

## PRESENCIA DE HIFAS DE *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) ACH. EN LOS TEJIDOS CAULINARES DE *BETULA ALBA* L.

M.A. MONSO SENABRE<sup>1</sup>, M.T. SOLAS ALADOS<sup>2</sup> & B. FERNANDEZ RUIZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal, EUIT Forestal, Universidad Politécnica. 28040 Madrid, España. <sup>2</sup>Dpto. de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense. 28040 Madrid, España.

**RESUMEN:** En el presente trabajo se estudia el mecanismo y alcance de la penetración de las hifas de un líquen epífito, *Evernia prunastri* (L.) Ach., en ramas de *Betula alba* L. Se pretende averiguar la relación entre el ataque químico de las sustancias líquénicas con el metabolismo foliar.

*Palabras clave:* *Evernia prunastri*, Líquen epífito, *Betula alba*, ramas.

**SUMMARY:** The present research describes the results of the mechanisms and reach penetration study of an epiphytic lichen, *Evernia prunastri* (L.) Ach. into the branches of *Betula alba* L. It's a question of to discover its relation between chemical attack of the lichen substances with foliate metabolism.

*Keywords:* *Evernia prunastri*, epiphytic lichen, *Betula alba*, branches.

### INTRODUCCION

El hecho de que los líquenes epífitos puedan ser considerados como parásitos facultativos, es decir, de vida saprofítica aprovechando la materia orgánica del substrato leñoso, o bien que los líquenes epífitos sean organismos patógenos, capaces de causar daño a su fitóforo, es en la actualidad tema de discusión. BRODO (1973), en una revisión sobre este tema, considera que los líquenes epífitos pueden penetrar en distintos grados en los tejidos del fitóforo. ESTEVEZ & al. (1980), demuestran una extensa penetración de las hifas del líquen epífito *Evernia prunastri* (L.) Ach. en ramas caídas de *Fagus sylvatica* L. llegando incluso hasta los vasos conductores del xilema. Asimismo, ASCASO & al. (1980), han estudiado la penetración del mismo líquen en ramas vivas de *Quercus pyrenaica* Willd. y de *Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp. ORUS & ASCASO (1982) obtienen idénticos resultados de un acceso activo del líquen al xilema y,

por tanto, al propio metabolismo del fitóforo. ASCASO (1985) y HAWKSWORTH (1988) califican de observación fascinante, cuyo significado no es bien conocido, el que las hifas de ciertos líquenes puedan pasar a través de la corteza hacia los vasos del xilema.

## MATERIAL Y METODOS

Para el estudio de la penetración de los talos liquénicos en el fitóforo, se recolectaron ramas vivas de *Betula alba* L. de pequeño diámetro densamente cubiertas de talos de *Evernia prunastri* (L.) Ach. y con señales de desvitalización, en el abedul del monte "La Dehesa del Alcalde", en la vertiente Norte de la Sierra de Ayllón (Segovia), UTM 30TVL6263, durante los meses de primavera y otoño de años consecutivos: 1988 y 1989.

En el estudio con microscopía óptica se siguió el método usado por GRAM & JØRGENSEN (1953). Las muestras se obtenían cortando fragmentos de las ramas, de forma aproximadamente cúbica, en los puntos de inserción del líquen. Estas muestras eran primeramente sometidas a un pretratamiento para eliminar el aire de los tejidos, colocando las muestras de madera en un tubo de ensayo con etanol 96%, que se introduce en un kitasato. A continuación los fragmentos de madera se mantienen en agua para que ésta sustituya al alcohol de los tejidos.

Se realizó el corte de madera mediante un microtomo de congelación Shibuya Optical N0.535. Con este aparato se obtenían secciones transversales de 10 $\mu$  de las ramas en los puntos de inserción del líquen y a diferentes distancias de los mismos. Para proceder a la tinción, se preparó el colorante disolviendo 0,5 g. de Fast green FCF y 1,5 g. de safranina en alcohol al 60%, y añadiendo después unas gotas de ácido clorhídrico; dicho colorante se dejaba reposar dos días; las secciones se mantenían en el colorante durante tres minutos, al cabo de los cuales se procedía a la diferenciación y a la deshidratación, que tenía lugar mediante tres cambios de alcohol absoluto de tres minutos cada uno. El montaje de las secciones se realizó en Euparal.

Para el estudio al microscopio electrónico de transmisión, las muestras se tallaron en forma de cubos en la zona de inserción del líquen. La fijación y la deshidratación se realizó según el método descrito por ASCASO & GALVAN (1976). El resto de las operaciones se hicieron de acuerdo con el método de ASCASO & *al.* (*l.c.*). Las inclusiones se realizaron en Spurr Tipo B (duro), (SPURR, 1969). Las muestras se introdujeron en moldes planos de silicona y fueron convenientemente embebidas en resina; después de polimerizar a 70°C durante 24 horas, los bloques se cortaron. Los cortes ultrafinos se realizaron con un ultramicrotomo Reichert OmU2 y se montaron para microscopio electrónico. Se tiñeron en citrato de plomo durante 10 minutos conforme el método de REYNOLDS (1963), y se observaron al microscopio electrónico Philips 300.

Las muestras de ramas de abedul cubiertas de líquen, también se procesaron para su observación al microscopio electrónico de barrido. Previamente se criofijaron en N<sub>2</sub> líquido para facilitar su fragmentación, durante 2 minutos, y se desecaron completamente en un liofilizador con silicagel. Seguidamente se recubrieron con una capa muy fina de una sustancia conductora como el oro-paladio, y se examinaron al microscopio electrónico ISi-SX-25.

## RESULTADOS

Con microscopía óptica, se observó como las hifas liquénicas se extienden debajo de la peridermis, separándola de las capas subyacentes por presión mecánica ejercida por la masa de hifas y aplastando las células del súber (Fig. 1A). También se pudo observar como algunas hifas profundizan verticalmente en la rama hacia los tejidos vasculares. En algunos casos las paredes celulares han sido eliminadas. Pueden encontrarse en ciertas ocasiones grupos de células de la felodermis rodeadas por una masa de hifas, aunque no se ha podido detectar la progresión en los espacios intercelulares.

Las observaciones al microscopio electrónico de transmisión de la penetración del líquen en su fitóforo, nos consolidan los resultados interpretados con anterioridad. Se localiza en la corteza del abedul, hifa que llega a las células suberosas y alcanza las capas más internas de la peridermis que conservan una integridad más completa, mostrando su penetración entre paredes celulares adyacentes (Fig. 1B). Este estudio de cortes transversales del tallo permite reconocer la ultraestructura de las hifas liquénicas como es, el espesor de las paredes de las células de las diferentes zonas hifales.

Con microscopio electrónico de barrido se observa, inserciones liquénicas que coincide con lo observado con microscopio óptico, es decir, masa de hifas que penetra en la corteza, rodean la peridermis y la separan del floema (Fig. 1C). Igualmente se observa zonas celulares desaparecidas por la masa de hifas liquénicas.

La penetración de hifas liquénicas en el tejido xilemático es muy destacable tanto a nivel de microscopía óptica como a nivel de microscopía electrónica.

Con microscopio óptico se observa, que las hifas liquénicas aisladamente o en pequeños grupos, se dispersan progresando en los radios y parénquima longitudinal, fibras y vasos xilemáticos hasta situarse en el interior de los mismos (Fig. 2A). Algunas hifas progresan por los radios leñosos hasta llegar al interior de los vasos y fibras (Fig. 2B). La penetración del líquen en la madera de las ramas de abedul fue observada con toda evidencia como las hifas liquénicas adosadas a las paredes celulares interiores de un vaso leñoso (Fig. 2C).

Todos estos resultados relacionados con la penetración de hifas liquénicas en el xilema, se constataron con el microscopio electrónico de transmisión (Figs. 3A, 3B y 4A). En cortes transversales del cilindro vascular se observan, hifas liquénicas en el interior de elementos celulares del xilema, adosadas a sus paredes, y en la proximidad de las punteaduras cuando se trata de un vaso. Se aprecia hifa en sección transversal en el interior de un vaso conductor, cercana a una punteadura (Fig. 3A). Asimismo, aparecen varias hifas en el interior de fibras del xilema (Fig. 3B). Se destaca en este caso, la capacidad del líquen para atravesar y romper las paredes celulares del fitóforo. El paso de hifas liquénicas a través de una punteadura del vaso leñoso del abedul es, en esta situación, más notable que las observaciones anteriormente consideradas (Fig. 4A).

Con microscopio electrónico de barrido, se analizó los cortes transversales de ramas de abedul, donde la aparición de hifas liquénicas en el interior de los vasos conductores, es similar a la descrita con microscopio óptico. Si bien pueden ser observadas desarrollándose a lo largo del interior de los vasos leñosos (Fig. 4B).

Las hifas que aisladamente o en conjunto se dispersan, evolucionan en los radios hasta alcanzar los elementos celulares de los vasos conductores e invadir en ocasiones, las células más internas de la médula (Fig. 4C).

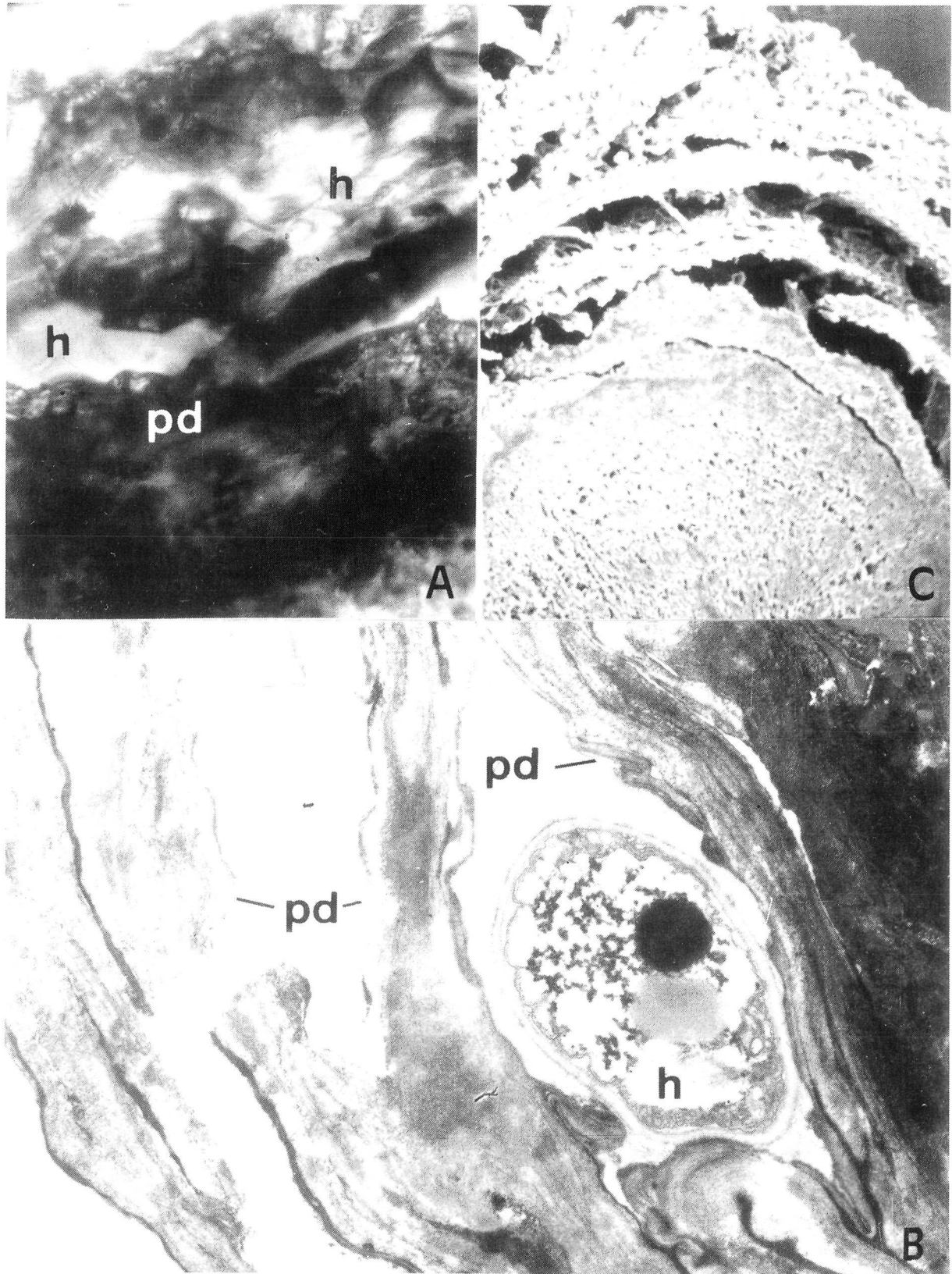


Figura 1. Corte transversal de la corteza de *Betula alba*. A: Hifas de *Evernia prunastri* (x500). B: Microfotografía electrónica de hifa de *E. prunastri* (x13.000). C: Microfotografía electrónica de barrido, mostrando masas de hifas desgarrando los tejidos corticales (x40). **h**: hifa; **pd**: peridermis.

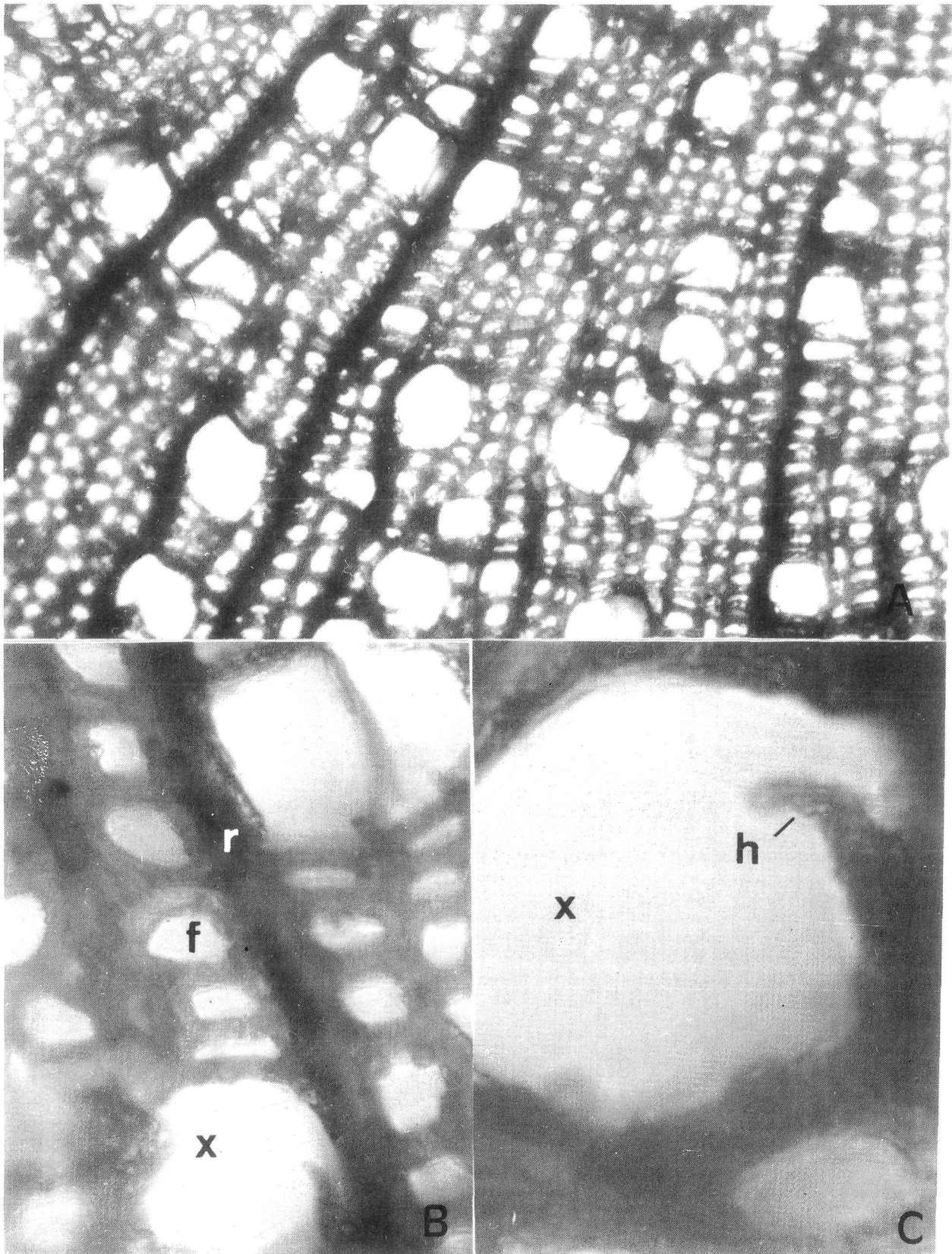


Figura 2. Corte transversal del leño de *Betula alba*. A: Hifas de *Evernia prunastri* en el interior de las células conductoras (x700). B: Radios invadidos por hifas de *E. prunastri* hasta llegar al interior de vasos y fibras (x1.400). C: Detalle de las hifas de *E. prunastri* (x1.700). f: fibra; h: hifa; r: radio; x: xilema.

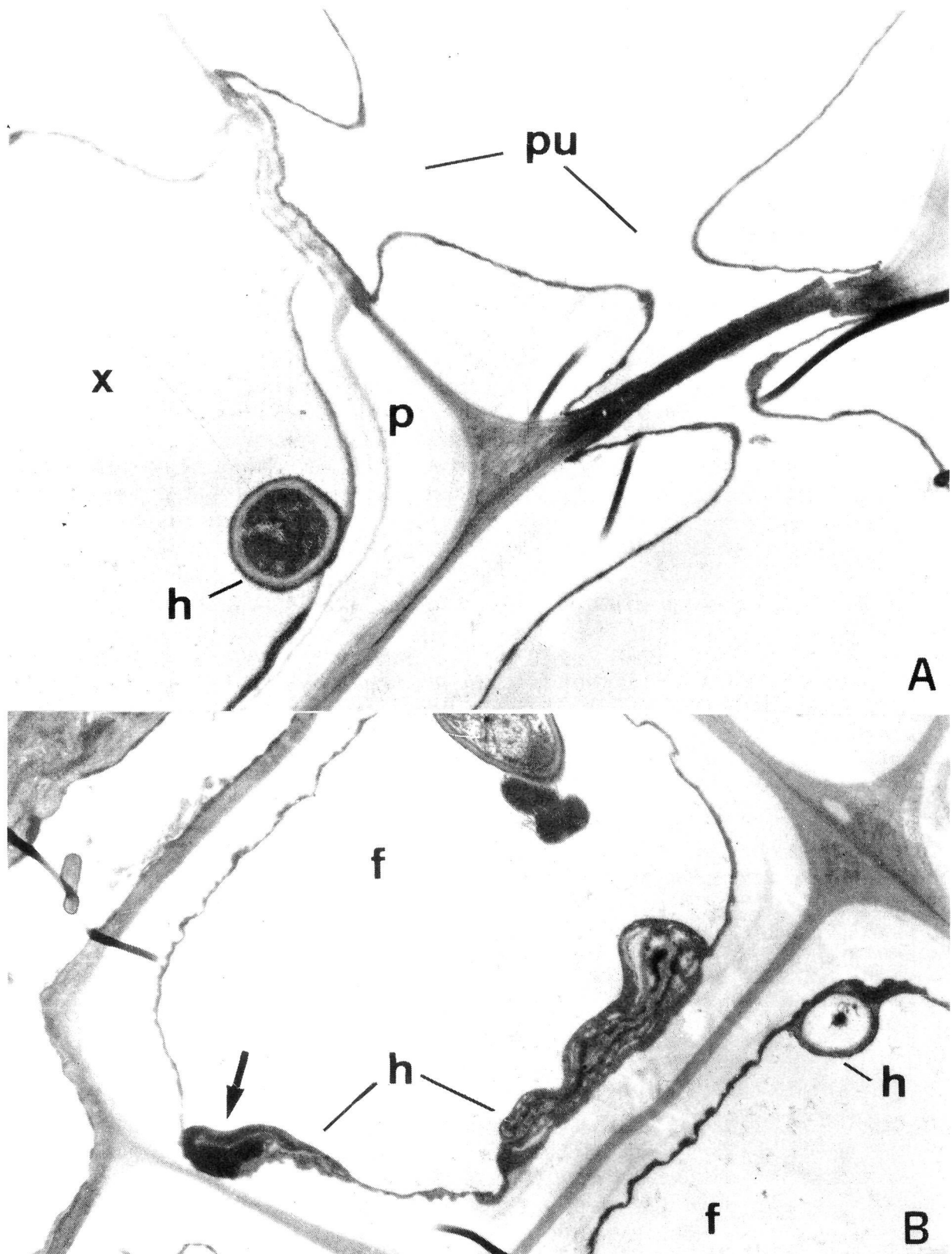


Figura 3. Corte transversal del leño de *Betula alba*. A: Microfotografía electrónica de hifa de *E. prunastri* en el interior del vaso, adosada a la pared y en la proximidad de una punteadura (x11.000). B: Grupo de hifas en el interior de fibras y atravesando la pared (x6.000). **f**: fibra; **h**: hifa; **p**: pared; **pu**: punteadura; **x**: xilema.

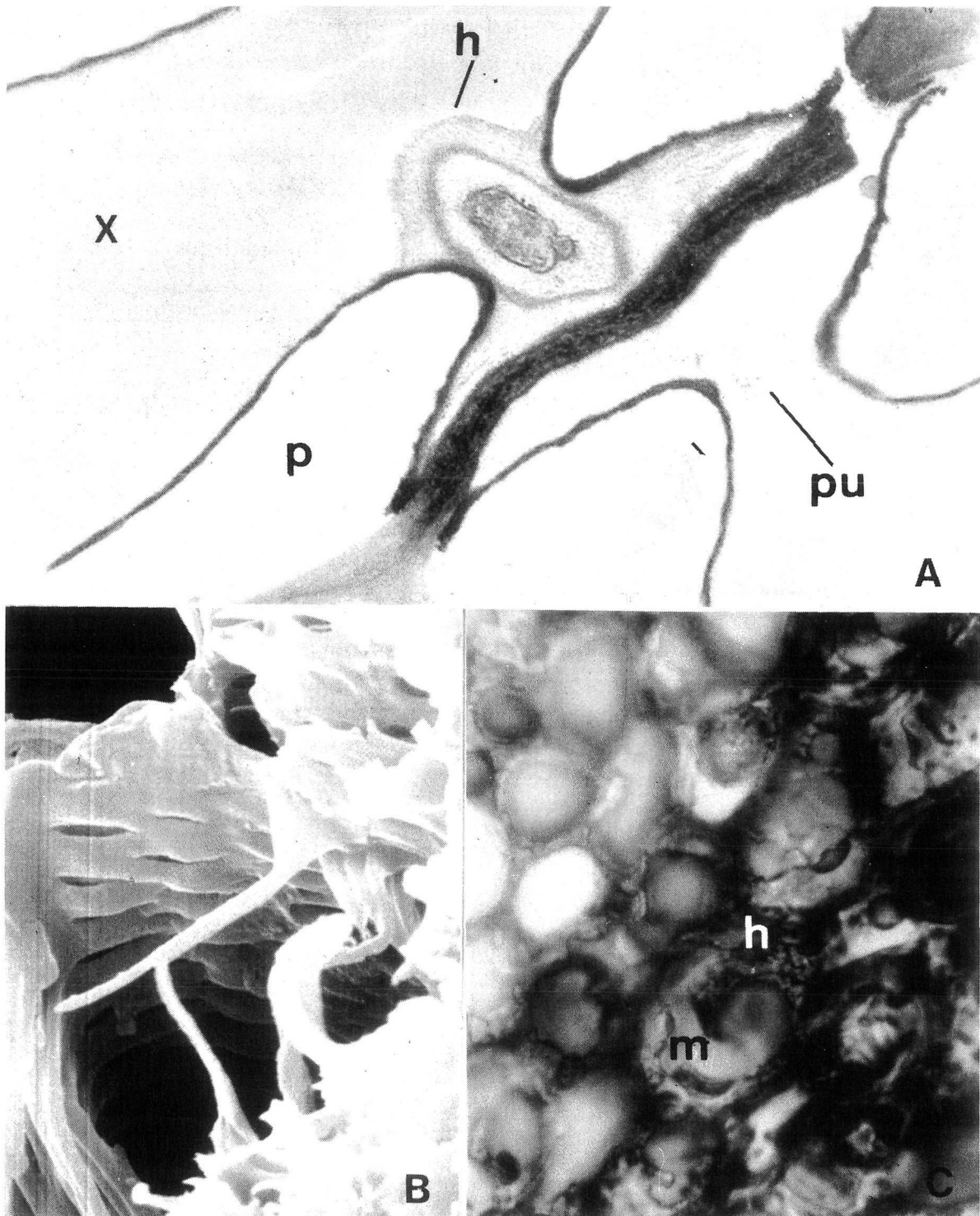


Figura 4. Corte transversal del leño y de la médula de *Betula alba*. A: Microfotografía electrónica de hifa de *E. prunastri* pasando a través de una punteadura de la pared de un vaso leñoso (x23.000). B: Microfotografía electrónica de barrido, vaso con hifas de *E. prunastri* que penetran por las punteaduras de la pared (x3.500). C: Acceso de hifas líquénicas a la médula. **h**: hifa; **p**: pared; **pu**: punteadura; **x**: xilema; **m**: médula.

## DISCUSION

Las observaciones microscópicas estudiadas en el presente trabajo, ponen de manifiesto que el líquen epífito *Evernia prunastri* creciendo sobre ramas vivas de *Betula alba* (abedul), es capaz de invadir tejidos corticales y vasculares del fitóforo. La ruptura de las paredes celulares por hifas líquénicas y su paso a través de las punteaduras de los vasos conductores, indican un ataque químico de las sustancias líquénicas ligado al proceso de penetración.

En principio se consideraba que el crecimiento de las hifas líquénicas quedaba restringido a las capas de la peridermis, pero por simple presión mecánica a través de los espacios intercelulares, sin romper ni traspasar las paredes celulares (LINDAU, 1904). Investigaciones posteriores (PORTER, 1917), demostraron que las hifas líquénicas penetran a través de la corteza e incluso a través del floema hasta alcanzar el cambium.

En nuestras observaciones se comprueba, que el líquen epífito *Evernia prunastri* penetra activamente a través de los distintos tejidos corticales, desgarrándolos. Sin embargo, así como en ramas muertas de haya (*Fagus sylvatica* L.) ESTEVEZ & al. (l.c.) encontraban masas de hifas líquénicas invadiendo el xilema, cuando se trata de ramas de árbol que aún conservan cierta vitalidad, como es nuestro caso en *Betula alba*, las masas de hifas no son capaces de progresar hacia el interior del tejido, teniendo entonces lugar la penetración a nivel de hifas que, aisladamente o en pequeños grupos, se dispersan progresando en el interior de vasos, fibras y radios leñosos, y por éstos llegar en ocasiones hasta las mismas células de la médula. Esta situación concuerda con las observaciones ultraestructurales realizadas en rebollo (*Quercus pyrenaica* Willd.) por ASCASO & al. (l.c.).

De nuestro estudio realizado, también se confirma la capacidad de las hifas líquénicas de perforar paredes celulares del fitóforo, aspecto ya demostrado en encina (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) por ORUS & ASCASO (l.c.).

En el presente trabajo, se aporta la detección de hifas del líquen epífito *Evernia prunastri* en el interior de células conductoras del tallo de la especie arbórea *Betula alba*. Las hifas al pasar a través de las punteaduras de las paredes de un vaso leñoso, posiblemente interfieren el transporte de la savia xilemática, con la consiguiente alteración en el metabolismo del fitóforo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento a la doctora C. Ascaso (Instituto de Edafología y Biología Vegetal, C.S.I.C. Madrid) por la ayuda prestada en la microscopía electrónica de transmisión.



## BIBLIOGRAFIA

- ASCASO, C. (1985): In *Surface Physiology of Lichens* (Vicente, C., D.H. Brown & M.E. Legaz, eds.), p. 97. Complutense University Press, Madrid.
- ASCASO, C. & J. GALVAN (1976): The ultrastructure of the symbionts of *Rhizocarpon geographicum*, *Parmelia conspersa* y *Umbilicaria pustulata*. Growing under Dryness Conditions. *Protoplasma* 87: 409-418.
- ASCASO, C., C. GONZALEZ & C. VICENTE (1980): Epiphytic *Evernia prunastri* (L.) Ach.: Ultrastructural Facts. *Cryptog. Bryol. Lichenol.* 1: 43-51.
- BRODO, I.M. (1973): *Substrate Ecology*. En "The Lichens" (V. Ahmadjian & M. E. Hale, eds.) Academic Press, New York, London pp. 401-441.
- ESTEVEZ, M.P., M.I. ORUS & C. VICENTE (1980): Estudios morfológicos sobre *Evernia prunastri* de vida saprofítica. *Cryptog. Bryol. Lichenol.* 1: 33-41.
- GRAM, K. & E. JØRGENSEN (1953): An easy, rapid and efficient method of counter-staining plant tissues and hyphae in wood-sections by means of Fast green or Light green and Safranin. *Friesia IV* 4-5: 262-266.
- HAWKSWORTH, D.L. (1988): *Coevolution of Fungi with Algal and Cyanobacteria in Lichen Symbiosis*. En: *Coevolution of Fungi with plant and animals*. Academic Press. pp. 125-148.
- LINDAU, G. (1904): Die Beziehungen der Flechten zu den Pilzen. *Hedwigia* 43: 195-204.
- ORUS, M.I. & C. ASCASO (1982): Localización de hifas líquénicas en los tejidos conductores de *Quercus rotundifolia* Lam. *Collectanea Botánica* 13(1): 325-338.
- PORTER, L. (1917): On the attachment organs of the common corticolous Ramalinae. *Proc. Roy. Irish Acad. Sect. B* 34: 205-211.
- REYNOLDS, S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 200-211.
- SPURR, A.R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26-31.

(Aceptado para su publicación el 30.X.1991)