

Cantidades de DNA nuclear y esporas en Aspleniaceae: *Asplenium* L., *Phyllitis* Hill y *Ceterach* Willd.

N. REDONDO, M. HORJALES & A. BLANCO

Departamento de Biología Vexetal e Ciencia do Solo. Apto. 874. 36200 Vigo

(Recibido, diciembre de 1998. Aceptado, mayo de 1999)

Resumen

REDONDO, N., HORJALES, M. & BLANCO, A. (1999). Cantidades de DNA nuclear y esporas en Aspleniaceae: *Asplenium* L., *Phyllitis* Hill y *Ceterach* Willd. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 9: 99-107

Se ha estudiado mediante citometría de flujo la cantidad de DNA nuclear de 57 individuos de distintos taxones de los géneros *Asplenium*, *Phyllitis* y *Ceterach*, procedentes de poblaciones naturales de diferentes localidades. A la vista de los datos obtenidos, se observa que en los géneros estudiados parece haber tres grupos, en cuanto a cantidades de DNA nuclear: el primero constituido por *A. onopteris* y *A. marinum*, con cerca de 8.5 pg; el segundo formado por *A. adiantum-nigrum* var. *adiantum-nigrum*, *A. billotii* y *A. trichomanes*, *Phyllitis scolopendrium* y *Ceterach officinarum*, aproximadamente 15.5 pg de DNA; y un tercer grupo formado por *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense* y *A. ruta muraria* con aproximadamente 11 pg. Se estudió la ornamentación esporal de los taxones del género *Asplenium* que, aunque variable, concuerda con la descrita en las referencias bibliográficas. En *A. trichomanes* subsp. *pachyrachis* se indica la diferente morfología del exosporio, según el estado de juventud o madurez de las esporas.

Palabras clave: Aspleniaceae, taxonomía, contenido DNA nuclear, citometría de flujo, esporas.

Abstract

REDONDO, N., HORJALES, M. & BLANCO, A. (1999). Nuclear DNA amounts and spores in Aspleniaceae: *Asplenium* L., *Phyllitis* Hill and *Ceterach* Willd. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 9: 99-107

Nuclear DNA amounts of 57 individuals of *Asplenium*, *Phyllitis* and *Ceterach*, originating from natural populations were analyzed using flow cytometry. Results have indicated that there are three groups within the studied genus where each group corresponds to the content of nuclear DNA. The first group with 8.5 pg of nuclear DNA, includes *Asplenium onopteris* and *A. marinum*; the second with approximately 15.5 pg, includes *A. adiantum-nigrum* var. *adiantum-nigrum*, *A. billotii*, *A. trichomanes*, *Phyllitis scolopendrium* and *Ceterach officinarum*; and finally the third group with 11 pg includes *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense* and *A. ruta-muraria*. Spore ornamentation of *Asplenium* genus taxa was studied, although variable, data presented good agreement with those of literature references. *A. trichomanes* subsp. *pachyrachis* showed differentiated exospore morphology according to the juvenility /maturity status of spores.

Key words: Aspleniaceae, taxonomy, nuclear DNA content, flow cytometry, spores.

INTRODUCCIÓN

Uno de los criterios más fiables para diferenciar los distintos taxones de *Asplenium*, es la determinación del número de cromosomas.

Pero en algunos casos resulta difícil, porque no se producen esporangios regularmente, y en otros, el elevado número de los mismos no aconseja el estudio de la mitosis. SHIVAS (1969) estudia el número de cromosomas en el com-

plejo *A. adiantum-nigrum*, y en el complejo *A. obovatum*, así como los resultados de hibridaciones en cada uno de los grupos. SLEEP *et al.* (1978) hacen el recuento de cromosomas en 20 colecciones del putativo *A. cuneifolium* Viv. de las localidades serpentínícolas de Escocia, y obtienen de modo uniforme el nivel tetraploide con $n = 72$. DESCHATRES *et al.* (1978) proponen que estas plantas son claramente el derivado autotetraploide del diploide *A. cuneifolium*. SLEEP *et al.* (1978), estiman que sería necesaria una confirmación de tal hipótesis.

SLEEP *et al.* (1978), apuntan como otra posibilidad que cuando *Asplenium adiantum-nigrum* crece en las serpentinas, puede originar una cierta morfología que recuerda a *A. cuneifolium*. Esto, sin embargo, parece improbable por el hecho de que *A. adiantum-nigrum* y *A. cuneifolium* crecen simultáneamente en un conjunto de rocas que contienen serpentina, tanto en Italia como en Suiza, donde además se ha encontrado el híbrido triploide de ellos, que se conoce con el nombre de *A. x centovallense* D.E. Meyer. SLEEP *et al.* (1978) inician un programa de hibridación en Leeds, para aclarar la naturaleza y el origen del tetraploide *A. cuneifolium* de Córcega, Escocia e Irlanda. SLEEP (1980) estudia el número de cromosomas del grupo *Asplenium adiantum-nigrum* e indica que *A. cuneifolium* no está presente en Inglaterra porque todo el material es tetraploide. PAGE & BENNELL (1979) hacen un estudio preliminar en el grupo *A. adiantum-nigrum*, en las localidades de Devon y West Cornwall, y confirman la presencia de *A. cuneifolium* en la flora inglesa. JERMY (1981) pone de manifiesto que *A. cuneifolium* ha sido citado para las Islas Británicas erróneamente.

SLEEP (1983), en el estudio que hace del género *Asplenium* en la Península Ibérica, establece que todas las especies de este taxón propuestas hasta esa fecha comprenden citotipos diploides y tetraploides, y dentro de éstos tanto autotetraploides como alotetraploides, haciendo mención especial de *A. foreziense* Le Grand, *A. majoricum* Litard., *A. petrarchae* (Guérin) DC. y *A. billotii* F. W. Schultz. Con relación a

las plantas de *A. cuneifolium* que crecen sobre suelos serpentínícolas, tanto de Córcega como de las Islas Británicas, señala que son alotetraploides y que, casi con certeza, no son más que formas serpentínícolas especializadas de *A. adiantum-nigrum*, sugiriendo que es probable que estas formas estén presentes en Francia y en la Península Ibérica; de hecho, Reichstein recolectó material de un híbrido triploide en el área de Sierra Bermeja. SLEEP (1983) indica que es imprescindible hacer el estudio cromosómico, y que no bastan los simples estudios morfológicos a partir de los pliegos de herbario para poder decidir si el material de Sierra Bermeja corresponde a *A. cuneifolium* o a la forma serpentínícola de *A. adiantum-nigrum*. RASBACH *et al.* (1986) estudian *A. cuneifolium* (diploide) en distintas localidades europeas, así como la «special serpentine form» de *Asplenium adiantum-nigrum* en la región Mediterránea, en las que incluye material de Málaga (Sierra Bermeja), que fue cultivado y posteriormente revisado, resultando 3 de ellos tetraploides y 1 triploide, concluyendo que los diploides deben de ser raros en Sierra Bermeja. HORJALES (1986) realizó el estudio de cromosomas en el grupo *Asplenium adiantum-nigrum* en 12 localidades gallegas, 4 de las cuales corresponden a sustrato serpentínícola, con aspecto más o menos flabeliforme, y en todas las plantas encontró $n = 72$. Horjales concluye que las plantas que viven en localidades serpentínícolas gallegas no corresponden al diploide *A. cuneifolium*, ya que se trata de un tetraploide que debe representar un ecotipo de *A. adiantum-nigrum*.

Varios autores han puesto de manifiesto que parece existir una buena correlación entre las cantidades de DNA nuclear y el número de cromosomas. SHARMA *et al.* (1983), MICHAELSON *et al.* (1991) y BENNET & LEITCH (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. 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.

Es por ello por lo que se ha realizado el estudio de la cantidad de DNA nuclear de diferentes individuos, mediante citometría de flujo, como un método más rápido, fiable e indicador del nivel de ploidía y que puede ayudar a aclarar las lagunas taxonómicas de este grupo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material recogido procede de diversas poblaciones naturales del Noroeste Ibérico y, en casos muy concretos, de regiones del sur y del este de la Península. Se estudiaron 57 plantas (51 correspondientes al género *Asplenium*) y se han comparado con otros géneros de la familia: *Ceterach* y *Phyllitis*. Las plantas se mantuvieron en cultivo, para utilizar las frondes en el momento más adecuado (sin esporangios) para medir la cantidad de DNA, y frondes con esporangios bien desarrollados, para hacer pliegos y observar las esporas a MEB. Los pliegos correspondientes están depositados en el Herbario SANT.

En cada individuo estudiado se obtuvieron los núcleos a partir de frondes jóvenes, realizándose tres medidas en cada planta. En cada análisis efectuado, se han medido al menos 5000 núcleos y el coeficiente de variación en cada análisis ha sido inferior a 5.

Este estudio se ha realizado en un Coulter, Epics* Elite con láser que emite a 488 nm. Se ha seguido el método descrito por GALBRAITH (1989) para la obtención de los núcleos, usando como medio el Medio Bergounioux (BERGOUNIOUX *et al.*, 1988). Los patrones internos empleados han sido hojas jóvenes del diploide *Pisum sativum* L. cultivar Express Long (2C=8.37 pg de DNA nuclear, 40.5 % GC), y del diploide *Petunia hybrida* L. cultivar PxPC6 (2C=2.85 pg, 41 % GC). El fluorocromo

empleado ha sido Bromuro de Etidio (BrEt Sigma E8751) previa adición de RNAsa (Boehringer product 109169) para eliminar el RNA, ya que el Bromuro de Etidio es un intercalante que tiñe ambos ácidos nucleicos. Hay que hacer constar que este material presenta dificultades técnicas para la obtención de núcleos estables, que nos ha obligado a hacer múltiples muestras hasta obtener un resultado aceptable, que cumpla las condiciones antes enunciadas, siendo en el caso de *A. ruta-muraria* L. especialmente difícil.

A fin de caracterizar aquellas taxones más problemáticos del género *Asplenium*, el material procedente de poblaciones naturales, objeto de estudio, ha sido contrastado con material de herbario y se ha realizado el estudio en los mismos individuos de la morfología de las esporas y de la cantidad de DNA nuclear. La ornamentación esporal ha sido contrastada con la descrita en la bibliografía correspondiente y con material procedente del herbario MA.

Para observar la superficie de las esporas, se ha empleado un Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL30, con filamento de tungsteno entre 5 y 20 KV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han encontrado tres grupos diferentes de cantidades DNA nuclear, como se puede observar en la Fig. 1. Un primer grupo cuyos valores se sitúan en torno a 8.5 pg, correspondiente a *A. onopteris* L. y *A. marinum* L., otro cercano a 15.5 pg, correspondiente a la mayor parte de los taxones estudiados, *A. adiantum-nigrum* var. *adiantum-nigrum*, *A. billotii*, *A. trichomanes* L. subsp. *quadri-valens* D. E. Meyer, *A. trichomanes* L. subsp. *pachyrachis* (Christ) Lovis & Reichst., *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newman subsp. *scolopendrium*, *Ceterach officinarum* Willd. subsp. *officinarum* y, finalmente, valores intermedios próximos a 11 pg correspondientes a *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense* y *A. ruta-muraria*. La cantidad de DNA nuclear observada en los tetraploides se sitúa en torno

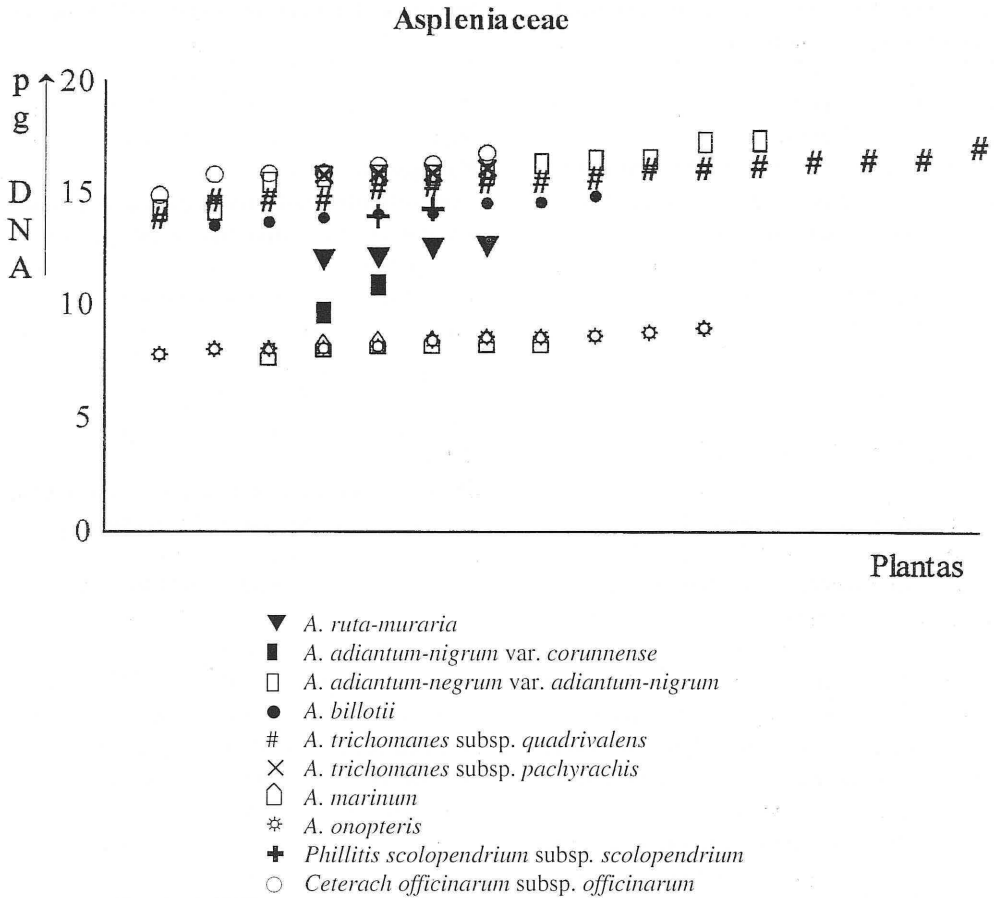


Fig. 1. Diagrama de dispersión de los valores obtenidos del contenido de DNA nuclear de los distintos taxones estudiados.

a 15.5 pg, en los diploides, excepto en *Phyllitis*, que es cercana a 8.5 pg. Las plantas con cantidades próximas a 11 pg, cuando presentaban esporas, éstas tenían aspecto de estar abortadas en su mayor parte (Fig. 2d).

En la Tabla 1 figuran las medias de los valores obtenidos para el contenido de DNA nuclear para los individuos estudiados de los géneros *Asplenium*, *Phyllitis* y *Ceterach*.

Ha sido citado por RASBACH *et al.* (1986) para Sierra Bermeja (Málaga), *A. adiantum-nigrum* tetraploide y un híbrido triploide reco-

nocible por tener esporas abortadas, al que han denominado *A. x centovallense*; también indican la posibilidad de que esté *A. cuneifolium*, pero que debe ser raro. Los datos que se presentan en este trabajo, para Sierra Bermeja (Málaga) (DNA = 15.90, y 10.85 pg) corresponden a *A. adiantum-nigrum* var. *adiantum-nigrum* y al híbrido triploide, no sólo por la cantidad de DNA, sino también por la presencia de un elevado número de esporas abortadas.

Para la localidad de Melide-Furelos (Coruña), serpentinícola (*loc. clas.* de Merino), se

TABLA I. Contenido de DNA nuclear de los distintos taxones, número de individuos estudiados (N) y localidades de procedencia del material

| Nº | Taxones | pg DNA | Localidades |
|----|---|--------|---|
| 3 | <i>Asplenium marinum</i> | 8.3 | Baiona |
| 21 | <i>Asplenium trichomanes</i> subsp. <i>quadrivalens</i> | 15.4 | Somiedo, Courel, Mondariz, Rfo, A Veiga de Cascallá, Vigo |
| 1 | <i>Asplenium trichomanes</i> subsp. <i>pachyrachis</i> | 15.9 | Sierra Bermeja |
| 3 | <i>Asplenium billotii</i> | 14.2 | Larouco, A Veiga de Cascallá, Mougás |
| 3 | <i>Asplenium onopteris</i> | 8.4 | Vigo, Larouco, Melide |
| 15 | <i>Asplenium adiantum-nigrum</i> var. <i>adiantum-nigrum</i> | 15.9 | Somiedo, A Veiga de Cascallá, Mos, Rfo, Melide, Sierra Bermeja |
| 3 | <i>Asplenium adiantum-nigrum</i> var. <i>corunnense</i> | 10.8 | Melide, Sierra Bermeja |
| 2 | <i>Asplenium ruta-muraria</i> subsp. <i>ruta-muraria</i> | 12.3 | Courel, Somiedo |
| 1 | <i>Phyllitis scolopendrium</i> subsp. <i>scolopendrium</i> | 14.1 | Mondariz |
| 5 | <i>Ceterach officinarum</i> subsp. <i>officinarum</i> | 15.8 | Tolox, Somiedo, Larouco, Courel, Sierra Javalambre |

han encontrado valores de 8.5 pg para *A. onopteris*, 15.5 pg para *A. adiantum-nigrum*, y 11 pg para *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense*. La presencia, tanto en las plantas de Sierra Bermeja como en las de Mellid, de una cantidad de DNA próxima a 11 pg, con escasas frondes fértiles, y en éstas un alto número de esporas abortadas, aunque ha sido imposible el estudio de cromosomas dada la baja frecuencia de esporangios, nos hace concluir que estos individuos son triploides. Podría tratarse en ambos casos del mismo híbrido triploide, al que está por asignar un nombre, ya que Rasbach (*loc. cit.*) indica dos nombres *A. lamotteanum* Héribaud (1880:6-7); Legrand (1883:74-75); y *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense* Christ, aunque es difícil establecer cuál es el válido.

Ormonde in CASTROVIEJO *et al.* (1986) indican este último pero con otra fecha: Christ in Bull. Acad. Int. Géogr. Bot. (1904) y es el nombre que proponen para todas las citas hechas como *A. x centovallense* D.E. Meyer .

Con relación a *A. ruta-muraria* subsp. *ruta-muraria*, sólo se han obtenido resultados de representantes de 2 localidades, debido a las dificultades encontradas para la obtención de núcleos en buen estado, ya comentadas. El hecho de que en este grupo de plantas parece haber una buena correlación entre la cantidad de DNA nuclear y el número de cromosomas, y el que la cantidad de DNA nuclear encontrada es próxima a la de *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense*, nos hace pensar que pudiera tratarse igualmente de un nivel triploide.

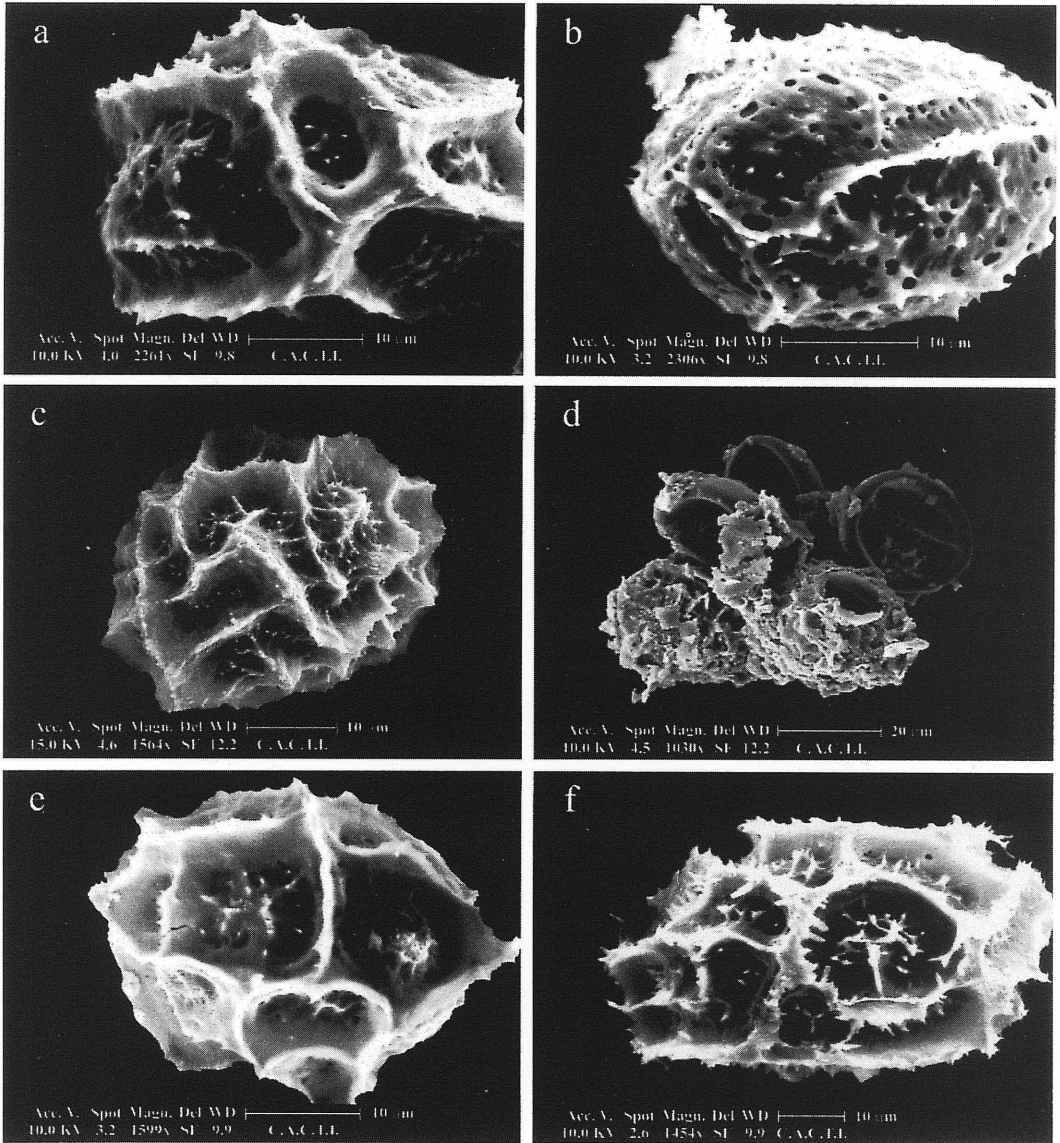


Fig. 2. (a) *Asplenium oopteris* (Po: Vigo, Zamáns). (b) *A. marinum* (Po: Oia, Mougás). (c) *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense* (Ma: Sierra Bermeja). (d) Esporas malformadas de *A. adiantum-nigrum* var. *corunnense*. (e) *A. adiantum-nigrum* var. *adiantum-nigrum* (O: Somiedo). (f) *A. billotii* (Po: Oia, Mougás).

La ornamentación esporal se ha estudiado mediante Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.) y, si bien la morfología es variable, es concordante con la descrita en la bibliografía revisada FERRARINI *et al.* (1986); PANGUA & PRADA (1988). Con relación a *A. adiantum-*

nigrum var. *corunnense*, tanto de Málaga como de Coruña, después de cuatro años en cultivo, sólo han aparecido tres soros en una fronde, que nos han permitido estudiarlos a M.E.B. y el resultado es la presencia de esporas más o menos normales y múltiples esporas que pare-

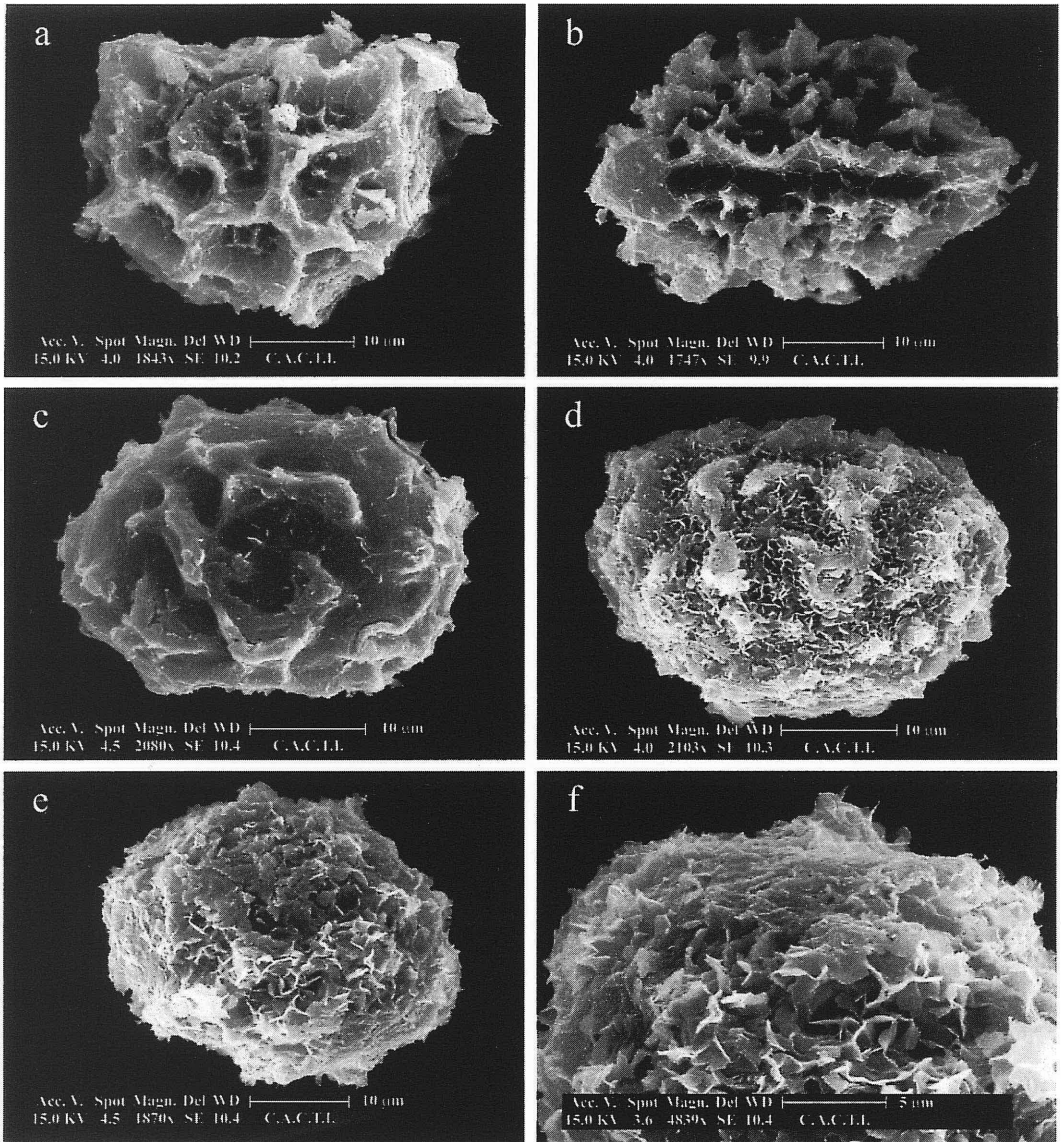


Fig. 3. (a) *A. trichomanes* subsp. *trichomanes* (MA-415402). (b) *A. trichomanes* subsp. *quadrivalens* (Po: Mondariz). (c-f) Diferentes estadios de la maduración del exosporio de *A. trichomanes* subsp. *pachyrachis* (Ma: Sierra Bermeja). (c) Estadío temprano. (d) Estadío intermedio. (e) Estadío maduro. (f) Detalle del exosporio maduro.

cen estériles (Fig. 2c,d), y que ponen de manifiesto el supuesto grado triploide correspondiente a 11 pg y los problemas de reproducción que presenta este taxón.

En *Asplenium trichomanes*, aunque el número de individuos estudiado es todavía bajo,

21 individuos, los datos son muy próximos, en torno a 15.5 pg y, en cualquier caso, las variaciones observadas estarían dentro del error esperado, dados los coeficientes de variación de cada muestra. En relación con el número de cromosomas de cada una de las subespecies

reseñadas en la bibliografía, éste es de $n = 72$ (LÖVE *et al.*, 1977; CASTROVIEJO *et al.*, 1986, etc.) y para las subsps. *trichomanes* e *inexpectans*, $n = 36$, por lo que los materiales estudiados en este trabajo corresponderían a individuos tetraploides. Es difícil establecer caracteres diferenciales claros entre las distintas subespecies. JERMY & PAGE (1980) proponen como caracteres diferenciales, para reconocer el material en la naturaleza, la disposición de las frondes, el color del raquis, la duración de las pínulas sobre el raquis, etc. MORAN (1982) indica que es difícil, por no decir imposible, utilizar esos caracteres en pliegos de herbario, e incluye, para material en el campo, además de esos, los correspondientes a número de soros por pinna, tamaño de los mismos, tamaño de las esporas y de las células guarda, aunque los datos que aporta para las subsps. *trichomanes* (fundamentalmente sobre rocas no calcáreas) y *quadrivalens* (sobre rocas calcáreas), para Estados Unidos y Canadá, se solapan entre ellos.

Se ha estudiado la ornamentación esporal de *A. trichomanes* (Fig. 3) en los individuos de los que conocemos su cantidad de DNA. Estas plantas viven tanto sobre rocas calizas como silíceas y ultrabásicas, como es el caso de la subsp. *pachyrachis* de Sierra Bermeja. En Flora iberica se describe la subsp. *quadrivalens* con un tamaño de la fronde de 10 a 20 cm. Mantenemos en cultivo plantas con frondes menores de 10 cm, procedentes de Somiedo y de Río, y con la pínula apical claramente diferenciada y grande; estas plantas presentan una cantidad de DNA próxima a 15.5 pg, correspondiente al tetraploide. La morfología de esta subespecie es más variada de lo que la bibliografía refleja. QUEIRÓS & ORMONDE (1990) piensan que, tal vez, la amplia variabilidad morfológica de las pínulas podría estar relacionada con el tipo de sustrato. El *A. trichomanes* subsp. *quadrivalens* estudiado para Portugal se encuentra sobre esquistos, rocas calcáreas, areniscas, rocas graníticas, así como en muros o en paredes en ruinas.

El exosporio en *A. trichomanes* presenta una amplia variabilidad individual y poblacional,

así como en función del grado de madurez de la espora (Fig. 3 c-f). PANGUA & PRADA (1988) señalan, como carácter diferencial, la presencia de crestas agudas y dentadas en el caso de *A. trichomanes* subsp. *trichomanes*, crestas obtusas y lisas para *A. trichomanes* subsp. *quadrivalens* y obtusas y angulares para *A. trichomanes* subsp. *pachyrachis*. En general, la morfología esporal que hemos encontrado coincide con la indicada por esta autoras, aunque hay que destacar su variabilidad morfológica y el diferente aspecto que presentan según el estado de desarrollo.

Con relación a *Phyllitis scolopendrium* subsp. *scolopendrium* ($n=36$), se ha obtenido la cantidad de 14.12 pg para una sola localidad (Po: Mondariz), ya que del material estudiado de otras localidades no se obtuvo ningún resultado fiable. Siguiendo el comportamiento de la familia, esto podría hacer pensar que el individuo estudiado fuera tetraploide, pero dado que sólo se han conseguido resultados fiables de una sola planta de una localidad sería demasiado especulativo llegar a esta conclusión. En cualquier caso, nos parece interesante señalar la cantidad de DNA nuclear obtenida para este taxon en esta localidad.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer la colaboración prestada por el Real Jardín Botánico de Madrid al habernos enviado el material de Herbario que ha sido empleado en este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNET, M.D. & LEITCH, Y.J. (1995). Nuclear Amount in Angiosperms. *Annals of Botany*, **76**: 113-176.
- BERGOUNIOUX, C., PERENNES, C., BROWN, S.C. & GADAL, P. (1988). Nuclear DNA quantification in protoplast cell-cycle phases. *Cytometry*, **9**: 84-87.
- CASTROVIEJO, S., LAÍNZ, M., LÓPEZ GONZÁLEZ, G., MONTSERRAT, P., MUÑOZ GARMENDIA, F., PAIVA, J. & VILLAR, L. (1986). *Flora iberica*. I. Servicio de Publicaciones del C.S.I.C. Madrid.

- DESCHATRES, R., SCHNELLER, J.J. & REICHSTEIN, T. (1978). A tetraploid cytotype of *Asplenium cuneifolium* Viv. in Corsica. *Fern Gaz.*, **11** (6): 343-344.
- FERRARINI, E., CIAMPOLINI, F., PICHI SERMOLLI, R.E.G. & MARCHETTI, D. (1986). Icononographia Palynologica pteridophytorum Italiae. *Webbia*, **40** (1): 1-202.
- GALBRAITH, D.W. (1989). Analysis of higher plants by flow cytometry and cell sorting. *International Review Cytology*, **116**: 165-228.
- HORJALES, M. (1986). Sobre *Asplenium cuneifolium* en Galicia: Estudio citotaxonomico. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, **43** (1): 9-14.
- JERMY, C. (1981). *Asplenium cuneifolium* Viv. erroneously recorded in the British Isles. *Watsonia*, **13** (4): 322-323.
- JERMY, C. & PAGE, C.N. (1980). Additional field characters separating the subspecies of *Asplenium trichomanes* in Britain. *Fern Gazette*, **12** (2): 112-113.
- LÖVE, Á., LÖVE, D. & PICHI SERMOLLI, R.E.G. (1977). *Cytotaxonomical Atlas of the Pteridophyta*. J. Cramer, Vaduz.
- 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. *Am. J. Bot.*, **78** (2): 183-188.
- MORAN, R.C. (1982). The *Asplenium trichomanes* complex in the United States and Adjacent Canada. *Am. Fern Journal*, **72** (1): 5-11.
- PAGE, C.N. & BENNELL, F. M. (1979). Preliminary investigation of two South-West England populations of the *Asplenium adiantum-nigrum* aggregate and the addition of *A. cuneifolium* to the English flora. *Fern Gaz.*, **12** (1): 5-8.
- PANGUA, E. & PRADA, C. (1988). Tipos esporales en Aspleniaceas Ibéricas. *Lagascalia*, **15**, Vol. extra: 157-167.
- QUEIRÓS, M. & ORMONDE, J. (1990). *Asplenium trichomanes* L. subsp. *quadrivalens* D.E. Meyer, em Portugal. *Anales Jard. Bot. Madrid*, **46** (2): 553-561.
- RASBACH, H., SCHNELLER, J., GIBBY, M. & REICHSTEIN, T. (1986). *Asplenium cuneifolium* Viv. (diploid) from the type locality (Aspleniaceae, Pteridophyta) with an appendix on related plants from other places in south-western and central Europe. *Candollea*, **41**: 219-244.
- 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. (1969). A cytotaxonomic survey of the *Asplenium adiantum-nigrum* complex. *British Fern Gaz.*, **10** (2): 68-80.
- SLEEP, A. (1980). On the reported occurrence of *Asplenium cuneifolium* and *A. adiantum-nigrum* in the British Isles. *Fern Gaz.*, **12** (2): 103-107.
- SLEEP, A. (1983). On the genus *Asplenium* in the Iberian Peninsula. *Acta Bot. Malacitana*, **8**: 11-46.
- SLEEP, A., ROBERTS, R. H., SOUTER, J. I. & STIRLING, A. McG. (1978). Further investigations on *Asplenium cuneifolium* in the British Isles. *Fern Gaz.*, **11** (6): 345-348.
- 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. Conservation and Use*, CAB International.