

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



ESTUDIO BIOSISTEMÁTICO DE *ASPLENIUM FOREZIENSE*
LEGRAND EX GIRAUDIAS Y TÁXONES RELACIONADOS
(*ASPLENIACEAE*, PTERIDOPHYTA)



ARCEIVO

TESIS DOCTORAL

por

ALBERTO HERRERO NIETO

Directores: Carmen Prada Moral y Santiago Pajarón Sotomayor

Madrid, 1998

Quisiera agradecer a las siguientes personas e instituciones la inestimable ayuda que me han prestado durante la realización de esta memoria:

A Carmen Prada Moral y Santiago Pajarón Sotomayor por su labor como directores de esta memoria.

A Esther Fuertes Lasala, anterior directora del Departamento de Biología Vegetal I y a Carlos Vicente Córdoba, actual director, por poner a mi disposición las instalaciones y el material del mismo.

A la Universidad Complutense por la concesión de una beca predoctoral.

A los conservadores de los herbarios que nos han prestado o nos han permitido consultar material, así como a Helga Rasbach, Ronald Viane y Johannes Vogel por enviarnos material.

Al personal del Servicio de Microscopía Electrónica y de la Biblioteca del Real Jardín Botánico de Madrid.

Al personal del Servicio Común de Investigación y de la Biblioteca de esta facultad.

A los compañeros y personas del Departamento de Biología Vegetal I que tanto me han ayudado y con los que he compartido tantos momentos.

Y como no, a mis amigas y amigos y a mi familia por quererme tanto y por su continuo apoyo, ayuda e ilusión. A ellos quiero dedicar este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Material estudiado	6
3.2. Metodología	6
3.2.1. Generación esporofítica	6
3.2.1.1. Estudio morfológico	6
3.2.1.2. Estudio citológico	7
3.2.2. Generación gametofítica	8
3.2.2.1. Germinación de las esporas y fases iniciales del desarrollo del protalo	8
3.2.2.2. Estudio morfológico del protalo adulto	8
3.2.2.3. Secuencia ontogenética de los gametangios, expresión sexual y sistemas de reproducción	9
3.2.2.4. Potencial de aislamiento	9
3.2.2.5. Obtención de híbridos artificiales	10
3.2.3. Electroforesis de isoenzimas	10
3.2.3.1. Obtención del extracto vegetal	10
3.2.3.2. Preparación de los geles	11
3.2.3.3. Electroforesis	12
3.2.3.4. Tinción	13
3.2.3.5. Nomenclatura e interpretación de las bandas	13
3.2.3.6. Parámetros genéticos	15
3.2.3.7. Aislamiento de orgánulos celulares	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Generación esporofítica	18
4.1.1. Táxones estudiados	18
4.1.1.1. <i>Asplenium fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>	18
4.1.1.2. <i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>	25
4.1.1.3. <i>A. foreziense</i>	30
4.1.1.4. <i>A. macedonicum</i>	35
4.1.1.5. <i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>obovatum</i>	38
4.1.1.6. <i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>deltoideum</i>	44
4.1.1.7. <i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>protobillotii</i>	48
4.1.1.8. <i>A. obovatum</i> subsp. <i>lanceolatum</i>	53
4.1.1.9. <i>A. obovatum</i> subsp. <i>numidicum</i>	60
4.1.1.10. <i>A. obovatum</i> nothosubsp. <i>cyrnosardoum</i> nothovar. <i>cyrnosardoum</i>	63
4.1.1.11. <i>A. obovatum</i> nothosubsp. <i>cyrnosardoum</i> nothovar. <i>ibericum</i>	66
4.1.1.12. <i>A. x protomajoricum</i> nothosubsp. <i>protomajoricum</i>	70

4.1.1.13. <i>A. x recoderi</i> nothosubsp. <i>recoderi</i>	74
4.1.1.14. <i>A. x sleepiae</i> nothosubsp. <i>sleepiae</i>	78
4.1.1.15. <i>A. x sleepiae</i> nothosubsp. <i>krameri</i>	83
4.1.1.16. Híbrido artificial de <i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>obovatum</i> y <i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>protobillotii</i>	89
4.1.2. Discusión global	95
4.2. Generación gametofítica	98
4.2.1. Desarrollo y morfología del protalo	98
4.2.2. Biología reproductiva	110
4.2.2.1. Secuencia ontogenética de los gametangios y expresión sexual	110
4.2.2.2. Potencial de aislamiento	114
4.2.2.3. Sistemas de reproducción	119
4.2.3. Discusión global	121
4.3. Electroforesis de isoenzimas	123
4.3.1. Sistemas enzimáticos	123
4.3.1.1. Aspártico aminotransferasa	123
4.3.1.2. Isocítrico deshidrogenasa	124
4.3.1.3. Leucín aminopeptidasa	125
4.3.1.4. Málico deshidrogenasa	127
4.3.1.5. Fosfoglucoisomerasa	130
4.3.1.6. Fosfoglucomutasa	132
4.3.1.7. 6-Fosfogluconico deshidrogenasa	136
4.3.1.8. Siquímico deshidrogenasa	138
4.3.1.9. Triosa-fosfato isomerasa	139
4.3.2. Parámetros genéticos	140
4.3.2.1. Medidas de la variabilidad genética de las poblaciones de los diploides	141
4.3.2.2. Identidad y distancia genética de los diploides	154
4.3.2.3. Índice de fijación de Wright de los diploides	159
4.3.2.4. Parámetros genéticos de los tetraploides	160
4.4. Consideraciones taxonómicas y nomenclaturales	163
5. CONCLUSIONES	166
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168
7. APÉNDICES	187
7.1. Apéndice I	187
7.2. Apéndice II	203
7.3. Apéndice III	208
7.4. Apéndice IV	210

1. INTRODUCCIÓN

La publicación en 1950 del trabajo de Irene Manton "Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta" sentó las bases para el estudio de los pteridófitos a nivel citológico. Los subsecuentes trabajos basados en los métodos citológicos desarrollados por Manton dilucidaron las relaciones entre los miembros europeos de numerosos táxones de pteridófitos, entre ellos los del género *Asplenium* L. En 1983 Anne Sleep estableció las relaciones de los miembros ibéricos de fronde lanceolada de este género, que incluye tanto diploides como tetraploides derivados y que son táxones morfológicamente muy variables.

Este conjunto de táxones está integrado por el diploide *A. fontanum* (L.) Bernh., del cual se han descrito hasta ahora dos subespecies (REICHSTEIN & SCHNELLER, 1982), la subsp. tipo y la subsp. *pseudofontanum* (Kossinsky) Reichst. & Schneller; el grupo *A. obovatum* Viv., y *A. foreziense* Legrand ex Giraudias (incluido *A. macedonicum* Kümmerle), un alotetraploide derivado de *A. fontanum* y la subespecie diploide de *A. obovatum*.

El concepto actual de *A. obovatum* incluye dos subespecies, una diploide, la subsp. *obovatum*, y una tetraploide, la subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva. A ellas se añade una tercera subespecie, *numidicum* Salvo & Cabezudo, de incierta posición taxonómica (BECHERER, 1935; SALVO *et al.*, 1992; MAIRE, 1959; RUMSEY & VOGEL, 1996). De la subespecie diploide se han reconocido tres variedades (DEMIRIZ *et al.*, 1990): *obovatum*, *deltoideum* Demiriz, Viane & Reichst. y *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst.

Hasta que se describió la variedad *protobillotii* de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, todos los autores coincidían en señalar que *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (sub *A. billotii* F.W. Schultz) era un autotetraploide derivado de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, basándose fundamentalmente en el comportamiento meiótico de híbridos naturales y artificiales de este taxon con otros (BENNERT *et al.*, 1991; BOUHARMONT, 1977a, 1977b; CALLÉ *et al.*, 1975; CUBAS & SLEEP, 1994; EMMONTT, 1964; GIRARD & LOVIS, 1968; LOVIS, 1977; LOVIS & VIDA, 1969; MANTON & REICHSTEIN, 1962; RASBACH *et al.*, 1991; REICHSTEIN, 1981; SLEEP, 1983).

Ante los resultados de los análisis citológicos y por el hecho, inusual en los autotetraploides, de presentar diferencias morfológicas evidentes con su ancestro diploide, SLEEP (1983) indicó que *A. billotii* era un autotetraploide derivado de *A. obovatum* o de una forma con cromosomas

homólogos, dejando abierta la posibilidad de que pudiera tratarse de otro taxon.

Tras encontrar una variedad diploide de morfología muy próxima a la del tetraploide, DEMIRIZ *et al.* (1990) y RASBACH *et al.* (1990) atribuyeron a ésta el origen del tetraploide por autoploidía, y así la llamaron var. *protobillotii*.

Los pteridófitos difieren del resto de las plantas vasculares por tener completamente independientes la generación esporofítica y la gametofítica. Los gametófitos, a pesar de su sencillez anatómica, tienen sus caracteres morfológicos, sus condiciones de crecimiento y sus preferencias ecológicas. Además, son los responsables de la reproducción sexual y la selección inicial del hábitat. Su conocimiento es indispensable para tratar de conocer los mecanismos de dispersión y de especiación de los pteridófitos.

Aunque la clasificación y las hipótesis filogenéticas de los helechos se han basado tradicionalmente en los caracteres del esporófito, la morfología y la biología de la generación gametofítica es de gran valor y puede contribuir a un mejor conocimiento de la evolución de los helechos (ATKINSON, 1973; MILLER, 1968; NAYAR & KAUR, 1971; STOKEY, 1951; WINDHAM & HAUFLE, 1986). Cada vez son más los estudios morfológicos de los protalos en los que se destaca la importancia de estos caracteres gametofíticos en los helechos. En el género *Asplenium* cabe destacar, entre otros, los de HENRIET (1970), HENRIET & MOENS (1976), HENRIET *et al.* (1976), HERRERO *et al.* (1993), MOMOSE (1959, 1960a, 1960b, 1960c, 1961a, 1961b), NAYAR *et al.* (1968), PANGUA *et al.* (1994) y PRADA *et al.* (1995, 1996).

El sistema de reproducción juega un papel importante en la biología evolutiva de una especie. En contraste con todas las demás plantas vasculares, los pteridófitos homospóreos tienen gametófitos potencialmente bisexuales. Esta peculiaridad del ciclo de vida hace que existan tres posibles formas de fecundación (KLEKOWSKY, 1969a, 1979; LLOYD, 1974), de consecuencias evolutivas muy diferentes:

- 1) autofecundación intragametofítica, la fusión de gametos del mismo gametófito,
- 2) autofecundación intergametofítica, la fecundación cruzada de gametófitos producidos por un solo esporófito, y
- 3) fecundación cruzada intergametofítica, la fecundación cruzada de gametófitos producidos por diferentes esporófitos.

Como los anteridios y los arquegonios se forman muy próximos en el mismo talo, KLEKOWSKI (1979) y KLEKOWSKI & BAKER (1966)

sugerían que la autofecundación intragametofítica era el modo de reproducción más frecuente en poblaciones naturales de helechos. Estudios de laboratorio y observaciones de gametófitos en la naturaleza indican, sin embargo, que muchas especies de pteridófitos poseen mecanismos que conducen a la formación de gametófitos funcionalmente unisexuales, lo cual promovería la fecundación intergametofítica (D. SOLTIS & P. SOLTIS, 1987 y referencias contenidas).

Son tres los principales mecanismos que tienen los pteridófitos homospóreos para promover la formación de gametófitos funcionalmente unisexuales y/o fomentar la fecundación intergametofítica:

- 1) la secuencia ontogenética de los gametangios puede producir gametófitos unisexuales al mismo tiempo o gametófitos bisexuales donde maduran asincrónicamente sus gametangios (KLEKOWSKI, 1969a; LLOYD, 1974).
- 2) la producción de la hormona anteridiógeno por parte de protalos femeninos maduros y que inducirían en su vecindad la formación de jóvenes protalos masculinos (DÖPP, 1950; NÄF, 1979, SCHNELLER *et al.*, 1990), y
- 3) la presencia de una carga genética debida a alelos letales recesivos que se expresaría en esporófitos producidos vía autofecundación intragametofítica, reducirá o eliminará su viabilidad reproductiva en favor de la producción de esporófitos vía fecundación intergametofítica (KLEKOWSKI, 1969b; LLOYD, 1974; COUSENS, 1979; CRIST & FARRAR, 1983). Relacionado con esto, estaría también la capacidad para reproducirse de un gametófito aislado, que puede expresarse mediante el potencial de aislamiento.

El análisis de estos mecanismos se utilizan para inferir los tipos de sistema de reproducción de los pteridófitos.

Además, el sistema de reproducción de una población o una especie puede ser inferido por la distribución de la variación alélica en los genotipos (p. ej. a través de los datos obtenidos de los zimogramas de electroforesis de isoenzimas) y por comparación de las proporciones de los genotipos observados con los esperados en condiciones de equilibrio según Hardy-Weinberg. Las desviaciones de este equilibrio se pueden calcular a través del índice de fijación de Wright (F).

En los últimos años, gracias a los estudios isoenzimáticos, se han aclarado algunos de los conceptos de la biología y evolución de los helechos homospóreos. Éstos incluyen la hipótesis de que los actuales helechos homospóreos diploides se han originado tras sucesivos ciclos de poliploidización seguidos de la pérdida de la expresión génica y extinción de los táxones progenitores (HAUFLER, 1987, 1989); lo cual explicaría que, a pesar de que los helechos homospóreos tienen un elevado número cromosómico, lo que llevó a interpretarlos como poliploides antiguos, se

comportan como verdaderos diploides y serían antiguos poliploides diploidizados (HAUFLER & SOLTIS, 1986).

Además, el estudio de electroforesis de isoenzimas se ha revelado como uno de los métodos más útiles para interpretar los mecanismos que han podido conducir a la formación de pteridófitos de origen poliploide y su posterior evolución (BRYAN & D. SOLTIS, 1987; GASTONY, 1986, 1988, 1990; HAUFLER, 1985a, 1985b; HAUFLER *et al.*, 1985, 1990, 1995; LIN *et al.*, 1996; PRYER & HAUFLER, 1993; RABE & HAUFLER, 1992; RANKER *et al.*, 1989; D. SOLTIS & P. SOLTIS, 1993; P. SOLTIS *et al.*, 1991, WERTH, 1989, 1991; WERTH *et al.*, 1985a, 1985b); así como para interpretar los sistemas de reproducción de los pteridófitos (HAUFLER & D. SOLTIS, 1984; KIRKPATRICK *et al.*, 1990; KORPELAINEN, 1995; RANKER, 1992; RANKER *et al.*, 1996; D. SOLTIS & P. SOLTIS, 1986, 1987a, 1987b; D. SOLTIS *et al.*, 1988; P. SOLTIS & D. SOLTIS, 1988b).

En el género *Asplenium* cada vez son más los estudios realizados utilizando técnicas moleculares, tanto de electroforesis de isoenzimas (BENNERT & FISCHER, 1993; DEDERA & WERTH, 1987; PAJARÓN *et al.*, 1996; RANKER *et al.*, 1994; SCHNELLER & HOLDEREGGER, 1996; WERTH *et al.*, 1985a, 1985b), como de ADN (VOGEL *et al.*, 1996), que están contribuyendo al mejor conocimiento de este género.

2. OBJETIVOS

Este trabajo nos lo planteamos como una contribución al mejor conocimiento de la biología de los táxones, preferentemente ibéricos, de fronde lanceolada del género *Asplenium*.

Los principales objetivos de este trabajo han sido:

1. Estudiar la generación esporofítica de todos los táxones del grupo, así como de híbridos relacionados con ellos.
2. Estudiar la generación gametofítica, tanto su morfología como su biología reproductiva.
3. Estudiar la variabilidad genética de los táxones usando técnicas de electroforesis de isoenzimas. Comprobar si la variabilidad morfológica se corresponde con la variabilidad genética y así delimitar mejor los táxones.
4. Esclarecer, utilizando técnicas citológicas e isoenzimáticas, el origen y evolución de los tetraploides del grupo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL ESTUDIADO

Los estudios se han llevado a cabo con plantas secas y vivas. Las primeras proceden tanto de nuestras herborizaciones, como de las visitas y los préstamos de los herbarios que se enumeran a continuación (abreviaturas según HOLMGREN *et al.*, 1990): B, BM, G, K, JVC, MA, MACB, MAF y MGC. En el apéndice I se relaciona el material de herbario revisado, en el apéndice II el material recolectado por nosotros, en el apéndice III los individuos utilizados en los estudios de la generación gametofítica y en el apéndice IV el material utilizado en los diferentes estudios, incluyendo el número de individuos de cada población usados en el estudio de electroforesis.

De las plantas vivas se recolectaron varias frondes jóvenes que se conservaron en papel húmedo y en frío para su posterior análisis citológico y electroforético, no durando más de una semana su conservación en frío antes de ser procesadas; además, se recolectaron una o dos frondes maduras que se prensaron para obtener esporas y para observar y medir los caracteres macro y micromorfológicos del esporófito. Así mismo, con el fin de tener material vivo en el laboratorio de forma permanente, se recolectaron entre 1 y 3 rizomas en aquellas poblaciones que estaban formadas por numerosos individuos. Estos rizomas se mantuvieron en cultivo en una cámara con luz artificial.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Generación esporofítica

3.2.1.1. Estudio morfológico.

Del esporófito se han analizado los caracteres que se resumen en la tabla 1. De los caracteres métricos se realizaron 30 medidas en cada individuo estudiado. Para la observación de los caracteres de las pinnas medias de las frondes se hicieron preparaciones permanentes aclaradas con hidróxido sódico al 2.5% e hipoclorito sódico al 10%, teñidas con rojo de rutenio y montadas en bálsamo de Canadá (VIANE, 1990). Las esporas y las páleas del rizoma se montaron en DePeX para su observación con el microscopio óptico. De las esporas se ha medido la longitud del exosporio en posición polar o ecuatorial longitudinal y se ha realizado el estudio morfológico del perisporio con microscopio electrónico de barrido. De los estomas localizados en la zona entre las venas se midió su longitud.

De los caracteres métricos estudiados se calculó su media y su desviación estándar, y se representaron en una gráfica.

Para caracterizar las células epidérmicas y las células estomáticas y su(s) célula(s) aneja(s) hemos adoptado la terminología de VAN COTTHEM (1970, 1973), y la terminología revisada de VIANE (1993) para determinar la posición de la zona de contacto entre las células estomáticas y las paredes transversales de la(s) célula(s) aneja(s).

FRONDE	PINNAS	EPIDERMIS	PÁLEAS	ESPORAS
forma	forma	células epidérmicas	tipo	ornamentación
color del peciolo y raquis	tipo de dientes	longitud de los estomas*	color	longitud del exosporio*
grado de división	mucrón	tipo de estomas indusio indumento	forma	

Tabla 1. Caracteres morfológicos del esporófito analizados. Con * los caracteres métricos.

3.2.1.2. Estudio citológico

La mayor parte de los estudios citológicos se han realizado observando el comportamiento meiótico de las células madres de las esporas, y en algunos casos observando las mitosis de células radicales de jóvenes esporófitos.

Para el estudio de las meiosis, se fijaron los esporangios en una mezcla de alcohol absoluto-ácido acético (3:1). Generalmente las fijaciones se realizaron directamente en el campo, pero en algunos casos se llevaron a cabo en el laboratorio tras permanecer las frondes varias horas en la nevera. La tinción se realizó con hematoxilina de Wittman durante 12-14 horas, a continuación se lavaron con ácido acético glacial durante 5 minutos y se montaron en medio Hoyer diluido para obtener preparaciones semipermanentes. La observación se realizó al microscopio óptico en campo claro y con contraste de fases.

Para observar las mitosis se siguió un método muy similar al de las meiosis, pero realizamos un pretratamiento de las raicillas de los jóvenes esporófitos con para-diclorobenceno durante unas 7 horas antes de proceder a la fijación.

3.2.2. Generación gametofítica

Para el estudio de los gametófitos se realizaron siembras de esporas del material que se señala en el apéndice III. Las esporas, que procedían en cada caso de un único esporófito, se sembraron en placas Petri de 6 cm de diámetro. Para el estudio de la germinación, de los primeros estados del desarrollo de los protalos y como fuente para el trasplante de jóvenes protalos en estado presexual para los distintos experimentos, se sembraron en medio nutritivo solidificado con agar (DYER, 1979). Para el estudio de la morfología del gametófito adulto se sembraron en una mezcla de compost y arena en proporción 3:1, esterilizada en autoclave a 125° C durante 20 minutos, con el fin de desvitalizar posibles esporas contaminantes de otros táxones. En ambos casos las placas se sellaron con Parafilm, y las de tierra se regaron periódicamente. De cada muestra se realizaron 2 réplicas. Todas las placas se mantuvieron en una cámara de cultivo a 20° ± 2° C con 12 horas de luz fluorescente (28 µE) / 12 horas de oscuridad.

Para los diferentes estudios de la generación gametofítica los muestreos se realizaron de la siguiente manera:

3.2.2.1. Germinación de las esporas y fases iniciales del desarrollo del protalo

A partir de los cultivos en medio nutritivo solidificado con agar se contabilizó cada dos días el porcentaje de germinación de las esporas, el número de células que formaban la fase filamentosa y se observaron en protalos sin teñir sus primeras fases del desarrollo.

3.2.2.2. Estudio morfológico del protalo adulto

Se muestrearon unos 50 protalos en las placas de tierra de los cultivos multisporos en las diferentes etapas de desarrollo, aproximadamente cada dos semanas, se fijaron y tiñeron en aceto-carmín con hidrato de cloral en baño maría a 50° C durante dos horas (EDWARDS & MILLER, 1972), y se montaron en agua para su estudio al microscopio óptico. En los táxones con protalos pelosos, la densidad de los pelos marginales, que viene dada por el nº de pelos / mm, se determinó utilizando un analizador de imagen (Microm) y la longitud de los pelos se estudió con el microscopio óptico dotado de ocular micrométrico. De estos dos últimos parámetros se hicieron 30 medidas en protalos maduros de aproximadamente 4.5-5 mm de anchura en cada muestra estudiada, se calculó su media y su desviación estándar, y los datos se representaron en un diagrama "box and whisker" múltiple.

3.2.2.3. Secuencia ontogenética de los gametangios, expresión sexual y sistemas de reproducción

Se aislaron de los cultivos en agar 50 protalos en estado presexual y se transplantaron al mismo tipo de placa Petri con suelo desvitalizado preparado como ya hemos indicado anteriormente. Los protalos se situaron de forma regular en las placas Petri con el fin de obtener una densidad homogénea (1 protalo / 0,56 cm²) en todos los cultivos (Fig. 1) y facilitar el examen periódico (semanal) de cada gametófito individualmente para determinar la expresión sexual inicial y su evolución a lo largo del período de observación. Éste ha variado entre 113 y 148 días dependiendo de las muestras; las observaciones finalizaron cuando los porcentajes de cada tipo de gametófito (masculino, femenino y bisexual) se hicieron estables.



Figura 1. Placa de cultivo de los 50 protalos, ya maduros y estables, de la muestra BUF 10a de *A. foreziense* para determinar la secuencia ontogenética de sus gametangios.

3.2.2.4. Potencial de aislamiento

Para determinar la capacidad de autofecundación intragametofítica en las muestras estudiadas hemos transplantado gametófitos en estado presexual a cajitas de plástico de 3 cm x 3 cm con suelo desvitalizado. Se aislaron 25 protalos por un lado, y por otro 25 parejas. Estos protalos se regaron semanalmente con el fin de facilitar la fecundación y se observó la producción de esporófitos tanto en los cultivos de protalos aislados como en los emparejados, como medida para determinar el potencial de aislamiento.

También se compararon estos datos con los datos obtenidos de la formación de esporófitos en los cultivos multisporos.

3.2.2.5. Obtención de híbridos artificiales

Como medida de la semejanza genómica y las relaciones de parentesco de las variedades *obovatum* y *protobillotii* del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* con el tetraploide *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* hemos analizado el apareamiento de cromosomas en meiosis y los datos de las electroforesis de híbridos artificiales. Para obtener estos híbridos en el laboratorio hemos cruzado los individuos VAR7 x MIE27 (ver apéndice II) siguiendo el método descrito por RASBACH *et al.* (1994).

3.2.3. Electroforesis de isoenzimas

Para la electroforesis de isoenzimas en gel de almidón hemos seguido fundamentalmente los protocolos de D. SOLTIS *et al.* (1983). Las diferentes etapas del proceso se han realizado de la siguiente forma:

3.2.3.1. Obtención del extracto vegetal

Se recogió material fresco en el campo y se mantuvo siempre fresco y húmedo, nunca más de una semana, hasta prepararlo para su posterior análisis electroforético. El primer paso fue la obtención de un homogeneizado del tejido vegetal, en nuestro caso hojas o pinnas jóvenes de los diferentes individuos para analizar la generación esporofítica, o bien gametófitos maduros cuando se trataba de analizar la generación gametofítica. La extracción se hizo triturando aproximadamente 0.05 g de material vegetal fresco en 0.5 ml de tampón de extracción con la base de tubos de centrífuga, en pocillos de porcelana que se situaban sobre placas de hielo con el fin de mantener el material a una temperatura no superior a 5° C. La homogeneización de los tejidos rompe la compartimentalización celular produciendo la interacción entre proteínas y compuestos secundarios (fundamentalmente fenoles), lo que interfiere en la actividad enzimática que se pretende analizar; para evitar esto los tampones de extracción contienen una serie de aditivos que reducen la interacción entre las proteínas y estos compuestos secundarios y sus productos de reacción. Se ha utilizado para la extracción el tampón fosfato-polivinilpirrolidona (fosfato-PVP) con 2-mercaptoetanol al 1% (D. SOLTIS *et al.*, 1983); a las muestras que iban a ser conservadas en el ultracongelador se les añadió además un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Una vez obtenido el homogeneizado, el extracto se absorbía en rectángulos de 6 mm x 4 mm de papel de filtro Whatman nº 3. Las muestras se conservaron a una temperatura aproximada de -86°C hasta su

utilización. En algunos casos se utilizaron inmediatamente después de haber sido preparadas.

3.2.3.2. Preparación de los geles

Se utilizaron geles de almidón en una concentración que ha variado entre el 10% y el 12% según el lote, ya que se trata de un producto biológico que está sujeto a variaciones. Tras la cocción del gel, se desgasifica con una bomba de vacío durante 1 minuto. A continuación el gel se vierte uniformemente en un molde de 18.5 cm x 15.5 cm x 0.5 cm y se deja enfriar. Por último se tapa con una película de plástico para evitar su desecación y se mantiene en un sitio fresco hasta su utilización (normalmente se han preparado 15 horas antes de cargar las muestras).

En la tabla 2 se detallan los diferentes tampones del gel y del electrodo de los sistemas que hemos usado.

SISTEMA TAMPÓN	TAMPÓN ELECTRODO	pH	TAMPÓN DEL GEL	pH
Sistema 1 (WENDEL & WEEDEN 1989)	0.065 M L-histidina 0.019 M ácido cítrico	5.7	dilución 1:6 del tampón del electrodo	5.7
Sistema 2 (WENDEL & WEEDEN 1989)	0.04 M ácido cítrico, ajustar pH con N-(3-aminopropil) morfolina	6.1	dilución 1:19 del tampón del electrodo	6.1
Sistema 3 (WENDEL & WEEDEN 1989)	0.135 M Tris 0.043 M ácido cítrico	7.0	dilución 1:14 del tampón del electrodo	7.0
Sistema 5 (WENDEL & WEEDEN 1989)	0.3 M ácido bórico, ajustar pH con NaOH	8.0	0.076 M Tris 0.005 M ácido cítrico	8.6
Sistema 6 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)	0.1 M ácido bórico, ajustar pH con NaOH	8.6	0.015 M Tris 0.004 M ácido cítrico	7.8
Sistema 8 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983), modificado (HAUFLER 1985a)	0.039 M hidróxido de litio 0.263 M ácido bórico	8.0	0.033 M Tris 0.005 M ácido cítrico 0.004 M hidróxido de litio 0.03 M ácido bórico	7.6
Sistema 11 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)	0.4 M ácido cítrico, ajustar pH con HCl 1 N	7.0	0.005 M L-histidina, ajustar pH con NaOH	7.0

Tabla 2. Composición y pH de los distintos sistemas tampón utilizados.

Las muestras se colocan a lo largo de un corte que hacemos en el gel a unos 4 ó 5 cm de su parte inferior. Una vez cargadas las muestras se vuelven a unir las dos partes del gel producto del corte y se comprimen con la ayuda de una barra de vidrio para evitar su separación durante la electroforesis. En la zona central del gel se pone una lámina de acetato para evitar la desecación y se coloca encima de las cubetas que contienen el tampón del electrodo, se colocan las bayetas y encima se pone un peso (un cristal) para facilitar el contacto de las bayetas con el gel.

3.2.3.3. Electroforesis

El molde en el que hemos preparado el gel se sitúa sobre las dos cubetas que contienen el tampón del electrodo, unidas por un soporte horizontal. El contacto entre el tampón del electrodo y el gel se consigue mediante una bayeta de cocina de aproximadamente 16 cm x 15 cm., Todo ello se coloca en un refrigerador a unos 4° C y se conecta a una fuente de alimentación regulable (Hoefer PS 500XT y Consort E714), con la precaución de colocar siempre las muestras en el extremo catódico, ya que todos los sistemas enzimáticos que hemos ensayado migran hacia el ánodo.

Las condiciones de voltaje o intensidad de la fuente de electroforesis se detallan junto a cada sistema utilizado, así como el tiempo aproximado que mantenemos el gel sometido a la acción de la corriente eléctrica, en la tabla 3.

SISTEMA TAMPÓN	VOLTAJE (v) O INTENSIDAD (mA)	TIEMPO (HORAS)
Sistema 1 (WENDEL & WEEDEN 1989)	40 mA	6-7
Sistema 2 (WENDEL & WEEDEN 1989)	40 mA	6-7
Sistema 3 (WENDEL & WEEDEN 1989)	40 mA	6-7
Sistema 5 (WENDEL & WEEDEN 1989)	250 v	3-4
Sistema 6 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)	250 v	3-4
Sistema 8 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983), modificado (HAUFLER 1985a)	30 mA	5-6
Sistema 11 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)	40 mA	6-7

Tabla 3. Condiciones de la corriente eléctrica y tiempo aproximado de los diferentes sistemas utilizados.

Con las condiciones de voltaje (250 v) del sistema 6, la intensidad con la que comienza es elevada (80-90 mA). Para evitar problemas en la resolución de las bandas debidos al calentamiento del gel, además de introducir todo en el refrigerador, se colocan placas de hielo alrededor del molde con el gel.

3.2.3.4. Tinción

Los geles se tiñen inmediatamente para detectar la presencia de enzimas específicas (3 por cada gel) cuyos patrones de migración a través del gel podrán ser utilizados como marcadores genéticos y como una fuente de información acerca de la variabilidad genética de los táxones. Para las tinciones hemos utilizado tanto soluciones líquidas como solidificadas con agarosa al 1%.

La base bioquímica de esta tinción consiste fundamentalmente en la interacción de los productos resultantes de la reacción de las enzimas con sus sustratos (que añadimos en la solución) con sales de diazonio u otros compuestos que precipitan como una mancha insoluble allí donde se ha producido la reacción enzimática.

Los protocolos usados en la tinción son fundamentalmente los señalados por D. SOLTIS *et al.* (1983). De los 14 sistemas enzimáticos ensayados, sólo 9 se han resuelto satisfactoriamente y son los que se señalan en la tabla 4, junto a su abreviatura en inglés, su código de nomenclatura (International Union of Biochemistry Nomenclature, 1984) y los sistemas ensayados.

Las fotografías de los geles una vez teñidos (zimogramas) las hemos realizado con película Kodak Tmax 100.

3.2.3.5. Nomenclatura e interpretación de las bandas

Los sistemas enzimáticos se han designado de acuerdo con las reglas usuales de nomenclatura. Se ha utilizado la abreviatura en mayúsculas del nombre de la enzima en inglés (Tabla 4). El patrón de bandas de cada gel (zimograma) se divide en diferentes zonas de actividad, correspondientes a cada una de las isoenzimas que conforman el sistema enzimático y se designan con la abreviatura del nombre en mayúsculas de la enzima seguida de un número (por orden del ánodo al cátodo). Los diferentes loci se indican con la abreviatura del nombre en minúscula y en cursiva, seguida de un número que indica cada uno de los genes que codifican en un mismo sistema enzimático. Para cada alelo de un determinado gen se utiliza una letra

minúscula en cursiva y se nombran por orden alfabético, del más rápido al más lento.

SISTEMA ENZIMÁTICO	ABREV.	CÓDIGO	SISTEMAS ENSAYADOS
Aspártico aminotransferasa (= Glutámico oxalacético transferasa)	AAT (= GOT)	E.C.2.6.1.1	1 (WENDEL & WEEDEN 1989) 6 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983) 8 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)*
Isocitríco deshidrogenasa	IDH	E.C.1.1.1.42	1 (WENDEL & WEEDEN 1989) 2 (WENDEL & WEEDEN 1989) 11 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)*
Leucín aminopeptidasa	LAP	E.C.3.4.11.1	2 (WENDEL & WEEDEN 1989) 3 (WENDEL & WEEDEN 1989) 8 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)*
Málico deshidrogenasa	MDH	E.C.1.1.1.37	1 (WENDEL & WEEDEN 1989) 2 (WENDEL & WEEDEN 1989)*
Fosfoglucoisomerasa	PGI	E.C.5.3.1.9	5 (WENDEL & WEEDEN 1989) 6 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)*
Fosfoglucomutasa	PGM	E.C.2.7.5.1	1 (WENDEL & WEEDEN 1989)* 6 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)
6-Fosfogluconíco deshidrogenasa	6-PGD	E.C.1.1.1.44	1 (WENDEL & WEEDEN 1989)* 2 (WENDEL & WEEDEN 1989)* 3 (WENDEL & WEEDEN 1989)
Siquímico deshidrogenasa	SDH	E.C.1.1.1.25	1 (WENDEL & WEEDEN 1989) 2 (WENDEL & WEEDEN 1989)*
Triosa-fosfato isomerasa	TPI	E.C.5.3.1.1	6 (SOLTIS <i>et al.</i> 1983)*

Tabla 4. Sistemas enzimáticos resueltos satisfactoriamente junto a su abreviatura en inglés, su código de nomenclatura y el sistema con el o los que hemos conseguido su mejor resolución (con *) después de haber ensayado con varios sistemas y haber consultado trabajos sobre otros táxones de pteridófitos.

La interpretación genética de los distintos zimogramas la recogen varios autores, entre ellos, KEPHART (1990) y WENDEL & WEEDEN (1989). Son varios los factores que son determinantes para la interpretación de los modelos de bandeo que se evidencian tras la tinción de los geles

(considerados como fenotipo electroforético): (1) la estructura cuaternaria de la enzima, (2) el número de genes que codifican, (3) su estado alélico (homocigoto o heterocigoto), y (4) su localización particular en los distintos compartimentos celulares.

Las subunidades polipeptídicas de la isoenzima codificadas por cada alelo se visualizan como fenotipos (bandas coloreadas) en el gel. Las aloenzimas (variantes alélicas) de un determinado gen tienen normalmente herencia codominante, es decir en los individuos heterocigotos se expresan todos los alelos de sus parentales homocigotos, con lo cual, podemos diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos.

3.2.3.6. Parámetros genéticos

Una vez determinados los fenotipos enzimáticos para cada uno de los loci estudiados se procedió al cálculo de las frecuencias alélicas de los táxones diploides y éstas se usaron para determinar los parámetros comúnmente utilizados, con ayuda del programa informático BIOSYS-1 (SWOFFORD & SELANDER, 1981, 1989). Con los táxones tetraploides sólo hemos calculado las frecuencias de las combinaciones alélicas. Los parámetros son los siguientes:

- **Porcentaje de loci polimórficos (P)**

Lo hemos calculado con un nivel de significación del 0.99, es decir, hemos considerado un locus polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es igual o inferior a 0.99.

- **Número medio de alelos por cada locus (A)**

- **Número medio de heterozigosis observada por cada locus polimorfo (H_o)**

- **Número medio de heterozigosis esperada en condiciones de equilibrio según Hardy-Weinberg por cada locus polimorfo (H_e)**

- **Índice de fijación de Wright (F)**

Este índice compara la heterozigosis esperada y la observada según la fórmula:

$$F = 1 - (H_o / H_e)$$

F varía de -1, indicando un exceso de heterocigotos, a 1 que significa una deficiencia de heterocigotos.

Se ha calculado el nivel de significación de la desviación de F a lo esperado en condiciones de equilibrio según Hardy-Weinberg para cada loci polimórfico usando un test de chi-cuadrado.

• **Identidad genética (I) y distancia genética (D)**

La medida más empleada de identidad y de distancia genética fue propuesta por NEI (1972). La identidad genética (I) indica el grado de similitud entre dos poblaciones, tomando la proporción de alelos idénticos en esas dos poblaciones.

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

donde J_x , J_y y J_{xy} son las medias aritméticas de todos los loci de $\sum x_i^2$, $\sum y_i^2$ y $\sum x_i \cdot \sum y_i$ respectivamente, x e y son las frecuencias del alelo i en en las poblaciones X e Y respectivamente.

I varía entre 0 (no hay alelos en común) y 1 (las dos poblaciones poseen los mismos alelos y en idénticas frecuencias).

La distancia genética (D) deriva de la anterior. Es el número de sustituciones alélicas por locus.

$$D = - \ln I$$

D varía entre 0 (no hay ningún cambio alélico, identidad total de las poblaciones comparadas) e infinito (su valor se incrementará a medida que las frecuencias alélicas sean más diferentes).

A partir de las identidades genéticas se pueden elaborar dendrogramas con el fin de agrupar táxones y poblaciones por el método UPGMA (Unweighted Par Group Method with Arithmetic mean, SNEATH & SOKAL, 1973).

3.2.3.7. Aislamiento de orgánulos celulares

Con el fin de localizar la compartimentalización subcelular de las isoenzimas hemos procedido al aislamiento de los cloroplastos de las frondes de los esporófitos. Hemos utilizado básicamente la metodología de GASTONY & DARROW (1983) con algunas modificaciones. Éstas han sido:

(1) el tampón de extracción de las pinnas es el mismo que hemos utilizado para el resto del material (D. SOLTIS *et al.*, 1983).

(2) se ha realizado una primera centrifugación a 300 g (2000 r.p.m.) durante 6 minutos para eliminar los restos de material vegetal y los núcleos. El sobrenadante se ha vuelto a centrifugar a 2000 g (5200 r.p.m.) durante 15 minutos y el sedimento obtenido es una fracción rica en cloroplastos. Se verifica que los cloroplastos están intactos con un microscopio óptico y por último se rompen con dos gotas del tampón de extracción (D. SOLTIS *et al.*, 1983) antes de absorberse en un rectángulo de 6 mm x 4 mm de papel de filtro Whatman nº 3.

La ultracentrífuga que hemos utilizado ha sido una Beckman Optima XL 90, un rotor Type 70 Ti y tubos Beckman de polialómero de 32.4 ml.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. GENERACIÓN ESPOROFÍTICA

4.1.1 Táxones estudiados

Este apartado está estructurado de la siguiente manera:

- Un primer bloque donde aparece el nombre correcto de cada taxon, seguido de la publicación original. A continuación se relacionan los sinónimos más utilizados, con su correspondiente publicación original. Para los nombres de los autores hemos seguido a PICHÍ SERMOLLI *et al.* (1996).
- Un segundo bloque en el que se incluye la descripción del taxon con los caracteres macro y micromorfológicos estudiados (Tabla 1).
- A continuación se detallan los datos citológicos.
- El último bloque lo constituyen los datos corológicos y ecológicos.

En los táxones híbridos, naturales y artificiales, no se sigue esta estructura.

4.1.1.1. *Asplenium fontanum* (L.) Bernh. subsp. *fontanum* in J. Bot. (Schrader) 1799(1): 314. 1799

Polypodium fontanum L., Sp. Pl.: 1089. 1753 (basiónimo)

A. halleri (Rothm.) DC. in Lam. & DC., Fl. Franç. ed. 3, 5: 240. 1815

A. leptophyllum Lag., D. García & Clemente, Anales Ci. Nat. 5(14): 155. 1802

Taxon morfológicamente muy variable (Figs. 2 y 3). Rizoma corto y erecto, cubierto por abundantes páleas clatradas linear-lanceoladas de color castaño (Fig. 4a), como en el resto de los táxones estudiados. Lámina de lanceolada a ovado-lanceolada oblonga (Figs. 2 y 3). El grado de división de la lámina es muy variable, de bipinnatipartida a tripinnatipartida, raramente tripinnatisecta. El tamaño de las pinnas disminuye bruscamente desde las medias (las más largas) hacia las de la base, siendo el par de pinnas basales llamativamente más reducidas que las medias; además la distancia entre las pinnas va aumentando desde las medias hacia las basales (Figs. 2 y 3). El color marrón oscuro normalmente sólo llega hasta la mitad del pecíolo, algo más en la cara abaxial; raramente asciende hacia el raquis, y cuando lo hace generalmente es sólo en la cara abaxial y llega, como mucho, hasta el tercer o cuarto par de pinnas basales.

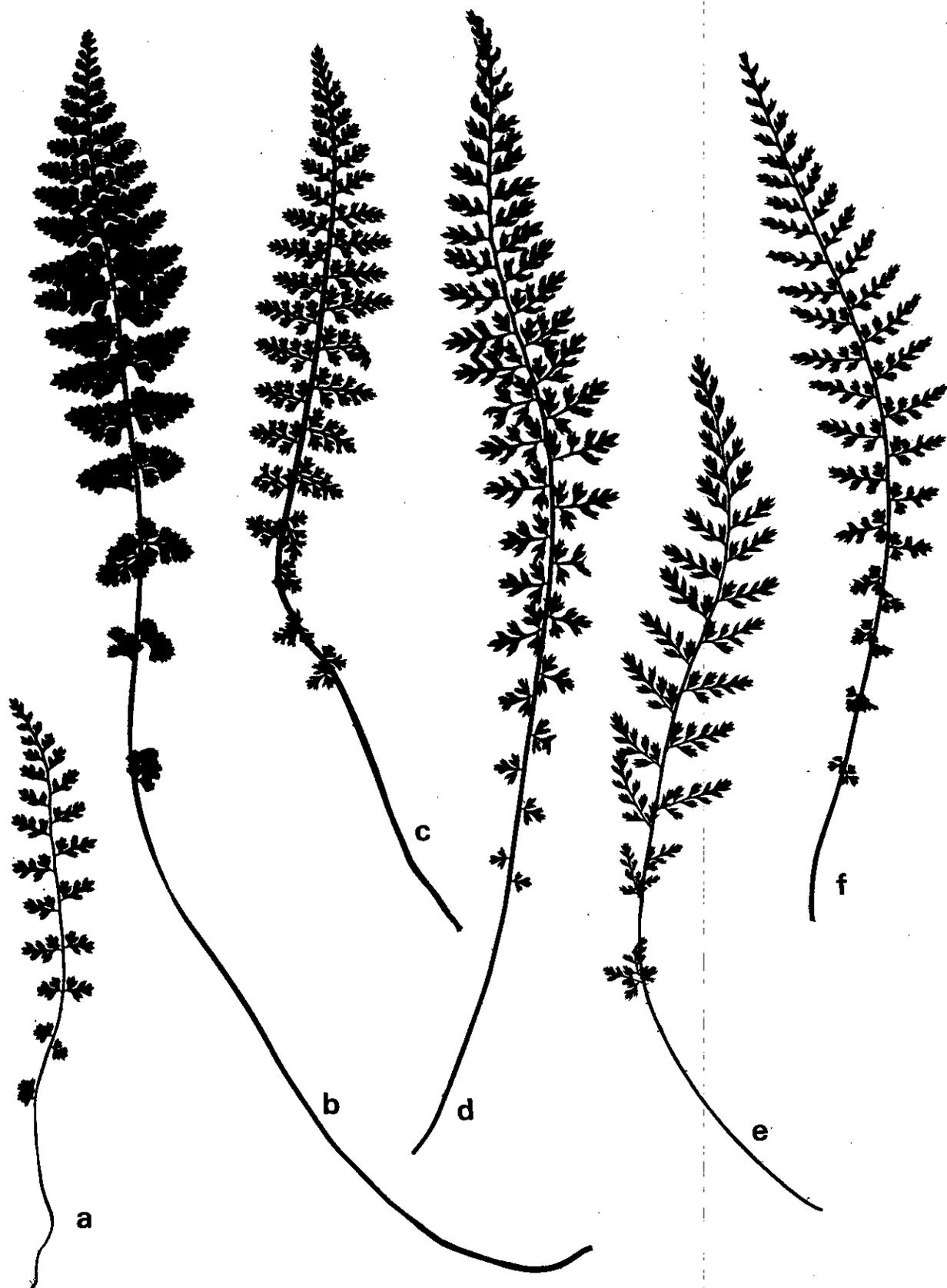


Figura 2. Siluetas de frondes de *A. fontanum* subsp. *fontanum*, individuos: a, FOU 8; b, TRA 15; c, BET 7; d, GAR 11; e, CAM 4; f, BAI 16. Tamaño natural.

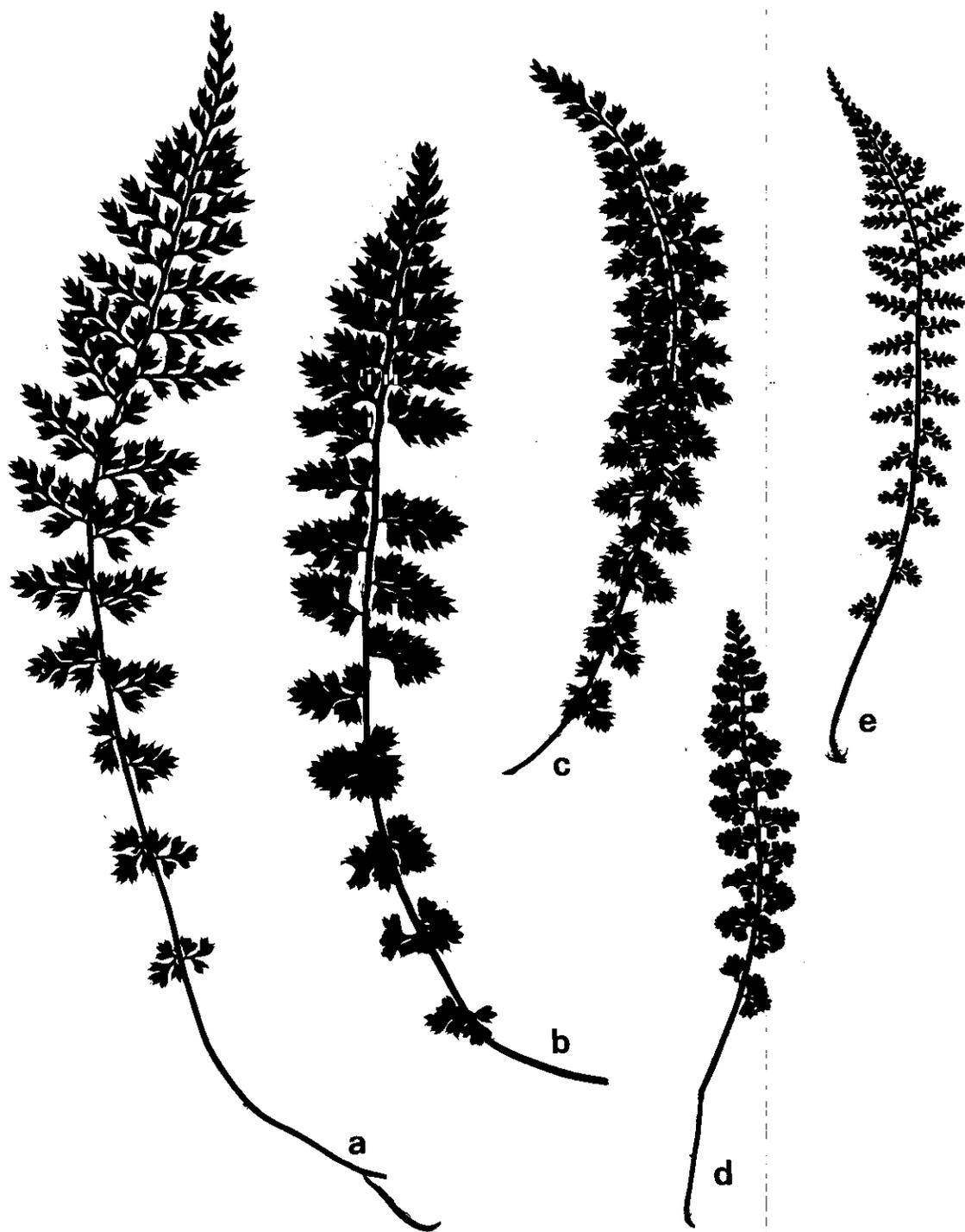


Figura 3. Siluetas de frondes de *A. fontanum* subsp. *fontanum*, individuos: a, BET 18; b, RIP 13; c, TRA 8; d, ARA 4; e, BUJ 2. Tamaño natural.

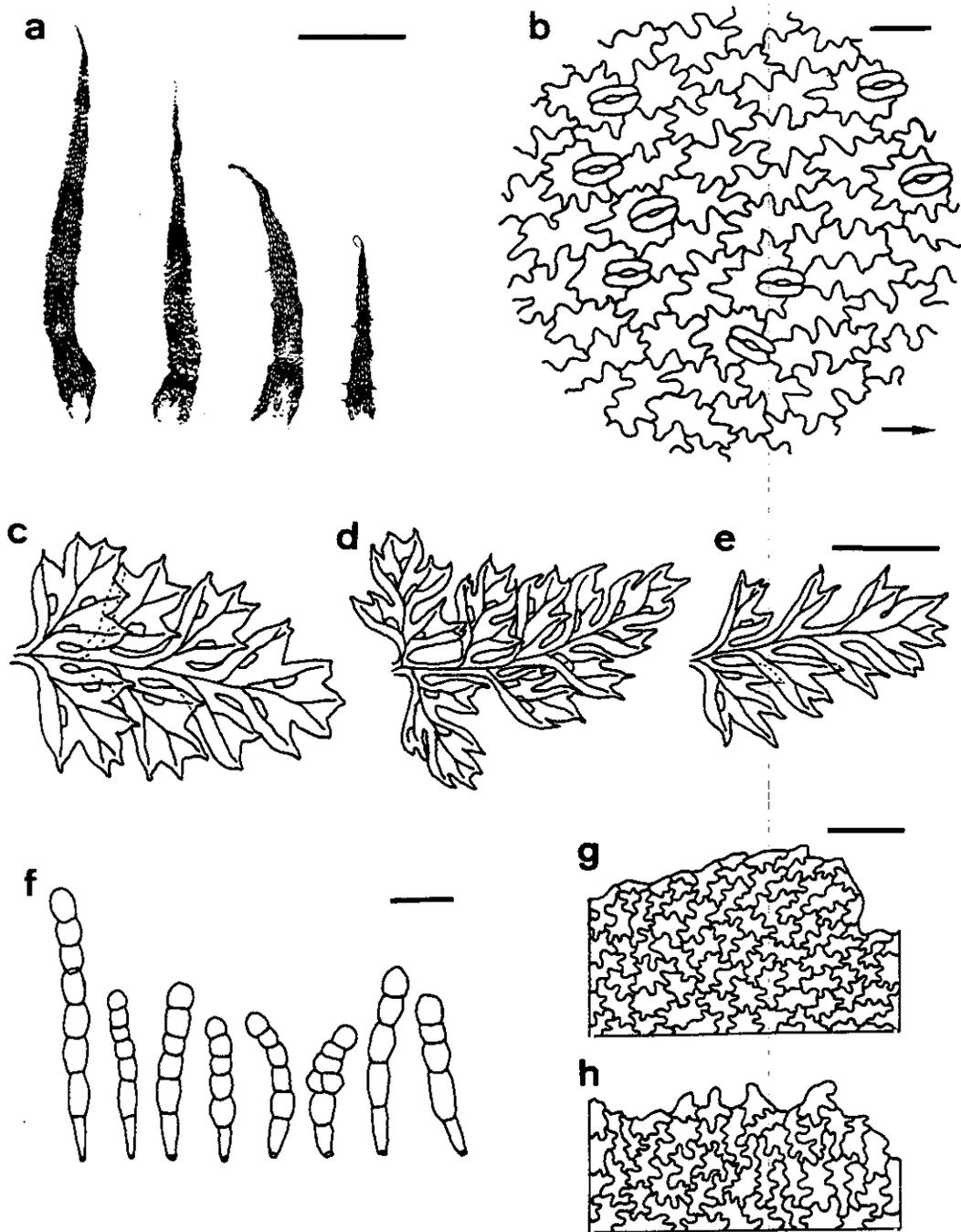


Figura 4. *A. fontanum* subsp. *fontanum*: a, páleas del rizoma; b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c-e pinnas medias de las frondes; f, indumento de las pinnas; g y h, modelos de las células de los indusios. Barra a: 0.125 mm, b: 50 μ m, c-e: 0.5 cm, f- h: 0.1 mm.

Las pinnas son generalmente triangulares; la relación longitud/anchura varía de unos individuos a otros (Figs. 3 y 4). Se insertan en el raquis de forma oblicua, erecto-patentes las superiores, casi perpendiculares las medias, y reflejas las inferiores (Figs. 3 y 4). Las pinnulas son cuneado-triangulares, pudiendo llegar a ser estrechamente triangulares, casi lineares (Fig. 3 d y e). Presentan dientes agudos, más o menos profundos, de morfología y tamaño muy variables; son más o menos triangulares. Los dientes acaban en un mucrón conspicuo (Fig. 4 c-e). El indumento es escaso, formado por pelos multicelulares uniseriados en ambas caras, con 8-5 células (Fig. 4 f).

Los estomas aparecen únicamente en la cara abaxial de las pinnas, como en el resto de los táxones estudiados, son polocíticos y generalmente varían de acropolocíticos a mesopolocíticos (Fig. 4 b); su longitud media es de $38.32 \mu\text{m}$ (Tabla 5). Las células epidérmicas de la cara abaxial son anomomorfas, con las paredes lobuladas y los lóbulos tienden a ser más o menos agudos (Fig. 4 b).

Los indusios se disponen sobre los nervios y suelen estar más cercanos al nervio medio que a los marginales; son de borde liso e irregular (Fig. 4 g), y en casos extremos algunas de las células del borde se prolongan dándole un aspecto irregularmente dentado (Fig. 4 h). Sus células son lobuladas muy similares a las células de la epidermis abaxial (Fig. 4 g y h).

Las esporas de este taxon, como en el resto de Aspleniáceas, son monoletas (Fig. 5) (PANGUA, 1989; TRYON & LUGARDON, 1990); elípticas en vista polar y plano-convexas en vista ecuatorial longitudinal (Fig. 5 f), al igual que en el resto de los táxones estudiados. Para caracterizar la morfología del perisporio de las esporas hemos seguido el criterio de PANGUA & PRADA (1988). Las esporas de este taxon son de tipo flaviforme-fenestrado (Fig. 5 a-d). El número de perforaciones es variable, llegando a tener en algunos casos el perisporio un aspecto casi reticulado, como ya indicara MARTÍN (1984) en una muestra de la Sierra de Guara (Huesca). En un mismo individuo la variación del número de perforaciones puede ser elevada (Fig. 5 a y b). La media de la longitud del exosporio es de $35.03 \mu\text{m}$ (Tabla 5).

Esta especie es diploide. Nuestros recuentos cromosómicos coinciden con los de MANTON (1950), MEYER (1958, 1960, 1962), PÉREZ CARRO & FERNÁNDEZ ARECES (1996) y SÁEZ *et al.* (1997), entre otros. Nuestros resultados han sido de $2n = 72$ en los individuos CE318 y AH1F (PRADA *et al.*, 1996) y de $n = 36$ en los individuos BUJ 3, GUA 7, CAM 7, CAM 9 (Fig. 6), BET 17 (HERRERO *et al.*, 1997a) y GOR 1, FOU 1, FOU 20, CON 9 (HERRERO *et al.*, 1997b).

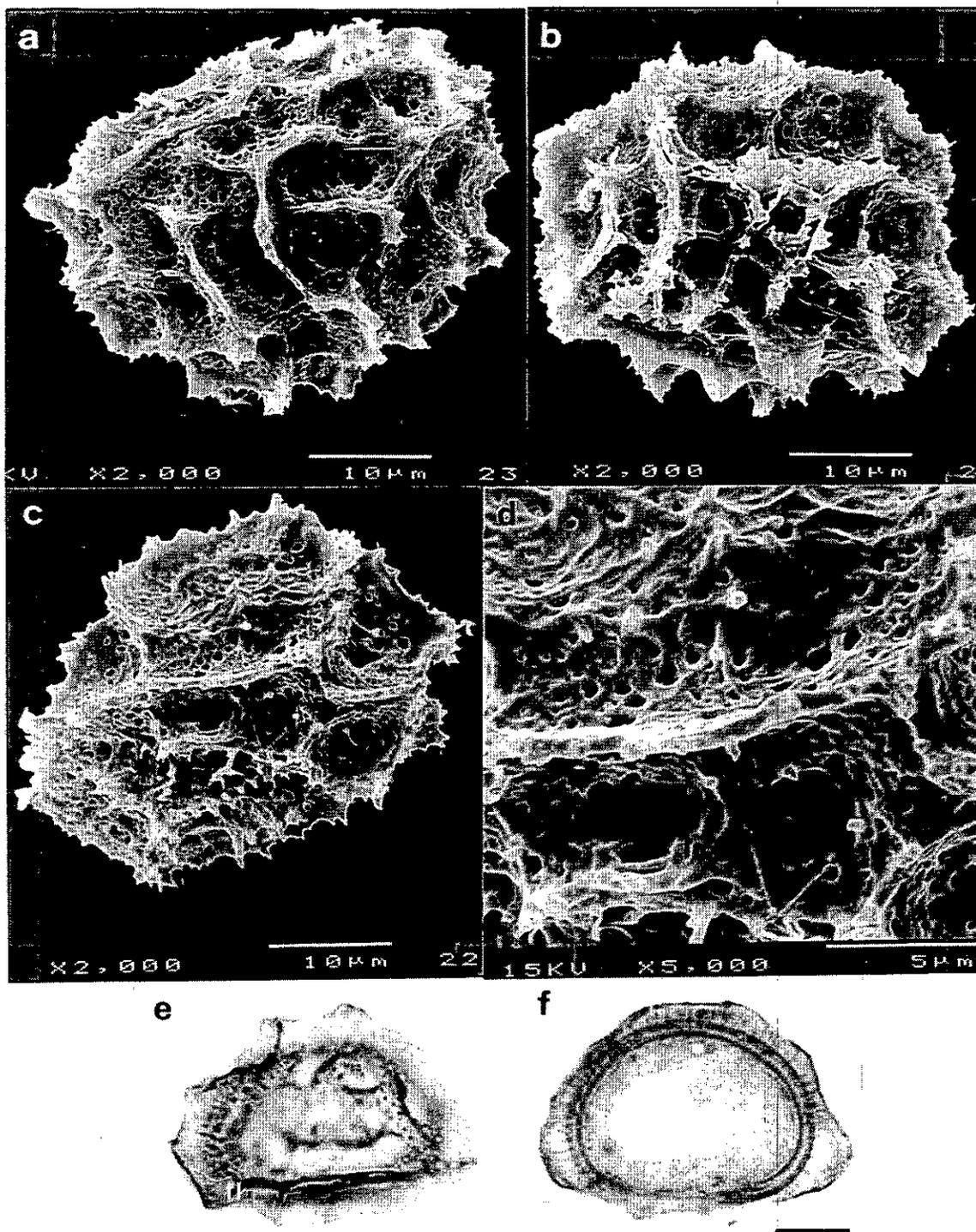


Figura 5. *A. fontanum* subsp. *fontanum*: a-d, fotografías al microscopio electrónico de barrido; e-f, fotografías al microscopio óptico. Barra e y f : 10 µm.

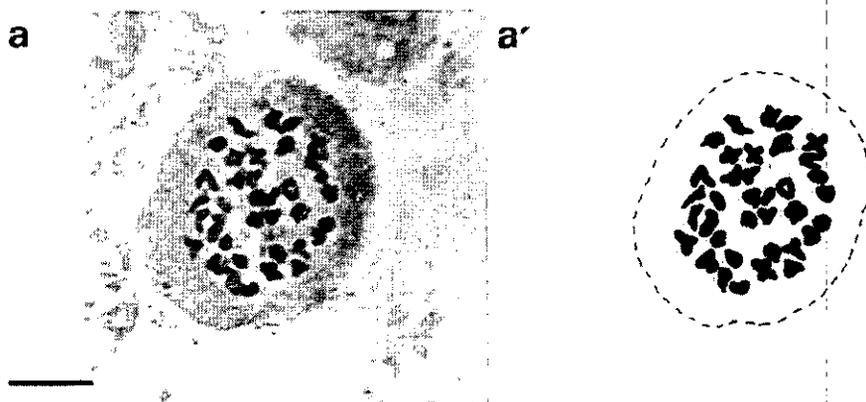


Figura 6. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de las esporas de *A. fontanum* subsp. *fontanum*, individuo CAM 9, mostrando $n = 36$. Barra: 10 μm .

Esta especie es fundamentalmente fisurícola, aunque también ocupa rellanos de rocas y taludes más o menos rocosos. Prefiere las rocas básicas, y sólo puntualmente aparece sobre sustratos ácidos (BOUDRIE, 1996; SÁEZ *et al.*, 1996); nosotros también la hemos observado en sustratos ácidos, sobre pizarras en el valle de Benasque (Huesca) y en el barranco de la Baillanouse (Pirineos-orientales) y sobre granitos en el valle de Ordiso (Huesca). Tiene una amplitud altitudinal muy grande; nosotros la hemos recolectado desde los 300 m en el Vall de Laguart (Alicante) hasta cerca de los 2200 m en el refugio de Góriz (Huesca).

Tiene una distribución más o menos continua por el este de la Península Ibérica, Pirineos, Alpes y Prealpes franceses, suizos e italianos, y Jura, existiendo localidades aisladas en Marruecos (QUEZEL, 1959), Apeninos y sur de Alemania. REICHSTEIN & SCHNELLER (1982) señalan que los individuos de la pequeña población de los montes Vértes (Hungría) probablemente hayan desaparecido y que las citas antiguas de Inglaterra, Bélgica, noroeste de Alemania, Austria y Grecia no han podido ser confirmadas con recolecciones recientes. ADLER *et al.* (1994) lo consideran extinguido en Austria, si bien existen referencias de principios de este siglo de su presencia en este país (DALLA TORRE, 1906; FRITSCH, 1922). Nosotros hemos estudiado un pliego en el herbario B (B 14494) con un individuo, que corresponde a este taxon, de Salzburgo (Austria), del herbario de Mettenius sin fecha, probablemente del siglo pasado.

En la Península Ibérica se distribuye principalmente por los Pirineos y sistemas montañosos de la mitad este peninsular (desde Gerona hasta Alicante) con un areal más o menos continuo; además existe otra localidad puntual en los Picos de Europa (MAF 115718). De las citas que recogen

MORALES & FERNÁNDEZ CASAS (1989), la de Sierra Nevada (MA 233997) corresponde a *A. foreziense*, las de la Sierra de Segura corresponden a una referencia de Fernández-Galiano & Heywood sin que exista ningún testimonio de pliego de herbario, como señala SORIANO (1988) y sin que ninguno de los autores que han trabajado en esta zona lo hayan vuelto a indicar; las citas de El Escorial (Madrid) (MA 981 y MA 158975) corresponden a este taxon, pero tenemos dudas de que la localidad sea correcta, ya que con la misma etiqueta hay un pliego en el herbario MA de *A. marinum* L., y las de Sevilla y Zamora nos parecen muy dudosas. Existen testimonios de pliego de este taxon en Mallorca (BENNERT *et al.*, 1987); estos autores indican que si actualmente todavía está presente en la flora mallorquina, sería muy raro y probablemente restringido a muy pocas localidades.

4.1.1.2. *Asplenium fontanum* (L.) Bernh. subsp. *pseudofontanum* (Kossinsky) Reichst. & Schneller in Candollea 37(1): 124. 1982
A. pseudofontanum Kossinsky, Bot. Mater. Gerb. Glavn. Bot. Sada RSFSR. III(31): 122. 1922 (basiónimo)

Taxon morfológicamente muy similar al anterior y que algunos autores no reconocen (BIR & SHUKLA, 1968; DHIR, 1980). Las diferencias morfológicas de uno y otro son muy escasas, por no decir nulas (Fig. 7). En cuanto a la morfología de las pinnas, quizá haya una tendencia a que el número de dientes de las pínulas sea menor y que los mucrones sean de menor longitud en la subsp. *pseudofontanum* que en la subsp. *fontanum* (Fig. 8 c-e). Además, las pínulas suelen estar más separadas unas de otras y ser de menor tamaño en este taxon, lo que le da a las frondes un aspecto general menos compacto (Fig. 8 a-b).

Todos los caracteres micromorfológicos de las pinnas son similares a los de la subsp. *fontanum*. Los estomas son polocíticos, como ya comentaran BIR *et al.* (1981), y generalmente van de acropolocíticos a mesopolocíticos (Fig. 8 b); su longitud media es de 34.94 μm , algo menor que la de la subsp. *fontanum* (Tabla 5). Las células epidérmicas de la cara abaxial son anomomorfás, con las paredes lobuladas y con los lóbulos más o menos agudos (Fig. 8 b).

Los indusios se disponen sobre los nervios y suelen estar más cercanos al nervio medio que a los marginales; son de borde liso, más o menos irregular y sus células son lobuladas muy similares a las de la epidermis abaxial (Fig. 8 g).

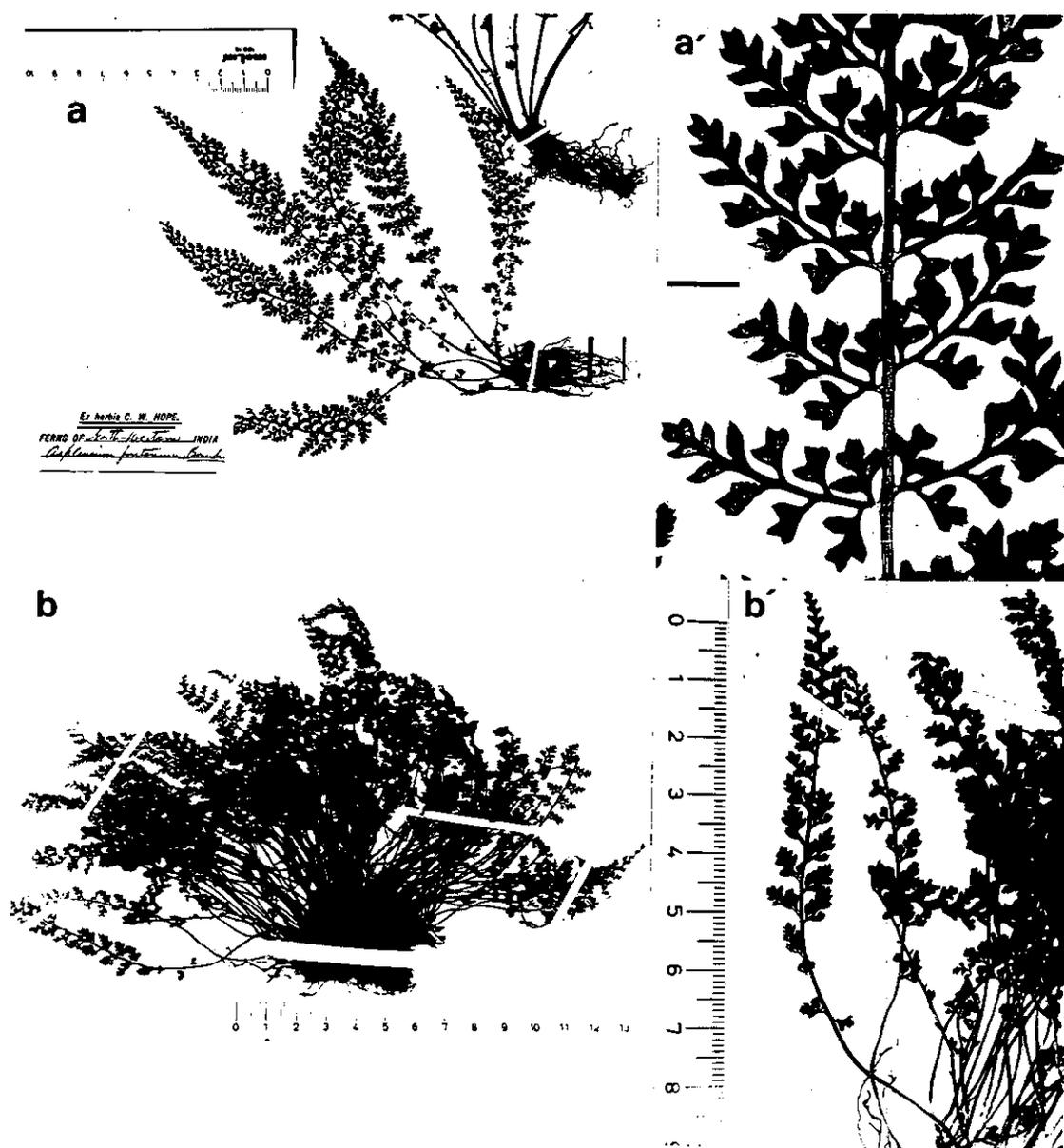


Figura 7. Fotografías de material de herbario de *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*: a, individuo del herbario BM; a', detalle de las pinnas; b individuo B 14668 (isótipo); b', detalle de las frondes. Barra: 0,5 cm.

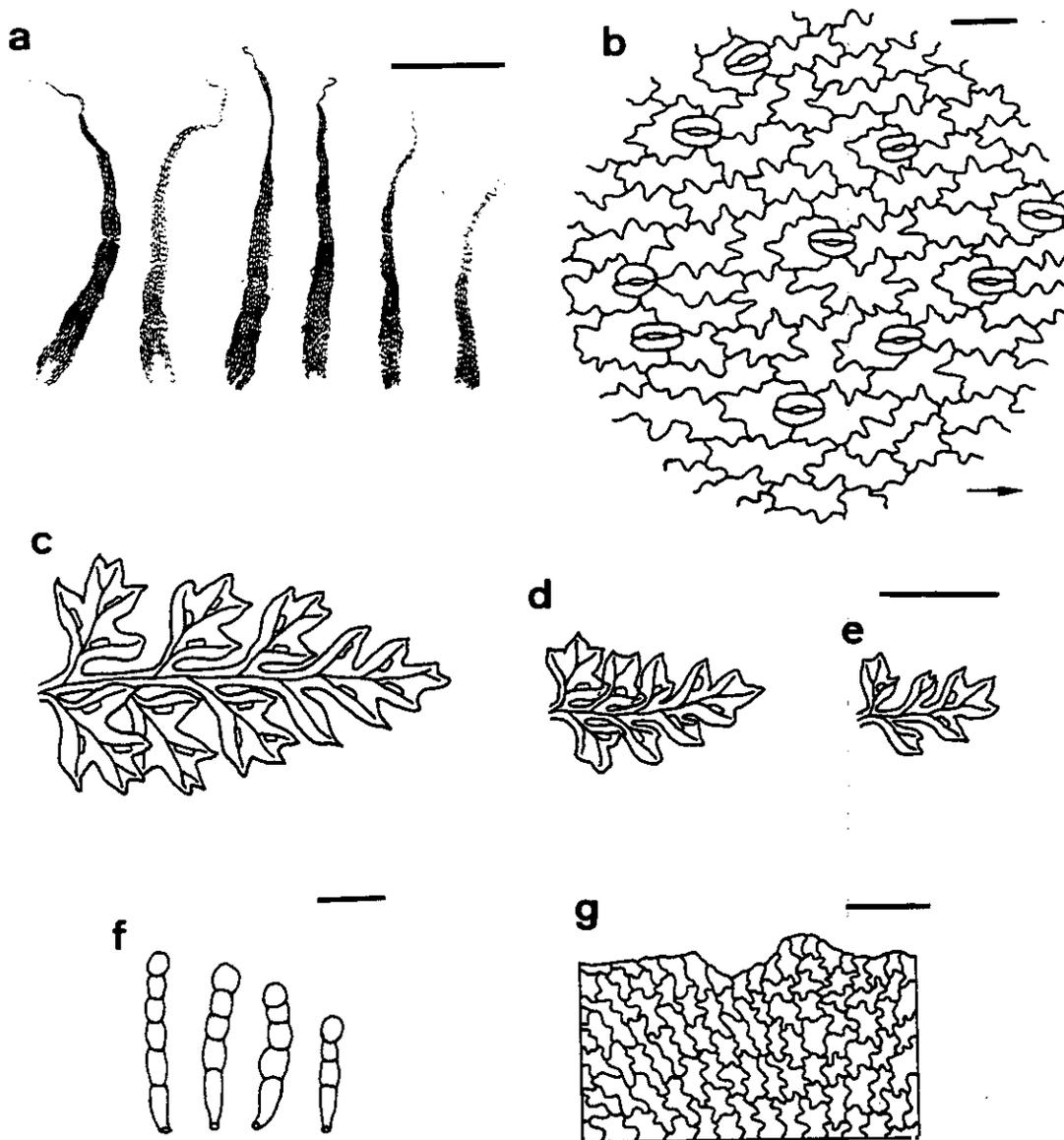


Figura 8. *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*: a, páleas del rizoma; b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c-e pinnas medias de las frondes; f, indumento de las pinnas; g, modelos de las células de los indusios. Barra a: 0.125 mm, b: 50 μ m, c-e: 0.5 cm, f y g: 0.1 mm.

Al microscopio óptico se observa la ornamentación del perisporio más o menos espinulosa (Fig. 9 e y f), y ésta debe ser la razón por la que NAYAR & DEVI (1964, fig. 28) comentan que la ornamentación del perisporio de este taxon es uniformemente espinulosa. Pero al microscopio electrónico de barrido se observa una morfología completamente distinta; se trata de una ornamentación de tipo flaviforme-fenestrado, con los pliegues poco levantados, las crestas equinuladas y con numerosas perforaciones uniformemente repartidas por toda la superficie de la espora, lo que le da un aspecto casi reticulado (Fig. 9 a-d). Todas las muestras observadas son muy uniformes en cuanto al tipo de ornamentación del perisporio. La media de la longitud del exosporio es de 34.11 μm (Tabla 5).

KOSSINSKY (1922) ya indicó ciertas diferencias en la ornamentación de *A. fontanum* y *A. pseudofontanum*, al igual que VIANE (1987), quien comenta que las muestras de esporas al microscopio electrónico de barrido se puede usar para diferenciar táxones muy relacionados como es el caso de *A. fontanum* subsp. *fontanum* y subsp. *pseudofontanum*. Es cierto que en general la ornamentación del perisporio de estos dos táxones es diferente, sobre todo, en el número de perforaciones; si bien este carácter permanece muy constante en el caso de la subsp. *pseudofontanum*, en cambio, en la subsp. *fontanum* es muy variable y dentro del rango de variación aparecen muestras con la ornamentación típica de la subsp. *pseudofontanum* (MARTIN, 1984: 759).

En general, en los caracteres morfológicos en los que existen pequeñas diferencias entre las dos subsp. de *A. fontanum* (grado de división y mucrones de los dientes de las pinnas y ornamentación del perisporio), la subsp. *pseudofontanum* es más uniforme que la subsp. *fontanum*, y en el rango de variación de esta última, aparecen formas que recuerdan a la primera. Es posible que esta menor variabilidad observada en la subsp. *pseudofontanum* se deba al menor número de individuos estudiados, aunque estos individuos corresponden a poblaciones representativas de todo su área de distribución.

El recuento cromosomático de BIR (1962, 1966-67) con material del Monte Shali (Himachal Pradesh), que da un número $n = 72$ para este taxon es erróneo (KHULLAR, 1994); ya REICHSTEIN & SCHNELLER (1982) ponían en duda este recuento, debido a que todos los individuos estudiados por ellos fueron diploides ($n = 36$, $2n = 72$), al igual que los de GIBBY (1982) y KHULLAR *et al.* (1988). GIBBY (1982) tras un estudio de hibridaciones artificiales llega a la conclusión de que los genomas de *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum* son homólogos.

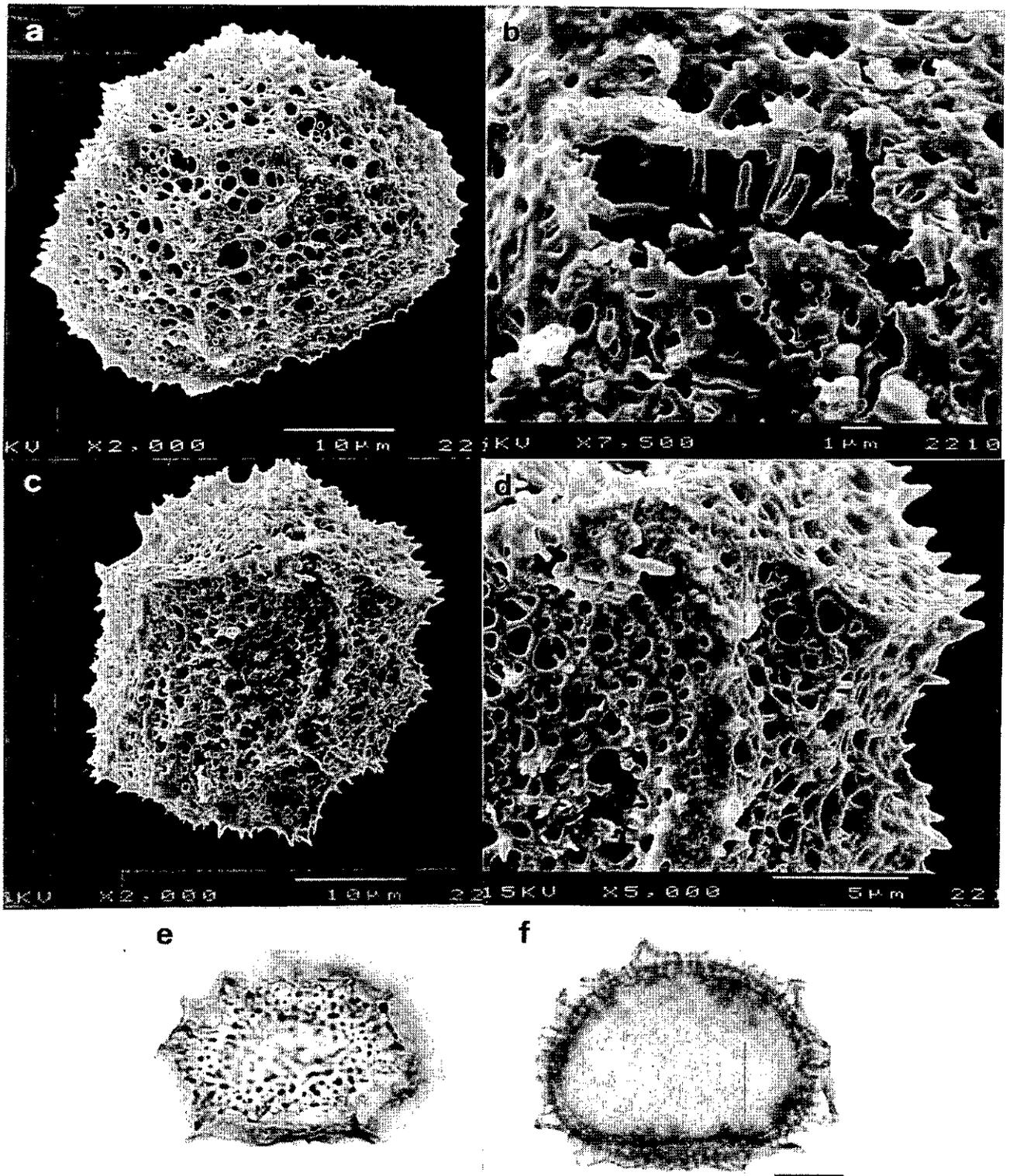


Figura 9. *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*: a-d, fotografías al microscopio electrónico de barrido; e-f, fotografías al microscopio óptico. Barra e y f : 10 μm.

Este taxon se distribuye por los Himalayas occidentales (Pakistán, Cachemira, India y Nepal), Afganistán, Uzbekistán y Tajikistán (AITCHISON, 1881; BIR & SHUKLA, 1968; KHULLAR, 1994; KOMAROV, 1968; KOSSINSKY, 1922; NAKAIKE & MALIK, 1992, 1993; REICHSTEIN & SCHNELLER, 1982), y crece en grietas de rocas calizas y silíceas entre los 1400 y los 3700 m de altitud (REICHSTEIN & SCHNELLER, 1982).

4.1.1.3. *Asplenium foreziense* Legrand ex Giraudias in Bull. Soc. Dauphin. Échange Pl. 12: 501. 1885

A. forisiense Legrand, Ann. Soc. Agric. Industr. Sci. Loire 17: 378. 1873.

A. foreziense Legrand ex Hérib. in Magnier, Fl. Selecta Exsicc., n° 743. 1884 (in sched.)

A. foresiacum (Legrand) Christ, Farnkr. Schweiz 1-2: 84. 1900

Se trata de un alotetraploide derivado de *A. obovatum* subsp. *obovatum* y *A. fontanum* subsp. *fontanum* (SLEEP, 1967, 1982), por lo que comparte con sus parentales muchos de sus caracteres morfológicos, y algunos de ellos son intermedios entre sus parentales (Fig. 10). El rizoma es corto y erecto, cubierto por abundantes páleas clatradas lanceoladas (Fig. 11 a). La fronde varía de lanceolada a ovado-lanceolada; más o menos estrecha, pero algo menos que en *A. fontanum* (Fig. 10). El grado de división de la lámina varía de bipinnatipartida a bipinnatisecta, raramente tripinnatipartida (Fig. 10). El carácter del color marrón oscuro del pecíolo y raquis es muy variable; en la cara adaxial normalmente no asciende hasta el raquis, quedándose sólo en el pecíolo donde puede ocupar únicamente la parte basal o prácticamente todo él; en cambio, en la cara abaxial asciende por el raquis, pudiendo llegar desde la mitad hasta las dos terceras partes del mismo.

Las pinnas son generalmente triangulares, raramente ovoideas (Fig. 11 c-e), y se insertan en el raquis normalmente de forma oblicua, erecto-patentes las apicales, casi perpendiculares las medias, y reflejas las basales (Fig. 10). Las pinnas presentan dientes, de profundidad muy variable (Figs. 10 y 11 c-e), que acaban en un mucrón, y que son intermedios entre sus parentales; los dientes son más profundos que en *A. obovatum* subsp. *obovatum*, pero generalmente menos que los de *A. fontanum*, y los mucrones son cortos como los de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, pero más claramente diferenciados (Fig. 11 c-e). Presentan escasos pelos multicelulares uniseriados en ambas caras de las pinnas, con 8-5 células (Fig. 11 f).

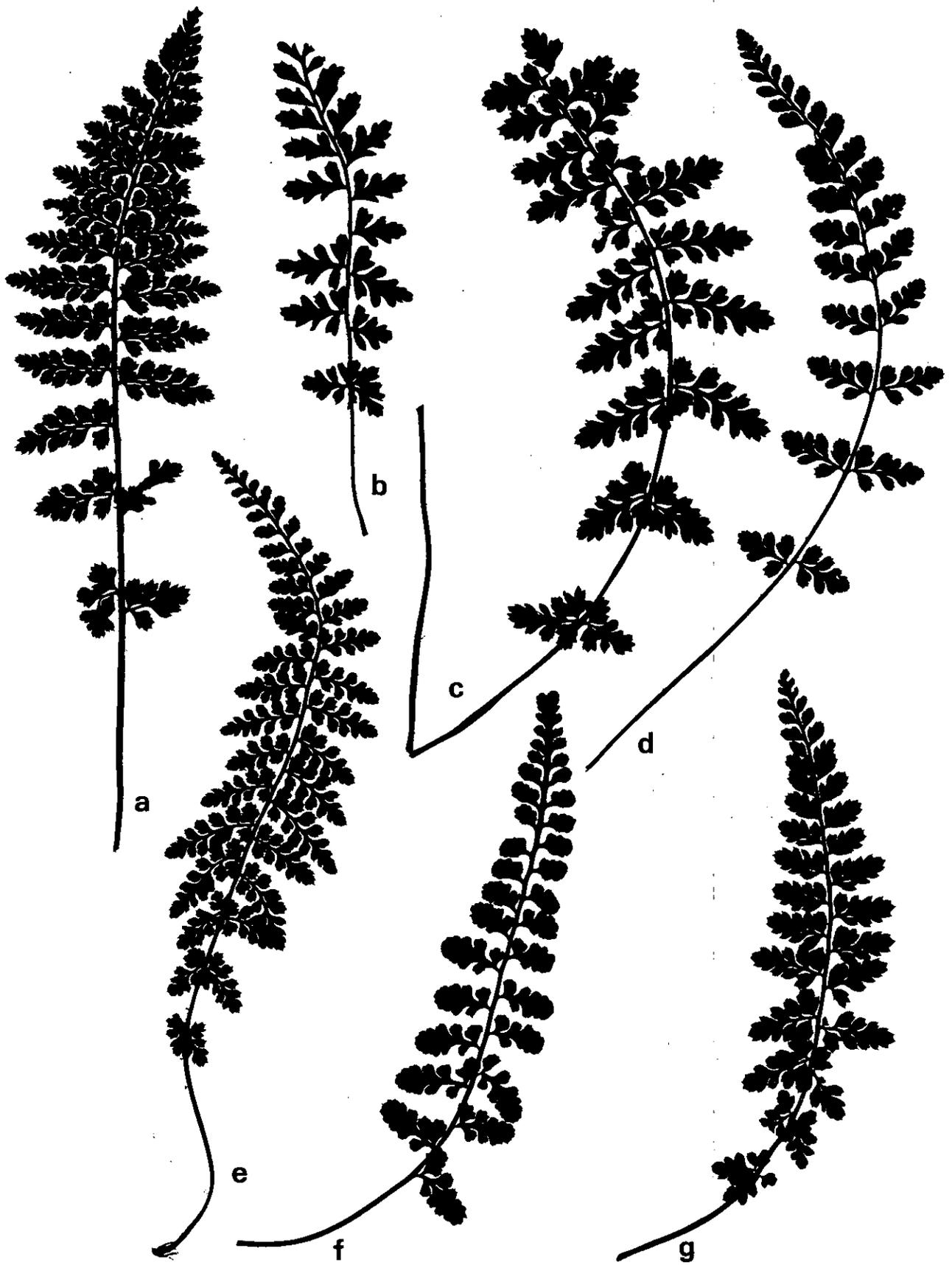


Figura 10. Siluetas de frondes de *A. foreziense*, individuos: a, RV6046; b, BUF 19; c, BUF 20; d, FRA 3; e, TIO 2; f, AH108F; g, FRA 13. Tamaño natural.

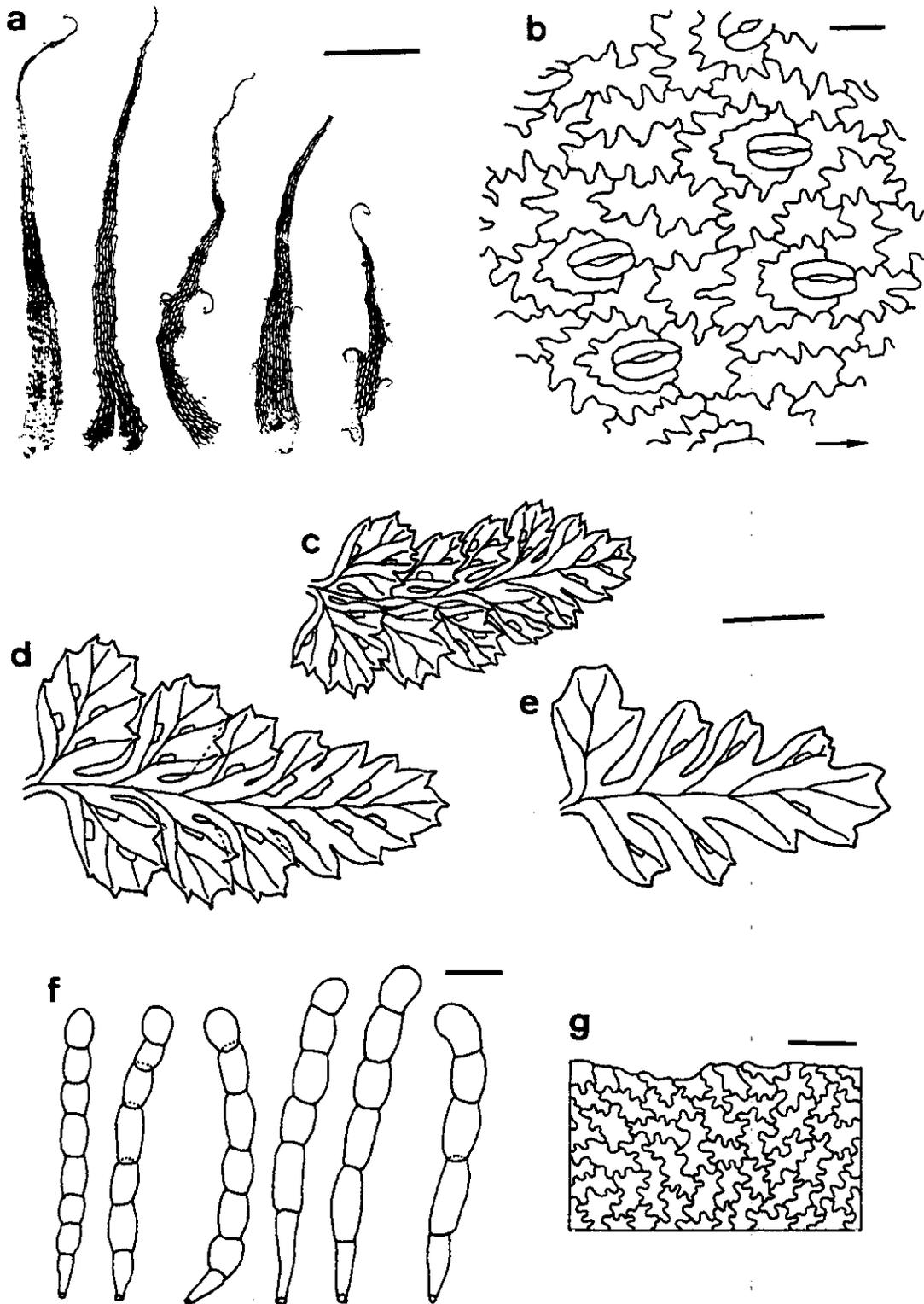


Figura 11. *A. foreziense*: a, páleas del rizoma; b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c-e pinnas medias de las frondes; f, indumento de las pinnas; g, modelos de las células de los indusios. Barra a: 0.125 mm, b: 50 μ m, c-e: 0.5 cm, f y g: 0.1 mm.

Los estomas aparecen únicamente en la cara abaxial de las pinnas, son polocíticos y generalmente van de acropolocíticos a mesopolocíticos; su longitud media es de $55.32 \mu\text{m}$ (Tabla 5). Las células epidérmicas de la cara abaxial son anomomorfas, con las paredes lobuladas, siendo los lóbulos más o menos agudos, semejantes a las de *A. fontanum* (Fig. 11 b).

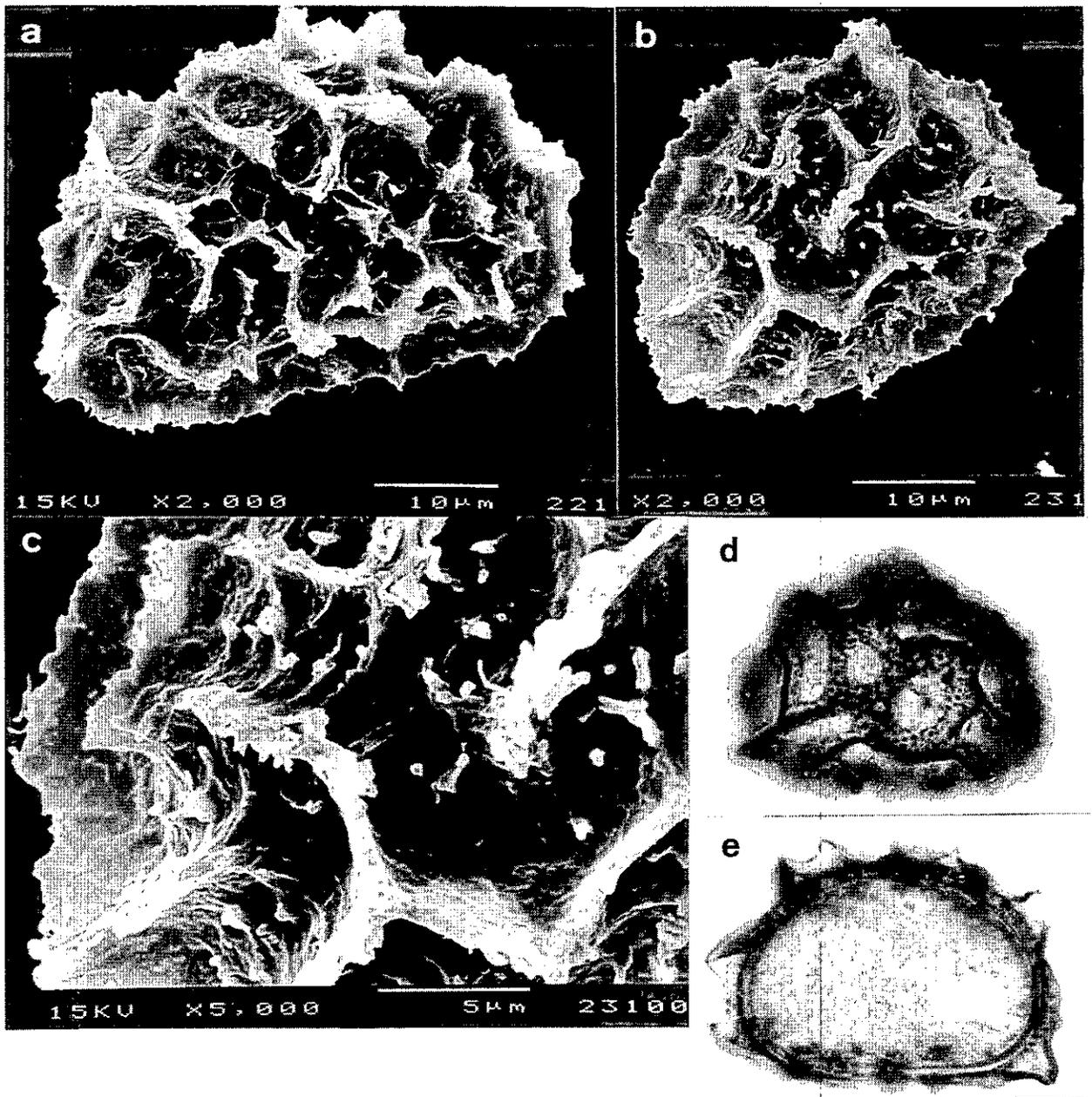


Figura 12. *A. foreziense*: a-c, fotografías al microscopio electrónico de barrido; d-e, fotografías al microscopio óptico. Barra d y e: $10 \mu\text{m}$.

Los indusios, al igual que en *A. fontanum*, suelen estar más cercanos al nervio medio que a los marginales, como ya señalara MARCHETTI (1995), y son de borde liso e irregular (Fig. 11 g). Sus células son lobuladas muy similares a las de la epidermis abaxial (Fig. 11 g).

El carácter de la ornamentación de la espora es intermedio entre sus dos parentales. El perisporio puede presentar pliegues y sólo algunas perforaciones, que nunca llegan a ser tan numerosas como en *A. fontanum* (FERRARINI *et al.*, 1986), aunque es más frecuente que no presenten ninguna perforación (Fig. 12 a-c). La media de la longitud del exosporio es de 39.64 μm . (Tabla 5).

Los recuentos cromosómicos coinciden con los de DIEKJOBST & BENNERT (1985) y MEYER (1960, 1962), entre otros autores. Hemos obtenido el recuento de $n = 72$ en los individuos BUF 2, BUF 3, AH115F (HERRERO *et al.*, 1997a), MUL 12, CAB 9 (HERRERO *et al.*, 1997b) y FRA 34 (Fig. 13).

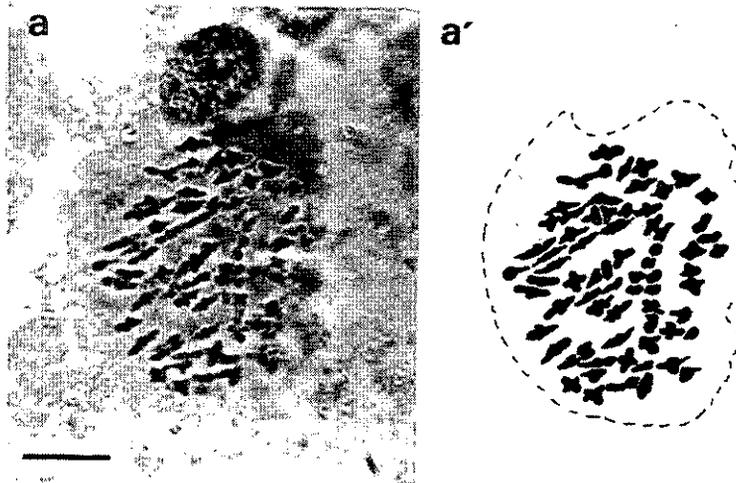


Figura 13. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de las esporas de *A. foreziense*, individuo FRA 34, mostrando $n = 72$. Barra: 10 μm .

Su principal área de distribución está centrada en la mitad sur del Macizo Central francés y más particularmente en Les Cévennes, donde es abundante (PRELLI & BOUDRIE, 1992). Además de este área principal se encuentra puntualmente también en Alemania (DIEKJOBST & BENNERT, 1985), Suiza (CHRIST, 1900; HESS *et al.*, 1967; REICHSTEIN, 1984), Córcega (BADRÉ *et al.*, 1986; BRIQUET, 1910), Italia (BOVIO & CERUTTI, 1993; MARCHETTI, 1995), España (NOGUEIRA & ORMONDE, 1986; PANGUA *et al.*, 1990) y Marruecos (RUMSEY & VOGEL, 1996).

Es una planta típicamente fisurícola y acidófila. Tiene una gran amplitud altitudinal; nosotros la hemos encontrado desde el nivel del mar en el Cabo de Creus hasta los 2500 metros en Sierra Nevada.

4.1.1.4. *Asplenium macedonicum* Kümmerle in Bot. Közlem. 15: 145. 1916
A. bornmuelleri Kümmerle, Bot. Közlem. 19: 81. 1921

Taxon muy emparentado con *A. foreziense*. Algunos autores los consideran táxones diferentes (DERRICK *et al.*, 1987; GREUTER *et al.*, 1984), y otros incluyen a *A. macedonicum* en *A. foreziense* (VIANE *et al.*, 1993).

Ninguno de los caracteres morfológicos del esporófito estudiados difieren significativamente entre *A. macedonicum* y *A. foreziense* (Figs. 14-16, Tabla 5). En la descripción original, KUMMERLE (1916), se limita a señalar que ambos táxones son vicariantes. Posteriormente describió otro taxon, *A. bornmuelleri* (KÜMMERLE, 1921), que la mayoría de los autores consideran como sinónimo de *A. macedonicum* (DERRICK *et al.*, 1987; GREUTER *et al.*, 1984; JALAS & SUOMINEN, 1972; VIANE *et al.*, 1993), y al que diferencia básicamente por el tamaño de la planta y la forma y grado de división de las pinnas.



Figura 14. Fotografías de material del herbario BM de *A. macedonicum*: a, hábito; a' detalle de las frondes.

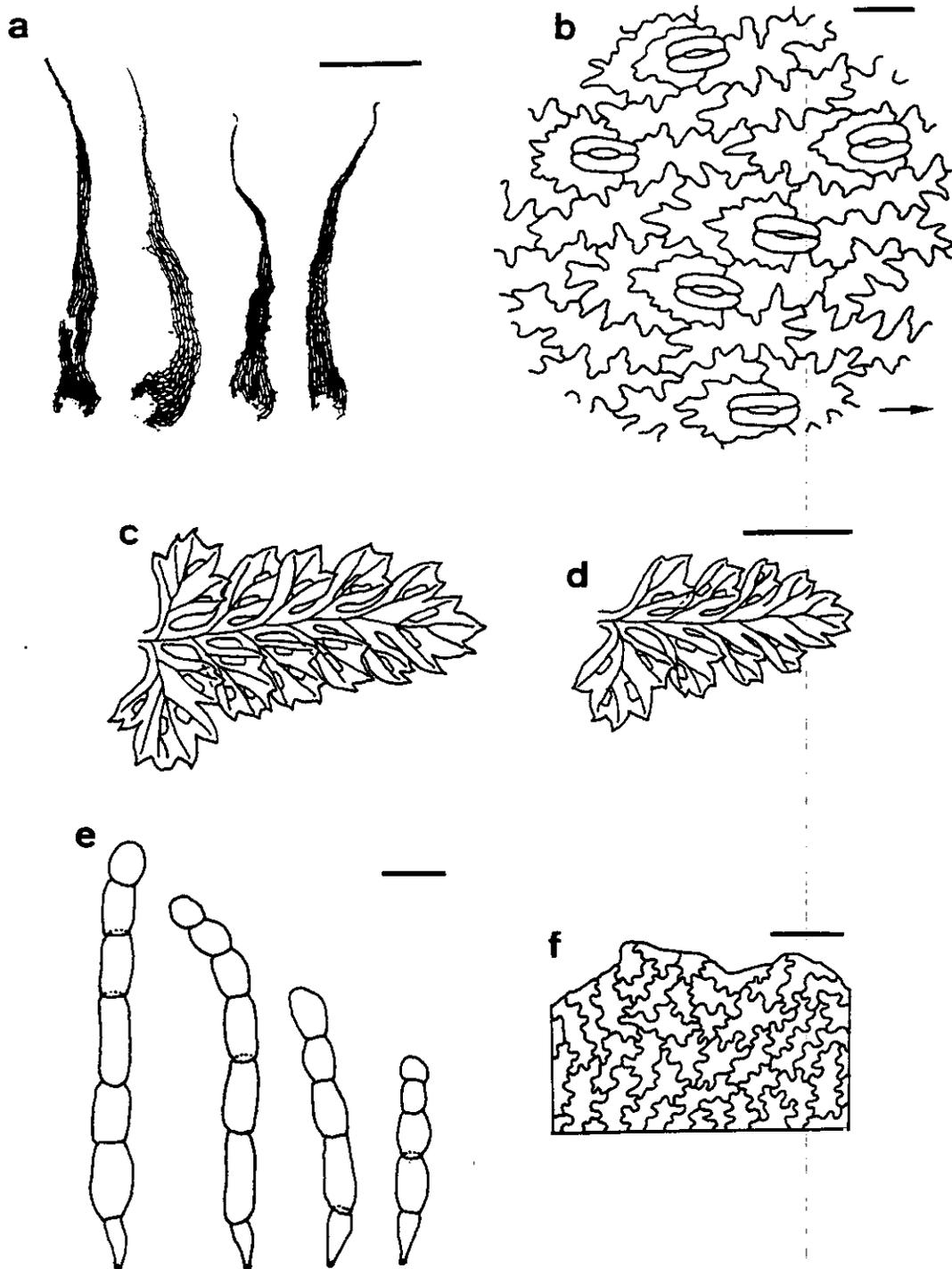


Figura 15. *A. macedonicum*: a, páleas del rizoma; b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c-d pinnas medias de las frondes; e, indumento de las pinnas; f, modelos de las células de los indusios. Barra a: 0.125 mm, b: 50 μ m, c-e: 0.5 cm, f y g: 0.1 mm.

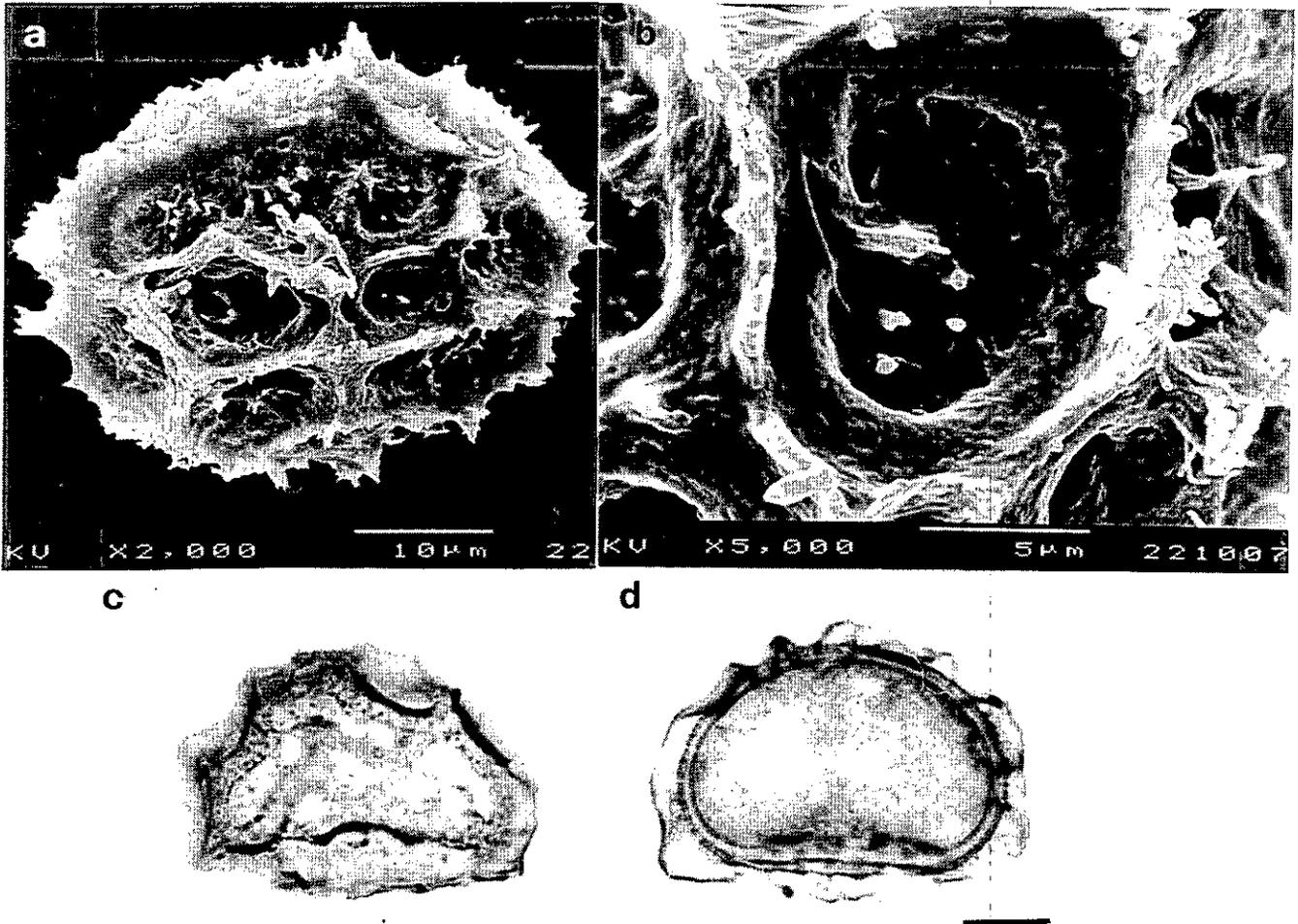


Figura 16. *A. macedonicum*: a-b, fotografías al microscopio electrónico de barrido; c-d, fotografías al microscopio óptico. Barra c y d : 10 µm.

Las evidencias citológicas aportadas por SLEEP (1967) indican que es un taxon tetraploide; el hecho de que se hayan cruzado experimentalmente *A. macedonicum* y *A. foreziense* y los híbridos muestren una meiosis completamente normal y produzcan esporas viables (REICHSTEIN, 1984) apunta un comportamiento genético similar de ambos táxones.

LOVIS (1977) señala que la diversidad encontrada en el complejo *A. foreziense/macedonicum* es debida más al origen politópico de este alotetraploide que a diferenciaciones ocurridas después de la poliploidización.

Su distribución es muy puntual, en Macedonia, en una zona montañosa cercana a Prilep. Crece en fisuras de granitos entre los 700 y los 900 metros (KUMMERLE, 1921 y datos obtenidos de las etiquetas de herbario).

4.1.1.5. *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* in Fl. Libycae Spec.: 68. 1824

Taxón morfológicamente muy variable (Fig. 17). Rizoma corto y erecto, cubierto por abundantes páleas clatradas lanceoladas (Fig. 18 a). Lámina de lanceolada a ovado-lanceolada; su grado de división varía de bipinnatisecta a bipinnatipartida (Fig. 17). El color marrón oscuro asciende generalmente hasta el raquis en ambas caras, aunque no siempre en la cara adaxial; en la cara adaxial suele quedarse en las pinnas basales, mientras que la cara abaxial llega hasta las dos terceras partes del raquis.

Las pinnas son generalmente triangulares (Figs. 17 y 18 c-e) y se insertan en el raquis normalmente de forma oblicua, erecto-patentes las apicales, casi perpendiculares las medias, y reflejas las basales (Fig. 17), como en el resto de los táxones estudiados. Los dientes de las pinnas es uno de los caracteres más variables de este taxon; lo más frecuente es que sean muy poco profundos, casi inapreciables (Fig. 17 d y e), pero también aparecen individuos con los dientes más marcados (Fig. 17 b y c), sin llegar a ser tan profundos como los de la variedad *protobillotii* y los de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*. PRELLI & BOUDRIE (1992) comentan que en situaciones umbrosas, las pinnulas son a menudo más dentadas, hasta el punto que pueden llegar a parecerse en este carácter a las de *A. foreziense*. Los mucrones son inconspicuos, en muchos casos inexistentes (Fig. 18 c y e). El indumento de las pinnas aparece en ambas caras y está formado por pelos multicelulares uniseriados, con 11-4 células (Fig. 18 f).

Los estomas son polocíticos y normalmente varían de mesopolocíticos a basipolocíticos; su longitud media es de 47.46 μm (Tabla 5). Las células epidérmicas de la cara abaxial son anomomorfos, con las paredes lobuladas, siendo los lóbulos más o menos obtusos o redondeados (Fig. 18 b).

Los indusios aparecen sobre los nervios y suelen disponerse de forma marginal; son irregularmente lisos (Fig. 18 g). Sus células son lobuladas muy similares a las células de la epidermis abaxial (Fig. 18 g).

Las esporas de este taxon son de tipo flaviforme-imperforado (Fig. 19 a-d) y la media de la longitud del exosporio es de 30.55 μm (Tabla 5).



Figura 17. Siluetas de frondes de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, individuos: a, VAR 18; b, VAR 12; c, BEA 13; d, VAR 11; e, BON 13; f, VAR 10. Tamaño natural.

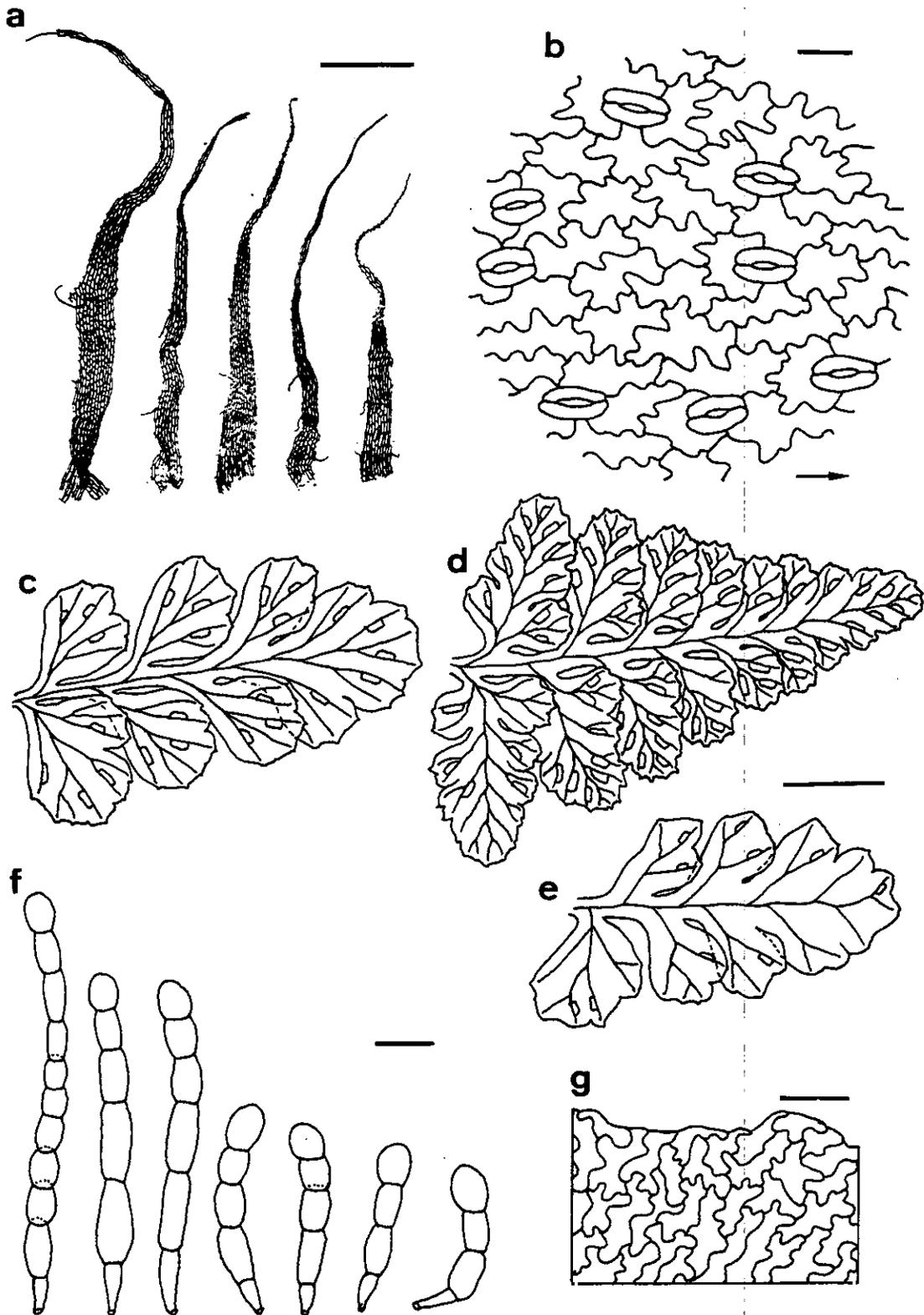


Figura 18. *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*: a, páleas del rizoma; b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c-e, pinnas medias de las frondes; f, indumento de las pinnas; g, modelos de las células de los indusios. Barra a: 0.125 mm, b: 50 μ m, c-e: 0.5 cm, f y g: 0.1 mm.

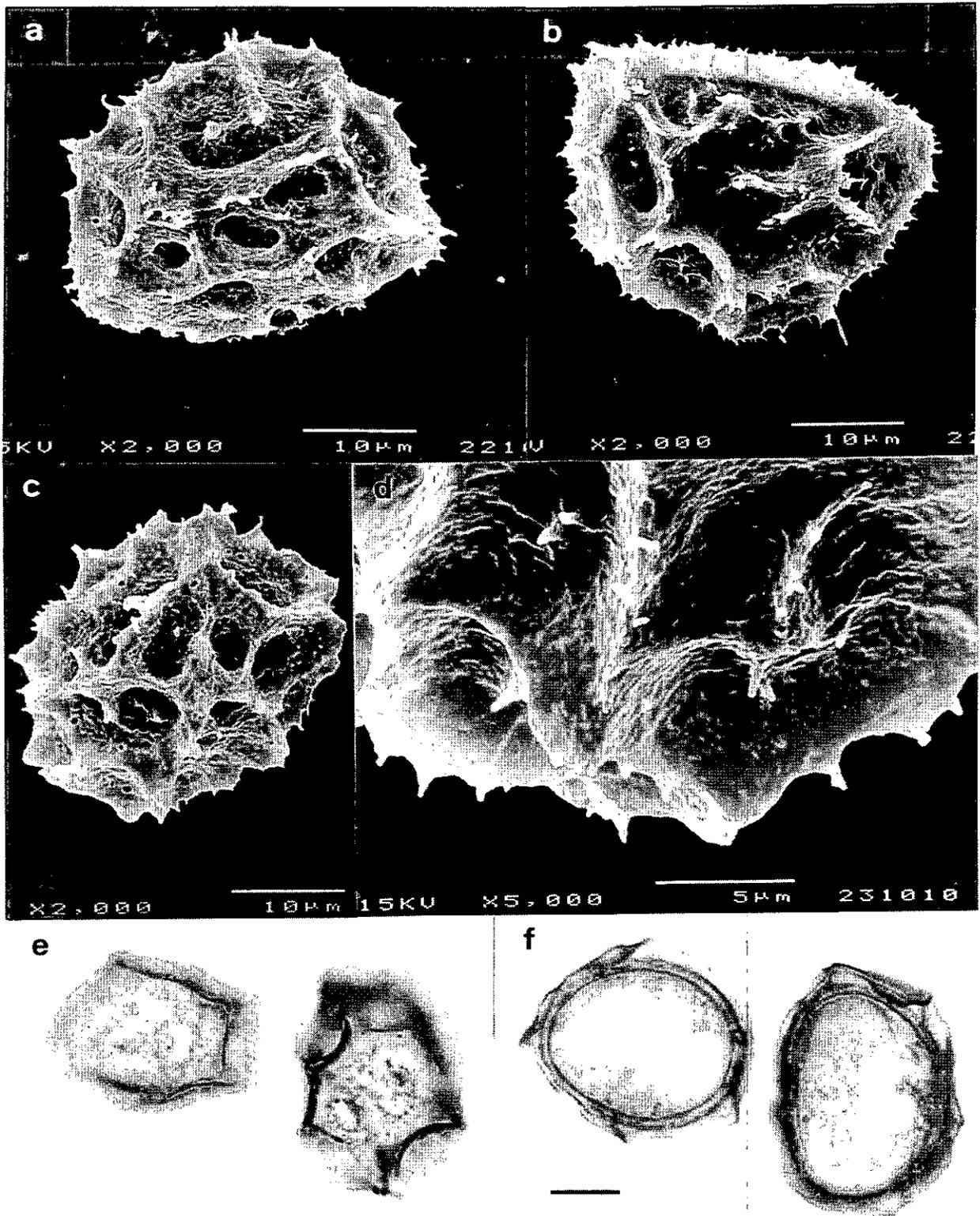


Figura 19. *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*: a-d, fotografías al microscopio electrónico de barrido; e-f, fotografías al microscopio óptico. Barra e y f: 10 µm.

STEINECKE & BENNERT (1993) han realizado un estudio morfológico del esporófito de este taxon, junto al de las variedades *deltoideum* y *protobillotii* y la subespecie *lanceolatum*, obteniendo unos resultados similares a los nuestros.

Se trata de un taxon diploide. Nuestros recuentos cromosómicos han sido de $n = 36$ en todos los individuos, BEA 18 (HERRERO *et al.*, 1997a), VAR 7 (HERRERO *et al.*, 1997b) y BON 4 y BON 17 (Fig. 20), que coinciden con los de BRULLO *et al.* (1982), MANTON & REICHSTEIN (1962), SÁEZ *et al.* (1993) y VIANE *et al.* (1996), entre otros autores.

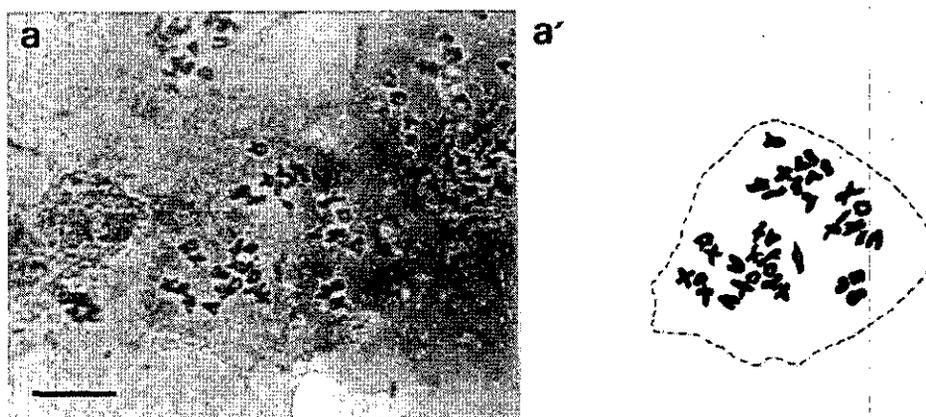


Figura 20. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de las esporas de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, individuo BON 17, mostrando $n = 36$. Barra: 10 μm .

Es un taxon silicícola y generalmente fisurícola, aunque también puede ser terrícola, creciendo en rellanos de rocas y entre el matorral. Es termófilo y aparece muy ligado a la costa, siempre bajo su influencia y no subiendo mucho en altitud (alrededor de los 100 m, excepcionalmente hasta los 900 metros en una localidad de la isla de Icaria en Grecia, en un pliego del herbario BM).

Se distribuye fundamentalmente en la zona costera del Mediterráneo norte, siendo más abundante en el centro y centro-este de esta región; aparece también en las Islas Canarias, norte de África y una localidad relictica en la Bretaña francesa (PICHI SERMOLLI & BIZZARRI, 1992).

La distribución exacta de este taxon no está del todo clara, debido fundamentalmente a confusiones con el tetraploide *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* por cuestiones nomenclaturales. Su presencia en la Bretaña francesa fue señalada por AYMOUNIN (1974) y confirmada y estudiada

citológicamente por LABATUT *et al.*, (1984). KUNKEL (1966, 1971) lo señala para la Isla de Gran Canaria, pero ORMONDE (1991) y ORMONDE *et al.* (1995) dudan de su presencia en las Islas Canarias, ya que todo el material estudiado por ellos corresponde a *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, al igual que el estudiado por nosotros; sin embargo algunas de las siluetas que aparecen en KUNKEL (1971: 33) del grupo *A. obovatum*, efectivamente, recuerdan a la morfología típica del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, con las pinnas redondeadas, sin apenas dientes y con un mucrón inconspicuo, pero sin otro tipo de datos no podemos asignarlas a un taxon u otro. Parece que su presencia en la Macaronesia es cuando menos dudosa y precisa de un estudio más profundo.

Todo el material del complejo *A. obovatum* del norte de África (Marruecos) que hemos estudiado, corresponde a *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*. BATTANDIER & TRABUT (1905) diferencian dentro de los *Asplenium* de fronde lanceolada una forma bajo el nombre de *A. obovatum* Viv. con los lóbulos de las pinnas redondeados, crenados o con los dientes menos agudos en La Calle (Argelia); MAIRE (1952) también diferencia una forma de pinnas redondeadas, con dientes cortos y obtusos dentro del complejo *A. obovatum*. Al igual que ocurre en la Macaronesia, es necesario un estudio más profundo para corroborar la presencia de este taxon en el norte de África.

La presencia de este taxon en la Península Ibérica fue señalada en 1990 (PANGUA *et al.*, 1990; SALVO, 1990) y estudiada citológicamente por SÁEZ *et al.* (1993). De la población del Cabo de Gata (Almería) sólo hemos podido estudiar el material de herbario (MGC 20602) que había sido revisado anteriormente por PANGUA *et al.* (1990), ya que, a pesar de buscar insistentemente esta población en el campo, no hemos conseguido encontrar ningún ejemplar vivo para su análisis citológico y con electroforesis de isoenzimas; debe tratarse de una población relictica con muy pocos individuos muy localizados.

A la vista de los datos corológicos disponibles se puede suponer que este taxon pudo ocupar un área más o menos continua por gran parte de la costa mediterránea, llegando hasta la costa atlántica europea (Bretaña francesa), con posibles radiaciones en la Macaronesia. Según PICHÍ SERMOLLI (1979) se trata de un taxon antiguo ya presente en la flora del Mediterráneo en el Terciario. Desde entonces parece que su área de distribución ha ido disminuyendo, centrándose fundamentalmente a la región este y centro del Mediterráneo norte y quedando localidades relicticas en el Cabo de Gata (Almería) y la Bretaña francesa. También es cierto que en numerosas zonas costeras mediterráneas no encuentra su sustrato óptimo, al tratarse de sustratos básicos no muy aptos para su desarrollo, por lo que en

muchos casos su distribución no puede ser continua. Quizá, en el Mediterráneo occidental, norte de África, zona atlántica y Macaronesia nunca fue muy abundante y ha perdido terreno en favor de su derivado tetraploide *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, abundante en estas zonas.

4.1.1.6. *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *deltoideum* Demiriz, Viane & Reichst. in Candollea 45(1): 244. 1990

Esta variedad fue descrita como diferente de las otras dos variedades de *A. obovatum* subsp. *obovatum* por tener las frondes deltoideas (Fig. 21a). En los demás caracteres morfológicos las tres variedades son similares (Fig. 22, Tabla 5).

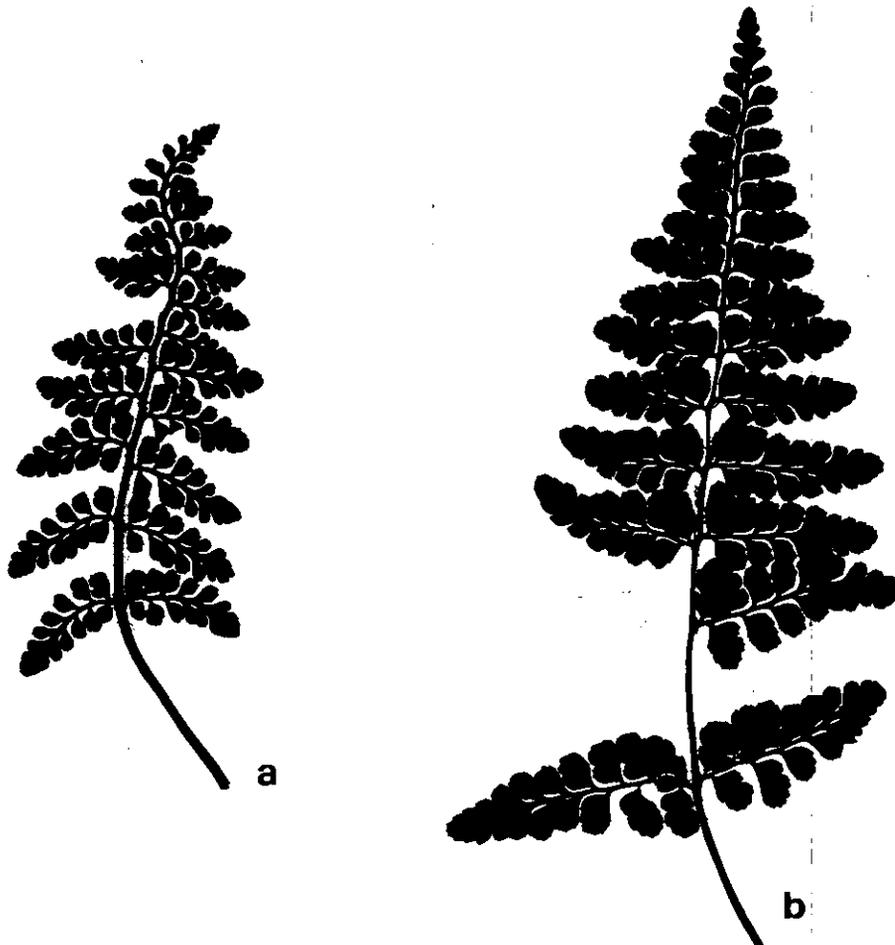


Figura 21. Siluetas de frondes: a, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum* individuo Ras-1022; b, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* individuo BEA 2. Tamaño natural.

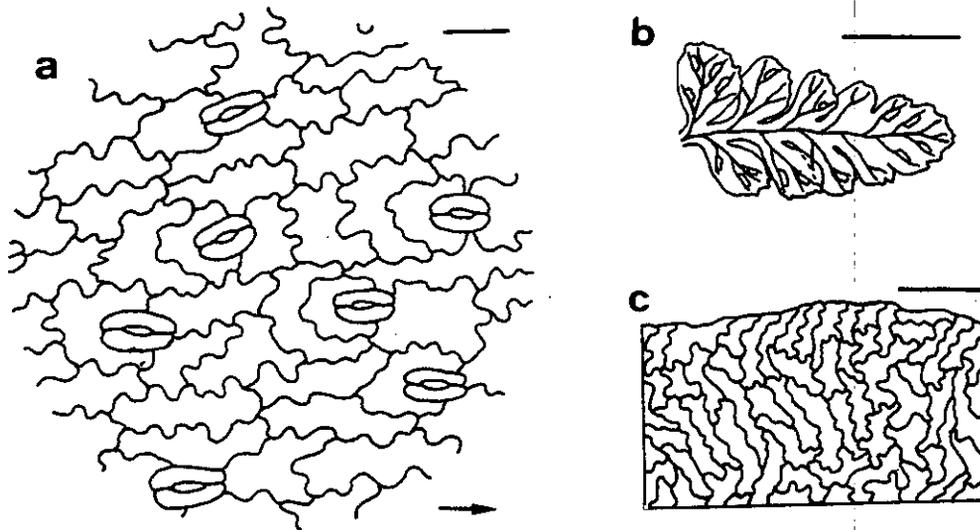


Figura 22. *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum*: a, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); b, pinna media de las frondes; c, modelos de las células de los indusios. Barra a: 50 μ m, b: 0.5 cm, c: 0.1 mm.

El carácter de la forma de la fronde es muy variable en este grupo. Hemos observado ocasionalmente en un mismo individuo frondes deltoideas junto a frondes lanceoladas, en *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (Fig. 21 b), *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (Fig. 23 a), *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (Fig. 24 b), y *A. foreziense* (Fig. 25 b), por lo que este carácter tiene una dudosa validez taxonómica.

Es un taxon diploide, como el resto de las variedades de *A. obovatum* subsp. *obovatum*. El material que hemos estudiado ha sido comprobado citológicamente por Helga Rasbach (com. pers.), con un resultado de $n = 36$.

Hasta el momento se ha citado esta variedad en Turquía (DEMIRIZ *et al.*, 1990), Grecia (VIANE *et al.*, 1996) y Francia (VIANE *et al.*, 1996, basándose en una silueta que aparece en LABATUT *et al.*, 1984). En la población griega convive con las otras dos variedades del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum*, siendo interfértiles y apareciendo formas intermedias entre unos y otros táxones.

Crece en los mismos medios que *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, sobre sustratos ácidos en enclaves costeros.



Figura 23. Siluetas de frondes del individuo MIE 37 de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*. Tamaño natural.

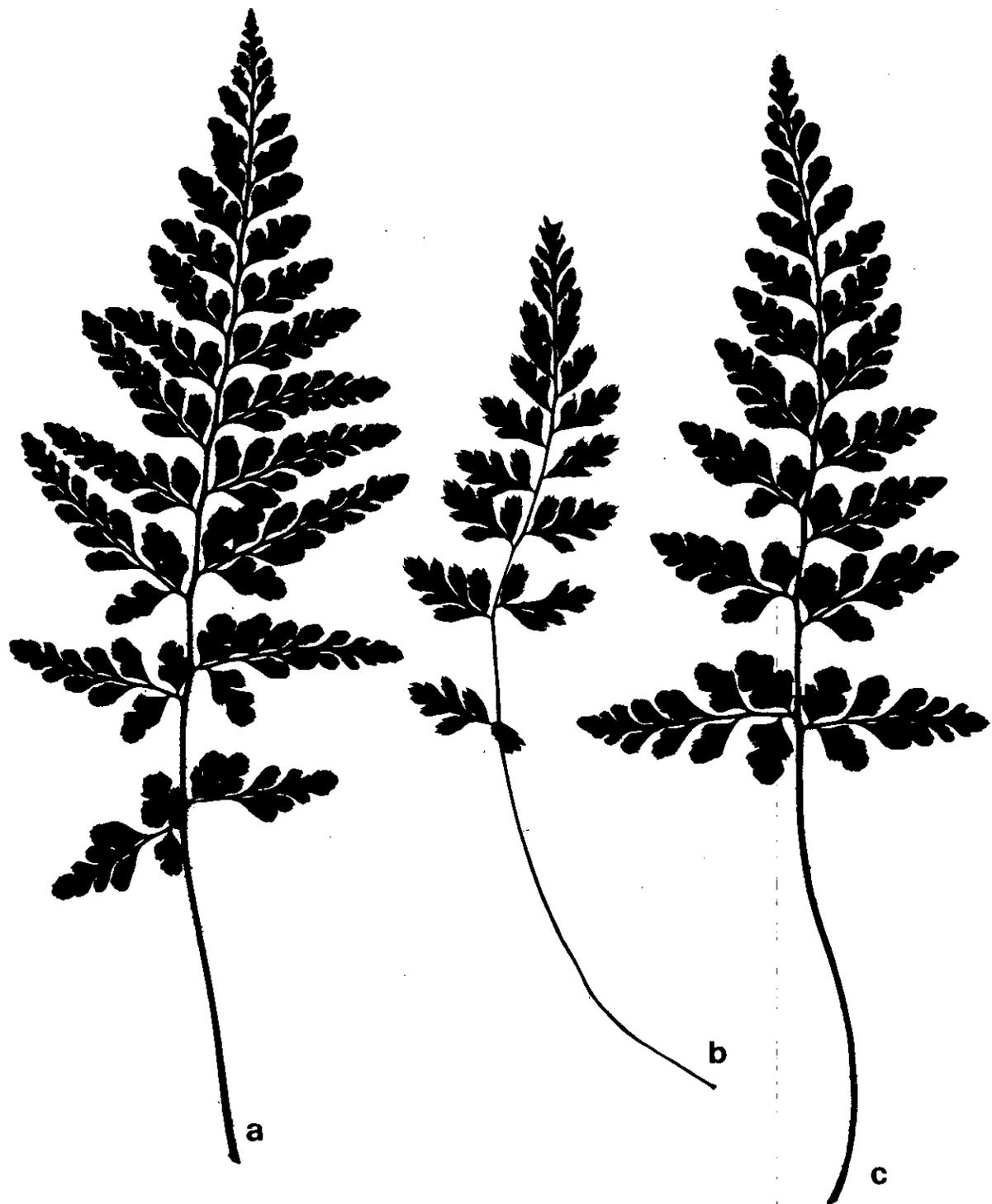


Figura 24. Siluetas de frondes del individuo CHE 16 de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*. Tamaño natural.

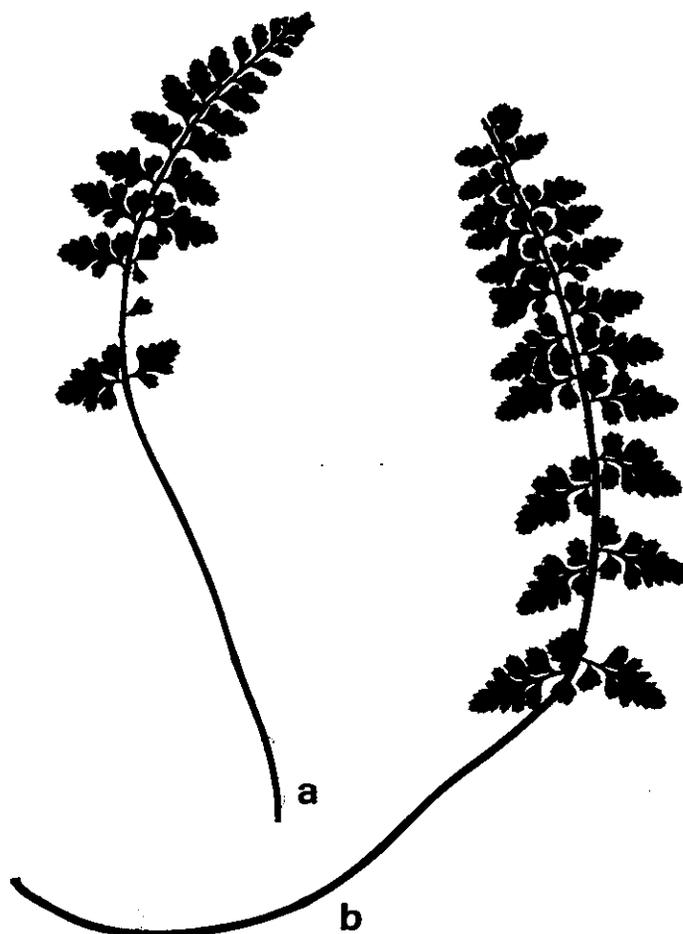


Figura 25. Siluetas de frondes del individuo AH123F de *A. foreziense*. Tamaño natural.

4.1.1.7. *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst. in Candollea 45(1): 244. 1990

Es muy similar morfológicamente a las otras dos variedades de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, de las que se diferencia fundamentalmente por los dientes y mucrones de las pinnas más profundos y marcados (Figs. 26 y 27 c-d), lo que le hace indistinguible a simple vista del tetraploide *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*. En el resto de los caracteres las tres variedades son semejantes (Figs. 27 a-b y e-f, y 28, Tabla 5).

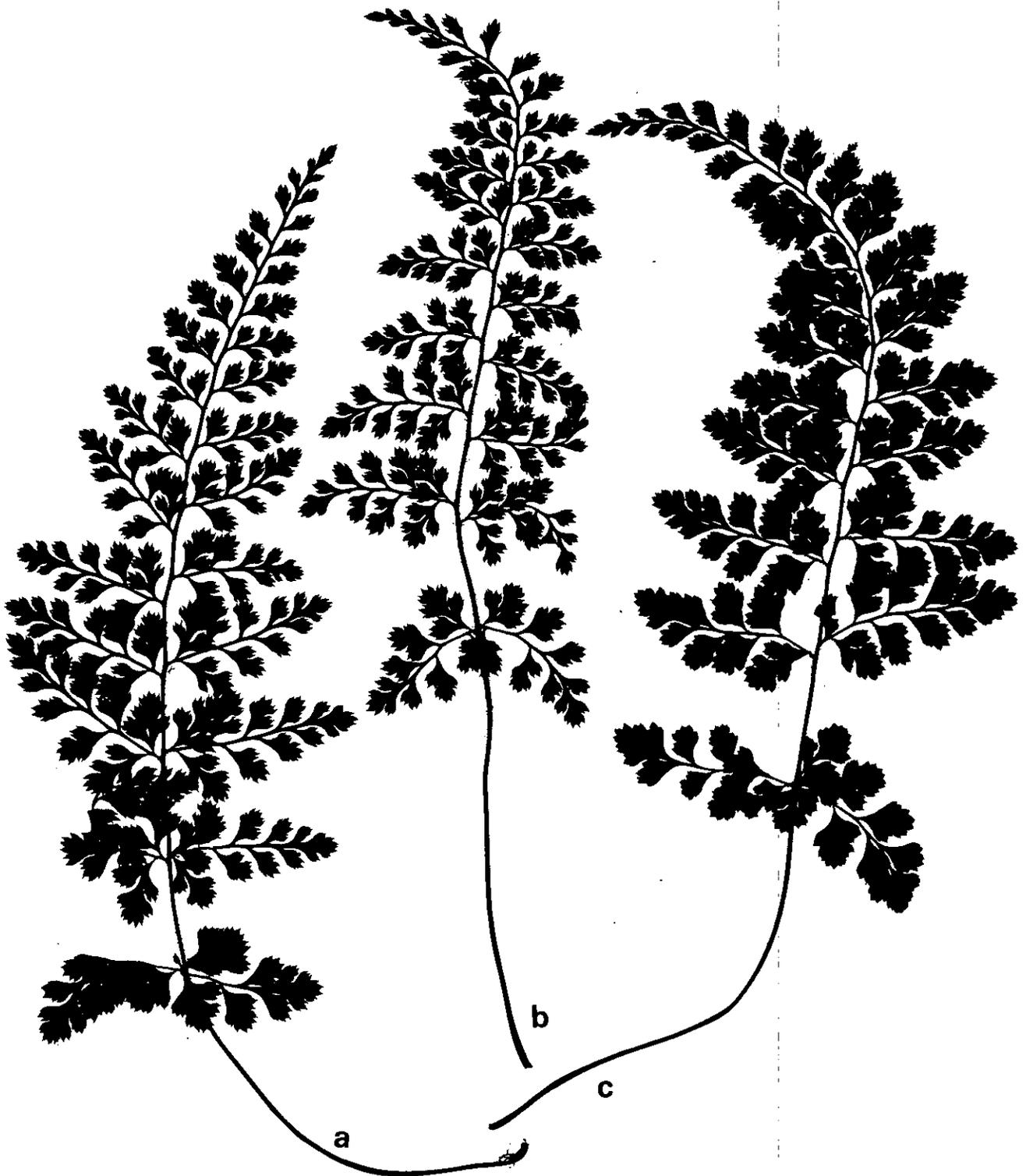


Figura 26. Siluetas de frondes de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*, todas ellas del individuo MIE 34. Tamaño natural.

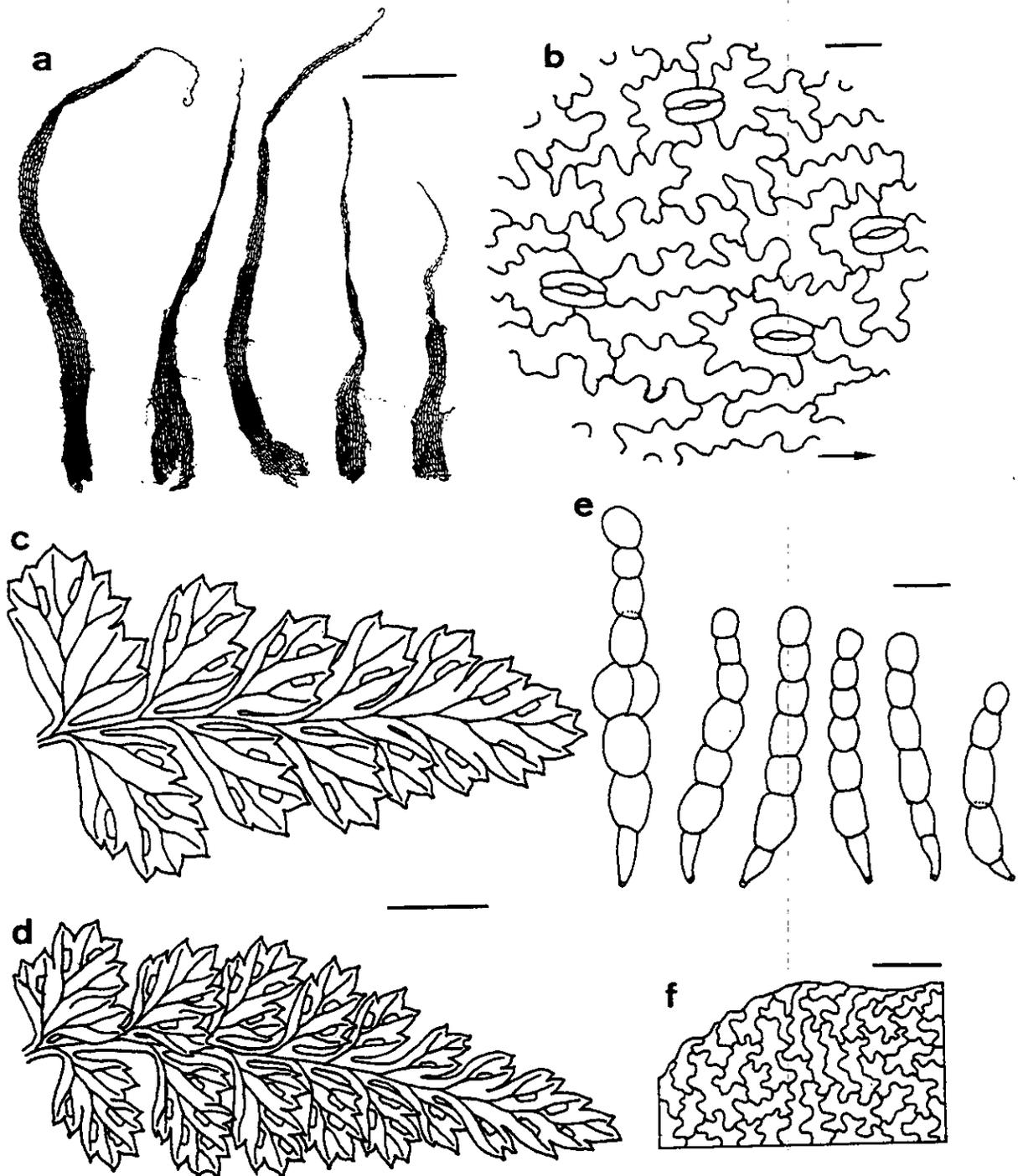


Figura 27. *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*: a, páleas del rizoma; b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c-d, pinnas medias de las frondes; e, indumento de las pinnas; f, modelos de las células de los indusios. Barra a: 0.125 mm, b: 50 μ m, c-e: 0.5 cm, f y g: 0.1 mm.

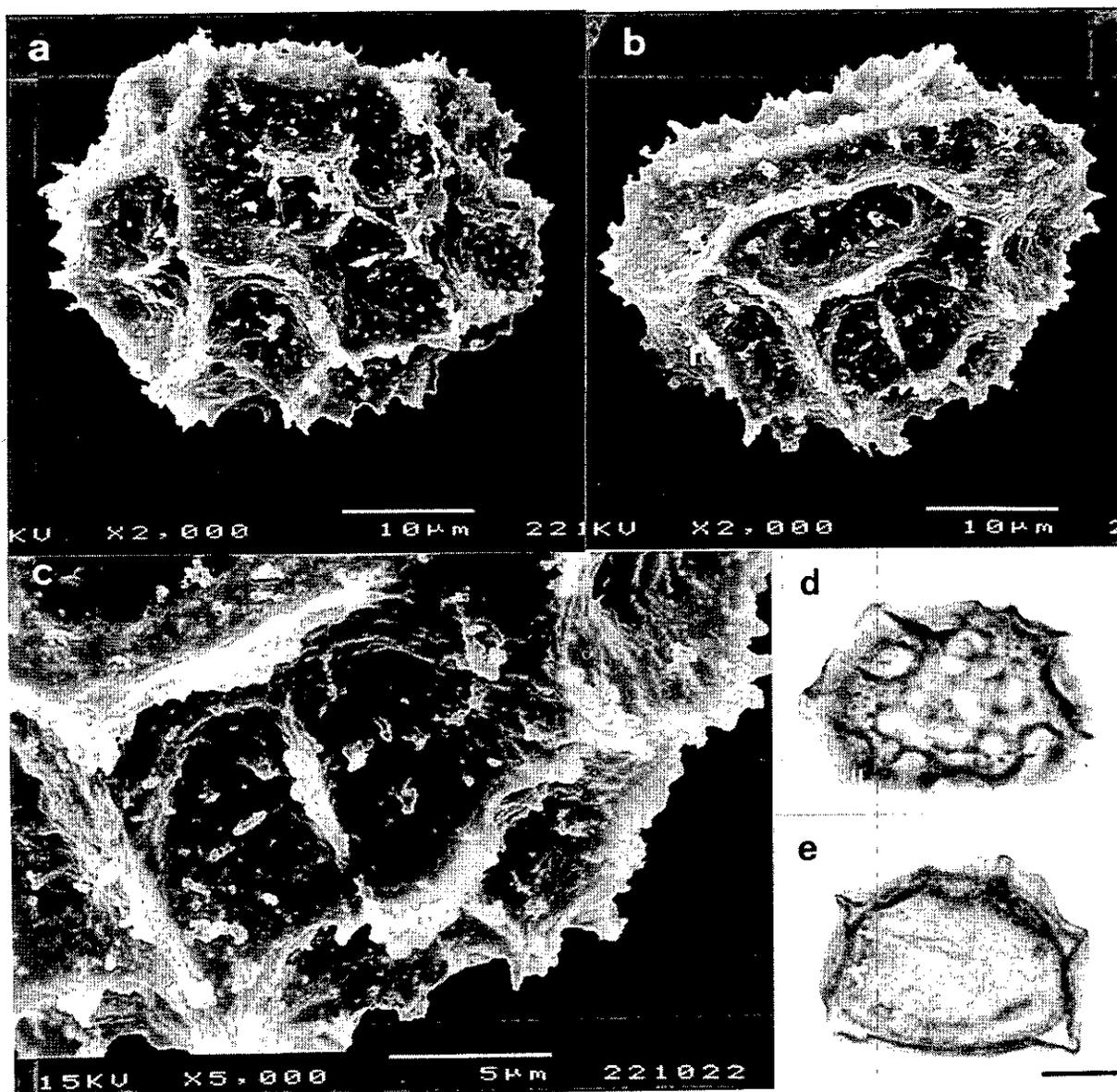


Figura 28. *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*: a-c, fotografías al microscopio electrónico de barrido; d-e, fotografías al microscopio óptico. Barra d y e: 10 μ m.

El carácter diferenciador de los dientes de las pinnas profundos y de sus mucrones conspicuos se mantiene constante en todos los individuos estudiados y en los estudiados por otros autores (DEMIRIZ *et al.*, 1990; RASBACH *et al.*, 1990; STEINECKE & BENNERT, 1993; VIANE *et al.*, 1996), y lo separa claramente de las otras dos variedades de *A. obovatum* subsp. *obovatum*. Además de este carácter, es llamativo el indumento de las pinnas, del mismo tipo que en las otras dos variedades (Fig. 27 e), pero más abundante.

En la única población estudiada, en el valle del río de la Miel (Cádiz), los individuos examinados tienen un número cromosómico de $n = 36$ (MIE 26, MIE 27, MIE 41, MIE 75, Fig. 29 a y b) y $2n = 72$ (MIE 75, Fig. 29 c), lo que coincide con el recuento de otros autores en individuos de la misma población (RASBACH *et al.*, 1990) y en otras poblaciones (DEMIRIZ *et al.*, 1990; VIANE *et al.*, 1996).

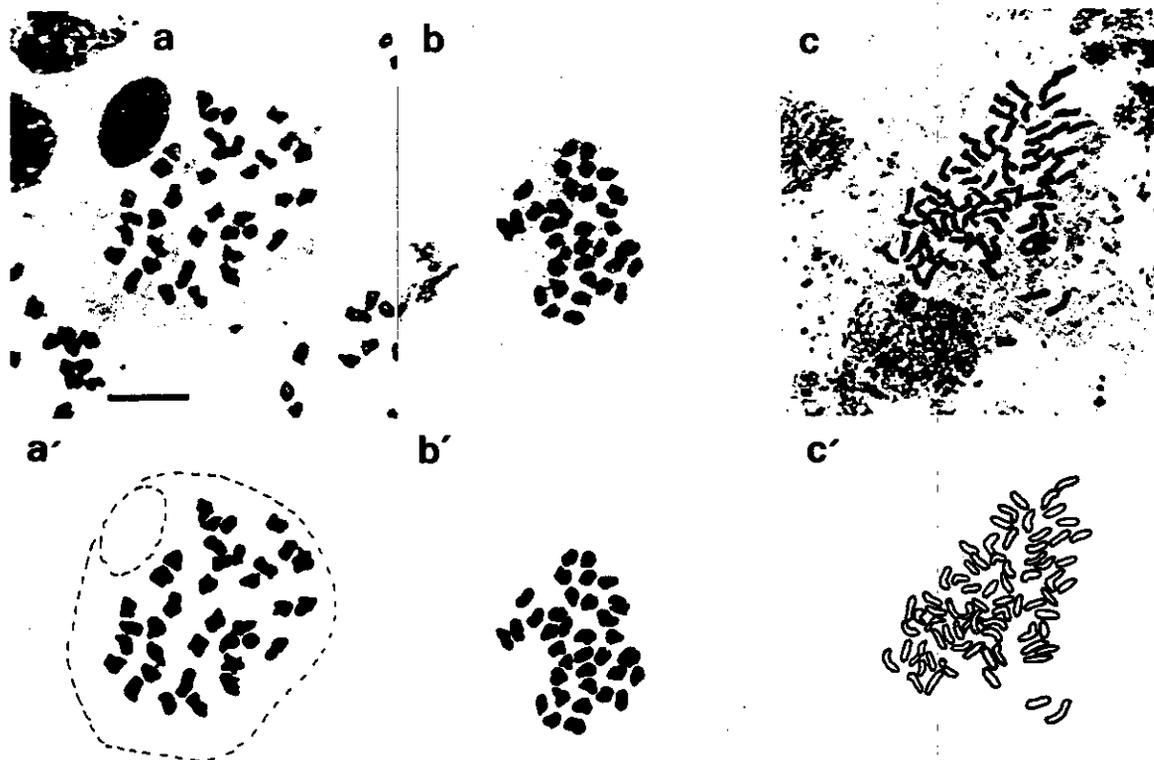


Figura 29. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de las esporas de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*: a y a', individuo MIE 26 ($n = 36$); b y b', individuo MIE 75 ($n = 36$); c y c', mitosis de ápices de raíces del individuo MIE 75 ($2n = 72$). Barra: 10 μm .

Esta variedad se ha encontrado hasta el momento en Turquía (DEMIRIZ *et al.*, 1990), España (RASBACH *et al.*, 1990) y Grecia (VIANE *et al.*, 1996).

Crece en los mismos medios que *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, sobre sustratos ácidos en enclaves costeros. La población gaditana no se encuentra en la misma costa, sino un poco hacia el interior, en un canuto.

4.1.1.8. *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva in Agron. Lusit. 20: 217. 1959

A. billotii F.W. Schultz, Flora (Regensburg) 28: 738. 1845

A. lanceolatum Hudson, Fl. Angl. ed. 2: 454. 1778

El concepto actual de *A. obovatum* incluye dos subespecies; una diploide, la subespecie *obovatum*, con tres variedades, que ya hemos comentado, y otra tetraploide, que es la subespecie *lanceolatum*.

Hasta que se describió la variedad *protobillotii* de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, todos los autores coincidían en señalar que este taxon era un autotetraploide derivado de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, basándose fundamentalmente en el comportamiento meiótico de híbridos naturales y artificiales de este taxon con otros (BENNERT *et al.*, 1991; BOUHARMONT, 1977a, 1977b; CALLÉ *et al.*, 1975; CUBAS & SLEEP, 1994; EMMONTT, 1964; GIRARD & LOVIS, 1968; LOVIS, 1977; LOVIS & VIDA, 1969; MANTON & REICHSTEIN, 1962; RASBACH *et al.*, 1991; REICHSTEIN, 1981; SLEEP, 1983).

Ante los resultados de los análisis citológicos y por el hecho, inusual en los autotetraploides, de presentar diferencias morfológicas evidentes con su ancestro diploide, SLEEP (1983) indicó que *A. billotii* era un autotetraploide derivado de *A. obovatum* o de una forma con cromosomas homólogos, dejando abierta la posibilidad de que pudiera tratarse de otro taxon.

Tras encontrar la variedad diploide *protobillotii*, de morfología muy próxima a la del tetraploide, DEMIRIZ *et al.* (1990) y RASBACH *et al.* (1990) atribuyeron a ésta el origen del tetraploide por autoploidía.

Morfológicamente, no se diferencia a simple vista, como ya hemos comentado, del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (Figs. 30 y 31), pero ambos táxones sí se diferencian en las longitudes del exosporio y de los estomas (Tabla 5), como sucede en otros complejos poliploides de pteridófitos y sus parentales (BARRINGTON *et al.*, 1986).



Figura 30. Siluetas de frondes de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, individuos: a, LUA 9; b, MIE 16; c, LUA 16; d, TOR 33; e, CIG 9. Tamaño natural.

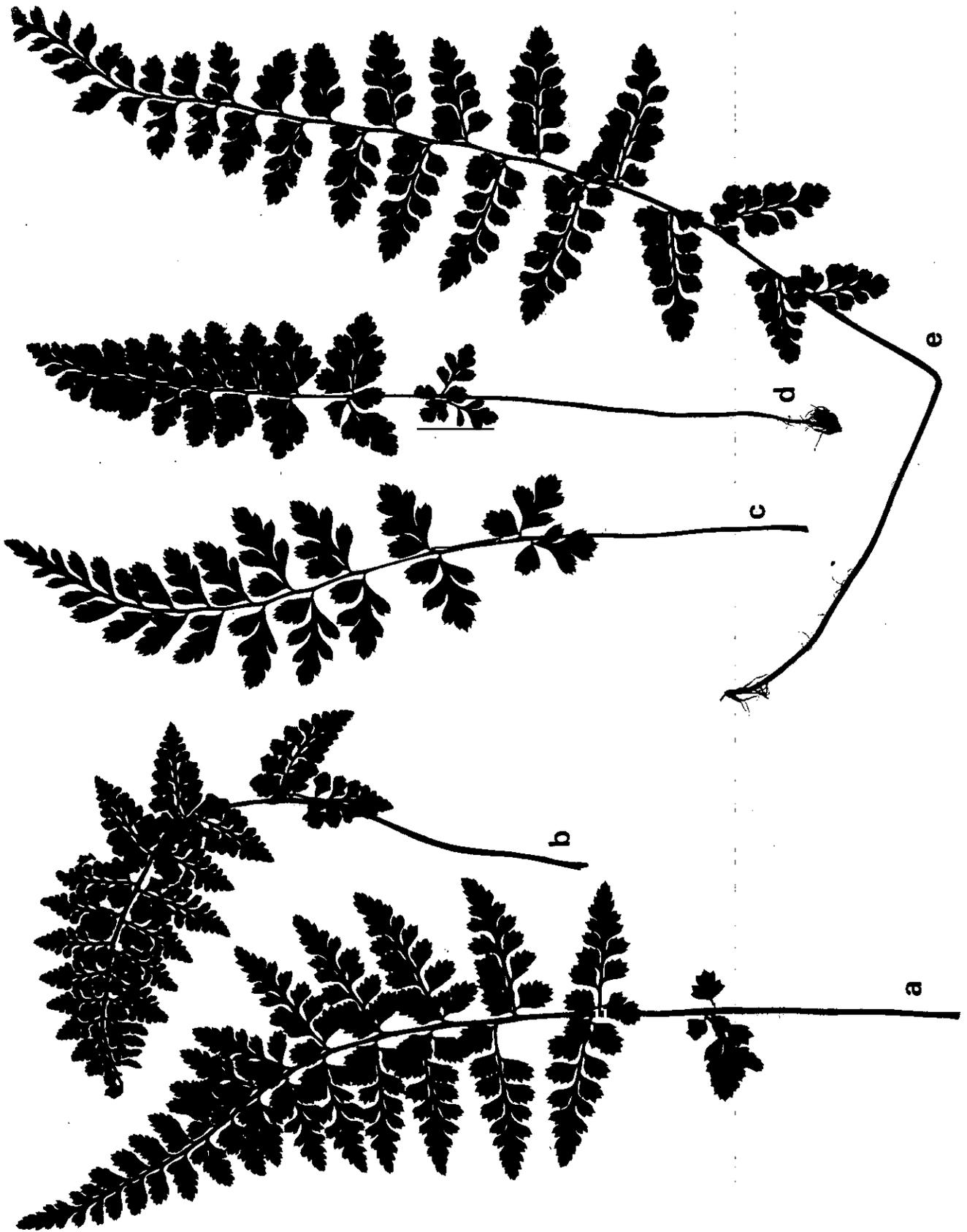


Figura 31. Siluetas de frondes de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, individuos: a, ALM 18; b, ITA 12; c, LUA 13; d, CIG 3; e, HOY 20. Tamaño natural.

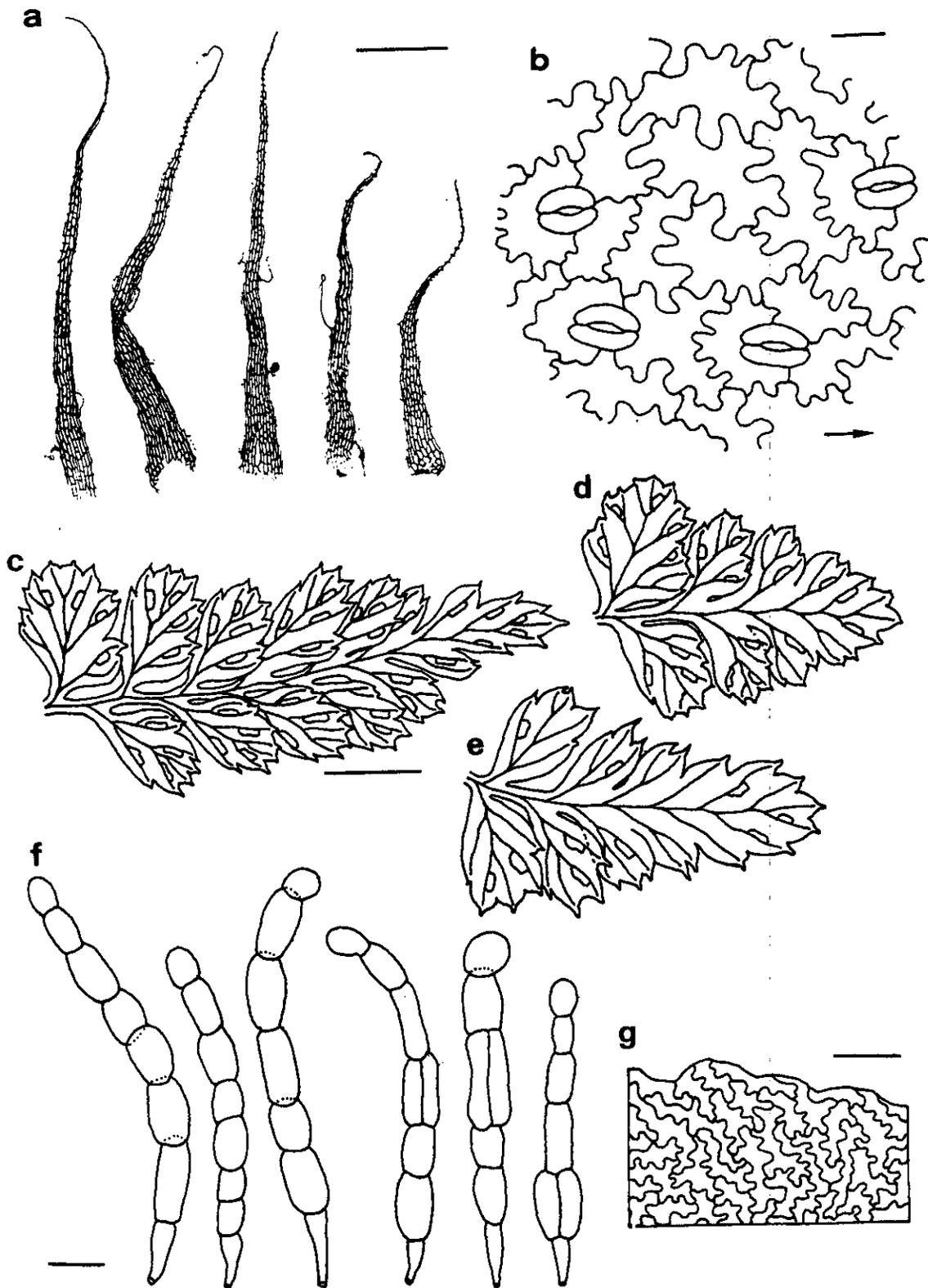


Figura 32. *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*: a, páleas del rizoma; b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c-e, pinnas medias de las frondes; f, indumento de las pinnas; g, modelos de las células de los indusios. Barra a: 0.125 mm, b: 50 μ m, c-e: 0.5 cm, f: 0.1 mm, g: 0.1 mm.

Las esporas son de tipo flaveliformes-imperforadas (Fig. 33 a-c).

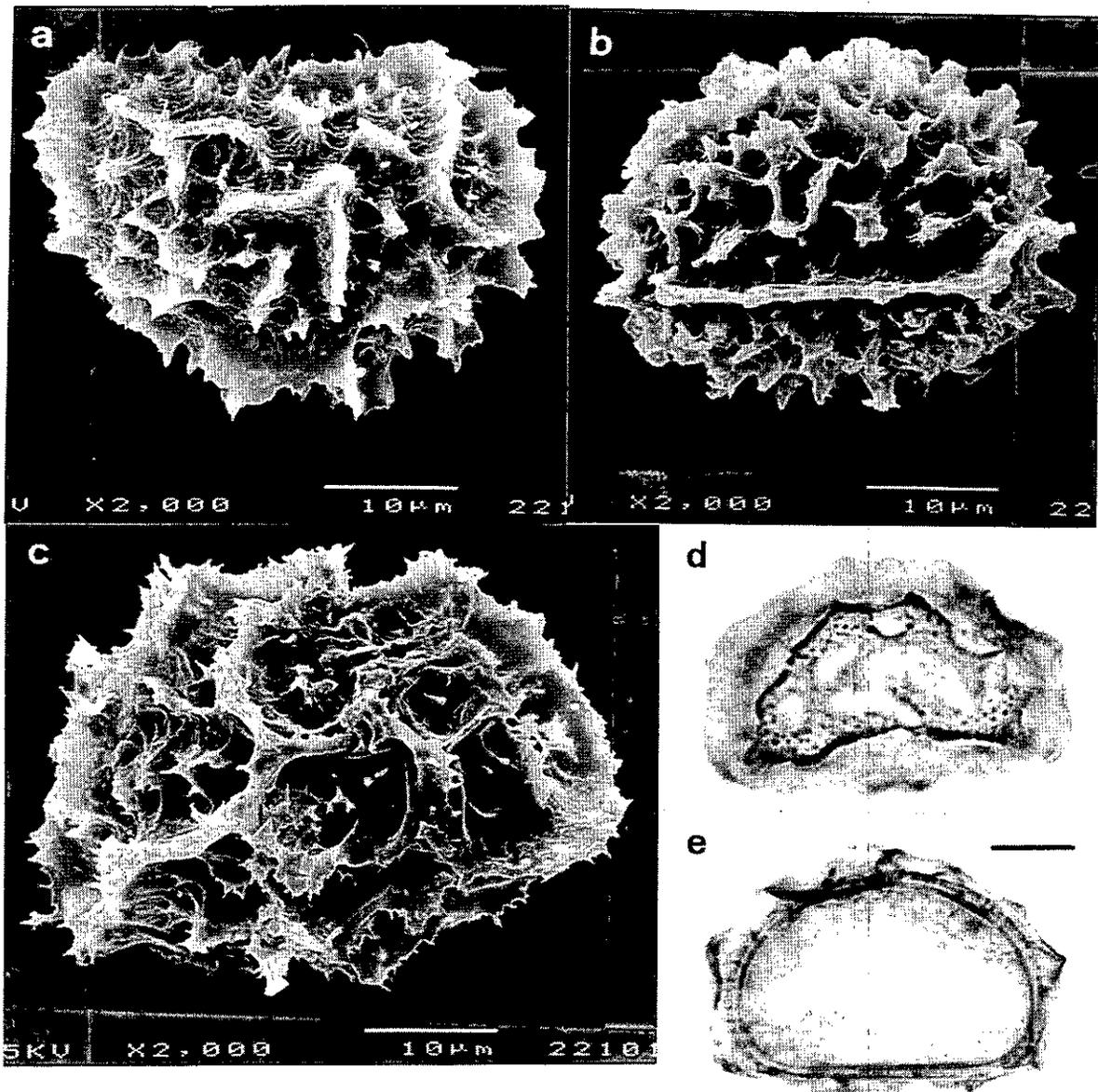


Figura 33. *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*: a-c, fotografías al microscopio electrónico de barrido; d-e, fotografías al microscopio óptico. Barra d y e: 10 μ m.

En este taxon existe una gran variabilidad en el grado de disección de la fronde, relación longitud/anchura de la fronde y profundidad de los dientes de las pinnas y longitud de sus mucrones (Figs. 30, 31 y 32 c-e), lo que ha contribuido a la descripción de nuevos táxones muy próximos a *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y que no son más que formas extremas del mismo. KUNKEL (1966) describe con material de la Isla de Gran Canaria una especie

nueva, *A. terorense* G. Kunkel. No hemos podido ver material de ésta, pero ORMONDE *et al.* (1995) opinan que se trata de formas tripinnatisectas de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*.

A esta gran variabilidad también se debe el que se haya confundido frecuentemente con otros táxones, fundamentalmente con *A. obovatum* subsp. *obovatum* y *A. foreziense*. La diferencia más clara con *A. obovatum* subsp. *obovatum* es el nivel de ploidía, acompañado del mayor tamaño de algunos de los caracteres micromorfológicos, como son las longitudes del exosporio y de los estomas (Tabla 5): en los individuos típicos de uno y otro taxon con los caracteres de las pinnas son suficientes para diferenciarlos.

Más difícil resulta diferenciar algunos individuos de *A. foreziense*, como ya señalara AYMONTIN (1969); ambos son tetraploides por lo que las diferencias de tamaño de los caracteres micromorfológicos no los discriminan (Tabla 5). Habitualmente se utilizan una serie de caracteres, como son la relación longitud/anchura de la fronde, color marrón oscuro del pecíolo y raquis, dientes y mucrón de las pinnas, abundancia del indumento de las pinnas, posición de los soros y ornamentación del perisporio al microscopio electrónico de barrido, que normalmente sirven, en su conjunto, para diferenciar un taxon de otro. Además de estos caracteres, existe otro que hemos comprobado que resulta muy útil, y es la morfología de los lóbulos de las células epidérmicas; en *A. foreziense* éstos son agudos (Fig. 11 b), mientras que en *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* son más redondeados (Fig. 32 b).

Nuestros recuentos cromosómicos coinciden con los de CUBAS *et al.* (1990), HORJALES *et al.* (1991), MANTON *et al.* (1986), ORMONDE & QUEIRÓS (1995) y QUEIRÓS (1991), entre otros autores. Hemos obtenido el recuento de $n = 72$ en los individuos HOY 20, NAV 8 (Fig. 34), CHE 16 (HERRERO *et al.*, 1997a), CIG 21, AH95F, ALM 17, TOR 33 (HERRERO *et al.*, 1997b), AH68F, AH76F, MIE 1, MIE 2, MIE 4, MIE 6, MIE 8, MIE 11, MIE 12, MIE 18, MIE 24 y MIE 33.

Crece fundamentalmente en grietas de rocas, aunque también aparece en repisas, taludes más o menos rocosos e incluso en sotobosques, generalmente sobre sustratos silíceos. En la región mediterránea busca los ambientes más frescos y protegidos. Nosotros lo hemos observado desde el nivel del mar en numerosas localidades del norte peninsular hasta los 1200 metros en la Sierra de Gata (Cáceres).

Se distribuye principalmente en el Mediterráneo occidental (Italia, Sicilia, Córcega, Cerdeña, Francia, España, Portugal, Argelia, Túnez y Marruecos), Macaronesia (Canarias, Madeira, Azores) y zona de influencia

Atlántica europea (Portugal, España, Francia, Islas del Canal, Gran Bretaña e Irlanda), con radiaciones en Suiza y Luxemburgo.

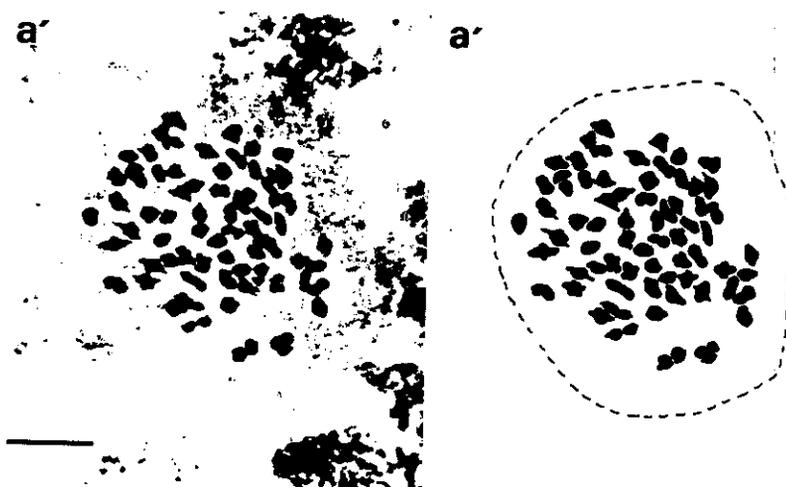


Figura 34. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de las esporas de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, individuo NAV 8, mostrando $n = 72$. Barra: 10 μm .

Ninguno de los autores consultados (DERRICK *et al.*, 1987; GREUTER *et al.*, 1984; VIANE *et al.* 1993) señala su presencia en Grecia, pero en el herbario K hemos estudiado un pliego con material mezclado de Argolis (Grecia), uno de los individuos tiene la morfología de la fronde y de las pinnas con dientes y mucrón desarrollados típica de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y con la longitud del exosporio ($37.03 \mu\text{m} \pm 1.73$) y de los estomas ($61.53 \mu\text{m} \pm 3.71$) dentro del rango de este tetraploide; por todo ello, lo hemos atribuido a este taxon, tratándose pues, de una localidad aislada en Grecia, en el Mediterráneo oriental, que requeriría confirmación citológica. GREUTER & RECHINGER (1967) ya comentan que en Kithira (Grecia) dentro del complejo *A. obovatum* aparecen formas con una morfología que recuerda a *A. billoii*, pero que atribuyen al rango de variación del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* y que VIANE *et al.* (1996) suponen que podría tratarse de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobilloii*. Más al oriente de Grecia, DERRICK *et al.* (1987) y GREUTER *et al.* (1984) lo citan en Crimea (Ucrania), sin ninguna referencia, y no hemos podido encontrar ningún dato más acerca de esta cita.

Se encuentra disperso por toda la Península Ibérica, siendo más frecuente en la mitad occidental, fundamentalmente en la zona costera y tierras bajas del Cantábrico y Atlántico, y hacia el interior en el Sistema Central, Montes de Toledo y Sierra Morena. Las citas de Baleares no son correctas (ROSSELLÓ *et al.*, 1986).

4.1.1.9. *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *numidicum* Salvo & Cabezudo in Acta Bot. Malac. 17: 288. 1992

A. obovatum Viv. var. *numidicum* Trab. in Batt. & Trab., Fl. Algérie Tunisie: 403. 1902 (basiónimo)

Todos los caracteres morfológicos estudiados del esporófito incluyen a este taxon en el rango de variación de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (Fig. 35, Tabla 5). Se trata de formas de fronde oblonga de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*.

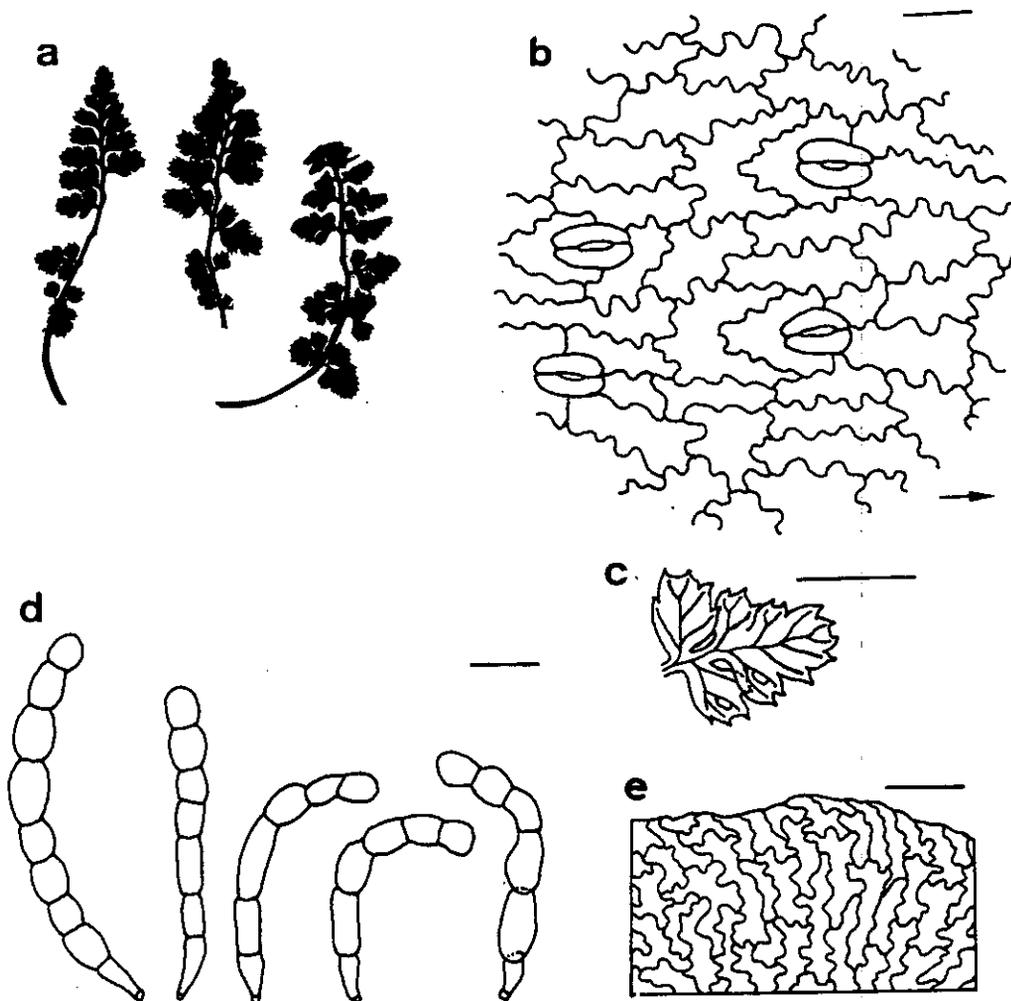


Figura 35. *A. obovatum* subsp. *numidicum*: a, siluetas de frondes del individuo MGC 28503 (tamaño natural); b, estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas (la flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna); c, pinna media de las frondes; d, indumento de las pinnas; e, modelos de las células de los indusios. Barra b: 50 μ m, c: 0.5 cm, d y e: 0.1 mm.

MAIRE (1959) señala que este taxon se aproxima por sus caracteres a *A. foreziense*, BECHERER (1935) lo incluye en *A. foreziense* y RUMSEY & VOGEL (1996) sospechan que podría tratarse de un sinónimo de *A. foreziense*, a pesar de no haber visto material de este taxon. Después de haber estudiado el material tipo, hemos llegado a la conclusión de que se trata de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y no de *A. foreziense*.

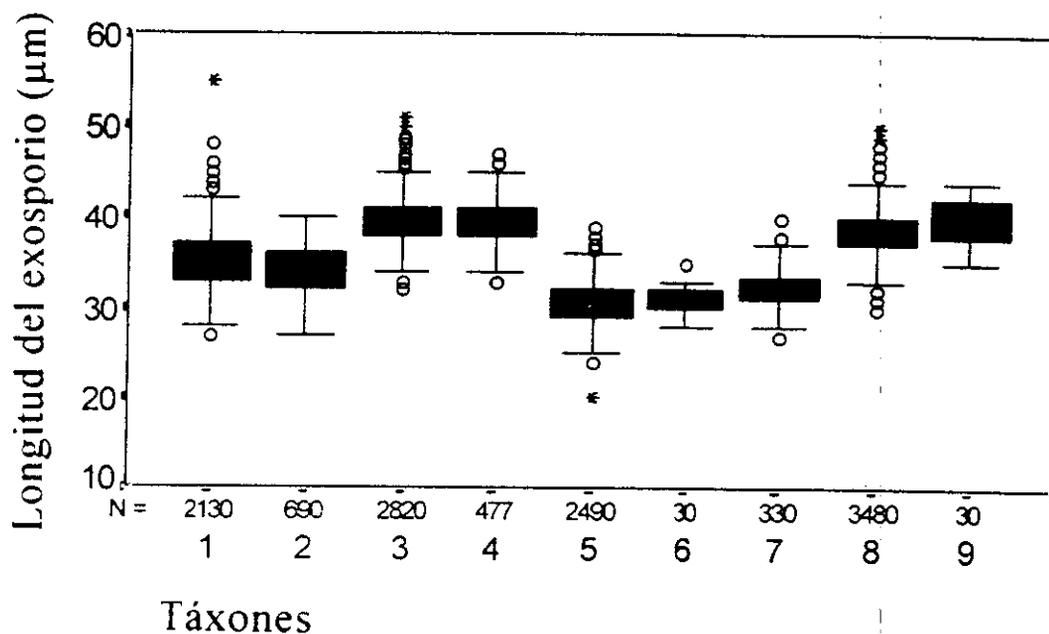


Figura 36. Representación gráfica de la longitud del exosporio de los distintos táxones: 1, *A. fontanum* subsp. *fontanum*; 2, *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*; 3, *A. foreziense*; 4, *A. macedonicum*; 5, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; 6, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum*; 7, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*; 8, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 9, *A. obovatum* subsp. *numidicum*. N: número de medidas realizadas en cada taxon.

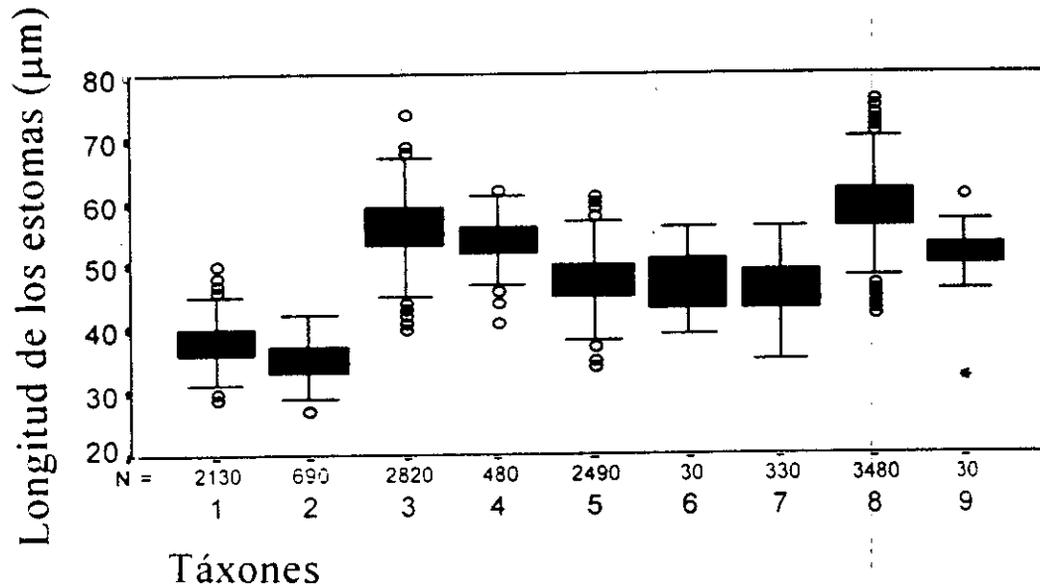


Figura 37. Representación gráfica de la longitud de los estomas de los distintos táxones: 1, *A. fontanum* subsp. *fontanum*; 2, *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*; 3, *A. foreziense*; 4, *A. macedonicum*; 5, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; 6, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum*; 7, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*; 8, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 9, *A. obovatum* subsp. *numidicum*. N: número de medidas realizadas en cada taxon.

Taxon	N	Longitud exosporio	N	Longitud estomas
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>	113	(27)32.5- 35 -37.5(46)	71	(29)35.3- 38.3 -41.3(50)
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>	23	(27)31.6- 34.1 -36.6(40)	23	(27)37.5- 34.9 -37.3(42)
<i>A. foreziense</i>	98	(32)37- 39.6 -42.2(51)	94	(40)51.1- 55.3 -59.5(74)
<i>A. macedonicum</i>	16	(33)36.8- 39.1 -41.4(47)	16	(41)50.6- 54.1 -57.6(62)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>obovatum</i>	85	(20)28.6- 30.5 -32.4(39)	84	(34)43.5- 47.4 -51.3(61)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>deltoideum</i>	1	(28)29.3- 30.8 -32.3(35)	1	(39)42.3- 46.9 -51.5(56)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>protobillotii</i>	41	(27)30.3- 32.3 -34.3(40)	11	(35)42- 45.8 -49.6(56)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>lanceolatum</i>	168	(30)36- 38.3 -40.6(50)	116	(42)53.8- 58.6 -63.4(76)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>numidicum</i>	1	(35)37.6- 40 -42.4(44)	1	(32)46.4- 51.1 -55.8(61)

Tabla 5. Media (en negrita) ± la desviación estándar, y los valores mínimo y máximo (entre paréntesis) de las longitudes del exosporio y de los estomas de los diferentes táxones (en micras). N: número de individuos.

4.1.1.10. *Asplenium obovatum* Viv. nothosubsp. *cyrnosardoum* (Rasbach, Vida & Reichst.) Rasbach, K. Rasbach, Viane & Bennert nothovar. *cyrnosardoum* in Bot. Helv. 100: 10. 1990

Asplenium x cyrnosardoum Rasbach, Vida & Reichst. in Bot. Helv. 91: 114. 1981 (basiónimo)

= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva

En la población de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* que hemos recolectado en el Cap Béar (Pyrénées-orientales) apareció uno de los individuos (BEA 9) con el contenido esporangial abortado (Fig. 38 a) y con la morfología de los dientes y mucrones de las pinnas intermedia entre *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (Figs. 38 b-d y 39). Ésto nos hizo sospechar de que se podría tratar del híbrido entre estos dos táxones, descrito por RASBACH *et al.* (1981) con material de Córcega.

No hemos podido estudiar citológicamente esta planta para comprobar su apareamiento cromosómico en las células madres de las esporas, pero el estudio de la electroforesis de isoenzimas nos ha confirmado que se trata de este híbrido.

Además de este individuo recolectado por nosotros, en un pliego del herbario G de la isla de Giglio, en el archipiélago toscano (Italia) apareció material mezclado de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y entre ellos una fronde con el material esporangial abortado y con morfología intermedia entre estos dos táxones, y que hemos atribuido a este híbrido.

En ambos casos no se observan diferencias en las células epidérmicas de la cara abaxial de las pinnas (Fig. 40 a-c) y en los indusios del híbrido y de sus parentales (Fig. 38 e-g), pero la longitud de las células estomáticas del híbrido es intermedia entre la de sus parentales (Tabla 6), como también indicaron RASBACH *et al.* (1990).

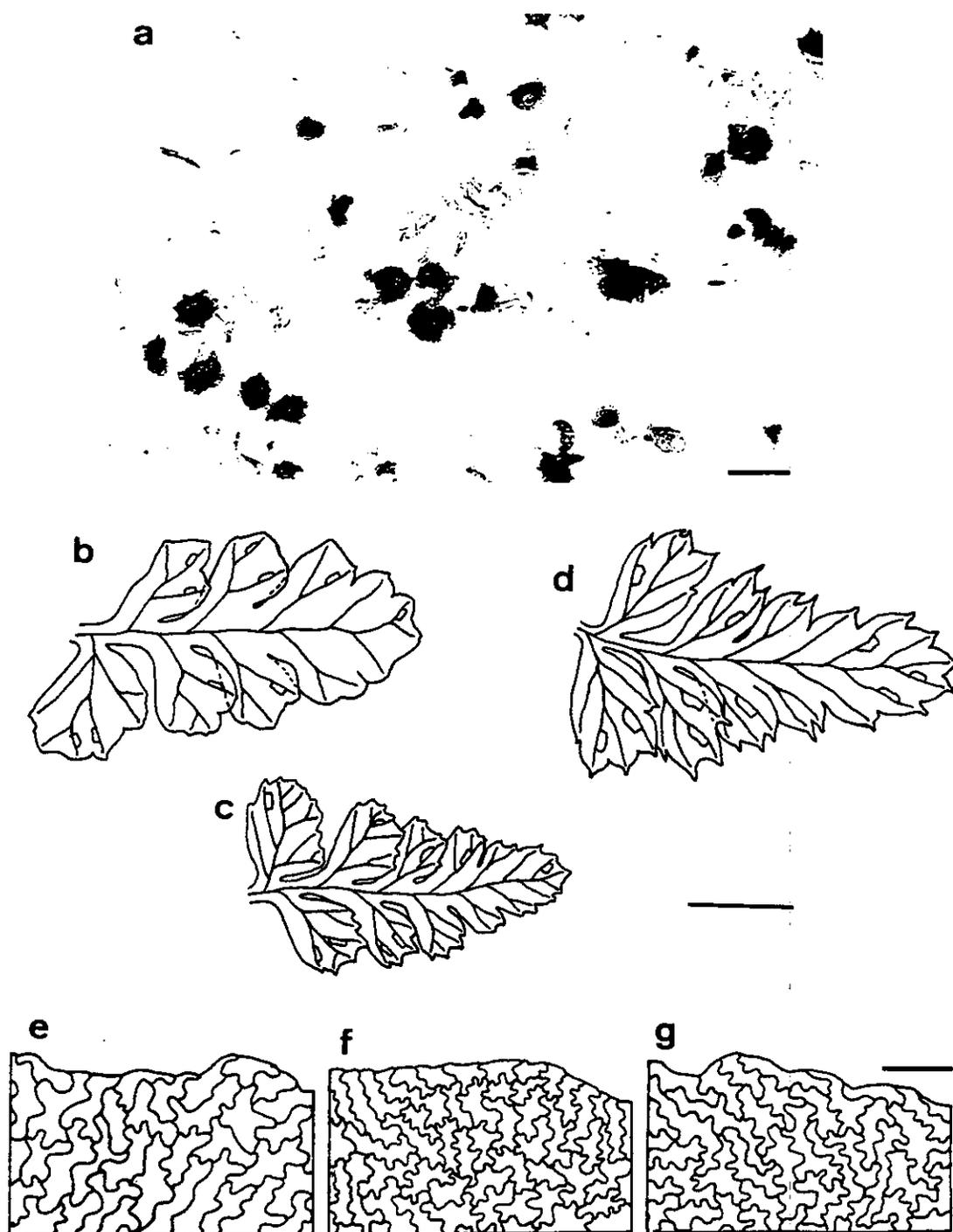


Figura 38. Esporas de *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *cyrnosardoum* (a), y pinnas medias de las frondes (b-d) y modelos de las células de los indusios (e-g) de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (b y e), *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *cyrnosardoum* (c y f) y *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (d y g). Barra a: 50 μ m, b-d: 0.5 cm, e-g: 0.1 mm.

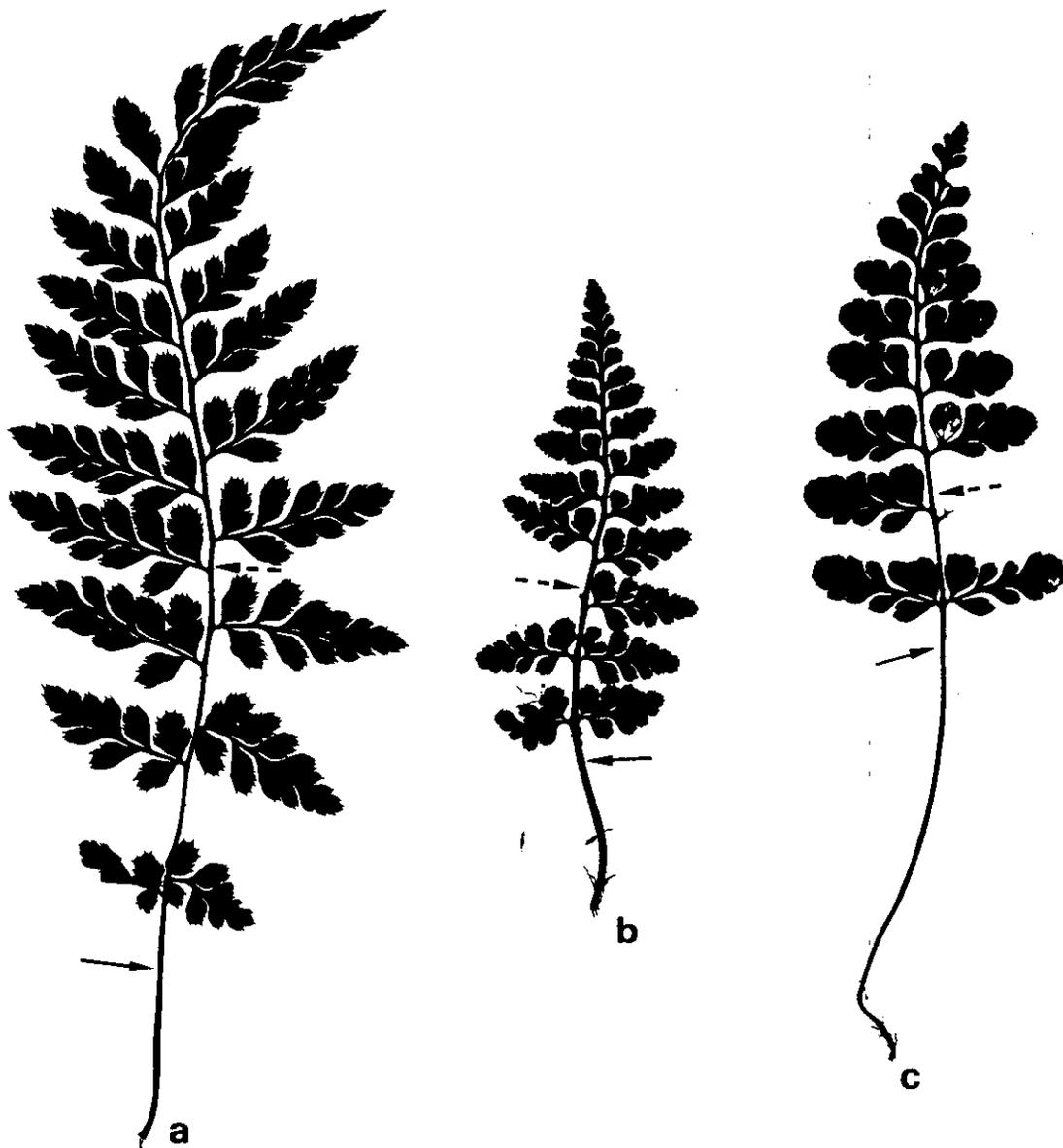


Figura 39. Siluetas de las frondes: a, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; b, *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *cyrnosardoum*; c, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*. (→): Nivel que alcanza el color marrón oscuro en el pecíolo y raquis por la cara adaxial, y (--->) por la cara abaxial de la fronde. Tamaño natural.

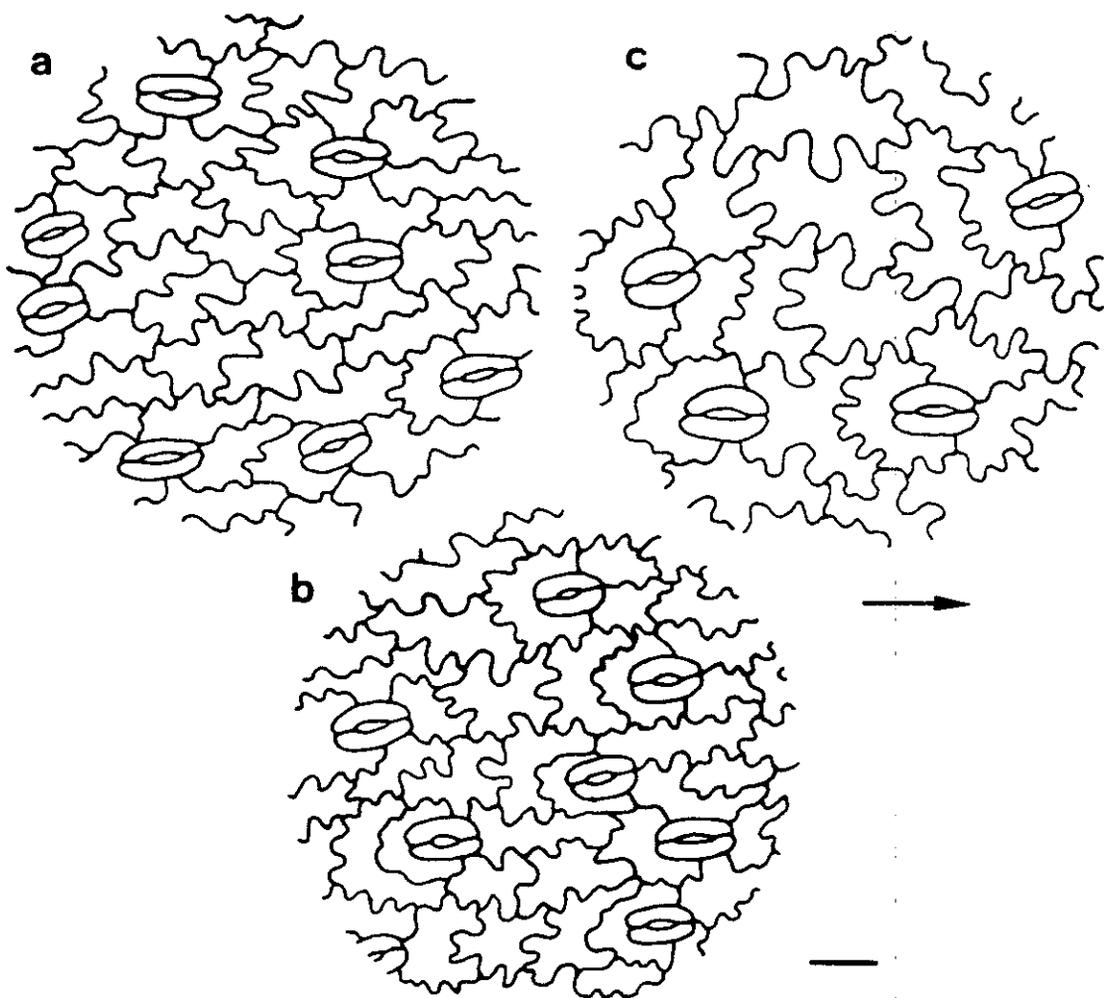


Figura 40. Estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas: a, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; b, *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *cyrnosardoum*; c, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*. La flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna. Barra: 50 μm .

4.1.1.11. *Asplenium obovatum* Viv. nothosubsp. *cyrnosardoum* (Rasbach, Vida & Reichst.) Rasbach, K. Rasbach, Viane & Bennert nothovar. *ibericum* Rasbach, K. Rasbach, Viane & Bennert in Bot. Helv. 100: 12. 1990

= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst. x *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva

Hemos encontrado este híbrido en el valle del río de la Miel (Cádiz), única localidad donde se ha encontrado hasta ahora (RASBACH *et al.*, 1990), y en la que convive con sus parentales.

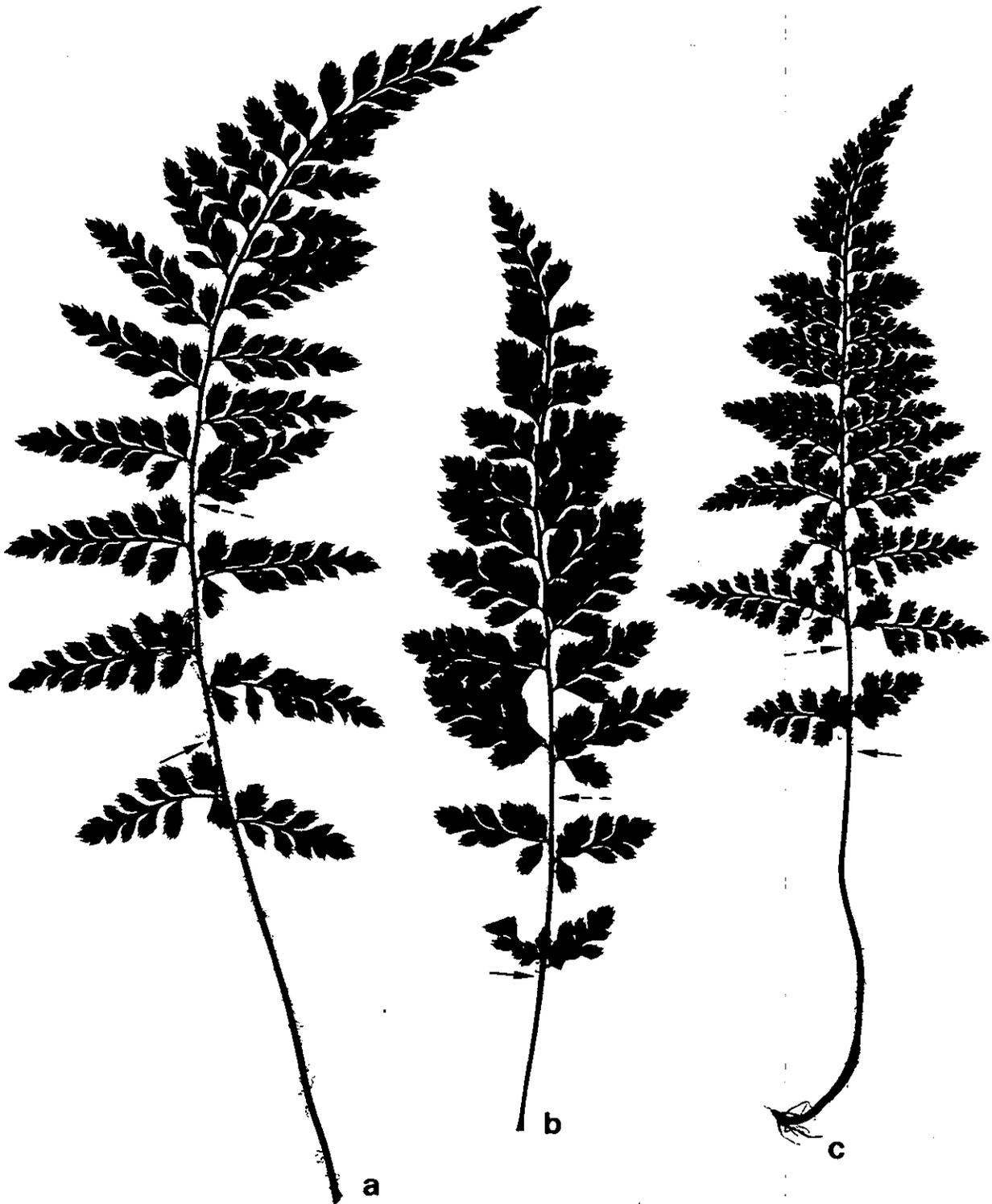


Figura 41.- Siluetas de las frondes: a, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; b, *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *ibericum*; c, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*. (→): Nivel que alcanza el color marrón obscuro en el pecíolo y raquis por la cara adaxial, y (—→) por la cara abaxial de la fronde. Tamaño natural.

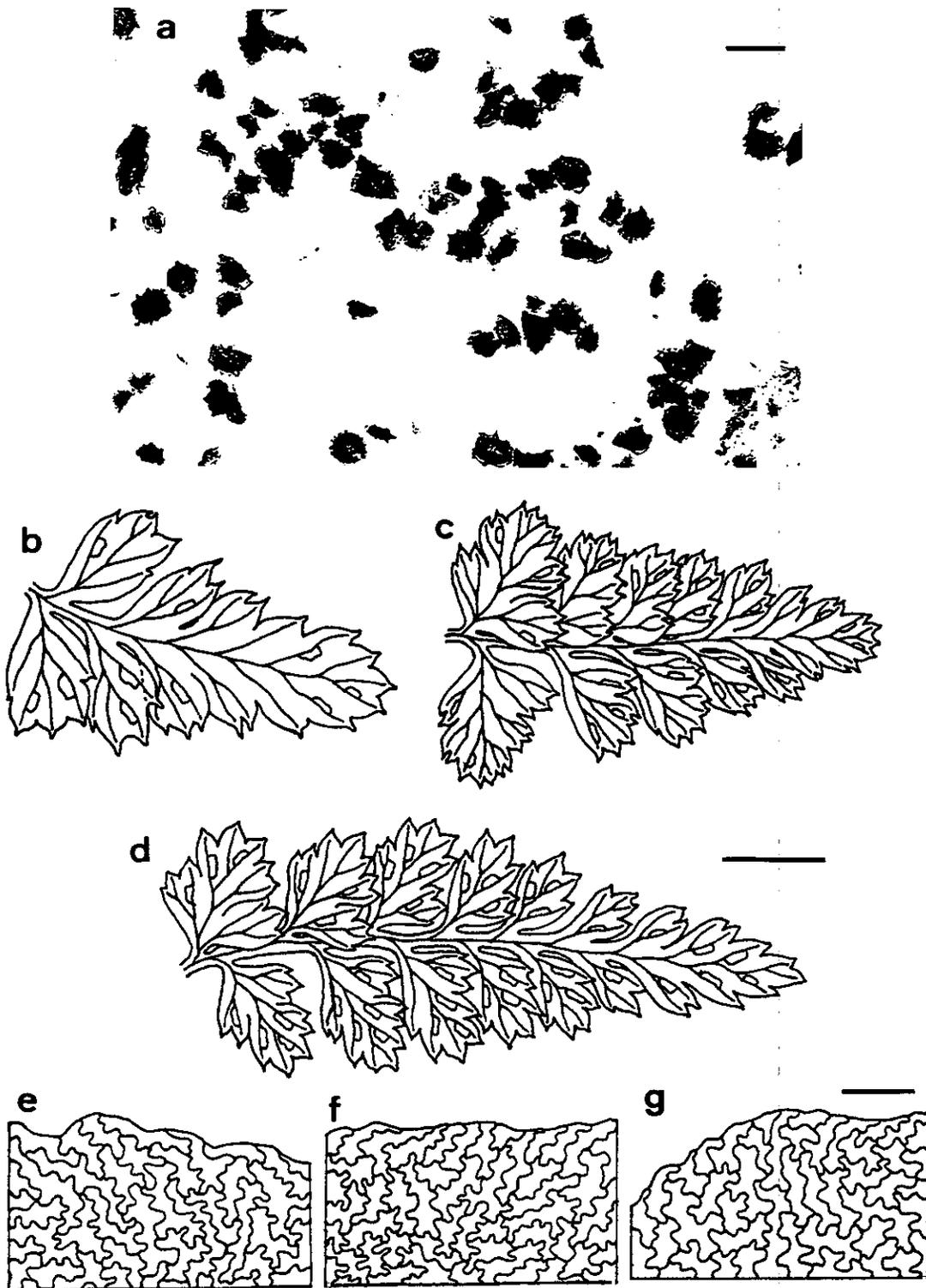


Figura 42. Esporas de *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *ibericum* (a), y pinnas medias de las frondes (b-d) y modelos de las células de los indusios (e-g) de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (b y e), *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *ibericum* (c y f) y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (d y g). Barra a: 50 μ m, b-d: 0.5 cm, e-g: 0.1 mm.

La morfología de la fronde y de las pinnas es muy similar a la de sus parentales que, a su vez, son muy similares entre sí (Figs. 41 a-c y 42 b-d). Tampoco se aprecian diferencias ni en los indusios (Fig. 42 e-g) ni en las células epidérmicas de la cara abaxial de las pinnas (Fig. 43 a-c) de los tres táxones. Sólo existen diferencias en la longitud de las células estomáticas (Tabla 6), siendo la del híbrido intermedia entre la de los parentales, como también indican RASBACH *et al.* (1990), al igual que en la notovariedad tipo.

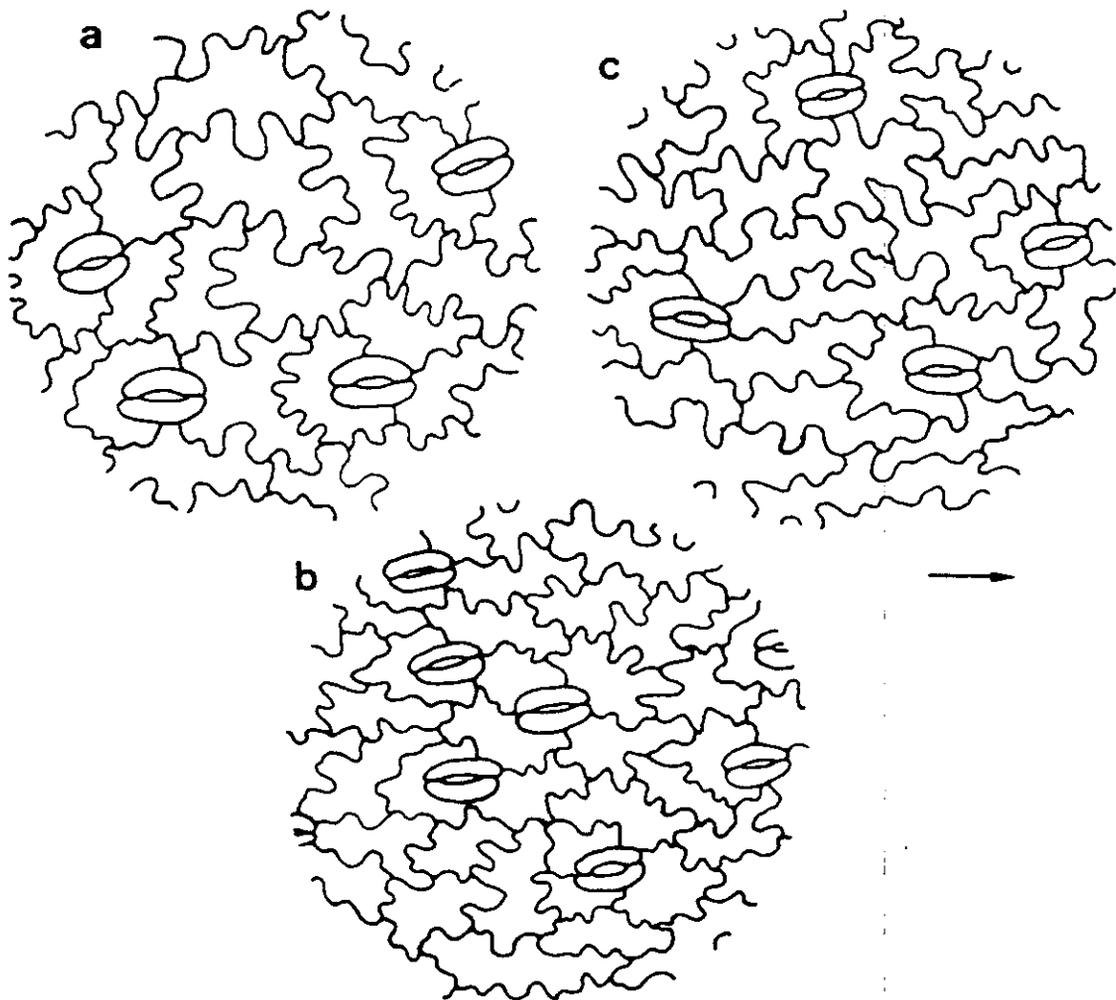


Figura 43. Estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas: a, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; b, *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *ibericum*; c, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*. La flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna. Barra: 50 μ m.

Hemos encontrado un total de cinco plantas híbridas, todas ellas con el contenido esporangial abortado (Fig. 42 a). El único individuo que hemos podido estudiar citológicamente ha sido MIE 40 y mostró cerca de 36^I y 36^{II} en metafase I.

Debido a la gran homología genómica de sus parentales, es frecuente que aparezcan numerosos individuos híbridos en la única población hasta ahora conocida (datos propios y en RASBACH *et al.*, 1990).

4.1.1.12. *Asplenium x protomajoricum* Pangua & Prada nothosubsp. *protomajoricum* in Bot. J. Linn. Soc. 108(1): 2. 1992

Asplenium x protomajoricum Pérez Carro & Fern. Areces. Anales Jard. Bot. Madrid 49(2): 188. 1992

= *Asplenium fontanum* (L.) Bernh. subsp. *fontanum* x *A. petrarchae* (Guérin) DC. subsp. *bivalens* (D.E. Mey.) Lovis & Reichst.

Nuestra planta, que se encontraba conviviendo con sus parentales, presenta, además de los escasos pelos pluricelulares comunes en muchas especies de *Asplenium*, numerosos pelos unicelulares en la lámina, peciolo y raquis, carácter que es propio de *A. petrarchae* subsp. *bivalens*.

Las frondes tienen una morfología similar a la de *A. fontanum* subsp. *fontanum* (Fig. 44 b), si bien las pinnas son menos incisas y los dientes no tan cuspidados (Fig. 45 c); el peciolo y la mitad inferior del raquis son de color marrón oscuro, siendo en este carácter intermedio el híbrido con respecto a sus parentales (Fig. 45 a-c). El raquis sin embargo es de sección circular, como ocurre en *A. petrarchae* subsp. *bivalens* y no aplanado y acanalado, como es el caso en *A. fontanum* subsp. *fontanum*. No se aprecian diferencias ni en los indusios (Fig. 45 e-g) ni en las células epidérmicas de la cara abaxial (Fig. 46 a-c) de los tres táxones.

Se ha podido realizar el análisis de la meiosis en cuatro células madres de las esporas, que presentaron $n = 72^I$ en tres de ellas (Fig. 47) y $n = 70^I$ 1^{II} en la otra.

Este híbrido diploide ha sido citado únicamente del Levante español; hasta ahora se habían recolectado dos (PANGUA *et al.*, 1992) y cinco individuos (PÉREZ CARRO & FERNÁNDEZ ARECES, 1992), en la provincia de Valencia. Por las descripciones del híbrido que estos autores hacen, y a la vista del nuevo individuo encontrado por nosotros, podemos afirmar que la pubescencia de las frondes es extremadamente variable, habiéndose encontrado plantas con la lámina y el peciolo prácticamente

glabros, otras con la superficie abaxial de las pinnas provista de pelos glandulares dispersos y otras con abundantes pelos en toda la fronde.

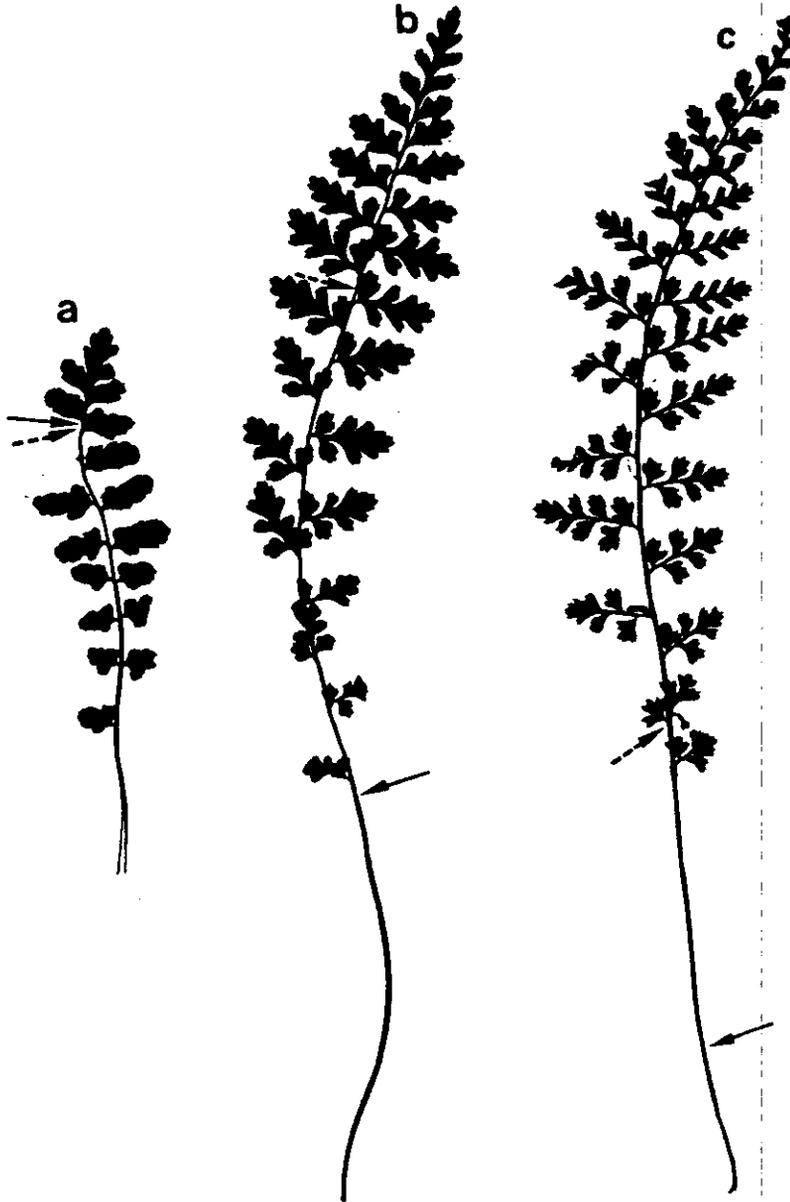


Figura 44. Siluetas de las frondes: a, *A. petrarche* subsp. *bivalens*; b, *A. x protomajoricum* nothosubsp. *protomajoricum*; c, *A. fontanum* subsp. *fontanum*. (→): Nivel que alcanza el color marrón oscuro en el peciolo y raquis por la cara adaxial, y (---→) por la cara abaxial de la fronde. Tamaño natural.

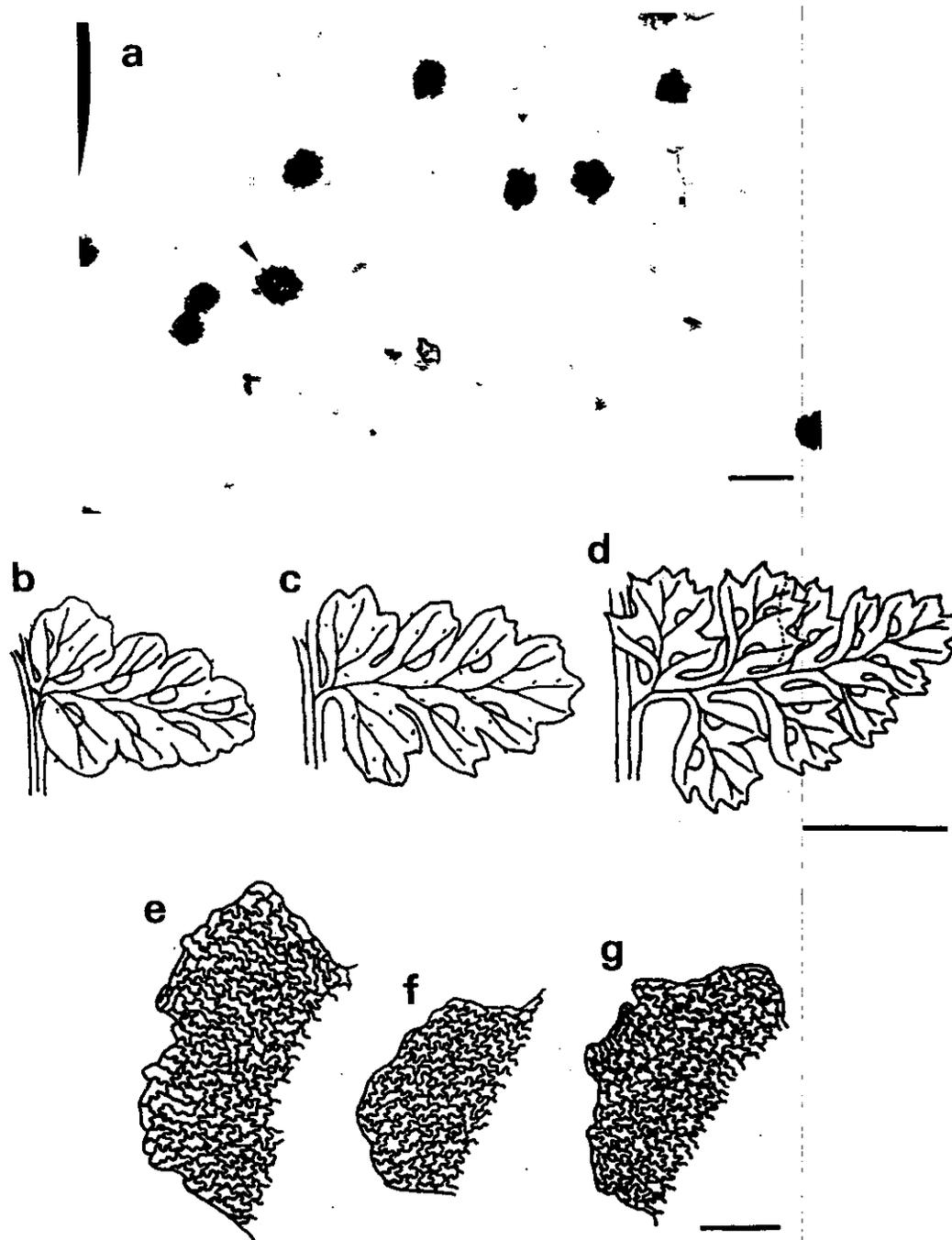


Figura 45. Esporas de *A. x protomajoricum* nothosubsp. *protomajoricum*, la flecha indica una diplóspora (a), y pinnas medias de las frondes (b-d) y modelos de las células de los indusios (e-g) de *A. petrarche* subsp. *bivalens* (b y e), *A. x protomajoricum* nothosubsp. *protomajoricum* (c y f) y *A. fontanum* subsp. *fontanum* (d y g). Barra a: 50 μ m, b-d: 0.5 cm, e-g: 0.2 mm.

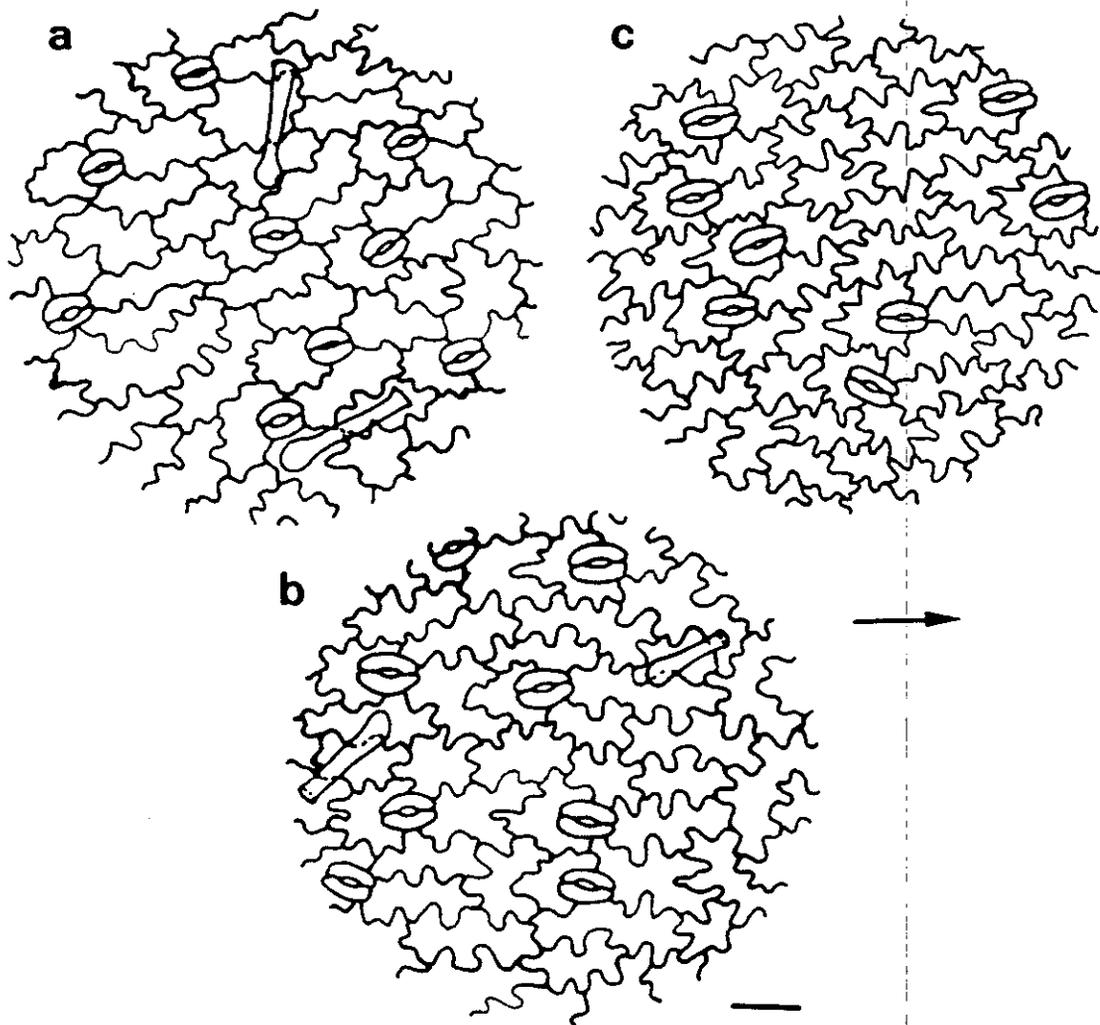


Figura 46. Estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas: a, *A. petrarche* subsp. *bivalens*; b, *A. x protomajoricum* nothosubsp. *protomajoricum*; c, *A. fontanum* subsp. *fontanum*. La flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna. Barra: 50 μm .



Figura 47. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de las esporas de *A. x protomajoricum* nothosubsp. *protomajoricum*, individuo CAM 5, $n = 72^I$. Barra: 10 μm .

En el ejemplar estudiado se han observado algunas diplósporas (Fig. 45 a). REICHSTEIN (1981) señala que existe gran variación en la capacidad de las especies diploides para formar híbridos y en el potencial de tales híbridos para duplicar posteriormente sus cromosomas y originar alopoliploides. En este caso, la duplicación de los cromosomas en el híbrido parece ser relativamente fácil dado el contenido en diplósporas denunciado en los ejemplares hasta ahora localizados; este hecho probablemente está relacionado con la presencia en esa región del alopoliploide derivado, *A. majoricum*, recientemente recolectado en Valencia (PÉREZ CARRO & FERNÁNDEZ ARECES, 1992) y cuya presencia en la provincia de Alicante fue indicada por PANGUA *et al.* (1992) basándose en material de herbario recolectado por Rigual y señalado por este autor bajo *A. lanceolatum* Huds. var. *valentinum* (Pau) Knoch (RIGUAL, 1972).

**4.1.1.13. *Asplenium x recoderi* Aizpuru & Catalán nothosubsp. *recoderi* in Anales Jard. Bot. Madrid 42(2): 531. 1986
= *A. fontanum* (L.) Bernh. subsp. *fontanum* x *A. ruta-muraria* L. subsp. *ruta-muraria***

El individuo que hemos recolectado presenta las frondes de morfología intermedia entre las de sus parentales (Fig. 48 a-c), con la lámina lanceolada como en *A. fontanum* subsp. *fontanum* y las pinnas basales divididas de forma pinnada, con pinnulas flabeladas muy semejantes a las de *A. ruta-muraria*

subsp. *ruta-muraria*, pero presentando pequeños dientes agudos bien definidos (Fig. 49 c) y abundantes pelos pluricelulares. Los caracteres del indusio son también intermedios en este híbrido, lo que se manifiesta principalmente por la presencia de algunas fimbrias en el borde del indusio al igual que ocurre en *A. ruta-muraria* subsp. *ruta-muraria* y por el tamaño y tipo de células, semejantes a las de *A. fontanum* subsp. *fontanum* (Fig. 49 e-g). En cambio, no hay diferencias significativas en las células de la epidermis de las pinnas de la cara abaxial de los tres táxones (Fig. 50 a-c). Sus esporangios están colapsados (Fig. 49 a) y la distribución del material genético en las tétradas es irregular (Fig. 49 a').

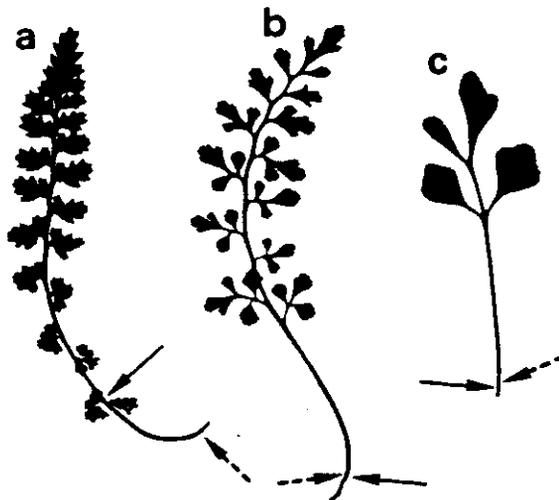


Figura 48. Siluetas de las frondes: a, *A. fontanum* subsp. *fontanum*; b, *A. x recoderi* nothosubsp. *recoderi*; c, *A. ruta-muraria* subsp. *ruta-muraria*. (→): Nivel que alcanza el color marrón oscuro en el pecíolo y raquis por la cara adaxial, y (---→) por la cara abaxial de la fronde. Tamaño natural.

Este híbrido triploide ha sido citado en el Pirineo navarro (AIZPURU & CATALÁN, 1986) y en la Sierra de Albarracín (PÉREZ CARRO & FERNÁNDEZ ARECES, 1996), habiéndose encontrado un solo individuo en cada caso, al igual que en nuestra recolección, en que el único ejemplar hallado se encontraba conviviendo con sus parentales. Si bien hasta ahora este híbrido se ha encontrado ocasionalmente, el hecho de que *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. ruta-muraria* subsp. *ruta-muraria* se desarrollen sobre sustratos básicos y sus áreas de distribución se solapen, hace pensar que posiblemente se encuentre en otros puntos del área en que esos dos táxones coinciden.

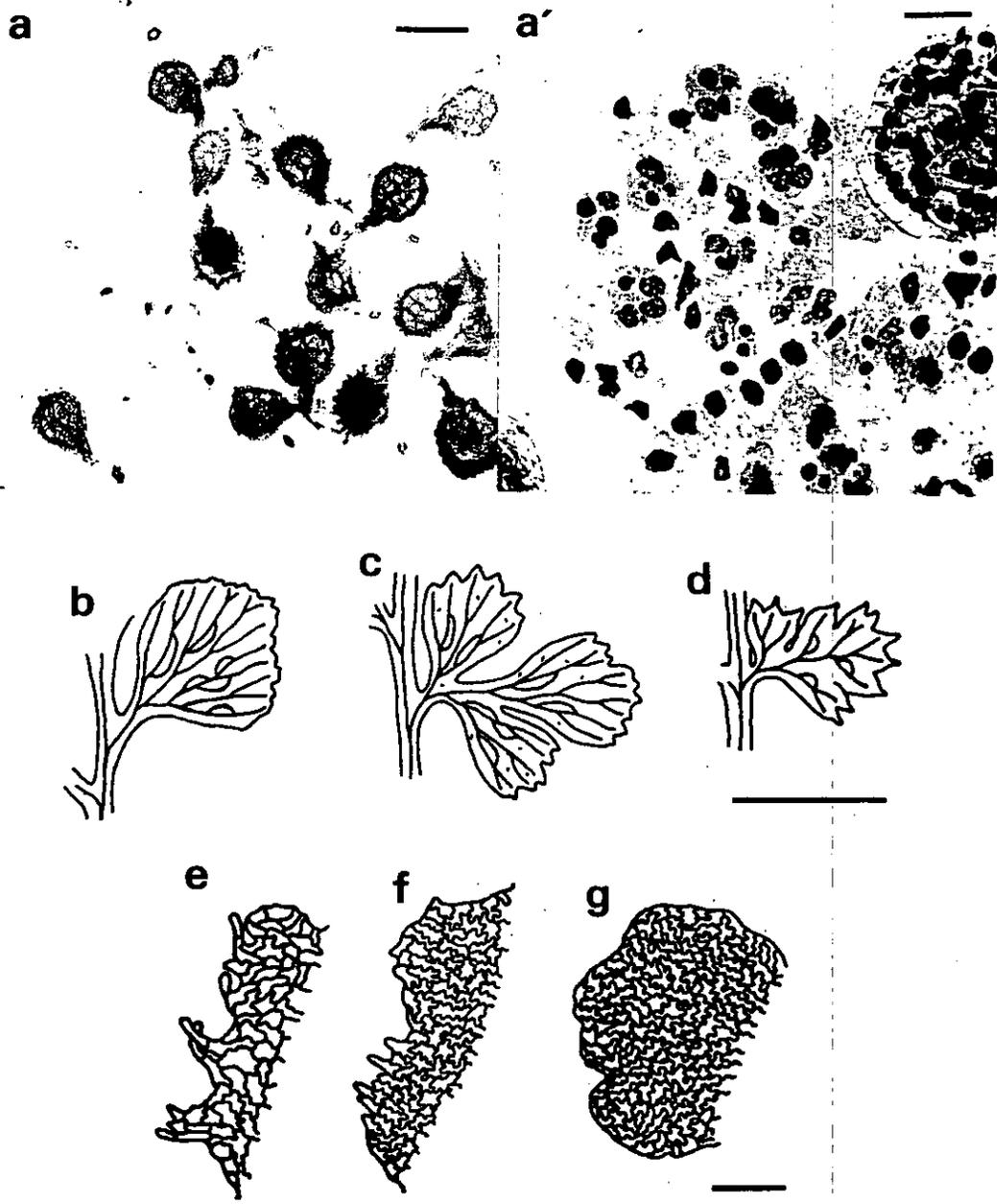


Figura 49. Esporangios (a) y tétradas (a') de *A. x recoderi* nothosubsp. *recoderi*, y pinnas medias de las frondes (b-d) y modelos de las células de los indusios (e-g) de *A. ruta-muraria* subsp. *ruta-muraria* (b y e), *A. x recoderi* nothosubsp. *recoderi* (c y f) y *A. fontanum* subsp. *fontanum* (d y g). Barra a: 125 μ m, a': 50 μ m, b-d: 0.5 cm, e-g: 0.2 mm.

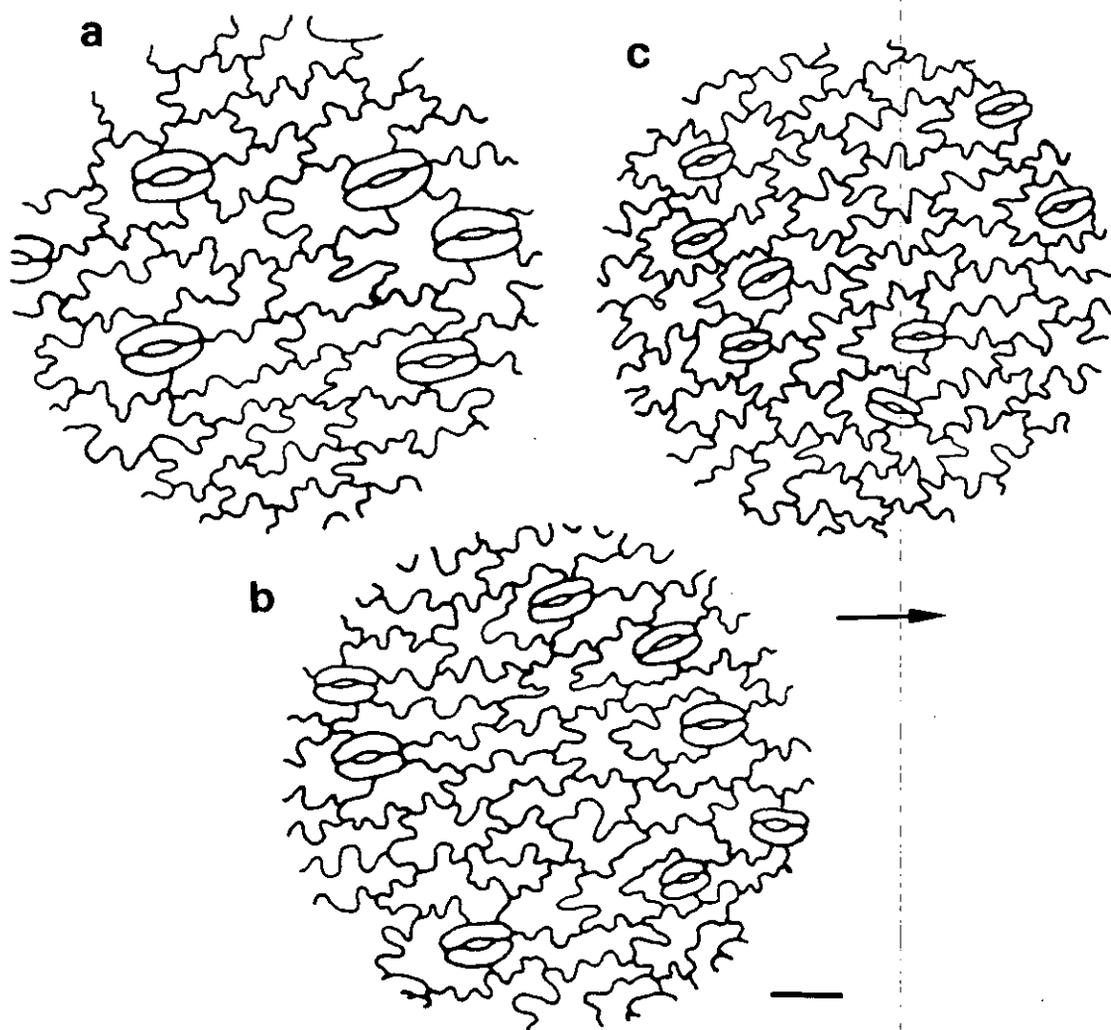


Figura 50. Estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas: a *A. ruta-muraria* subsp. *ruta-muraria*; b, *A. x recoderi* nothosubsp. *recoderi*; c, *A. fontanum* subsp. *fontanum*. La flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna. Barra: 50 μ m.

En las dos células madres de las esporas en que ha sido posible observar la meiosis, se ha obtenido $n = c. 36^I$ y 36^{II} (Fig. 51).



Figura 51. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de *A. x recoderi* nothosubsp. *recoderi*, individuo EST 2, $n = c. 36^I$ y 36^{II} . Barra: 10 μm .

**4.1.1.14. *Asplenium x sleepiae* Badré & Boudrie nothosubsp. *sleepiae* in Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., B, Adansonia 4(3): 477. 1981
= *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva x *A. foreziense* Legrand ex Giraudias**

Este híbrido lo hemos encontrado en dos localidades, en el Puig dels Bufadors (Gerona) y en la Sierra de Albarracín (Teruel), una de ellas con dos individuos. Tanto los parentales como el híbrido presentan una morfología muy parecida en lo que se refiere a la forma y grado de disección de la lámina (Fig. 52 a-c), observándose algunas diferencias en las características de los dientes de las pinnulas, que son divergentes y cortamente mucronados en *A. foreziense*, aproximados y largamente cuspidados en *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* e intermedios en el híbrido (Fig. 53 b-d). No se aprecian diferencias en los indusios de los tres táxones (Fig. 53 e-g), pero sí en las células de la epidermis, los lóbulos de éstas son agudos en *A. foreziense*, obtusos en *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, y más o menos agudos en el híbrido (Fig. 54 a-c).

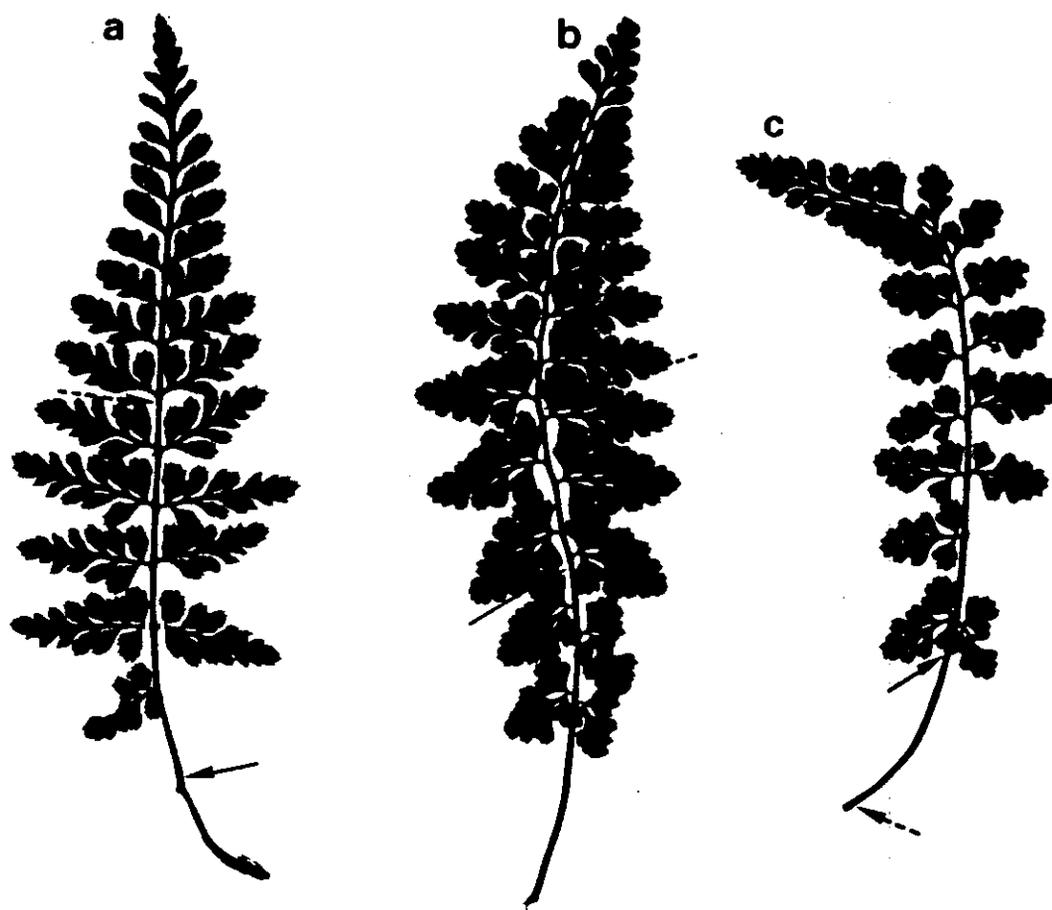


Figura 52. Siluetas de las frondes: a, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; b, *A. x sleepiae* nothosubsp. *sleepiae*; c, *A. foreziense*. (→): Nivel que alcanza el color marrón oscuro en el pecíolo y raquis por la cara adaxial, y (---→) por la cara abaxial de la fronde. Tamaño natural.

El contenido esporangial está totalmente abortado (Fig. 53 a). El análisis de la meiosis en los individuos estudiados ha dado como resultado $n = c. 66^I 30^{II} 6^{III}$ (Fig. 55 a y a') y $n = c. 65^I 32^{II} 5^{III}$ en el individuo BUF 21, y $n = c. 69^I 33^{II} 3^{III}$ en el individuo CAB 7 (Fig. 55 b y b').

Debido a que en el híbrido se presentan tres genomas provenientes de *A. obovatum* subsp. *obovatum* pueden aparecer un número variable de trivalentes, habiéndose encontrado en los individuos hasta ahora estudiados citológicamente, de 0 a 15 trivalentes.

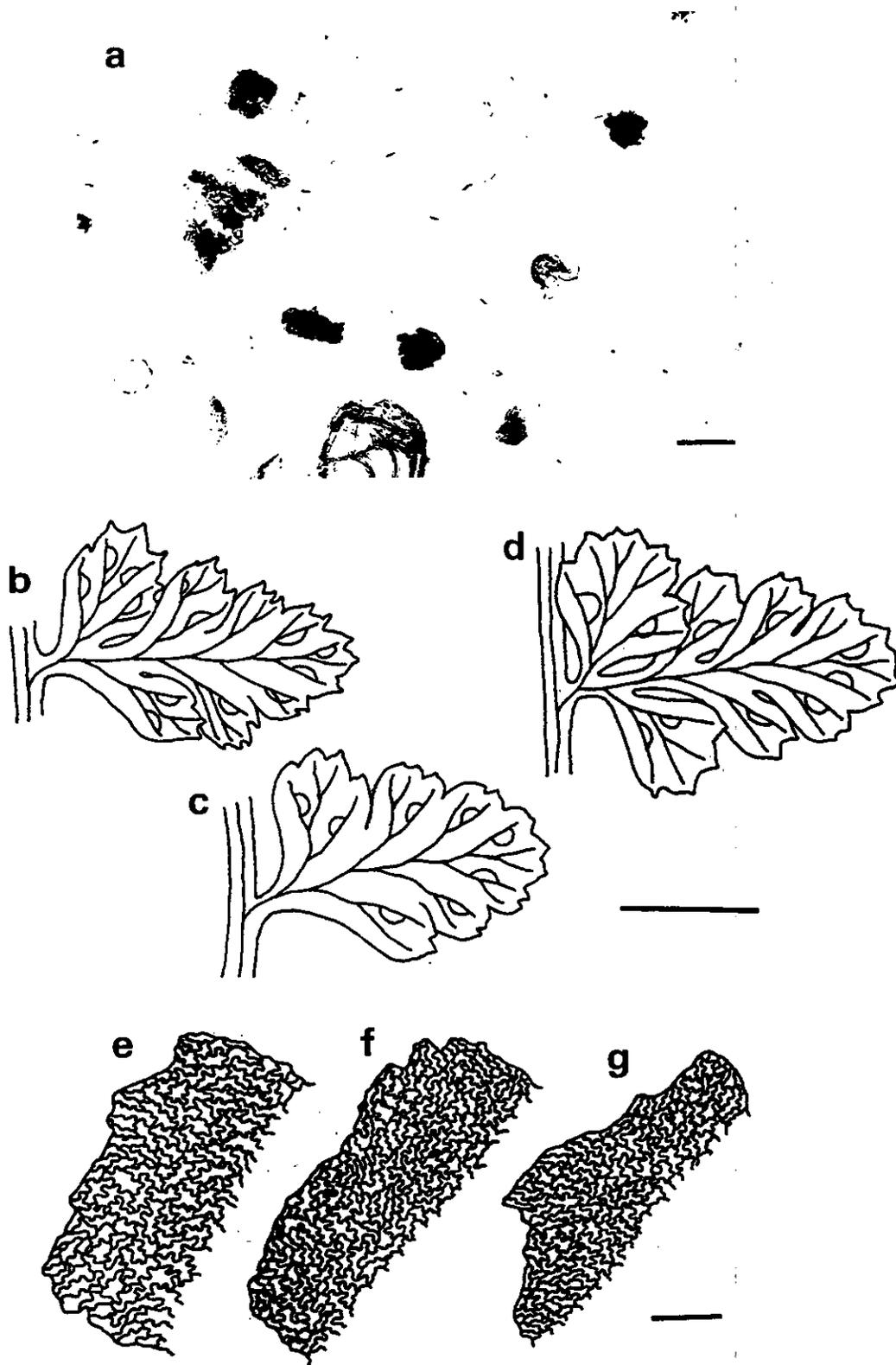


Figura 53. Esporas (a) de *A. x sleepiae* nothosubsp. *sleepiae*, y pinnas medias de las frondes (b-d) y modelos de las células de los indusios (e-g) de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (b y e), *A. x sleepiae* nothosubsp. *sleepiae* (c y f) y *A. foreziense* (d y g). Barra a: 50 μ m, b-d: 0.5 cm, e-g: 0.2 mm.

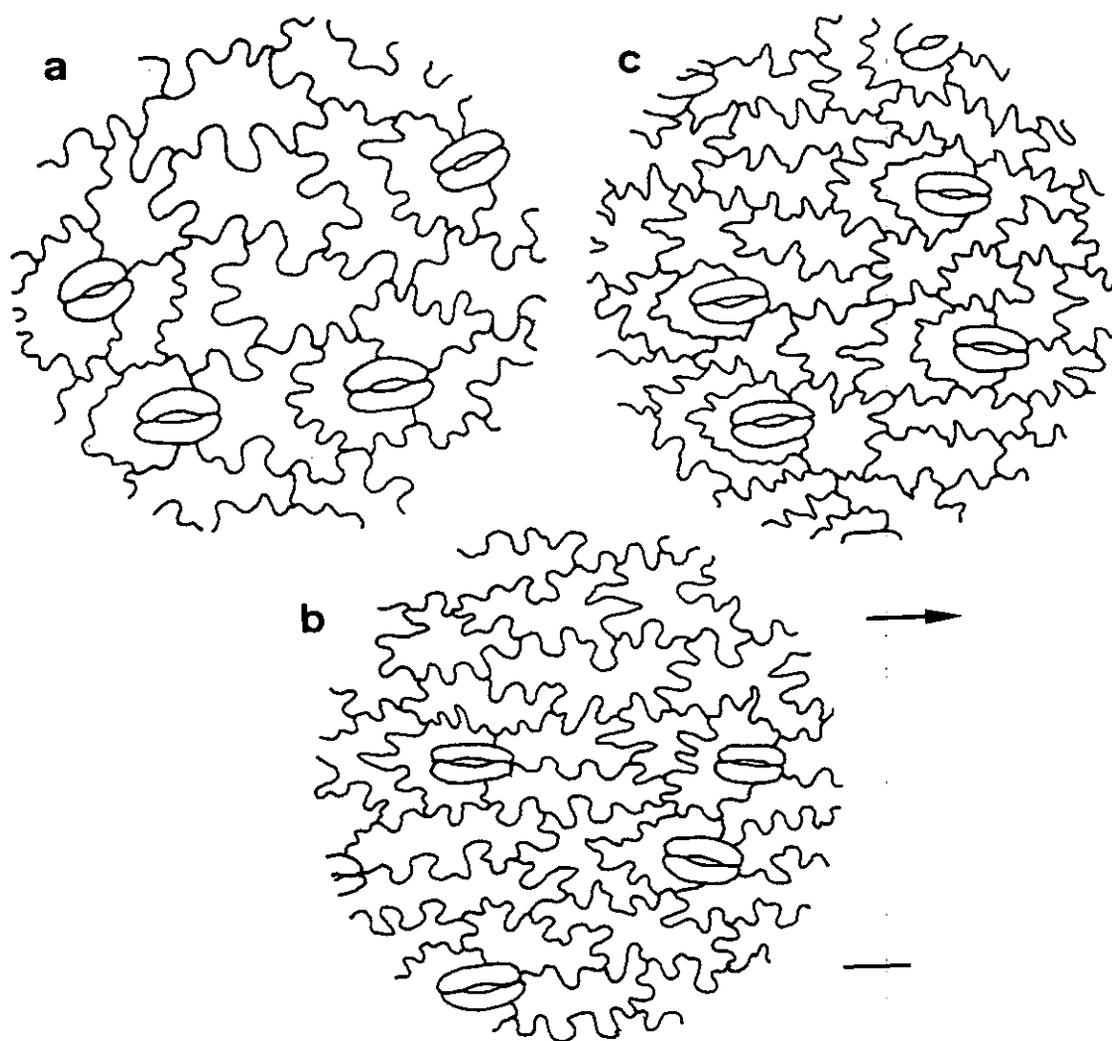


Figura 54. Estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas: a *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; b, *A. x sleepiae* nothosubsp. *sleepiae*; c, *A. foreziense*. La flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna. Barra: 50 μ m.

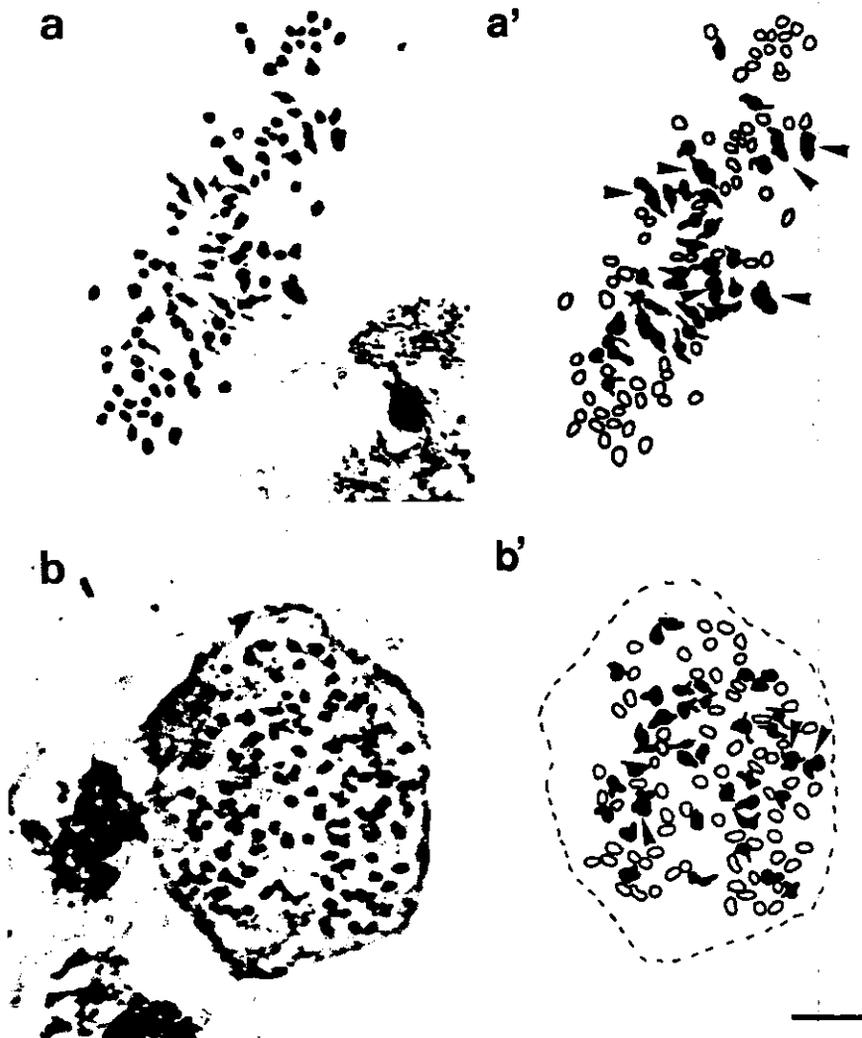


Figura 55. Fotografías y diagramas explicativos de las meiosis de las células madres de las esporas de *A. x sleepiae* nothosubsp. *sleepiae*: a y a', individuo BUF 21, $n = c. 66^I 30^{II} 6^{III}$; b y b', individuo CAB 7, $n = c. 69^I 33^{II} 3^{III}$. Las flechas indican los trivalentes. Barra: 10 μ m.

Este híbrido tetraploide fue obtenido de forma artificial por SLEEP (1983), y hasta ahora se ha encontrado de forma natural en Francia y en España. En Francia se conoce de numerosas localidades correspondientes a varios departamentos (BADRE *et al.*, 1981; BOUDRIE, 1994, 1996; BOUZILLÉ & BOUDRIE, 1991; RASBACH *et al.*, 1991); en España SÁEZ *et al.* (1993) lo encontraron en Gerona, en la misma localidad que nosotros. Además, en el material de herbario que hemos revisado han aparecido frondes con el contenido esporangial abortivo y con la morfología intermedia entre *A.*

obovatum subsp. *lanceolatum* y *A. foreziense* que hemos atribuimos a este híbrido; en el herbario MGC el pliego MGC 12288 con material procedente de Sierra Nevada, del río Lanjarón (Granada), y en el herbario MA el pliego MA 332560 con material procedente de Boniches (Cuenca).

En todos los casos las plantas se desarrollaban sobre sustrato silíceo (granitos, pizarras, esquistos, areniscas), sobre los que crecen normalmente sus parentales.

La estrecha relación entre sus dos parentales hace que presenten una morfología muy similar, diferenciándose normalmente por el grado de división de la lámina y por las características de los dientes de las pinnas, pero esta diferenciación no siempre es fácil dada la variabilidad de los dos táxones. La morfología del híbrido es también variable, asemejándose unas veces más a uno de sus parentales y otras veces al otro. Al ser los parentales muy próximos genéticamente, parece que es frecuente la aparición de este híbrido allí donde conviven.

**4.1.1.15. *Asplenium x sleepiae* Badré & Boudrie nothosubsp. *krameri* Herrero, Prada, Pajarón & Pangua in Anales Jard. Bot. Madrid 53(2): 246. 1995
= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. foreziense* Legrand ex Giraudias**

SLEEP (1983) había sintetizado este híbrido en el laboratorio y nosotros lo hemos encontrado de forma natural en el Cabo de Creus (Gerona) y lo hemos descrito recientemente (HERRERO *et al.*, 1995).

Esta planta híbrida se asemeja en su morfología general a las plantas de *A. foreziense* que crecían cercanas a ella. Sus frondes, al igual que las de sus parentales, son ovado-lanceoladas, siendo más estrechas en *A. foreziense*, al igual que en el híbrido y miden cerca de 24 cm de longitud. Son bipinnadas, aunque los segmentos distales no están diferenciados en pínulas (Fig. 56 a-c). El pecíolo, como en *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, es marrón oscuro en la cara abaxial, así como en el raquis al menos hasta el espacio entre las dos pares de pinnas basales, lo que le diferencia de *A. foreziense*, donde el raquis y la mayor parte del pecíolo es verde.

El carácter de los dientes del margen de las pinnas y sus mucrones es intermedio entre sus dos parentales; los dientes son poco profundos, algo más semejantes a los de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, en cambio, los mucrones son algo más largos como en *A. foreziense* (Fig. 57 b-d).

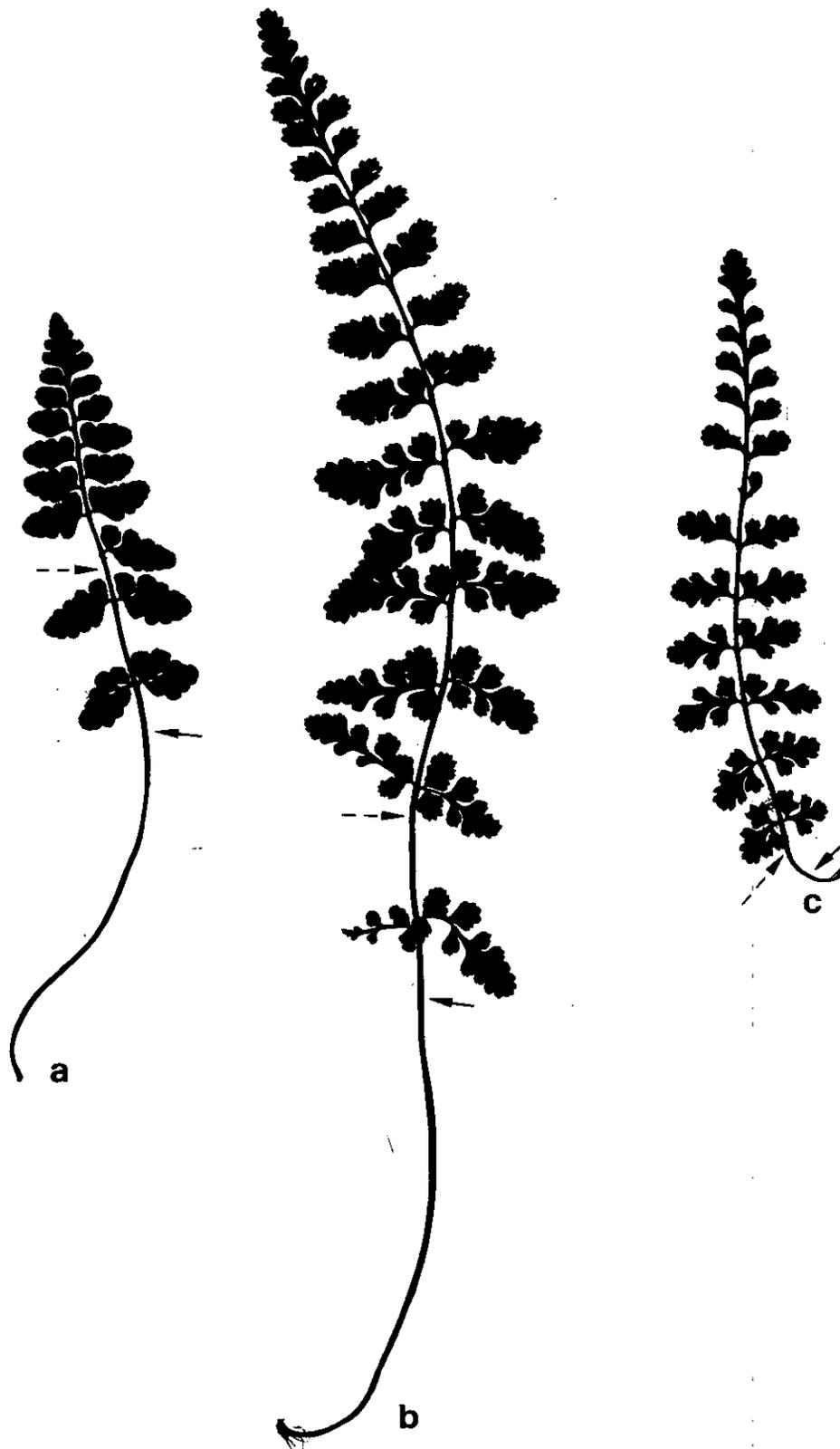


Figura 56. Siluetas de las frondes: a, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; b, *A. x sleepiae* nothosubsp. *krameri*; c, *A. foreziense*. (→): Nivel que alcanza el color marrón oscuro en el pecíolo y raquis por la cara adaxial, y (---→) por la cara abaxial de la fronde. Tamaño natural.

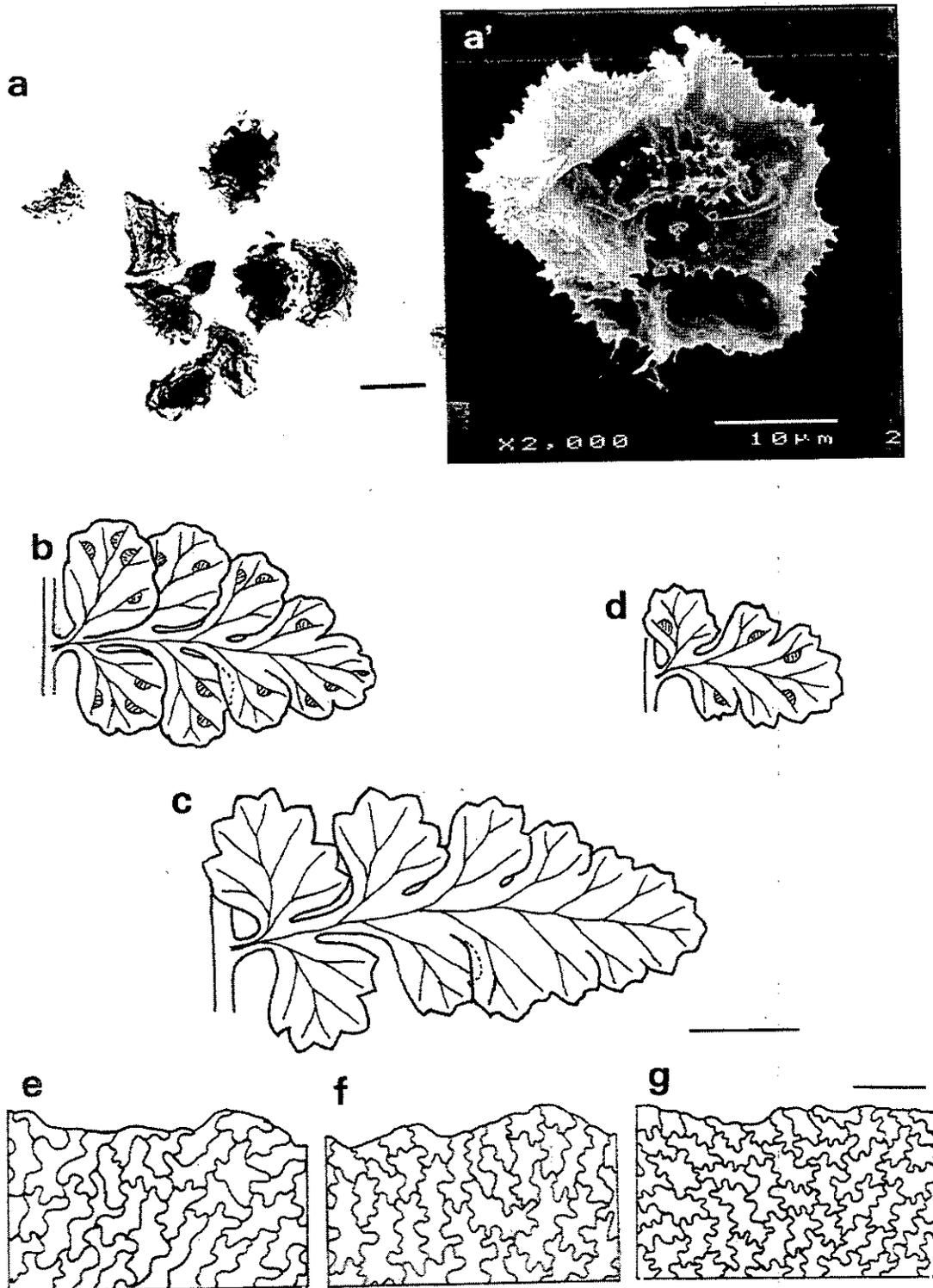


Figura 57. Esporas (a y a') de *A. x sleepiae* nothosubsp. *krameri*, y pinnas medias de las frondes (b-d) y modelos de las células de los indusios (e-g) de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (b y e), *A. x sleepiae* nothosubsp. *krameri* (c y f) y *A. foreziense* (d y g). Barra a: 30 μ m, b-d: 0.5 cm, e-g: 0.1 mm.

Las células epidérmicas de la cara abaxial de las pinnas medias son anomomorfas, con las paredes típicamente lobuladas. En el híbrido, al igual que en *A. foreziense*, estos lóbulos son algo más agudos que en *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (Fig. 58 a-c). Los estomas son generalmente polocíticos; en el híbrido y en *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* generalmente van de mesopolocíticos a basipolocíticos, a diferencia de *A. foreziense* que van de mesopolocíticos a acropolocíticos (Fig. 58 a-c). La longitud de las células estomáticas es intermedia entre los padres (Tabla 6). No se aprecian diferencias en los indusios del híbrido y sus padres (Fig. 57 e-g).

Todo el material de los esporangios está abortado (Fig. 57 a y a'). Para el análisis citológico se estudiaron diez células madres de las esporas en división. Todas ellas mostraron 36^I y 36^{II} en metafase I (Fig. 59 a y a'). Se trata, por tanto, de un híbrido triploide en el que dos genomas son homólogos, lo que permite la formación de bivalentes. Estos bivalentes serían el resultado del apareamiento entre los cromosomas de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y el juego de cromosomas de *A. foreziense* que corresponde a la contribución de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* en este alotetraploide.

Además de esta localidad gerundense, este híbrido ha sido encontrado recientemente por RASBACH *et al.* en el departamento de Var, en Francia (comunicación personal).

De forma accidental en nuestros cultivos hemos obtenido un híbrido triploide proveniente de la fecundación cruzada de un gametófito de *A. foreziense* y de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*. Se trataría, pues, de este taxon. Tiene una morfología intermedia entre sus parentales, y para comprobar su origen hemos comparado sus perfiles electroforéticos con los de sus padres. El análisis citológico de esta planta muestra la existencia de 108 cromosomas en mitosis (Fig. 59 c y c'), y una meiosis en la que hemos constatado la formación de 36^{II} y 36^I en seis células madres de las esporas, y en una han aparecido dos trivalentes ($n = c. 34^I 34^{II} 2^{III}$) (Fig. 59 b y b'). Esta formación de trivalentes puede explicarse por la cierta homología que presenta el genoma de algunos diploides del género *Asplenium*, como ya han observado otros autores (CUBAS & SLEEP, 1994; HERRERO & PRADA, 1997; PANGUA *et al.*, 1990).

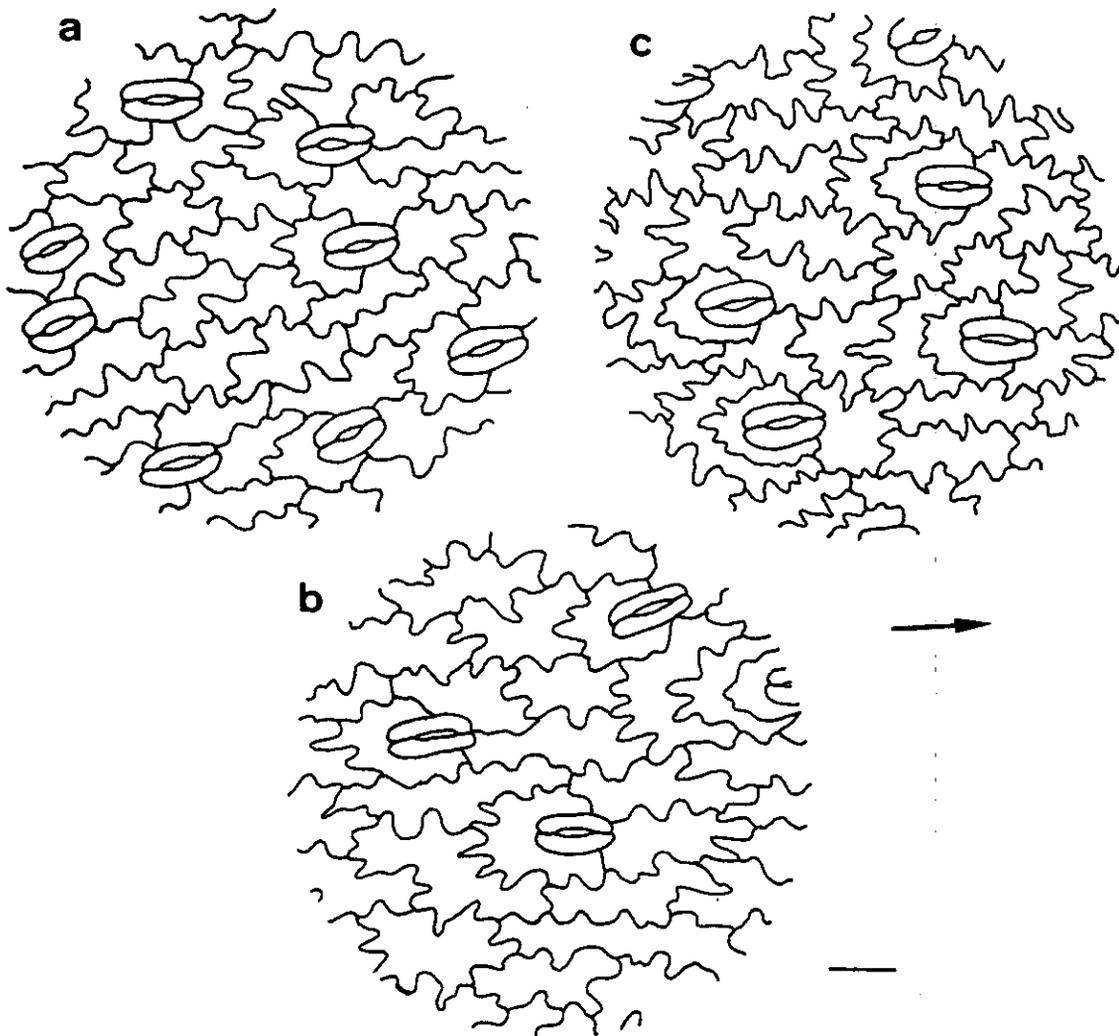


Figura 58. Estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas: a *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; b, *A. x sleepiae* nothosubsp. *krameri*; c, *A. foreziense*. La flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna. Barra: 50 μ m.

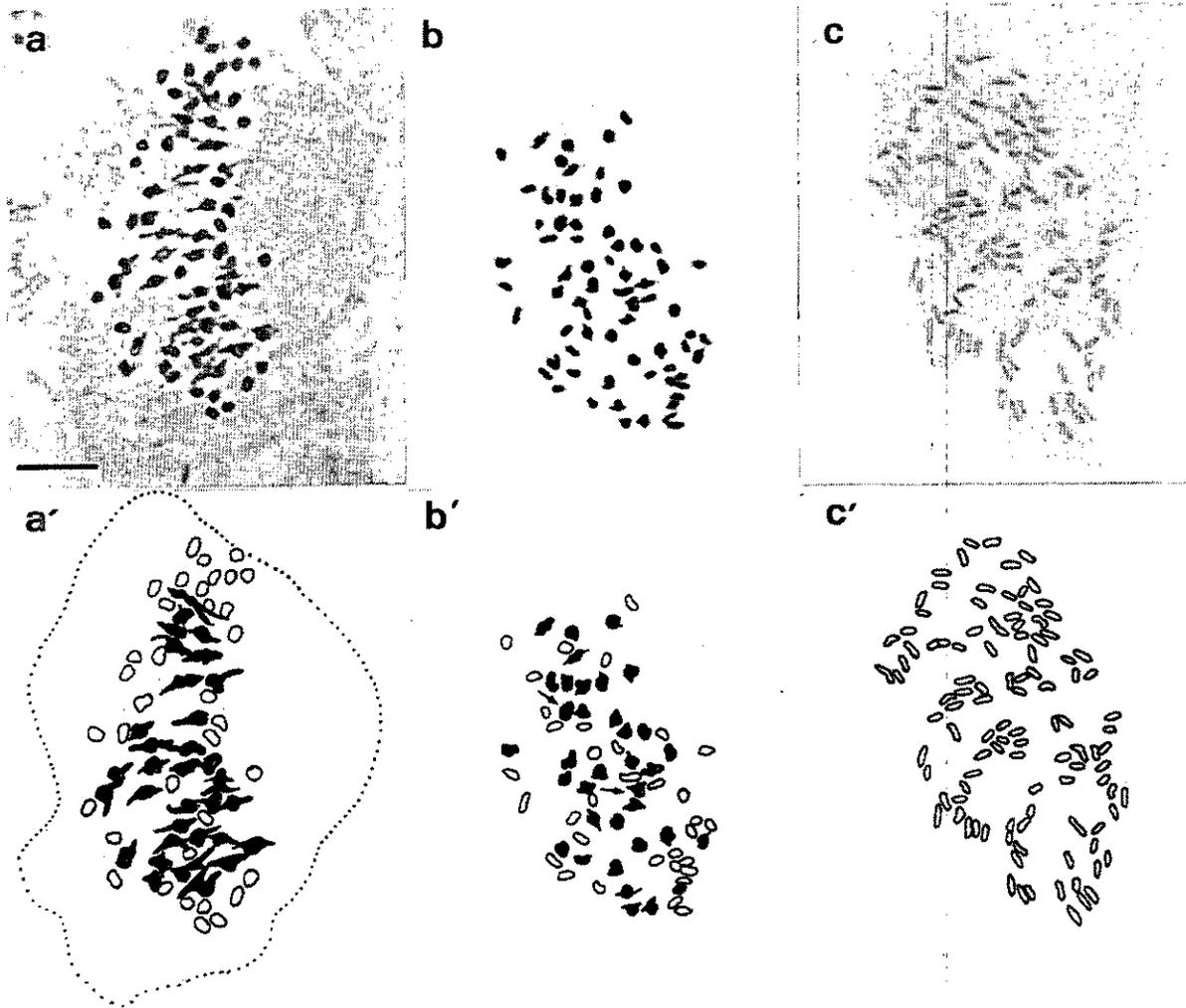


Figura 59. Fotografías y diagramas explicativos de la meiosis de las células madres de las esporas de *A. x sleepiae* nothosubsp. *krameri*: a y a' individuo natural BON 9, $n = c. 36^I$ y 36^{II} ; b y b', híbrido artificial de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y *A. foreziense* (*A. x sleepiae* nothosubsp. *krameri*), $n = c. 34^I$ 34^{II} 2^{III} ; c y c', mitosis de ápices de raíces del híbrido artificial de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y *A. foreziense*, mostrando $2n = 108$. Las flechas indican los trivalentes. Barra 10 μ m.

TAXON	N	NIVEL DE PLOIDÍA	LONGITUD ESTOMAS
<i>A. x protomajoricum</i> notosubsp. <i>protomajoricum</i>	1	diploide	(37)39.2- 40.8 -42.4(44)
<i>A. x recoderi</i> nothosubsp. <i>recoderi</i>	1	diploide	(42)46.4- 49.6 -52.8(57)
<i>A. obovatum</i> nothosubsp. <i>cyrnosardoum</i> nothovar. <i>cyrnosardoum</i>	2	triploide	(45)48.1- 51.9 -55.7(60)
<i>A. obovatum</i> nothosubsp. <i>cyrnosardoum</i> nothovar. <i>ibericum</i>	2	triploide	(46)47.9- 50.2 -52.5(55)
<i>A. x sleepiae</i> nothosubsp. <i>sleepiae</i>	8	tetraploide	(49)53.8- 58 -62.3(70)
<i>A. x sleepiae</i> nothosubsp. <i>krameri</i>	2	triploide	(48)52.9- 55.8 -59.2(63)

Tabla 6. Nivel de ploidía, y la media (en negrita) \pm la desviación estándar y los valores mínimo y máximo (entre paréntesis) de la longitud de los estomas de los diferentes táxones híbridos (en micras). N: número de individuos.

4.1.1.16. Híbrido artificial de *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst.

Con el fin de comprobar la semejanza genómica y las relaciones de parentesco de las variedades *obovatum* y *protobillotii* del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* con el tetraploide *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* hemos sintetizado en el laboratorio el híbrido de estas dos variedades (individuos VAR 7 y MIE 27).

En total hemos obtenido tres plantas híbridas, de las cuales hemos analizado en profundidad una de ellas. Morfológicamente, esta planta presenta caracteres intermedios entre sus parentales en los dientes y mucrones de las pinnas (Figs. 60 y 61 a-c). No presenta diferencias en los indusios (Fig. 61 e) ni en las células epidérmicas de la cara abaxial (Fig. 62 b) con sus padres.

El contenido esporangial en algunos casos es normal (Fig. 63 a) y en otros casos se presenta abortado (Fig. 63 b). En las observaciones realizadas hemos comprobado que esto ocurre en todo el esporangio, es decir, que cuando las esporas están abortadas lo están las 64 de un esporangio y cuando son normales lo son todas las de un esporangio. Son más frecuentes los esporangios con las esporas normales que aquellos que las presentan abortadas.

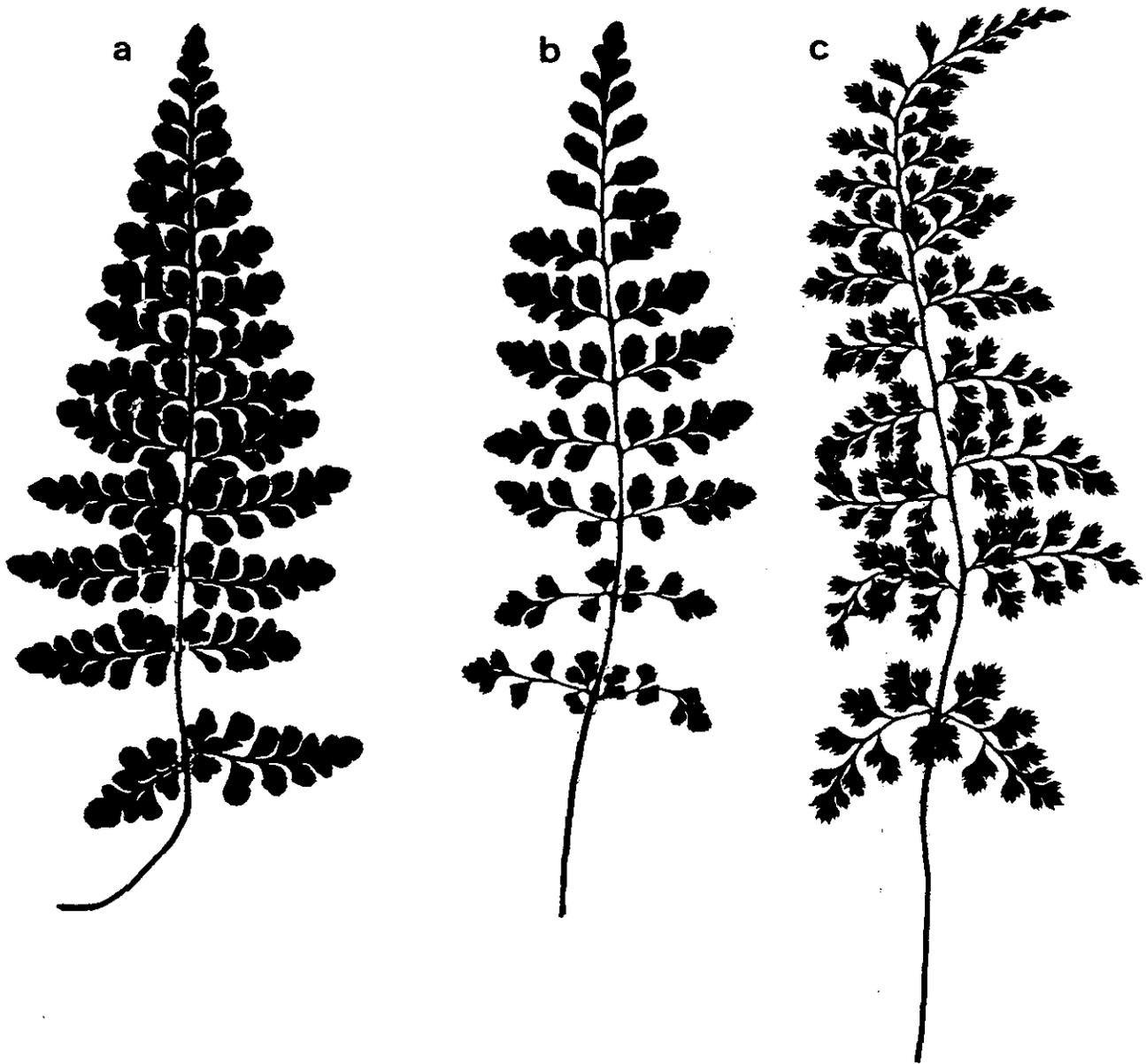


Figura 60. Siluetas de las frondes: a, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* individuo VAR 7; b, híbrido artificial; c, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* individuo MIE 27. Tamaño natural.

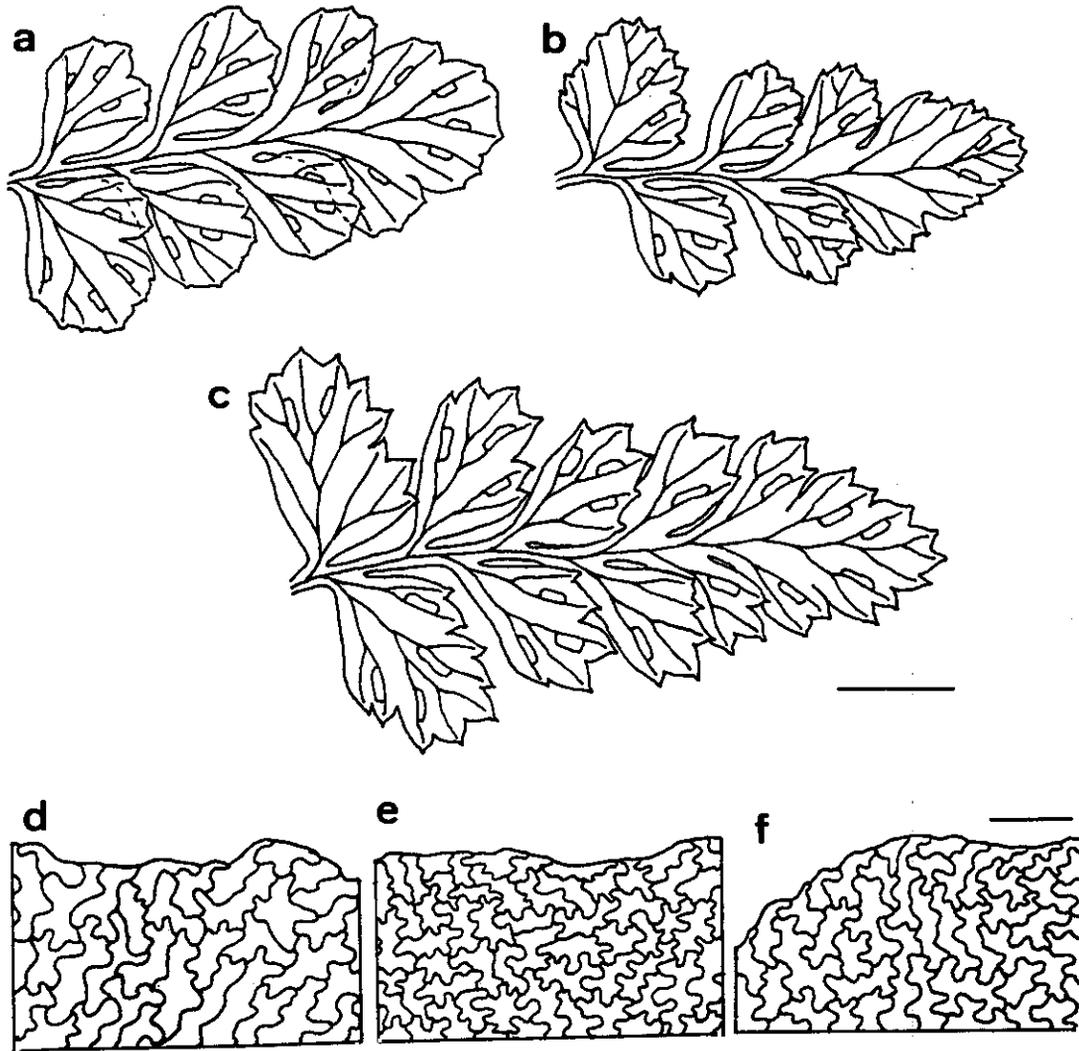


Figura 61. Pinnas medias de las frondes (a-c) y modelos de las células de los indusios (d-f) de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (a y d), híbrido artificial (b y e) y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (c y f). Barra a-c: 0.5 cm, d-f: 0.1 mm.

La meiosis de los híbridos diploides sintetizados muestra un elevado porcentaje de células madres de las esporas con apareamiento regular de 36^{II} (Fig. 64), lo que conduce a la formación de esporas normales. STEINECKE & BENNERT (1993) mencionan que en este híbrido aparecen esporas normalmente constituidas. Además, como ya hemos señalado, hemos observado que entre ellas aparecen algunas mal formadas (Fig. 63 b), debido a que en algunas células madres de las esporas se dan meiosis irregulares con formación de 35^{II} y 2^I . En la anafase I de las células madres de las esporas que presentan meiosis irregulares aparecen en el huso univalentes retardados que no se reconocen (Fig. 65 a); en cambio, en la telofase I de las células madres de las esporas con meiosis regular no aparecen estos univalentes (Fig. 65 b). El porcentaje de meiosis regulares e irregulares en un mismo individuo

híbrido va a depender del grado de semejanza genómica que tengan los parentales; como ya hemos dicho, son más frecuentes las meiosis regulares que las irregulares, lo que significaría que la semejanza genómica de las variedades *obovatum* y *protobillotii* de *A. obovatum* subsp. *obovatum* es elevada.

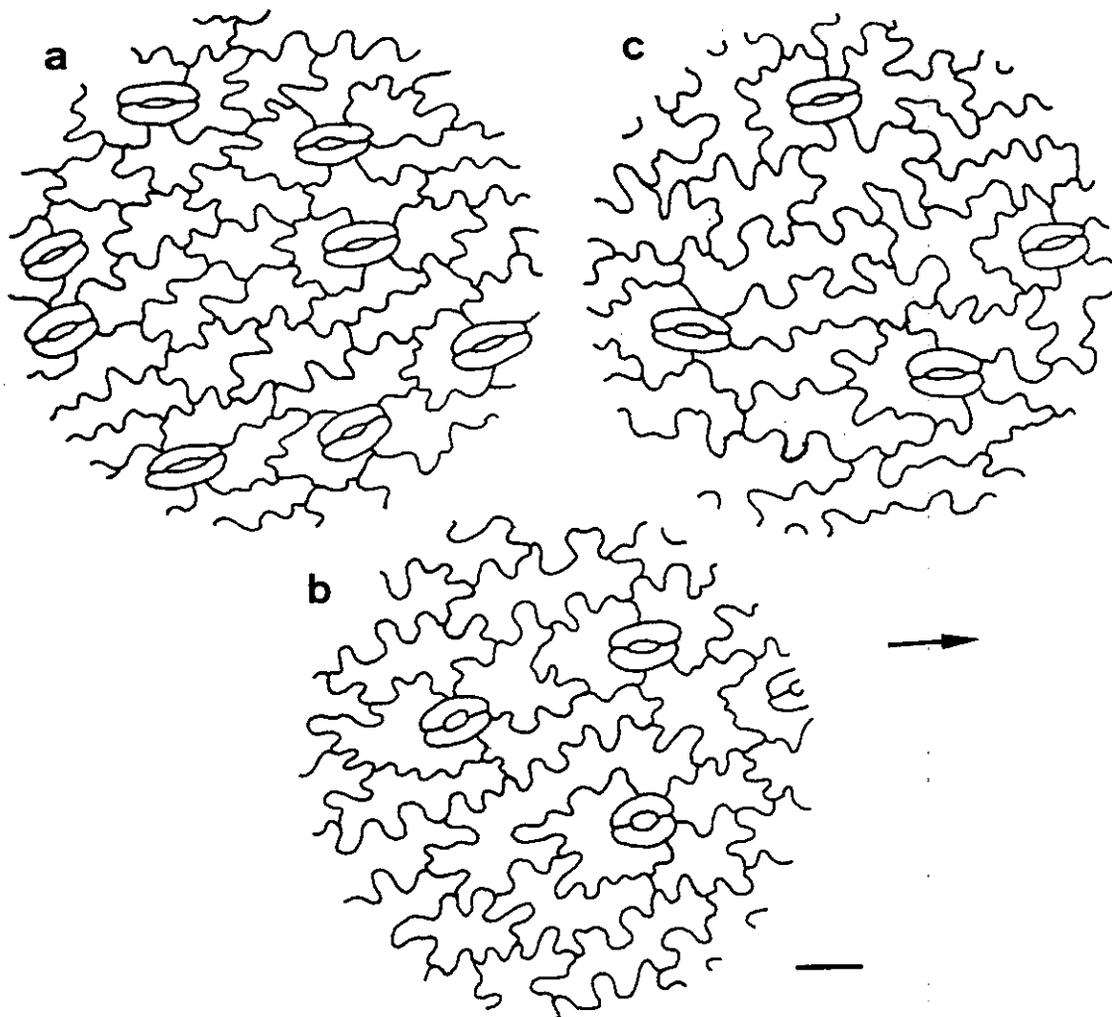


Figura 62. Estomas y células de la epidermis abaxial de las pinnas: a, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; b, híbrido artificial; c, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*. La flecha indica la dirección de las venas hacia el margen de la pinna. Barra: 50 μm .

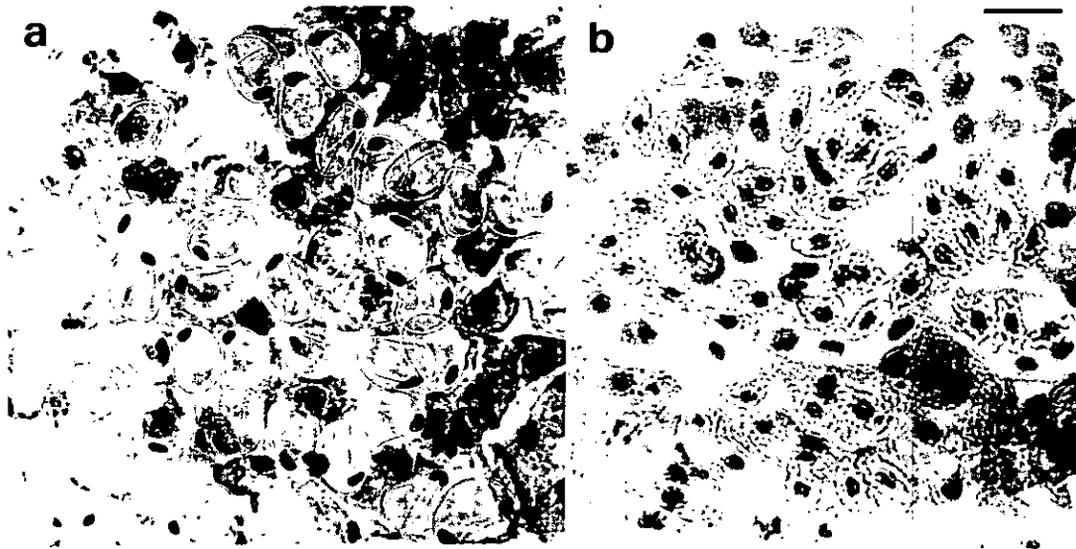


Figura 63. Esporas inmaduras del híbrido artificial de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* x var. *protobillotii*: a, esporas normales; b, esporas abortadas. Barra: 30 μ m.

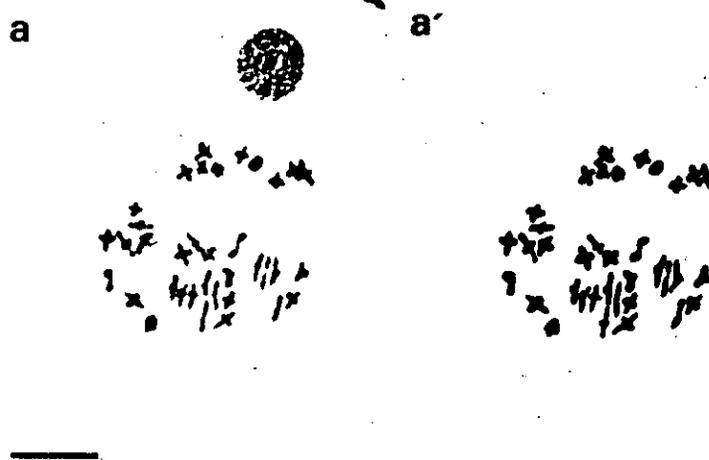


Figura 64. Fotografía y diagrama explicativo de la meiosis de las células madres de las esporas del híbrido diploide artificial de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*, mostrando $n = 36^{II}$. Barra 10 μ m.

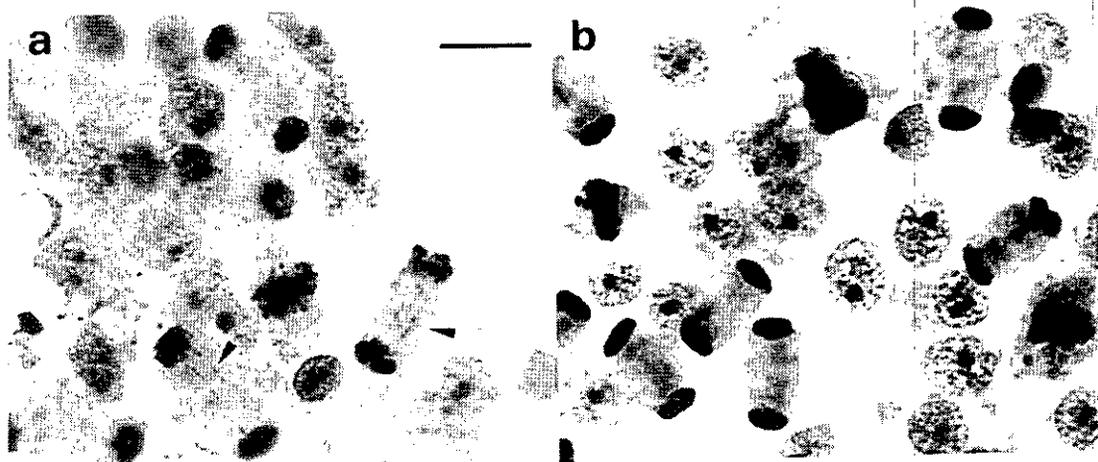


Figura 65. Meiosis de las células madres de las esporas del híbrido artificial de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*: a, anafase I de meiosis irregulares; b, telofase I de meiosis regulares. Las flechas indican los univalentes retardados. Barra: 30 μ m.

En las mismas condiciones de cultivo que el resto de las plantas no híbridas que hemos mantenido en cultivo, estos híbridos han crecido con más dificultades. Han formado frondes normalmente, pero a medida que iban creciendo y madurando se iban secando por los bordes hasta secarse toda ella.

Para comprobar la viabilidad de las esporas producidas por el único esporófito híbrido que maduró, realizamos una siembra en medio nutritivo solidificado con agar. El porcentaje de germinación fue relativamente elevado (cerca del 64%), pero los gametófitos que se formaron a partir de estas esporas tuvieron problemas de desarrollo. Estas esporas empezaron a germinar como el resto de los táxones no híbridos (entre 5 y 9 días después de la siembra), pero después de la apertura de la célula esporal, el crecimiento se detuvo y el desarrollo del protalo sufrió un retraso de unos 3 meses con respecto al resto de los táxones. Aproximadamente a los 4 meses y medio después de la siembra se empezaron a formar los gametangios de forma normal.

VIANE *et al.* (1996) comentan que en las poblaciones griegas que han estudiado conviven individuos de las tres variedades de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, que son interfértiles y que aparecen formas intermedias entre ellas. A la vista de nuestros resultados parece que, aunque debido a su similitud genómica sea frecuente que las variedades *obovatum* y *protobillotii* hibriden y originen esporófitos diploides parcialmente fértiles allí donde conviven,

tanto estos esporófitos como los gametófitos derivados de ellos, parecen tener un desarrollo precario y probablemente en la naturaleza no prosperen bien.

4.1.2. Discusión global

Los resultados obtenidos del estudio morfológico del esporófito nos indican que existe una gran variabilidad en todo el grupo; se trata de táxones con gran plasticidad fenotípica, lo que hace que sean difíciles de reconocer en algunos casos. Sin embargo, hay algunos caracteres que varían menos y en los más variables se aprecian unas tendencias morfológicas que nos permiten delimitar cada taxon.

Los caracteres macromorfológicos de la fronde son quizá los más variables y, a pesar de ello, los que más se han utilizado para la separación de los táxones. En los individuos típicos estos caracteres son muy útiles y en la mayoría de los casos suficientes para su identificación.

Por el contrario, para los individuos desviantes es necesario tener en cuenta caracteres micromorfológicos. En los poliploides, debido a su naturaleza, aumenta el tamaño de algunas de las células de ambas generaciones con respecto a las de sus parentales, pero también pueden ser intermedias entre ellos. En concreto esto ocurre con la longitud del exosporio y la de las células estomáticas (BARRINGTON *et al.* 1986). Ambos datos resultan, en conjunto, prácticamente definitivos para discriminar los táxones diploides de los tetraploides (Figs. 36 y 37, Tabla 5). En los dos grupos de táxones diploides (*A. fontanum* y *A. obovatum*) hay diferencias en estos caracteres (Figs. 36 y 37, Tabla 5), pero estas diferencias no tienen un reflejo tan claro en sus poliploides derivados (Figs. 36 y 37, Tabla 5). En general, la longitud del exosporio es menos variable que la longitud de los estomas (Tabla 5). Otros caracteres que también pueden estar relacionados con el nivel de ploidía, como las páleas del rizoma y el indumento de las pinnas, son más variables, aunque hay una tendencia a que sean de menor tamaño en los diploides que en los tetraploides, especialmente marcada en el caso de *A. fontanum* (Figs. 4 a y f, y 8 a y f).

Otros microcaracteres observados que pueden ser útiles para diferenciar individuos conflictivos de los táxones tetraploides (*A. foreziense* y *A. macedonicum* de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum*), son las células de la epidermis abaxial de las pinnas y la inserción de la-s célula-s aneja-s y los estomas.

Con los datos morfológicos estudiados podemos apuntar varias consideraciones taxonómicas.

Las poblaciones europeas y norteafricanas, por un lado, y las del Himalaya, por otro, de *A. fontanum* han sido tratadas por los autores que las han estudiado recientemente como dos subespecies distintas (REICHSTEIN & SCHNELLER, 1982), en base a que, a pesar de su similitud genética (GIBBY, 1982), poseen ciertas diferencias morfológicas. Las diferencias macromorfológicas son muy vagas, y dentro del rango de variación de unas u otras poblaciones aparecen individuos intermedios. En cuanto a los microcaracteres, no existen diferencias significativas en ninguno de ellos (Figs. 4 y 8, Tabla 5), excepto en la ornamentación del perisporio (Figs. 5 y 9). Sin embargo, en el rango de variación de *A. fontanum* subsp. *fontanum* (mucho más variable en este carácter y en el resto de los que hemos estudiado) aparecen esporas con ornamentación similar a la de *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*. Parece, y los datos morfológicos pueden apoyarlo, que se trata de poblaciones disyuntas originadas, bien por fragmentación del área original, bien por dispersión a larga distancia una de la otra, de un único taxon y que debido a la falta de flujo genético, se encuentran en un proceso de estabilización de ciertos caracteres que podrían resultar diferenciadores en el futuro.

No hemos observado ninguna diferencia significativa entre *A. foreziense* y *A. macedonicum* en los datos morfológicos del esporófito, por lo que nuestros resultados apoyan el tratamiento taxonómico de VIANE *et al.* (1993).

La única diferencia de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum* con la variedad tipo es la forma deltoidea de la fronde (DEMIRIZ *et al.*, 1990). Nosotros no hemos observado ninguna otra diferencia. Ésto, unido a que en el resto de los táxones del grupo *A. obovatum*, e incluso en *A. foreziense*, aparecen frondes deltoideas junto a frondes lanceoladas en un mismo individuo, no justifica el reconocimiento de un taxon diferente.

Las variedades *obovatum* y *protobillotii* de *A. obovatum* subsp. *obovatum* tienen su diferencia más clara en los dientes y mucrones de las pinnas. Parece ser un carácter que se mantiene constante, aunque hemos estudiado algunos individuos de la variedad tipo con los dientes más pronunciados que recuerdan a la variedad *protobillotii*. En general es un buen carácter que sirve para diferenciar ambos táxones que, por otra parte, muestran una diferenciación genómica que ya hemos indicado al comentar su híbrido artificial.

Algo similar a lo dicho de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum* le ocurre a *A. obovatum* subsp. *numidicum*, que no es más que una forma de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* con la fronde más estrecha.

De los resultados citológicos en el grupo *A. obovatum*, y de los obtenidos por otros autores que han estudiado anteriormente este grupo, se desprende que las variedades *obovatum* y *protobillotii* tienen genomas casi homólogos. En los híbridos triploides naturales del tetraploide *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* con estas dos variedades diploides no se forman multivalentes o se forman en muy pequeño número (RASBACH *et al.*, 1980, 1990, 1991, y datos propios), típico de los híbridos triploides de los alotetraploides con sus padres. En cambio, en los híbridos, tanto naturales como artificiales, de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* con otros táxones diploides y tetraploides no relacionados con el grupo *A. obovatum*, el apareamiento de los cromosomas apunta a un comportamiento de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* más como un autotetraploide que como un alotetraploide (BOUHARMONT, 1977a, 1977b; CALLÉ *et al.*, 1975; CUBAS & SLEEP, 1994; GIRARD & LOVIS, 1968; LOVIS & VIDA, 1969; SLEEP, 1983. Parece que hay algún mecanismo que dificulta la formación de multivalentes en los híbridos triploides entre los táxones del grupo *A. obovatum*.

El análisis de los datos corológicos sugiere que los diploides *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y *A. fontanum* subsp. *fontanum* debieron tener una distribución mucho más amplia en el pasado que la que presentan actualmente.

Las poblaciones del tetraploide *A. foreziense* coinciden en algunos casos con las de uno de sus parentales (*A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*) y, en general, no están muy alejadas de ellos, lo que podría significar que ha tenido un origen relativamente reciente.

En cambio, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, aunque coincide en algunas zonas con su parental, tiene centrada su distribución en el Mediterráneo occidental, zona Atlántica europea y Macaronesia, alejada de la actual de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, que se localiza principalmente en el Mediterráneo central y oriental. Parece que *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* tiene un origen más antiguo y que se ha extendido en aquellas zonas en las que *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* ha estado y está en regresión.

4.2. GENERACIÓN GAMETOFÍTICA

4.2.1. Desarrollo y morfología del protalo

Existían ya algunos datos morfológicos de la generación gametofítica de *A. fontanum* subsp. *fontanum* (HENRIET & MOENS, 1976; HENRIET *et al.*, 1976; MOMOSE, 1960c; PRADA *et al.*, 1996), *A. foreziense* (HENRIET & MOENS, 1976; HENRIET *et al.*, 1976), *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (HENRIET, 1970; HENRIET & MOENS, 1976; HENRIET *et al.*, 1976) y *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (HENRIET & MOENS, 1976; HENRIET *et al.*, 1976).

En las muestras que hemos estudiado, las esporas comenzaron a germinar entre 5 y 17 días después de la siembra, dependiendo fundamentalmente del tiempo transcurrido desde la recolección del esporófito (Tabla 7). Las esporas de los esporófitos recolectados más recientemente tardaron menos días en germinar y los porcentajes fueron más altos (> 90%) que en las muestras más antiguas (Tabla 7). El modelo de germinación de la espora es del tipo *Vittaria* (NAYAR & KAUR, 1968). La célula esporal emerge por la zona de la lesura, y contiene plastos que le dan un color verde brillante. La primera división es a través de un tabique paralelo al eje ecuatorial de la espora y así se forma una pequeña célula hemisférica. Generalmente, de la célula basal surge el primer rizoides. Los rizoides inicialmente contienen plastos que degeneran a medida que el rizoides se va alargando. Las sucesivas divisiones de esta célula dan lugar a la fase filamentosa, formada por un número variable de células (Tabla 7).

El modelo general de desarrollo en todos los casos es muy similar, y básicamente corresponde a los dos tipos que se indican a continuación. No se han observado diferencias significativas entre las muestras estudiadas de un mismo taxon, salvo en el caso de *A. foreziense*, que dependiendo del individuo puede seguir un tipo de desarrollo u otro, como más tarde se comentará. El paso a la fase bidimensional se produjo entre 15 y 20 días después de la germinación, siguiendo un desarrollo de tipo *Adiantum* (NAYAR & KAUR, 1969, 1971) en las dos variedades de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, en *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, en *A. obovatum* subsp. *numidicum*, en *A. macedonicum* y en la muestra CAB 9 de *A. foreziense*. Este modelo de desarrollo se caracteriza por la formación de un tabique oblicuo en la célula terminal del filamento seguida de la diferenciación de una célula cuneiforme que por sucesivas tabicaciones origina un grupo de células meristemáticas que dan lugar a una lámina más o menos simétrica al principio de su desarrollo y cordiforme y desnuda en las fases más avanzadas del mismo (Figs. 66 a-g y 67 a-e).

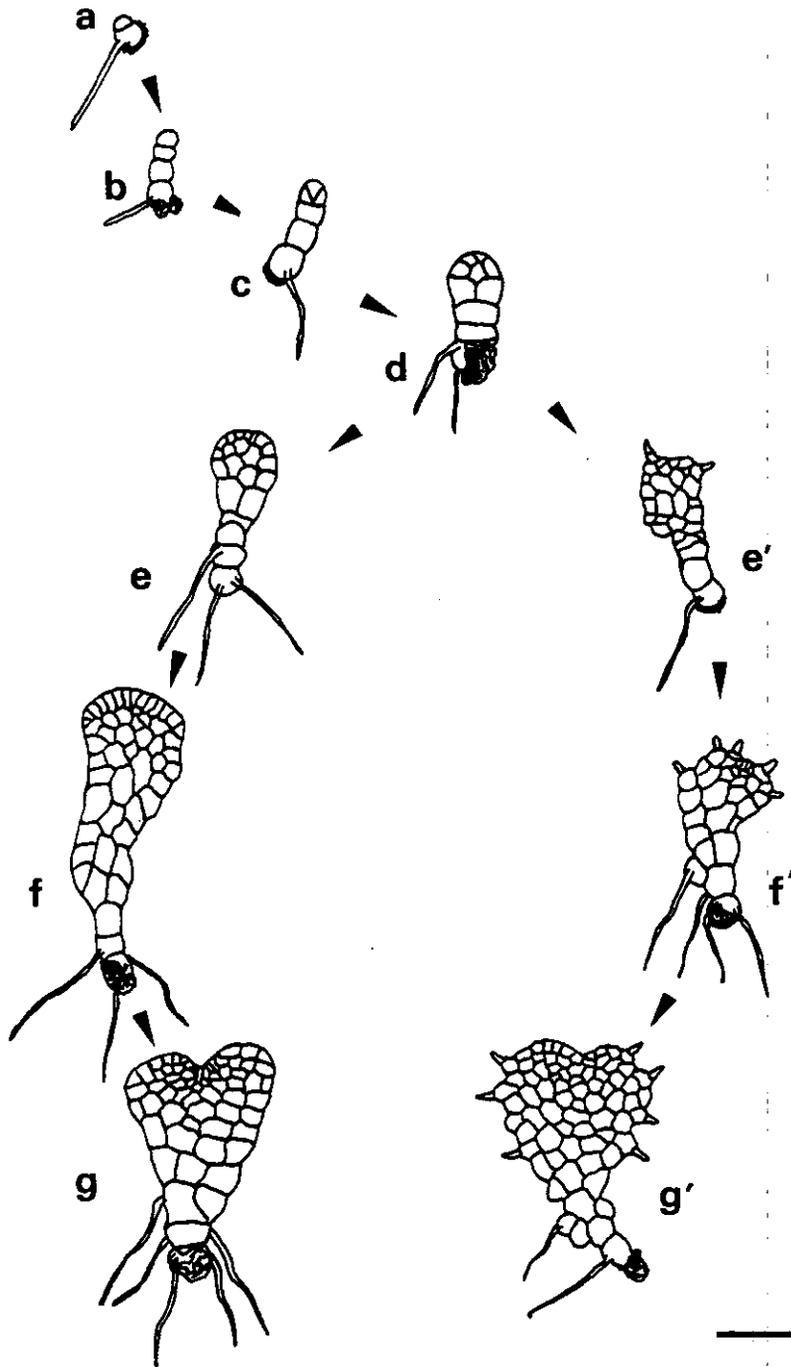


Figura 66. Primeras fases del desarrollo de los gametófitos: a-g, desarrollo de tipo *Adiantum*; a-g', desarrollo de tipo *Aspidium*. Barra: 0,1 mm.

Táxones	Porcentaje de germinación	Nº de células del filamento
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>		
BAI 14 (5)	90% (64)	1-3(4)
BET 19 (7)	90% (45)	(1)2-3(4)
BUJ 1 (7)	98% (37)	1-4
GOR 1 (7)	94% (64)	1-4(5)
CE318 (3)	88% (46)	1-4(5)
AH1F (23)	76% (46)	1-5(6)
AH3F (18)	80% (39)	1-4(5)
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>		
TR7400 (40)	16% (86)	1-4
TR7402 (40)	59% (86)	(1)2-4(6)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>obovatum</i>		
BEA 20 (2)	100% (17)	1-2(3)
BON 20 (2)	100% (17)	1-2(3)
VAR 7 (8)	100% (17)	1-3
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>deltoideum</i>		
Ras-1022 (28)	81% (52)	1-2(3)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>protobillotii</i>		
MIE 27 (7)	100% (24)	1-2(3)
MIE 41 (7)	100% (29)	1-3(4)
Ras-610 (83)	56% (86)	1-2(3)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>lanceolatum</i>		
AH84F (9)	94% (64)	1-2(3)
ITA 12 (17)	100% (15)	1-3(4)
NAV 8 (11)	100% (15)	1-2(4)
TUY 6 (9)	96% (23)	1-3(4)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>numidicum</i>		
MGC 28503 (40)	84% (55)	1-(4)
<i>A. foreziense</i>		
AH115F (9)	100% (52)	(1)2-5(6)
BUF 10a (13)	100% (15)	2-3(5)
CAB 9 (2)	100% (12)	(1)2-3
FRA 2 (18)	96% (64)	(1)2-4(5)
<i>A. macedonicum</i>		
J1 (78)	74% (46)	1-3(4)
J2 (174)	30% (46)	1-3

Tabla 7. Porcentaje de germinación (entre paréntesis el día después de la siembra en que alcanzaron este porcentaje) y número de células que forman el

filamento de las distintas muestras. Después de cada muestra y entre paréntesis, el tiempo aproximado desde que se prensaron las frondes hasta que empezaron a germinar las esporas, en número de meses.

Los protalos maduros de los táxones que los presentan desnudos son muy similares en su morfología; la única diferencia observada es la longitud del filamento basal, es decir, el número de células de la fase filamentosa que no han sufrido divisiones longitudinales durante el período de crecimiento del protalo; en *A. macedonicum* y la muestra sin pelos de *A. foreziense* (CAB 9) hay una tendencia a que el filamento esté formado por un número mayor de células que en el complejo *A. obovatum* (Tabla 7).

En las dos subespecies de *A. fontanum* y en la mayoría de las muestras de *A. foreziense* el desarrollo del protalo sigue el modelo tipo *Aspidium* (NAYAR & KAUR, 1969, 1971), caracterizado por la formación más o menos temprana (más en *A. fontanum* que en *A. foreziense*) de un pelo en el joven gametófito (Fig. 64 e'-g'). Los protalos que siguen este tipo de desarrollo producen nuevos pelos a medida que continúan el crecimiento, de modo que en la madurez son pelosos, con una mayor densidad de pelos en el caso de *A. fontanum* que en *A. foreziense* (Figs. 66 a-e, 68b y 69b, Tabla 8). Los pelos se localizan en los márgenes y en la superficie del protalo; en su mayor parte se trata de pelos unicelulares cilíndricos, de tipo papiloso (STOKEY, 1951), más o menos alargados y a veces ligeramente ensanchados en la base. Con cierta frecuencia *A. fontanum* subsp. *fontanum* presenta además pelos bicelulares y en algunos casos tricelulares (la muestra BAI 14), al igual que las muestras pelosas de *A. foreziense* (Fig. 66 b y e); sin embargo, este tipo de pelos no los hemos observado en *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*. Este tipo de pelos aparece en otras Aspleniáceas, como en el citótipo tetraploide de *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newman (ATKINSON & STOKEY, 1964), en *Asplenium onopteris* L. (PRADA *et al.*, 1995) y en *Asplenium adiantum-nigrum* L. (MOMOSE, 1960a). En el ápice de los pelos se ha observado de forma constante un exudado que parece tener naturaleza lipídica (Fig. 66 f), como ocurre normalmente en protalos de otros táxones con pelos similares (ATKINSON, 1973; NAYAR & KAUR, 1971; STOKEY, 1951).

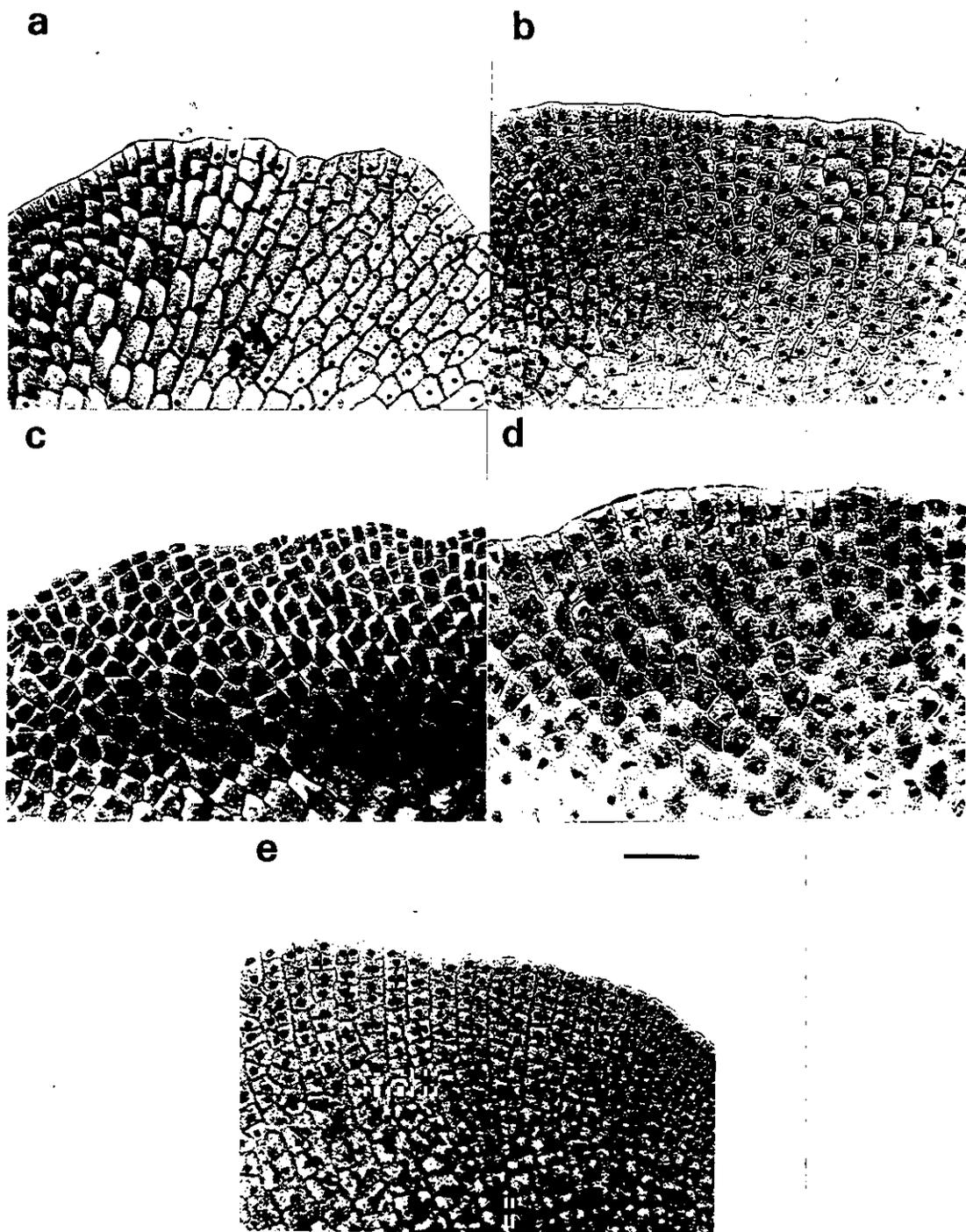


Figura 67. Detalle de los márgenes de los protalos maduros: a, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; b, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*; c, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; d, *A. obovatum* subsp. *numidicum*; e, *A. macedonicum*. Barra: 50 μ m.

En los táxones que presentan protalos pelosos, las alas en su parte lateral y basal presentan generalmente un contorno muy irregular con profusión de entrantes y salientes (Fig. 69 a). Muchos de ellos corresponden a filas de células que van decreciendo en tamaño de la base al ápice y que HENRIET & MOENS (1976) interpretan como pelos multicelulares, pero que no son más que proliferaciones celulares que normalmente terminan en un pelo unicelular o bicelular (Fig. 69 b). Entre ellos, la diferencia más evidente estriba en la densidad de los pelos marginales, que es menor en *A. foreziense* que en ambas subespecies de *A. fontanum* (Figs. 68 a-e, 70 b y 71 b, Tabla 8), como ya señalaron HENRIET & MOENS (1976), así como en la mayor frecuencia de pelos bicelulares en *A. foreziense* (Tabla 9). La longitud de los pelos marginales también presenta diferencias entre los táxones; aunque es un carácter más variable dentro de cada taxon, hay una tendencia a que sean de menor tamaño en ambas subespecies de *A. fontanum* que en *A. foreziense* (Figs. 70 a y 71 a, Tabla 8). HENRIET & MOENS (1976) señalan lo contrario, pero al ser este carácter tan variable, las diferencias encontradas entran en el rango de variación de cada taxon.

En la madurez, algunos de los pelos se vacían de contenido, se fragmentan por la base y se caen, dejando una cicatriz en la célula que los soportaba (Fig. 70); algo similar ocurre en *Asplenium trichomanes* L. subsp. *trichomanes* (HERRERO *et al.*, 1993), pero en menor medida, sin que el protalo devenga desnudo.

Los protalos maduros de todos los táxones presentan cierto dimorfismo sexual. Los protalos que permanecen masculinos en la madurez, generalmente no presentan una escotadura diferenciada con lo cual el aspecto del protalo es más o menos espatulado, mucho más largo que ancho, más irregular y de menor tamaño que los protalos femeninos y bisexuales (Fig. 73 a). Los protalos que en la madurez son femeninos o bisexuales presentan una escotadura bien diferenciada y son cordiformes; su aspecto es similar en ambos casos aunque hay una tendencia a que los femeninos sean de mayor tamaño que los bisexuales (Fig. 73 b y c). Esta diferencia de tamaño y morfología entre los protalos masculinos y los femeninos y bisexuales ha sido observada en otros representantes del género *Asplenium* (PRADA *et al.*, 1995) y en otros géneros de pteridófitos (BANKS *et al.*, 1993; HAUFLER & RANKER, 1985; HOLBROOK-WALKER & LLOYD, 1973; KIRKPATRICK *et al.*, 1990; SCHEDLBAUER, 1976; SCHNELLER, 1979). Además, en los protalos en los que aparecen pelos bicelulares, éstos aparecen en más protalos y en mayor número en los protalos femeninos y bisexuales que en los masculinos (Tablas 9 y 10).

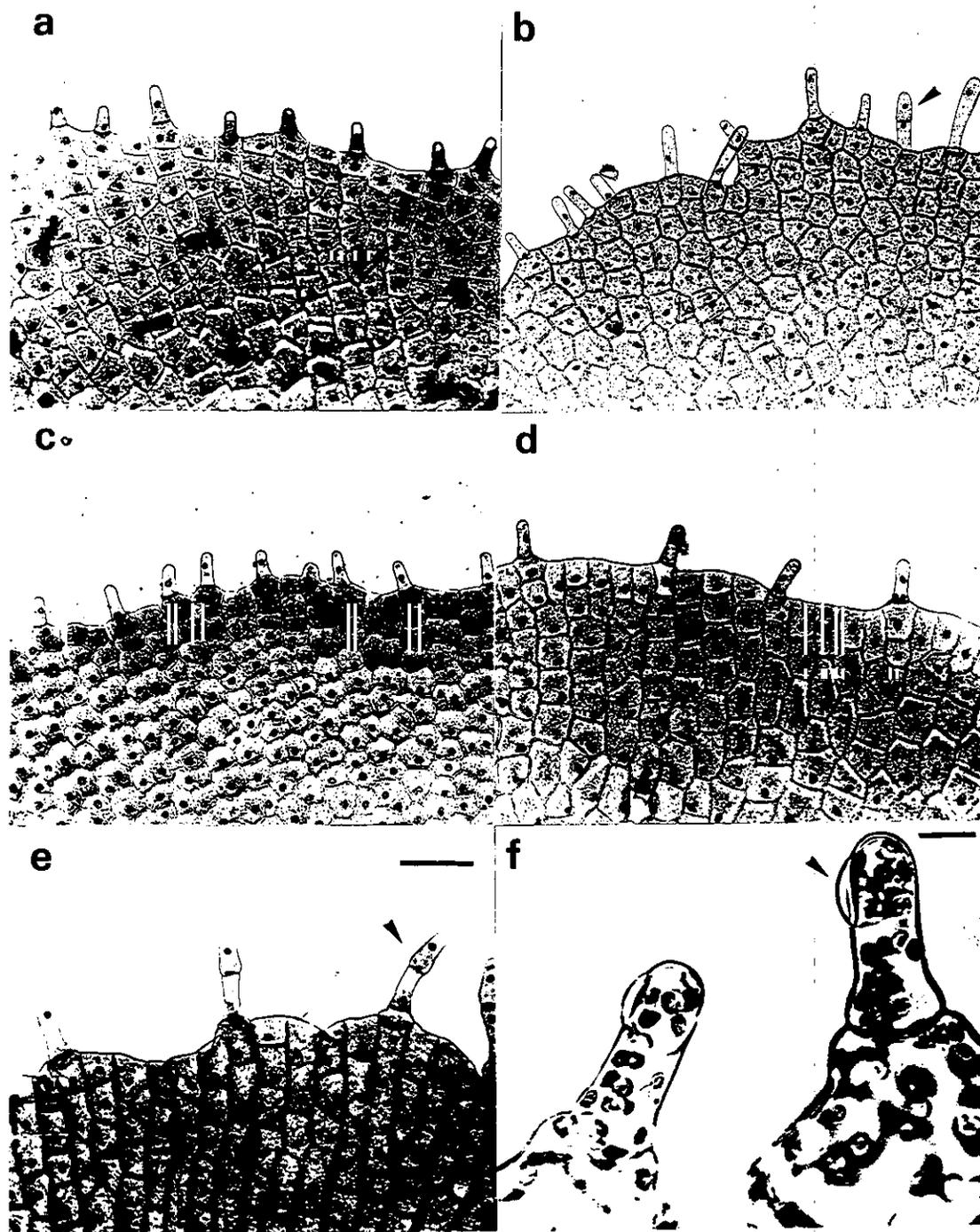


Figura 68. Detalle de los márgenes de los protalos maduros: a y b, *A. fontanum* subsp. *fontanum*; c, *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*; d y e, *A. foreziense*; f, exudado de los pelos marginales. Barra: a-e, 50 μ m; f, 10 μ m.

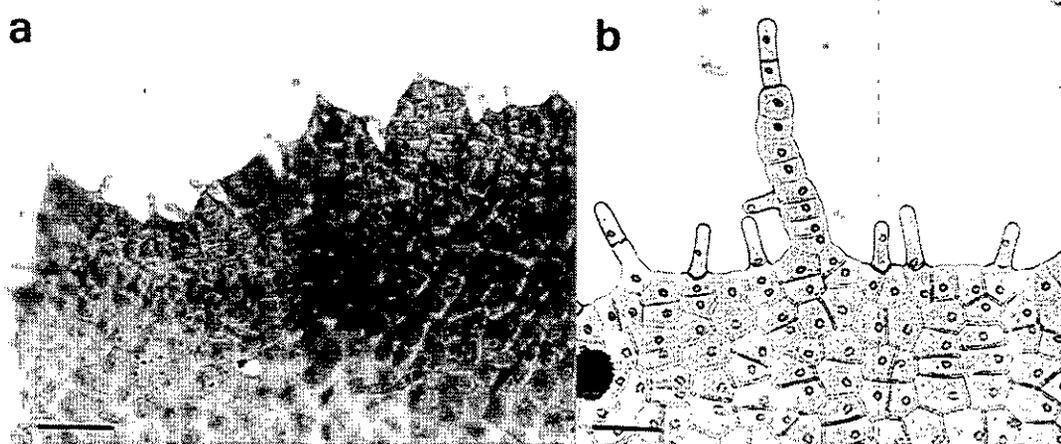


Figura 69. a, detalle del margen irregular de *A. fontanum* subsp. *fontanum*; b, proliferaciones celulares del margen del protalo de *A. fontanum* subsp. *fontanum*. Barra: a, 100 μ m; b, 50 μ m.

Táxones	Longitud de los pelos marginales	Densidad de los pelos marginales
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>	39.39 \pm 5.63	10.42 \pm 2.31
BAI 14	35.33 \pm 4.58	12.14 \pm 2.04
BET 19	36.9 \pm 4.18	10.87 \pm 1.56
BUJ 1	46.26 \pm 5.57	10.54 \pm 1.48
GOR 1	35.06 \pm 3.65	10.48 \pm 1.22
CE318	39.8 \pm 4.31	6.93 \pm 1.62
AH1F	41.56 \pm 4.17	11.91 \pm 1.93
AH3F	40.83 \pm 3.22	10.04 \pm 1.84
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>	37.86 \pm 3.51	9.12 \pm 1.47
TR 7400	37.33 \pm 2.59	9.02 \pm 1.74
TR 7402	38.4 \pm 4.21	9.23 \pm 1.15
<i>A. foreziense</i>	52.87 \pm 13.49	3.49 \pm 1.4
BUF 10a	47.96 \pm 5.42	4.48 \pm 0.6
AH115F	69.93 \pm 6.37	1.74 \pm 0.55
FRA 2	40.73 \pm 3.21	4.26 \pm 0.75

Tabla 8. Media y desviación estándar de la longitud y de la densidad de los pelos marginales de cada muestra y de cada taxon (en negrita).

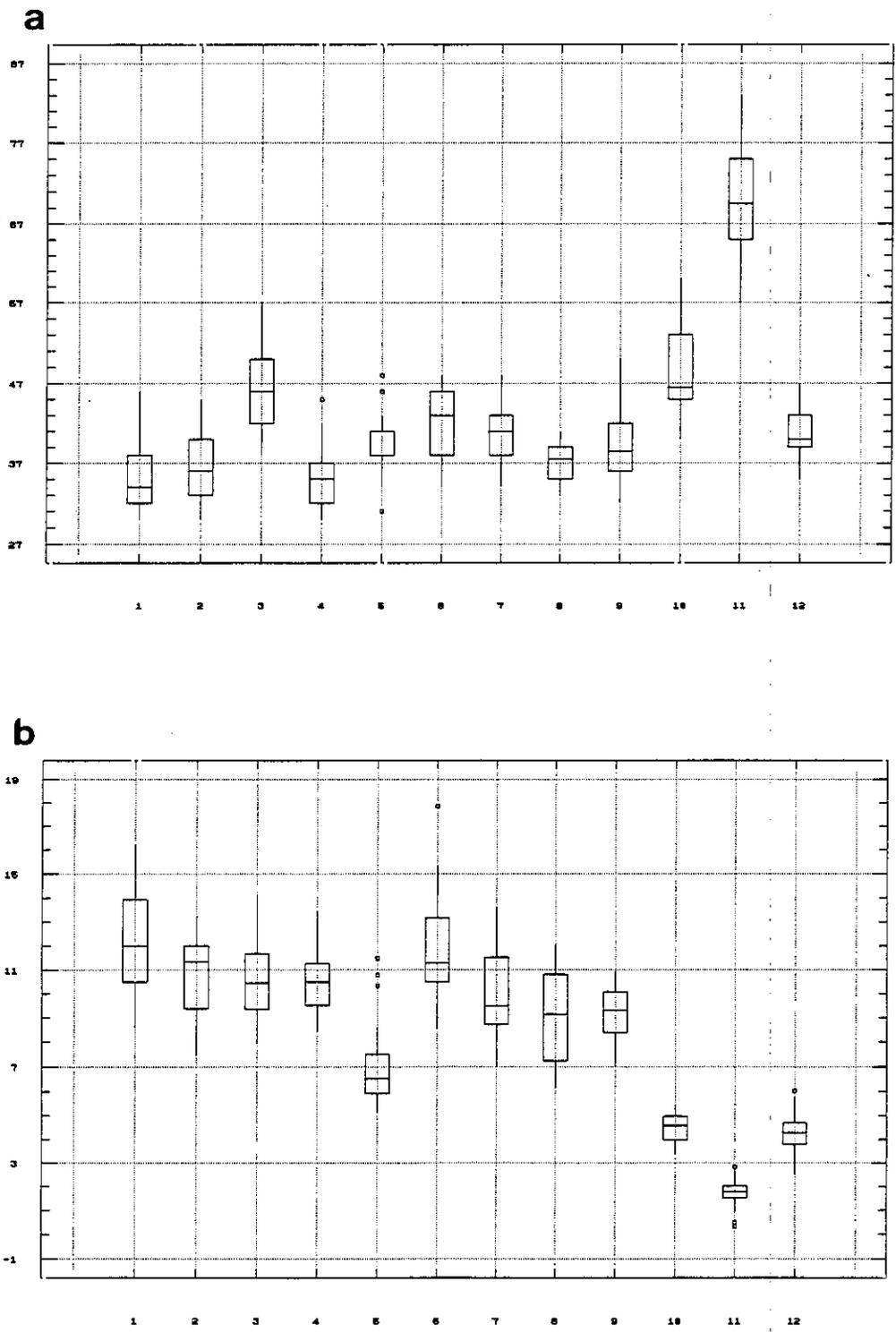


Figura 70. Representación en un diagrama “box and whisker” múltiple de la longitud de los pelos marginales (a) y de la densidad (b) de cada muestra: 1, *A. fontanum* subsp. *fontanum* BAI 14; 2, BET 19; 3, BUJ 1; 4, GOR 1; 5, CE318; 6, AH1F; 7, AH3F; 8, *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum* TR 7400; 9, TR 7402; 10, *A. foreziense* BUF 10a; 11, AH115F; 12, FRA 2. La longitud en µm y la densidad en nº de pelos/mm.

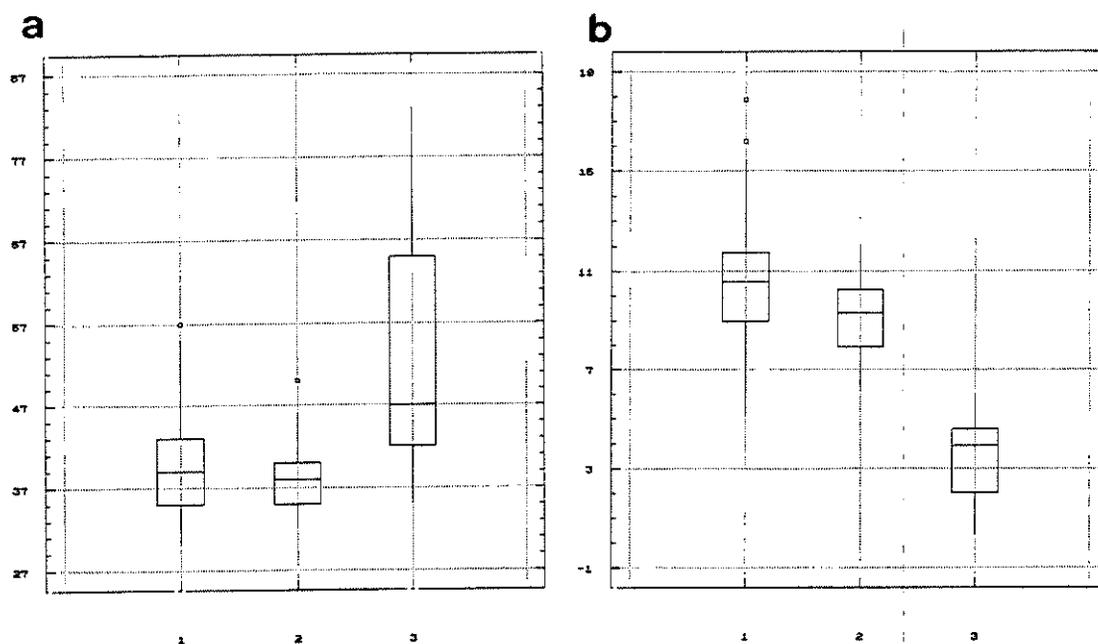


Figura 71. Representación en un diagrama “box and whisker” múltiple de la longitud de los pelos marginales (a) y de la densidad (b) de cada taxon: 1, *A. fontanum* subsp. *fontanum*; 2, *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*; 3, *A. foreziense*. La longitud en μm y la densidad en n° de pelos/mm.

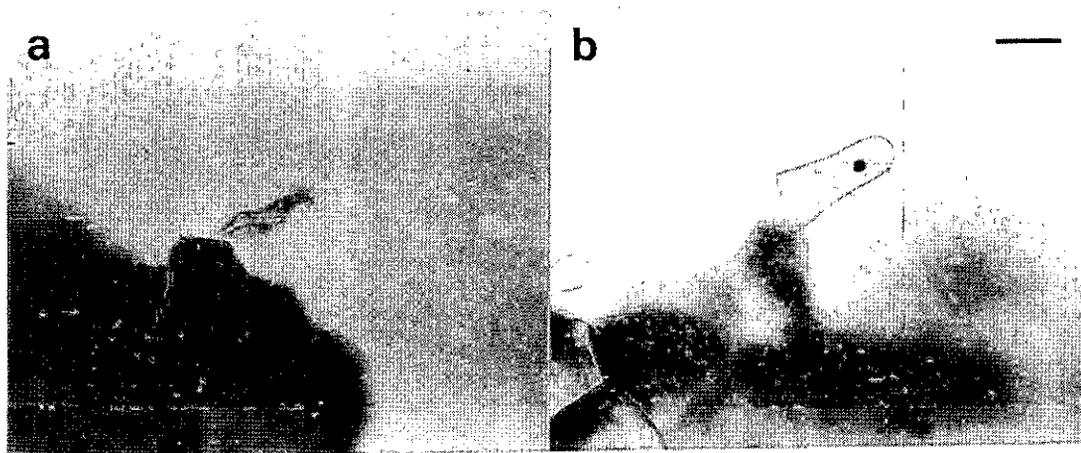


Figura 72. Vaciado y rotura de los pelos marginales de *A. fontanum* subsp. *fontanum*. Barrá: 20 μm .

Táxones	Porcentaje de protalos con pelos bicelulares		
	Masculinos	Femeninos	Bisexuales
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>			
BAI 14	0	70.58	30.77
BET 19	0	0	0
BUJ 1	0	23.33	10.52
GOR 1	0	7.69	17.64
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>			
TR 7400	0	0	0
TR 7402	0	0	0
<i>A. foreziense</i>			
BUF 10a	23.33	30.77	80
AH115F	0	86.66	50
FRA 2	10	84	66.66

Tabla 9. Porcentaje de protalos (según su expresión sexual) con pelos bicelulares (en la muestra BAI 14 de *A. fontanum* subsp. *fontanum* también aparecen tricelulares) en las distintas muestras.

Porcentaje de pelos bicelulares en los protalos en los que aparecen			
Táxones	Masculinos	Femeninos	Bisexuales
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>			
BAI 14	0	(1.01)-4.24-(22.3)	(1.43)-4.14-(10.08)
BET 19	0	0	0
BUJ 1	0	(0.68)-1.02-(2.68)	(1.22)-1.96-(4.8)
GOR 1	0	1.18	(0.55)-0.93-(1.31)
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>			
TR 7400	0	0	0
TR 7402	0	0	0
<i>A. foreziense</i>			
BLF 10a	(1.06)-5.91-(16.66)	(1.17)-8.16-(21.05)	(1.16)-11.69-(29)
AH115F	0	(1.71)-19.96-(40.54)	(7.14)-18.44-(34.61)
FRA 2	(3.7)-10.95-(20.58)	(1.98)-14.91-(39.39)	(1.37)-9.34-(28.2)

Tabla 10. Porcentaje de pelos bicelulares del total de pelos en los protalos en los que aparecen. Entre paréntesis los valores extremos y en el centro la media.

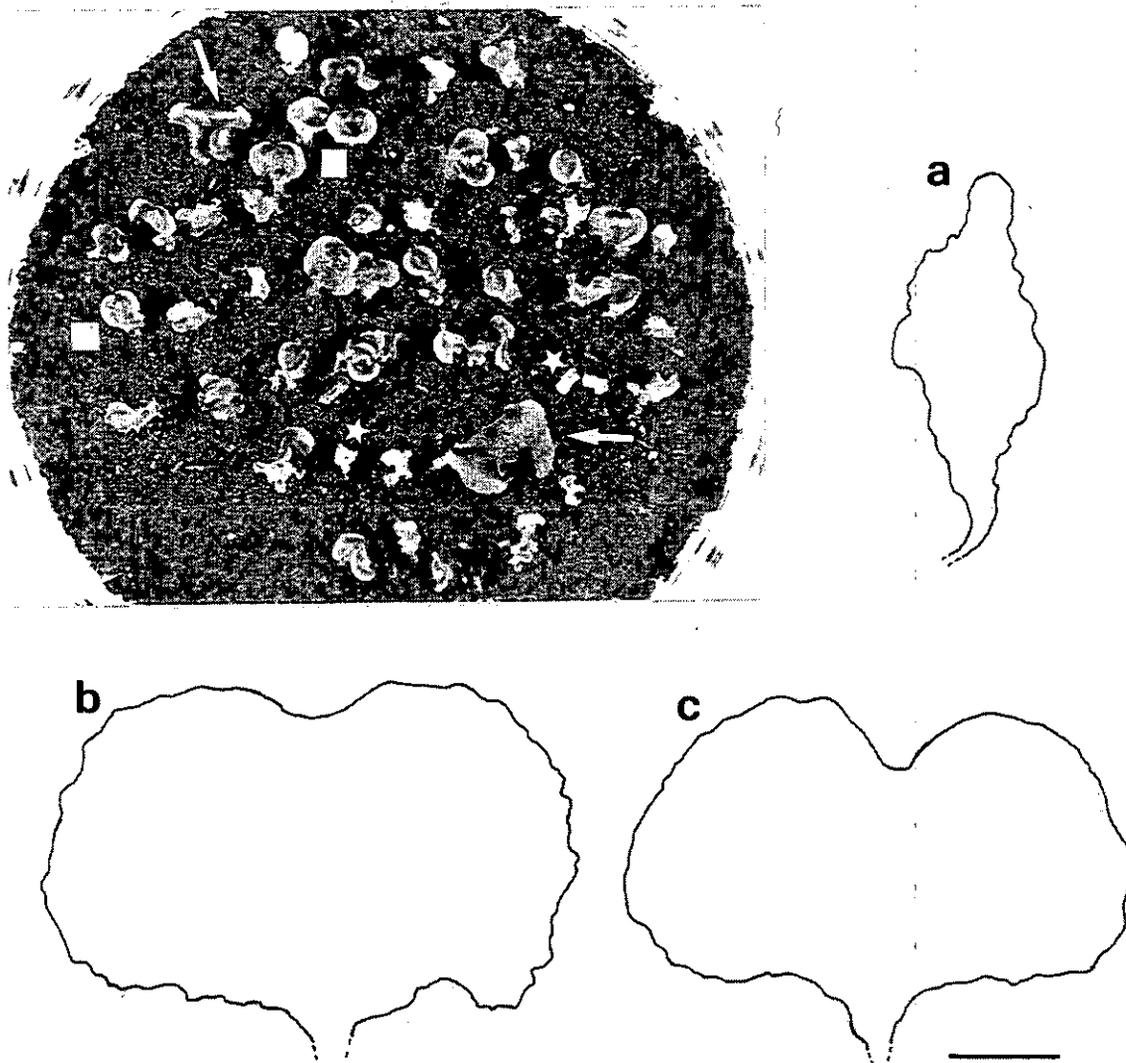


Figura 73. Fotografía de placa de cultivo de gametófitos maduros de la muestra AH84F de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*: (*) masculino; (→) femenino; (□) bisexual, y siluetas de protalos maduros de la misma muestra: a, masculino; b, femenino; c, bisexual. Barra: 1 mm.

4.2.2. Biología reproductiva

4.2.2.1. Secuencia ontogenética de los gametangios y expresión sexual

Los protalos empezaron a mostrar expresión sexual entre 61 y 82 días después de la siembra. La estructura de los anteridios es la típica de la de los helechos leptosporangiados; se localizan fundamentalmente en la mitad basal de la cara ventral del protalo, aunque en aquellos que permanecen en la madurez masculinos, ocupan toda su superficie ventral. Cabe destacar la peculiar morfología de los anteridios de *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*

y de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*, con una célula opercular abovedada, más prominente que en los otros táxones (Fig. 74 a).

Los arquegonios se localizan fundamentalmente en la zona central apical de la cara ventral del protalo, en las proximidades de la escotadura. En la madurez, los cuellos de los arquegonios están formados por 4-5 filas de 4 células cada una y se encuentran curvados hacia la zona basal del protalo donde se localizan los anteridios y la mayoría de los rizoides (Fig. 74 b), lo que se ha interpretado como una disposición que facilita la entrada de los espermatozoides y también la autofecundación intragametofítica (KLEKOWSKI & BAKER, 1966; KLEKOWSKI & LLOYD, 1968).

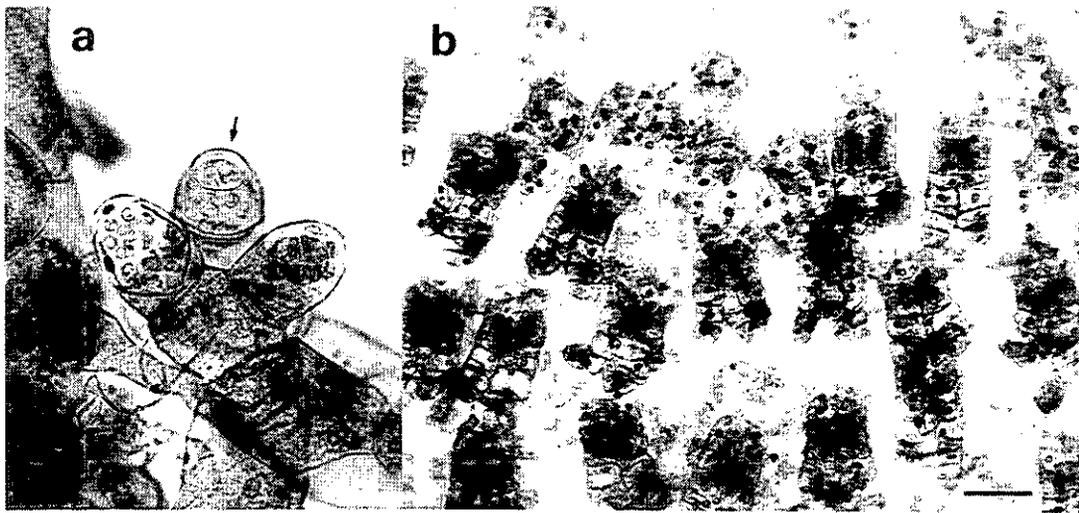


Figura 74. Gametangios: a, anteridios de *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*; b, arquegonios de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*. Barra: 25 μ m.

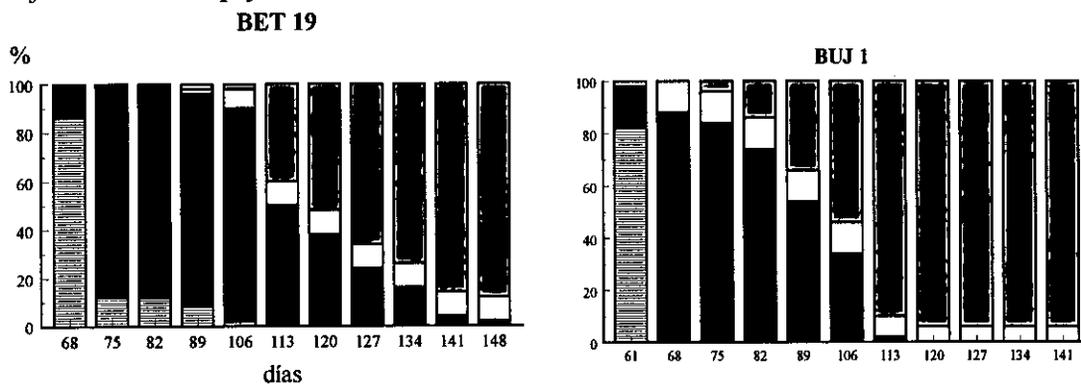
En los táxones de los que hemos estudiado dos muestras se observa que la secuencia ontogenética de los gametangios parece estar fijada, independientemente de la muestra, hecho que ya ha sido señalado en otros grupos de *Asplenium* (HERRERO *et. al.*, 1993; PRADA *et. al.*, 1995, 1996). En todos los táxones, excepto en *A. foreziense* y en *A. macedonicum* los protalos comienzan siendo masculinos o se produce una formación simultánea de algunos protalos femeninos, siempre en mucha menor proporción que los masculinos (Fig. 75), que es la secuencia característica de la mayoría de los pteridófitos homospóreos (ATKINSON & STOKEY, 1964). El paso a protalos bisexuales se produce fundamentalmente a partir de los masculinos, en las proporciones que se indican en la Tabla 11. Al final del período de observación todos los protalos tenían expresión sexual. Algunos cultivos se mantuvieron trigametofíticos (terminología según KLEKOWSKI, 1969a), es decir aparecían gametófitos masculinos, femeninos y bisexuales a

la vez (BET 19 de *A. fontanum* subsp. *fontanum*, VAR 7 de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, AH84F de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y las dos muestras de *A. foreziense* y *A. macedonicum*), mientras que otros sólo presentaban protalos masculinos y bisexuales (TR7400 de *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*; BEA 20 de *A. obovatum* var. *obovatum*, MIE 27 y MIE 41 de *A. obovatum* var. *protobillotii*, NAV 8 de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y MGC 28503 de *A. obovatum* subsp. *numidicum*) o femeninos y bisexuales (BUJ 1 de *A. fontanum* subsp. *fontanum*) (Tabla 11).

En *A. foreziense* y *A. macedonicum* se ha observado que la proporción de protalos que inicialmente son femeninos es mayor que en los restantes táxones y, salvo en la muestra J1 de *A. macedonicum*, esas proporciones se mantienen elevadas (más del 50%) hasta el final del período de observación, en que coexisten las tres expresiones sexuales. En estos casos, los protalos bisexuales proceden mayoritariamente de los femeninos o directamente de los estériles. En cambio, en el resto de los táxones los protalos bisexuales provienen mayoritariamente de los protalos masculinos (Tabla 11).

Figura 75. Evolución de la expresión sexual de los cultivos expresada en porcentajes de cada tipo sexual a lo largo del período de observación de cada muestra.

A. fontanum subsp. *fontanum*



A. fontanum subsp. *pseudofontanum*

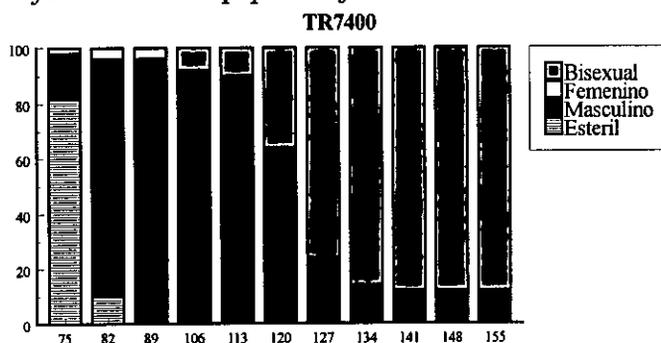
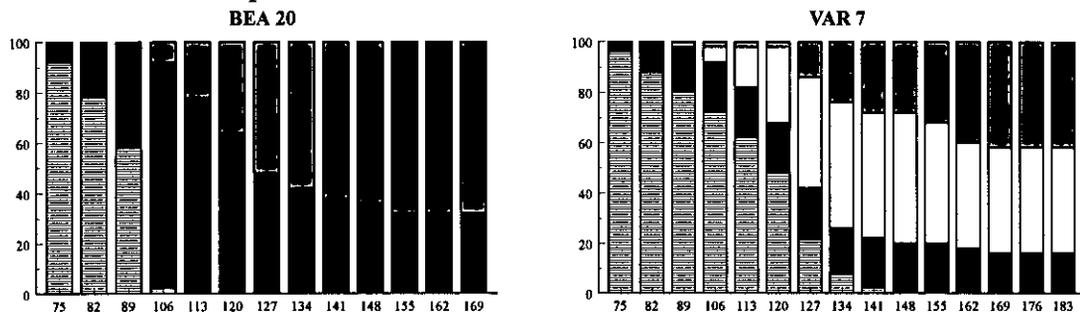
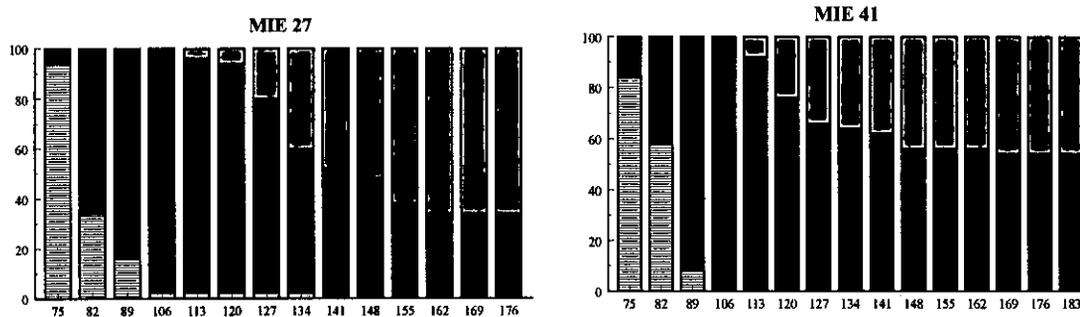


Figura 75. Continuación

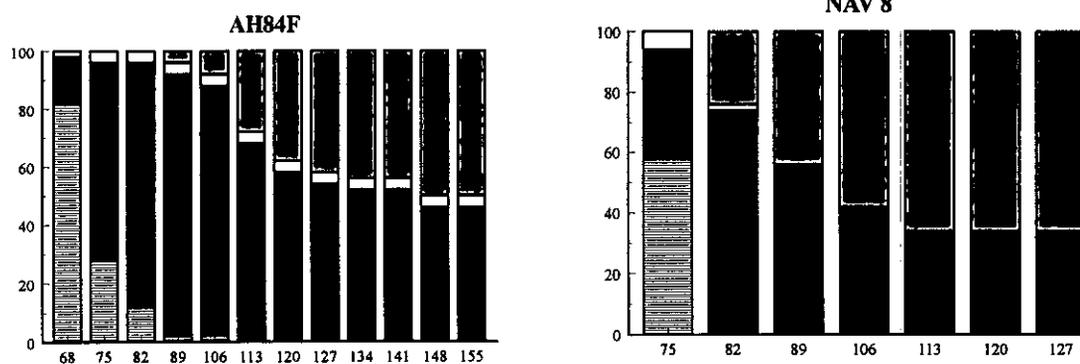
A. obovatum subsp. *obovatum* var. *obovatum*



A. obovatum subsp. *obovatum* var. *protobillotii*



A. obovatum subsp. *lanceolatum*



A. obovatum subsp. *numidicum*

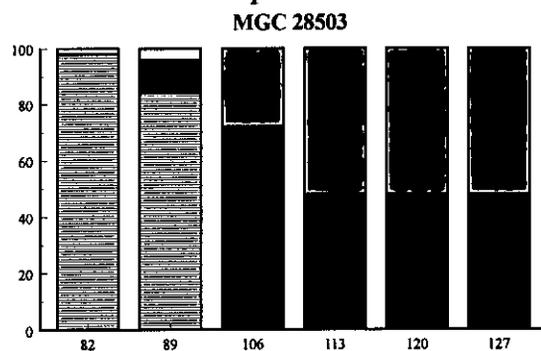
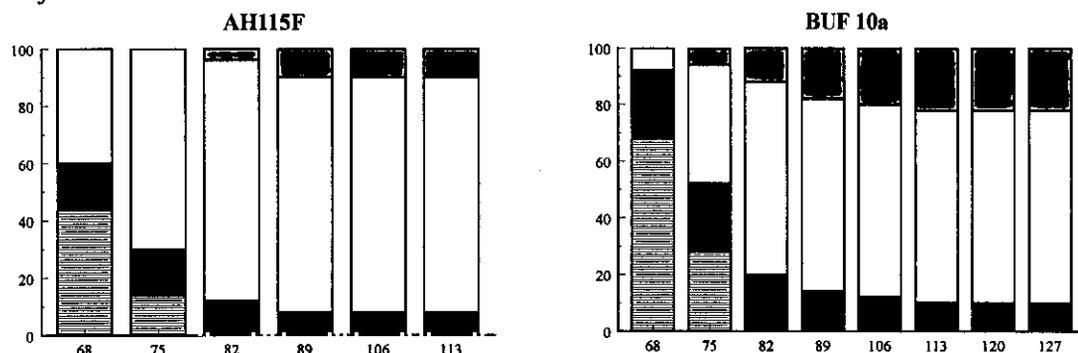
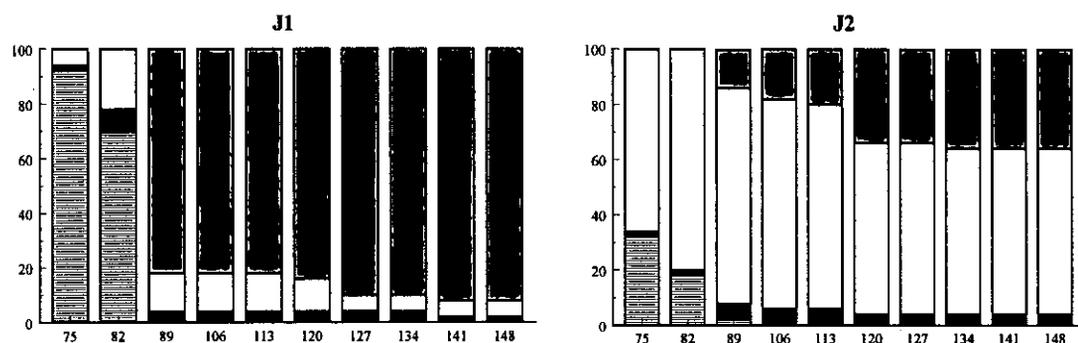


Figura 75. Continuación

A. foreziense*A. macedonicum***4.2.2.2. Potencial de aislamiento**

Los resultados de este estudio son fragmentarios, ya que no prosperaron los cultivos de todos los táxones. Los resultados de los que pudimos obtener datos se muestran en la figura 76. En las muestras de *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. foreziense*, las diferencias entre los protalos aislados y los emparejados son muy significativas, en los protalos aislados no se produjo ninguna fecundación, mientras que en los emparejados se produjeron en torno al 50% de fecundaciones. Tras observar los protalos de *A. fontanum* subsp. *fontanum*, tanto aislados como emparejados, que no habían formado esporófito, comprobamos que no había ningún embrión abortado y que todos eran bisexuales, lo que concuerda con los datos obtenidos de la expresión sexual, con lo cual potencialmente todos podían autofecundarse.

En las muestras de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y *A. macedonicum* las diferencias entre protalos aislados y emparejados no han sido significativas, en los tres casos son muy similares, siendo siempre mayor el porcentaje de esporófitos formados en los protalos emparejados que en los aislados.

Táxones	♂	♀	♀♂	♂→♀♂	♀→♀♂	Sistema de reproducción
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>						
BET 19	2	10	-	88	-	trigametofítico
BUJ 1	-	6	-	88	6	bigametofítico
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>						
TR7400	12	-	-	84	4	bigametofítico
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i>						
var. <i>obovatum</i>						
BEA 20	32	-	-	68	-	bigametofítico
VAR 7	18	40	-	16	26	trigametofítico
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i>						
var. <i>protobillotii</i>						
MIE 27	34	-	-	66	-	bigametofítico
MIE 41	54	-	-	46	-	bigametofítico
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>lanceolatum</i>						
AH84F	46	4	-	50	-	trigametofítico
NAV 8	34	-	-	50	16	bigametofítico
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>numidicum</i>						
MGC 28503	48	-	22	26	4	bigametofítico
<i>A. foreziense</i>						
AH115F	8	82	-	8	2	trigametofítico
BUF 10a	10	68	-	22	-	trigametofítico
<i>A. macedonicum</i>						
J1	2	6	56	10	26	trigametofítico
J2	4	58	-	2	36	trigametofítico

Tabla 11. Porcentaje total de cada tipo sexual al final del período de observación una vez que los cultivos permanecieron estables y sistema de reproducción de cada muestra.

En todas las muestras, tanto en los protalos aislados como en los emparejados, se produjo poliembrionía, muy acusada en el caso de *A.*

macedonicum, en el que se formaron en algunos protalos hasta 11 esporófitos. Esta poliembrionía puede explicarse por la edad de los cultivos; al mantenerse durante muchos meses en crecimiento sin límite de espacio ni nutrientes, los protalos se desarrollan mucho, forman numerosas proliferaciones llenas de arquegonios y anteridios que se producen y maduran continuamente, lo que favorece que se puedan producir múltiples fecundaciones tanto por vía intragametofítica como intergametofítica. Algo similar a lo que les ocurre a los protalos tuberosos de larga vida de *Lycopodiaceae*, *Ophioglossaceae* y *Psilotaceae* (KLEKOWSKI, 1969a).

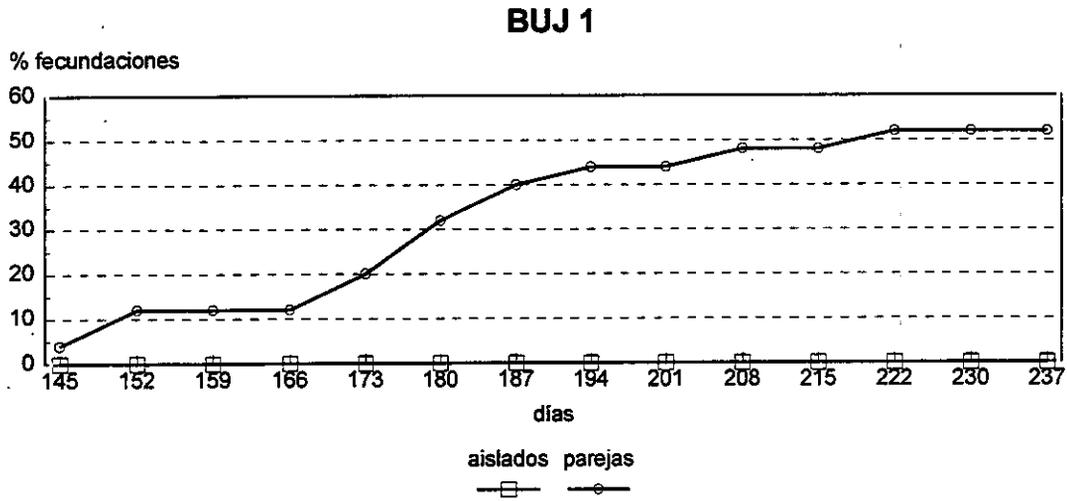
En todos los cultivos multispores y en los de 50 protalos para observar la evolución de la expresión sexual las fecundaciones fueron más o menos numerosas, por lo que no parece que exista ningún problema de incompatibilidad en esporas provenientes de un solo individuo esporofítico.

A la hora de interpretar estos datos, hay que hacerlo con ciertas reservas, no es fácil saber si en la secuencia ontogenética de los gametangios han coexistido maduros, de tal forma que se hayan podido producir autofecundaciones en los protalos aislados. Además al final del experimento quizá las condiciones no sean muy naturales, ya que se sobremantiene a los protalos en condiciones de cultivo, los protalos degeneran un poco, y empiezan a formar muchas proliferaciones cargadas tanto de anteridios como de arquegonios, que quizá no formasen en la naturaleza al no mantenerse continuamente vivos.

En cualquier caso, con los datos obtenidos, se observa que las muestras de *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. foreziense* tienen un nulo potencial de aislamiento, que se podría interpretar como imposibilidad para la autofecundación intragametofítica. Al no haber diferencias significativas en la formación de esporófitos en los protalos aislados y en los emparejados en las muestras de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y *A. macedonicum*, se puede interpretar como que tienen posibilidad de autofecundación intragametofítica.

Figura 76. Porcentaje de fecundaciones producidas en los protalos aislados y en los emparejados en las distintas muestras.

A. fontanum subsp. *fontanum*



A. obovatum subsp. *obovatum* var. *obovatum*

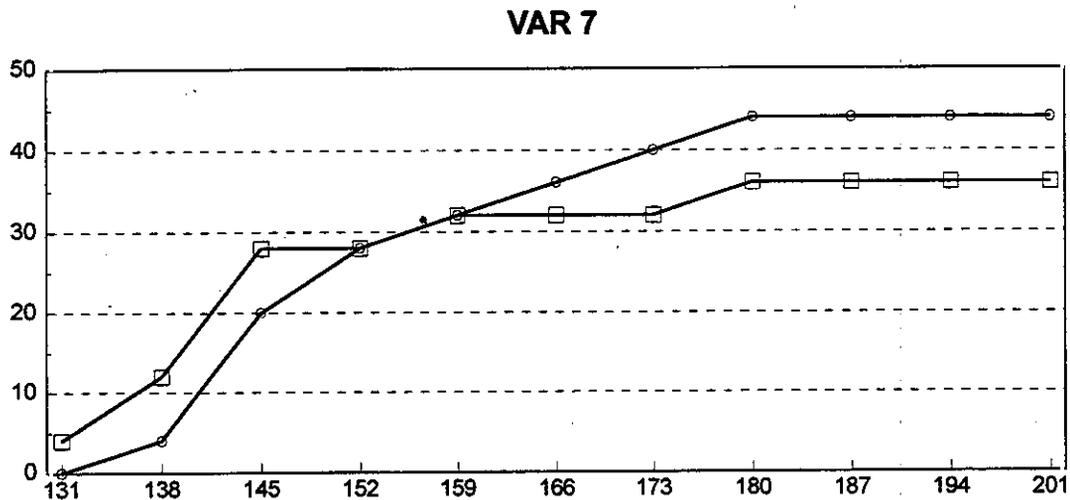
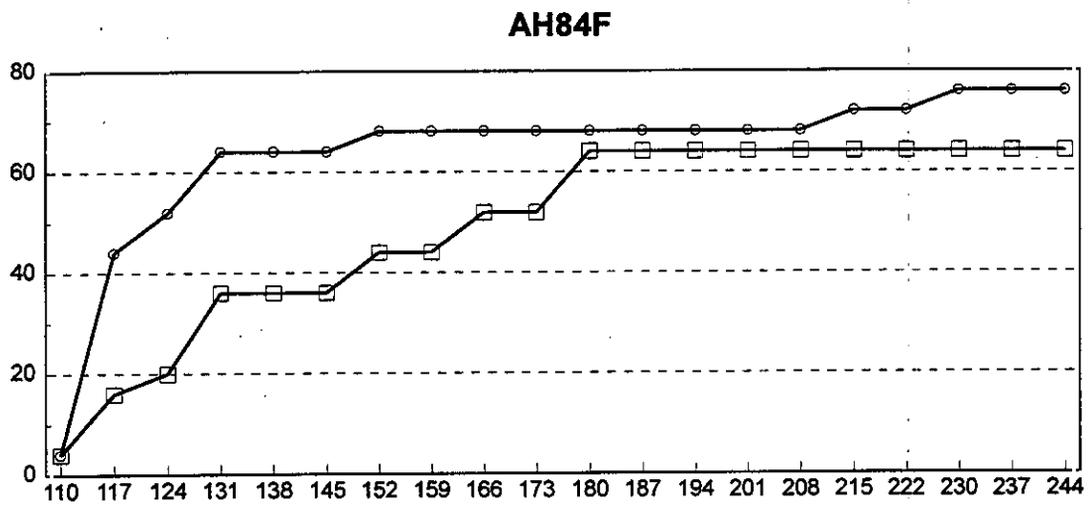


Figura 76. Continuación.

A. obovatum subsp. *lanceolatum*



A. foreziense

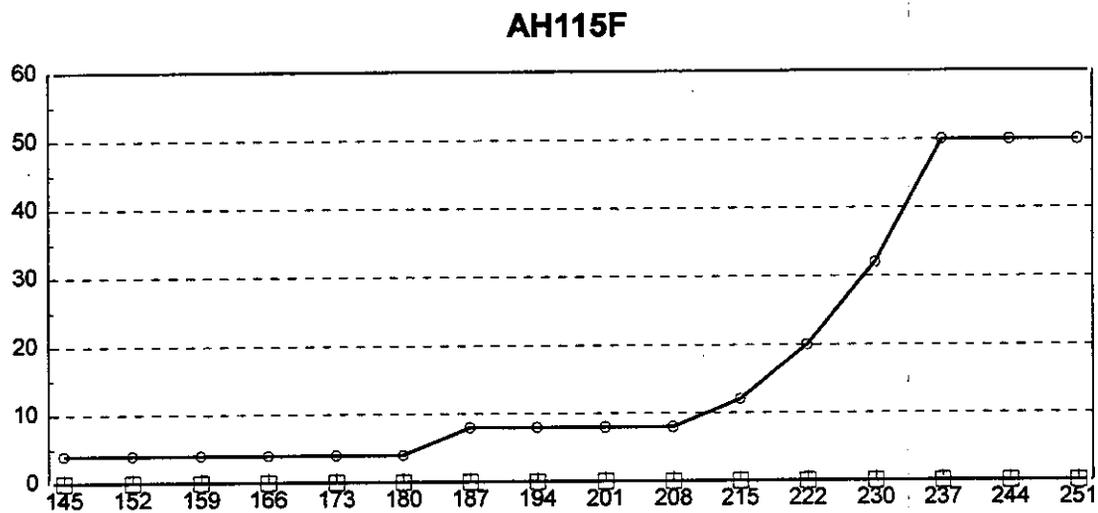
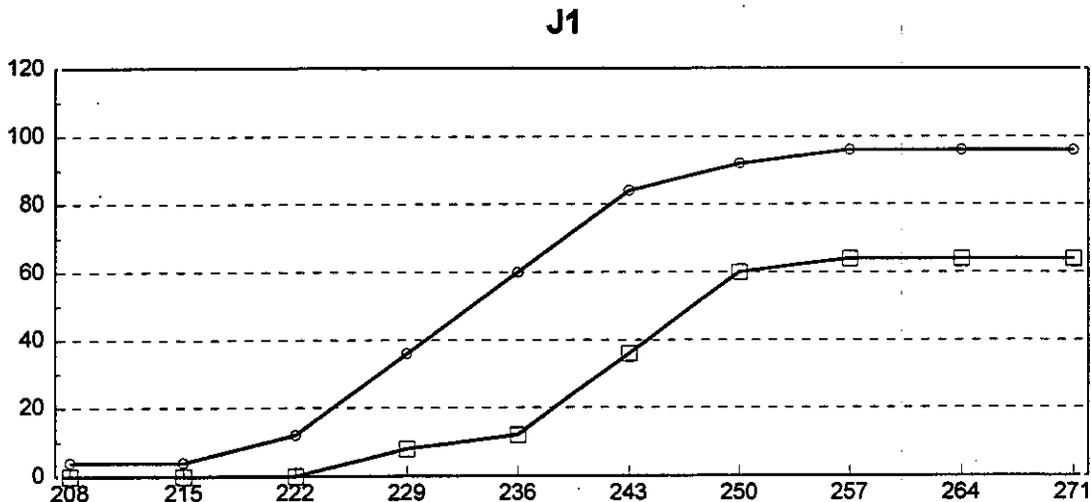


Figura 76. Continuación.

A. macedonicum**4.2.2.3. Sistemas de reproducción**

La mayoría de los índices de fijación de Wright (F) de los diferentes loci polimórficos de las distintas poblaciones de *A. fontanum* subsp. *fontanum* no difieren significativamente de 0 (de lo esperado en condiciones de equilibrio según Hardy-Weinberg) (Tabla 22). Sólo en *Aat-1* de tres poblaciones (BET, BUJ y GAR), *Lap-1* de la población BAI, *Pgi-2* de la población CAM, la *6Pgd-2* de las poblaciones BET y GUA, y *Sdh* de la población CAM el índice de fijación es significativo (Tabla 22). En la población de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* estudiada, ninguno de los loci tiene un índice de fijación significativo (Tabla 23). Estos resultados apoyan la existencia de un sistema de reproducción cruzada de estos dos diploides, y son similares a los obtenidos en la mayoría de las especies de pteridófitos homospóreos estudiados genéticamente, en los que las poblaciones con bajos niveles de autofecundación intragametofítica también tienen valores de F cercanos a 0 (P. SOLTIS & D. SOLTIS, 1990). Estos resultados, además, están de acuerdo con los obtenidos para las identidades genéticas entre los pares de poblaciones de estos táxones, que han dado valores relativamente altos de I (Tablas 19 y 20), lo que indica poca diferenciación entre las poblaciones y que existe flujo genético entre ellas.

Los datos de los niveles de variabilidad genética también apuntan a que estos diploides mayoritariamente tienen fecundación cruzada. En *A. fontanum* subsp. *fontanum* los valores de P, A y H_e (Tabla 18) son similares a la media de once especies de pteridófitos con fecundación cruzada, 36%, 1.67

y 0.113, respectivamente (RANKER, 1992, y referencias que contiene). En *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* estos valores son algo menores, 28.6%, 1.3 y 0.014, respectivamente (Tabla 18).

Con los datos de la secuencia ontogenética de los gametangios, siguiendo el criterio de KLEKOWSKI (1969a), todos los táxones, excepto *A. foreziense* y *A. macedonicum* y la muestra VAR 7 de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, tienen una secuencia general de protalos masculinos que se transforman mayoritariamente en bisexuales y la formación de protalos femeninos es escasa (Tabla 11). Ésta secuencia favorecería la autofecundación intragametofítica.

La secuencia de *A. foreziense*, *A. macedonicum* y, en menor medida, la muestra VAR 7 de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* difiere de las restantes en que hay un predominio de protalos femeninos, en mayor o menor proporción, y en que un alto porcentaje de ellos se mantiene sin transformarse en bisexuales; las tres expresiones sexuales conviven al final del periodo de observación con diferentes frecuencias (Tabla 11). Éste tipo de secuencia favorecería la fecundación cruzada.

Con todos estos datos podemos apuntar varias tendencias. Parece que *A. fontanum* subsp. *fontanum*, a pesar de que su secuencia ontogenética de los gametangios según el criterio de KLEKOWSKI (1969a) indicaría lo contrario, tiene principalmente un sistema de reproducción cruzada; así lo indican los datos del potencial de aislamiento y los datos isoenzimáticos. De la subespecie *pseudofontanum* sólo tenemos los datos de la secuencia ontogenética de los gametangios; sin más datos sólo podemos apuntar que puede que tenga un comportamiento similar al de la subespecie *fontanum*.

Todos los táxones del grupo *A. obovatum* tienen una secuencia que favorecería la autofecundación. Los datos del potencial de aislamiento confirman que tienen esta posibilidad de autofecundación intragametofítica. En cambio, los datos isoenzimáticos del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* apuntan hacia un sistema de fecundación cruzada predominantemente, ya que no existe desviación significativa de lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg.

Los datos de la secuencia ontogenética de los gametangios de *A. foreziense* y *A. macedonicum* parece que señalan que generalmente se reproducen de forma cruzada.

Los sistemas de reproducción de los pteridófitos homospóreos son muy complejos, incluso dentro de un mismo taxon (P. SOLTIS & D. SOLTIS,

1990). Debido a sus posibilidades y flexibilidad reproductora pueden utilizar varios tipos de reproducción según las circunstancias.

4.2.3. Discusión global

De los resultados expuestos en los apartados anteriores se desprende que en el complejo *A. obovatum* los caracteres gametofíticos son muy homogéneos en todos los táxones pertenecientes a este grupo, tanto en el desarrollo y morfología de los protalos como en su expresión sexual, con una secuencia de formación de gametangios constante, caracterizada por la diferenciación inicial de protalos masculinos que se transforman mayoritariamente en bisexuales, aunque muchos de ellos permanecen masculinos (entre el 18% de la muestra VAR 7 de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y el 54% de la muestra MIE 41 de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*). HENRIET & MOENS (1976) señalan que a lo largo del desarrollo, los protalos de *A. obovatum* (*A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*) son más pequeños que los de *A. billotii* (*A. obovatum* subsp. *lanceolatum*).

Una situación semejante se da en las dos subespecies de *A. fontanum*, si bien en este caso se ha observado una ligera diferenciación en los protalos de ambos táxones, que se manifiesta en la ausencia de pelos bicelulares en la subespecie *pseudofontanum*.

En el caso de *A. foreziense* tres de los cuatro individuos estudiados formaron protalos con pelos y uno de ellos (CAB 9) produjo protalos sin pelos. Para comprobar si este carácter se mantenía constante en otros individuos de la misma población sembramos seis nuevos individuos de la población CAB, así como otros 9 individuos de la población FRA, que había originado protalos pelosos en la muestra estudiada (FRA 2). De los siete individuos de la población CAB, cinco formaron pelos y dos no los formaron, mientras que los nueve individuos de la población FRA dieron lugar a protalos pelosos. Ya sean desnudos o pelosos, el carácter se mantiene en todos los protalos procedentes de un mismo individuo. Parece que lo general es que los protalos de *A. foreziense* formen pelos, pero algunos individuos desarrollan protalos desnudos. El hecho de que los protalos de *A. macedonicum* sean desnudos no parece que tenga valor taxonómico, ya que vemos que dentro de *A. foreziense* también hay individuos que tienen este tipo de protalos. Por otra parte, y a diferencia del resto de los táxones estudiados, la secuencia de formación de los gametangios en *A. foreziense* y *A. macedonicum* coincide en la diferenciación inicial de protalos mayoritariamente femeninos.

En los protalos de *A. foreziense* el carácter de presencia/ausencia de pelos y densidad de éstos es intermedio entre sus dos parentales, yendo desde protalos desnudos como ocurre en *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, uno de sus parentales, hasta protalos pelosos como ocurre en *A. fontanum* subsp. *fontanum*, su otro parental, pero con una densidad menor. Este carácter ya se ha visto que es intermedio en otra especie de *Asplenium* de origen aloploiploide (PRADA *et al.*, 1995) y en el híbrido de los diploides *A. obovatum* Viv. y *A. onopteris* L. (HENRIET, 1970).

4.3. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

4.3.1. SISTEMAS ENZIMÁTICOS

4.3.1.1. Aspártico aminotransferasa (AAT) (E.C.2.6.1.1)

Se trata de una enzima dimérica que puede tener de 2 a 4 formas codificadas por diferentes loci (KEPHART, 1990). En su tinción hemos observado una única zona de actividad en todas las muestras, pero en algunas poblaciones además de ésta, aparecen bandas menos teñidas y menos anódicas, pudiéndose tratar de un locus más lento que no se tiñe bien. Por éso, al locus que se tiñe bien en todas las muestras lo hemos designado *Aat-1*, y es el que hemos interpretado. En todos los táxones del grupo *A. obovatum* es monomórfico, todos ellos son homocigotos para el alelo más lento (*Aat-1c*) (Fig. 77, Tablas 16 y 17). En *A. fontanum* se presentan dos alelos diferentes (*Aat-1a* y *Aat-1b*), siempre en homocigosis y es más frecuente el alelo *Aat-1a* (Tabla 16).

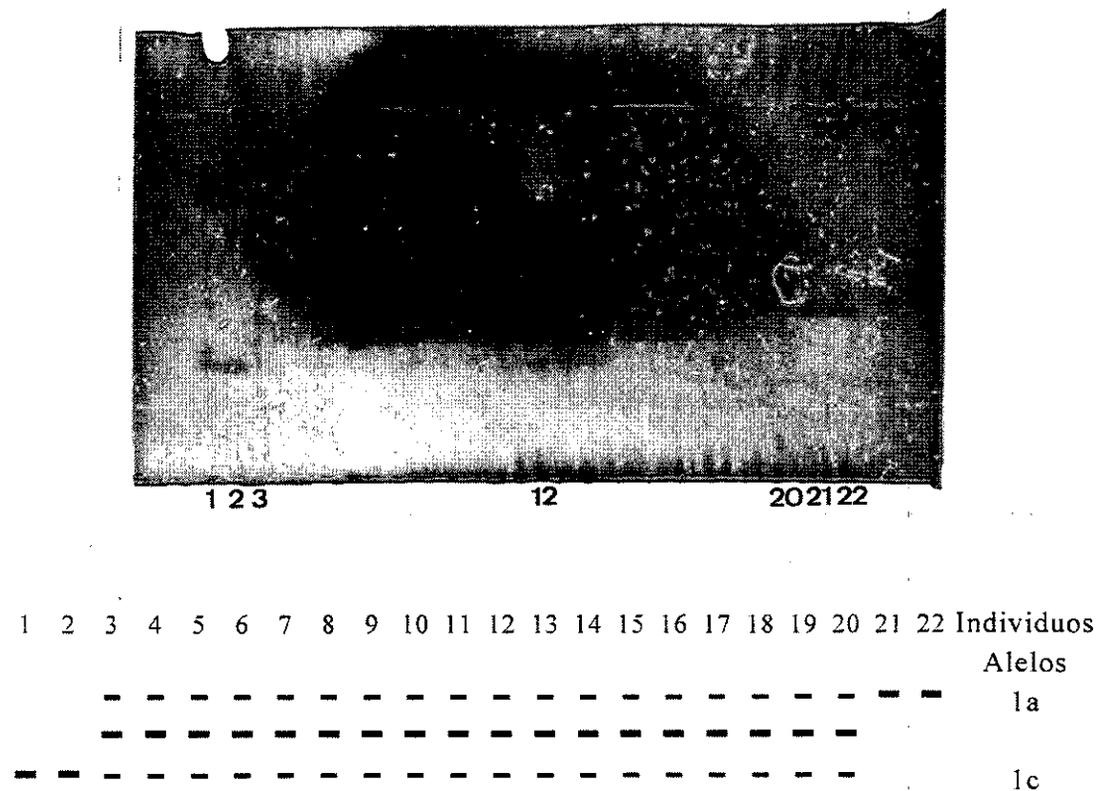


Figura 77. Fotografía y esquema del zimograma de la isoenzima AAT-1. Individuos 1 y 2: *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; 3-20: *A. foreziense*; 21 y 22: *A. fontanum* subsp. *fontanum*.

Todos los individuos analizados de *A. foreziense* y *A. macedonicum* presentan un modelo de bandas homogéneo, tres bandas que corresponden a la figura típica de los heterocigotos en las enzimas diméricas, dos bandas más tenues que corresponden a los homodímeros aa y cc y una banda intermedia de doble intensidad que corresponde a los heterodímeros ac + ca (Fig. 77); en ningún individuo ha aparecido el alelo *Aat-1b* menos frecuente de *A. fontanum* (Tabla 17). Después de analizar la segregación de los gametófitos de *A. foreziense* y *A. macedonicum* se observa que no segregan, por lo que son heterocigotos fijos para este locus.

4.3.1.2. Isocítrico deshidrogenasa (IDH) (E.C.1.1.1.42)

Es una enzima dimérica que puede tener 1 ó 2 formas codificadas por diferentes loci (KEPHART, 1990). Puede ser NAD o NADP dependiente (WENDEL & WEEDEN, 1989), y en nuestro material es NADP dependiente.

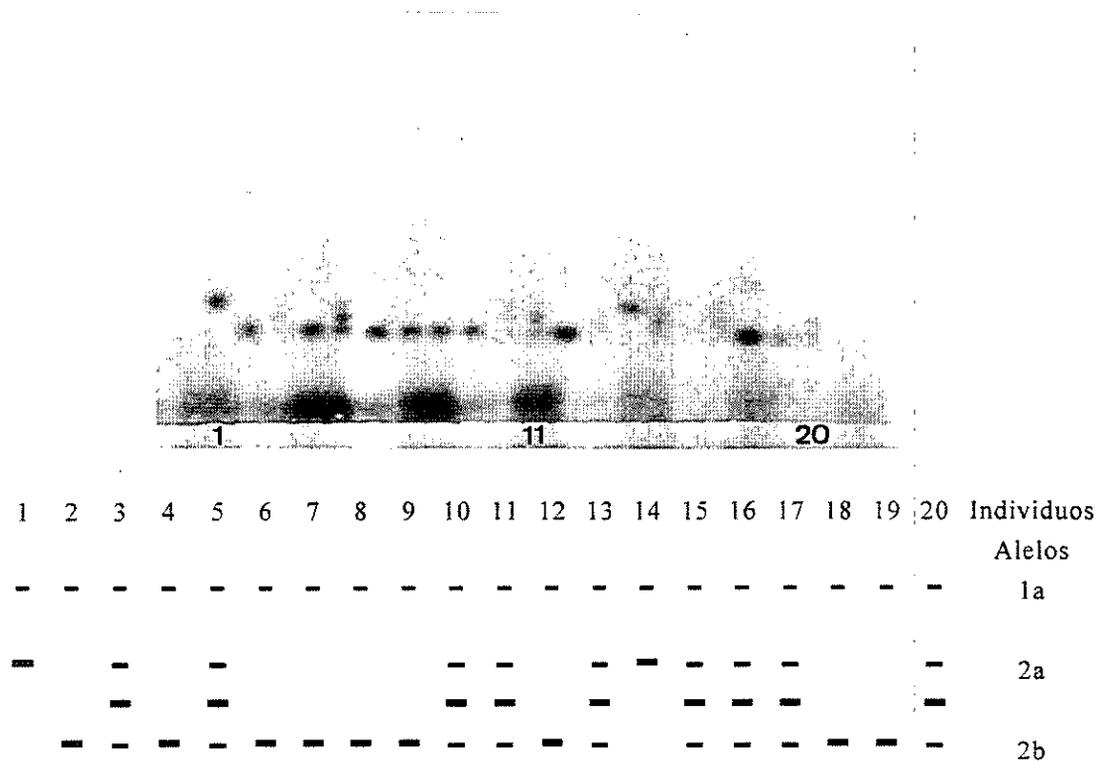


Figura 78. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático IDH (IDH-1 e IDH-2) de la población ARA de *A. fontanum* subsp. *fontanum*.

Sólo hemos obtenido buena resolución en *A. fontanum* subsp. *fontanum*. En los zimogramas aparecen dos zonas de actividad que hemos interpretado como dos loci diferentes. La IDH-1 se tiñe muy tenue y es monomórfica en todas las poblaciones estudiadas (Tabla 16). La IDH-2 es polimórfica y aparecen tres fenotipos, dos de ellos con una única banda y otro

con tres bandas. Los fenotipos con una única banda corresponden a dos alelos diferentes en homocigosis (*Idh-2a* e *Idh-2b*) (Fig. 78). El fenotipo de tres bandas responde al típico modelo de heterocigotos de una enzima dimérica y corresponde a individuos heterocigotos para los alelos *Idh-2a* e *Idh-2b* (Fig. 78).

La segregación de los gametófitos confirma la interpretación de los dos loci y en los individuos heterocigotos para la IDH-2 da valores cercanos a una segregación mendeliana (1:1).

4.3.1.3. Leucín aminopeptidasa (LAP) (E.C.3.4.11.1)

Se trata de una enzima monomérica que puede tener 2 ó 3 formas codificadas por diferentes loci (KEPHART, 1990). En la mayoría de los zimogramas obtenidos se observa una única zona de actividad y en algunos se observa, además de ésta, otra zona de actividad más lenta. Interpretamos que está codificada por dos loci y que sólo se tñe bien en todos los casos el más anódico, que correspondería a la LAP-1, y es el que hemos analizado.

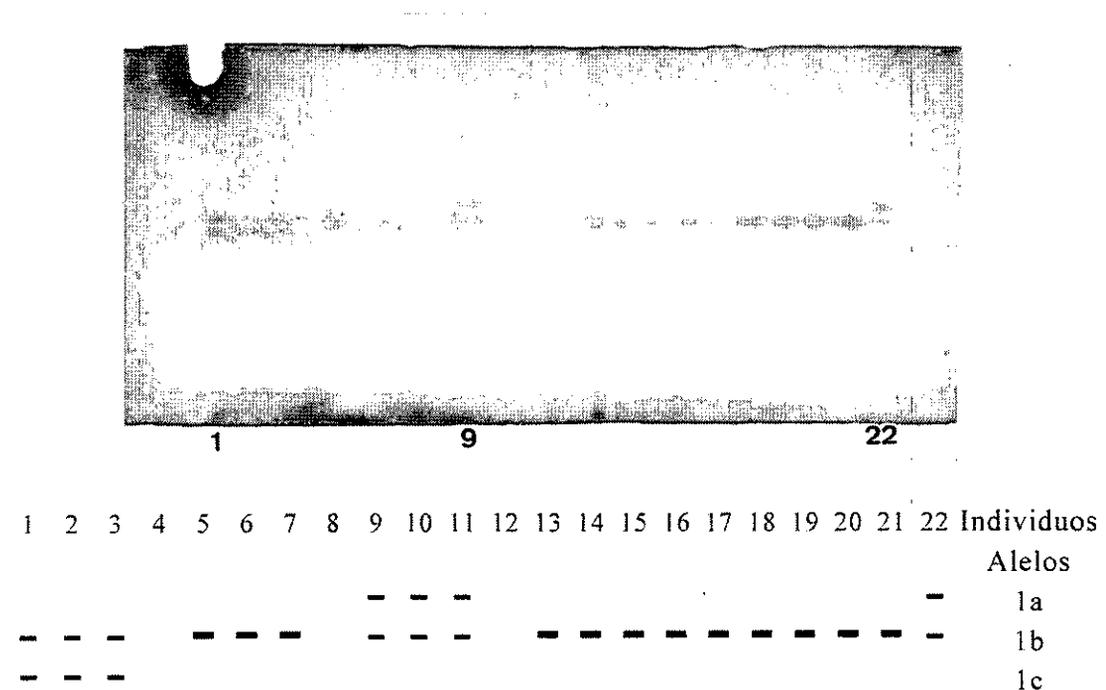


Figura 79. Fotografía y esquema del zimograma de la isoenzima LAP-1. Individuos 1-4: *A. fontanum* subsp. *fontanum*; 5-8: *A. foreziense*; 9-12: *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 13-21: *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; 22: *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*.

Aparecen fenotipos con una sola banda y fenotipos con dos bandas (Figs. 79 y 80). Los fenotipos con una sola banda corresponderían a alelos en homocigosis y hay tres (*Lap-1a*, *Lap-1b* y *Lap-2c*). Los fenotipos de dos bandas corresponderían a los típicos heterocigotos de una enzima monomérica.

En los táxones del grupo *A. obovatum* podemos considerar los alelos como marcadores genéticos. Todos los individuos de los diploides *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*, var. *obovatum* y var. *deltoideum* son homocigotos para un alelo diferente, *Lap-1a* en la primera variedad y *Lap-2a* en las otras dos variedades (Fig. 80). En los tetraploides *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum* hay aditividad de estos alelos, apareciendo siempre en heterocigosis (Fig. 80), salvo en un individuo de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (HOY 20) que presenta únicamente una banda.

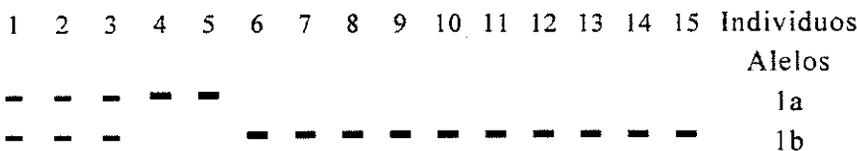
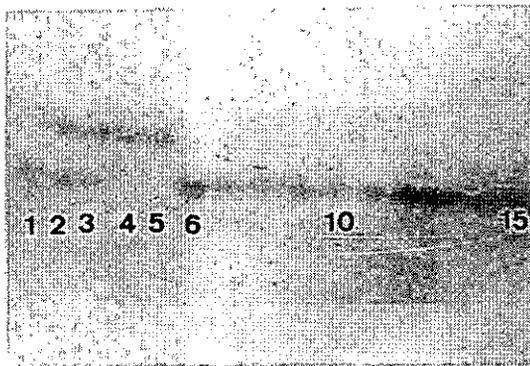


Figura 80. Fotografía y esquema del zimograma de la isoenzima LAP-1 en el grupo *A. obovatum*: 1-2: *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 3: *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *ibericum*; 4-5: *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*; 6-15: *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*.

En *A. fontanum* es donde aparece mayor variabilidad, hay fenotipos de una sola banda (homocigotos) y de dos bandas (heterocigotos). Los alelos presentes en este taxon son el *Lap-1b* (aparece también en *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y var. *deltoideum*) y *Lap-2c*, exclusivo en *A. fontanum* (Tabla 16). Todos los individuos de *A. foreziense* y *A. macedonicum* presentan una sola banda, la correspondiente al alelo *Lap-1b* (Fig 79, Tabla 17).

El estudio de la segregación de los gametófitos nos ha confirmado la interpretación de los loci. Los diploides heterocigotos (únicamente en *A. fontanum*) segregan en una relación cercana a la mendeliana (1:1); en cambio, en los tetraploides heterocigotos (sólo *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum*) no ha habido segregación, por lo que se comportan como heterocigotos fijos.

4.3.1.4. Málico deshidrogenasa (MDH) (E.C.1.1.1.37)

Se trata de una enzima dimérica y generalmente presenta tres formas codificadas por loci diferentes (KEPHART, 1990). En los zimogramas se observan dos zonas de actividad (Fig. 81). La más anódica la hemos interpretado como la MDH-1, y presenta dos fenotipos; uno de una sola banda que es el más frecuente (Tablas 16 y 17) y que correspondería a los individuos homocigotos para el alelo *Mdh-1a*, y otro con tres bandas que corresponde al típico bandeo de los heterocigotos en las enzimas diméricas. Este fenotipo de tres bandas sólo lo presentan tres individuos de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (Tabla 16). En *A. fontanum* no hay actividad en esta zona más anódica.

La zona menos anódica presenta tres fenotipos. Un fenotipo de dos bandas, que aparece en los individuos de *A. obovatum* subsp. *obovatum* (Fig. 81) y en unos pocos individuos de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, otro de tres bandas que aparece en el diploide *A. fontanum*, y en los tetraploides *A. foreziense* y *A. macedonicum*, y otro de cuatro bandas que aparece en *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (Fig. 81), *A. obovatum* subsp. *numidicum* y dos individuos de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*.

En *A. fontanum*, *A. foreziense* y *A. macedonicum* se repite el mismo modelo de tres bandas tanto en los esporófitos como en los gametófitos; no hay segregación ni en los diploides ni en los tetraploides. No hemos podido darle ninguna interpretación a este modelo de bandeo.

En el grupo *A. obovatum* sí hemos podido interpretar esta zona de actividad menos anódica. En los diploides, como ya hemos visto, aparece siempre (excepto en dos individuos de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*) un modelo de dos bandas específico en cada taxon. En los gametófitos estas bandas no segregan (Fig. 82), por lo que las hemos interpretado cada una como correspondiente a una isoenzima codificada cada una por un locus (*Mdh-2* y *Mdh-3*) en homocigosis. En *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y var. *deltoideum* se presentan los alelos *Mdh-2a* y *Mdh-3a*, y en la var. *protobillotii* los alelos *Mdh-2b* y *Mdh-3b* (Fig. 81). La MDH-2 se tiñe más intensamente que la MDH-3 (Fig. 81) y cada una presenta dos alelos diferentes. En los tetraploides *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y

subsp. *numidicum* el modelo es de cuatro bandas (Fig. 81), no hay segregación en los gametófitos (Fig. 82) y lo hemos interpretado como las bandas de cada uno de los dos loci (*Mdh-2* y *Mdh-3*) de los táxones diploides que se suman originando heterocigotos fijos, y que aparecen superpuestas según se indica en el esquema de la figura 81.

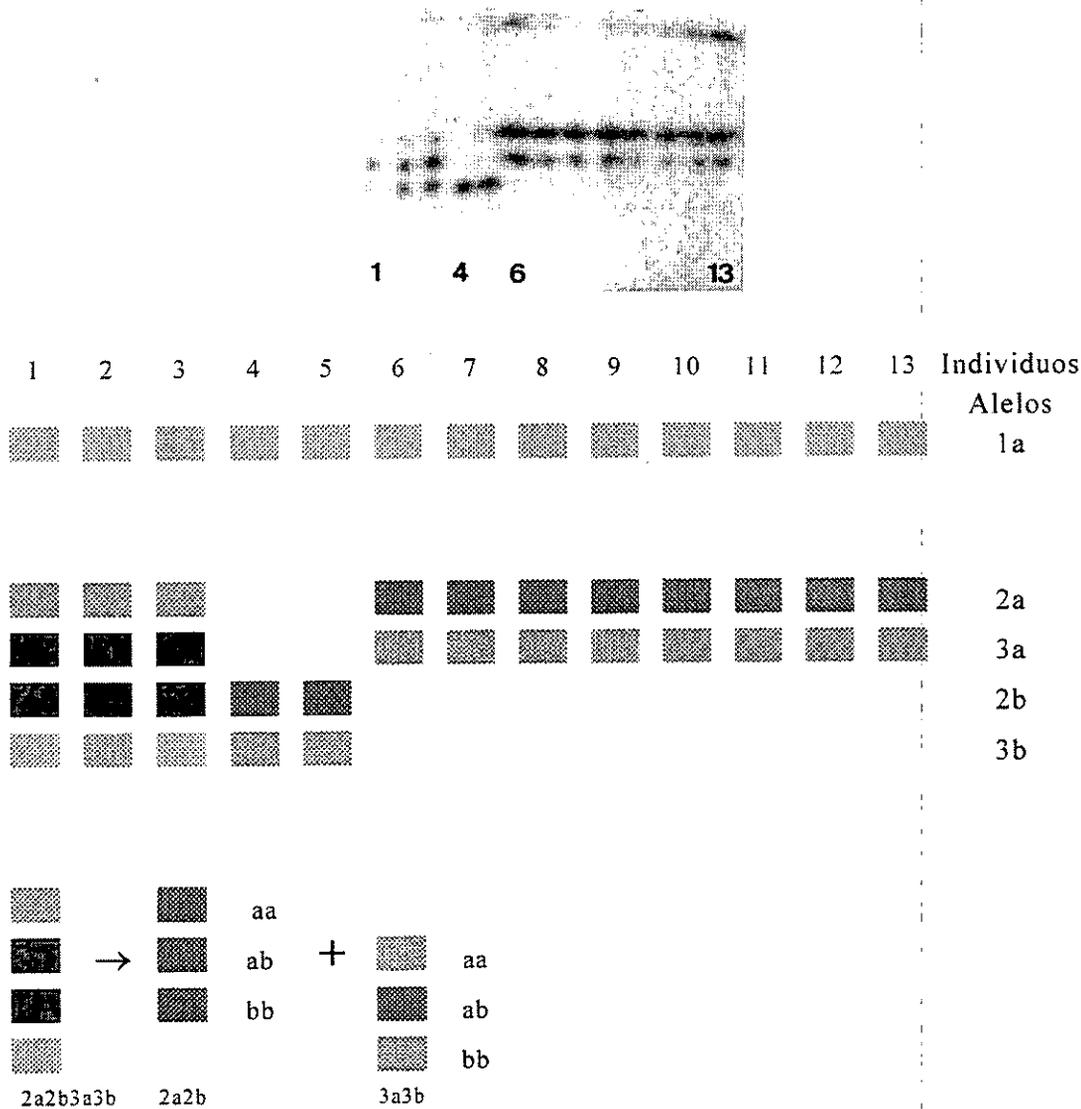


Figura 81. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático MDH (MDH-1, MDH-2 y MDH-3) del grupo *A. obovatum*: 1-3, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 4 y 5, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*; 6-13, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*.

En los gametófitos de uno de los individuos del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*, que presentaba un modelo de cuatro

bandas idéntico al de los tetraploides, los alelos han segregado, lo que confirma la interpretación que hemos hecho. La segregación ha sido mendeliana (cerca de 1:1), pero el alelo *Mdh-2a* segrega junto al *Mdh-3a* y el *Mdh-2b* junto al *Mdh-3b* según el modelo que luego aparece en los esporófitos del resto de los diploides (Fig. 83).

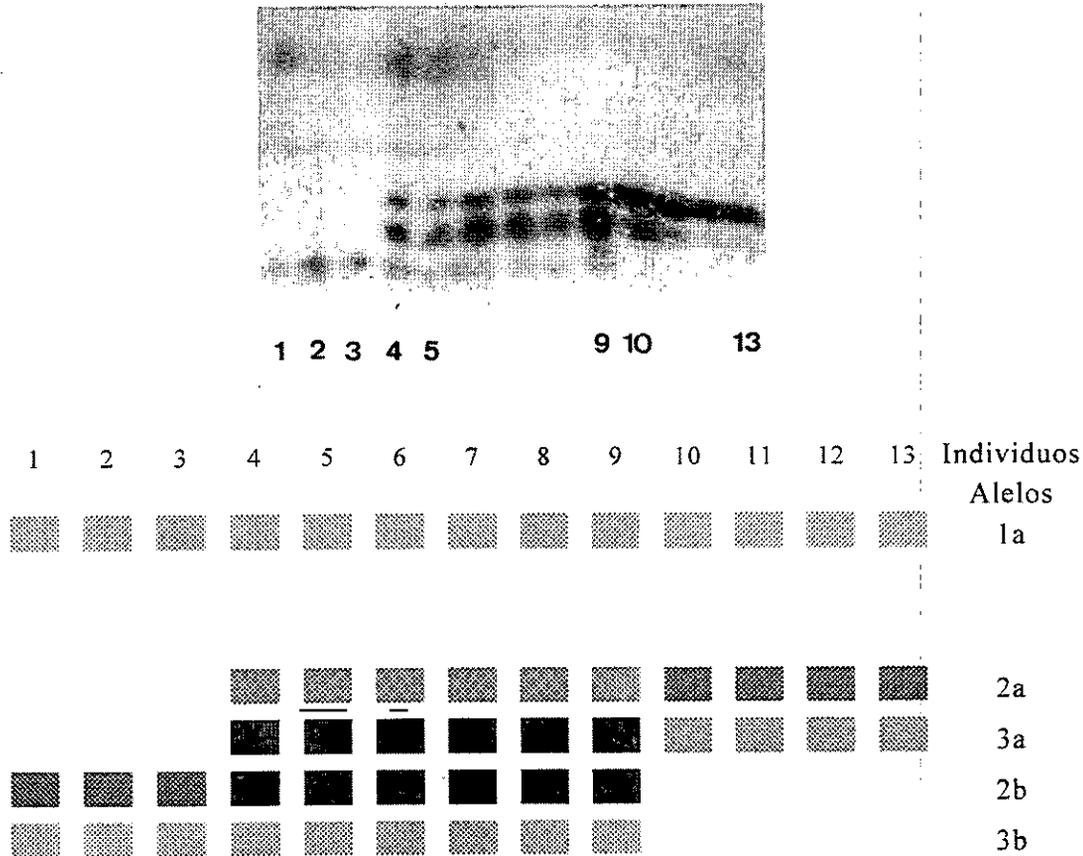


Figura 82. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático MDH (MDH-1, MDH-2 y MDH-3) de los gametófitos del grupo *A. obovatum*: 1-3, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*; 4-9 *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (4: esporófito); 10-13, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (10: esporófito).

En el grupo *A. obovatum* podemos considerar los alelos de las isoenzimas MDH-2 y MDH-3 como marcadores genéticos, ya que, excepto en los dos individuos heterocigotos de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* ya comentados, son específicos en las variedades *obovatum* y *deltoideum* por una parte, y *protobillotii* por otra. Aparecen de forma aditiva en los tetraploides y éstos se comportan como heterocigotos fijos (Fig. 80); excepto en los individuos AH92F-AH104F de la población de Rodalquilar (Almería) y cuatro individuos de la población VAL, que son homocigotos para los loci *Mdh-2* y *Mdh-3* (Tabla 15).

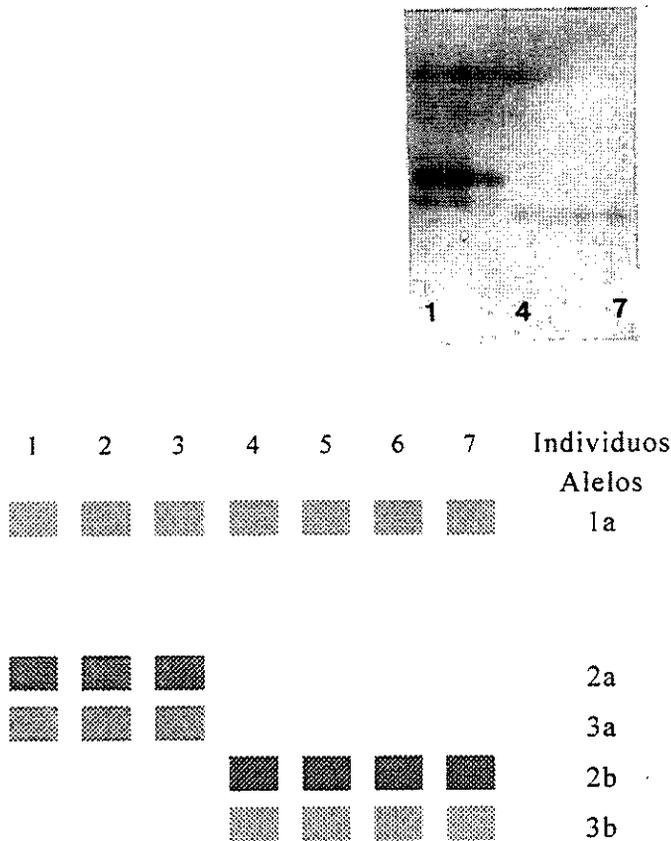


Figura 83. Fotografía y esquema del zimograma de la de segregación de los gametófitos del individuo MIE 75 de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* en el sistema enzimático MDH (MDH-1, MDH-2 y MDH-3).

4.3.1.5. Fosfoglucoisomerasa (PGI) (E.C.5.3.1.9)

Se trata de una enzima dimérica y generalmente presenta dos formas codificadas por loci diferentes (KEPHART, 1990). En los zimogramas de este sistema enzimático se observan dos zonas de actividad (Fig. 84) y que hemos interpretado como dos isoenzimas, PGI-1 y PGI-2, codificadas por dos loci.

La PGI-1 se tiñe con menor intensidad e incluso no llega a teñirse en la mayoría de las poblaciones de *A. fontanum* y *A. foreziense* estudiadas. En el grupo *A. obovatum* se presenta como un locus monomórfico (Tablas 16 y 17). Las pocas veces que se tiñe en *A. fontanum* (Fig. 84) y *A. foreziense* es monomórfico, pero no hemos podido comprobar si se trata del mismo alelo que aparece en el grupo de *A. obovatum* u otro diferente, por lo que no lo hemos podido tener en cuenta en estos táxones.

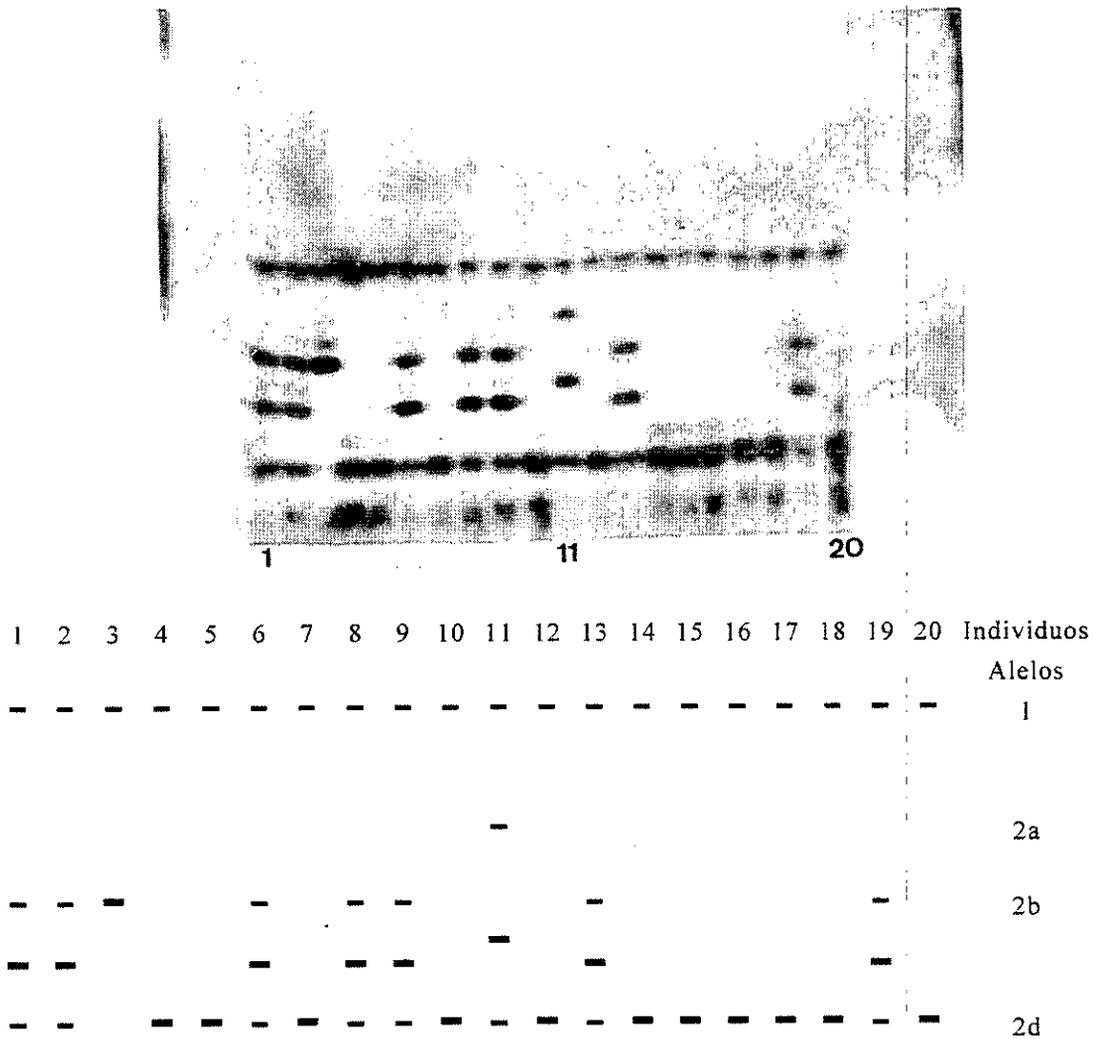


Figura 84. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático PGI (PGI-1 y PGI-2) de la población TRA de *A. fontanum* subsp. *fontanum*.

La PGI-2 es polimórfica y aparecen 4 alelos diferentes (Fig. 84, Tabla 16). En el grupo *A. obovatum* es muy homogénea y sólo presenta cierta variabilidad en unos pocos individuos de la población MIE de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* y *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, los cuales son heterocigotos (Tablas 13 y 15); el resto de los individuos de todos los táxones del grupo son homocigotos para el alelo *Pgi-2b*. En *A. fontanum* subsp. *fontanum* es donde este locus presenta mayor variabilidad, apareciendo los 4 alelos que hemos observado (Fig. 84, Tabla 16). Este polimorfismo se presenta en todas las poblaciones estudiadas (Tabla 12) y aparecen individuos homocigotos con una única banda e individuos heterocigotos con las tres bandas típicas de una enzima dimérica; estos individuos heterocigotos lo son con todas las combinaciones posible entre los 4 alelos distintos (Tabla 16). En *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum* es monomórfica, todos los individuos estudiados son homocigotos para el alelo *Pgi-2b* (Tabla 16). En *A. foreziense* es polimórfico, reflejo del polimorfismo de su parental *A. fontanum*; la

mayoría de los individuos estudiados son homocigotos para el alelo *Pgi-2b* (Tabla 14), lo cual es razonable ya que éste es el único alelo que presenta su parental *A. obovatum* subsp. *obovatum*, pero algunos individuos son heterocigotos, presentando alguno de los alelos (*Pgi-2c* y *Pgi-2d*) presentes en su parental *A. fontanum* combinado con el alelo *Pgi-2b* de su otro parental *A. obovatum* subsp. *obovatum* (Tabla 16). Todos los individuos estudiados de *A. macedonicum* son uniformes, son homocigotos para el alelo *Pgi-2b* (Tabla 16).

Este modelo en el que la PGI-1 es monomórfica y la PGI-2 es polimórfica se repite en otros táxones de *Asplenium* (DEDERA & WERTH, 1987; WERTH *et al.*, 1985a).

Del estudio de la segregación en gametófitos de esporófitos heterocigotos hemos obtenido una segregación mendeliana (cerca 1:1) en el diploide *A. fontanum* y no han segregado en los individuos tetraploides heterocigotos de *A. foreziense* y *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*, por lo que se comportan como heterocigotos fijos. En el diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* hemos podido confirmar la interpretación de los dos loci que hemos hecho de esta enzima.

4.3.1.6. Fosfoglucomutasa (PGM) (E.C.2.7.5.1)

Se trata de una enzima monomérica con dos formas codificadas por loci diferentes (KEPHART, 1990). Los zimogramas obtenidos presentan un bandeo complejo. A primera vista aparecen dos zonas de actividad separadas y teñidas de diferente intensidad, que podríamos interpretar como PGM-1 y PGM-2 (Figs. 85, 86 y 87).

En la zona de actividad más rápida (PGM-1) en los táxones diploides siempre aparecen dos bandas y en los táxones tetraploides tres (*A. foreziense* y *A. macedonicum*) y cuatro (*A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum*). En la zona de actividad más lenta (PGM-2) aparece una sola banda o dos tanto en los diploides como en los tetraploides.

Para poder interpretar estas bandas hemos estudiado la segregación en los gametófitos. En la zona de actividad más rápida no ha habido segregación en los gametófitos, repitiéndose el mismo modelo de bandeo de los esporófitos de los que procedían, tanto en los táxones diploides como en los tetraploides (Fig. 85). En cambio, en la zona de actividad más lenta en los diploides que presentaban dos bandas sí ha habido segregación, próxima a la mendeliana (1:1); y en los táxones tetraploides con dos bandas no ha habido segregación. De esto podemos deducir que estas dos zonas de actividad corresponden a dos loci diferentes (*Pgm-1* y *Pgm-2*) y que el locus más

rápido (*Pgm-1*) aparentemente está duplicado (*Pgm-1* y *Pgm-1'*) ya que la PGM tiene típicamente sólo dos loci (GOTTLIEB, 1982).

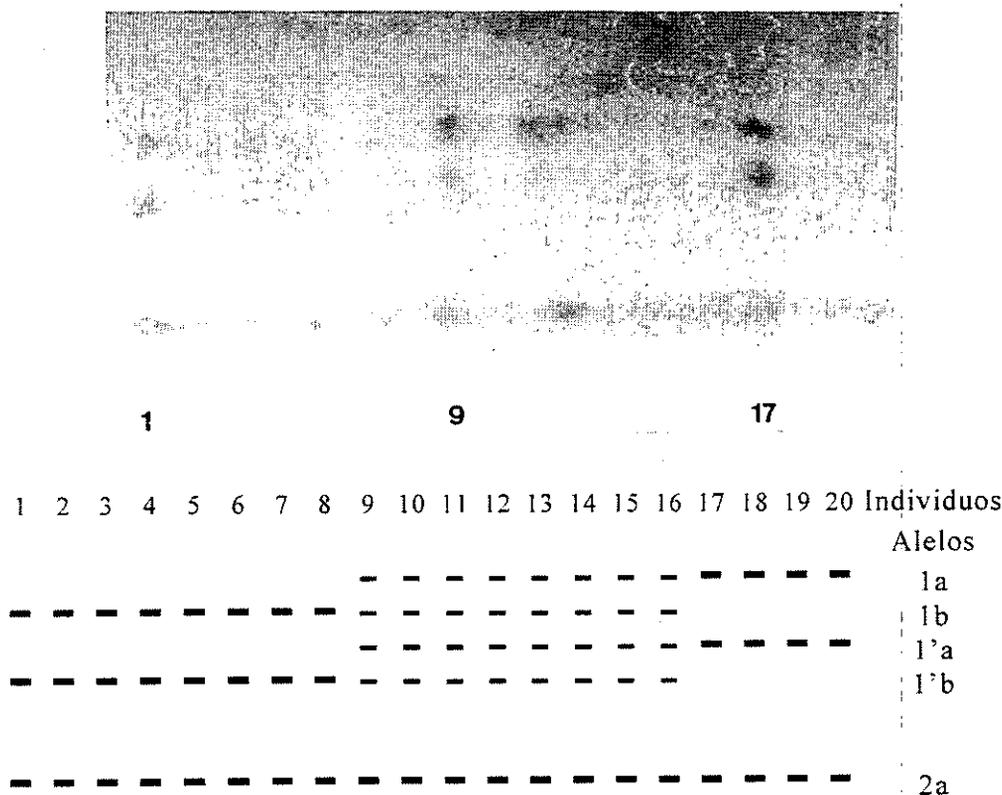


Figura 85. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático PGM (PGM-1, PGM-1' y PGM-2) de gametófitos del grupo *A. obovatum*: 1-8, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (1: esporófito); 9-16, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (9: esporófito); 17-20, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (17: esporófito).

El locus duplicado *Pgm-1* es monomórfico dentro de cada taxon, pero presenta diferentes aloenzimas dependiendo del taxon, por lo que puede ser usado como marcador genético a nivel específico. En cada uno de los loci duplicados, los diploides *A. fontanum* (ambas subespecies), y las variedades *protobillotii* por una lado, y *obovatum* y *deltoideum* por otro de *A. obovatum* subsp. *obovatum* presentan alelos diferentes, exclusivos y siempre en homocigosis (Tabla 16). Los tetraploides *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum* presentan dos bandas en cada uno de los loci duplicados de la PGM-1, típico de los heterocigotos en una enzima dimérica, las más rápidas y que se tiñen más intensamente corresponden a las de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y var. *deltoideum*, y las más lentas a las de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (Figs. 86 y 87); estos heterocigotos no segregan como ya hemos visto, por lo que son heterocigotos fijos para el locus duplicado *Pgm-1* (Fig. 85). Los tetraploides *A. foreziense* y

A. macedonicum presentan un modelo de tres bandas (Fig. 87); la más rápida, de intensidad intermedia, corresponde al alelo del loci duplicado más rápido de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (*Pgm-1a*); la de movilidad intermedia, de mayor intensidad, en realidad corresponde a la superposición de dos alelos, el alelo del locus duplicado más lento de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (*Pgm-1'a*) y el alelo del locus duplicado más rápido de *A. fontanum* (*Pgm-1c*), y la más lenta, de menor intensidad, corresponde al alelo del locus duplicado más lento de *A. fontanum* (*Pgm-1'c*). Estas bandas de los tetraploides *A. foreziense* y *A. macedonicum* en heterocigosis no segregan en los gametófitos, tratándose pues de una heterocigosis fija.

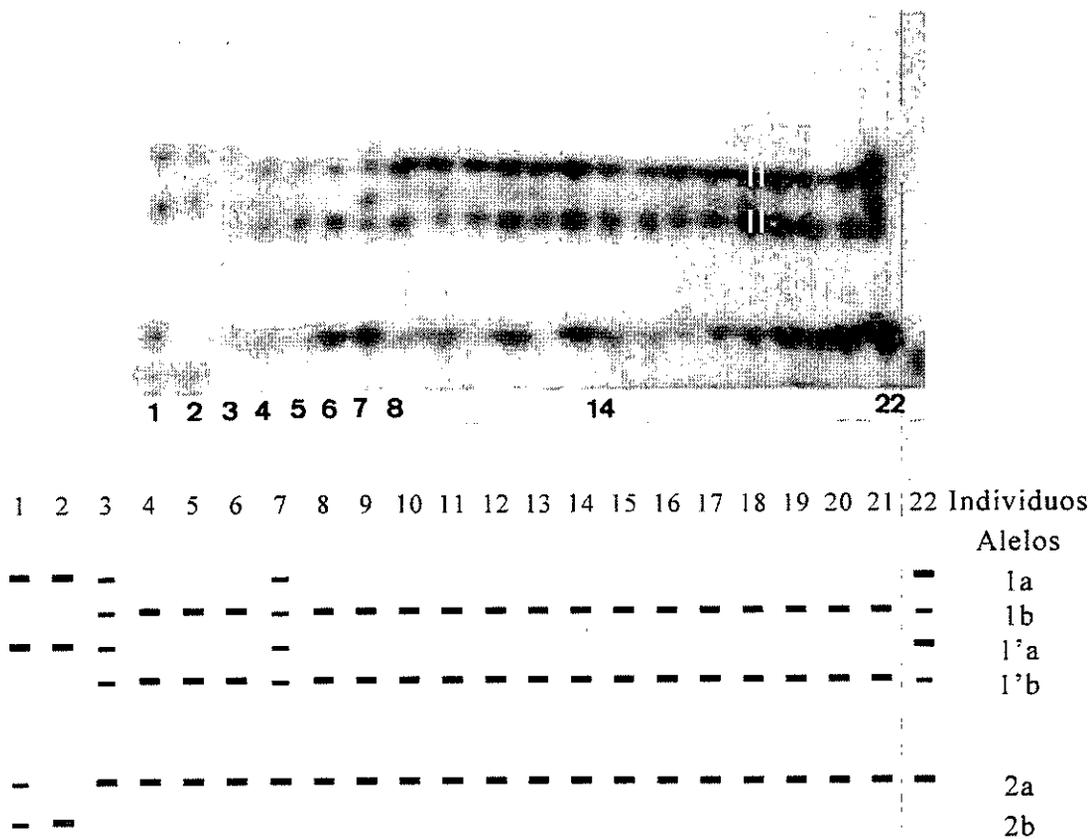
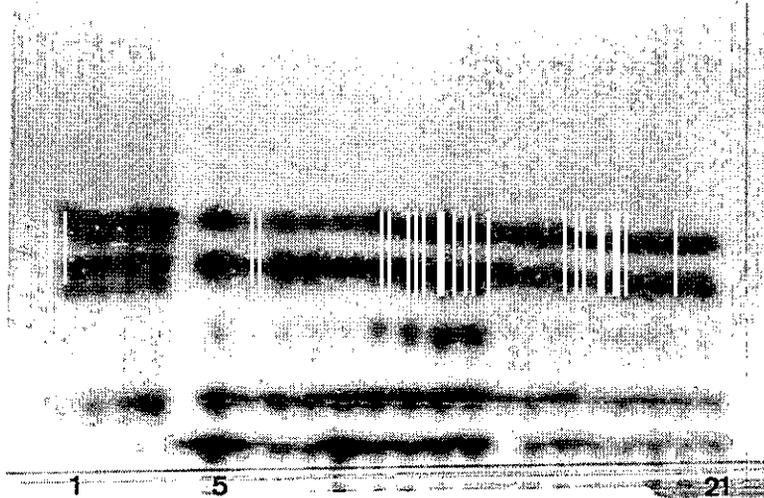


Figura 86. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático PGM (PGM-1, PGM-1' y PGM-2) del grupo *A. obovatum*: 1-2, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; 3 y 7, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 4-6 y 8-21, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*; 22, *A. obovatum* nothosubsp. *cyrnosardoum* nothovar. *ibericum*.

El locus más lento (*Pgm-2*) no está duplicado. Aparecen una o dos bandas tanto en los diploides como en los tetraploides (Figs. 86 y 87, Tablas 16 y 17). En los diploides con dos bandas hay segregación en los gametófitos y así hemos podido interpretar que se trata de un locus en heterocigosis típico de una enzima monomérica. En los tetraploides con dos bandas no hay

segregación en los gametófitos, de nuevo se trata de una heterocigosis fija. Así pues, el locus *Pgm-2* tiene dos alelos diferentes, uno más rápido (*Pgm-2a*) y otro más lento (*Pgm-2b*), que pueden presentarse en homocigosis o en heterocigosis sin depender del taxon ni del nivel de ploidía.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Individuos	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Alelos
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1a
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1b
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1'a + 1c
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1'b
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1'c
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2a
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2b

Figura 87. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático PGM (PGM-1, PGM-1' y PGM-2): 1-4, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 5-21, *A. foreziense*..

La PGM es una enzima que frecuentemente presenta alguno de sus loci duplicado. Duplicaciones en la PGM ya han sido observadas con anterioridad en *Asplenium* (WERTH *et al.*, 1985a), aunque en este caso en la PGM-2, y en otros géneros de pteridófitos (BRYAN & D. SOLTIS, 1987; HAUFLER, 1985a) y de espermatófitos (RIESEBERG & D. SOLTIS, 1987; P. SOLTIS *et al.*, 1987).

En el estudio del fraccionamiento celular se observa actividad en la zona de la PGM-2 en la fracción rica en cloroplastos. Igual ocurre en

Equisetum arvense L. (SOLTIS, 1986), sin embargo en *Athyrium filix-femina* L. es en la PGM-1 (GASTONY & DARROW, 1983).

4.3.1.7. 6-Fosfogluconico deshidrogenasa (6PGD) (E.C.1.1.1.44)

Se trata de una enzima dimérica y generalmente presenta dos formas codificadas por loci diferentes (KEPHART, 1990). En los zimogramas se observan dos zonas de actividad de desigual intensidad (Fig. 88) y que hemos interpretado como dos isoenzimas (6PGD-1 y 6PGD-2) codificadas cada una por un locus.

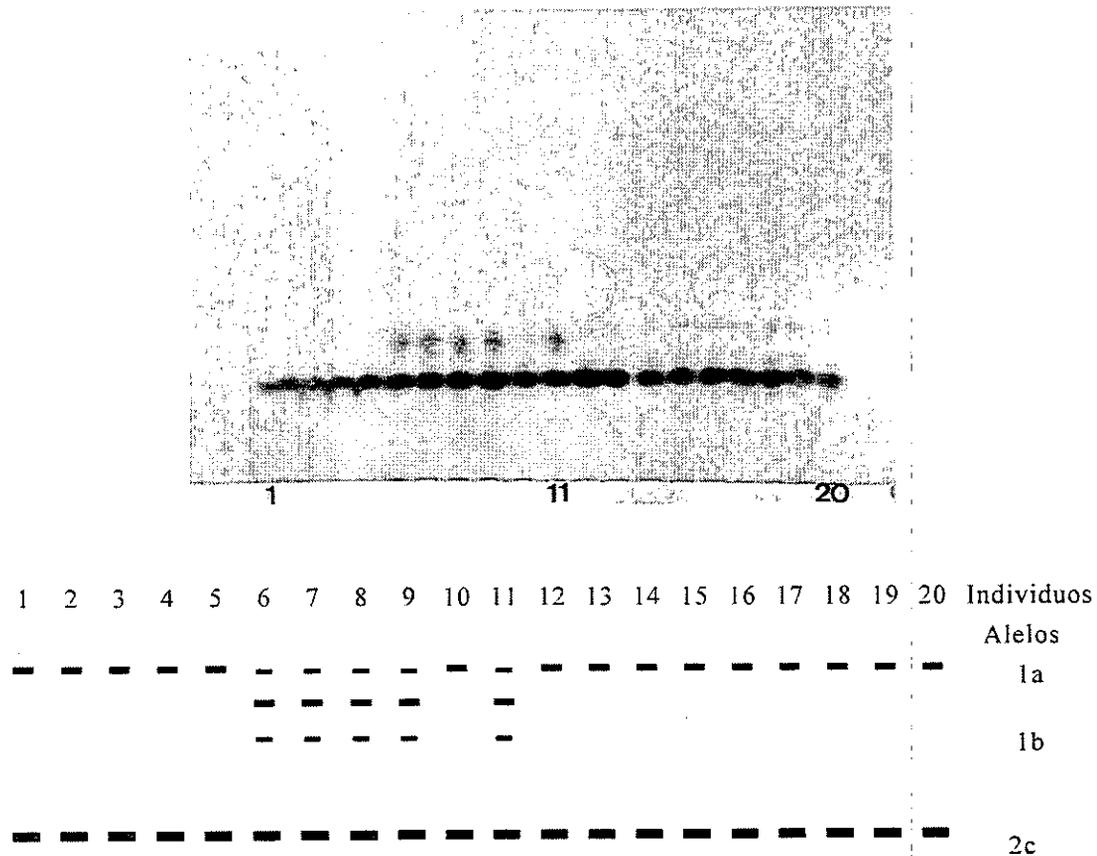


Figura 88. Fotografía y esquema del zimograma del sistema enzimático 6PGD (6PGD-1 y 6PGD-2) de la población TOR de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*.

La 6PGD-1 se tiñe con menor intensidad y sólo la hemos podido interpretar en los táxones del grupo *A. obovatum*. Presenta dos fenotipos, uno de una banda que corresponde a los individuos homocigotos y otro de tres bandas que corresponde al modelo de los heterocigotos de una enzima dimérica (Fig. 88). Todos los individuos estudiados de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* son homocigotos y homogéneos para el alelo más rápido (*6Pgd-1a*) (Tabla 16), y los de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var.

obovatum y var. *deltoideum* lo son para el alelo más lento (*6Pgd-1b*) (Tabla 16). En el tetraploide *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* aparecen tanto individuos homocigotos para uno u otro alelo, como heterocigotos (Fig. 88, Tabla 17).

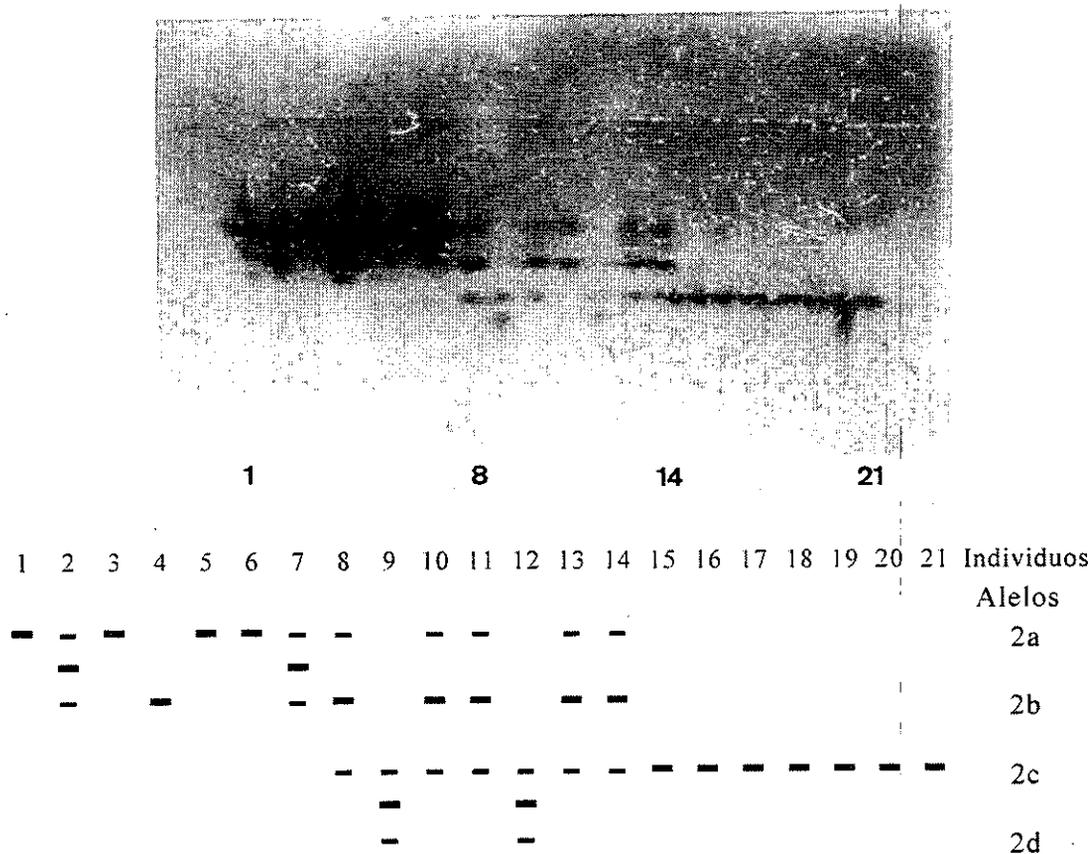


Figura 89. Fotografía y esquema del zimograma de la isoenzima 6PGD-2: 1-7, *A. fontanum* subsp. *fontanum*; 8, 10, 11, 13 y 14, *A. foreziense*; 9, 12 y 15-21, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*.

En la 6PGD-2 aparecen cuatro alelos diferentes (Fig. 89), los dos más rápidos (*6Pgd-2a* y *6Pgd-2b*) son específicos de *A. fontanum* y los dos más lentos (*6Pgd-2c* y *6Pgd-2d*) del grupo *A. obovatum* (Tablas 16 y 17). En *A. fontanum* la variabilidad es mayor (Tabla 16), habiendo individuos con una única banda, homocigotos para uno u otro alelo, e individuos heterocigotos con las tres típicas bandas de los heterocigotos en las isoenzimas diméricas (Fig. 89).

En cambio, el grupo *A. obovatum* es mucho más homogéneo. Tan solo los cuatro individuos de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* de la población CAB son heterocigotos para los alelos *6Pgd-2c* y *6Pgd-2d* (Tabla 15), el resto de individuos de todos los táxones del grupo son homocigotos para el alelo *6Pgd-2c* (Tablas 16 y 17).

Todos los individuos estudiados de *A. foreziense* y *A. macedonicum* presentan aditividad entre el alelo más frecuente de *A. fontanum* y el único presente en *A. obovatum* subsp. *obovatum* (Tabla 17), por lo que presentan el típico fenotipo de tres bandas de los heterocigotos en las enzimas diméricas. Los gametófitos analizados de *A. foreziense* en este locus, no han segregado por lo que se comportan como heterocigotos fijos. Hemos analizado también la segregación de uno de los individuos heterocigotos de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* de la población CAB (CAB 3) y tampoco ha segregado.

4.3.1.8. Siquímico deshidrogenasa (SDH) (E.C.1.1.1.25)

Se trata de una enzima monomérica con 1 ó 2 formas codificadas por loci diferentes (KEPHART, 1990). En los zimogramas obtenidos se observa una única zona de actividad, que corresponde a un solo locus.

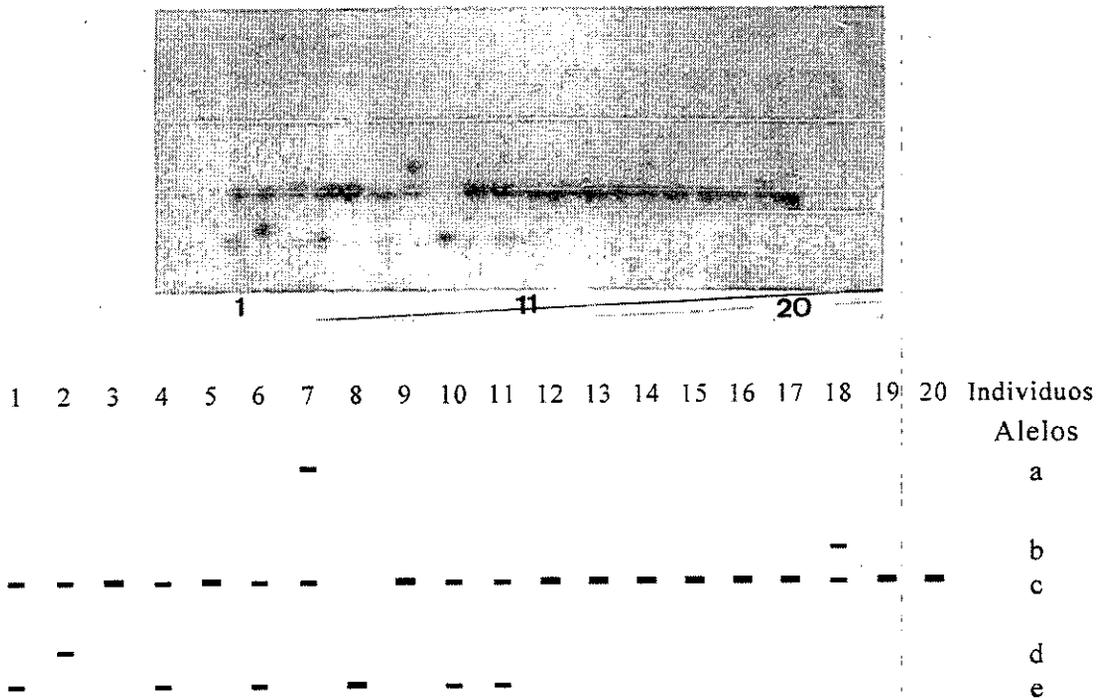


Figura 90. Fotografía y esquema del zimograma de la SDH de la población FOU de *A. fontanum* subsp. *fontanum*.

En todos los táxones del grupo *A. obovatum* es monomórfica con un único fenotipo de una banda (Tablas 16 y 17). En *A. fontanum* es polimórfica y hay hasta 5 alelos diferentes, habiendo fenotipos de una sola banda (homocigotos) y de dos bandas (heterocigotos) (Fig. 90). En *A. foreziense* es polimórfico, aunque menos variable que en *A. fontanum*; la mayoría de los individuos presentan una única banda, la que comparten sus dos parentales, la correspondiente al alelo *Sdh-c* (Tabla 17), algunos individuos presentan dos

bandas, una de ellas siempre es la correspondiente al alelo *Sdh-c*, y la otra a alguno de los alelos presentes en *A. fontanum* (Tabla 14).

En el estudio de localización subcelular no se observa actividad en la zona de la fracción rica en cloroplastos, es decir la isoenzima que actúa en los cloroplastos no se tiñe, bien porque no existe ese locus en el material estudiado, bien porque no se manifieste con los sistemas ensayados.

4.3.1.9. Triosa-fosfato isomerasa (TPI) (E.C.5.3.1.1)

Se trata de una enzima dimérica que generalmente tiene dos formas codificadas por loci diferentes (KEPHART, 1990). En los zimogramas obtenidos se presenta un modelo de bandas complejo, que sólo hemos podido interpretar en parte.

Una banda se tiñe con más intensidad que el resto en cada uno de los táxones diploides y no segrega en los gametófitos (Fig. 91). En todos los individuos estudiados de *A. foreziense* (Fig. 91, Tabla 17) y *A. macedonicum* aparecen aditivas las bandas correspondientes a sus parentales. Lo hemos interpretado como una de las isoenzimas de este sistema enzimático. Además de estas bandas, aparecen una serie de ellas que no hemos podido interpretar y que probablemente se trate de las bandas correspondientes a otro locus.

Este locus presenta dos alelos (*Tpi-1a* y *Tpi-1b*). El más rápido es exclusivo del grupo *A. obovatum* y lo presentan todos los táxones de este grupo, tanto los diploides como los tetraploides (Tablas 16 y 17). El más lento es exclusivo de *A. fontanum* (Tabla 16). En *A. foreziense* y *A. macedonicum* estos dos alelos son aditivos y su fenotipo es el típico modelo de tres bandas de los heterocigotos en las enzimas diméricas; en los gametófitos no segregan por lo que de nuevo se trata de heterocigotos fijos (Fig. 91).

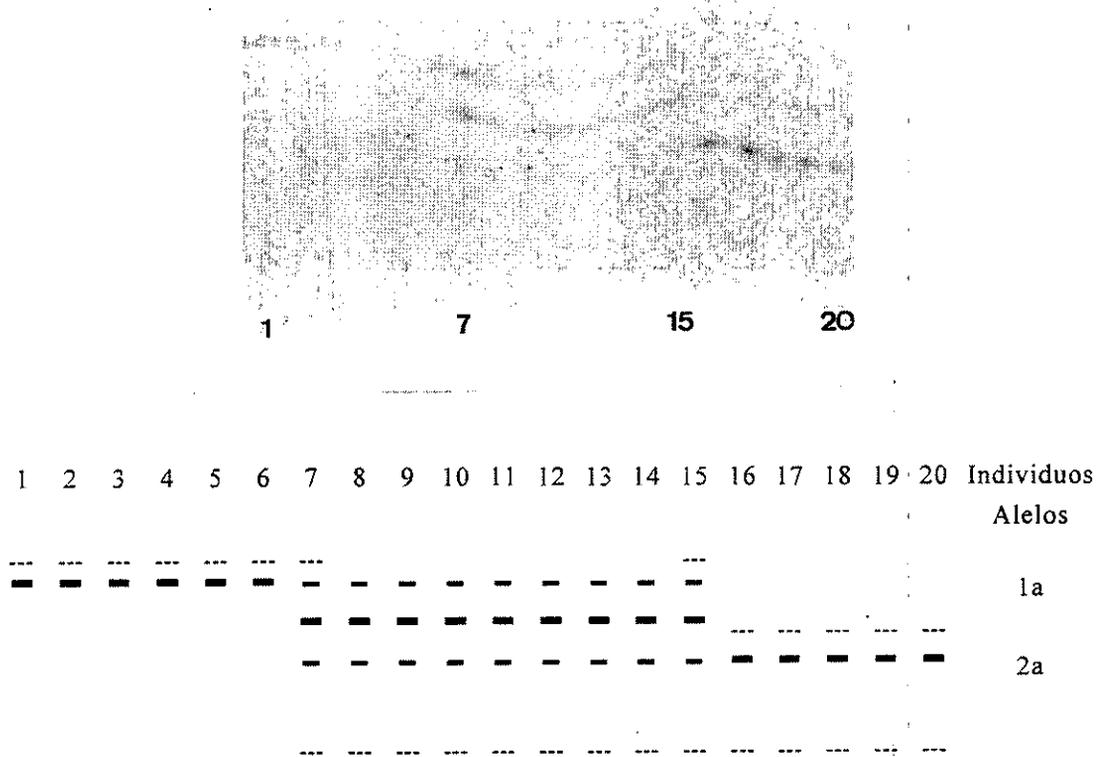


Figura 91. Fotografía y esquema del zimograma del sistema isoenzimático TPI (con línea continua el locus que hemos interpretado como *Tpi-1* y en línea discontinua otro posible locus): 1, esporófito del individuo ALM 11 de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 2-6, gametófitos provenientes de este individuo; 7, esporófito del individuo FRA 32 de *A. foreziense*; 8-15, gametófitos provenientes de este individuo; 16, esporófito del individuo FOU 1 de *A. fontanum* subsp. *fontanum*; 17-20, gametófitos provenientes de este individuo.

4.3.2. PARÁMETROS GENÉTICOS

Hemos ensayado nueve sistemas enzimáticos aparentemente codificados por 16 loci distintos (*Aat-1*, *Lap-1*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-1'*, *Pgm-2*, *6Pgd-1*, *6Pgd-2*, *Sdh* y *Tpi-1*). De éstos, *Idh-1* e *Idh-2* sólo los hemos podidos resolver en el grupo *A. fontanum* y *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1* y *6Pgd-1*, en el grupo *A. obovatum*. Las frecuencias alélicas de cada una de las poblaciones de los táxones diploides se indican en la tabla 12 (*A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. fontanum* subsp. *fontanum*) y en la 13 (*A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum* y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*), y las de todas las poblaciones de todos los diploides en la tabla 16. Las frecuencias de las combinaciones alélicas de

cada una de las poblaciones de los tetraploides aparecen en la tabla 14 (*A. foreziense* y *A. macedonicum*) y en la 15 (*A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y *A. obovatum* subsp. *numidicum*), y las de todas las poblaciones de los tetraploides en la tabla 17.

4.3.2.1. Medidas de la variabilidad genética de las poblaciones de los diploides

Las medidas de la variabilidad genética (A , P , H_o y H_e) de las poblaciones de los diploides se muestran en la tabla 18. Todos los loci en *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum* y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum* son monomórficos: este resultado parece lógico teniendo en cuenta que los individuos de cada taxon provienen de un solo esporófito respectivamente y sólo lo hemos tenido en cuenta en cuestiones taxonómicas. De las poblaciones naturales con un suficiente número de individuos de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*, BON y BEA tienen todos sus loci monomórficos (Tabla 18) y sólo la población VAR tiene un locus polimórfico, *Pgm-2* (Tabla 18).

A. fontanum subsp. *fontanum* exhibe una variabilidad genética ($A = 1.56$; $P = 38.46$; $H_o = 0.136$; $H_e = 0.147$) comparable a la media de otros pteridófitos (GASTONY & GOTTLIEB, 1985; HAUFLE, 1985a; HAUFLE *et al.*, 1995; KIRKPATRICK *et al.*, 1990; RANKER *et al.*, 1996; P. SOLTIS & D. SOLTIS, 1987; P. SOLTIS *et al.*, 1990; WOLF *et al.*, 1988). En cambio, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* tiene unos niveles relativamente más bajos de diversidad genética ($A = 1.3$; $P = 28.6$; $H_o = 0.014$; $H_e = 0.014$), similares a los de *Botrychium virginianum* (L.) Sw. (D. SOLTIS & P. SOLTIS, 1986), *Blechnum spicant* (L.) Roth (P. SOLTIS & D. SOLTIS, 1988a), *Equisetum arvense* L. (D. SOLTIS *et al.*, 1988) y *Hemionitis palmata* L. (RANKER, 1992).

P. SOLTIS & D. SOLTIS (1988a) comentan que aunque los bajos niveles de variación genética observados en *Blechnum spicant* sean reflejo de la baja diversidad genética de esta especie, también pueden ser atribuidos al muestreo; algo similar puede que ocurra en el grupo *A. obovatum*.

Tabla 12. Frecuencias alélicas de las poblaciones estudiadas de *A. fontanum* subsp. *fontanum* (CAM, BET, RIP, EST, GOR, GUA, BUJ, ARA, GAR, CON, FOU, TRA, BAI) y *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum* (TR7400 y TR7402). N: número de individuos.

Loci	POBLACIONES														
	CAM	BET	RIP	EST	GOR	GUA	BUJ	ARA	GAR	CON	FOU	TRA	BAI	TR7400	TR7402
<i>Aat-1</i>															
(N)	-	42	-	13	10	-	20	-	21	-	-	20	-	10	3
a	-	0.952	-	1.000	1.000	-	0.750	-	0.762	-	-	1.000	-	1.000	1.000
b	-	0.048	-	-	-	-	0.250	-	0.238	-	-	-	-	-	-
<i>Idh-1</i>															
(N)	-	-	20	-	-	20	20	20	21	20	-	-	-	-	-
a	-	-	1.000	-	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-
<i>Idh-2</i>															
(N)	-	-	20	-	-	20	20	20	21	20	-	-	-	-	-
a	-	-	0.300	-	-	-	-	0.275	0.095	-	-	-	-	-	-
b	-	-	0.700	-	-	1.000	1.000	0.725	0.905	1.000	-	-	-	-	-
<i>Lap-1</i>															
(N)	-	21	20	-	-	20	2	-	21	20	20	20	4	10	3
b	-	0.952	0.400	-	-	0.625	0.750	-	0.976	0.700	0.675	1.000	0.250	1.000	1.000
c	-	0.048	0.600	-	-	0.375	0.250	-	0.024	0.300	0.325	-	0.750	-	-
<i>Pgi-2</i>															
(N)	17	42	20	13	10	20	20	20	21	20	20	20	4	10	3
a	0.265	0.381	0.025	0.038	-	0.050	0.075	0.050	0.381	-	0.175	0.025	-	-	-
b	0.235	0.429	0.650	0.769	0.950	0.400	0.675	0.475	0.619	0.550	0.450	0.225	0.875	1.000	1.000
c	0.265	-	-	-	-	0.125	-	-	-	0.025	0.025	-	-	-	-
d	0.235	0.190	0.325	0.192	0.050	0.425	0.250	0.475	-	0.425	0.350	0.750	0.125	-	-

Tabla 12. Continuación.

Loci	POBLACIONES														
	CAM	BET	RIP	EST	GOR	GUA	BUJ	ARA	GAR	CON	FOU	TRA	BAI	TR7400	TR7402
<i>Pgm-1</i>															
(N)	1	3	20	-	10	2	4	2	2	2	20	20	4	10	3
c	1.000	1.000	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Pgm-1'</i>															
(N)	1	3	20	-	10	2	4	2	2	2	20	20	4	10	3
c	1.000	1.000	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Pgm-2</i>															
(N)	1	3	20	-	10	2	4	2	2	2	20	20	4	10	3
a	-	-	-	-	-	-	0.125	-	-	-	-	-	-	-	-
b	1.000	1.000	1.000	-	1.000	1.000	0.875	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>6Pgd-2</i>															
(N)	19	22	20	13	10	20	20	19	21	20	20	20	4	10	3
a	0.868	0.864	0.925	0.846	1.000	0.800	0.825	0.789	1.000	1.000	0.750	0.975	0.875	1.000	1.000
b	0.132	0.136	0.075	0.154	-	0.200	0.175	0.211	-	-	0.250	0.025	0.125	-	-
<i>Sdh</i>															
(N)	19	42	20	13	10	20	20	20	21	20	20	20	4	10	3
a	-	-	0.075	-	-	-	-	-	-	-	0.025	-	-	-	-
b	0.421	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.025	-	-	-	-
c	0.579	0.821	0.800	1.000	1.000	0.975	1.000	0.975	1.000	1.000	0.750	0.475	1.000	1.000	1.000
d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.025	-	-	-	-
e	-	0.179	0.125	-	-	0.025	-	0.025	-	-	0.175	0.525	-	-	-
<i>Tpi-1</i>															
(N)	19	42	20	13	10	20	20	20	21	20	20	20	4	10	3
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabla 13. Frecuencias alélicas de las poblaciones estudiadas de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (VAR, BEA, BON, Ras-813 y 815, y Ras-825), *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum* (Ras-1022) y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (MIE y MGC 32201). N: número de individuos.

Loci	POBLACIONES						
	BON	BEA	VAR	RaS-813 y 815	Ras-825	Ras-1022	MIE y MGC 32201
<i>Aat-1</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	10
c	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Lap-1</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
a	-	-	-	-	-	-	1.000
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-
<i>Mdh-1</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.962
b	-	-	-	-	-	-	0.038
<i>Mdh-2</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.025
b	-	-	-	-	-	-	0.975
<i>Mdh-3</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.025
b	-	-	-	-	-	-	0.975
<i>Pgi-1</i>							
(N)	28	19	7	-	-	-	10
a	1.000	1.000	1.000	-	-	-	1.000
<i>Pgi-2</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.988
c	-	-	-	-	-	-	0.012

Tabla 13. Continuación.

Loci	POBLACIONES						
	BON	BEA	VAR	RaS-813 y 815	Ras-825	Ras-1022	MIE y MGC 32201
<i>Pgm-1</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	25
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-
b	-	-	-	-	-	-	1.000
<i>Pgm-1'</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	25
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-
b	-	-	-	-	-	-	1.000
<i>Pgm-2</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	25
a	1.000	-	0.214	-	-	1.000	1.000
b	-	1.000	0.786	1.000	1.000	-	-
<i>6Pgd-1</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
a	-	-	-	-	-	-	1.000
b	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-
<i>6Pgd-2</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
c	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Sdh</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
c	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Tpi-1</i>							
(N)	28	19	7	2	1	1	40
a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabla 14. Frecuencias de las combinaciones alélicas de las poblaciones estudiadas de *A. foreziense* (AH105F-130 y FIL, TIO, BON, BUF, MUL, CAB, FRA, RV6044-6046) y *A. macedonicum* (J1). N: número de individuos.

Loci	POBLACIONES								
	AH-105-130F y FIL	TIO	BON	BUF	MUL	CAB	FRA	RV6044-RV6046	J1
<i>Aat-1</i>									
(N)	11	6	-	4	20	8	7	3	12
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ac	1.000	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lap-1</i>									
(N)	6	6	-	2	20	8	7	3	12
bb	1.000	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Pgi-2</i>									
(N)	21	6	3	28	20	8	7	3	12
bb	1.000	-	1.000	0.928	1.000	0.875	0.286	-	-
bc	-	-	-	0.071	-	-	-	-	-
cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bd	-	1.000	-	-	-	0.125	0.714	1.000	1.000
cd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pgm-1</i>									
(N)	6	6	3	28	20	8	7	3	12
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ac	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pgm-1'</i>									
(N)	6	6	3	28	20	8	7	3	12
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ac	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 14. Continuación.

Loci	POBLACIONES								
	AH-105-130F y FIL	TIO	BON	BUF	MUL	CAB	FRA	RV6044-RV6046	J1
<i>Pgm-2</i>									
(N)	6	6	3	28	20	8	7	3	12
aa	-	-	-	-	-	-	0.143	-	-
ab	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.857	1.000	1.000
bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>6Pgd-2</i>									
(N)	21	6	3	28	20	8	7	3	12
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ac	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sdh</i>									
(N)	21	6	3	28	20	8	7	3	12
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ac	-	1.000	-	-	-	-	0.286	-	-
cc	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000	0.714	1.000	1.000
<i>Tpi-1</i>									
(N)	21	6	3	28	20	8	7	3	12
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ab	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 15. Frecuencias de las combinaciones alélicas de las poblaciones estudiadas de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (CIG, AH92F-104F, TIM, HOY, AH51F-88F y MIE, CHE, TOR, VAL, TUY, CAB, ALM, NAV) y *A. obovatum* subsp. *numidicum* (MGC 28503). N: número de individuos.

Loci	POBLACIONES												
	CIG	AH92F-AH104F	TIM	HOY	AH51-88 y MIE	CHE	TOR	VAL	TUY	CAB	ALM	NAV	MGC 28503
<i>Aat-1</i>													
(N)	6	1	1	20	12	2	2	2	1	4	20	1	6
cc	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Lap-1</i>													
(N)	6	1	14	20	29	2	20	21	1	4	20	1	6
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ab	1.000	1.000	1.000	0.950	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
bb	-	-	-	0.050	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mdh-1</i>													
(N)	20	13	14	20	33	22	38	21	1	4	20	22	6
aa	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Mdh-2</i>													
(N)	20	13	14	20	33	22	38	21	1	4	20	22	6
aa	-	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-	-	-
ab	1.000	-	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
bb	-	1.000	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mdh-3</i>													
(N)	20	13	14	20	33	22	38	21	1	4	20	22	6
aa	-	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-	-	-
ab	1.000	-	1.000	1.000	1.000	0.909	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
bb	-	1.000	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pgi-1</i>													
(N)	20	-	14	20	10	22	20	21	-	4	20	22	6
aa	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Pgi-2</i>													
(N)	20	-	14	20	33	22	20	21	-	4	20	22	6
bb	1.000	-	1.000	1.000	0.788	1.000	1.000	1.000	-	1.000	1.000	1.000	1.000
bc	-	-	-	-	0.212	-	-	-	-	-	-	-	-
cc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 15. Continuación.

Loci	POBLACIONES												
	CIG	AH92F- AH104F	TIM	HOY	AH51-88 y MIE	CHE	TOR	VAL	TUY	CAB	ALM	NAV	MGC 28503
<i>Pgm-1</i>													
(N)	-	-	-	20	24	-	20	-	1	4	-	22	-
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ab	-	-	-	1.000	1.000	-	1.000	-	1.000	1.000	-	1.000	-
bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pgm-1'</i>													
(N)	-	-	-	20	24	-	20	-	1	4	-	22	-
aa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ab	-	-	-	1.000	1.000	-	1.000	-	1.000	1.000	-	1.000	-
bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pgm-2</i>													
(N)	-	-	-	20	24	-	20	-	-	4	-	-	-
aa	-	-	-	0.100	1.000	-	0.700	-	-	1.000	-	-	-
ab	-	-	-	0.900	-	-	0.300	-	-	-	-	-	-
bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>6Pgd-1</i>													
(N)	20	-	14	20	26	-	38	21	-	-	20	22	-
aa	1.000	-	-	0.300	1.000	-	0.684	0.524	-	-	0.300	0.363	-
ab	-	-	1.000	0.700	-	-	0.315	-	-	-	0.700	0.636	-
bb	-	-	-	-	-	-	-	0.476	-	-	-	-	-
<i>6Pgd-2</i>													
(N)	20	13	14	20	26	22	38	-	1	4	20	22	6
cc	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-	1.000	-	1.000	1.000	1.000
cd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.000	-	-	-
dd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sdh</i>													
(N)	6	13	14	20	33	22	38	21	1	4	20	22	6
cc	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Tpi-1</i>													
(N)	-	-	14	20	33	22	20	21	1	4	20	22	6
aa	-	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabla 16. Frecuencias alélicas de los táxones diploides: 1, *A. fontanum* subsp. *fontanum*; 2, *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*; 3, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum*; 4, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum*; 5, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*. N: número de individuos.

Loci	TÁXONES				
	1	2	3	4	5
<i>Aat-1</i>					
(N)	126	13	57	1	10
a	0.905	1.000	-	-	-
b	0.095	-	-	-	-
c	-	-	1.000	1.000	1.000
<i>Lap-1</i>					
(N)	152	13	57	1	40
a	-	-	-	-	1.000
b	0.753	1.000	1.000	1.000	-
c	0.247	-	-	-	-
<i>Idh-1</i>					
(N)	121	-	-	-	-
a	1.000	-	-	-	-
<i>Idh-2</i>					
(N)	121	-	-	-	-
a	0.112	-	-	-	-
b	0.888	-	-	-	-
<i>Mdh-1</i>					
(N)	-	-	57	1	40
a	-	-	1.000	1.000	0.962
b	-	-	-	-	0.038
<i>Mdh-2</i>					
(N)	-	-	57	1	40
a	-	-	1.000	1.000	0.025
b	-	-	-	-	0.975
<i>Mdh-3</i>					
(N)	-	-	57	1	40
a	-	-	1.000	1.000	0.025
b	-	-	-	-	0.975
<i>Pgi-1</i>					
(N)	-	-	51	1	10
a	-	-	1.000	1.000	1.000
<i>Pgi-2</i>					
(N)	247	13	57	1	40
a	0.150	-	-	-	-
b	0.512	1.000	1.000	1.000	0.988
c	0.032	-	-	-	0.013
d	0.306	-	-	-	-
<i>Pgm-1</i>					
(N)	91	13	57	1	25
a	-	-	1.000	1.000	-
b	-	-	-	-	1.000
c	1.000	1.000	-	-	-

Tabla 16. Continuación.

Loci	TÁXONES				
	1	2	3	4	5
<i>Pgm-1'</i>					
(N)	91	13	57	1	25
a	-	-	1.000	1.000	-
b	-	-	-	-	1.000
c	1.000	1.000	-	-	-
<i>Pgm-2</i>					
(N)	91	13	57	1	25
a	0.005	-	0.518	1.000	1.000
b	0.995	1.000	0.482	-	-
<i>6Pgd-1</i>					
(N)	-	-	51	1	40
a	-	-	-	-	1.000
b	-	-	1.000	1.000	-
<i>6Pgd-2</i>					
(N)	228	13	57	1	40
a	0.884	1.000	-	-	-
b	0.116	-	-	-	-
c	-	-	1.000	1.000	1.000
<i>Sdh</i>					
(N)	249	13	57	1	40
a	0.008	-	-	-	-
b	0.034	-	-	-	-
c	0.855	1.000	1.000	1.000	1.000
d	0.002	-	-	-	-
e	0.100	-	-	-	-
<i>Tpi-1</i>					
(N)	249	13	57	1	40
a	-	-	1.000	1.000	1.000
b	1.000	1.000	-	-	-

Tabla 17. Frecuencias de las combinaciones alélicas de los táxones tetraploides: 1, *A. foreziense*; 2, *A. macedonicum*; 3, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*; 4, *A. obovatum* subsp. *numidicum*. N: número de individuos.

Loci	TÁXONES			
	1	2	3	4
<i>Aat-1</i>				
(N)	59	12	72	6
aa	-	-	-	-
ac	1.000	1.000	-	-
cc	-	-	1.000	1.000
<i>Lap-1</i>				
(N)	52	12	159	6
ab	-	-	0.994	1.000
bb	1.000	1.000	0.006	-

Tabla 17. Continuación

Loci	TÁXONES			
	1	2	3	4
<i>Mdh-1</i>				
(N)	-	-	228	6
aa	-	-	1.000	1.000
<i>Mdh-2</i>				
(N)	-	-	228	6
aa	-	-	0.004	-
ab	-	-	0.931	1.000
bb	-	-	0.065	-
<i>Mdh-3</i>				
(N)	-	-	228	6
aa	-	-	0.004	-
ab	-	-	0.931	1.000
bb	-	-	0.065	-
<i>Pgi-1</i>				
(N)	-	-	173	6
aa	-	-	1.000	1.000
<i>Pgi-2</i>				
(N)	96	12	196	6
bb	0.823	-	0.965	1.000
bc	0.021	-	0.035	-
bd	0.156	1.000	-	-
<i>Pgm-1</i>				
(N)	81	12	91	6
ab	-	-	1.000	1.000
ac	1.000	1.000	-	-
<i>Pgm-1'</i>				
(N)	81	12	91	6
ab	-	-	1.000	1.000
ac	1.000	1.000	-	-
<i>Pgm-2</i>				
(N)	81	12	68	-
aa	0.012	-	0.647	-
ab	0.988	1.000	0.353	-
<i>6Pgd-1</i>				
(N)	-	-	181	-
aa	-	-	0.569	-
ab	-	-	0.375	-
bb	-	-	0.055	-
<i>6Pgd-2</i>				
(N)	96	12	200	6
ac	1.000	1.000	-	-
cc	-	-	0.980	1.000
cd	-	-	0.020	-
<i>Sdh</i>				
(N)	96	12	214	6
ac	0.083	-	-	-
cc	0.917	1.000	1.000	1.000
<i>Tpi-1</i>				
(N)	96	12	177	6
aa	-	-	1.000	1.000
ab	1.000	1.000	-	-

Tabla 18. Variabilidad genética de los diferentes táxones teniendo en cuenta en cada caso los siguientes loci: *A. fontanum* (*Lap-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-1'*, *Pgm-2*, *6Pgd-2*, *Sdh* y *Tpi-1*) y *A. obovatum* subsp. *obovatum* (*Aat-1*, *Lap-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-1'*, *Pgm-2*, *6Pgd-1*, *6Pgd-2*, *Sdh* y *Tpi-1*). Entre paréntesis los errores estándar. En negrita la media de todas las poblaciones del taxon.

Población	Nº medio de individuos por locus	Media de nº de alelos por locus (A)	Porcentaje de loci polimórficos (P)	Heterocigosis media	
				H _o	H _e
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>					
CAM	9.8 (3.3)	1.6 (0.4)	37.5	0.158 (0.12)	0.188 (0.10)
BET	22.3 (6.4)	1.6 (0.3)	50.0	0.128 (0.07)	0.159 (0.08)
RIP	20.0 (0.0)	1.8 (0.3)	50.0	0.244 (0.11)	0.183 (0.08)
EST	7.0 (2.3)	1.4 (0.3)	25.0	0.048 (0.03)	0.082 (0.05)
GOR	8.9 (1.1)	1.3 (0.2)	25.0	0.138 (0.12)	0.138 (0.12)
GUA	13.3 (3.3)	1.8 (0.4)	50.0	0.169 (0.11)	0.190 (0.09)
BUJ	11.8 (3.1)	1.6 (0.3)	50.0	0.206 (0.08)	0.192 (0.08)
ARA	10.8 (3.4)	1.5 (0.3)	37.5	0.108 (0.07)	0.119 (0.07)
GAR	13.9 (3.5)	1.3 (0.2)	25.0	0.042 (0.03)	0.066 (0.06)
CON	13.3 (3.3)	1.4 (0.3)	25.0	0.112 (0.08)	0.120 (0.08)
FOU	20.0 (0.0)	2.1 (0.5)	50.0	0.225 (0.10)	0.239 (0.09)
TRA	20.0 (0.0)	1.5 (0.3)	37.5	0.125 (0.08)	0.120 (0.74)
BAI	4.0 (0.0)	1.4 (0.2)	37.5	0.063 (0.04)	0.116 (0.06)
		1.56	38.46	0.136	0.147
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>					
TR7400	10.0 (0.0)	1.0 (0.0)	0.0	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)
TR7402	3.0 (0.0)	1.0 (0.0)	0.0	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)

Tabla 18. Continuación.

Población	Nº medio de individuos por locus	Media de nº de alelos por locus (A)	Porcentaje de loci polimórficos (P)	Heterocigosis media	
				H _o	H _e
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>obovatum</i>					
BON	28.0 (0.0)	1.0	0.0	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)
BEA	19.0 (0.0)	1.0	0.0	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)
VAR	6.1 (0.6)	1.1 (0.1)	7.1	0.10 (0.01)	0.026 (0.026)
Ras-813 y Ras-815	2.0 (0.0)	1.0	0.0	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)
Ras-825	1.0 (0.0)	1.0	0.0	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)
		1.02	1.42	0.02	0.005
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>deltoideum</i>					
Ras-1022	1.0 (0.0)	1.0	0.0	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>protobillotii</i>					
MIE y MGC 32201	32.5 (3.0)	1.3 (0.1)	28.6	0.014 (0.007)	0.014 (0.007)

4.3.2.2. Identidad y distancia genética de los diploides

En la tabla 19 se muestran los valores de identidad y distancia genética de las poblaciones del grupo *A. fontanum*, en la tabla 20 los de las poblaciones del grupo *A. obovatum*, y en la tabla 21 aparecen estos parámetros de los táxones diploides. La figura 92 es el dendrograma construido a partir de la matriz de identidad genética de las poblaciones del grupo *A. fontanum*, la figura 93 el de las poblaciones del grupo *A. obovatum*, y la figura 94 el de los táxones diploides.

La media de la identidad genética de las diferentes poblaciones de *A. fontanum* subsp. *fontanum* es de 0.952, con un valor mínimo de 0.844 y un valor máximo de 0.991. En *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* es algo superior (0.965) con un valor mínimo de 0.929 y un valor máximo de 1. Con estos resultados podemos interpretar que no existen diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas de estos diploides; sin embargo VOGEL *et al.* (1996), utilizando métodos moleculares con ADN cloroplástico, llegan a la conclusión de que existen variaciones entre poblaciones geográficamente separadas de *A. fontanum* subsp. *fontanum*.

Nuestros valores son similares a los obtenidos en otras especies de pteridófitos (D. SOLTIS & P. SOLTIS, 1989).

El valor medio de la identidad genética entre *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum* es de 0.968, superior a la media de la identidad genética de las distintas poblaciones de *A. fontanum* subsp. *fontanum*, lo que significa que no existen diferencias genéticas apreciables entre estos dos táxones. Lo mismo ocurre con las variedades *obovatum* y *deltoideum* de *A. obovatum* subsp. *obovatum*, cuya identidad genética es de 0.970.

En cambio los valores de identidad genética entre los distintos táxones diploides son bajos. Para *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* es de 0.372 (Tabla 21), algo superior al valor obtenido para *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*, 0.189 (Tabla 21). El valor obtenido para las variedades *obovatum* y *protobillotii* de *A. obovatum* subsp. *obovatum* es de 0.582 (Tabla 21). D. SOLTIS & P. SOLTIS (1989) dan una media de identidad genética de 0.33 para un total de 24 parejas de especies del mismo género de pteridófitos estudiados por diversos autores, con un rango de variación entre 0.000 y 0.850. HAUFLER (1996) da una media de identidad genética de 0.542 para un total de 4 parejas de especies del mismo género de pteridófitos de regiones templadas y una media de 0.941 para un total de 4 pares de parejas de especies del mismo género de regiones tropicales de pteridófitos estudiados por otros autores. Como se observa, la varibilidad es muy grande, por lo que no pueden ser considerados como datos concluyentes a nivel taxonómico. D. SOLTIS & P. SOLTIS (1989) señalan que los bajos valores de I entre táxones de rango infraespecífico de pteridófitos indican que probablemente no ocurran hibridaciones ni exista flujo genético entre estos táxones y, en cualquier caso, sugieren que son táxones muy antiguos.

Poblaciones	GUA	CON	GAR	BUJ	ARA	GOR	EST	BAI	RIP	FOU	BET	CAM	TRA	TR7400	TR7402
GUA	-	0.991	0.954	0.986	0.978	0.961	0.966	0.955	0.980	0.991	0.966	0.942	0.928	0.941	0.941
CON	0.009	-	0.967	0.990	0.980	0.974	0.977	0.956	0.981	0.982	0.968	0.940	0.933	0.964	0.964
GAR	0.048	0.03	-	0.977	0.970	0.952	0.985	0.911	0.933	0.961	0.989	0.954	0.904	0.982	0.982
BUJ	0.014	0.011	0.024	-	0.982	0.977	0.989	0.958	0.972	0.984	0.975	0.938	0.912	0.977	0.977
ARA	0.022	0.020	0.031	0.018	-	0.931	0.988	0.900	0.938	0.978	0.982	0.958	0.950	0.962	0.962
GOR	0.040	0.026	0.049	0.023	0.071	-	0.959	0.989	0.983	0.956	0.934	0.889	0.857	0.968	0.968
EST	0.034	0.023	0.015	0.011	0.012	0.042	-	0.921	0.942	0.969	0.980	0.947	0.918	0.992	0.992
BAI	0.046	0.045	0.094	0.043	0.105	0.011	0.082	-	0.986	0.947	0.900	0.852	0.824	0.923	0.923
RIP	0.021	0.020	0.069	0.028	0.064	0.017	0.059	0.014	-	0.978	0.938	0.902	0.901	0.934	0.934
FOU	0.009	0.018	0.040	0.017	0.022	0.045	0.031	0.055	0.022	-	0.981	0.955	0.946	0.945	0.945
BET	0.034	0.032	0.011	0.026	0.018	0.068	0.021	0.105	0.064	0.019	-	0.970	0.946	0.962	0.962
CAM	0.059	0.062	0.047	0.064	0.043	0.118	0.055	0.160	0.103	0.047	0.030	-	0.936	0.924	0.924
TRA	0.075	0.069	0.101	0.092	0.051	0.154	0.086	0.194	0.104	0.056	0.056	0.066	-	0.888	0.888
TR7400	0.060	0.036	0.018	0.023	0.038	0.033	0.008	0.080	0.68	0.056	0.039	0.079	0.119	-	1.000
TR7402	0.060	0.036	0.018	0.023	0.038	0.033	0.008	0.080	0.68	0.056	0.039	0.079	0.119	0.000	-

Tabla 19. Identities genéticas (por encima de la diagonal) y distancias genéticas (por debajo de la diagonal) (NEI, 1972) entre pares de poblaciones de *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*.

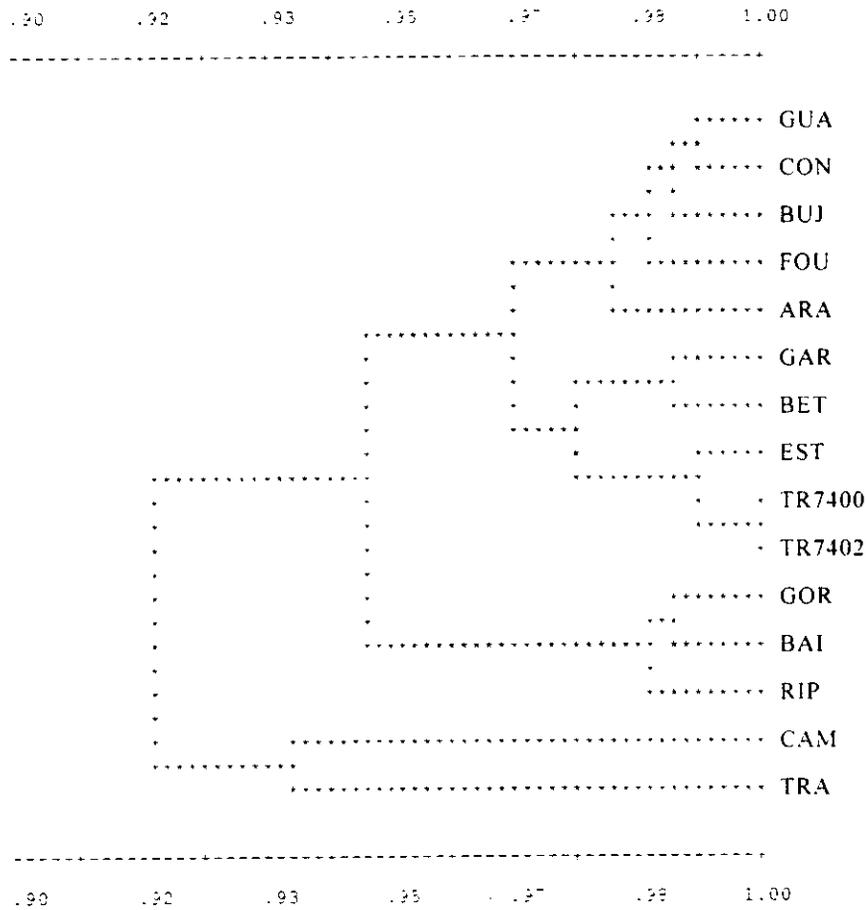


Figura 92. Dendrograma construido a partir de la matriz de identidad genética de las poblaciones de *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum*.

Poblaciones	VAR	BEA	BON	Ras-813 Ras-815	Ras-825	Ras-1022	MIE y MGC 32201
VAR	-	0.997	0.955	0.997	0.997	0.955	0.525
BEA	0.003	-	0.929	1.000	1.000	0.929	0.504
BON	0.046	0.074	-	0.929	0.929	1.000	0.575
Ras-813 y Ras-815	0.003	0.000	0.074	-	1.000	0.929	0.504
Ras-825	0.003	0.000	0.074	0.000	-	0.929	0.504
Ras-1022	0.046	0.074	0.000	0.074	0.074	-	0.575
MIE y MGC 32201	0.644	0.686	0.553	0.686	0.686	0.553	-

Tabla 20. Identidades genéticas (por encima de la diagonal) y distancias genéticas (por debajo de la diagonal) (NEI, 1972) entre pares de poblaciones de *A. obovatum* subsp. *obovatum* (variedades *obovatum*, *deltoideum* y *protobillotii*).

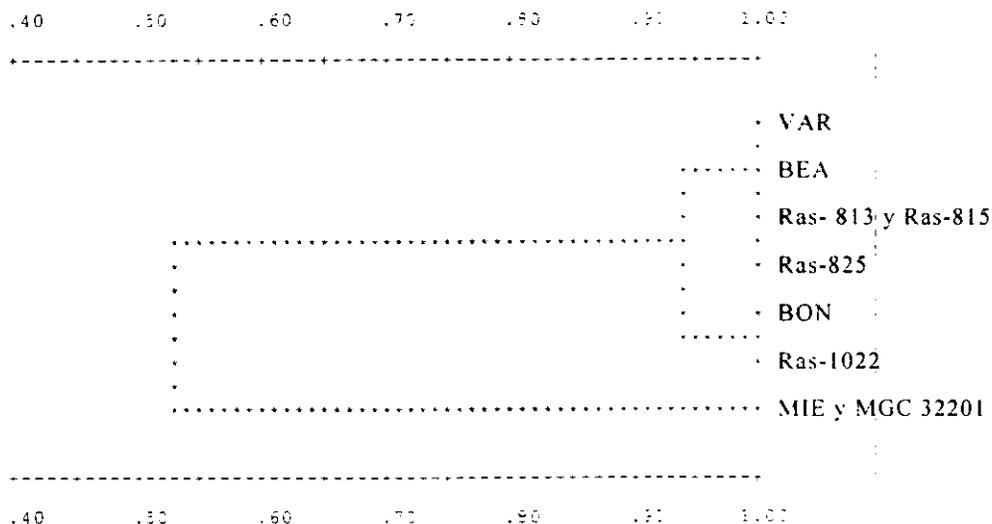


Figura 93. Dendrograma construido a partir de la matriz de identidad genética de las poblaciones de las variedades *obovatum*, *deltoideum* y *protobillotii* de *A. obovatum* subsp. *obovatum*.

Táxones	1	2	3	4	5
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i>	-	0.968	0.372	0.294	0.189
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>pseudofontanum</i>	0.032	-	0.450	0.375	0.249
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>obovatum</i>	0.989	0.799	-	0.970	0.582
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>deltoideum</i>	1.224	0.981	0.030	-	0.624
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>protobillotii</i>	1.664	1.391	0.540	0.471	-

Tabla 21. Identidades genéticas (por encima de la diagonal) y distancias genéticas (por debajo de la diagonal) (NEI, 1972) entre los táxones diploides.

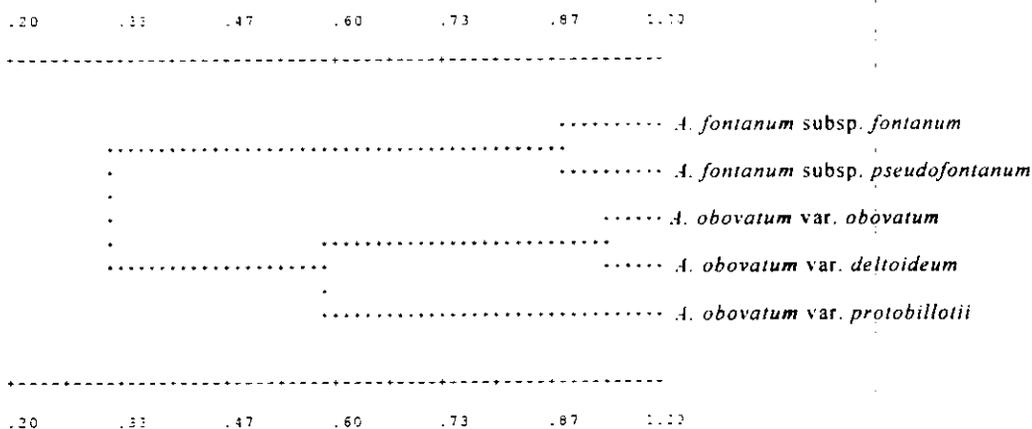


Figura 94. Dendrograma construido a partir de la matriz de identidad genética de los táxones diploides.

4.3.2.3. Índice de fijación de Wright (F) de los diploides

Este índice es un estimador indirecto del sistema de reproducción que opera dentro de las poblaciones (WRIGHT, 1969), y así lo hemos utilizado (ver apartado 4.2.2.3, pág. 119). En la tabla 22 se señala el índice de fijación (F) de las poblaciones de *A. fontanum* subsp. *fontanum*, y en la tabla 23 el de las poblaciones de *A. obovatum* subsp. *obovatum*.

Población	Loci						
	<i>Aat-1</i>	<i>Idh-2</i>	<i>Lap-1</i>	<i>Pgi-2</i>	<i>Pgm-2</i>	<i>6Pgd-2</i>	<i>Sdh</i>
CAM				-0.335***	-	-0.152	1.000***
BET	1.000***		-0.050	0.100	-	1.000***	-0.217
RIP		0.286	-0.667*	-0.273	-	-0.081	-0.181
EST	-			0.376	-	0.409	-
GOR	-			-0.053	-	-	-
GUA		-	-0.173	-0.170	-	1.000***	-0.026
BUJ	1.000***	-		-0.155*	-0.143	-0.212	-
ARA		-0.129		0.085	-	0.050	-0.026
GAR	1.000***	-0.105	-0.240	0.394*	-	-	-
CON		-	0.524*	-0.356	-	-	-
FOU			0.430	-0.165	-	-0.067	0.012
TRA	-		-	-0.036	-	-0.26	-0.103
BAI			1.000**	-0.143	-	-0.143	-

Tabla 22. Índice de fijación (F) de las poblaciones de *A. fontanum* subsp. *fontanum*. Sin asterisco significa que los valores no difieren significativamente de 0; * indica un nivel de significación de $P < 0.05$; ** indica un nivel de significación de $P < 0.01$; *** indica un nivel de significación de $P < 0.001$.

Población	Loci				
	<i>Pgm-2</i>	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Mdh-3</i>	<i>Pgi-2</i>
VAR	0.576*	-	-	-	-
MIE	-	-0.039	-0.026	-0.026	-0.13

Tabla 23. Índice de fijación (F) de las poblaciones de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (VAR) y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (MIE). Sin asterisco significa que los valores no difieren significativamente de 0; * indica un nivel de significación de $P < 0.05$.

4.3.2.4. Parámetros genéticos de los tetraploides

Se observa que no existen diferencias en las combinaciones alélicas entre *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum*, y *A. foreziense* y *A. macedonicum*.

Al comparar las bandas de los diploides con las de los tetraploides y su comportamiento en la segregación de los gametófitos de los tetraploides hemos obtenido los siguientes resultados.

De los 14 loci resueltos, *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum* presentan 5 loci monomórficos (*Aat-1*, *Mdh-1*, *Pgi-1*, *Sdh* y *Tpi-1*); 5 loci polimórficos en ambos táxones (*Lap-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgm-1* y *Pgm-1'*) y 4 loci polimórficos sólo en *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* (*Pgi-2*, *Pgm-2*, *6Pgd-1* y *6Pgd-2*). Los 5 loci polimórficos en ambos táxones (*Lap-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgm-1* y *Pgm-1'*) aparecen en la mayoría de los individuos en heterocigosis, de tal forma que se suman los alelos específicos de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* y *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* que resultan ser marcadores genéticos. En los tres híbridos artificiales que hemos obtenido de estas dos variedades aparece el mismo modelo de bandas para estos 5 loci que en el tetraploide. Los 4 loci que son polimórficos sólo en *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* aparecen mucho más frecuentemente en homocigosis que en heterocigosis (Tabla 17). Se deduce pues, que en el origen de los tetraploides *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y subsp. *numidicum* han intervenido las variedades *obovatum* y *protobillotii* del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum*.

Hemos estudiado la segregación en gametófitos provenientes de individuos heterocigotos para los loci *Lap-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgm-1*, *Pgm-1'*, *Pgi-2* y *6Pgd-2* de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* y en ningún caso ha habido segregación; son individuos con heterocigosis fija. Ésto, unido a que no hemos observado ningún indicio de herencia tetrasómica, sugiere que *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* se comporta más como un alotetraploide que como un autotetraploide.

Los escasos individuos heterocigotos para la *Pgi-2* de la población MIE de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* tienen las mismas bandas que los pocos individuos heterocigotos de la misma población del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii*. En cambio, los cuatro únicos individuos heterocigotos para la *6Pgd-2* de la población CAB de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* comparten con el resto de individuos de este taxon y con los de sus parentales el alelo más rápido, pero el más lento no aparece en ninguno de los individuos estudiados de sus parentales. Este raro alelo

huérfano quizá no haya aparecido en ningún individuo de sus parentales por cuestiones relacionadas con el muestreo.

De los 9 loci resueltos en los tetraploides *A. foreziense* y *A. macedonicum*, sólo uno, *Lap-1*, es monomórfico. De los polimórficos, 5 de ellos (*Aat-1*, *Pgm-1*, *Pgm-1'*, *6Pgd-2* y *Tpi-1*) aparecen en todos los individuos estudiados en heterocigosis como adición de los alelos de sus parentales, y en los 3 restantes (*Pgi-2*, *Pgm-2* y *Sdh*) hay alelos que comparten sus parentales y aparecen tanto individuos homocigotos, como heterocigotos. En los loci *Lap-1*, *Pgm-1* y *Pgm-1'*, en los que hay alelos específicos en las variedades *obovatum* y *protobillotii* del diploide *A. obovatum* subsp. *obovatum*; *A. foreziense* y *A. macedonicum* expresan los alelos de la variedad *obovatum* (Tablas 16 y 17), por lo que es ésta la variedad de *A. obovatum* subsp. *obovatum* que ha intervenido en su origen, junto a *A. fontanum*.

En *A. foreziense*, los loci *Aat-1*, *Pgm-1*, *Pgm-1'*, *6Pgd-2* y *Tpi-1* no segregan en los gametófitos; hay heterocigosis fija como cabría esperar al tratarse de un alotetraploide.

En cuanto al origen politópico de los tetraploides, hemos observado evidencia de que en *A. foreziense* han intervenido al menos dos líneas de *A. fontanum*. En el loci *Pgi-2* de *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* todos los individuos son homocigotos para el alelo *Pgi-2b* y en *A. fontanum* aparecen tanto homocigotos como heterocigotos con 4 alelos diferentes (*Pgi-2a*, *Pgi-2b*, *Pgi-2c* y *Pgi-2d*). La mayoría de los individuos de *A. foreziense* son homocigotos para el alelo *Pgi-2b* o bien heterocigotos para los alelos *Pgi-2b* y *Pgi-2d* (Tabla 17), lo que se puede explicar por la combinación de un *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *obovatum* (como ya hemos visto, homocigoto para el alelo *Pgi-2b*) y un *A. fontanum* heterocigoto para los alelos *Pgi-2b* y *Pgi-2d*. Pero hay dos individuos de *A. foreziense* de la población BUF (Tabla 14) que son heterocigotos para los alelos *Pgi-2b* y *Pgi-2c*, por lo que en su origen ha tenido que intervenir otro *A. fontanum* diferente que tuviera el alelo *Pgi-2c*. D. SOLTIS & P. SOLTIS (1993) señalan que es más frecuente en los poliploides el origen politópico.

En *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* no tenemos evidencia clara de su posible origen politópico. Tan sólo ha habido dos casos en los que han aparecido individuos que no tienen las combinaciones alélicas más frecuentes del resto de los individuos, pero sin más datos, por ellos solos no explican un posible origen múltiple de este taxon. En la población MIE aparece un pequeño porcentaje (Tabla 15) de individuos heterocigotos para los alelos *Pgi-2b* y *Pgi-2c*, al igual que unos pocos individuos de la misma población de uno de sus padres, *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* (Tabla 13).

Los individuos de la población CAB de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* son heterocigotos para la *6Pgd-2*, a diferencia del resto de los individuos de todo el grupo *A. obovatum*.

En *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* hay evidencias de pérdida de la expresión génica de alguno de los alelos provenientes de sus padres. Lo hemos observado en los loci *Lap-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3* y *6Pgd-1* (Tabla 17). En cada uno de los loci el proceso de diploidización tiene diferente magnitud, mientras que en *Lap-1* el porcentaje de homocigotos es mínimo (0.6%), al igual que en *Mdh-2* y *Mdh-3* (6.9%), en *6Pgd-1* es muy superior (62.4%). En *A. foreziense* y *A. macedonicum* no hemos observado ninguna evidencia de silenciamiento de genes. Ésto puede interpretarse como que el origen de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* es más antiguo que el de *A. foreziense* (incluido *A. macedonicum*).

4.4. CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS Y NOMENCLATURALES

Con todos los datos obtenidos en los diferentes estudios creemos adecuado hacer las siguientes consideraciones

- Todos los datos apuntan a que *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. fontanum* subsp. *pseudofontanum* son dos táxones con áreas disyuntas y que debido a la falta de flujo genético, se encuentran en un proceso de estabilización de ciertos caracteres que podrían resultar diferenciadores en el futuro, aunque genéticamente son prácticamente iguales. A diferencia de los espermatófitos, los helechos homosporos, necesitan acumular una gran cantidad de diferenciación genética y así poder prevenir las escasas o nulas barreras de fertilización que en general tienen (HAUFLER, 1996). Si existen barreras geográficas, en principio, este proceso puede ser más rápido al no existir apenas flujo genético entre las poblaciones. Si hasta el momento parece que genéticamente estos táxones son muy similares puede explicarse porque la separación entre ellos ha sido relativamente reciente y todavía no han acumulado la suficiente diferenciación genética. Quizá puedan estar en un proceso de especiación. En opinión de HAUFLER (1996), investigaciones recientes han demostrado que escasas diferenciaciones morfológicas y/o discontinuidades biogeográficas representan muy distintos elementos a nivel genético y crecen las dudas acerca de si es razonable utilizar táxones infraespecíficos con ellos. En espera de más datos, creemos más adecuado mantener el tratamiento taxonómico actual (REICHSTEIN & SCHNELLER, 1982).

- En el grupo *A. obovatum* las evidencias señalan que la variedad *deltoideum* de *A. obovatum* subsp. *obovatum* no tiene consistencia. En cambio la variedad *protobillotii* tiene entidad, como lo demuestran los datos morfológicos del esporófito, los citológicos de híbridos artificiales y los de electroforesis de isoenzimas. La subespecie tetraploide *numidicum* es igual a la subespecie *lanceolatum*, por lo que es más correcto incluirla dentro de *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*. Quizá un buen criterio, similar al que siguen BENNERT & FISCHER (1993) con el grupo *A. trichomanes* L., sea considerar tanto los diploides como los tetraploides del grupo *A. obovatum* con el mismo rango de subespecie; a pesar de que *A. obovatum* subsp. *lanceolatum* se comporte más como un alotetraploide que como un autotetraploide y la tendencia actual sea considerar a los alotetraploides como especies separadas de sus padres. En este caso sus padres son dos táxones muy relacionados, por lo que se le podría considerar un alotetraploide segmental (STEBBINS, 1947) y quizá sea más adecuado tratar a todos los táxones del grupo con rango subespecífico.

El grupo *A. obovatum* quedaría integrado, hasta ahora, por dos subespecies diploides (*obovatum* y *protobillotii*) y una tetraploide (*lanceolatum*). Así pues, proponemos la nueva combinación a nivel subespecífico de *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii*: *Asplenium obovatum* Viv. subsp. *protobillotii* stat. et nom. nov. [*A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst. in *Candollea* 45(1): 244. 1990 (basiónimo)].

- Todos los datos apuntan a considerar a *A. foreziense* y *A. macedonicum* como un mismo taxon. Opinamos, como VIANE *et al.* (1993) que *A. macedonicum* está incluido dentro de *A. foreziense*.

Después de revisar la nomenclatura de los táxones estudiados hemos encontrado dos cuestiones que pasamos a tratar:

- Cuando Antoine Legrand tuvo la intención de considerar como un taxon diferente a unas formas de *A. halleri* (= *A. fontanum*) y lo llamó *A. forisiense* (Ann. Soc. Agric. Industr. Sci. Loire 17: 378. 1873) no designó ningún tipo, lo cual invalida el nombre. Unos años más tarde, aparecen casi de forma simultánea dos exsiccatas, una en 1884 (Flora Selecta Exsiccata, 3) y otra en 1885 (Bull. Soc. Dauphin. Échange Pl., 12) que distribuyen plantas de este taxon asignándole la autoría a Legrand en la publicación antes citada. Se podría considerar a cualquiera de estas dos exsiccatas como la validación del nombre de Legrand.

Flora Selecta Exsiccata sería prioritaria, pero en la etiqueta impresa en que Héribaud daría validez al nombre, aparece como sinónimo la planta distribuida en la otra exsiccata (*A. halleri* forma Soc. dauph. n° 2308 bis); por lo que, a pesar de que la fecha de publicación que aparece en el boletín distribuido junto a la exsiccata de la Société dauphinoise sea un año posterior a la de Flora Selecta Exsiccata, parece claro que se distribuyó con anterioridad, lo que la haría prioritaria.

En la página 500 y 501 del número 12 de Bull. Soc. dauphin. Échange Pl. se dice textualmente: "2308 bis *Asplenium Halleri* DC forma.- D'après M. Le Grand, la plante distribuée sous ce n° est l'*Asplenium foreziense* Le Grand, Statist. bot. du Forez in Soc. agr. Sc. et Arts du département de la Loire, XVII, p. 378. (Note de M. Giraudias.)".

Creemos que el nombre correcto de este taxon sería, por tanto, *Asplenium foreziense* Legrand ex Giraudias in Bull. Soc. dauphin. Échange Pl. 12: 500. 1885.

• Tras ser considerado *A. billotii* un autotetraploide, DEMIRIZ *et al.* (1990) revisan su nomenclatura siguiendo la tendencia actual de considerar a los complejos autoploiploides y a sus padres como subespecies dentro de un mismo taxon específico. Tras señalar que en este caso el nombre más correcto por su biogénesis es el del taxon parental diploide *A. obovatum* Viv., sólo quedaba asignarle el epíteto subespecífico correcto al tetraploide. Después de su estudio, estos autores asignan, aunque no muy convencidos, al taxon tetraploide el epíteto *lanceolatum* de Hudson (DEMIRIZ *et al.*, 1990).

El nombre sería válido, ya que el ICBN (1994), Art. 58.3, permite el uso de epítetos inválidos a nivel específico si no hay obstáculos para su uso en la nueva posición o sentido, salvo por la inclusión de Fiori entre paréntesis que no sería necesaria.

Sin embargo, en la publicación de HUDSON (1778) de *Asplenium lanceolatum* cita en la sinonimia el nombre-frase linneano de *A. trichomanes-ramosum* (aunque cita mal la página del *Species Plantarum*). A pesar de que no está recogido en el ICBN (1994) actualmente, se considera igual que citar el tipo de un binomen linneano, por tanto según el Art. 52.1 este nombre es ilegítimo. *A. lanceolatum* Hudson sería un nombre superfluo para *A. trichomanes-ramosum* L. y su tipo debe de ser el mismo que para éste último, por lo tanto, todos los nombres infraespecíficos basados en el nombre de Hudson están también tipificados por el tipo de *A. trichomanes-ramosum* y no son en absoluto sinónimos de *A. obovatum*.

Por lo tanto, hay que buscar otro nombre correcto que sea sinónimo del taxon tetraploide. Éste es *A. billotii* F.W. Schultz in Flora (Regensburg) 28: 738. 1845. BECHERER (1929) ya utiliza este nombre para el taxon tetraploide como una combinación a nivel varietal de *A. obovatum*. Como hemos comentado anteriormente, creemos más correcto el tratamiento de este taxon a nivel subespecífico, por lo que sería necesario hacer este tipo de combinación. BOLÒS *et al.* (1993) hacen la combinación *A. obovatum* subsp. *billotii*, por lo que creemos que éste sería el nombre correcto de este taxon (*Asplenium obovatum* Viv. subsp. *billotii* (F.W. Schultz) O. Bolòs, Vigo, Masalles & Ninot in Flora manual dels Països Catalans: 1213. 1993).

5. CONCLUSIONES

1. Los esporófitos de los táxones estudiados muestran una elevada variabilidad morfológica, sobre todo en la forma y grado de disección de la fronde. Los caracteres micromorfológicos, tales como la longitud del exosporio, longitud de los estomas, y morfología de las células de la epidermis abaxial, resultan muy útiles a la hora de delimitar los táxones.

2. Se ha comprobado el número cromosomático de los táxones diploides y de los tetraploides en individuos de distintas poblaciones, y se han añadido nuevos datos sobre el comportamiento meiótico de cinco híbridos naturales y dos artificiales relacionados con ellos. Como consecuencia de estos estudios, se ha descrito un nuevo híbrido, *Asplenium x sleepiae* nothosubsp. *krameri*, entre *A. obovatum* subsp. *obovatum* y *A. foreziense*.

3. Las, hasta ahora, variedades *obovatum* y *protobillotii* de *A. obovatum* subsp. *obovatum* son genéticamente distintas, aunque genómicamente muy similares, y esta diferenciación tiene reflejo morfológico en los esporófitos; consideramos más correcto tratarlas como dos subespecies distintas, por lo que se propone la subespecie nueva *A. obovatum* subsp. *protobillotii*. Así mismo, creemos que el nombre válido del taxon tetraploide es *A. obovatum* Viv. subsp. *billotii* (F.W. Schultz) O. Bolòs, Vigo, Masalles & Ninot.

4. Se considera que *A. obovatum* subsp. *obovatum* var. *deltoideum* no tiene entidad como taxon independiente, que *A. macedonicum* es sinónimo de *A. foreziense* y que *A. obovatum* subsp. *numidicum* está incluido en *A. obovatum* subsp. *billotii*. En cuanto a *A. fontanum*, consideramos que el tratamiento taxonómico más adecuado para las poblaciones disyuntas europeas e himalayas en proceso de diferenciación, es el de subespecies que se ha aplicado hasta ahora.

5. Se han estudiado los caracteres morfológicos de la generación gametofítica. La secuencia ontogenética de los gametangios se mantiene constante dentro de un mismo taxon. Es más frecuente en este grupo la formación de protalos inicialmente masculinos que se transforman en bisexuales que la formación inicial de protalos femeninos. Nuestras observaciones indican que la forma de reproducción más frecuente en todos los táxones es la fecundación cruzada.

6. Se han ensayado nueve sistemas enzimáticos aparentemente codificados por 15 loci distintos (*Aat-1*, *Lap-1*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgi-1*, *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *6Pgd-1*, *6Pgd-2*, *Sdh* y *Tpi-1*), de los cuales uno, *Pgm-1*, parece estar duplicado (*Pgm-1* y *Pgm-1'*). Los loci *Lap-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Pgm-1*, *Pgm-1'* y *6Pgd-1* pueden ser usados como marcadores genéticos en *A. obovatum* subsp. *billotii*, y los loci *Aat-1*, *Pgm-1*, *Pgm-1'*, *6Pgd-2* y *Tpi-1* en *A. foreziense*.

7. La variabilidad genética de *A. fontanum* es mayor que la de *A. obovatum* subsp. *obovatum* y subsp. *protobillotii*. Las identidades genéticas entre los distintos táxones diploides son bajas, similares a las de otros pteridófitos que han sido estudiados de zonas templadas. Sin embargo, las identidades genéticas de las distintas poblaciones de los diploides *A. fontanum* subsp. *fontanum* y *A. obovatum* subsp. *obovatum* son relativamente elevadas, lo que indica que existe flujo genético entre ellas.

8. Se confirma, con datos isoenzimáticos, el origen del alotetraploide *A. foreziense*, ya que no hay segregación en los gametófitos de individuos heterocigotos, por lo que se comportan como heterocigotos fijos. De las dos subespecies diploides de *A. obovatum*, es la subespecie *obovatum* la que ha intervenido. De la misma forma, se analiza el origen del tetraploide *A. obovatum* subsp. *billotii*, en el que han intervenido los diploides *A. obovatum* subsp. *obovatum* y subsp. *protobillotii*, y no sólo la subsp. *protobillotii* como se pensaba hasta ahora, comportándose como un alotetraploide segmental.

9. Además, existen evidencias de que en el origen de *A. foreziense* han intervenido al menos dos líneas de *A. fontanum*. En cambio no hay estas evidencias de un posible origen múltiple en *A. obovatum* subsp. *billotii*.

10. Por otro lado, se observa pérdida de la expresión génica en algunos loci en *A. obovatum* subsp. *billotii* y no se observa en *A. foreziense*, lo que podría estar relacionado con que el origen de *A. obovatum* subsp. *billotii* es más antiguo que el de *A. foreziense*, lo que sería también congruente con sus áreas de distribución actuales.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, W., K. Oswal & R. Fischer. 1994. *Exkursionsflora von Österreich*. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart und Wien.
- Aitchison, T. 1881. On the flora of the Kuram Valley, Afghanistan. *J. Linn. Soc., Bot.*, 18: 1-113.
- Aizpuru, I. & P. Catalán. 1986. *Asplenium x recoderi*, nothosp. nov. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 42: 531-532.
- Atkinson, L.R. 1973. The gametophyte and family relationships. In: A.C. Jermy, J.A. Crabe & B.A. Thomas (Eds.). *The phylogeny and classification of the ferns* (Bot. J. Linn. Soc., 67, suppl. 1): 73-90.
- Atkinson, L.R. & A.G. Stokey. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. *Phytomorphology*, 14: 51-71.
- Aymonin, G.G. 1969. Sur l'identification de quelques *Asplenium* (groupe "lanceolatum") de l'ouest du Massif Central français. *Bull. Soc. Bot. France*, 116: 75-80.
- Aymonin, G.G. 1974. L'*Asplenium obovatum* Viv., plante de Corse. Observations sur la définition de l'espèce. *Bull. Soc. Bot. France*, 121: 61-65.
- Badré, F., M. Boudrie, R. Prelli & J. Schneller. 1981. *Asplenium x sleepiae* (*A. billotii* x *A. foreziense*) et *Asplenium x bouharmontii* (*A. obovatum* x *A. onopteris*), hybr. nov. (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., B, Adansonia*, 4: 473-481.
- Badré, F., R. Deschatres & J. Gamisans. 1986. Les ptéridophytes de la Corse. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., B, Adansonia* 4: 423-461.
- Banks, J.A., L. Hickok & M.A. Webb. 1993. The programming of sexual phenotype in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Int. J. Plant Sci.*, 154: 522-534.
- Barrington, D.S., C.A. Paris & T.A. Ranker. 1986. Systematic inferences from spore and stomate size in the ferns. *Amer. Fern J.*, 76: 149-159.
- Battandier, J.A. & L.C. Trabut. 1902. *Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie*. Alger.

- Becherer, A. 1929. Pteridologische Beiträge. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, 38: 24-29.
- Becherer, A. 1935. Note sur deux espèces d'*Asplenium*. *Candollea*, 6: 22-24.
- Bennert, H.W., M. Boudrie & H. Rasbach. 1991. Nouvelles données géographiques et cytologiques sur *Asplenium* x *sarniense* (*Aspleniaceae*, *Pteridophyta*) dans le Massif armoricain (France). Remarques sur le nouveau statut de l'*Asplenium billotii* (= *A. obovatum* subsp. *lanceolatum*). *Bull. Soc. Bot. France, Actual. Bot.*, 138: 187-195.
- Bennert, H.W. & G. Fischer. 1993. Biosystematics and evolution of the *Asplenium trichomanes* complex. *Webbia*, 48: 743-760.
- Bennert, H.W., H. Rasbach & K. Rasbach. 1987. *Asplenium* x *reichsteinii* (= *Asplenium fontanum* x *A. majoricum*; *Aspleniaceae*: *Pteridophyta*), a new endemic fern hybrid from Mallorca, Balearic Islands. *Fern Gaz.*, 13: 133-141.
- Bir, S.S. 1962. Cytological observations on some ferns from Simla (Western Himalayas). *Curr. Sci.*, 31: 248-250.
- Bir, S.S. 1966-67. Correlation between spore-size and polyploid-level in the Himalayan *Asplenioid* and *Athyrioid* ferns. *J. Palynol.*, 2-3: 41-48.
- Bir, S.S., C.K. Satija, P. Goyal & S. Kaur. 1981. Stomatal patterns in some *Asplenioid* ferns from India. *Biol. Bull. India*, 3: 24-34.
- Bir, S.S. & P. Shukla. 1968. Pteridophytic flora of Simla Hills (North Western Himalayas)-II. Families: *Aspleniaceae* and *Blechnaceae*. *Nova Hedwigia*, 16: 469-482.
- Bolòs, O., J. Vigo, R.M. Masalles & J.M. Ninot. 1993. *Flora manual dels Països catalans. Segona edició*. Editorial Pòrtic. Barcelona.
- Boudrie, M. 1994. Observations pteridologiques dans le département de l'Aude. *Monde Pl.*, 451: 1-6.
- Boudrie, M. 1996. Observations pteridologiques dans le département des Pyrénées-Orientales. *Monde Pl.*, 456: 1-8.
- Bouharmont, J. 1977a. Patterns of chromosome evolution in *Aspleniaceae*. *Nucleus*, 20: 65-70.

- Bouharmont, J. 1977b. Cytotaxonomie et évolution chez les *Asplenium*. *Cellule*, 72: 57-74.
- Bouzillé, J.B. & M. Boudrie. 1991. Cinquième journée: Samedi 14 avril: les vallées des Albères. *Bull. Soc. Bot. Centre-Ouest*, 22: 365-372.
- Bovio, M. & G.V. Cerutti. 1993. Segnalazioni Floristiche Italiane: 730. *Asplenium foreziense* Magnier (*Aspleniaceae*). *Inform. Bot. Ital.*, 25: 54.
- Bridson, G.D.R. & E.R. Smith. 1991. *Botanico-Periodicum-Huntianum/ Supplementum*. Hunt Institute for Botanical Documentation. Carnegie Mellon University. Pittsburgh.
- Briquet, J. 1910. *Prodrome de la Flore corse. Tome I*. Lyon.
- Brullo, S., W. de Leonardis & P. Pavone. 1982. Chromosome numbers of some Sicilian ferns. 1. *Webbia*, 35(2): 275-281.
- Bryan, F.A. & D.E. Soltis. 1987. Electrophoretic evidence for allopolyploidy in the fern *Polypodium virginianum*. *Syst. Bot.*, 12: 553-561.
- Callé, J., J.D. Lovis & T. Reichstein. 1975. *Asplenium x contrei* (*A. adiantum-nigrum x A. septentrionale*) hybr. nova et la vrai ascendance de l'*Asplenium x souchei* Litard. *Candollea*, 30: 189-201.
- Christ, H. 1900. *Die Farnkräuter der Schweiz. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, Band I, Heft 2*. Bern.
- Cousens, M.I. 1979. Gametophyte ontogeny, sex expression, and genetic load as measures of population divergence in *Blechnum spicant*. *Amer. J. Bot.*, 66: 116-132.
- Crist, K.C. & D.R. Farrar. 1983. Genetic load and long-distance dispersal in *Asplenium platyneuron*. *Canad. J. Bot.*, 61: 1809-1814.
- Cubas, P., E. Pangua & J.A. Rosselló. 1990. *Asplenium x ticinense* D.E. Meyer en el sector Guadarrámico de Madrid. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 47: 236-239.
- Cubas, P. & A. Sleep. 1994. *Asplenium x sarniense* (*Aspleniaceae*, *Pteridophyta*) from Guernsey (Channel Islands, U.K.): a cytological enigma?. *Fern Gaz.*, 14: 269-288.

- Dalla Torre, K.W. v. 1906. *Flora von Tirol. Vol. 6*. Innsbruck.
- Dedera, D.A. & C.R. Werth. 1987. Inheritance of three isozyme loci in the diploid fern *Asplenium platyneuron*. *J. Heredity*, 78: 201-203.
- Demiriz, H., R.L.L. Viane & T. Reichstein. 1990. *Asplenium obovatum* var. *protobillotii* var. nov. and var. *deltoideum* var. nov. in Turkey, with remarks on the status of *A. billotii*. *Candollea*, 45: 241-259.
- Derrick, L.N., A.C. Jermy & A.M. Paul. 1987. Checklist of European Pteridophytes. *Sommerfeltia*, 6.
- Dhir, K.K. 1980. *Ferns of the North Western Himalayas*. Bibliotheca Pteridologica I. J. Cramer. Vaduz.
- Diekjobst, H. & H.W. Bennert. 1985. Der Französische Streifenfarn (*Asplenium foreziense* Le Grand) neu für Deutschland. *Bot. Jahrb. Syst.*, 106: 99-106.
- Döpp, W. 1950. Eine die Antheridienbildung bei Farnen fördernde Substanz in den Prothallien von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 63: 139-159.
- Dyer, A.F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In: A.F. Dyer (Ed.). *The experimental biology of ferns*: 253-305. Academic Press. London.
- Edwards, M.E. & J.H. Miller. 1972. Growth regulation by ethylene in fern gametophytes. III. Inhibition of spore germination. *Amer. J. Bot.*, 59: 458-465.
- Emmott, J.I. 1964. A cytogenetic investigation in a *Phyllitis-Asplenium* complex. *New Phytol.*, 63: 306-318.
- Ferrarini, E., F. Ciampolini, R.E.G. Pichi Sermolli & D. Marchetti. 1986. Iconographia Palynologica Pteridophytorum Italiae. *Webbia*, 40: 1-202.
- Fritsch, K. 1922. *Exkursionsflora für Österreich*. Wien und Leipzig.
- Gastony, G.J. 1986. Electrophoretic evidence for the origin of fern species by unreduced spores. *Amer. J. Bot.*, 73: 1563-1569.

- Gastony, G.J. 1988. The *Pellaea glabella* complex: electrophoretic evidence for the derivations of the agamosporous taxa and a revised taxonomy. *Amer. Fern J.*, 78: 44-67.
- Gastony, G.J. 1990. Electrophoretic evidence for allotetraploidy with segregating heterozygosity in South African *Pellaea rufa* A.F. Tryon (Adiantaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 77: 306-313.
- Gastony, G.J. & D.C. Darrow. 1983. Chloroplastic and cytosolic isozymes of the homosporous fern *Athyrium filix-femina* L. *Amer. J. Bot.*, 70: 1409-1415.
- Gastony, G.J. & L.D. Gottlieb. 1982. Evidence for genetic heterozygosity in a homosporous fern. *Amer. J. Bot.*, 69: 634-637.
- Gastony, G.J. & L.D. Gottlieb. 1985. Genetic variation in the homosporous fern *Pellaea andromedifolia*. *Amer. J. Bot.*, 72: 257-267.
- Gibby, M. 1982. Hybridization studies involving *Asplenium pseudofontanum* Kossinsky (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Candollea*, 37: 235-242.
- Girard, P.J. & J.D. Lovis. 1968. The rediscovery of *x Asplenophyllitis microdon*, with a report on its cytogenetics. *Brit. Fern Gaz.*, 10: 1-8.
- Gottlieb, L.D. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*, 216: 373-380.
- Gottlieb, L.D. & N.F. Weeden. 1981. Correlation between subcellular location and phosphoglucose isomerase variability. *Evolution*, 35: 1019-1022.
- Greuter, W., H.M. Burdet & G. Long (Eds.). 1984. *Med-Checklist 1. Pteridophyta (ed. 2), Gymnospermae, Dicotyledones (Acanthaceae-Cneoraceae)*. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève. Genève.
- Greuter, W. & K.H. Rechinger. 1967. *Chloris Kythereia, simul purgatorium nomenclaturae florum graecae inchoatum*. *Boissiera*, 13.
- Haufler, C.H. 1985a. Enzyme variability and modes of evolution in *Bommeria* (Pteridaceae). *Syst. Bot.*, 10: 92-104.
- Haufler, C.H. 1985b. Pteridophyte evolutionary biology: the electrophoretic approach. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 86: 315-323.

- Haufler, C.H. 1987. Electrophoresis is modifying our concepts of evolution in homosporous pteridophytes. *Amer. J. Bot.*, 74: 953-966.
- Haufler, C.H. 1989. Towards a synthesis of evolutionary modes and mechanisms in homosporous pteridophytes. *Biochem. Syst. & Ecol.*, 17: 109-115.
- Haufler, C.H. 1996. Species concepts and speciation in pteridophytes. In: J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (Eds.). *Pteridology in perspective*: 291-305. Royal Botanic Gardens. Kew.
- Haufler, C.H. & D.E. Soltis. 1984. Obligate outcrossing in a homosporous fern: field confirmation of a laboratory prediction. *Amer. J. Bot.*, 71: 878-881.
- Haufler, C.H. & D.E. Soltis. 1986. Genetic evidence suggests that homosporous ferns with high chromosome numbers are diploid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 4389-4393.
- Haufler, C.H., M.D. Windham, D.N. Britton & S.J. Robinson. 1985. Triploidy and its evolutionary significance in *Cystopteris protrusa*. *Canad. J. Bot.*, 63: 1855-1863.
- Haufler, C.H., M.D. Windham & E.W. Rabe. 1995. Reticulate evolution in the *Polypodium vulgare* complex. *Syst. Bot.*, 20: 89-109.
- Haufler, C.H., M.D. Windham & T.A. Ranker. 1990. Biosystematic analysis of the *Cystopteris tennesseeensis* (Dryopteridaceae) complex. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77: 314-329.
- Henriet, M. 1970. Développement du gamétophyte et vascularisation du jeune sporophyte chez *Asplenium onopteris* L., *Asplenium obovatum* Viv. et leur hybride. *Cellule*. 68: 157-187.
- Henriet, M., J.P. Auquièrre & P. Moens. 1976. Étude quantitative de la morphogenèse prothallienne dans le genre *Asplenium*. *Cellule*, 71: 185-206.
- Henriet, M. & P. Moens. 1976. Étude morphologique comparée du développement du prothalle dans le genre *Asplenium*. *Cellule*, 71: 157-184.

- Hess, H.E., E. Landolt & R. Hirzel. 1967. *Flora der Schweiz. Band I: Pteridophyta bis Caryophyllaceae*. Birkhäuser Verlag. Basel.
- Herrero, A. & C. Prada. 1997. Nuevas citas para tres híbridos de *Asplenium* (Aspleniaceae, Pteridophyta) en la Península Ibérica. *Acta Bot. Malac.*, 22: 19-27.
- Herrero, A., C. Prada, S. Pajarón & E. Pangua. 1995. A new *Asplenium* hybrid from Spain involving *A. foreziense* Le Grand ex Héribaud (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Anales Jard. Bot. Madrid*, 53: 246-247.
- Herrero, A., C. Prada, S. Pajarón & E. Pangua. 1997a. Números cromosómicos de plantas occidentales. 723-726. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 55: 135.
- Herrero, A., C. Prada, S. Pajarón & E. Pangua. 1997b. Números cromosómicos de plantas occidentales. 742-745. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 55: 429-430.
- Herrero, A., C. Prada, E. Pangua, A. Escudero, A. Rubio & S. Pajarón. 1993. Gametophyte morphology of four subspecies of *Asplenium trichomanes* L. *Bot. Complut.*, 18: 67-77.
- Holbrook-Walker, S.G. & R.M. Lloyd. 1973. Reproductive biology and gametophyte morphology of the Hawaiian fern genus *Sadleria* (Blechnaceae) relative to habitat, diversity and propensity for colonization. *Bot. J. Linn. Soc.*, 67: 157-174.
- Holmgren, P.K., N.H. Holmgren & L.C. Barnett. 1990. *Index Herbariorum. Part I: The herbaria of the world*. Eighth edition. New York Botanical Garden, New York.
- Horjales, M., N. Redondo & P.M. Pérez Prego. 1991. Nota citotaxonómica sobre pteridoflora del noroeste de la Península Ibérica. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 48: 82-84.
- Hudson, W. 1778. *Flora Anglica*. Second edition. London.
- ICBN. 1994. *International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code)*. W. Greuter, F.R. Barrie, H.M. Burdet, W.G. Chaloner, V. Demoulin, D.L. Hawksworth, P.M. Jørgensen, D.H. Nicolson, P.C. Silva, P. Trehane & J. McNeill (Eds.). Koeltz Scientific Books. Königstein.

- Jalas, J. & J. Suominen (Eds.). 1972. *Atlas Florae europaea. I. Pteridophyta*. Helsinki.
- Kephart, S.R. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *Amer. J. Bot.*, 77: 693-712.
- Khullar, S.P. 1994. *An illustrated fern flora of West Himalaya. Vol. 1. Botrichiaceae to Aspleniaceae*. International Book Distributors. Dehra Dun.
- Khullar, S.P., S. Shanti, S. Sharma & C. Verma. 1988. In: S.S Bir (Ed.). SOCGI Plant chromosome number reports-VI. *J. Cytol. Genet.*, 23: 43-51.
- Kirkpatrick, R.E.B., P.S. Soltis & D.E. Soltis. 1990. Mating system and distribution of genetic variation in *Gymnocarpium dryopteris* ssp. *disjunctum*. *Amer. J. Bot.*, 77: 1101-1110.
- Klekowski, E.J. Jr. 1969a. Reproductive biology of the Pteridophyta. II. Theoretical considerations. *Bot. J. Linn. Soc.*, 62: 347-359.
- Klekowski, E.J. Jr. 1969b. Reproductive biology of the Pteridophyta. III. A study of the Blechnaceae. *Bot. J. Linn. Soc.*, 62: 361-377.
- Klekowski, E.J. Jr. 1979. The genetics and reproductive biology of ferns. In: A.F. Dyer (Ed.). *The experimental biology of ferns*: 132-170. Academic Press. London.
- Klekowski, E.J. Jr. & H.G. Baker. 1966. Evolutionary significance of polyploidy in the Pteridophyta. *Science*, 153: 305-307.
- Klekowski, E.J. Jr. & R.M. Lloyd. 1968. Reproductive biology of the Pteridophyta I. General considerations and a study of *Onoclea sensibilis* L. *J. Linn. Soc. Bot.*, 60: 315-324.
- Komarov, V.L. (Ed.). 1968. *Flora of the U.S.S.R. Volume I Archegoniatae and Embryophyta*. Israel Program for Scientific Translations Press. Jerusalem. Traducción de la edición original de 1934 en ruso.
- Korpelainen, H. 1995. Mating system and distribution of enzyme genetic variation in bracken (*Pteridium aquilinum*). *Canad. J. Bot.*, 73: 1611-1617.
- Kossinsky, C. 1922. *Asplenium pseudofontanum* sp. n. *Bot. Mater. Gerb. Glavn. Bot. Sada RSFSR*, III(31): 121-124.

- Kümmerle, J.B. 1916. Adatok a Balkán-félsziget Pteridophytáinak ismeretéhez. *Bot. Közlem.*, 15: 143-148.
- Kümmerle, J.B. 1921. *Asplenium Bornmülleri* Küm. spec. nova. *Bot. Közlem.*, 19: 81-83.
- Kunkel, G. 1966. Zur Pteridophytenflora der Insel Gran Canaria. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, 76: 42-58.
- Kunkel, G. 1971. Lista revisada de los pteridófitos de la Islas Canarias. *Cuad. Bot. Canaria*, 13: 21-46.
- Labatut, A., R. Prelli & J. Schneller. 1984. *Asplenium obovatum* in Brittany, NW France. *Fern Gaz.*, 12: 331-333.
- Legrand, A. 1873. Statistique botanique du Forez. *Ann. Soc. Agric. Industr. Sci. Loire*, 17: 129-416.
- Lin, S.J., M. Kato & K. Iwatsuki. 1996. Electrophoretic evidence for the origins of tetraploids and hybrids of *Sphenomeris chinensis* sensu lato (Lindsaeaceae) in Japan. *Bot. Mag. (Tokyo)*, 109: 201-209.
- Lovis, J.D. 1977. Evolutionary patterns and processes in ferns. *Advances Bot. Res.*, 4: 229-415.
- Lovis, J.D. & G. Vida. 1969 The resynthesis and cytogenetic investigation of x *Asplenophyllitis microdon* and x *A. jacksonii*. *Brit. Fern Gaz.*, 10: 53-66.
- Lloyd, R.M. 1974. Reproductive biology and evolution in the Pteridophyta. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 61: 318-331.
- Maire, R. 1952. *Flore de l'Afrique du nord 1*. Lechevalier. Paris.
- Manton, I. 1950. *Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Manton, I., J.D. Lovis, G. Vida & M. Gibby. 1986. Cytology of the fern flora of Madeira. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Bot.)*, 15: 123-161.
- Manton, I. & T. Reichstein. 1962. Diploides *Asplenium obovatum*. *Bauhinia*, 2: 79-91.

- Marchetti, D. 1995. Note su alcune pteridofite di area lunigianese nuove o rare per l'Italia. *Mem. Accad. Lunigianese Sci.*, 59: 127-147.
- Martin, J. 1984. Study of the spores of "Asplenium fontanum" (L.) Bernh. *Webbia*, 38: 757-764.
- Meyer, D.E. 1958. Die Chromosomenzahlen der Asplenien Mitteleuropas. *Willdenowia*, 2: 41-52.
- Meyer, D.E. 1960. Zur Zytologie der Asplenien Mitteleuropas (XXIV-XXVIII). *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 73: 386-394.
- Meyer, D.E. 1962. Zur Zytologie der Asplenien Mitteleuropas (XXIX-Abschluss). *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 74: 449-461.
- Miller, J.H. 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.*, 34: 361-440.
- Momose, S. 1959. The prothallia of Aspleniaceae. *J. Jap. Bot.*, 34: 231-238.
- Momose, S. 1960a. The prothallia of Aspleniaceae. *J. Jap. Bot.*, 35: 47-54.
- Momose, S. 1960b. The prothallia of Aspleniaceae. *J. Jap. Bot.*, 35: 229-235.
- Momose, S. 1960c. The prothallia of Aspleniaceae. *J. Jap. Bot.*, 35: 315-320.
- Momose, S. 1961a. The prothallia of Aspleniaceae. *J. Jap. Bot.*, 36: 33-40.
- Momose, S. 1961b. The prothallia of Aspleniaceae. *J. Jap. Bot.*, 36: 153-163.
- Morales, M.J. & J. Fernández Casas. 1989. *Asplenium fontanum* (L.) Bernh. subsp. *fontanum*, mapa 303. In: J. Fernández Casas (Ed.). *Asientos para un atlas corológico de la flora occidental*. *Fontqueria*, 25: 119-122.
- Näf, U. 1979. Antheriogens and antheridial development. In: A.F. Dyer (Ed.). *The experimental biology of ferns*: 435-470. Academic Press. London.
- Nakaike, T. & S. Malik. 1992. A list of pteridophytes collected from Pakistan in 1990. In: T. Nakaike & S. Malik (Eds.). *Cryptogamic flora of Pakistan, vol. 1*: 261-316. National Science Museum, Tokio.

- Nakaike, T. & S. Malik. 1993. A list of pteridophytes collected from Pakistan in 1991. In: T. Nakaike & S. Malik (Eds.). *Cryptogamic flora of Pakistan*, vol. 2: 317-356. National Science Museum, Tokio.
- Nayar, B.K. & S. Devi. 1964. Spore morphology of Indian ferns II. Aspleniaceae and Blechnaceae. *Grana Palynol.*, 5(2): 222-246.
- Nayar, B.K. & S. Kaur. 1968. Spore germination in homosporous ferns. *J. Palynol.*, 4: 1-14.
- Nayar, B.K. & S. Kaur. 1969. Types of prothallial development in homosporous ferns. *Phytomorphology*, 19(2): 179-188.
- Nayar, B.K. & S. Kaur. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev.*, 37(3): 295-396.
- Nayar, B.K., F. Raza & P. Lata. 1968. Gametophytes of some Indian spleenworts. *Phytomorphology*, 18: 467-478.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist*, 106: 283-292.
- Nogueira, I. & J. Ormonde. 1986. Asplenium L. In: S. Castroviejo, M. Lainz, G. López González, P. Montserrat, F. Muñoz Garmendia, J. Paiva & L. Villar (Eds.). *Flora iberica. Vol. I, Lycopodiaceae-Papaveraceae*: 90-104. Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid.
- Ormonde, J. 1991. Pteridófitas Macaronésicas endémicas, raras ou em vias de extinção I. Aspleniáceas. In: E. Dias, J.P. Carretas & P. Cordeiro (Eds.). *Comunicações Apresentadas nas 1ª Jornadas Atlânticas de Protecção do Meio Ambiente*: 215-242. Secretaria Regional do Turismo e Ambiente e Câmara Municipal, Angra do Heroísmo.
- Ormonde, J. & M. Queirós. 1995. Contribuição para o conhecimento citotaxonómico da flora dos Açores. VI. *Lazaroa*, 18: 63-70.
- Ormonde, J., M. Queirós & I. Nogueira. 1995. Contribuição para o conhecimento citotaxonómico da flora dos Açores. V. *Açoreana*, 8: 31-87.
- Pajarón, S., C. Prada, A. Herrero & E. Pangua. 1996. Isozymical study of genetic variability in *Asplenium foreziense* and related taxa. Preliminary results. In: J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (Eds.). *Pteridology in Perspective*: 307-311. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Pangua, E. 1989. *Estudios palinológicos en pteridófitos ibéricos: familia Aspleniaceae*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
- Pangua, E., S. Lindsay & A. Dyer. 1994. Spore germination and gametophyte development in three species of *Asplenium*. *Ann. Bot.*, 73: 587-593.
- Pangua, E., P. Muñoz & A. Rubio. 1990. *Asplenium foreziense* Le Grand ex Héribaud. In: A. Molina (Ed.). Cartografía corológica ibérica. aportaciones 12-18. *Bot. Complut.*, 16: 133-147.
- Pangua, E. & C. Prada. 1988. Tipos esporales en Aspleniáceas ibéricas. *Lagasalia*, 15 (extra): 157-167.
- Pangua, E., C. Prada, A. Castillo & A.E. Salvo. 1990. *Asplenium obovatum* Viv. en la Península Ibérica. In: J. Rita (Ed.), *Taxonomía, Biogeografía y Conservación de Pteridófitos*: 191-208. Palma de Mallorca.
- Pangua, E., C. Prada, S. Pajarón & A.E. Salvo. 1992. A new *Asplenium* hybrid from Valencia (Spain) related to *A. majoricum* Litard. *Bot. J. Linn. Soc.*, 108: 1-13.
- Pérez Carro, F.J. & M.P. Fernández Areces. 1992. *Asplenium x protomajoricum* hybrid. nov. (*A. fontanum* subsp. *fontanum* x *A. petrarchae* subsp. *bivalens*) y precisiones corológicas sobre *A. majoricum* en el Levante español. *Anales Jard. Bot. Madrid* 49: 187-194.
- Pérez Carro, F.J. & M.P. Fernández Areces. 1996. Híbridos del género *Asplenium* L. (Aspleniaceae) en la Península Ibérica. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 54: 106-125.
- Pichi Sermolli, R.E.G. 1979. A survey of the pteridological flora of the Mediterranean Region. *Webbia*, 34: 175-242.
- Pichi Sermolli, R.E.G. & M.P. Bizzarri. 1992. Le collezioni pteridologiche conservate nell'Erbario di Antonio Bertoloni. *Mem. Accad. Lunigianese Sci.*, 60-61: 177-232.
- Pichi Sermolli, R.E.G., M.P. Bizzarri, K.-S. Shing & X.-C. Zhang. 1996. *Authors of scientific names in Pteridophyta*. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Prada, C., E. Pangua, A. Herrero & S. Pajarón. 1996. A comparative study of the gametophytes of *Asplenium majoricum* Litard. (Aspleniaceae) and related taxa. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 54: 126-136.
- Prada, C., E. Pangua, S. Pajarón, A. Herrero, A. Escudero & A. Rubio. 1995. A comparative study of gametophyte morphology, gametangial ontogeny and sex expression in the *Asplenium adiantum-nigrum* complex (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Ann. Bot. Fenn.*, 32: 107-115.
- Prelli, R. & M. Boudrie. 1992. *Atlas écologique des fougères et plantes alliées. Illustration et répartition des Ptéridophytes de France*. Éditions Lechevalier. Paris.
- Pryer, K.M. & C.H. Haufler. 1993. Isozymic and chromosomal evidence for the allotetraploid origin of *Gymnocarpium dryopteris* (Dryopteridaceae). *Syst. Bot.*, 18: 150-172.
- Queirós, M. 1991. Estudos cromossómicos em Pteridophyta de Portugal. II. *Collect. Bot. (Barcelona)*, 20: 23-33.
- Quezel, P. 1959. Supplément à la flore de l'Afrique du nord, tomes 1 à 6- Monocotylédones. In: R. Maire. *Flore de l'Afrique du nord* 6: 375-397. Lechevalier. Paris.
- Rabe, E.W. & C.H. Haufler. 1992. Incipient polyploid speciation in the maidenhair fern (*Adiantum pedatum*; Adiantaceae)? *Amer. J. Bot.*, 79: 701-707.
- Ranker, T.A. 1992. Genetic diversity, mating systems, and interpopulation gene flow in neotropical *Hemionitis palmata* L. (Adiantaceae). *Heredity*, 69: 175-183.
- Ranker, T.A., C.E.C. Gemmill, P.G. Trapp, A. Hambleton & K. Ha. 1996. Population genetics and reproductive biology of lava-flow colonising species of Hawaiian *Sadleria* (Blechnaceae). In: J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (Eds.). *Pteridology in perspective*: 581-598. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Ranker, T.A., C.H. Haufler, P.S. Soltis & D.E. Soltis. 1989. Genetic evidence for allopolyploidy in the neotropical fern *Hemionitis pinnatifida* (Adiantaceae) and the reconstruction of an ancestral genome. *Syst. Bot.*, 14: 439-447.

- Ranker, T.A., S.K. Floyd, M.D. Windham & P.G. Trapp. 1994. Historical biogeography of *Asplenium adiantum-nigrum* (Aspleniaceae) in North America and implications for speciation theory in homosporous pteridophytes. *Amer. J. Bot.*, 81: 776-781.
- Rasbach, H. K. Rasbach, T. Reichstein & H.W. Bennert. 1991. *Asplenium trichomanes* subsp. *coriaceifolium*, a new subspecies and two new intraspecific hybrids of the *A. trichomanes* complex (Aspleniaceae, Pteridophyta). II. Description and illustrations. With an appendix on pairing behaviour of chromosomes in fern hybrids. *Willdenowia*, 21: 239-261.
- Rasbach, H. K. Rasbach, T. Reichstein, R.L.L. Viane & H.W. Bennert. 1990. *Asplenium obovatum* subsp. *obovatum* var. *protobillotii* and its hybrid with *Asplenium obovatum* subsp. *lanceolatum* in Spain (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Bot. Helv.*, 100: 3-16.
- Rasbach, H. T. Reichstein & R.L.L. Viane. 1994. *Asplenium chihuahuense* (Aspleniaceae, Pteridophyta) an allohexaploid species and the description of a simplified hybridization technique. *Amer. Fern J.*, 84(1): 11-40.
- Rasbach, H., G. Vida & T. Reichstein. 1981. *Asplenium* x *cynosardoum*. In: T. Reichstein. Hybrids in European Aspleniaceae (Pteridophyta). *Bot. Helv.*, 91: 114.
- Reichstein, T. 1981. Hybrids in European Aspleniaceae (Pteridophyta). *Bot. Helv.*, 91: 89-139.
- Reichstein, T. 1984. *Asplenium* L. In: K.U. Kramer (Hrsg.). *Hegi, G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band I, Teil 1. Pteridophyta*: 211-266. 3 Auflage. Berlin und Hamburg.
- Reichstein, T. & J. Schneller. 1982. *Asplenium pseudofontanum* Kossinsky (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Candollea*, 37(1): 117-128.
- Rieseberg, L.H. & D.E. Soltis. 1987. Phosphoglucomutase in *Helianthus debilis*: a polymorphism for isoenzyme number. *Biochem. Syst. & Ecol.*, 15(5): 545-548.
- Rigual, A. 1972. *Flora y vegetación de la provincia de Alicante*. Alicante.
- Roselló, J.A., J.J. Pericàs, G. Alomar & N. Torres. 1986. Atlas pteridológico de las Islas Baleares. *Acta Bot. Malac.*, 11: 294-302.

- Rumsey, F.J. & J.C. Vogel. 1996. Two *Asplenium* taxa new to Africa. *Lagasalia*, 18(2): 232-234.
- Sáez, L., P. Cubas & J.A. Rosselló. 1993. *Asplenium* x *sleepiae* and *A. obovatum* subsp. *obovatum* (Aspleniaceae, Pteridophyta) from Cap de Creus, NE Spain. *Nova Hedwigia*, 57(3-4): 437-443.
- Sáez, L., P. Cubas & J.A. Rosselló. 1997. *Asplenium* x *corbariense* nothosubsp. *andorranum* (Aspleniaceae, Pteridophyta): a new wild diploid hybrid from the Pyrenees (Andorra). *Nova Hedwigia*, 64(1-2): 267-277.
- Salvo, A.E. 1990. *Guía de helechos de la Península Ibérica y Baleares*. Ediciones Pirámide. Madrid.
- Salvo, A.E., A.L. Márquez, A. Pérez Latorre, J.M. Nieto & B. Cabezudo. 1992. Contribución a la flora pteridofítica de Marruecos. *Acta Bot. Malac.*, 17: 287-290.
- Schedlbauer, M.D. 1976. Fern gametophyte development: controls of dimorphism in *Ceratopteris thalictroides*. *Amer. J. Bot.*, 63: 1080-1087.
- Schneller, J.J.. 1979. Biosystematic investigations on the Lady Fern (*Athyrium filix-femina*). *Pl. Syst. Evol.*, 132: 255-277.
- Schneller, J.J., C.H. Haufler & T.A. Ranker. 1990. Antheridiogen in natural gametophyte populations. *Amer. Fern J.*, 80: 64-70.
- Schneller, J.J. & R. Holderegger. 1996. Colonisation events and genetic variability within populations of *Asplenium ruta-muraria* L. In J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (Eds.). *Pteridology in Perspective*: 571-580. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Schultz, F.W. 1845. Bemerkungen über einige Orobanchen und andere Pflanzen. *Flora (Regensburg)*, 47: 737-741.
- Silva, A.R. Pinto da. 1959. Plantas novas e novas áreas para a flora de Portugal. V. *Agron. Lusit.*, 20: 217-247.
- Sleep, A. 1967. A contribution to the cytotaxonomy of *Asplenium majoricum*. *Brit. Fern Gaz.*, 9: 321-329.

- Sleep, A. 1983. On the genus *Asplenium* in the Iberian peninsula. *Acta Bot. Malac.*, 8: 11-46.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman. San Francisco.
- Soltis, D.E. 1986. Genetic evidence for diploidy in *Equisetum*. *Amer. J. Bot.*, 73: 908-913.
- Soltis, D.E., C.H. Haufler, D.C. Darrow & G.J. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of griding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.*, 73: 9-27.
- Soltis, D.E. & P.S. Soltis 1986. Electrophoretic evidence for inbreeding in the fern *Botrychium virginianum* (Ophioglossaceae). *Amer. J. Bot.*, 73: 588-592.
- Soltis, D.E. & P.S. Soltis. 1987a. Polyploidy and breeding systems in homosporous Pteridophyta: a reevaluation. *Amer. Naturalist*, 130: 219-232.
- Soltis, D.E. & P.S. Soltis. 1987b. Breeding system of the fern *Dryopteris expansa*: evidence for mixed mating. *Amer. J. Bot.*, 74: 504-509.
- Soltis, D.E. & P.S. Soltis. 1989. Polyploidy, breeding systems, and genetic differentiation in homosporous pteridophytes. In: D.E. Soltis & P.S. Soltis (Eds.). *Isozymes in plant biology*: 241-258. Dioscorides Press. Portland.
- Soltis, D.E. & P.S. Soltis. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *C.R.C. Crit. Rev. Pl. Sci.*, 12: 243-273.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis & R.D. Noyes. 1988. An electrophoretic investigation of intragametophytic selfing in *Equisetum arvense*. *Amer. J. Bot.*, 75: 231-237.
- Soltis, P.S. & D.E. Soltis. 1987. Population structure and estimates of gene flow in the homosporous fern *Polystichum munitum*. *Evolution*, 41: 620-629.
- Soltis, P.S. & D.E. Soltis. 1988a. Genetic variation and population structure in the fern *Blechnum spicant* (Blechnaceae) from Western North America. *Amer. J. Bot.*, 75: 37-44.

- Soltis, P.S. & D.E. Soltis. 1988b. Estimated rates of intragametophytic selfing in lycopods. *Amer. J. Bot.*, 75: 248-256.
- Soltis, P.S. & D.E. Soltis. 1990. Evolution of inbreeding and outcrossing in ferns and fern-allies. *Pl. Spec. Biol.*, 5: 1-11.
- Soltis, P.S., D.E. Soltis & L.D. Gottlieb. 1987. Phosphoglucomutase gene duplications in *Clarkia* (Onagraceae) and their phylogenetic implications. *Evolution*, 41: 667-671.
- Soltis, P.S., D.E. Soltis & P.G. Wolf. 1990. Allozymic divergence in North American *Polystichum* (Dryopteridaceae). *Syst. Bot.*, 15: 205-215.
- Soltis, P.S., D.E. Soltis & P.G. Wolf. 1991. Allozymic and chloroplast DNA analyses of polyploidy in *Polystichum* (Dryopteridaceae). I. The origins of *P. californicum* and *P. scopulinum*. *Syst. Bot.*, 16: 245-256.
- Soriano, C. 1988. Distribución de los pteridófitos de Segura-Cazorla. *Fontqueria*, 20: 29-55.
- Stafleu, F.A. & R.S. Cowan. 1976-1989. *Taxonomic literature*. Ed. 2. Bohn, Scheltema & Holkema. Utrecht.
- Stebbins, G.L. Jr. 1947. Types of polyploids: their classification and significance. *Adv. Genet.*, 1: 403-429.
- Steinecke, K. & H.W. Bennert. 1993. Biosystematic investigations of the *Asplenium obovatum* complex (Aspleniaceae, Pteridophyta). I. Morphology. *Bot. Jahrb. Syst.*, 114: 481-502.
- Stokey, A.G. 1951. The contribution by the gametophyte to classification of the homosporous ferns. *Phytomorphology*, 1: 39-58.
- Swofford, D.L. & R.B. Selander. 1981. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Heredity*, 72: 281-283.
- Swofford, D.L. & R.B. Selander. 1989. *BIOSYS-1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7*. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Tryon, A.F. & B. Lugardon. 1990. *Spores of the Pteridophyta*. Springer-Verlag, New York.

- Van Cotthem, W. 1970. Comparative morphological study of the stomata in Filicopsida. *Bull. Jard. Bot. Belg.*, 40: 81-239.
- Van Cotthem, W. 1973. Stomatal types and systematics. In: A.C. Jermy, J.A. Crabe & B.A. Thomas (Eds.). *The phylogeny and classification of the ferns*. (Bot. J. Linn. Soc., suppl. 1): 59-71. Academic Press, London.
- Viane, R.L.L. 1987. Notes about Asplenium I. Asplenium quezelii, a pseudo-endemic species identical with A. daghestanicum (Aspleniaceae: Pteridophyta). *Fern Gaz.*, 13: 143-149.
- Viane, R.L.L. 1990. Epidermology of European ferns. In: J. Rita (Ed.). *Taxonomía, biogeografía y Conservación de Pteridófitos*: 69-89. Palma de Mallorca.
- Viane, R.L.L. 1993. *A multivariate morphological-anatomical analysis of the perispore in Aspleniaceae (Pteridophyta)*. Tesis Doctoral. Universidad de Gante.
- Viane, R.L.L., A.C. Jermy & J.D. Lovis. 1993. Asplenium L. In: T.G. Tutin, N.A. Burges, A.O. Charter, J.R. Edmondson, V.H. Heywood, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters & D.A. Weeb (Eds.). *Flora europaea. Volume I. Psilotaceae to Platanaceae*: 18-23. Second Edition. Cambridge University Press. Cambridge.
- Viane, R.L.L., H. Rasbach, K. Rasbach & T. Reichstein. 1996. Observations on some ferns of Poros and adjacent parts of the Ploponnesus (Greece). *Bocconeia*, 5: 279-300.
- Viviani, D. 1824. *Florae Libycae Specimen*.
- Vogel, J.C., S.J. Russell, J.A. Barret & M. Gibby. 1996. A non-coding region of chloroplast DNA as a tool to investigate reticulate evolution in European Asplenium. In: J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (Eds.). *Pteridology in Perspective*: 313-327. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Weeden, N.F. & J.F. Wendel. 1989. Genetics of plant isozymes. In: D.E. Soltis & P.S. Soltis (Eds.). *Isozymes in plant biology*: 46-72. Dioscorides Press. Portland.
- Wendel, J.F. & N.F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. In: D.E. Soltis & P.S. Soltis (Eds.). *Isozymes in plant biology*: 5-45. Dioscorides Press. Portland.

- Werth, C.R. 1989. The use of isozyme data for inferring ancestry of polyploid pteridophytes. *Biochem. Syst. & Ecol.*, 17: 117-130.
- Werth, C.R. 1991. Isozyme studies on the *Dryopteris* "spinulosa" complex, I: the origin of the log fern *Dryopteris celsa*. *Syst. Bot.*, 16: 446-461.
- Werth, C.R., S.I. Guttman & W.H. Eshbaugh. 1985a. Electrophoretic evidence of reticulate evolution in the Appalachian *Asplenium* complex. *Syst. Bot.*, 10: 184-192.
- Werth, C.R., S.I. Guttman & W.H. Eshbaugh. 1985b. Recurring origins of allopolyploid species in *Asplenium*. *Science*, 228: 731-733.
- Windham, M.D. & C.H. Haufler. 1986. Biosystematic uses of fern gametophytes derived from herbarium specimens. *Amer. Fern J.*, 76: 114-128.
- Wolf, P.G., C.H. Haufler & E. Sheffield. 1988. Electrophoretic variation and mating system of the clonal weed *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Bracken). *Evolution*, 42: 1350-1355.
- Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations. Vol. 2. The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press. Chicago.

7. APÉNDICES

7.1. APÉNDICE I

Material de herbario revisado

Asplenium fontanum (L.) Bernh. subsp. *fontanum*

ALEMANIA

Württemberg, Überkingen, Michelsberg, 30-VIII-1944, *A. Schumacher*, B 85055. Überkingen (Oberams Geislingen) in Felospalten der weisfsen Jura, c. 650 m. 1880, *G. Herter*, B 14488-89, B 14492.

ANDORRA

Santa Colona, riu d'Enclar, 31TCH7605, 1000 m. bosques de *Quercus pubescens*. 4-VII-1992, *C. Navarro et al.* CN830, MA 525548.

AUSTRIA

Salzburg, Salzburg, herbario Mettenius, B 14494.

ESPAÑA

Álava, Campezo, Sta. Cruz de Campezo, Barranco de la Dormida, 30TWN5723, 650 m, bosque mixto, 25-IX-1993. *P.M. Uribe-Echebarría*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 760, MACB 62101.

Alicante, Alpatro (Vall de Gallinera), 30SYJ3700, 350 m, paredes con orientación norte del barranco de Gallinera, 19-X-1993, *A.M. Ibars et al.*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 792, MACB 62102. Denia, Monte Montgó, 31SBD40, sobre praderas, 9-X-1986, *M. Vilar & M. Leal*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 257/86, MACB 30826.

Barcelona, Montserrat, in rupestribus humidis, 200 m, V-1883, MA 976.

Castellón, Vistabella del Maestrat, Bco. de la Ferreria, 30TYK36, 950 m, muros de piedra caliza en bancales abandonados. 9-X-1987, *C. Fabregat*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 411/87, MACB 30655. Sierra de Penyagolosa, 30TYK25, en grietas de roca con exposición N, 10-VI-1993, *A.M. Ibars, I. Martínez & E. Estrelles*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 784, MACB 62100.

Cuenca, La Cierva, Rambla de Prado Ciervo, 30TWK9838, 1260 m, en rocas calizas umbrosas, 20-IX-1995, *G. Mateo*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 863, MACB 62108. Tragacete, valle del río Júcar, junto al albergue juvenil San Blas, 30TWK9969, 1400 m, roquedo calizo entre la peña del Fraile y el monte de los Corzos, 28-VIII-1990, *F. Castilla & R. Gamarra* 432, MACB 40334. Hoz de Beteta, junto a la presa, 30TWK7389, 1100 m, 1-XI-1984, *M. Moreno et al.*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 239/86, MACB 31085. Foz de Beteta, fisuras y oquedades de rocas básicas, 20-VI-1981, *E. Fuertes*, MACB 7723. Hoz de Beteta, 30TWK79, 800 m, en taludes calcáreos, 1-IV-1990, *A.M. Ibars, I. Martínez & E. Estrelles*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 843, MACB 62109.

Gerona, Camprodón. 31TDG5285. 900 m, grietas de rocas calizas en el torrente de La Quera. 9-XI-1990, *M.L. Gil & J.A. Alejandre* 1259-90, MACB 42795.

Guadalajara, Armallones. El Hundido, en roquedo, 19-VI-1979, *V. Mazimpaka*, MACB 10930. Zaorejas, valle del Tajo, 5-VIII-1976, *V. Mazimpaka & M.E. Ron*, MACB 12557.

Huesca, Arguis. Pico del Águila, 30TYM1287. 1300 m, *J.M. Palacín*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 607, MACB 43350. Fiscal, cerca del Bco. M. Berroy (Canciás-N). 30TYN3306, 1300-1400 m, grietas de bloques erráticos calizos, 29-VII-1986, *L. Villar*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 164/86, MACB 30938. Jaca. umbría del Oroel. 30TYN0410, 1280 m, rellanos y grietas de conglomerado calizo. 26-VIII-1989, *L. Villar*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 494. MACB 36202. San Silvestre de Fontjanina. Alta Ribagorça. 31TCH10. 1350 m, sobre rocas musgosas, 24-VIII-1986, *J.M. Ninot*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 228/86, MACB 31067. Subida a El Alano, 21-VII-1982. *Carrasco, Velayos & Zapata*, MACB 11191. Cañón de Añisclo, 31TBH5512. 750 m, fisuras calizas, 24-VI-1987, *E. Pangua et al.*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 347/87, MACB 31004. Valle de Añisclo, paredones calizos que rodean al río Bellos, 31TBH51, 1300 m, 13-IX-1990, *F. Castilla et al.* 525. MA 488538.

León, Picos de Europa, Macizo Central, Canal de Asotín. 1800 m, com. de Asplenietea. 14-VI-1981, *Rivas Martínez et al.*, MAF 115718.

Lérida, Estahón. 16-VII-1986, *Carrasco, Velayos & Yagüe*, MACB 24477. Montsec d'Ares. 31TCG2455. 800 m, rocas extraplomadas. 1-V-1985, *J. Pedrol* 136JP, MA 419529.

Logroño, Arnedo, Peña Isasa. 30TWM7068, 1400 m, en grietas de las calizas jurásicas de la cumbre. 25-III-1989, *M.L. Gil & J.A. Alejandre* 288-89, MACB 39494. Arnedo, Peña Isasa, 30TWM7068. 1400 m, en grietas de los roquedos de la umbría, 20-XI-1994, *B. Fernández de Betoño & J.A. Alejandre* 945/94, MA 555172. Grávalos, roquedos calizos al W del Monte Portillo, 30TWM8365, 930-980 m, 12-VII-1992, *M.L. Gil & J.A. Alejandre* 447/92, MA 533745. Muro de Aguas, 30TWM7365, 900-940 m, roquedos carbonatados de orientación N, fisuras y repisas del roquedos, 13-VII-1992, *M.L. Gil & J.A. Alejandre* 465/92, MA 533802. Préjano, Peñalmonte, 30TWM6571, 1200-1240 m, roquedos de las crestas y umbría, calizas. 31-VII-1991, *J.A. Alejandre* 903/91, MA 534077. Préjano, subida al Peñalmonte, 30TWM6571, c. 1200 m, extraplomos calizos, pie de cantil, 29-V-1988, *J. Arizaleta et al.* 3194 JP, MA 438489. Turruncún, 800 m, roca caliza, 17-VI-1972, *A. Segura Zubizarreta*, MA 352573. Viguera, sierra de la Laguna, 30TWM3780, 1280 m, roquedos de la umbría del Cerroyera, calizas, 25-IV-1992, *M.L. Gil & J.A. Alejandre* 26/92, MA 533485.

Madrid, El Escorial. VII, *Reyes Prosper*, MA 981. El Escorial, 6-X-1852, *Ysern*, MA 158975. Localidad dudosa.

- Navarra**, Villanueva de Aezkoa, Sierra de Berrendi, 30TXN4557, 1300 m, fisuras de roquedo calizo, 24-VII-1986, *I. Aizpuru & P. Catalán*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 202/86 MACB 30858. Cerca de la Foz de Arbaiun, 30TXN2848, 600 m, grietas de roquedos calizos en un quejigar, 14-X-1989, *A. Quintana & I. García*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 540, MACB 36102.
- Soria**, Almenar de Soria, Sierra de Cortado, 30TWM6821, 1270 m, grietas de un roquedo calizo umbroso cerca del collado entre Cortada y Peñalta, 20-V-1990, *M.L. Gil & J.A. Alejandro* 130-90, MACB 42799. Beratón, 1200 m, in rupestribus calcareis, 26-VI-1972, *A. Segura Zubizarreta* 6630, MA 267335. Villaciervos, Sierra de Cabrejas, 30TWM2328, 1370 m, en fisuras del roquedo calizo de las crestas, 20-II-1988, *M.L. Gil & J.A. Alejandro* 1102-88, MACB 35261.
- Tarragona**, Arnés, Puertos de Tortosa y Beceite, roquedos calizos del barranco Gregola, 31TBF7225, 900-1100 m, 10-VII-1990, *M.L. Gil & J.A. Alejandro*, 587/90, MACB 42794.
- Teruel**, Alcalá de la Selva, Barranco de Cañaluenga, 30SXX86, 800 m, en grietas de paredes calizas, 26-VIII-1988, *E. Estrelles*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 482, MACB 36181; Puerto de San Rafael, 30SXX9469, VIII-1985, *J. Alcober*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 106-85, MACB 18887. Cucalón, Sierra de Cucalón, Modorra, 30TXL5548, 1300-1380 m, roquedos calizos en la base de la muralla del NE, 18-V-1991, *M.L. Gil & J.A. Alejandro* 154-91, MACB 57136. Gudar, Río Alfambra, 30TX97, 1200 m, en fisuras umbrosas de rocas calizas, 13-X-1991, *A.M. Ibars, J. Balaguer & A. del Toro*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 678/91, MACB 43428. Javalambre, grietas de rocas, 5-IV-1976, *M. Horjales*, MACB 11745. Manzanera, 30TXK94, 1350 m, grietas en caliza, 22-VIII-1993, *J.T. Corbín*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 785, MACB 62103. Origüela (Orihuela), rochers escarpés et ombrages, 1400 m, V-1895, *Reverchon*, Plantes d'Espagne n° 1073, B 14659. Segura de Baños, 30TXL7235, 1140-1200 m, roquedos calizos de orientación EN sobre el desfiladero de los Baños, 19-V-1991, *M.L. Gil & J.A. Alejandro*, MACB 57144.
- Valencia**, Puebla de San Miguel, 30SXX53, 1100 m, en grietas de paredes calizas, 1-X-1989, *A.M. Ibars, J. Iranzo & M. Vilar*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 475, MACB 36175. Rincón de Ademuz, barranco de Cañada de Jorge, 30SXX53, 2-X-1989, *J.T. Corbín & A.M. Ibars*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 848, MACB 62105. Titaguas, La Caballera, 30SXX51, 600 m, en grietas de roquedos calizos sombreados, 3-XI-1991, *A.M. Ibars & J. Balaguer*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 674/91, MACB 13432.
- Zaragoza**, Añón, Macizo del Moncayo, Peñas de Talamantes, 30TXM0620, 1400-1460 m, roquedos calizos, W-NW, 15-V-1990, *M.L. Gil & J.A. Alejandro* 656/90, MACB 42800. Berdejo, Mte. Ituero, 30TWM8702, 1000-1070 m, roquedos calizos, 16-VI-1990, *M.L. Gil & J.A. Alejandro* 1632-90, MACB 42826; Mte. Rituerta, 30TWM874024, 1000 m, grietas y pequeñas repisas de la base del roquedo de la umbria, calizas, 16-VI-1990, *M.L. Gil &*

J.A. Alejandre 1646-90, MACB 42827. Calcena, carretera hacia Oseja, desfiladero en las calizas de Peñas del Cabo, 30TXM0611. 900-1000 m, roquedos y laderas pedregosas muy abruptas, 4-VI-1991. *J.A. Alejandre* 317-91, MACB 57515. Malanquilla, Mte. Cucuta, 30TWM920052. 1190 m, roquedos calizos, 15-VI-1990, *M.L. Gil & J.A. Alejandre* 1786-90 MACB 42801. Tabuenca, Sierra de la Nava Alta. Peña de las Armas, 30TXM1816, 1100-1130 m, roquedos calizos en umbría, 11-VI-1989. *M.L. Gil & J.A. Alejandre* 490-89, MACB 39389. Luesia, Sierra de Sto. Domingo, 30TXM6901, 1100-1200 m. paredones calizos, 26-V-1987. *J. Pedrol* 1828JP, MA 437279.

FRANCIA

Ain, Jura, pente en face de l'Abbaye de Sélignac, rochers calcaires, alt. 400 m, 3-IV-1955, *P. Villaret*, BM.

Alpes-Maritimes, Rojatal zwischen St. Dalmas de Tende und Fontan, ca. 500 m, 15-IX-1968, *J. Damboldt & M. Dittrich* 606, B 14610. St. Martin-Vésubie, rocks near Vessanson, 27-V-1937, *M.S. Campbell*, BM. St. Etienne de Tinée, Schlucht südlich des Ortes, 26-V-1931, *K. Ronniger*, MA 195033.

Haute-Savoie, in ditione oppidi "Cluses" provinciae Sapaudinae superioris, secus viam ad pagum "Nancy-sur-Cluses" ducentem, 680-700 m, supra maris aequor, in umbrosis ad rupes calcareas praeruptas, 7-IV-1971, *A. Charpin & F. Jacquemoud*, Exsiccata genavensia, BM. Annecy. Alpes françaises, fentes rocheuses près du lac entre Albigny et Chavoire, ± 500 m, 12-IV-1947, *B. de Retz*, Pteridophyta Exsiccata Walter-Callé 305, BM.

Isère, Fontaine, près Grenoble, rochers ombragés, 18-X-1878, *A. Pellat*, Société dauphinoise 1879. K. Freney, Vallée de l'Arc, falaise à l'ouest-sud-ouest de Freney, 29-VIII-1974, *F. Badré* 1444, BM. Entre Voiron et St-Laurent-du-Pont, défilé du Grand Crossey, rochers calcaires, alt. 440 m, 12-IX-1954, *P. Villaret*, BM. Grenoble, lac Chambon, fissures de rochers, 24-VII-1971, *F. Badré* 378, BM. Saint-Etienne de Crossey, 485 m, parois calcaires des Gorges, 10-IX-1973, *R. Barbezat*, MAF 98654.

Rhône, St. Romain au Mt. d'Or, Mont Cindre, éboulis calcaires exp. N., c. 350 m, 8-V-1949, *A.J. Bange*, Pteridophyta Exsiccata Walter-Callé 362, BM.

Var, Bewachsene Kalkfelsen an der Corniche Sublime so. Aiguines, 4-IV-1972, *C. & W. Bennert*, B 14609. Forêt de la Ste. Baume, 22-V-1950, *C. Webert*, G.

ITALIA

Liguria, an Kalksteinmauern zu Buggio im Val Nervia 600 m, 8-IV-1901, *C. Bicknell*, Pteridophyta Exsiccata F. Wirtgen 14b, BM.

Piemonte, sulle rocce schisto-micacee presso Susa, otoño 1859, *Cesati*, B 14647. Alta Valle del Tanaro a Nava, verano de 1881, *I. Strafforello*, BM. Cottische Alpen, Zwischen Chiomonte und Exilles, 9-VI-1924, *K. Ronninger*, BM.

SUIZA

Genève, in saxosis infra Salevam (Salève) prope Genevan, *Duby*, B 14531.

Neuchâtel, Chaumont, supra Neuchâtel (Jura), 1876, *Lerchy*, B 85069.

Valais, Bas Valais, Monthey sur les vieux murs, terrains siliceux, alt. 420 m environ, 9-IX-1924, *C. Genty*, Exsiccata Ch. Duffour, MA 471409.

Vaud, Roche, rocky woods, 11-III-1896, *R.P. Murray*, BM. Rochers ombrages à Roche, c. 420 m, VI-1904, *Wilzek*, B 14593. Roche, 11-IX-1941, Herb. Spiess, B 14578.

Waadt (Wallis), Villeneuve, an schattigen Felsen bei Roche, in etwa 420 m, 22-VIII-1953, *Höpflinger*, BM. Rhone-tal, St. Maurice, 420 m, 18-VI-1914, *J. Bornmüller*, B 14555. Tourbillon, pr. Sion, IV-1889, *F.O. Wolf*, B 14550. Porte du Sex (Südufer des Genfer Sees), 15-VIII-1959, *Wagenitz* 87, B 14548.

***Asplenium fontanum* (L.) Bernh. subsp. *pseudofontanum* (Kossinsky) Reichst. & Schneller**

CACHEMIRA

Barungalli, 6500', 5-VII-1876, *C.B. Clarke* 28403B, BM; *C.B. Clarke* 28403A, K. Gurais Valley, 8000 ft., 22-IX-1893, *J.F. Duthie*, Flora of Kashmir n° 14084, BM 36495. Bagtor, alt. 7700, rock crevices, 20-IX-1940, *Ludlow & Sherriff*, Flora of Kashmir n° 8225, BM. (2 individuos). Lollowai, Kishenganga Valley, 7000 ft., hab. on rocks, 1-IV-1940, *Ludlow & Sherriff*, Flora of Kashmir n° 8236, BM. Kulam valley, near Rampur, about 4500 ft., XI-1891, *R.W. McLeod*, BM. 9000 ft., *Winterbotton*, BM. Pahalgam, mit andern Farmen, in Fichben Tamenwald, 2400 m. ca. 30° NW, 8-IX-1976, *H. Hartmann*, G 152735. Rampur, 4000 ft. 3-VII-1931, *R.R. Stewart*, Plants of North west Himalaya N° 12154, K. Chittapani valley, 7500-8000 ft., 23-VIII-1888, *E.W. Trotter* n° 213, K.

INDIA

Himachal Pradesh, below Sach Pass, 9000', 14-VIII-1882, *H. McDonell*, Flora of the Chenab Valley north-western Himalaya, BM.

Uttar Pradesh, wet rocks near Kangua, in Káli Valley, 11000, 13-IX-1884, *J.F. Duthie*, Plants of Kumaun n° 3637, BM.

Chamba, W Himalaya, at 8500', 1-I-1899, *J.F. Duthie*, K. Chamba, 1885, *H. McDonell*, Ferns of North-western India, BM.

NEPAL

Kutti Valley, 10-11000 ft., 29-IX-1886, *J.R. Reid* 6246, BM.

PAKISTÁN

Cachemira, Shekh Bela, entre Shardi et Kel, alt. 2000-2100 m, 14-VIII-1953, *F. Schmid* 602, BM y G. Cachemira, Shardi, 2000 m, 1-10-VIII-1953, *F. Schmid* 590, G.

Plants of Swat, c. 8000, 21-VII-1955, *R.R. Stewart & A. Rahman* 25215, BM. Swat, Valley of Kalam, c. 2500 m alt., rock overhangs, 1990, TR7400 (= C.R. Fraser-Jenkins sheet 20), herbario personal de T. Reichstein; TR7402 (= C.R. Fraser-Jenkins sheet 22), herbario personal de T. Reichstein.

TAJIKISTÁN

Madm. 5000', 5-VI-1893, *V.L. Komarov*. Flora Seravschanica, B14668. Isótipo.

Localidad sin determinar: W Himalaya, Kamalban Kagan, 29-VI-99, *J.F. Duthie*, K.

Asplenium foreziense* Legrand ex Giraudias*ESPAÑA**

Almería, Castro de Filabres, Sierra de los Filabres. 30SWG4518. 1950 m, in rupibus siliceis, *J. Fernández Casas et al.*, MA 227261.

Cuenca, Cañete, 900 m. en grietas de rodenos, 31-III-1974, *G. Moreno & G. López*. MA 232289. Entre Villar del Humo y San Martín de Boniches. sobre rodenos, 25-V-1974, *A. González & G. López* 1294. MA 232291. Sierra de Talayuelas, XK41, 1200 m, grietas de conglomerados calizos, 19-VI-1977, *G. Mateo*, MA 275568.

Gerona, Port Bou, au cap Lauseilh, tout près de la frontière française, 15-VIII-1891, *Herbier E.J. Neyraud*, MA 910. S. Climent, rochers granitiques, 22-IV-9-VI-1908, *Sennen*. Plantes d'Espagne n° 611. MA 891.

Granada, Sierra Nevada, margen derecho del barranco del río Lanjarón, 16-IX-1983, *J. Molero*, MGC 12290. Jeres del Marquesado, Sierra Nevada. VIII-1978, *A.E. Salvo*, MGC 5925. Proximidades a Jeres del Marquesado. Sierra Nevada. en una oquedad profunda en la base de rocas silíceas. sobre sustrato edáfico bastante bien conformado. 27-VIII-1978, *A.E. Salvo*. MAF 105470. Barranco del río Lanjarón a su paso por Soportujar, bajo un roquedo silíceo, 30SVF6884, 1800 m, 12-VII-1979, *A.E. Salvo*, MGC 5986. Lanjarón, barranco del río Lanjarón. arriba del cortijo del Encinar, VF5991, alt. 750 m, fisuras extraplomadas de rocas esquistas, 20-VII-1979, *J. Molero*. MA 211435. Sierra Nevada, *Clemente*. MA 233997.

Teruel. Sierra de Gea Carbonera, 4-5 Km above Albarracín on Bezas road, on sandstone in pinewood, 28-III-1970, *C.R. Fraser-Jenkins* 1371, BM. Origüela (Orihuela), 1400 m, V-1895, *Reverchon*. B 14663. Origüela (Orihuela), rochers escarpés et ombrages, 1400 m, V-1895, *Reverchon*. Plantes d'Espagne n° 1073, B 14659, B 35827. Albarracín, desvío hacia las pinturas rupestres, 1370 m, areniscas rojas triásicas. 20-IX-1979, *A. Antúnez et al.*, MA 227420.

Valencia, Castielfabib a Tormón, XK4452, 1150 m, rodenos. 23-V-1988, *G. Mateo*, MA 440318. Montes de rodenos entre Talaguedos y Tejar, VII-1981, *J. Iranzo*, MGC 8178.

FRANCIA

Albères, rochers humides qui entourent l'hermitage de Sorrède, VI-1834, B 16788.

Ardèche, Burzet à Belvezet, murs de pierres granitiques, 650 m, 3-VIII-1942, *R. de Litardière*, G. Vals les Bains, X-1891, *L.A. Girod*, G.

Aveyron, entre Marcillac et Saint-Cyprien. rochers schisteux de formation primitive. rive droite du Dourdon, IX-1874. *G. Chastaingt*. Flora selecta exsiccata n° 743 bis. G. Puy de Volf, X-1879. *Héribaude*, G. Puy de Volf, X-1879, *Saltet*. G. Vallée du Rance à Balagnier, rochers schisteux. 300 m, 26-IV-1899, *H. Coste*. G.

Cantal, rochers des bords du Lot à Vieillevie, IV-1880. *Héribaude*, Flora selecta exsiccata n° 743, B 14698.

Corse, Laqua, *Requien*, B 14687.

Haute-Loire, rochers à Campdes, 550 m, IX-1878. *A. Girardet*, G.

Hérault, gorges d'Héric, 350-360 m, sur rochers gnessiques. 26-V-1965, *A. Charpin*, G 127058.

Loire, entre St. Victor et St. Rambers, 400-500 m. rochers granitiques, 2-VIII-1924. *E. Walter*, G. Prope Montbrison. granit. IX-1874. *Legrand*, B 14701.

Tarn, Ambialet. schistes, V-1902. *Sudre*, B 14706-07. Pampelonne. rochers murs sur le gneiss ou le micaschistes, V-1892. *Sudre*. B 14697.

Rhône, St. Genis les Ollières, vallée du Ratier, interstices des blocs de rochers granitiques. 10-IV-1949, *A.J. Bange*, Pteridophyta Exsiccata Walter-Callé 364, G.

Rochers granitiques de Seillans, 17-IX-1893. *A. Legrand*, G.

Rochers shisteuses des Cévennes, 1833, *Boissier*, G.

ITALIA

Toscana, valle delle Font, ad Asciano, a.q. 125 m. circa Monte Pisano, su verrucano. 3-XII-1986, *D. Marchetti*, MGC 18644.

Liguria, Riviera di Levante. supra Framura. 300 m, 8-V-1909. *Bornmüller*, B 14681-83. Riviera di Levante, inter Framura superiore et Bonassola. 300 m, 8-V-1909, *Bornmüller*, B 14682.

SUIZA

Ticino, Piodina. above Brissage, between Verbania and Locarno, Lake Maggiore, stone walls bellow and slightly N. of village, 25-IX-1969, *C.R. Fraser-Jenkins* 1190, BM. Brissago, Piodina, 30-IX-1959. *D. Meyer*, B 14710-13. Murs à Ronco, 21-IV-1870, *Favrat*. K.

Asplenium macedonicum Kümmerle

MACEDONIA

Prilep, in monte Treskarc, Hb. C. Christensen, 1913. *J. Bornmüller* 3263, BM. Prilep, Kloster Treskarc, am granit felem, 1957. *K. Micev*, BM. Prilep, in fissuris rupium. montis Gujchsti, solo granitico, 17-VI-1933, *Soska*, BM. Prilep, Markova Kula prope Prilep, in rupium fissuris. solo granitico, 700 m, 19-VII-1960, *D.E. Mayer*, BM. Prilep, W side of Markov Grad, 2 Km N. of Prilep, 700-850 m. granite, 7-VI-1971, *A.O. Chater* 124, BM. Prilep, Markovgrad, NW. of Prilep, crevices of granite rocks. 31-VIII-1957, *A.H.G. Alston* 17776, BM (5 individuos), otro de los individuos numerado TR706 (herbario personal de T. Reichstein). Prilep. in m. Gujchsti, VI-1921, *Soska*,

B 17641. Prilep, 24-VII-1970. *Joncheere*, B 17643. Prilep. *A. Sleep* AS/62/32 (= TR707, herbario personal de T. Reichstein).

Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum

CRETA

W Crete, South of Ano Sfinari, in crevices of 300 m schist rocks on streambank under *Platanus/Arbutus*, 24-V-1984, *B.S. Parris & J.P. Croxal* N° 10276. K.

ESPAÑA

Almería, Cabo de Gata, barranco del Cigarrón, WF7570, 250-300 m, 12-IV-1985, *A. Castillo*, MGC 20602.

Gerona, Cadaqués, in rupestribus inf. et mediae, 300-500 m, IV-1879. *F. Trémols*, B 19075. Cadaqués, barranco de la Sabolla, roques maritimes, 11-V-1917, *Gros*, MA 907 (individuo superior). Cap de Creus, 31TEG28, ad 50 m. in fissuris rupium ad ora maris, 19-IV-1981, *J. Fernández Casas & J. Molero*, MA 393510-11.

FRANCIA

Corse, Bonifacio, Trinitá, 1850, *Herbier Jordan*. B 19070. Rochers du Mt. della Trinitá près de Bonifacio, 4-VI-1849, *Herb. C. Bolle*. B 19068. Ajaccio, 1906, *Requien*, K. Ajaccio, *Requien*. B 19071. Corse-du-Sud, Bonifacio, ermitage de la Trinité, env. 120 m, fentes des rochers granitiques ombragés, 5-III-1983, *J. Lambinon et al.*, MA 392495.

Var. Hyerès, rochers du St. Jean, 12-V-1843, *D. Champ.*. G. Midi, Hyerès, rocher de St. Jean, 27-IV-1929, *Ruppert*, G. Hyerès, rochers maritimes de l'île du Levant près Hyères, 3-V-1851, G. Îles d'Hyerès, cliffs at the S. end of Porquerolles. 26-IV-1901, K. Cap Roux. Le Trayas, 13-V-1951, *C. Weber*. G.

GRECIA

Argolis, Methana peninsula, 4-V-1992. *H. Rasbach, K. Rasbach & R. Viane* Ras-813. herbario personal de H. Rasbach, ($n = 36^{II}$, H. Rasbach); Ras-815. herbario personal de H. Rasbach, ($n = 36^{II}$, H. Rasbach). Poros island, 4-V-1992, *H. Rasbach, K. Rasbach & R. Viane* Ras-825, herbario personal de H. Rasbach. ($n = 36^{II}$, H. Rasbach). Supra urbem Poros, K. In rupibus trachyticis ins. Calauriae. supra urbem Poros, 25-V-1889, *Heldreich Herbarium Graecum Normale*, BM (2 individuos).

Athos, south Macedonia, near Dionysiou, on shady rocks, 18-IV-1934, *A.W. Hill, N.Y. Sandwith & W.B. Turrit* N° 2465, Flora of the Athos Peninsula, K.

Eubea, Insula Eubea meridionalis, 3 km a promontorio Kaphireos occidentem versus, 22-VI-1958, *K.H. Rechinger*, *Iter Graecum IX*, G.

Insula Ikaria (Nikaria), in ditone pagi Hagios Kirykos, in cavernis rupium schist., montis Atheras, ca. 900 m, 18-24-IV-1934, *K.H. Rechinger & F. Rechinger*, BM.

Ikaria, in monte Atheras, 24-VII-1887. *F. Major*, G.

Insula Samothrake, in rupium fissuris infra Palaeopolis, substr. silic., alt. 10 m. 18-20-VI-1936, *K.H. Rechinger & F. Rechinger*, BM.

ITALIA

Calabria, Bagnara, in rupibus graniticis mari proximis. alt. 20 m. solo siliceo, 7-III-1906, *A. Fiori*, Flora Italica Exsiccata n° 703, BM (2 individuos); K. Aspromonte, SW. of Reggio di Calabria. c. 20 Km N. of Melito di Porto Salvo. c. 500 m, steep gully on vertical schistose rocks, 11-VI-1979, *D. Davis & S. Sutton* D64828, BM.

Campania, Île d'Ischia. M. Gasbone, 1857, *Guy*. G. Insel Ischia, Porto d'Ischia, IV-1937, *J. Bornmüller*, B 19102.

Sardegna, Santu Lussùrgia (Cascada), at 500 m, steep bank of the river near waterfall, VI-1960, *G.J. de Joncheere* MME39, BM. Sassari, 20-50 m, rochers siliceux au Cabo Testa, 25-V-1983, *A. Charpin, M. Dittrich, D. Jeanmonod & I. Camarda* AC17714, G 235145. Nei monti di Pula. S. Barbara e Carbonara, XII-1858. *Gennari*, G. Sulle rupi presso la grotta S. Giovanni a Domus novas, e presso Orri, 1867. *Canepa*, G. Caprera, unter Garibaldi's house, 8-VII-1863, *P. Ascherson & O. Reinhardt*, B 19089, B 84800.

Sicilia, Cefalù, in waste ground and along cliffs of acid rock, facing NE and the sea, 29-V-1983, *A.C. Jermy* 16241, BM. Messina, nella Fiumara di Bordonaro, in fissuris rupium schistosarum, 26-V-1907, *C.C. Lacaita*, Hb. C.C. Lacaita 9469, BM. In muris vinearum ad Galati dit. di Messina, 5-10 m, sol. granit., 19-IV-1877. *Porta & Rigo*, Ex. Itinere Italico III, G. St. Lucia valley, 3 Km E. of St. Lucia del Mela, c. 50 Km WSW. of Messina, in Quercus woodland, on steep slopes, sandstone with some igneous rocks some signs of basic flushing. 16-VI-1983, *A.C. Jermy* 16385, BM 36468; *A.C. Jermy* 16386, BM. Insula Lipari ad muros umbrosos, 0 m. 29-V-1933, *J. Bornmüller* 527, BM. Prope Catania, ad rupes vulcanicas ad radices Etnae, 24-III-1856, *E. Huet & A. Huet*, G.

Toscana, von der Insel Giglio, Porto S. Stefano, 28-III-1931. *W. Freiberg*, G. Insel Giglis, V-1933. *W. Freiberg*, G. Livorno, Insel Elba. P. Nera, 3-VIII-1967, *F. Mokry*, B 19095. Insel Elba, Felsen am Fusse des Cima del Monte, 22-V-1974, *F. Mokry*, B 11962. Insel Elba, Porto Ferraiolo, 22-V-1974, *F. Mokry*, B 11962. Insel Elba, Felsen lui der Madonna di Monserato, 20-V-1974, *F. Mokry*, B 11963. Archipelago toscano. Isola di Capraia, rupi trachandesitiche tra l'Abitato e il "Piano", a.q. 125 m, 10-III-1982, *D. Marchetti*, MGC 18681.

TURQUÍA

Istambul, Îles des Princes. Büyükada (=Prinkipo), rochers, 11-IX-1986, *J.J. Lazare*, G 288280.

A. obovatum Viv. subsp. *obovatum* var. *deltoideum* Demiriz, Viane & Reichst.

FRANCIA

Finistère, cap Brezellec. 21-VI-1995, *H. Rasbach, K. Rasbach & R. Viane* Ras-1022, herbario personal de H. Rasbach, ($n = 36^{II}$, H. Rasbach).

A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst.*ESPAÑA**

Cádiz. Miel valley, c. 5 km W. of Algeciras, c. 110 m alt., 15-IV-1988, *H. Rasbach, K. Rasbach & H.W. Bennert* Ras-610 ($n = 36^{II}$), MGC 32201. Algeciras, Sierra de Luna, valle de Miel, oberhalb des Dorfes Cobre, auf sandsteinfelsen, 9-V-1958, *A. Schumacher*, B 11975. Algeciras, bewachsene Felsen in Mieltal, 2-IV-1974, *W. Bennert & C. Bennert*, (las tres primeras frondes inferiores), B 11969. Algeciras, El Cobre, 18-XI-1983, *B. Cabezudo, A.E. Salvo & P. Otermin*, MGC 11168.

GRECIA

Argolis. 1889, Col. Heldreich, K (2 individuos).

A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva*ESPAÑA**

Almería. Cabo de Gata, barranco de Mónsul, en comunidades rupícolas de *Cheilanthion*, 22-III-1972, *Acuña et al.*, MAF 83018. Sierra del Cabo de Gata, umbría de Cambronero, rocas volcánicas, 11-IV-1972, *Ladero & Fuertes*, MAF 84631 y MAF 84643. Proximidades de Rodalquilar, fisuras de rocas cuarcitosas, 11-IV-1973, *Ladero & Fuertes*, MAF 84630. Rodalquilar, roquedos cuarcitosos, 11-IV-1973, *Ladero & Fuertes*, MAF 84539. Entre la Isleta del Moro y Rodalquilar, rocas volcánicas, 11-IV-1973, *Ladero & Fuertes*, MAF 84540.

Asturias. rochers à Peñaflor près Grado, 23-V-1864, *E. Bourgeau*, G.

Ávila. Pedro Bernardo, macizo oriental de la Sierra de Gredos, Garganta Elisa, 30TUK3660, 1075 m, grietas anchas de tapias graníticas rezumantes, 21-V-1991, *D. Sánchez Mata & R. Gavilán*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 651/91, MACB 43231. El Barraco, Valle de Iruelas, piscifactoría, 30TUK6670, roquedos frescos, 5-V-1985, *J.R. Molina*, MACB 57806. Valle del Horno, 28-VI-1982, MACB 25192.

Badajoz. en fisuras de cuarcitas de los altos riscos silúricos de Sierra Siruela, 15-V-1954, *Rivas Goday*, MAF 92263.

Cáceres. Jaraiz de la Vera, 30TTK6538, 540 m, fisuras humificadas y umbrosas de paredes, 8-XI-1993, *A. Amor*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 772, MACB 62104. Madrigal de la Vera, 30TTK94, 300 m, fisuras húmedas, 12-X-1986, *M. Luceño & P. Vargas* 1693PV, MACB 24339. Cerros au dessus de Navalmoral, 29-IV-1863, *E. Bourgeau* 2577, G.

Cádiz. Montes Propios de Jerez de la Frontera, El Parral, 14-V-1989, *E.F. Galiano & A. Ramos*, MACB 32225. Los Barrios, La Montera del Torero, 25-IX-1985, *F.J. Fernández Díez*, G 374090; rochers, c. 150 m, 22-IV-1987, *A. Charpin* 20958, G 305712; arroyo de las Tunas, growing in crevices amongst moss, 300 m, 11-IX-1967, *B. Molesworth*, K. Algeciras, 25-III-1907, Det. R. Chodat, G. Au Picacho de Alcalá de los Gazules, 20-IV-1849, *E. Bourgeau* 512, G. Algeciras, bewachsene Felsen in Mieltal, 2-IV-1974, *W. & C.*

Bennert, (2ª fronde superior). B 11969. Algeciras, barranco del canuto del Capitán, 30STF7402. 100-120 m, rocas cercanas al arroyo, substrato ácido. 14-IV-1989, *J.A. Alejandre et al.*, MAF 143039.

Ceuta, ad rupes umbrosas, V-1907, *B. Vicioso*, MA 902. Camino cerca del faro. 17-V-1907, *B. Vicioso*, MA 892.

Ciudad Real, Moral de Calatrava, Sierra del Moral, roquedos cuarcíticos. 28-VII-1987, *Monge & Romero*. MACB 38405, 27-VII-1987, *M.A. Carrasco, C. Monge & M. Velayos*. MACB 38940. Valdepeñas, Sierra del Peral, 1000 m. roquedos cuarcíticos. 27-V-1989, *C. Monge et al.*, MACB 37045. Cabañeros, arroyo de la Chorrera, 30SUJ6058, 650 m, grietas de roquedos cuarcíticos umbrosos. 1-V-1990, *J. Vaquero*, MACB 41092.

La Coruña, Cuenca Alta del río Mandeo, 12-X-1966, *J. Dalda*, MACB 31611. Cuenca Alta del río Mandeo, linderos de Villarraso. 23-III-1967, *J. Dalda*. MACB 722. Montes del Pindo, Peñafiel, 350 m, en grietas de roquedos graníticos. 1-IV-1995, *R. Iglesias*. *Exsiccata Pteridophyta Iberica* 859. MACB 62099. Santixo, rochers aux bords de la route, 24-IV-1991, *A. Charpin et al.* AC22563, G 384976.

Cuenca, Sierra de Valdemeca. 1550 m, en fisuras de rodenos. 19-VII-1974, *G. López*. MA 232409 y MAF 91474. Cañete, Hoz del Cabriel, areniscas triásicas (rodenos), 19-V-1974, *A. González & G. López* 1301. MA 232288.

Gerona, Cap de Creus, Cala Bona, 31TEG28. 50 m, pelitas, 30-IV-1991, *L. Sáez*. ($n = 72$), MAF 137877. Cadaqués, in fissuris rupium. 30-III-1872, *F. Trémols*, MA 909 y MA 158981.

Granada, barranco del río Maitena, Sierra Nevada, en paredones silíceos rezumantes. III-1981, *A.E. Salvo*, MAF 106805. Sierra Nevada, barranco del río Laroles. 30SVF99. 1050 m. declives terrosos y umbríos. 2-XII-1989, *J. Molero & J. Jiménez*, *Exsiccata Pteridophyta Iberica* 570, MACB 36147. Margen derecho del río Lanjarón, 1800 m, 16-IX-1983, MGC 12288 (individuo más pequeño). Sierra Nevada, barranco del Río Maitena, en un paredón muy sombrío esquistoso, 1200 m, IV-1980, *Gil & A.E. Salvo*, MGC 6540.

Gran Canaria, Fuerteventura, Riscos Carniceros, 550 m. entre rocas, 15-XII-1973, *G. Kunkel*, JVC 15838. Gran Canaria, San Nicolás de Tolentino, rocas secas y sombrías sobre la población, 29-VII-1971, *E.R. Sventenius*, JVC 15763. Gran Canaria, Valleseco, Barranquillo de Saugo, 28RDS4202, 26-V-1985, *A. Marrero*, JVC 18275. Gran Canaria, Valleseco, Barranquillo de Saugo, 14-III-1992, *T. Sánchez & A. Marrero*, JVC 18259. Gran Canaria, Valleseco, Barranquillo de Saugo, 14-III-1992, *T. Sánchez & A. Marrero*, JVC 18261.

Huelva, entre Sta. Ana et Almonaster, murs de pierres sèches, silice, 500 m, *A. Charpin, C. Defferrand & B. Valdés* AC17030, G 222015.

Lugo, Doade, 22-V-1967, *Bellot*, MACB 31992. San Clodio, 23-VIII-1967, *Bellot*, MACB 32149. Los Peares, 3-XI-1976, *I. Barrera*, MACB 4774.

Málaga, Ronda. Sierra de Grazalema, Los Alcornocales, 30STF9671, 760 m, en areniscas. 8-VI-1993, *A. Aparicio, M.A. Carrasco & M. Velayos* 6558, MACB 51095. Tolox, dehesa de Bohornoque. 30SUF3256, 550 m, grietas profundas de rocas con protosuelo húmico. 15-II-1985, *Cabezudo & España*, MGC 16381. Sierra de Tolox, 30SUF25, V-1979, *A.E. Salvo*, MGC 5962.

Melilla, 1934, *Sennen*, MA 900.

Murcia, Sierra Carbonera, riscos del Cerro Carbonero, 1400 m, 12-VII-1968, *M. Ladero*, MACB 5144.

Orense, Los Peares, 29TPH0300, 7-I-1977, *I. Barrera*, MACB 12817, MACB 4785. Villamartin de Valdeorras, 29TPG59, 400 m, talud pizarroso, 10-X-1993, *C. Prada*, Exsiccata Pteridophyta Iberica, MACB 59147.

Pontevedra, Camposancos, 14-V-1948, MACB 11716. Lourizán, 29TNG2795, 50 m, muros graníticos. 21-IX-1987, *M.C. Casalderrey*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 302/87, MACB 31007. Tuy, Monte Aloya, 29TNG25, 250 m, fisuras de granitos, 5-V-1993, *S. Pajarón & E. Pangua*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 746, MACB 59141. Vigo, Moledo, grietas nitrificadas de muro granítico, 20-III-1982, *S. Castroviejo* 6175 SC, MACB 24299. Vigo, Illas Sicas, 8-IV-1970, *A.M. Hernández*, MGC 1659. Carretera de Bayona a Oya, 2-XI-1976, *I. Barrera*, MACB 4798.

Salamanca, entre Horcajo y Valdehijaderos, TK68, 6-III-1990, *Giráldez, Sampedro & Serradilla*, MACB 48254. Sotoserrano, 29TQE4883, 700 m, 14-XI-1989, *M. Ladero et al.*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 594, MACB 43363. Valle de las Batuecas, pr. monasterio, 29TQE4283, 640 m, fisuras de rocas silíceas en exposición SW, 25-VI-1989, *B. Marcos*, Exsiccata Pteridophyta Iberica 593, MACB 43364.

Sevilla, entre El Pedroso y Cazalla, suelos ácidos, roquedos, 15-IV-1071, *E. Domínguez et al.*, MACB 3473.

Toledo, Castillo de Bayuela, berrocales graníticos, 20-X-1977, *P. Cantó*, MAF 112504.

Teruel, Sierra de Gea, en los peñascos, MA 882.

Vizcaya, Urduliz, Las Peñas, 30TWP0302, 200 m, fisuras de roquedos silíceos, arenas terciarias, 3-XI-1984, *L.F. Sánchez & J.A. Alejandro* 1832/84, MA 333730.

FRANCIA

Alpes-Maritimes, Roquebillière, 19-XI-1872, *G.C. Joad.*, K.

Aveyron, vallée du Rance à Balagnier, rochers schisteux, 300 m, 26-IV-1899, *H. Coste*, G.

Calvados, rochers siliceux près Clécy, VII-1867, *Nusnot*, G.

Corse, Scala de Regina, 18-IV-1926, *Ruppert*, G.

Corrèze, Ste. Fortunade, gneiss, 550 m, 7-VII-1877, *A. Dumas*, BM.

Côtes du Nord, Ploumanach, plage de la Bastille, rochers granitiques, 25-VIII-1967, *A.C. Charpin*, G 127056.

Finistère, ad truncos vetustos humidus prope Quimper, I-1898, *L. Giraudias*, G. Mauer vei Trégunc, westl. Pont-Aven 15-VII-1962, *P. Aellen*, G. La Foret

Fouesnant, vieux murs habités à Keranbarz, 5-IX-1907, *C.A. Picquenard*, G. Bretagne, Crosson, at 50 m. shaded wall in pine forest, common around Crosson, VII-1961, *G.J. de Joncheere* WEF11, BM.

Loire-Atlantique, rocheurs maritimes humides à la Raise près Préfailles, 9-VIII-1864, herbario E.J.A. Gadeceau, BM.

Manche, fissures des rochers maritimes du Roc de Granville, VIII-1858, *Brehier*, G.

Morbihan, Bretagne, entre les rochers granitiques, près de Port Navalo, 16-IX-1924, *Ruppert*, G.

Vendée, Saint Hilaire, VII-1874, *Pontarlier*, G. Île de Noirmoutier, fentes rochers de grès, 10-X-1912, *H.A. Romieux*, G.

Vosges, circa Bilsche et Weisswenburg, ad saxa madida quartzosa "gres vosgien", 1860, *J.B. Mougeot*, *C. Nestler* & *W.I. Schimper*, G. Wasigenstein bei Steinbach, 9-VII-1915, *Ruppert*, G.

Var, Porquerolles, 11-III-1921, herbario H. Correvon, G.

GRAN BRETAÑA

Channel Islands, Guernsey, from hedgebank in lane above Petit Bôt Bay, forest, 20-IV-1971, *H. Gabe*, B 11961. Isle of Jersey, VII-VIII-1852, *H.C. Watson*, B 16763. Jersey, Bouley Bay, growing in crevices of dry rocks near the sea in association with *A. marinum*, 4-IX-38, *B.L. Perkins*, Flora of British Isles Cat. N° 2255, K.

England, Cornwall, pr. Pencanze, IX-1869, *A. Leipner*, G. Devonshire, crevices of Devomanshade rocks, VI-1878, *W.B. Waterfall*, B 16757-58.

Wales, North Wales, near Cornway, 1844, *N. Wilson*, B 16760. Barmouth, N. Wales, VII-1835, *N. Wilson*, B 16753.

GRECIA

Argolis, 1889, Col. Heldreich, K. (1 individuo).

ITALIA

Campania, Île d'Ischia, lave recente nommée Arbo, III-1832, *A. Richard*, G.

Liguria, Riviera di Levante, Riomaggiore, in muris vinearum supra urbem, 11-V-1909, *J. Bornmüller*, B 16773-74. Prov. di Genova, in fissuris murorum vetustorum vinearum secundum il canale qui inter pagos Río Maggiore et Mannarola fluit, solo siliceo, alt. 50 m, 6-VI-1906, *O. Mattiolo* & *E. Ferrari*, Exs. Fiori & Beguinot 1202, BM 36464 y K.

La Spezia, Cinque Terre, valle di Riomaggiore, lungo lamulattiera verso la Madonna di Montenero, a q. 175 m circa, su arenaria, 8-III-1994, *D. Marchetti*, MACB 62107. Cinque Terre, Sopra Groppo, verso Volastra, a q. 275 m circa, su arenaria, 8-III-1994, *D. Marchetti*, MACB 62106.

Sardegna, Abbasanta (Nuraghe Losa), at 300 m on the walls of the nuraghe, VI-1960, *G.J. de Joncheere* MME53, BM. Wet flush in middle of *Cistus* scrub. Porto Rafael, 0-50 m, 4-IV-1973, *C.J. Humphries* & *I.B.K. Richardson* 47, BM. Aggius, nr. Tempio, at 600 m. basaltic rocks above village, in cracks sometimes deeply hidden, VI-1960, *G.J. de Joncheere* MME18, BM.

Toscana, valle delle Fonti ad Asccano, IX-1862, *Savi*, G.

LUXEMBURGO

Sauertal, südlich Bollendorf, "Kahlekapp", in Kehlen und Spalten der Sandsteinfelsen, NW-Exp., 4-X-1959, *A. Schumacher*, B 11960.

MARRUECOS

Tanger, Tizi Taghilarte. Macizo del Gurugú, grietas de rocas silíceas, 28-XII-1986, *A.M. Escámez*, MGC 18749. Yazimen. Macizo del Gurugú, grietas de rocas, 15-IV-1987, *A.M. Escámez & A.E. Salvo*, MGC 18817. Hab. in rupestribus umbrosis montis Dj. Quebir, pr. Tandja, 8-VII-1930, *P. Font Quer*, Iter Maroccanum n° 6, B 16843 y MA 904. In rupestribus umbrosis montis Djebel Kebir, prope Tanger, III-1828, B 16846. In fissuris rupium ad promontorium Spartel prope Tanger, 12-VI-1802, B 16847. Contreforts du Gurugú, 28-I-1932, *Mauricio*, Plantes d'Espagne n° 8221, MA 897 y MA 163838. Gurugú, sites obscurs et frais, 24-X-1930, *Mauricio*, Plantes d'Espagne n° 8072, MA 1206. Ex rupibus maritimis prope Tanger, 18-IV-1871, *J. Ball*, B 16848. Ex rupibus maritimis prope Cap. Spartel, IV-1871, *J. Ball*, B 16849. Umgebung von Tanger, III-1904, *A. Albrecht*, F. Wirtgen Pteridophyta Exsiccata N° 3956. K. Gurugú, sites ombreux humides, 7-II-1934, Exsiccata Ch. Duffour, *Mauricio*, MA 425866. Tánger, IV-1921, *C. Pau*, MA 898.

Hab. in rupibus arenaceis pr. Emporium Sok-et-Tnin dictum (Beni Hadifa), 900 m, 25-VII-1927, *Font Quer*, Iter Maroccanum 1927 n° 4, MA 896.

Mazuza, Barranco del Lobo, 8-VI-1932, *Pardo & Marti*, MA 893.

PORTUGAL

Algarve, Serra da Picota, près Monchique, 14-VI-1855, *E. Bourgeau*, G. Monchique, Pico do Folha, XII-1980, *A.E. Salvo*, MGC 7236.

Açores, Faial, Espalmanca, 100 m, soil slope, 26-VI-1968, *E. Sjögren*, MA 521813.

Beira Alta, Estrada Coimbra-Guarda, Rio Torto, nas fendas das rochas graníticas, sitio sombrio, 29TPE18, 17-VI-1959, *A. Fernandes, J. Matos & A. Sarmiento*, G 113384.

Estremadura, sierra de Sintra, XII-1980, *A.E. Salvo*, MGC 7243. Sintra, pr. Alqueirão ad muros, solo siliceo, 23-I-1952, *B.V. Rainha & A.R. Pinto* 2255, G. Serrae de Cintra, in cavernis humidis, XII-1839. Welwitschii iter Lusitanicum 307, G. Azoia, Ribeira da Ursa, in declivibus umbrosis, 29SMC59, 150 m, 21-V-1986, *A.R. Pinto et al.* 2354, G 361294.

Madeira, Machico, 1900, *Borrmüller*, G. Pico João do Prado along road Poiso-Sta. de serra, ER202, in rock fissures, 13-VII-1985, *R. Viane* 3084, B 86649.

Minho, Ponte do Lima, 29TNG32, VIII-1917, *G. Sampaio*, G.

Trás-os-Montes, Bragança, Moinho dos Padres, 600 m. basi Cabeço do Jôguinho, in fissuris rupium fortasse serpentinosarum, 28-VI-1966, *P. Silva, B. Rainha & J. Martins* n° 7705, G 103201.

SUIZA

Wallis, Martigny, Felsen im wald Tolla, 4-V-1914, *H. Beger*, B 11955.

A. obovatum Viv. subsp. *numidicum* Salvo & Cabezudo

MARRUECOS

Tanger. Mediuna, areniscas, TE37. 14-V-1990, B. Cabezudo et al. 277/90, MCG 28503.

HÍBRIDOS NATURALES

Asplenium obovatum Viv. nothosubsp. *cyrnosardoum* (Rasbach, Vida & Reichst.) Rasbach, Rasbach, Reichst., Viane & Bennert nothovar. *cyrnosardoum* (= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva)

ITALIA

Toscana. von der Insel Giglio, Porto S. Stefano, 28-III-1931, W. Freiberg, (individuo mitad superior del pliego), G.

Asplenium obovatum Viv. nothosubsp. *cyrnosardoum* (Rasbach, Vida & Reichst.) Rasbach, Rasbach, Reichst., Viane & Bennert nothovar. *ibericum* Rasbach, Rasbach, Reichst., Viane & Bennert (= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst. x *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva)

ESPAÑA

Cádiz. Miel valley, c. 5 km W. of Algeciras. c. 110 m alt. H. Rasbach, K. Rasbach & H.W. Bennert Ras-601, 14-IV-1988. MGC 32202. Isotypus. Citología: $n = 2^{III}, 34^{II}, 34^I$ (híbrido triploide). Algeciras, bewachsene Felsen in Miertal. 2-IV-1974, W. Bennert & C. Bennert, (1ª y 4ª frondes superiores), B 11969.

Asplenium x *sleepiae* Badré & Boudrie nothosubsp. *sleepiae* (= *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva x *A. foreziense* Legrand ex Giraudias)

ESPAÑA

Cuenca. Boniches, XK12, 1100 m, 4-VI-1985. G. Mateo, MA 332560.

Gerona. Cap de Creus, torrent de Mas Bufadors, 31TEG18, 200 m, pelitas, 30-IV-1991, L. Sáez, MAF 137874.

Granada. Margen derecho del río Lanjarón. 1800 m. 16-IX-1983, MGC 12288 (individuo más grande).

FRANCIA

Cantal. Leynhac, 450 m, vieux murs de schiste, 8-X-1909, L. Lavergne, G 1934.

Loire. Montbrison, 1898, Legrand, B 14689. Rochers granitiques de Montbrison, IX-1874, Legrand, B 14700.

Asplenium x sleepiae Badré & Boudrie nothosubsp. *krameri* Herrero, Prada, Pajarón & Pangua (= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. foreziense* Legrand ex Giraudias)

FRANCIA

Var. near Roquebrune, montagne Les Maures, 28-VII-1997, H. Rasbach, K. Rasbach & R. Viane Ras-980. herbario personal de H. Rasbach, ($n = 36^{II} 36^I$, H. Rasbach), cultivated at Gottertal, fronds detached the 14-I-1997.

7.2. APÉNDICE II

Material recolectado por nosotros

Asplenium fontanum (L.) Bernh. subsp. *fontanum*

ESPAÑA

Alicante, Campell, Vall de Laguart, 30SYH5296, c. 300 m, grietas de rocas calizas, 18-VI-1995, *A. Herrero*, CAM1-CAM4 y CAM6-CAM20. Puig Campana, grietas de roca caliza, 17-II-1993, *S. Pajarón et al.*, CE318.

Cuenca, Beteta, hoz de Beteta, fuente de los Tilos, 30TWK7389, c. 1100 m, grietas de rocas calizas, 29-V-1995, *T. Almaraz, A. Herrero & L. Medina*, BET1-BET22; 1-VI-1996, *C. Prada*, BET24-BET43.

Corduente, valle del Alto Tajo, 30TWL7415, c. 1100 m. en roca caliza, 7-IV-1993, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*, AH1F.

Gerona, San Julián de Valfogona, 31TDG4271, c. 1000 m, en conglomerados calizos, 10-XII-1995, *G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez & A. Pujol*, RIP1-RIP20; Sierra del Milany, Castell de Milany, 31TDG46, c. 1530 m, grieta de conglomerados calizos, exposición S, 28-XII-1991, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*, AH3F.

Guadalajara. Corduente, valle del Alto Tajo, 30TWL7415, c. 1100 m, en roca caliza, 7-IV-1993, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*, AH1F y AH2F.

Huesca, Benasque, valle de Estós, embalse de Estós, 31TBH9822, c. 1300 m, grietas de calizas, 24-VIII-1996, *J.L. Castillo & A. Herrero*, EST3-EST15.

Fanlo, refugio de Góriz, 31TBH5527, c. 2200 m. grietas de rocas calizas, 15-VIII-1994, *M.E. González & A. Herrero*, GOR1-GOR7; 1-X-1995, *G. Aragón, J.L. Castillo, M.E. González, A. Herrero & J.L. Izquierdo*, GOR8-GOR15.

Fanlo, cañón de Añisclo, 31TBH5823, c. 1750 m. talud rocoso y grietas de calizas, 14-VIII-1994, *M.E. González & A. Herrero*, AÑI1-AÑI16.

Nueno, Sierra de Guara, barranco de Lapillera. 30TYM28, c. 950, 24-VI-1995, grietas y talud de rocas calizas; *I. Álvarez Fernández, A. Herrero, J.L. Izquierdo, A. Pujol & N. Yagüe*, GUA1-GUA20.

Torla, valle del río Ara, San Nicolás de Bujaruelo, 30TYN3731, c. 1300 m, grietas de roca caliza, 17-VIII-1994, *M.E. González & A. Herrero*, BUJ1-BUJ17; 3-X-1995, *G. Aragón, J.L. Castillo, M.E. González, A. Herrero & J.L. Izquierdo*, BUJ18-BUJ36.

Torla, valle del río Ara, Puente viejo de los Navarros, 30TYN3726, c. 1150 m, en las grietas de las piedras calizas del puente. 4-X-1995, *G. Aragón, J.L. Castillo, M.E. González, A. Herrero & J.L. Izquierdo*, ARA1-ARA20.

Navarra, Garayoa, a cerca de 2 Km del pueblo de Garayoa, 30TXN45, 900 m, calizas compactas, talud de borde de camino. 27-X-1995, *S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, GAR1-GAR24.

Isaba, Campa de la Contienda, 30TXN75, c. 1700 m, lapiaz de rocas calizas, 27-X-1995, *S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, CON1-CON20.

Tarragona, La Sénia, Reserva de los Puertos de Tortosa y Beceite, barranco de la Fou, 31TBF6711, c. 650 m, grietas de calizas, *I. Álvarez Fernández, A. Herrero & N. Yagüe*, FOU1-FOU20.

Teruel, Noguera, Sierra de Albarracín, barranco de los Polos de las Fuentes, 30TXK1776, c. 1450 m, en rocas calizas, 18-V-1996, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*, TRA1-TRA20.

FRANCIA

Pyrénées-orientales, Prats-de-Mollo, carretera D115 hacia Le Tech, Desfiladero de la Baillanouse, 31TDG69, talud y grietas de rocas pizarroso-esquistosas, 18-IX-1994, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, BAI1-BAI22.

Asplenium foreziense Legrand ex Giraudias

ESPAÑA

Almería, Gérgal, Sierra de los Filabres, Calar Alto, 30SWG31, c. 1700 m, grietas de rocas esquistosas, 16-VI-1994, *Herrero, Pangua & Prada*, AH105F-AH130F; 23-IV-1995, *T. Almaraz, A. Herrero, J.L. Izquierdo & L. Medina*, FIL1-FIL18.

Cuenca, Boniches, barranco del arroyo de la Vega, 30SXX1825, c. 1100 m, grietas de areniscas rojas, 11-VI-1994, *M.E. González & A. Herrero*, AH34F-AH50F; 30-VI-1996, *A. Herrero*, TIO1-TIO6.

Gerona, Cadaqués, Cap de Creus, Cala Bona, 31TEG2585, c. 50 m, en grietas de rocas silíceas orientadas al NE, 4-12-1994, *I. Álvarez Fernández, A. Herrero & N. Yagüe*, BON6-BON8.

El Port de la Selva, Puig dels Bufadors, 31TEG2083, c. 400 m, en grietas de rocas esquistosas, 4-XII-1994, *I. Álvarez Fernández, A. Herrero & N. Yagüe*, BUF1-BUF20; 9-XII-1995, *G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez & A. Pujol*, BUF22-BUF30 y BUF32-BUF33.

Granada, Pórtugos, Sierra Nevada, pista de Capileira al Mulhacén, Pico del Prado Llano, 30SVF7193, c. 2500 m, grietas de pizarras, 24-VII-1996, *T. Almaraz et al.*, MUL1-MUL19 (19 individuos).

Teruel, Albarracín, Sierra de Albarracín, barranco del Navazo, 30TXK3572, c. 1250 m, grietas de areniscas rojas, 18-V-1996, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*, CAB6 y CAB8-CAB14.

FRANCIA

Ardèche, Lafiguère, Los Cévennes, c. 350 m, grietas de esquistos, 29-VIII-1993, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, FRA8-FRA14 y FRA17-FRA20.

Gard, Chambon, Los Cévennes, c. 350 m, grietas de pizarras, 30-VIII-1993, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, FRA24-FRA25 y FRA31-FRA34.

Lozère, Ste. Margarite-La Figuère, Los Cévennes, Valle del Borne, c. 450 m, grietas de granitos, 29-VIII-1993, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, FRA1-FRA5.

Puy-de-Dôme: Champeix, carretera de Champeix a Neschers, en granitos, 12-IX-1994, *M. Boudrie & R. Viane*, RV6044-RV6046.

Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum

ESPAÑA

Gerona, Cadaqués. Cap de Creus, Cala Bona, 31TEG2585, c. 50 m, en grietas de rocas silíceas orientadas al NE, *I. Álvarez Fernández, A. Herrero & N. Yagüe*, 4-XII-1994, BON1-BON5 y BON10-BON18; 9-XII-1995, *G. Aragón, A. Herrero I. Martínez & A. Pujol*, BON19-BON32.

FRANCIA

Pyrénées-orientales, Port-Vendres, Cap Béar, 31TEH10, c. 50 m, en muros artificiales de pizarra, 27-VII-1994, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, BEA1; 9-XII-1995, *G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez & A. Pujol*, BEA2-BEA8 y BEA10-BEA20.

Var, Saint Raphaël, Le Dramont, Cap du Dramont, c. 30 m, en grietas de reolita orientadas al mar, 27-VII-1994, *M. Boudrie et al.*, VARI-VAR15; *I. Álvarez Fernández, A. Herrero & N. Yagüe*, 13-VIII-1997, VAR16-VAR21.

***Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst.**

ESPAÑA

Cádiz, Algeciras, valle del río de la Miel, 30STE7599, c. 200 m, areniscas del Algibe, 15-IV-1995, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, MIE26-MIE27; 14-V-1995, *A. Herrero*, MIE34-MIE39 y MIE41-MIE47; 11-III-1996, *A. Herrero*, MIE48-MIE50, MIE52-MIE58, MIE61-MIE67, MIE70-MIE71a, MIE73-MIE76.

***Asplenium obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva**

ESPAÑA

Almería, Níjar, sierra del Cabo de Gata, El Cigarrón, 30SWF7467, c. 150 m, grietas protegidas de rocas volcánicas, 15-VI-1994, *A. Herrero, E. Pangua & C. Prada*, AH89F-AH90F; 24-IV-1995, *T. Almaraz, A. Herrero, J.L. Izquierdo & L. Medina*, CIG1-CIG20; Níjar, Rodalquilar, sierra del Cabo de Gata, 30SWF8579, c. 100 m, rellanos protegidos de roca volcánica, 15-VI-1994, *A. Herrero, E. Pangua & C. Prada*, AH92F-AH104F.

Asturias, Luarca, playa de Salinas, 29TPJ9825, nivel del mar, grietas de pizarras orientadas al mar, 3-VII-1994, *Y. Álvarez, A. Herrero & J.L. Izquierdo*, LUA1-LUA19.

Luarca, Ermita de San Timoteo, 29TPJ9922, c. 50 m, muros artificiales abandonados de pizarras, 23-VIII-1995, *M.E. González, A. Herrero & J.L. Izquierdo*, TIM1-TIM22.

Cáceres, Hoyos, 29TPE9348, c. 500 m, en grietas de granito de un muro artificial, 5-IV-1996, *G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez & A. Pujol*, HOY1-HOY20.

Cádiz, Algeciras, valle del río de la Miel, 30STE7599, c. 200 m, areniscas del Algibe, 14-VI-1994, *A. Herrero, E. Pangua & C. Prada*, AH51F-AH88F; 22-I-1995, *A. Herrero, E. Pangua & C. Prada*, MIE1-MIE25; 15-IV-1995, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, MIE28 y MIE31-MIE33; 11-III-1996, *A. Herrero*, MIE77-MIE83.

La Coruña, Paderne, río Mandeo, Fraga de Chelo. 29TNH69, c. 70 m, grietas de pizarras, 2-VI-1995, *A. Herrero, J.L. Izquierdo & G. Morales*, CHE1-CHE21b.

Madrid, Torreldones, 30TVK2092, c. 850 m, grietas frescas de granitos, 13-XI-1994, *A. Herrero*, TOR1-TOR20; 4-II-1996, *A. Herrero*, TOR21-TOR38.

Orense, Villamartín de Valdeorras, 29TPG59, c. 450 m, talud pizarroso en zona de viñedos, 30-VII-1995, *C. Prada*, VAL1-VAL20.

Pontevedra, Tuy, grietas de muros artificiales de granito, 18-VI-1994, *S. Pajarón & E. Pangua*, TUY1-TUY16.

Teruel, Albarracín, Sierra de Albarracín, barranco del Navazo, 30TXK3572, c. 1250 m, grietas de areniscas rojas, 18-V-1996, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*, CAB1-CAB4.

Toledo, Almorox, Pinar de Almorox, 30TUK85, c. 700 m, grietas de rocas silíceas, 29-IV-1996, *A. Herrero, G. López & C. Prada*, ALM1-ALM20.

Los Navalucillos, Montes de Toledo, valle del arroyo del Chorro, 30SUJ5879, c. 750 m, grietas de pizarras, 2-IV-1995, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*, NAV1-NAV22.

ITALIA

La Spezia, Cinque Terre, c. 250 m. entre Riomaggiore y la Madonna de Montenero, muros artificiales de areniscas, 23-VII-1994, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*, ITA12-ITA25.

HÍBRIDOS NATURALES

Asplenium obovatum Viv. nothosubsp. *cyrnosardoum* (Rasbach, Vida & Reichst.) Rasbach, Rasbach, Reichst., Viane & Bennert nothovar. *cyrnosardoum* (= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva)

Pyrénées-orientales, Port-Vendres, Cap Béar, 31TEH10. c. 50 m, en muros artificiales de pizarra, 9-XII-1995, *G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez & A. Puñol*, BEA9 (sin comprobar citológicamente).

Asplenium obovatum Viv. nothosubsp. *cyrnosardoum* (Rasbach, Vida & Reichst.) Rasbach, Rasbach, Reichst., Viane & Bennert nothovar. *ibericum* Rasbach, Rasbach, Reichst., Viane & Bennert (= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst. x *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva)

Cádiz, Algeciras, río de la Miel, 30STE7599, c. 200 m, areniscas del Algibe, 14-VI-1994, A. Herrero. MIE40 ($n = c. 36^{II} 36^I$); MIE29, MIE30, MIE51, MIE68 (sin comprobar citológicamente).

Asplenium x *protomajoricum* Pangua & Prada nothosubsp. *protomajoricum* (= *A. fontanum* (L.) Bernh. subsp. *fontanum* x *A. petrarchae* (Guérin) DC. subsp. *bivalens* (D.E. Mey.) Lovis & Reichst.).

Alicante, Campell, vall de Laguart, 30SYH5296, c. 400 m, grieta de roca caliza, 18-VI-1995, A. Herrero, CAM5.

Asplenium x *recoderi* Aizpuru & Catalán nothosubsp. *recoderi* (= *A. fontanum* (L.) Bernh. subsp. *fontanum* x *A. ruta-muraria* L. subsp. *ruta-muraria*).

HUESCA: Benasque, valle de Estós, embalse de Estós, 31TBH9822, c. 1300 m, grieta de roca caliza, 24-VIII-1996, J.L. Castillo & A. Herrero, EST2.

Asplenium x *sleepiae* Badré & Boudrie nothosubsp. *sleepiae* (= *A. obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva x *A. foreziense* Legrand ex Giraudias).

Gerona, El Port de la Selva, Puig dels Bufadors, 31TEG2083, c. 400 m, en grieta de rocas esquistosas, 9-XII-1994, G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez, BUF21 y BUF31.

Teruel, Albarracín, Sierra de Albarracín, barranco del Navazo, 30TXK3572, c. 1250 m, grieta de areniscas rojas, 18-V-1996, G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez, CAB7.

Asplenium x *sleepiae* Badré & Boudrie nothosubsp. *krameri* Herrero, Prada, Pajarón & Pangua (= *A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum* x *A. foreziense* Legrand ex Giraudias)

Gerona, Cadaqués, Cap de Creus, Cala Bona, 31TEG2585, c. 50 m, en grietas de rocas silíceas orientadas al NE, 4-XII-1994, I. Álvarez Fernández, A. Herrero & N. Yagüe, BON9, MACB 52475.

7.3. APÉNDICE III

Individuos utilizados en los estudios de la generación gametofítica.

Asplenium fontanum (L.) Bernh. subsp. *fontanum*

CE318: Hs, Alicante, Puig Campana, grieta de roca caliza, 7-II-1993, S. Pajarón *et al.*

BET 19: Hs, Cuenca, Beteta, hoz de Beteta, fuente de los Tilos, 30TWK78, c. 1100 m, grieta de roca caliza, 29-V-1995, T. Almaraz, A. Herrero & L. Medina.

AH1F: Hs, Corduente, valle del Alto Tajo, 30TWL71, c. 1100 m, en roca caliza, 7-IV-1993, G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez.

AH3F: Hs, Gerona, San Julián de Valfogona, sierra del Milany, Castell del Milany, 31TDG46, c. 1530 m, grieta de conglomerados calizos, exposición S, 28-XII-1991, G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez.

BUJ 1: Hs, Huesca, Torla, valle del río Ara, San Nicolás de Bujaruelo, 30TYN33, c. 1300 m, grieta de roca caliza, 17-VIII-1994, M.E. González & A. Herrero.

GOR 1: Hs, Huesca, Fanlo, refugio de Góriz, 31TBH52, c. 2200 m, grieta de roca caliza, 15-VIII-1994, M.E. González & A. Herrero.

BAI 14: Ga, Pirénées orientales, Prats-de-Mollo, Desfiladero de la Baillanouse, 31TDG69, talud de rocas pizarrosas, 18-IX-1994, A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada.

Asplenium fontanum (L.) Bernh. subsp. *pseudofontanum* (Kossinsky) Reichst. & Schneller

TR7400 (= C.R. Fraser-Jenkins sheet 20): Pakistán, Swat, Valley of Kalam, c. 2500 m alt., rock overhangs, 1990.

TR7402 (= C.R. Fraser-Jenkins sheet 22): Pakistán, Swat, Valley of Kalam, 1990.

Asplenium foreziense Le Grand ex Giraudias

AH115F: Hs, Almería, Gérgal, Sierra de los Filabres, Calar Alto, 30SWG31, c. 1700 m, grieta de esquistos, 16-VI-1994, A. Herrero, E. Pangua & C. Prada.

BUF 10a: Hs, Gerona, El Port de la Selva, Puig dels Bufadors, 31TEG28, c. 400 m, grieta de rocas esquistosas, 4-XII-1994, I. Álvarez Fernández & A. Herrero & N. Yagüe.

CAB 9: Hs, Teruel, Albarracín, Sierra de Albarracín, barranco del Navazo, 30TXK37, c. 1250 m, grieta protegida de areniscas rojas, 18-V-1996, G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez.

FRA 2: Ga, Lozère, Ste. Margarite-La Figuière, Macizo de los Cévennes, valle del Borne, c. 450 m, grieta de granitos, 29-VIII-1993, A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada.

***Asplenium macedonicum* Kümmerle**

J1: Macedonia, Prilep, 1969-1970 (fecha sin determinar), *A. Sleep*. Fronde prensada el 10-VIII-1989 proveniente de planta viva en cultivo.

J2: Macedonia, Prilep, 20-IX-1973, *A. Sleep*. Fronde prensada el 10-VIII-1981 proveniente de planta viva en cultivo.

Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *obovatum

BON 20: Hs, Gerona, Cadaqués, Cap de Creus, Cala Bona, 31TEG28, c. 50 m, grieta de roca silícea, 9-XII-1995, *G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez & A. Pujol*.

BEA 20: Ga, Pyrénées orientales, Port-Vendres, Cap Béar, 31TEH10, c. 50 m, grieta de pizarras orientadas al mar, 9-XII-1995, *G. Aragón, A. Herrero, I. Martínez & A. Pujol*.

VAR 7: Ga, Var, Saint Raphaël, Le Dramont, Cap du Dramont, c. 30 m, grieta de roca silícea, 27-VII-1994, *M. Boudrie et al.*

***A. obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *deltoideum* Demiriz, Viane & Reichst.**

Ras-1022: Ga, Finistère, cap Brezellec, 21-VI-1995, *H. Rasbach, K. Rasbach & R. Viane*.

***Asplenium obovatum* Viv. subsp. *obovatum* var. *protobillotii* Demiriz, Viane & Reichst.**

MIE 27 y MIE 41: Hs, Cádiz, Algeciras, valle del río de la Miel, 30STE79, c. 200 m, en areniscas del Algibe, 14-V-1995, *A. Herrero*.

MGC 32201: Hs, Cádiz, Algeciras, Miel valley, c. 5 km W. of Algeciras, c. 110 m alt., 15-IV-1988, *H. Rasbach, K. Rasbach & H.W. Bennert*, Ras-610.

***Asplenium obovatum* Viv. subsp. *lanceolatum* (Fiori) P. Silva**

AH84F: Hs, Cádiz, Algeciras, valle del río de la Miel, 30STE79, c. 200 m, en areniscas del Algibe, 14-VI-1994, *A. Herrero, E. Pangua & C. Prada*.

TUY 6: Hs, Pontevedra, Tuy, grieta de muro artificial de granito, 18-VI-1994, *S. Pajarón & E. Pangua*.

NAV 8: Hs, Toledo, Los Navalucillos, Montes de Toledo, valle del arroyo del Chorro, 30SUJ57, c. 750 m, grieta de pizarras, 2-IV-1995, *G. Aragón, A. Herrero & I. Martínez*.

ITA 12: It, Liguria, La Spezia, Cinque Terre, Monte della Madonna, carretera de La Spezia a Riomaggiore, c. 150 m, muro artificial de areniscas, 23-VII-1994, *A. Herrero, S. Pajarón, E. Pangua & C. Prada*.

***Asplenium obovatum* Viv. subsp. *numidicum* Salvo & Cabezudo**

MCG 28503: Ma, Tanger, Mediuna, areniscas, 30STE37, 14-V-1990, *B. Cabezudo et al.*, 277/90.

7.4. APÉNDICE IV

Material utilizado en los estudios de: C = citología, EI = electroforesis de isoenzimas, ES = expresión sexual, ME = morfología del esporófito, MG = morfología del gametófito, PA = potencial de aislamiento.

* Individuos esporofíticos obtenidos en cultivos multisporos provenientes de un solo esporófito.

** Mezcla de gametófitos obtenidos en cultivos multisporos provenientes de un solo esporófito.

TAXON: NOMBRE INDIVIDUO O POBLACIÓN	POBLACIÓN	Nº INDIVIDUOS ELECTROFORESIS	ESTUDIOS
<i>A. fontanum</i> subsp. <i>fontanum</i> :			
CAM	Alicante, Campell, Vall de Laguart	19	C, EI, ME
CE316,CE318 y CE323	Alicante, Puig Campana	-	C, ME, MG
BET	Cuenca, Hoz de Beteta	42	C, EI, ES, ME, MG
RIP	Gerona, San Julián de Valfogona	20	EI, ME
AH3F	Gerona, Castell del Milany	-	ME, MG
AH1F	Guadalajara, Alto Tajo	-	C, ME, MG
EST	Huesca, Valle de Estós	13	EI, ME
GOR	Huesca, Refugio de Góriz	10	C, EI, ME, MG
GUA	Huesca, Sierra de Guara, Lapillera	20	C, EI, ME
BUJ	Huesca, San Nicolás de Bujaruelo	20	C, EI, ES, ME, MG, PA
ARA	Huesca, Puente de los Navarros	20	EI, ME
AÑI	Huesca, Cañón de Añisclo	-	ME
GAR	Navarra, Garayoá	21	EI, ME
CON	Navarra, Campa de la Contienda	20	C, EI, ME
FOU	Tarragona, Barranco de la Fou	20	C, EI, ME
TRA	Teruel, Sierra de Albarracín	20	EI, ME
BAI 12, 14, 17 y 20	Francia, Desfiladero Baillanouse	4	EI, ME, MG

Apéndice IV. Continuación.

TAXON: NOMBRE INDIVIDUO O POBLACIÓN	POBLACIÓN	Nº INDIVIDUOS ELECTROFORESIS	ESTUDIOS
<i>A. fontanum</i> subsp.			
<i>pseudofontanum</i> :			
TR7400	Pakistán, Valley of Kalam	10*	EI, ES, ME, MG
TR7402	Pakistán, Valley of Kalam	3*	EI, ME, MG
<i>A. foreziense</i> :			
AH105F-AH130F y FIL	Almería, Sierra de los Filabres	21	C, EI, ES, ME, MG, PA
TIO	Cuenca, Boniches	6	EI, ME
BON	Gerona, Cala Bona	3	EI, ME
BUF	Gerona, Puig Bufadors	28	C, EI, ES, ME, MG
MUL	Granada, Sierra Nevada	20	C, ME
CAB	Teruel, Sierra de Albarracín	8	C, EI, ME, MG
FRA 5, 11, 12, 26, 32 y 36	Francia, Los Cévenes	7	C, EI, ME, MG
RV6044-RV6046	Francia, Champeix	3	EI, ME
<i>A. macedonicum</i> :			
J1	Macedonia, Prilep	12*	EI, ES, ME, MG, PA
J2	Macedonia, Prilep	-	ES, ME, MG
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var.			
<i>obovatum</i> :			
BON	Gerona, Cala Bona	28	C, EI, ME, MG
BEA	Francia, Cap Béar	19	C, EI, ES, ME, MG
VAR	Francia, Cap du Dramont	7	C, EI, ES, ME, MG, PA
Ras-813 y Ras-815	Grecia, Argolis, Methana peninsula	2**	EI, ME
Ras- 825	Grecia, Argolis, Poros island	1**	EI, ME

Apéndice IV. Continuación.

TAXON: NOMBRE INDIVIDUO O POBLACIÓN	POBLACIÓN	Nº INDIVIDUOS ELECTROFORESIS	ESTUDIOS
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>deltoideum</i>			
Ras-1022	Francia, Finistère, Cap Brezellec	1**	EI, ME
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>obovatum</i> var. <i>protobilloti</i> :			
MIE	Cádiz, Valle del Río de la Miel	38	C, EI, ES, ME, MG
MGC 32201	Cádiz, Miel valley	2*	C, EI, ME, MG
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>lanceolatum</i> :			
CIG	Almería, Cabo de Gata, Cigarrón	20	C, EI, ME
AH92F-AH104F	Almería, Rodalquilar	13	C, EI, ME
TIM	Asturias, Luarca, San Timoteo	14	EI, ME
HOY	Cáceres, Hoyos	20	C, EI, ME
AH51F-AH88F y MIE	Cádiz, Valle del río de la Miel	33	C, EI, ES, ME, MG, PA
CHE	La Coruña, Fraga de Chelo	22	C, EI, ME
TOR	Madrid, Torrelodones	38	C, EI, ME
VAL	Orense, Villamartín de Valdeorras	21	EI, ME
TUY	Pontevedra, Tuy	1	EI, MG, ME
CAB	Teruel, Sierra de Albarracín	4	EI, ME
ALM	Toledo, Pinar de Almoróx	20	C, EI, ME
NAV	Toledo, Los Navalucillos	22	C, EI, ES, ME, MG
ITA	Italia, La Spezia, Cinque Terre	-	MG, ME
<i>A. obovatum</i> subsp. <i>numidicum</i> :			
MGC 28503	Marruecos, Tánger, Mediuna	6*	EI, ES, ME, MG