UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

Ensayo sobre anatomía, palinología y fitoquímica de especies españolas de la sección *Trichophyllae* B.S.G. del género *Grimmia* Hedw. (Bryopsida, Bryophyta).

TESIS DOCTORAL

BELÉN ESTÉBANEZ PÉREZ

Madrid, febrero de 1995

BELÉN
ESTÉBANEZ
PÉREZ

Ensayo sobre anatomía, palinología y fitoquímica de especies españolas de las sección *Trichophyllae* B.S.G. del género *Grimmia* Hedw. (Bryopsida, Bryophyta).

TESIS DOCTORAL

1995

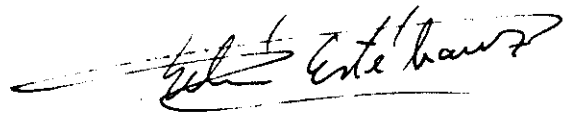
¡Qué vergüenza! Después de terminar la tesis "al filo de lo imposible," descubro que hay una errata imperdonable. Y es que se me pueden olvidar las láminas, o las leyendas, o las conclusiones, o incluso limar los ejemplares. ¡Pero la dedicatoria del ejemplar de Mª Eugenia...! Aunque sea 9 meses después, ya imagino con cuánto cariño te la dedico.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

Ensayo sobre anatomía, palinología y fitoquímica de especies españolas de la sección *Trichophyllae* B.S.G. del género *Grimmia* Hedw. (Bryopsida, Bryophyta).

Memoria presentada por

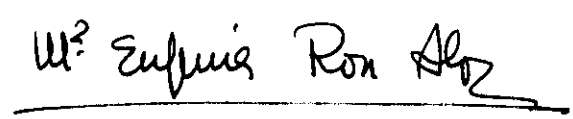
BELEN ESTÉBANEZ PÉREZ



para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Trabajo realizado bajo la dirección de la doctora

EUGENIA RON ÁLVAREZ



Madrid, febrero de 1995

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradezco a la Dra. Eugenia Ron, Directora de esta tesis, su extraordinario interés y dedicación a lo largo de todas las fases de su realización, tanto en la orientación y desarrollo de la investigación, donde puso de manifiesto su increíble conocimiento botánico y creatividad científica, como durante la confección material de la Memoria doctoral, en la que me proporcionó todo tipo de medios que necesitara, y colaboró con absoluta entrega incluso en las tareas más mecánicas y tediosas. Quiero resaltar también su ayuda en el plano personal a lo largo de estos años, que ha conseguido mantener viva la ilusión por una "aventura investigadora", que no siempre se sabía cómo iba a concluir (ni siquiera, a veces, qué rumbo iba a tomar a corto plazo). Trabajar a su lado, bajo su dirección, ha sido una experiencia personal y científica enormemente enriquecedora.

También expreso mi más profundo reconocimiento al Dr. Jaime Bermejo, del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología de La Laguna (Tenerife), a quien se debe la parte fitoquímica. Su colaboración, totalmente desinteresada, y su dedicación y paciencia, durante el tiempo que estuve en su laboratorio, y en la corrección del manuscrito, han sido un estímulo importante en esta investigación.

Asimismo, en cuanto a esta parte de la tesis, quiero agradecer a los Dres. Arturo Velasco y Mª José Pérez Alonso su colaboración en la búsqueda de flavonoides, así como su ayuda, suministrando reactivos y productos, y discutiendo los resultados.

Los Directores de Departamento a lo largo de estos años me facilitaron en todo momento el acceso a la infraestructura necesaria. Además, el Dr. Carlos Vicente colaboró en la búsqueda de bibliografía sobre las sustancias químicas identificadas.

En esta tesis no se habrían podido ofrecer datos histoquímicos de no ser por la Dra. Alicia Cortella, del Museo Nacional de La Plata (Argentina), profesora visitante en el Departamento, que me enseñó las técnicas fundamentales y, durante sus tres estancias, me brindó siempre su generosa colaboración en cualquier aspecto.

Agradezco a los Dres. Cruz Casas y Víctor Canalís, de Barcelona, la información y las precisas indicaciones que me dieron sobre la localización de *Gr. incurva*, gracias a las cuales conseguí recolectarla. La identificación cierta de *Gr. retracta* fue posible gracias a la amabilidad del Dr. Juan Guerra, que me envió todas las muestras presentes en el Herbario de la Universidad de Murcia.

La asistencia técnica recibida en esta investigación ha sido excepcional. La profesionalidad de D. Miguel Jerez, en el microscopio electrónico de barrido del Real Jardín Botánico de Madrid, y de D. Agustín Fernández y D. Eugenio Baldonedo, del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense, han ido más allá de lo que su trabajo les exige, y todos ellos se han implicado personalmente en los problemas investigadores que se precisaba resolver. Resalto el trato especial dispensado por el director del mencionado Centro, el Dr. Carlos Barba, que muy a menudo nos dio prioridad en la utilización del servicio de microscopía. Por esto, y por la preocupación mostrada por los técnicos, su buen hacer y su extremada generosidad con su tiempo, más allá de sus jornadas laborales, ha sido posible la presentación de observaciones sobre ultraestructura, fundamentales en esta tesis.

En la recolección de las especies me han acompañado amigos que no solamente estaban dispuestos a postergar sus planes, madrugar y subirse al monte a por musgos en cualquier condición climatológica; sino que además parecían disfrutar con ello, lo que sorprende siendo casi todos ellos de fuera del mundo de la botánica. A Toño, Quique, Elena, Pili, Humberto, Elisa, Berna y otros que sería largo especificar, muchas gracias.

Durante mis dos estancias en Tenerife, gocé de una cálida acogida, tanto por parte de mis compañeros de laboratorio, como de los investigadores del Departamento de Biología Celular de la Universidad de La Laguna.

Entre éstos, el Dr. Miguel Ángel Pérez Batista, entre otras atenciones, me facilitó el acceso a la biblioteca del Departamento, y me resolvió abundantes consultas sobre la interpretación de los datos ultraestructurales.

La próximamente doctora Mª del Carmen Alfayate me ofreció su apoyo, su compañerismo y su amistad, consolidada también aquí durante sus visitas a la Universidad Complutense. No olvido tampoco la simpatía y ayuda de su familia. Desde aquí le deseo a Manane toda la suerte del mundo, para el remate de su tesis y para su investigación futura.

Tampoco puedo olvidar la generosidad de Carmina, en cuya casa estuve alojada; y la delicadeza de mis compañeras posteriores, en el C.M.U. Santa María del Pino, que respetaron mis horarios de trabajo y me animaron en los descansos.

Con cariño, debo mencionar a mis compañeros de departamento, a Luis y Miguel (amigos con los que compartí, además, equipo de investigación), Antonio, Elena, Jesús V.; Mari, que tantas veces me echó una mano en las labores más pesadas, Jesús, Mª Elena, y todos los que contribuyeron a que el tiempo que he pasado aquí sea inolvidable. Especialmente recuerdo a Marta y a Luis, que con su esfuerzo y ayuda hicieron posible la presentación a tiempo de este trabajo.

Otros amigos me dieron ánimo durante el tiempo libre. Entre ellos, Elisa, Antonio, Marisa, Carmen, María, Pedro, Carmen, Benito, y mis compañeros del barrio, en especial los del grupo "Mater Natura".

No puedo olvidar la ayuda de Mercedes Molina, imprescindible en las gestiones para conseguir, contra reloj, presentar y defender esta tesis a tiempo.

Por último, agradezco a mi familia el apoyo constante, material y moral, que se ha plasmado también en contribución directa (mecanografiado del texto, recolecciones, gestiones, etc.).

Que todos ellos, y también aquéllos que imperdonablemente me pasan ahora inadvertidos, crean en mi más profunda gratitud.

ÍNDICE

INTRODUCCION 1

Anatomía 3

Palinología 10

Fitoquímica 12

MATERIAL Y MÉTODOS 17

Material biológico 17

Métodos 32

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Anatomía 57

Gametófito: Resultados 57
Gametófito: Discusión 128
Esporófito: Resultados 142
Esporófito: Discusión 194
Zona de transición: Resultados 206
Zona de transición: Discusión 236
Discusión general 243

Palinología: Resultados 251
Palinología: Discusión 278

Fitoquímica: Resultados 289
Fitoquímica: Discusión 323

Discusión general 327

CONCLUSIONES 335

BIBLIOGRAFÍA 339

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los briófitos son una división de plantas arquegoniadas, caracterizada por un ciclo de alternancia de generaciones heteromorfa, en la que el esporófito establece una relación de dependencia con el gametófito, al que está unido durante toda su vida.

Por su organización intermedia entre las algas y las plantas vasculares, se consideran un grupo clave para entender la evolución de los vegetales y la colonización del medio terrestre. Su posible origen mono- o polifilético está en el centro de la controversia acerca de si existió un único antecesor de las plantas verdes, y, dada la presencia de algunos datos que indican su posible relación con las algas de la división Charophyta, especialmente con el orden Charales (Graham & Delviche 1991), de si la colonización del medio terrestre por parte de un hipotético antepasado algal fue realizada en uno o varios eventos.

Sin embargo, muchos aspectos de su biología son aún desconocidos. Por la escasa tradición existente en cuanto a su utilización práctica, y por carecer de los complejos tejidos conductores de plantas vasculares, son a menudo relegados en su estudio, y aparecen en muchas ocasiones con la consideración de "plantas inferiores" o "de escasa diferenciación", cuando se trata de vegetales capaces de desarrollar especializaciones que les permiten sobrevivir en ambientes muy hostiles: regiones polares en las que no aparece ninguna planta, desiertos o rocas expuestas, donde deben soportar rigurosas oscilaciones térmicas y xericidad.

Esta postergación hace que existan pocos protocolos experimentales desarrollados específicamente para briófitos (Duckett et al. 1988), lo que dificulta su estudio, aunque en el pasado algunas técnicas de inclusión en parafina han sido puestas a punto con este material vegetal, debido a la ausencia de tejidos leñosos.

Aún se carece de un inventario completo de las especies de briófitos (más de 25000), y de muy pocas de ellas se dispone de monografías a nivel mundial.

Las revisiones taxonómicas, incluso actualmente, se hacen basándose casi exclusivamente en la morfología externa, lo que no contribuye a contrastar el valor general para el grupo de los estudios estructurales, morfogenéticos o bioquímicos, hasta la fecha muy restringidos en cuanto al número de especies investigadas.

El género *Grimmia*, dentro de los musgos acrocárpicos, elegido para la realización de esta tesis, comprende cerca de 170 especies. Muestran una gran heterogeneidad con respecto a tamaño, diferenciación estructural, morfología externa del filidio, cápsula, perístomas, esporas, etc., lo que ha originado múltiples subdivisiones en subgéneros y secciones (Bruch, Schimper & Gümbel 1845, Schimper 1856, 1860, 1876, Limpricht 1889, Kindberg 1897, Hagen 1909, Loeske 1930). Solamente se conoce un estudio anatómico del género realizado por Kawai (1965). Sin embargo, las principales monografías están basadas en general en datos sobre su morfología externa (Loeske 1930, Deguchi 1978, Cao & Vitt 1986). Por la amplitud de este género, el presente trabajo se ha restringido a la sección *Trichophyllae* B.S.G., caracterizada por un filidio biestrato sólo en su porción apical, un margen plano o recurvado, seta flexuosa o cígnea, y cápsulas frecuentemente con costillas presentes en estado deshidratado.

Con el fin de contribuir a su estudio, se han seleccionado caracteres considerados, en principio, relevantes en la biología de estos musgos:

ANATOMÍA

En la biología de briófitos es fundamental la investigación sobre su complejidad estructural y la caracterización de los tejidos, especialmente en musgos acrocárpicos, donde la organización es máxima.

Los primeros autores en poner de manifiesto los distintos tipos celulares de los tejidos briofíticos fueron Schimper (1848), que observó por primera vez la presencia de traza vascular en musgos, Potonié (1883), que definió como "hidroides" las células que la componen, y Tansley & Chick (1901), que señalaron la presencia de otro tipo de células conductoras que denominaron "leptoides". Sin embargo, otros autores también destacables por sus trabajos sobre organografía son Lorentz (1867), Haberlandt (1886), gran estudioso de la anatomía fisiológica vegetal, Vaizey (1888) y Lorch (1894), que investigaron la anatomía y el desarrollo del esporófito, y Goebel (1930), que trabajó sobre briófitos y pteridófitos.

Con respecto al gametófito, más recientemente, Kawai abordó una tipificación de los caulidios de musgos (Kawai & Ikeda 1970, Kawai 1989), basándose en tinciones diferenciales, y encontrando una estrecha correspondencia entre determinados tipos anatómicos y ciertos órdenes de musgos.

En función de sus características fisiológicas y estructurales, destacan los trabajos de Hébant sobre tejidos conductores. El alto valor taxonómico y evolutivo que les concede (Hébant 1965, 1977, 1979) le lleva a ser un pionero del análisis de sus caracteres ultraestructurales (Hébant 1975), con el fin de conocer con mayor detalle las posibles semejanzas entre los distintos grupos de briófitos, así como de éstos con las plantas vasculares.

Asimismo, suponen una aportación los trabajos de Berthier (1972) sobre morfogénesis, y los ultraestructurales de Finocchio (1967), Caputo & Castaldo (1968), Ligrone et al. (1980, 1982a, b), Oliver & Bewley (1984) entre otros. Se reconoce que estos trabajos, especialmente los morfogenéticos, pueden aportar una importante contribución al entendimiento de la sistemática y filogenia de briófitos (Duckett 1986, Duckett & Renzaglia 1988).

Sobre *Grimmia* se conoce tan sólo el trabajo de Kawai (1965), que se refiere a la diferenciación morfológica de los tejidos del caulidio y del filidio, y a la ontogenia de éste.

* * *

Con respecto al esporófito de musgos, las investigaciones realizadas son aún más escasas. Aparte de los primeros estudios ya reseñados, la mayor parte de los trabajos se han llevado a cabo sobre la fisiología del transporte de nutrientes, resumidos por Bopp & Weniger (1971) y Hébant (1977). Sobre anatomía, destacan los trabajos de Wijk (1932), Hébant (1964), Roth (1969), Kawai (1969), y los ultraestructurales de Bassi & Favali (1973), Favali & Gianni (1973, 1975) y Schulz & Wiencke (1976).

Sobre la cápsula, aunque la morfología externa se estudia ampliamente para el diagnóstico taxonómico, no ocurre lo mismo con los caracteres anatómicos. Acerca de éstos, poco se ha aportado desde los estudios de Goebel (1930) o Campbell (1918), con la excepción de la anatomía y estructura del tapete (Paolillo 1969, Mueller 1974, Gambardella et al. 1994). Esta situación contrasta con el gran número de datos acerca del perístoma, que siempre ha sido considerado como un importante carácter para la diferenciación de los grandes grupos de musgos, y, desde los estudios de Philibert (1884-1902), los caracteres del perístoma, al menos a microscopía óptica, se incluyen normalmente en las descripciones de cada especie. Su desarrollo ha sido revisado por Edwards (1984), y su función en la liberación de esporas, discutida en profundidad por Mueller & Neumann (1988). Han sido empleados con fines taxonómicos en Encalyptaceae (Vitt & Hamilton 1974), Fissidentaceae (Bruggeman-Nannenga & Berendsen 1990, Bruggeman-Nannenga & Roos 1990), Ditrichaceae y Dicranaceae (Shaw et al. 1989), Tetraphidae (Shaw & Anderson 1988), y Orthotrichaceae (Vitt 1971, 1981, Lewinsky 1989, Lara et al. 1993).

En *Grimmia*, dada la estabilidad de algunas especies, o su rara fructificación, los estudios sobre anatomía de esporófito son muy escasos, y se limitan a comentarios genéricos sobre el desarrollo de su traza (Lorch 1931) o sobre la diferenciación de tejidos en seta o la morfología de las células del exotecio (Deguchi 1978). Sobre el perístoma, además de las observaciones de Philibert (1884), se conocen algunas anotaciones sobre la ornamentación o el grado de división en las monografías citadas.

* * *

El estudio de la zona de transición es de gran importancia por referirse específicamente a la relación de dependencia permanente del esporófito con respecto al gametófito, característica de briófitos.

En cuanto a los estudios anatómicos referentes a la zona de contacto de ambas generaciones, destacan los de Goebel (1930), Bower (1908) y Haberlandt (1914). Lorch (1925a,b, 1931) fue el primero en señalar la existencia de unas células en la placenta briofítica con gruesos depósitos de material de pared. El trabajo de Blaikley (1933) confirma la naturaleza celulósica de los mismos, y asocia su presencia, además, a la aparición de un denso citoplasma en estas células.

Eymé & Suire (1967) y Maier (1967) publicaron los primeros estudios ultraestructurales sobre estas células, señalando caracteres típicos como abundancia de mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso, así como el contorno irregular de los engrosamientos. Roth (1969) realizó diversas observaciones histogenéticas y morfológicas sobre la placenta, y en particular sobre estas células, en varias especies. Pero fueron Gunning et al. (1968) los que les dieron la denominación de células de transferencia, caracterizadas por sus "paredes laberínticas", que consideraron especializadas en transporte a cortas distancias (Gunning et al. 1969) y que ellos estudiaron en primer lugar en vasos floemáticos de hojas de leguminosas, y en nódulos radiculares (Pate et al. 1969). Posteriormente, en la recopilación de Gunning et al. (1974) y en la de Kelley (1969) en hepáticas, se señaló la amplia diversidad de su presencia en embriófitos, tanto en estructuras vegetativas como reproductoras (aunque ellos restringieron su presencia en briófitos tan sólo a la placenta), así como la especificidad taxonómica tanto en su distribución en el organismo vegetal como en la disposición y forma de los engrosamientos dentro de la célula. Posteriormente se ha conocido la existencia de estas células en estructuras vegetativas de briófitos: en el parénquima contiguo a la traza vascular gametofítica (Hébant 1970), en el parénquima foliar de *Polytrichum commune* (Scheirer 1983) e incluso en las superficies de callos de cultivo gametofíticos (Lal & Narang, 1985), lo que, junto con trabajos previos de Maier & Maier

(1972) sobre el crecimiento de los engrosamientos al añadir azúcares al medio, parece indicar la influencia de factores ambientales sobre una base genética que permite el desarrollo de estas células.

De gran importancia filogenética puede considerarse el descubrimiento de células de transferencia en el clorófito *Coleochaete orbicularis* (Graham & Wilcox 1983) en las células adyacentes al zigoto, no sólo por ser la primera cita en talófitos, sino por tratarse de una situación en cierto modo equivalente a la placenta briofítica, lo que sugiere la existencia de un antecesor común para ambos grupos vegetales.

Los primeros estudios ultraestructurales, ya reseñados, fueron completados con mayor profundidad por diversos autores. Destacan los de Wiencke & Schulz (1975, 1978), Browning & Gunning (1977, 1979a,b,c), Chauhan & Lal (1980), Caussin et al. (1983), Ligrone et al. (1982a) y Ligrone & Gambardella (1988a,b) sobre características citológicas de las células de transferencia, tales como abundancia de plasmodesmos, subdivisión de la pared en distintas capas y extensión de la pared laberíntica según la localización de las células en la placenta, todo ello en distintas especies de briófitos.

Se sugiere una utilización de los caracteres anatómicos de la vagínula para taxonomía, tanto para grandes grupos (Ligrone & Gambardella 1988a,b) como para niveles genéricos (Vaughn & Hasegawa 1993).

En el género *Grimmia* tan sólo se ha estudiado la morfología externa de la vagínula (Hagen 1909) y la de sus células epidérmicas (Deguchi 1978).

* * *

Una dificultad añadida a los estudios anatómicos en briófitos es la gran confusión terminológica en cuanto a la denominación de los tipos celulares (Hébant 1979), y las divergencias en cuanto a la interpretación de la configuración organográfica: así, mientras que Kawai considera casos de especímenes en que colapsa la traza vascular de hidroides, o en que es poco diferenciable (Kawai 1965), Hébant (1979) opina que el primer caso se debe a alteraciones sufridas por la desecación en material de herbario, mientras que el segundo no lo admite ni siquiera como posibilidad, al ser para él la distinción entre la traza vascular de hidroides y el parénquima circundante absolutamente tajante, pues éste está formado por células vivas y aquél, por células muertas. Hay que indicar que el glosario más moderno, editado por Magill (1990), cuya terminología se ha seguido en esta tesis (junto con la de Font-Quer 1985), no se pronuncia al respecto, dejando sin zanjar esta divergencia.

La obtención del mayor número posible de datos para ajustar cada vez más las interpretaciones se hace esencial, y aquí cobra importancia la invitación de Hébant (1979) a generalizar los estudios ultraestructurales, hasta ahora restringidos a un escaso número de especies.

Por esto, se ha considerado esencial abordar la ultraestructura de las especies de la sección *Trichophyllae* para caracterizar los tejidos presentes en gametófito y esporófito.

Una valiosa ayuda podría venir de las investigaciones histoquímicas, al aportar datos sobre la composición diferencial de los tejidos. No se conocen en briófitos estudios acerca de histoquímica cuantitativa, y muy escasos sobre cualitativa. Se han aplicado con éxito algunas técnicas para averiguar la presencia o ausencia de lignina en sus paredes celulares (Erickson & Miksche 1974), y para caracterizar determinadas células y estructuras: esporócitos (Lal & Chauhan 1982), esporas (Olesen & Mogensen 1978), tejidos conductores (Stevenson 1977, Scheirer 1978, 1980) o pelos secretores (Berthier et al. 1974, Ligrone 1986). Una prueba sencilla, la reacción de medios básicos en las paredes de Pottiaceae, ha sido empleada con fines taxonómicos por Zander (1993).

Dada la ausencia total de estudios histoquímicos en Grimmiaceae, se han seleccionado en esta tesis algunas pruebas encaminadas a la detección de sustancias ergásticas (almidón y lípidos), y de componentes de pared (presencia de ligninas, fenoles, suberinas, celulosa y pectinas).

Los intentos de detección de ligninas se justifican por existir controversia acerca de la capacidad de los briófitos de sintetizarla. Erickson & Miksche (1974), Hébant (1974) y Miksche & Yasuda (1978) informaron de las posibles contaminaciones o errores en trabajos anteriores en los que se afirmaba la presencia de este polímero (Siegel 1962, 1969, Bland et al. 1968). Sin embargo, recientemente se ha demostrado, por técnicas analíticas, la presencia de derivados de lignina en la hepática *Pellia epiphylla* (Downey & Basile 1989).

No se han realizado pruebas para la detección de proteinas dada la alta reacción que las paredes manifestaban en medios básicos, vehículos de los reactivos disponibles. Sin embargo, y en vista de los resultados de Zander (1993), se han incluido pruebas sobre la actuación de medios ácidos y básicos sobre las secciones de las muestras.

Las pruebas histoquímicas realizadas, descritas en el siguiente capítulo, se han seleccionado por su fiabilidad según Hébant (1977), Jensen (1962) y Gahan (1984).

ESPORAS

A pesar de los trabajos pioneros de Leitgeb (1884), y Roth (1904-1905), las esporas de briófitos no han sido consideradas en un principio como poseedoras de caracteres de marcada importancia. A diferencia del polen de las fanerógamas, presentan patrones de ornamentación que parecen restringirse a un reducido espectro de variabilidad (Saito & Hirohama 1974). Asimismo, dado que su germinación necesita escasos requisitos ambientales, comunes además para esporas de muchos taxones no necesariamente emparentados, el patrón de ornamentación, al contrario que el del grano de polen, no se relaciona con el reconocimiento específico de un sustrato biológico de cuyos estímulos la espora dependa para germinar. Mogensen (1981) lo supone implicado en impedir, mediante interacciones con las fuerzas de tensión superficial, que este proceso se desencadene con cantidades de agua en el medio insuficientes para el desarrollo posterior del protonema, lo que no precisaría de específicas diferencias taxonómicas. Por otra parte, de la misma génesis de la cubierta perínica (por deposición de nanogránulos, con elevada densidad y al azar, sobre la superficie de la espora), no cabe esperar la presencia de una variabilidad debida a la existencia de patrones predefinidos sobre su superficie e intracelularmente controlados, sino tan sólo la causada por la cantidad, el tamaño y la forma de los nanogránulos, así como por la separación final entre los elementos esculturales de la espora madura.

Sin embargo, McClymont (1954) concluyó, sobre observaciones realizadas únicamente con microscopía óptica, que el tamaño, la forma y la ornamentación de la espora eran caracteres potencialmente importantes desde el punto de vista taxonómico y filogenético. Aunque se ha comprobado la influencia de las condiciones ambientales sobre el tamaño y la forma (Reitsma 1969), ambos se consideran significativos al menos en taxones de alto rango. En cuanto a la ornamentación, si bien ya la microscopía óptica consigue en algunos casos diferenciar esporas dentro de un mismo género (Mc Clymont 1955), la introducción del microscopio electrónico de barrido ha permitido mejorar la observación de los caracteres esculturales. Aunque algunos intentos de utilizarlos

taxonómicamente, como los de Castaldo et al. (1981), en *Buxbaumia*, o Sorsa & Koponen (1973), en Mniaceae, no han tenido éxito, han resultado en cambio ser importantes para el diagnóstico en Bartramiaceae (Griffin 1981, 1982, Griffin & Acuña 1983), así como en Encalyptaceae (Vitt & Hamilton 1974), donde además se han establecido correspondencias con otros datos para elaborar hipótesis filogenéticas (Horton 1982).

* * *

Otro carácter relevante es la ultraestructura de la pared y del citoplasma de la espora, observada con microscopio electrónico de transmisión. Aunque existen muy pocos estudios al respecto (especialmente sobre el citoplasma), con estos datos se ha podido, en hepáticas, diferenciar órdenes (Denizot 1976, Neidhart 1979), y, en musgos, independizarlos dentro de los briófitos por presentar una envuelta perínica (Neidhart 1979), así como constatar diversificación tanto en lo que se refiere a la participación de la exina en los elementos esculturales (McClymont & Larson 1964), como con respecto a las peculiaridades de la estratificación de esta capa, que parecen poder caracterizar el grupo de los esfagnos (Brown et al. 1982a, b, Boudier 1989).

* * *

Apenas existen trabajos sobre esporas del género *Grimmia.* Además de las menciones al tamaño y la forma en las descripciones de sus taxones, tan sólo se conocen cuatro publicaciones que incluyen algunas de las especies objeto de la presente tesis. En el atlas de Boros & Jãrai-Komlõdi (1975) aparecen varias imágenes de *Gr. pulvinata*, obtenidas con microscopía óptica y escasamente comentadas (interpretando la ornamentación como perteneciente a la sexina). En los otros tres trabajos se ofrecen exclusivamente datos sobre morfología externa, procedentes de microscopía óptica y electrónica de barrido, en algunos de estos taxones. Los estudios que aquí se exponen pretenden aportar características de la morfología interna y externa de las esporas de las especies señaladas, con el fin de discutir la variabilidad presente en este grupo en comparación con lo conocido en el resto de los briófitos.

FITOQUÍMICA

La primera noticia que se tiene acerca de estudios fitoquímicos en briófitos fue dada por Lohmann (1903) en su discurso inaugural de la Universidad de Jena, en el que afirmó que los cuerpos oleosos de algunas hepáticas estaban compuestos por aceites esenciales capaces de inhibir la predación de los caracoles. Desde entonces, distintos trabajos han demostrado la gran diversidad de constituyentes químicos que poseen los briófitos, desde compuestos inorgánicos a complicadas moléculas orgánicas (terpenoides o fenólicas).

Muchas estructuras nuevas para la Química se han descrito por primera vez, o de manera exclusiva, en esta División. Un ejemplo reciente lo constituyen los biflavonoides macrocíclicos, encontrados por vez primera por Seeger et al. 1991, o los triflavonoides macrocíclicos, descritos por López Sáez 1994. Además, para comprender la biología de los briófitos, es esencial el estudio del papel que desempeñan estas sustancias en la planta, como reservas nutritivas, como intermediarios de síntesis o degradación de otros compuestos, como acúmulos inactivos para contrarrestar su posible acción tóxica; por su actividad hormonal, por su contribución a las características de la pared celular, o por la protección ante agentes externos abióticos (sequía, congelación, radiaciones, daño mecánico, etc.) o bióticos (depredación o parasitismo).

Las investigaciones fitoquímicas permiten, adicionalmente, numerosas aplicaciones prácticas. Así, los briófitos se han empleado como indicadores de cobre (Persson 1956, Shacklette 1967), en la biomonitorización de trazas de contaminantes (Herrmann 1990), como insecticidas (Asakawa 1988a, b), y en medicina, por su poder antibiótico, antifúngico y antitumoral (Asakawa 1990).

De igual modo, algunas sustancias han mostrado cierta relevancia como marcadores quimiotaxonómicos, así como en la elaboración de hipótesis filogenéticas. Entre ellas se encuentran ácidos grasos, esteroles, terpenoides, y, de modo destacado, flavonoides.

* * *

Dado que las pruebas histoquímicas realizadas en las 10 especies objeto de esta tesis indicaron la abundancia de sustancias fenólicas en las paredes celulares, y de acúmulos lipídicos en el citoplasma, se consideró de gran interés abordar el análisis fitoquímico, prestando especial atención a la presencia de flavonoides y compuestos lipídicos, con el fin de discutir el papel biológico de las sustancias encontradas en el conjunto del grupo.

El estudio de los flavonoides en briófitos tiene interés desde varios puntos de vista. En primer lugar, biológico, puesto que, aunque hasta la fecha no se sabe con certeza qué función desempeñan en este grupo vegetal, se ha apuntado la posibilidad de que contribuyan al refuerzo de las paredes celulósicas (lo que sugiere su semejanza biogenética con la lignina), de que desempeñen un papel regulador como inhibidores del transporte de auxinas (Jacobs & Rubery 1988), de que actúen como filtro químico ante la luz ultravioleta (Stafford 1990) o de que, por su poder antibiótico (Van Hoof et al. 1981, Spilkova & Hubik 1988, 1992), lleven a cabo una misión defensiva, lo que a su vez abre un interesante campo de investigación aplicada. En segundo lugar, taxonómico: por su relativa estabilidad y facilidad de extracción y aislamiento han sido muy utilizados en quimiotaxonomía. La presencia exclusiva de tricetinas-di-C-glicosiladas en hepáticas, y de biflavonoides en musgos, ha permitido separar estos grupos del resto de los briófitos, y, en musgos, a pesar del escaso número de especies sometidas a una investigación exhaustiva, los flavonoides parecen probar su utilidad sobre todo en el diagnóstico de taxones infragenéricos (Markham et al. 1976, López Sáez 1994). En tercer lugar, filogenético: sin duda, la relación que la planta establece con el entorno a través de ellos es resultado de un proceso evolutivo. Estos compuestos aparecen en todos los grupos de embriófitos, pero no en algas, con la señalada excepción del género *Nitella* en Charophyta (Markham & Porter 1969), lo que hace pensar en un origen común para estas algas y para las plantas terrestres.

Los flavonoides sólo han sido estructuralmente dilucidados en tres especies de Grimmiaceae: *Racomitrium lanuginosum* (Geiger et al. 1988, Seeger 1992), *R. ptychophyllum* y *Grimmia ovalis* (Seeger 1992), en las que se han hallado biflavonoides. Además, se ha investigado la presencia de estas sustancias en *R. aciculare* y *R. heterostichum*, donde se ha postulado la presencia de biflavonoides (Ron et al. 1990), en *Gr. torquata*, en la que se han detectado flavonoides en general (McClure & Miller 1967), en *Gr. orbicularis*, donde se ha sugerido la presencia de un flavonol (Estébanez 1991), y en *Gr. hartmanii*, donde sólo se ha descrito la ausencia de proantocianidinas (Bendz et al. 1966).

En cuanto a los lípidos, la inmensa mayoría de los trabajos han tenido como objeto las hepáticas, por presentar cuerpos oleosos y por la actividad biológica demostrada de las sustancias extraídas, especialmente terpenoides (Asakawa 1990). En musgos, los lípidos han sido escasamente estudiados. Huneck (1983), en su revisión de los trabajos publicados hasta la fecha, indica la frecuente presencia de ácidos grasos de 14 a 22 átomos de carbono, con distintos grados de insaturación; de hidrocarburos alifáticos, con predominio de los de número de átomos de carbono impar, de escasos terpenos (un solo diterpeno y nueve triterpenos) y de 11 esteroles. Destaca el bajo número de especies estudiadas (no más de 55 para cada tipo de compuestos). Los trabajos posteriores no añaden nuevos compuestos extraídos de musgos a esta lista.

Entre los ácidos grasos, son especialmente notables, por no aparecer apenas en otros grupos vegetales, los ácidos eicosanoico y araquidónico. Este último, además, es relevante por ser precursor de prostaglandinas, de elevada actividad biológica.
Algunos autores han dado importancia taxonómica a la distribución de ácidos grasos acetilénicos (Kohn et al. 1987), o a los patrones presentados de ácidos grasos totales (Karunen 1990), así como significado evolutivo a la proporción de los poliénicos de 20-22 átomos de carbono frente a los de 16-18 (Karunen 1982). Sin embargo, en la mayor parte de los trabajos se considera la variación de sus cantidades en relación con diversas etapas o fases de su ciclo vital (Karunen et al. 1979, Al-Hasan et al. 1990). Tan sólo *Racomitrium canescens* var. *ericoides* y *R. lanuginosum* (Anderson et al. 1974, Catalano et al. 1976) representan a la familia Grimmiaceae entre las especies estudiadas.

Por su parte, los terpenos han sido estudiados exclusivamente en 19 especies de musgos, ninguna de ellas perteneciente a Grimmiaceae, y se cuestiona en algunas la procedencia de los triterpenos de una contaminación del sustrato (Herout 1990). Aunque en helechos parecen prometedores marcadores quimiotaxonómicos (Asakawa 1986), y se ha comprobado su efecto anti-depredador en plantas vasculares y hepáticas (Herout 1990), apenas existen estudios sobre su papel y significación en musgos, si bien se señala que su presencia en éstos, al igual que en helechos, y su ocasional hallazgo en hepáticas y algas puede deberse a relaciones de parentesco entre estos grupos (Asakawa 1986).

Asimismo, en cuanto a los esteroles, sólo han sido analizadas 55 especies de musgos, de donde se han obtenido 11 compuestos (Huneck 1983, Patterson et al. 1990, Matsuo & Sato 1991). A este respecto sólo se conocen datos de *Racomitrium lanuginosum*, dentro de Grimmiaceae (Huneck et al. 1973, Catalano et al. 1976). Los autores de estos trabajos subrayan la ausencia de estudios sobre el papel que estos compuestos desempeñan en musgos, aunque se piensa en uno semejante al que realizan en plantas vasculares: hormonal, defensivo (Herout 1990) o indirectamente fotomorfogenésico, al asociarse a lipoproteínas relacionadas con el fitocromo (Lamparter et al. 1992). Se ha propuesto que la composición en esteroles de un vegetal es reflejo de su posición taxonómica (Patterson et al. 1990). Los datos en briófitos no parecen suficientes para hacer esta valoración, pero, con respecto a la estereoquímica de C-24, se apunta que, teniendo en cuenta que en algas se encuentran solamente epímeros β, y en plantas vasculares un gran predominio de epímeros α, la presencia en briófitos de ambos epímeros (24α y 24β) podría apoyar la hipótesis de la posición intermedia de este grupo entre los dos anteriores (Patterson et al. 1990).

* * *

No se debe perder de vista que el estudio de los compuestos químicos que produce un organismo es al tiempo un examen de su expresión genética, y que el conocimiento de la información hereditaria es el dato más fiable a la hora de interpretar relaciones de parentesco, y al que intentan aproximarse todos los restantes estudios.

* * * * * * * *

En esta tesis se pretende, en suma, la caracterización histoquímica, anatómica y ultraestructural de los tejidos del esporófito y del gametófito[1], el estudio morfológico externo e interno de las esporas, y una aproximación al análisis fitoquímico de la especies españolas de la sección *Trichophyllae* del género *Grimmia*.

[1] *Con un análisis somero del filidio, en vista de la abundancia de datos sobre su morfología, diferenciación estructural y ontogenia que aparecen en las distintas monografías reseñadas y en el trabajo de Kawai (1965).*

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

La sección *Trichophyllae* B. S. G. del género *Grimmia*, según es interpretada por Corley et al. (1981), consta de 12 especies en Europa e Islas Azores. De ellas, siguiendo a Casas (1991), se citan a continuación las que están presentes en la flora briológica española:

Grimmia anomala Hampe ex Schimp.
Grimmia decipiens (Schultz) Lindb.
Grimmia elatior Bruch ex Bals. & De Not.
Grimmia hartmanii Schimp.
Grimmia funalis (Schwaegr.) B. S. G.
Grimmia incurva Schwaegr.
Grimmia orbicularis Bruch ex Wils.
Grimmia pulvinata (Hedw.) Sm.
Grimmia retracta Stirt.
Grimmia torquata Grev.
Grimmia trichophylla Grev.

De la presente tesis se ha excluido *Grimmia anomala* Hampe ex Schimp., por no haber sido encontrada en las dos únicas localidades en que esta especie está citada en España: Espinama, Santander (Allorge 1928), y el Alto Valle del Ter, Lérida (Lloret 1989).

Se describen más adelante las especies que constituyen el objeto del presente estudio. Se han utilizado para ello los datos que recogen tanto las descripciones originales de cada especie como las siguientes floras y monografías: Husnot (1884-1890), Loeske (1930), Jones (1933), Nyholm (1956), Smith (1978), Deguchi (1978), Crum & Anderson (1981) y Cao & Vitt (1986). Sólo se han reseñado las sinonimias correspondientes a los basónimos.

Grimmia decipiens (F. Schultz) Lindb. in C.J. Hartman, 1861
(= *Trichostomum decipiens* Schultz, Fl. Starg. Suppl. 1819).

Autoica. Plantas de 1-2'5(-4) cm, en pulvínulos incanos que se desintegran facilmente.

Filidios laxamente adpresos cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, de lanceolados a anchamente lanceolados, que se adelgazan hacia una punta aguda; ápice y margen biestratosos; margen recurvado; pelo tan largo como la lámina en los filidios superiores, muy dentado, decurrente por el margen en el ápice del filidio; nervio que termina en el ápice; células basales estrechamente rectangulares, hasta 10 veces más largas que anchas, rectas o ligeramente sinuosas, las marginales más cortas, hialinas, con paredes transversales engrosadas, y que forman una zona marginal conspicua; las superiores son de rectangulares a cuadradas, muy sinuosas, paquidermas, de 7-10 μm de anchura en la mitad del limbo.

Seta arqueada cuando húmeda, flexuosa cuando seca.

Cápsula elipsoide, estriada.

Opérculo cónico, subulado, recto.

Perístoma rojo, dientes bi-trífidos, muy papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base.

Esporas de 12-14 μm.

Fructificación frecuente.

Grimmia elatior Bruch ex Bals. & De Not., Mem. R. Acc. Sc. Torino, 1838.

Dioica. Plantas de hasta 7 cm, pulviniformes, oscuras.

Filidios laxamente adpresos cuando secos, de erecto-patentes a patentes cuando húmedos, estrechamente lanceolados desde una base ancha; un margen muy revoluto y el otro menos (o plano), biestratoso y opaco hacia el ápice; pelo liso o ligeramente denticulado, de hasta 1/2 de la longitud de la lámina; el nervio termina en el ápice; células basales de rectangulares a lineares, sinuosas, paquidermas, hacia el margen son de rectangulares a cuadradas con paredes transversales engrosadas, las de la fila marginal más largas, las superiores de irregularmente cuadradas a redondeado-hexagonales, muy sinuosas, paquidermas, papilosas, de 8-10 μm de anchura en la mitad del limbo.

Seta arqueada cuando húmeda, flexuosa cuando seca.

Cápsula elipsoide.

Opérculo cónico-rostrado, erecto.

Perístoma rojo vivo, dientes bi-trífidos, ligeramente papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base.

Esporas de hasta 15 μm.

Fructificación rara.

Grimmia funalis (Schwaegr.) B. S. G., 1845.
(= *Trichostomum funale* Schwaegr., Sp. Musc. Supp. 1(1). 1811).

Dioica. Plantas (1-)2 -4 cm, en densos pulvínulos grisáceos.

Filidios adpresos, contorneados en espiral cuando secos dando un aspecto juláceo, lanceolados; margen recurvado; pelo ligeramente rugoso, 1/2-1 vez tan largo como la lámina en los filidios superiores; nervio fuerte en la base, más débil hacia el ápice, donde termina; células basales estrechas, hasta 10 veces más largas que anchas, sinuosas, paquidermas, más cortas en la base junto al nervio, cuadrado-rectangulares hacia el margen, más alargadas y hialinas en 1-2 filas marginales, las superiores de cuadrado-rectangulares a cuadradas, sinuosas, pelúcidas, de 10 µm de anchura en la mitad del limbo.

Seta arqueada.

Cápsula ovoide, a menudo escondida entre los pelos de las hojas periqueciales.

Opérculo cónico, mamilado.

Perístoma rojo, dientes bífidos en la mitad superior, con ramas desiguales, papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada.

Esporas de 16-18 µm.

Fructificación ocasional.

Grimmia hartmanii Schimp., Syn., 1860.

Dioica. Plantas de (0'5-)1 - 4(-6) cm, cespitosas, verdoso-amarillentas.

Filidios ligeramente contortos y a menudo de ápices secundos cuando secos, patentes o recurvados y frecuentemente secundos cuando húmedos, lanceolados, que se adelgazan hacia una punta aguda; margen biestratoso en la zona superior, uno o los dos márgenes recurvados en la base; pelo corto, de 40-320 (-500) µm de longitud en los filidios superiores (rara vez más largos); nervio fuerte que termina en la punta; células basales 3-6 veces más largas que anchas, más o menos sinuosas y paquidermas, más cortas hacia el margen, las superiores cuadradas, generalmente sinuosas, paquidermas, de 8-12 µm de anchura en la mitad del filidio.

Propágulos pardos, pluricelulares, globosos, de hasta 250 µm de diámetro, dispuestos en grupos en los extremos de filidios malformados.

Seta curvada.

Cápsula ovoide.

Opérculo rostrado.

Perístoma rojizo, dientes ligera o totalmente perforados en el ápice, ligeramente papilosos.

Caliptra cuculado-mitriforme.

Esporas de 12-13 µm.

Fructificación muy rara.

Grimmia incurva Schwaegr., Suppl. I, 1811.

Dioicas. Plantas de 1-2'5 cm, cespitosas, pulviniformes, con ramas erectas, fastigiadas, verdosas por arriba y negruzcas por debajo.

Filidios crespos cuando secos, patentes cuando húmedos, lineares o a veces linear-lanceolados; margen y ápice biestratosos; ápice agudo, margen plano o ligeramente recurvado; pelo muy corto en los filidios superiores (hasta 120 μm) y ausente en los inferiores; nervio muy fuerte, que termina en o bajo el ápice; células basales leptodermas, hialinas, firmes, hasta 6 veces más largas que anchas, más o menos uniformes hacia el margen, las superiores cuadradas, firmes, de 10-12 μm de anchura en la mitad del filidio.

Seta curvada.

Cápsula inmersa entre los filidios periqueciales, oval-elipsoide, lisa, parduzco-amarillenta.

Opérculo cónico, obtuso, que iguala la mitad de la longitud de la urna, rojo en la base y parduzco-amarillento en el ápice.

Perístoma con dientes amarillento-rojizos, lanceolados, erectos, perforados, trabeculados y papilosos.

Caliptra mitriforme, subulada, a veces hendida en la base y con pelos parduzco-amarillentos.

Esporas de hasta 15 μm.

Fructificación rara.

Grimmia orbicularis Bruch in Wils., Eng. Bot. Suppl., 1844.

Autoica. Plantas de hasta 4 cm, pulviniformes, oscuras e incanas.

Filidios erectos, adpresos cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, los superiores de lanceolado a oval-lanceolados; abruptamente prolongados en un pelo rugoso, de 1/2 - 1(-2) veces la longitud de la lámina en los filidios superiores; margen uniestratoso o, a veces, biestratoso sólo cerca del ápice; células basales estrechamente rectangulares, hasta 8 veces más largas que anchas, ligeramente sinuosas, más cortas y hialinas hacia el margen, de 10-12 μm de anchura en la mitad del limbo.

Seta curvada cuando húmeda, erecto-flexuosa cuando seca.

Cápsula de subesférica a ovoide, rara vez ovado-elipsoide.

Opérculo mamilado, obtuso.

Perístoma rojo-amarillento de dientes bi-trífidos, ligeramente papilosos.

Caliptra cuculada.

Esporas de 10-14 μm.

Fructificación frecuente.

Grimmia pulvinata (Hedw.) Sm., Eng. Bot. 1807.
(*Fissidens pulvinatus* Timm ex Hedw., Spec. Musc. 1801.

Autoica. Plantas de hasta 3 cm, en densos pulvínulos incanos.

Filidios erectos, adpresos cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, los superiores de lanceolados a oval-lanceolados; abruptamente prolongados en un pelo rugoso de 1/2 - 1(-2) veces la longitud de la lámina en los filidios superiores; margen recurvado, biestratoso en la zona superior; células basales ± rectangulares, sinuosas, 2-4 veces más largas que anchas, más largas hacia el nervio, células superiores de cuadradas a cuadrado-rectangulares, paquidermas, sinuosas, pelúcidas, de 7-10 μm de anchura en la mitad del filidio.

Seta curvada cuando húmeda, erecto-flexuosa cuando seca.

Cápsula ovado-elipsoide, estriada.

Opérculo rostelado o rostrado, agudo.

Perístoma con dientes pequeños, rojos, transversalmente estriados, bífidos, papilosos.

Caliptra mitriforme, hendida solamente en la base.

Esporas de 8-12 μm.

Fructificación frecuente.

Grimmia retracta Stirt., Scot. Nat., 1866.

Plantas de 1-3(-3'5) cm, pulviniformes, verdinegras.

Filidios laxamente adpresos cuando secos, escuarrosos o recurvados (pero no secundos) cuando húmedos; lanceolados u oval-lanceolados, que se adelgazan hacia un ápice agudo u obtuso; margen recurvado en la base, biestratoso en el ápice; pelo corto, de 40-240(-500) μm en los filidios superiores; células basales hialinas, 3-4 veces más largas que anchas, lisas o ligeramente sinuosas, más cortas hacia el margen; las superiores cuadradas o más anchas que largas, de 8-10 μm de anchura en la mitad del limbo.

Ni fructificación ni propágulos conocidos.

Grimmia torquata Hornsch. in Grev., Scot. Crypt., 1826.

Dioicas. Plantas de 1-5 cm, en pulvínulos pardos a menudo tumescentes.

Filidios crespo-espiralados cuando secos, erecto-patentes cuando húmedos, estrechamente oblongo-lanceolados, agudos; margen recurvado en uno o los dos lados; pelo corto, de hasta 250 µm de longitud en los filidios superiores, muy rara vez más largo, liso; nervio que se adelgaza desde una base fuerte, y que terminan en o bajo el ápice; células basales rectangulares, hasta 6 veces más largas que anchas, paquidermas, sinuosas, uniformes excepto 1-2 filas marginales, leptodermas y hialinas, las superiores de cuadrado-rectangulares a cuadradas, paquidermas, sinuosas, pelúcidas, de 8-10 µm de anchura en la mitad del filidio, las marginales de la zona superior a menudo más cortas que las restantes.

Propágulos pardos, multicelulares, de 40-120 µm de diámetro, a menudo presentes en el dorso de los filidios superiores.

Seta arqueada.

Cápsula cilíndrica.

Opérculo rostrado.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base.

Perístoma de dientes mal desarrollados, amarillo-rojizos, irregularmente divididos, papilosos.

Esporas de 9-11 µm.

Fructificación muy rara.

Grimmia trichophylla Grev., Fl. Edin., 1824.

Dioicas. Plantas de hasta 3'5 cm, cespitosas, ramificadas, incanas.

Filidios laxamente adpresos, rectos o ligeramente retorcidos cuando secos, de erecto-patentes a esquarrosos cuando húmedos, de lanceolados a estrechamente lanceolados, que se adelgazan hacia un ápice agudo, estrechados o no en la inserción; margen recurvado en la zona inferior en uno o en ambos lados; pelo de hasta 3/4 de la longitud de la lámina en los filidios superiores, de liso a denticulado o espinuloso, muy rara vez ausente; células basales rectangulares, 6(-8) veces más largas que anchas, rectas o sinuosas, células superiores más o menos cuadradas, de rectas a sinuosas, paquidermas, 8-10 μm de anchura en la mitad del filidio.

Yemas de forma irregular, de hasta 60 μm de diámetro, a veces presentes en la faz del filidio.

Seta arqueada cuando húmeda, erecto-flexuosa cuando seca, de hasta 6 mm de longitud.

Cápsula ovoide o elipsoide, de amarillenta a parduzco-rojiza, estriada.

Opérculo rojo, rostrado, que iguala la mitad de la longitud de la urna.

Perístoma de 16 dientes anaranjados, equidistantes, perforados y a veces ligeramente hendidos en el ápice, papilosos.

Caliptra mitriforme, lobulada en la base, a veces hendida de un lado y oblicua.

Esporas de 10-14 μm.

Fructificación frecuente.

Los especímenes estudiados corresponden a las siguientes recolecciones:

Grimmia decipiens (Schultz) Lindb.

Madrid, 30TVL351251 "Canencia, Puerto de Canencia, 1500 m", *Estébanez & Ron*, 28-IV-1992, MACB 52514. 30TVL239129 "Manzanares El Real, La Pedriza, 1100 m", *Abella, Alcalde & Estébanez*, 4-VI-1992, MACB 52515.

Grimmia elatior Bruch ex Bals. & De Not.

Huesca, 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 27-I-1994, MACB 52513. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 21-V-1994, MACB 52512. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 10-VII-1994, MACB 52511.

Grimmia hartmanii Schimp.

Lérida, 31TCH119279 "Viella, Pla de la Artiga, Artiga de Lin, 1500 m", *Estébanez & Ron*, 4-VII-1993, MACB 52506.

Grimmia funalis (Schwaegr.) B.S.G.

Huesca, 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 27-I-1994, MACB 52509. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 21-V-1994, MACB 52510. 30TYN267391 "Panticosa, Balneario, senda al Ibón de Bachimaña, 1900 m", *Estébanez*, 10-VII-1994, MACB 52508. **Lérida**, 31TCH246240 "Alto Arán, Valartiés, 1580 m", *Estébanez & Ron*, 5-VII-1993, MACB 52507.

Grimmia incurva Schwaegr.

Lérida, 31TCH115224 "Viella, Tuc de Molières, 3000 m", *Estébanez*, 15-VIII-1994, MACB 52505.

Grimmia orbicularis Bruch ex Wils.

Cuenca, 30TWK721893 "Beteta, Hoz de Beteta, 950 m", *Estébanez*, 28-IV-1990, MACB 52501. **Granada**, 30SVG494063 "La Zubia, 1000 m", *Estébanez*, 8-XII-1990, MACB 52500. **Madrid**, 30TVK648598 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 680 m, *Estébanez*, 17-V-1990, MACB 52499. 30TVK648598 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 680 m, *Estébanez*, 12-I-1991, MACB 52503. 30TVL629261 "Patones, Pontón de la Oliva, 760 m", *Estébanez*, 27-III-1993, MACB 52504. **Huesca**, 30TYN249358 "Panticosa, carretera al Balneario, 1450 m", *Estébanez*, 27-I-1994, MACB 52498. 30TYN249358 "Panticosa, carretera al Balneario, 1450 m", *Estébanez*, 21-V-1994, MACB 52502.

Grimmia pulvinata (Hedw.) Sm.

Granada, 30SVG494063 "La Zubia, 1000 m", *Estébanez*, 8-XII-1990, MACB 52493. **Madrid**, 30TVK646613 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 660 m", *Estébanez*, 24-I-1992, MACB 52497. 30TVK646613 "Arganda del Rey, Dehesa *El Carrascal*, 660 m", *Estébanez*, 25-I-1993, MACB 52496. 30TVK162985 "Villalba, 900 m", *Estébanez*, 8-IV-1992, MACB 52495. 30TVK162985 "Villalba, 900 m", *Estébanez*, 29-XII-1992, MACB 52494.

Grimmia retracta Stirt.

Albacete, 30SWH227715 "Alcaraz, Cerro de las Pilas Verdes, 1100 m", *Estébanez*, 29-VIII-1994, MACB 52492.

Grimmia torquata Grev.

Granada, 30SVG705047 "Güéjar-Sierra, Valle del Genil, Camino de la Estrella, 2300 m", *Estébanez*, 6-XII-1993, MACB 52491.

Grimmia trichophylla Grev.

Ávila, 30TUK291654 "Villarejo del Valle, Puerto del Pico, 1370 m", *Estébanez & Ron*, 1-IV-1993, MACB 52486. 30TUK278622 "Cuevas del Valle, desvío a El Arenal, 1160 m", *Estébanez & Ron*, 1-IV-1993, MACB 52489. 30TUK291654 "Villarejo del Valle, Puerto del Pico, 1370 m", *Estébanez*, 1-VII-1993, MACB 52485. 30TUK278622 "Cuevas del Valle, desvío a El Arenal, 1160 m", *Estébanez*, 1-VII-1993, MACB 52487. 30TUK291654 "Villarejo del Valle, Puerto del Pico, 1370 m", *Estébanez*, 13-VII-1994, MACB 52484. 30TUK278622 "Cuevas del Valle, desvío a El Arenal, 1160 m", *Estébanez*, 13-VII-1994, MACB 52490. **Madrid**, 30TVL465248 "La Cabrera, 1350 m", *Estébanez & Ron*, 14-VII-1992, MACB 52488.

No se han hallado ejemplares fructificados de cuatro especies. *Gr. retracta* sólo se conoce en estado estéril. *Gr. hartmanii y Gr. torquata* son de fructificación muy rara, sin que en España se hayan recolectado muestras fértiles. *Gr. incurva* es una especie muy escasa en la Península Ibérica. El autor de las únicas citas españolas la ha encontrado siempre en estado estéril (V. Canalís, com. pers.). Por este motivo, sólo el caulidio, el filidio y, en su caso, las yemas de estas cuatro especies han sido examinadas en la presente investigación.

En cuanto al estado de desarrollo de los especímenes examinados, es como se indica:

- Las esporas y perístomas han sido obtenidos de cápsulas completamente maduras y abiertas, y las medidas del diámetro máximo se han tomado sobre 80 esporas de cada especie, totalmente hidratadas

- Las setas, cápsulas y zonas de transición, a menos que se indique expresamente el empleo de otras fases, se han analizado en el momento en que la cápsula había alcanzado su máximo tamaño sin haber comenzado a amarillear (fases tempranas de la esporogénesis). De la seta se ha elegido su porción proximal para su estudio con microscopía electrónica de transmisión.

- Los filidios observados habían completado su desarrollo y, salvo especificación contraria, no habían entrado en senescencia; por su parte, los caulidios han sido examinados desde la base hasta el ápice, comprendiendo así toda su variación ontogenética. Debe observarse, sin embargo, que es muy probable que las distintas recolecciones empleadas no cubran la variabilidad fenológica de la planta, lo que ha de tenerse en cuenta especialmente en la discusión de los resultados acerca de actividad celular, cantidad de sustancias de reserva y presencia relativa de componentes de pared.

MÉTODOS

Una vez recolectado el material biológico, si el análisis no había de ser inmediato, se emplearon los sistemas de conservación que más abajo se indican. El primero de ellos se utilizó para el material destinado al estudio fitoquímico, los dos restantes, para los especímenes que habían de ser objeto del examen estructural e histoquímico. Como control de las posibles modificaciones estructurales originadas por estos tratamientos, se ha examinado *in vivo* material de todas las especies.

a. Congelación.

Este sistema ha sido utilizado con el fin de preservar los compuestos fitoquímicos durante el almacenamiento prolongado del material. Se ha llevado a cabo en un congelador Ignis *** a -18° C.

b. Secado al aire y almacenamiento en sobres de papel.

Se ha comprobado que muchos briófitos, y en particular los musgos pertenecientes a este género, tras permanecer largos períodos de tiempo en estado deshidratado, son capaces de volver a la vida activa al rehidratarse. Así, Allorge (1947) estima que *Gr. decipiens* retiene su viabilidad durante más de 18 meses, y *Gr. elatior*, entre 70 meses y 6 años, y Keever (1957) informa de una duración de 7-10 años de la vida latente de *Gr. laevigata* en herbario. Asimismo, a lo largo de esta experimentación no se han apreciado modificaciones en sus caracteres anatómicos con respecto al material analizado en fresco. Por estos motivos, éste ha sido el método más empleado para conservar los especímenes procedentes de las distintas recolecciones. La rehidratación del material, requisito previo al examen anatómico, se ha conseguido tras su inmersión durante un mínimo de 12 horas en agua con una gota de jabón líquido como emoliente. La adición de jabón se ha suprimido en el caso de que los lípidos se constituyeran en objeto de estudio, para evitar su emulsión y pérdida en los tejidos.

c. Fijación en FAA o FPA.

Ha sido una técnica empleada en tres circunstancias: sobre muestras que no iban a ser examinadas a corto plazo y en las que se quería evitar que maduraran sobrepasando una etapa concreta del desarrollo (fenómeno que se ha observado repetidamente a lo largo de esta experimentación en los otros métodos de almacenamiento), en el caso de desear un endurecimiento del material para dificultar su disgregación en la obtención de secciones y, por último y principalmente, para preservar sus estructuras, tanto a lo largo del proceso de obtención de cortes a congelación como durante el protocolo de deshidratación, inclusión en parafina, corte, desparafinado y rehidratación. El material puede conservarse durante meses sumergido en la solución fijadora. Las muestras, completamente hidratadas tras 12 horas de inmersión en agua, y troceadas en piezas de dimensión máxima inferior a 3 mm, han sido sometidas al siguiente procedimiento de fijación:

. solución fijadora (FAA o FPA) ..... 4 horas (mínimo)
. agua ..... lavado de 10-15 minutos

La composición por cada 100 ml de las soluciones fijadoras empleadas es la que a continuación se indica:

FAA (formaldehído-ácido acético-alcohol), según Jensen (1962):

etanol 50°		90 ml
ácido acético glacial	5 ml	
formaldehído 40%		5 ml

FPA (formaldehído-ácido propiónico-alcohol), según Johansen (1940):

etanol 50°		90 ml
ácido propiónico	5 ml	
formaldehído 40%		5 ml

Ambas, pero especialmente la segunda, son recomendadas por los autores respectivamente citados para especímenes delicados, con referencia expresa a los briófitos.

Anatomía y palinología

1. Preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido:

El material de partida fue usado indistintamente fresco o bien tras su secado al aire. En ambos casos se rehidrató por inmersión en agua durante 12 horas. El protocolo posterior que se ha seguido es el recomendado por Carrión et al. (1990).

1.1. Fijación:

. glutaraldehído (3%) en
tampón cacodilato[1] 0,1 M ..... 2 baños de 1 hora

. sacarosa (3%) en tampón
cacodilato 0,1 M ..... lavado (mínimo: 3 horas)

[1] *La preparación de las distintas soluciones en tampón cacodilato fue facilitada partiendo de una solución-base 0,2 M, que se obtuvo disolviendo 4,28 g de cacodilato sódico trihidratado en 100 ml de agua destilada, y ajustando el pH a valores entre 7,2 y 7,4 con una gota de HCl puro.*

1.2. Deshidratación:

. acetona[2] de 30°	1 baño de 10 minutos
. acetona[2] de 50°	1 baño de 10 minutos
. acetona[2] de 70°	1 baño de 10 minutos
. acetona[2] de 96°	1 baño de 10 minutos
. acetona de 100°	1 baño de 10 minutos

1.3. Secado a punto crítico y metalización:

Las muestras fueron transferidas al aparato de secado a punto crítico en acetona, luego ésta fue sustituida por dióxido de carbono líquido, que fue eliminado tras alcanzar su punto crítico, con lo que se minimizó la deformación producida por fuerzas de tensión superficial.

Inmediatamente al secado, las muestras fueron colocadas en portas impregnados de adhesivo de plata coloidal y, seguidamente,
metalizadas con oro puro, quedando recubiertas por una capa de 150-200 Å.

[2] *En tampón cacodilato 0,1 M.*

2. Obtención de cortes semifinos y ultrafinos:

Se ha partido de material fresco u, ocasionalmente, secado al aire. En ambos casos se ha asegurado su rehidratación sumergiéndolo en agua durante al menos 12 horas y eligiendo las muestras que se encontraban, pasado ese tiempo, en el fondo del recipiente. Seguidamente se cortaron en piezas de dimensión máxima inferior a 2 mm.

2.1. Fijación:

. glutaraldehído (3%)
en tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 baños de 1 hora

. tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 lavados de 30 minutos

. tetróxido de osmio (1%)
en tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 baños de 1 hora

. tampón cacodilato 0,1 M ..... 2 lavados de 30 minutos

En el primer paso las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos para facilitar la rápida penetración del fijador, así como la desgasificación de los tejidos.

2.2. Deshidratación del material:

. etanol[3] de 30°	1 baño de 10 minutos
. etanol[3] de 50°	1 baño de 10 minutos
. etanol[3] de 70°	1 baño de 10 minutos
. etanol[3] de 96°	1 baño de 10 minutos
. etanol absoluto	1 baño de 10 minutos

2.3. Inclusión en resina EPON 812[4]:

. etanol : acetona (1:1)	2 baños de 15 minutos
. acetona	2 baños de 15 minutos
. acetona : resina (2:1)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (1:1)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (1:2)	1 baño de 1 hora
. resina	1 baño de una noche

[3] *En tampón cacodilato 0,1 M.*

[4] *Comercializada por la casa Serva*

El procedimiento descrito ha dado en general buenos resultados. Sin embargo, algunas muestras especialmente problemáticas han precisado un proceso de inclusión más gradual y prolongado en resina:

. etanol : acetona (1:1)	2 baños de 15 minutos
. acetona	2 baños de 15 minutos
. acetona : resina (3:1)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (2:1)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (3:2)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (1:1)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (2:3)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (1:2)	1 baño de 1 hora
. acetona : resina (1:3)	1 baño de 1 hora
. resina	1 baño de una noche

En ambos casos, los pasos en los que se emplea resina se realizaron en oscuridad (a temperatura ambiente), para evitar la fotopolimerización de la misma.

Los bloques definitivos fueron obtenidos poniendo resina nueva en moldes de silicona, transfiriendo a ellos las muestras y orientando éstas convenientemente. Se dejaron polimerizar durante 72 horas en estufa a 70° C.

2.4. Corte de las muestras:

Se ha empleado un ultramicrótomo Reichert-Jung, con cuchilla de cristal para conseguir cortes semifinos (0,5-1 μm) o de diamante para obtener secciones ultrafinas (70-90 nm).

2.5. Tinción y conservación de los cortes:

Los cortes semifinos fueron colocados en un porta, puestos a secar unos minutos en estufa a 80° C hasta quedar adheridos a éste y, posteriormente, teñidos durante 1 minuto a esa temperatura con azul de metileno de Richardson, cuya composición se indica:

Azul de metileno	1 g
Azur II	1 g
Bórax	1 g
Glicerina (30%)	1 ml
Agua	hasta completar 100 ml

Las preparaciones teñidas fueron lavadas en agua, secadas de nuevo y montadas permanentemente en bálsamo de Canadá o en DePeX (solución neutra de poliestireno y plastificadores en xileno, comercializada por Serva).

Los cortes ultrafinos fueron depositados sobre rejillas de cobre (de 100 ó 200 celdas) recubiertas por una película de Formvar, y teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo (disoluciones acuosas saturadas). Las rejillas se han conservado durante tiempo indefinido (hasta la fecha) en un rejillero colocado dentro de un desecador.

3. Corte de las muestras en secciones de mayor grosor:

3.1. Cortes a congelación:

Ha sido la técnica más utilizada, puesto que, al tiempo que permite una preservación buena de paredes celulares y contenidos lipídicos, proporciona un gran número de secciones en poco tiempo. Sin embargo, presenta la desventaja de suministrar cortes muy disgregados si el material es poco cohesionado (como es el caso de las cápsulas), así como de permitir sólo una grosera aproximación de la localización de la sección en el espécimen, considerando además la mezcla de secciones producida por el hecho de que de forma rutinaria se han cortado varias muestras de por vez, dado su pequeño tamaño y la dificultad práctica de orientarlas en la platina.

Se ha empleado generalmente material fresco o secado al aire, en ambos casos rehidratado tras 12 horas de inmersión en agua, y cortado en piezas inferiores a 5 mm en su dimensión máxima. Ocasionalmente se han utilizado también muestras fijadas en FPA o FAA, especialmente en el caso de las cápsulas, donde la dureza aportada por la fijación permitía compensar su escasa consistencia.

Las secciones se han realizado con un micrótomo de traslación Nakamura Works o uno de rotación Microm HM 340 E, ambos con cuchillas recambiables. Se ha elegido una temperatura de -35° C para conseguir una congelación rápida de la muestra que minimizara el daño en los tejidos por la formación de cristales de hielo. Aun así, el tiempo de congelación ha debido prolongarse a un mínimo de 20 minutos para asegurar que ésta afectaba a todo el material. Se ha estimado en 7° el ángulo de inclinación de la cuchilla con respecto a la vertical como el óptimo para la dureza y superficie de corte que ofrecían las muestras. Se ha escogido un grosor de las secciones variable entre 5 y 15 μm.

3.2) Cortes mediante inclusión en parafina:

La técnica de inclusión en parafina y posterior corte contrarresta los inconvenientes antes mencionados. Su mayor interés es, precisamente, el proporcionar cortes seriados. Sin embargo, la modificación estructural es considerablemente mayor, puesto que precisa un protocolo que implica la exposición del material a disolventes que causan la pérdida de gran parte de los componentes lipídicos de los tejidos, la posible deformación de las células durante los procesos de deshidratación y desparafinado, y el empleo de temperaturas de 60° C durante el tiempo de inclusión. Por esta razón, este método siempre se ha aplicado sobre material fijado en FPA o FAA.

El protocolo empleado fue el siguiente:

3.2.1. Deshidratación del material:

. etanol de 30°	1 baño de 20 minutos
. etanol de 50°	1 baño de 20 minutos
. etanol de 70°	1 baño de 20 minutos
. etanol de 96°	1 baño de 20 minutos
. etanol absoluto	2 baños de 20 minutos

3.2.2. Inclusión en parafina:

. acetato de isoamilo	2 baños de 30 minutos
. acetato de isoamilo : parafina (1:1)	1 baño de 30 minutos
. parafina	1 baño de 30 minutos

Los dos últimos pasos se realizaron en estufa a 60° C. La parafina utilizada era de punto de fusión a 56° C.

3.2.3. Preparación del bloque y obtención de secciones:

Al terminar el tiempo de inclusión se vertió la parafina entre unas pinzas de Leuckart, orientando la muestra convenientemente, y tras solidificar por completo, se talló el bloque, se colocó en la plataforma del micrótomo y se reorientó para conseguir el plano de corte deseado. Se utilizó un micrótomo de rotación Minot Reichert-Jung. Las tiras de secciones, entre 8 y 10 µm de grosor, se preestiraron en un baño de agua a 37° C, se recogieron sobre portas previamente impregnados en albúmina de Mayer[5], para permitir su adherencia e impedir su pérdida durante el desparafinado y la tinción y, seguidamente, se dejaron estirar 30 minutos en la estufa a 60° C.

3.2.4. Desparafinado y rehidratación:

Los portas con las tiras de secciones fueron sumergidos en los siguientes líquidos:

. xileno	2 baños de 30 minutos
. etanol absoluto	2 baños de 30 minutos
. etanol de 96°	1 baño de 30 minutos
. etanol de 70°	1 baño de 10 minutos
. etanol de 50°	1 baño de 10 minutos
. etanol de 30°	1 baño de 10 minutos
. agua	lavado durante 5-10 minutos

[5] *Este adhesivo se ha preparado formando una mezcla con la clara de un huevo y una cantidad igual de glicerina, filtrando la mezcla a través de celulosa y, finalmente, añadiendo un cristal de timol para evitar su contaminación (Johansen 1940).*

3.3. Tinción y montaje:

3.3.1. Tinción:

En este apartado se consideran solamente las tinciones con finalidad puramente morfológica, sin que de sus resultados se pretenda extraer ninguna conclusión sobre la composición de las estructuras teñidas. Las técnicas empleadas con esta finalidad se exponen en el epígrafe correspondiente a histoquímica.

No siempre se ha considerado necesario teñir los cortes, dado que la pigmentación natural de las paredes celulares normalmente es suficiente para observarlas al microscopio. No obstante, en ocasiones se ha precisado la tinción para incrementar el contraste en las secciones más delgadas, o para contribuir a diferenciar algunas estructuras. Siempre se han elegido colorantes hidrofílicos.

El proceso de tinción se ha realizado sumergiendo en el colorante los portas con las cortes adheridos (si procedían del micrótomo de parafina), o bien infiltrando el colorante y el agua de aclarado por capilaridad entre porta y cubre si las secciones, obtenidas con el micrótomo de congelación, estaban libres.

Se exponen a continuación las técnicas de coloración utilizadas:

1. verde de metilo[6] (0,01%) ..... 2 minutos
. agua ..... lavado durante 2-3 minutos

2. azul de anilina[6] (1%) ..... 12-24 horas
. agua ..... lavado durante 2-3 minutos

3. rojo Congo[6] (0,1)% ..... 1 hora
. agua ..... lavado durante 2-3 minutos

4. azul de toluidina[6] (0,5%) ..... 15-30 minutos
. agua acidulada (con una gota de HCl) ..... lavado durante 2-3 minutos

La única combinación empleada de estas técnicas ha sido la tinción con verde de metilo seguida de rojo Congo, por los buenos resultados que, en cuanto a la diferenciación de hidroides y placenta, había proporcionado en anteriores investigaciones (Estébanez 1991).

[6] *En disolución acuosa*

3.3.2. Montaje:

Se han empleado los siguientes medios de montaje, hidrofílicos y semipermanentes:

1. Glicerogelatina, preparada según Johansen (1940):

glicerina		50 g
gelatina en agua al 16,55%, dejada disolver 2 horas	50 g	
fenol		1 g

Tras mezclar durante 15 minutos, calentando con suavidad en agitación, y posteriormente filtrar, se han utilizado pequeños trozos de este medio, sólido a temperatura ambiente, y se han vuelto a fundir para montar las preparaciones, que pueden ser empleadas casi inmediatamente, por su rápida solidificación.

2. Medio de Hoyer, preparado según Anderson (1954):

goma arábiga en polvo	30 g	
agua		50 ml
hidrato de cloral	20 g	
glicerina		20 ml

La mezcla se ha realizado en ese orden y a temperatura ambiente.

3. Medio de Pearse (1961):

goma arábiga en polvo	1 g	
agua		100 ml
sacarosa		30 g

La mezcla se ha realizado en ese orden calentando suavemente en agitación.

Los medios 2 y 3 no permiten la utilización inmediata de las preparaciones, sino tras solidificar transcurridas varias horas.

4. Técnicas histoquímicas:

Las reacciones se han llevado a cabo siempre sobre material no fijado y cortado a congelación en secciones de 15 µm, colocadas bien en pequeños viales, de donde, una vez aplicado el método histoquímico correspondiente, eran transferidas a portas para su observación, o bien directamente sobre éstos. Dado el carácter temporal de la mayoría de las preparaciones, no se montaron, desechándose tras su estudio.

De manera sistemática, antes de aplicar cada técnica sobre las muestras se han realizado los controles para comprobar el funcionamiento de los reactivos, así como que el resultado se debe a la reacción específicamente, y no a alguno de los reactivos o vehículos de los mismos por separado.

4.1. Detección de sustancias ergásticas:

Almidón:

Método del Lugol (Johansen 1940):

Preparación del reactivo:

a) yoduro potásico	2 g
agua	100 ml
b) yodo	0,2 g

Tras mezclar a) y b), la solución resultante (Lugol) se conservó en oscuridad.

Realización:

Lugol ..... 2 minutos

agua ..... lavado durante 2-3 minutos.

El color azul-negro es indicativo de la presencia de almidón de cadena larga (amilosa), el pardo-rojizo, de almidón de cadena corta (amilopectina).

Control: se probó sobre pulpa de patata.

Lípidos:

1. Método del Sudán III o Sudán Black B:

Preparación del reactivo: disolución saturada de colorante en etanol acuoso (70°), filtrada justo antes de su uso.

Realización:

. etanol acuoso de 50° ..... 1 minuto
. disolución de Sudán ..... 15 minutos
. etanol acuoso de 50° ..... lavado de 2-3 minutos

Los lípidos se detectan al acumularse en ellos el colorante por solubilidad diferencial.

2. Método del azul de Nilo, modificado de Gahan (1984):

Preparación del reactivo: disolución acuosa al 1% de azul de Nilo (sulfato A).

Realización:

. disolución de azul de Nilo ..... 30 segundos a 37° C
. ácido acético acuoso (1%) ..... lavado de 30 segundos a 37° C
. ácido acético acuoso (1%) ..... 2 horas a temperatura ambiente
. agua ..... lavado de 2-3 minutos

Los lípidos neutros se tiñen de rojo, y los ácidos, de azul. Se ha aumentado el tiempo de diferenciación en ácido acético a causa de la fuerte reacción de las paredes celulares con el componente azul del colorante.

Control: las técnicas de detección de lípidos se probaron sobre endosperma de almendra o nuez.

4.2. Detección de componentes de pared:

Efecto de ácidos y álcalis:

Se han añadido estos reactivos a las secciones para comprobar el efecto del pH sobre la coloración de las paredes celulares, lo que a la vez sirve de control para otras reacciones que emplean medios ácidos o básicos.

1. Ácido sulfúrico concentrado (Jensen 1962):

Además del posible cambio de color de las paredes, la resistencia de las mismas a este tratamiento se interpreta como posiblemente debida a la presencia de suberina.

2. Ácido clorhídrico concentrado.

3. Ácido perclórico (60%).

4. Hidróxido potásico acuoso (14%).

5. Hidróxido sódico 2 N.

6. Amoniaco concentrado.

Detección de celulosa:

1. Método del cloro-yoduro de zinc (Jensen 1962):

Preparación del reactivo:	
cloruro de zinc	50 g
yoduro potásico	16 g
agua	17 ml
yodo	hasta la saturación

La disolución se dejó reposar varios días, y el sobrenadante se decantó, conservándose en oscuridad.

Realización: las secciones se montaron directamente en la disolución de cloro-yoduro de zinc.

La coloración azul se considera un resultado positivo.

2. Método del Lugol-ácido sulfúrico (Johansen 1940):

Realización:

. Lugol (ver página 47) ..... 2 minutos

. ácido sulfúrico (65%) ..... montaje de las secciones en el ácido

La coloración azul se considera un resultado positivo.

Control: los reactivos para la detección de celulosa se probaron sobre pañuelos de papel.

Detección de sustancias pécticas:

1. Método del rojo de rutenio (Gahan 1984):

Preparación del reactivo:	
rojo de rutenio	0,01 g
cloruro amónico	0,1 g
agua	100 ml

El reactivo se ajusta con amoniaco a pH 9.

Realización:

. disolución de rojo de rutenio ..... 24 horas

. agua ..... lavado de 2-3 minutos

La coloración roja se considera indicativa de la presencia de sustancias pécticas.

2. Método de la hidroxilamina-cloruro férrico (Jensen 1962):

a) disolución alcalina de hidroxilamina[7]:	
hidroxilamina (14%) en etanol acuoso de 60°	50 ml
hidróxido sódico (14%) en etanol acuoso de 60°	50 ml

b) disolución de ácido clorhídrico alcohólico:	
ácido clorhídrico concentrado	30 ml
etanol de 96°	60 ml

c) disolución de cloruro férrico alcohólico:	
cloruro férrico	5 g
etanol de 60° en ácido clorhídrico 0,1 N (1%)	45 ml

[7] *El reactivo debe de prepararse justo antes de su uso, dado que la disolución de hidroxilamina (14%) se desnaturaliza rápidamente.*

Realización:

. hidroxilamina alcalina ..... 1 parte, 5 minutos (tiempo mínimo)

. ácido clorhídrico alcohólico ..... 1 parte

(mezclar y retirar el exceso de disolución)

. cloruro férrico alcohólico ..... unas gotas

La coloración rojo-granate se considera como un resultado positivo.

Control: ambas reacciones para detectar sustancias pécticas se han ensayado sobre albedo de naranja.

Detección de lignina:

Método del floroglucinol (Gahan 1984):

Preparación del reactivo:

floroglucina	10 g
etanol absoluto	95 ml

Realización:

. floroglucinol ..... 3-5 minutos

. ácido clorhídrico concentrado ..... montaje de las secciones en el ácido

La coloración roja se interpreta como debida a la presencia de lignina.

Control: la reacción se probó sobre virutas de madera.

Detección de sustancias fenólicas:

Método del cloruro férrico (Gahan 1984):

Preparación del reactivo:	
cloruro férrico	2 g
etanol de 96°	98 ml

Realización: las secciones se montan directamente en el reactivo.

La coloración verde oscura es indicativa de la presencia de polifenoles.

Control: la reacción se ensayó sobre secciones de hojas de zarza.

5. Observación de las muestras:

5.1. Microscopía óptica:

Las observaciones de cortes semifinos y de mayor grosor se realizaron utilizando un microscopio Olympus BH-2, al que se le acoplaron dos prismas de Nicol para tener la posibilidad de analizar el comportamiento de las muestras con luz polarizada. Una cámara Olympus permitió dejar constancia gráfica de las imágenes observadas.

5.2. Microscopía electrónica de barrido:

Las muestras, secadas a punto crítico y metalizadas, se observaron en un microscopio JEOL-JSM-T-330 A, instalado en el Real Jardín Botánico de Madrid.

5.3. Microscopía electrónica de transmisión:

Las rejillas, una vez teñidas y secas, se obsevaron en un microscopio Zeiss 902, del Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid; o bien en un JEOL-JEM-1010, instalado en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de dicha Universidad.

Fitoquímica

Se realizó una prueba preliminar sobre las diez especies, para localizar los compuestos más abundantes comunes a todas ellas.

Del material de cada una, conservado en congelación, se separaron y limpiaron, uno por uno, los especímenes correspondientes (incluyendo, en su caso, el esporófito), para asegurar la ausencia de ejemplares de otras especies, así como de restos vegetales, puestas de huevos, etc. Otras impurezas de menor tamaño (tierra, polen, etc.) fueron eliminadas mediante prolongados lavados en agua corriente. Posteriormente el material se dejó secar a la sombra, y se almacenó, por periodos inferiores a un mes, hasta su extracción. De cada especie se consiguió reunir una cantidad final de muestra de 5 g en peso seco.

La extracción se realizó en Soxhlet, sobre material previamente triturado, utilizando como disolventes, sucesivamente, n-hexano y etanol, durante 48 horas cada uno. Los extractos se evaporaron en rotavapor a sequedad, se redisolvieron en cloroformo y se percolaron en alúmina neutra. Se reevaporaron y se aplicaron en una capa fina de gel de sílice. El cromatograma se desarrolló utilizando n-hexano:acetato de etilo (80:20) como fase móvil. El revelado se realizó o bien con vapores de amoniaco, si se trataba de detectar la presencia de flavonoides, o bien pulverizándolo con *oleum*: ácido sulfúrico:ácido acético:agua (5:1:20), y dejándolo unos minutos en estufa a 110° C. En ambos casos se observó con luz visible y con luz ultravioleta.

Una vez localizados los compuestos abundantes en todas las especies, la investigación se centró en una sola, *Gr. pulvinata*, elegida por su fácil recolección e identificación. Se empleó una mayor cantidad de material, sobre el que se aplicaron técnicas destinadas a la extracción, aislamiento e identificación de los compuestos seleccionados.

En este caso, dado que los compuestos objeto de estudio estaban ya seleccionados y se conocía de ellos su comportamiento cromatográfico, la presencia de un pequeño grado de contaminación no parecía susceptible de afectar su posterior análisis. Por ello, y puesto que éste requería de mayores cantidades de material, la limpieza se realizó menos exhaustivamente (se utilizaron pulvínulos no colonizados por otras especies, pero no se retiraron las partículas de pequeño tamaño extrañas al musgo). Tras conseguirse 100 g de muestra, se trituró y se colocó en un Soxhlet para su extracción en etanol durante 3 días, sin utilizarse previamente el n-hexano, dado que en la prueba preliminar no se halló ningún compuesto procedente de los extractos en este disolvente que fuera adicional a los separados de los etanólicos.

Tras concentrar el extracto en rotavapor, los compuestos se aislaron, en primer lugar, mediante varios fraccionamientos en columna de gel de sílice (eluyendo con n-hexano y acetato de etilo 80:20), y de Sephadex LH-20 (eluyendo con metanol, cloroformo y n-hexano 1:1:2). La presencia de la sustancia buscada en las sucesivas fracciones se aseguró mediante cromatografía en capa fina (empleando como fase móvil la proporción de n-hexano:acetato de etilo que mejor separación diera, y revelando el cromatograma como se ha expuesto anteriormente). En segundo lugar, se realizaron cromatografías en capas gruesas de las fracciones (con n-hexano y acetato de etilo 90:10 ó 80:20 como fase móvil) para separar y eluir los compuestos buscados.

La identificación se realizó utilizando espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (^{1}H-RMN), espectrometría de masas (EM), espectroscopía infrarroja (IR) y co-cromatografía en capa fina con sustancias patrón.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANATOMÍA: RESULTADOS

Gametófito

CAULIDIO

La descripción básica se ha realizado sobre la región de mayor complejidad estructural dentro de cada especie. Ésta corresponde a la zona más apical de los caulidios, una vez diferenciados todos sus tejidos. En las que fructifican, se han elegido ejemplares fértiles. Posteriormente se han especificado las modificaciones que pueden aparecer en otras regiones del caulidio.

Aunque la naturaleza de estos tejidos será objeto de discusión, por el momento se emplea la terminología más comúnmente aceptada, recogida por Hébant (1977).

En sección transversal, las células aparecen siempre en disposición alterna. Las paredes presentan dos estratos. El primario es bastante opaco a los electrones y en ocasiones es dificil diferenciar su estructura, forma los trígonos (raramente tetrágonos) en las confluencias de las células y en los tabiques se distribuye a ambos lados de la lámina media. El estrato secundario muestra un aspecto fibrilar, ocasionalmente subestratificado. Los grosores que se indican corresponden, en el caso de la pared primaria y de los tabiques de los hidroides al total presentado por dos células vecinas, mientras que para la pared secundaria se refiere sólo al de una célula.

Los caulidios están rodeados por una cutícula transparente a los electrones, y presentan tres tejidos fundamentales, con paredes de grosor decreciente desde la periferia hasta el centro. Se señala que hay espcies en que alguno de estos tejidos puede no estar diferenciado.

. Epidermis. Se trata de un complejo formado por las bases de filidios en diferenciación y por la epidermis real del caulidio. Según la densidad de las bases de los filidios imbricados y de su disposición, forma un cilindro exterior de grosor y contorno desigual, no siempre claramente delimitable. En general, sus células son de contorno irregularmente poligonal, con tendencia a alargarse tangencialmente, de tamaño relativamente pequeño y de paredes gruesas.

. Parénquima. Está constituido por un número variable de estratos de células, generalmente isodiamétricas en sección transversal, de forma irregularmente poligonal.

. Hidroma. Forma la traza conductora, no siempre presente, en el centro del caulidio. Consta de células siempre muertas, en número variable, con estratos primario y secundario de la pared altamente degradados. Frecuentemente presentan un contorno variable en sección transversal. En corte longitudinal sus paredes transversales son oblicuas, aunque por la dificultad de obtención de cortes sagitales y la fácil ruptura de sus paredes celulares se han omitido las medidas correspondientes a esta dimensión.

No aparecen espacios intercelulares en la epidermis y el parénquima. Las células presentan entre sí gran abundancia de comunicaciones plasmodesmáticas, especialmente en las paredes transversales. Pueden aparecer aisladamente, pero son frecuentes los campos de punteaduras primarias, especialmente en las regiones apicales del caulidio. Sólo se han considerado como campos de punteaduras los que cumplen las siguientes condiciones:

. Suponen una constricción, más o menos brusca, de la pared secundaria, auque ésta participa, al menos en pequeña proporción, en la constitución de esta estructura.

. Causan una pérdida de la organización típica de la pared, sin que se diferencien claramente los estratos ni la organización de éstos. Es frecuente que aumente su densidad electrónica.

Las zonas perforadas de las paredes, más o menos delgadas, aunque no constreñidas, con plasmodesmos atravesando su espesor, pero con su estructura intacta, ocasionalmente presentes, no se han considerado como campo de punteaduras primarias.

En cuanto a las reacciones histoquímicas[1], se exponen los resultados comunes a los caulidios de todas las especies:

. No se ha detectado en ningún caso almidón, aunque algunas regiones parecen oscurecerse levemente.

. La aplicación de los colorantes tipo Sudán ha demostrado la presencia de abundantes lípidos en el citoplasma celular.

. La reacción para la detección de celulosa, descrita como inmediata por Jensen (1962), ha necesitado al menos veinticuatro horas para tener lugar, dando resultados variables. En general, la pared primaria no reacciona (aunque sólo se distingue en la epidermis). Los resultados descritos se refieren sólo al estrato secundario.

. En todas las especies ha sido fallida la detección de ligninas y suberinas, aunque se señala que las yemas de multiplicación vegetativa de *Gr. hartmanii*, *Gr. torquata* y *Gr. trichophylla* mantienen su estructura tras veinticuatro horas en ácido sulfúrico concentrado, disolviéndose sólo en tiempos más prolongados.

. Las disoluciones básicas producen un enrojecimiento de las paredes celulares (fig. 10 B), con distinta intensidad en los diversos tejidos.

. En medios ácidos no se han apreciado cambios de coloración.

[1] *las pruebas histoquímicas realizadas sobre la pared en esta tesis, por observarse con microscopía óptica, no permiten resolver con precisión las diferencias entre los estratos primario y secundario. Por ello, las que en algunos casos se indican son sólo aproximadas. Por otra parte, donde la pared es delgada, cobran importancia las interferencias producidas por la difracción, dificultándose la interpretación de los resultados. Por este motivo, no se presentan aquí observaciones histoquímicas relativas a los hidroides.*

FILIDIO

La descripción se ha realizado sobre secciones transversales del filidio a tres niveles: basal, medio y apical. En cada una de ellas se ha analizado separadamente el nervio y el limbo. Los números de células indicados corresponden, en el caso del nervio, a todo él, y en el del limbo sólo a la mitad.

El filidio, inicialmente unido a la epidermis del caulidio en toda su extensión, libera primero sus márgenes en su diferenciación, y en último lugar el nervio. Una excepción se produce en *Gr. torquata*, donde este proceso se realiza a la inversa, desarrollándose una cámara entre el filidio y el caulidio en donde frecuentemente se observan pelos mucilaginosos y abundante epiflora.

En el filidio aparecen los siguientes tipos celulares:

. Células parenquimáticas: constituyen con exclusividad el limbo, asimismo pueden estar o no en el nervio.

. Estereidas: son células de paredes muy engrosadas, de localización variable en el nervio.

. Células leptodermas: su posición en el nervio es central, y presentan un aspecto semejante a los hidroides del caulidio. No se observan en todas las especies.

. Células-guía: aparecen en el nervio en posición adaxial, y se diferencian por poseer engrosada la pared correspondiente a esta cara, y por su mayor lumen.

En todos los casos, los filidios están rodeados por una cutícula, y las células presentan una pared primaria considerablemente engrosada, en especial la que constituye la superficie periférica, donde puede alcanzar un espesor de 1-2 μm; y una pared secundaria variable según los tipos celulares.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, los filidios presentan los siguientes comportamientos comunes:

. El almidón se detecta, bajo una apariencia informe, en su mitad apical, correspondiente a la localización preferente de cloroplastos. Una excepción la constituye *Gr. torquata*, donde se ha observado en toda la extensión del filidio.

. Aunque la aplicación de Sudán III y Sudán Black demuestra la presencia de lípidos, éstos no suelen encontrarse en forma de grandes acúmulos. Es frecuente su detección asociada a los cloroplastos, que sugiere su localización intraplastidial.

. La detección de celulosa en la pared tarda varias horas en producirse, y da un doble resultado: positivo para la pared secundaria, y negativo para la pared primaria. Aplicando de ácido sulfúrico tras el Lugol, se observa la formación de agujas de cristales sobre la superficie del filidio.

. La reacción para las sustancias pécticas se produce con fuerte intensidad, excepto en los filidios de *Gr. funalis*.

. Los filidios demuestran ser las estructuras con mayor abundancia de sustancias fenólicas, especialmente acumuladas en las paredes de sus elementos celulares reforzados (fig. 8 B).

. Las disoluciones básicas causan un viraje de la coloración de la pared a amarillo vivo, excepto en las bases, donde la reacción es como se ha indicado para los caulidios.

. Las disoluciones ácidas producen una decoloración, o bien una tonalidad amarillenta, en las paredes de los filidios.

Se ha realizado un estudio de la punta pilífera que remata el ápice del filidio. En corte transversal, el pelo está constituido por células muertas, de paredes muy reforzadas, que dan resultado positivo tan sólo para la detección de la celulosa (que se produce de manera inmediata y con fuerte intensidad).

Con microscopía electrónica de barrido, el pelo se observa como una estructura tridimensional, formada por fibras (que corresponden a las anteriores células) densamente empaquetadas, no torsionadas. El nervio del filidio no participa en su constitución, y termina en todos los casos en su base.

El comportamiento ante la luz polarizada indica la presencia de refuerzos de ordenación cristalina o paracristalina (probablemente celulósicos) en el nervio, el margen y la punta pilífera. Sin embargo, se observa con más intensidad en el pelo y en regiones concretas del nervio que se especifican en cada caso.

Gr. decipiens

CAULIDIO

Diámetro de 220-250 μm.

La epidermis consta de 1-3 estratos, irregulares según la diferenciación de filidios (es uniestrata donde no los hay). Las células son de 15-18 μm en su dimensión tangencial, 8-15 μm en la radial y 70-100 μm en la longitudinal.

El parénquima presenta 4-6 estratos de células de 100-150 μm en su dimensión longitudinal, más o menos isodiamétricas en corte transversal, con 15-25 μm de diámetro, con los máximos valores, por lo general, en las células más internas (fig. 1 A).

El hidroma está constituido por 25-35 células de 10-20 μm de diámetro en sección transversal, que dan una traza de contorno muy irregular (fig. 1 A).

La epidermis y el parénquima presentan una pared primaria muy electrondensa, con un estrato interno sin estructura distinguible, que forma los trígonos, y una banda más transparente, fibrilar, sólo perceptible en la epidermis y el parénquima. La pared primaria tiene un grosor total de 0,5-0,8 μm en los tabiques epidérmicos, y queda constreñida a una fina línea en el parénquima interno. No forma un engrosamiento apreciable en la periferia del caulidio, salvo si se trata de un filidio en diferenciación (fig. 2 B).

La pared secundaria es uniestrata, medianamente opaca a los electrones, muy densamente fibrilar, subdividida en bandas por finas líneas concéntricas muy electrondensas. Ocasionalmente está bordeada internamente por una estrecha banda opaca. Su grosor disminuye gradualmente desde la epidermis (2-2,5 μm) hacia el interior (0,5 μm en el parénquima interno). Este espesor es bastante regular para una misma célula, y si existen irregularidades no están polarizadas.

Se observan algunos plasmodesmos aislados, frecuentemente en la epidermis. Pero son más frecuentes los agrupados en campos de punteaduras primarias, más abundantes en el parénquima (fig. 2 A), pero también presentes en la epidermis. Suelen distribuirse preferentemente en las paredes transversales, pero se encuentran también en las longitudinales. Los campos de punteaduras primarias producen un adelgazamiento gradual de la pared contigua, y su espesor total es de 0,6 μm.

La delimitación entre el parénquima y la epidermis es relativamente clara, por el alargamiento tangencial y el menor tamaño celular en ésta.

Las paredes de los hidroides presentan trígonos muy opacos a los electrones, donde ocasionalmente se percibe una banda fibrilar semejante a la aparecida en los otros tejidos. No se ven bordeados por pared secundaria. Los lados de la pared muestran una estructura fibrilar laxa, poco densa a los electrones, donde no se diferencian estratos primario o secundario, con un grosor total de 0,4 μm.

La transición entre parénquima e hidroma es siempre brusca, y en la superficie de contacto, la pared parenquimática mantiene siempre su estructura, mientras que la del hidroide se observa degradada, aunque conserva en este caso su pared primaria en los tabiques.

Se observa una alta degradación citoplasmática, con abundantes restos vacuolizados, cloroplastos en degradación, etc., a menudo encerrados en guirnaldas de retículo endoplasmático. Los lípidos se acumulan en grandes cantidades (fig. 2A), llegando a ocupar casi la totalidad del lumen celular en la epidermis.

Aparecen túneles de degradación de la pared, desarrollados desde el exterior, probablemente producidos por microorganismos, aunque éstos no se han visto en este nivel.

Hacia la parte basal se pierde casi completamente la actividad celular y disminuye la acumulación de lípidos. El diámetro del caulidio se mantiene hasta niveles muy basales, en que se reduce a 150-200 μm. Se conserva la cutícula, y la epidermis no presenta un apreciable engrosamiento de sus paredes celulares. Degenera la traza de hidroides, en algunas regiones aparece una laguna central, y cuando se observan, los tabiques están desestructurados, y los trígonos se degradan en su periferia. Aparecen abundantes microorganismos de organización procariota, tanto en el lumen como en las paredes de las células periféricas. No se ha encontrado una vaina de tejido degradado circundando el caulidio.

El caulidio, cuyo color natural es pardo-amarillento, más oscuro en la base, enrojece en presencia de soluciones básicas, fuertemente en regiones basales y menos intensamente en el ápice.

La reacción para la detección de celulosa se produce con bastante intensidad en todas las paredes, así como la correspondiente a la localización de sustancias pécticas. Se demuestra acumulación de sustancias fenólicas en la epidermis. Las secciones mantienen su integridad durante unas horas en ácido sulfúrico concentrado.

La coloración con azul de Nilo muestra una predominancia de lípidos neutros, aunque en las yemas de ramificación se encuentran mezclas de neutros y ácidos.

FILIDIO

. Nivel basal: el nervio presenta cuatro células-guía adaxiales, semejantes entre sí, y uno o dos estratos, cada uno con 10-12 estereidas de contorno simétrico en sección transversal, en su envés. El nervio presenta un contorno en media luna, poco resaltado en la superficie abaxial del filidio. El limbo comprende en cada lado 30 células, alargadas en sentido lateral, ligeramente convexas hacia ambas superficies externas. El margen es muy recurvado en ambos lados (frecuentemente más en uno de ellos), uniestrato.

Fig. 1. A: Corte transversal de caulidio apical de *Gr. decipiens*, teñido con azul de metileno, 850×. **B**: Corte transversal de caulidio apical estéril de *Gr. elatior*, sin teñir, 220×. **C**: Corte transversal caulidio apical fértil de *Gr. elatior*, sin teñir, 220×.

Fig. 2. A: Corte longitudinal de parénquima apical, con campos de punteaduras primarias, de *Gr. decipiens* a MET. **B**: Corte transversal de caulidio de *Gr. decipiens*, detalle de la inserción de un filidio a MET.

Fig. 1

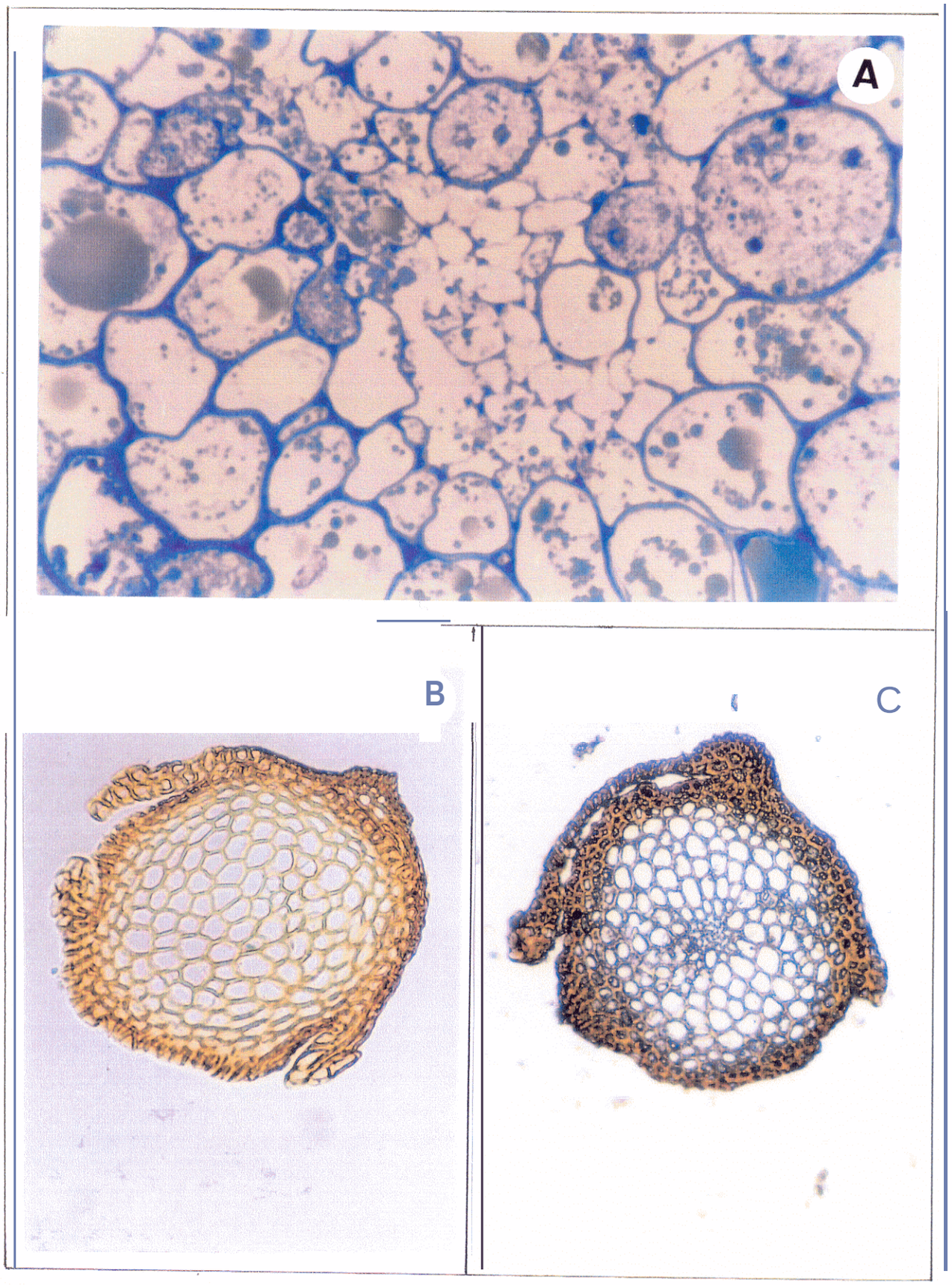
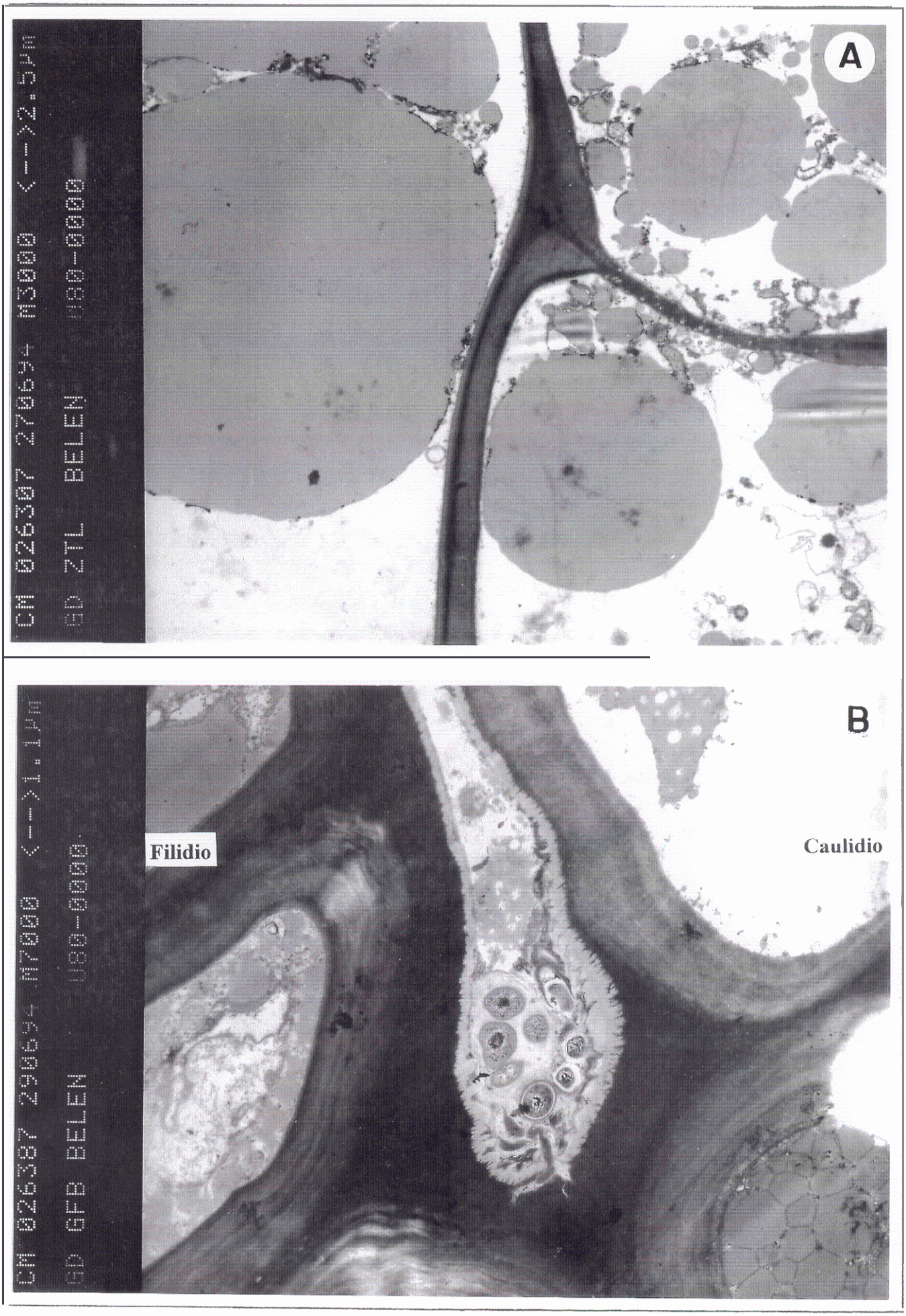


Fig. 2



. Nivel medio: el nervio muestra cuatro células-guía, de las que las dos centrales son mayores. En su envés presenta una capa de 10-12 células parenquimáticas ligeramente menores que las del limbo. En su interior se encuentra una capa irregular de 6-10 estereidas. El contorno del nervio es laxamente trilobulado, y resalta acusadamente en la superficie abaxial del filidio. El limbo tiene una anchura de 25-30 células, más o menos cuadradas, con lumen ovalado, alargado en sentido anteroposterior, en sección transversal. Ocasionalmente es irregularmente biestratificado. El margen es menos recurvado, uniestrato, ocasionalmente crenulado por la convexidad de las paredes celulares abaxiales y adaxiales.

. Nivel apical: el nervio tiende a redondear su contorno, aunque a veces las células periféricas constituyen protuberancias irregulares. Las células tienden a la uniformidad, acercándose al tipo parenquimático del limbo. Esta región presenta mayor tendencia a la biestratificación, y las 2-3 filas marginales pueden ser triestratas.

La punta pilífera es decurrente hacia el margen, dentada especialmente en esta zona, y en corte transversal se observa compuesta por 30 fibras en su región basal.

La máxima intensidad ante la luz polarizada la presenta la base del filidio, el primer tercio del nervio y el pelo.

Gr. elatior

CAULIDIO

Diámetro de 150-200 µm.

Existe una clara diferenciación entre caulidios fértiles y estériles: los primeros poseen hidroma desde el ápice hasta la parte media, los últimos carecen de ella (figs. 1 B, C).

La epidermis está formada por 2-4 estratos, con un contorno más o menos regular. Las células son más o menos isodiamétricas en corte transversal, con un diámetro de 8-12 µm, que tienden levemente a alargarse tangencialmente, y de 20-30 µm en su dimensión longitudinal (figs. 1 B, C).

El parénquima consta de 4-6 estratos de células isodiamétricas en sección transversal, de 15-20 µm de diámetro, y 20-30 µm en su dimensión longitudinal, más o menos semejantes entre sí (figs. 1 B, C).

El hidroma es de contorno más o menos regular, formado por 50 ó más células de 10-15 µm de diámetro (fig. 1 C).

En el interior de caulidios estériles las células son claramente parenquimáticas, sin que se observe ningún estado de transición hacia el hidroma.

La epidermis y el parénquima presentan una pared celular primaria electrondensa, biestrata, con un estrato interno más o menos homogéneo, formador de trígonos, y una franja, sólo visible en epidermis, fibrilar. El grosor de la pared primaria alcanza 0,6 μm en la epidermis, hacia el interior se reduce a una línea. No se engruesa signficativamente en la periferia, salvo si corresponde a la diferenciación de un filidio.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, medianamente opaca a los electrones. En ocasiones está bordeada por una línea interna o aparece un estrato interno de estructura reticular, más opaco. En la epidermis alcanza 1,5 μm de grosor, que se adelgaza gradualmente hasta 0,5 μm en el parénquima interno. El espesor es algo irregular en cada célula, pero no de forma polarizada.

Las células se comunican por algunos plasmodesmos aislados, pero en su mayor parte se agrupan en campos de punteaduras, observados con gran abundancia tanto en corte transversal como longitudinal, de variables dimensiones, preferentemente distribuidos en el parénquima. Producen un adelgazamiento muy brusco de la pared secundaria, para alcanzar un grosor final de 0,5 μm.

La transición entre la epidermis y el parénquima es más o menos clara, especialmente por las diferencias de tamaño.

Las paredes de los hidroides presentan trígonos degradados en su periferia, bordeados por una estrecha banda de pared secundaria laxamente fibrilar. Los lados presentan un grosor de 0,6-0,8 μm, de estructura fibrilar desorganizada, donde se distingue la lámina media.

En el contacto con el parénquima, tan sólo la pared de los hidroides presenta degradación y ésta no afecta a la pared primaria.

La actividad citoplasmática es muy escasa, sólo se han observado restos degradados y acúmulos lipídicos, fundamentalmente en las células epidérmicas. Se ha constatado la presencia de abundantes microorganismos procariontes en la periferia del caulidio.

En regiones más basales del caulidio disminuye progresivamente el número de células del hidroma hasta desaparecer por completo. La pared secundaria se engruesa (2,5 µm en la epidermis, 0,7 µm en el parénquima interno). No se observa degradación de la cutícula. La invasión de microorganismos alcanza frecuentemente el interior del caudilio. Éste está circundado por una estrecha vaina de tejido degenerado, con abundantes microorganismos, que en estado hidratado posee una textura gelatinosa.

En cuanto a las reacciones histoquímicas de pared, partiendo de una coloración natural amarillo-naranja en el ápice y rojiza en la zona basal, en medios alcalinos se produce un viraje a rojo intenso. La reacción para la celulosa, así como para las sustancias pécticas se presenta con intensidad débil. Tan sólo los filidios en diferenciación muestran abundancia de sustancias fenólicas. El azul de Nilo muestra la presencia de acúmulos lipídicos ácidos o bien neutros, sin mezcla.

FILIDIO

. Nivel basal: el nervio presenta 2 (3) células-guía adaxiales, y un segudo estrato de cuatro células similares. En el envés aparecen dos o tres estratos, cada uno con cerca de 15 estereidas, con lumen casi colapsado. El limbo tiene una anchura de 30 células, alargadas en sentido lateral, con las paredes externas convexas. El margen es fuertemente recurvado a un lado (2 ó 3 espiras), y algo menos al otro. En este nivel se presentan ocasionales biestratificaciones irregulares, y las células a veces son papilosas.

. Nivel medio: El nervio posee un primer estrato de dos células-guía adaxiales, y un segudo de 4-6. En el envés aparecen dos o tres estratos de 15 estereidas cada uno, con el lumen algo mayor. El contorno del nervio es redondeado y resalta fuertemente en la superficie abaxial del filidio. El limbo tiene una anchura de 40 células o más, con alta tedencia a biestratificarse irregularmente. Se observan abundantes papilas en ambas superficies. El margen es variablemente recurvado (frecuentemente un lado más que otro) y es biestratificado en sus dos últimas filas.

. Nivel apical: todas las células del filidio son uniformes, parenquimáticas, muy marcadamente papilosas, e irregularmente distribuidas en dos o tres estratos.

La punta pilífera es algo decurrente hacia el margen, denticulada por encima de este nivel, y en corte transversal presenta un máximo de cerca de 30 células.

La máxima actividad ante la luz polarizada se detecta en la mitad basal del nervio y en el pelo.

Gr. funalis

CAULIDIO

Diámetro de 120-150 μm.

La epidermis es uniestrata (a veces biestrata), con células de aproximadamente 30 μm en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, con diámetro de 5-8 μm, en sección transversal (fig. 3 C).

El parénquima consta de 2-3 estratos de células de 30-40 μm en su dimensión longitudinal, isodiamétricas, y con diámetro de aproximadamente 10 μm en sección transversal, bastante regulares (fig. 3 C).

El hidroma es de contorno regular, formado por células de 5-6 μm en sección transversal, en número normalmente superior a 20 en caulidios fértiles, y de 8-15 en estériles.

Las células parenquimáticas y epidérmicas poseen una pared primaria muy densa a los electrones. En las células periféricas se distingue una banda externa algo difusa. El grosor total de la pared primaria es de 0,5-1 μm en la periferia, y se constriñe a una fina línea hacia el interior. No se engruesa en la superficie externa del caulidio, a menos que se trate de un filidio en diferenciación.

La pared secundaria es medianamente opaca, biestrata, con un estrato fibrilar denso, en el que a veces se distinguen bandas, bordeado internamente por un estrato laxo, más opaco, de estructura reticular o fibrilar. En la epidermis alcanza un grosor de 0,5-1 μm, y es uniforme para una misma célula, excepto si presenta campos de punteaduras.

Los plasmodesmos se han observado sólo agrupados en campos de punteaduras, con preferencia en las paredes transversales, aunque que son relativamente poco abundantes. Producen un adelgazamiento paulatino, y poco marcado, de la pared contigua, hasta alcanzar un espesor de 0,5 μm.

La transición entre epidermis y parénquima es bastante gradual, de forma que la epidermis no es un tejido bien diferenciado en esta especie (figs. 3 B, C).

La pared de los hidroides presenta trígonos degradados en su periferia. En su interior se diferencian a menudo campos con abundantes perforaciones (fig. 3 A). Los lados presentan una estructura laxamente fibrilar, escasa densidad electrónica y un grosor de 0,3 μm. En ellos no se puede distiguir los estratos que componen la pared.

En la zona de contacto entre parénquima e hidroma permanece íntegra la pared parenquimática, así como el estrato primario de la de los hidroides.

El citoplasma aparece degradado, con restos de mitocondrias, alto grado de vacuolización, y abundantes acúmulos de lípidos en todas las células, salvo en los hidroides.

No se han observado microorganismos invadiendo los tejidos, ni señales de su presencia.

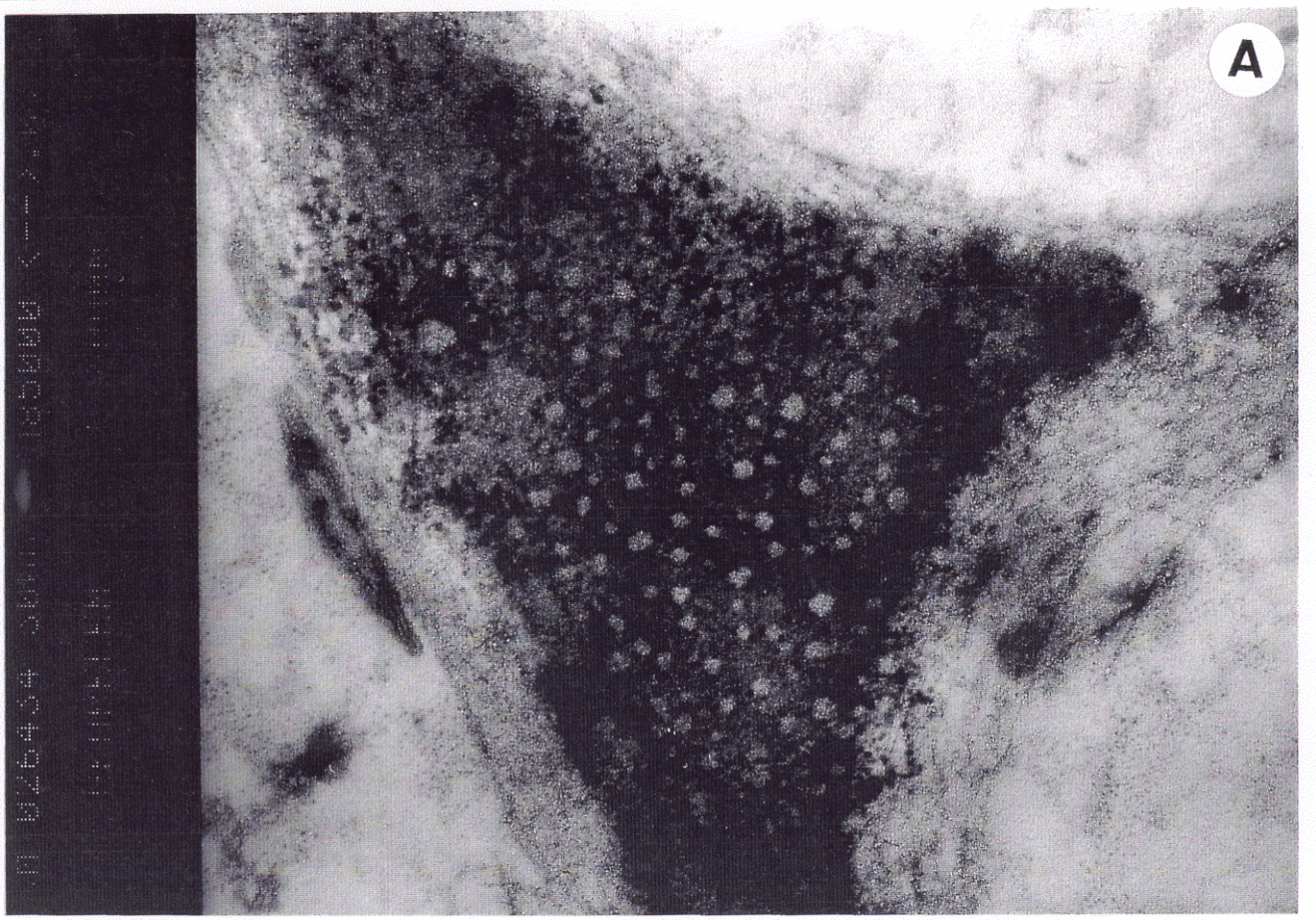
Hacia la base del caulidio, se mantiene la cutícula, decrece el diámetro de la sección hasta 70 μm, se desestructuran las paredes de los hidroides hasta acabar por desaparecer la traza central, y se elimina la distinción entre epidermis y parénquima, con lo que se alcanza una uniformidad celular en la sección, que puede quedar reducida a 10 células. Aparecen perforaciones en las paredes, algo desorganizadas. La pared secundaria se engruesa hasta 2-2,5 μm. No parece decrecer la actividad celular ni la acumulación de lípidos.

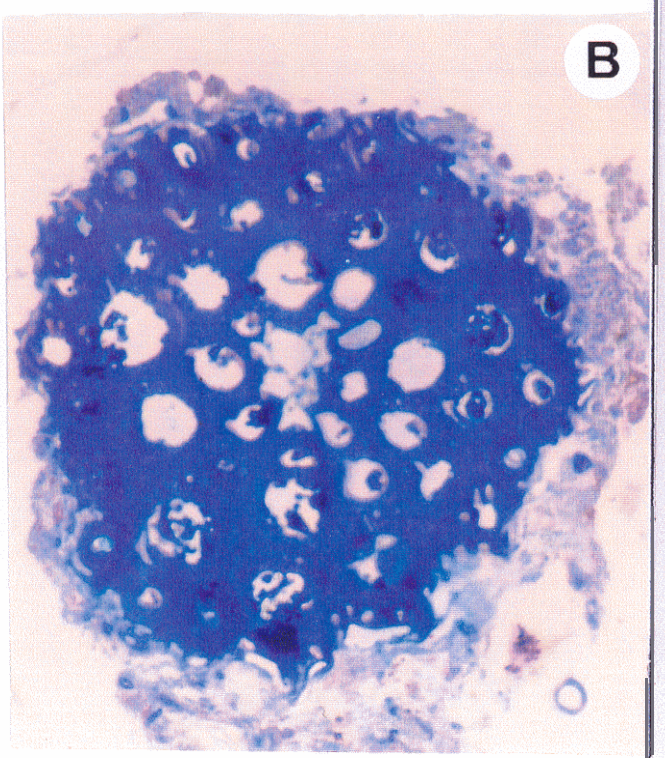
Se observa una vaina, de hasta 10 μm de espesor, de tejido degenerado con abundantes microorganismos, circundando el caulidio, aunque éstos no han aparecido en su interior (fig. 3 B).

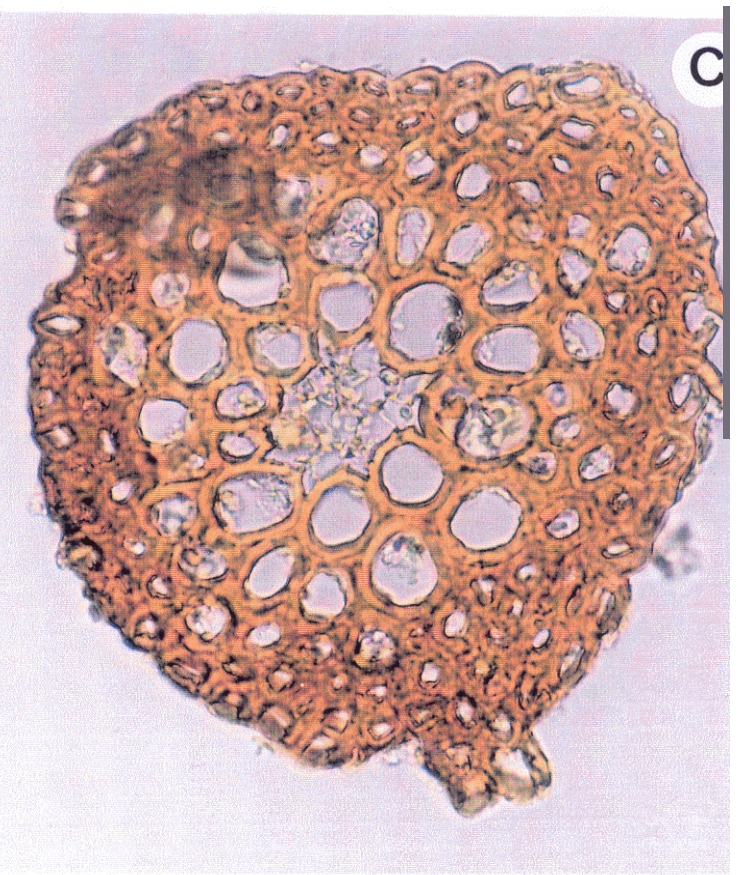
La pared, cuyo color natural es anaranjando en el ápice y rojizo hacia la base, da un fuerte enrojecimiento en medios alcalinos (fig. 3 C), se mantiene unas horas en ácido sulfúrico concentrado antes de desorganizarse, y da una reacción intensa para la detección de pectinas. Tan sólo la periferia muestra acumulación de fenoles. La prueba para la detección de celulosa ofrece un resultado dudoso, al producir un fuerte oscurecimiento, con una coloración que no se corresponde con la descrita. En los acúmulos de lípidos predominan los ácidos.

Fig. 3. A: Corte transversal de trígono de la traza de hidroides de *Gr. funalis*, mostrando las áreas de perforaciones, a MET. **B**: Corte transversal de caulidio basal de *Gr. funalis*, teñido con azul de metileno, 740×. **C:** Corte transversal de caulidio de *Gr. funalis*, reacción con potasa, 600×.

Fig. 3







FILIDIO

. Nivel basal: el nervio tiene dos células-guía adaxiales, un estrato de 6 estereidas abaxiales y una capa interna de estereidas casi colapsadas. Su contorno, semilunar, resalta poco en el envés. El limbo tiene 20 células de anchura, que son de paredes convexas en ambas caras y alargadas en sentido lateral. Ocasionalmente es biestratificado en algunos puntos. El margen es plano, uniestrato.

. Nivel medio: el nervio presenta dos células adaxiales, una capa de aproximadamente seis estereidas abaxiales, que a veces forman protuberancias irregulares, y una capa interna de 3 ó 4 células de paredes muy adelgazadas. El contorno del nervio es redondeado, con escaso resalte en el envés. El limbo presenta hasta 40 células de anchura, es irregularmente biestrato, y su margen es plano o ligeramente recurvado, con una o dos células de grosor.

. Nivel apical: las células se igualan todas al tipo parenquimático del limbo, con la excepción ocasional de las células centrales del nervio. El filidio se hace irregularmente bi- o triestrato.

La punta pilífera es decurrente, denticulada, y con un máximo de 15-20 células en corte transversal.

Ante la luz polarizada, la máxima actividad la muestra la base, la mitad basal del nervio y el pelo.

Gr. hartmanii

CAULIDIO

Diámetro de aproximadamente 200 µm.

La epidermis es muy diferenciada, de contorno aproximadamente regular, con 2-3 estratos de células de 50 µm en su dimensión longitudinal, más o menos isodiamétricas o levemente alargadas tangencialmente en sección transversal, con diámetro de 10-15 µm (figs. 4 A, B).

El parénquima consta de 4 ó 5 estratos de células de 50-70 µm en su dimensión longitudinal, aproximadamente isodiamétricas en su sección transversal, con diámetro de 15-20 µm, con los mínimos valores en las internas y los máximos en las centrales. Las periféricas pueden tender a alargarse tangencialmente (figs. 4 A, B).

No se ha observado en ningún caso la presencia de una traza de hidroides, y las células centrales muestran características claramente parenquimáticas, sin ninguna tendencia a la degradación de la pared (fig. 4 A).

Estos tejidos presentan una pared primaria biestrata, con un estrato interno denso, con apariencia homogénea, que forma los trígonos, y una banda interna fibrilar, perceptible en todas las células. La pared primaria alcanza un grosor de 0,8 µm en la epidermis, que disminuye a 0,2 µm en el parénquima interno. No forma una banda periférica engrosada, salvo en los filidios en diferenciación.

La pared secundaria es uniestrata, muy densamente fibrilar, con un grosor de 1-1,5 μm en la epidermis, que decrece gradualmente hasta 0,3 μm en el parénquima interno. Su espesor es muy regular para cada célula.

Se observan algunos plasmodesmos aislados entre las células parenquimáticas, pero son más frecuentes los campos de punteaduras primarias, principalmente distribuidos en las paredes transversales. Su presencia supone un adelgazamiento gradual de la pared hasta alcanzar un grosor final de 0,6 μm.

La delimitación entre epidermis y parénquima es siempre clara (figs. 4 A, B).

No se han encontrado orgánulos citoplasmáticos, sólo restos degenerados de membranas y acúmulos lipídicos.

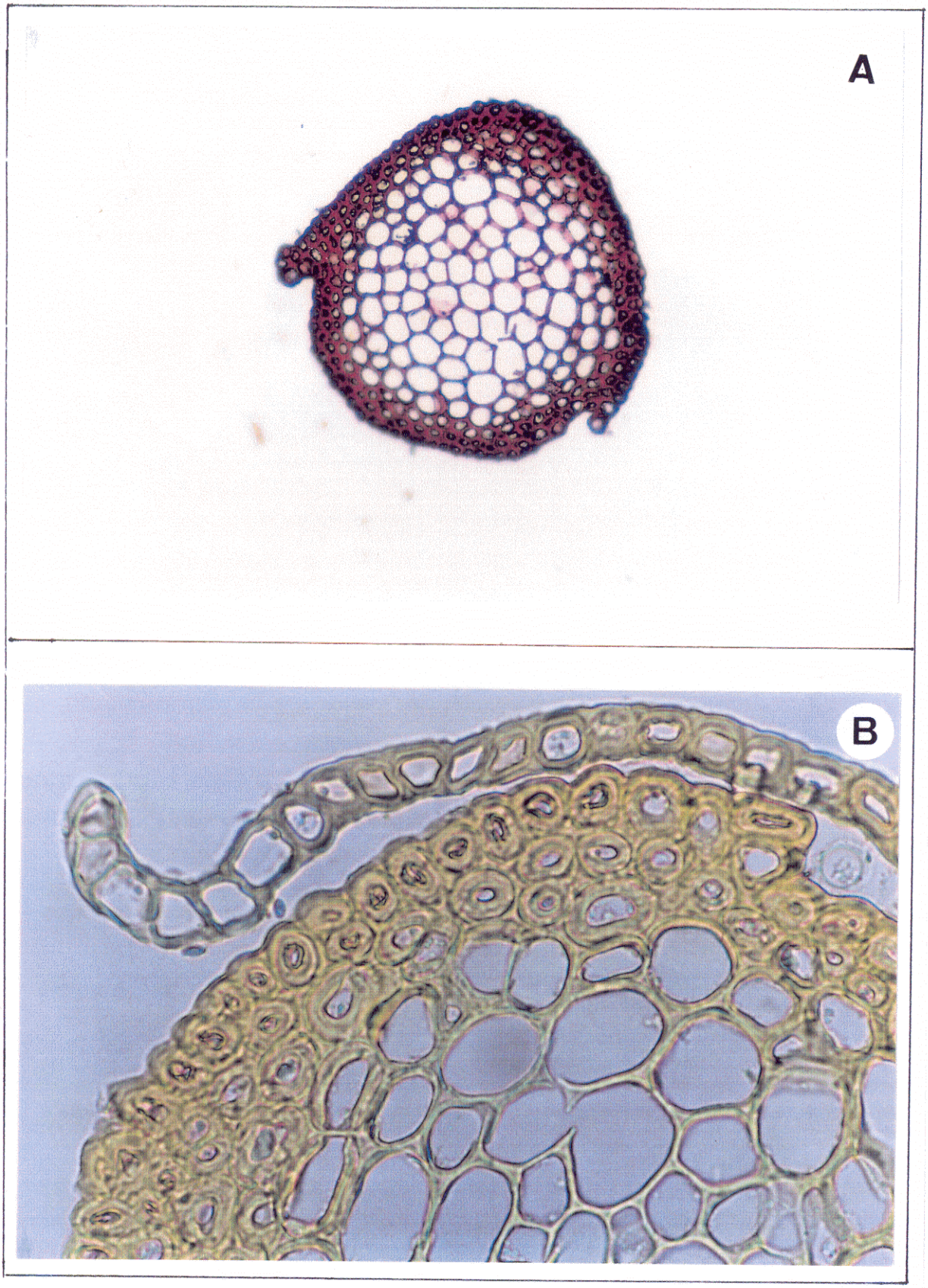
Hacia la base, el diámetro del caulidio decrece hasta 120 μm. La epidermis aumenta en número de estratos (4 ó 5), aunque en niveles muy basales vuelve a presentar dos o tres. La existencia de estratos de transción puede oscurecer algo la delimitación entre epidermis y parénquima. El grosor de la pared secundaria puede aumentar hasta colapsar el lumen de algunas células epidérmicas, alcanzando 3-4 μm. Es frecuente la aparición de bandas concéntricas en el espesor de este estrato. En el interior, la pared secundaria muestra cierta desestructuración.

La cutícula se observa íntegra, y no aparecen señales de invasión de microorganismos, aunque se ha encontrado frecuentemente una vaina de tejido degenerado, de forma más o menos disgregada, circundando el caulidio.

La pared de las células parenquimáticas y epidérmicas, de color natural ocre, reacciona con fuerte intensidad para la detección de pectinas (fig. 4 B) y, especialmente, de sustancias fenólicas. La detección de celulosa requiere una semana de actuación de los reactivos, y aun así el resultado es débil, aunque es algo más marcado en el parénquima interno. En medios básicos la pared enrojece fuertemente, y en ácido sulfúrico concentrado se disuelve en pocos minutos. Los acúmulos de lípidos muestran estar formados por mezclas de neutros y ácidos.

Fig. 4. A: Corte transversal de caulidio medio de *Gr. hartmanii*. Test de detección de pectinas (rojo de rutenio), 220×. **B**: Corte transversal de caulidio apical de *Gr. hartmanii*, 850×.

Fig. 4



YEMAS

Aparecen en el ápice de los caulidios, tienen forma de mora, con 20-30 células y un diámetro de 100 µm. Las paredes constan sólo del estrato primario, que a su vez es biestratificado, con una banda fibrilar reticulada bordeada internamente por otra más difusa. Externamente están recurbiertas por una sustancia lipofílica amorfa.

Su comportamiento ante las reacciones histoquímicas es semejante al del caulidio, exceptuando la mayor resistencia al ácido sulfúrico concentrado (más de 24 horas).

FILIDIO

. Nivel basal: el nervio está formado por 6 células-guía adaxiales y tres estratos de estereidas abaxiales, con 8 células cada uno. Su contorno es semilunar, poco resaltado en el envés. El limbo tiene una anchura de 15-20 células, que son leptodermas, de paredes exteriores convexas y alargadas en sentido lateral. El margen es uniestrato y recurvado.

. Nivel medio: el nervio presenta 4-6 células-guía adaxiales y tres estratos de estereidas abaxiales, de 10-15 células cada uno. Su contorno es laxamente trilobulado, a veces irregular. El limbo tiene una anchura de 30 células isodiamétricas en sección transversal. El margen es poco recurvado, biestrato.

. Nivel apical: el número de células-guía adaxiales decrece hasta dos, y las estereidas aumentan progresivamente el diámetro de su lumen. Finalmente estos tipos celulares se igualan al parenquimático del limbo. El contorno del nervio es muy irregular. El limbo presenta un margen biestratificado en 2-3 filas de células.

La punta pilífera no es decurrente, está formada en corte transversal por un máximo de 20-30 células y es dentada.

Ante la luz polarizada la máxima actividad es la registrada por el cuarto basal del nervio y por el pelo.

Gr. incurva

CAULIDIO

Diámetro de cerca de 150 μm.

La epidermis es uniestrata, a veces biestrata, de contorno bastante regular, formada por células de 15-30 μm en su dimensión longitudinal, y aproximadamente isodiamétricas, o levemente alargadas tangencialmente, con diámetro de 8-15 μm, en corte transversal (fig. 5 B).

El parénquima consta de tres o cuatro estratos, de células de 30-40 μm en su dimensión longitudinal, más o menos isodiamétricas, con diámetro de 15-20 μm, con los máximos valores en los estratos centrales, y los menores en el interno (fig. 5 B).

El hidroma es ligeramente excéntrico, de contorno regular, constituido por 6-10 células de 5-8 μm de diámetro (fig. 5 B).

La epidermis y el parénquima poseen una pared primaria opaca, bordeada por un estrato fibrilar menos denso a los electrones, indistinguible en el parénquima interno (fig. 4 A). El grosor de la pared primaria es de 0,4 μm en la epidermis, aunque hacia el interior se reduce a una línea muy delgada. En la periferia no se engruesa formando una corona diferenciada, excepto si se trata de un filidio.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar (fig. 5 A), a veces con dos o tres bandas. Ocasionalmente puede aparecer un segundo estrato interno laxo, más denso a los electrones. En la epidermis puede alcanzar 2 µm de espesor, y va adelgazándose gradualmente hacia el interior hasta 0,3 µm. El grosor es uniforme para una misma célula.

Se observan algunos plasmodesmos aislados, pero en su mayor parte aparecen en campos de punteaduras primarias, más abundantes en paredes transversales, pero también presentes en las longitudinales; igualmente distribuidos en la epidermis y el parénquima. Producen un adelgazamiento gradual de la pared, hasta un espesor final de 0,5-0,6 µm (fig. 5 A).

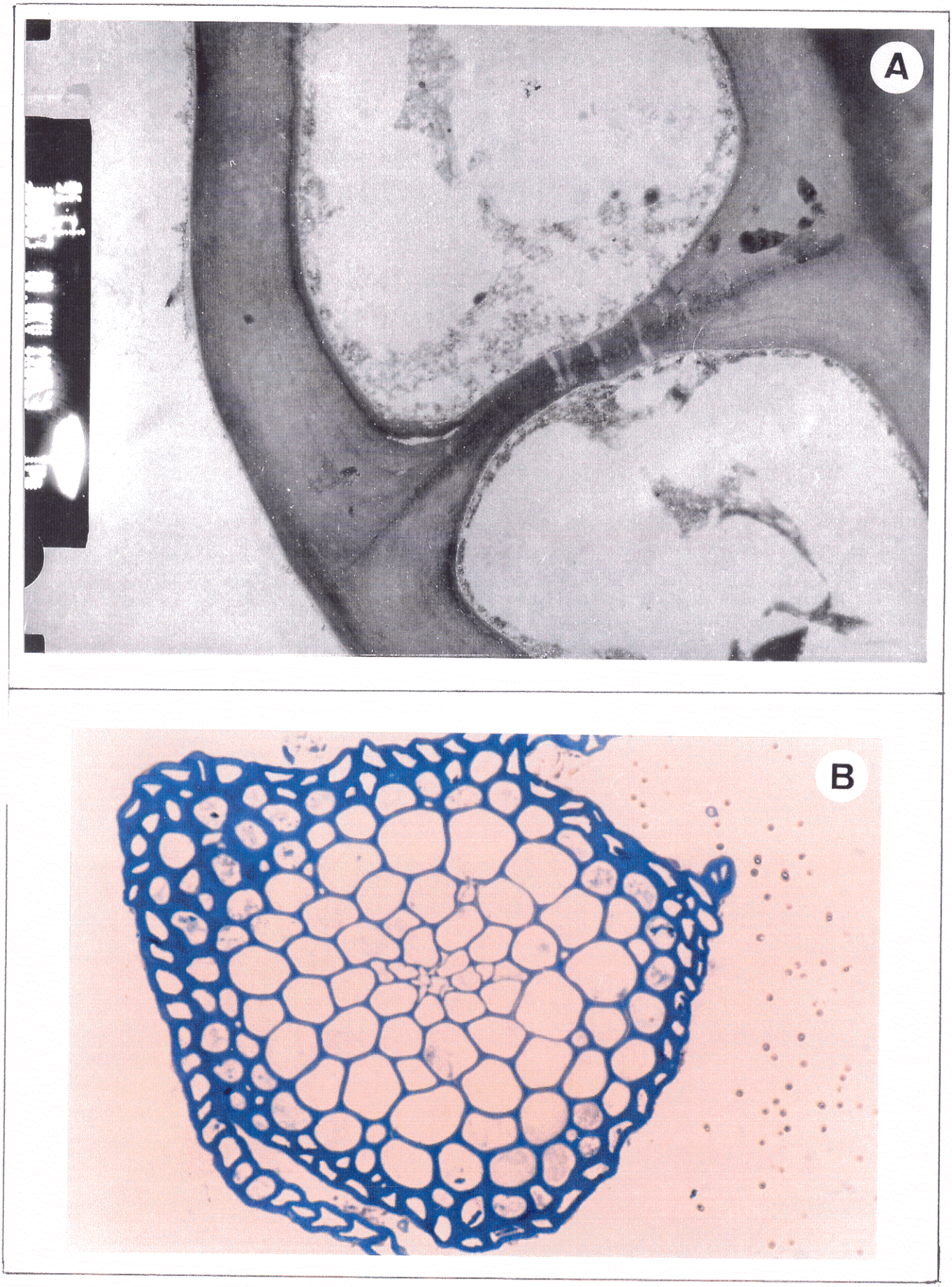
La delimitación entre el parénquima y la epidermis es generalmente clara (fig. 5 B).

La pared de los hidroides muestra trígonos opacos, frecuentemente con áreas de perforaciones, bordeados por una banda fina de pared secundaria. Los lados aparecen muy desestructurados, laxos, fribrilares, con un grosor de 0,2 µm, y muestran trazos discontinuos de la lámina media.

La actividad citoplasmática es muy escasa, sólo se encuentran acúmulos lipídicos y restos degradados de orgánulos. Aparecen señales de invasión de microorganismos, aunque sus células no se han observado.

Fig. 5. A: Corte transversal de caulidio de *Gr. incurva*: campo de punteaduras primarias en la epidermis, a MET. **B**: Corte transversal de caulidio apical de *Gr. incurva*, 600×.

Fig. 5



Hacia la base, el diámetro del caulidio se reduce hasta 100 µm, a veces hasta 70 µm. Las paredes de los hidroides pierden su estructura fibrilar, y se afinan a menos de 0,1 µm. Finalmente desaparece el hidroma. La pared secundaria se engruesa hasta 2,5-3 µm en la epidermis y 0,5 en el parénquima interno. Aunque se mantiene la cutícula, se observan abundantes microorganismos, de orgaización procariota sin pared celular (tipo micoplasma), hasta el interior del caulidio.

No se observa vaina de tejido degradado, o es muy reducida.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, las paredes celulares reaccionan fuertemente para la detección de pectinas, celulosa y fenoles (éstos, especialmente en la periferia). Las secciones, de color natural ocre-amarillento, enrojecen en disoluciones alcalinas, y se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado. El azul de Nilo muestra predominantemente acúmulos neutros.

FILIDIO

. Nivel basal: El nervio presenta dos células adaxiales poco diferenciadas y tres estratos de 4-8 estereidas cada uno hacia la cara abaxial. Su contorno es semilunar, destacando poco en dicha superficie. El limbo tiene una anchura de unas 15 células, es uniestrato y de margen ligeramente recurvado.

. Nivel medio: el nervio se compone de dos células-guía adaxiales, de dos estratos abaxiales de 8-10 estereidas cada uno, y de 1-2 estereidas interiores. Su contorno es redondeado, poco resaltado en el envés. El limbo tiene una anchura de 20-25 células, que se alargan en sentido lateral, de paredes convexas. Presenta ocasional biestratificación. El margen es asimétricamente recurvado y uniestrato.

. Nivel apical: el nervio y el limbro tienden a presentar exclusivamente células parenquimáticas, ovaladas en sentido anteroposterior. El margen es plano, biestrato en sus 2-4 últimas filas celulares.

No se han observado papilas en las células del filidio.

La punta pilífera no es decurrente, y las fibras presentan extremos patentes, produciendo dientes. En sección transversal se ve formada por un máximo de diez fibras.

Ante la luz polarizada, la máxima actividad la presenta el tercio basal del nervio y el pelo.

Gr. orbicularis

CAULIDIO

Diámetro de 150-200 μm.

Se destaca la presencia de una cutícula muy delgada. La epidermis es de contorno bastante irregular, por la alta densidad de bases de filidios imbricadas, y está formada por 1-3 estratos de células de aproximadamente 25 μm en su dimensión longitudinal, que en corte trasversal son aproximadamente isodiamétricas o algo alargadas tangencialmente, con un diámetro de 8-15 μm.

El parénquima consta de 2-3 estratos de células de 25-50 μm en su dimensión longitudinal, isodiamétricas en su sección transversal, con un diámetro de 12-18 μm, con los máximos valores en el estrato contiguo al más interno (fig. 6 B).

El hidroma presenta hasta 40 células en los caulidios fértiles, con un contorno más o menos regular. El diámetro de los hidroides en sección transversal es de 5-10 μm (fig. 6 B).

En la epidermis y el parénquima, la pared primaria es opaca, con un estrato homogéneo que forma los trígonos y una banda más clara fibrilar que los bordea internamente, sólo distinguible en la epidermis. El grosor de la pared primaria es de 0,6 μm en la periferia, y se constriñe a una fina línea en el interior (fig. 6 A). No se engruesa formando una corona externa, salvo en las regiones en las que se diferencia un filidio.

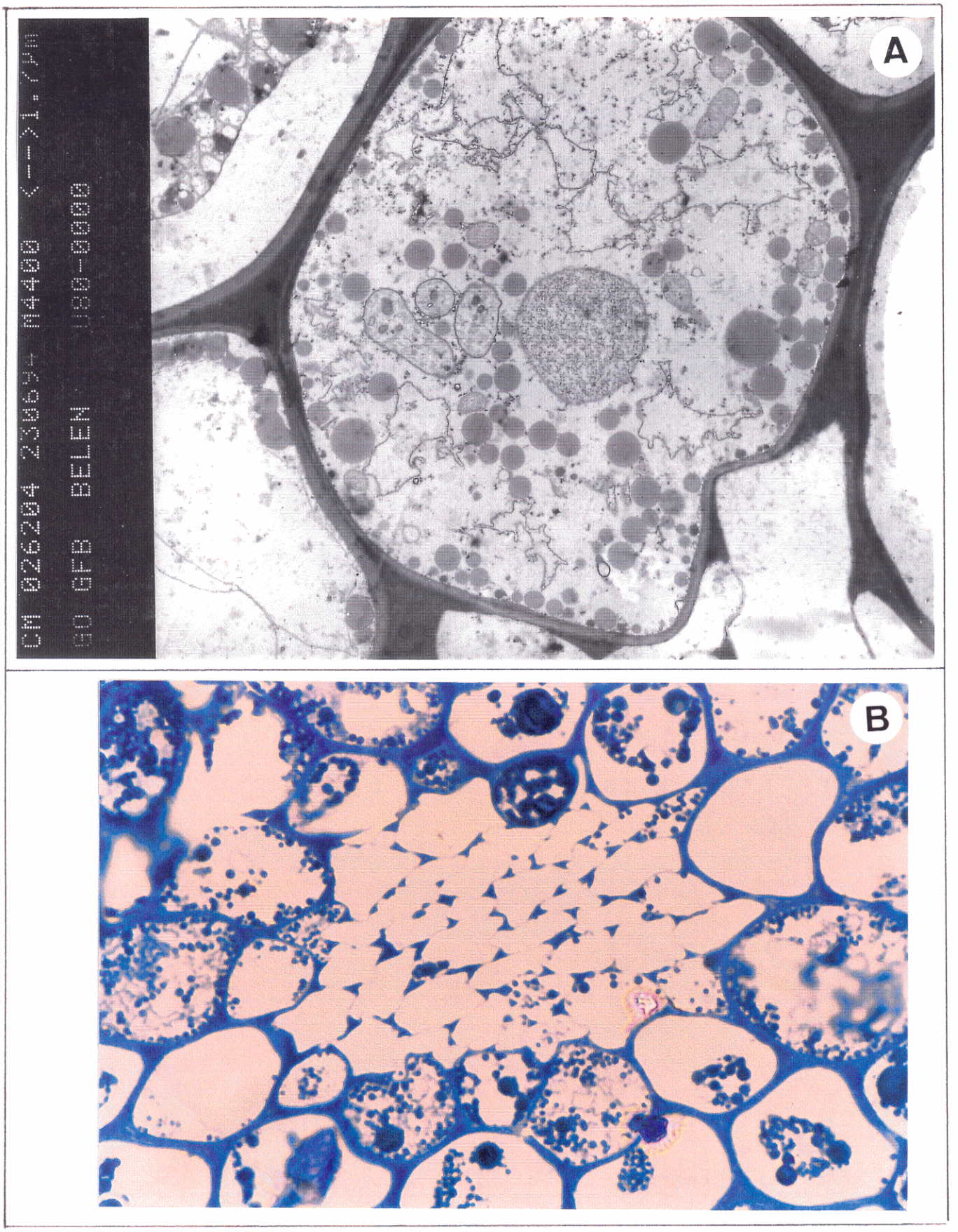
La pared secundaria es de mediana densidad electrónica, biestrata, con un estrato densamente fibrilar y otro interno reticular, más electrondenso. El grosor, de 2 μm en la epidermis, disminuye gradualmente hasta 0,3 μm en el parénquima interno (fig. 6 A), y es bastante regular para cada célula.

Los plasmodesmos se encuentran principalmente agrupados en campos de punteaduras primarias, más abundantes en las paredes transversales del parénquima interno. Sólo ocasionalmente se han encontrado en la epidermis. Su presencia causa una disminución gradual del grosor de la pared, hasta alcanzar 0,5 μm.

La transición entre el parénquima y la epidermis es bastante gradual, y es difícil distinguir este último tejido. Las paredes de los hidroides presentan trígonos homogéneos y muy opacos, rodeados por una fina banda de pared secundaria. Los lados presentan una estructura fibrilar, donde no se distingue la antigua estratificación de la pared, y son muy delgados (0,1-0,2 μm), aunque normalmente continuos (fig. 6 A). En el contacto con el parénquima la degradación sólo afecta a la pared secundaria de los hidroides.

En el citoplasma aparecen cloroplastos bien organizados, de hasta 5 μm de diámetro máximo, mitocondrias, retículo endoplasmático, dictiosomas, núcleo y nucléolo, así como grandes acúmulos lipídicos (fig. 6 A). Se han observado al microscopio óptico depósitos de cristales en las paredes de los hidroides.

Fig. 6. A: Corte transversal de caulidio de *Gr. orbicularis*: parénquima interno, a MET. **B**: Corte transversal de caulidio basal de *Gr. orbicularis*, teñido con azul de metileno, 1500×.


A
CM 026204 23069- M4400 <-->1.7µm
GO GFB BELEN U80-0000
B

Hacia la base el diámetro disminuye hasta 100-120 µm. La cutícula se reduce mucho y puede desaparecer. En el hidroma tiende a decrecer el número de células, y a veces se colapsa totalmente, aunque se han encontrado secciones basales con 30 hidroides. Se elimina por completo la diferenciación entre epidermis y parénquima. Se observa una alta degradación de las paredes celulares, que no se engruesan apreciablemente. El estrato interno de la pared secundaria aumenta de espesor y adquiere una estructura homogénea. Es frecuente observar roturas y discontinuidades en los tabiques.

Disminuye la actividad citoplasmática, aunque algunas células parenquimáticas muestran aún alta organización.

Se han observado microorganismos en el interior de las paredes periféricas.

No se ha encontrado una vaina de tejido degradado circundado el caulidio.

En cuanto a las reacciones histoquímicas se detecta con intensidad la presencia de sustancias pécticas, celulosa y fenoles. Las paredes, de color natural ocre se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado y dan una reacción anaranjada en la epidermis y rojiza en el parénquima en medios alcalinos. Los acúmulos de lípidos pueden estar constituidos por ácidos, neutros o mezclas.

FILIDIO

. Nivel basal: el nervio consta de dos células-guía adaxiales, 2-4 células internas semejantes a éstas y 2-3 estratos de abaxiales de cerca de 8 estereidas cada uno. El contorno es semilunar, con cierto resalte en el envés. El limbo tiene una anchura de 20-30 células, que se observan alargadas en sentido lateral, con las paredes externas convexas. El margen es uniestrato, recurvado.

. Nivel medio: en el nervio aparecen 2 células-guía adaxiales, 6-7 células parenquimáticas abaxiales, algo más reducidas que el limbo, y una capa interna de tres células, separadas por tabiques muy delgados. El contorno del nervio es redondeado y sobresale poco en el envés. El limbo, siempre uniestrato, alcanza las 30 células de anchura, que hacia el ápice presentan convexa la pared adaxial. Frecuentemente las uniones intercelulares son protuberantes a modo de papilas. Ambos márgenes son uniestratos e igualmente recurvados.

. Nivel apical: todas las células se igualan al tipo parenquimático del limbo. Se hace más frecuente la presencia de prórulas intercelulares. El margen y el limbo son irregularmente biestratos.

La punta pilífera es un poco decurrente, lisa o levemente dentada, con un máximo de 35-40 fibras en sección transversal.

La máxima actividad ante la luz polarizada era la registrada por la base, la mitad basal del nervio y el pelo.

Gr. pulvinata

CAULIDIO

Diámetro de aproximadamente 200 μm.

La epidermis es uniestrata, ocasionalmente con dos estratos y muy raramente tres, poco diferenciada, con células de 30 μm en su dimensión longitudinal, aproximadamente isodiamétrica en sección transversal, con diámetro de 12-18 μm (fig. 7 B).

El parénquima consta de 3-4 estratos de células de 30-50 μm en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, con diámetro de cerca de 20 μm, en sección transversal, donde los máximos valores corresponden al estrato contiguo al más interno (fig. 7 B).

El hidroma tiene un contorno bastante regular, y está constituido por unos 30 hidroides de 4-15 μm de diámetro (fig. 7 B).

Las células parenquimáticas y epidérmicas presentan una pared primaria con un estrato muy opaco, de estructura indistinguible, que forma los trígonos, y una banda fibrilar que los bordea internamente. La pared primaria alcanza en la epidermis un grosor de 0,8 μm en la epidermis, y queda reducida a una fina línea hacia el interior (fig. 7 A). No forma una corona periférica engrosada, salvo en los filidios en diferenciación.

La pared secundaria es uniestrata, medianamente electrondensa, muy densamente fibrilar. Ocasionalmente se diferencia un segundo estrato interno de organización reticular. La pared secundaria alcanza un grosor de 2 μm en la epidermis, y decrece gradualmente hasta 0,3 μm en el parénquima interno (fig. 7 A). El espesor de este estrato es muy regular para cada célula.

Se observan plasmodesmos aislados entre las paredes parenquimáticas y epidérmicas, pero más frecuentemente aparecen agrupados en campos de punteaduras primarias, preferentemente distrubuidos en paredes transversales. Causan un adelgazamiento gradual de la pared contigua, hasta presentar 0,3-0,4 μm de espesor.

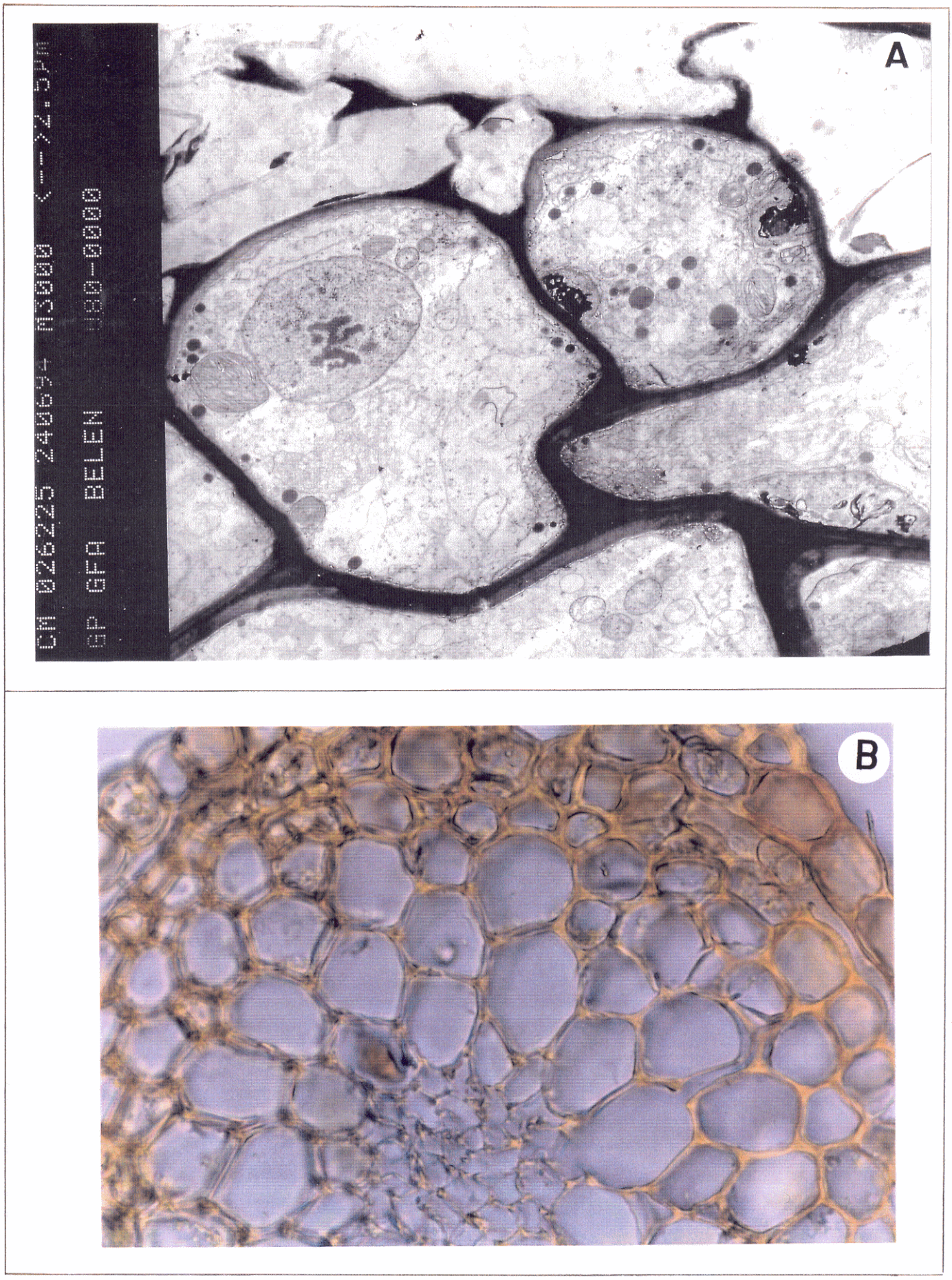
La transición entre la epidermis y el parénquima es bastante gradual (fig. 7 B).

Los hidroides presentan trígonos muy opacos de apariencia homogénea, bordeados por una fina banda de pared secundaria. Los lados presentan una estructura fibrilar laxa, donde a veces se distinguen restos de la lámina media, con un grosor total de 0,3 μm. En el contacto con el parénquima interno la degradación de la pared no afecta ni a la célula parenquimática ni a la pared primaria del hidroide (fig. 7 A).

El citoplasma aparece altamente organizado, con cloroplastos de pequeño tamaño (2-3 μm), cisternas de retículo endoplasmástico, dictiosomas, núcleo con nucléolo, etc. Sin embargo, las células periféricas muestran signos de degeneración citoplasmática, con abundantes guirnaldas concéntricas de retículo endoplasmático, estructuras residuales y alto grado de vacuolización (fig. 7 A). Con microscopía óptica se han observado depósitos de cristales en algunos hidroides. No se han registrado señales de invasión de microorganismos.

Fig. 7. A: Corte transversal de caulidio de *Gr. pulvinata*: parénquima interno, a MET. **B**: Corte transversal de caulidio basal de *Gr. pulvinata*, sin teñir, 600×.

Fig. 7



En niveles más basales el diámetro del caulidio se reduce hasta 100 µm. El hidroma tiende a colapsar, decreciendo su número de células o formando una laguna central. Sus paredes se hacen frecuentemente discontinuas, amorfas, con alta densidad electrónica.

Se produce una mayor pérdida de actividad en las células, especialmente en las epidérmicas, lo que contribuye a la mayor diferenciación de este tejido. El parénquima, aunque altamente vacuolizado, mantiene algunos orgánulos, así como abundantes acúmulos lipídicos.

En la pared secundaria se diferencia casi siempre un segundo estrato reticulado. Es frecuente, asimismo, la aparición de bandas en el estrato principal.

No se ha observado ni presencia de microorganismos ni vaina de tejido degradado circundando el caulidio.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, se detecta con intensidad la presencia de pectinas, celulosa y sustancias fenólicas. La pared, de color originalmente ocre, enrojece fuerte y uniformemente en medios alcalinos, y se disuelve en pocos minutos con ácido sulfúrico concentrado. Los lípidos se localizan con preferencia en los extremos apical y basal, y tienden a mezclarse los ácidos y los neutros.

FILIDIO

. Nivel basal: en el nervio aparecen dos células-guía adaxiales, dos estratos de cerca de 6 estereidas cada uno en el envés (el periférico, de células mayores), y 2-4 células centrales de paredes muy finas, de apariencia semejante a los hidroides del caulidio. El contorno del nervio es semilunar, con cierto resalte en la superficie abaxial. El limbo posee 25-30 células leptodermas, isodiamétricas, con las paredes adaxiales y abaxiales convexas. El margen es uniestrato y plano.

. Nivel medio: el nervio se compone de dos células-guía adaxiales, una capa abaxial de células parenquimáticas, algo menores que las del limbo, una capa interna de estereidas y 2-3 células centrales semejantes a hidroides. El contorno es redondeado, con resalte poco acusado del envés del filidio. El limbo tiene una anchura hasta de 40 células, con el lumen ovalado, alargado en sentido anteroposterior, con el margen recurvado, biestrato en la última o dos últimas filas de células.

. Nivel apical: el filidio presenta exclusivamenate células parenquimáticas, con dos capas en el nervio. El limbo es casi siempre uniestrato hasta el margen, que es como en el nivel medio.

No se han obsevado papilas en las superficies del filidio, pero ocasionalmente han aparecido formas anómalas con dos nervios.

La punta pilífera es algo decurrente, lisa, con 30-40 fibras densamente empaquetadas.

Ante la luz polarizada la base del filidio, los dos tercios basales del nervio y la punta pilífera registran la máxima actividad.

Gr. retracta

CAULIDIO

Diámetro de 200-250 μm.

La epidermis presenta 2-4 estratos, con células de 100-120 μm en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, o levemente alargadas tangencialmente, con diámetro de 10-15 μm, en sección transversal (fig. 8 A).

El parénquima está formado por 3-4 estratos de células, de 100-120 μm en su dimensión longitudinal, y que en sección transversal son isodiamétricas, con un diámetro de 15-25 μm, donde los mínimos valores corresponden a las más internas (fig. 8 A).

El hidroma tiene un contorno irregular y está formado por hasta 40 células de 5-10 μm de diámetro en sección transversal (fig. 8 A).

Las células epidérmicas y parenquimáticas poseen una pared primaria con un estrato opaco, homogéneo, que forma los trígonos, y otro fibrilar que lo bordea internamente, sólo visible en las capas externas del caulidio. El grosor total de la pared primaria alcanza 0,5 μm en la periferia y decrece hasta 0,2 μm en el parénquima interno. No se diferencia en una corona externa especialmente engrosada, salvo si corresponde a un filidio en diferenciación.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, medianamente opaca a los electrones. A veces presenta una subestratificación en bandas delimitadas por finas líneas opacas, y sólo ocasionalmente se diferencia un estrato reticular, más denso a los electrones, hacia el interior del caulidio. En la epidermis, la pared secundaria alcanza un grosor de 1-1,5 μm, que disminuye gradualmente hacia el interior hasta 0,3 μm. El espesor es constante para una misma célula.

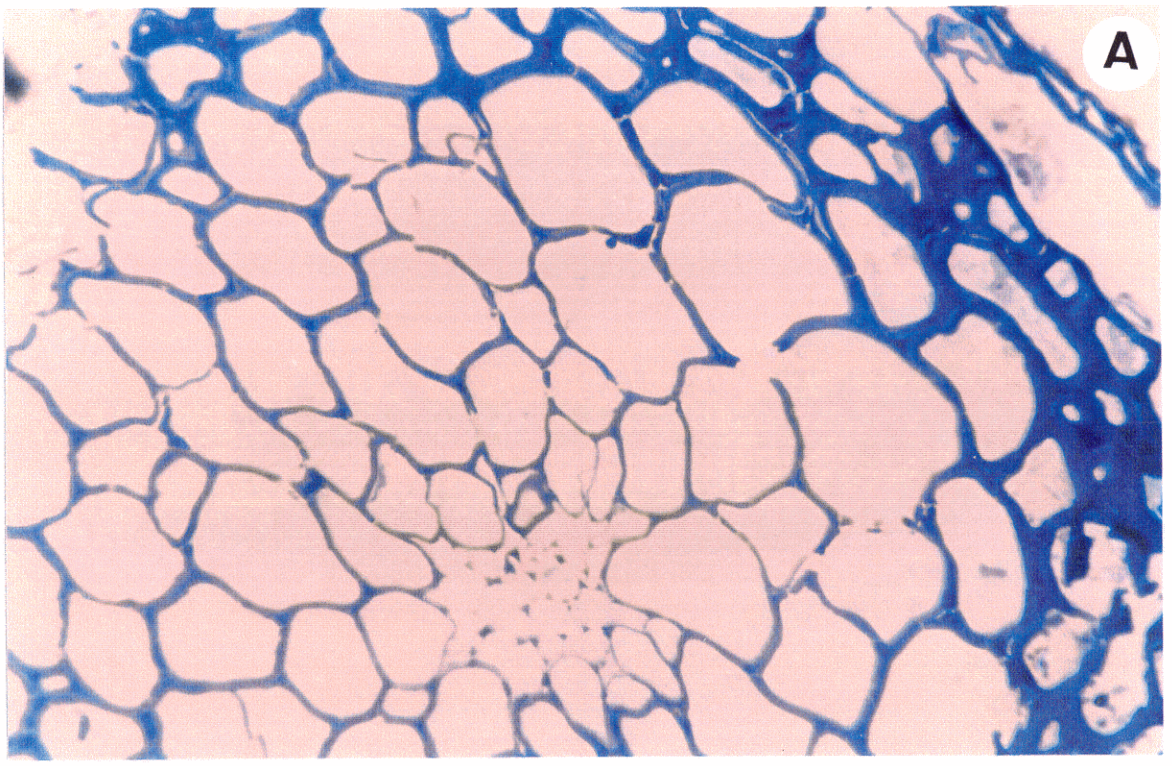
Los plasmodesmos presentes nunca se han observado agrupados en campos de punteaduras primarias. Aparecen con mucha abundancia en las paredes transversales, que, aunque su espesor se limita a 0,5 μm, no muestran diferencias de grosor con paredes similares no perforadas, y mantienen su estructura y organización (fig. 8 C). En ocasiones se encuentran en las paredes longitudinales, que se adelgazan ligeramente, aunque sus espesores pueden ser superiores a 1 μm.

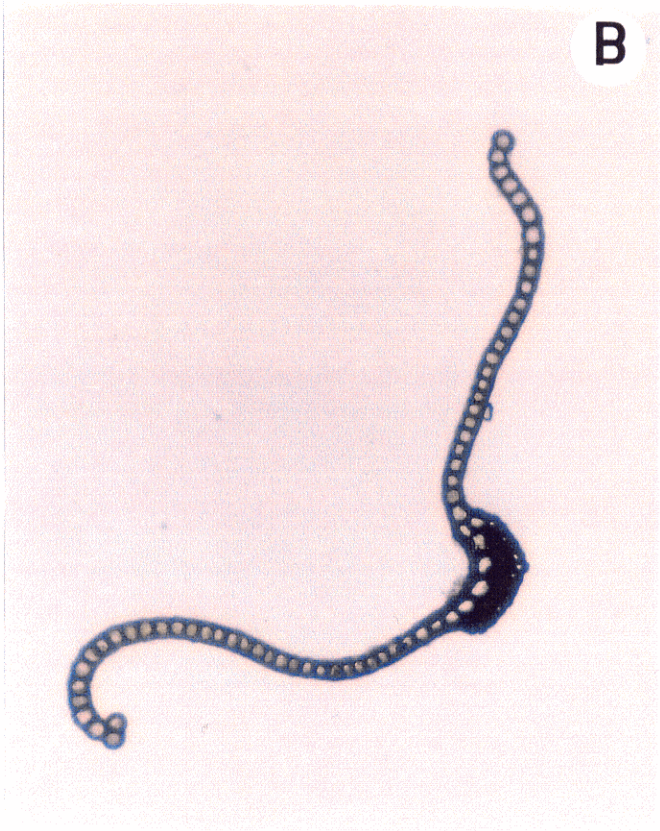
La delimitación entre la epidermis y el parénquima es bastante clara (fig. 8 A).

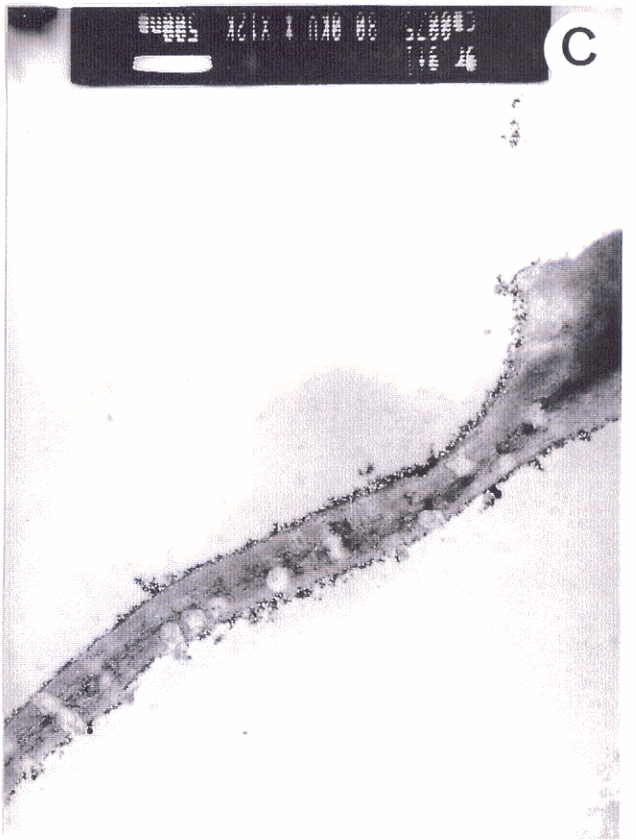
Los hidroides presentan trígonos muy densos bordeados por una fina banda de pared secundaria. Los lados, con un grosor de 0,2 μm, presentan una estructura muy laxa, en la que de forma discontinua se diferencia la lámina media.

En el contacto con el parénquima, la degradación de la pared afecta sólo a las paredes secundarias correspondientes al hidroma.

Fig. 8. A: Corte transversal de caulidio medio de *Gr. retracta*, teñido con azul de metileno, 600×. **B**: Corte transversal de filidio de *Gr. retracta* (nivel medio). Test de detección de sustancias fenólicas ($FeCl_3$), 220×. **C**: Pared celular transversal del parénquima, a MET.


A


B


C

El citoplasma muestra un alto grado de degeneración y vacuolización, aunque se observan cloroplastos de 1-2 μm, acúmulos de lípidos, mitocondrias y restos de membranas.

No se han observado señales de invasión de microorganismos.

Hacia la base tiende a degenerar la traza central, haciéndose discontinuas sus paredes y en ocasiones adelgazándose por debajo de 0,1 μm. Se mantiene la cutícula, y las paredes secundarias no se engruesan sustancialmente, aunque presentan con más frecuencia una estructura en bandas. Se observan abundantes microorganismos en el lumen celular y en el interior de las paredes. El caulidio está circundado por una fina vaina de tejido degradado con gran abundancia de microorganismos.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, la prueba para la detección de celulosa da un resultado positivo en la pared secundaria, quedando la primaria sin reaccionar. Se detecta con intensidad la presencia de sustancias fenólicas (especialmente en la periferia) y de pectinas. Las paredes, de color natural ocre-verdoso en el ápice y pardo-rojizo en la base, viran a un rojo fuerte en medios alcalinos, y se disuelven en pocos minutos en ácido sulfúrico concentrado. Los acúmulos lipídicos presentan mezclas de ácidos y neutros.

FILIDIO

. Nivel basal: el nervio se compone de 6 células-guía adaxiales y de 3 estratos de estereidas, con 15-16 células el externo, y 5 ó 6, irregularmente dispuestas, el interno. Su contorno es semilunar, con mediano resalte del envés. El limbo tiene una anchura de 15-20 células, que son leptodermas, con paredes externas convexas y algo mayores en el margen, que es plano y uniestrato.

. Nivel medio: el nervio consta de 4-6 células adaxiales, de un estrato abaxial de células en transición de estereidas a parenquimáticas, y de 2-3 estratos de estereidas centrales. Su contorno es muy laxamente trilobular, y resalta abruptamente del envés del filidio. El limbo posee hasta 35-40 células, y es uniestrato salvo, ocasionalmente, en las 2-4 últimas filas marginales. El margen es ligera y asimétricamente recurvado (fig. 8 B).

. Nivel apical: el nervio consta de 2-4 células adaxiales y de un estrato abaxial. Todas las células tienden a uniformarse con el parénquima del limbo, aunque a veces queda alguna estereida central. El limbo está formado por células de lumen oblongo, alargado en sentido anteroposterior, y la biestratificación se extiende a las 5-10 filas de células marginales.

No se han observado papilas ni relieves similares.

La punta pilífera no es decurrente, es denticulada, y en corte transversal aparece formada por un máximo de 10 células.

Con respecto a la luz polarizada, la máxima actividad la muestra el tercio basal del nervio y el pelo.

Gr. torquata

CAULIDIO

Diámetro de aproximadamente 100 μm.

La epidermis está formada por 2-3 estratos, con un contorno bastante regular. Sus células miden 30-50 μm en su dimensión longitudinal, y son más o menos isodiamétricas, o levemente alargadas tangencialmente en la periferia, con diámetro de 5-10 μm, en sección transversal (fig. 9 B).

El parénquima está formado por dos estratos de células de 30-50 μm en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas, con diámetro de 12-15 μm, bastante semejantes entre sí, en sección transversal (figs. 9 A, B).

El hidroma presenta un contorno bastante regular, y consta de 6-10 células con un diámetro de 1-7 μm (fig. 9 B).

Las células parenquimáticas y epidérmicas poseen una pared primaria consistente en un estrato denso que forma los trígonos, bordeado por una casi inconspicua banda fibrilar (fig. 9 A). Su grosor es de 0,3 μm en la periferia, y se reduce a una línea muy delgada en el interior.

La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, relativamente densa a los electrones. Con frecuencia aparece subdividida en bandas paralelas. Ocasionalmente está delimitada al interior por una línea más opaca (fig. 9 A). Su grosor, muy uniforme para cada célula, es de 0,8 μm en la epidermis, y se reduce gradualmente hasta 0,2 en el parénquima interno.

Las células se comunican por algunos plasmodesmos sueltos, pero más frecuentemente se agrupan en campos de punteaduras primarias, que son más abundantes en las paredes transversales del parénquima. La presencia de estos campos causa un adelgazamiento muy gradual de la pared, hasta alcanzar 0,6 μm.

La transición entre la epidermis y el parénquima es relativamente brusca (fig. 9 B).

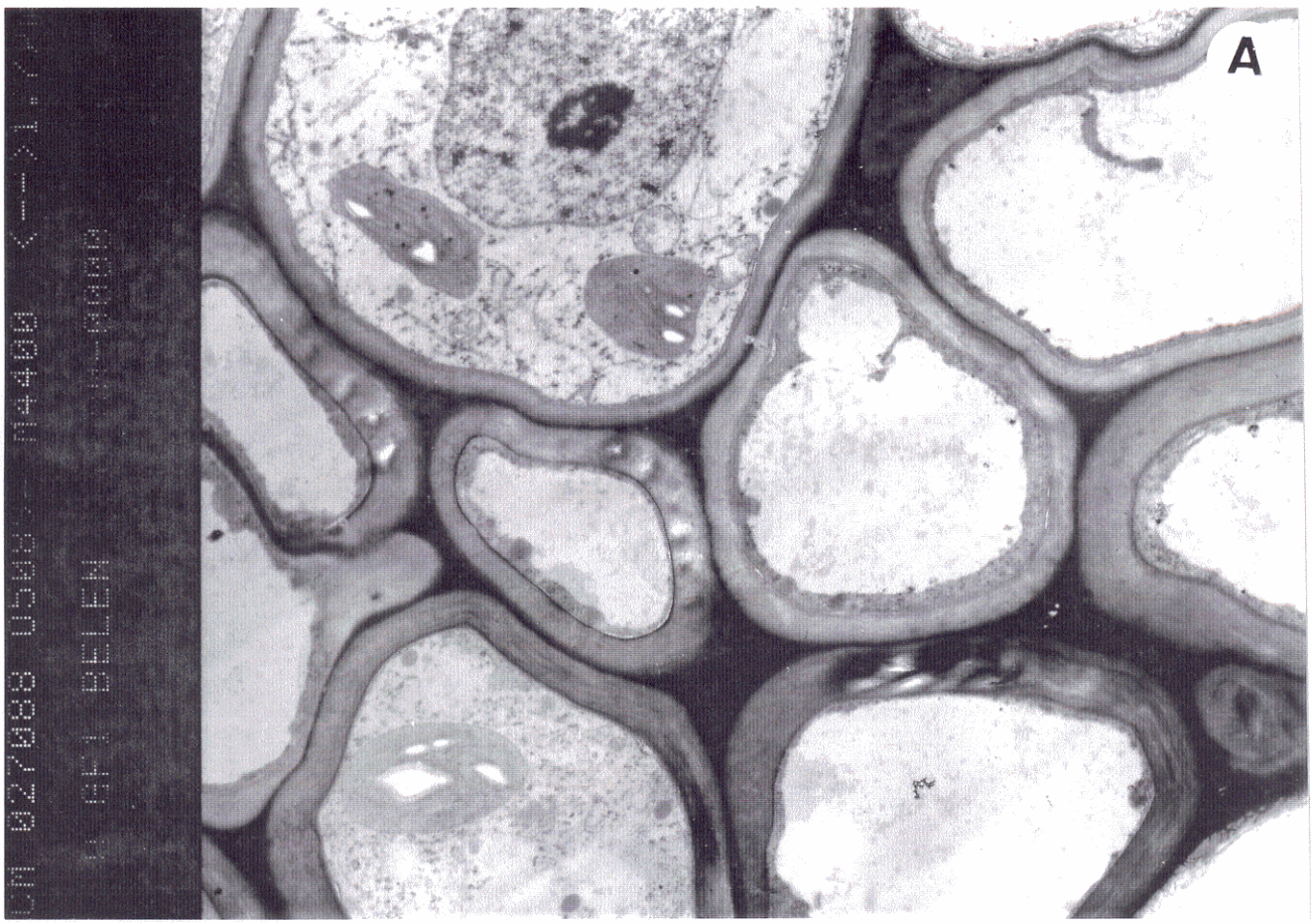
Los hidroides presentan trígonos con aspecto laxo, frecuentemente perforados, bordeados por una pared secundaria relativamente opaca de estructura fibrilar muy laxa. En los lados, de 0,1 μm de grosor, se mantiene la lámina media. En las paredes de los hidroides adyacentes al parénquima interno se conserva la estructura del estrato primario.

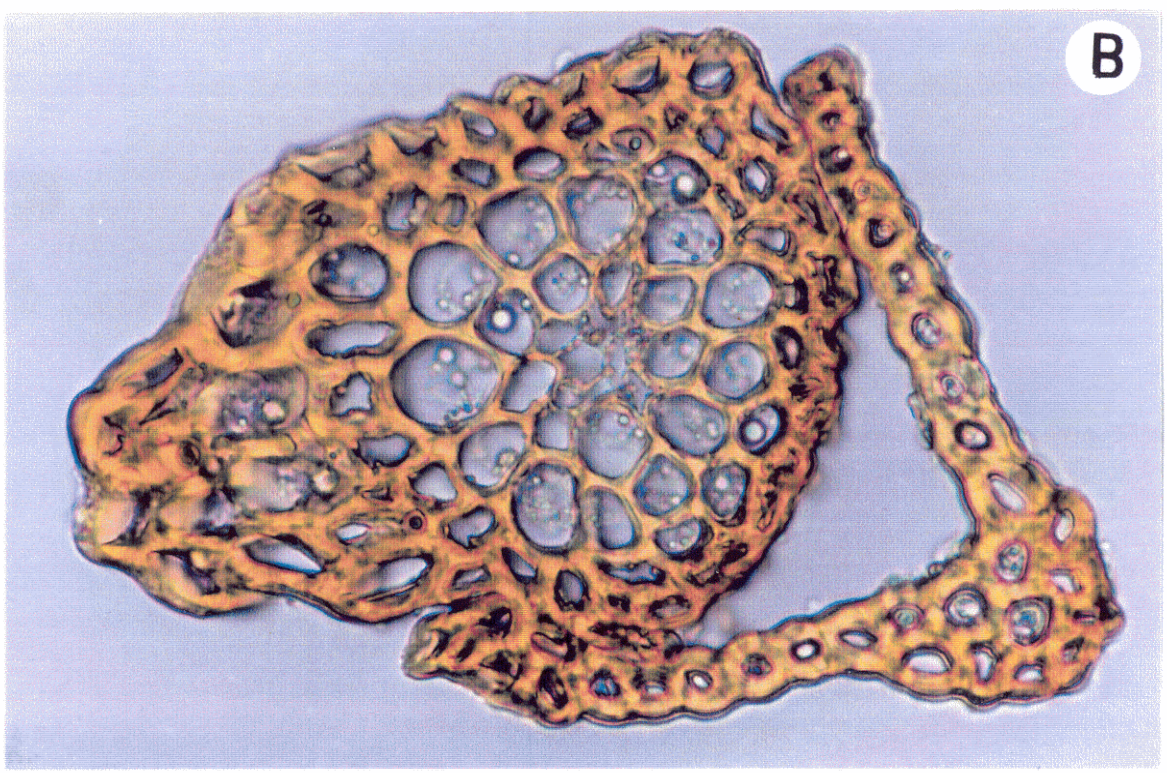
El citoplasma contiene cloroplastos de 2-4 μm, mitocondrias, núcleo con nucléolo, retículo endoplasmático, etc. Hacia la periferia tiende a degenerarse, y aparece vacuolizado. Los acúmulos de lípidos son muy abundantes, incluso en los hidroides.

No se han observado señales de invasión de microorganismos.

Fig. 9. A: Corte transversal de caulidio medio de *Gr. torquata*, epidermis y parénquima externo, a MET. **B**: Corte transversal de caulidio de *Gr. torquata* (nivel medio), sin teñir, 850×.

Fig. 9





Hacia la base el diámetro del caulidio se reduce a 75 µm, se desorganiza el citoplasma, especialmente en la periferia, aunque se mantienen los acúmulos lipídicos. Se desestructura la pared de los hidroides, aumentando las perforaciones, y llegando a colapsar por completo la traza. En la pared secundaria de la epidermis del parénquima se desarrollan más frecuentemente las bandas paralelas, así como un segundo estrato de estructura laxamente reticular. Desaparece la cutícula, y en las células periféricas se observan microorganismos en el lumen celular y en las paredes. El caulidio está circundado por una espesa vaina (hasta 70 µm de grosor) de tejido degenerado, con abundantes microorganismos, que en estado hidratado le da al caulidio una textura gelatinosa.

La reacción para la celulosa se produce con intensidad muy débil. Se detectan sustancias fenólicas en la periferia, y la pectina se localiza abundantemente en todas las paredes. Éstas, de color natural amarillo-ocre, enrojecen fuertemente en disoluciones básicas y se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado. Los acúmulos lipídicos son predominantemente ácidos o neutros.

YEMAS

Son de forma irregular, de aproximadamente 75 µm, compuestas por 20-30 células. Su pared consta sólo de un estrato primario, de estructura fibrilar-reticular, con un grosor de hasta 3 µm fig. 10 A). En su periferia se localiza una cubierta lipofílica de espesor irregular.

Se comportan de igual manera que el caulidio en las pruebas histoquímicas, excepto en que resisten hasta 24 horas en ácido sulfúrico concentrado, antes de desorganizarse.

FILIDIO

. Nivel basal: el nervio consta de dos células adaxiales muy poco diferenciadas, de una capa abaxial de 5-6 células, y de 1-2 células centrales, todas ellas de aspecto parenquimático. El limbo tiene una anchura de 8-11 células de paredes externas convexas, con el margen unido a la epidermis del caulidio.

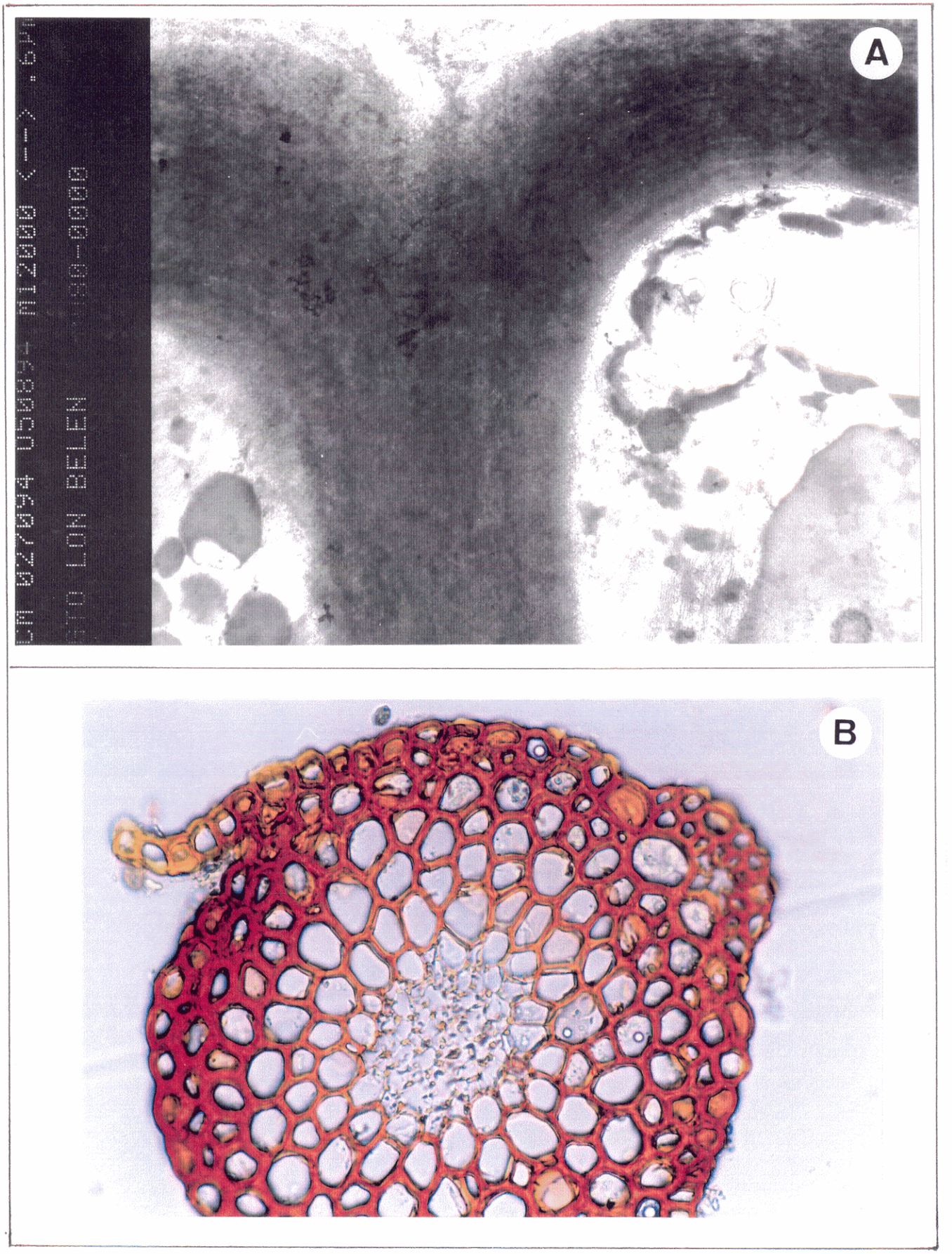
. Nivel medio: el nervio consta de dos células adaxiales (a veces una sola), de aspecto semejante al de las estereidas, y de dos estratos abaxiales de 3-4 estereidas, de las que las externas son a menudo protuberantes e irregulares. El contorno del nervio es a veces crenulado, con escaso resalte en el envés del filidio, y otras extremadamente irregular. El limbo tiene una anchura de 10-15 células, con el margen uniestrato, plano o ligeramente recurvado, con células de paredes externas convexas.

. Nivel apical: el nervio se compone únicamente de 3-5 células, similares entre sí, algo más engrosadas que el resto. El limbo es siempre uniestrato, con margen plano.

No se observan papilas propiamente dichas, pero prórulas en las uniones entre dos células.

Fig. 10. A: Corte de yema de *Gr. torquata*, a MET. **B**: Corte transversal de caulidio apical de *Gr. trichophylla*, reacción con potasa, 600×.

Fig. 10



La punta pilífera se presenta con escasa frecuencia, es lisa y no decurrente. En corte transversal presenta un máximo de 5-7 fibras.

Con respecto a la luz polarizada, la base del filidio, el nervio completo y el pelo registran la máxima actividad.

Gr. trichophylla

CAULIDIO

Diámetro de 150-200 μm.

La epidermis presenta 1-3 estratos de células de 20-30 μm en su dimensión longitudinal, e isodiamétricas o un poco alargadas tangencialmente, con diámetro de 10-15 μm, en sección transversal (fig. 10 B).

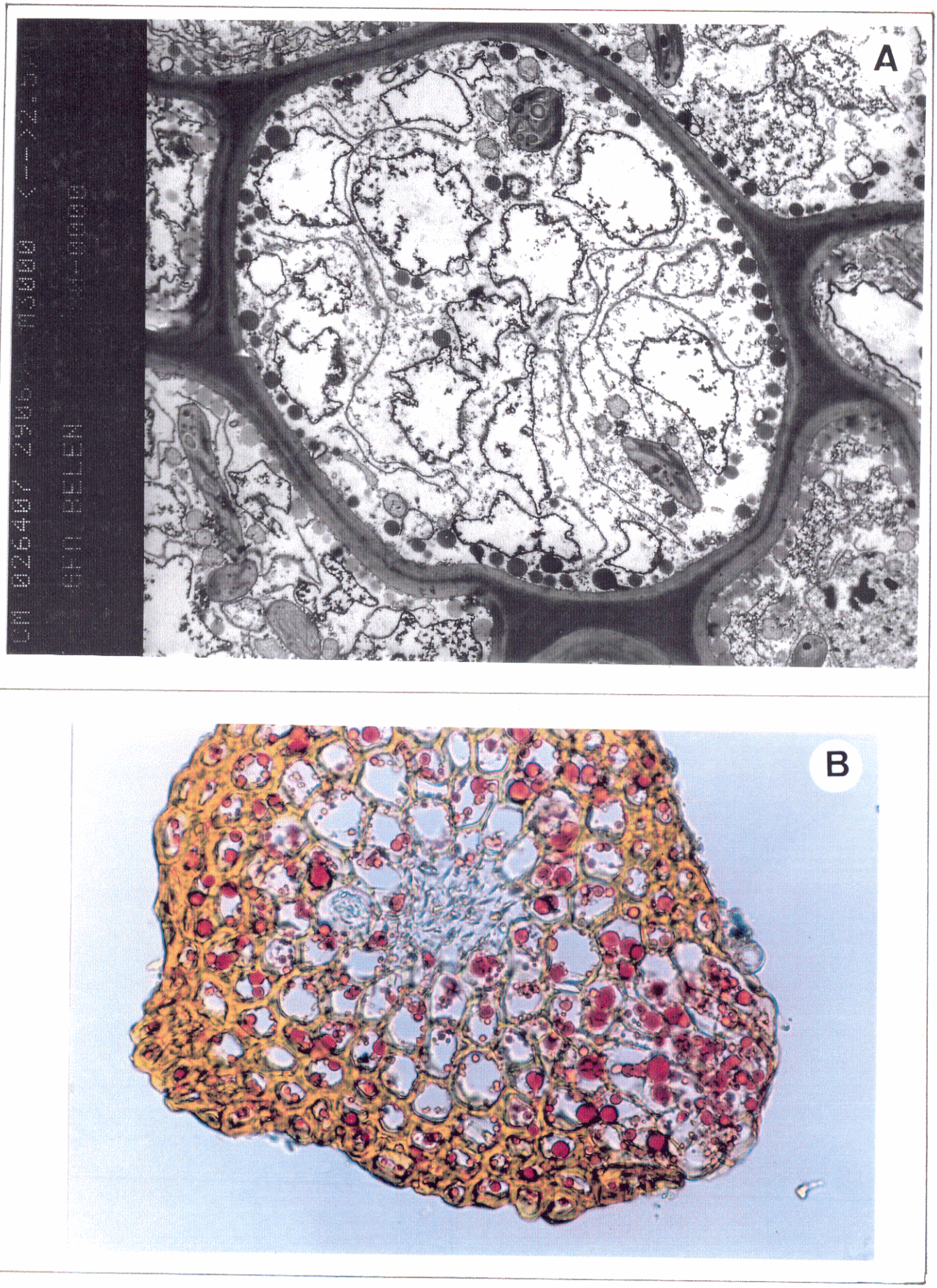
El parénquima está formado por 2-4 estratos de células de 30-40 μm en su dimensión longitudinal, isodiamétricas en sección transversal, con diámetro de 15-25 μm, donde los máximos valores corresponden a las más internas (fig. 10 B).

La traza de hidroides es de contorno regular y consta de 20-25 células de 5-10 μm de diámetro en sección transversal (fig. 10 B).

En la epidermis y el parénquima, la pared celular primaria aparece uniestrata, u ocasionalmente, en la epidermis, bordeada por una banda difusa. Su grosor es de 0,6 μm en la periferia, y se constriñe a una línea hacia el interior (fig. 10 A). No forma una corona externa diferenciada, salvo en el arco correspondiente a la diferenciación de un filidio.

Fig. 11. A: Corte transversal de caulidio de *Gr. trichophylla*, a MET. Se observan figuras de degradación citoplasmática. **B**: Corte transversal de caulidio apical de *Gr. trichophylla*. Test de detección de lípidos (Sudán III), 600×.

Fig. 11



La pared secundaria es uniestrata, densamente fibrilar, subdividida en 2-3 bandas con variable separación. A veces, sobre todo en la periferia, se diferencia un estrato interno laxamente reticulado. Su grosor, constante para una misma célula, es de 1,5 μm en la epidermis, y se reduce hacia el interior hasta 0,3 μm (fig. 11 A).

Se observan algunos plasmodesmos aislados, pero en su mayor parte se agrupan en campos de punteaduras primarias, que aparecen preferentemente en las paredes transversales, y que causan un adelgazamiento gradual de la pared hasta alcanzar 0,5-0,6 μm.

La delimitación entre la epidermis y el parénquima es clara (fig. 10 B).

Los hidroides presentan trígonos de estructura amorfa, bordeados por una pared secundaria muy fina y laxa. Los lados, con un grosor de 0,2-0,3 μm, son poco densos a los electrones, homogéneamente fibrilares, laxos, sin que se distinga estratificación o restos de lámina media. En la pared adyacente al parénquima interno se mantiene la estructura de la pared primaria.

En el citoplasma aparecen abundantes cloroplastos de hasta 5 μm de longitud, mitocondrias y abundantes lípidos, pero el retículo endoplasmático forma guirnaldas concéntricas y se aprecia un alto grado de vacuolización (fig. 11 A). No se han observado señales de invasión de microorganismos.

Hacia la base el diámetro se reduce a 100 μm, desaparece la organización citoplasmática, aunque permanecen los acúmulos lipídicos (fig. 11 B); se degrada la traza de hidroides, a menudo dejando en su lugar una laguna central. Se engruesa la pared secundaria epidérmica hasta alcanzar 3 μm, y tiende a desestructurarse. Desaparece la cutícula, y se observan abundantes microorganismos en los tejidos del caulidio. No se aprecia la presencia de una vaina de tejido degenerado alrededor del caulidio.

En cuanto a las reacciones histoquímicas, se detecta con intensidad la presencia de sustancias fenólicas (especialmente en la periferia), de pectinas y de celulosa. Las paredes, de color natural ocre-amarillo, enrojecen fuertemente en disoluciones básicas y se disuelven rápidamente en ácido sulfúrico concentrado. Predominan los acúmulos lipídicos ácidos o las mezclas de neutros y ácidos.

YEMAS

Son globulares, de 3-6 células, de 30-50 µm de diámetro. Sus paredes presentan sólo el estrato primario, que es reticular-fibrilar, con un grosor de 2-3 µm; y están rodeadas externamente por una vaina lipofílica irregular.

Su comportamiento es igual que el de caulidio en las reacciones histoquímicas, salvo en su mayor resistencia en ácido sulfúrico concentrado (hasta 24 horas).

FILIDIO

. Nivel basal: el nervio se compone de dos células-guía adaxiales, de dos estratos de 6-7 estereidas cada uno, y de 1-2 células centrales de paredes muy finas, semejantes a hidroides. El limbo tiene una anchura de 15 células, que son leptodermas, alargadas en sentido lateral, con las paredes externas convexas. El margen es uniestrato y plano o levemente recurvado.

. Nivel medio: el nervio consta de cuatro células-guía adaxiales, de dos estratos de estereidas abaxiales y de 3-4 células semejantes a hidroides. Su contorno es laxamente trilobulado, y resalta medianamente del envés del filidio. El limbo posee 30 células de anchura, de paredes externas convexas, con margen uniestrato o biestrato, a menudo asimétricamente recurvado.

. Nivel apical: el nervio presenta 3 ó 4 estratos de células parenquimáticas, semejantes a las del limbo. Éste es irregularmente biestrato o triestrato, pudiendo alcanzar cuatro estratos en el margen.

No se han observado papilas ni relieves similares.

La punta pilífera es algo decurrente, lisa o denticulada, compuesta por un máximo de 30 fibras en corte transversal.

Ante la luz polarizada, la máxima actividad es registrada por la base del filidio, el tercio basal del nervio y el pelo.

ANATOMÍA: DISCUSIÓN

Gametófito

En el caulidio y en el filidio aparece una cutícula periférica (fig. 2 B). Esta presencia está descrita como común, pero no general en musgos (Hébant 1977).

Destaca en el filidio, cuando es biestrato, la disposición enfrentada de las células del limbo en contraste con la tendencia a situarse alternadas en el caulidio.

En la ultraestructura del filidio destaca la importancia del estrato primario de la pared (fig. 2 B), que además forma una corona engrosada en la superficie periférica. En las yemas, presentes en tres especies, tan sólo se observa este estrato de la pared (fig. 10 A), aparte de la envuelta periférica irregular que las rodea.

La organización de las paredes celulares de los distintos tejidos del caulidio es básicamente similar en todas las especies. La epidermis y el parénquima no muestran clara diferenciación en función de la ultraestructura de la pared (fig. 9 A). El estrato secundario tiende en ambos tejidos a formar bandas, especialmente en la parte basal del caulidio, que reflejan tal vez distintos ritmos de síntesis de material de pared. Tan sólo se destaca el menor grosor de este estrato y la constricción del primario hacia el interior del caulidio, procesos ambos que son graduales.

El tamaño, aunque es menor en las células epidérmicas, presenta solapamientos en su variabilidad con el de las células parenquimáticas, lo que impide considerarlo por sí solo como carácter distintivo.

Ambas características, en su conjunto, sí permiten en algunas especies una distinción más o menos clara, con *Gr. hartmanii* como caso más destacado (fig. 3 B), donde los engrosamientos llegan a obliterar por completo el lumen de las células epidérmicas.

Una modificación de la pared celular, no exclusiva del parénquima, pero más frecuente en este tejido, es la aparición de campos de punteaduras primarias (figs. 2 A, 5 A), que permiten considerarlo, al menos en su porción apical, como un parénquima conductor. Aunque su presencia concuerda con la afirmación de Hébant (1977) sobre su situación cercana al ápice en caulidios fructificados de musgos en general, lo cierto es que los estudios conocidos hasta ahora se basan en musgos mesofíticos (Finocchio 1967, Caputo & Castaldo 1968, Cortella et al. 1994), e incluso Bewley (1979) recoge la aserción (aunque indica que no está comprobada de manera general) de que en musgos xerofíticos están ausentes incluso los simples plasmodesmos aislados. La abundancia de campos de punteaduras en estas especies xerofíticas contradice esta apreciación.

Para definir el campo de punteaduras primarias se ha tenido en cuenta no sólo la constricción que originan en la pared sino, asimismo, el cambio de estructura que ésta presenta en dicha región. Aunque en los manuales de anatomía no se recoge esta condición como característica especializada, se ha observado generalizada en las especies aquí estudiadas que la presentan, y se ha desmostrado, con microscopía electrónica de barrido y de transmisión, para *Hookeria lucens* (Cortella et al. 1994).

La morfología y abundancia de los campos de punteaduras primarias varía de unas especies a otras. Como tendencia general, representan una constricción gradual, más abundante en las paredes transversales del parénquima, por lo que se observan mejor en cortes longitudinales. Frente a esto, destacan *Gr. elatior*, que presenta campos de punteaduras muy numerosos, tanto en paredes transversales como en longitudinales, que producen un estrechamiento de la pared extremadamente brusco; *Gr. funalis* y *Gr. torquata*, por la constricción de la pared muy gradual; y *Gr. retracta*, donde las perforaciones, preferentemente situadas en la pared transversal, no se agrupan en campos de punteaduras, en el sentido indicado.

El posible uso taxonómico que sugieren estas diferencias en la morfología y abundancia de estas estructuras requiere de un estudio más extenso sobre su presencia en otras poblaciones y taxones.

Con relación a los hidroides, en éstos se muestra en los tabiques la desorganización de su pared, que queda reducida a una estructura laxamente fibrilar, sin estratificación diferenciada (figs. 3 A, 7 A). Los trígonos aparecen también degradados en su periferia, y hacia niveles basales pueden degenerar por completo, quedando la traza de hidroides sustituida por células parenquimáticas o por una laguna central. Se subraya la relativa preservación de la pared en el estrato más externo del hidroma. Dado que el parénquima adyacente no muestra los signos de degradación de las células de la traza, que es endógena (Hébant 1967, 1974), es posible que, si su protección se debe a una inhibición de las enzimas hidrolíticas responsables de la degeneración citoplasmática y parietal, los factores responsables puedan difundir asimismo a la pared de los hidroides contiguos. En los trígonos destaca la aparición de áreas con perforaciones en *Gr. torquata, Gr. incurva* y *Gr. funalis* (fig. 3 A), que a menudo aparecen más opacos, o bien plegados. Aunque no puede descartarse que sean artefactos causados por la precipitación del tetróxido de osmio, del citrato de plomo o del acetato de uranilo, es extraña su alta regularidad en los hidroides de dichas especies, así como su ausencia en otras áreas de la sección y en otros taxones. Si este carácter se debe a un mayor grado de degeneración de la pared, o bien tiene una base taxonómica (las tres especies están relacionadas según Hagen 1909), es algo que debe ser investigado con mayor profundidad .

Se destaca la baja actividad celular apreciada en los ápices de los caulidios de *Gr. decipiens, Gr. elatior, Gr. funalis, Gr. hartmanii, Gr. incurva* y *Gr. retracta*, frente a la organización citoplasmática observada en *Gr. orbicularis, Gr. pulvinata, Gr. torquata* y *Gr. trichophylla*. Aunque la pérdida de actividad celular es más o menos general en todas hacia partes basales, parecen subsistir células en las especies con mayor organización citoplasmática apical. Las diferencias pueden deberse a un distinto ritmo de maduración de las células recién diferenciadas, aunque debe considerarse la posible incidencia de factores debidos a la fijación o a la conservación de las muestras desde su recolección. Aunque no se ha investigado en profundidad, se apunta una relación entre la actividad celular en el caulidio y la capacidad de producción de ramificaciones basales, aparentemente mayor en las cuatro últimas especies.

Independientemente de la complejidad estructural máxima del caulidio de cada espcie, en todas se registra, hacia niveles basales, una reducción del diámetro (por colapso o erosión de capas celulares) y una simplificación anatómica, en la diferenciación de la epidermis o de la traza de hidroides (fig. 3 B). Se observa asimismo una tendencia a la ruptura y degradación de las paredes celulares. Esto puede explicarse si la diferenciación estructural está al servicio de la vitalidad del ápice, donde se encuentra la célula apical trilátera responsable del crecimiento.

En los especímenes observados, esta degradación, e incluso la eventual invasión de micoorganismos no parece afectar al ejemplar, aparentemente en buen estado. Se subraya la permanencia de este tejido degenerado en forma de una vaina que circunda el caulidio de *Gr. elatior, Gr. funalis, Gr. hartmanii, Gr. retracta* y *Gr. torquata*. Dado el aspecto gelatinoso que presenta en estado hidratado, puede interpretarse como una estrategia de regulación del agua en las bases, o una fuente de nutrientes por los posibles solutos liberados en el proceso de descomposición.

Se ha observado frecuentemente la presencia de microorganismos unicelulares eucariontes (tipo levaduras) y procariontes (con pared, posiblemente bacterias, y sin ella, tal vez micoplasmas). Se encuentran especialmente en los tejidos periféricos, donde se ven túneles que los comunican con el exterior. La invasión de microorganismos parece relacionada con la actividad celular. No se da, ni siquiera ocasionalmente, en ápices con células activas, ni se encuentra siempre en los tejidos muertos, y cuando aparece no suele ser masiva (aunque en las bases, donde a veces degenera la cutícula, puede ser muy avanzada), lo que sugiere que no son directamente causantes de la muerte celular, sino saprófitos oportunistas.

En cuanto a las diferencias estructurales entre las distintas especies, la mayor variabilidad se encuentra en la distinción más o menos clara de la epidermis y en el desarrollo de la traza vascular.

Se destaca en el siguiente cuadro la correspondencia entre los datos, sobre la anatomía del caulidio, del estudio más exhaustivo realizado en el género *Grimmia* (Kawai 1965), y los aquí obtenidos (excepto en *Gr. retracta*, no estudiada por este autor).

	Distinción de la epidermis		Distinción de la traza		número de hidroides	
	*	**	*	**	*	**
Gr. decipiens	clara	clara	clara	clara	> 15	25-30
Gr. elatior	clara	clara	no clara	clara	?	fértiles: 50 estériles: -
Gr. funalis	clara	no clara	clara	clara	< 15	fértiles: > 20 estériles: 8-15
Gr. hartmanii	clara	clara	clara	-	< 15	-
Gr. incurva	clara	clara	no clara	clara	?	6-10
Gr. orbicularis	clara	no clara	clara	clara	< 15	> 40
Gr. pulvinata	clara	no clara	clara	clara	< 15	30
Gr. torquata	clara	clara	no clara	clara	?	6-10
Gr. trichophylla	clara	clara	clara	clara	ssp. lisae: < 15 var. robusta: > 15	20-25

*: observaciones de Kawai (1965)

**: observaciones del presente trabajo

Se han sombreado las casillas donde no concuerdan los datos obtenidos

Se oberva un cierto desacuerdo respecto a ambos caracteres. En cuanto a la epidermis, su diferenciación con respecto al parénquima, no es nunca tajante (salvo para *Gr. hartmanii*), dada la forma y tamaño, tan sólo levemente diferente, de sus células, y la disminución gradual del grosor de las paredes. Estas características, que no consiguen por separado una distinción cualitativa de ambos tejidos, pueden verse sometidas a una variación interpoblacional que explique estas discrepancias.

No ocurre lo mismo, sin embargo, con la traza de hidroides. En *Gr. incurva* y *Gr. torquata*, donde para Kawai (1965) la diferenciación de la traza no es clara, la distinta estructura de sus paredes permite siempre una delimitación nítida (aunque el desarrollo de este tejido sea pobre), incluso frente al parénquima cuyas células aparecen vacías. En *Schistidium apocarpum* este autor recoge observaciones sobre la presencia de hidroma en caulidios fértiles y la ausencia en los estériles. En sus propias investigaciones, incluidas en el citado trabajo, llega a la conclusión de que los estériles poseen una traza de hidroides, aunque oscuramente diferenciados. Esta situación se planteó con *Gr. elatior*, donde siempre se ha apreciado la total ausencia de hidroma en caulidios estériles, y su presencia en los fértiles, sin que se haya observado la existencia de células intermedias que puedan causar una interpretación dudosa.

La resolución del microscopio óptico, con el que trabajó Kawai, impide esta diferenciación, e incluso la determinación exacta del número de hidroides presentes en una sección, carácter en el que también aparecen divergencias (aunque puede estar sometido a mayor variabilidad intraespecífica, y deberse a las distintas poblaciones o subespecies utilizadas).

El caso de *Gr. hartmanii*, en la que Kawai (1965) observa distintamente una traza, no puede ser explicado por las razones anteriores. Un estudio posterior sobre varias poblaciones de *Gr. hartmanii* (Vitikainen 1969), confirma la ausencia total de hidroma, lo que le sirve al autor para apoyar la separación de *Gr. anomala*, con traza presente, como especie independiente. Se desconoce si Kawai empleó en su estudio poblaciones de *Gr. anomala* o *Gr. retracta*, ambas consideradas por muchos autores, incluyendo Wijk et al. (1959-1969) y Crosby et al. (1992), como subespecies de *Gr. hartmanii*.

En cuanto a los datos obtenidos por Deguchi (1978) para *Gr. funalis, Gr. incurva* y *Gr. trichophylla*; y Cao & Vitt (1986) para *Gr. pulvinata, Gr. decipiens, Gr. incurva* y *Gr. elatior*, en ambos casos consistentes en un dibujo de una sección transversal con un comentario referido exclusivamente al grado de desarrollo de la traza, están fundamentalmente de acuerdo con las observaciones aquí registradas.

Con respecto a estas observaciones, es preciso tener en cuenta que, en dos especies, los ejemplares estériles presentan una traza menos desarrollada que los fértiles (*Gr. funalis*) o ausente por completo (*Gr. elatior*, fig. 1 B). Por tanto, los hidromas relativamente pobres de *Gr. incurva* (fig. 5 B) y *Gr. torquata* (fig. 9 B) pueden deberse a la esterilidad de los caulidios en que aparecen.

Con las salvedades expuestas en cuanto a la diferenciación de epidermis, pueden distinguirse los siguientes tipos de caulidios. Los números romanos corresponden al número de tejidos presentes, según una tipificación posterior de Kawai (1989).

A. Diferenciación relativamente clara de los tres tejidos (III), traza desarrollada:

Gr. decipiens (diámetro relativamente grande)
Gr. retracta (diámetro relativamente grande)
Gr. trichophylla (diámetro mediano)
Gr. elatior (caulidios fértiles, diámetro mediano)

B. Diferenciación relativamente clara de la epidermis, traza reducida:

Gr. incurva (diámetro mediano): III

Gr. hartmanii (diámetro relativamente grande, sin traza): II

Gr. torquata (diámetro relativamente pequeño): III

Gr. elatior (caulidios estériles, diámetro mediano): II

C. Diferenciación escasa de la epidermis, traza desarrollada (III?):

Gr. orbicularis (diámetro mediano)

Gr. pulvinata (diámetro mediano)

D. Diferenciación escasa de la epidermis, traza reducida (III?):

Gr. funalis (diámetro relativamente pequeño)

En general, el diámetro se relaciona con la robustez del aspecto de la planta, salvo en *Gr. elatior*, donde este aspecto se debe a la densa imbricación de filidios.

La complejidad estructural permite agrupar especies consideradas próximas, como *Gr. orbicularis* y *Gr. pulvinata*, o *Gr. incurva* y *Gr. torquata* (Hagen 1909). Algunos autores la consideran como una medida del grado de evolución o primitivismo del vegetal, pero su valor sistemático es dudoso por la posible variabilidad intraespecífica, tal vez inducida por las condiciones ambientales.

Las reacciones histoquímicas en el caulidio demuestran la abundancia de sustancias pécticas (fig. 4 A) y, en la periferia, de fenoles. De forma general, las paredes enrojecen en medios alcalinos (figs. 3 C, 10 B), lo que sugiere la presencia de compuestos ácidos. El test para la presencia de celulosa permite una diferenciación de los dos estratos de la pared, al menos en los estratos externos. Se demuestra que los lípidos constituyen las principales sustancias ergásticas (fig. 11B), y, aunque el azul de Nilo muestra variabilidad en cuanto a la proporción de lípidos ácidos y neutros, parece deberse, al menos en parte, a la fenología de la planta, al dar resultado distinto en caulidios desarrollados y en inicios de ramificaciones.

En cuanto al filidio, en el siguiente cuadro se reúnen las principales características observadas por Kawai (1965) en relación con las aquí registradas (excepto en *Gr. retracta*, no estudiada por este autor).

	nº de células adaxiales		diferenciación de tejidos del nervio		biestratificación		punta pilífera	
	*	**	*	**	*	**	*	**
Gr. decipiens	6-7	4	clara	clara	limbo	irregular, limbo y margen	dentada	dentada
Gr. elatior	2	2 + 4-6	media	media	limbo y margen, irregular	irregular, limbo y margen	sin punta	dentada
Gr. funalis	2 (var. *calvescens*: 5)	2	no clara a media	media	limbo y margen	limbo y margen	dentada, o sin punta	dentada
Gr. hartmanii	4	6	media	clara	margen	margen	sin punta	dentada
Gr. incurva	2	2	no clara	clara	margen	limbo y margen	sin punta	corta
Gr. orbicularis	var. *persica*: 2	2	media	media	no	extremo apical, limbo y margen	lisa	lisa
Gr. pulvinata	2	2	media	media	margen	margen	lisa	lisa
Gr. torquata	2	2	no clara	media	no	no	sin punta	muy corta
Gr. trichophylla	2 (var. *robusta*: 6)	2	media (clara)	clara	margen	limbo y margen	lisa (sin punta)	lisa

*: observaciones de Kawai (1965)

**: observaciones del presente trabajo

Se han sombreado las casillas donde no concuerdan los datos obtenidos.

Se observan abundantes discordancias en cuanto a la presencia de una punta pilífera, la tendencia a la biestratificación del limbo, y a la distinción de los estratos.

La primera característica, según los autores de las diversas descripciones aquí recogidas es relativamente variable. Las especies que Kawai describe como carentes de pelo se han observado en esta tesis con una punta, aunque muy corta. De esto no puede derivarse una gran discrepancia.

La tendencia a la biestratificación del limbo observada es muy a menudo irregular, por lo que no cabe esperar una gran constancia taxonómica.

La distinción de los tejidos, en tanto que Kawai no define los tipos celulares que encuentra, es meramente subjetiva. La aquí presentada es asimismo una valoración personal sobre el grado de diferenciación, que no necesariamente sigue el criterio de Kawai.

En cuanto al número de células adaxiales en el nervio, el desacuerdo es relativamente pequeño, teniendo en cuenta la fundamental coincidencia en si es dos o superior a dos. En el caso de *Gr. hartmanii*, además, como se ha expuesto para el caulidio, Kawai podría haber estudiado otra especie. En el de *Gr. elatior*, aquí se han añadido las células no estrictamente adaxiales, pero sí diferenciadas igual que éstas. Este carácter, por tanto, presenta relativa estabilidad, y como considera Kawai (1965), puede ser importante taxonómicamente.

En función de la variabilidad de los caracteres del filidio estudiados, las especies pueden dividirse en los siguientes grupos (se reseñan los otros tipos celulares presentes en el nervio, así como los relieves de las células y la tendencia a la biestratificación del limbo):

- dos capas de células-guía adaxiales en el nervio: (estereidas; alta papilosidad; bi- o triestratificación apical).

Gr. elatior

- una capa de células-guía adaxiales en el nervio:

. más de dos células-guía (estereidas; sin relieves; tendencia a limbo uniestrato):

Gr. decipiens
Gr. hartmanii
Gr. retracta

. dos células-guía:

(estereidas)

Gr. torquata (prórulas; limbo uniestrato)
Gr. incurva (sin relieves; biestratificación irregular)

(estereidas y células leptodermas)

Gr. orbicularis (prórulas; biestratificación apical)
Gr. pulvinata (sin relieves; biestratificación marginal)
Gr. trichophylla (sin relieves; biestratificación irregular)
Gr. funalis (sin relieves; biestratificación irregular)

La arquitectura del filidio, ante la luz polarizada, revela principalmente refuerzos en la base del nervio y en la punta pilífera (ocasionalmente en la inserción del filidio). Con menos intensidad aparece en el resto del nervio y en el margen.

El pelo, de naturaleza fundamentalmente celulósica, tiene un significado primordialmente ecológico, como Kawai (1965) demostró en esta familia estudiando poblaciones de *Schistidium apocarpum*, procedentes de distintos ambientes hídricos.

Las reacciones histoquímicas dan clara presencia de pectinas (excepto en *Gr. funalis*), diferenciación de los dos estratos de la pared en cuanto a la detección de celulosa, una fuerte presencia de sustancias fenólicas (fig. 8 B) y una reacción en medios alcalinos diferente a la de los caulidios. La detección de almidón produce un oscurecimiento indefinido de la mitad apical del filidio (en correspondencia con su mayor riqueza en cloroplastos y tendencia a la biestratificación) y del nervio (lo que refleja probablemente su función conductora de polisacáridos solubles).

ABRIR RESULTADOS - ANATOMÍA **(CONTINUACIÓN)**