

Estudio del género *Polypodium* L. del noroeste Ibérico: Cantidades de DNA nuclear

N. REDONDO, A. BLANCO & M. HORJALES

*Departamento de Biología Vexetal e Ciencia do Solo. Facultade de Ciencias
Universidade de Vigo. 36200 Vigo*

(Recibido, diciembre 1998. Aceptado, mayo 1999)

Resumen

REDONDO, N., BLANCO, A. & HORJALES, M. (1999). Estudio del género *Polypodium* L. del noroeste Ibérico: Cantidades de DNA nuclear. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 9: 109-116

Se ha estudiado la cantidad de DNA nuclear, mediante citometría de flujo, de 123 plantas del género *Polypodium* procedentes de diferentes poblaciones naturales del Noroeste ibérico: *P. cambricum* (15 pg), *P. vulgare* (25 pg) y *P. interjectum* (37.5 pg) Señalamos, también la presencia de los híbridos *P. x font-queri* (19.5 pg), *P. x shivasiae* (27 pg) y *P. x mantoniae* (31 pg).

Palabras clave: *Polypodium*, taxonomía, contenido de DNA nuclear, citometría de flujo.

Abstract

REDONDO, N., BLANCO, A. & HORJALES, M. (1999). Study of the genus *Polypodium* in the Iberian northwest: Nuclear DNA content. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 9: 109-116

It has been studied the content of nuclear DNA by flow cytometry in 123 plants of the genus *Polypodium* from different natural populations of NW of Iberian Peninsula: *P. cambricum* (15 pg), *P. vulgare* (25 pg) y *P. interjectum* (37.5 pg). We indicate the presence of the hybrids *P. x font-queri* (19.5 pg), *P. x shivasiae* (27 pg) y *P. x mantoniae* (31 pg).

Key words: *Polypodium*, taxonomy, nuclear DNA content, flow cytometry.

INTRODUCCIÓN

El género *Polypodium* L. es un género complejo y de amplia distribución, representado en la Península Ibérica por tres especies: *P. cambricum* L., *P. vulgare* L. y *P. interjectum* Shivas.

El área de distribución de *P. cambricum* es Europa austral, Norte de África, Islas Atlánticas, etc.; *P. vulgare* va desde el Norte de Escandinavia hasta los Pirineos y Cordillera Cantábrica, siendo más raro cuanto más al sur (en Sierra Nevada se sitúa por encima de los 2000 m.) y *P. interjectum* abarca Irlanda, País de Gales, Suroeste de

Inglaterra y la costa del Continente Europeo, desde Portugal hasta Holanda (FERNANDES, 1968; JERMY, 1984; MONTSERRAT, 1982; SHIVAS, 1961b).

RUIZ DE AZÚA (1930) cita 13 variedades de *Polypodium vulgare* de la provincia de Pontevedra, y señala que es una de las especies de helechos que goza de mayor plasticidad. Estudios posteriores de diversos autores (SHIVAS, 1961a; ROBERTS, 1970; ROBERTS & SYNNOTT, 1972; NARDI, 1977; ROBERTS, 1980; PICHISERMOLLI, 1987) destacan que el género *Polypodium* es un grupo con un gran polimorfismo

tanto en las entidades boreales como en las australes. Según FERNANDES (1968) los criterios morfológicos son insuficientes para la distinción entre las subespecies de *Polypodium*. Si a ello se le añade el hecho de que, debido a la existencia de formas poliploides, ciertos caracteres parecen sufrir gran variación, resulta complicado establecer los límites entre los taxones (FERNANDES, 1968).

La presencia de paráfisis no es un carácter suficientemente identificativo, ROBERTS (1970) señala que se han encontrado en algunos individuos de *P. interjectum* y *P. vulgare* en Holanda y en Alemania, respectivamente. Las paráfisis son caducas y pueden llevar a errores en la identificación de los taxones, como señala FERNANDES (1968). Pese a todo, la presencia de paráfisis es el mejor carácter simple (ROBERTS, 1970). MARTENS (1950) señala que se pueden encontrar paráfisis en la mayoría de los *P. cambricum* estudiados. Si se examinan los soros (de las plantas vivas) en un estadio muy joven se pueden observar muchas paráfisis cortas y muy ramificadas, pero son extraordinariamente difíciles de observar en soros maduros y pueden perderse fácilmente en especímenes de herbario.

FERNANDES (1968) señala que tanto *P. interjectum* y *P. cambricum* como *P. vulgare* y *P. cambricum* se encuentran cohabitando, y encuentra, además, dos localidades donde están las tres especies. En los lugares donde cohabitan los diploides y los tetraploides pueden surgir híbridos pentaploides, donde lo hacen los diploides y los tetraploides, pueden surgir triploides (SHIVAS, 1961a; FERNANDES, 1968). Se han descrito tres híbridos naturales de diversas localidades europeas: el triploide *P. x font-queri* Rothm. (*P. cambricum* x *P. interjectum*), el tetraploide *P. x shivasiae* Rothm. (*P. cambricum* x *P. vulgare*) y el pentaploide *P. x mantoniae* Rothm. (*P. interjectum* x *P. vulgare*). En la Península Ibérica se han señalado en Navarra y Cataluña.

SHIVAS (1961a) estudia híbridos de los Pirineos, Bretaña, Suiza, N de Italia y Gales. Para conocer el origen de *P. vulgare*, realiza cruza-mientos de los posibles parentales y propone que cuando crecen juntas cualquier par de especies

de *Polypodium* pueden formar híbridos. Señala también que es bastante difícil distinguirlos, ya que combinan caracteres de los parentales, aunque sí es posible en el laboratorio, incluso el híbrido tetraploide puede ser diferenciado de *P. vulgare* por la presencia de meiosis irregulares.

NEUROTH *et al.* (1998) basándose en estudios isoenzimáticos sobre *P. x font-queri* de Madeira describe *P. x font-queri* nothosp. *encumeadense* Neuroth, Jäger & Bennert (*P. cambricum* ssp. *macaronesicum* x *P. vulgare*) que se diferencia de *P. x font-queri* nothosp. *font-queri* (*P. cambricum* ssp. *cambricum* x *P. vulgare*) por diferencias alélicas, un menor número de células basales en el esporangio y más pequeñas, y un mayor número de bivalentes en la meiosis.

En principio, el número de cromosomas parece diferenciar claramente las tres especies. NEUROTH (1996) señala los problemas en la determinación de los distintos taxones (no sólo los híbridos) así como la necesidad que tuvo de reubicar ciertas plantas, después de los análisis citológicos, en otros taxones. El recuento de cromosomas es una técnica lenta y laboriosa, máxime en este grupo de vegetales debido a su elevado número: *P. cambricum* 2n=74, *P. vulgare* 2n=148 y *P. interjectum* 2n=222 (*in* LÖVE *et al.*, 1971; CASTROVIEJO *et al.*, 1986), *P. x font-queri* Rothm. 2n=111, *P. x shivasiae* Rothm. 2n=148, *P. x mantoniae* Rothm. 2n=185, (ROTHMALER, 1961). Los recuentos son realizados, por este motivo, en un escaso número de individuos, lo que plantea un problema estadístico en el estudio de las poblaciones. SHIVAS (1961a) realizó el recuento de cromosomas de individuos de sólo dos localidades de la Península Ibérica (Oporto y Pirineos) y de cada una de las localidades sólo estudió un taxón (*P. cambricum* y *P. vulgare*, respectivamente).

En el Noroeste Ibérico no es raro encontrar localidades donde se encuentren al menos dos especies de polipodios, por lo que sería de esperar la presencia de los híbridos descritos y que han sido señalados en el noreste ibérico y otras zonas europeas.

Ante la dificultad en la diferenciación morfológica de estos taxones, así como de los

recuentos de cromosomas en helechos, se realizó un estudio de la cantidad de DNA nuclear en los polipodios del noroeste ibérico, paralela al estudio morfológico.

La única referencia bibliográfica que conocemos sobre la medida de la cantidad de DNA nuclear en polipodios es el trabajo de MURRAY (1985), quien mediante densitometría estudia cuatro taxones diploides, entre ellos *P. cambricum*, y *P. vulgare*, *P. interjectum* y el híbrido pentaploide derivado de los últimos.

Varios autores han señalado que existe una buena correlación entre las cantidades de DNA y el número de cromosomas (SHARMA *et al.*, 1983). MICHAELSON *et al.* (1991) y BENNETT & LEITH (1995) comparan los datos obtenidos mediante citometría de flujo, microspectrofotometría y microdensitometría y concluyen que hay una buena correlación entre las medidas realizadas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Esta técnica permite procesar cada muestra en pocos minutos, y abordar el estudio de la variación intrapoblacional. En este sentido, BENNETT & LEITH (1995) señalan que la citometría de flujo utilizada en el estudio de las poblaciones de plantas permitirá entender y evaluar el significado evolutivo de la variación intraespecífica. WESTMAN & KRESOVICH (1997) indican que la citometría de flujo es una buena herramienta para comparar el contenido de DNA nuclear y el nivel de ploidía de las plantas de la misma familia, género, especie y ecotipos así como para evaluar los híbridos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 123 individuos del género *Polypodium* procedentes de diferentes localidades del Noroeste Ibérico (Tabla I). Del mismo individuo, se ha estudiado su cantidad de DNA nuclear, mediante citometría de flujo, y se han realizado pliegos, que están depositados en el herbario SANT, de los que se han extraído las esporas para ser estudiadas al natural al Microscopio Electrónico de Barrido. Con el fin de que el material estuviese en las mejores condiciones,

tanto para su determinación, como para la obtención de núcleos, para el estudio del DNA y para la obtención de esporas, se han mantenido las muestras en macetas en el invernadero.

El estudio de la cantidad de DNA nuclear se ha realizado mediante citometría de flujo con un citómetro Coulter, Epics* Elite con láser que emite a 488 nm. Se ha usado para la obtención de núcleos el medio Bergounioux (BERGOUNIOUX *et al.*, 1986). El fluorocromo utilizado ha sido Bromuro de Etidio, se ha añadido a la muestra RNAsa a fin de eliminar el RNA ya que el Bromuro de Etidio es un intercalante que tiñe ambos ácidos nucleicos. Los patrones internos empleados han sido hojas jóvenes del diploide *Pisum sativum* L. cultivar Express Long (8.37pg, 40.5% GC), y el diploide *Petunia hybrida* L. cultivar PxPC6 (2.85 pg, 41% GC), en casos puntuales para confirmar las cantidades de DNA nuclear de las plantas muestra. La validez de la tinción y el buen estado de los núcleos (enteros y sin restos de citoplasma) se contrastó en el microscopio de fluorescencia. Los núcleos rotos o con restos de citoplasma son señalados por PRICE & JOHNSTON (1996) como las principales fuentes de error en las medidas de citometría de flujo.

De cada individuo se han realizado tres medidas. En cada análisis efectuado, se han medido al menos 5000 núcleos con un coeficiente de variación, en cada análisis, inferior al 7%, siendo considerados los coeficientes inferiores al 5% como excelentes o buenos, siguiendo a STEEN (1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores obtenidos en las medidas realizadas, mediante citometría de flujo, de la cantidad de DNA nuclear se pueden observar en las Figs. 1 y 2. La Fig.1 corresponde a la distribución discreta de estos valores, y en la Fig. 2 se puede observar la distribución continua de los mismos para cada ejemplar estudiado, sin diferenciar a qué taxón pertenecen. En ambas se pueden observar claramente 3 modas.

TABLA I. Material estudiado

Localidad	Taxones	N
C: Serra da Capelada, Cariño	<i>P. cambricum</i>	2
	<i>P. vulgare</i>	1
	<i>P. interjectum</i>	1
	<i>P. x mantoniae</i>	1
C: Melide	<i>P. interjectum</i>	1
	<i>P. vulgare</i>	1
C: Portodemouros	<i>P. cambricum</i>	1
	<i>P. interjectum</i>	1
Or: río Sil, Nogueira de Ramuín	<i>P. interjectum</i>	12
	<i>P. vulgare</i>	16
	<i>P. x shivasiae</i>	2
Or: río Mao, Cristosende	<i>P. cambricum</i>	16
	<i>P. interjectum</i>	7
	<i>P. vulgare</i>	4
	<i>P. x fontqueri</i>	3
	<i>P. x mantoniae</i>	5
	<i>P. x shivasiae</i>	1
Or: río Navea, Río	<i>P. vulgare</i>	2
Po: Mondariz	<i>P. cambricum</i>	2
	<i>P. interjectum</i>	2
	<i>P. x mantoniae</i>	1
Po: Vigo	<i>P. cambricum</i>	10
	<i>P. interjectum</i>	23
	<i>P. vulgare</i>	2
	<i>P. x fontqueri</i>	3
	<i>P. x shivasiae</i>	3

La primera de las modas se encuentra en 15 pg, corresponde a individuos determinados como *P. cambricum* por presentar paráfisis y a algunos que en un primer momento fueron determinados como *P. interjectum*, tal vez erróneamente debido a que los esporangios estaban ya totalmente maduros y como señala ROBERTS (1970) las paráfisis pueden perderse al madurar los soros. Estas plantas fueron cultivadas y se pudo com-

probar que, antes de que los esporangios madurasen totalmente, presentaban paráfisis. La media de los valores obtenidos es $\bar{x} = 14.68$ pg, $\sigma = 0.72$. Teniendo en cuenta los coeficientes de variación en cada medida efectuada en el citómetro, 5 % en general, podríamos situar los valores de la cantidad de DNA nuclear de *P. cambricum* en un rango de 13.96 a 15.39 pg. A este grupo de plantas pertenecen un 21,8 % del total.

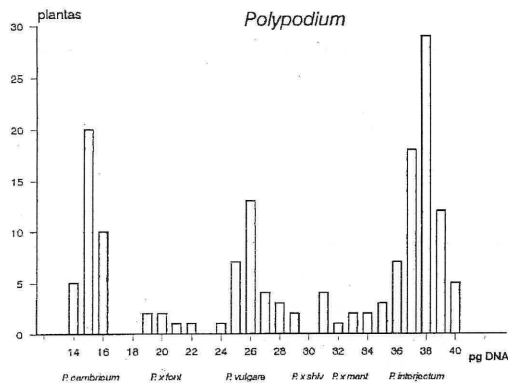


Fig. 1. Distribución discreta de los valores obtenidos mediante citometría de flujo, de la cantidad de DNA nuclear en *Polypodium*.

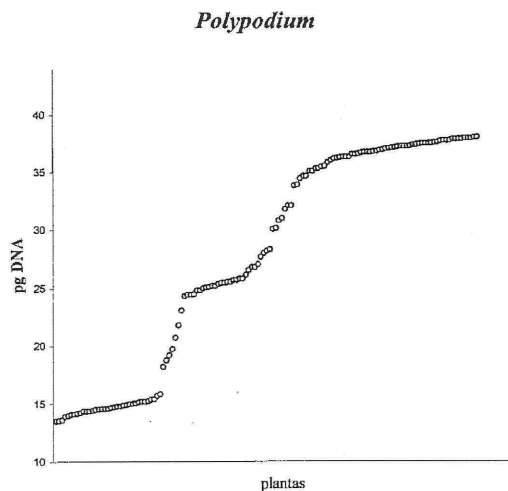


Fig. 2. Distribución continua de los valores obtenidos mediante citometría de flujo, de la cantidad de DNA nuclear en *Polypodium* para cada ejemplar estudiado, sin diferenciar a qué taxón pertenecen.

Una segunda moda se encuentra en 25 pg, ($\bar{x} = 25.18$, $\sigma = 0.5$, [23.9 - 26.5]) y que corresponde a plantas sin paráfisis y con un número alto de células del anillo (de 10 a 18) y que fueron determinados como *P. vulgare* (supone aproximadamente un 18,3 % del total).

La tercera moda corresponde a unos 37 pg, ($\bar{x} = 37.48$, $\sigma = 0.68$, [35.61 - 39.35]), se trata de

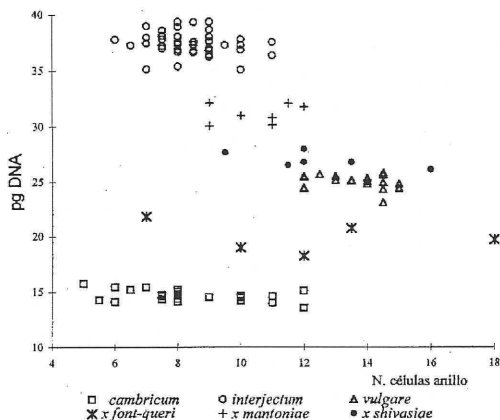


Fig. 3. Número de células del anillo frente a la cantidad de DNA nuclear para cada individuo estudiado.

individuos sin paráfisis y número bajo de células del anillo y que fue determinado como *P. interjectum*, con un 33.1 % del total de plantas, es sin duda el taxón más abundante en el noroeste ibérico.

Se han encontrado también individuos con valores intermedios: 19 - 20 pg (4.5 %) correspondientes a *P. x font-queri*; 26-28 pg (4.2 %) correspondientes a *P. x shivasiae* y 30-32 pg (4.2 %) correspondientes a *P. x mantoniae*.

A partir de los valores obtenidos se realizó un análisis de correspondencias entre los valores observados y los grupos realizados a partir de las modas coincidiendo el número de ejemplares observados con el esperado. Además, los ejemplares que no fue posible determinar en un primer momento por presentar esporangios muy jóvenes, se clasificarían mayoritariamente como *P. interjectum* (14 de 19) y en segundo lugar (5 plantas) como *P. cambricum*.

En la Fig.3 se representa el número de células del anillo frente a la cantidad de DNA nuclear para cada individuo estudiado.

Estos resultados confirman la presencia de los híbridos *P. x mantoniae*, *P. x shivasiae* y *P. x font-queri* en el noroeste ibérico, así como la posibilidad de formar híbridos en aquellas loca-

lidades donde convivan dos especies cualesquiera.

En estos híbridos, es frecuente encontrar esporas y esporangios con aspecto de estar abortados, pero también otros con aspecto de ser viables. En estos esporangios se ha observado la presencia de esporas grandes y redondas junto a esporas con aspecto de estar abortadas y otras normales. NEUROTH (1996) describe estos mismos tipos de esporas en híbridos de *Polypodium* y señala que estas esporas grandes y redondas podrían ser diplósporas.

MURRAY (1985) obtuvo medidas del contenido de DNA nuclear de individuos de cuatro especies diploides: *P. cambricum*, *P. scouleri*, *P. virginianum* y *P. glycyrrhiza*, teniendo todas cantidades de DNA muy similares (próximas a 20 pg). También midió el contenido de DNA de *P. vulgare* y *P. interjectum*, siendo las cantidades obtenidas de 30.75 pg y de 39.32 pg, respectivamente. Las medidas fueron realizadas sobre 10 células de al menos 2 plantas distintas de cada taxón excepto para *P. scouleri*, *P. virginianum*, *P. glycyrrhiza* y el híbrido pentaploide de las que sólo estudia una. Para individuos *P. vulgare* x *P. interjectum* (pentaploides), la cantidad de DNA obtenida fue 35.65 pg. Murray destaca, asimismo, que el tetraploide tiene 1.5 veces el contenido de DNA de los diploides, en lugar del doble que es lo que cabría esperar, y el hexaploide 2 veces el contenido de DNA de los diploides, en vez del triple, aunque el híbrido pentaploide procedente de *P. vulgare* y *P. interjectum* presenta una cantidad de DNA intermedia entre ambos.

Los datos obtenidos para *P. interjectum* son coincidentes con la cantidad de DNA nuclear señalada por MURRAY (1985) en plantas de Cornualles, no así para el resto de los taxones, en los que encontramos valores inferiores a los que él señala.

La relación entre las cantidades de DNA nuclear y el número de cromosomas parece no mantenerse en los distintos niveles de ploidía, ya que el tetraploide debería tener unos 30 pg, y el hexaploide cerca de 45 pg. Los híbridos sí presentan, sin embargo, cantidades intermedias, en

lo que coincidimos con MURRAY (1985) en cuanto a los valores que obtiene para el pentaploide.

MURRAY (1985) achaca el hecho de que no se mantenga la relación cromosomas-cantidad de DNA a que los cromosomas de los tetraploides y los hexaploides son más pequeños que los de los diploides y que la evolución en los polipodios parece que va acompañada por la pérdida o ganancia de DNA nuclear, aunque, con los estudios realizados, no puede indicar la dirección de la evolución. Esta idea corroboraría las observaciones de MANTON (1950) en las que señala una reducción en el tamaño de los cromosomas acompañando o siguiendo a la poliploidía. Indica que sería posible que ocurriese un reajuste nuclear o fisiológico con el paso del tiempo, y se reponga la capacidad de un organismo para mantener la poliploidía en una dimensión en que, de otra forma, no sería posible (MANTON, 1950). No obstante, también hay que tener en cuenta que el genoma de *P. cambricum* no se encuentra en *P. vulgare*, aunque no esté totalmente resuelto el origen de este taxón. SHIVAS (1962) propone que este taxón, posiblemente, se haya formado por la hibridación de *P. virginianum* L. (diploide procedente de Norte América y de Asia y *P. glycyrrhiza* D.C. Eaton, (también diploide de N. América). FERNANDES (1968), apunta la posibilidad de que *P. vulgare* tenga sus progenitores en *P. virginianum* asiático y otro taxón japonés, probablemente *P. faurei* Christ., que posee Soros redondeados sin paráfisis y anillo del esporangio del tipo *vulgare*.

LOVIS (1977) propone como progenitores de *P. vulgare*: *P. appalachianum* Haufler & Windham y *P. glycyrrhiza*. HAUFLE & WINDHAM (1995), realizando análisis de isoenzimas, señalan como progenitores *P. glycyrrhiza* y *P. sibiricum* Siplivinski, aunque señalan también que la identidad genética entre *P. sibiricum* y *P. appalachianum* es relativamente alta: 0.608, por lo que el alto número de bivalentes encontrados por SHIVAS en el híbrido obtenido en el laboratorio a partir de estos taxones y *P. vulgare* (n bivalentes y n univalentes) no es tan extraño.

NEUROTH (1996), basándose en el número de loci polimorfos, apoya la teoría de *P. glycyrrhiza*

en el origen de *P. vulgare*, pero descarta *P. appalachianum* o *P. sibiricum*.

Puesto que *P. vulgare* se originó de taxones distintos a *P. cambricum*, sería lógico que su cantidad de DNA nuclear se separe de la que correspondería a un tetraploide originado de él. Sin embargo *P. interjectum*, que se ha originado a partir de *P. cambricum* y *P. vulgare* contiene un poco menos del doble que *P. x font-queri* (1.9), cuya cantidad de DNA nuclear es aproximadamente la mitad de la suma de la de sus progenitores, aunque el número de plantas estudiadas por el momento sea muy escaso.

Es de destacar la variabilidad morfológica encontrada en los híbridos, que en un primer momento fueron determinados como taxones diferentes, así como el hecho de no haber encontrado esporangios en un alto porcentaje de ellos, o presentarlos en muy bajo número y en una alta proporción no se desarrollan completamente. *P. x font-queri* presenta de 7 a 18 células del anillo, y en una de las plantas se observaron paráfisis. *P. x mantoniae* de 9 a 12 células del anillo, una de las plantas con paráfisis y dos con pelos ramificados similares a pequeñas paráfisis. *P. x shivasiae* de 9 a 16 células del anillo y pelos escasamente ramificados.

Consideramos que la medida de la cantidad de DNA nuclear mediante citometría de flujo, y a la vista de los resultados obtenidos, es una excelente herramienta en el estudio de este grupo de plantas, permitiendo de un modo sencillo la determinación rápida de éstas. Por otra parte permite el estudio de un alto número de individuos en un tiempo relativamente corto, lo que posibilita un mejor estudio de las poblaciones. Debido a los problemas en la identificación de los híbridos y al escaso porcentaje en que deben encontrarse en la naturaleza, la probabilidad de detectarlos es muy escasa, el estudio de la cantidad de DNA nuclear mediante citometría aumenta las posibilidades de detección.

Todos estos datos inducen a pensar que en el género *Polypodium* podría existir un gran número de hibridaciones, duplicaciones cromosómicas, pérdidas y/o ganancias de DNA, etc. que, unidos

a la posibilidad de reproducirse sexual y/o vegetativamente, le confieren esa plasticidad fenotípica que caracteriza a este género y que ha llevado a diversos autores a describir numerosas taxones dentro de este grupo de helechos. Es por todo ello que se hace necesario un estudio más profundo de este género tanto en el número de individuos como en el número de localidades estudiadas, empleando el mayor número de técnicas moleculares posible para poder aclarar este taxón.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETT, M.D. & LEITH, Y. (1995). Nuclear Amount in Angiosperms. *Annals of Botany*, **76**: 113-176.
- BERGOUNIOUX, C., PERENNES, C., MIÈGE, C. & GADAL, P. (1986). The effect of male sterility on protoplast division in *Petunia hybrida*. Cell Cycle comparison by flow cytometry. *Protoplasma*, **130**:138-144.
- CASTROVIEJO, S., LAÍNZ, M., LÓPEZ GONZÁLEZ, G., MONTSERRAT, P., MUÑOZ GARMENDIA, F., PAIVA, J. & VILLAR, L. (1986). *Flora iberica*. I. Real Jardín Botánico. Servicio de Publicaciones del C.S.I.C. Madrid.
- FERNANDES, R.B. (1968). O genero *Polypodium* em Portugal. *Bol. Soc. Brot.*, **42**: 33-158.
- FERRARINI, E., CIAMPOLINI, F., PICI SERMOLLI, R.E.G. & MARCHETTI, D. (1986). Iconographia Palynologica Pteridophytorum Italiae. *Webbia*, **40** (1): 1 - 202.
- HAUFLER, C.H., WINDHAM, M.D. & RABE, E.W. (1995). Reticulate evolution in the *Polypodium*-complex. *Syst. Bot.*, **20**: 89-109.
- JERMY, A.C. (1984). Origin and distribution of Pteridophytes in the Mediterranean area. *Webbia*, **38**: 397-416
- LÖVE, Á., LÖVE, D. & PICI SERMOLLI, R.E.G. (1971). *Cytotaxonomical Atlas of the Pteridophyta*. J. Cramer, Vaduz, Germany.
- LOVIS, J.D. (1977). Evolutionary patterns and processes in ferns. In: Preston, R. D. & Woodhouse, H. W.(Eds.), *Advances in botanical research*, **4**: 229-415. Academic Press, London.
- MANTON, I. (1950). *Problems of cytology and evolution in Pteridophyta*. Cambridge University Press.
- MARTENS, P. (1950). Les paraphyses de *Polypodium vulgare* et de la sous-espèce *serratum*. *Bull. Soc. r. Bot. Belg.*, **82**: 225-265.

- MICHAELSON, M.J., PRICE, H.J., ELLISON, J.R. & JOHNSTON, J.S. (1991). Comparison of plant DNA contents determined by Feulgen microspectrophotometry and laser flow cytometry. *American Journal of Botany*, **78** (2): 183-188.
- MONTERRAT, P. (1982). Comentarios sobre las Investigaciones Pteridológicas en España, 1ª parte (1976). *Collectanea Botanica*, **13** (1): 55-65.
- MURRAY, B. G. (1985). Karyotypes and nuclear DNA amounts in *Polypodium* L. (Polypodiaceae). *Bot. Jour. Lin. Soc.*, **90**: 209-216.
- NARDI, E. (1977). Note sistematiche sul *Polypodium australe* s.l. delle Isole Atlantiche (Azzorre, Madeira, Canarie). *Webbia*, **31**: 79-96.
- NEUROTH, R. (1996). Biosystematik und Evolution des *Polypodium vulgare*-Komplexes (Polypodiaceae; Pteridophyta). *Diss. Bot.*, **256**.
- NEUROTH, R.N., JÄGER, W. & BENNETT, H.W. (1998). *Polypodium x font-queri* nothosp. *encumeadense* (= *Polypodium cambricum* ssp. *macaronesicum* x *P. vulgare*, Polypodiaceae, Pteridophyta), a new hybrid from Madeira. *Nova Hedwigia*, **66** (3-4): 523-533.
- PICHI SERMOLLI, R.E.G. (1987). A look at the chromosomes numbers in the families of Pteridophyta. *Webbia*, **41** (2): 305-314.
- PRICE, H.J. & JOHNSTON, J.S. (1996). Analysis of Plant DNA Content by Feulgen Microspectrophotometry and Flow Cytometry. In: Jauhar, P.P. (Ed.), *Methods of Genome Analysis in Plants*: 115-132. CRC Press, London.
- ROBERTS, R.H. (1970). A revision of some of the taxonomic characters of *Polypodium australe* Fée. *Watsonia*, **8**: 121-134.
- ROBERTS, R.H. (1980). *Polypodium macaronesicum* and *P. australe*: A morphological comparison. *Fern Gaz.*, **12** (2): 69-74.
- ROBERTS, R.H. & SYNNOTT, D.M. (1972). *Polypodium australe* Fée in Scotland and North-East Ireland. *Watsonia*, **9**: 39-41.
- ROTHMALER, W. & SCHNEIDER, U. (1962). Die Gattung *Polypodium* in Europa. *Die Kulturpfl.*, **3**: 234-248.
- RUIZ DE AZÚA, J. (1930). Helechos de Galicia. *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.*, **30**: 129-134.
- SHARMA, D.P., FIROOZABADY, E., AYRES, N.M. & GALBRAITH, D.W. (1983). Improvement of anther culture in Nicotiana: media cultural conditions and flow cytometric determination of ploidy levels. *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**: 441.
- SHIVAS, M.G. (1961a). Contributions to the cytology and taxonomy of species of *Polypodium* in Europe and America. I. Cytology. *J. Linn. Soc. (Bot.)*, **58**: 13-25.
- SHIVAS, M.G. (1961b). Contributions to the cytology and taxonomy of species of *Polypodium* in Europe and America. II. Taxonomy. *J. Linn. Soc. (Bot.)*, **58**: 27-38.
- STEEN, H.B. (1990). Light scattering measurement in an Arc Lamp-Based Flow Cytometer. *Cytometry*, **11**: 223-230.
- WESTMAN, A.L. & KRESOVICH, S. (1997). Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. In: Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V. & Newbury, H.J. (Eds.), *Biotechnology and Plant Genetic Resources*: 9-48. CAB International, Oxon.