

Ed. J. Rita  
*Taxonomía, Biogeografía y  
 Conservación de Pteridófitos*  
 Soc. Hist. Nat. Bal. - IME  
 Palma de Mallorca, 1990

# ESTUDIOS BIOSISTEMATICOS EN PTERIDOFITOS EUROPEOS

PALOMA CUBAS

Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense,  
 28040 Madrid, ESPAÑA.

## Resumen.

Desde el trabajo de Irene Manton (1950) *Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta*, gran parte de la investigación en helechos ha estado fuertemente influenciada por el enfoque biosistemático de esta autora. Algunos ejemplos pueden poner de manifiesto el estado actual de los conocimientos y los problemas que aún quedan por resolver:

I) Se han establecido las relaciones genéticas existentes entre las tres especies ampliamente distribuidas en Europa de *Polypodium* (*P. cambricum*, *P. vulgare* y *P. interjectum*), y el origen de sus tres híbridos silvestres. Sin embargo, aún están sin aclarar las relaciones que existen entre *P. cambricum* y las poblaciones diploides de Macaronesia (*P. azoricum* y *P. macaronesicum*).

II) La taxonomía del género *Cheilanthes* en Europa y Macaronesia se ha esclarecido gracias al estudio de numerosos híbridos, tanto silvestres como producidos en laboratorio. A pesar de ello, sería conveniente confirmar la naturaleza alopoliploide de *C. tinaei*, mediante la síntesis de un híbrido amplio (i.e. un híbrido entre *C. tinaei* y un diploide o tetraploide no relacionado).

III) Aunque se han realizado numerosos trabajos sobre *Cystopteris fragilis* aggr., las relaciones genéticas dentro de este complejo permanecen oscuras y la taxonomía está lejos de estar resuelta.

IV) *Asplenium* es uno de los géneros mejor conocidos y más estudiados de Europa. No obstante, quedan aspectos por resolver, en particular los relacionados con el complejo *A. trichomanes*, en el cual la autoploidía y la diversificación ecológica han generado táxones poco diferenciados en su morfología y genética.

**Palabras clave:** Biosistemática, citogenética, pteridófitos, *Asplenium*, *Cheilanthes*, *Cystopteris*, *Polypodium*.

## Summary.

Since the book of Irene Manton (1950) *Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta*, and greatly influenced by her biosystematic approach, much work has been done on ferns in Europe. Some examples can help to clarify how far are we now from these early days, and what remains to be done regarding the European ferns under a biosystematic point of view:

I) The genetic relationships between the three widespread species of *Polypodium* in Europe (*P. cambricum*, *P. vulgare* and *P. interjectum*) and the origin of their three wild hybrids have been established. Nevertheless, experimental work is still needed to clarify the relationship between *P. cambricum* and diploids populations from Macaronesia (*P. azoricum* and *P. macaronesicum*).

II) Based on the study of both, wild and synthesized hybrids, the taxonomy of the genus *Cheilanthes* of Europe and Macaronesia has been almost completely disentangled.

III) Even if much work on the biosystematics of *Cystopteris fragilis* aggr. has been done, the genetic relationships within the complex and its taxonomy are still an unsettled matter. Several levels of ploidy (from 4x to 8x) have been found in European plants, however, the diploids ancestors are still missing. This adds difficulties to the experimental work needed to cope with this troublesome group.

IV) *Asplenium* is one of the most studied and best known genus of Europe. Nevertheless, some aspects remain insufficiently known, in particular those related to the *A. trichomanes* complex, in which, autoploidity together with ecological diversification have resulted in taxa poorly differentiated regarding morphology and genetics.

**Key words:** Biosystematics, cytogenetics, pteridophytes, *Asplenium*, *Cheilanthes*, *Cystopteris*, *Polypodium*.

## INTRODUCCION.

Los estudios biosistemáticos tratan de delimitar y describir unidades biológicas naturales a través de sus características reproductivas, variación genotípica y fenotípica en relación con el ambiente y mecanismos evolutivos: hibridación, poliploidía, etc. Desde el inicio de estos estudios (por los años 20-30) se ha puesto énfasis en el uso de métodos experimentales, tanto en los estudios de campo como en los cultivos controlados. En la actualidad la biosistemática está orientada evolutivamente y se basa en cuatro fuentes principales:

**A) Estudios citológicos y genéticos:** números cromosómicos, cariotipos, análisis genómicos a través del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis, herencia del conjunto de caracteres, sistemas reproductivos, barreras al intercambio genético, interfertilidad, hibridación y reconstrucción de especies poliploides.

**B) Estudios de desarrollo y morfogénesis:** inducción de la germinación y desarrollo del gametofito, factores que afectan la gametogénesis y la fecundación, esporogénesis y desarrollo del esporofito (meristemo apical, yemas laterales y frondes...).

**C) Estudios ecológicos y biogeográficos:** diseminación de esporas y condiciones ambientales de germinación, análisis de clines, transplante de ecotipos, análisis de areales, endemismos...

**D) Estudios moleculares y fitoquímicos:** comparación de contenidos de DNA, pigmentos, proteínas y enzimas.

De todos estos aspectos, los citogenéticos fueron uno de los principales objetivos de los estudios biosistemáticos iniciales en helechos y continúan siendo una pieza clave en el conocimiento de las unidades biológicas naturales en este grupo.

## BIOSISTEMATICA Y CITOGENETICA DE HELECHOS.

La Biosistemática de los helechos puede considerarse fundada con la publicación en 1950 de la obra de la Profesora Irene Manton: "Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta". En este trabajo se aborda el estudio de los principales grupos de helechos europeos y se sientan las bases metodológicas del estudio de los pteridófitos. Las técnicas y la metodología desarrolladas por la Prof. Manton y su escuela en Leeds (U.K.) y continuadas por diversos investigadores, muchos de ellos en colaboración con el Prof. Reichstein de Basel (Suiza), han sido y siguen siendo de gran importancia en el desarrollo de la Pteridología europea. Los aspectos clave en que se basan los estudios citogenéticos en helechos se pueden resumir en:

**A) El uso del método de aplastamiento ("squash") para establecer el número cromosómico gamético (n) y, sobre todo, para el análisis del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis.**

Las técnicas anteriormente utilizadas, en especial los cortes seriados, daban mal resultado para el estudio de células con elevado número de cromosomas. Con el uso del aplastamiento de células madres de las esporas (en suspensión en una gota de carmín-acético) se obtienen recuentos absolutamente fiables, incluso de números cromosómicos muy elevados. Además, se puede, aunque no siempre es sencillo, analizar la meiosis de los híbridos que suele ser compleja.

**B) La importancia dada al estudio de los híbridos para la comprensión de las relaciones existentes entre los distintos táxones.**

Se emplean y estudian híbridos silvestres (formados espontáneamente en el campo) y especialmente híbridos sintéticos, producidos experimentalmente en el laboratorio a partir de progenitores conocidos. Las técnicas empleadas para obtener estos últimos híbridos han sido descritas detalladamente en Lovis (1968). La posibilidad de producir experimentalmente híbridos entre especies de helechos muy alejadas tanto morfológica como geográfica o ecológicamente, es uno de los factores que ha convertido a estas plantas en un material altamente favorable para estudios citogenéticos experimentales.

El análisis de estos híbridos ha permitido poner de manifiesto los principales mecanismos citogenéticos que han operado en la evolución y especiación de los helechos i.e. la hibridación seguida por poliploidía (Manton, 1950; Lovis, 1977), y ha permitido establecer las relaciones genéticas existentes entre las especies. Además ha puesto de relieve el peso de otros factores, como el aislamiento ecológico o geográfico, que están en la base de la divergencia y de la especiación (Tryon, 1985).

Complementariamente, el análisis morfológico de los híbridos sintéticos ha permitido ver el grado de aditividad y/o dominancia-recesividad de los caracteres. Esto ha facilitado la interpretación de los numerosos híbridos existentes en la naturaleza y su empleo en los casos en que determinadas combinaciones genómicas no se han obtenido artificialmente y eran necesarias para entender las relaciones de parentesco entre algunas especies.

**C) El empleo de plantas dihaploides inducidas artificialmente a partir de tetraploides.**

La capacidad de los protalos, bajo determinadas condiciones ambientales, de formar esporofitos sin que se haya producido fecundación (apogamia) se da naturalmente en algunas especies. Al no existir fecundación, los esporofitos resultantes de este proceso tienen el mismo número cromosómico que el gametofito (Manton, 1950; Lovis, 1977, entre otros).

La inducción de este proceso bajo condiciones controladas en plantas tetraploides permite obtener plantas dihaploides en las que se puede ver el grado de homología existente entre los genomas que estaban presentes por duplicado en el tetraploide original (Manton & Walker, 1954). El empleo de estas plantas dihaploides ha resultado de gran interés para esclarecer el origen autoploide de diversos helechos e.g. *A. ruta-muraria*, *A. septentrionale*, *A. trichomanes*, poniendo de manifiesto diversos grados de autoploidía (Bouharmont, 1972 a, b, c).

**D) El análisis genómico, a través del estudio del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis, en los híbridos artificiales y silvestres y en las plantas dihaploides.**

Este tipo de estudios parte de la consideración, bien establecida en la mayor parte de los helechos estudiados, de que cuando en una planta se presentan varios genomas (varios conjuntos de cromosomas) los cromosomas tienden a formar bivalentes con los que son más semejantes, es decir en las primeras fases de la meiosis se aparean cromosomas de genomas homólogos. Si por el contrario, los genomas presentes no son homólogos, los cromosomas no pueden asociarse por falta de semejantes y se observan como cuerpos individuales, como univalentes, en metafase I. Así, si en una planta triploide se reúnen tres genomas (dos procedentes de un parental tetraploide y uno aportado por el otro parental diploide), los cromosomas tienden a asociarse con los semejantes independientemente de que procedan de uno u otro parental. Esto se expresa diciendo que está más favorecido el apareamiento por homología que por autosindesis (procedencia del mismo parental).

Por ello, el número de bivalentes (II) y univalentes (I) que se observa en metafase I y fases previas en distintos híbridos permite deducir la relación existente entre los genomas de los parentales del híbrido. El fundamento del análisis genómico y la interpretación de los resultados que pueden obtenerse en diversos híbridos se presenta en la figura 1.

Como se observa en esta figura, se puede deducir el origen auto- o aloploide de una planta viendo el comportamiento meiótico de los cromosomas de los híbridos producto del cruce del tetraploide en estudio con un diploide no relacionado. Si los híbridos presentan  $n$  bivalentes y

n univalentes en la meiosis (Fig. 1 A) cabe deducir que el tetraploide es autopoliploide y su genoma está formado por dos pares de conjuntos de cromosomas idénticos (AAAA), o al menos muy semejantes (AAA'A'), que forman bivalentes entre sí en la meiosis; los cromosomas del diploide no relacionado (BB) no tienen homólogos y se presentan desapareados en la meiosis. Si el híbrido presenta  $3n$  univalentes en metafase I (Fig. 1 B), ésto indica que los tres genomas presentes (A, B y C) no son homólogos, por tanto los dos genomas (A y B) aportados por el tetraploide tampoco lo son; la deducción directa es que el tetraploide se ha originado por aloploidía y puede representarse por AABB, y además no está relacionado con el diploide CC, tal como se suponía.

También se prueba el origen aloploidía de dos tetraploides si el híbrido tetraploide que resulta de cruzarlos entre sí (Fig. 1 B) presenta en la metafase I todos los cromosomas desapareados, es decir  $4n$  univalentes. Esto indica que ninguno de los cuatro genomas presentes en el híbrido presenta homología con otro genoma y, por tanto, los dos parentales son aloploidios (AABB y CCDD).

Una vez establecido el origen auto- o aloploidía de una planta, se puede investigar cual o cuales fueron sus ancestros mediante el estudio de los híbridos que forman con diferentes diploides. Como ejemplo se puede señalar que si el híbrido triploide producido del cruce del alotetraploide en estudio con un diploide (Fig. 1 B) presenta  $n$  bivalentes y  $n$  univalentes, se puede deducir que el genoma del diploide es homólogo de uno de los genomas del tetraploide. Por tanto, este diploide es uno de los parentales que intervinieron en la formación del alotetraploide.

Analogamente el estudio de la meiosis de los dihaploides (Fig. 1 C) inducidos mediante apogamia ayuda a establecer el origen auto- o aloploidía de una planta. Los dihaploides (AB) derivados de alotetraploides (AABB) no presentan bivalentes en la meiosis, ya que sus genomas A y B no son homólogos; sin embargo si el tetraploide es de origen autopoliploide, por tanto AAA'A', el dihaploide que se obtiene tiene de fórmula AA' y formará en meiosis un elevado número de bivalentes, hasta el máximo de  $n$ .

La combinación de estos estudios, iniciados por la Prof. Manton y seguidos por un gran número de colaboradores, ha permitido que hoy día se conozcan con gran detalle la mayoría de los géneros de helechos europeos, tanto desde el punto de vista evolutivo (relaciones mutuas y procesos que han intervenido en su formación) como del taxonómico clásico. Para la taxonomía este tipo de estudios ha sido de fundamental importancia ya que, sin una comprensión general de las relaciones entre los táxones, la taxonomía de helechos se hace sumamente confusa debido a la gradación de caracteres que se observa en muchas plantas como consecuencia de su gran capacidad de hibridación y de los procesos de evolución reticulada que están en la base de su diversificación.

En algunos ejemplos se pondrá de relieve como se han utilizado este enfoque y esta metodología para estudiar los helechos europeos.

## POLYPODIUM ( $x = 37$ ).

Las especies europeas del género *Polypodium* fueron de las primeras en ser estudiadas usando estas técnicas y enfoque. Manton (1950) puso de manifiesto la existencia de tres citotipos ( $2x$ ,  $4x$ ,  $6x$ ) en Europa, que podían diferenciarse morfológica, ecológica y geográficamente, y que forman además híbridos silvestres  $3x$  y  $5x$ . En este caso como en muchos otros, quedó de manifiesto la ventaja del squash para obtener células con cromosomas bien separados y fáciles de contar.

Shivas (1956, 1961), continuando los trabajos de Manton (1950) y sobre todo con la obtención de híbridos experimentales, aclaró las relaciones genéticas existentes entre los tres citotipos europeos. Además de sintetizar experimentalmente los híbridos que se forman espontáneamente en Europa (*P. x font-queri*,  $3x$ ; *P. x shivasiae*,  $4x$ ; *P. x mantoniae*,  $5x$ ), produjo híbridos entre polipodios europeos y polipodios americanos (*P. virginianum*,  $2x$  y  $4x$ ; *P. glycyrrhiza*,  $2x$ ). El esquema de sus experimentos y la interpretación de sus resultados se muestra en las figuras 2 y 3. Con sus trabajos quedaron esclarecidas las relaciones existentes entre los tres polipodios

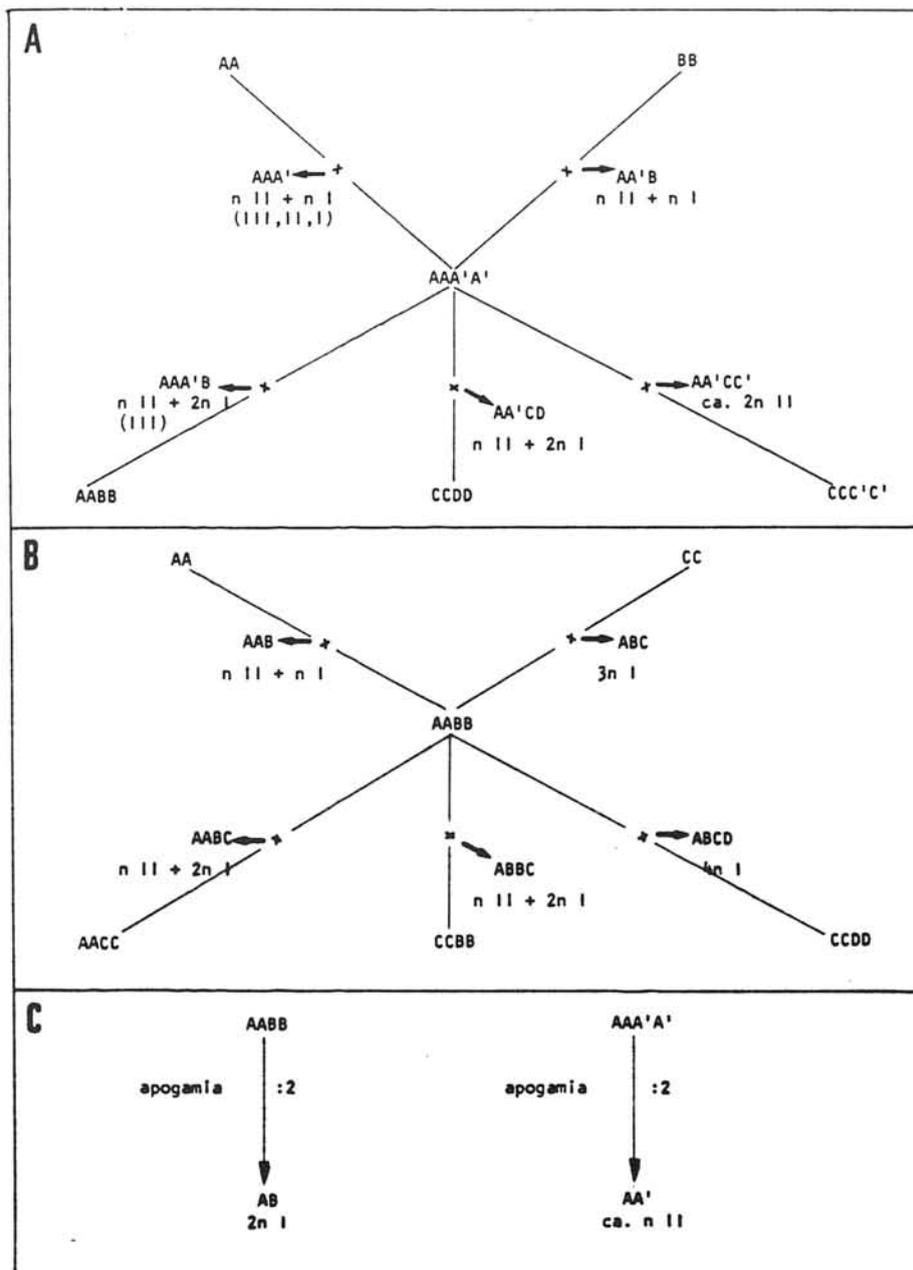


Fig. 1. Comportamiento esperado de los cromosomas en la meiosis de diferentes plantas: número de bivalentes (II) y univalentes (I) que se observan en: A) Híbridos entre una planta autotetraploide (AAA'A') con un diploide relacionado (AA), un diploide no relacionado (BB), un allotetraploide relacionado (AABB), un allotetraploide no relacionado (CCDD) y un autotetraploide no relacionado (CCC'C'); B) Híbridos entre un allotetraploide (AABB) con un diploide relacionado (AA), un diploide no relacionado (CC), un allotetraploide (AACC) con el que tiene el genoma A en común, un allotetraploide (CCBB) con el que comparte el genoma B y un allotetraploide no relacionado (CCDD); C) Plantas dihaploides obtenidas mediante apogamia a partir de un allotetraploide (AABB) y un autotetraploide (AAA'A').

Europeos y sus híbridos, aunque no completamente su origen. En forma resumida los resultados de Shivas (1961) muestran (Fig. 3):

1- El único diploide representado en Europa, *P. cambricum* (*P. australe*), no está directamente relacionado con el tetraploide *P. vulgare*, como lo pone de manifiesto la ausencia total (o prácticamente total) de bivalentes en la meiosis del híbrido *P. x font-queri*.

2- *P. vulgare* es alotetraploide, ya que en *P. x font-queri* no se forman bivalentes (o en número demasiado reducido) como cabría esperar si *P. vulgare* tuviera dos genomas iguales.

3- *P. interjectum* es alohexaploide: tiene dos genomas semejantes a los de *P. vulgare*, según muestra la meiosis de *P. x mantoniae* con  $74^{\text{II}}$ . El otro genoma es semejante al de *P. cambricum* como se desprende del comportamiento meiótico de *P. x shivasiae*, donde se forman  $37^{\text{II}}$  procedentes del apareamiento de los cromosomas del genoma de *P. cambricum* con los de un genoma de *P. interjectum*, quedando 74 cromosomas desapareados (los procedentes de los otros dos genomas de *P. interjectum*). La explicación más verosímil para el origen de *P. interjectum* es que se formó mediante duplicación cromosómica de un híbrido triploide de *P. cambricum* por *P. vulgare*. Es decir, a partir de una planta estéril semejante a *P. x font-queri* que por algún mecanismo duplicó su complemento cromosómico y produjo plantas hexaploides con fertilidad restablecida.

4- En el origen de *P. vulgare* debieron intervenir plantas diploides actualmente no existentes en Europa y semejantes a algunos polipodios que hoy viven en Norteamérica (*P. virginianum* y *P. glycyrrhiza*). Esto se deduce de los híbridos sintéticos producidos (Fig. 2): *P. vulgare* x *P. virginianum* (2x) presenta  $37^{\text{II}}$ , que deben formarse debido a la homología de los cromosomas de *P. vulgare* con los de *P. virginianum* (ya que *P. vulgare* es alotetraploide). El híbrido *P. interjectum* x *P. virginianum* (2x) también presenta  $37^{\text{II}}$ , que igualmente pueden explicarse por la presencia de un genoma común en *P. interjectum* y *P. virginianum*.

El otro ancestro de *P. vulgare* bien pudo ser *P. glycyrrhiza*. Esta planta también tiene un genoma muy semejante a uno de los de *P. vulgare* ya que el híbrido de estas dos plantas presenta  $37^{\text{II}}$  en la meiosis. Además, sus características morfológicas concuerdan con lo que cabría esperar en un ancestro de *P. vulgare*. Sin embargo, falta la prueba citológica de que *P. glycyrrhiza* y *P. virginianum* sean genéticamente diferentes y no meras razas geográficas, lo que invalidaría la consideración de *P. glycyrrhiza* como el otro ancestro de *P. vulgare*.

Como conclusión de estos trabajos biosistemáticos los polipodios europeos que en una primera aproximación parecen un grupo difícil con límites imprecisos, hoy pueden ser atribuidos a reales entidades biológicas (Fig. 4) cuya taxonomía está bien establecida y fundamentada (Shivas, 1961; 1970):

Taxon	Ploidía	Fórmula genómica
<i>P. cambricum</i>	2x	CC
<i>P. vulgare</i>	4x	AABB
<i>P. interjectum</i>	6x	AABBCC
<i>P. x font-queri</i>	3x	ABC
<i>P. x shivasiae</i>	4x	ABCC
<i>P. x mantoniae</i>	5x	AABBC

Un problema queda aún pendiente en las especies europeas de este género: la relación genética existente entre el complejo *P. vulgare* europeo y los polipodios macaronésicos. En Azores y Canarias existen poblaciones de polipodios diploides que presentan ligeras diferencias morfológicas con el *P. cambricum* europeo (*P. australe*). Estas poblaciones han recibido atención desde el punto de vista morfológico y nomenclatural (Vasconcellos, 1968; Fernandes, 1968; Nardi, 1977; Díaz Garretas & Salvo Tierra, 1979; Roberts, 1980) pero no existen datos genéticos experimentales que señalen si estas poblaciones están diferenciadas genéticamente entre sí (lo que apoyaría la separación de *P. azoricum* y *P. macaronesticum*), ni su grado de divergencia genética respecto a *P. cambricum* del resto de Europa.

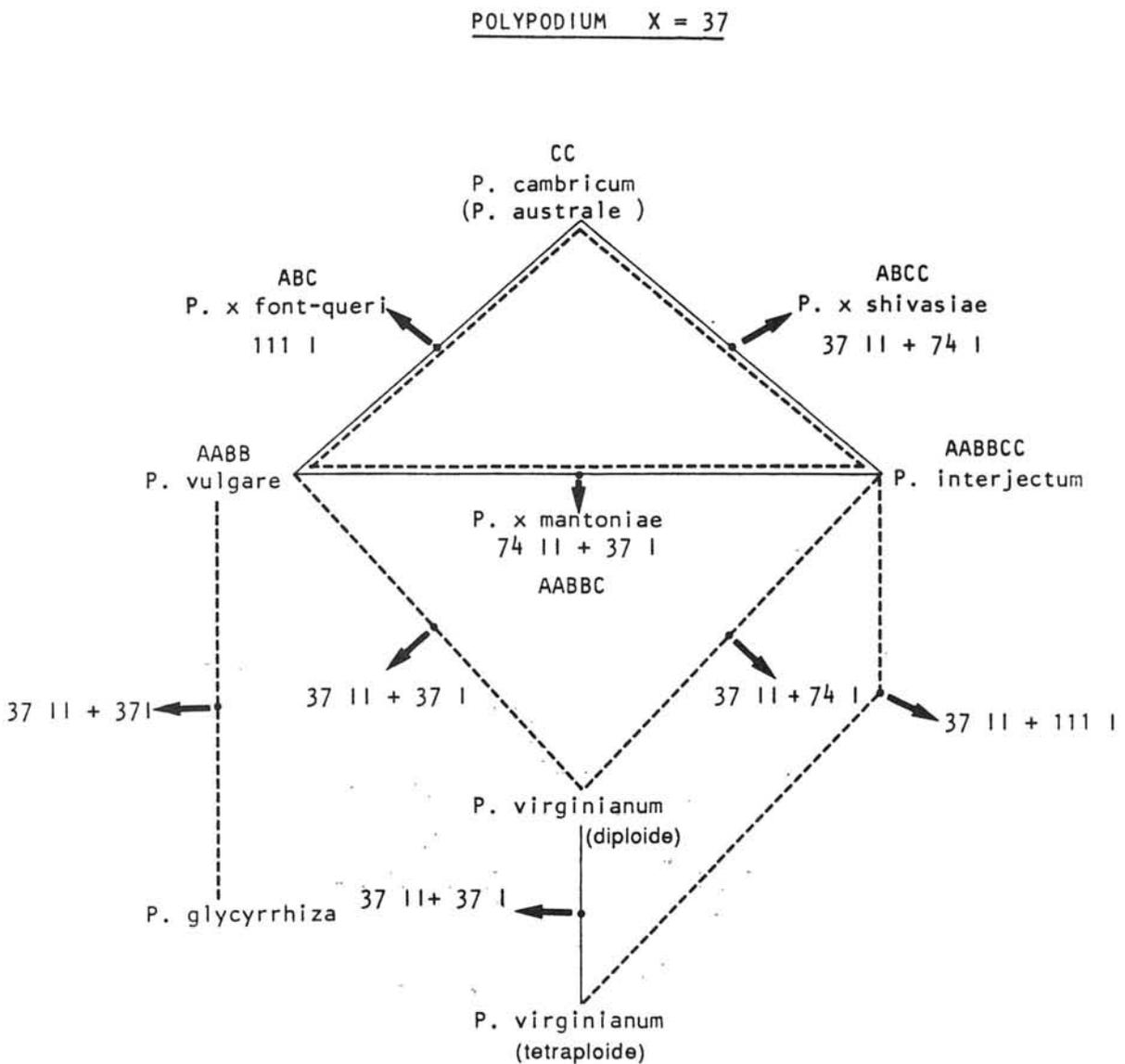


Fig. 2. Resultados obtenidos en la meiosis de híbridos silvestres (línea continua) y sintéticos (línea discontinua) del género *Polypodium* (Shivas, 1961).

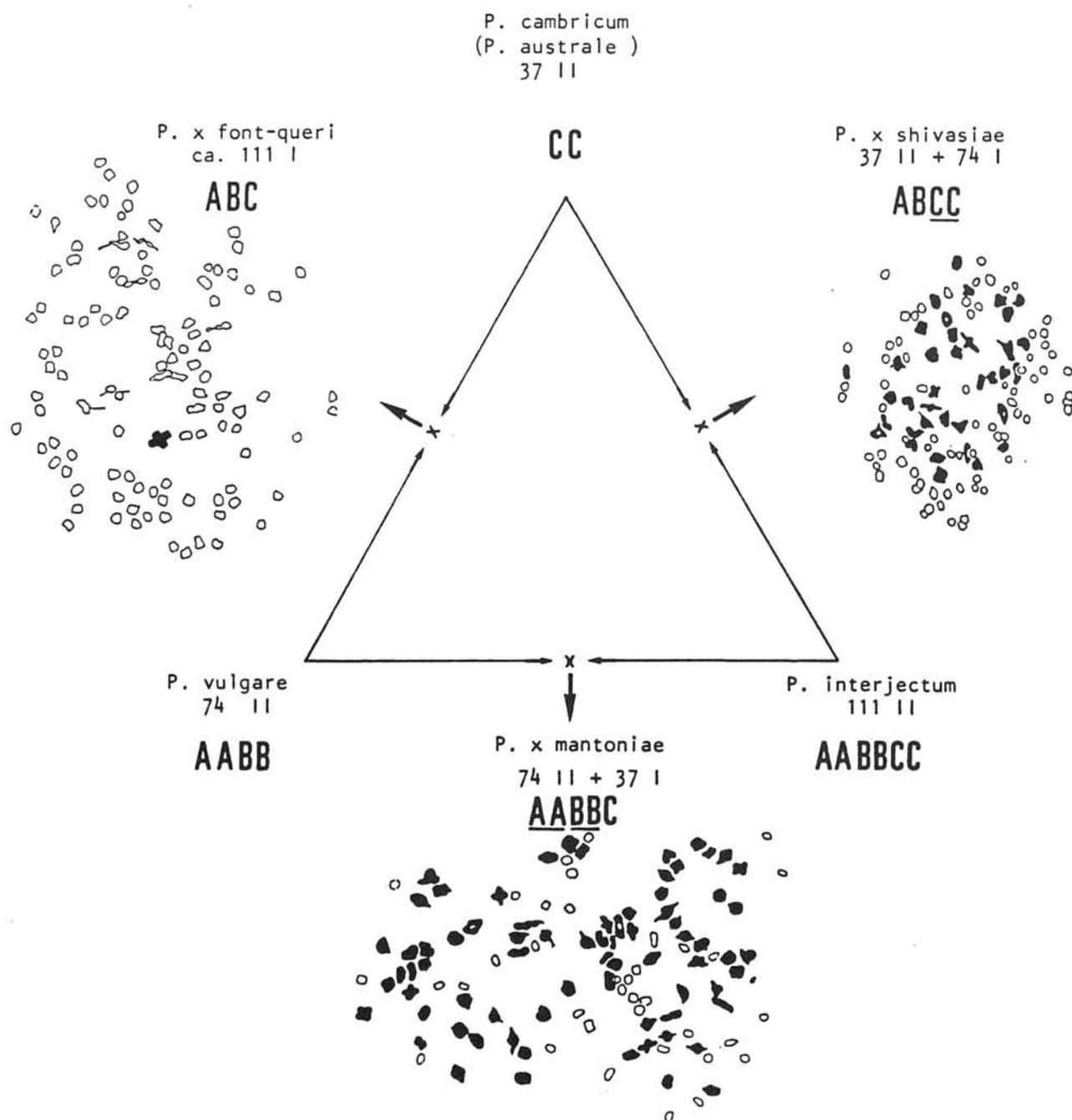


Fig. 3. Origen, fórmula genómica y comportamiento meiótico de los híbridos europeos del género *Polypodium* (diagramas meióticos tomados de Shivas, 1961).

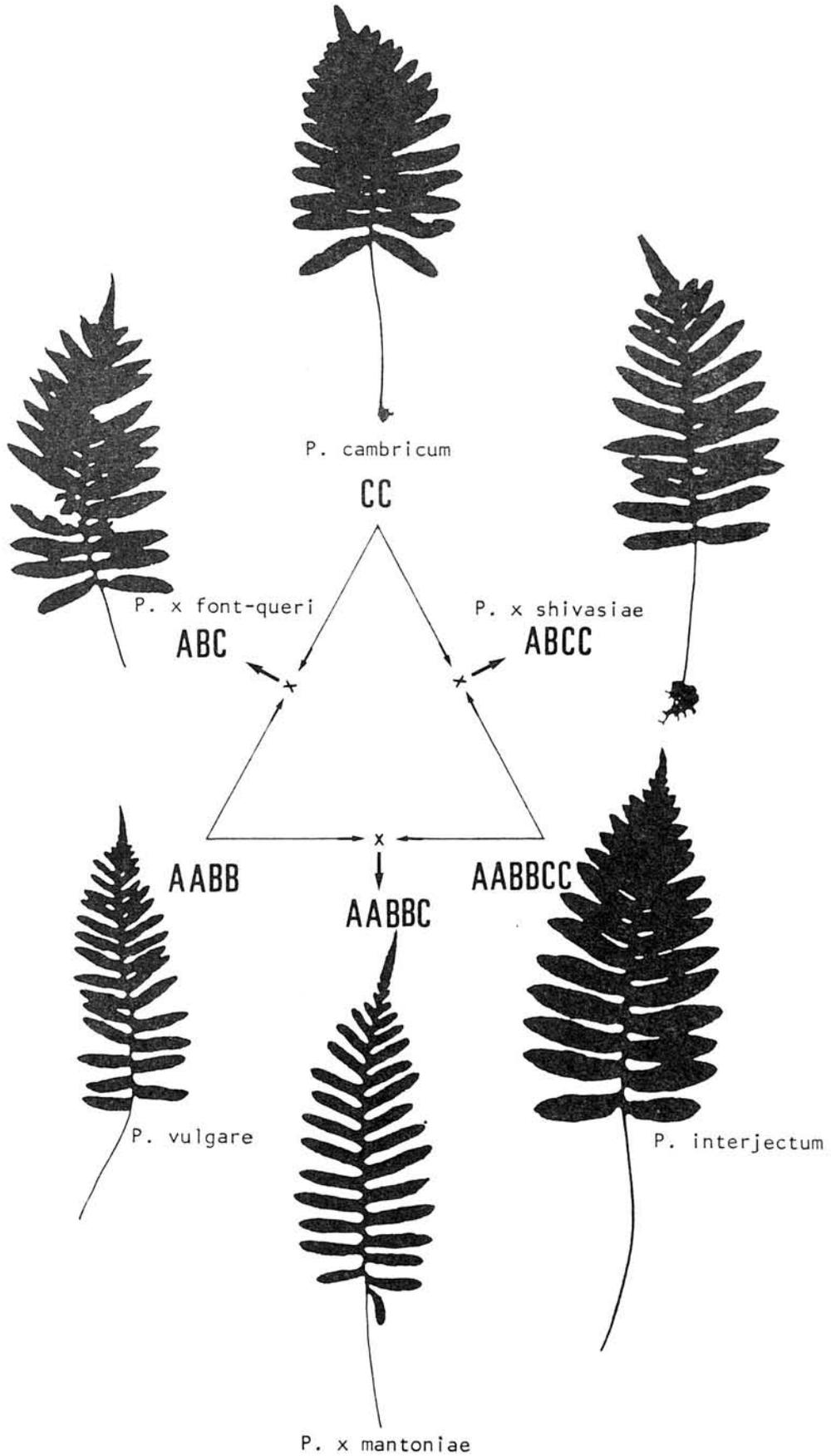


Fig. 4. Siluetas representativas de las especies e híbridos europeos del género *Polypodium* (siluetas tomadas de Manton, 1950; Shivas, 1961).

## CHEILANTHES.

El género *Cheilantes* también ha sido intensivamente estudiado en Europa desde el punto de vista genético, y las relaciones entre las distintas especies europeas y macaronésicas están prácticamente aclaradas. También en este caso la utilización de híbridos formados bajo condiciones controladas ha marcado los principales avances (Fig. 5). A partir de los trabajos de Vida et al. (1971; 1972; 1983) se ha podido establecer que existen cuatro especies diploides (*C. hispanica*, *C. maderensis*, *C. persica* y *C. pulchella*) y tres especies tetraploides relacionadas (*C. acrostica*, *C. guanchica* y *C. tinaei*). *C. acrostica* y *C. guanchica* son alotetraploides derivados respectivamente de *C. maderensis* x *persica* y *C. maderensis* x *pulchella*. Fue fundamental para establecer este hecho la síntesis de dos híbridos triploides (Vida et al., 1983): *C. acrostica* x *pulchella* y *C. guanchica* x *persica*. Ambos híbridos mostraron 90<sup>l</sup> en meiosis, con total ausencia de apareamiento entre cromosomas, lo que indica que los tres genomas presentes en esas plantas son distintos. La deducción directa es que tanto *C. guanchica* como *C. acrostica* tienen en su composición genética dos genomas no homólogos y son por tanto alotetraploides.

La identificación de sus ancestros se logró en ambos casos mediante cruzamiento con especies diploides (Vida et al., 1983). *C. acrostica* cruzado con *C. maderensis* y con *C. persica* formaba híbridos triploides con 30<sup>II</sup> y 30<sup>I</sup> en la meiosis. La interpretación más simple es que en el primer caso el genoma aportado por *C. maderensis* encuentra un homólogo procedente de *C. acrostica*, y en el segundo caso los pares corresponden a la unión de los cromosomas de *C. persica* con un genoma homólogo presente en *C. acrostica*. Por tanto, *C. acrostica* reúne los genomas de *C. maderensis* y *C. persica*. De modo semejante se pudo establecer que *C. guanchica* es un alotetraploide derivado de *C. maderensis* y *C. pulchella*. Una prueba adicional de que *C. acrostica* y *C. guanchica* comparten un genoma es el híbrido tetraploide formado al cruzar ambas especies. Este híbrido presenta 30<sup>II</sup> y 60<sup>I</sup>.

Con respecto a *C. tinaei*, el otro tetraploide, falta la prueba final de que es alotetraploide, la cual podría obtenerse cruzando esta planta con un diploide o tetraploide no relacionados. Sin embargo, en base a la morfología y comportamiento citológico de diversos híbridos silvestres (Fig. 5) la interpretación más probable es que también se trata de una planta originada por aloploidía, siendo sus probables ancestros *C. hispanica* y *C. maderensis* (Rasbach & Reichstein, 1982; Rasbach et al., 1983; Vida et al., 1983). Esta interpretación de las relaciones genómicas existentes es la que mejor explica la morfología y el comportamiento meiótico observado en los numerosos híbridos silvestres encontrados.

Como consecuencia de estos trabajos citogenéticos, unidos a estudios morfológicos, corológicos y nomenclaturales (Pichi-Sermolli, 1977; Nardi et al., 1978, 1979; Saenz & Rivas Martínez, 1979; Rocha Afonso, 1981; Perez Carro et al., 1985), las relaciones genómicas y la taxonomía de las distintas especies e híbridos europeos y macaronésicos del género *Cheilantes* están hoy bien fundadas:

Taxon	Ploidía	Fórmula genómica
<i>C. hispanica</i>	2x	HH
<i>C. maderensis</i>	2x	MM
<i>C. persica</i>	2x	SS
<i>C. pulchella</i>	2x	PP
<i>C. tinaei</i>	4x	HHMM
<i>C. acrostica</i>	4x	MMSS
<i>C. guanchica</i>	4x	MMPP



<i>C. x prototinaei</i>	2x	HM
<i>C. x teneriffae</i>	2x	MP
<i>C. x iberica</i>	3x	HHM
<i>C. x kochiana</i>	3x	HMM
<i>C. x marchettiana</i>	3x	MMS
<i>C. x kurdica</i>	3x	MSS
<i>C. x tolocensis</i>	3x	MMP
<i>C. x insularis</i>	4x	HMMP
<i>C. x malacitensis</i>	4x	MMSP

## CYSTOPTERIS.

El género *Cystopteris*, y en particular *Cystopteris fragilis* aggr., es uno de los grupos que todavía presenta numerosas incógnitas genéticas y problemas dentro de los helechos europeos, a pesar de los trabajos taxonómicos realizados en este grupo (Blasdell, 1963; Jermy & Harper, 1970; Rocha Afonso, 1982; Prada, 1986, entre otros). En Europa se reconocen varios táxones dentro de este agregado: *C. alpina* (*C. regia*), *C. dickieana*, *C. fragilis* y *C. viridula* (Greuter et al., 1984).

Desde el punto de vista genético, este grupo parece un complejo poliploide antiguo, con escasos representantes diploides actuales y altos niveles de ploidía (Lovis, 1977). *C. viridula* se conoce sólo en el nivel hexaploide, *C. fragilis* s.str. presenta tres niveles de ploidía (4x, 6x y 8x), de *C. alpina* sólo se ha encontrado el citotipo 6x y *C. dickieana* presenta niveles de ploidía 4x y 6x. Las relaciones de parentesco entre los distintos táxones están parcialmente establecidas gracias a los trabajos de hibridación experimental (Vida, 1974; Vida & Mohay, 1980) (Fig. 6). Cabe destacar por su gran trascendencia la formación de una planta dihaploide a partir del citotipo 4x de *C. fragilis* mediante apogamia (formación de un esporofito sin que medie fecundación, por tanto con el mismo número de cromosomas que el gametofito i.e. diploide). Esta planta presentó hasta 12<sup>II</sup> en su meiosis, lo que permitió ver que *C. fragilis* es básicamente de naturaleza alopoliploide segmental, es decir presenta dos genomas distintos pero que conservan un pequeño grado de homología residual. Gracias a este dato se pueden interpretar los resultados obtenidos en los híbridos sintéticos triploides de *C. fragilis* (4x) y *C. dickieana* (4x) con *C. protusa* (diploide norteamericano). Ambos híbridos presentan cierto número de bivalentes en la meiosis (13 - 15). En el primer híbrido (*C. fragilis* x *C. protusa*) se considera que este bajo número de bivalentes resulta del apareamiento autosindético (es decir, entre los cromosomas procedentes del mismo parental) de los cromosomas de los genomas parcialmente homólogos de *C. fragilis*. Análogamente, aunque ésto no está tan claramente probado, se interpretan los resultados obtenidos en el híbrido de *C. dickieana* x *C. protusa*. Se considera que *C. dickieana* es también alotetraploide segmental, no emparentado con *C. protusa*, y por tanto en el híbrido se observa cierto apareamiento autosindético de cromosomas parcialmente homólogos procedentes de los dos genomas de *C. dickieana*.

Otro híbrido, de gran importancia para interpretar las relaciones que existen entre los táxones de este complejo, fué el obtenido al cruzar los citotipos tetraploides de *C. fragilis* y *C. dickieana*. En esta planta se observaron hasta un máximo de 54 bivalentes, quedando los demás cromosomas desapareados. La interpretación más simple de este resultado es que *C. fragilis* y *C. dickieana* tienen un genoma homólogo, cuyos cromosomas forman 42 bivalentes; los otros 12 bivalentes observados pueden deberse a un cierto grado de homología (parcial) entre los cromosomas de los otros genomas de *C. fragilis* y *C. dickieana*.

CYSTOPTERIS X = 42

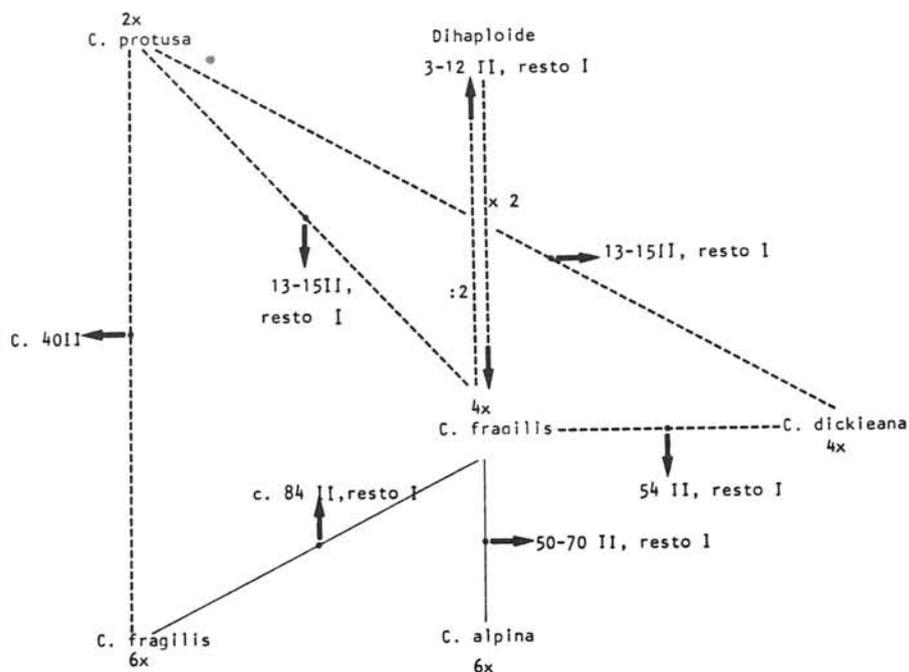


Fig. 6. Resultados citogenéticos obtenidos en híbridos sintéticos del género *Cystopteris* (datos de Vida, 1974; Vida & Mohay, 1980).

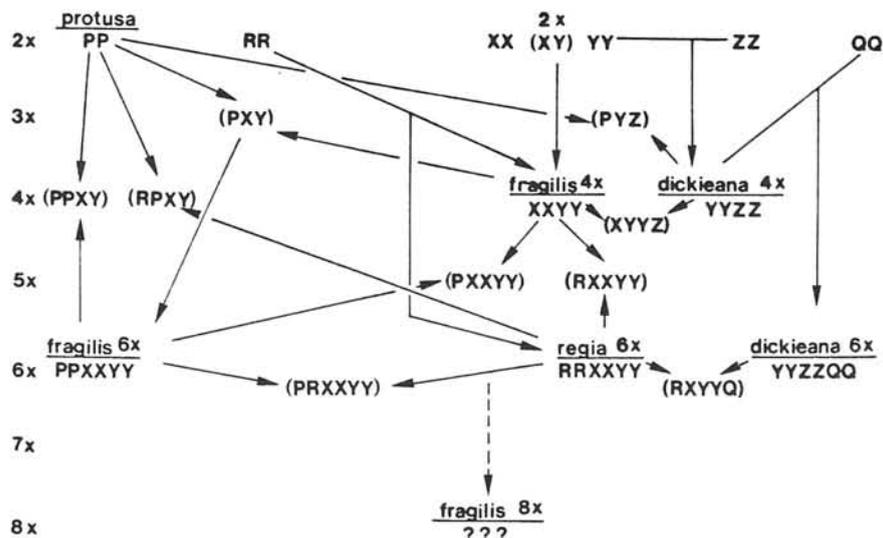


Fig. 7. Relaciones genómicas dentro del complejo *Cystopteris fragilis* (Vida & Mohay, 1980).

La interpretación dada por Vida & Mohay (1980) (Fig. 7) requiere:

- 1- Postular la existencia , en algún momento, de al menos seis especies diploides parcialmente diferenciadas para explicar la formación de los taxones actuales (PP, RR, XX, YY, ZZ y QQ).
- 2- Formación de los citotipos tetraploides de *C. fragilis* (XXYY) y *C. dickieana* (YYZZ) por hibridación de algunos de los diploides postulados y posterior doblamiento del número cromosómico del híbrido resultante. Estos tetraploides se comportan como alotetraploides segmentales.
- 3- Formación de los hexaploides (*C. fragilis*, *C. dickieana* y *C. alpina*) a partir de híbridos formados entre los citotipos tetraploides con diferentes diploides no relacionados y posterior duplicación cromosómica.

La complejidad genética existente en este grupo deja abierta la posibilidad, que debe ser estudiada, de que existan más entidades biológicas p. e. tetraploides del tipo QQYY, hexaploides QQXXYY, etc..., que presentarían pequeñas diferencias morfológicas. Así, táxones como *C. fragilis* subsp. *huteri* (Prada & Salvo, 1986) o *C. fragilis* subsp. *pseudoregia* (Rivas Martínez et al., 1984:263) no pueden ser descartados a priori.

En resumen, debido a la amplia distribución y complejidad de este grupo, se requiere todavía mucho trabajo experimental y de campo antes de que puedan darse por resueltas y esclarecidas las relaciones entre los distintos táxones:

<b>Taxon</b>	<b>Ploidía</b>	<b>Fórmula genómica</b>
<i>C. protusa</i>	2x	PP
<i>C. fragilis</i>	4x, 6x, 8x	XXYY, PPXXYY, ?
<i>C. alpina</i>	6x	RRXXYY
<i>C. dickieana</i>	4x, 6x	YYZZ, QQYYZZ
<i>C. viridula</i>	6x	?

## ASPENIUM.

El género *Asplenium* es uno de los más estudiados en Europa desde el punto de vista citogenético. Presenta diploides, tetraploides y hexaploides, aunque estos últimos son muy escasos. La diferenciación de sus especies es de los mejores ejemplos de evolución reticulada, en la que han intervenido procesos de hibridación, autopoliploidía y aloploidía. El conocimiento de las

relaciones genéticas entre los distintos táxones ha sido de fundamental importancia para establecer una taxonomía clara en el grupo y para identificar los numerosos híbridos (más de 50, sólo en Europa, cf. Reichstein, 1981) intra e interespecíficos que han sido encontrados en la naturaleza. La figura 8 recoge las relaciones existentes entre distintos taxones europeos, y pone de manifiesto los principales mecanismos que han operado en la diversificación de las especies europeas: hibridación, auto- y aloploidía y cierto grado de divergencia ecológica y/o geográfica.

Como ejemplo de diversificación y especiación a través de auto- y aloploidía, se puede citar el grupo de especies relacionadas con *A. adiantum-nigrum* y *A. billotii* (Fig. 9). Este grupo ha sido muy estudiado y hoy se conoce bien, gracias fundamentalmente a los trabajos de Manton (1950), Manton & Reichstein (1962), Shivas (1956, 1969), Sleep (1966, 1983) y Lovis et al. (1972): *A. adiantum-nigrum*, *A. onopteris* y *A. cuneifolium* están íntimamente relacionados ya que el primero es un alotetraploide derivado de los otros dos. *A. obovatum* y *A. billotii* también están muy relacionados pues *A. billotii* parece haber derivado por autopoliploidía de *A. obovatum* o de algún diploide muy próximo. *A. balearicum* relaciona ambos grupos ya que es un alotetraploide derivado de *A. onopteris* y *A. obovatum*.

Estas especies (tres diploides y tres tetraploides) se cruzan entre sí con relativa frecuencia, dando híbridos estériles que pueden ser identificados en base a su morfología y comportamiento citológico. El diagrama de la figura 9 recoge la información citológica existente y el origen de algunos híbridos de este grupo. Por ejemplo, el híbrido triploide silvestre *A. x tyrrhenicum* (ObOnOn) se considera derivado del cruzamiento entre *A. balearicum* (ObObOnOn, 4x) y *A. onopteris* (OnOn, 2x) (Cubas et al., 1987, 1988). En meiosis forma 36 bivalentes, como resultado de la asociación de los cromosomas de los genomas On y 36 univalentes procedentes del genoma Ob, presentes en su constitución genética (Fig. 10). Una situación parecida se observa en *A. x ticinense* (Meyer, 1960), también triploide y con el mismo comportamiento citológico (36<sup>II</sup> y 36<sup>I</sup>; Reichstein & Vida in Reichstein, 1981; Cubas et al., en prensa); así mismo, su morfología refleja que deriva de *A. adiantum-nigrum* y *A. onopteris* (Fig. 11), lo que es compatible con las evidencias citológicas. En otros casos, como *A. x joncherei* (*A. billotii* x *A. onopteris*) no hay datos citológicos de su comportamiento meiótico, aparte de la presencia de esporas abortadas, por lo que su origen se ha propuesto en base a su morfología (Meyer, 1960) (Fig. 11).

Un problema diferente se presenta en el híbrido tetraploide *A. x sarniense* (Fig. 11) derivado del cruce entre *A. adiantum-nigrum* y *A. billotii* (Sleep, 1971; Sleep & Ryan, 1972). El comportamiento meiótico esperado sería la formación de 36 bivalentes y 72 univalentes: los bivalentes formados por asociación autosindética de los cromosomas procedentes del autotetraploide *A. billotii* y los univalentes provenientes de los genomas On y Cu aportados por *A. adiantum-nigrum*. Sin embargo, los resultados obtenidos (Sleep & Cubas, en prep.) muestran la formación de un número de bivalentes mucho más elevado del esperado y una disminución en el número de univalentes. Estos datos son de gran interés a la hora de valorar la diferenciación genética existente entre los diploides *A. cuneifolium* y *A. onopteris*, que quizás no sea tan grande como generalmente se admite.

Esta cuestión enlaza con otro problema pendiente: la existencia de dos formas ecotípicas de *A. adiantum-nigrum*. Una de ellas, que crece asociada a substratos serpentinícolas como *A. cuneifolium*, fue durante mucho tiempo confundida con este último taxon. Se ha podido demostrar que en realidad se trata de una forma de *A. adiantum-nigrum* que presenta diferencias morfológicas y ecológicas que no se reflejan en grandes cambios genéticos. De hecho esta forma de serpentinícolas es también alotetraploide y los híbridos que se han obtenido con la forma típica tienen una meiosis regular (Sleep et al., 1978; Sleep, 1980, 1983, 1985). Cabe preguntarse si estas dos formas de *A. adiantum-nigrum* se diferenciaron con posterioridad a la formación de esta especie o por el contrario ambas formas se originaron independientemente.

Otro grupo que vale la pena comentar es el complejo *A. trichomanes*. En Europa presenta dos citotipos diploides, dos tetraploides y esporádicamente uno hexaploide. Los diploides, subsp. *inexpectans* y subsp. *trichomanes* parecen tener requerimientos edáficos diferentes, asociándose el primero a substratos calcáreos, mientras que el segundo parece no tolerarlos. Los tetraploides, subsp. *quadrivalens* y subsp. *pachyrachis* están más diferenciados morfológicamente pero no tanto

ASPLENIUM X = 36

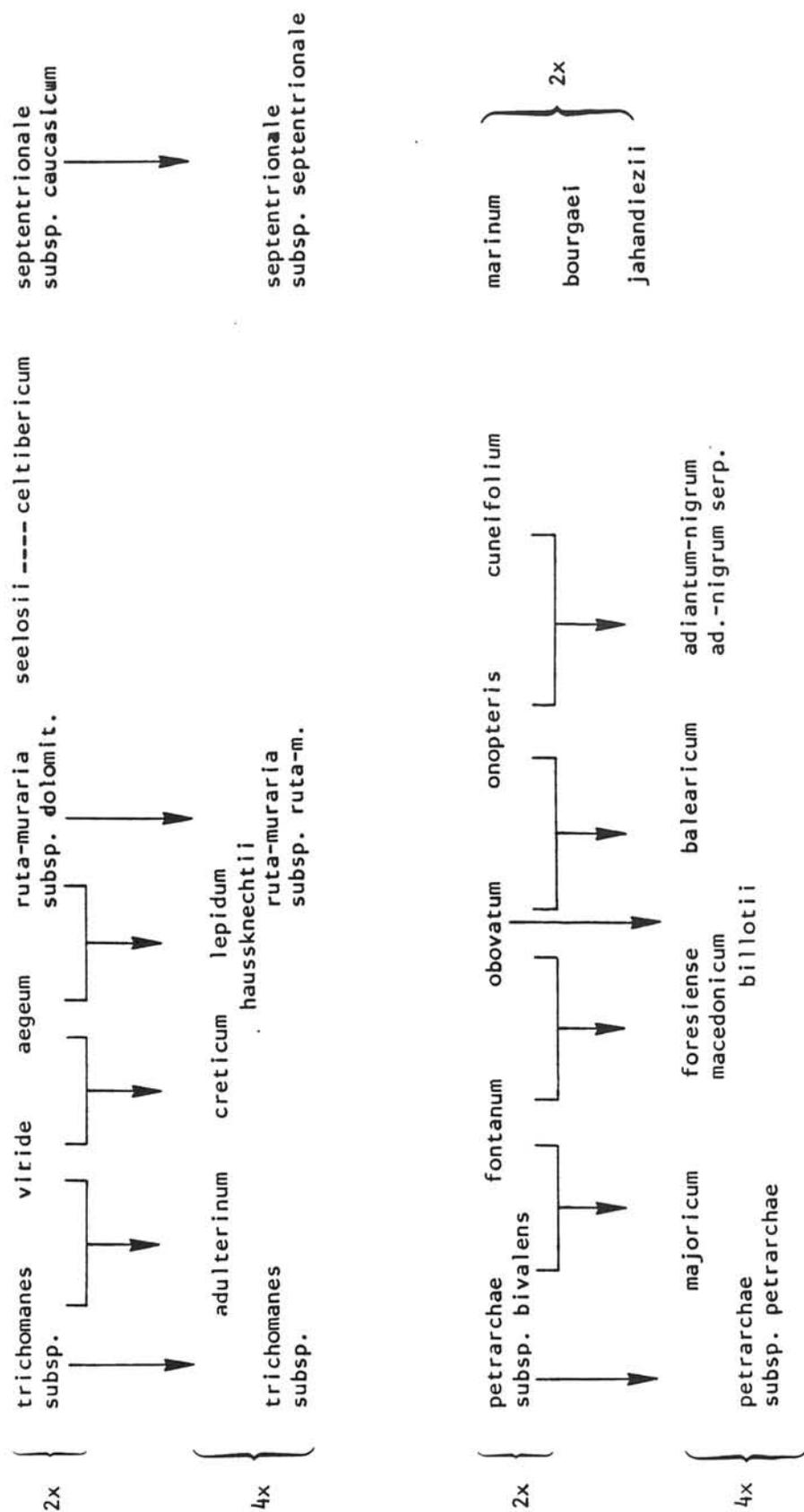


Fig. 8. Relaciones entre las especies europeas del género *Asplenium* (basado en Reichstein, 1981).

ASPLENIUM  $X = 36$

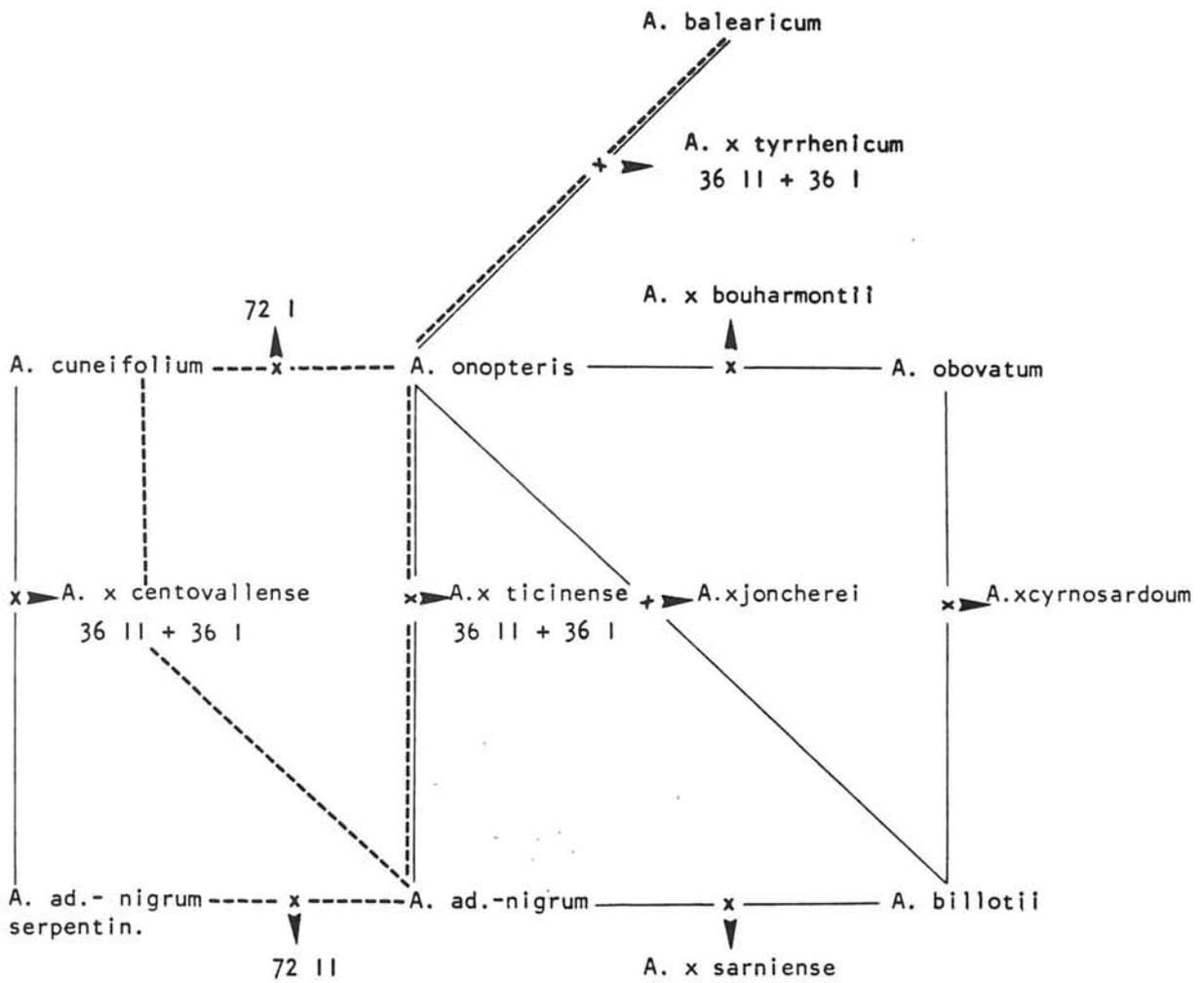


Fig. 9. Origen y comportamiento meiótico de híbridos silvestres (línea continua) y sintéticos (línea discontinua) formados entre especies de los complejos *A. adiantum-nigrum* y *A. billotii*.

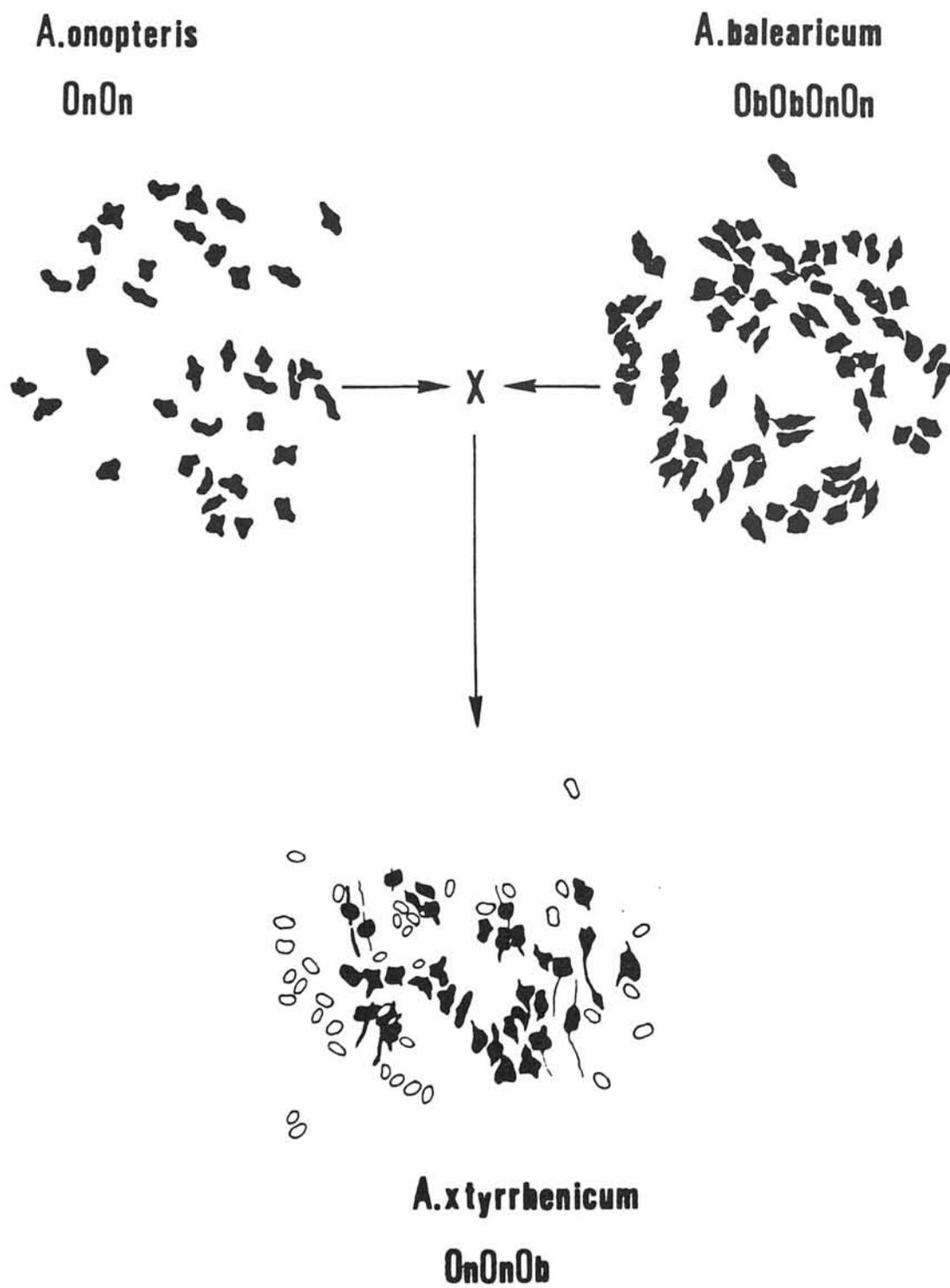


Fig. 10. Diagramas de los cromosomas en metafase I meiótica en *A. x tyrrhenicum* y sus parentales *A. balearicum* y *A. onopteris*.

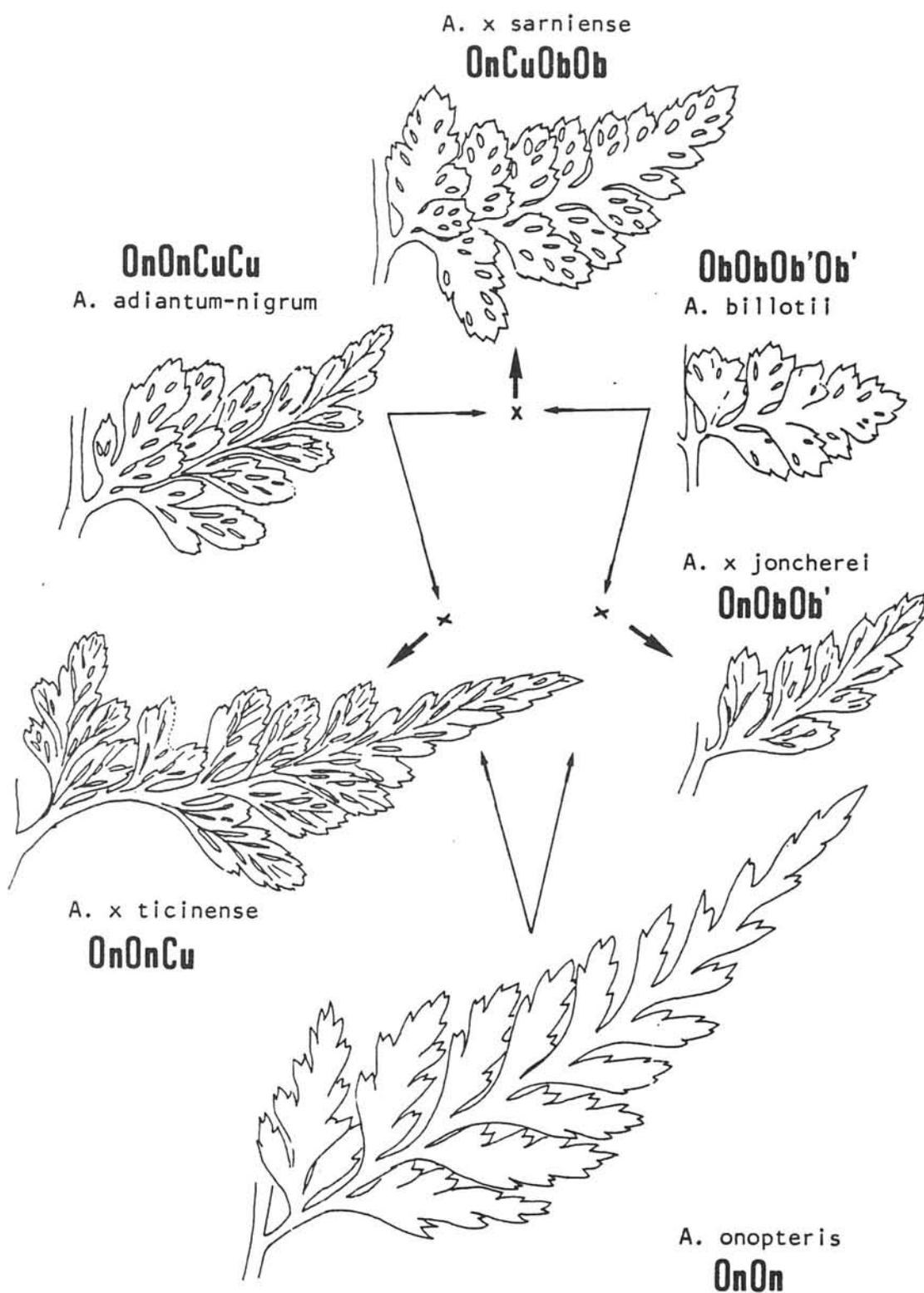


Fig. 11. Relaciones genómicas y morfológicas entre *A. adiantum-nigrum*, *A. onopteris*, *A. billotii* y sus híbridos.

ecológicamente (Lovis, 1964, 1977; Lovis & Reichstein *in* Greuter, 1980; Lovis & Reichstein, 1985).

Los tetraploides se consideran originados básicamente por autoploidía en base al estudio de numerosos híbridos naturales y experimentales, pero la relación precisa entre los diploides y tetraploides aún no está completamente establecida. Las principales evidencias se resumen en la figura 12.

Del taxon que se tiene más información es la subsp. *quadrivalens*. En este caso la inducción de un esporofito haploide mediante apogamia (Bouharmont, 1972 b), permitió ver que sus genomas se comportan como prácticamente homólogos, formando gran número de bivalentes en la meiosis. Igualmente en los híbridos silvestres o experimentales de este taxon con especies diploides o alotetraploides no relacionados, los cromosomas procedentes de subsp. *quadrivalens* forman bivalentes, lo que señala la homología de los dos genomas (cf. Reichstein, 1981). Sin embargo, en las plantas que reúnen más de dos genomas homólogos Tr, como en los híbridos intraspecíficos entre los citotipos 2x y 4x o en híbridos con alotetraploides relacionados (p. ej. *A. adulterinum*, derivado de *A. trichomanes* y *A. viride*), cabría esperar la formación de numerosas asociaciones multivalentes de cromosomas (III y IV). Esto se ha observado esporádicamente en algunos híbridos intraespecíficos de *A. trichomanes* (Lovis, 1955; Cubas et al., 1989) y ocasionalmente en híbridos con *A. adulterinum* (Lovis, 1958), pero el número de multivalentes es muy bajo; igualmente los tetraploides naturales fértiles presentan meiosis completamente regular, lo que induce a pensar que existen mecanismos genéticos que controlan la formación de asociaciones multivalentes de cromosomas.

La información de que se dispone respecto al otro citotipo tetraploide, subsp. *pachyrachis*, es más escasa. El híbrido entre las subsp. *quadrivalens* y *pachyrachis* (*A. x staufferi*) presenta entre 55-60<sup>n</sup> y la meiosis es irregular resultando en la formación de esporas en su mayoría abortivas (Lovis & Reichstein, 1985). Esto indica que la homología entre los genomas presentes en subsp. *quadrivalens* y subsp. *pachyrachis* dista mucho de ser completa.

## CONCLUSIONES.

Como ya señaló Lovis (1958), todos los estudios presentados parten de un supuesto básico que merece ser mencionado: que el grado de sinapsis (apareamiento) que se observa en meiosis entre los cromosomas de dos genomas puede interpretarse como un medida aproximada del grado de homología existente entre dichos genomas. Esta homología no debe interpretarse como que los genomas son completamente idénticos, citológica ni genéticamente. Lo más que puede decirse es que los cromosomas son lo suficientemente parecidos como para formar pares en los primeros estados de la meiosis y para mantenerse reunidos hasta la metafase.

Aunque esta presunción básica ha sido discutida por algunos autores en ciertos casos (Klekowski, 1973), en conjunto ha demostrado ser la mejor interpretación posible para las numerosas evidencias obtenidas en el estudio de complejos poliploides tanto en las plantas superiores como en los helechos. Hay que señalar, no obstante, que se requieren métodos y herramientas más poderosos para dilucidar los casos más complejos en los que es necesaria una medida más precisa de la semejanza entre los genomas, es decir aquellos casos en los que la diversificación morfológica, ecológica o geográfica no ha sido acompañada por fuertes cambios genéticos, que se reflejen en una pérdida de la capacidad de formación de bivalentes en la meiosis. Esto se requiere especialmente en los grupos considerados aloploidios segmentales y autoploidios (p. ej. *Polystichum*, *Cystopteris*, *A. trichomanes*, etc.)

Otro aspecto que requiere mayor estudio, combinando estudios biosistemáticos con aspectos bio- y paleogeográficos, es la cuestión aún abierta de si los taxones poliploides de amplia distribución se han originado una sola vez, extendiendo su area a partir de ese punto de origen, o se han originado en distintos momentos y lugares. Esta última alternativa podría implicar que en

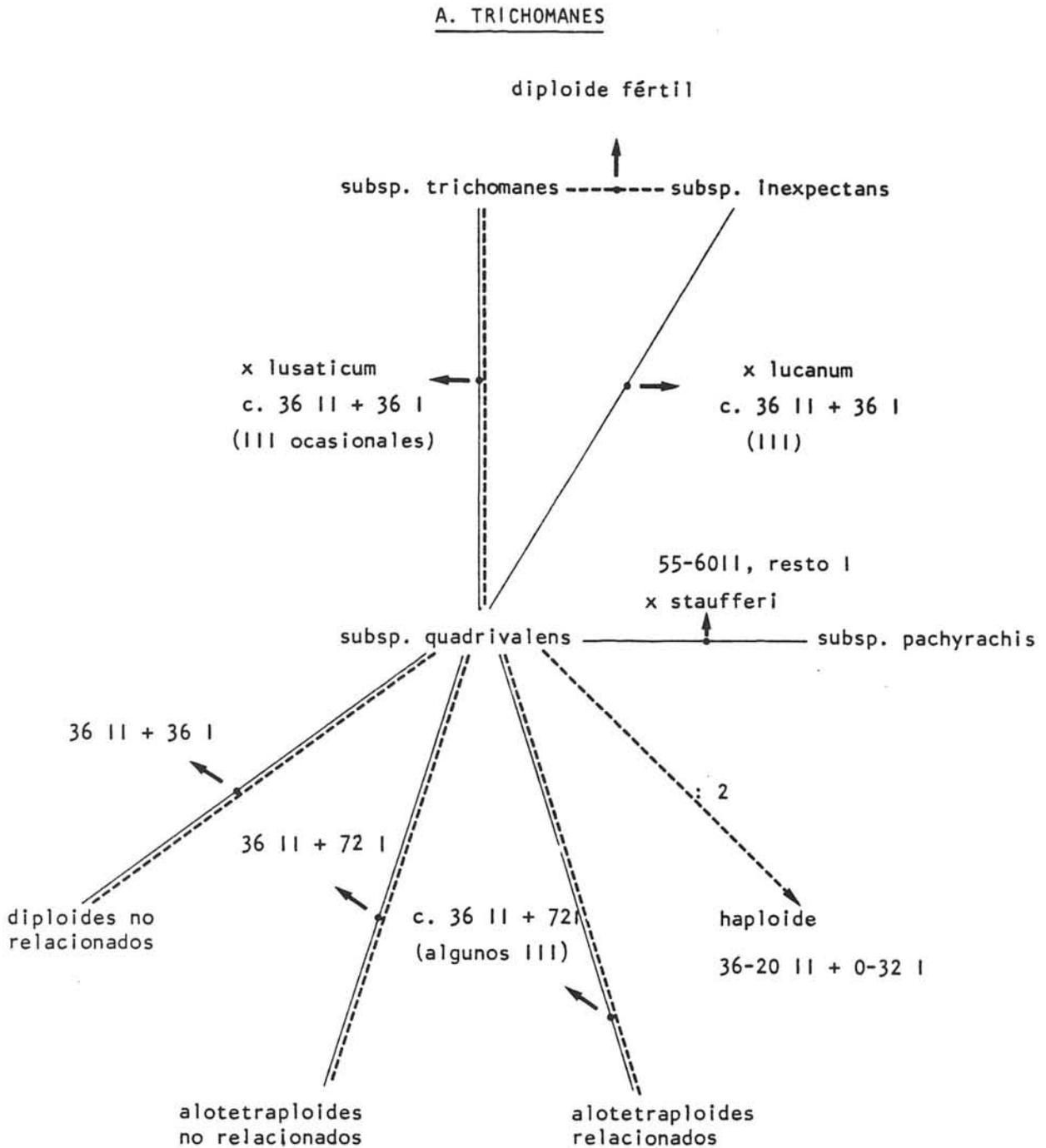


Fig. 12. Resultados meióticos observados en híbridos silvestres (línea continúa) y sintéticos (línea discontinua) en híbridos inter e intraespecíficos de *A. trichomanes* (datos de Lovis, 1955, 1958, 1977; Bouharmont, 1972 b; Lovis & Reichstein, 1985; Cubas et al., 1989; entre otros).

su origen habrían intervenido plantas, ya parcialmente diferenciadas, con lo que los poliploides formados en distintos lugares podrían estar parcialmente diferenciados, genética, morfológicamente y en sus requerimientos ecológicos, desde su origen.

## BIBLIOGRAFIA.

- BLASDELL, R.F. (1963). A monographic study of the fern genus *Cystopteris*. *Mem. Torrey Bot. Club*, 21(4): 1-102.
- BOUHARMONT, J. (1972 a). Origine de la polyploidie chez *Asplenium ruta-muraria* L. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.*, 42: 375-383.
- BOUHARMONT, J. (1972 b). Meiosis and fertility in apogamously produced diploid plants of *Asplenium trichomanes*. *Chromosomes Today*, 3: 253-258.
- BOUHARMONT, J. (1972 c). Meiosis in apogamously produced diploid plants of *Asplenium septentrionale*. *Brit. Fern Gaz.*, 10(5): 237-240.
- CUBAS, P., PANGUA, E. & ROSSELLO, J.A. (1987). Un nuevo híbrido balear del género *Asplenium*. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 44(2): 534-536.
- CUBAS, P. ROSSELLO, J.A. & PANGUA, E. (1988). Comparative study of *Asplenium balearicum*, *A. onopteris* and their spontaneous hybrid *A. x tyrrhenicum*. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 45(1): 75-92.
- CUBAS, P., ROSSELLO, J.A. & PANGUA, E. (1989). A new triploid hybrid in the *Asplenium trichomanes* complex: *Asplenium trichomanes* nothosubsp. *lucanum* (*A. trichomanes* subsp. *inexpectans* x *A. trichomanes* subsp. *quadrivalens*) nothosubsp. *nova*. *Candollea*, 44: 181-190.
- DIAZ GARRETAS, B. & SALVO-TIERRA, A.E. (1979). Sobre la existencia de *Polypodium macaronesicum* Bobrov en el S. de la Península Ibérica. *Acta Bot. Malacitana*, 5: 5-14.
- FERNANDES, R.B. (1968). Sobre a ocorrência do complexo *Polypodium vulgare* nos Açores. *Bol. Soc. Brot.*, 42: 241-248.
- GREUTER, W. (1980). Med-Checklist Notulae 1. *Willdenowia*, 10: 13-21.
- GREUTER, W., BURDET, H.M. & LONG, G. (1984). *Med-Checklist, Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève*, 330 pp.
- JERMY, A.C. & HARPER, L. (1970). Spore morphology of the *Cystopteris fragilis* complex. *Brit. Fern. Gaz.*, 10(4): 211-213.
- KLEKOWSKI, E.J. (1973). Sexual and subsexual systems in homosporous pteridophytes: A new hypothesis. *Amer. J. Bot.*, 60(6): 535-544.
- LOVIS, J.D. (1955). The problem of *Asplenium trichomanes*. *Bol. Soc. Brit. Isles Conf. Rep.*, 4: 99-106.
- LOVIS, J.D. (1958). *An evolutionary study of the fern Asplenium trichomanes*. Ph. D. Thesis, University of Leeds.
- LOVIS, J.D. (1964). Autopolyploidy in *Asplenium*. *Nature*, 203: 324-325.
- LOVIS, J.D. (1968). Fern hybridists and fern hybridising. II Fern hybridising at the University of Leeds. *Brit. Fern Gaz.*, 10(1): 13-20.
- LOVIS, J.D. (1977). Evolutionary Patterns and Processes in Ferns. In R.D. Preston & H.W. Woolhouse (Eds.), *Advances in Botanical Research*, 4: 229-415.
- LOVIS, J.D., BROWNSEY, P.J., SLEEP, A. & SHIVAS, M.G. (1972). The origin of *Asplenium balearicum*. *Brit. Fern Gaz.*, 10(5): 263-269.
- LOVIS, J.D. & REICHSTEIN, T. (1985). *Asplenium trichomanes* subsp. *pachyrachis* (Aspleniaceae, Pteridophyta), and a note on the typification of *A. trichomanes*. *Willdenowia*, 15: 187-201.
- MANTON, I. (1950). *Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyte*. Cambridge University Press, 316 pp.
- MANTON, I. & REICHSTEIN, T. (1962). Diploides *Asplenium obovatum* Viv. *Bauhinia*, 2: 79-91.
- MANTON, I. & WALKER, S. (1954). Induced apogamy in *Dryopteris dilatata* (Hoffm.) A. Gray

- and *D. filix-mas* (L.) Schott emend. and its significance for the interpretation of the two species. *Ann. Bot. N.S.*, 18: 377-383.
- MEYER, D.E. (1960). Über typus-exemplare von *Asplenium*-bastarden mitteleuropas. *Willdenowia*, 2: 514-531.
- NARDI, E. (1977). Note sistematiche sul *Polypodium australe* s.l. delle isole Atlantiche (Azzorre, Madera, Canarie). *Webbia*, 31(1): 79-96.
- NARDI, E., RASBACH, H. & REICHSTEIN, T. (1978). Identification of *Cheilanthes fragans* var. *gennarii* with *C. guanchica* Bolle and remarks on related taxa. *Webbia*, 33(1): 1-18.
- NARDI, E., RASBACH, H. & REICHSTEIN, T. (1979). *Cheilanthes tinaei* Tod., an earlier name for *C. corsica* Reichstein et Vida and related species in Sicily. *Webbia*, 33(2): 449-456.
- PEREZ CARRO, F.J., FERNANDEZ-ARECE, P. DIAZ GONZALEZ, T.E. & SALVO, A.E. (1985). Aportación al conocimiento del género *Cheilanthes* en la Península Ibérica. *Acta Bot. Malacitana*, 10: 27-32.
- PICHI-SERMOLLI, R.E.G. (1977) Tentamen Pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigende. *Webbia*, 31(1): 313-512.
- PRADA, C. (1986). *Cystopteris* Bernh. In *Flora Ibérica* vol. I, S. Castroviejo et al. (Eds.), Madrid, 575 pp.
- PRADA, C. & SALVO, A.E. (1984). Notas sobre *Cystopteris* Bernh. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 41(2): 466.
- RASBACH, H. & REICHSTEIN, T. (1982). Four natural hybrids in the genus *Cheilanthes* (Sinopteridaceae, Pteridophyta). *Webbia*, 35(2): 261-273.
- RASBACH, H., REICHSTEIN, T. & SCHNELLER, J. (1983). Five further natural hybrids in the genus *Cheilanthes* Sw. (Sinopteridaceae, Pteridophyta). *Webbia*, 37(1): 43-62.
- REICHSTEIN, T. (1981). Hybrids in European *Aspleniaceae* (Pteridophyta). *Botanica Helvetica*, 91: 89-139.
- RIVAS MARTINEZ, S., DIAZ, T.E., FERNANDEZ PRIETO, J.A., LOIDI, J. & PENAS, A. (1984). *La vegetación de la alta montaña cantábrica. Los Picos de Europa*. Ediciones Leonesas, León, 295 pp.
- ROBERTS, R.H. (1980). *Polypodium macaronesicum* and *P. australe*: a morphological comparison. *Fern Gaz.*, 12(2): 69-74.
- ROCHA AFONSO, M. (1981). O genero *Cheilanthes* Swartz em Portugal. *Bol. Soc. Brot. sér. 2*, 55: 121-145.
- ROCHA AFONSO, M. (1982). Contribução para o estudo de genero *Cystopteris* Bernh. em Portugal continental e insular. *Bol. Soc. Brot. sér.2*, 55: 337-352.
- SAENZ, C. & RIVAS MARTINEZ, S. (1979). Revisión del género *Cheilanthes* (Sinopteridaceae) en España. *Lagascalia*, 8(2): 215-241.
- SHIVAS, M.G. (1956). *Some problems in cytology and taxonomy in the genera Polypodium and Asplenium*. Ph. D. Thesis, University of Leeds.
- SHIVAS, M.G. (1961). Contributions to the cytology and taxonomy of species of *Polypodium* in Europe and America I. Cytology II. Taxonomy. *J. Linn. Soc. (Bot.)* 58, 370, I: 13-25, II: 27-38.
- SHIVAS, M. G. (1969). A cytotaxonomic study of the *Asplenium adiantum-nigrum* complex. *Brit. Fern Gaz.*, 10: 68-80.
- SHIVAS, M.G. (1970). Names of hybrids in the *Polypodium vulgare* complex. *Brit. Fern Gaz.*, 10: 152.
- SLEEP, A. 1966. *Some cytotaxonomic problems in the fern genera Asplenium and Polystichum*. Ph D. Thesis, The University of Leeds.
- SLEEP, A. (1971). A new hybrid from the Channel Islands. *Brit. Fern Gaz.*, 10(4): 209-211.
- SLEEP, A. (1980). On the reported occurrence of *Asplenium cuneifolium* and *A. adiantum-nigrum* in the British Isles. *Fern Gaz.*, 12(2): 103-107.
- SLEEP, A. (1983). On the genus *Asplenium* in the Iberian Peninsula. *Acta Bot. Malacitana*, 8: 11-46.
- SLEEP, A. (1985). Speciation in relation to edaphic factors in the *Asplenium adiantum-nigrum* group. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 86 B: 325-334.

- SLEEP, A. & RYAN, P. (1972). The Guernsey spleenwort - A new fern hybrid. *Soc. Guernesiaise*, 212-223.
- SLEEP, A., ROBERTS, R.H., SOUTER, J.I. & STIRLING, A. McG. (1978). Further investigation on *Asplenium cuneifolium* in the British Isles. *Fern Gaz.*, 11(6): 345-348.
- TRYON, R. (1985). Fern speciation and biogeography. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 86, Sect. B: 353-360.
- VASCONCELLOS, J. de C. (1968). Nota sobre o Polipodio dos Açores. *Bol. Soc. Brot.*, 42: 159-160.
- VIDA, G. (1974). Genome analysis of the European *Cystopteris fragilis* complex. *Acta Bot. Sc. Hungaricae*, 20(1-2): 181-192.
- VIDA, G., PAGE, C.N., WALKER, T.G. & REICHSTEIN, T. (1971). Cytologie der farn-gattung *Cheilanthes* in Europa und auf den Canarischen Inseln. *Bauhinia*, 4: 223-253.
- VIDA, G., PAGE, C.N., WALKER, T.G. & REICHSTEIN, T. (1972). Cytology of the fern genus *Cheilanthes* in Europe and in the Canary Islands. *Symp. Biol. Hung. Budapest*, 12: 103-104.
- VIDA, G. & MOHAY, J. (1980). Cytophotometric DNA studies in polyploid series of the fern genus *Gystopteris* Bernh. *Acta Bot. Sci. Hungaricae*, 26 (3-4): 455-461.
- VIDA, G., MAJOR, A. & REICHSTEIN, T. (1983). Relations and evolution in *Cheilanthes* (Sinopteridaceae, Pteridophyta) in Macaronesia and Mediterranean area, deduced from genome analysis of their hybrids. *Acta Bot. Malacitana*, 8: 101-126.