

PRECISIONES HISTOLOGICAS Y BIOQUIMICAS ACERCA DE LOS EJEMPLARES DE FRENELOPSIS PROCEDENTES DE TORRELAGUNA (MADRID)

C. Alvarez-Ramis (**), G. Almendros (*) y A. Polo (*)

RESUMEN

Son descritos diferentes aspectos morfológicos de los *Frenelopsis* del yacimiento de Torrelaguna, comparándose sus características con las descritas por otros autores para las especies *F. alata* y *F. oligostomata*.

Los restos de *Frenelopsis* presentan, en el yacimiento estudiado, un notable polimorfismo respecto a las dimensiones del fronde, pero todos los ejemplares descritos poseen características muy similares a las de *F. oligostomata*.

El estudio químico de los constituyentes orgánicos de las cutículas muestra una composición compleja, siendo los componentes mayoritarios un residuo cutinizado insoluble en álcalis y una fracción polifenólica extraíble de características similares a los ácidos húmicos. Los restos presentan una cierta proporción de polímeros similares a la lignina, aunque muy alterada, así como pequeñas cantidades de ácidos fúlvicos, compuestos nitrogenados, hidrocarburos libres y carbohidratos.

PALABRAS CLAVE: Histología, Bioquímica, *Frenelopsis*, Cretácico superior, Paleobotánica, sustancias húmicas.

ABSTRACT

Different morphological features of the *Frenelopsis* from a Torrelaguna basin (Madrid, Spain) are described and compared with *F. alata* and *F. oligostomata*, studied by other authors.

The *Frenelopsis* rests present, in the studied deposit, a remarkable polymorphism with respect to the dimensions of the leaves, but all the specimens studied are greatly related to *F. oligostomata*.

The chemical study of the organic constituents of the cuticles shows a heterogeneous composition, being the major constituents an alkali-insoluble cutinized residue and a like-humic acid polyphenolic extractable fraction. Cuticles contains a certain proportion of a highly altered lignin-like polymer, and minimal amounts of fulvic acids, nitrogenated compounds, free hydrocarbons and carbohydrates.

KEY WORDS: Hystology, Biochemistry, *Frenelopsis*, Upper cretaceous, Palaeobotany, Humic substances.

Introducción

La zona estudiada debería pertenecer, durante el Cretácico, a una región litoral poblada de Coníferas, pertenecientes a los géneros *Araucaria*, *Brachyphyllum* y *Frenelopsis*, relativamente pobre en especies, y dominando el número de individuos de este último (Alvarez-Ramis *et al.*, 1981). Los restos de Coníferas (fragmentos de tronco, órganos reproductores, etc.) se encuentran asociados a los de los helechos, preespermatofitas y diversos tipos de dicotiledóneas, si bien poco abundantes. La situación, edad y otras características

del yacimiento han sido descritas con anterioridad (Alvarez-Ramis, 1980; Alvarez-Ramis, 1981).

Desde el punto de vista químico, la característica más notable de estos restos fosilizados es el hecho de que conserven un considerable contenido en materia orgánica. Esta circunstancia viene favorecida primariamente por las condiciones de formación de la tafocenosis y por la ausencia de fuertes procesos geológicos oxidativos o tectónicos sobre el yacimiento durante millones de años, así como por la propia naturaleza química de los vegetales, que pueden presentar originariamente elevada resistencia a la acción microbiana

(*) Instituto de Edafología y Biología Vegetal (C. S. I. C.). Serrano, 115 dpdo., Madrid-6.

(**) Laboratorio de Paleobotánica y Paleoecología. Departamento de Paleontología, Facultad de Ciencias Geológicas. Universidad Complutense, Madrid-3.

en condiciones fuertemente reductoras (cutinas, ligninas, esporopoleninas, sustancias bituminosas, etc.). Por otra parte, los materiales más fácilmente biodegradables pueden contribuir a la formación de nuevos compuestos estables frente a los microorganismos, conocidos genéricamente como sustancias húmicas, que forman parte de la composición de ciertos tipos de carbones, aunque se siguen formando activamente en los suelos actuales.

Aunque los restos de cutículas fosilizadas de Gimnospermas no pueden ser comparadas con los carbones por su estructura ni por su composición química, en el presente estudio se pretende realizar un aislamiento de diferentes grupos de compuestos orgánicos, en la suposición de que estas cutículas también pudieran venir acompañadas por una proporción más o menos elevada de sustancias comparables a los compuestos húmicos (que serían responsables, en parte, de la coloración oscura, que desaparece después de limpiar químicamente la muestra para su observación al microscopio). De confirmarse la presencia de estos compuestos, su estudio podría aportar datos de interés respecto a la naturaleza y conservación del humus producido a partir de diferentes especies vegetales en otros períodos geológicos.

Métodos

Los métodos empleados para efectuar las preparaciones histológicas se indicaron en publicaciones anteriores (Alvarez-Ramis *et al.*, 1980; Alvarez-Ramis, 1981). El microscopio electrónico de barrido utilizado fue un JEOL JSM 50-A. Para el estudio paleobioquímico, los fragmentos de cutícula fueron lavados con HCl 1M para eliminar los restos de marga. La determinación del contenido en C, H y N se realizó con un microanalizador Hewlett-Packard 185.

Mediante el tratamiento con extractantes alcalinos (Dabin, 1971) se obtuvo una fracción soluble en $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 0.1 M y NaOH 0.1 M en la que se puede diferenciar, a su vez, un precipitado insoluble en medio ácido (de características similares a los ácidos húmicos) y un extracto soluble (ácidos fúlvicos). La determinación cuantitativa (en C) de ambas fracciones tuvo lugar con un microanalizador Beckman 950-B, empleando 50 μl de solución previamente descarboxilada. En cuanto al residuo de extracción, y en la suposición de que pudiera conservar algún compuesto del tipo de la lignina, se realizó una extracción con dioxano caliente en presencia de HCl.

A pesar de la escasa cantidad de muestra disponible se aplicaron algunas técnicas al estudio de la naturaleza de los ácidos húmicos. La determinación de las densidades ópticas se realizaron en soluciones de 0,136 mg. de C/ml NaCO_3H 0.02 N (Kononova, 1961). Para la filtración a través de gel se utilizó Sephadex G-75 en columna Pharmacia K 16/70 (Dorado *et al.*, 1972). La hidrólisis a ebullición con H_2O y HCl de esta fracción se llevó a cabo de acuerdo con Haworth (1971).

Resultados y discusión

Estudio sistemático e histológico

Desde el punto de vista sistemático, el género *Frenelopsis* se incluye dentro de la extinta familia de las Cheirolepidiaceas, que presenta indudables afinidades botánicas respecto a las demás coníferas del Cretácico superior, productoras de polen del tipo *Classopollis*, especialmente con las *Araucariaceas*, e incluso podrían estar emparentadas con las *Clamidospermas* por una rama de las *Gnetaceas*, relacionada con el género *Ephedra* (Vakrhamiev, 1960).

Las distintas especies del género *Frenelopsis* han alcanzado una amplia distribución, tanto estratigráfica (Triásico-Senonense-Paleoceno?) como geográfica, pues su dispersión sólo

se ha visto detenida por los límites de las zonas áridas de las áreas costeras del antiguo mar de Tetis.

Las cutículas estudiadas en los ejemplares procedentes del yacimiento de Torrelaguna son histológicamente casi idénticas a los figurados por Pons y Broutin (1978) como *Frenelopsis oligostomata* (ROMARIZ) Alvin, tanto en los detalles observados al microscopio óptico (lámina, fig. 1) como al electrónico de barrido (figs. 2 y 3). Se asemejan también mucho a las epidermis figuradas por Hlušík (1974) como de *Frenelopsis alata* (FEISTM.) Knobloch.

Las cutículas de nuestros ejemplares muestran células de gruesas paredes provistas de espinas patentes y estomas muy complejos, hundidos en la epidermis, como puede apreciarse en la lámina (figs. 1, 2 y 3), así como otras características indicadas en los trabajos realizados por los autores anteriormente citados.

Las ramificaciones de los *Frenelopsis* encontrados en el yacimiento coinciden con la descripción de Pons *et al.* (1978) de las ramas vegetativas de la especie *F. oligostomata*: ramas portadoras de hojas, aplanadas, articuladas y ramificadas de forma alterna, recubiertas de epidermis carbonizada que se prolonga lateralmente en alas rectilíneas y estrechas. En la parte superior de cada nudo se aprecian verticilos de tres hojas idénticas, unidas por la base.

Además del de la rama descrita, hemos observado otros dos tipos morfológicos en el yacimiento de Torrelaguna (lámina: figs. 4, 5 y 6) (Alvarez-Ramis, 1981; Alvarez-Ramis *et al.*, 1983). Las ramas correspondientes a la figura 4 presentan las expansiones alares francamente anchas y patentes, mientras que las de la figura 5 son tan estrechas que apenas se perciben.

Por otra parte, las epidermis muestran también una estrecha semejanza con las figuradas como *F. alata* por Pons *et al.* (1979) (incluso por la presencia de espinas en las paredes) y con las anteriormente indicadas por Hlušík (1974).

El aspecto macroscópico de las partes vegetativas de nuestros ejemplares no se asemejan a *F. alata*, pues las de esta última especie son mucho más estrechas, con expansiones alares poco aparentes, presentando distinto tipo de ramificación y, sobre todo, en los ejemplares de Torrelaguna no se observan irregularidades verrucosas (ver fig. 7), ni hemos encontrado nunca verticilos con seis hojas incluso en los ejemplares de ramas más anchas, que son relativamente frecuentes (Pons, 1979).

Estudio de la materia orgánica

El análisis elemental orgánico de los restos (tabla 1) indica un elevado contenido en carbono orgánico y una baja proporción de nitrógeno, siendo el contenido en oxígeno relativamente bajo, respecto a otros materiales humificados, como correspondería a las condiciones reductoras del medio de fosilización.

Al representar las relaciones atómicas entre los distintos elementos mediante el método gráfico-estadístico de Van Krevelen (1950) (gráfica 1), la composición elemental de las cutículas (F) no se incluye netamente en ningún grupo de materiales orgánicos actuales, subfósiles o fósiles. La materia orgánica de los restos de *Frenelopsis*, se muestra sumamente transformada respecto a los tejidos celulares inalterados (vegetales actuales: V). Otros materiales transformados en ambiente reductor (T), con elevada proporción de humus estable (turbas), se diferencian, a su vez, por su contenido en oxígeno mucho más

TABLA I

Análisis elemental orgánico de cutículas de *Frenelopsis* y de los ácidos húmicos (AH) extraídos a partir de una muestra media.

Muestra	%C	%H	%O	%N	C/N	%cenizas
Cutícula-1	75.57	7.08	16.55	0.81	93.67	9.67
"	-2 81.99	9.14	7.94	0.94	87.68	14.28
"	-3 73.24	6.98	18.80	0.98	74.84	16.60
"	-4 66.49	6.51	26.00	1.00	66.38	15.60
"	-5 75.49	8.34	15.34	0.83	90.55	9.09
"	-6 73.33	7.66	18.23	0.78	93.92	6.66
"	-7 68.76	5.95	24.45	0.83	82.56	12.50
"	-8 77.92	9.25	11.92	0.91	85.26	8.09
"	-9 80.10	8.14	10.88	0.88	90.84	15.70
AH	64.30	5.11	28.90	1.69	38.05	

(% respecto a muestra libre de cenizas)

alto. Los lignitos y otros carbones de mayor grado de transformación presentan un contenido alifático más reducido.

Tan solo algunos tipos de sustancias bituminosas aislados de turbas y lignitos, y constituidas por mezclas de ceras y resinas (G), pueden distribuirse en estas áreas cercanas de la gráfica, pero, por regla general, su carácter alifático es mucho más acusado y su contenido en nitrógeno, bastante más bajo. Por otra parte, fue posible obtener una considerable proporción de extracto húmico (26,3% en carbono respecto al peso de muestra (fig. 2). La mayor parte de este extracto, está constituido por compuestos similares a los ácidos húmicos, circunstancia común con los lignitos (Villalba, 1975), donde la fracción de ácidos fúlvicos es también muy reducida. La fracción soluble en dioxano del residuo de extracción (del orden del 4% del C de la muestra), presenta un 44% de carbono (libre de cenizas) y un bajo contenido en N (C/N=103). El hecho de que el

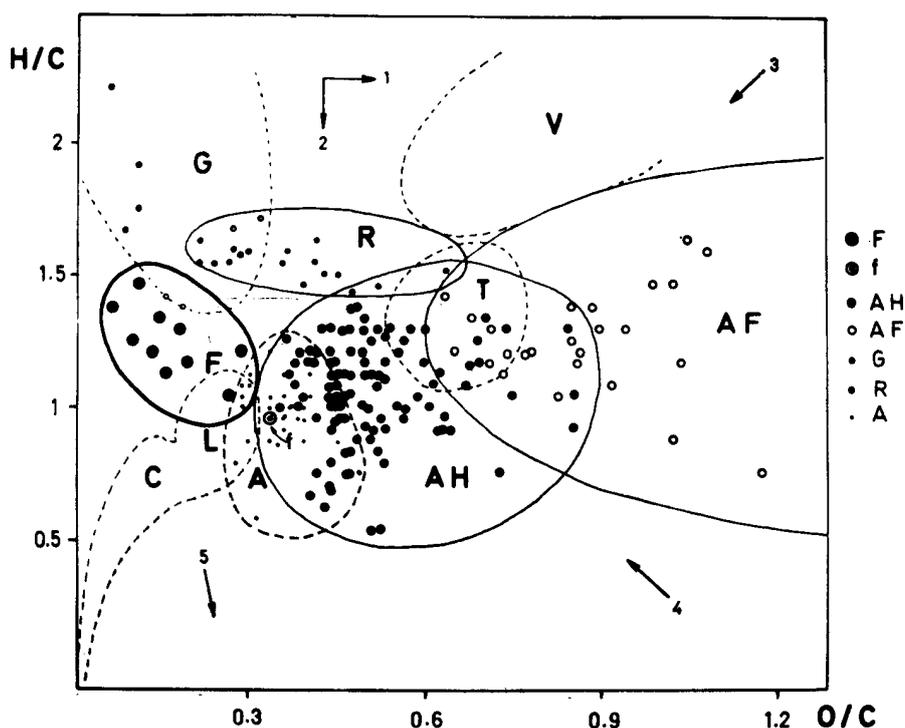
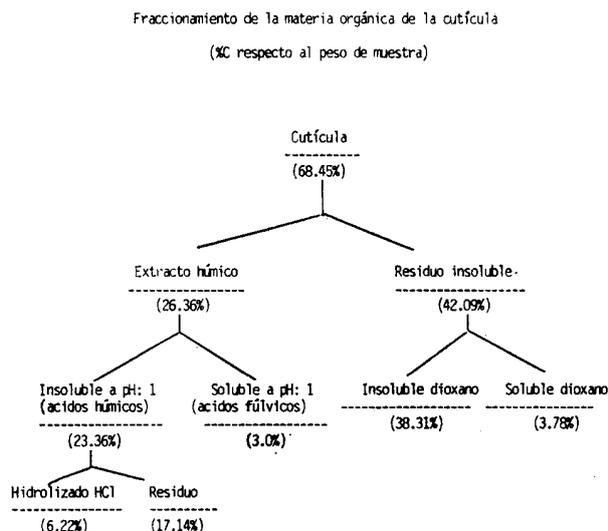


Fig. 1.—Representación gráfica de las relaciones atómicas H/C y O/C de las cutículas de *Frenelopsis* (F) y de los ácidos húmicos extraídos (f) en comparación con otros tipos de materia orgánica actual, subfósil o fósil: F) Cutículas de *Frenelopsis* del yacimiento de Torrelaguna; L) Lignitos; C) Diversos tipos de carbones; AH) Ácidos húmicos de diferentes tipos de suelo; AF) Ácidos fúlvicos de diferentes tipos de suelo; G) Substancias grasas. Betunes (Reinas y ceras); R) Ácidos húmicos de bajo grado de transformación procedentes de residuos vegetales. Ligninas; A) Residuo de hidrólisis de ácidos húmicos (ABHA); V) Tejidos vegetales actuales inalterados (en peso seco). 1: oxidaciones; 2: deshidrogenaciones; 3: deshidrataciones; 4: descarboxilaciones; 5: Demetilaciones.

espectro infrarrojo de esta fracción mostrase bandas amplias y mal definidas respecto a las lignitas extraídas de plantas actuales, sugiere que la molécula se encontraría muy alterada, o acompañada por considerable cantidad de impurezas.

Fig. 2



Contrariamente a lo que se esperaba en principio, más de la tercera parte de la fracción inicial de ácidos húmicos fue hidrolizada por el HCl 6N. Este valor, del mismo orden que los obtenidos de las muestras actuales, indica que las moléculas húmicas, a pesar de su elevado grado de condensación, que se deduce de su posición en el gráfico H/C : O/C (f), presenta todavía considerable contenido de constituyentes periféricos de la molécula, así como trazas de hidratos de carbono hidrolizables (reacción con antrona).

Las anteriores observaciones se confirman mediante el análisis elemental de los ácidos húmicos (gráfica 1 y tabla 1), cuyas razones atómicas entran dentro de los límites de variabilidad propios de los actuales, si bien su contenido en carbono es francamente elevado y el de N relativamente bajo. En cambio, la razón H/C (función inversa del grado de aromaticidad) no es excesivamente baja, como correspondería a un material en avanzado estado de carbonización. Sin embargo, su bajo contenido en grupos oxigenados les diferencia de los extraídos de otros materiales, asemejándoles a los residuos de hidrólisis de los ácidos húmicos (ABHA) (A), constituidos por la región más condensada de su molécula.

Conclusiones

Los restos epidérmicos obtenidos del yacimiento de Torrelaguna muestran características morfológicas propias de la especie *F. oligostomata*, si bien aparecen una serie de caracteres similares a los descritos para otras especies del mismo género por distintos autores. De hecho, los ejemplares de Torrelaguna presentan una acusada variabilidad respecto a las partes vegetativas, que podrían corresponder a diferentes estados de desarrollo, diferentes posiciones en la planta, o incluso a la coexistencia de especies, variedades o ecotipos en la misma zona.

Los análisis químicos realizados a partir de restos de epidermis, aunque limitados por la pequeña cantidad disponible, ponen de manifiesto su semejanza química con los compuestos del tipo de las cutinas. Sin embargo, su composición elemental no es la propia de las sustancias del tipo de las ceras o resinas, por presentar un carácter aromático mucho más acusado, de tal forma que los fósiles presentan una composición intermedia entre la de los compuestos alifáticos y los lignitos. Esta circunstancia puede ser atribuida, por una parte, a la presencia de constituyentes aromáticos y oxigenados con propiedades similares a las de los ácidos húmicos, que indicaría una evolución del tipo de la formación de los lignitos (en el mismo yacimiento se observan otros materiales en fases de carbonización hasta el estado de azabache), y, por otra, a la persistencia o conservación de materiales difícilmente degradables, del tipo de las secreciones propias de las gimnospermas, compuestos cerosos o cutinas, observándose, en cada uno de los distintos ejemplares analizados, tendencias más o menos acusadas en uno u otro sentido.

La semejanza con los lignitos se corrobora por la escasa proporción en sustancias del tipo de los ácidos fúlvicos respecto a los húmicos, pues probablemente, estos primeros compuestos (cuyos constituyentes moleculares se encuentran mucho menos condensados) presentan menor resistencia al efecto de los procesos geológicos. Los ácidos húmicos muestran muchos caracteres comunes respecto a los formados en los suelos actuales, aunque resalta su alto contenido en carbono y bajo en oxígeno, de acuerdo con sus condiciones de transformación.

También se han detectado en las cutículas pequeñas cantidades de hidratos de carbono (posibles restos de celulosas o hemicelulosas) y un cierto contenido en compuestos solubles en etanol-benceno (del orden del 4% en peso) presentando espectros infrarrojos similares a las sustancias bituminosas.

Bibliografía

- ALVAREZ-RAMIS, C.
1980. Estudio de *Frenelopsis oligostomata* (Romariz) Alvin, procedente del Cretácico superior de Torrelaguna (Madrid). *Estudios geol.*, 37, 83-87.

- ALVAREZ-RAMIS, C. y DOUBINGER, J.
1980. Los microfósiles vegetales del Cretácico superior de Torrelaguna (Madrid). *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Geol.)*, 78, 205-216.
- ALVAREZ-RAMIS, C.; BIONDI, ED.; DESPLATS, D.; HUGHES, N. F.; KOENIGUER, J. C.; PONS, D. y RIOULT, M.
1981. Les végétaux (macrofósiles) du Crétace Moyen de l'Europe Occidentale et du Sahara. Végétations et Paléoclimats. *Cretaceous Research*, 2, 339-359.
- ALVAREZ-RAMIS, C.; ALMENDROS, G. y POLO, A.
1983. Sur la présence du genre *Frenelopsis* dans le gisement de Guadalix de la Sierra (Madrid, Espagne). *C. R. 107 Congrès des Sociétés Savantes*, 5-10 Avril. Brest. (France). 85-95.
- DABIN, B.
1971. Etude d'une méthode d'extraction de la matière humique du sol. *Sci. du Sol*, 1, 47-63.
- DORADO, E.; POLO, A. y DEL RÍO, J.
1972. Caracterización de los ácidos húmicos por electroforesis y gel-filtración. *An. Edaf. Agrobiol.*, 31, 693-718.
- HAWORTH, R. D.
1971. The chemical nature of humic acids. *Soil Sci.*, 111, 71-79.
- HLUŠTÍK, A.
1974. Nález *Frenelopsis* (Cupresacea) V křide Československa a jejich problematika: *Čas. Miner. Geol.*, 19, 263-268.
- KONONOVA, M. M.
1961. *Soil Organic Matter*. Pergamon Press. London, 450 páginas.
- PONS, D. y BROUTIN, J.
1978. Les organes reproducteurs de *Frenelopsis oligostomata* (Crétace, Portugal). *103^e Congrès National de Sociétés Savantes*, Nancy, 139-159.
- PONS, D.
1979. Les organes reproducteurs de *Frenelopsis alata* (K. Feitsm) Knobloch. *104^e Congrès des Sociétés Savantes*. Bourdeaux. Sciences, 1, 209-231.
- PONS, D.; LAUVERJAT, J. y BROUTIN, J.
1980. Paleoclimatologie comparée de deux gisements de Crétace supérieur d'Europe occidentale. *Mém. Soc. Geol. Fr. N. S.*, 139, 181-158.
- VAKHRAMEEV, V. A.
1970. Range and paleoecology of Mesozoic conifers. The Cheirolepidiaceae. *Paleont. Jour.*, 4, 19-34.
- VAN KREVELLEN, D. W.
1950. Graphical statistical method for the study of structure and reaction process of coal. *Fuel*, 29, 269-284.
- VILLALBA, L.
1975. *Estudio de los ácidos húmicos de ciertos lignitos españoles*. Tesis doctoral. Universidad Complutense (Biol.), Madrid, 210 págs.

Recibido el 21 de abril de 1983.

Aceptado el 23 de febrero de 1984.

LAMINA 1

- Fig. 1.**—Epidermis de *Frenelopsis* vista al microscopio óptico (141 ×).
- 2.—Aspecto de conjunto de un fragmento de cutícula al microscopio electrónico de barrido (58 ×).
 - 3.—Detalle de la cutícula mostrando las espinas en las paredes celulares (146 ×).
 - 4.—Rama mostrando la disposición de las ramificaciones y las expansiones alares (3 ×).
 - 5.—Varios fragmentos de rama en las que casi no se aprecian las expansiones alares (tamaño natural).
 - 6.—Detalle de otro fragmento de rama de *Frenelopsis* del yacimiento de Torrelaguna.
 - 7.—Aspecto macroscópico de ramas de *F. alata* (Angers, Francia: cenomanense medio); según Pons.

LÁM. 1

