a Short Course*, Broadhead, T. W., Ed.; Stud. Geol. Univ. Tennessee: Knoxville, TN, 1985; Vol. 13, pp 50–71.
- (7) Carter, J. G.; Harries, P. J.; Malchus, N.; Sartori, A. F.; Anderson, L. C.; Bieler, R.; Bogan, A. E.; Cope, J. C.; Cragg, S. W.; García-March,

- J. R.; Hylleberg, J.; Kelley, P.; Kleemann, K.; Kříž, J.; McRoberts, C.; Mikkelsen, P. M.; Pojeta, J.; Skelton, P. W.; Tëmkin, I.; Yancey, T. E.; Zieritz, A. In *Treatise Online*; Carter, J. G., Ed.; Kansas University Paleontological Institute: Lawrence, 2012; Part N, Revised, Vol. 1, Chapter 31, pp 1–209.
- (8) Hedegaard, C. *J. Moll. Stud.* **1997**, *63*, 369–377.
- (9) Carter, J. G.; Tevesz, M. J. S. *J. Paleontol.* **1978**, *52*, 859–880.
- (10) Haas, W. *Malacologia* **1981**, *21*, 403–418.
- (11) Vendrasco, M. J.; Checa, A. G.; Kouchinsky, A. V. *Palaeontology* **2011**, *54*, 825–850.
- (12) Palmer, A. R. *Mar. Biol.* **1983**, *75*, 287–292.
- (13) Kamat, S.; Su, X.; Ballarini, R.; Heuer, A. H. *Nature* **2000**, *405*, 1036–1040.
- (14) Kobayashi, I. *Sci. Rep. Niigata Univ. E* **1971**, *2*, 27–50.
- (15) Wise, S. W. *Eclogae geol. Helv.* **1971**, *64*, 1–12.
- (16) Uozumi, S.; Iwata, K. *Contr. Dept. Geol. Mineral. Fac. Sci. Hokkaido University: Sapporo, Japan*, 1972; Vol. 1236, pp 447–477.
- (17) Omori, M.; Kobayashi, I.; Shibata, M.; Mano, K.; Kamiya, H. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants*; Watabe, N., Wilbur, K. M., Eds.; Belle W. Baruch Library in Marine Science: Columbia, SC, 1976; Vol. 5, pp 403–426.
- (18) Wilmot, N. V.; Barber, D. J.; Taylor, J. D.; Graham, A. L. *Philos. Trans. R. Soc., B* **1992**, *337*, 21–35.
- (19) Dauphin, Y.; Guzman, N.; Denis, A.; Cuif, J.-P.; Ortlieb, L. *Aquat. Living Resour.* **2003**, *16*, 95–103.
- (20) Kobayashi, I.; Akai, J. *Chishitsugaku Zasshi* **1994**, *100*, 177–180.
- (21) Kogure, T.; Suzuki, M.; Kim, H.; Mukai, H.; Checa, A. G.; Sasaki, T.; Nagasawa, H. *J. Cryst. Growth* **2014**, *397*, 39–46.
- (22) Nouet, J.; Baronnet, A.; Howard, L. *Micron* **2012**, *43*, 456–462.
- (23) Nakahara, H.; Kakei, M.; Bevelander, G. *Veliger* **1981**, *23*, 207–211.
- (24) Chateigner, D.; Hedegaard, C.; Wenk, H. R. 1996. In *Textures of Materials ICOTOM-11: Proceedings of the 11th International Conference on Textures of Materials*; Liang, Z., Zuo, L., Chu, Y., Eds.; Academic Publishers: Xi'an, China, 1996; pp 1221–1226.
- (25) Hedegaard, C.; Wenk, H.-R. *J. Molluscan Stud.* **1998**, *64*, 133–136.
- (26) Chateigner, D.; Hedegaard, C.; Wenk, H. R. *J. Struct. Geol.* **2000**, *22*, 1723–1735.
- (27) Ouhenia, S.; Chateigner, D.; Belkhir, M. A.; Guilmeau, E. *J. Struct. Biol.* **2008**, *163*, 175–184.
- (28) Chateigner, D.; Kaptein, R.; Dupont-Nivet, M. *Am. Malacol. Bull.* **2009**, *27*, 157–165.
- (29) Rodríguez-Navarro, A. B.; Checa, A. G.; Willinger, M. G.; Bolmaro, R.; Bonarski, J. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 830–835.
- (30) Almagro, I.; Drzymala, P.; Rodríguez-Navarro, A. B.; Sainz-Díaz, C. I.; Willinger, M.-G.; Bonarski, J.; Checa, A. G. *Key Eng. Mater.* **2015**, *672*, 60–70.
- (31) Pokroy, B.; Zolotoyabko, E. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 682–688.
- (32) Hayashi, A.; Watanabe, T.; Nakamura, T. *Zoology* **2010**, *113*, 125–130.
- (33) Hayashi, A.; Yokoo, N.; Nakamura, T.; Watanabe, T.; Nagasawa, H.; Kogure, T. *J. Struct. Biol.* **2011**, *176*, 91–96.
- (34) Suzuki, M.; Kim, H.; Mukai, H.; Nagasawa, H.; Kogure, T. *J. Struct. Biol.* **2012**, *180*, 458–468.
- (35) Suzuki, M.; Kameda, J.; Sasaki, T.; Saruwatari, K.; Nagasawa, H.; Kogure, T. *J. Struct. Biol.* **2010**, *171*, 223–230.
- (36) Caspi, E. N.; Pokroy, B.; Lee, P. L.; Quintana, J. P.; Zolotoyabko, E. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **2005**, *61*, 129–132.
- (37) *LaboTex*, The Texture Analysis Software, 2010; LaboSoft s.c.
- (38) Pawlik, K. *Phys. Status Solidi B* **1986**, *134*, 477–483.
- (39) Bunge, H. J. *Texture Analysis in Materials Science. Mathematical Methods*; Butterworth & Co: London, 1982.
- (40) Bonarski, J. T. *Prog. Mater. Sci.* **2006**, *51*, 61–149.
- (41) Hayashi, A.; Yokoo, N.; Nakamura, T.; Watanabe, T.; Nagasawa, H.; Kogure, T. *J. Struct. Biol.* **2011**, *176*, 91–96.
- (42) Checa, A. G.; Okamoto, T.; Ramírez, J. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **2006**, *273*, 1329–1337.
- (43) Pokroy, B.; Kapon, M.; Marin, F.; Adir, N.; Zolotoyabko, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7337–7341.

# New crystallographic relationships in biogenic aragonite: the crossed-lamellar microstructures of mollusks

Io Almagro<sup>†,‡</sup>, Piotr Drzymała<sup>‡</sup>, Katarzyna Berent<sup>§</sup>, Claro Ignacio Saínez-Díaz<sup>‡</sup>, Marc Georg Willinger<sup>||</sup>, Jan Bonarski<sup>‡</sup> and Antonio G. Checa<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>†</sup>*Departamento de Estratigrafía y Paleontología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain,*

<sup>‡</sup>*Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC), Avda. de Las Palmeras nº 4, 18100. Armilla, Granada, Spain*

<sup>‡</sup>*Institute of Metallurgy and Materials Science of the Polish Academy of Sciences, 25 Reymonta Str., 30-059 Krakow, Poland*

<sup>§</sup>*AGH University of Science and Technology, Academic Centre for Materials and Nanotechnology, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Poland*

<sup>||</sup>*Fritz Haber Institute of the Max-Planck-Society, Department of Inorganic Chemistry, Faradayweg 4-614195 Berlin, Germany*

## SUPPORTING INFORMATION

### Contents

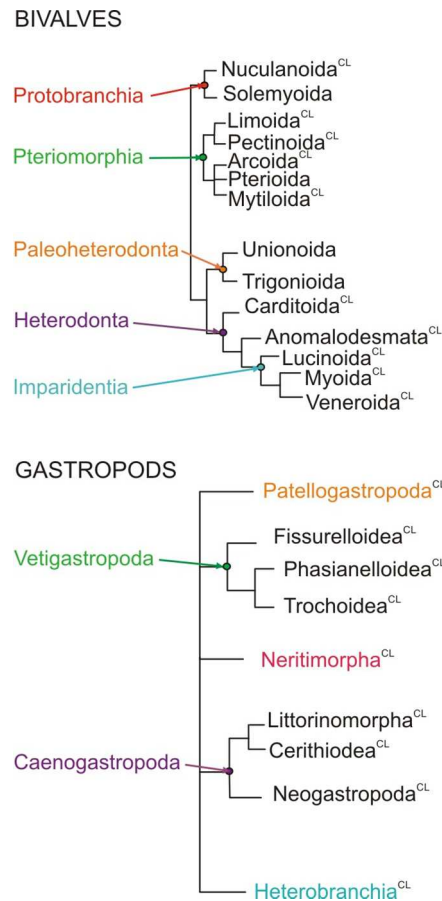
Table S1	2S
Table S2	3S
Figure S1	4S
Figure S2	5S
Figure S3	6S
Figure S4	7S
Figure S5	8S
Figure S6	9S
Figure S7	10S
Figure S8	11S

**Table S1.** List of bivalve species examined

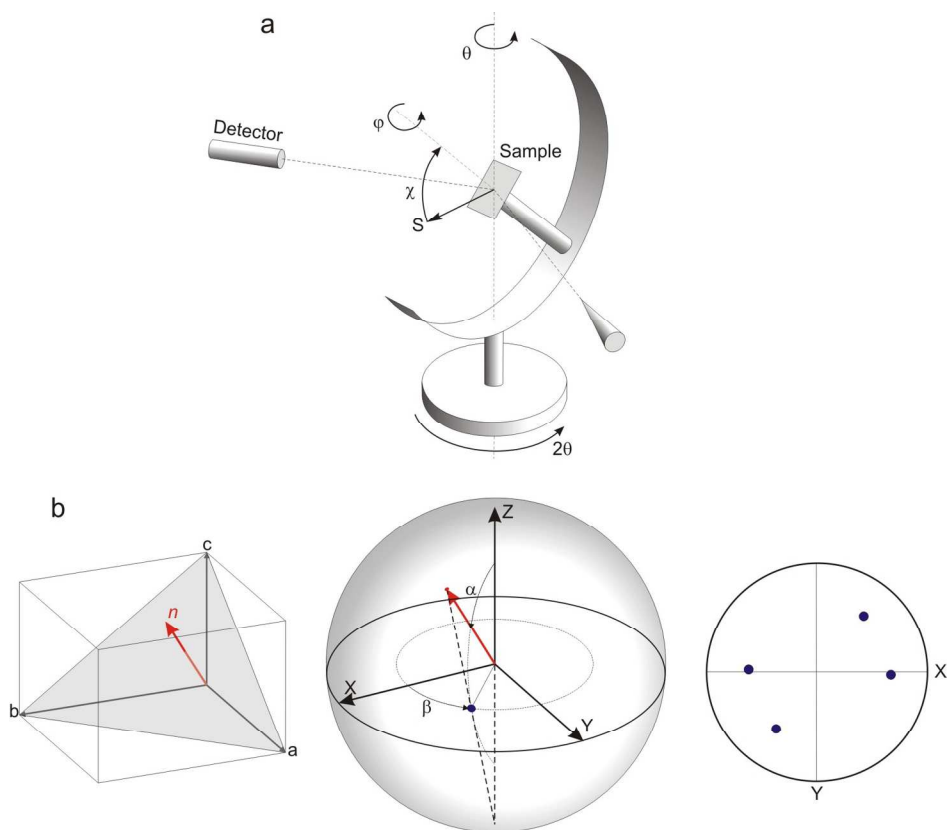
Subclass	Order	Species
Protobranchia	Nuculanoida	<i>Megayoldia thraciaeformis</i> (Storer, 1838)
Pteriomorpha	Arcoida	<i>Arca noae</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Glycymeris glycymeris</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Glycymeris nummaria</i> (Linnaeus, 1758)
“	Limoida	<i>Lima lima</i> (Linnaeus, 1758)
“	Pectinoida	<i>Plicatula muricata</i> (G. B. Sowerby II, 1873)
“	Pectinoida	<i>Spondylus sinensis</i> (Schreibers, 1793)
Heterodonta	Carditoida	<i>Eucrassatella decipiens</i> (Reeve, 1842)
“	Anomalodesmata	<i>Cuspidaria nobilis</i> (A. Adams, 1864)
“	Lucinoida	<i>Phacoides pectinatus</i> (Gmelin, 1791)
“	Myoida	<i>Pholas dactylus</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Corbula sinensis</i> (Bernard, Cai & Morton, 1993)
“	Veneroida	<i>Laevicardium oblongum</i> (Gmelin, 1791)
“	“	<i>Tridacna gigas</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Donax deltoides</i> (Lamarck, 1818)
“	“	<i>Lioconcha castrensis</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Periglypta albocancellata</i> (Huber, 2010)
“	“	<i>Circe rivularis</i> (Born, 1778)
“	“	<i>Callista chione</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Tellina foliacea</i> (Linnaeus, 1758)

**Table S2.** List of gastropod species examined

Subclass	Order	Species
Patellogastropoda	Patelloidea	<i>Cymbula safiana</i> (Lamarck, 1819)
Neritimorpha	Cycloneritimorpha	<i>Nerita undata</i> (Linnaeus, 1758)
Vetigastropoda	Fissurelloidea	<i>Diodora graeca</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Fissurella crassa</i> (Lamarck, 1822)
“	Phasianelloidea	<i>Tricolia capensis</i> (Dunker, 1846)
“	Trochoidea	<i>Cittarium pica</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Tectus pyramis</i> (Born, 1778)
Caenogastropoda	Littorinimorpha	<i>Semicassis bisulcata</i> (Schubert & Wagner, 1829)
“	“	<i>Semicassis granulata</i> (Born, 1778)
“	“	<i>Littorina littorea</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Naticarius hebraeus</i> (Martyn, 1786)
“	“	<i>Naticidae sp.</i>
“	“	<i>Lobatus gigas</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Strombus.pugilis</i> (Linnaeus, 1758)
“	Cerithioidea	<i>Turritella duplicata</i> (Linnaeus, 1758)
“	Neogastropoda	<i>Conus marmoreus</i> (Linnaeus, 1758)
“	“	<i>Oliva reticulata</i> (Röding, 1798)
Heterobranchia	Eupulmonata	<i>Achatina fulica</i> (Bowdich,1822)
“	“	<i>Eobania vermiculata</i> (Müller,1774)
“	“	<i>Ryssota otahejata</i> (Férussac, 1821)

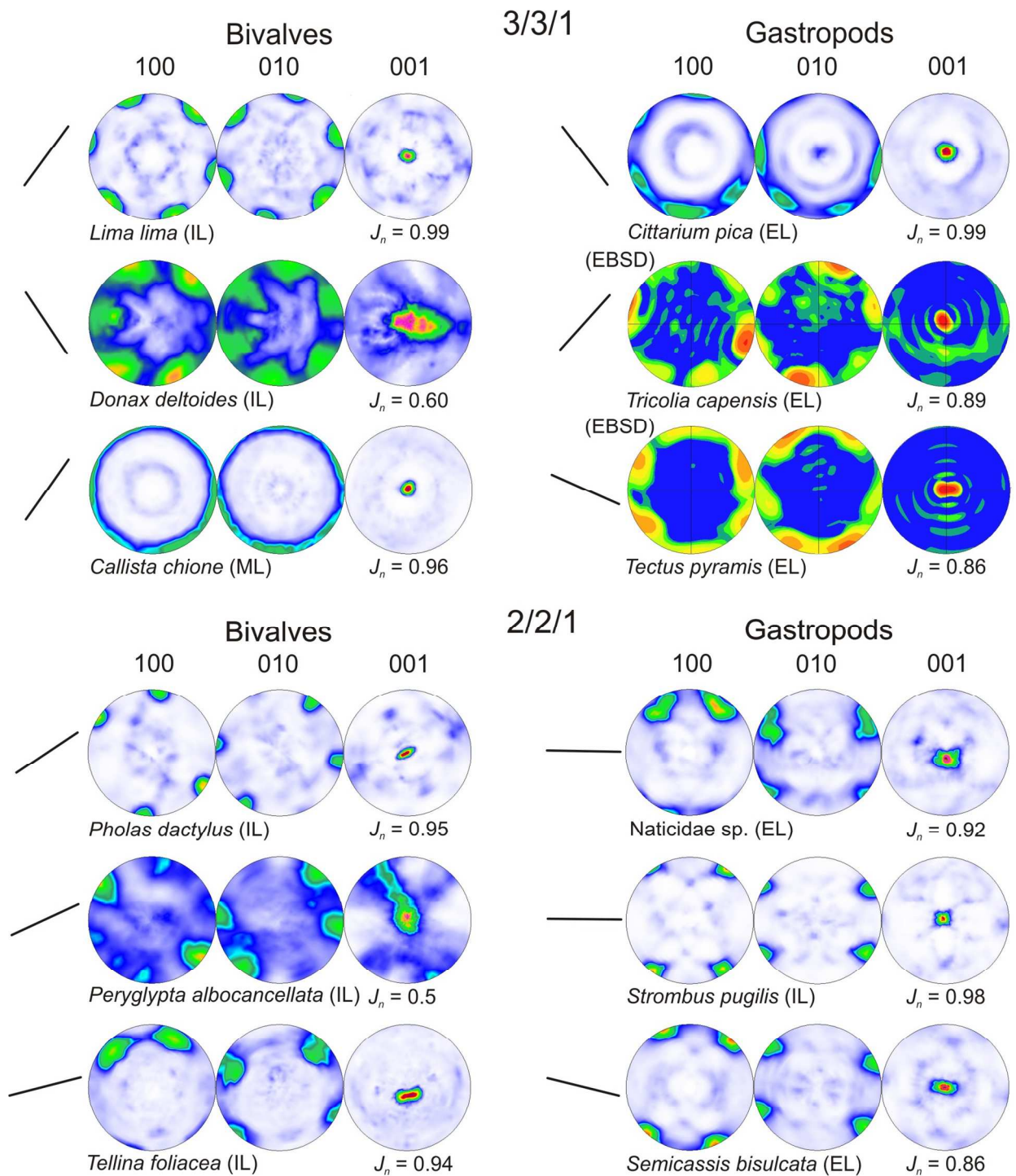


**Figure S1.** Phylogenetic diagrams of the main groups of bivalves and gastropods. Superscript CL indicates that the group contains representatives with CL layers. Schemes for bivalves modified from: (1) González, V. L.; Giribet, G. *Zool. Scripta* **2015**, *44*, 41-58, with additions from (2) Sharma, P. P.; González, V. L.; Kawauchi, G. Y.; Andrade, S. C. S.; Guzmán, A.; Collins, T. M.; Glover, E. A.; Harper, E. M.; Healy, J. M.; Mikkelsen, P. M.; Taylor, J. D.; Bieler, R.; Giribet, G. *Mol. Phylog. Evol.* **2012**, *65*, 64–74. Scheme for gastropods modified from: (1) Zapata, F.; Wilson, N. G.; Howison, M.; Andrade, S. C. S.; Jörger, K. M.; Schrödl, M.; Goetz, F. E.; Giribet, G.; Dunn, C. W. *Proc. R. Soc. B*, **2014**, *281*, 20141739, with additions from (2) Hedegaard, C. *J. Moll. Stud.* **1997**, *63*, 369-377, and (3) Colgan, D. J.; Ponder, W. F.; Eggler, P. E. *Zool. Scripta* **2000**, *29*, 29-63.

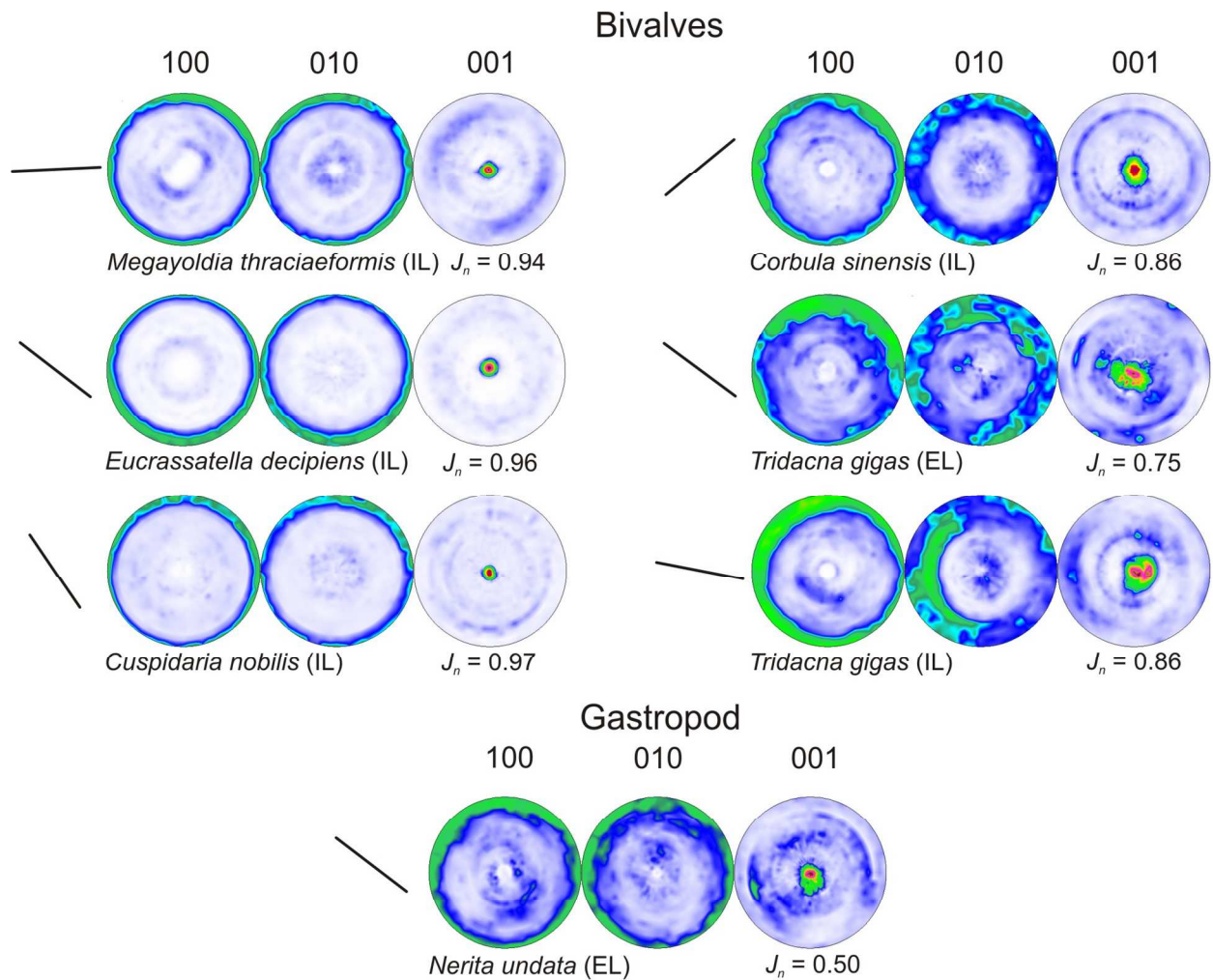


**Figure S2.** X-ray diffraction and associated pole figures. (a) Scheme of the Eulerian cradle. The axis of X-ray source, axis of detector and diffraction vector  $S$  are in the horizontal plane and are defined by angles  $\theta$  and  $2\theta$ . The position of the sample with respect to diffraction vector  $S$  is described by the tilt ( $\chi$ ) and rotation ( $\varphi$ ) angles. (b) Left, example of an orthorhombic crystal system (with  $a$ ,  $b$ ,  $c$  dimensions approximated to those of aragonite) and a crystallographic plane  $(hkl) = (111)$  expressed in Miller indices. Red vector  $n$  denotes normal to  $(111)$  plane (pole). Center, stereographic projection of vector  $n$  on the  $X$ - $Y$  plane of the sample coordinate system (blue point). The angular position of  $n$  ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) corresponds to the position of the Euler cradle ( $\chi$ ,  $\varphi$ ) in this measurement mode. Right, complete  $111$  pole figure for a single ideal crystal (only the poles in the upper hemisphere are represented).

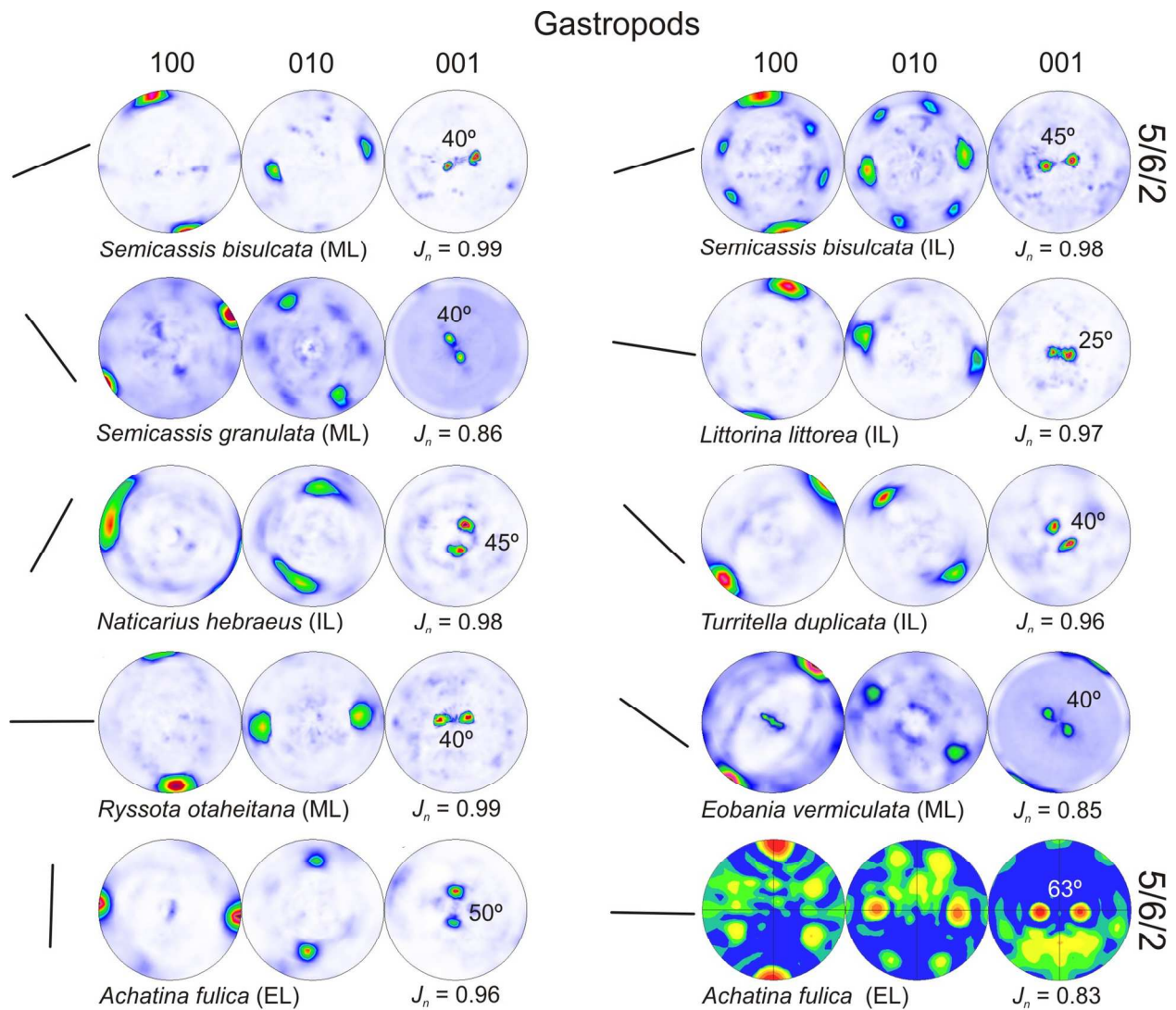




**Figure S3.** PFs of the molluscan species with 3/3/1 and 2/2/1 patterns. Bars on the left of PFs represent the orientation of the 1<sup>st</sup> OL.  $J_n$  is the texture index. All XRD data, except when indicated. EL = external layer; IL = internal layer; ML = middle layer.

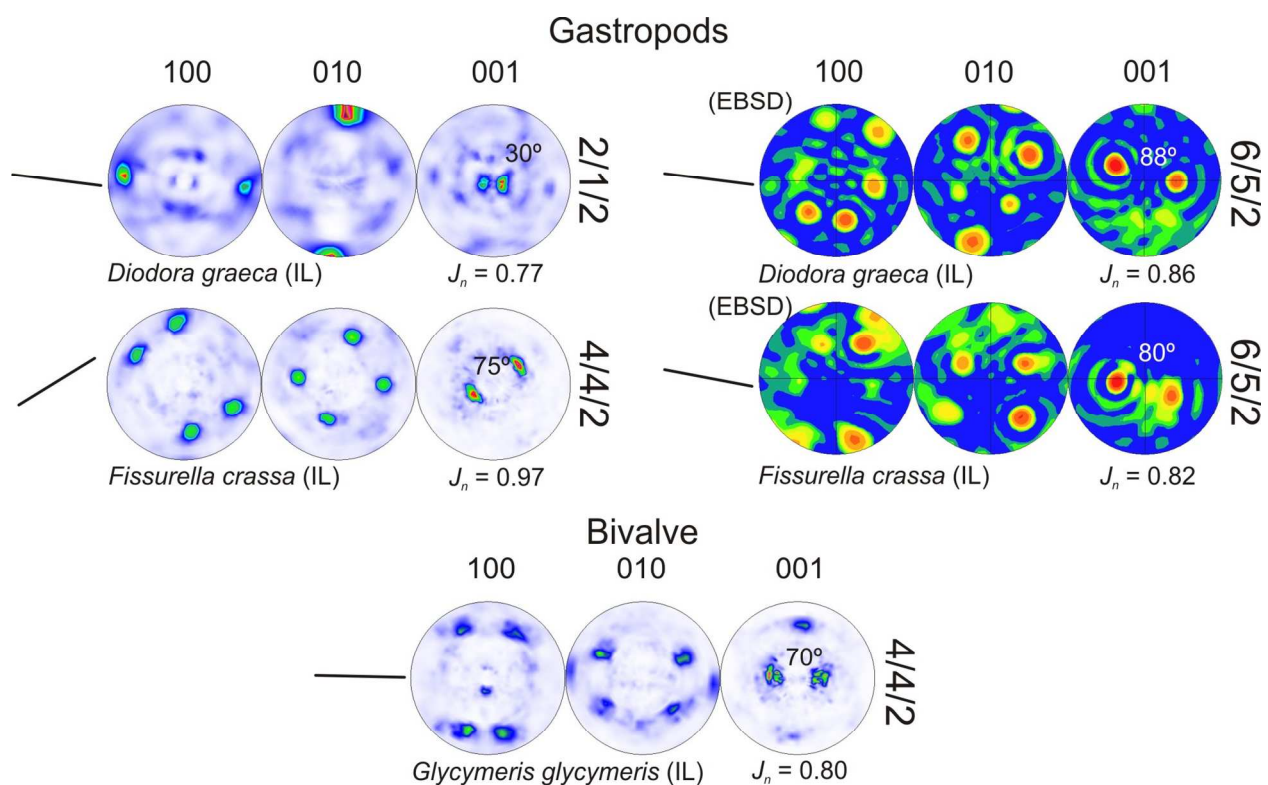


**Figure S4.** PFs of the molluscan species with  $\infty/\infty/1$  patterns (fiber texture). Bars on the left of PFs represent the orientation of the 1<sup>st</sup> OL.  $J_n$  is the texture index. All XRD data. EL = external layer; IL = internal layer.

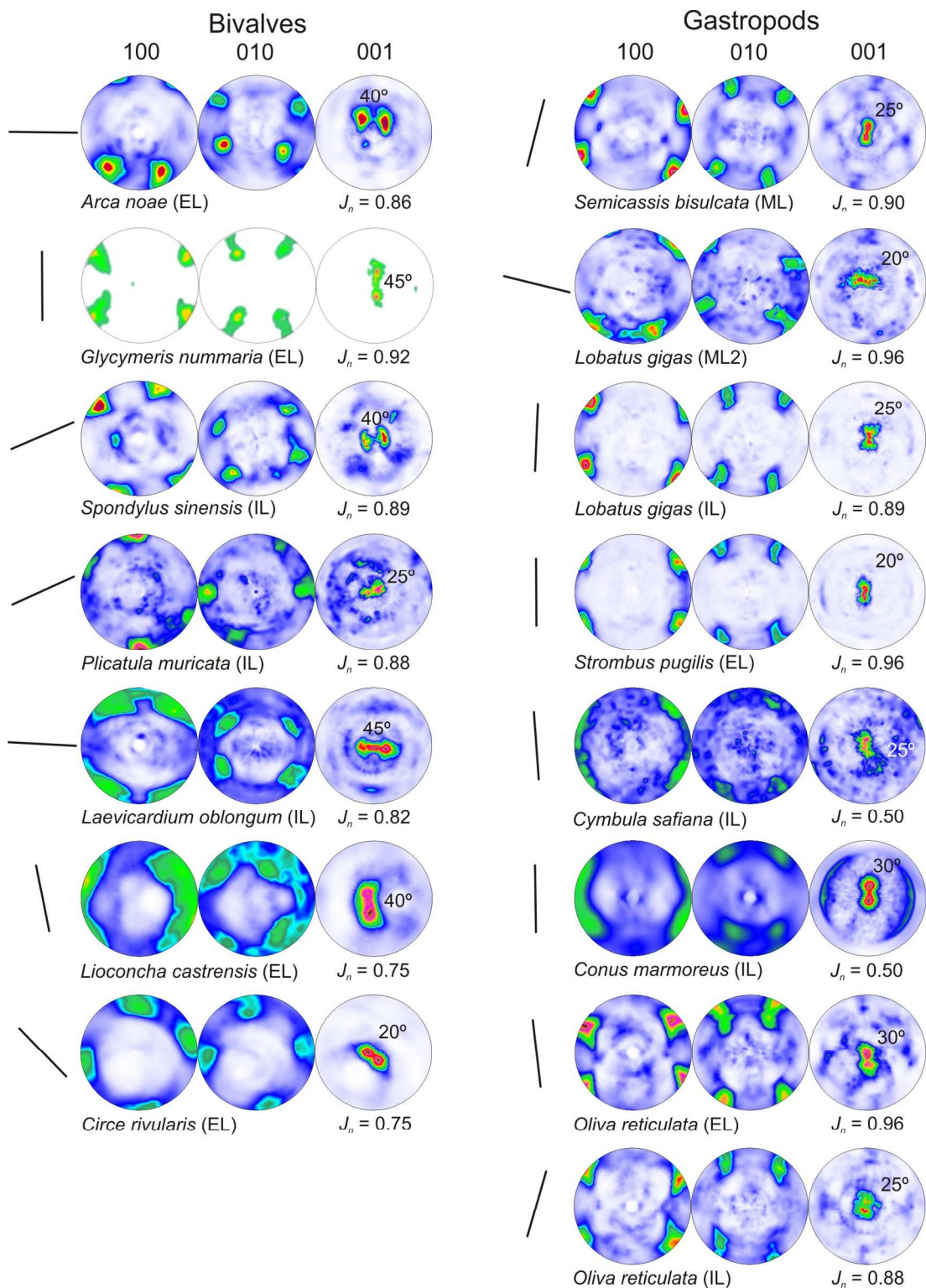


**Figure S5.** PFs of the molluscan species (all gastropods) with 1/2/2 and 5/6/2 patterns (indicated). Bars on the left of PFs represent the orientation of the 1<sup>st</sup> OL.  $J_n$  is the texture index. All XRD data. EL = external layer; IL = internal layer; ML = middle layer.

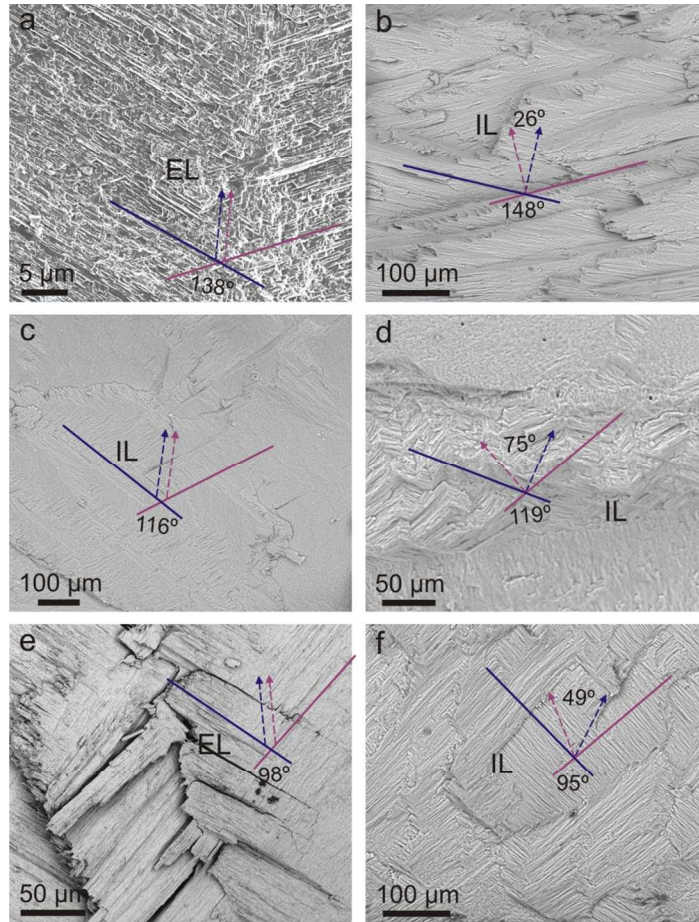




**Figure S6.** PFs of the molluscan species with 2/1/2, 6/5/2 and 4/4/2 patterns (indicated). Bars on the left of PFs represent the orientation of the 1<sup>st</sup> OL.  $J_n$  is the texture index. All XRD data, except when indicated. IL = internal layer.



**Figure S7.** PFs of the molluscan species with 2/4/2 patterns. Bars on the left of PFs represent the orientation of the 1<sup>st</sup> OL.  $J_n$  is the texture index. All XRD data. EL = external layer; IL = internal layer; ML = middle layer; ML2 = second middle layer.



**Figure S8.** SEM views of fractures parallel to the 1<sup>st</sup> OL of the species indicated with arrows in Figure 6. The superimposed sketches and numbers are the orientations of and angles between the 3<sup>rd</sup> OL of the adjacent 1<sup>st</sup> OL, as well as the orientation of and angles between the *c*-axes of the adjacent 1<sup>st</sup> OL. Colors indicate correspondence between the orientations of 3<sup>rd</sup> OL and *c*-axes. (a) *Tectus pyramis*. (b) *Cymbula safiana*. (c) *Corbula sinensis*. (d) *Fissurella crassa*. (e) Naticidae sp. (f) *Laevicardium oblongum*. EL = external layer; IL = internal layer.