

¿CHLAMYDOMONAS Y CRYPTOMONAS, ESLABON INTERMEDIARIO ENTRE PROCARIONTES Y EUCARIONTES?

por

LUIS M. CARRFRAS

Abstract. It is critically sentenced in a negative way the value of certain magnitudes of the ribosome and its sub-units (sedimentation constants, percentage of protein and RNA) as characters capable of backing radical modifications in our phylogenetic and systematic present schemes.

Resumen. Se enjuicia críticamente de modo negativo el valor de determinadas magnitudes del ribosoma y sus subunidades (constantes de sedimentación, porcentaje de proteína y de RNA) como caracteres capaces de avalar modificaciones radicales en nuestros esquemas filogenéticos y sistemáticos actuales.

El interrogante que encabeza estas líneas tal vez induzca a pensar en incontenida proclividad al sensacionalismo o en un deliberado afán de provocación intelectual. Nada más alejado de la verdad. Trata, sencillamente, de conceder, amparado bajo la forma de pregunta, un generoso margen de duda sobre el sentido de ciertas conclusiones a las que llegan M. RODRÍGUEZ LÓPEZ, M.^a MUÑOZ y D. VÁZQUEZ (1974) en su trabajo publicado en esta revista, después de ser presentado al I Simposio de Botánica Criptogámica. Dichos investigadores al resumir la interpretación de los resultados de sus experiencias declaran: «Así, pues, prescindiendo de sus características animales o vegetales y a la luz de estos estudios realizados a nivel subcelular, tanto *Chlamydomonas* como *Cryptomonas* parecen ocupar una posición filogenética evolutiva intermedia entre organismos procarióticos y eucarióticos.» (pág. 133). Es fácil comprobar que, prescindiendo de la redundancia, «filogenética evolutiva», el contenido de nuestro capítulo refleja el de la citada conclusión. Deseo adelantar aquí, que aún en el supuesto de que la metodología y los resultados aportados por los autores fuesen rigurosamente irreprochables, no podría suscribir sus conclusiones. Entre otras causas, porque no puede asimilarse, sin más, la exhibición de un carácter primitivo por parte de un organismo actual que se compara con otros organismos actuales (y menos aún si, como en el caso que nos ocupa, la mayoría de los

restantes caracteres coexistentes son indiscutiblemente más *modernos*) con la *posición* filogenética del organismo portador del mencionado carácter. Se incidiría en lo que ZIMMERMAN (1959) califica, con un punto de mordacidad, como Filogenia de aluvión (Alluvialphylogenetik). Si, en vez de autoridades, apelamos a los ejemplos, es patente que la heterotrofia es filogenéticamente más antigua que la autotrofia, y, sin embargo, nadie pensará que, en una clasificación filogenética, el género *Boletus* «sea más primitivo» que *Nostoc*, ni que *Viscum* o *Cuscuta* ocupen «una *posición filogenética intermedia*» entre los dos géneros anteriores. Y ciertamente resulta difícil sustraerse a un involuntario sentimiento de sorpresa cuando a renglón seguido de su tan discutible conclusión, los autores añaden a modo de epílogo: «¿No constituye todo ello una apreciable contribución de la Biología Molecular al desarrollo de la Filogenia?» Pues bien, no. Lamento verme obligado a discrepar de nuevo. Y no porque desconfíe de las posibilidades que pueda ofrecer la Biología Molecular para el desarrollo de la Filogenia. (¿Quién podría olvidar, v. g., los trabajos de DIKERSON (1971) sobre la evolución del citocromo C?). Sino precisamente por lo que se encuentra detrás del binomio «todo ello».

Es decir: a) por los supuestos de los que, al parecer, parten los autores, b) por la falta de rigor que entiendo existe en la presentación de los datos y, c) por las conclusiones que pretenden deducir de tales datos.

¿De qué supuestos parten los autores? En primer lugar y pese a denunciar ya en el primer párrafo de su trabajo, cómo en «muchos casos» los estudios filogenéticos han llevado a conclusiones «puramente imaginativas» (supongo que querrán decir *imaginarias*, es decir, que *sólo* tienen existencia en la imaginación del sujeto) y como se ha caído en «un juego deslumbrante sin sentido ni rigor científico», exponen a lo largo de dos páginas, no precisamente modélicas, por lo menos en cuanto al rigor documental se refiere, lo que, para ellos, constituye el estado *actual* de la Sistemática y de la Filogenia. Lo mencionamos porque algunas de sus aseveraciones fundamentales, no tienen otro apoyo que la alusión a un impersonal, «*Se está de acuerdo*», o la recurrencia a un no menos impersonal, «*se dice*». No hay citas ni referencias de quiénes son, los que «dicen» o «están de acuerdo». El resultado es, que vienen a establecer la gran dicotomía que separa a los seres vivos a nivel de los dos antiguos Reinos de la naturaleza; el vegetal y el animal. (Si no es así, carece de sentido afirmar que: «*el microscopio electrónico nos revela la universalidad de las estructuras y orgánulos celulares en cualquiera de los Reinos vivientes.*» Lo que evidentemente implica que los Procarion-

tes no constituyen un Reino, ya que se hallan desprovistos de todo un conjunto de orgánulos celulares que precisamente caracterizan a los Eucariotes). Ello les llevará a plantearse dilemas que bien pudieran haberse ahorrado, ya que tales «dilemas» más que entrañar un verdadero problema filogenético constituyen un capcioso pseudoproblema. Y éstos no tienen fácil solución. («El caso de los Dinoflagelados *nos pone en el dilema* de considerar a unos como vegetales, por tener pared celulósica, cromoplastos y nutrición holofítica, mientras otros, que carecen de los primeros componentes y tienen nutrición completamente holozoica son tenidos por animales»). Por ello, es decir, por su peculiaridad de pseudoproblema los autores se ven forzados a prescindir de las *dilemáticas* características animales o vegetales de los organismos enjuiciados, cuando llegan a la conclusión citada al comienzo de este escrito ¿De dónde puede proceder la visión que, según parece, tienen los autores del estado *actual* de la Filogenia y de la Sistemática? La ya insinuada falta de todo apoyo bibliográfico que no sea el de las citas, en exclusiva, de sus propios trabajos, nos impide dar una respuesta cumplida. Pero aventuramos la hipótesis de que si existe deformación en presentar como un punto de vista especialmente favorecido, lo que hoy estimamos que se halla en *franca regresión*, procede de confundir las clasificaciones de los tratados y cursos introductorios, con las actitudes que mantienen muchos de sus autores cuando libres de constricciones académicas se dedican sin trabas a *hacer* Sistemática filogenética. Ejemplos de tal situación no faltan. De tal suerte es tradicional estudiar, v. g.: los Esquizomicetos o Bacterias en los tratados de Botánica, pero pocos botánicos tendrán al bacteriólogo como compañero de profesión. Igualmente recogen dichos tratados (y pensamos *deberán* seguir así por mucho tiempo) al gran grupo polifilético de los Hongos. Sin embargo, botánicos como ROTHMALER (1948), WHITTAKER (1969), micólogos como AINSWORTH, ALEXOPOULOS (1962), MARTÍN (1955, 1968), biólogos como COPELAND (1956), MARGULIS (1970), E. WILSON (1973), etc., propenden a conceder a los Hongos un «status» taxonómico independiente y de rango equivalente al de los vegetales y animales. A este respecto, y para no alargarnos más en la casuística, creemos tajante y oportuno citar a STAFLEU (1969): «los tiempos en los que reconocíamos dos Reinos, Regnum vegetabile y Regnum Animale, *sobreviven quizá únicamente* en la subdivisión de la Biología de alguna de nuestras universidades», y añade: «Tal división binaria se ha mostrado insostenible». No sería honesto por nuestra parte negar que botánicos tan eminentes, v. g., como KLEIN y

CRONQUIST (1967) todavía siguen manteniendo, *fuera de toda pedagogía*, buena parte del venerable enfoque tradicional. Pero tampoco lo sería, ignorar el elevado precio que tienen que pagar por ello, con la confección de 14 tipos distintos de filogenias parciales, elaborando, para cada una de ellas, conjuntos de criterios taxonómicos diferentes.

Mantenemos, pues, que en el estado *actual* de la biología y en particular de la Sistemática filogenética, hay que partir—y de hecho se parte— de una dicotomía insalvable entre los organismos vivientes. La existencia de organismos procariontes y la de organismos eucariontes. El hiato es irreductible. No hay organismos «intermedios». La clasificación de cualquier ser vivo queda a este respecto desprovista de la menor ambigüedad. O pertenece al primer grupo o pertenece al segundo. Los abundantes caracteres diferenciales entre uno y otro son sobradamente conocidos, pero de pedírsenos personalmente una completa y articulada exposición del repertorio no recataríamos nuestra particular, y discutible, preferencia por MARGULIS (1970). La clasificación en Reinos se establece en la actualidad *a partir* de este corte previo entre los Procariontes y Eucariontes. Los primeros constituyen, de por sí, un único Reino (v. g., Monera). Los Eucariontes se clasifican en tres o cuatro Reinos, según criterios de los distintos autores. En el primer tipo de clasificación no tiene mayor sentido preguntarse si un Protista es animal o vegetal que el que tendría interrogarse si una sonata es literaria o pictórica. En el segundo tal actitud se hace extensiva al status taxonómico de los Hongos que vienen a formar otro Reino.

Ello implica un trasiego de grandes grupos de seres inferiores (que *ya no tienen que ser*, como antes, o bien animales o bien plantas) con el correspondiente reajuste de la clasificación. Evidentemente ésta deja *ipso facto*, de ser pedagógica y pierde todas las ventajas que ofrece una ecléctica clasificación «para fines generales». Pero, aquí y ahora, de lo que se trata es de Filogenia —«parcela difícil de la Biología» (MARGULIS, 1970)— y las clasificaciones adjetivadas de filogenéticas intentan únicamente reflejar el estado de dicha ciencia. No el dar facilidades a quien intenta pasar un examen.

Otro de los supuestos del que parecen partir los autores es que los ribosomas citoplasmáticos de los procariontes son más pequeños (*) (coe-

(*) Entiéndase *cum granum salis*. En el «pequeño» influye no sólo el tamaño, o el peso, sino también la *forma* de la cual depende igualmente la constante de sedimentación S.

ficiente de sedimentación 70 S, integrado por dos subunidades respectivamente de 50 S y 30 S) que los de los eucariontes (80 S con unidades de 60 S y 40 S). Tal principio, y siempre que la exactitud de la segunda cifra de esta constante de sedimentación se tome con cierto escepticismo, sobre todo en lo que respecta a los eucariontes, creemos que corresponde a un hecho lo suficientemente estudiado como para ser aceptado mientras no se demuestren las excepciones. Suponen, además, que el r-RNA de los procariontes alcanza «alrededor» del 63 por 100, mientras que el r-RNA de los eucariontes es menor, quedando «aproximadamente» en un 50 por 100 del peso del ribosoma. Suponen, además, que la ultracentrifugación diferencial en gradiente de sacarosa les va a permitir averiguar el primer extremo. Y que la determinación de la densidad óptica a 260 nm, del extracto perclórico de los ribosomas les llevará a dilucidar el segundo. Sin embargo, cabe decir que la centrifugación diferencial rinde *normalmente* mejores servicios en el caso de los organismos procariontes que en el de los eucariontes. En estos últimos ni la pureza ni la conservación de la estructura de los orgánulos, se consigue siempre fácilmente a través de la extracción y posterior centrifugación en gradiente. Tal es el caso, v. g., de *Acetabularia mediterranea* (*Siphonocladales*), organismo eucariótico, con mitosis y meiosis bien conocidas, diferenciación clara entre las regiones reproductoras y somáticas, etc. *Acetabularia* como el resto de los vegetales eucariontes estudiados tiene dos clases de ribosomas. Los citoplasmáticos, que *se supone* son del tipo 80 S y los ribosomas 70 S presentes siempre en los cloroplastos y mitocondrias. Los ribosomas citoplasmáticos (¿80 S?) son los más claramente observables al microscopio electrónico. Sin embargo, JANOWSKI & col. (1969), tan sólo consiguen confirmar la presencia, por centrifugación en gradiente de sacarosa, de ribosomas *no* citoplasmáticos, tipo 70 S, y sus fragmentos de 50 S y 30 S. Ello conduce a una disyuntiva. O bien la universal existencia de ribosomas citoplasmáticos tipo 80 S en los eucariontes debe rechazarse, o bien el método general de extracción y separación a través de gradiente de sacarosa, no es lo suficiente sensible. Es prematuro concluir que todos los ribosomas de *Acetabularia* sean del tipo procarriótico de 70 S. (Digamos que, aunque así fuese, no por ello *Acetabularia* dejaría de ser un verdadero eucarionte.) Parece más prudente pensar como señala WOODCOCK & BOGORAD (1971), en la necesidad de descubrir mejores métodos para proteger la integridad de los ribosomas durante la extracción, aunque él mismo se ve en dificultades para señalar con

firmeza las nuevas medidas que debieran tomarse. Por otra parte, dicho autor al enjuiciar la coincidencia en los resultados de *más de nueve investigadores*, que al estudiar el r-RNA de *Acetabularia* por la técnica de sedimentación en gradientes de sacarosa (coosedimentación con RNA de *E. coli*), encuentran unánimemente valores de 23 S y 16 S, correspondientes al r-RNA de los ribosomas 70 S (tipo procariótico), dicho autor, repito, denuncia el bajo poder de resolución que posee el método de separación utilizado. La electrofóresis sobre gel de acrilamida, en cambio, parece por el contrario *apuntar*, pese al ensanchamiento de las bandas atribuido a la acción de RNA-asas intracelulares, a la existencia de r-RNA asignable a las fracciones 25 S y 18 S del ribosoma citoplasmático tipo eucariótico de 80 S, acompañados de fracciones 23 S y 18 S que corresponderían a los ribosomas procarióticos de los plastos y mitocondrias.

Mencionamos este ejemplo de *Acetabularia*, por ser alga casi exhaustivamente estudiada, y adecuado por ello para alertar sobre la fiabilidad de los resultados de un método cuando se aplica rutinariamente y, máxime, cuando estos resultados parecen hallarse en contradicción con los restantes datos y caracteres, que han permitido, hasta el presente, situar taxonómicamente un organismo. La posibilidad de notable impurificación de ribosomas tipo 80 S con los 70 S de los plastos y mitocondrias, la acción de las RN-asas intracelulares, etc., debe ser tomada en cuenta y, a ser posible, establecer (que no siempre lo es —y menos con tiempo o medios limitados—) controles capaces de detectar tales interferencias, por lo menos, antes de extraer conclusiones de *largo alcance*: Y pocos negarán que, a estas alturas, concluir en que *Chlamydomonas* y *Cryptomonas* —una cloroficea y una pirrofitas— pueden ocupar una *posición* filogenética *intermedia* entre procariontes y eucariontes, es algo poco menos que revolucionario. Sin embargo, tal aserto para los autores no cobra su fuerza de las curvas de sedimentación, que, a pesar de no manifestar un gran poder de resolución, apoyan la existencia de ribosomas citoplasmáticos del tipo 80 S (aunque no excluyan una mayor o menor impurificación con ribosomas 70 S del tipo procariótico de los orgánulos), *sino* del análisis del r-RNA que *se supone* procedente exclusivamente de los ribosomas citoplasmáticos (80 S). A tal efecto, quisiéramos suponer que aun en el caso, poco probable, de que el r-RNA, analizado fuese puro al 100 por 100, antes de deducir conclusiones habría que comprobar con irreprochable metódica que la cantidad de r-RNA ribosómico asignada a *Chlamydomonas* y *Cryptomonas* por los autores es efectivamente del 63 por 100 (frente a un 50 por 100 para los eucarion-

tes). Pero sabemos (17), que la relación de las bases púricas y pirimídicas, en el RNA ribosómico de *Chlorella*, así como otros varios microorganismos *varia* con la fase del ciclo vital. ¿En tales condiciones la evaluación de la cantidad de r-RNA a partir del valor de las densidades ópticas a 260 nm, puede arrojar resultados estrictamente significativos? Evidentemente no pretendemos considerar la absorbancia del r-RNA como determinada coligativamente por el coeficiente de absorción molecular de las bases componentes (adenina: $13,0 \times 10^3$; guanina: $7,4 \times 10^3$; timina: $8,0 \times 10^3$; citosina: $6,0 \times 10^3$) («Properties of Nuclear Acid Derivates» — Calbiochem, 1964). Es obvia la existencia de hipocromicidad que afecta a los polinucleótidos debido a la adopción de una estructura ordenada. Ello hace que para la multitud de efectos, la absorbancia, v. g., del DNA se considere independiente de las proporciones de las bases integrantes. Ya Chargaff situaba la «constancia» de dicha absorbancia entre los valores de 6.100 y 6.900. Ello permite verificar multitud de valoraciones espectrofotométricas, pero también a partir de tales datos, es fácil ver que en casos, no particularmente favorables, el error relativo capaz de afectar a nuestras determinaciones, podría ser del orden del 13 por 100 ($\frac{6.900 - 6.100}{6.100} \times 100$). Se nos dirá, y con razón, que la

hipocromicidad del RNA es inferior a la del DNA y por ello resultaría sumamente improbable que un 50 por 100 de RNA, de determinada composición en las bases (si se evaluase por vía espectral) nos diese un error del 13 por 100, con lo que podríamos figurarnos que teníamos el 63 por 100 (50 % + 13 %) del RNA. El ejemplo, no diremos que imposible, pero sí inevitablemente rebuscado, tiende solamente a extender un ligero velo de escepticismo sobre la constancia (calidad que los sistemáticos exigen a un «buen carácter») a ese 50 por 100 de r-RNA en los eucariontes. Dicha «constancia» adoptaría siempre el valor de 50 por 100 + E, y es, precisamente, la cuantía de este margen de fluctuación «E», el que debe acreditarse sobre un protocolo lo suficientemente amplio de eucariontes, para poder enjuiciar acerca del valor del porcentaje de r-RNA, a efectos de encasillamiento en sistemática, cuando este porcentaje se determina por vía espectral apelando a una sola longitud de onda (260 nm).

Hemos señalado algunos aspectos de la metódica que, sin invalidarla *a priori*, creemos que deberían inducir a interpretar con cierta cautela algunos resultados obtenidos, los cuales, a nuestro entender, no pueden darse como definitivos. Nos referimos ahora particularmente al porcentaje de r-RNA. A tal efecto, no podemos por menos de señalar el estuor

que nos invade al contemplar las tablas I y II, donde se recogen los resultados correspondientes a los porcentajes de proteína de RNA que componen a los ribosomas citoplasmáticos y a sus correspondientes subunidades. Después de tantas paciencias metódicas, de tanta sofisticación instrumental, de tanta ultracentrífuga, gradientes y espectrofotómetros, aparece esa inquietante preocupación que, a modo de furor por la exactitud, quiere hacer que las cuentas cuadren a cero. Y, en efecto, si sumamos el porcentaje de proteína (valorado por el método de Lowry) al porcentaje de RNA (evaluado *independientemente* por el método espectral), la suma de ambos arroja *exactamente* el 100 por 100. ¡Ni una centésima más ni una centésima menos! Y ello tanto para el ribosoma total como para cada uno de sus componentes. Y así, para cada una de las seis especies estudiadas. Parece como si nos hallásemos en ese «lugar celeste» —en ese *topos uranos* de la República de Platón—, donde habitan asépticas las ideas incontaminadas, en vez de estar instalados en este imperfecto mundo de los fenómenos, en el que la mejor valoración espectral rara vez tiene un error inferior al 2 por 100 y en el que existen extracciones con perclórico que no fijan el 100 por 100 del material, en el que las valoraciones de proteínas de distinta composición fácilmente arrastran errores considerablemente superiores al 5 por 100, y en el que las capas estratificadas en el gradiente de sacarosa contienen con frecuencia un grado de impurificación superior al 10 por 100, como tantas veces demuestra su filtración a través de Sephadex de escaso índice de reticulado, etc.

Este es un aspecto más en el que me veo obligado a discrepar del trabajo citado. No espero que después de su aparición nadie intente arrancar *Chlamydomonas* de su consuetudinario domicilio de las Volvocales, ni a desaparcar a *Cryptomonas* de las Criptomonadales para crear con ellas un nuevo «Abteilung», en aras de una mayor perfección y enriquecimiento de nuestra valentudinaria Sistemática. Tampoco creemos que sean estos los caminos por los que deba transitar la Biología Molecular en ayuda de la Filogenia.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, G. C. — The Fungi. Vol. IV-V — Academic Press, N. Y.
 Alexopoulos, C. J. — 1962 — Introductory Micology — J. Wyley, N. Y.
 Copeland, H. B. — 1956 — The Classification of lower Organisms — Pacific Book, Palo Alto.
 Dikerson, R. E. — 1971 — Journal of Molecular Evolution, 1: 26.

- Goodwin, T. W. & Mercier, E. I. — 1972 — Introduction to Plant Biochemistry — Pergamon Press, 34.
- Janowski, A. & col — 1969 — Biochem. Biophys. Acta, 174: 525.
- Klein, R. & Cronquist, A. — 1967 — Quart. Rev. Biol., 42: 105.
- Margulis, L. — 1970 — Origin of Eucariotic Cells — Yale University Press.
- Martin, G. W. — 1955 — Micología, 47: 779.
- Martin, G. W. — 1968 — The Fungi. Vol III — Academic Press, N. Y.
- Rodríguez López, M., Muñoz Calvo, M.^a L. & Vázquez, D. — 1974 — Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 31: 127.
- Rothmaler, W. — 1948 — Biol. Zentralbl., 67: 242.
- Staffleu, T. A. — 1969 — Taxon, 18: 485.
- Wilson, E. O. — 1973 — Life on Earth — Smaver Ass. Stanford.
- Wittaker, R. H. — 1969 — Science, 163: 150.
- Woodcock, C. L. F. & Bogorad, L. — 1971 — Structure and function of Chloroplasts — Edit. M. Gibbs. Springer-Verlag-Berlin-Heilderger-New York, 116.
- Zimmerman, W. — 1959 — Die Phylogenie der Pflanzen-Gustav Fischer, Stuttgart, 25.
- 1964 — Properties of Nuclear Acid Derivates — Calbiochem, Los Angeles.

Departamento J. C. Mutis
 Inst. Botánico A. J. Cavanilles
 Serrano, 117.
 Madrid