

APROXIMACIÓN AL ESTUDIO ANATOMO-HISTOLÓGICO Y DE LA MICORRIZA DE *OPHIOGLOSSUM LUSITANICUM* L.

JOSÉ REIG ⁽¹⁾, FRANCISCO GARCÍA ^(1,2),
ANA M^a IBARS ⁽¹⁾ & ELENA ESTRELLES ⁽¹⁾

(1) Laboratorio de Anatomía e Histología Vegetal "Julio Iranzo".

Jardí Botànic de la Universitat de València. (C. Quart, 80. 46003 València)

(2) Unidad Docente de Biología Vegetal. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y
Enología. Universidad Politécnica de València. Avda. Blasco Ibáñez, 21. València.

E-mail: jose.reig@uv.es

Abstract. REIG, J., GARCÍA, F., IBARS, A.M. & ESTRELLES, E. (2002). An approach to the anatomico-histological study and the mycorrhizae of *Ophioglossum lusitanicum* L. *Butll. Soc. Micol. Valenciana* 7: 55-60

Several organs of *Ophioglossum lusitanicum* L., a species recently found in the Valencian Community, are described here from histological point of view. Special emphasis was given to the study of its mycorrhizae that appears clearly visible in its roots. It was identified Vesicular-arbuscular Zygomycete.

Is necessary to approach this type of study to processes of conservation and reintroduction of this species in different ecosystems, since the mycorrhization is necessary to obtain specimens germinated from spores.

Key words: Mycorrhizae, *Ophioglossum*, Valencian Community.

Resumen. REIG, J., GARCÍA, F., IBARS, A.M. & ESTRELLES, E. (2002). Aproximación al estudio anatomico-histológico y de la micorriza de *Ophioglossum lusitanicum* L. *Butll. Soc. Micol. Valenciana* 7: 55-60

Se describen, desde el punto de vista histológico, los diversos órganos de *O. lusitanicum* L., especie recientemente citada en la Comunidad Valenciana, y se hace especial hincapié en el estudio de su micorriza, que aparece claramente visible en sus raíces y que se ha identificado como un Zigomicete vesículo - arbuscular.

Este tipo de estudios son necesarios para abordar los procesos de conservación de esta especie y reintroducción de la misma en los diferentes ecosistemas, ya que la micorrización es necesaria para la obtención de ejemplares a partir de esporas.

Palabras clave: Micorriza, *Ophioglossum*, Comunidad Valenciana.

INTRODUCCIÓN

Ophioglossaceae constituye una familia de Pteridofitos isosopóreos, herbáceos, vivaces y rizomatosos; sus frondes se dividen en dos segmentos, uno estéril laminar y otro fértil espiciforme con dos filas de esporangios.

Está integrada por 4 géneros con 55 especies de distribución sub-cosmopolita. En la península Ibérica sólo se encuentra descrito el género *Ophioglossum* L., con tres especies *O. lusitanicum* L., *O. azoricum* K. y *O. vulgatum* L. (Castroviejo et al. 1986)

Hasta hace muy poco tiempo sólo la última especie había sido encontrada en nuestra Comunidad, en el Mazizo de Peñagolosa, en la comarca de L'Alcalatén y en el Alto Maestrazgo.

Recientemente, en el año 2001 se ha descubierto, por el equipo de microrreservas de

la flora valenciana de la Consellería de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana una población de *O. lusitanicum* en la microrreserva de flora del Pla de Mora, en Quatretonda, y poco tiempo después una segunda población en la microrreserva de flora del Puntal de L'Abella, en Estivella, situada en la Sierra de la Calderona (Figura 1) (Olivares et al., 2002).

La aparición de estas poblaciones en la Comunidad Valenciana es un hecho de gran relevancia puesto que se consideraba que la especie tenía una distribución más bien occidental en la península Ibérica (Salvo, 1986).

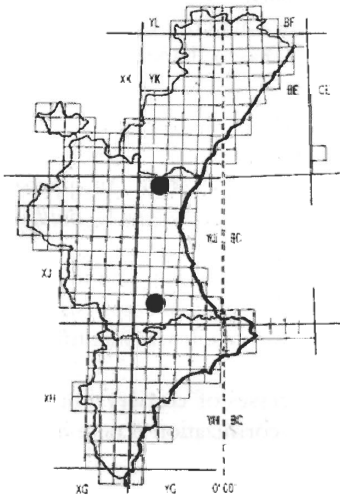


Figura 1. Mapa de distribución de *O. lusitanicum* L.

Se trata de una especie poco común y de escaso porte, apenas alcanza 4 cm. de altura (Figura 2, pág. 197), por lo que pasa fácilmente desapercibida en los claros de jarales secos de tipo arenoso pero que conservan la humedad durante el invierno, lugares estos donde se sitúa su hábitat.

Tiene un rizoma corto, oblongo o sub-globoso, castaño, vertical, a veces estolonífero con raíces gruesas. Sus láminas aéreas se renuevan anualmente, se trata de hojas estériles con pecíolo y limbo de forma oblongo-lanceolada y nervadura reticulada, sin nervios libres dentro de las mallas del retículo.

La novedad que ha supuesto el encuentro de la especie en nuestra Comunidad, la escasez de individuos de la misma -se puede calificar, al igual que la otra especie de

Ophioglossum como muy rara (Mateo & Crespo, 2001) y en categoría UICN como EN (Ibars & al., 1999)-, así como lo delicado de su conservación nos ha llevado a profundizar en un estudio completo y multidisciplinar conducente, a la postre, a su multiplicación y reintroducción en su hábitat. En nuestro laboratorio de Anatomía e Histología, en colaboración con el Banco de Germoplasma del Jardín Botánico, hemos procedido a estudiar desde el punto de vista anatomo-histológico las distintas partes del helecho, haciendo especial hincapié en el estudio de su micorriza, ya que se necesita la infección con el hongo para poder obtener, a partir de esporas, individuos adultos en el laboratorio para reintroducirlos posteriormente en el medio.

Los primeros estudios de la micorriza mediante cortes histológicos en parafina y en resinas epoxi nos han permitido comprobar que se trata de un zigomicete micorrízico vesículo arbuscular con unas estructuras perfectamente definidas (Harley & Smith, 1983; Sieverding 1991).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares pertenecen a la clase *Zigomycetes* y se caracterizan porque producen, a lo largo de su ciclo de vida, unas estructuras conocidas como arbuscúlos (en todos los casos) y vesículas (en la mayoría de ellos). Las vesículas son estructuras globosas e irregulares que actúan como órganos de reserva de lípidos. Los arbuscúlos son las estructuras responsables de la transferencia bidireccional de nutrientes entre los simbioses, realizada en la interfase planta-hongo producida a este nivel (Harley & Smith, 1983; Sieverding, 1991). Esta observación en la especie por nosotros estudiada, estaría de acuerdo con lo observado en otros helechos similares en los que la aparición de protalos subterráneos a partir de las esporas y la consiguiente formación de los gametangios sólo se produce cuando están micorrizados. Trabajos posteriores sobre el desarrollo de las esporas para obtener gametófitos, han demostrado la inviabilidad de las mismas si no se produce el contacto con el hongo. Hemos de concluir que la importancia de la micorriza en *Ophioglossum* es, si cabe, mayor que en otras muchas especies vegetales.

En este trabajo mostramos, entre un conjunto de componentes histológicos de las diversas partes del pteridófito, la aparición de las micorrizas entre las células de sus raíces, con diversos estadios de las hifas fúngicas. La caracterización precisa del hongo en el interior del helecho es necesaria para poder determinar si ha habido o no infección con el zigomicete en el laboratorio y poder estar seguros de que reintroducimos en el medio una planta perfectamente micorrizada en un porcentaje determinado.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Los individuos adultos se fijaron directamente en el campo. Las muestras que iban a ser incluidas en parafina se fijaron en FAA. Los individuos que iban a ser incluidos en resina se fijaron en glutaraldehido-paraformaldehido al 4%, durante 24 h, tras lavar con tampón fosfato 0'1M y pH 6, se post fijaron con tetraóxido de osmio al 1% durante 2 h. (Ruzin, 1999).

2. DESHIDRATACIÓN E INCLUSIÓN.

Todas las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación en series de etanol (desde 70° hasta etanol absoluto).

Posteriormente, las muestras fijadas en FAA se introdujeron en acetato de isoamilo y, finalmente, en parafina (Histosek) durante 40 min a 61°C. Tras ello se confeccionaron los bloques de parafina.

Las muestras que iban a incluirse en resina se introdujeron, tras su deshidratación inicial, en una mezcla de etanol:resina LR White (relación 2:1) y se mantuvieron durante 60 min; luego se pasaron a una mezcla donde se aumentó la concentración de resina hasta una relación final de 2:2, durante otros 60 min, y finalmente, a una mezcla etanol:resina (relación 1:2), en la que se mantuvieron toda la noche a temperatura ambiente para conseguir la evaporación del etanol. Por último, las muestras se introdujeron en cápsulas de infiltración conteniendo resina pura y se mantuvieron durante 2 horas a temperatura ambiente; luego se colocaron en estufa a 60° durante 24 h. para conseguir la polimerización de la resina.

3. OBTENCIÓN DE SECCIONES Y TINCIÓN

El material incluido en parafina se cortó en secciones de 10 µm con un microtomo rotatorio Anglia Scientific. La tinción se llevó a cabo con safranina y verde rápido (Johansen, 1940).

El material incluido en resina se cortó con un ultramicrotomo Sorval-540 en secciones de 1,5 µm que posteriormente se tiñeron con azul de toluidina al 1% durante 5 seg.

Las preparaciones se observaron en un microscopio Olympus BX/50 y se fotografiaron mediando un sistema óptico digital Olympus P-330NE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la Anatomía interna de *Ophioglossum lusitanicum* L., podemos destacar las siguientes estructuras en cada uno de sus órganos:

HOJAS.

En las Figura 3a, 3b y 3c (pág. 197) se aprecian detalles del aspecto de la hoja en sección transversal. La epidermis es monoestratificada (Figura 3c), con células de

paredes finas y de forma irregular. Aparecen estomas poco numerosos en la parte abaxial de la lámina (Figuras 3a y 3c) No existe hipodermis y la práctica totalidad de la lámina está formada por un mesófilo uniforme compuesto de células de paredes finas con numerosos cloroplastos y con abundantes espacios intercelulares. El mesófilo se encuentra recorrido por 3 haces vasculares (Figura 3 y 3b) que poseen una disposición de los vasos de tipo colateral. Cada haz está delimitado por una discreta vaina (Figura 3b).

Algunas células del mesófilo presentan un contenido denso en el interior de una vacuola centrada que adquiere una coloración pardo oscura, característica de la interacción del tetraóxido de osmio con los lípidos. Asimismo adquieren una tonalidad semejante a los numerosos cloroplastos, lo que nos indica el alto contenido en lípidos de los mismos. También aparece un contenido semejante en numerosas células de la epidermis (Figuras 3a y 3b).

RAÍZ.

La sección transversal de la raíz (Figura 4, pág. 197) nos muestra una estela central, un amplio córtex y una epidermis monoestratificada. Las células epidérmicas en las raicillas adultas poseen paredes tangenciales externas más engrosadas y algo suberizadas. El amplio córtex se diferencia en dos zonas concéntricas. La más exterior, con una anchura de 3 a 5 células, está formada por células parenquimatosas angulares sin apenas espacios intercelulares. Normalmente en esta zona se aprecia la presencia de hifas fúngicas (Figura 5a, pág. 198), pertenecientes a una micorriza de tipo arbuscular. La zona interna del córtex está formada por células más redondeadas y con amplios espacios intercelulares. La estela de la raíz es monarca a diferencia de otras especies de *Ophioglossum* donde puede ser diarcas, triarcas, tetrarcas o, incluso, pentarcas, caso de *O. fibrosum*, *O. aitchisoni* y *O. pendulum* (Parihar, 1977). En nuestro caso el xilema y el floema se encuentran enfrentados en una zona central, rodeados por una endodermis con una apenas perceptible banda de Caspary (Figura 5a).

Las micorrizas presentes en las raíces de *O. lusitanicum* L. son de tipo arbuscular (Figuras 5a, 5b y 5c, pág. 198). Existen abundantes hifas fúngicas en la zona correspondiente al córtex más exterior casi en el límite con el interior, así como algunas penetrando desde el exterior de la raíz. En algunos casos se observa claramente la presencia de vesículas (Figura 5d, pág. 198) en el exterior del órgano. Por sus características morfológicas, tanto de las hifas como de las vesículas y arbuscúlos, el hongo micorrízico creemos que pertenece al género *Glomus*, aunque este punto necesitará confirmación posterior, ya que los arbuscúlos tienen generalmente forma de troncos cilíndricos (Figura 5c), las vesículas exteriores son generalmente de paredes delgadas y elipsoides (Figura 5d), y las hifas intrarradicales raramente se enrollan (Figura 5b).

El grupo de los hongos *Glomales* se caracteriza por ser micorrícico con una gran cantidad de especies vegetales, indicio de que el proceso de simbiosis es muy antiguo desde el punto de vista evolutivo, y que este grupo de hongos ha ido, a lo largo del tiempo, adaptándose a los diferentes cambios evolutivos de las plantas.

Asimismo se observa que, al igual que sucede con otras muchas especies de pteridófitos, se da una imposibilidad de desarrollo de protalos en ausencia de la infección micorrícica. La constatación de la imposibilidad de crecimiento también en *Ophioglossum* es un fenómeno de sumo interés, que implica el estudio de su micorrización in vitro para reproducirlo en el laboratorio y reintroducirlo en su hábitat. Para todo ello es necesario el estudio anatómico-histológico de las plantas recién germinadas con el hongo a fin de poder determinar el grado de micorrización alcanzado.

BIBLIOGRAFÍA

- CASTROVIEJO ET AL.. (1986). *Flora Ibérica*. Vol. I. Servicio de Publicaciones del CSIC.
- FRANCK L.J. (1993) *Interactions of nematodes with mycorrhizae and mycorrhizal fungi*. In: Khan MW (ed) *Nematode interactions*. Chapman & Hall, London, pp 203-216.
- HARLEY, J. L. & S. E. SMITH. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.
- JOHANSEN. D.A. (1940). *Plant microtechnique*. Ed Mc Graw Hill. Londres.
- IBARS A. ET AL. (1999). *Helechos de la Comunidad Valenciana*. Generalitat Valenciana. Consellería de Medio Ambiente.
- MATEO, G. & CRESPO, M.B. (2001). *Manual para la determinación de la flora valenciana*. Ed. Moliner-40. Valencia.
- OLIVARES, A., DELTORO, V., ARREGUI, J. M., JUAREZ, J. & IBARS, A. (2002) Primeras citas de *Ophioglossum lusitanicum* L. (*Ophioglossaceae*) en la Comunidad Valenciana. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. Enviado para publicación.
- PARIHAR, N.S. (1977). *Biology and Morphology of the Pteridophytes*. Central Book Depot. Indian University Press. Allahabad.
- RUZIN, S. E. (1999). *Plant Microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. New York.
- SALVO, E (1986). *Guía de helechos de la península Ibérica y Baleares*. Ed. Pirámide. Madrid.
- SIEVERDING, E. (1991) *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems*. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn GmbH, Germany.



Figura 2.
Aspecto general de *O. lusitanicum* L.

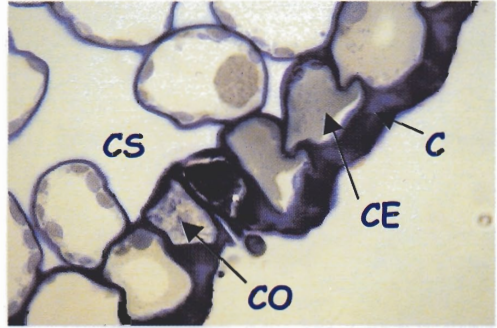


Figura 3a. Corte semifino mostrando un estoma (x1000). CS: cámara subestomática; CO: célula oclusiva; CE: célula epidérmica; C: cutícula.

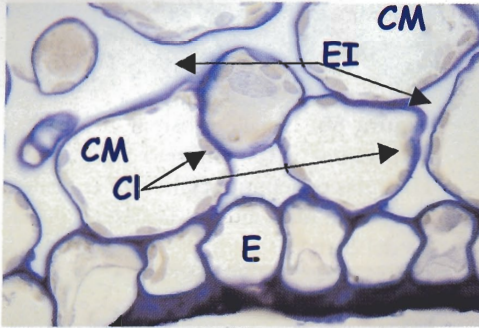


Figura 3c. Corte semifino mostrando la morfología de las células del mesófilo así como de la epidermis foliar (x1000). CM: célula mesófilo; E: epidermis; EI: espacios intercelulares; E: epidermis; Cl: cloroplastos.

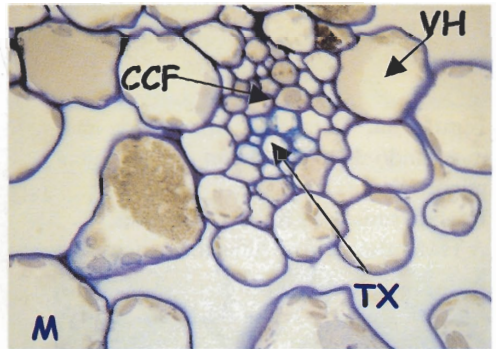


Figura 3b. Corte semifino mostrando la disposición de los tejidos conductores en uno de los haces foliares (x1000). M: mesófilo; TX: traqueadas xilema; CCF: células cribosas floema; VH: vainas del haz

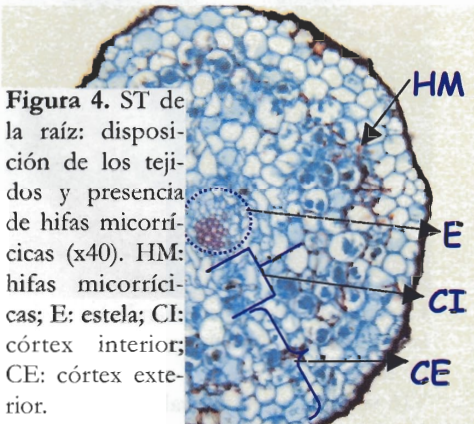


Figura 4. ST de la raíz: disposición de los tejidos y presencia de hifas micorrízicas (x40). HM: hifas micorrízicas; E: estela; CI: córtez interior; CE: córtez exterior.

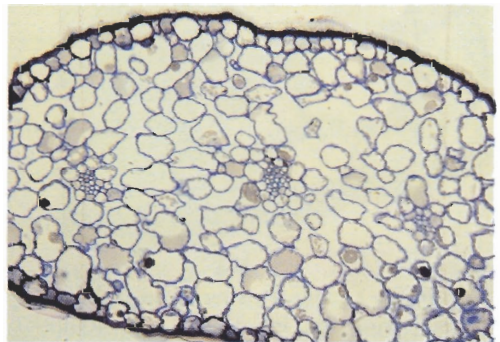


Figura 5. Corte transversal de la hoja estéril de *O. lusitanicum*

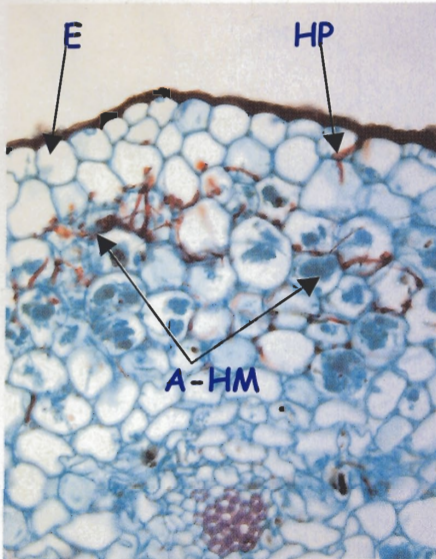


Figura 5a. Detalle de una ST de raíz mostrando la distribución de las hifas micorrízicas (x100).

E: epidermis; HP: hifas penetrantes; A-HM: arbusculos e hifas micorrízicas.

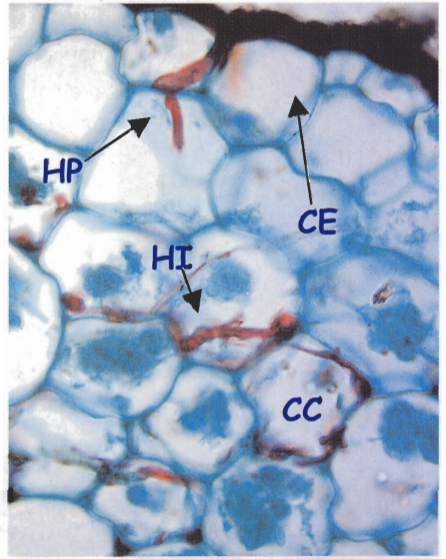


Figura 5b. Detalle mostrando las hifas penetrantes y las intraradicales (x400).

HP: hifas penetrantes; CE: células epidérmicas; HI: hifas intraradicales; CC: células del córtex.

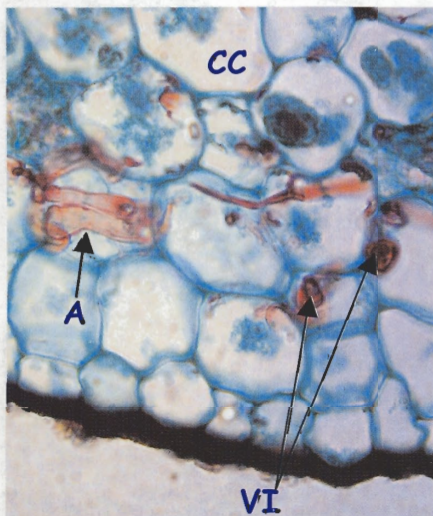


Figura 5c. Detalle mostrando los arbusculos y vesículas intraradicales (x400).

CC: células del córtex; A: arbusculos; VI: vesículas intraradicales.

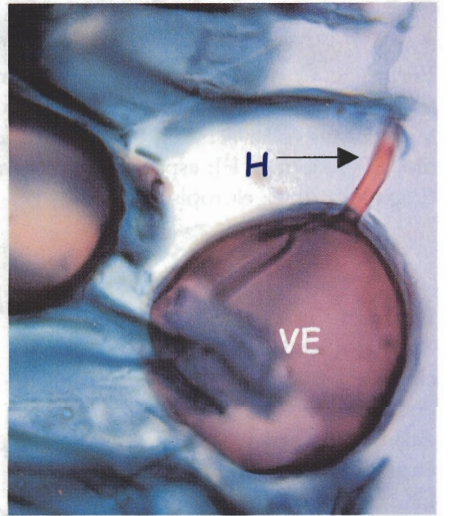


Figura 5d. Detalle mostrando las vesículas exteriores (x1000).

H: hifas; VE: vesícula extraradical.