

Alteraciones anatómicas en epidermis de hojas infectadas de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler (Viscaceae)

Alejandro F. Vugin*, Graciela B. Bassols, Beatriz G. Varela

Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 4º Piso (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: alevug@hotmail.com.

Resumen

Phoradendron bathyoryctum Eichler (Viscaceae) es una planta hemiparásita que crece en la República Argentina sobre varias especies arbóreas. Se utiliza en medicina popular de la misma manera que el muérdago europeo (*Viscum album* L. –Viscaceae–), para disminuir la presión arterial. Los muérdagos, a veces, pueden ser susceptibles de epiparasitismo, o también sufrir el ataque de diferentes agentes fitopatógenos. El objetivo de este estudio es analizar los cambios anatómicos que se producen en las hojas de *Ph. bathyoryctum* cuando son afectadas por algún agente infeccioso. Se colectaron ejemplares sanos e infectados, los últimos, con lesiones foliares superficiales. Se realizaron técnicas de raspado, diafanizado y obtención de epidermis en las hojas de los ejemplares. También se practicaron reacciones histoquímicas. En las hojas infectadas se observó una destrucción progresiva de los estomas y cambios en el resto de los tejidos epidérmico y subepidérmico, que dieron como resultado la formación de estructuras visibles macroscópicamente, y semejantes a lenticelas foliares. De acuerdo con las observaciones realizadas y por comparación con la bibliografía consultada, se supone que el daño foliar se inicia en el estoma donde se producen cambios estructurales hasta su destrucción, la modificación de las células adyacentes y la formación de lesiones superficiales en las hojas infectadas. En cuanto al agente, si bien no se pudo determinar en esta oportunidad, podría asociarse a algún tipo de virus. Se sugiere realizar futuros estudios para confirmar si los virus son los causantes de las lesiones.

Anatomical Changes in Epidermis of Infected Leaves of *Phoradendron bathyoryctum* Eichler (Viscaceae)

Summary

Phoradendron bathyoryctum Eichler (Viscaceae) is a hemiparasitic plant that grows in Argentina on several tree species. It is used in folk medicine in the same way as the European mistletoe (*Viscum album* L. –Viscaceae–) to lower blood pressure. These plants may sometimes be susceptible to epiparasitism, or even attacked by different plant pathogens. The aim of this study is to analyze the anatomical changes that occur in the leaves of *Ph. bathyoryctum* infected by a phytopathogen agent. Healthy and infected specimens were collected, the latter with superficial foliar injuries. Scraping, clearing, and epidermis obtaining techniques were performed on the leaves of the plants. Histochemical reactions were also performed. In the infected

Palabras clave: anatomía - epidermis - infección - muérdago - *Phoradendron* - Viscaceae.

Key words: Anatomy - epidermis - infection - mistletoe - *Phoradendron* - Viscaceae.

leaves a progressive destruction of stomata and changes in the rest of epidermal and sub epidermal tissue were observed, resulting in the formation of macroscopically visible structures and similar to foliar lenticels. According to the observations made and compared to the literature, it is believed that the leaf damage starts at the stoma, where structural changes occur until destruction, modification of adjacent cells, and superficial lesions in infected leaves. In respect to the agent, although it could not be determined at this time, it might be associated with a type of virus. Further studies are suggested to detect and confirm that the plant pathogen is causing the injuries.

Introducción

Phoradendron bathyoryctum Eichler –Viscaceae– (Sin. *Ph. hieronymi* Trel.) es una planta hemiparásita que crece sobre diversas especies arbóreas en el Norte y Centro de la República Argentina. Se trata de un arbusto con ramas opuestas o pseudo-dicotómicas, cilíndricas en su base y comprimidas en la región superior, con entrenudos de 2-7,5 cm de largo. Las hojas son coriáceas o subcoriáceas, de 3,5-9 cm de longitud y 1,5-3,5 cm de ancho, glabras, de lámina aovada o elíptica, basinervada con 5-7 nervaduras pronunciadas, ápice obtuso o redondeado y con un pecíolo de 5-10 mm de largo (Abbiati, 1946).

Se conoce a *Ph. bathyoryctum* con los nombres vulgares de “madroño”, “liga”, “muérdago”, “hierba huérfana”, entre otros. Se utiliza la infusión de sus hojas en medicina popular para tratar el asma y los dolores de cabeza (Martínez Crovetto, 1964; Toursarkissian, 1980), y para problemas cardíacos (dolores, palpitaciones) (Martínez Crovetto, 1981).

Además, por su hábito hemiparásito y por pertenecer a la misma familia que el muérdago europeo (*Viscum album* L.) se emplea, al igual que este, como hipotensora (Franz, 1986). Las hemiparásitas se nutren en parte de su hospedante, y así obtienen agua y sales minerales por medio de estructuras denominadas haustorios.

Según el criterio actual de clasificación de las plantas vasculares, basado en el sistema APG III (Stevens, 2012), los géneros *Viscum* y *Phoradendron* han sido reubicados dentro de Santalaceae. Sin embargo, en tanto no se afirme de manera definitiva ese sistema, se ha seguido el criterio taxonómico del *Catálogo de plantas vasculares de la flora del Cono Sur*, con actualizaciones en línea (Zuloaga y col., 2009).

Si bien se considera a *Ph. bathyoryctum* una planta invasora de los hospedantes sobre los que crece, su carácter hemiparásito no la hace inmune al ataque de

otros organismos como otras hemiparásitas (epiparasitismo o hiper-parasitismo) (Wiens y Calvin, 1987; Calvin y Wilson, 2009), al ataque de insectos diversos, hongos, bacterias, virus y viroides. Sin embargo, hay muy pocos registros que detallen patologías en el género *Phoradendron*, con excepción del ataque de algunas especies fúngicas (Darling, 1940).

Una enfermedad vegetal se puede definir como un efecto producido por cualquier agente patógeno que interfiera con su fisiología normal, y la planta muestra ese efecto con síntomas visibles (Brown, 1997). Las relaciones entre esos agentes y la planta huésped van desde transitorias hasta un alto grado de dependencia y especificidad. Los virus fitopatógenos, por ejemplo, son parásitos obligados y completamente dependientes de células vegetales vivas para completar su ciclo de replicación, lo cual provoca infecciones sistémicas de fácil transmisión y de difícil diagnóstico (Gepp, 1996). Por otro lado, los cambios metabólicos que producen esos patógenos, podrían alterar el metabolismo secundario del vegetal y originar modificaciones en la acción farmacológica.

El objetivo de este trabajo es informar el hallazgo de especímenes infectados y determinar las alteraciones anatómicas producidas en la superficie foliar de la hemiparásita luego de la infección.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se recolectaron ramas floríferas de plantas de *Ph. bathyoryctum* con hojas infectadas y también sanas en la provincia de Tucumán, Argentina. Con parte del material se confeccionaron ejemplares de herbario con los siguientes datos: Localidad: Dique El Cadillal, Tucumán, Argentina; fecha de recolección:

11-06-2011; Leg.: G.I. Ponessa, M.L. Wagner; observaciones: sobre hospedante sin determinar. Las muestras de estudio fueron determinadas y depositadas en la Cátedra de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Los ejemplares de herbario confeccionados serán incorporados próximamente en el Herbario del Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez" (BAF).

Para la identificación del material de estudio se consultaron los siguientes ejemplares: a. Jujuy, Ledesma; Leg.: R. Kiesling n° 8155 (SI); XI-1992; sobre hospedante sin determinar; b. San Juan, Valle Fértil; Leg.: R. Kiesling n° 4504 (SI); 19-II-1984; sobre *Celtis tala* Gill. & Planchon (Celtidaceae); c. San Juan, Valle Fértil; Leg.: E.R. Guaglianone & N. Tur n° 2450 (SI); 13-IV-1989; hospedante sin determinar; d. Catamarca, Quebrada del Tala; Leg.: Lorentz & Hieronymus n° 421 (BAF); 21/24-XI-1872; sobre hospedante sin determinar.

Se consideraron infectadas las hojas que presentaban lesiones superficiales visibles que se pueden observar a simple vista en ambas superficies del limbo foliar. Las hojas de las ramas colectadas fueron seleccionadas y separadas de los tallos.

Métodos

Tanto en las hojas sanas como en las enfermas se realizaron los siguientes procedimientos:

Observación macroscópica

Las hojas seleccionadas fueron observadas con un microscopio estereoscópico Carl Zeiss y fotografiadas con una cámara digital Kodak Easyshare M 1063.

Raspado

Se realizó según la técnica de Metcalfé. Las hojas se colocaron sobre un portaobjetos con la epidermis en estudio hacia abajo (se seleccionó la epidermis adaxial), se agregó sobre la superficie abaxial una solución de hipoclorito de sodio al 50 %, y se dejó actuar durante 10 minutos. La superficie abaxial y el mesófilo se rasparon cuidadosamente con una hoja de bisturí. Luego se lavó con agua destilada, y el material fue girado de manera que la superficie en observación quedara hacia arriba (D'Ambrogio de A., 1986).

Obtención de epidermis (Peeling)

El material en estudio fue colocado en un recipiente con una solución de ácido nítrico al 60 % y calentado en una estufa a 60 °C durante 5 minutos; se decantó el ácido y se lavó con agua destilada. La epidermis adaxial fue separada cuidadosamente con una pinza y montada entre portaobjetos y cubreobjetos (Ruzin, 1999).

Diafanización

Sobre hojas enteras se realizó la técnica con hidrato de cloral, y los diafanizados fueron coloreados con safranina a saturación en Etanol 80° y montados en Bálsamo de Canadá (Dizeo de Strittmatter, 1973).

Histoquímica

A algunas porciones del material obtenido por *peeling*, se les practicó las siguientes reacciones histoquímicas: 1) azul de anilina al 0,1 % en agua destilada y observación por microscopía de fluorescencia para la detección de calosa (Zarlavsky, 2014); 2) solución alcohólica al 1 % de floroglucina para detectar lignina (D'Ambrogio de A., 1986).

Fotomicrografías

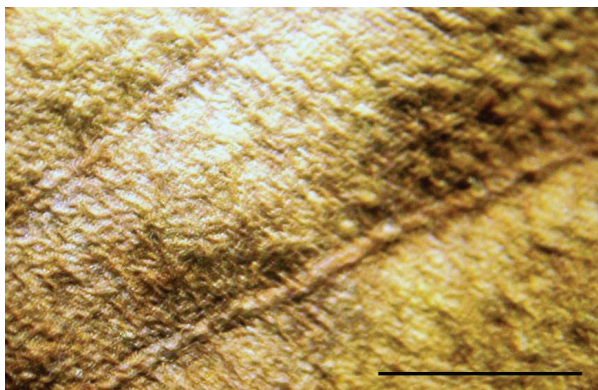
Los preparados se fotografiaron con un microscopio óptico Zeiss Axioskop 2, con lámpara de fluorescencia Zeiss Atto Arc 2 y capturadora de imágenes SONY NO SSCDE504.

Resultados y discusión

Macroscopía

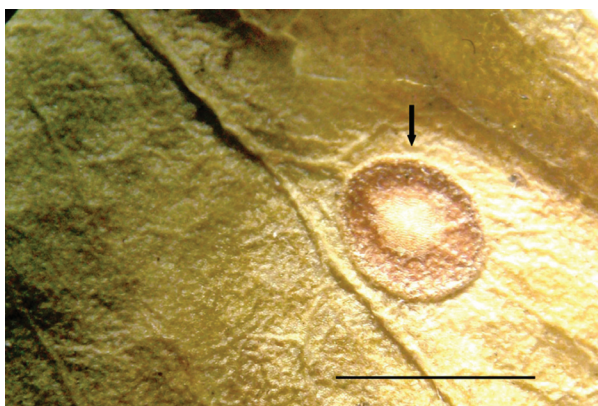
Las hojas sanas no presentaron ninguna lesión superficial (Figura 1). Se consideraron infectadas las hojas que, observadas con un microscopio estereoscópico, presentaron lesiones epidérmicas de contorno circular y bordes levantados de color pardo amarillento, rodeando un tejido irregular con pequeñas elevaciones de color más claro que el resto del limbo (Figura 2). Esas lesiones se extendían desde un 25 % a un 75 % de la superficie foliar. Por otro lado, no se detectó desarrollo fúngico en la superficie de las hojas enfermas.

Figura 1.- Limbo de hoja sana observado con microscopio estereoscópico



Escala: 5 mm.

Figura 2.- Lesión foliar observada con microscopio estereoscópico



La flecha indica la lesión. Escala: 5 mm.

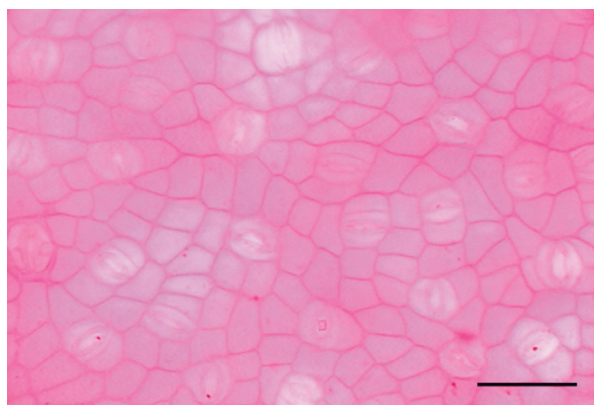
Microscopía

Se compararon los preparados obtenidos con las técnicas de diafanización, raspado y de *peeling*. En las zonas donde la hoja enferma presentaba las lesiones macroscópicas fueron observados cambios anatómicos que involucraban a las células de la epidermis y sus modificaciones (estomas).

Mediante la diafanización se comprobó el estado de las hojas sanas y de las lesiones en las hojas enfermas (Figuras 3 y 4). Las hojas sanas presentaron células epidérmicas rectangulares a poligonales (4-6 lados), de paredes rectas o algo curvadas. Los estomas son de tipo paracítico, con dos células anexas

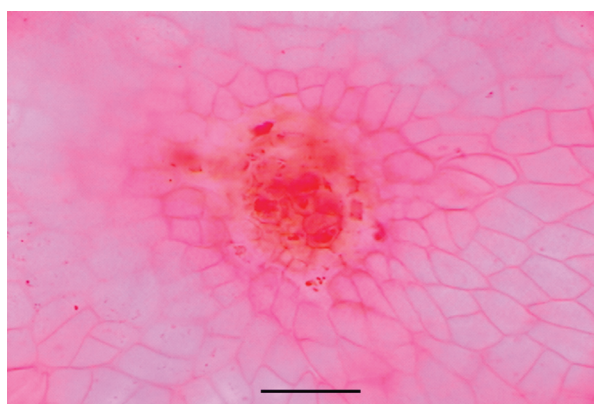
en orientación paralela al eje del ostiolo, con paredes laterales internas cóncavas y externas profundamente convexas (Varela, 2003). El mismo patrón se repitió en ambas epidermis. Las hojas enfermas mostraron una alteración generalizada en la zona estomática y las células circundantes.

Figura 3.- Diafanizado de hoja sana: células epidérmicas y estomas



Escala: 100 μ m.

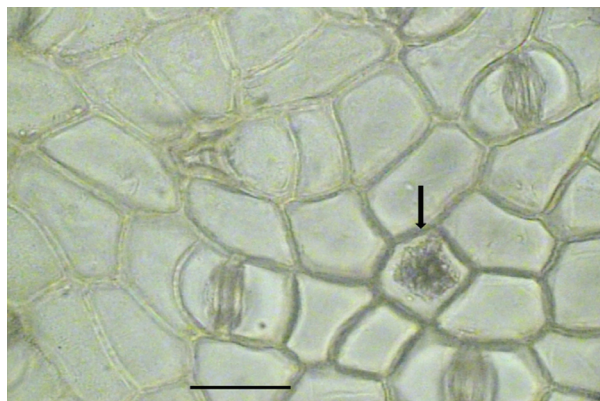
Figura 4.- Lesión observada en diafanizado de una hoja enferma



Escala: 100 μ m.

La observación del *peeling* en el microscopio óptico reveló la presencia de idioblastos que contenían depósitos amorfos (Figura 5).

Figura 5.- Peeling. Epidermis de hoja infectada y diferentes estadios de lesiones adyacentes



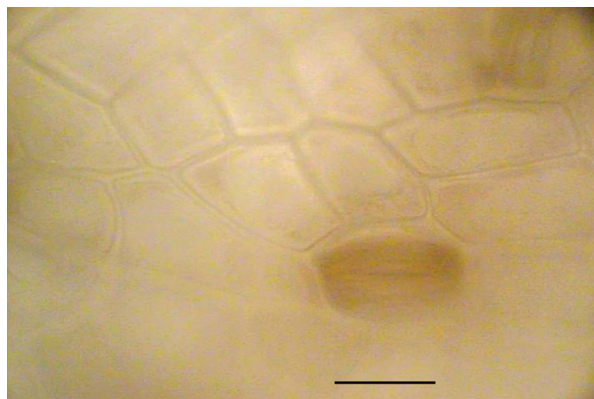
Idioblasto con depósito de material amorfo (flecha). Escala: 100 μm .

Los raspados realizados mostraron alteraciones en las células oclusivas de los estomas, con engrosamiento de sus paredes o las del ostiolo, y diferentes estadios de destrucción. Además, se observó que se rodean de un grupo de células a medida que avanza la destrucción del estoma (Figuras 6 - 11).

Con ninguno de los métodos microscópicos aplicados se observaron hifas ni otras estructuras fúngicas. Se comparó con la bibliografía existente sobre patologías vegetales y se consideró que podría tratarse de algún agente viral, afín al virus del mosaico del tabaco (Agrios, 2005). Debido a los estadios de las lesiones observadas, se supone que el agente infeccioso penetra por el estoma y asume su control y se rodea de células epidérmicas que forman una corona a su alrededor. Las paredes del ostiolo comienzan a engrosarse y luego, las del resto del estoma, y producen su necrosis. En forma espiralada se afectan las zonas adyacentes a la lesión primaria, y se forma una lesión macroscópicamente visible en ambas superficies de la hoja. La infección se disemina al resto de la hoja y, por último, a la planta entera a través del floema, según otros estudios realizados (Hipper, 2013).

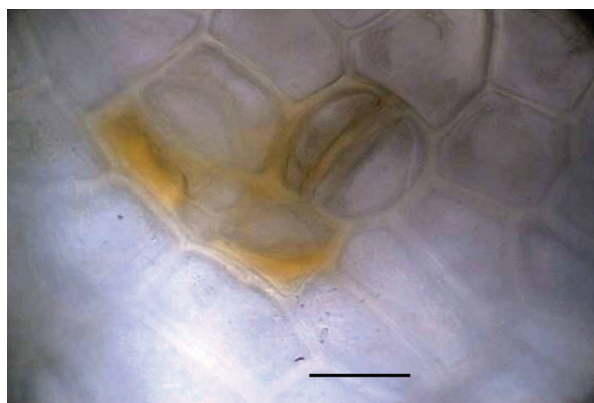
Los estudios histoquímicos revelaron la presencia de engrosamientos de calosa en algunos sectores afectados. La microscopía de fluorescencia reveló zonas fluorescentes en esos engrosamientos por la reacción con azul de anilina, y se diferenció de la fluorescencia de base del resto de la epidermis.

Figura 6.- Raspado de una hoja infectada



Se observan alteraciones en el estoma y engrosamiento de las paredes del ostiolo. Escala: 50 μm .

Figura 7.- Raspado. Estoma con ostiolo engrosado



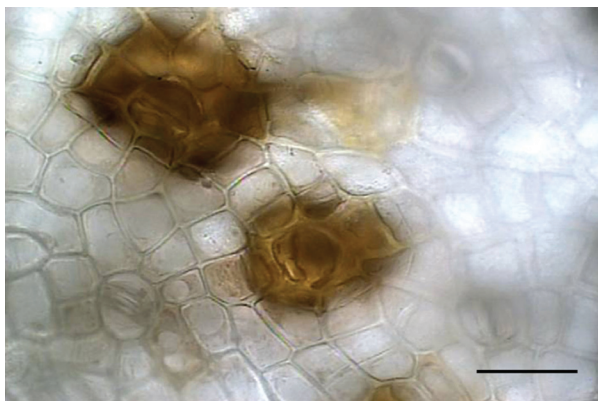
Inicio de necrosis en células oclusivas, y grupo de células que comienzan a rodear al estoma. Escala: 50 μm .

Figura 8.- Raspado. Primer estadio



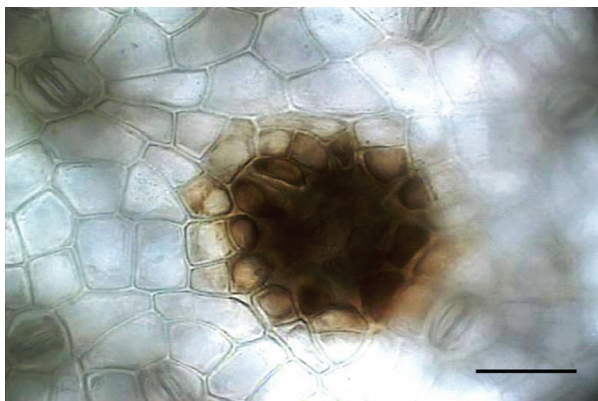
Engrosamiento del ostiolo (arriba, derecha). Estadio más avanzado: destrucción parcial del estoma y corona de células a su alrededor (centro). Escala: 50 μm .

Figura 9.- Raspado. Estadio intermedio



Estoma con una célula oclusiva destruida y la otra con las paredes del ostiolo engrosadas (centro). Estoma con una célula oclusiva a punto de estallar (arriba, izquierda). Escala: 100 μ m.

Figura 10.- Raspado. Estadio final



Destrucción casi total del estoma y células alrededor de la lesión (centro). Diferentes estadios de necrosis estomática. Escala: 100 μ m.

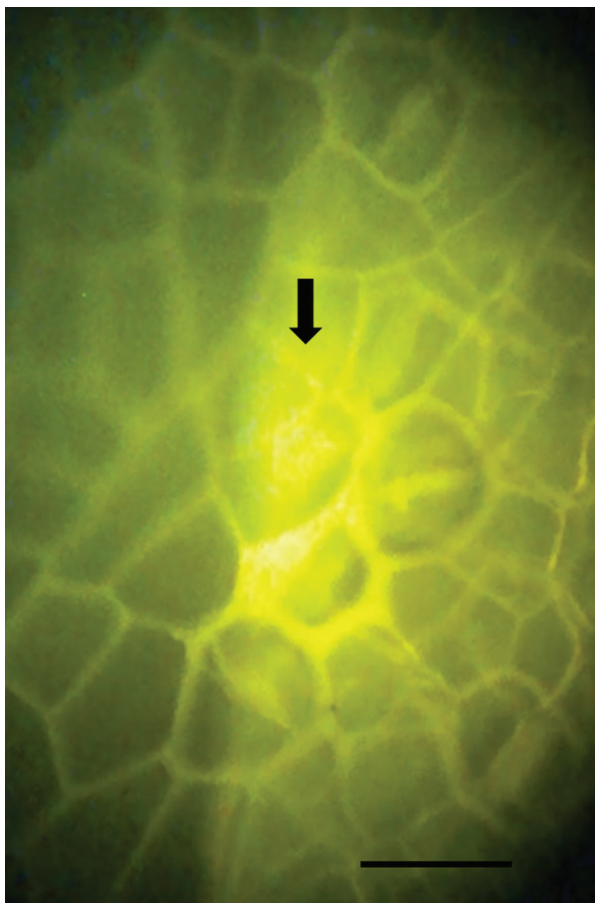
Figura 11.- Raspado. Estoma destruido completamente



La lesión se propaga en forma centrífuga. Escala: 100 μ m.

Estas manifestaciones indican que el vegetal reacciona, y en consecuencia, intenta frenar el avance del agente infeccioso mediante el recubrimiento con calosa de las zonas afectadas (Figura 12). Con la evolución, las plantas generaron sistemas de defensa contra el ataque de patógenos basados en barreras estructurales o químicas, o bien una respuesta metabólica activa (Blanco-Labra y Aguirre Mancilla, 2002). Por otro lado, mediante la reacción de caracterización con floroglucina no se detectó lignina.

Figura 12.- Detección de calosa



Engrosamientos de calosa vistos con microscopía de fluorescencia (flecha). Escala: 50 μ m.

Si bien los primeros estadios observados fueron macroscópicamente semejantes a las lenticelas foliares descritas en *Tripodanthus acutifolius* (R. & P.) Tiegh. (Loranthaceae), la microscopía fue diferente e indica un origen distinto. Las lenticelas foliares se forman por divisiones periclinales y anticlinales en el nivel subepidérmico y de las cámaras subestomáticas, con posterior suberificación y lignificación (De Morretes y Venturelli, 1985). La ausencia de lignina revelada por la histoquímica confirmó un origen distinto para las lesiones observadas.

Conclusión

Hasta el momento no se han descrito patologías causadas por bacterias, virus o viroides en especies de *Phoradendron*, ni en plantas relacionadas, pero las lesiones y los cambios anatómicos epidérmicos observados en las hojas enfermas serían consecuencia de una infección provocada en la hemiparásita. En cuanto a la cantidad de hojas enfermas por planta, es un dato que no se pudo precisar porque no se colectó la planta entera (que puede tener un tamaño considerable, y en general, son de acceso complicado por crecer sobre árboles), sino que se recogieron ramas floríferas.

Se propone continuar los estudios en trabajos futuros para analizar si la infección produce modificaciones anatómicas en los tejidos foliares más internos; detectar y confirmar el agente infeccioso en las lesiones, además de los cambios metabólicos que se producen en el ejemplar, y destacar la importancia de la determinación de este tipo de infecciones en los controles farmacobotánicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado mediante el subsidio 01/W459 de la Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad de Buenos Aires. Los autores agradecen al Dr. Marcelo L. Wagner por la provisión del material vegetal y la lectura crítica del trabajo.

Referencias bibliográficas

Abbiatti, D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Rev. Mus. La Plata* (N.S.), Sec. Bot. 7: 1-110.

- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. Academic Press, New York: 723-824.
- Blanco-Labra, A.; Aguirre Mancilla, C. (2002). "Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas". *Acta Universitaria* 12(3): 3-28.
- Brown, J.F. (1997). "Plant pathology: an overview", en *Plant Pathogens and Plant Diseases*, J.F. Brown & H.J. Ogle (eds), Rockvale Publications, APPS, Armidale: 3-20.
- Calvin, C.L.; Wilson, C.A. (2009). "Epiparasitism in *Phoradendron durangense* and *P. falcatum* (Viscaceae)". *Aliso* 27: 1-12.
- D'Ambrogio de A., A. (1986). *Manual de Técnicas en Histología Vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 54-60.
- Darling, L. (1940). "Protocoronospora on *Phoradendron flavescens* in California". *Madrono* 5(8): 241-246.
- De Morretes, B.L.; Venturelli M. (1985). "Ocorrência de "lenticelas" en folhas de *Tripodanthus acutifolius* (R. & P.) Tiegh. (Loranthaceae)". *Rev. Brasil. Bot.* 8: 157-162.
- Dizeo de Strittmatter, C. (1973). "Nueva técnica de diafanización". *Bol. Soc. Argent. Bot.* 15: 126-129.
- Franz, H. (1986). "Request for an impartial discussion of the so-called Mistletoe therapy". *Oncology* 43(1): 1.
- Gepp, V. (1996). *Virus y viroides fitopatógenos*. Dpto. de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay: 27 pp.
- Hipper, C.; Brault, V.; Ziegler-Graff, V.; Revers, F. (2013). "Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses". *Front. Plant Sci.* 4, artículo 154: 1-24.
- Martínez Crovetto, R. (1964). "Estudios etnobotánicos I. Nombres de plantas y su utilidad, según los indios Tobas del este del Chaco". *Bonplandia* 1(4): 279-333.
- Martínez Crovetto, R. (1981). "Las plantas utilizadas en Medicina Popular en el Noroeste de Corrientes (República Argentina)". *Miscelánea* 69: 1-139.
- Ruzin, S.E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, Oxford: 133.
- Stevens, P.F. [en línea]. *Angiosperm Phylogeny Website*; última revisión: 2012 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>[Consulta: 03/2014].
- Toursarkissian, M. (1980). *Plantas medicinales de la Argentina*. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 79.

- Varela, B.G. (2003). "Anatomía foliar y caulinar comparativa de los muérdagos argentinos. Importancia Farmacobotánica. Relación con el muérdago europeo. *Tesis Doctoral*, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA): 223.
- Wiens, D.; Calvin C.L. (1987). "Epiparasitism in Mistletoes". *The Golden Bough* 9: 2-4.
- Zarlavsky, G.E. (2014). *Histología vegetal. Técnicas simples y complejas*. Soc. Argentina de Botánica, Buenos Aires: 57, 125.
- Zuloaga, F.O; Morrone, O.; Belgrano, M.J. (Eds.). (2009) [en línea]. *Catálogo de las Plantas Vasculares del Conosur II*; <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp> [Consulta: 02/2014].