

8. ESTUDIOS EXPERIMENTALES SOBRE GRANOS DE POLEN DE AMBROSIA CUMANENSIS H.B.K. DE EL SALVADOR

J.A. LAGOS¹, M. KEDVES², Á. PÁRDUTZ³, K. PRISKIN², D. TOMBÁ CZ² y A. HORVÁTH²

1. Col. Miramonte, Pje. N° 10, 3034, San Salvador, El Salvador, 2. Laboratorio de Biología celular y Micropaleontología evolutiva de la Universidad Szeged: Apartado Postal 993, H-6701 Szeged, Hungría, 3. Institute de Biofísica, Centro de Investigaciones Biológicas de la Academia Húngara de Ciencias H-6701, Apartado Postal 521, Szeged, Hungría

Resumen

Se investigaron granos de polen de *Ambrosia cumanensis*, secos, hidratados y parcialmente degradados, de acuerdo con el método LM; además, se empleó el método TEM, para investigar un material de polen, parcialmente degradado. Basados en los estudios con LM, se estableció que la esporopolenina de la ectexina es menos resistente en contraste con la de *Ambrosia artemisiifolia*; pero desde el punto de vista taxonómico, no se observaron alternaciones en la morfología general del material experimental estudiado con el método LM. El estudio con el método TEM, de los granos parcialmente degradados con 2-aminoetanol, reveló la fina estructura de los granos de polen. En las cámaras de aire de la exina del polen se observaron microorganismos. En la intina existen unidades electrónicas globulares densas de origen desconocido.

Palabras claves: Palinología Experimental, reciente, *Ambrosia cumanensis*, LM y TEM.

Introducción

Existe un gran número de granos de polen del género *Ambrosia* que presentan un grado extremo alergénico. En 1967 GRATER y STEMEN señalaron que entre los granos de polen alergénicos, el del ragweed (*Ambrosia*) ha sido el más investigado intensamente. La ubicación de las proteínas antigénicas y alergénicas en la intina fue establecida por KNOX, HESLOP-HARRISON (1970, 1971), KNOX, HESLOP-HARRISON y REED (1970).

LAGOS (1975) publicó el dibujo del grano de polen de *Ambrosia cumanensis* y, con relación a esta especie, enfatizó lo siguiente, p. 37: "La altamisa constituye una planta muy importante en el campo de las alergias". O'ROURKE (1996) indicó que el género *Ambrosia*, con 45 especies, es el aeroalergeno más importante en Norteamérica. Se ha discutido, en primer lugar, que dos ácido-proteínas constituyen los principales antígenos (E y K). Durante nuestros estudios, empleando el método TEM en granos de polen, parcialmente disueltos, de *Ambrosia artemisiifolia* L. se observaron cloroplastos en la intina (KEDVES y PÁRDUTZ, 2000). El complejo molecular observado en la superficie de las membranas tilakoides, pueden constituir los factores, directos o indirectos, del extremo efecto alergénico de los granos de polen de *Ambrosia* (ragweed).

Durante las operaciones de simetría, el pentágono regular de la unidad biopolímera de la ectexina, parcialmente degradada del polen del ragweed, se rotó un pentágono

exunidad biopolímera globular (KEDVES, PÁRDUTZ y MADARÁSZ, 2000), lo cual fue un paso importante para los estudios del esqueleto metaestable cuasi-cristaloide de la ectexina.

El propósito de este estudio es el siguiente:

1. Establecer las alteraciones de la morfología de los granos de polen de *Ambrosia cumanensis*, después de diferentes tipos de experimentos.
2. Publicar los primeros datos, aplicando el TEM, de los granos de polen, parcialmente degradados, de *Ambrosia cumanensis*.
3. Comparar los resultados más recientes, con los anteriormente publicados.

Materiales y Métodos

El material del polen fue colectado por el Dr. J.A. LAGOS en San Salvador, El Salvador.

Los estudios con LM se realizaron como sigue:

Se investigó el diámetro de los granos de polen y la solubilidad de la esporopolenina de la exina de los siguientes granos de polen.

Diámetros de los granos de polen sin experimento:

Experimento N° 1/7-1373: granos de polen frescos montados en gel de glicerina hidratada al 39.6%. La temperatura para experimentos adicionales fue de 30° grados centígrados.

Experimento N° 1/7-1374: 5mg de granos de polen fueron hidratados con 5 ml de agua destilada durante 24 horas. Se estudiaron granos de polen coloreados con azul de metileno y granos sin colorear.

Experimento N° 1/7-1375-1377: 5mg de granos de polen + 1ml de 2-aminoetanol fueron sometidos durante: 24 horas a 1375; 48 horas a 1376 y 72 horas a 1377.

Experimento N° 1/7-1378-1380: 5mg de granos de polen + 1 ml de 2-aminoetanol, como en los casos 1375-1377; pero, después de lavados, fueron oxidados con 10 ml de $KMnO_4$ al 0.01%, durante 24 horas.

Experimento N° 1/7-1381-1383: igual a los experimentos anteriores (1378-1380); pero, al final, se agregó 1 ml de mercaptoetanol durante 24 horas.

Fueron preparados granos de polen, parcialmente degradados, para las investigaciones con el microscopio electrónico de transmisión. La fijación fue con OsO_4 aq. dil. 1% embebido en araldita (Durcupan, Fluka). Los cortes ultrafinos fueron hechos con un ultramicrotomo Porter Blum, con cuchillas de cristal, en el Laboratorio Em del Departamento de Biofísica del Centro de Investigaciones de la Academia Húngara de Ciencias. Las fotos fueron tomadas con un Teşla BS-540 (resolución 6-7 Å) y no se retocaron. En este trabajo presentamos los resultados del experimento N : 1375.

En lo referente a la nomenclatura de la ultraestructura de la exina, se tomaron como base las publicaciones de: SKVARLA y LARSON (1965), SKVARLA y TURNER (1966), PAYNE y SKVARLA (1970), VASANTHY (1975), ROWLEY, DAHL y ROWLEY (1981) y ROWLEY, CLAUGHER y SKVARLA (1999).

Resultados

Resultados con LM.

La morfología básica de los granos de polen no ha alterado el punto de vista taxonómico (Láminas 8.1, fig. 1-16). Las alteraciones del diámetro de los granos de polen se resumen como sigue:

Diámetros	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0	27.5	30.0	µm	%
Granos de polen secos		2.5	21.5	49.0	23.5	3.5				
Experimento: 1/7-1373		4.0	50.5	40.75	4.75					
Experimento: 1/7-1374a			49.5	45.0	5.5					
Experimento: 1/7-1374b		6.0	46.0	38.5	9.5					
Experimento: 1/7-1375			29.5	47.0	23.5					
Experimento: 1/7-1376	0.5	4.5	27.0	32.0	21.5	8.0	5.0	1.5		
Experimento: 1/7-1377		14.0	43.0	35.5	7.5					

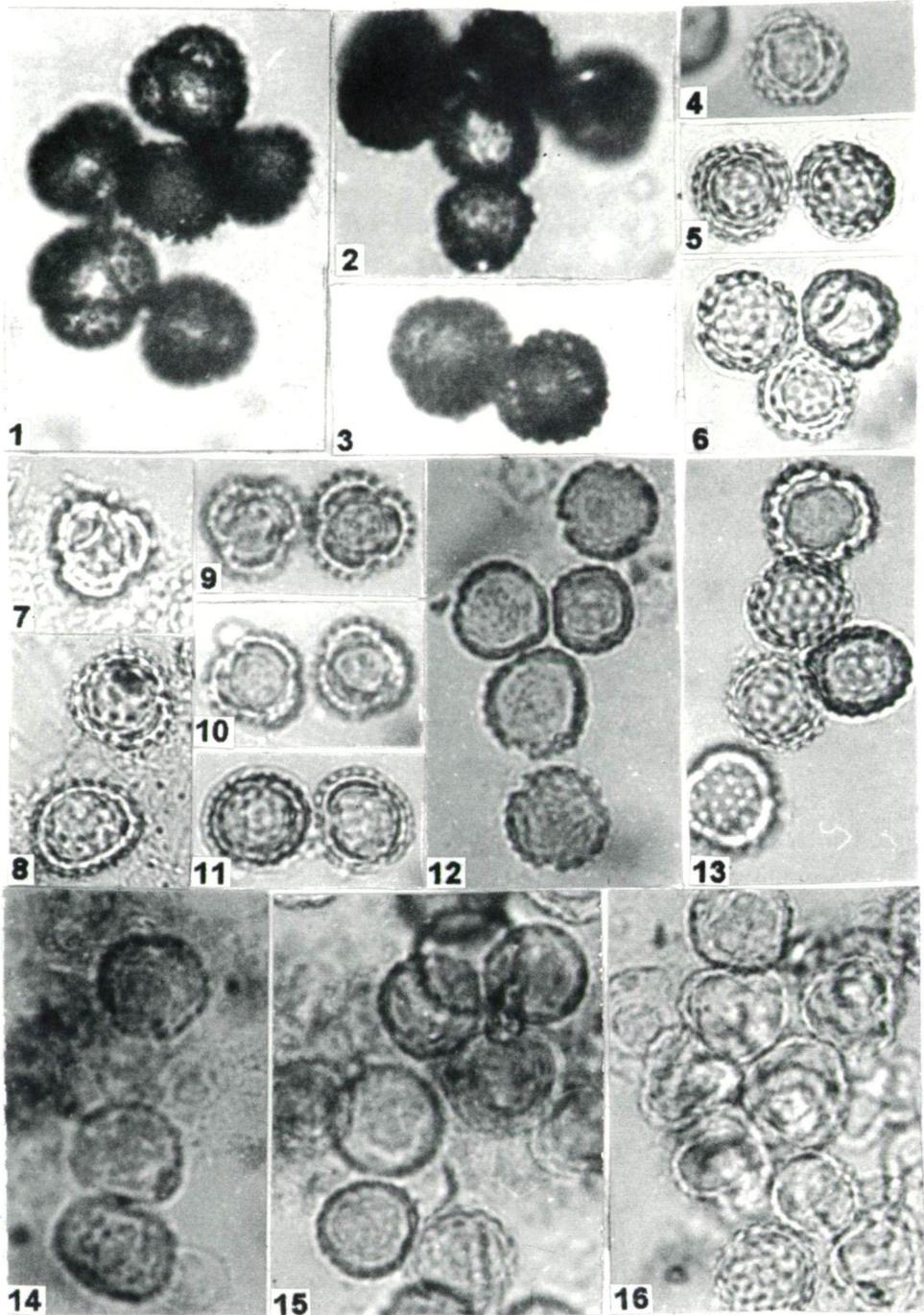


Lámina 8.1.

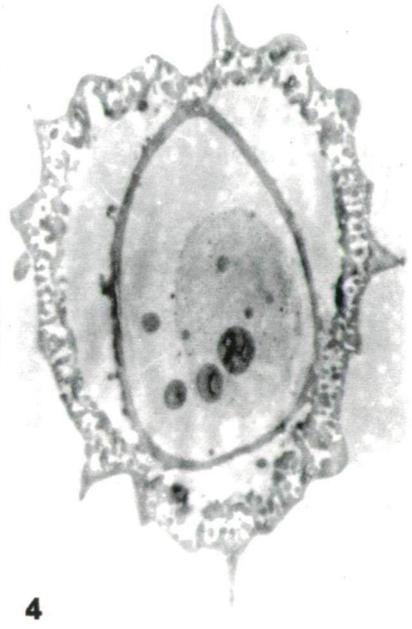
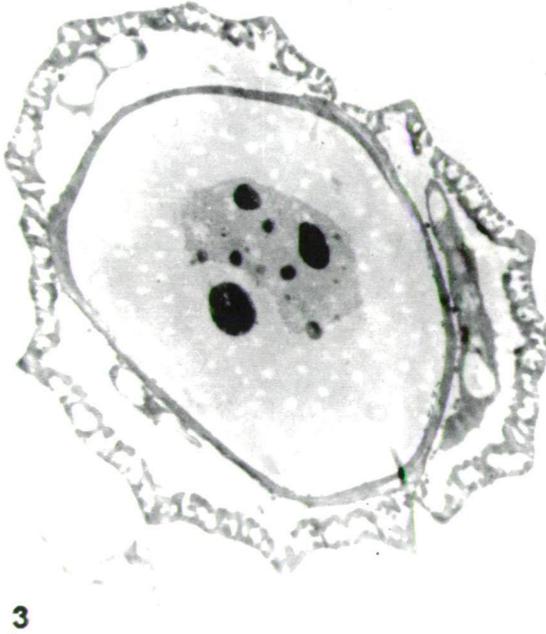
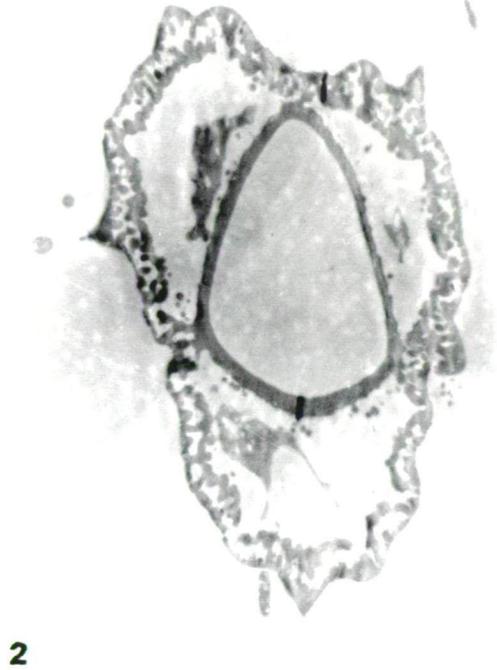
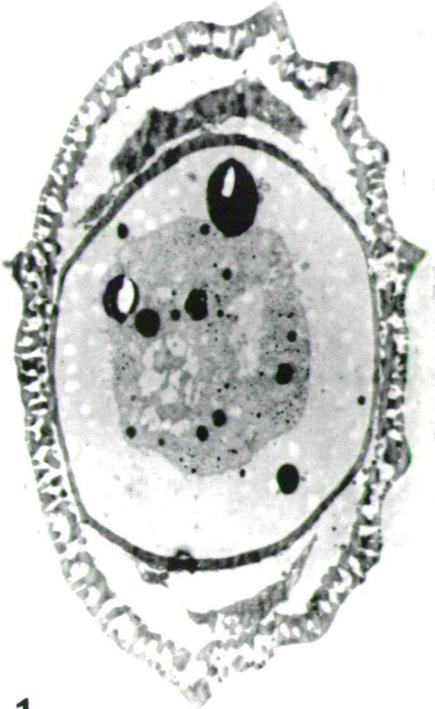


Lámina 8.2.

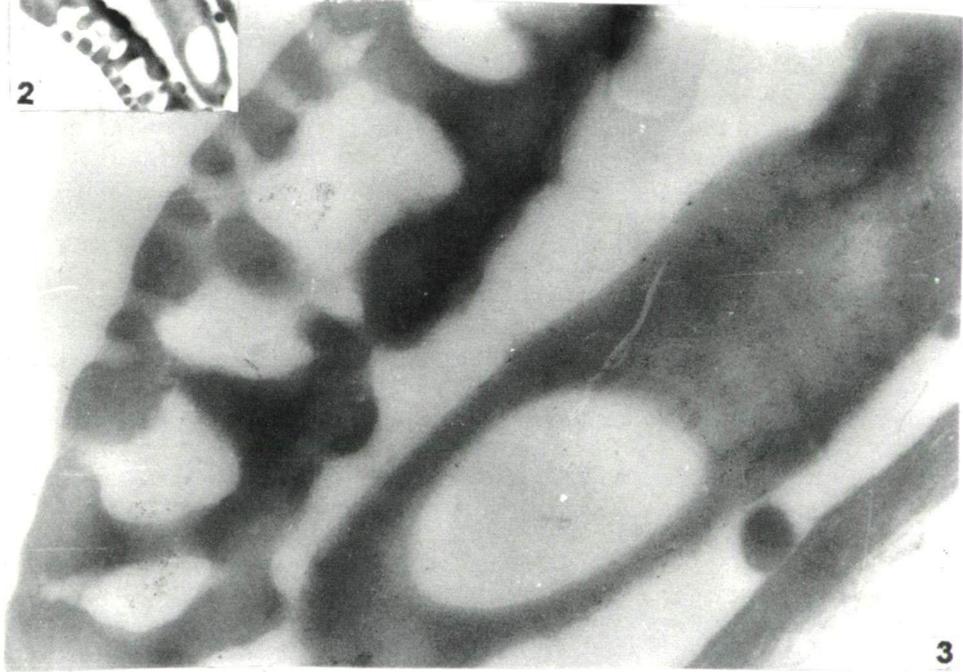
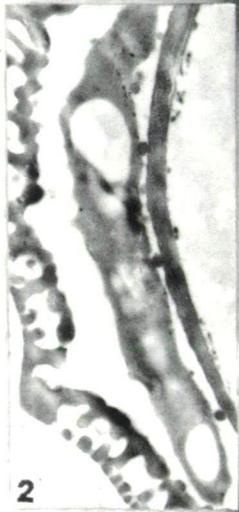


Lámina 8.3

Lámina 8.1.

Ambrosia cumanensis H.B.K., fotografías con microscopio óptico (LM), 1.000x.

- 1-3. Granos de polen secos.
4. Experimento N°: 1/7-1373a.
- 5, 6. Experimento N°: 1/7-1373b.
- 7-11. Experimento N°: 1/7-1374.
- 12, 13. Experimento N°: 1/7-1375.
14. Experimento N°: 1/7-1376.
- 15, 16. Experimento N°: 1/7-1377.

Lámina 8.2.

Ambrosia cumanensis H.B.K., fotografías con microscopio electrónico de transmisión (TEM) de granos de polen parcialmente degradados. Experimento N°: 1375.

- 1-4. Resumen general: fotografías de la ultraestructura de los granos de polen. 1. Negativo N°: 8333, 4500x, 2. Negativo N°: 8344, 4.500x, 3. Negativo N°: 8342, 4.500x, 4. Negativo N°: 8343, 4.500x.

Lámina 8.3.

Ambrosia cumanensis H.B.K. fotografías con microscopio electrónico de transmisión (TEM) de granos de polen parcialmente degradados. Experimento N°: 1375.

1. Foto altamente aumentada de la escultura equinada del grano de polen. Negativo N°: 8337, 50.000x.
2. Foto que muestra el aspecto general de la ectexina del grano de polen, con microorganismos en la cámara del aire. Negativo N°: 8329, 85.000x.
3. Foto altamente aumentada del área inter-apertural que muestra el tectum perforado, el estrato columelar infratectal y el estrato de la base. Se observa bien una parte de la ultraestructura del microorganismo, un gránulo denso electrónico, en la cámara de aire, y la intina.

Resultados con TEM (Láminas 8.2. y 3.)

El examen general de las fotografías de los granos de polen (Lámina 8.2., fig. 1-4), muestra: la ectexina tectada, porforada y con espinas; el estrato de columelas infratectales; las cámaras de aire y el estrato de la base (Lámina 8.2., fig. 1-4). Los gránulos densos electrónicos no son frecuentes en el estrato infratectal (Lámina 8.2., fig. 2,3). La intina está hinchada. Algunas veces se observan gránulos densos electrónicos, de diferentes tamaños, en este estrato. Se han observado en el núcleo y en el protoplasma unidades de gránulos densos electrónicos (Lámina 8.2., fig. 1). Las fotografías con gran aumento muestran, muy bien, el tectum perforado, el estrato columelar infratectal y el estrato de la base (Lámina 8.3., fig. 3). Los microorganismos en las cámaras de aire se observan bien en la lámina 8.3., fig. 2-3. La fina estructura espinosa se distingue bien en la lámina 8.3., fig. 1.

Discusión y Conclusiones

1. La esporopolenina de la ectexina de *Ambrosia cumanensis*, es menos resistente comparada con la de *Ambrosia artemisiifolia* L. (KEDVES, PÁRDUTZ y HORVÁTH en proceso de publicación). Esto puede ser consecuencia de factores taxonómicos, ecológicos y ontogenéticos. La alteración molecular de la esporopolenina fue establecida hace mucho tiempo.

2. Vale la pena mencionar la estabilidad morfológica de nuestro material investigado con el microscopio óptico (LM).

3. Al comparar los presentes datos obtenidos con el microscopio electrónico de transmisión (TEM), con el mismo experimento de *Ambrosia artemisiifolia*, podemos señalar las similitudes en la estratificación de la ectexina, pero los gránulos densos electrónicos, no son tan frecuentes como en el estrato infratectal de *A. artemisiifolia*.

4. El microorganismo observado en la cámara de aire no es muy frecuente, pero interesante, y, probablemente, puede contribuir a la acción alérgica de este grano de polen.

Reconocimiento

Este trabajo fue patrocinado por la Grant OTKA T 031715

Referencias

- GRATER, W.C. and STEMEN, T.R. (1967): The plant, the pollen and the patient. - *Rev. Palaeobot. Palynol.* 4, 187-192.
- KEDVES, M. and PÁRDUTZ, Á. (2000): Chloroplast thylakoid membranes in the intine of ragweed pollen grains as a possible constituent in the biosynthesis of its extreme allergenic antigens. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)* 12, 87-92.
- KEDVES, M., PÁRDUTZ, Á. and HORVÁTH, A. (2002): Transmission electron microscopy of partially degraded pollen grains of *Ambrosia artemisiifolia* L. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)*, 14, 49-58.
- KEDVES, M., PÁRDUTZ, Á. and MADARÁSZ, M. (2000): New data on the molecular symmetry and organization of the quasi-crystalloid skeleton of the sporoderm. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)* 11, 184-192.
- KNOX, R.B. and HESLOP-HARRISON, J. (1970): Pollen-wall proteins: localization and enzymatic activity. - *J. Cell. Sci.* 6, 1-17.
- KNOX, R.B. and HESLOP-HARRISON, J. (1971): Pollen-wall proteins localisation of antigenic and allergenic proteins in the pollen grain walls of *Ambrosia* ssp. (ragweeds). - *Cytobios* 4, 49-54.
- KNOX, R.B., HESLOP-HARRISON, J. and REED, C. (1970): Localisation of antigens associated with the pollen wall immunofluorescence. - *Nature* 225, 1066-1068.
- LAGOS, J.A. (1975): Pólenes Anemófilos de El Salvador. - Ed. Universitaria, San Salvador, El Salvador.
- O'ROURKE, M.K. (1996): New Frontiers in Palynology 23F - Medical Palynology. In: Palynology, principles and applications, eds.: JANSONIUS J. and MCGREGOR, D.C. - A.A.S.P. Foundation Publ. Press, Salt Lake City, Utah 3, 945-955.
- PAYNE, W.W. and SKVARLA, J.J. (1970): Electron microscope study of *Ambrosia* pollen. - *Grana* 10, 89-100.
- SKVARLA, J.J. and LARSON, D.A. (1965): An electron microscopic study of pollen morphology in the Compositae with special reference to the Ambrosiae. - *Grana Palynol.* 6, 210-269.
- SKVARLA, J.J. and TURNER, B.L. (1966): Systematic implications from electron microscopic studies of Compositae pollen - A review. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 53, 220-244.
- ROWLEY, J.R., CLAUGHER, D. and SKVARLA, J.J. (1999): Structure of the Exine in *Artemisia vulgaris* (Asteraceae): A Review. - *Taiwania* 44, 1-21.
- ROWLEY, J.R., DAHL, A.O. and ROWLEY, J.S. (1981): Substructure in exines of *Artemisia vulgaris* (Asteraceae). - *Rev. Paleobot. Palynol.* 35, 1-38.
- VASANTHY, G. (1975): Structure et nomenclature de la paroi sporopollinique: Asteraceae. - APLF Documents pour la réunion de Groupe de travail Morphologie sporopollinique et nomenclature, Paris, 6-7 Octobre 1975, 44-46.