

**Proceedings of the Segunda Reunión del Grupo Latinoamericano de Liqueólogos, Mérida, 24-25 October 1995, organized by Vicente Marcano**

## **La microscopía electrónica aplicada al estudio de los líquenes en Venezuela**

Sari Mohali\*, Vicente Marcano\*\* y Ernesto Palacios-Prü\*

\*Centro de Microscopía Electrónica, Vicerrectorado Académico, Universidad de Los Andes, P.O. Box 163, Mérida, Venezuela.

\*\*Centro de Investigaciones Liqueológicas CEIL, FUNDACITE-ULA, P.O. Box 234, Mérida, Venezuela.

**Resumen:** Se discute el desarrollo histórico de los estudios de los líquenes por microscopía electrónica en Venezuela. Se describen las distintas metodologías empleadas y los principales aportes que han alcanzado estos estudios. Se discute el estado actual de las investigaciones y su futuro.

**Abstract:** The historical development of lichen studies by electron microscopy in Venezuela is discussed. The various methods employed and the main results are described, and the current state of this research and its future outlined

### **Introducción**

El estudio estructural de los líquenes comenzó hace más de 100 años con la utilización del microscopio de luz (ML). Schwendener en 1860 fue capaz de presentar una explicación precisa de la estructura interna de diferentes líquenes fruticosos. Para su observación en dos dimensiones, estos especímenes fueron seccionados y coloreados antes de ser magnificados. Las estructuras transparentes o translúcidas son esencialmente invisibles y los objetos opacos no pueden ser examinados del todo (Hale 1976).

El microscopio electrónico (ME), ha sido una herramienta importante para los estudios taxonómicos de líquenes en Venezuela. Para ello se utilizaron dos tipos de microscopios electrónicos: El microscopio electrónico de transmisión (MET, TEM en inglés) y el microscopio electrónico de barrido (MEB, SEM en inglés). En el primero, el haz de electrones pasa a través del objeto, obteniéndose una imagen en dos dimensiones y se observa su estructura interna; mientras en el MEB, el haz de electrones secundarios generados desde la superficie del objeto, produce una imagen tridimensional, observándose por consiguiente, las características

micromorfológicas o superficiales de la muestra.

Al principio de la década de los años setenta, los estudios liquenológicos con MET, suministraron una nueva comprensión de la ultraestructura de los componentes celulares de los líquenes. Peveling (1969) estudió por MET los distintos fotobiontes (e.g. clorofíceas y cianobacterias), incluyendo el micobionte de los líquenes. Los micobiontes observados fueron ascomicetes, con la excepción del basidioliquen *Cora pavonia* (Sw.) Fr. (= *Dictyonema glabratum* (Spreng.) D. Hawksw). A través del análisis ultraestructural, se pudo diferenciar las características intracelulares de los fotobiontes verde, verde-azul y otros de vida libre. En el caso de los micobiontes, se observó por primera vez en su protoplasma la presencia de cristales, los cuales fueron relacionados a las sustancias liquénicas producidas por el hongo (Peveling 1976).

A pesar que el primer MET comercial apareció en 1939, producido por la casa Siemens y Halske en Alemania (Wischnitzer 1970), no fue sino 29 años después cuando Elizabeth Peveling y Vahl en 1968 realizaron los primeros estudios ultraestructurales del fotobionte y del micobionte. La tardanza en la utilización del MET se debió a las dificultades técnicas en la preparación del talo liquénico. No obstante, no sucedió así, en el momento de aparecer el primer MEB comercial (Cambridge-Stereoscan) en 1965, desarrollado en Inglaterra (Dykstra 1992), donde los estudios micromorfológicos en líquenes comenzaron tan solo tres años después por Peveling y Vahl (1968), aunque la mayor contribución en esta área fue realizada por Mason Hale a partir de 1973 (Hale 1973).

Hawksworth (1969) examinó la superficie de

varias especies de Alectoriaceae, con el intento de aplicar esta información a los problemas taxonómicos. Peveling (1970) reportó con descripciones detalladas, las formaciones de cristales sobre las hifas y ciertos detalles referentes a la superficie. Tibell (1971) demostró el valor del MEB al estudiar la estructura de las ascósporas en la familia Cypheliaceae. Hale (1973), describió una capa epicortical compuesta de polisacáridos, 0.1 - 0.3  $\mu$ m de espesor, presente en varias especies de Parmeliaceae, en la cual descubrió la presencia de poros. Estas estructuras aparecen en muchos géneros no pseudocifelados. Hale reconoció el valor taxonómico del epicortex poreado en el estudio de la familia, y recomendó completar estos estudios con el MET y análisis químicos, para evitar así interpretaciones verdaderamente erróneas (Hale 1973).

Lopez-Figueiras y Palacios-Prü (1979) fueron los primeros en Venezuela en realizar estudios estructurales en líquenes con el MEB. Comenzando con el liquen *Glossodium aversum* Nyl. en 1979, y después con dos especies indeterminadas pertenecientes a los géneros *Anzia* y *Usnea*. El trabajo realizado por estos investigadores fue únicamente descriptivo. Se estudió las características talinas y apoteciales de estos líquenes, considerados para aquellos entonces pocos conocidos y donde no existía suficiente literatura sobre análisis micromorfológico con MEB (Lopez-Figueiras y Palacios-Prü 1979, 1980 y 1981).

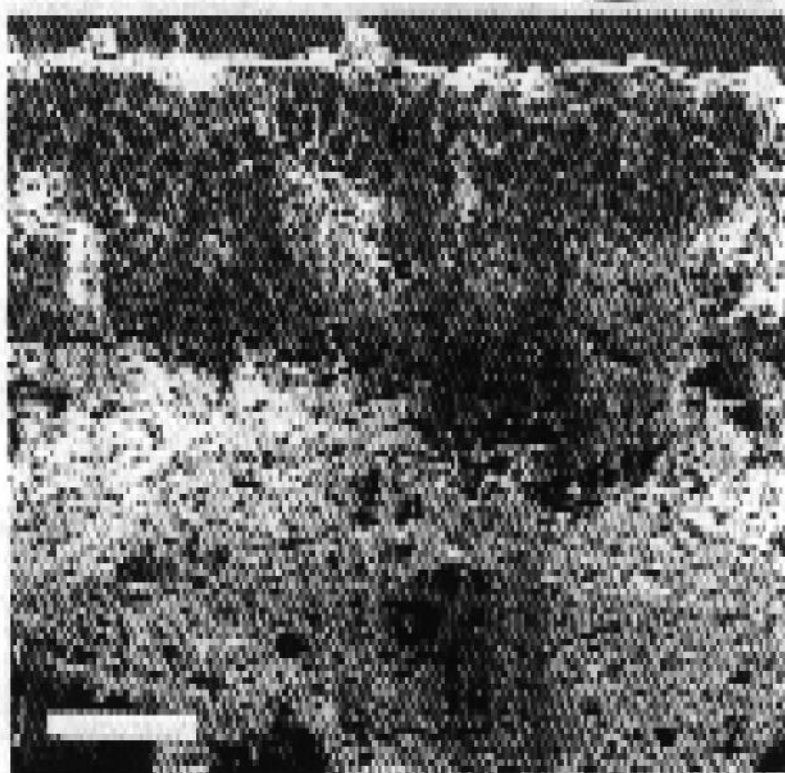
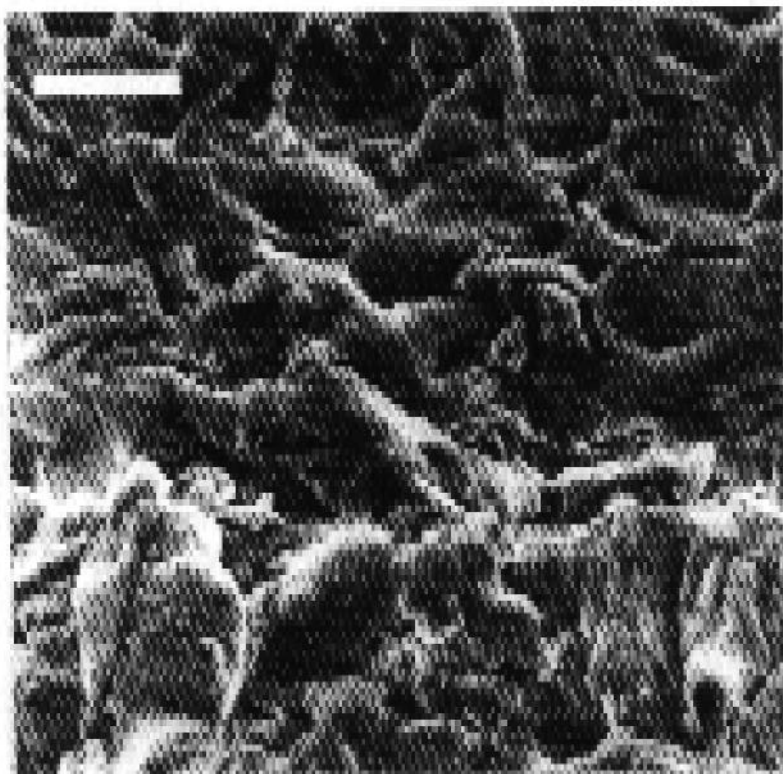
### Alcances

Más recientemente (1994-1995) un equipo multidisciplinario conformado por Sari Mohali, Vicente Marcano, Ernesto Palacios-Prü y Antonio Morales, han realizado varios estudios

---

Fig. 1. *Peltigera vainoi* Gyelnik. Vista en detalle de la superficie superior, donde se observa la presencia de poros elongados. Escala= 15  $\mu$ m.

Fig. 2. *Peltigera vainoi*. Corte transversal del talo, donde se observa el epicortex (a), una capa de hifas leptodermáticas (b), un tejido medular anastomosado con algas (c), y una capa de hifas aracnoides (d). Escala= 37.5  $\mu$ m.



estructurales con líquenes provenientes de la región Andina y Amazonas. La técnica utilizada en la preparación del material liquénico para MEB consistió en secar el material liquénico al aire y después en alto vacío (10-3 torr) por 24-48 horas, para asegurar la eliminación de restos de agua. Luego fue sombreado con una capa de oro por ionización al vacío, y por último se observó en un Hitachi S-2500 a 10 KV. Para aquellas muestras que presentaban cierta humedad, éstas fueron colocadas en una estufa entre 36-38°C por 2 días y después en alto vacío.

En *Peltigera vainoi* Gyelnik., a través de la MEB se registró por primera vez dentro del género y la familia Peltigeraceae, la presencia de poros elongados, 5-6 m de longitud, 0.75 - 1.57 m de ancho, 6-10 poros por mm<sup>2</sup> y superficie fuertemente nodular a verrucoso (Fig. 1). Estos poros son excepcionales entre las especies hasta ahora estudiadas mediante MEB. Vitikainen (1994) ofrece una serie de imágenes por MEB de la superficie superior, las cuales no muestran la presencia de poros o estructuras similares a las halladas en *P. vainoi*. En un corte transversal de *P. vainoi*, se observó un epicortex con un grosor de 0.65-0.70 m; la corteza superior está constituida por un tejido paraplectenquimatoso con hifas leptodermáticas; luego sigue un tejido formado por hifas anastomosadas del tipo aracnoide, el cual cumple la función de adhesión al sustrato (Fig. 2).

En *Coccocarpia* se descubrieron dos especies nuevas: *Coccocarpia duidensis* V. Marcano, L. Galiz & A. Morales, procedente del Amazonas venezolano y *Coccocarpia culatensis* V. Marcano & A. Morales, procedente de los Andes venezolanos (Marcano et al. 1995a). Mediante MEB, se estudió su epicortex, donde se determinó para ambas especies la presencia de poros sim-

ples y esparcidos, con un tamaño promedio de 0.15-3 m en diámetro y con una densidad de 40 poros por mm<sup>2</sup>. El epicortex presentó una superficie lisa y carente de sustancias liquénicas. En un corte transversal de *Coccocarpia culatensis* se observó en la corteza superior un tejido paraplectenquimatoso, luego sigue la médula y el manto de rizinas (Fig. 3,5). El arreglo de las hifas en la corteza superior e inferior es periclinal y sobre estas se observó la ausencia de sustancias liquénicas (Fig. 4), el cual es característico dentro del género *Coccocarpia*. Los detalles morfológicos observados en estas dos especies mediante MEB no difirieron de los observados por Arvidsson (1982) para el resto de las especies del género.

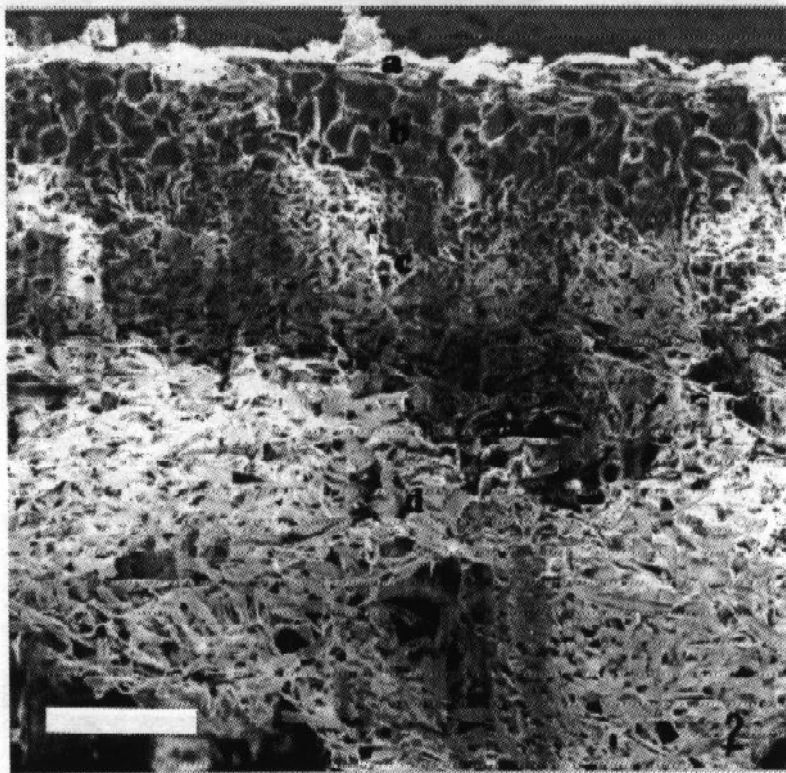
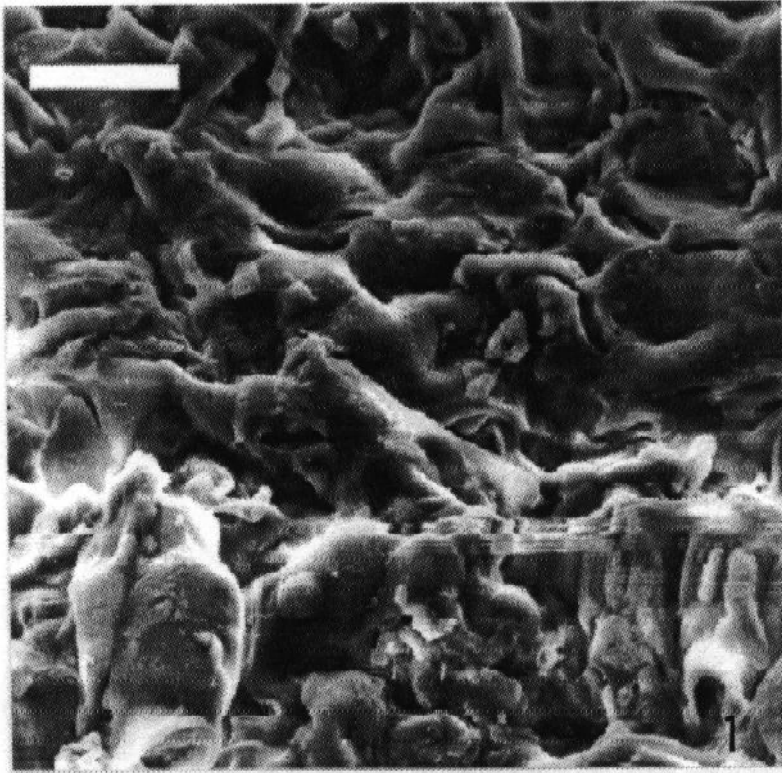
Un nuevo género descrito es *Bulbothricella* V. Marcano, S. Mohali & A. Morales, procedente del Amazonas Venezolano (Marcano et al. 1996). Este líquen pertenece a la familia Parmeliaceae y presenta ciertas características micromorfológicas que, observadas en el MEB, permitieron segregarlo del género *Bulbothrix* (Morales et al. 1995). El líquen se caracteriza por presentar cilios bulbados en los márgenes del talo (Fig. 6) y un epicortex superior poreado, poros simples, más o menos oblongos, 150-270 poros de mm<sup>2</sup> y 7.3-9 m de diámetro (Fig. 7), apotecios numerosos, adnados, coronados, con abundantes picnidios en los márgenes del mismo, conidios globosos, los cuales se desarrollan acrogenamente (en cadenas) a partir de la pared picnidial (Fig. 8). Estas características lo diferencian de los demás géneros dentro de la familia Parmeliaceae, donde la forma de los conidios es cilíndrica, fusiforme a bifusiforme, y el desarrollo de los conidios es pleurógeno (Elix 1993). Es posible que algunas de las especies descritas de *Bulbothrix* no hallan sido suficientemente estudiadas, principalmente en lo

---

Fig. 3. *Coccocarpia culatensis* V. Marcano & A. Morales. Corte transversal del talo, donde se observa un cortex superior paraplectenquimatoso, una médula y un cortex inferior constituido por hifas muy compactas. La zona electrón-densa inferior corresponde al manto de rizinas. Escala = 50 m.

Fig. 4. *Coccocarpia duidensis* V. Marcano, L. Galiz & A. Morales. Detalle de las hifas del cortex inferior, donde se observa su carácter compacto, aglutinado y una superficie lisa. Escala = 15 m.

Fig. 5. *Coccocarpia duidensis*. Vista general de las rizinas. Escala= 43 m.





referente a las características de sus conidios y conidióforos. Por ello, se recomienda su estudio detallado mediante ME.

En el Amazonas Venezolano se colectó otro líquen, perteneciente al género *Stereocaulon*, siendo el primer registro de este género para toda la bioregión de la Amazonia. *Stereocaulon follmannii* V. Marcano, A. Morales & L. Galiz, llamado así en honor al líquenólogo alemán Gerhard Follmann (Marcano et al. 1995b). Los estudios por MEB de *S. follmannii*, permitieron reportar por primera vez la presencia del epicortex poreado en el género *Stereocaulon*. La forma de estos poros es rara en los líquenes, y se caracteriza por ser circulares, con un tamaño de 0.35 - 1.4 m de diámetro y una densidad de 8-12 poros por mm<sup>2</sup>. La corteza está formada por un tejido prosoplectenquimatoso, ausente de sustancias fenólicas, mientras que la médula esta compuesta de hifas paquidermatosas, con diámetro de 2-3 m, el cual posee la función de producir los componentes secundarios del líquen. Estos componentes secundarios son depositados como plaquetas o escamas sobre la superficie de las hifas medulares. A pesar de la importancia que guarda la presencia de un epicortex poreado en *S. follmannii*, no es así para el género, el cual no ha sido suficientemente estudiado a nivel ultraestructural.

En *Rimelia cetrata* Hale & Fletcher, procedente de los Andes venezolanos, se registró la presencia de poros en el epicortex de la superficie inferior, el cual es considerado el primer registro en los líquenes foliáceos. La forma de estos poros es regular, más o menos redondeada o circular, y tienen un tamaño de 2.3-3 m de diámetro y una densidad de 12-18 poros por mm<sup>2</sup> (Fig. 9). Hale

(1973, 1976 y 1981) y Hale and Fletcher (1990), estudiaron el epicortex de la superficie inferior de varias especies de líquenes pertenecientes a la familia Parmeliaceae, pero no reporta la presencia de poros. A través de MEB, también se pudo observar la presencia de rizinas simples de color negro, compuesto de un tejido prosoplectenquimatoso. El paquete de hifas que constituye las rizinas esta unida por una sustancia cementante electrón-densa. Sin embargo, la base de estas rizinas está compuesta por un tejido paraplectenquimatoso, observándose poca presencia de la sustancia cementante entre las paredes hifales. Este hecho llama la atención y sugiere el estudio del epicortex inferior de otras especies de Parmeliaceae, el cual ha sido muy descuidado.

Con todos estos resultados se intentó realizar una sistema de clasificación de los poros epicorticales en los Ascomicetes liquenizados suramericanos, determinándose dos tipos principales de epicortex poreados. Estos poros epicorticales presentan dos formas constantes, la cuales difieren atendiendo a su medida y modo de proyección en la superficie. La forma de macroporos epicorticales es común en las Parmeliaceae y está presente en *Bulbothricella amazonensis*, *Rimelia cetrata* y *Stereocaulon follmannii*. Estos poros se caracterizan por su variabilidad, son irregulares, aplanados y anchos, con un diámetro de (4-) 7.3-15 m, mientras los microporos epicorticales presentan un diámetro menor 0.35-1.4 (-3) m, son circulares o elongados, aplanados o más o menos hemiesféricos, semejante a una vejiga, y están presente en *Peltigera vainoi*, *Coccocarpia culatensis*, *C. duidensis* y *S. follmannii*. Esta última forma de poro epicortical ha sido reportada por otros autores en varios líquenes. La presencia

---

Fig 6. *Bulbothricella amazonensis* (V. Marcano, L. Galiz & A. Morales) V. Marcano, L. Galiz, A. Morales & S. Mohali. Vista de una sección del margen talino, donde se observan los cilios bulbados, bifurcados apicalmente, y los poros epicorticales. Escala = 85.5 µm.

Fig. 7. *Bulbothricella amazonensis*. Vista en detalle del epicortex poreado. Escala = 7.7 µm.

Fig. 8. *Bulbothricella amazonensis*. Corte transversal de un picnidio situado en las márgenes del apotecio, donde se observa los conidios globosos, con disposición acrógena. Escala = 30.5 µm.

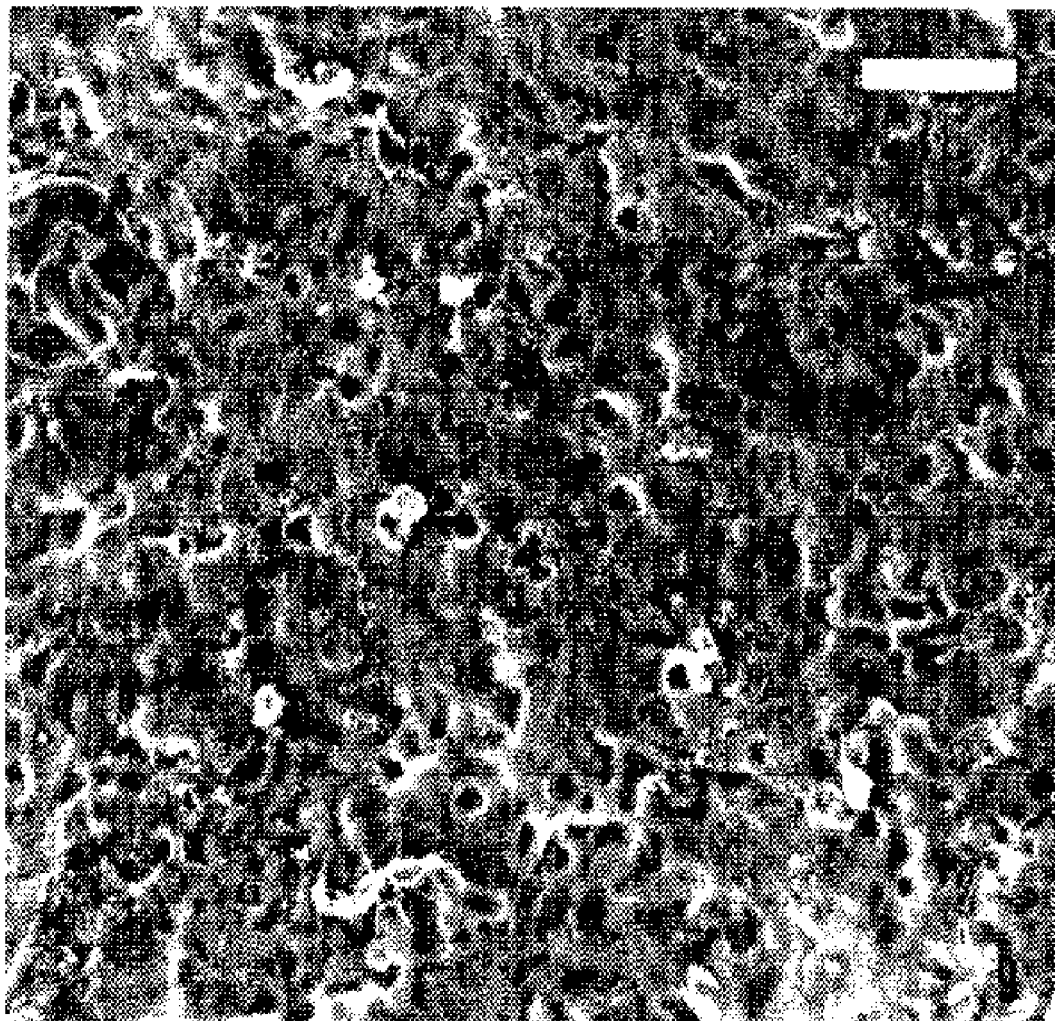


Fig. 9. *Rimelia cetrata* Hale & Fletcher. Vista en detalle del epicortex inferior, donde se aprecian los poros. Escala = 13.5  $\mu$ m.

de un epicortex microporeado sobre la corteza inferior está presente en *Rimelia cetrata*. En *S. follmannii* se hallan presente simultáneamente ambos tipos de poros.

La MET constituye el futuro promisor de los estudios por ME de los líquenes en Venezuela. Actualmente, se adelanta un estudio referente a los componentes intracelulares de los conidios de *Bulbothricella amazonensis* por MET.

### Consideraciones Finales y Problemas

Según Hawksworth (1994) la liquenología ha contribuido mucho con el debate de tópicos relacionados a la evolución de los hongos, colonización, co-evolución, fisiología y la ultraestructura de los mutualismos. En tales casos la utilización de la ME ha jugado un papel decisivo.

El avance en el estudio taxonómico de los



líquenes comenzó hace aproximadamente 30 años con la utilización del MET y MEB, observándose las características intracelulares y micromorfológicas del simbionte, que ayudaron por consiguiente a la clasificación de las diferentes taxa. Los estudios ultraestructurales de Honegger (1978-83) y Kärnefelt et al. (1993) modificaron el significado del asco en los grupos liquenizados, permitiendo el reconocimiento de diferentes grupos en distintos órdenes, por ejemplo : Lecanorales, Peltigerales, Pertusariales y Teloschistales. De igual manera estos estudios han permitido ampliar el conocimiento a cerca de las interacciones entre los biontes. Ahmadjian et al. (1978) observó una capa común que une a los biontes en las primeras etapas de la síntesis liquénicas. De igual forma fue importante el descubrimiento mediante MET de modelos similares sobre la superficie de los ficobiontes y micobiontes (Honegger 1984).

A pesar de haberse iniciado sólo hace dos años una investigación sistemática y continua de los líquenes venezolanos con el MEB, es posible que el futuro sea poco promisor. Una de nuestras mayores limitaciones constituye la escasez de recursos de nuestras instituciones y el enorme índice inflacionario. Las oficinas públicas nacionales de control fiscal han estimado una inflación del 70% desde octubre de 1994 a octubre de 1995. La inflación se debe a la devaluación del bolívar ante el dólar. La inconstancia de los valores de cambio y la escasez de dólares no permite adquirir equipos, reactivos y otros productos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de los niveles de producción científica de nuestros centros de investigación.

Por ello, para garantizar un mejor futuro de las investigaciones liquenológicas en Venezuela, es necesario fortalecer nuestros proyectos con el apoyo directo de instituciones extranjeras, mediante programas de intercambios. Actualmente, el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) apoya las investigaciones en el estado Amazonas. Algunas instituciones alemanas, como la universidad de Hamburgo se han mostrado interesadas en asistir estas investigaciones con programas de intercambios a través de la Deutscher Akademi-

scher Austauschdienst (DAAD).

De poder concretarse muchas de las expectativas de apoyo internacional, los estudios de los líquenes por ME en Venezuela podrían ofrecer experiencias y logros que contribuirían con el mejor conocimiento de la biodiversidad Neotropical. Así mismo daría la oportunidad para la formación de investigadores y estudiantes en el manejo de esta técnica y en la propia disciplina.

#### Reconocimientos

Se expresa un agradecimiento a José B. Ramírez y Henry Picón, del Departamento de Fotografía del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad de Los Andes, Mérida.

#### Referencias Bibliográficas

- Admadjian, V. Jacobs, J. & Russell, L. 1978.** Scanning electron microscope study of early lichen synthesis. *Science* 200: 1062-1064.
- Arvidsson, L. 1982.** A monograph of the lichen genus *Coccocarpia*. *Opera Botanica* 67: 1-96.
- Dykstra, M. 1992.** *Biological Electron Microscopy: theory, techniques, and troubleshooting*. Plenum Press, New York. 360 p.
- Elix, J.A. 1993.** Progress in the generic delimitation of *Parmelia sensu lato* lichens (Ascomycotina : Parmeliaceae) and a synoptic key to the Parmeliaceae. *The Bryologist* 96: 359-383.
- Hale, M. 1973.** Fine structure of the cortex in the lichen family Parmeliaceae viewed with the scanning-electron microscope. *Smithsonian Contributions to Botany* 10: 1-15.
- Hale, M. 1976.** Lichen structure viewed with the scanning electron microscope. In: *Lichenology: Progress and Problems* (Eds. D. Brown, D. Hawksworth and R. Bailey), 1-15. Academic Press, London, New York and San Francisco.
- Hale, M. 1981.** Pseudocypellae and pored epicortex in the Parmeliaceae. their delimitation and evolutionary significance. *Lichenologist* 13: 1-10.
- Hale, M. and Fletcher, A. 1990.** *Rimelia* Hale & Fletcher, a new lichen genus (Ascomycotina : Parmeliaceae). *The Bryologist* 93: 23-29.
- Hawksworth, D.L. 1969.** The scanning electron microscope:

- An aid to the study of cortical hyphal orientation in the lichen genera *Alectoria* and *Cornicularia*. *Journal Microscopie* 8: 753-760.
- Hawksworth, D.L. 1994.** The recent evolution of lichenology : a science for our times. *Cryptogamic Botany* 4: 117-129.
- Honegger, R. 1978a.** Licht-und elektronenoptische Untersuchungen an Flechten-Asci von Lecanorotyp. Dissertation, University of Zurich, Suiza.
- Honegger, R. 1978b.** The ascus apex in lichenized fungi. I. The *Lecanora*, *Peltigera* and *Teloschistes* types. *Lichenologist* 10: 47-72.
- Honegger, R. 1982.** The ascus apex in lichenized fungi. III. The *Pertusaria* type. *Lichenologist* 14: 205-219.
- Honegger, R. 1983.** The ascus apex in lichenized fungi. IV. *Baeomyces* and *Icmadophila* in comparison with *Cladonia* (Lecanorales) and the non-lichenized *Leotia* (Helotiales). *Lichenologist* 15: 57-63.
- Honegger, R. 1984.** Cytological aspects of the mycobiont-photobiont relationship in lichens. *Lichenologist* 16: 111-127.
- Kärnefelt, I. Mattsson, J. & Thell, A. 1993.** The lichen genera *Arctocetraria*, and *Cetrariella* (Parmeliaceae) and their presumed evolutionary affinities. *The Bryologist* 96: 394-404.
- López-Figueiras, M. & Palacios-Prü, E. 1979.** Ultraestructura de *Glossodium aversum*. *Revista de la Facultad de Farmacia. Mérida, ULA*, 20: 41-69.
- López-Figueiras, M. & Palacios-Prü, E. 1980.** Aspectos ultraestructurales de *Anzia* sp. *Pittieria* 8: 1-21.
- López-Figueiras, M. & Palacios-Prü, E. 1981. Organización morfológica del género *Usnea*. *Cuadernos de CME*. 1: 7-46.
- Marcano, V., Morales, A., Mohali, S., Galiz, L. & Palacios-Prü, E. 1995a.** El género *Coccocarpia* Pers. (Ascomycetes liquenizados) en Venezuela. *Tropical Bryology* 10: 215-227.
- Marcano, V., Galiz, L., Palacios-Prü, E., Mohali, S. & Morales, A. 1995b.** *Stereocaulon folmannii* Marcano, Morales et Galiz (Stereocaulaceae, Lecanorales), a new species from Venezuelan Amazonas. En : Flechten Follmann. Contributions to Lichenology in Honour of Gerhard Follmann (eds. F.J.A. Daniels, M. Schulz y J. Peine), 273-280. Published by the Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany.
- Marcano, V., Mohali, S., Palacios-Prü, E. & Morales, A. 1996.** The lichen genus *Bulbothricella*, a new segregate in the Parmeliaceae from Venezuela. *Lichenologist* 28: 421-430.
- Morales, A., Marcano, V., Galiz, L., Mohali, S. & Palacios-Prü, E. 1995.** *Bulbothrix amazonensis* sp. nov., a new species of Parmeliaceae (Lecanorales), from Venezuelan Amazonia. En : Flechten Follmann. Contributions to lichenology in Honour of Gerhard Follmann (eds. F.J.A. Daniels, M. Schulz y J. Peine), 281-286. Published by the Geobotanical and Phytotaxonomical Study Group, Botanical Institute, University of Cologne, Germany.
- Peveling E. 1969.** Elektronenoptische Untersuchungen an Flechten. IV. Die Feinstruktur einiger Flechten mit Cyanophyceen-Photobionten. *Protoplasma* 68: 209-222.
- Peveling, E. 1970.** Die Darstellung der Oberflächenstrukturen von Flechten mit dem Raster-Elektronenmikroskop. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, neue Folge* 4: 89-101.
- Peveling, E. 1976.** Investigations into the ultrastructure of lichens. In: *Lichenology: Progress and Problems* (Eds. D. Brown, D. Hawksworth & R. Bailey), 17-26. Academic Press, London, New York and San Francisco.
- Peveling, E. and Vahl, J. 1968.** Die Anwendung der Gefrierätzmethode für Untersuchungen mit Raster-Elektronenmikroskop im Vergleich mit herkömmlichen Untersuchungsmethoden. *Beitrag Elektronenmikroskopische Direktabbildung von Oberflächen* 1: 205-212.
- Tibell, L. 1971.** The Genus *Cyphelium* in Europe. *Svensk botanisk Tidskrift* 65 : 138-164.
- Vitikainen, O. 1994.** Taxonomic revision of *Peltigera* (lichenized Ascomycotina) in Europe. *Acta Botanica Fennica* 152: 1-96.
- Wischnitzer, S. 1970.** Introduction to Electron Microscopy. Pergamon Press, New York. 292 p.