

## **La tecnica del peel negli studi di paleobotanica**

JAMES E. MICKLE, MARIA ROSARIA BARONE LUMAGA\*, ALDO MORETTI\*\*

Department of Botany, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695-7612 U.S.A.; \*Orto Botanico e \*\*Dipartimento di Biologia vegetale, Facoltà di Scienze, Università di Napoli Federico II, Via Foria, 223 - I-80139 Napoli, Italy.

### *Riassunto*

Molte piante fossili degli ambienti paludosi del Carbonifero si sono pietrificate in carbonato di calcio formando fossili detti "coal ball". Le piante preservate nei coal ball possono essere studiate con la tecnica del "peel" ("spellatura") di acetato di cellulosa. Questa tecnica permette di ottenere sezioni che mantengono in loco le pareti cellulari del materiale fossile. In questo lavoro viene descritta tale tecnica, pochissimo nota in Italia.

I coal ball vengono tagliati a fette e le superfici delle fette vengono lucidate e trattate con acido cloridrico diluito per pochi secondi. Questo trattamento espone le pareti cellulari che a differenza del carbonato di calcio sono resistenti all'acido. La superficie delle fette viene bagnata con acetone e su di essa si poggia un foglio di acetato di cellulosa trasparente. Il foglio a contatto con l'acetone diventa gelatinoso ed include la componente vegetale esposta. Quando l'acetone evapora, l'acetato di cellulosa riprende la sua consistenza intrappolando la parte di fossile. Il foglio, rimosso, rappresenta il peel.

Le strutture delle piante incluse nel peel possono essere ora studiate con uno stereomicroscopio oppure piccole parti del peel possono essere osservate al microscopio ottico. Questa tecnica può rappresentare un interessante argomento di esercitazione da inserire nei corsi di biologia generale, paleobotanica, geologia e paleontologia.

### INTRODUZIONE

Le piante dalle quali si sono formati i fossili del Carbonifero sono ben note, in parte perchè molte di esse si sono preservate in particolari formazioni chiamate "coal ball" (massi che si sono organizzati da torba permineralizzata). Il meccanismo di permineralizzazione non è ben conosciuto. Poichè la matrice principale del coal ball è formata da carbonato di calcio, si presume che durante la fossilizzazione il carbonato di calcio

presente in soluzione satura nell'acqua percolante si sia infiltrato negli spazi liberi della torba. In questo modo la struttura tridimensionale della pianta viene preservata prima che questa sia compressa durante le fasi di fossilizzazione. Non si ha pertanto la sostituzione della parte organica delle cellule ma una incrostazione di queste con il carbonato. Spesso durante questo processo sono conservati anche i dettagli strutturali della cellula con risultati paragonabili a quelli ottenibili tramite la fissazione istologica. Ad esempio, in un cono di licopodio estinto, la preservazione era risultata tanto buona da rendere possibile lo studio dei cromosomi (BRACK-HANES & VAUGHN, 1978). I coal ball sono esclusivi degli strati del Carbonifero Superiore (circa 310-280 milioni di anni fa) degli Stati Uniti, della Gran Bretagna, del Belgio e della Russia. I pezzi di coal ball possono avere dimensioni che variano da pochi millimetri a diversi metri e pesare anche diverse tonnellate.

Le piante preservate nei coal ball possono essere studiate con la tecnica del "peel" ("spellatura") di acetato di cellulosa. Questa tecnica permette di ottenere sezioni che mantengono in loco le pareti cellulari del materiale fossile. Tale tecnica, pochissimo nota in Italia, viene descritta nel presente lavoro al fine di proporla per una sua utilizzazione nell'insegnamento universitario in Italia.

#### DESCRIZIONE DELLA TECNICA DEL PEEL

Materiale necessario:

- coal ball (i campioni commerciali sono forniti già tagliati in fette)
- lastra di vetro di almeno 30 x 30 cm
- polvere di carborundo a granulazione fine (660 mesh) e media (220 mesh)
- sassolini di 3-5 mm di diametro
- un contenitore di plastica resistente agli acidi
- un contenitore di plastica, profondo circa 10 cm, resistente all'acetone
- due spruzzette da laboratorio
- fogli di acetato di cellulosa trasparente di circa 0,1 mm di spessore
- lamette da istologia
- forbici

- uno stereomicroscopio oppure una buona lente d'ingrandimento
- HCl diluito (5-10 %)
- acetone
- acqua distillata

Procedura:

Porre una piccola quantità di polvere fine di carborundo (660 mesh) sulla lastra di vetro e bagnare la polvere con acqua fino a formare una fanghiglia. Strofinare la superficie della fetta di coal ball sulla lastra premendo moderatamente per circa un minuto fino a quando la superficie della fetta appare perfettamente levigata. Allontanare la polvere dalla fetta con acqua corrente utilizzando, se necessario, una spazzola non abrasiva.

Nei casi in cui la superficie della fetta è molto rugosa utilizzare preliminarmente polvere di carborundo di dimensione media (220 mesh).

Sospendere per 10-15 secondi la fetta nell'acido cloridrico diluito (versato nella bacinella resistente agli acidi in modo da riempirla fino ad un livello di 2-3 cm) immergendo solo la parte levigata. Lavare, quindi, la superficie trattata con acqua di fonte, facendo attenzione a non toccare la superficie trattata del fossile. Con questa operazione circa 15  $\mu\text{m}$  di carbonato di calcio risultano rimossi dalla superficie. Il materiale vegetale è ora esposto sulla superficie di carbonato di calcio. Coal ball di provenienza diversa richiedono tempi di immersione in acido cloridrico leggermente diversi. E' opportuno procedere con prove preliminari allo scopo di individuare il tempo ottimale di trattamento.

Il coal ball viene ora asciugato appoggiandolo obliquamente nel contenitore resistente all'acetone preventivamente riempito con i sassolini; per accelerare questa fase la superficie del coal ball può essere bagnata con acetone soffiandovi contemporaneamente sopra.

La fetta va ora posizionata orizzontalmente nello stesso contenitore con la superficie trattata verso l'alto bagnandola abbondantemente con acetone. Tagliare un foglio di acetato di cellulosa in modo da ottenere un pezzo di poco più grande della superficie della fetta di coal ball e poggiarlo subito sulla superficie bagnata con acetone. Al fine di evitare la formazione di bolle d'aria è consigliabile effettuare tale operazione iniziando da un lato della fetta e lasciando che il foglio si poggia

delicatamente sulla superficie. Lasciare il foglio di acetato almeno 20-30 minuti sulla superficie del fossile per permettere la completa evaporazione dell'acetone. Il peel è pronto quando, terminata l'evaporazione dell'acetone, non è più freddo al contatto.

Rimuovere il peel sollevandolo delicatamente. Se il peel non si stacca facilmente si può far uso di una lametta. La difficoltà nel distacco del peel può essere dovuta ad una immersione troppo prolungata in acido cloridrico.

Il peel, che appare rugoso, può essere appiattito ponendolo sotto un peso per qualche giorno. Esso può essere conservato spillandolo su di un cartoncino bianco e può essere studiato usando uno stereomicroscopio oppure una lente d'ingrandimento.

Una volta che il foglio di acetato di cellulosa è rimosso, la fetta di coal ball può essere sottoposta ad un nuovo ciclo di preparazione per ottenere un nuovo peel. La procedura può essere ripetuta molte volte ottenendo una serie di sezioni delle parti delle piante incluse nel coal ball.

Il peel può essere facilmente montato su un vetrino per microscopia per l'osservazione dei dettagli cellulari.

#### PREPARAZIONE DEL PEEL PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO OTTICO

Materiale necessario:

- vetrini da microscopia
- pinzette
- balsamo del Canada

Procedura:

Tagliare la porzione del peel contenente la zona da osservare al microscopio, facendo attenzione che il pezzo ritagliato rientri di 2-3 mm nei margini del vetrino coprioggetto.

Eventuali residui minerali presenti sul peel vanno eliminati perchè creerebbero problemi durante l'osservazione. A tale scopo si consiglia di trattare il pezzo di peel tagliato con HCl al 10% per 30 min. Tale operazione può essere effettuata in una capsula Petri in cui il pezzo viene posto con il lato rugoso rivolto verso l'alto per assicurare la completa liberazione dai residui minerali. Al fine di prevenire la formazione di bolle che possono

bloccare la reazione è necessario smuovere continuamente il peel.

Lavare accuratamente il peel trasferendolo dall'acido cloridrico in un contenitore con acqua distillata. Asciugare il peel tra due fogli di carta caricando il tutto con un peso per prevenire l'accartocciamento del peel.

Il peel, una volta asciutto, può essere montato; a tal fine mettere una goccia o due di balsamo del Canada al centro di un vetrino e poggiarvi il pezzetto di peel con il lato rugoso rivolto verso il basso. Ricoprire il tutto con un vetrino coprioggetto facendo attenzione ad evitare la formazione di bolle d'aria. Il vetrino, con un piccolo peso su di esso per evitare l'arrotondamento del peel, viene posto su una piastra calda oppure in una stufetta ad una temperatura di circa 40 °C per alcuni giorni. Il vetrino una volta asciutto è pronto per l'osservazione al microscopio.

#### UTILIZZAZIONE DELLA TECNICA DEL PEEL

L'uso della tecnica del peel può essere un importante esercizio da inserire nei corsi di biologia generale, botanica, paleobotanica e geologia. L'uso di questa tecnica arricchisce lo studente di esperienza sia in campo chimico (manipolazione di prodotti chimici) sia in campo biologico. E' interessante, inoltre, notare che gli studenti possono portare via il peel per eventuali approfondimenti. Come dimostrazione in laboratorio tale tecnica può rendere i fossili più "reali" e rappresenta un ottimo modo per introdurre gli studenti al mondo della paleobotanica.

Gli argomenti legati a queste osservazioni sono principalmente quelli legati alla flora palustre rappresentata nei coal ball. Questo tipo di flora è molto diversa da quella attuale sebbene queste piante siano classificate in ordini che comprendono anche piante viventi. Questi ordini sono attribuibili ai seguenti cinque gruppi: i licopodi (Lycophyta), le felci (Polypodiophyta), le cordaitine (Cordaitophyta, un gruppo di pre-conifere primitive), le pteridosperme (Lyginopteridophyta, un gruppo primitivo di piante a seme) e gli equiseti (Equisetophyta).

Con lo studio della flora delle paludi del Carbonifero si ottiene parallelamente un altro risultato: un approccio alla paleoecologia. A tal riguardo, per studiare la struttura delle comunità della flora delle paludi del Carbonifero possono essere utilizzate tecniche quantitative. Per una di queste può essere utilizzato un foglio di plastica trasparente che abbia una grigliatura di 1 cm di lato che viene poggiato sulla superficie del

peel. Per le specie rappresentate nel peel la biomassa è calcolata in base all'area occupata. I dati ottenuti per le varie biomasse possono essere confrontate tra le varie località di provenienza dei coal ball o tra campioni dello stesso sito.

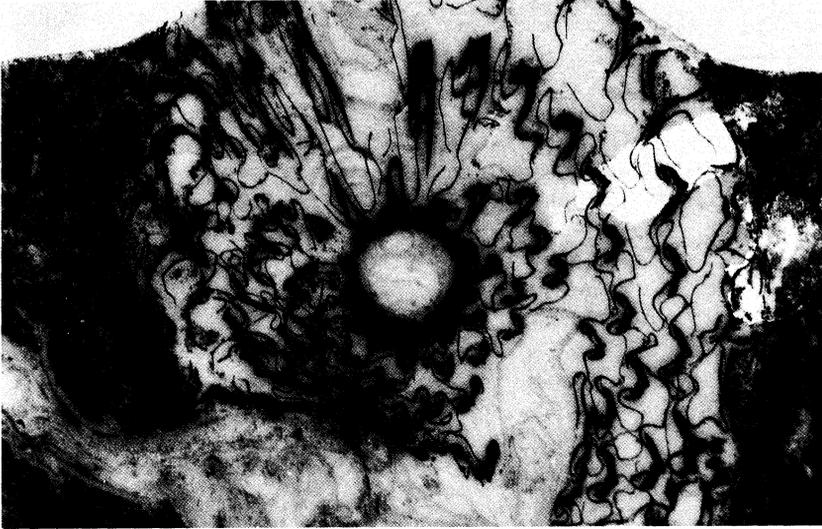


Fig. 1 - Peel mostrante una sezione trasversale di *Lepidostrobos oldhamus* Williamson.



Fig. 2 - Peel mostrante una sezione tangenziale di *Lepidostrobos oldhamus* Williamson.

*Abstract*

Many fossil plants of the Carboniferous Period coal swamps were petrified in calcium carbonate masses called coal balls. Plants preserved in coal balls are studied by the cellulose acetate peel technique which "sections" and holds cell walls in place. In this paper is presented the coal ball studying technique.

The coal ball is cut into slabs. The slab faces are ground smooth and etched in dilute hydrochloric acid for a few seconds. The etched surface is flooded with acetone and cellulose acetate is placed on the flooded surface. When the acetone evaporates, the acetate hardens, and the resulting "peel" can be easily removed. Portions of the peel can be cut out and mounted on microscope slides. Using the cellulose acetate peel technique as a learning exercise can be a valuable addition to classes in biology, paleobotany, earth science, and paleontology.

BIBLIOGRAFIA CONSIGLIATA PER APPROFONDIRE ARGOMENTI RELATIVI ALLO STUDIO DEI COAL BALL E ALLA TECNICA DEL PEEL

- DIMICHELE W.A. AND WING S.L., 1988. *Methods and applications of plant paleoecology*. The Paleontological Society, Special Publication N. 3. University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, U.S.A.
- JOY K.W., WILLIS A.J. AND LACEY W. S., 1956. *A rapid cellulose peel technique in paleobotany*. *Annals of Botany*, new series, 20: 635-637.
- PHILLIPS T.L., AVCIN M.J. AND BERGGREN D., 1976. *Fossil peat from the Illinois Basin: a guide to the study of coal balls of Pennsylvanian age*. Educational Series II, Illinois State Geological Survey, Urbana, Illinois, U.S.A.
- STEWART W. N. AND TAYLOR T.N., 1965. *The peel technique*. In: Kummel B. AND Raup D. (Eds.). *Handbook of paleontological techniques.*, Freeman, San Francisco, California, U.S.A.
- STEWART W.N. AND ROTHWELL G.W., 1993. *Paleobotany and the evolution of plants*. Cambridge University Press.
- TAYLOR T.N. AND TAYLOR E.L., 1993. *The biology and evolution of fossil plants*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.
- WING S.L. AND DIMICHELE W.A., 1992. *Ecological Characterization of fossil plants*. In: Behrensmeier A.K., Damuth J.D., DiMichele W.A., Potts R., Sues H.D., AND Wing S.L. (Eds.). *Terrestrial ecosystems through time: evolutionary paleoecology of terrestrial plants and animals*, The University of Chicago Press, Chicago, U.S.A.

BIBLIOGRAFIA

- BRACK-HANES S.D. AND VAUGHN J.C., 1978. *Evidence of Paleozoic chromosomes from lycopod microgametophytes*. *Science*, 200: 1383-1385.

Finito di stampare nel marzo 1996.