

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL POR CRIOFRACTURA DE LOBARIA PULMONARIA (L.) HOFFM.

C. Ascaso y S. Rapsch *

RESUMEN

Los estudios ultraestructurales en talos liquénicos se han incrementado en los últimos años. La técnica de criofractura aborda la posibilidad de estudiar ultraestructuralmente material procedente de talos liquénicos sin necesidad de que éstos sean sometidos a fijación química y a inclusión en resinas. Recientemente la técnica de criofractura se ha convertido en una de las técnicas preparativas más importantes para estudios ultraestructurales, fundamentalmente a nivel de membrana.

Aunque ésta técnica presenta un método físico independiente para elucidar la ultraestructura liquénica, en este caso se ha completado el estudio de **Lobaria pulmonaria** con observaciones paralelas por los métodos convencionales de microscopía electrónica de transmisión.

Dado que la membrana del ficobionte parece estar implicada en su totalidad en el proceso de transferencia de metabolitos, se ha hecho especial hincapié en la observación de las partículas intramembranas IMPs y de las invaginaciones del plasmalema.

SUMMARY

Freeze-etching ultrastructural study of Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm.

The ultrastructural studies on lichens have been increased during the last years. The freeze-etching technique deals with the possibility of studying ultrastructurally, material coming from lichen thallus without any need that these will be submitted to a chemical fixation and to an inclusion on resins. Recently, the technique of freeze-etching has become one of the preparative techniques more important to ultrastructural studies fundamentally to a membrane level.

Though, this technique presents a physical method independently to elucidate the ultrastructure of lichen, in this case, this study has been completed with parallel observations by the conventional methods of Transmission Electron Microscopy.

As the phycobiont's membrane seems to be involved in its totality in the process of transference of metabolites, an special remark on intramembrane particles (IMPs) and on the ridges of the plasmalemma, was made.

* Instituto de Edafología y Biología Vegetal. Serrano n.º 115 bis. Madrid-6.

INTRODUCCION

Hasta 1976 la ultraestructura de los líquenes había sido documentada en unas 20 publicaciones (PEVELING, 1976). A partir de esa fecha se han seguido realizando investigaciones en la estructura fina de los líquenes y se han resuelto, en parte, los problemas que la fijación e inclusión de talos líquénicos tenía planteados (ASCASO y GALVAN, 1976; ASCASO, 1978; BOISSIERE, 1979; HONEGGER, 1980; SILVA-PANDO y ASCASO, 1982; BELLEMERE y LETROUIT-GALINO, 1982; AHMADJIAN, 1982).

Sucede sin embargo que la fijación química puede inducir artefactos en el material biológico. Además el estudio por cortes ultrafinos no permite la observación de las membranas biológicas en toda su extensión.

La membrana total del ficobionte tiene una gran importancia en el proceso de transferencia de metabolitos (HESSLER y PEVELING, 1978). SMITH (1980) muestra que muchas cuestiones sobre interrelaciones nutricionales en líquenes no tienen respuesta y AHMADJIAN, en un trabajo muy reciente (1982), resalta el hecho de que cuestiones tales como de rápida es la translocación de carbohidratos entre alga y hongo, a cual es la causa y a como ocurre están sometidas únicamente a hipótesis y con frecuencia a conjeturas. Por ello es de gran importancia realizar investigaciones sobre las membranas de los simbioses líquénicos.

La técnica de Freeze-etching (criofractura) puesta a punto por MOOR y MÜHLETHALER (1963) permite la observación de las caras de fractura de las membranas celulares. En estas caras de fractura aparecen partículas intramembranas (IMPs) que son glicoproteínas o complejos de proteínas y lípidos distribuidos en la bicapa de lípidos (BRANTON, 1966; SINGER y NICOLSON, 1972; VERKLEIJ y VERVERGAERT, 1978). Los cambios en la densidad y diámetro de las IMPs están relacionados con alteraciones en el estado fisiológico del talo líquénico (PEVELING y ROBENEK, 1980; RAPSCH y ASCASO, 1983).

MATERIAL Y METODOS

Talos de *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm fueron recogidos en el mes de Abril en el Hayedo de Montejo de la Sierra (Madrid).

Los talos fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión por la técnica convencional que implica la fijación, deshidratación e inclusión de los talos líquénicos (ASCASO y GALVAN, 1976) y por la técnica de criofractura. Para esta técnica se siguió el esquema mostrado en la figura 1.

Las réplicas fueron obtenidas con un minuto y medio de «etching» a -100°C . Se utilizó un aparato Polaron Modelo E.7900.

Para la observación y obtención de las microfotografías se utilizó un microscopio electrónico Philips 300.

El diámetro y densidad de las partículas ha sido determinado con un Analizador de Imágenes MOP-VIDEOPLAN, de la marca Kontron.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ultraestructura del ficobionte

Por corte ultrafino la zona gonidial del talo de *L. Pulmonaria* presenta el aspecto mostrado en la fig. 2a.

En la fig. 2b, se observa un alga *Mycrocystis* individualizada y a mayores aumentos que muestra de afuera a adentro: la pared, el plasmalema, el citoplasma donde son evidentes mitocondrias, dos cloroplastos uno de ellos cortado en su zona media y donde se observa los plastoglobulos, y también lateralmente situado el núcleo.

Cuando se aplica la técnica de criofractura, según el esquema de la figura 1, a un talo líquénico la observación que se tiene del ficobionte es la que muestra la figura 2c. Se trata únicamente la réplica de platino y carbono obtenida una vez el alga ha quedado fracturada en su zona media.

Se distinguen claramente las lamelas tilacoidales, que aquí quedan escalonadas por efecto de la fractura. Pueden observarse claramente en ellas las partículas de que están formadas. El aspecto y distribución

de las partículas intratilacoidales es de gran importancia para todos los estudios relacionados con la fotosíntesis en el componente algal. En la figura 2c, además del cloroplasto, se observa un dictiosoma del aparato de Golgi con su sistema de cisternas y vesículas. La figura 2d, perteneciente a otra microfotografía, nos muestra el plasmalema y el núcleo celular con el aspecto típico de sus poros que revela esta técnica.

En el plasmalema se producen dos caras de fractura internas que algunos autores llaman K y V, aunque es más utilizado el término cara EF y cara PF.

La figura 3a muestra la cara de fractura EF. Esta cara de fractura se caracteriza por menor densidad de partículas que la cara PF. En el talo líquénico estudiado la densidad de partículas por μm^2 de esta cara (fig. 3b) es de 400.

Obsérvese en esta figura el espacio existente entre plasmalema y pared y las vesículas que aparentemente están recorriendo dicho espacio en alguna de las dos direcciones posibles.

Las medidas de los diámetros de las partículas se realizan sobre microfotografías como la de la fig. 3c. Se han encontrado partículas con diámetro de hasta 250 Å pero lo interesante en estos estudios es la obtención de histogramas de frecuencias para conocer en cada caso concreto como están representados determinados tamaños de partículas y para observar la variación en tamaños que tienen lugar, bajo condiciones de experimentación diversas, (PEVELING y ROBENEK, 1980; RAPSCH y ASCASO, 1983).

Las invaginaciones del plasmalema, que en la cara de fractura EF aparecen como crestas (Fig. 3a) también pueden ser analizadas. Estas invaginaciones sirven para incrementar el área superficial. Su variabilidad en tamaño y frecuencia es función de la edad según MOOR y MÜHLETHALER, en sus estudios en levaduras (1963).

La cara PF (Fig. 4a), nos muestra la cara de fractura interna del plasmalema que es más próxima al citoplasma celular. Se observan así mismo vesículas en el espacio vacío bajo la pared celular, ya anteriormente citado.

En la cara de fractura PF (Fig. 4b) se han recontado para esta especie 1.650 partículas por μm^2 . El diámetro de las mismas no ha sido determinado por el momento (Fig. 4c). La relación entre densidad de partículas PF/EF es igual a 4,1 para esta especie.

Ultraestructura del micobionte

El micobionte de la zona gonidial de *L. pulmonaria* presenta el aspecto típico de una hifa cuando se observa al TEM en corte ultrafino (Fig. 5a). La pared tiene un espesor de 0,25 μm , luego se observa el plasmalema con invaginaciones y en el contenido citoplásmico observamos aquí fundamentalmente mitocondrias, vacuolas y cuerpos de reserva. En los micobiontes líquénicos (al contrario de lo que sucede en los ficobiontes) no suelen observarse espacios vacíos importantes entre plasmalema y pared.

Por criofractura, podemos observar la célula fúngica en diversos aspectos de su estructura según el plano de fractura obtenido.

La fig. 5b muestra la pared fúngica ornamentada con estructuras fibrilares organizadas direccionalmente.

La Fig. 5c muestra el plasmalema de la célula fúngica. Se trata además en esta microfotografía de una hifa que forma un haustorio de penetración en la célula algal. En la figura 5d se observan por analogía con la fig. 5a cuerpos de reserva y mitocondrias, además de observarse la estructura típica del núcleo ya descrita y cuerpos concéntricos. Los cuerpos concéntricos o elipsoidales son típicos de los hongos líquenizados. Aunque son varias las descripciones que existen sobre la estructura del cuerpo concéntrico observado por corte ultrafino, esta técnica únicamente revela la estructura de su cuerpo central y de las proyecciones periféricas en forma radial.

FIGURAS

En fotografías de criofractura, la flecha indica dirección del sombreado.

Signos convencionales: A, alga; c, cuerpo de reserva; cc, cuerpo concéntrico; D, dictiosoma; e, espacio vacío entre pared y plasmalema; h, haustorio; H, hifa; i, invaginación del plasmalema; m, mitocondria; N, núcleo; P, pared; pg, plastoglóbulo; pm, plasmalema; po, poro; t, tilacoide; v, vesícula; va, vacuola.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Teresa Carnota y Fernando Pinto su colaboración en la realización de este trabajo. La ayuda financiera para la realización del mismo la hemos recibido de la Comisión Asesora de Ciencia y Tecnología (n.º Proyecto 0502/81).

BIBLIOGRAFIA

- AHMADJIAN, V. (1982). Algal/fungal symbioses. En «*Progress in Phycological Research*» (Round y Chapman, eds.). 179-233. Vol. I. Elsevier Medical Press B.V.
- ASCASO, C. (1978). Ultrastructural modification in lichens induced by environmental humidity. *Lichenologist*, 10: 209-219.
- ASCASO, C. y GALVAN, J. (1976). The Ultrastructure of the Symbionts of *Rhizocarpon geographicum*, *Parmelia conspersa* and *Umbilicaria pustulata*. Growing under Dryness Conditions. *Protoplasma* 87: 409-418.
- BELLEMERE, A. y LETROUIT-GALINOU, M.A., (1982). Le developpement des asques et des ascospores chez le *Caloplaca marina* Wedd. et chez quelques Lichens de la famille des Teloschistaceae (*Caloplaca*, *Fulgensia*, *Xanthoria*): etude ultrastructurale. *Cryptogamie, Bryol. Lichenol.* 3 (2): 95-137.
- BOISSIERE, M.C. (1979). Cytologie du *Peltigera canina* (L.) Willd. en microscopie electronique: Le mycobionte a l'etat vegetatif. *Revue de Mycologie*, 43: 1-49.
- BRANTON, D. (1966). Fracture faces of frozen membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.)*. 55: 9048.
- HESSLER, R. y PEVELING, E. (1978). Die Lokalisation von C-Assimilation in Flechtenthalli von *Cladonia incrustata* Floerke und *Hypogymia physodes* (L.) Ach. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 86: 287.
- HONEGGER, R. (1980). The ascus apex in lichenized fungi II. The *Rhizocarpon* type. *Lichenologist*. 12: 157-172.
- MOOR, H. y MÜHLETHALER, K. (1963). Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.* 17: 609-628.
- PEVELING, E. (1976). Investigations in the Ultrastructure of Lichens. En *Lichenology: Progress and Problems* (Brown, D.H., Hawksworth, D.L. y Bailey, R.H. eds.) 17-26. Academic Press, London.
- PEVELING, E. y ROBENEK, H. (1980). The plasmalemma structure in the phycobiont *Trebouxia* at different stages of humidity of a lichen thallus. *New Phytol.* 84: 371-374.
- RAPSCH, S. y ASCASO, C. (1983). Estudio por criofractura del plasmalema del ficobionte en diferentes condiciones ambientales. *Anales de Edafología y Agrobiología*. 42: 1195-1207.
- SILVA-PANDO, F.J. y ASCASO, C. (1982). Modificaciones ultraestructurales de líquenes epifitos transplantados a zonas urbanas de Madrid. *Collectanea Botanica*. 13, (1): 351-374.
- SINGER, S.J. y NICOLSON, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- SMITH, D.C. (1980). Mechanisms of nutrient movement between the Lichen Symbionts. En *Cellular Interactions in Symbiosis and Parasitism* (Cook, C.B., Pappas, P.W. y Rudolph, E.D., eds.): 197-227. Ohio State University, Columbus.
- VERKLEIJ, A.T. y VERVERGAERT, P.H.J. (1978). Freeze-Fracture morphology of biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 515: 303-327.

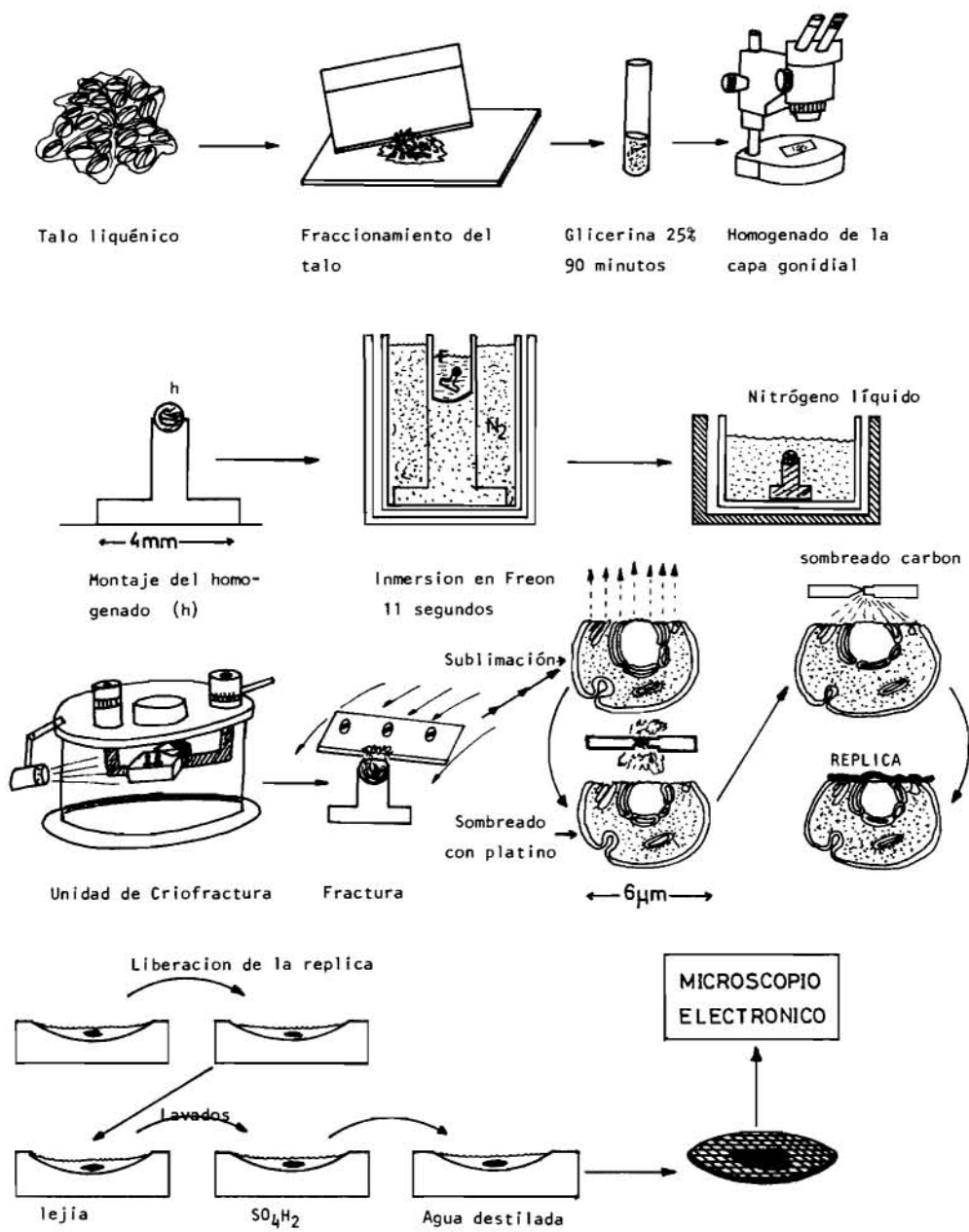


FIGURA 1.-Esquema de la técnica de criofractura aplicada al estudio de talos líquénicos.

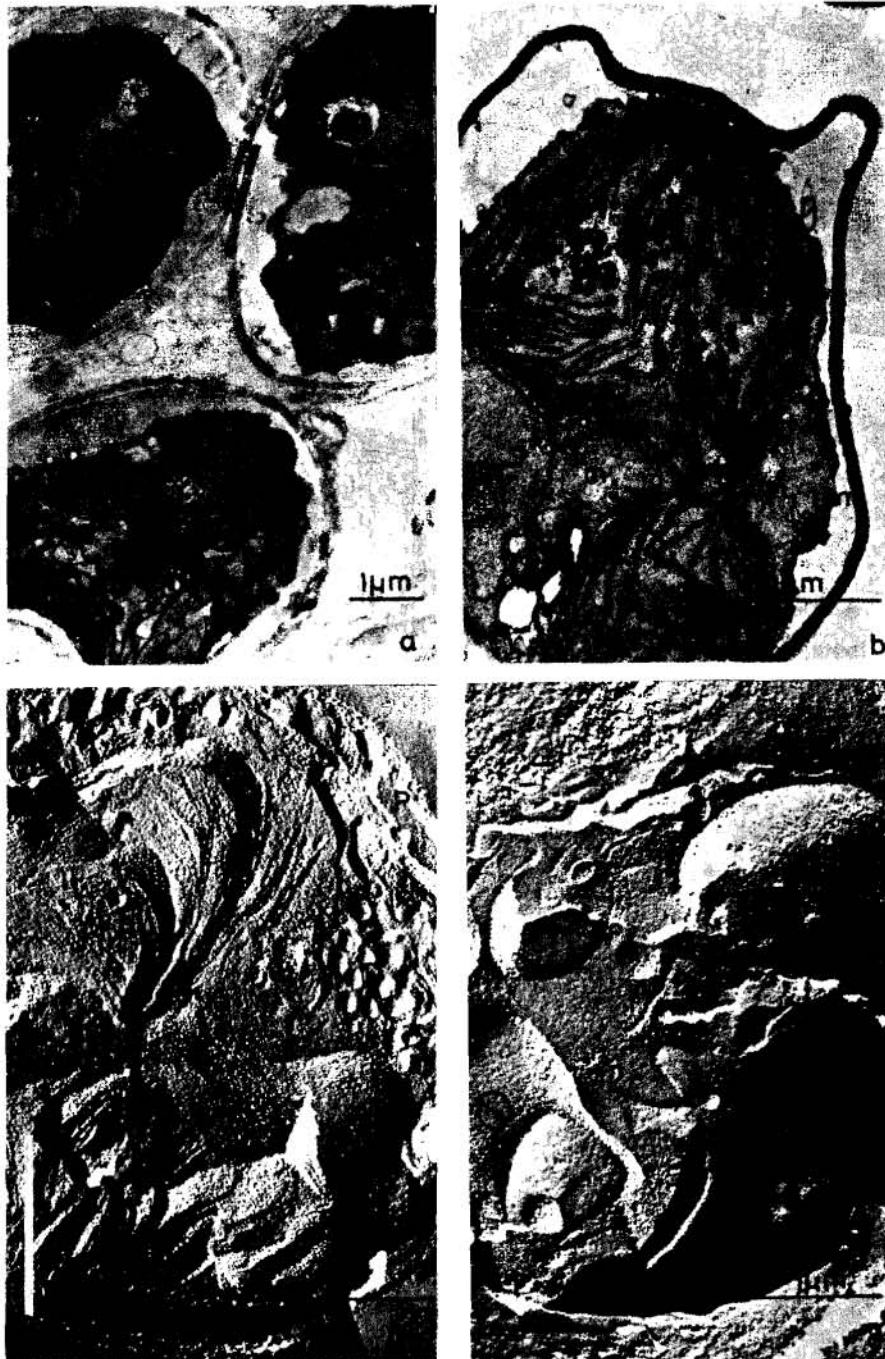


FIGURA 2.—a) Zona gonidial del talo de *Lobaria pulmonaria*. Conjunto de ficobiontes (alga *Myrmecia*). b) *Myrmecia*. c) Célula algal observada según la técnica de criofractura. Sección media. d) Detalle de célula algal.

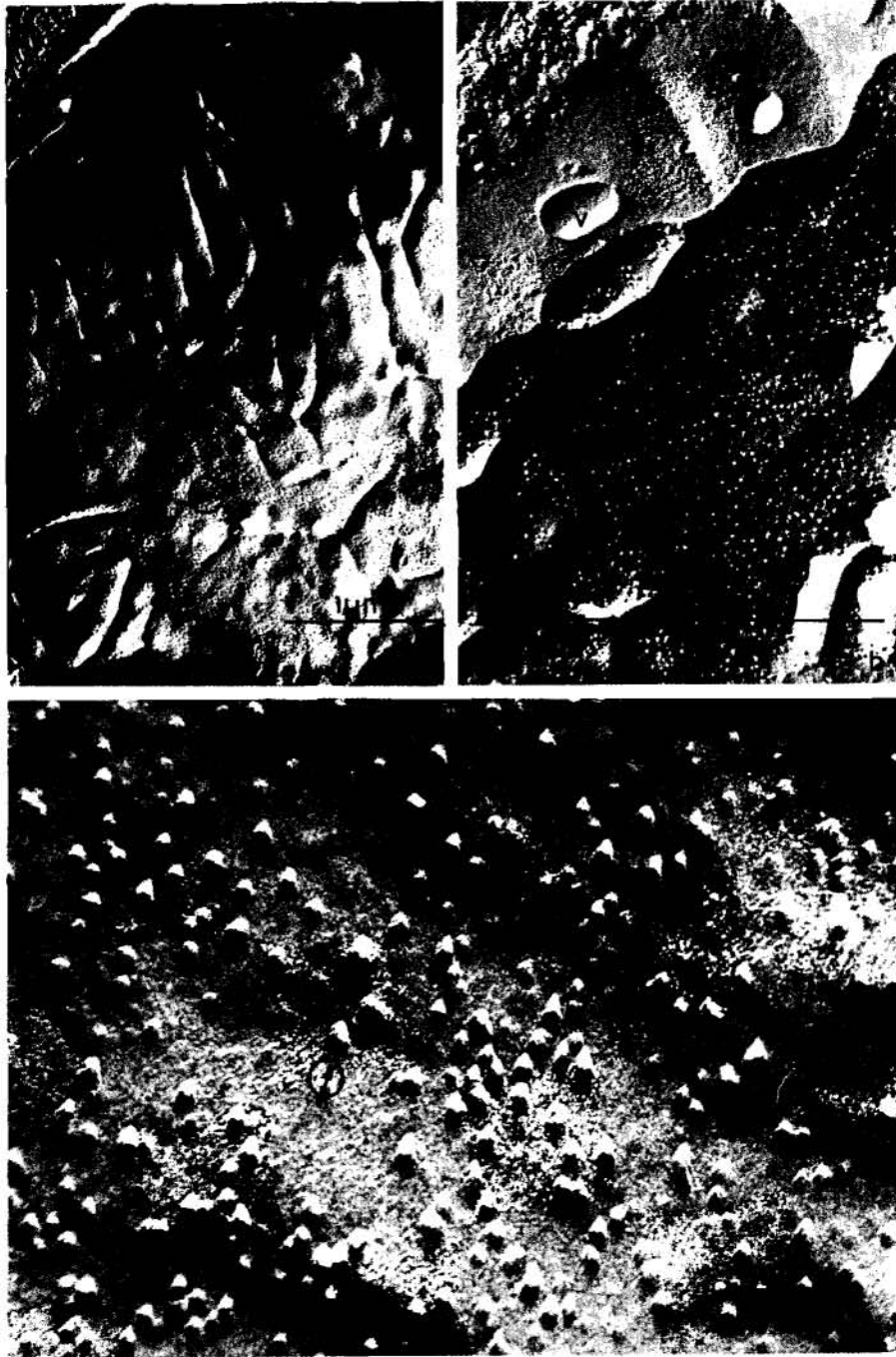


FIGURA 3.-a) Aspecto parcial de la membrana plasmática del ficobionte. Cara EF. Obsérvense las partículas y las invaginaciones o crestas. b) Microfotografías de la cara EF para la determinación de la densidad de partículas. c) Microfotografía de la cara EF para determinación del diámetro de las IMPs.

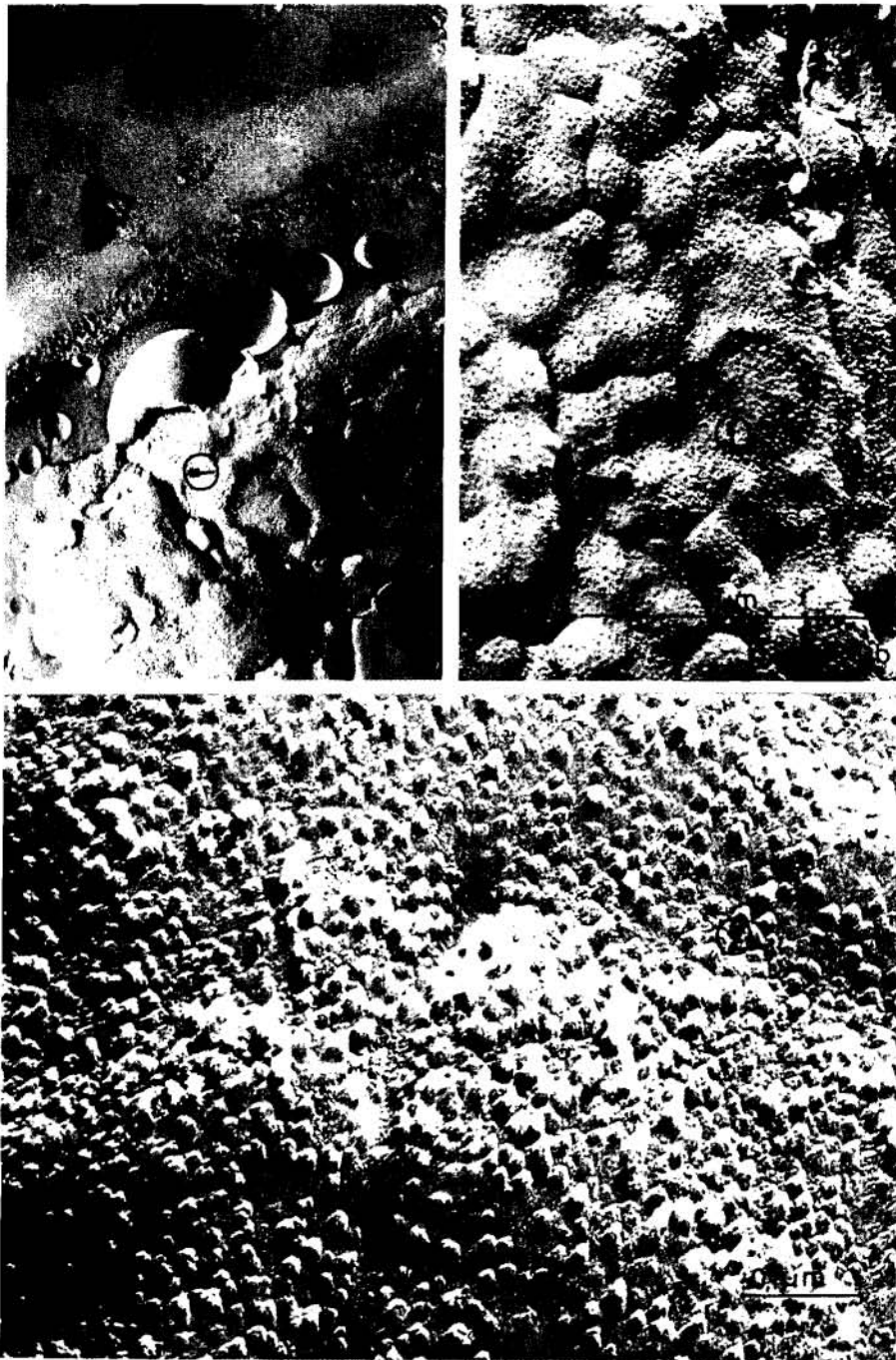


FIGURA 4.-a) Membrana plasmática del ficobionte. Cara PF. b) Microfotografía de la cara PF para la determinación de la densidad de partículas. c) Detalle de lo anterior.

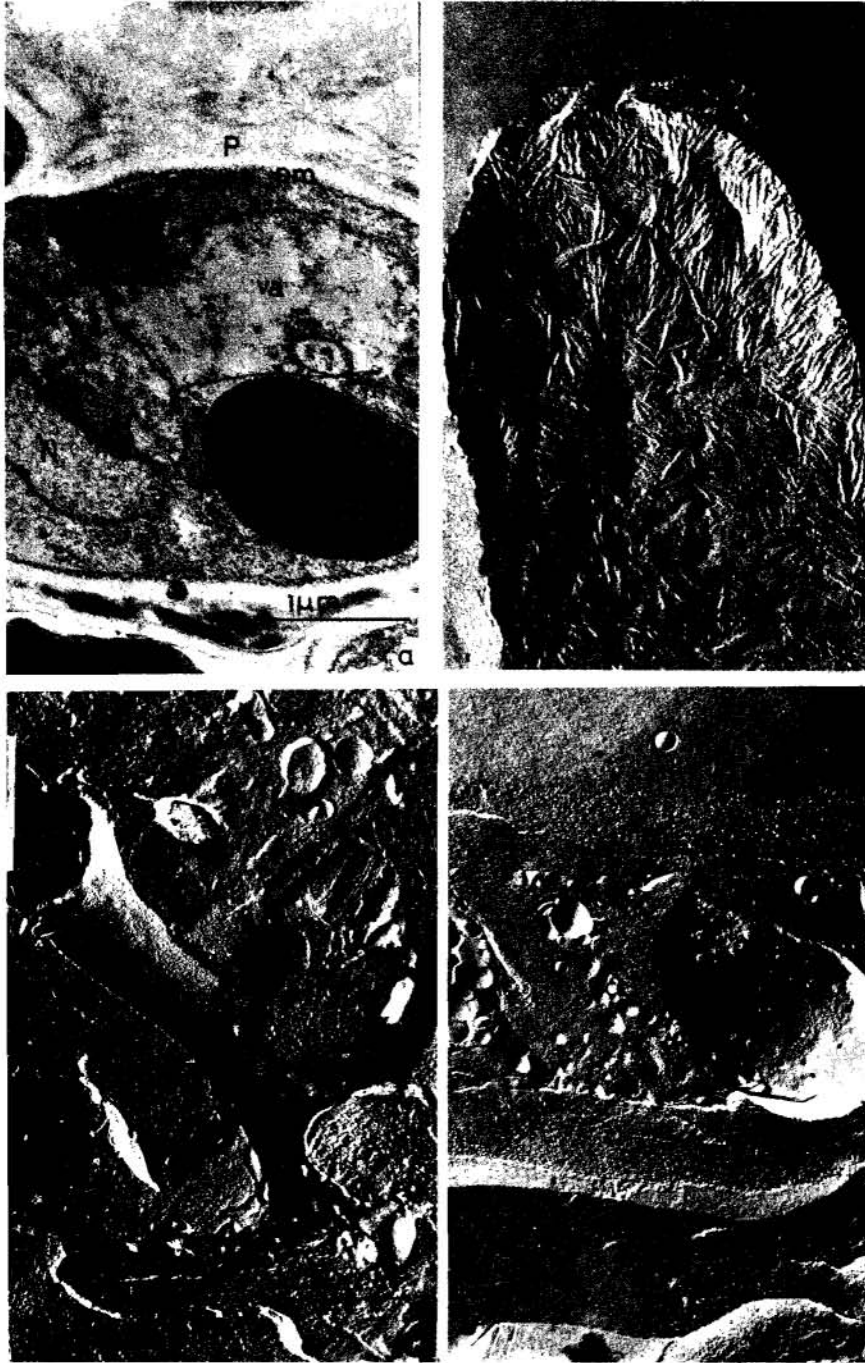


FIGURA 5.-a) Micobionte. Observación por corte ultrafino. b) Micobionte. Observación según la técnica de crio-fractura. Aspecto de la pared fúngica. c) Célula fúngica formando un haustorio de penetración en la célula algal. d) Micobionte. Fractura a través de su zona media.