

LA ULTRAESTRUCTURA DE LAS ESPORAS DE RHODOPHYTA

ALDO AVANZINI*

RESUMEN

Las carposporas y tetrasporas de las algas de la división Rhodophyta carecen siempre de una pared celular rígida y están envueltas en un mucílago transparente. A pesar de los numerosos trabajos de microscopía electrónica de transmisión acerca de la esporogénesis, muy menos ha sido publicado acerca de la ultraestructura de la espora libre.

En esta relación se describen algunos aspectos ultraestructurales de las esporas libres en unas especies de algas rojas marinas y en el género de agua dulce *Batrachospermum*. Ellos son sobre todo el mucílago, las invaginaciones tubulares del plasmalema y los materiales en el citoplasma periférico que parecen tener un papel durante la adherencia y la germinación de las esporas. Además se discuten las informaciones logradas por técnicas citoquímicas, como el rojo de rutenio y el test de Thiery. Brevement se trata también el aspecto de la espora germinada investigada por el microscopio electrónico de scanning.

Las algas de la división Rhodophyta están caracterizadas por la falta de esporas móviles. Todas las esporas de las Rhodophyta además no presentan, por lo menos en las primeras horas después de la liberación al medio acuático, una pared celular rígida. En lugar de ella, las tetrasporas, carposporas y monosporas tienen una envoltura mucilaginososa que parece ser encargada de la protección y de la primera adherencia de las células a un substrato. Aquella envoltura se presenta perfectamente transparente y se puede mirar en microscopía óptica por contraste negativo en tinta china o por coloración positiva con ciertos colorantes como el verde Janus o el rojo rutenio.

Los trabajos acerca de la ultraestructura de las esporas de las algas rojas describen sobre todo los varios aspectos de la esporogénesis. En este sentido he hallado trabajos que describen la ultraestructura de las carposporas de 15 especies, la de las

* Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Trieste (Italia)

tetrasporas de 11 especies y además la de las monosporas de 3 especies. En total hay por lo menos 35 publicaciones desde 1970 que describen la esporogénesis en el microscopio electrónico de transmisión, pero solo 3 de aquellos trabajos presentan una fotografía de espora libre. En las varias fases de la esporogénesis se observa una sucesión de secreciones, producidas sobre todo por el Golgi, que van a formar la serie de estratos de la pared del esporangio y el mismo mucílago que envuelve la espora (CHAMBERLAIN & EVANS, 1973).

Las investigaciones en curso en nuestro laboratorio se refieren a la ultraestructura de las esporas después de su salida de los esporangios. Las esporas son liberadas en cápsulas de plástico de 1 ml que contienen agua de mar y un trocito de talo con esporangios maduros. Después de la liberación, las esporas se quedan sobre el fondo de las cápsulas y así toda la preparación para el estudio en el microscopio electrónico de transmisión se hace sin remover las células de ese sitio. Las esporas libres están llenas de cloroplastos y de granos de almidón. Está ausente el gran vacuolo que se puede encontrar en las células vegetativas bien desarrolladas. Al nivel del plasmalema no hay evidentes actividades de secreción durante las primeras horas. El mucílago que ya era transparente en el microscopio óptico, queda también transparente frente a los electrones, por lo menos cuando se utiliza el método standard de preparación: aldeido glutárico y tetróxido de osmio para las muestras, sales de uranio y de plomo para las secciones ultrafinas. Para hacer visible el mucílago utilizamos la técnica de mezclar el rojo de rutenio a la disolución de tetróxido de osmio durante la preparación de las esporas (AVANZINI & HONSELL, 1984). Por esa manera el mucílago aparece como una envoltura de fibrillas al rededor de la espora (Fig. 1). Esta técnica ya fue utilizada por FLETCHER & FLOODGATE (1973) para hacer visible el mucílago de bacterias marinas. LUFT (1971) estudió las reacciones del rojo de rutenio con varias substancias. Los polisacáridos ácidos y las substancias grasas presentaron la mayor afinidad para el rojo de rutenio. Pues polisacáridos ácidos parecen estar presentes en el mucílago de las esporas.

Si volvemos a investigar el citoplasma de las esporas, parece interesante que algunos autores describan en la fase final de la esporogénesis unas estructuras semejantes a microtúbulos que se localizan en la parte periférica de las células. Durante el estudio de las esporas maduras y libres hemos hallado semejantes estructuras en las tetrasporas de *Nitophyllum punctatum* y *Acrosorium venulosum*,

y tambien en las carposporas de *Gracilaria verrucosa* y *Gracilaria bursa-pastoris* del Mar Mediterráneo (Fig.1). Estas estructuras tienen un diámetro constante: en *Nitophyllum* 25 nm. Pero al final de la esporogénesis de *Caloglossa leprieurii* (TRIEMER & VASCONCELOS, 1977) se encuentran tubulos con un diámetro de 45-50 nm. Por supuesto el tamaño puede variar segun la especie. En ciertos casos excepcionales hemos encontrado tambien trifurcaciones de estos tubulos en *Nitophyllum punctatum* (AVANZINI & HONSELL, 1984).

Habria que subrayar que seguramente no se trata de microtúbulos, aunque el diámetro sea muy semejante. Los túbulos de las esporas parecen ser continuos con el plasmalema y sus paredes tienen el aspecto de una membrana unitaria. Los túbulos aparecen al final de la esporogénesis y no se encuentran mas después de la germinación. Pues pueden tener cualquier función durante la fase libre de las células, cuando las células todavía carecen de una pared rigida. Quizás tienen una importancia para la osmoregulación de las células, pero esa es solo una suposición sin pruebas.

Hasta hoy estos túbulos se han encontrado en unas especies marinas de Ceramiales, Gigartinales y Cryptonemiales en el curso de investigaciones ultra-estructurales de los esporangios o de las esporas. No parecen estar presentes en los esporangios de otras especies, sobre todo las que pertenecen a otros órdenes, y no estan presentes en las carposporas libres de la especie de agua dulce *Batrachospermum moniliforme*, del orden Batrachospermales (AVANZINI et al., 1984). Una investigacion mas detallada de las esporas libres de las algas rojas podrá aclarar si la presencia de estos tubulos tiene un sentido sistematico o una relación con el medio marino.

En un trabajo publicado en el año 1973, CHAMBERLAIN & EVANS formularon la expresion en ingles "cored vesicles" para describir numerosas vesículas presentes en las tetrasporas y carposporas de *Ceramium rubrum*. Estas vesículas, observadas en el microscopio electrónico de transmisión, tienen una estructura de tipo fibrillar condensadas en su centro (Fig.2). Las investigaciones citoquímicas indican una naturaleza glicoproteica de estas estructuras. Los autores vieron en estas vesículas una materia adhesiva que la espora secreta su germinación. En semejantes vesiculas en la especie *Polysiphonia sertularioides* (TRIPODI & DE MASI, 1975) fue demostrada la presencia de polisacáridos. La presencia de "cored vesicles" ha sido descrita en casi todos los trabajos de esporogénesis publicados. Pero en las carposporas de la Delesseriacea *Caloglossa leprieurii* estas vesículas faltaban tambien en la última fase de la

esporogénesis (TRIEMER & VASCONCELOS, 1977). Nosotros en Triste hemos estudiado en el microscopio electrónico de transmisión otras dos especies de Delesseriaceae: *Nitophyllum punctatum* y *Acrosorium venulosum*. Después de su liberación sus esporas también carecían de las numerosas vesículas con centro condensado. Estaban sin embargo presentes pequeñas estructuras fibrillares aisladas que iban a ser secretas después de unas horas. Entonces no solo la morfología de estos cuerpos fibrillares es un poco diferente de aquella clásica de las vesículas con adhesivo que se encuentran en otras especies, también la cantidad de la materia adhesiva parece diferente.

Sin embargo los polisacáridos adhesivos se encuentran en gran cantidad también en la familia Delesseriaceae, como nos ha revelado la aplicación del test de Thiery en el caso de las tetrasporas libres de *Nitophyllum punctatum*. Este test se efectúa con secciones de muestras preparadas para el microscopio electrónico de transmisión y recolectadas sobre un soporte de oro. Grupos glicólicos cercanos se oxidan con ácido periódico a grupos aldehídicos. Después se ligan estos últimos con tiosemicarbazide, una sustancia que hace precipitar el proteinado de plata que es opaco frente a los electrones. Así se visualizan los sitios en los cuales están presentes polisacáridos (HALL, 1978) con un test semejante a la técnica PAS en microscopía óptica. En el caso de *Nitophyllum* el test de Thiery nos ha revelado la presencia en el citoplasma periférico de agregados fibrillares de polisacáridos que antes no estaban visibles y que posiblemente serían secretados durante la germinación de las esporas junto a los cuerpos fibrillares más pequeños que ya se pueden ver sin el test de Thiery. Ahora estamos investigando otras especies de Delesseriaceae para ver si hay una ultraestructura de las esporas que caracteriza toda la familia.

El microscopio electrónico de scanning no ha sido utilizado tan frecuentemente para el estudio de las esporas como el microscopio electrónico de transmisión. Con esta técnica vimos la envoltura de mucílago de las tetrasporas de *Nitophyllum punctatum* recolectadas sobre varios soportes. También estudiamos la morfología del algula y su disco de adherencia (AVANZINI et al., 1982). La germinación de las esporas de *Polysiphonia urceolata* fue también estudiada en el microscopio electrónico de scanning por FLETCHER (1976). El autor describió las variaciones en la forma del disco de adherencia sobre un sustrato de plástico. Anadió también que sobre un sustrato de vidrio el algula crecía con un rizoide largo en vez de desarrollar un disco de adherencia.

Para conservar las estructuras de las algulas sin daño es necesa

rio que la desecación se haga en anhídrido carbonico líquido con aparatos para el punto crítico. En caso que la desecación se haga con etanol y en el aire, muchas células quedan colapsadas. Hace muy poco traté de utilizar una técnica mas simple y barata, ya utilizada por NATION (1983) para preparar tejidos blandos de insectos. Pasé las esporas, recolectadas sobre el vidrio, al etanol y luego para unos minutos al hexametildisilazano, un líquido tóxico. Por último las muestras fueron desecadas en el aire. Aunque los resultados no fueron idénticos a los que se logran con el aparato para el punto crítico, ellos fueron aceptables. No se pudo ver bien el mucílago de las esporas, pero las células quedaron sin daños grandes y no colapsaron. Otras investigaciones tendran que confirmar la utilidad de esta técnica para el estudio de las esporas de las Rhodophyta.

AGRADECIMENTOS

A las personas que están colaborando en el estudio de las esporas de las Rhodophyta en la Universidad de Trieste (Prof. Dr. Laura Talarico, Dr. Anna Maria Piacquadio, Dr. Giorgio Honsell).

BIBLIOGRAFIA

- AVANZINI, A., HONSELL, G. & GARDONIO, S. 1982. Some aspects of germination and cell wall formation in tetraspores of *Nitophyllum punctatum* (Rhodophyta). *Caryologia*, 35 (3): 352-353.
- AVANZINI, A. & HONSELL, G. 1984. Membrane tubules in the tetraspores of a red alga. *Protoplasma*, 119: 156-158.
- AVANZINI, A., HONSELL, G. & GARDONIO, S. 1984. Some aspects of carpospore ultrastructure in *Batrachospermum moniliiforme* (Rhodophyta). *Giorn. Bot. It.*, 118: 80-81.
- CHAMBERLAIN, A.H.L. & EVANS, L.V. 1973. Aspects of spore production in the red alga *Ceramium*. *Protoplasma*, 76: 139-159.
- FLETCHER, R.L. 1976. Post-germination attachment mechanisms in marine fouling algae. *Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp.*, 443-464.
- FLETCHER, M. & FLOODGATE, G.D. 1973. An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J. Gen. microbiol.*, 74: 325-334.

- HALL, J.L. (ed.) 1978. *Electron microscopy of plant cells*. Amsterdam, Elsevier.
- LUFT, J.H. 1971. Ruthenium red and violet. I) Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171: 347-368.
- NATION, J.L. 1983. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, 58 (6): 347-351.
- TRIEMER, R.E. & VASCONCELOS, A.C. 1977. The ultrastructure of carposporogenesis in *Caloglossa leprieurii* (Delesseriaceae, Ceramiales). *Amer. J. Bot.* 64 (7): 825-834.
- TRIPODI, G. & DE MASI, F. 1975. Cytological localization of polysaccharidic molecules in some red algae. *J. Submicr. Cytol.*, 7: 197-209.

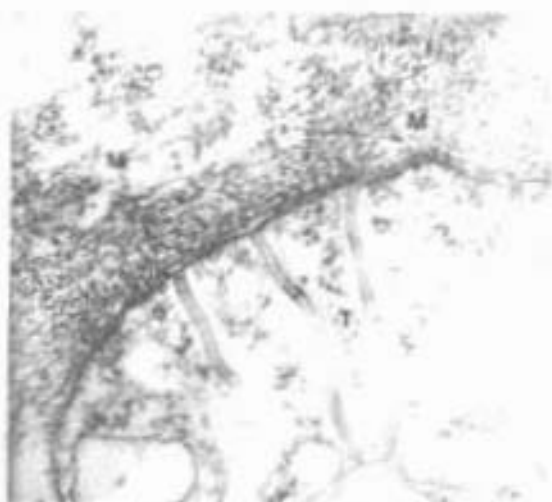


Figura 1

- Tetraspora de *Nitophyllum punctatum* Grev. (técnica del rojo de roténio); M= mitoflagio, T= túbulos: 81.000 x.

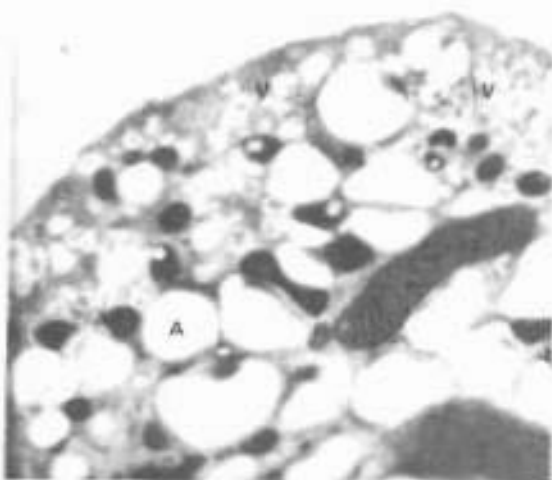


Figura 2

- Carpospora de *Gaiochloa basta-pastoralis* (Oenlin) Hilse, A= almidón, V= vesículas: 14.400 x.

