

#### 4. INVESTIGACIONES SOBRE EL EFECTO DE LA SOLUCION DE C60 FULLERENO/BENZOL EN LAS ESPORAS DE ALSOPHILA SALVINII HOOK. REALIZADAS CON LOS MICROSCOPIOS OPTICO Y ELECTRONICO DE TRANSMISION

J.A. LAGOS<sub>1</sub>, M. KEDVES<sub>2</sub>, Á. PÁRDUTZ<sub>3</sub>, D. JACSÓ<sub>2</sub>, L. JACSÓ<sub>2</sub>, O. BÉRES<sub>2</sub>,  
Á. FARKAS<sub>2</sub> y B. VARGA<sub>2</sub>

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 de la Academia Húngara de Ciencias H-6701, Apartado Postal 521, Szeged, Hungría.

#### Resumen

Esporas de *Alsophila salvinii* fueron tratadas con una solución de C60 fullereno/benzol durante 1 a 6 días y, con mercaptoetanol, por 2 días, para luego ser investigadas con los microscopios óptico y electrónico de transmisión. Por medio del microscopio óptico se estudiaron las variedades de formas y el diámetro de las esporas. La ultraestructura de la pared consiste en una ectexina muy gruesa y una perispora delgada. Se observó acumulación de fullereno, especialmente, en la parte externa de la pared.

*Palabras clave:* Palinología Experimental, reciente, *Alsophila salvinii*, MO, MET.

#### Introducción

Nuestros primeros resultados experimentales en torno a las esporas de *Alsophila salvinii* ya fueron publicadas (LAGOS et al., 2003). Previamente se estableció la estructura biopolímera altamente organizada que puede ser modelada con fullereno (KEDVES, ROJIK y VÉR, 1991, KEDVES y ROJIK, 1994, etc.). La importancia de los estudios con la solución de fullereno/benzol, en las investigaciones de la organización biopolímera de la pared de las esporas y de los pólenes fue enfatizada en 1996 (KEDVES). Los primeros datos obtenidos con el MET, en paredes parcialmente degradadas de *Botryococcus braunii* KÜTZ., aisladas de Húngara Alginito, fueron publicadas por KEDVES y FREY (2002). A continuación se estudiaron los granos de polen de *Taxus baccata*, así como operaciones de simetría en las estructuras biopolímeras que se describieron con la aplicación del nuevo método (KEDVES et al., 2003).

Existen diferentes tipos de estudios experimentales sobre la resistencia y estructura biopolímera de la pared de las esporas (KEDVES, 1990, COLLINSON, HEMSLEY y TAYLOR, 1993) y ya se han publicado los resultados. Hay numerosas publicaciones con respecto a la ultraestructura de las esporas de las Pteridófitas: LUGARDON (1965, 1972, 1974, 1975, 1976, 1980, 1981, 1986, 1992a,b), LUGARDON y HUSSON, (1982), LUGARDON y PIQUEMAL (1993), GIUDICE y MORBELLI (1988), DETTMANN y CLIFFORD (1991), VAN KONIJNENBURG-VAN CITTERT y KURMANN, (1994), etc.

TRYON y LUGARDON (1991) han publicado, conjuntamente, monografías de las esporas de las pteridófitas incluyendo su ultraestructura. En la pared de las esporas de *A. bryophila* TRYON, fue descrita una períspora triestratificada. En lo referente a las observaciones de los elementos ornamentales de la parte externa de la pared, se usaron los siguientes trabajos: VAN CAMPO (1957), KRUTZSCH (1959), KREMP (1965), RUEDA-GAXIOLA (1969), PUNT, BLACKMORE, NILSSON y LE THOMAS (1994).

El objetivo de nuestros estudios combinados, es obtener los primeros resultados relacionados con el efecto de la degradación parcial, incluyendo la solución de C60 fullereno/benzol, sobre la morfología y ultraestructura de la pared de las esporas.

### Materiales y Metodos

El material de experimentación fueron 2 mg de esporas secas; para cada experimento fueron agregados 6 ml de mercaptoetanol, por 48 horas. Después de lavar las esporas con agua destilada, fueron secadas. Se agregaron 5 ml de una solución de C60 fullereno/benzol y 5 ml de benzol. Se sometieron a una temperatura de 30° C durante un espacio de tiempo de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días (Experimento No.: T-12-312-317). Las esporas, después del tratamiento con la solución de C60 fullereno/benzol, fueron lavadas con benzol y, luego, secadas. Para los estudios con el microscopio óptico, las esporas fueron montadas en gel de glicerina hidratada al 39.6% (cf. LOBREAU, 1966). Para las investigaciones de la ultraestructura, las esporas secas fueron embebidas en Araldita. Los cortes ultrafinos fueron hechos con un ultramicrotomo Porter Blum con cuchillas de cristal, en el Laboratorio de Biología Celular y Micropaleontología Evolutiva de la Universidad de Szeged. Las microfotografías con el MET, fueron tomadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Biofísica del Centro de Investigaciones Biológicas de la Academia de Ciencias de Hungría, con un equipo Tesla BS 540, con una resolución aproximada de 6 - 7 Å y un Zeiss Opton EM - 902, con una resolución de 2-3 Å. Ninguna fotografía fue retocada.

### Resultados

Resultados con el microscopio óptico (Lámina 4.1., figs. 1-12)

Los datos cualitativos con el microscopio óptico son, aproximadamente, idénticos. No se observaron alteraciones características en la estructura de la pared y en los organelos del protoplasma. Se distinguen muy bien los característicos elementos granulares del protoplasma.

Los datos cuantitativos se resumen como sigue:

A - Diametro de las esporas en posición polar

Numero del experimento	Tamaño (µm %)								Tamaño dominante (µm %)	Promedio (µm %)
	22.5	25.0	27.5	30.0	32.5	35.0	37.5	40.0		
T-12-312		6.0	17.5	28.0	38.0	10.0	0.5		38.0	21.70
T-12-313	0.5	7.0	18.0	28.0	35.5	9.5	1.5		35.5	30.64
T-12-314		5.5	33.5	34.0	19.5	7.5			34.0	29.75
T-12-315	2.0	6.5	26.5	31.0	23.0	10.5	0.5		31.0	28.39
T-12-316		5.5	12.5	14.5	22.0	24.5	20.0	1.0	24.5	32.79
T-12-317			0.5	3.5	16.0	38.0	35.5	6.5	38.0	35.60

En el diámetro de las esporas se pueden observar interesantes alteraciones. Existe un aumento importante entre el primero y segundo experimento, con respecto al que hubo entre el quinto(5th) y el último(6th) experimento. Es muy significativa la diferencia de los valores promedios del primer experimento: 21.7µm y del ultimo: 35.6µm.

B - Variedad de formas

	triangular	convexa	concava	polar triplanoide	triplana	ecuatorial	monoleta	%
T-12-312	4.0	22.5	5.0	52.5	1.0	15.0		
T-12-313	2.5	10.0	12.0	70.0		5.5		
T-12-314	1.5	2.5	19.0	66.5	10.0	0.5		
T-12-315	1.0	2.0	19.0	51.5	25.5	1.0		
T-12-316	2.5		11.5	50.0	34.0	1.5	0.5	
T-12-317	2.0		17.0	44.0	35.5	1.5		

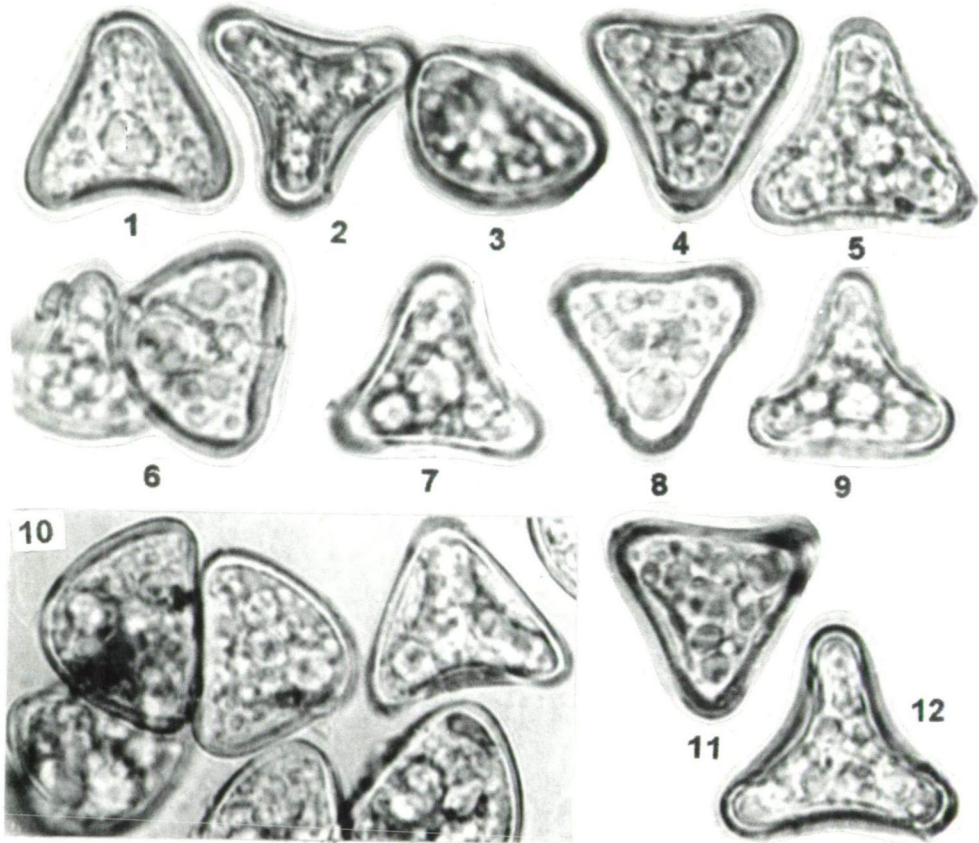


Lámina 4.1.

*Alsophila salvinii* HOOKER: microfotografía de las esporas tomadas con microscopio óptico, después de los experimentos.

Aumento: 1.000x.

1-3. Experimento No.: T-12-312.

4,5. Experimento No.: T-12-313.

6,7. Experimento No.: T-12-314.

8,9. Experimento No.: T-12-315.

10. Experimento No.: T-12-316.

11,12. Experimento No.: T-12-317.

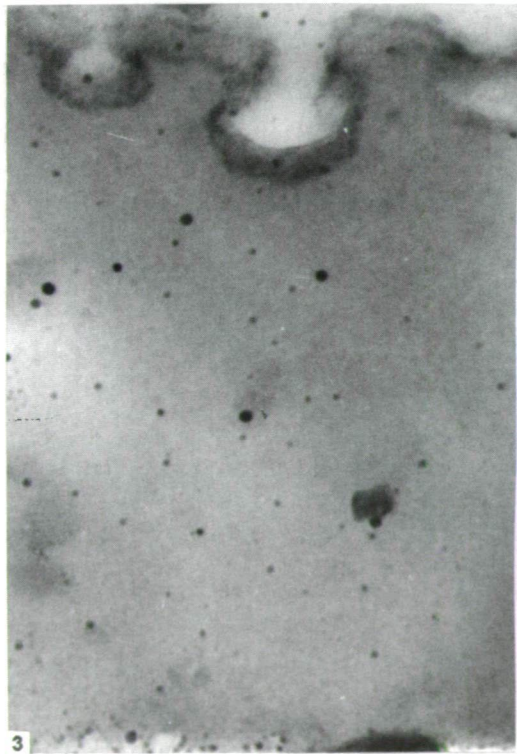
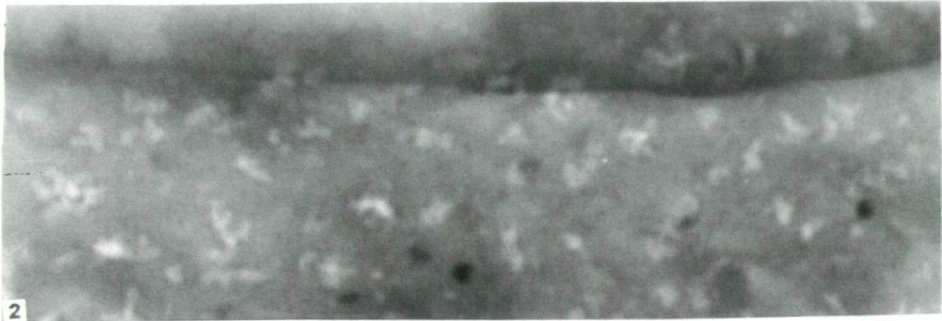
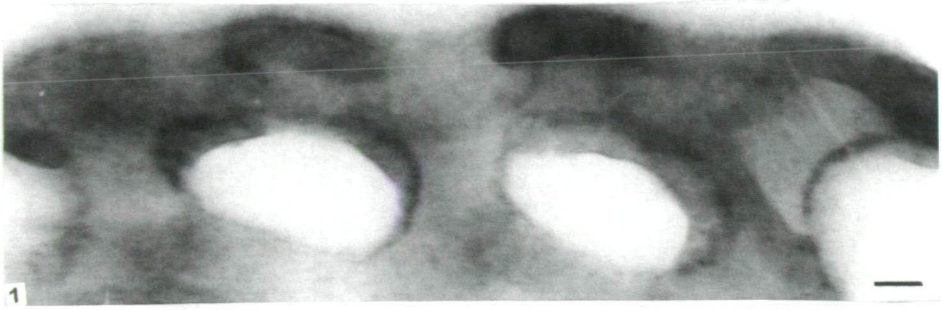


Lámina 4.2.

Lámina 4.2.

*Alsophila salvinii* HOOKER: ultraestructura de la pared de las esporas, después del experimento.

1,2. Experimento No.: T-12-312. 1. Negativo No.: 10198. 2. Negativo No.: 10201.

3,4. Experimento No.: T-12-313. 3. Negativo No.: 10184. 4. Negativo No.: 10184.

5. Experimento No.: T-12-314. Negativo No.: 10174.

Escala: 0.1  $\mu\text{m}$ .

---

Basados en los datos cuantitativos de las diferentes formas, podemos enfatizar lo siguiente:

- 1 - En el primer experimento la forma convexa ocurre en considerable cantidad y un número significativo de esporas se encuentran en posición ecuatorial. Esa característica disminuye en el segundo experimento y, en los últimos, son nulas o se observan en pequeños porcentajes.

La forma dominante es la triplanoide, con gran número de formas triplanas y cóncavas.

Resultados con el microscopio electrónico de transmisión (Lámina 4.2., figs. 1-5, Lámina 4.3., figs. 1-8, Lámina 4.4., figs. 1-5)

En general se pueden confirmar los siguientes resultados:

- 1 - La gruesa exóspora es resistente; en la parte más externa de la oscura y pequeña pared de la espora, con toda probabilidad, está presente una períspora.
- 2 - La períspora y la región marginal de las fóveas son electrónicamente densas. Esta densidad electrónica puede ser a consecuencia de la impregnación de fullereno.

De acuerdo con los detalles observados, es importante mencionar los siguientes resultados:

- 1 - En el primer experimento (Lámina 4.2., figs. 1,2) se advierte muy bien la característica diferencial por la impregnación del fullereno, fig. 1. En la pared compacta original de la exóspora existen, más o menos, agujeros luminosos algo irregulares (fig. 2). Esto puede ser secundario, probablemente una parte del fullereno no actuó durante el tiempo, relativamente corto, del experimento y esta reacción ocurrió durante las investigaciones con el MET.
- 2 - En el segundo experimento se observaron gránulos oscuros globulares en la exóspora (Lámina 4.2., figs. 3,4). En este experimento está bien ilustrada la ultraestructura característica de la fóvea. La parte interna de la fóvea es más oscura que la región externa y, particularmente, en la fotografía 4, se pueden observar unidades biopolímeras altamente organizadas.
- 3 - En los últimos experimentos, usando el instrumental del MET, no se observaron más alteraciones importantes (Lámina 4.2., fig. 5, lámina 4.3., figs. 1-8, lámina 4.4., figs. 1-5). La homogénea exóspora está bien mostrada en la fotografía 8 de la lámina 4.3 y en las otras fotos se muestran los elementos ornamentales en diferente posición.

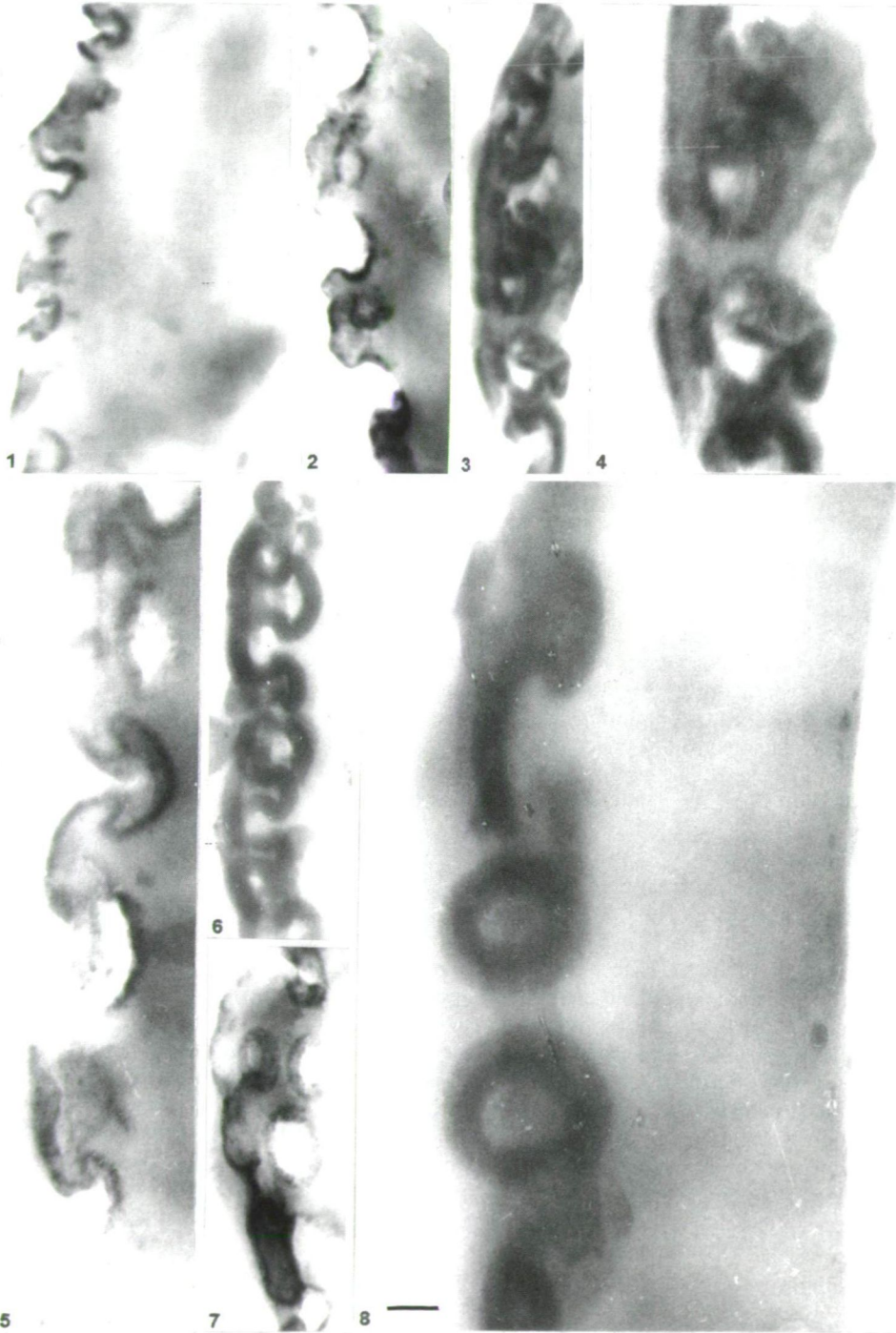


Lámina 4.3.

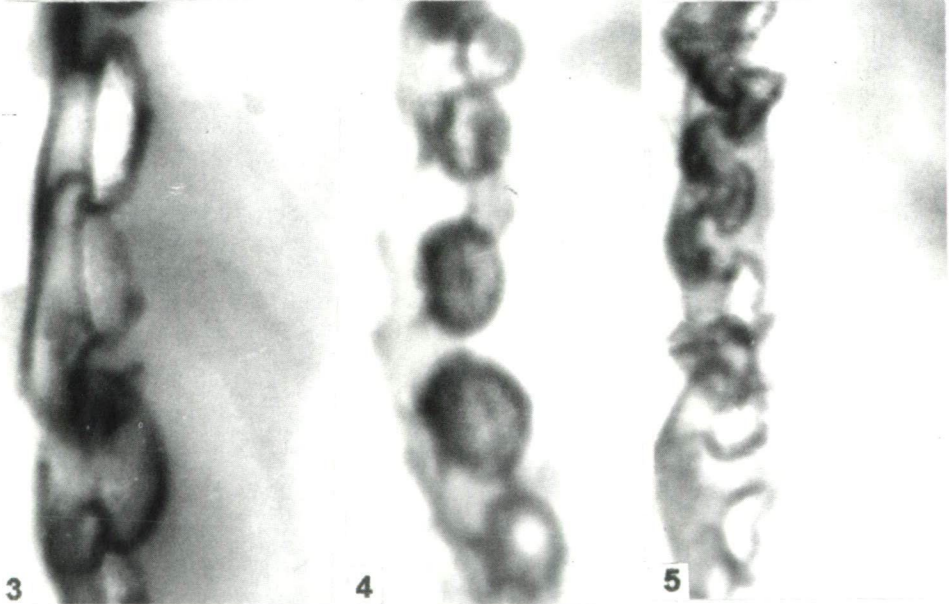
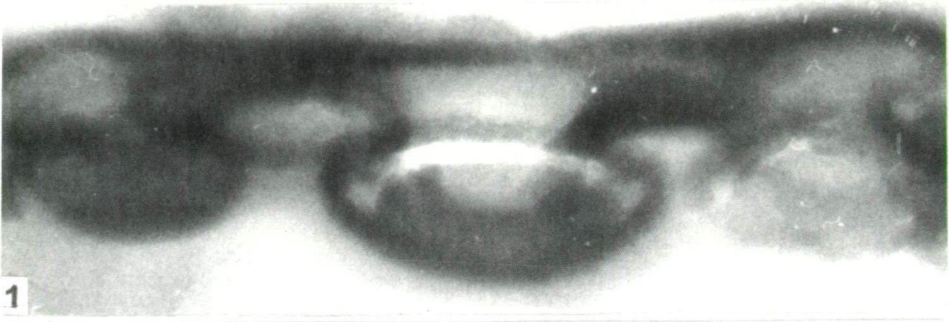


Lámina 4.4.

#### Lámina 4.3.

*Alsophila salvinii* HOOKER: ultraestructura de la pared de las esporas, después del experimento.

1,2. Experimento No.: T-12-314. 1. Negativo No.: 10173. 2. Negativo No.: 10177.

3,4. Experimento No.: T-12-314. 3. Negativo No.: 10231. 4. Negativo No.: 10231.

5-7. Experimento No.: T-12-316. 5. Negativo No.: 10265. 6. Negativo No.: 10266. 7. Negativo No.: 10264.

8. Experimento No.: T-12-317. Negativo No.: 10272.

Escala: figs. 1-3, 6,7: 0.2  $\mu\text{m}$ , figs. 4,8: 0.1  $\mu\text{m}$ .

#### Lámina 4.4.

*Alsophila salvinii* HOOKER: ultraestructura de la pared de las esporas, después del experimento.

1-5. Experimento No.: T-12-317. 1. Negativo No.: 10268. 2. Negativo No.: 10275. 3. Negativo No.: 10269.

4. Negativo No.: 10769. 5. Negativo No.: 10270.

Aumento: figs. 1. y 2.: 100.000x, figs. 3-5. 50.000x.

---

### Discusion y Conclusiones

- 1 - En nuestros primeros experimentos realizados con esporas de pteridófitas, se varió que se puede usar la solución de C60 fullereno/benzol, para la degradación parcial de la pared de las esporas. Obtuvimos resultados satisfactorios sin el uso del  $\text{OsO}_4$  en la postfijación. La aceptación diferenciada del fullereno en la parte más externa de la pared de la espора, confirmó que este método puede ser útil para establecer diferencias en el sistema molecular.
- 2 - Los instrumentos del MET, de alta resolución, se usarán para la ultraestructura de la parte más externa de la pared, con la esperanza de encontrar estructuras biopolímeras.
- 3 - Con base en los resultados del microscopio óptico, será interesante estudiar, también, la ultraestructura del protoplasma de las esporas.
- 4 - Las monografías de TRYON y LUGARDON (1991) son de mucha utilidad e importantes para la interpretación de los datos del microscopio electrónico de las esporas recientes y fósiles.
  - 4.1 - La ultraestructura de *Alsophila bryophila* TRYON, es diferente de nuestra especie porque su períspora es triestratificada.
  - 4.2 - TRYON y LUGARDON (1991) publicaron similares resultados con el MET, de las siguientes especies: *Sphaeropteris lockwoodiana*, *S. elongata*, *S. myosuroides*, *Trichipteris costaricensis* y *T. schiedeana*.

En resumen, los primeros datos experimentales de las esporas de *Alsophila salvinii* fueron exitosos. En el futuro trataremos de obtener datos ultraestructurales del sistema biopolímero de la pared de las esporas.

Es probable que los resultados con la períspora sean similares a los nuestros obtenidos con las esporas de *Selaginella bellula* MOORE (KEDVES, 1990).

### Agradecimiento

Estos trabajos fueron patrocinados por la Grant OTKA T 31715.

### Referencias

- COLLINSON, M., HEMSLEY, A.R. and TAYLOR, W.A. (1993): Sporopollenin exhibiting colloidal organization in spore wall. - Grana 1993, Suppl. 1, 31-39.
- DETTMANN, M.E. and CLIFFORD, H.T. (1991): Spore morphology of *Anemia*, *Mohria* and *Ceratopteris* (Filicales). - Amer. J. Bot. 78, 303-325.



- GIUDICE, G.E. y MORBELLI, M.A. (1988): Analisis palinologico de las especies del genero *Adiantum* L. (Adiantaceae - Pteridophyta) del Noroeste de Argentina. Parte I. Escultura y estructura. - *Pollen et Spores* 30, 297-312.
- KEDVES, M. (1990): Experimental investigations on recent *Selaginella* spores. - *Taiwania* 35, 240-252.
- KEDVES, M. (1996): Biopolimer strukturák szimmetriája. In: Szimmetria-aszimmetria. Megközelítések, értelmezések. Ed.: BALOGH, T. - MTA, SZAB, Szeged, 7-18.
- KEDVES, M., BÉRES, O., JACSÓ, D., KOCSICSKA, I. and VARGA, B. (2003): Symmetry operations on the C60 fullerene/benzol solution revealed biopolymer structures. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)* 15, 93-95.
- KEDVES, M. and FREY, K. (2002): C60 fullerene/benzol solution as an agent of partial degradation of *Botryococcus braunii* KÜTZ. colonied from Hungarian Alginite. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)* 14, 92-94.
- KEDVES, M. and ROIK, I. (1994): Buckminsterfullerene-like biopolymer units from the exine of *Thalictrum flavum* L. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)* 5, 58-66.
- KEDVES, M., ROIK, I. and VÉR, A. (1991): Biopolymer organization of the partially degraded oil shale with the fragmentation method. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)* 1, 28-31.
- KREMP, G.O.W. (1965): Morphologic Encyclopedia of Palynology. An International Collection of Definitions and Illustrations of Spores and Pollen. - The University of Arizona Press, Tucson.
- KRUTZSCH, W. (1959): Mikropaläontologische (sporenpaläontologische) Untersuchungen in der Braunkohle des Geiseltales. - *Geologie* 8, BH 21/22, 1-425.
- LAGOS, J.A., KEDVES, M., MADARÁSZ, M. y BÉRES, O. (2003): Investigaciones experimentales de las esporas de *Alsophila salvinii* HOOKER. - *Plant Cell Biology and Development (Szeged)* 15, 13-19.
- LOBREAU, D. (1966): Variations polliniques liées à la composition de la gélatine glycéricée. - *Pollen et Spores* 8, 229-236.
- LUGARDON, B. (1965): Structure des parois de la spore de *Blechnum spicant* (L.) ROTH. - *Pollen et Spores* 7, 409-428.
- LUGARDON, B. (1972): La structure fine de l'exospore et de la périspore des Filicinées isosporées I. - Généralités, Eusporangiées et Osmundales. - *Pollen et Spores* 14, 227-261.
- LUGARDON, B. (1974): La structure fine de l'exospore et de la périspore des Filicinées isosporées II. Filicales. Commentaires. - *Pollen et Spores* 16, 161-226.
- LUGARDON, B. (1975): Sur le sporoderme des isosporés et microspores des Ptéridophytes, et sur la terminologie appliquée à ses parois. - *Soc. bot. Fr., Coll. Palynologie*, 155-165.
- LUGARDON, B. (1976): Sur la structure fine de l'exospore dans les divers groupes de Ptéridophytes actuelles (microspores et isosporés). - *Linnean Society Symposium Ser. 1*, 231-150.
- LUGARDON, B. (1980): TEM observations on the sporoderm of Hymenophyllaceae and Hymenophyllopsidaceae. - 5 Int. Palynol. Conf. Cambridge, Abstracts, 236.
- LUGARDON, B. (1981): Les globules des Filicinées homologues des corps d'Ubisch des Spermatophytes. - *Pollen et Spores* 23, 93-124.
- LUGARDON, B. (1986): Données ultrastructurales sur la fonction de l'exospore chez Ptéridophytes (Ultrastructural data of the exospore function in pteridophyte spores.). - In: BLACKMORE, S. and FERGUSON, I.K.: *Pollen et Spores - Form and Function* (Linn. Soc. Ser. 12), Academic Press, 251-264.
- LUGARDON, B. (1992a): Données d'ontogénie comparée entre exospore des Ptéridophytes et entre des Gymnospermes: Microsporogenesis chez *Chamaecyparis lawsoniana*. - 8th Int. Palynol. Congr. Aix-en-Provence, Program and Abstracts, 89.
- LUGARDON, B. (1992b): Ultrastructure des parois sporales et relation phylétiques chez les Ptéridophytes. - 9 Simposio de Palinologia A.P.L.E. resúmenes, Las Palmas de Gran Canaria, 14, 15.
- LUGARDON, B. et HUSSON, P. (1982): Ultrastructure exosporale et caractères généraux du sporoderme dans les microspores et les mégasporés des Hydroptéridées. - *C.R. Acad. Sc. Paris*, 294, 789-794.
- LUGARDON, B. et PIQUEMAL, P. (1993): Ultrastructure exosporale et phylogénie chez les Pteridophytes. - *Gaussenia* 8, 16-24.
- PUNT, W., BLACKMORE, S., NILSSON, S. and LE THOMAS, A. (1994): Glossary of Pollen and Spore Terminology. - LPP Contr. Ser. 1, LPP Foundation, Utrecht.
- RUEDA-GAXIOLA, J. (1969): Una nueva clasificación morfológico-sistémica para polenosporas fosiles, nomenclatura y parataxonomía. - *Inst. Mexicano del Petróleo, Publ. No. 69 AG/048*.
- TRYON, A.E. and LUGARDON, B. (1991): Spores of the Pteridophyta Surface, Wall Structure, and Diversity Based on Electron Microscope Studies. - Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona.
- VAN CAMPO, M. (1957): Palynologie africaine I. - *Bull. de l'I.F.A.N.* 19, A, 659-678.
- VAN KONJENBURG-VAN CITTERT, J.H.A. and KURMANN, M.H. (1994): Comparative ultrastructure of living and fossil matoniaceous spores (Pteridophyta). In: KURMANN, M.H. and DOYLE, J.A.: *Ultrastructure of fossil spores and pollen*. Royal Botanic Gardens, Kew. 67-86.