

OBSERVACIONES AL M.E.T. DE *MICROSPORA QUADRATA* HAZEN (*MICROSPORACEAE*, *CHLOROPHYTA*)

por

JAUME CAMBRA & MARTA LÓPEZ*

Resumen

CAMBRA, J. & M. LÓPEZ (1991). Observaciones al M.E.T. de *Microspora quadrata* Hazen (*Microsporaceae*, *Chlorophyta*). *Anales Jard. Bot. Madrid* 48(2): 121-129.

Se presentan los resultados de un estudio sobre la ultraestructura y la multiplicación asexual de *Microspora quadrata* Hazen (*Microsporaceae*, *Chlorophyta*) en muestras procedentes de los lagos prepirenaicos, de tipo cárstico, de Basturs y Estaña. *M. quadrata* presenta las características ultraestructurales propias de la familia *Microsporaceae*; sus filamentos producen dos tipos de zoósporas biflageladas: esféricas y elípticas. Se describe, asimismo, el proceso de elongación de las zoósporas y se discute su función.

Palabras clave: *Chlorophyta*, *Microspora quadrata*, ultraestructura, multiplicación asexual, zoósporas.

Abstract

CAMBRA, J. & M. LÓPEZ (1991). *Microspora quadrata* Hazen (*Microsporaceae*, *Chlorophyta*) observed with transmission electron microscopy. *Anales Jard. Bot. Madrid* 48(2): 121-129 (in Spanish).

Results of a study of ultrastructural and asexual reproductive features of *Microspora quadrata* Hazen (*Microsporaceae*, *Chlorophyta*) are given. *M. quadrata* filaments were found within *Phragmites australis* (Cav.) Trin. stems in karstic pre-Pyrenean lakes (Basturs and Estaña). *M. quadrata* has ultrastructural features that conform to the pattern characteristic of members of the family *Microsporaceae*. The filaments produce two different kinds of biflagellate zoospores: spherical and elliptical. Zoospore elongation and function is discussed.

Key words: *Chlorophyta*, *Microspora quadrata*, ultrastructure, asexual reproduction, zoospores.

INTRODUCCIÓN

Durante los estudios sobre las algas epifíticas llevados a cabo en diversos sistemas lacustres españoles, entre los años 1986 y 1989, se observó la presencia de *Microspora quadrata* Hazen (*Microsporaceae*, *Chlorophyta*) entre tallos de

* Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.

Phragmites australis (Cav.) Trin. en los lagos de Basturs (31TCG3667) y de Estaña (31TBG9556), situados en el nordeste de la Península Ibérica, cerca de las poblaciones de Isona (Lérida) y Benabarre (Huesca).

En España, el género *Microspora* está representado por ocho especies (ÁLVA-REZ-COBELAS & GALLARDO, 1986; CAMBRA, 1985), la mayor parte de ellas escasamente citadas; así, *Microspora quadrata*, que se considera especie cosmopolita (PRINTZ, 1964; RAMANATHAN, 1964), en nuestro país únicamente ha sido citada de turberas de *Sphagnum*, para Andorra (MARGALEF, 1952), y de un torrente de la provincia de Gerona (MARGALEF, 1957).

A pesar del gran número de trabajos que se han realizado en las últimas décadas sobre la ultraestructura celular de los clorófitos, *Microspora quadrata* aún no había sido estudiada a fondo desde este punto de vista (Pickett-Heaps, comm. pers.). PICKETT-HEAPS (1973) describe el mecanismo de la división celular de *Microspora* sp. y comenta su similitud con el descrito para *Ulothrix*.

En este trabajo se presentan los primeros datos sobre la ultraestructura celular de los filamentos de *Microspora quadrata*, se describen la zoosporogénesis, los tipos y función de las zoósporas y se esquematiza la multiplicación asexual de este clorófito.

METODOLOGÍA

Los ejemplares de *Microspora quadrata* recolectados se introdujeron en placas de Petri con agar-agar y se mantuvieron a 4 °C hasta llegar al laboratorio. Los filamentos se sembraron en un medio acuático, que se obtuvo a partir de agua filtrada y esterilizada procedente de los mismos puntos donde fueron recolectadas las muestras. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente (14-16 °C), iluminación artificial de 3.000 lux y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). Al cabo de un día se observó la aparición masiva de zoósporas, en las primeras horas de la mañana. Posteriormente, para su conservación, el material se fijó con formaldehído al 4%; también se fijaron algunas submuestras para estudiarlas al microscopio electrónico de transmisión (M.E.T.).

El protocolo que hemos seguido para el estudio ultraestructural de las muestras al M.E.T. ha sido:

- 1) Fijación en glutaraldehído a 4 °C, durante dos horas.
- 2) Dos lavados en tampón cacodilato 0,1 M, durante 2 y 12 horas, respectivamente.
- 3) Osmificación en OsO₄ al 2%, a 4 °C, durante dos horas.
- 4) Lavado en tampón cacodilato 0,1 M.
- 5) Deshidratación en serie acetónica (50% 1 × 10'; 70% 2 × 10'; 90% 3 × 10'; 96% 3 × 15'; 100% 2 × 30').
- 6) Inclusión en resina spurr (spurr: óxido de propileno, 1:3 dos horas; 1:1 dos horas; 3:1 doce horas).
- 7) Obtención de cortes ultrafinos.
- 8) Colocación de los cortes en las rejillas.
- 9) Contrastado: a) se añade una solución acuosa saturada de uranilo y acetona (1:1), durante 4 minutos a temperatura ambiente; b) lavado en agua bidestilada (3 veces); c) se añade citrato de plomo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lava en abundante agua destilada.
- 10) Observación a un kilovoltaje de 60 Kv.

Todas las observaciones se han realizado con un M.E.T. Philips 300 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

RESULTADOS

Los filamentos de *Microspora quadrata* se desarrollaron abundantemente de mayo a junio, aunque su presencia también se apreció en diciembre de 1989, y desaparecieron por completo en verano. En ambos casos se encontraban fijados, mediante una célula basal, a la parte sumergida de los tallos de *Phragmites australis* (Cav.) Trin.

Las características físico-químicas del agua de los referidos lagos podemos resumirlas del siguiente modo: presentan una elevada alcalinidad, con valores

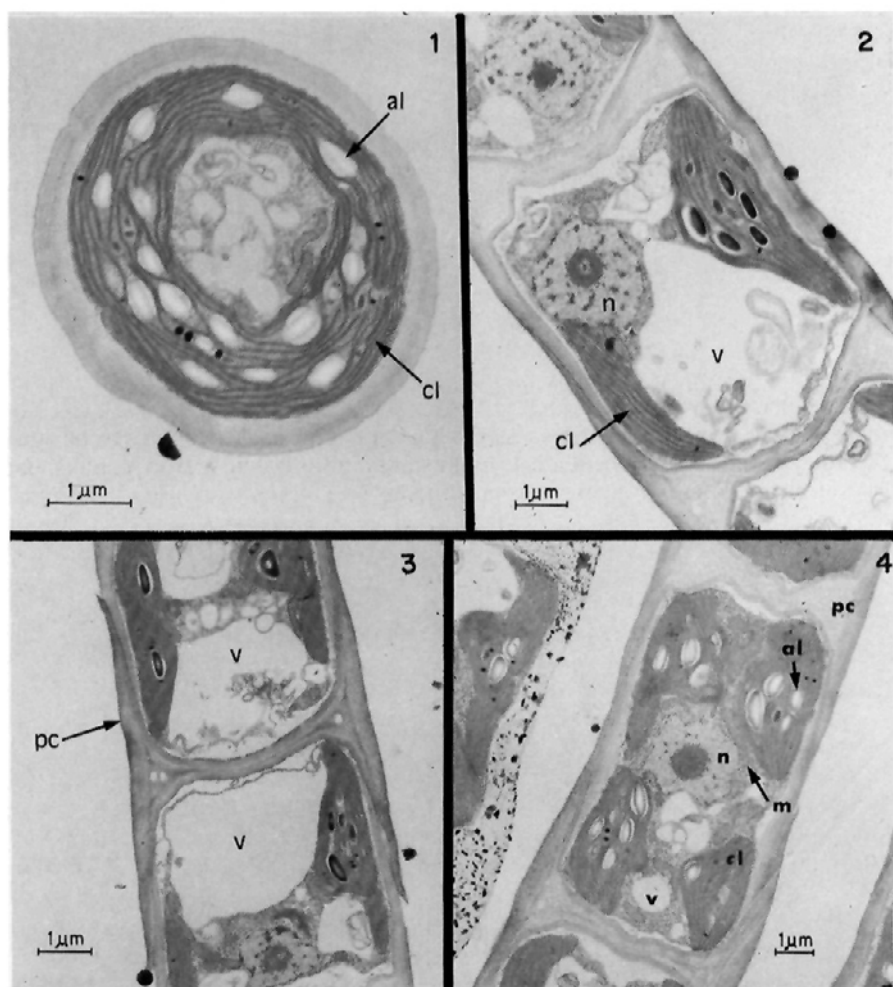


Fig. 1.—*Microspora quadrata* Hazen: 1, sección transversal del filamento; 2, detalle de la sección longitudinal de una célula recién dividida; 3, detalle de la pared celular en "H"; 4, detalle de una célula; n, núcleo; cl, cloroplasto; al, gránulos de almidón; pc, pared celular; m, mitocondria; v, vacuólos.

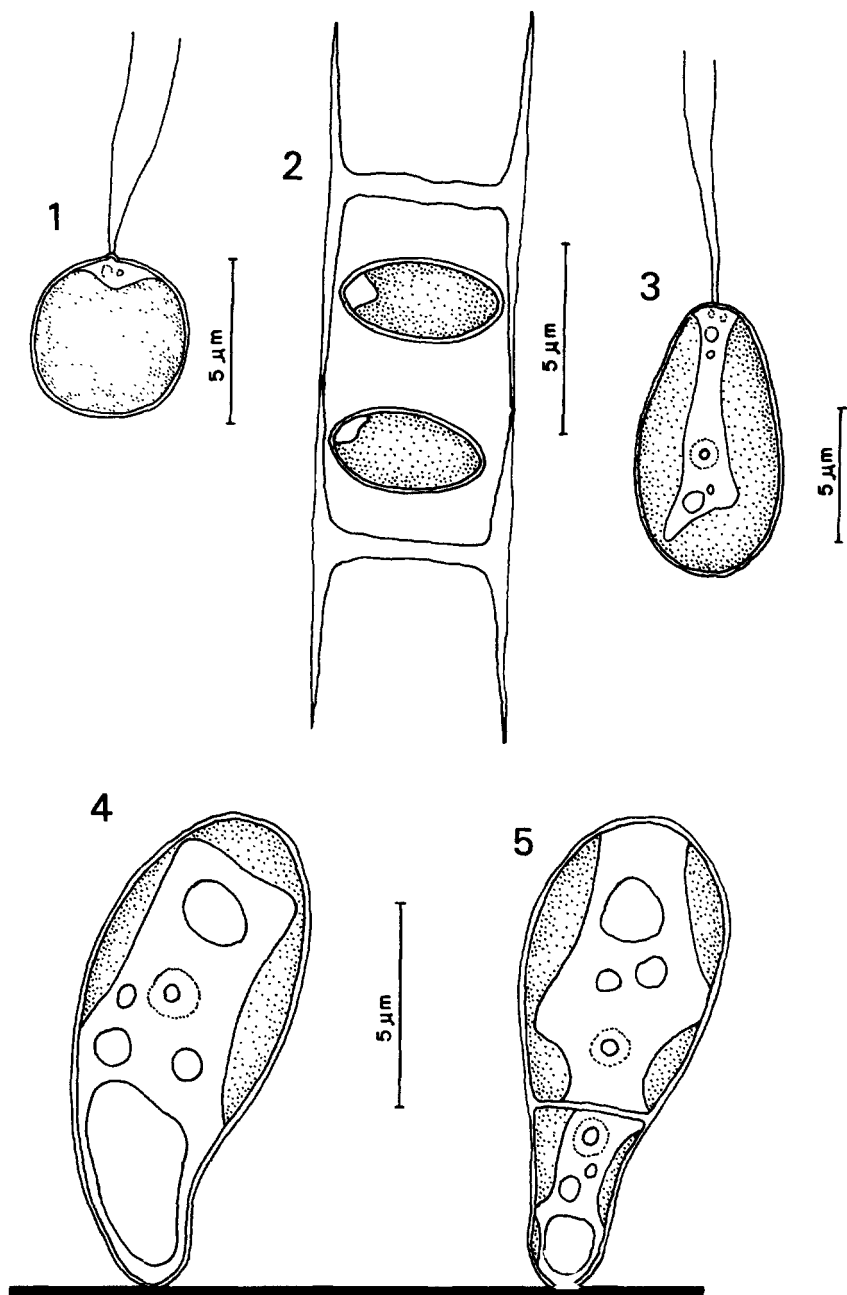


Fig. 2.—*Microspora quadrata* Hazen: 1, zoóspora esférica; 2, zoósporas elípticas en el interior de la célula progenitora; 3, zoóspora elíptica; 4, zoóspora sin flagelos, fijada a un sustrato; 5, primera división celular de la zoóspora.

que oscilan entre 4,75-6,27 meq.l⁻¹. Por lo que se refiere a la temperatura del agua, en la época en que se observó la máxima biomasa de *M. quadrata* se registraron valores entre 15-25 °C. El pH es neutro, muy ligeramente básico, con valores entre 7,1-7,6. Con respecto a la concentración de cloruros y sulfatos, se observa que en Basturs las aguas presentan unos valores muy bajos (Cl⁻: 10 mg.l⁻¹; SO₄⁼: 15 mg.l⁻¹), y en Estaña algo más elevada (Cl⁻: 195 mg.l⁻¹; SO₄⁼: 340 mg.l⁻¹).

En el mismo hábitat, junto a *Microspora quadrata*, convivían un elevado número de especies, entre las que destacamos las siguientes diatomeas: *Achnanthes flexella* (Kütz.) Brun., *A. minutissima* Kütz., *Amphora pediculus* (Kütz.) Grun., *Cocconeis placentula* Ehr., *Cyclotella kuetzingiana* var. *planetophora* Fricke, *Diploneis ovalis* (Hilse) Cleve, *Eunotia arcus* Ehr., *E. pseudopectinalis* Hustedt, *Fragilaria lapponica* Grun., *Gomphonema angustum* Agardh, *G. truncatum* Ehr., *Navicula radiosa* Kütz. y *Synedra acus* Kütz. También abundaban diversos clorófitos planctónicos, como *Ankistrodesmus spiralis* (Turner) Lemm., *Binuclearia tectorum* (Kütz.) Beger, *Oocystis submarina* Lager, *Pediastrum boryanum* (Turpin) Menegh., *Scenedesmus ecornis* (Ehr.) Chodat, *Sphaerocystis shroeterii* Chodat, *Cosmarium brebissonii* Menegh. y *C. laeve* Rabenh.

Los filamentos de *Microspora quadrata* son simples y uniseriados. Están integrados por células de 7-8 µm de longitud por 5-7,5 µm de diámetro. La pared celular es rígida, de grosor variable (fig. 1.1) y ligeramente estratificada, constituida por dos fragmentos o piezas que presentan la forma de una "H" en sección longitudinal, rasgo característico del género (fig. 1.3).

El cloroplasto es parietal (figs. 1.1, 1.2), reticulado en mayor o menor grado y desprovisto de pirenoide. A menudo existe un elevado número de gránulos de almidón, que se encuentran distribuidos de forma irregular entre los tilacoides (fig. 1.4). Las mitocondrias presentan una morfología más o menos cilíndrica y sinuosa y suelen estar situadas en las proximidades del cloroplasto (fig. 1.4).

En general, las células presentan dos grandes vacúolos localizados en ambos extremos (fig. 1.3), aunque esta disposición puede ser diferente (fig. 1.4).

Todas las células tienen un único núcleo, que se sitúa, por regla general, en la parte ecuatorial (fig. 1.4), aunque a veces, después de la división celular, puede también colocarse en las proximidades del septo (fig. 1.2).

Las zoósporas se originan a partir de cualquier célula vegetativa. Generalmente entran en zoosporulación simultánea cortos segmentos del filamento, por lo común series de hasta 20 células. La liberación de las zoósporas se produce por la separación de los dos fragmentos en "H" de la pared celular, lo que permite la salida de las mismas; el filamento queda así absolutamente desintegrado. Esta zoosporogénesis es radicalmente distinta de la que presenta *Ulothrix*, ya que en este género las zoósporas se liberan a través de poros de dehiscencia lateral, con lo que los filamentos no se llegan a desintegrar.

En los filamentos estudiados se han observado zoósporas pertenecientes a dos tipos morfológicos y funcionales distintos: esféricas y elípticas. En ambos casos eran biflageladas, aunque MEYER (1913) y WICHMANN (1937) han observado zoósporas provistas de cuatro flagelos.

Zoósporas esféricas. Cada célula vegetativa puede originar una única zoóspora biflagelada esférica, de 5 µm de diámetro, con un cloroplasto parietal, desprovisto de pirenoide (fig. 2.1). En general, las zoósporas esféricas se liberan en series constituidas por 7-10 células de un filamento. Una vez liberadas, presentan

un movimiento irregular y lento. No se ha podido establecer con claridad la función de estas zoósporas, aunque algunos autores han señalado que pueden convertirse en aplanósporas o hipnósporas (WILLE, 1887).

Zoósporas elípticas. En el interior de cualquier célula vegetativa, estas zoósporas se disponen, en número de dos, de forma más o menos perpendicular res-

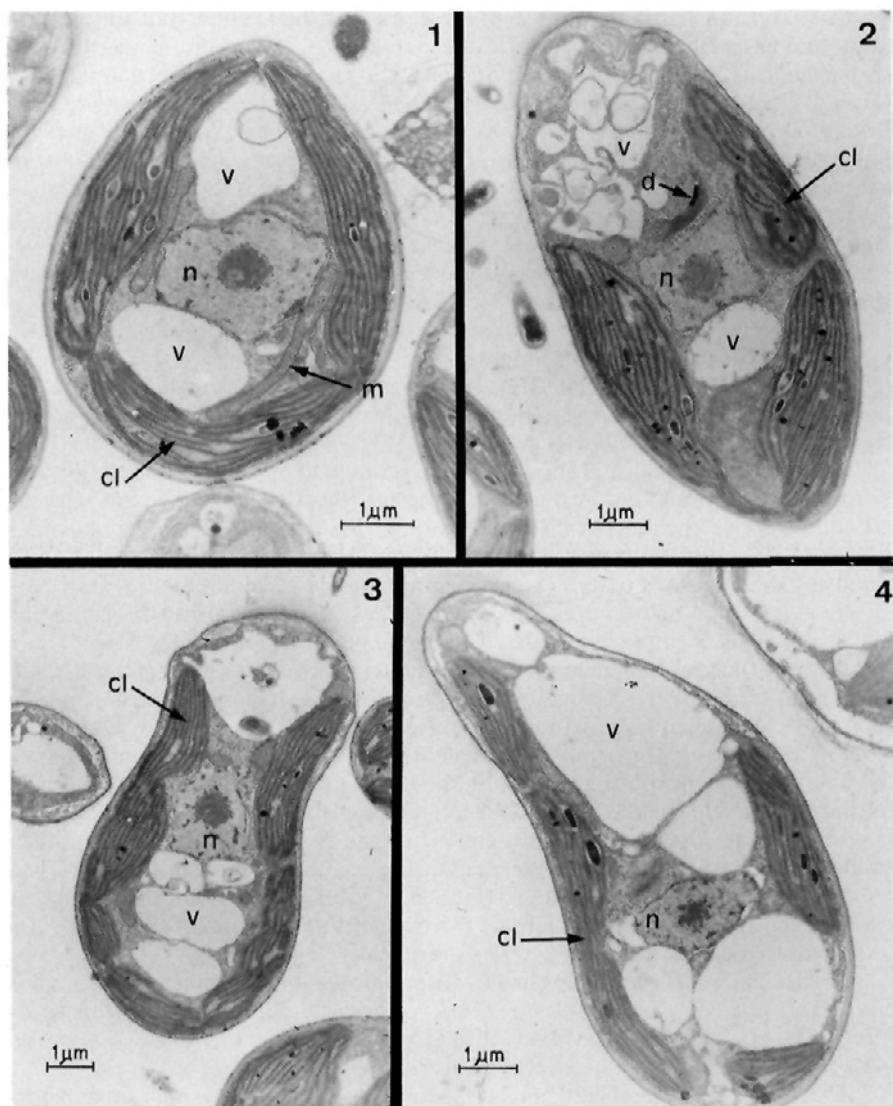


Fig. 3.—*Microspora quadrata* Hazen: 1-2, aspecto de las zoósporas elípticas después de haber perdido los flagelos; 3-4, detalle de la elongación anterior de las zoósporas; v, vacuolos; d, dictiosomas; n, núcleo; cl, cloroplasto; m, mitocondria.

pecto al eje longitudinal del filamento (fig. 2.2). Son biflageladas, entre elípticas y ligeramente ovoides, de $10 \times 5 \mu\text{m}$ (fig. 2.3, 3.1). El cloroplasto es parietal, carece de pirenoide y contiene numerosos plastoglóbulos reunidos en grupos entre los tilacoides (fig. 4.2). El núcleo (fig. 4.3) se sitúa, por regla general, en la zona ecuatorial de la célula (fig. 3.1).

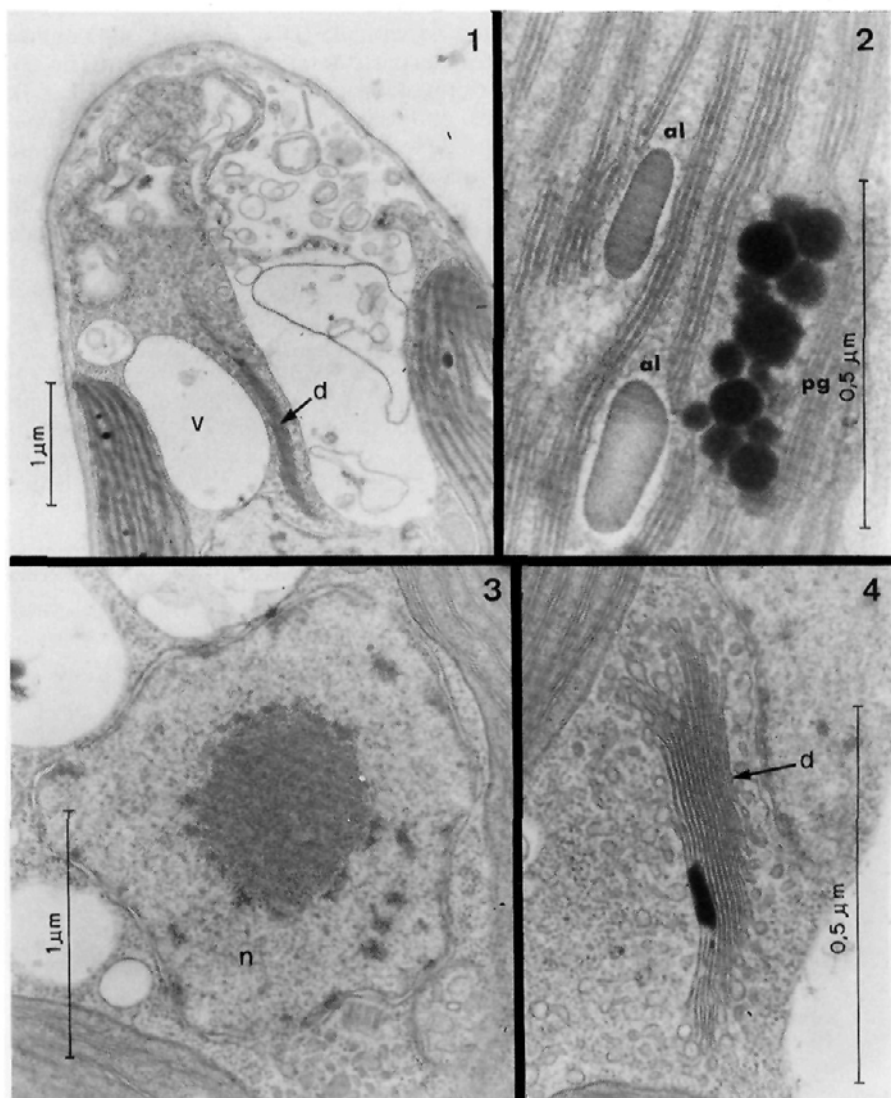


Fig. 4.—*Microspora quadrata* Hazen: 1, parte anterior de la zoóspora elíptica después de haber perdido los flagelos; 2, detalle de un grupo de plastoglóbulos entre los tilacoides, a los que acompañan gránulos de almidón; 3, núcleo de la zoóspora; 4, detalle de los dictiosomas; v, vacuólos; d, dictiosomas; n, núcleo; pg, plastoglóbulos; al, gránulos de almidón.

Al igual que las zoósporas esféricas, las elípticas también se originan en segmentos del filamento y se liberan de forma parecida. Sin embargo, a diferencia de aquéllas, éstas tienen un movimiento muy activo que, transcurridas dos horas desde su liberación, desciende paulatinamente hasta llegar a un estado más o menos inmóvil. En este momento, las zoósporas pierden los flagelos (figs. 2.4, 3) y empieza un proceso de elongación celular. Los dictiosomas de las zoósporas elípticas inician una activa producción de vesículas (figs. 3.2, 4.1, 4.4) que se fusionan y acumulan preferentemente en la parte anterior de la zoóspora (fig. 3). Este proceso va acompañado de una cierta elongación de la célula (figs. 3.3, 3.4), que pierde así su forma elíptica inicial. Asimismo, durante el proceso de elongación, el cloroplasto empieza a dividirse de forma irregular y adquiere finalmente un aspecto más o menos reticulado que recuerda al de las células vegetativas (fig. 3). En último término entran en citocinesis y mitosis, y se originan, por un lado, una célula de tamaño reducido que corresponde a la parte anterior, donde

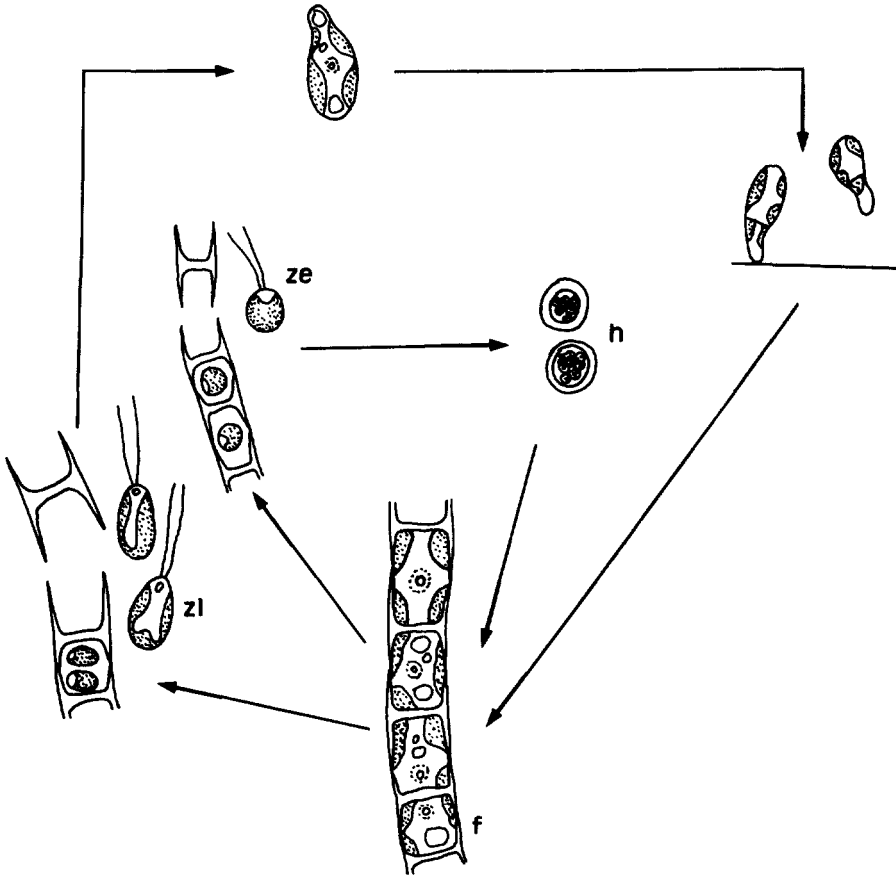


Fig. 5.—Esquema de la multiplicación asexual de *Microspora quadrata* Hazen: f, filamento vegetativo; zl, zoóspora elíptica; ze, zoóspora esférica; h, hipnósporas.

se insertaban los flagelos (zona de elongación) y, por otro, una célula de tamaño mayor (fig. 2.5). A continuación, estas células se dividen sucesivamente hasta constituir un nuevo filamento. Cabe señalar la posibilidad de que las zoósporas, una vez que han perdido los flagelos, si entran en contacto con algún sustrato, se fijan a éste por la parte anterior (fig. 2.4), en la que posteriormente se forma la célula de tamaño reducido. Si las zoósporas no se adhieren a ningún sustrato, también empiezan a dividirse siguiendo el mismo mecanismo, y originando así filamentos libres que flotan.

En cuanto a la funcionalidad que se atribuye a los dos tipos de zoósporas observados conviene hacer resaltar que, por un lado, las de tipo esférico, con período de latencia, actuarían como hipnósporas o cistos; y por otro, las elípticas, sin ningún tipo de período latente, estarían relacionadas con la multiplicación activa de los filamentos para una rápida colonización del medio.

A partir de todos estos resultados se esboza el mecanismo de multiplicación asexual de *Microspora quadrata* (fig. 5). Por lo que se refiere a la reproducción sexual, diremos que ha sido observada solamente por STEINECKE (1932) y WICHMANN (1937), quienes detectaron la presencia de gámetas con flagelos desiguales.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor J. D. Pickett-Heaps, por sus interesantes sugerencias durante la realización de este trabajo. Asimismo, agradecemos la amabilidad del profesor P. Bourrelly por habernos confirmado la identificación de *Microspora quadrata*, y a los miembros del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona, su ayuda en la preparación y observación de las muestras al M.E.T.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ-COBELAS, M. & T. GALLARDO (1986). Catálogo de las algas continentales españolas. IV. Chlorophyceae Wille in Warming, 1884. Prasinophyceae T. Christensen ex Silva, 1980. *Acta Bot. Malacitana, Málaga* 11: 17-38.
- CAMBRA, J. (1985). Catàleg de les espècies d'algues dels Països Catalans. In: X. Llimona (ed.), *Història Natural dels Països Catalans* 4: 505-528. Barcelona.
- MARGALEF, R. (1952). *La vida en las aguas dulces de Andorra*. I Congr. Int. Pirineo. Zaragoza.
- MARGALEF, R. (1957). Materiales para una flora de las algas del NE de España, VIII. Suplemento. *Collect. Bot. Barcelona* 5(2): 353-365.
- MEYER, K. (1913). Über die *Microspora amoena* (Kütz.) Rabh. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 31: 441-448.
- PICKETT-HEAPS, J. D. (1973). Cell division and wall structure in *Microspora*. *New Phytol.* 72: 347-355.
- PRINTZ, H. (1964). Die Chaetophorales der Binnengewässer. *Hydrobiologia* 24: 1-376.
- RAMANATHAN, K. R. (1964). *Ulotrichales*. I.C.A.R. New Delhi.
- STEINECKE, F. (1932). Untersuchungen über die phyletische Stellung der Microsporaceen. *Bot. Arch.* 34: 216-229.
- WICHMANN, L. (1937). Studien über die durch H-Stück-Bau der Membran ausgezeichneten Gattungen *Microspora*, *Binuclearia*, *Ulotrichopsis* and *Tribonema*. *Pflanzenforschung* 20: 1-110.
- WILLE, N. (1887). Über die Ruhezellen von *Conferva*. *Jahrb. Wiss. Bot.* 18: 459-473.