

OBSERVACIONES MORFOLÓGICAS Y ANATÓMICAS EN NÚCULAS DE MELISSA L. (LAMIACEAE) EN EL SUROESTE DE ESPAÑA

M^a A. MARTÍN MOSQUERO, J. PASTOR & R. JUAN
Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Apartado 1095, 41080 Sevilla
(Recibido el 11 de Julio de 2003)

Resumen. Se estudia la morfología y anatomía de núculas de *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* y subsp. *altissima*, tanto al microscopio óptico como al electrónico de barrido. Existen diferencias en la pared tangencial externa de las células mucilaginosas y no mucilaginosas. Anatómicamente, hay que destacar en el epicarpo grupos de células grandes y con alto contenido mucilaginoso. El grosor del mucílago en la subsp. *altissima* es el doble que en la subsp. *officinalis*. Por último indicar que la dispersión de las núculas es balística.

Summary. The aim purpose is to study the morphology and anatomy of nutlets of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and subsp. *altissima*, using light and scanning electron microscopy. There are differences in the outer tangential wall of mucilaginous and not mucilaginous cells. Anatomically, the occurrence of groups of big cells with much mucilage in the epicarp is remarkable. The mucilage in subsp. *altissima* is twice as thick as in subsp. *officinalis*. Lastly, it should be noted that the dispersal system of nutlets is ballistic.

INTRODUCCIÓN

El género *Melissa* se halla ampliamente distribuido por las regiones del centro y sur de Europa, norte de África, centro de Asia y Persia y la Macaronesia (WILLIS, 1966). De las tres especies reconocidas por HYAM & PANKHURST (1995), dos de ellas están presentes en Europa (FERNÁNDES, 1972). La *Flora Vascular de Andalucía Occidental* sólo indica la presencia de *Melissa officinalis* subsp. *altissima*; ampliamente distribuida por todo el territorio, aunque recientemente (MARTÍN MOSQUERO, 2001) se han localizado varias poblaciones de la subsp. *officinalis*, siendo su presencia debida, probablemente, a la existencia de antiguos cultivos en la zona. Ambos taxones se han encontrado en lugares húmedos, junto a cursos de agua, fundamentalmente en la Sierra de Huelva, muy cerca de huertos y ribazos.

Son hierbas perennes, con hojas basales pecioladas y caulinares sentadas. Flores en espiga de verticilastros distanciados. Cáliz bilabiado, con 13 nervios. Corola bilabiada blanca, crema o rosada, con labio superior plano, ligeramente emarginado y labio inferior con tres lóbulos, el central más grande que los laterales. Estambres con filamentos convergentes y tecas divergentes. Estilo con ramas desiguales.

Es un género muy conocido y cultivado como medicinal y por su contenido en esencias con un olor agradable a limón (FONT QUER, 1980). La mayoría de los trabajos acerca de este género son estudios fitoquímicos sobre el contenido en aceites esenciales, en flavonoides o heterósidos volátiles, como los realizados por CORSI & al. (1979), MULKENS & al. (1985), o MULKENS & KAPETANIDIS (1987, 1988). No obstante, más recientemente destaca el estudio molecular de WOLF & al. (1999) que, utilizando secuencias de ADN, apoya la diferenciación de las subespecies de *M. officinalis*.

Respecto a las núculas, además del estudio anatómico de WAGNER (1914) en *Lamiaceae* de la flora de Francia, merece mención el trabajo de WOJCIECHOWSKA (1961) sobre morfología y anatomía de las mismas en especies de la subfamilia *Stachyoideae*, donde incluye este género, así como el estudio micromorfológico de HUSAIN & al. (1990) en las núculas de algunas *Lamiaceae*, entre ellas las de *M. officinalis* s. l.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material estudiado fue fijado en FAA durante un mínimo de 24 horas, y a continuación se pasó a etanol al 70 % que actuó como líquido conservante hasta su posterior análisis. Los testigos se encuentran en el Herbario de la Universidad de Sevilla (SEV).

El estudio morfológico se realizó con núculas maduras, fijadas y sometidas a punto crítico. Este material se montó en portas utilizando adhesivo de doble cara. Seguidamente se metalizó con oro-paladio y posteriormente se examinó con un microscopio electrónico de barrido (M.E.B.) Philips LX-30. Los datos sobre longitud y anchura se basan en un muestreo de 50-160 núculas.

Para el estudio anatómico se utilizaron núculas en distinto grado de madurez, fijadas y deshidratadas mediante la serie de alcohol butílico terciario (JOHANSEN, 1940). A continuación, fueron incluidas en parafina y se cortaron a 9-12 μm de grosor. Una vez montadas las secciones, se tiñeron con safranina alcohólica al 1 % y fast-green alcohólico al 0.1 %, y se montaron de modo permanente para su posterior observación al microscopio óptico (M.O.) Los dibujos de los cortes anatómicos se han realizado con ayuda de una cámara clara.

Para la terminología se ha seguido principalmente a FONT QUER (1993) y STEARN (1992).

El estudio del mucílago se hizo sobre núculas que se colocaron durante un máximo de 48 horas en cámara húmeda y a las que se les realizó el "Test del agua destilada" (ALBURQUERQUE & ANDRADE, 1998). Las que presentaban mucílago fueron sometidas a una solución de fast-green (0,1%) en alcohol de 70° durante unos segundos, lo que tiñó ligeramente el mucílago y permitió medir el grosor del halo. Se midieron 25 núculas por taxón. También se tomaron muestras del mucílago, se montaron en un portaobjetos sobre el que se colocó un cubreobjetos previamente humedecido con una gota de agua destilada, y se analizaron las preparaciones con ayuda del M. O.

Material estudiado

a) subsp. *officinalis*. **Huelva**: Galaroza, junto al río Múrtiga, 19.IX.1997, *Martín Mosquero & Santa-Bárbara* (SEV 153985).

b) subsp. *altissima* (Sibth. & Sm.) Arcang. **Córdoba**: Trassierra, 30.VII.1996, *Martín Mosquero & Ocaña* (SEV 153548). Entre Palma del Río y Las Navas de la Concepción, junto a arroyo, 17.IX.1996, *Garrido & Martín Mosquero* (SEV 153684). **Huelva**. Galaroza, arcén húmedo, 12.VIII.1996, *Martín Mosquero & Ocaña* (SEV 153587). Entre Cortegana y Aroche, entrada a cortijo, 12.VIII.1996, *Martín Mosquero & Ocaña* (SEV 153594). Puerto Moral, junto a arroyo, 5.X.1996, *Martín Mosquero & Muñoz* (SEV 153694). **Sevilla**. Entre Cantilla y El Pedroso, junto a arroyo, 25.VII.1996, *Martín Mosquero* (SEV 153550).

RESULTADOS

Núculas de 1.0-1.7 x 0.5-0.8 mm, leñosas. De contorno estrechamente obovado a oblongo, trígonoas hacia la base. Ápice redondeado y base aguda. Hilo blanquecino, de contorno subcircular, localizado en la base de la cara ventral, donde se observan depósitos esféricos de ceras. De color negro; brillante. Simetría dorsiventral. Superficie lisa, formada por dos tipos de células poligonales: unas de paredes radiales no visibles o ligeramente superficiales y tangencial externa lisa o ligeramente estriada y de planas a convexas, y otras de paredes radiales no visibles y tangencial externa de rugada a verruculada (Fig. 1 A-C, E-H).

Pericarpo de 93-150 μm de grosor. *Epicarpo* de 20-32 μm , formado por una capa en la que se distinguen dos tipos de célula: unas ligeramente más elevadas con contenido mucilaginoso oscuro, más o menos isodiamétricas, de paredes delgadas; y otras no mucilaginosas, algo más pequeñas que las anteriores, alargadas radialmente y con paredes delgadas; cutícula de aproximadamente 3-4 μm de grosor. *Mesocarpo* de 17-34 μm , en el que se observan dos regiones bien diferenciadas: la más externa de 5-14 μm , formada por 2-3 capas de células rectangulares (a veces difícilmente diferenciables), intensamente teñidas y de paredes delgadas, y la más interna de 12-20 μm , formada por una capa de células de mayor tamaño y con paredes delgadas, siendo la tangencial interna normalmente cóncava. Capa en empalizada de 50-75 μm , constituida por esclereidas alargadas radialmente, de paredes engrosadas y un lumen central irregular con uno o a veces dos cristales de (7) 12-20 μm de diámetro en la zona apical. *Endocarpo* de 3-5 μm de grosor, formado por una capa de células más o menos rectangulares de paredes delgadas (Fig. 2 A, B).

Testa de aproximadamente 3-4 μm de grosor, formada por una capa de células más o menos isodiamétricas, intensamente teñidas y de paredes delgadas, siendo la tangencial externa ligeramente convexa (Fig. 2 A, B).

Mucílago continuo, formando un halo transparente, consistente y homogéneo de (0.2) 0.3-0.9 mm de grosor. Matriz mucilaginoso con espinas patentes, hebras helicoidales entrecruzadas y elementos peltados. En ocasiones se aprecia la pared tangencial externa de las células (Fig. 1 D, I).

a) subsp. **officinalis**

Núculas de 1.2-1.6 x 0.5-0.8 mm. Pared tangencial externa de las células mucilaginosas lisas y de las células no mucilaginosas verruculada (Fig. 1 C).

Pericarpo de 100-150 μm de grosor. *Mesocarpo* de 24-34 μm : región externa de aproximadamente 7-14 μm y región interna de 17-20 μm . Capa en empalizada de 50-75 μm .

Mucílago continuo, formando un halo de (0.2) 0.3-0.4 mm (Fig. 1 D).

b) subsp. **altissima**

Núculas de 1.0-1.7 x 0.5-0.8 mm. Pared tangencial externa de las células mucilaginosas ligeramente estriada y convexa, y de las no mucilaginosas rugada (Fig. 1 G-H).

Pericarpo de 93-139 μm de grosor. *Mesocarpo* de 17-30 μm : región externa de 5-10 μm y región interna de 12-20 μm . Capa en empalizada de 50-68 μm .

Mucílago continuo, formando un halo de (0.7) 0.8-0.9 mm (Fig. 1 I).

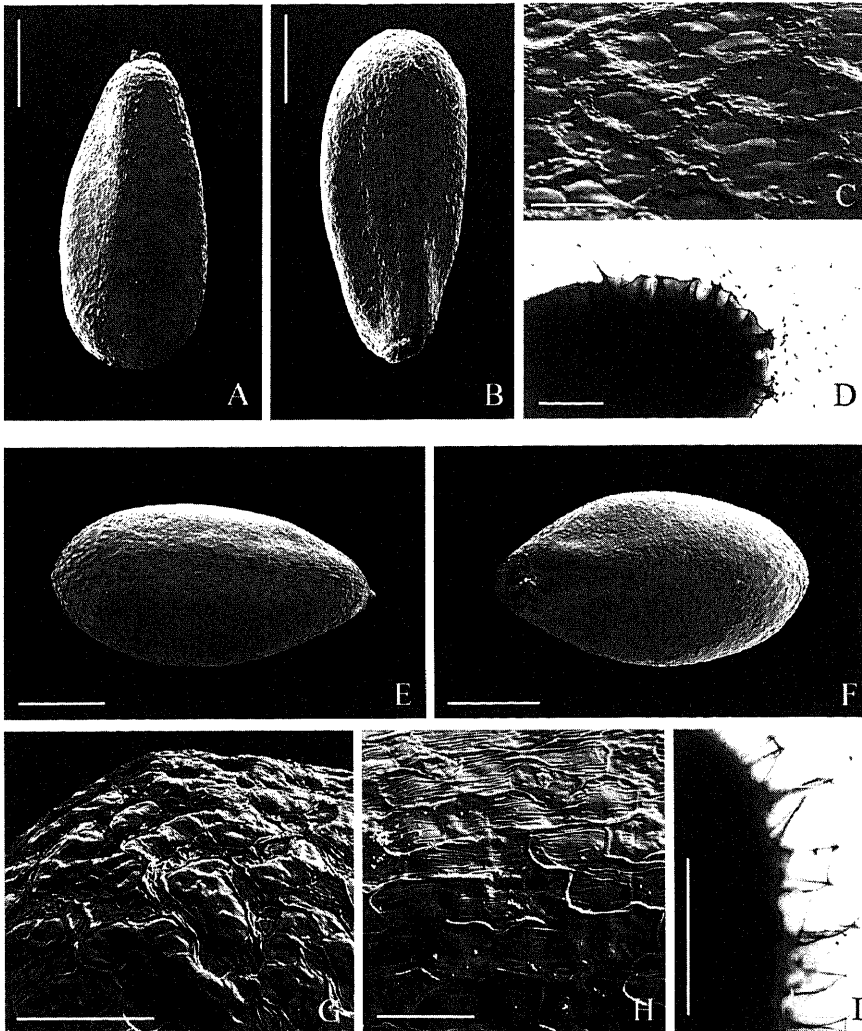


Fig. 1. A - D. *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. E - I. *M. officinalis* subsp. *altissima*. A, E, contorno dorsal; B, F, contorno ventral; C, G, H, detalle de la superficie; D, I, detalle del mucílago. Escalas: 500 μm (A, B, D, E, F, I); 100 μm (G); 50 μm (C, H).

DISCUSIÓN

La diferenciación de las dos subespecies de *M. officinalis* s. l. presentes en el área de estudio, resulta bastante compleja considerando únicamente los caracteres de las núculas tanto a nivel morfológico como anatómico. No obstante, la observación de las superficies de las núculas con ayuda del M.E.B. refleja la existencia de ligeras variaciones respecto al tipo de pared tangencial

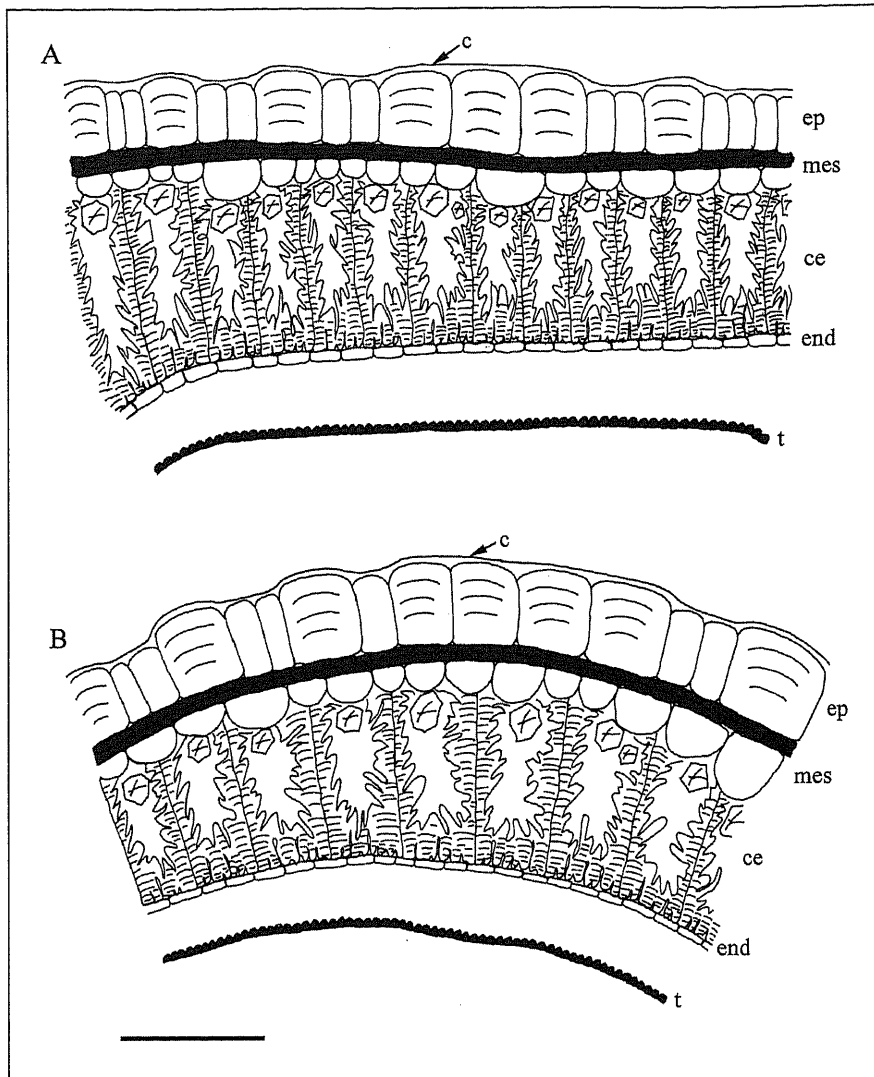


Fig. 2. Esquema de la estructura anatómica del pericarpo. A. *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*; B. *Melissa officinalis* subsp. *altissima*. Escala: 100 μ m.

externa que muestran las células mucilaginosas y no mucilaginosas en los dos taxones estudiados. Así, mientras que en la subsp. *officinalis* dicha pared es lisa en las células mucilaginosas y verruculada en las no mucilaginosas, en la subsp. *altissima* es ligeramente estriada y convexa en las primeras y rugada en las segundas; si bien, macroscópicamente la superficie de *M. officinalis* s. l. es lisa, como también destacan WOJCIECHOWSKA (1961) y HUSAIN & al. (1990).

En cuanto a la anatomía del pericarpo, de acuerdo con WAGNER (1914) y WOJCIECHOWSKA (1961), en estos dos taxones destaca la presencia de una capa de células parenquimáticas globosas y de mayor tamaño que el resto de células del mesocarpo, localizada justo sobre la capa esclerenquimática. No obstante, a pesar de que WOJCIECHOWSKA (1961) subraya la presencia de pigmentos en estas células, éstos no fueron observados ni por WAGNER (1914) ni en el presente estudio, donde se ha comprobado que dichas células no muestran afinidad por ninguno de los colorantes utilizados.

Igualmente, desde un punto de vista anatómico, en el epicarpo destaca la disposición de grupos de células grandes y con abundante contenido mucilaginoso, entre grupos de células más estrechas y carentes de mucílago. Aunque esta estructura también fue observada por WAGNER (1914) y WOJCIECHOWSKA (1961) difiere de los resultados obtenidos en que ambos autores, observaron una única célula no mucilaginosa, de morfología más o menos osiforme entre los grupos de células mucilaginosas. No obstante, ya sea una o varias células, su función probablemente sea la de actuar como pilares entre las mucilaginosas, evitando que el epicarpo se desorganice cuando estas últimas liberen el contenido tras ser hidratadas. De acuerdo con WAGNER (1914), este mismo fenómeno se puede observar en el epicarpo de *Lavandula spica* aunque la disposición de las células es diferente.

Por otra parte, también se observan ciertas discrepancias entre los resultados obtenidos y los aportados por WAGNER (1914) y WOJCIECHOWSKA (1961), en cuanto a la disposición de los cristales en las esclereidas de la capa empalizada. Así, mientras que en material francés y centroeuropeo de *M. officinalis* s. l. lo normal es que los cristales se localicen hacia la mitad de la célula, en el material del área de estudio generalmente se localiza hacia el ápice de la célula.

En cuanto al mucílago, el grosor del halo ha resultado ser un carácter importante en la diferenciación de los dos taxones estudiados. Así, en la subsp. *altissima* es el doble que en la subsp. *officinalis*, presentando al mismo tiempo mayor cantidad de elementos en la matriz, si bien el tipo de elementos es el mismo en las dos subespecies. La presencia de mucílago en el género fue observada con anterioridad por WAGNER (1914), WOJCIECHOWSKA (1961) y GRUBERT (1974, 1981), de los cuales el primero subraya la presencia de abundante contenido mucilaginoso en las células del epicarpo que son casi en su totalidad mucilaginosas.

Por último y de acuerdo con BOUMAN y MEEUSE (1992), al igual que en muchos géneros de *Lamiaceae*, la dispersión de las núculas en *M. officinalis* s. l. es balística. Sin embargo, no hay que olvidar las ventajas que confiere el mucílago a las mismas, propiciando la fijación al suelo y favoreciendo la atelecoria o la fijación al pelaje de los animales permitiendo la epizoocoria.

Agradecimientos. Los autores agradecen a Dña. A. Fernández (S.M.E.) la preparación de las muestras en punto crítico, y al Dpto. de Biología del Desarrollo de la Facultad de Medicina de Sevilla las facilidades prestadas para el uso del microtomo de parafina y la cámara de vacío.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBURQUERQUE, U. P. & L. C. ANDRADE (1998). El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el nordeste del Brasil. *Anales Jard. Bot. Madrid* **56**: 43-64.
- BOUMAN, F. & A. D. J. MEEUSE (1992). Dispersal in Labiatae. In R. M. HARLEY & T. REYNOLDS (eds.), *Advances in Labiatae Science*: 193-202. Royal Botanic Gardens. Kew.
- CORSI, G., I. MORELLI, A. M. PAGNI & S. CATALANO (1979). Osservazioni morfologiche, isto-anatomiche, cariológicas e fitoquímiche su *Melissa officinalis* s. l. (Lamiaceae). *Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Mem., Serie B* **86**: 331-353.
- FERNANDES, R. (1972). *Melissa*. In T. G. TUTIN & al. (eds.), *Flora Europaea* **3**. Cambridge University Press. Cambridge.
- FONT QUER, P. (1980). *Plantas Medicinales (El Dioscórides Renovado)*. 6ª edición. Labor. Barcelona.
- (1993). *Diccionario de Botánica*. Labor. Barcelona
- GRUBERT, M. (1974). Studies on the distribution of myxospermy among seeds and fruits of Angiospermae and its ecological importance. *Acta Biol. Venez.* **8**: 315-551.
- (1981). *Mucilage or gum in seeds and fruits of angiosperms*. Minerva Publikation. München.
- HUSAIN, S. Z., P. D. MARIN, C. ŠILIC, M. QAISER & B. PETCOVIC (1990). A micromorphological study of some representative genera in the tribe Saturejeae (Lamiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **103**: 59-80.
- HYAM, R. & R. PANKHURST (1995). *Plants and their names*. Oxford University Press. Oxford.
- JOHANSEN, D. A. (1940). *Plant microtechnique*. MacGraw-Hill Book Company. New York.
- MARTÍN MOSQUERO, M. A. (2001). Sobre *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* en Andalucía occidental. *Acta Bot. Malac.* **26**: 277-278.
- MULKENS, A. & I. KAPETANIDIS (1987). Flavonoides des feuilles de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). *Pharm. Acta Helv.* **62**: 19-22.
- & I. KAPETANIDIS (1988). Étude de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). *Pharm. Acta Helv.* **63**: 266-270.
- , E. STEPHANOU & I. KAPETANIDIS (1985). Hétérosides à génines volatiles dans les feuilles de *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). *Pharm. Acta Helv.* **60**: 276-278.
- STEARNS, W. T. (1992). *Botanical Latin*. David & Charles Book. Newton Abbott. London.
- WAGNER, S. (1914). *Contribution à l'étude anatomique du fruit des Labiées*. Thèse. Université de Paris.
- WILLIS, J. C. (1966). *A dictionary of the flowering plants and Ferns*. Cambridge University Press. Cambridge.
- WOJCIECHOWSKA, B. (1961). Fruits in the Middle European species of some genera of Stachyoideae. *Monogr. Bot.* **12**: 89-120.
- WOLF, H. T., T. VAN DEN BERG, F. C. CZYGAN, A. MOSANDL, T. WINCKLER, I. ZÜNDORF & T. DINGERMAN (1999). Identification of *Melissa officinalis* subspecies by DNA fingerprinting. *Pl. Med.* **65**: 83-85.