

**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**ESTUDIO ANATÓMICO
Y CROMOSOMÁTICO
DE PLANTAS
IBÉRICAS DE INTERÉS:
Ephedra distachya L. subsp.
distachya y
Cerastium dubium
(Bast.) Guépin**

**Tamara Sánchez Gómez
Trabajo de Fin de Grado
Grado en Ciencias Ambientales**

Salamanca 2016



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**ESTUDIO ANATÓMICO Y CROMOSOMÁTICO
DE PLANTAS IBÉRICAS DE INTERÉS:
Ephedra distachya L. subsp. *distachya* y
Cerastium dubium
(Bast.) Guépin**

**Tamara Sánchez Gómez
Grado en Ciencias Ambientales
Salamanca 2016**

**Tutora del trabajo: Dra. Luz María Muñoz Centeno (Departamento de
Botánica. Universidad de Salamanca)**

**Cotutor del trabajo: Dr. Luis Delgado Sánchez (Departamento de
Botánica. Universidad de Salamanca)**

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	4
2.	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS	5
	2.1.- <i>Ephedra distachya</i> L. subsp. <i>distachya</i>	5
	2.2.- <i>Cerastium dubium</i> (Bast.) Guépin	11
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
	3.1.- Recolección del material biológico	18
	3.2.- Procedimientos y materiales utilizados	19
	3.2.1.- Técnica histológica	19
	3.2.2.- Estudio cariológico	27
	3.2.3.- Pliegos de herbario	31
4.	RESULTADOS	32
	4.1.- Histología	32
	4.1.1.- Descripción de los tejidos del tallo.....	32
	4.1.2.- Descripción de los tejidos de la raíz	34
	4.1.3.- Descripción de los tejidos de la hoja (escama)	35
	4.2.- Cariología	41
5.	CONCLUSIONES	43
6.	BIBLIOGRAFÍA	44
	6.1.- Listado de documentos.....	44
	6.2.- Listado de páginas webs y bases de datos.....	45

1. INTRODUCCIÓN

El presente estudio micromorfológico, anatómico y cromosómico está basado en dos especies vegetales incluidas en el Anexo III (De Atención Preferente) del Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León. Dicho catálogo se crea, junto a la figura de protección denominada Microrreserva de Flora, tras la publicación en 2007 del DECRETO 63/2007, de 14 de junio, con el objetivo principal de preservar la biodiversidad y los recursos genéticos vegetales.

Las especies estudiadas son *Ephedra distachya* L. subsp. *distachya* (*Ephedraceae*) y *Cerastium dubium* (Bast.) Guépin (*Caryophyllaceae*). Se lleva a cabo el estudio histológico y micromorfológico de *Ephedra distachya* subsp. *distachya*, y el cromosómico de *Cerastium dubium*.

El género *Ephedra* L. se encuentra dentro del grupo de las Gimnospermas y está compuesto por arbustos o subarbustos de ramas verdes, opuestas o pseudoverticiladas, articuladas o no. Todas las especies dentro de él tienen las hojas reducidas a escamas, soldadas en la base, y verdosas o de color castaño. Presentan conos axilares, generalmente agrupados en brácteas membranáceas libres, y sacos polínicos 2(3)-loculares, dehiscentes por hendidura transversal apical, reunidos en grupos de (2)4-8, sobre un pedículo, simulando un estambre; rudimentos seminales con el tegumento prolongado apicalmente en forma de tubo delgado (túbulo) y rodeados de pares de brácteas concrecentes. Pseudofruto (“sincarpo”) globoso u oblongo, con 1-2 semillas cubiertas por 2-3(4) pares de brácteas imbricadas rojas o amarillentas y carnosas en la madurez. (Amaral Franco, 1986).

Muchas de las especies del género *Ephedra* tienen aplicaciones en medicina. De ellas se obtiene el alcaloide efedrina, con propiedades antiasmáticas, antitusígenas e hipertensoras.

Se decide realizar el estudio histológico de *Ephedra distachya* L. subsp. *distachya* debido a que no existe ninguno previo elaborado en nuestro país.

El género *Cerastium* L. se encuentra dentro del grupo de las Angiospermas y está compuesto por hierbas anuales o perennes, en ocasiones bienales, a menudo pelosas. Presentan hojas opuestas, sésiles o subsésiles, de lineares a suborbiculares, sin estípulas. Flores pentámeras, a veces tetrámeras, hipóginas, en cimas dicótomas, a veces solitarias, con brácteas foliáceas -pelosas por ambas caras u sin margen escarioso- o sepaloideas – glabras por el haz, con o sin margen escarioso-. Sépalos libres. Pétalos bífidos o emarginados, raramente enteros, blancos, a veces inexistentes. Estambres 5-10, muy raramente menos. Estilos 5(3,4,6). Cápsula en general netamente mayor que el cáliz, ± cilíndrica, dehiscente en el ápice por dientes cortos en doble número que el de estilos -10(8,6)-, rectos, con los bordes planos o algo revolutos o más raramente recurvados; placenta en general con funículos muy cortos, raramente de longitud igual o algo superior a la de las semillas. Semillas numerosas, ± reniformes, con tubérculos ± salientes; testa fuertemente adherente o más raramente libre en su mayor parte. El indumento tiene morfologías muy variadas: los pelos pueden ser glandulares, tectores rígidos o tectores “lanosos” (Rico, 1990)

La escasez de datos acerca de caracteres cromosómicos en el género es relevante. Para la especie *Cerastium dubium* en concreto existen únicamente 7 recuentos cromosómicos, detallados en la tabla del apartado 4.2.

2. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

La descripción morfológica de ambas especies está basada en la *Flora iberica* [Vol. I para el género *Ephedra* (Amaral Franco, 1986) y Vol. II para el género *Cerastium* (Rico, 1990)]. Para la información relativa a la biología, ecología, distribución y conservación de las especies se ha consultado Delgado et al (2010) para *Cerastium dubium* y Sánchez Agudo et al (2010) para *Ephedra distachya* subsp. *distachya*.

2.1.- *Ephedra distachya* L. subsp. *distachya*

NOMBRE CIENTÍFICO

Ephedra distachya L., Sp. Pl.: 1040 (1753) subsp. *distachya* (EPHEDRACEAE)

NOMBRE COMÚN

Se la conoce con el nombre vulgar de efedra rastrera.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Arbusto de hasta 1 m, profusamente rizomatoso. Ramillas 0,7-1 mm de diámetro, ascendentes, de color verde claro o glaucas, verruculoso-ásperas, difícilmente desarticulables. Hojas de hasta 2 mm, verdes en el dorso y de margen escarioso, las más viejas ceniciento-blanquecinas. Conos masculinos 4-8 pares, en grupos oblongo-ovoides de 3-5 mm, sésiles o pediculados; brácteas ovado-cocleariformes; sacos polínicos 2(3) locales, deshiscentes por una hendidura transversal apical. Conos femeninos con pedículo de 3-10 mm y 2 rudimentos seminales, generalmente con 3(4) pares de brácteas; tubo estiliforme c. 1,5 mm, recto. Sincarpo 5-7 x 2,5-4 mm, ovoide; brácteas rojizas. Semillas que sobresalen netamente de las brácteas. $2n = 24, 28$. (Amaral Franco, 1986)

Imagen 1: Individuo de *Ephedra distachya* L. subsp. *distachya* de la población de los cerros de “La Flecha” (Cabrerizos, Salamanca)



Fuente: Elaboración propia

En Castilla-León están presentes las tres especies del género *Ephedra* que se citan para la Península Ibérica: *Ephedra fragilis* Desf., *Ephedra nebrodensis* Tineo ex Guss. y *Ephedra distachya* L. subsp. *distachya*. Se reconocen entre sí por caracteres como el grosor de las ramillas –de 1,5-2,2 mm de diámetro en *E. fragilis*, de 0,7-1 mm en *E. distachya*, y de 0,4-07 mm en *E. nebrodensis*-, la facilidad/dificultad en desarticular esas ramillas – fácilmente en la primera, difícilmente en las otras dos-, y por el color de las hojas viejas – ceniciento blanquecinas en *E. distachya* y castaño oscuro en *E. nebrodensis*.

BIOLOGÍA

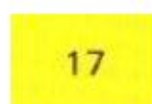
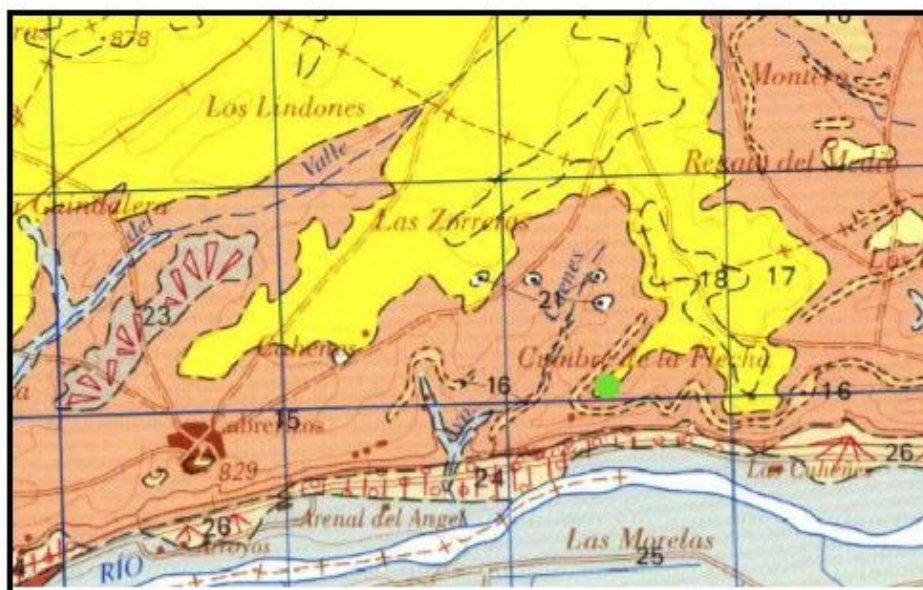
Ephedra distachya subsp. *distachya* es una especie dioica que florece entre mayo y julio, y fructifica entre agosto y septiembre. Su polinización es anemófila y sus semillas se dispersan por barocoria. Número cromosómico: $2n = 24, 28$ (Amaral Franco, 1986).

ECOLOGÍA

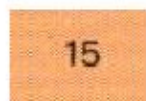
Es una planta de suelos calcáreos que prospera en cerros margosos, sobre suelos yesosos, roquedos calcáreos y arenales.

En Castilla y León crece formando parte de la vegetación rala, xerófila y gipsícola, con predominio de pequeños caméfitos y nanoterófitos, que se desarrolla en tesos margosocalizos con afloramientos de yesos. La población estudiada, situada en los cerros de “La Flecha” (Cabrerizos), se asienta sobre Regosoles calcáreos (en fase lítica), con textura franco-arcillo-arenosa, con un horizonte A siempre con profundidad superior a 10 cm y cuya roca madre son areniscas más o menos duras y compactas (en concreto, arcosas y gravas arcósicas)- García Marcos, 1994-.

Mapa 1: Mapa geológico de la zona de los cerros de “La Flecha” (Cabrerizos, Salamanca).



17. Arcosas y gravas arcósicas.



15. Litoarcosas, litoarenitas y fangos ocreos cementados por carbonatos



Localización de la población.

Fuente: Instituto Geológico y Minero de España (MAGNA 50; Hoja 478).

En la parte superior llana de los cerros aparecen también Cambisoles éutricos, cálcicos y crómicos, aunque no en la zona exacta en la que se encuentran las poblaciones.

Desde el punto de vista fitosociológico se puede adscribir a la asociación *Lino differentis-Lepidietum subulati*, dentro de la alianza *Rosmarinetea officinalis* (incluida en la Directiva Hábitats dentro del hábitat prioritario *1520)-más típicamente gipsícola-, o a la de *Artemisio herbae-albae-Santolinetum squarrosae*, dentro de la alianza *Salsolo vermiculatae-Peganion harmalae* (incluida en la Directiva Hábitats dentro del hábitat no prioritario 1430), - con un mayor componente nitrófilo-. Estas formaciones presentan su óptimo en la zona central de la Península, con irradiaciones hacia el este y sureste (costa mediterránea y Almería

principalmente) donde, al cambiar las condiciones climáticas, se produce un empobrecimiento de especies.

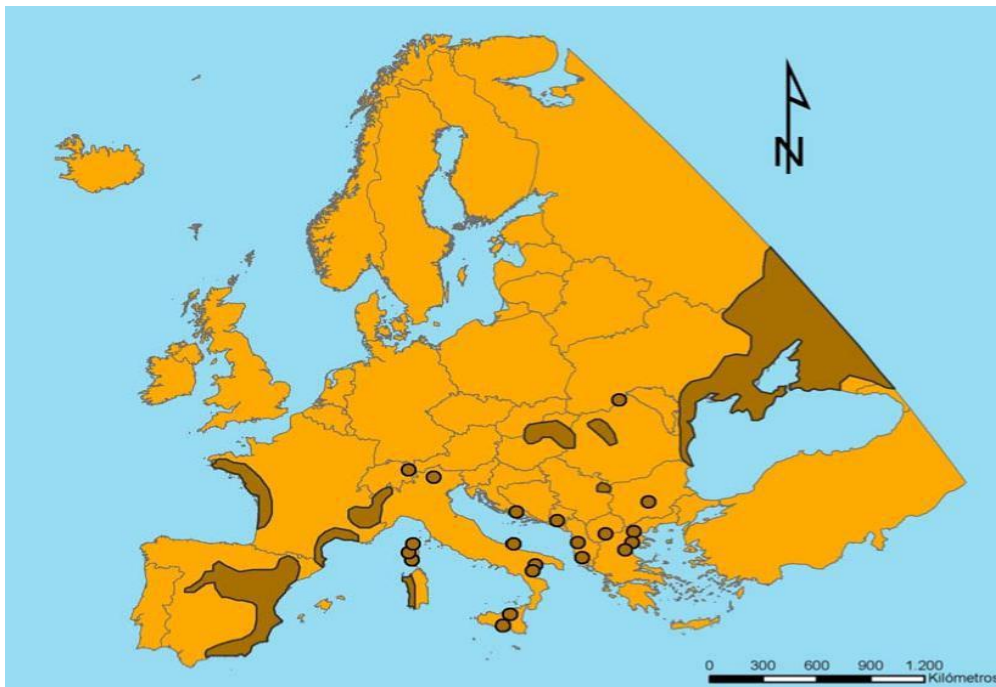
Sus poblaciones se encuentran entre los pisos bioclimáticos termo y supramediterráneo, de ombroclima seco a semiárido. Su rango altitudinal, según Amaral Franco (1986), en toda su distribución, variaría de 0 a 1200 m.

DISTRIBUCIÓN

Distribución General (Corología)

Esta subespecie está distribuida de forma dispersa por el sur de Europa, y en el oeste y centro de Asia. En la Península Ibérica ocupa fundamentalmente la mitad este, llegando hacia el oeste a través de la cuenca del Duero, siempre en suelos calizos.

Mapa 2: Distribución general de *E. distachya* subsp. *distachya* en el oeste de las Regiones Mediterránea y Eurosiberiana.

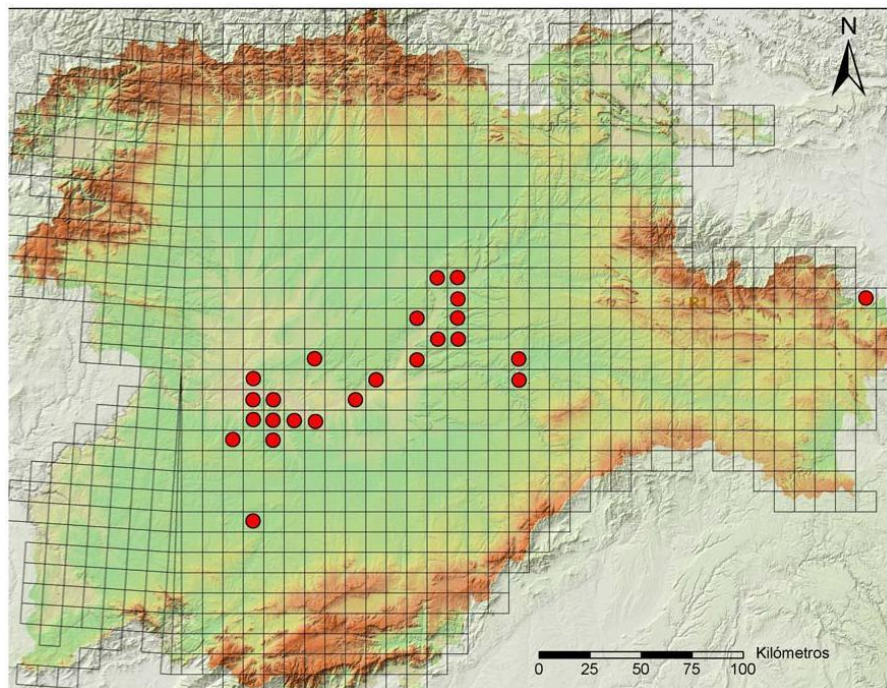


Fuente: Sánchez Agudo et al (2010).

Distribución en Castilla y León

En Castilla-León aparecen poblaciones en todas las provincias excepto en Segovia y en León. Es más frecuente en la zona centro, sobre todo en Palencia y Valladolid, llegando de forma marginal hacia Salamanca y Soria.

Mapa 3: Distribución de *E. distachya* subsp. *distachya* en Castilla y León



Fuente: Sánchez Agudo et al (2010).

Imagen 2: Población de *E. distachya* subsp. *distachya* en los cerros de “La Flecha” (Cabrerizos, Salamanca).



Fuente: Elaboración propia

ABUNDANCIA Y ESTADO DE CONSERVACIÓN

Esta especie tiene su óptimo en las laderas margoso-yesosas, sometidas a fuerte insolación. Con frecuencia es el único biotipo arbustivo que aparece en esas laderas.

La población de *E. distachya* subsp. *distachya* estudiada (véase Tabla 1, pág. 16) es una de las más occidentales. Se desarrolla sobre las laderas arcósicas de unos tesos de baja altitud, en orientación suroeste, muy próximas a cultivos de secano. El número de individuos no llega al centenar y en general son de pequeño porte (no más de 50 cm).

Podemos decir que es un taxón raro a la escala regional, pero es un componente habitual en los cerros calizos y yesosos del centro de Castilla y León. Sus poblaciones no son abundantes, aunque su grado de adaptación es tan alto que son bastante estables y resistentes a los cambios o alteraciones.

Según Sánchez Agudo et al. (2010), aplicando los criterios de la UICN, esta especie estaría considerada como "VULNERABLE". Estos autores consideran que es una planta con bastantes poblaciones conocidas en otras zonas de la Península Ibérica (algunas no lejanas de las castellano-leonesas, como las de Cuenca, La Rioja, etc.), por lo que estiman que lo más apropiado es mantener esa categoría de "DE ATENCIÓN PREFERENTE" que se propone en el Decreto 63/2007 de Flora Protegida de Castilla y León.

FACTORES DE AMENAZA Y MEDIDAS DE GESTIÓN ACONSEJABLES

A continuación se enumeran, de mayor a menor importancia, todos los factores de amenaza que podrían influir negativamente en el estado de conservación de la especie en la región:

- **Plantaciones artificiales:** desde hace décadas los tesos donde esta especie crece en Castilla y León han sido sometidos a constantes reforestaciones, generalmente utilizando *Pinus pinea* L., como ocurre en los cerros de "la Flecha" (véase Imagen 2, en la que aparece la población de la especie estudiada junto a ésta última), o *Pinus halepensis* Mill. en otras zonas de Castilla y León.
- **Pistas:** La existencia de una pista para bici-cross no solo reduce la superficie de la población, sino que además la fragmenta y da lugar a otros efectos negativos sobre la especie: contaminación, polvo, etc. Esto sucede concretamente en los cerros de La Flecha.
- **Urbanización dispersa:** en los últimos años en los cerros próximos a La Flecha se han construido numerosas zonas residenciales.

- **Cultivos:** Aunque la elevada pendiente de las laderas impide cultivar en ellas, si que puede afectar negativamente a la especie el uso indiscriminado de herbicidas, las malas hierbas de cultivo, etc.

Como medidas preventivas y/o correctoras se pueden señalar la realización periódica de censos de la especie, el control de las actividades agrícolas y ganaderas en las proximidades de las poblaciones, la prohibición de cualquier actuación que suponga la destrucción o modificación de la cubierta vegetal y la recolección de germoplasma.

2.2.- *Cerastium dubium* (Bast.) Guépin

NOMBRE CIENTÍFICO

Cerastium dubium (Bast.) Guépin, Fl. Maine & Loire: 267 (1830) (CARYOPHYLLACEAE).

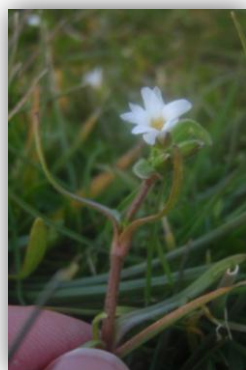
NOMBRE COMÚN

Sin nombre vulgar conocido en Castilla y León.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Hierba anual, con tallos hasta de 35 cm, al menos uno erecto, algo acodados en la base, pubescente-glandulosos al menos en la parte superior. Hojas 6-40 x 1-3 mm, opuestas, sésiles, linear-lanceoladas, ciliado-glandulosas en los bordes, glabras o con algunos pelos glandulares en ambas caras. Inflorescencias hasta de 25 flores, laxas, con pedicelos erectos, filiformes, los mayores de longitud 1,3-3 veces la del cáliz, glandular-pubescentes; brácteas totalmente herbáceas o las superiores de estrechísimo margen escarioso. Cáliz cuneado en la base; sépalos 5, de 4-6 mm, libres, lanceolados, de margen escarioso, glandulares en el dorso. Pétalos de longitud 1,3-1,5(2) veces la del cáliz, bífidos hasta 1/4 de su longitud, glabros. Estambres 10, glabros; anteras 0,4-0,6 mm. Estilos 3(4). Cápsula 6-13 mm, hasta 2,5 veces más larga que el cáliz, dehiscente por 6(8) dientes erectos, casi planos. Semillas 0,6-0,8 mm, acastañado-amarillentas, con tubérculos subobtusos. 2n=38*(recuento extrapeninsular) -Rico, 1990-.

Imagen 3: Ejemplar de *Cerastium dubium* de las poblaciones presentes en la comarca de La Armuña (Salamanca).



Fuente: Elaboración propia

Según Delgado et al (2010), en las poblaciones presentes en la provincia de Ávila, *Cerastium dubium* podría confundirse con *C. cerastoides* (L.) Britton, con la que está próxima desde el punto de vista filogenético.

Se distinguen morfológicamente en que *C. cerastoides* es una planta perenne con tallos glabros o con una línea de pelos cortos en cada entrenudo, mientras que *C. dubium* es anual y presenta tallos pubescente-glandulosos, y también por su ecología, ya que *C. cerastoides* aparece en lugares húmedos de alta montaña en altitudes superiores a los 1600 m.s.n.m., y *C. dubium* vive en pastos densos próximos a zonas encharcadas y algo salobres entre los 800 y 1100 m de altitud.

BIOLOGÍA

Planta hermafrodita que florece entre abril y junio. Se trata de una especie con polinización entomófila inespecífica y dispersión a corta distancia por barocoria.

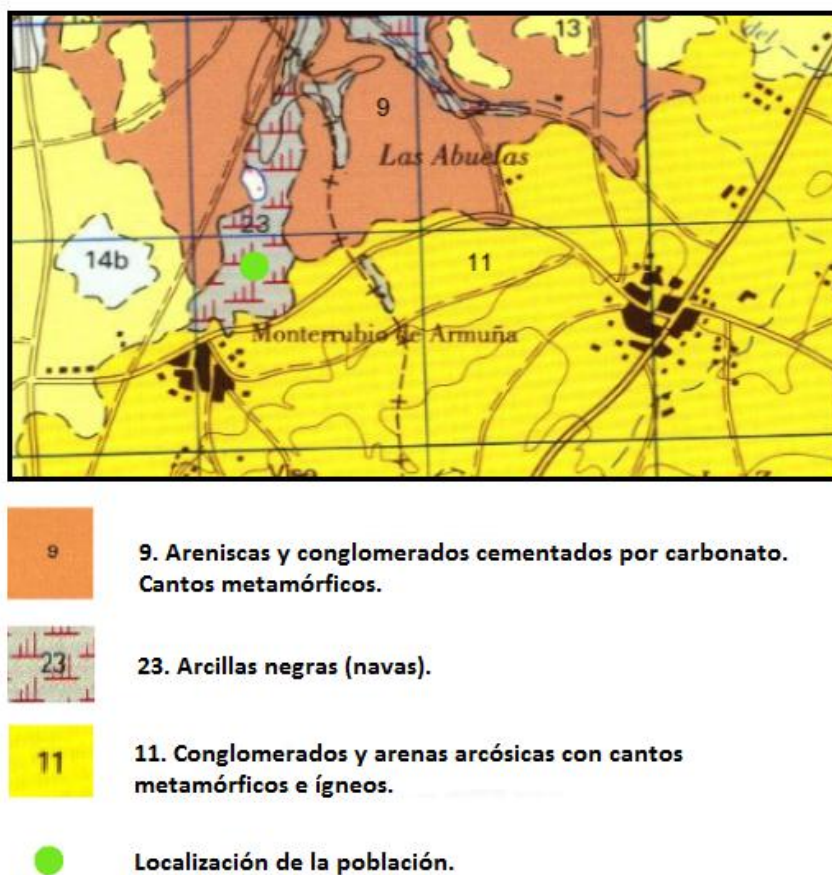
Para esta especie no existen recuentos cromosómicos realizados en la Península Ibérica, razón por la cual esta tarea se ha llevado a cabo en este trabajo. En el resto de su distribución existen recuentos en poblaciones europeas de $2n = 38$ (Starlinger 2000) $n = 19$ (Çelebioglu & Favarger) y un recuento haploide en Norte América de $n = 18$ (Shildneck & Jones, 1986).

ECOLOGÍA

Cerastium dubium se encuentra en pastos halosubnitrofilos, densos, con zonas que se encharcan temporalmente, correspondientes a majadales basófilos. La población estudiada se ubica en el prado de "Las Abuelas", en Monterrubio de la Armuña (Salamanca). Se encuentra en la llamada (desde el punto de vista geológico) "Depresión de Monterrubio", la cual está colmatada por arcillas grises oscuras, que en superficie se cubren de eflorescencias salinas y que desarrollan, en épocas de sequía, grandes grietas de desecación y *microrrelieve gilgai*, y que tiene el nivel freático muy cerca de la superficie. Esta depresión se ha formado en la confluencia de cuatro o cinco arroyos estacionales que drenan las arenas feldespáticas y que producen encharcamientos temporales (Santos Francés et al. 2014).

Desde el punto de vista edafológico esta población de *C. dubium* se encuentra asentada sobre vertisoles cálcicos, suelos formados por arcillas tipo montmorillonita en la capa más superficial, y arcilla gris hasta los 80-90 cm. Además presentan un pH neutro, gracias al calcio, beneficioso para la mayoría de las plantas. Hay que decir que, aunque sus propiedades químicas sean muy buenas, las físicas no lo son: en épocas de sequía se endurece demasiado, y en épocas húmedas se vuelve demasiado plástico (Santos Francés et al. 2014).

Mapa 4: Mapa geológico de la zona del prado de “Las Abuelas”



Fuente: Instituto Geológico y Minero de España (MAGNA 50; Hoja 452).

Dichas zonas se caracterizan florística y fisionómicamente por *Poa bulbosa* L. y *Trifolium ornithopodioides* (L) Sm. y que se adscriben al *Trifolio ornithopodioidis-Poetum bulbosae* del *Astragalion sesamei-Poion bulbosae* (Ladero et al, 1997). En estos pastos también se presentan terófitos halófilos como *Hordeum marinum* Huds. que forma un pasto propio del *Polyogo maritimi-Hordeetum marini* del *Hordeion marini*). En determinadas zonas de estos pastos, con mayor humedad y encharcamiento, se instalan formaciones de cárcices de difícil adscripción fitosociológica entre las que destacan las formadas por *Carex divisa* Huds. Catenalmente con estos pastos suelen aparecer especies perennes como *Camphorosma monspeliaca* L., *Plantago maritima* L. y *Puccinellia caespitosa* Julià & J. M. Monts. que forman parte de diversas comunidades vegetales del *Puccinellion caepitosae*.

Cerastium dubium abunda en zonas ligeramente encharcadas del majadal aunque también suele aparecer de manera esporádica en lugares menos húmedos, donde predomina *Poa bulbosa*, o en zonas más encharcadas donde domina *Carex divisa*. Esta cariofilácea también aparece puntualmente en pequeños calveros junto a *Myosurus minimus* L.

Imagen 4: Población de *Cerastium dubium* en una de las pequeñas depresiones encharcables en la comarca de La Armuña (Salamanca). Los puntos blancos que aparecen en la fotografía corresponden a ejemplares de *C. dubium* en flor.



Fuente: Elaboración propia

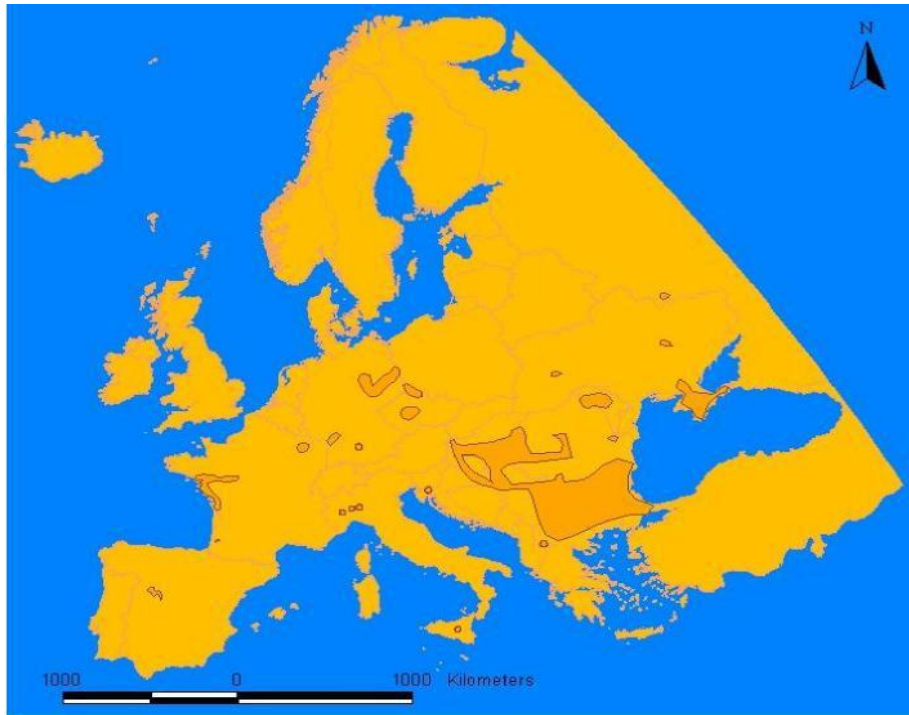
En la Península Ibérica aparece en la provincia Mediterránea Ibérica Occidental (subprovincia Carpetano-Leonesa; sectores Guadarrámico y Salmantino) y en la provincia Mediterránea Ibérica Central (subprovincia Castellana; sector Castellano Duriense). En Castilla y León el rango de altitud en el que vive *C. dubium* es de 800 a 1100 m.s.n.m. Todas las poblaciones quedan incluidas dentro del piso bioclimático Supramediterráneo.

DISTRIBUCIÓN

Distribución General (Corología)

Distribuida por el C y S de Europa, el W de Asia y el N de África (Rico, 1990) e introducida recientemente en Norte América. En la Península Ibérica se encuentra exclusivamente en Castilla y León, en algunos enclaves de la cuenca del Duero pertenecientes a las provincias de Salamanca y Ávila.

Mapa 5: Distribución general de *Cerastium dubium* en el oeste de las Regiones Mediterránea y Eurosiberiana.



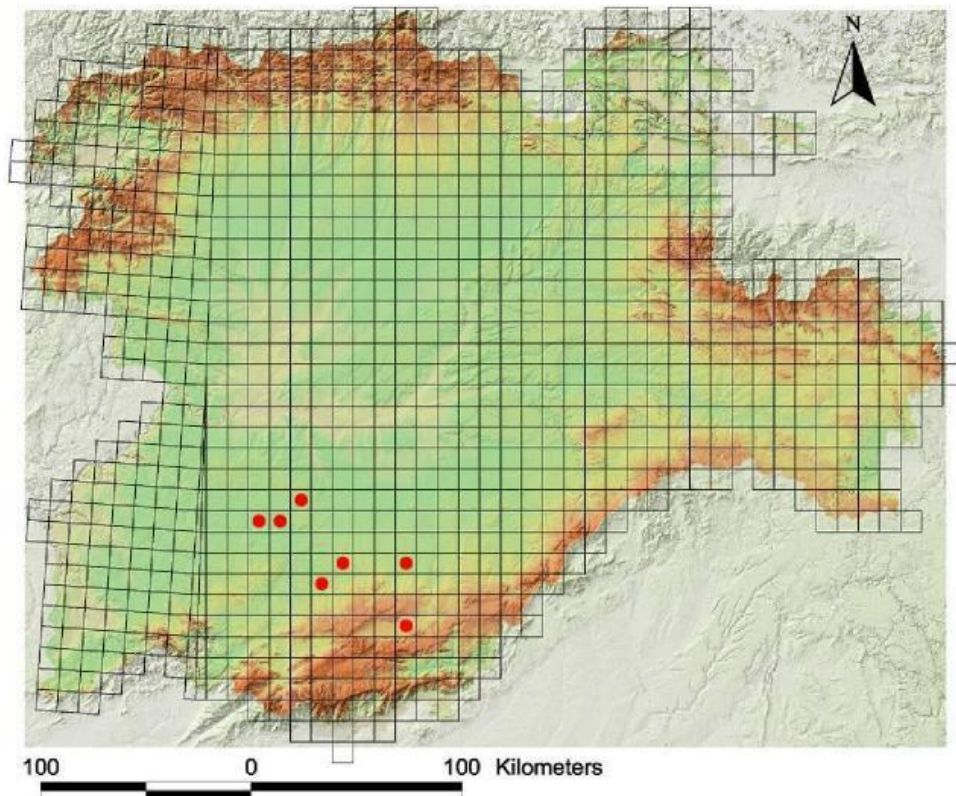
Fuente: Delgado et al (2010).

Distribución en Castilla y León

Cerastium dubium se encuentra en Castilla y León en las provincias de Salamanca y Ávila, en zonas dentro de la cuenca del Duero. Según Delgado et al (2010), hasta la fecha se conocen 9 poblaciones (4 en Ávila y 5 en Salamanca) localizadas en las comarcas salmantinas de La Armuña y Campo de Peñaranda, y en las abulenses de la Moraña y Valle de Amblés. Estas poblaciones son las únicas que se conocen en la Península Ibérica. Las poblaciones más próximas conocidas son del SW de Francia (véase Mapa 5).

Las primeras recolecciones de *C. dubium* en la Península Ibérica se realizaron en dos municipios de Salamanca (San Cristóbal de la Cuesta y Pedrosillo el Ralo) en 1967. Años más tarde se encontraron las poblaciones del Valle de Amblés (Ávila), y posteriormente las demás.

Mapa 6: Distribución de *Cerastium dubium* en Castilla y León



Fuente: Delgado et al (2010).

ABUNDANCIA Y ESTADO DE CONSERVACIÓN

Cerastium dubium es una planta rara en Castilla y León y más aún en la Península Ibérica. En concreto, en la población de Monterrubio de Armuña se estimaron más de 10.000 individuos en el censo realizado en 2010 (Delgado et al. 2010). Alcanza un estado de conservación óptimo en pastos basófilos o neutros, densos, con cierto grado de salinidad y encharcados a comienzos de la primavera. Estos prados están formados por un mosaico de comunidades vegetales dominadas por *Poa bulbosa*, *Trifolium ornithopodioides* y *Hordeum marinum*. En general, estos pastos son utilizados para el pastoreo de ganado ovino que, siempre que sea moderado, favorece el desarrollo y la expansión de estas comunidades.

Según Delgado et al. (2010), el régimen de precipitaciones al comienzo de la primavera es un factor determinante en la germinación de las semillas de *C. dubium*. Así, si no se produce un cierto encharcamiento en los lugares donde se desarrollan las poblaciones de esta planta, el número de ejemplares será bajo. Dicha situación tuvo lugar este año (2016) en la zona de La Armuña. En el momento de ir a recoger el material para el estudio cromosómico (marzo), se detectó que el número de ejemplares que conformaban las poblaciones no era excesivamente alto.

A nivel nacional la categoría asignada en la última Lista Roja (Moreno, 2008) es NT (Especie casi amenazada), debido a la enorme fluctuación del número de individuos en las poblaciones según en qué año se haga la observación.

En el Decreto 63/2007 de la normativa de la Junta de Castilla y León figura dentro de la categoría “De Atención Preferente”. Si se aplicaran los criterios y subcriterios utilizados en la catalogación UICN en Castilla y León, la categoría que le correspondería sería la de VU, “Vulnerable”. No obstante, se considera que es una planta de área amplia y relativamente abundante en otras zonas de Europa o Asia, parece lo más apropiado mantener esa categoría de “De Atención Preferente” (Delgado et al. 2010).

FACTORES DE AMENAZA Y MEDIDAS DE GESTIÓN ACONSEJABLES

A continuación se enumeran todos los factores de amenaza que podrían influir negativamente en el estado de conservación de la especie, de mayor a menor importancia:

- **Drenaje:** además de desecar el suelo y modificar así las condiciones físico-químicas propicias para el desarrollo del majadal, estas infraestructuras han eliminado directamente extensas manchas de *C. dubium*.
- **Amontonamiento o deposición de materiales de excavación:** esta amenaza se ha observado en el prado “Los Salinares” (La Orbada, Salamanca) donde se presenta una de las mejores poblaciones de *C. dubium*. Esta amenaza se acentúa debido al hecho de que, al no poder construir ni cultivar la zona, se aprovecha como escombrera de forma ilegal.
- **Pastoreo:** se ha comprobado que un pastoreo moderado y disperso (no vallado en una única zona) es beneficioso para el crecimiento y desarrollo de las poblaciones. En poblaciones donde se ha sustituido el pastoreo ovino por el bovino se ha observado un deterioro en la composición florística (predominando plantas nitrófilas), en la estructura de las comunidades vegetales así como también en el suelo que es más compacto y duro.
- **Cultivo:** posible causa de amenaza que puede afectar directamente a determinadas poblaciones de esta especie. La extensión de los cultivos y la consiguiente reducción del área ocupada por la población podría significar una clara reducción de los individuos.
- **Zonas urbanizadas para la construcción de viviendas:** se trata de una posible causa de amenaza ya que en ninguno de los prados donde está *C. dubium* están siendo urbanizados. Sin embargo, se incluye este epígrafe debido a la proximidad del núcleo urbano de Monterrubio de Armuña al prado donde se presenta la población de *C. dubium*.

Algunas medidas de gestión que podrían aplicarse serían: la propuesta de una microrreserva de flora en la población situada en el prado de “Las Abuelas”, en Monterrubio de la Armuña, la de mayor riqueza de individuos y mejor conservada (ya en trámite), la prohibición de cualquier actividad que conlleve destrucción directa de las poblaciones, y también de aquellas que modifiquen el nivel freático de los prados; el control y la regulación del uso ganadero en estos prados, o la realización de censos periódicos de la especie, entre otras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Recolección del material biológico

En la siguiente tabla se indican los datos de las localidades de las poblaciones estudiadas de *Ephedra distachya* subsp. *distachya* y *Cerastium dubium*:

Tabla 1: Localización geográfica de las poblaciones estudiadas.

ESPECIE	UBICACIÓN DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA	COORDENADAS DEL LUGAR
<i>Ephedra distachya</i> subsp. <i>distachya</i>	España: Salamanca: Cabrerizos; Cerros de La Flecha. 850 m.s.n.m.	40° 58' 70 N 5° 35' 0" O
<i>Cerastium dubium</i>	España: Salamanca: Monterrubio de La Armuña; Prado “Las Abuelas”. 804 m.s.n.m.	41° 2' 10" N 5° 38' 30" O

Fuente: Elaboración propia

La población de *Ephedra distachya* subsp. *distachya* presente en los cerros de La Flecha no llega al centenar de individuos, como se ha señalado anteriormente. Las que se encuentran en zonas más orientales de la Península constan de un mayor número de individuos, pero ninguna población alcanza los 1000. Aunque cada población tenga un número reducido de ejemplares, existen bastantes poblaciones en España y todas ellas son bastante estables y resistentes a los cambios (Delgado et al., 2010).

Se recogieron dos ejemplares: uno para realizar el estudio histológico, en fragmentos (tallo y raíz) de aproximadamente 2 centímetros, intentando tomar algún segmento del tallo con una escama en buen estado, y otro para crear un pliego de la especie y adjuntarlo al herbario de Salamanca (SALA).

En el caso de *Cerastium dubium* solo se conocen 9 poblaciones en la Península, 4 en Ávila y 5 en Salamanca. La población estudiada (Monterrubio de la Armuña) es localmente abundante, con un número elevado de ejemplares. Cabe señalar que el último recuento se llevo a cabo en el año 2010, pero en la visita realizada en abril de 2016 para la recogida del

material se advirtió un notable descenso de los individuos debido a las escasas precipitaciones en el mes de abril.

En este caso se recogieron unos 15-20 botones florales de distinto tamaño y grado de desarrollo para el estudio cariológico, y varios ejemplares con raíz, tallo, hojas y flores bien desarrolladas para crear un pliego de la especie y adjuntarlo al herbario de Salamanca (SALA).

3.2.- Procedimientos y materiales utilizados

Para la identificación de los diferentes caracteres histológicos, cariológicos y morfológicos, se llevan a cabo las siguientes técnicas:

3.2.1.- Técnica histológica

La técnica histológica que consta de varios pasos:

1. Fijación del tejido vivo
2. Inclusión del mismo en parafina
3. Corte del tejido con un micrótopo (12 micras)
4. Desparafinado y tinción de los cortes histológicos
5. Lavado, estabilización y montaje de la preparación
6. Observación de los cortes teñidos al microscopio

Fijación del tejido vivo

Fijar una célula consiste en conservarla en un estado lo más parecido posible al estado vivo, intentando mantener todas sus partes, sin que aparezcan nuevas estructuras producidas artificialmente.

La fijación se realizó *in situ* (Imagen 5). Una vez localizados los ejemplares, se cortó parte del tallo con escamas y de la raíz (en el caso de *E. distachya*).

El fijador que se ha utilizado es Karpechenco, que está formado por una disolución A que contiene agua destilada 6% y formaldehído 2%, y una disolución B, que contiene ácido acético al 20% y óxido crómico al 2%. Este fijador permite que los tejidos se mantengan en las mismas condiciones que antes de ser cortados debido a:

- Su gran velocidad de penetración y fijación.
- Es ácido, de manera que coagula las proteínas de forma paulatina para que las células no sufran retracciones.
- No endurece demasiado los tejidos.

El material una vez fijado necesita conservarse en frío, por tanto, para su traslado se empleó una nevera portátil. Los tejidos han permanecido con el fijador 24 horas en una cámara frigorífica, aunque pueden estar incluso años. Al sacarlos, se lavaron y se mantuvieron en agua de 4-24 horas.

Imagen 5: Fijación "in situ" de tallo y raíz de *E. distachya* subsp. *distachya*.



Fuente: Luz María Muñoz Centeno (Tutora del trabajo).

Inclusión en parafina

La observación de los distintos tejidos vegetales con microscopio óptico viene limitada por la opacidad de los mismos; para obtener cortes lo suficientemente delgados como para que la luz pase a través de ellos es necesario incluir previamente el material en alguna sustancia que actúe como soporte y cortar después el bloque con un micrótopo.

El soporte que se ha utilizado es la parafina. La parafina es una sustancia de aspecto ceroso que está formada por mezclas de hidrocarburos saturados. A temperatura ambiente es sólida y su punto de fusión puede variar entre los 40 y 70°C según su composición. Por tanto, para obtener la parafina líquida habrá que colocar las lentejas (Imagen 6) en un vaso de precipitados e introducirlo en la estufa a la temperatura indicada.

Imagen 6: Lentejas de parafina utilizadas en el laboratorio.



Fuente: Elaboración propia.

Un problema que se plantea es que la parafina no es miscible con agua (hidrófoba), mientras que todos los tejidos vegetales están hidratados. Esto implica que, para que la parafina líquida pueda penetrar por completo en el tejido, éste ha de deshidratarse previamente y sustituir el agua por un solvente orgánico. Este proceso consta de varias fases:

- I. La deshidratación del tejido en alcoholes. Se empieza por alcohol etílico al 5%, al 10% y al 30% sucesivamente (1-2 horas en cada uno) y se continúa por la serie de TBA (alcohol butílico terciario), con una parte hidrófoba y otra hidrófila, permitiendo la unión del material vegetal con la parafina.

La serie TBA es una mezcla de agua destilada, alcohol de 96° y TBA (Imagen 7) y consta de 6 series en las que se va aumentando la concentración de alcohol:

- 50% (50 ml agua, 40 ml alcohol 96°, 10 ml TBA) y 50% de agua destilada.
- 70% (30 ml agua, 50 ml alcohol 96°, 20 ml TBA) y 30% de agua destilada.
- 85% (15 ml agua, 75 ml alcohol 96°, 35 ml TBA) y 15% de agua destilada.
- 95% (45 ml agua, 95 ml alcohol 96°, 35 ml TBA) y 5% de agua destilada.
- 100% (25 ml alcohol absoluto, 75 ml TBA).
- 100% TBA

El material debe permanecer en las 4 primeras series (50%, 70%, 85% y 95%) entre 2 y 4 horas, menos de 24 horas en la quinta y unas 8 horas en la última.

Imagen 7: Etanol 96% y etanol puro utilizados.

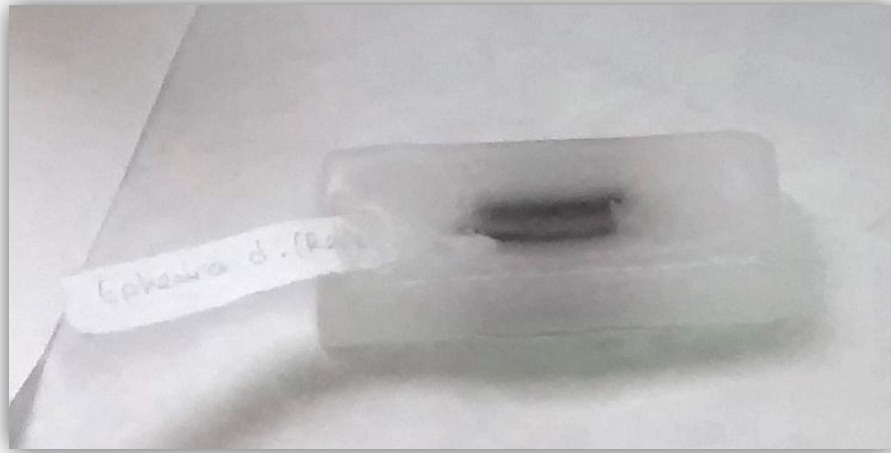


Fuente: Elaboración propia.

- II. Una vez deshidratados los tejidos con alcohol, hay que incluirlos en parafina líquida. Para ello se toman varios recipientes (que contengan 50% de TBA y 50% de parafina líquida) y se colocan dos o tres fragmentos (tallo y raíz) de la muestra en cada uno. Los recipientes se introducen en la estufa a 60°C durante 4-5 horas. Posteriormente, se traspasan las muestras a frascos de cristal con parafina líquida 100% y se introducen en la estufa a la misma temperatura y durante 24 horas. La parafina líquida se renueva dos veces, con la finalidad de eliminar los restos de TBA que pudiesen contener estos

tejidos. Finalmente, se trasladan los tejidos a moldes con parafina líquida y se dejan solidificar a temperatura ambiente durante 24 horas (Imagen 8), identificándolos correctamente (papel con nombre de la especie y parte de la planta).

Imagen 8: Bloque de parafina con raíz de *E. distachya* subsp. *distachya*



Fuente: Elaboración propia.

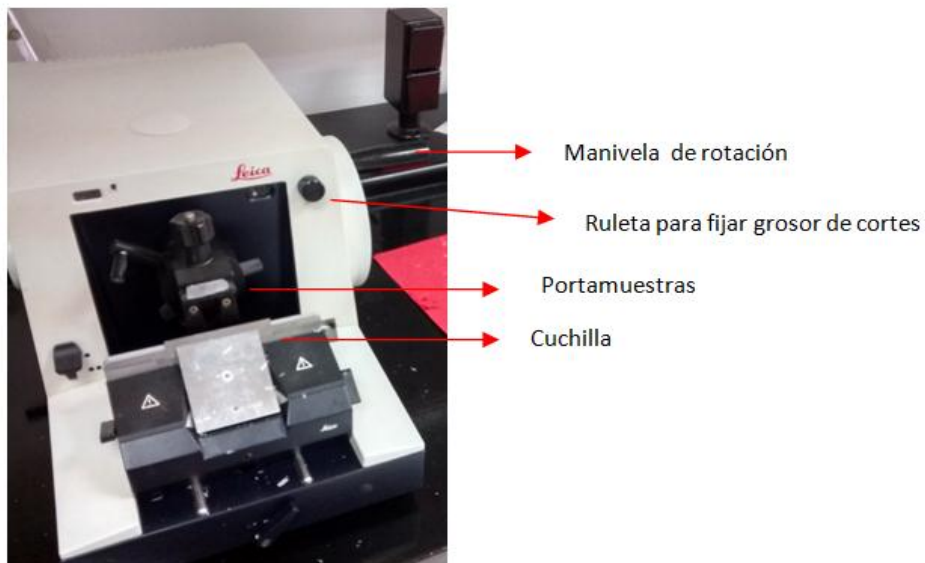
La primera inclusión en parafina de las muestras de raíz no fue del todo efectiva, puesto que la parafina no penetró bien en la raíz. Hubo que deshacer algunos de los bloques, dejar de nuevo las muestras inmersas en parafina líquida durante aproximadamente 24 horas, y hacer los bloques de nuevo. Con esta segunda inclusión se solventó el problema y se pudieron realizar los cortes correctamente.

Corte del tejido con un microtomo

Los microtomos son aparatos destinados a cortar el material incluido en parafina. Todos poseen varias partes comunes: una cuchilla, un portabloques y un sistema mecánico que permite acercar el bloque de parafina a la cuchilla, a una distancia que se corresponde con el grosor de la sección que pretendemos obtener (en este caso 12 μm) y realizar el corte.

Hay varios tipos de microtomos pero en este estudio se ha utilizado el microtomo de rotación tipo Minot, el cual provoca el corte gracias a la transformación de un movimiento de rotación en otro de ascenso y descenso del portamuestras.

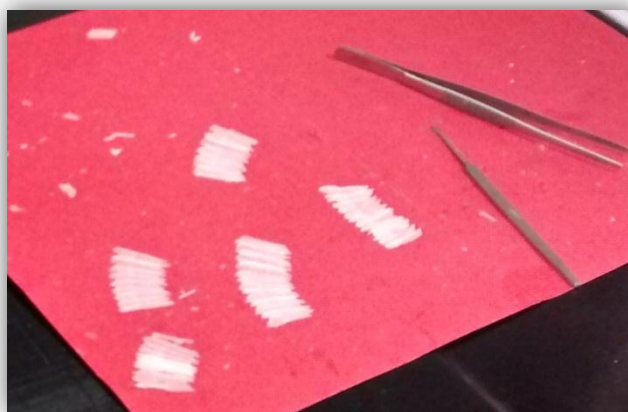
Imagen 9: Microtomo de rotación tipo Minot y sus partes



Fuente: Elaboración propia

Antes de llevar a cabo los cortes con el microtomo se tallan los bloques de parafina en forma de pirámide truncada dejando 3-4 mm alrededor de la pieza. El bloque tallado debe contener caras paralelas para permitir una buena orientación y corte de la muestra. Posteriormente se coloca en el microtomo dejando una de las aristas paralelas al filo de la cuchilla y se empiezan a realizar cortes de 12 micras, que salen adheridos formando una tira (Imagen 10). Estas tiras se manipulan con lancetas y pinzas, y antes de su fijación en el portaobjetos, se estiran para que el tejido quede perfectamente estirado. Para ello, se coloca la cinta sobre agua a 40°C en el baño maría.

Imagen 10: Tiras de parafina



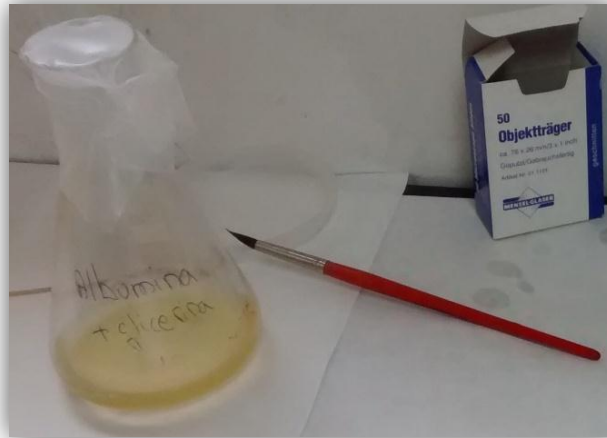
Fuente: Elaboración propia.

Antes de colocar la tira sobre el portaobjetos, éste debe estar previamente tratado para que el tejido quede perfectamente adherido a él. Para ello se extiende sobre él una o dos gotas de albúmina glicerizada con un pincel (Imagen 11). La albúmina glicerizada o albúmina

de Mayer es un adhesivo elaborado de forma manual con clara de huevo (albúmina) y glicerina en igual proporción. Las claras se batan a punto de nieve y se filtran con un colador. Una vez hecho esto se mezclan con glicerina y se añaden unos cristales de timol para evitar el ataque bacteriano.

Cuando la tira este lo suficientemente estirada (pasados 1-2 minutos), se recoge con el portaobjetos y se deja secar a temperatura ambiente durante 24 horas (Imagen 12).

Imagen 11: Álbumina glicerinada



Fuente: Elaboración propia.

Imagen 12: Secado de las tiras



Fuente: Elaboración propia.

Para realizar los siguientes procesos de forma más rápida y efectiva se utiliza una cestilla en la que se colocan 10 portaobjetos a la vez, la cual se va pasando de un cristizador a otro.

Desparafinado y tinción de los cortes histológicos

Es necesario teñir las muestras para poder distinguir los diferentes tejidos que conforman los órganos. El problema que se plantea en este proceso es que los colorantes están en disolución acuosa y por tanto, hay que eliminar la parafina y volver a hidratar de nuevo los tejidos para que el colorante pueda teñirlos. El proceso que se lleva a cabo para ello es el siguiente:

- I. Se disuelve la parafina introduciendo los cortes en dos baños de xilol durante 3 minutos en cada uno.
- II. Se hidratan los cortes pasándolos (2 minutos en cada disolución) por una serie de alcoholes de graduación decreciente (100%, 96%, 85%, 70%, 60%, 50%) hasta llegar al agua destilada (dejar la muestra por lo menos 1 hora en ella).
- III. Se destruyen los orgánulos internos (para que no interfieran en la observación posterior de los tejidos) pasando los cortes por un baño de hipoclorito sódico al 10% durante 1 minuto.
- IV. Se pasan los cortes por tres baños de ácido acético al 5% (1 minuto en cada uno) para eliminar cualquier resto de hipoclorito sódico, evitando así que el azul alcian precipite.

Una vez acabado el desparafinado comienza la tinción. La tinción se realiza mediante baños secuenciales de diferentes colorantes y reactivos (Imagen 13). Para teñir las muestras se utiliza la tinción FASGA (Tolivia, D. *et al.* 1987) en la que se mezclan dos colorantes compatibles, la safranina y el azul alcian. Su composición exacta es: 20 ml de agua destilada, 30 ml de glicerina, 14 ml de azul alcian, 1 ml de ácido acético y 3 ml de safranina al 1%. Las diferentes estructuras de las plantas quedan teñidas de la siguiente forma:

- Paredes de celulosa: verde o azul (varios tonos)
- Esclerénquima: generalmente rosa o rojo
- Colénquima: verde o azul-violáceo
- Lignina: rojo (varios tonos).
- Suberina: roja o rojo-anaranjada
- Cutina: roja y rojo-anaranjada
- Taninos: generalmente rojizos

Se dejan los cortes en la solución de tinción durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente, y después se procede al lavado, estabilización y montaje de las preparaciones.

Lavado, estabilización y montaje de la preparación

Para eliminar el exceso de colorante se introducen las preparaciones durante 1 minuto aproximadamente en un cristizador con agua destilada. Una vez hecho esto, y con el fin de estabilizar las preparaciones, se introducen en ácido fosfotúngstico durante 3 minutos, y después de nuevo en agua destilada para lavarlas, esta vez durante 5 minutos.

Para el montaje de la preparación se emplea un pegamento orgánico utilizado para unir los cubres al portaobjetos. Al utilizar este pegamento hidrófobo hay que volver a pasar cada muestra, mediante un baño simple, por alcohol de 100° y xilol para volver a deshidratar.

Finalmente, se dejan secar las muestras como mínimo durante 15 minutos antes de observarlas al microscopio.

Imagen 13: Proceso de desparafinado, tinción, lavado y estabilización de muestras.



Fuente: Elaboración propia.

Debido al grosor y la dureza de la raíz, muchos de los cortes se despegaron del portaobjetos durante el proceso de desparafinado, tinción, lavado y estabilización, por lo que hubo que añadir a las preparaciones posteriores más cantidad de la normal de albúmina glicerizada para que los cortes de raíz quedaran bien adheridos al portaobjetos.

Observación de los cortes teñidos al microscopio

Una vez preparadas las muestras para su observación, se procede a buscar el mejor corte para su estudio. Para observar los tejidos una vez teñidos es necesario utilizar un microscopio. En este trabajo se ha utilizado en concreto el microscopio óptico Olympus CHCO11.

Imagen 14: Microscopio utilizado.



Fuente: Elaboración propia

Se observan los cortes a 10x10 aumentos para ver su aspecto y estructura general, y después a 10x40 para analizar su estructura interna. El mejor corte será aquel que no esté roto (muchos se fragmentan a lo largo del proceso), que esté también bien teñido (ni exceso ni falta de colorante), y aquel cuyos tejidos y estructuras se distingan con claridad.

3.2.2.- Estudio cariológico

El estudio cariológico consistió en realizar el recuento cromosómico a partir de botones florales. Para realizar este recuento tenemos que tener en cuenta las diferentes fases de la división nuclear. De las diferentes fases en que se divide la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) es la metafase la que se utiliza para realizar el recuento cromosómico ya que es en esta fase cuando los cromosomas están en su mayor grado de condensación. Es necesario matizar que sólo sirven aquellas células que se encuentran en metafase polar ya que las metafases ecuatoriales no sirven para el recuento al estar los cromosomas muy próximos entre sí.

Para conocer la dotación cromosómica de una planta es muy importante hacer una buena elección del material de partida. Por eso, para este estudio es necesario obtener botones florales que contengan gineceos lo más inmaduros posible.

Los pasos a seguir para efectuar este procedimiento los podemos resumir en:

1. Recogida y fijación del tejido vivo
2. Hidrolisis y tinción
3. Preparación y montaje de las muestras
4. Observación de las muestras al microscopio.

Recogida y fijación del tejido vivo

Las primeras preparaciones se elaboraron en noviembre-diciembre de 2015, utilizando material recogido en primavera de 2011. Debido al largo tiempo que llevaban las muestras (botones florales) en el fijador, la mayoría de las preparaciones no salieron del todo nítidas. Para remediarlo se recogieron nuevas muestras en marzo de 2016, y se realizaron 4 nuevas preparaciones con ellas.

En primer lugar, se fijaron los botones florales de *Cerastium dubium* en frascos de cristal con un fijador formado por etanol y ácido acético y en una concentración 3:1 para conservarlo en un estado lo más parecido al estado vivo posible. La acción del ácido acético provoca una desnaturalización de las histonas, rompiendo parte de las uniones existentes entre el ADN y los aminoácidos de estas proteínas, facilitando así, en pasos posteriores, la unión del colorante al ADN.

El ácido acético tiene el inconveniente de producir fuertes cambios osmóticos en las células, pudiendo provocar la rotura de la membrana plasmática. Por ello, se utilizó también el etanol cuya función es paralizar todas las reacciones enzimáticas y deshidratar los tejidos vegetales, endureciéndolos sin causar deformaciones en los cromosomas. Esta fijación se realizó en el campo y posteriormente se llevaron al laboratorio, donde se mantuvieron durante varios días en una cámara frigorífica.

Imagen 15: Detalle de la recogida y fijación de botones florales de *C. dubium*.



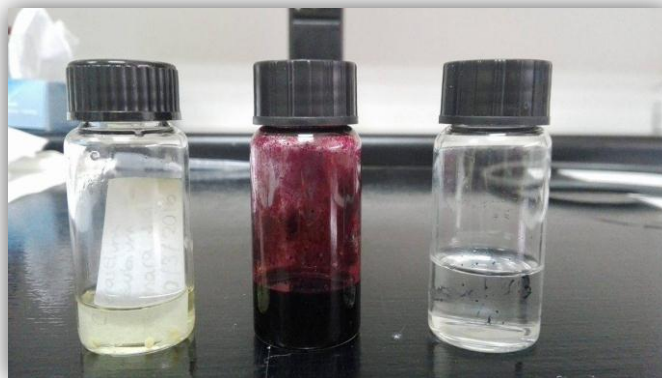
Fuente: Luis Delgado Sánchez (Cotutor del trabajo).

Hidrolisis y tinción

La hidrolisis produce una ruptura de las uniones celulares y un ablandamiento de la pared celular, facilitando la penetración del colorante.

El protocolo seguido fue el siguiente: una vez fijado el material, se vierten en un vidrio de reloj unas gotas de fijador junto con 3 botones florales con gineceos de entre 0,5 y 1 mm de longitud. A continuación se echa en un portaobjetos un poco de fijador junto con varios gineceos (2-3 según tamaño) y se limpia el resto del fijador con papel de filtro sin dejar que se sequen en ningún momento los gineceos. Después se añade el colorante. En este caso se emplea orceína acética al 2%, ya que proporciona un alto contraste de los cromosomas sobre el citoplasma y es más selectivo que otros colorantes (*La Cour, 1954*). Para ablandar la pared celular y facilitar aún más la penetración del colorante en las células se añade HCl 1N como agente hidrolizante en una proporción 9:1 (9 ml de disolución de orceína acética y 1 ml de HCl). Además de utilizar HCl también se aplica calor con un mechero Buchner para ablandar aún más las paredes.

Imagen 16: De izquierda a derecha, fijador con botones florales, orceína acética y ácido acético.



Fuente: Elaboración propia.

Preparación y montaje de las muestras

En primer lugar, se eliminan con papel de filtro los restos del colorante que queden aún líquidos tras pasar el porta durante 3 veces por el mechero, con un intervalo de 10 minutos entre cada una. Después se añaden unas gotas de ácido acético al 45% para retirar el exceso de colorante hasta que el portaobjetos quede limpio, siempre teniendo en cuenta que los gineceos deben estar húmedos de continuo (no hay que retirar por completo los restos de ácido acético). Una vez lavada la muestra, se coloca un cubreobjetos encima.

Posterior a la preparación y montaje de las muestras, se utiliza la técnica que se conoce como “método por aplastamiento o squash” (*La Cour, 1954*), una de las más utilizadas en cariología. Se coloca papel de filtro cubriendo parte del cubreobjetos y presionando con

firmeza la muestra contra la mesa. Una vez adoptada la posición correcta, se dan golpes secos pero no muy fuertes (para evitar resquebrajar el cubreobjetos) sobre la muestra con el mango de una lanceta. La finalidad de este procedimiento es acabar de romper los tejidos y separar bien las células para su posterior observación. Finalmente, se sella el cubre al portaobjetos con esmalte de uñas, se deja secar unos minutos y se observa al microscopio óptico.

Imagen 17: Material de trabajo para la preparación de las muestras del estudio cariológico.



Fuente: Elaboración propia.

Además de las preparaciones elaboradas para el recuento cromosomático, también se realizaron preparaciones con anteras, en este caso sin necesidad de proceso de tinción. Todas las anteras median 0,3 mm.

Observación de las muestras al microscopio

La observación de las preparaciones se lleva cabo con un microscopio Olympus CHCO11. Se realiza un barrido exhaustivo de la muestra 10x40 aumentos en primer lugar, y se van apuntando, las coordenadas de la muestra de aquellas células que nos pueden servir. Después se observan las células anotadas empleando un objetivo de inmersión en aceite x100 con un ocular x10.

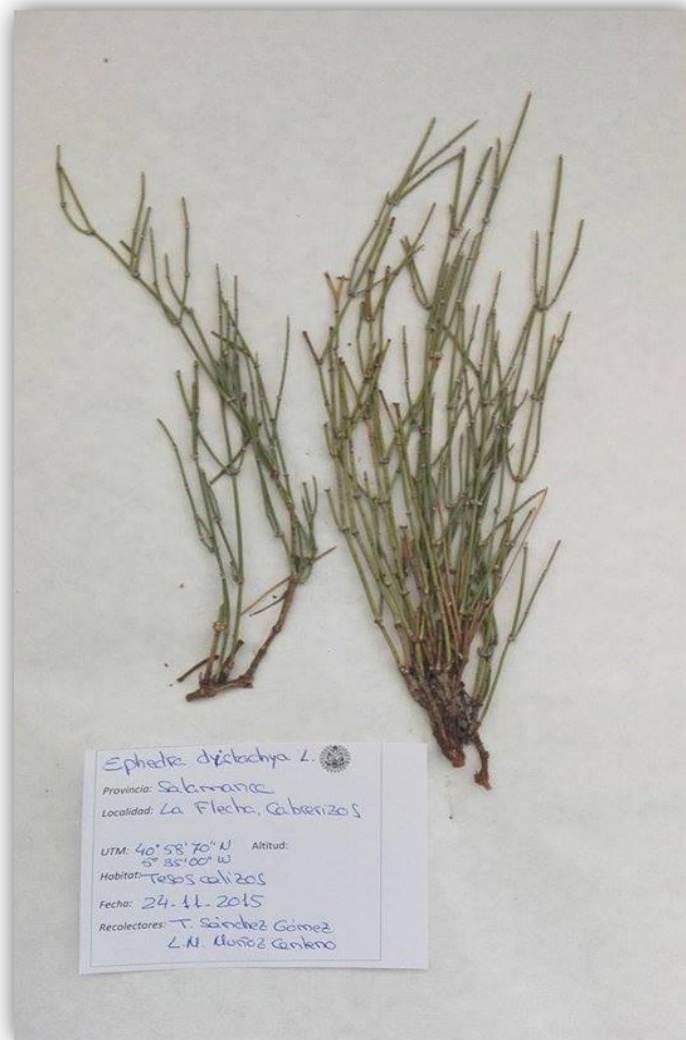
Las fotografías digitales fueron obtenidas con un microscopio Nikon HFX-II tipo 115 al que se le acopló una cámara digital.

3.2.3.- Pliegos de herbario

Aunque no se llevó a cabo un estudio micromorfológico de las especies debido a que ya existían otros anteriores, si que se recogió un ejemplar de cada una para añadirlo al herbario de la Universidad de Salamanca (SALA).

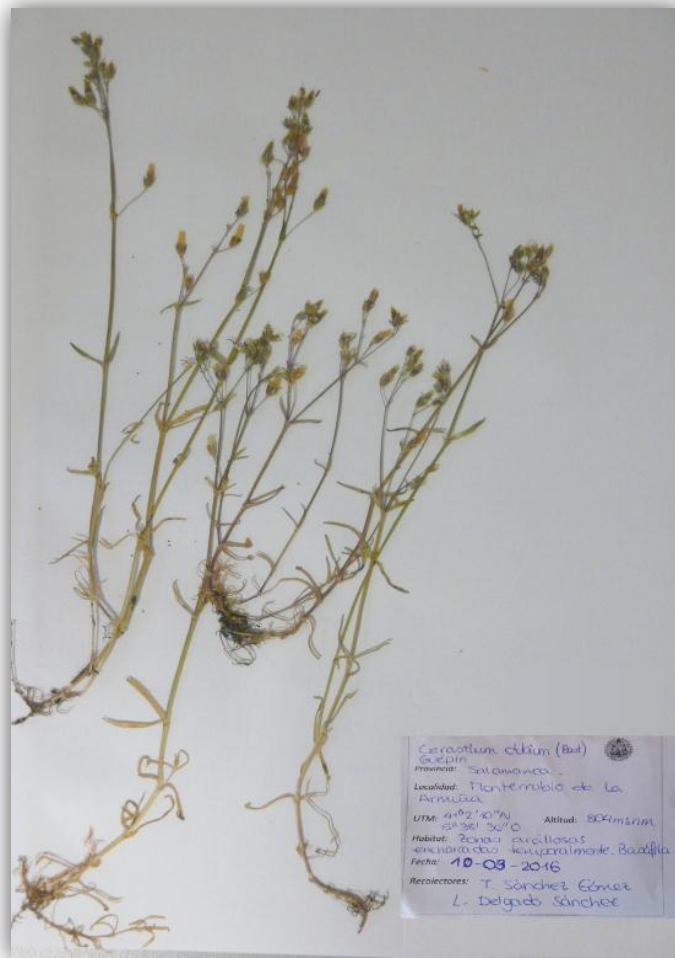
Los pliegos se enviaron con sus correspondientes referencias al herbario para que fueran incluidos en él pero, a fecha de entrega de este trabajo, aún no les había asignado un número de pliego.

Imagen 18: Pliego de *Ephedra distachya* subsp. *distachya*



Fuente: Elaboración propia.

Imagen 19: Pliego de *Ephedra distachya* subsp. *distachya*.



Fuente: Elaboración propia

4. RESULTADOS

4.1. Histología

Para el estudio histológico se han realizado un total de 60 preparaciones, escogiendo después aquellas donde los tejidos se diferenciaron más claramente. Se seleccionaron 11 muestras de cortes de tallos con escamas y de raíces.

4.1.1.- Descripción de los tejidos del tallo

Ephedra distachya subsp. *distachya* pertenece, como ya se ha mencionado, al grupo de las Gimnospermas, con lo que tendrá un grado de evolución menor a las Angiospermas.

Las Gimnospermas tienen menos evolucionado su sistema vascular. En vez de formar largos vasos continuos, esos vasos están formados por células que se suceden con sus paredes

comunes perforadas (traqueidas o células cribosas). Esta es la razón de que, al realizar los cortes con el microtomo, se rasguen más fácilmente, sobre todo el floema, ya que las células que lo forman tienen las paredes de celulosa, mientras que las paredes del xilema están formadas por células muertas lignificadas, mucho más resistentes. Esto se debe a que los vasos de xilema deben ser mucho más duros para poder absorber la mayor cantidad de agua y sales minerales posible, siendo prioridad soportar una gran presión, mientras que en el caso del floema están constituidas de celulosa, un tejido vivo y que permite el paso de los nutrientes a través de él.

La parte externa del tallo de *Ephedra distachya* subsp. *distachya* está recubierta por una cutícula, que está compuesta por una cubierta superior de ceras epicuticulares, seguida por otra capa inferior formada por cutina y ceras mezcladas con sustancias de la pared celular, pectinas, celulosa y otros carbohidratos, los cuales constituyen la capa cuticular. La composición química exacta de la cutícula de *E. distachya* subsp. *distachya* se desconoce, pero siempre el componente mayoritario es la cutina (compuesto formado principalmente por ácidos grasos de 16 carbonos), ya que constituye una proporción que varía desde 40 a 80 % del peso (Tafolla-Arellano et al. 2013).

Los diferentes tejidos se distinguen gracias a la coloración diferencial: la safranina tiñe aquellas paredes que tengan lignina (xilema y esclerénquima), y el azul alcian las que tengan celulosa (parénquima y floema). La descripción de los tejidos está basada en los *Cuadernos de Histología Vegetal* de Cortés Benavides (1986).

Tejidos:

- Epidermis (ep): la epidermis es un tipo de tejido protector que recubre los tallos jóvenes. Está formada por una sola capa de células vivas íntimamente unidas, en nuestro caso bastante alargadas. Como peculiaridad de *E. distachya* subsp. *distachya* podemos señalar que esta fila de células de la epidermis presenta formas sinuosas, nada regulares, con muchos entrantes y salientes.
- Parénquima de la corteza (pc): está compuesto por varias capas de células alargadas con cloroplastos. Su función es realizar la fotosíntesis. El contorno sinuoso que presenta el tallo se corresponde con fibras ininterrumpidas de esclerénquima (fescl) que se sitúan debajo de la epidermis formando los salientes. Se observan también numerosos espacios intercelulares (ei).

Cilindro central:

- Floema (fl): el floema es el tejido vascular que conduce la savia elaborada. En el caso de las Gimnospermas está formado por tubos cribosos, constituidos por filas de células vivas cuyos tabiques de separación están perforados para permitir el paso de la savia elaborada. En la imagen 23 se observa que el floema está formado por varias filas de células empaquetadas, y situado en la parte más externa del haz vascular, separado del xilema por el cambium.
- Cambium (cb): es un tejido meristemático secundario (encargado del crecimiento de los tallos y raíces en grosor) que produce xilema y floema. En la imagen 23 se

observan, teñidas de azul claro, dos filas de células entre en xilema y el floema, que conforman este tejido. En muchos de los cortes apenas se observa, ya que frecuentemente se fragmenta durante el proceso.

- Xilema (xl): el xilema es el tejido vascular que conduce la savia bruta, y está constituido por filas de células muertas huecas, cuyas paredes están lignificadas, y entre las cuales los tabiques están perforados (en el caso de las Gimnospermas). En la imagen 23 se observa claramente como los vasos del xilema (teñidos de color rosa claro) están situados en la parte más interior del haz vascular, y está rodeado de fibras de esclerénquima.
- Esclerénquima (fescl): aunque se observa mucho mejor en los cortes de la raíz, el tallo también presenta fibras de esclerénquima alrededor de los vasos del xilema. El esclerénquima es un tejido de sostén que proporciona resistencia. Está constituido por células muertas cuyas paredes están impregnadas de lignina.
- Parénquima de la médula (pme): los tejidos parenquimáticos sirven de relleno o unión entre unos tejidos y otros. Están formados por células vivas entre las que existen, por lo general, numerosos espacios intercelulares para permitir la circulación de gases por el interior de la planta. El parénquima medular sirve como almacén de sustancias. En el caso de *E. distachya* subsp. *distachya* existen numerosos cristales de oxalato cálcico (coxc) -estructuras angulosas teñidas de naranja-, que proporcionan mayor rigidez al tallo.

Aunque en ninguna de las imágenes tomadas se observan los estomas, hay estudios referentes a otras especies del mismo género (*E. triandra* Tul. y *E. tweediana* C.A. Mey.) que los sitúan en el tallo, en concreto en los entrantes de la epidermis (Scaglione et al., 1989).

4.1.2- Descripción de los tejidos de la raíz

Puesto que muchos de los tejidos ya se han descrito en el apartado 4.1.1. porque aparecen también en el tallo, me limitaré en este apartado a señalar las diferencias con la raíz y a describir aquellos exclusivos de dicho órgano.

- Epidermis (ep): como se observa en la imagen 24, la corteza está formada por 8-10 capas de células lignificadas, razón por la cual fue tan complicado obtener un corte de raíz válido para la observación de sus tejidos.
- Parénquima de la corteza (pc): en las imágenes 24 y 26 se observa claramente que el parénquima de la corteza está formado por células redondeadas, cuyas paredes están teñidas de color azul violáceo, y entre ellas existen espacios intercelulares cuya función es permitir la circulación de los gases.

Cilindro central:

- Floema (fl): se observa de forma menos clara debido a que, como ya se ha mencionado, sus paredes no son rígidas y están fragmentadas, lo que hace que se

rasguen al realizar los cortes. Aún así se puede ver que son células alargadas y empaquetadas (al igual que en el tallo).

- Cambium (cb): en muchos de los cortes apenas se observa, ya que frecuentemente se fragmenta, aunque si se visualiza bastante bien en la Imagen 26, teñido de azul, entre el xilema y el floema.
- Xilema (xl): los vasos del xilema están situados en el cilindro interno de la raíz, colocados de manera irregular, y rodeados de fibras de esclerénquima.
- Fibras de esclerénquima (fescl): son mucho más abundantes en la raíz que en el tallo. Se observa claramente (Imágenes 24, 25 y 26) como rodean y dan soporte a los vasos del xilema.

4.1.3.- Descripción de los tejidos de la hoja (escama)

Las hojas están reducidas a escamas y tienen una estructura muy simple: una epidermis, un mesófilo formado por células de parénquima más o menos regulares y haces vasculares muy reducidos, que en la escama estudiada estaban en formación.

- Epidermis (ep): en el caso de la hoja (o escama) existe una epidermis superior o epidermis del haz, recubierta por una cutícula y con pocos estomas; y una epidermis inferior o del envés, con cutícula más fina y muchos estomas. En este caso la escama es bastante simple y está aún en desarrollo, con lo que en las imágenes apenas se observa esta capa.
- Mesófilo (ms): es un tejido parenquimático clorofílico situado entre las dos capas epidérmicas. En una hoja de Angiosperma se diferenciaría un parénquima empalizada y un parénquima lagunar. En el caso de las Gimnospermas, las hojas o escamas son mucho más simples y solo constan de células parenquimáticas redondeadas situadas muy cerca unas de otras.
- Haces vasculares (hvc): solo se observan 2 muy pequeños en la imagen 29, en uno de los cuales (el que está marcado) puede distinguirse xilema y floema.

A continuación se muestran las imágenes de las mejores muestras de tallo, raíz, y escama obtenidas con los correspondientes tejidos indicados, todas ellas realizadas en el trabajo (elaboración propia).

Imagen 20: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal del tallo (x10). xl: xilema; pm: parénquima medular; fl: floema; cb: cambium; ep: epidermis; cc: cutícula de ceras; pc: parénquima de la corteza; coxc: cristales de oxalato cálcico.

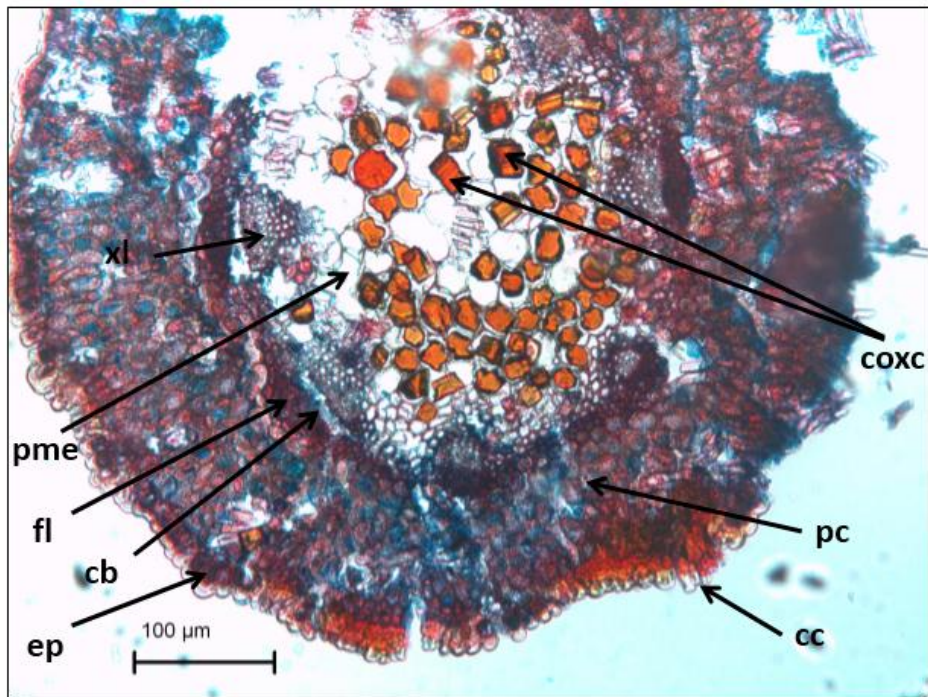


Imagen 21: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal del tallo (x10). pm: parénquima medular; ep: epidermis; cc: cutícula de ceras; pc: parénquima de la corteza; ei: espacios intercelulares; hvc: haces vasculares; fescl: fibras de esclerénquima.

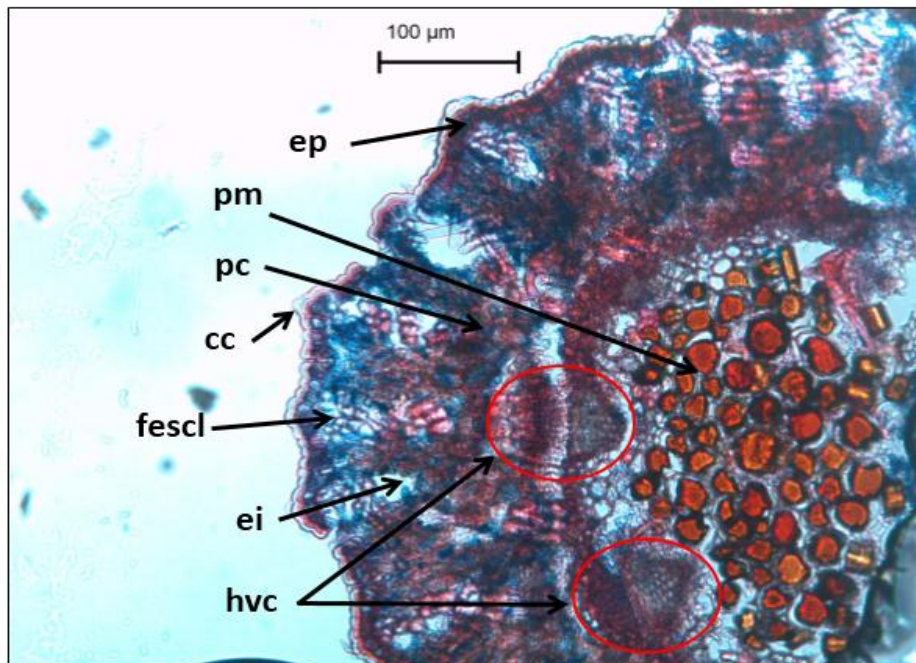


Imagen 22: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal del tallo (x20). ep: epidermis; cc: cutícula de ceras; ei: espacios intercelulares; fescl: fibras de esclerénquima.

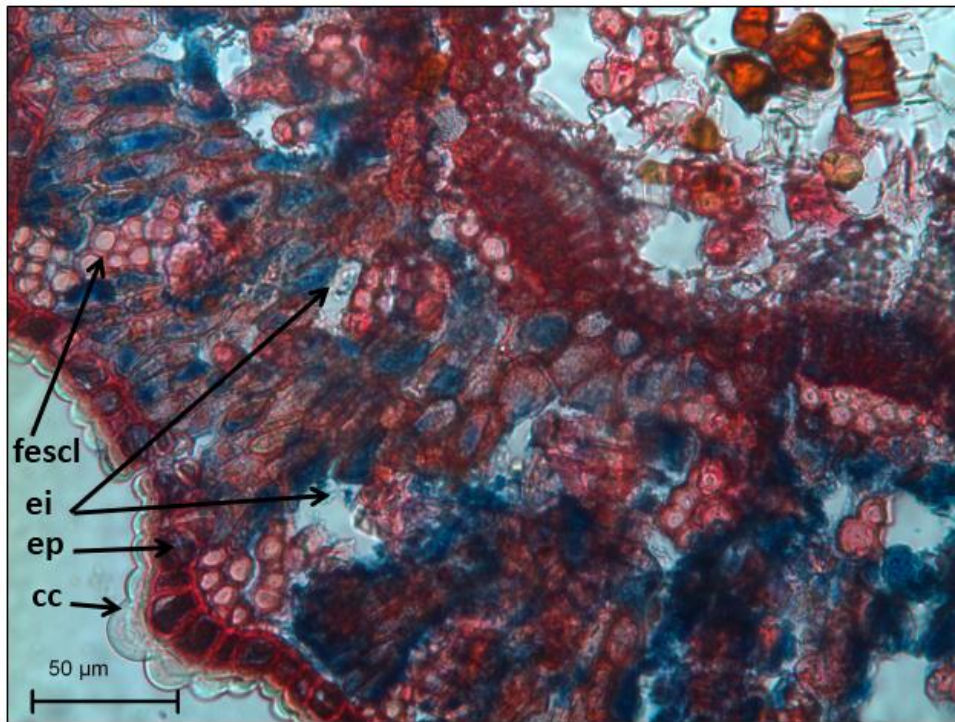


Imagen 23: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Detalle de un haz vascular (x40). fl: floema; cb: cambium; vxl: vasos del xilema.

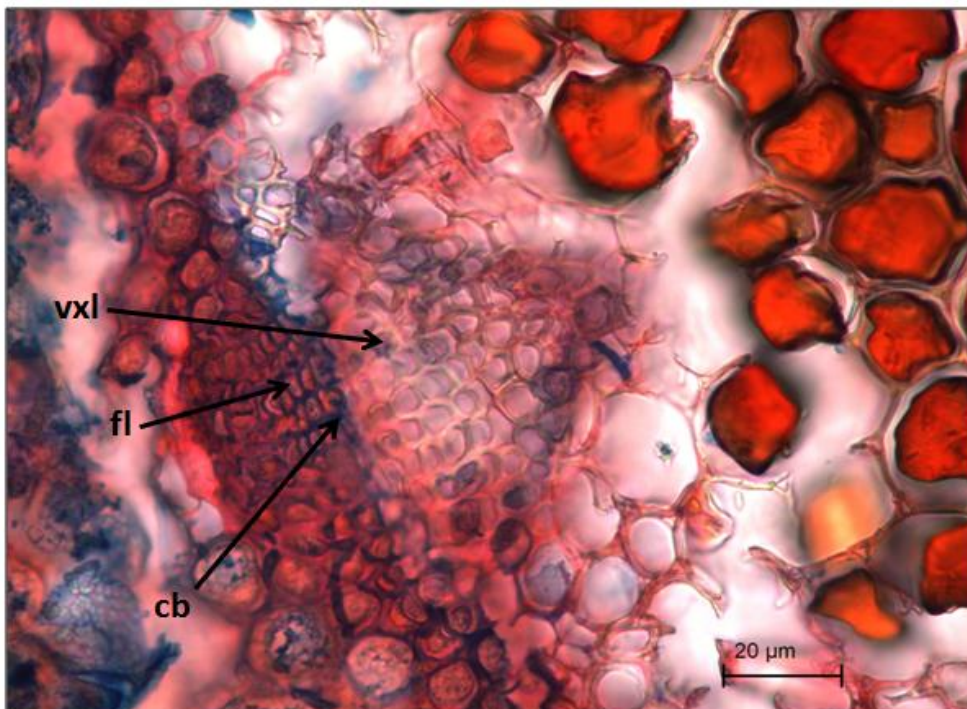


Imagen 24: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal de la raíz (x20). ep: epidermis; pc: parénquima de la corteza; fescl: fibras de esclerénquima; vxl: vasos del xilema; fl: floema.

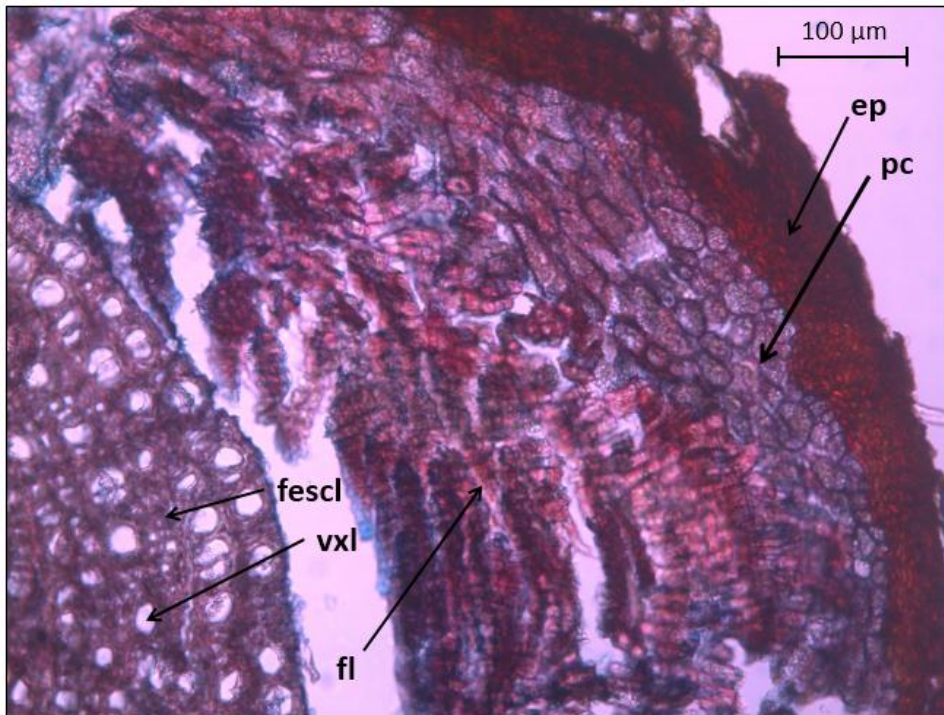


Imagen 25: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal de la raíz (x20). ep: epidermis; pc: parénquima de la corteza; fescl: fibras de esclerénquima; vxl: vasos del xilema; fl: floema.

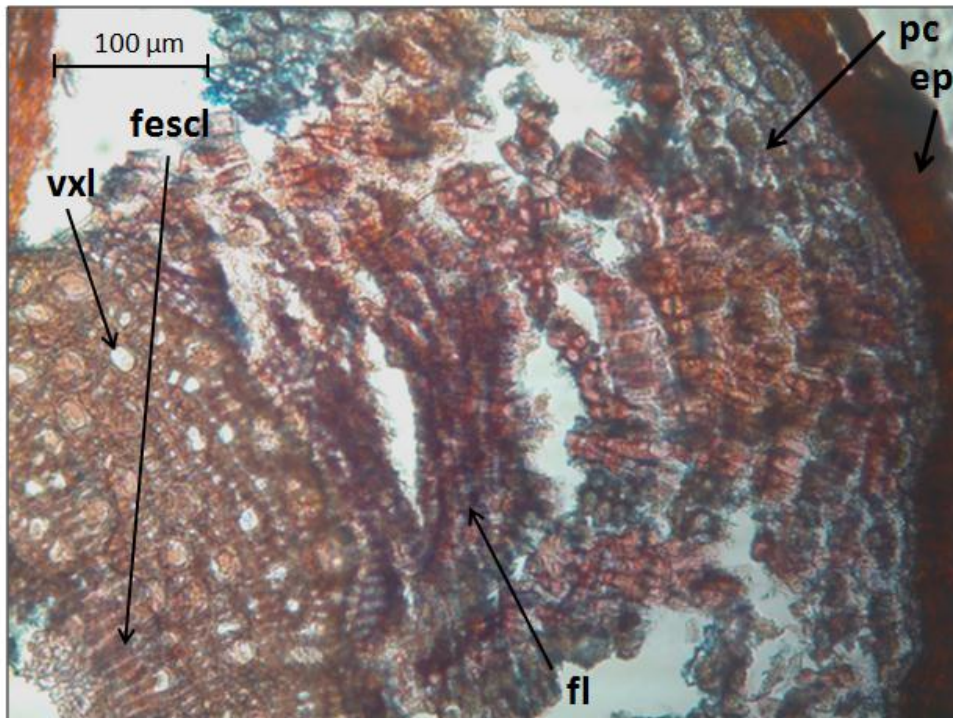


Imagen 26: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal de la raíz. ep: epidermis; pc: parénquima de la corteza; fescl: fibras de esclerénquima; vxl: vasos del xilema; fl: floema; cb: cambium.

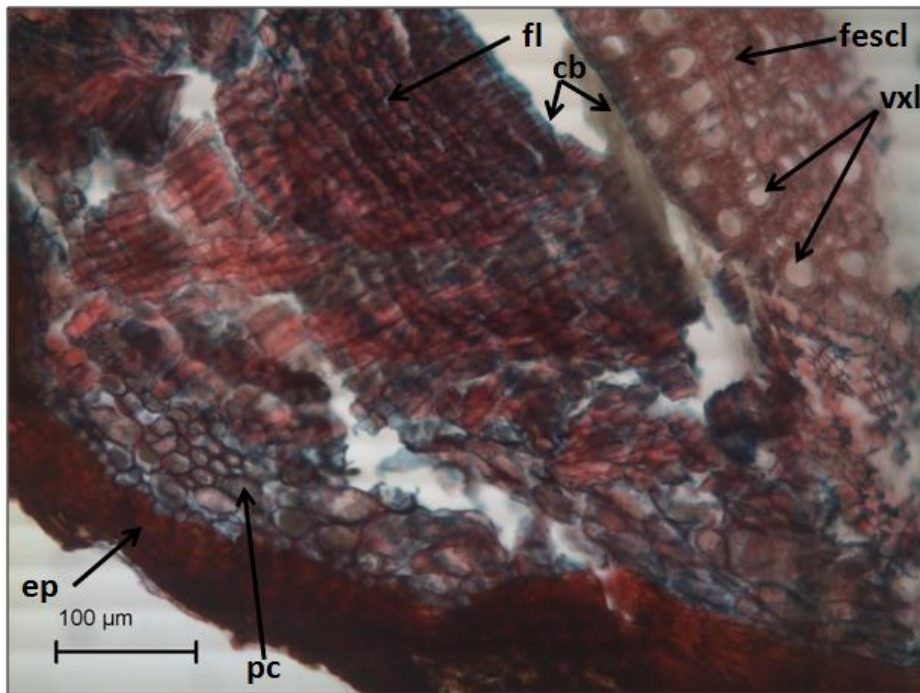


Imagen 27: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal de la escama aún enrollada y en formación (x20). Únicamente se observa de forma clara el parénquima del mesófilo. Las escamas comienzan su desarrollo a principios de otoño y lo acaban en junio-julio.

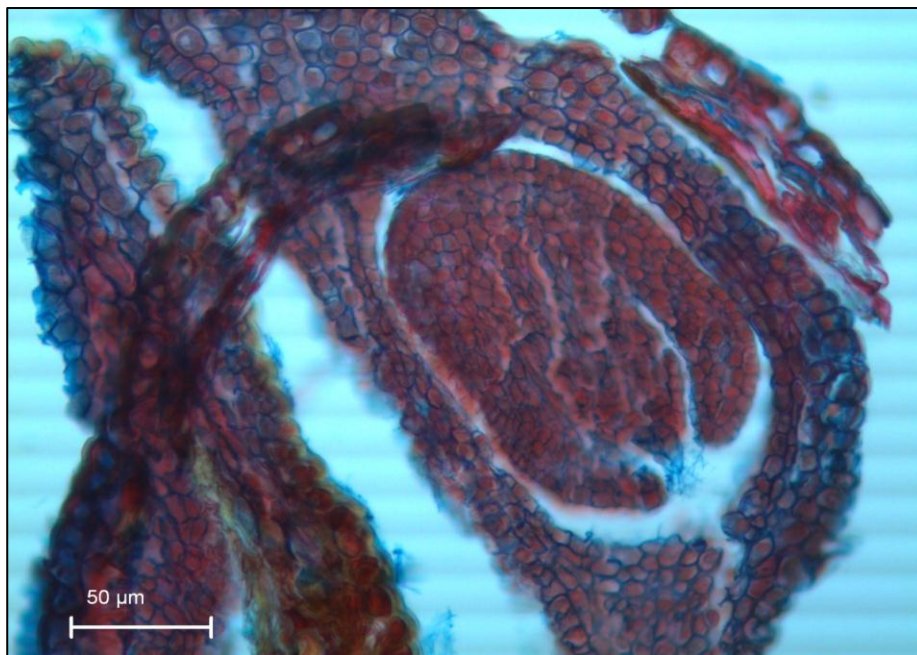


Imagen 28: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal de la escama (x20). ms: mesófilo; coxc: cristales de oxalato cálcico.

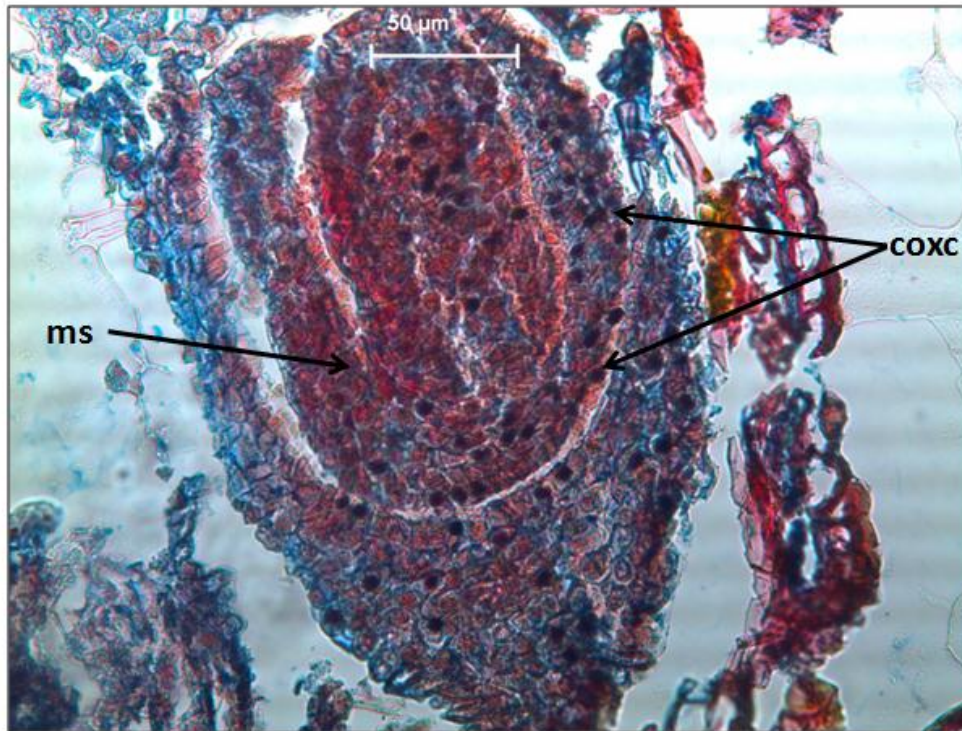
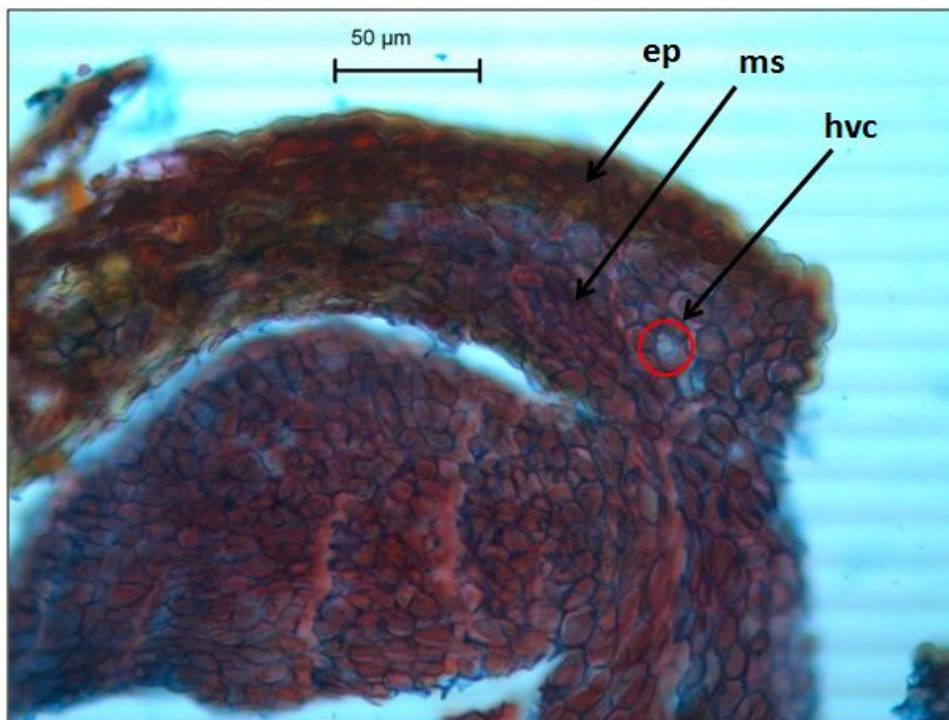


Imagen 29: *Ephedra distachya* subsp. *distachya*. Corte transversal de la escama (x20). ep: epidermis; ms: mesófilo; hvc: haz vascular.



4.2. Cariología

El género *Cerastium*, desde el punto de vista cariológico, presenta una gran complejidad y diversidad en su dotación cromosomática (CCDB, 2015). Tiene una serie aneuploide de $2n = 15, 17, 18, 19, 20, 26, 27, 33, 34, 35, 36, 37, 45, 54, 72$. De estos números, los más frecuentes son $2n = 18, 36$ y 72 , por lo que se trata de un género con un número cromosomático básico de $x = 9$, con especies diploides ($2x$), tetraploides ($4x$), hexaploides ($6x$) y octoploides ($8x$) y con especies aneuploides.

Según la bibliografía consultada, únicamente se han llevado a cabo 6 recuentos cromosómicos de *Cerastium dubium* (anteriores a este trabajo) en todo el mundo, todos ellos de $2n = 38$ a excepción del realizado en Norte América por Schildneck & Jones de $n = 18$. Ninguno de los recuentos realizados anteriormente se llevó a cabo en la Península Ibérica.

Tabla 2: Recuentos cromosómicos de *Cerastium dubium* realizados.

TAXÓN	n	2n	AUTOR	ORIGEN
<i>Cerastium dubium</i> (Bast.) O. Schwarz	---	38	Söllner, 1954	Francia
<i>Cerastium dubium</i> (Bast.) Guépin	---	38	Majovsky et al., 1970	Checoslovaquia
<i>Cerastium dubium</i> (Bast.) Guépin	---	38	Aryavand & Favarger, 1980	Irán
<i>Cerastium dubium</i> (Bast.) Guépin	18	---	Schildneck & Jones, 1986	Norte América
<i>Cerastium dubium</i> (Bast.) Guépin	19	---	Çelebioglu & Favarger, 1993	Turquía
<i>Cerastium dubium</i> (Bast.) Guépin	---	38	Starlinger, 2000	Austria

Fuente: Elaboración propia.

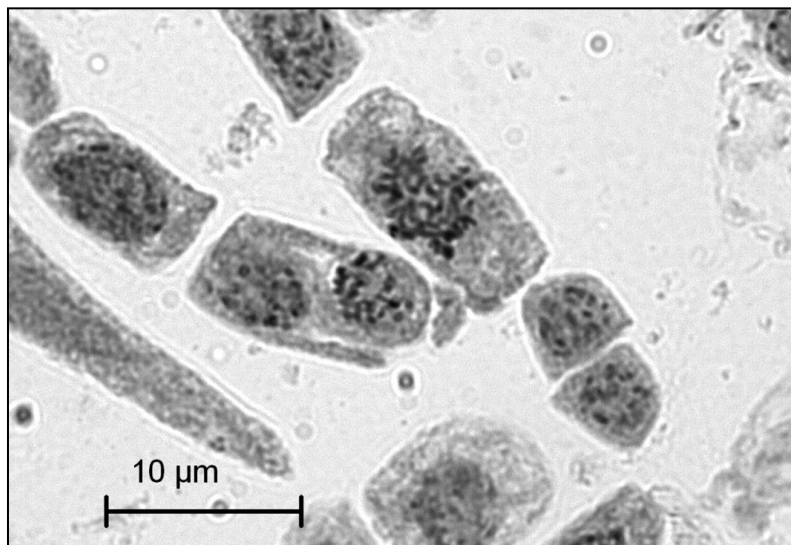
NOTA: Çelebioglu & Favarger consideraron el recuento de $n=18$ (Schildneck & Jones, 1986) como sorprendente.

Se han realizado un total de 12 preparaciones, de las que solo 2 podrían ser válidas para realizar un recuento cromosómico fiable. En estas preparaciones se localizaron únicamente 2 células en las que se intentó realizar un recuento cromosómico. Se han realizado las fotografías pertinentes de estas dos células para el estudio.

Como ya se ha explicado en el apartado 3.2.2., interesa que las células estén en metafase, vista polar. Excepto estas dos células, el resto del material o no se encontraba en

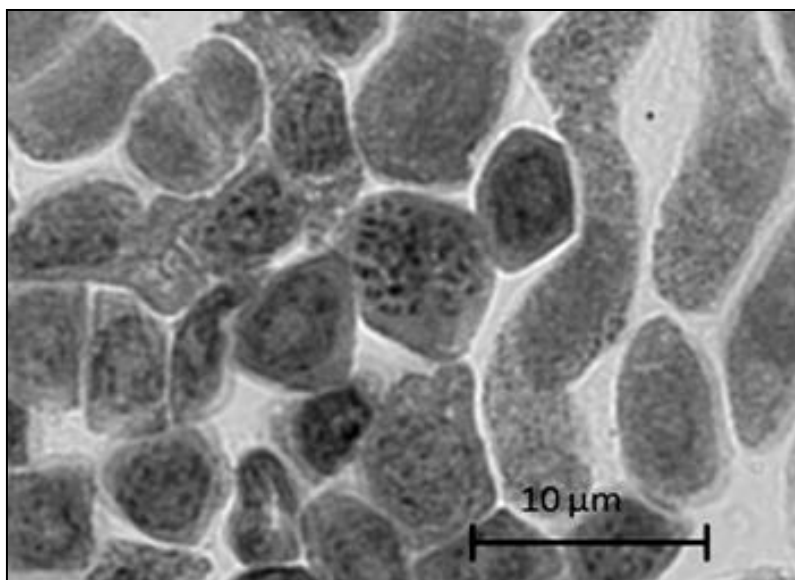
división celular (la mayoría) o las fases observadas eran diferentes a metafases polares. Además, hay que resaltar que los cromosomas de *C. dubium* son extremadamente pequeños ($0,5 \mu\text{m}$, aproximadamente), y aparecen muy juntos (como podemos observar en las siguientes figuras) y esto produce una complicación a la hora de realizar el recuento. Por lo tanto, aunque no se ha encontrado una célula en la que se haya podido contar el número exacto de cromosomas, si podemos decir que el número cromosómico diploide está en torno a los 38 cromosomas ($2n = c. 38$). No obstante, sería necesario realizar más preparaciones para encontrar células aptas para confirmar dicho número.

Imagen 30: *Cerastium dubium*. Célula en metafase ($\times 1000$). $2n = c.38$



Fuente: Elaboración propia.

Imagen 31: *Cerastium dubium*. Célula en metafase ($\times 1000$). $2n = c.38$



Fuente: Elaboración propia.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones relativas al estudio histológico de *Ephedra distachya* subsp. *distachya* son las siguientes:

- El estudio histológico de *Ephedra distachya* subsp. *distachya* es novedoso, puesto que no se había realizado hasta la fecha.
- La epidermis del tallo está formada por una capa de células regulares, aplanadas e íntimamente unidas recubierta por una cutícula cerosa. Tiene una morfología peculiar ya que presenta formas sinuosas e irregulares, con continuos entrantes y salientes, debidos a las fibras ininterrumpidas de esclerénquima (fesc1) que se sitúan debajo de la epidermis.
- *Ephedra distachya* subsp. *distachya* no tiene hojas como tal, solo escamas de tamaño bastante reducido y mucho menos evolucionadas que las hojas de Angiospermas.
- Se observan numerosos cristales de oxalato cálcico entre las células que conforman el parénquima medular del tallo, y también algunos en la escama.
- Es una especie con raíz muy leñosa, que presenta una corteza bastante gruesa formada por 8-10 capas de células lignificadas.
- Abundan las fibras de esclerénquima en el cilindro central de la raíz, rodeando por completo a los vasos del xilema, proporcionando rigidez y protección.

Las conclusiones relativas a la parte de Cariología de *Cerastium dubium* con las siguientes:

- Se ha realizado por primera vez en España el recuento de la especie *Cerastium dubium*, el número propuesto es de $2n = c.38$.
- Dicho número coincide con la mayoría de recuentos realizados anteriormente (véase Tabla 2), excepto con el realizado en Norte América por Schildneck & Jones de $n = 18$.
- Los cromosomas de *Cerastium dubium* son muy pequeños (alrededor de 0,5 micras). Este hecho y el que los cromosomas se encontraron muy próximos entre sí, impidieron realizar un recuento cromosómico fiable.

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1.- Listado de documentos

Amaral Franco, J. 1986. *Ephedra* L. In: Castroviejo, S., Lainz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz Garmendia, F., Paiva, J., & Villar, L. Vol. I Lycopodiaceae – Papaveraceae. Flora ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.

Aryavand, A. & Favarger, C. 1980. *Cerastium dubium*. $2n=38$. Contribution à l'étude cytotaxonomique des Caryophyllacées de l'Iran. – Biol. Ecol. Médit. 7: 15-26.

Çelebioglu, T. & Favarger, C. (1993). In: Kamari, G., Felber, F. & Garbari, F. (eds.): Mediterranean chromosome number reports 3 (125-166). Fl. Medit. 3: 323-333.

Cortés Benavides, F., (1986). Cuadernos de Histología Vegetal. Universidad de Sevilla (España). 190pp.

Delgado Sánchez, L., López González, B., & Rico Hernández, E. 2010. *Cerastium dubium* (Bast.) Guépin. "Trabajos científicos vinculados al desarrollo del Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el que se crean el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora". Consejería de Fomento y Medio Ambiente. Castilla y León.

García Marcos, J.M. (1994). Estudio edafológico del sector Arapiles-Salamanca-Zamayón. Tesis doctoral de la Universidad de Salamanca.

La Cour, L. F., (1954). Smear and squash techniques in plant cytology. *Lab. Practique* 3: 326-330.

Ladero, M., Valle, C.J., Amor, A., Santos, M.T., Santos, F. & Gutiérrez, A. (1997). Halosubnitrophilous pastures of the west of the regional community of Castilla y León (Spain). *Phytocoenología* 27 (4): 573-588.

Majovsky, J. et al. 1970. *Cerastium dubium*. $2n=38$. Index of chromosome numbers of Slovakian Flora. Part 2 (Determinavit Vachova). – Acta Fac. Rerum Nat. Univ. Comeniana Bot. 18: 45-60.

Moreno, J.C., coord. (2008). Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), Madrid, 86 pp.

Rico Hernández, E. 1990. *Cerastium* L. In: Castroviejo, S., Lainz, M., López González, G., Montserrat, P., Muñoz Garmendia, F., Paiva, J., & Villar, L. Vol. II Platanaceae – Plumbaginaceae (partim). Flora ibérica. Plantas Vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.

Sánchez Agudo, J.A., Rodríguez de la Cruz, D., & Delgado Sánchez, L. 2010. *Ephedra distachya* L subsp. *distachya*. "Trabajos científicos vinculados al desarrollo del Decreto 63/2007, de 14 de junio, por el que se crean el Catálogo de Flora Protegida de Castilla y León y la figura de protección denominada Microrreserva de Flora". Consejería de Fomento y Medio Ambiente. Castilla y León.

Santos Francés, F. y Martínez Graña, A. Eds. (2014). "Itinerario edafológico por la provincia de Salamanca: La Armuña - La Dehesa - La Sierra de Francia". Unidad docente de Edafología y departamento de Geología de la Universidad de Salamanca.

Scaglione, L.L., & Gurni, A.A. 1989. Anatomía Caulinar Comparada de *Ephedra triandra* Tul. emend. Hunz. y *E. tweediana* Fisch et Mey emend. Hunz. Acta Farmacéutica Bonaerense 8 (3): pp 165-170. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires (Argentina).

Shildneck, P. & Jones A.G. 1986: *Cerastium dubium* (Caryophyllaceae). New for the half of North America. – Castanea 51: 49-55.

Söllner, R. 1954. *Cerastium dubium*. 2n=38. Recherches cytotaxonomiques sur le genre *Cerastium*. – Phytion 23: 127-139.

Starlinger 2000. *Cerastium dubium*. 2n=38. Dobês, C., & Vitek, E. Documented Chromosome Number. Checklist of Austrian Vascular Plants. Museum of Natural History. Vienna.

Tafolla-Arellano, J.C.¹, González-León, A.¹, Tiznado-Hernández, M.E.¹, Zacarías García, L.², y Báez-Sañudo, R.¹. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas.

¹Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.

²Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas., Paterna. Valencia, España.

Tolivia, J. (1987). Fasga: A new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *Journal of Microscopy*. Vol 148: 113-117.

UICN. (2001). *Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1*. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido.

6.2.- Listado de páginas webs y bases de datos

IPCN Chromosome Reports: <http://www.tropicos.org/Project/IPCN> [noviembre 2015 y junio 2016].

Rice, A., Glick, L., Abadi, S., Einhorn, M., Kopelman, N. M., Salman-Minkov, A., Mayzel, J., Chay, O. and Mayrose, I. The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist* (2014): <http://ccdb.tau.ac.il/> [noviembre 2015 y junio 2016].

Castroviejo, S. (coord. gen.). 1986-2012. Flora ibérica 1-8, 10-15, 17-18, 21. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid: <http://www.floraiberica.es/> [14 junio 2016].

Mapa Geológico de España 1:50.000 (MAGNA 50). Hojas 452 y 478. Instituto Geológico y Minero de España. Ministerio de Economía y Competitividad: <http://info.igme.es/cartografiadigital/geologica/Magna50.aspx?language=es> [11 junio 2016].