

B-80/912
ISSN 0081-0657



22 MAI 1987

BOLETIM

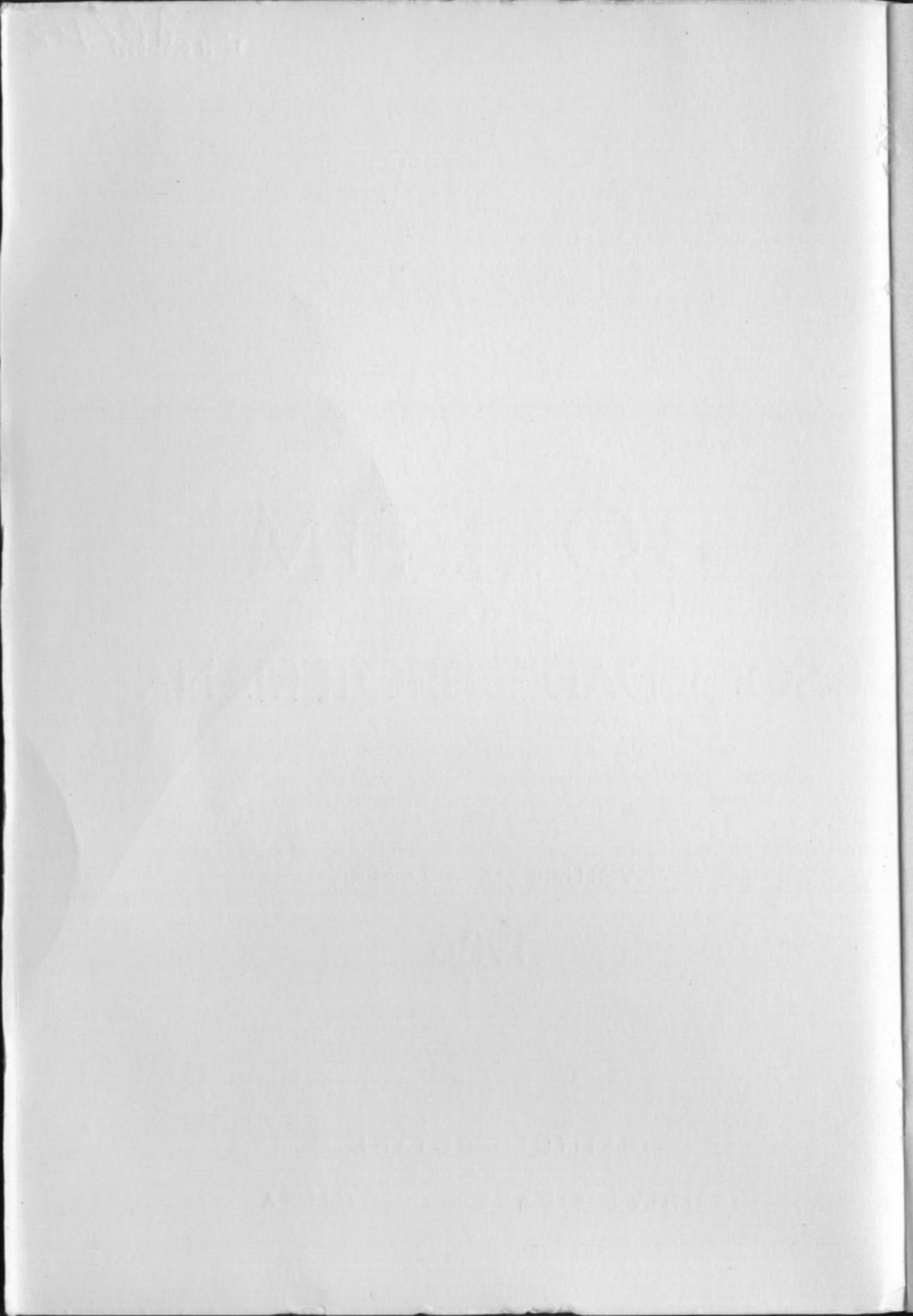
DA

SOCIEDADE BROTERIANA

VOLUME LIX — 2.^a SÉRIE

1986

INSTITUTO BOTÂNICO
DA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



BOLETIM DA
SOCIEDADE BROTERIANA
VOL. LIX (2.^a SÉRIE)
1986



10-11-20

INSTITUTO BOTÂNICO DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

BOLETIM
DA
SOCIEDADE BROTERIANA

22. MAI 1987

(FUNDADO EM 1880 PELO DR. JÚLIO HENRIQUES)

VOL. LIX (2.ª SÉRIE)

REDACTORES

PROF. DR. A. FERNANDES
PROF. DR. JOSÉ F. MESQUITA



SUBSIDIADO POR:

Instituto Nacional de Investigação Científica (I. N. I. C.)
Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (J. N. I. C. T.)
Fundação Calouste Gulbenkian

COIMBRA

1986



Composição e impressão das Oficinas da
Tipografia Alcobacense, Lda. — Alcobça

THE TAXONOMIC SIGNIFICANCE OF SEEDLING CHARACTERS IN THE GENUS *BISCUTELLA* L. (CRUCIFERAE)

by

J. DELE OLOWOKUDEJO

Department of Botany, Plant Science Laboratories
University of Reading, England

Received May 6, 1985.

SUMMARY

Morphological characters of seedlings were studied for 54 populations representing 25 taxa of the genus *Biscutella* L. The size, shape and indumentum of both the cotyledon and juvenile leaf could be used for the identification of most taxa. The consistency of these juvenile features within each taxon confers a good degree of taxonomic importance on seedling characters within the genus. A highly significant linear relationship was observed between cotyledon length and width which justified the division of the species into two groups that corresponded with the two subgenera recognized within the genus. The presence of well-developed buds in the axils of the cotyledons of some taxa are good identification features for these taxa. A key for the identification of species is presented together with diagrams made from silhouettes of pressed seedlings.

INTRODUCTION

Biscutella L. is a distinct genus of the family Cruciferae (Brassicaceae) and can be easily recognised by its didymous fruit which resemble a pair of spectacles. The species are found mainly in the Mediterranean region except for one species, *B. laevigata* L. *sensu lato*, which extends into central Europe (Fig. 37). The genus is well known for its taxonomic complexity and since its description the species have undergone varied taxonomic treatments (COSSON, 1872; WILLKOMM, 1880; MALINOWSKI, 1910; MACHATSCHKI-LAURICH, 1926; GUINEA, 1963; GUINEA & HEYWOOD, 1964). The difficulties encountered within the genus are caused

by the relative uniformity of the floral and fruiting characters, and the unreliability of those that do vary. The vegetative features which have traditionally provided most of the characters in previous taxonomic revisions are highly variable and little is known about their range of plasticity (OLWOKUDEJO & HEYWOOD, 1984). Consequently there is a general lack of reliable taxonomic characters within the genus.

In the course of a systematic revision of the genus, it became apparent that some species could be identified in the seedling stage. Except for a single drawing and description of *Biscutella laevigata* L. by MULLER (1978), seedlings of *Biscutella* species have never been studied in detail. Seedling characters of most genera are generally ignored by taxonomists for various reasons, such as, the non-availability of viable seeds, incorrect identification of available seeds, the absence of seedling in the wild when mature plants are collected and the problems of growing the seeds even when they are available. Yet, as BRAYSHAW (1959), DUKE (1965, 1969), BURGER (1972) have shown for tree seedling, CHANCELLOR (1966) for weed seedling and MULLER (1978) for the seedlings of the North-Western European Lowlands, many species can be identified in their seedling stage. The works of GOMEZ-CAMPO & TORTOSA (1974) and NOZZOLILLO (1976), on the seedlings of *Brassicaceae* and *Vicia* respectively, have shown the taxonomic value of these largely unexplored juvenile features which are known to be of immense value in the assessment of relationship (DAVIS & HEYWOOD, 1963). The recent work of VOGEL (1980) on Malesian tree seedlings further revealed the potential taxonomic value of seedling characters and also contain some pertinent literature.

The present paper reports the results of studying 54 seedling populations representing 25 taxa of the genus *Biscutella*.

MATERIAL AND METHODS

Most of the seeds were collected by the author during his field expedition to Spain while a number of samples, of wild origin, were obtained from other individuals and botanic gardens. Species used in the study and the origins of the seed samples are listed according to their taxonomic groupings in Table 1.

TABLE 1

Taxa	Collector/source and reference no.	Locality
1. <i>B. variegata</i> Boiss. & Reuter	Olowokudejo 60	Spain: Granada, Barranco de San Juan
	Olowokudejo 62	Spain: Granada, Sierra Nevada/Guejar Sierra
	Olowokudejo 90	Spain: Malaga, Antequerra-El Torcal
2. <i>B. megacarpaea</i> Boiss. & Reuter	Olowokudejo 91	Spain: Malaga, El Burgo-Ronda
	Olowokudejo 92	Spain: Malaga, between El Burgo and Ronda
3. <i>B. foliosa</i> Mach.-Laur.	Olowokudejo 93	Spain: Malaga, Serrania de Ronda
4. <i>B. laevigata</i> L. subsp. <i>laevigata</i>	BG 780349	Switzerland: Valais, Lac de Salanfe
	BG 780416	Austria: Karnten, Hohe Tauern
	BG 187	France: Dept. Nord, Valenciennes
	BG 789348 BG 789423	Switzerland: Valais Switzerland: Saint Gall, Walensee
5. subsp. <i>gracilis</i> Mach.-Laur.	BG 780311	Switzerland: Unterwald, Tribsee
6. subsp. <i>kernerii</i> Mach.-Laur.	BG 780544	Czechoslovakia: Montes Stravovska
7. subsp. <i>guestphalica</i> Mach.-Laur.	BG 780419	Germany: Frankfurt
8. <i>B. frutescens</i> Cosson	Olowokudejo 187	Spain: Granada, Sierra de Loja, Cruz de Periqueta
	Olowokudejo 188	Spain: Granada, Sierra de Loja, Santa Cruz de Alhama
9. <i>B. sempervirens</i> L. var. <i>sempervirens</i>	Leadlay & al. 314	Spain: Malaga, Marbella-Ojen road
10. var. <i>brevifolia</i> (Rouy) Heywood	Olowokudejo 120	Spain: Granada, Sierra de la Yedra, N. of Alfacar
	Olowokudejo 122	Spain: Granada, South of Huerto Santillan
	Olowokudejo 129	Spain: Granada, Guadix

TABLE 1 (Continued)

Taxa	Collector/source and reference no.	Locality
	Olowokudejo 232	Spain: Almeria, Sierra de Gador, near Dalias
11. <i>B. glacialis</i> (Boiss. & Reuter)	Olowokudejo 234	Spain: Almeria, Almeria-Enix
Jordan	Gomez-Campo 53-2161-72	Spain: Granada, Sierra Nevada
var. <i>glacialis</i>	Olowokudejo 200	Spain: Granada, Sierra Nevada, Mulhacen
12. var. <i>harana</i> Olowo.	Socorro 209	Spain: Granada, Sierra Harana, Cortijo del Sotillo
13. <i>B. intermedia</i> Gouan	Gomez-Campo 54-1199-68	Spain: Madrid, Sierra de Guadarrama
14. <i>B. valentina</i> (L.) Heywood	Olowokudejo 72	Spain: Jaen, Sierra del Pozo, Pico de Cabanas
var. <i>valentina</i>	Olowokudejo 73	Spain: Jaen, Sierra de Cazorla
	Olowokudejo 80	Spain: Jaen, Sierra de Segura
	Olowokudejo 82	Spain: Jaen, Sierra de Cabrilla
15. var. <i>leptophylla</i> (Pau)	Olowo.	
	Olowokudejo 6	Spain: Cuenca, Madrid-Valencia, near Alarcon
	Olowokudejo 8	Spain: Cuenca, Motilla del Palancar
16. <i>B. scaposa</i> Sennen ex Mach.-Laur.	Olowokudejo 94	Spain: Madrid, El Escorial Valle de los Caidos
	Olowokudejo 96	Spain: Madrid, El Escorial
	Olowokudejo 98	Spain: Madrid, Peguerimos
	Olowokudejo 99	Spain: Madrid, Sierra de Malagon
	Olowokudejo 100	Spain: Madrid, North of Las Herreras
17. <i>B. gredensis</i> Guinea	Gomez-Campo 2295	Spain: Avila, Circo de Gredos
18. <i>B. coronopifolia</i> L.	GB 780336	France: Vaucluse, Mont Ventoux
19. <i>B. polyclada</i> Jordan	BG 780429	France: Drome, Bourg-de-Peage
20. <i>B. sclerocarpa</i> Revel	BG 180	France: Aveyron, Firmy, Puy de Wolf
21. <i>B. microcarpa</i> DC.	Heywood & al. 138	Spain: Cadiz, El Colorado, near Chiclana de la Frontera
22. <i>B. didyma</i> L.	BG 7711425	Spain: Malaga, Ronda
	BG 7800337	Egypt: Alexandria
	BG 7800339	Greece: Attica, Athens
23. <i>B. lyrata</i> L.	BG 771147	Italy: Sicilia, Siracusa

TABLE 1 (Continued)

Taxa	Collector/source and reference no.	Locality
24. <i>B. auriculata</i> L.	BG 780185	Morocco: Melilla, Sidi Musa
	BG 780356	Algeria: Bouchata Mahmouda
	Olowokudejo 5	Spain: Cuenca, Alarcon
	Olowokudejo 7	Spain: Cuenca, Alarcon
	Olowokudejo 9	Spain: Cuenca, Motilla del Palancar
25. <i>B. cichoriifolia</i> Loisel.	Gomez-Campo 1164-67	Spain: Ciudad Real, Alhambra
	BG 781184	Portugal: Algarve, Castro-Marim
	BG 780335	France: Hautes Pyrenees, Bagneres de Luchon

Seeds were initially sown in 8 cm plastic pots. One week after germination the seedlings were transplanted to 10 cm pots, one seedling per pot. All seedlings were raised in the greenhouses of the Science Laboratories, University of Reading, England.

Fifty-four populations representing 25 taxa of the genus *Biscutella* were studied. About 15-30 seedlings of each population were observed daily immediately after germination but the measurements presented were taken after the cotyledons attained maximum size, which is usually about three to four weeks after germination. For each seedling the shape, colour, margin, length, maximum width and petiole length of the cotyledons and juvenile leaves were observed and recorded. The corresponding mean values, standard deviations and standard errors of the means were computed. The degree of pubescence was examined under a stereomicroscope.

Either one, two or three seedlings of each population, depending on the variability, were subsequently harvested, pressed and dried. Silhouettes of these representative samples were prepared and drawings made from them.

RESULTS AND DISCUSSION

Tables 2 and 3 contain some of the data concerning cotyledon and juvenile leaf characters. Figures 1-34 are drawings made from the silhouettes of representative specimens of 24 taxa. Two or

TABLE 2

Morphological characters of the cotyledons ($\bar{x} \pm s.e.$ = mean \pm standard error; d = dense; v.d = very dense; sp. = sparse)

Taxa	Shape	Length (cm) $\bar{x} \pm s.e.$	Width (cm) $\bar{x} \pm s.e.$	Petiole length $\bar{x} \pm s.e.$	Indumentum
1. <i>B. variegata</i> Boiss. & Reuter	ovate/oblong	1.61 \pm 0.41	0.95 \pm 0.28	0.25 \pm 0.15	pubescent, v.d
2. <i>B. megacarpaea</i> Boiss. & Reuter	ovate/oblong	1.85 \pm 0.38	0.96 \pm 0.23	0.28 \pm 0.13	pubescent, v.d
3. <i>B. foliosa</i> Mach.-Laur. <i>B. laevigata</i> L.	ovate/oblong	1.53 \pm 0.43	0.84 \pm 0.21	0.25 \pm 0.11	pubescent, v.d
4. subsp. <i>laevigata</i>	ovate/orbiculate	1.52 \pm 0.21	1.01 \pm 0.28	0.24 \pm 0.14	pubescent, d
5. subsp. <i>gracilis</i> Mach.-Laur.	ovate/oblong	1.46 \pm 0.29	0.86 \pm 0.19	0.21 \pm 0.09	pubescent, v.d
6. subsp. <i>kernerii</i> Mach.-Laur.	ovate/orbiculate	1.36 \pm 0.17	0.83 \pm 0.22	0.21 \pm 0.08	pubescent, sp.
7. subsp. <i>guestphalica</i> Mach.-Laur.	ovate/orbiculate	1.53 \pm 0.15	1.00 \pm 0.17	0.23 \pm 0.13	pubescent, v.d
8. <i>B. frutescens</i> Cosson <i>B. sempervirens</i> L.	ovate	1.56 \pm 0.48	0.92 \pm 0.26	0.32 \pm 0.18	pubescent, v.d
9. var. <i>sempervirens</i>	ovate/oblong	1.65 \pm 0.48	0.96 \pm 0.33	0.38 \pm 0.18	pubescent, v.d
10. var. <i>brevifolia</i> (Rouy) Heywood <i>B. gracialis</i> (Boiss. & Reuter) Jordan	ovate/oblong	1.62 \pm 0.46	0.95 \pm 0.32	0.35 \pm 0.16	pubescent, v.d
11. var. <i>glacialis</i>	orbiculate	0.71 \pm 0.04	0.54 \pm 0.18	0.12 \pm 0.11	pubescent, v.d
12. var. <i>harana</i> Olowo.	orbiculate	0.72 \pm 0.04	0.54 \pm 0.19	0.14 \pm 0.13	pubescent, d
13. <i>B. intermedia</i> Gouan <i>B. valentina</i> (L.) Heywood	ovate	0.81 \pm 0.29	0.58 \pm 0.12	0.14 \pm 0.07	glabrous
14. var. <i>valentina</i>	ovate	1.23 \pm 0.54	0.65 \pm 0.15	0.2 \pm 0.08	pubescent, d
15. var. <i>leptophylla</i> (Pau) Olowo.	ovate	1.25 \pm 0.56	0.65 \pm 0.16	0.2 \pm 0.07	pubescent, d
16. <i>B. scaposa</i> Sennen ex Mach.-Laur.	orbiculate	1.34 \pm 0.56	0.78 \pm 0.18	0.31 \pm 0.06	pubescent, d
17. <i>B. gredensis</i> Guinea	ovate	1.36 \pm 0.55	0.81 \pm 0.14	0.28 \pm 0.12	pubescent, d
18. <i>B. coronifolia</i> L.	ovate	1.42 \pm 0.42	0.82 \pm 0.21	0.25 \pm 0.17	pubescent, d
19. <i>B. polyclada</i> Jordan	ovate	1.40 \pm 0.41	0.81 \pm 0.22	0.23 \pm 0.16	pubescent, d
20. <i>B. sclerocarpa</i> Revel	orbiculate	1.04 \pm 0.32	0.75 \pm 0.18	0.16 \pm 0.15	pubescent, sp.
21. <i>B. microcarpa</i> DC.	oblong	0.88 \pm 0.22	0.62 \pm 0.21	0.26 \pm 0.21	glabrous
22. <i>B. didyma</i> L.	ovate	1.14 \pm 0.31	0.75 \pm 0.33	0.25 \pm 0.18	pubescent, d
23. <i>B. lyrata</i> L.	ovate/orbiculatet	1.56 \pm 0.29	1.16 \pm 0.42	0.42 \pm 0.28	pubescent, d
24. <i>B. auriculata</i> L.	obovate/ovate	2.31 \pm 0.51	1.35 \pm 0.39	0.72 \pm 0.29	glabrous
25. <i>B. cichoriifolia</i> Loisel.	obovate/oblong	2.54 \pm 0.48	1.38 \pm 0.41	1.01 \pm 0.45	pubescent, sp.

TABLE 3

Morphological characters of the juvenile leaves ($\bar{x} \pm s. e.$ = mean \pm standard error; d = dense; v.d = very dense; sp. = sparse)

Taxa	Shape	Length (cm) $\bar{x} \pm s. e.$	Width (cm) $\bar{x} \pm s. e.$	Petiole (cm) $\bar{x} \pm s. e.$	Margin	Indumentum
1. <i>B. variegata</i> Boiss. & Reuter	ovate/obovate	3.84 \pm 0.17	1.56 \pm 0.13	1.32 \pm 0.14	entire/depate	pubescent, v.d
2. <i>B. megacarpaea</i> Boiss. & Reuter	ovate/oblong	3.67 \pm 0.21	1.58 \pm 0.18	0.86 \pm 0.09	entire/dentate	pubescent, v.d
3. <i>B. foliosa</i> Mach.-Laur.	ovate/oblong	3.49 \pm 0.24	1.42 \pm 0.16	0.5 \pm 0.17	entire/dentate	pubescent, v.d
<i>B. laevigata</i> L.						
4. subsp. <i>laevigata</i>	ovate/elliptic	3.82 \pm 0.21	1.12 \pm 0.28	0.66 \pm 0.21	entire	pubescent, v.d
5. subsp. <i>gracilis</i> Mach.-Laur.	ovate/obovate	3.26 \pm 0.14	1.12 \pm 0.17	0.48 \pm 0.19	entire/dentate	pubescent, v.d
6. subsp. <i>kernerii</i> Mach.-Laur.	ovate/elliptic	2.84 \pm 0.17	1.14 \pm 0.23	0.68 \pm 0.17	entire	pubescent, v.d
7. subsp. <i>guestphalica</i> Mach.-Laur.	ovate	2.72 \pm 0.15	1.23 \pm 0.18	0.70 \pm 0.19	entire	pubescent, v.d
8. <i>B. frutescens</i> Cosson	obovate	3.44 \pm 0.21	1.32 \pm 0.16	0.81 \pm 0.12	dentatet	pubescent, v.d
<i>B. sempervirens</i> L.						
9. var. <i>sempervirens</i>	ovate/obovate	3.71 \pm 0.14	1.48 \pm 0.18	1.51 \pm 0.08	entire/dentate	pubescent, v.d
10. var. <i>brevifolia</i> (Rouy) Heywood	ovate/obovate	3.68 \pm 0.11	1.44 \pm 0.19	1.43 \pm 0.07	entire/dentate	pubescent, v.d
<i>B. glacialis</i> (Boiss. & Reuter) Jordan						
11. var. <i>glacialis</i>	linear/elliptic	1.42 \pm 0.08	0.73 \pm 0.09	0.45 \pm 0.06	entire	villous, v.d
12. var. <i>harana</i> Olowo.	linear/elliptic	1.41 \pm 0.08	0.71 \pm 0.08	0.45 \pm 0.07	entire	villous, v.d
13. <i>B. intermedia</i> Gouan	ovate	1.76 \pm 0.12	0.61 \pm 0.08	0.32 \pm 0.06	entire/dentate	pubescent, v.d
<i>B. valentina</i> (L.) Heywood						
14. var. <i>valentina</i>	spathulate	2.26 \pm 0.18	0.84 \pm 0.09	0.38 \pm 0.08	dentate	setiform, d.
15. var. <i>leptophylla</i> (Pau) Olowo.	spathulate	2.24 \pm 0.17	0.82 \pm 0.08	0.36 \pm 0.07	dentate	setiform, d.
16. <i>B. scapoza</i> Sennen ex Mach.-Laur.	spathulate	3.81 \pm 0.11	1.3 \pm 0.13	1.02 \pm 0.10	entire/dentate	hispid, d.
17. <i>B. gredensis</i> Guinea	cuneate	2.52 \pm 0.17	1.04 \pm 0.12	0.65 \pm 0.11	dentate	pubescent, v.d
18. <i>B. coronopifolia</i> L.	deltoid	2.13 \pm 0.13	1.14 \pm 0.14	0.41 \pm 0.14	dentate/lobed	pubescent, v.d
19. <i>B. polyclada</i> Jordan	deltoid	2.1 \pm 0.12	1.11 \pm 0.13	0.38 \pm 0.12	dentate/lobed	pubescent, d.
20. <i>B. sclerocarpa</i> Revel	obovate	3.23 \pm 0.19	1.51 \pm 0.18	0.64 \pm 0.08	entire/dentate	pubescent, v.d
21. <i>B. microcarpa</i> DC.	lanceolate	3.61 \pm 0.18	0.84 \pm 0.26	1.0 \pm 0.21	dentate	pubescent, d.
22. <i>B. didyma</i> L.	cuneate/obovate	2.67 \pm 0.31	1.4 \pm 0.21	0.66 \pm 0.27	dentate	pubescent, v.d
23. <i>B. lyrata</i> L.	obovate	5.48 \pm 0.43	2.14 \pm 0.36	1.21 \pm 0.35	entire/dentate/lobed	pubescent, sp.
24. <i>B. auriculata</i> L.	elliptic/lanceolate	7.73 \pm 0.54	1.47 \pm 0.42	1.41 \pm 0.31	dentate/lobed	pubescent, sp.
25. <i>B. cichorifolia</i> Loisel.	elliptic/obovate	6.64 \pm 0.51	2.22 \pm 0.4	1.12 \pm 0.24	entire/dentate	pubescent, sp.

three diagrams are shown for any taxon with noticeable intra- or inter-population variation. *B. sclerocarpa* Revel is the only taxon not represented because most of the seedlings were destroyed just before harvesting and the remaining few were raised to maturity for other studies.

Seed germination

Germination is phanerocotylar in all cultivated taxa, the cotyledons appearing above the ground about 5-18 days after sowing. Most of the seeds germinated easily without any pre-treatment or other special requirements. The annual species, such as *B. didyma* L., *B. lyrata* L., *B. microcarpa* DC. and *B. auriculata* L., usually germinate faster, within one week, and have a higher percentage germination than the perennials. Seedlings are generally vulnerable at the early stages of their development. In *Biscutella* the threats to seedling establishment are damping off of disease and a molluscan slug which may destroy an entire population of about 30 seedlings overnight.

Cotyledon characters

The cotyledons vary in shape from ovate, obovate, oblong to orbiculate. In some taxa the shape is constant in all the populations examined while in others two or three types may be found. *B. glacialis* (Boiss. & Reuter) Jordan, *B. scaposa* Sennen ex Mach.-Laur. and *B. sclerocarpa* Revel have orbiculate cotyledons while in *B. frutescens* Cosson, *B. intermedia* Gouan, *B. valentina* (L.) Heywood, *B. gredensis* Guinea, *B. coronopifolia* L., *B. polyclada* Jordan and *B. didyma* L., the cotyledons are ovate. In the remaining taxa the shape varies within each of the populations (Table 2).

The length and width of the cotyledons vary very little within each taxon but the variation between species is considerable. Figure 35 shows the highly significant linear relationship between this pair of characters, the width increasing steadily with increase in length. On the basis of cotyledon size the 25 taxa studied can be divided into three main groups: the first group consists of *B. microcarpa* DC. (21), *B. intermedia* Gouan (13), *B. glacialis* (Boiss. & Reuter) Jordan var. *glacialis* (11), and *B. glacialis* (Boiss. & Reuter) Jordan var. *harana* Olowo. (12), which have

the smallest cotyledons, usually less than 1 cm long; most of the taxa investigated fall within the second group (19 taxa) where the cotyledons are always more than 1 cm long but less than 2 cm. The third group consists of two species, *B. auriculata* L. (24) and *B. cichoriifolia* Loisel. (25), which have cotyledons that are more than 2 cm long. The length of the cotyledon petiole is also positively correlated with the cotyledon size. Groups 1 and 2 correspond to subgenus *Biscutella* while group 3 includes the only two species of subgenus *Iondraba* (Medik.) Cosson.

The colour of the cotyledons varies from dark-green to light- or yellowish-green. There is variation both within and between the populations examined. The cotyledons of most taxa are usually densely pubescent except those of *B. laevigata* L. subsp. *kernerii* Mach.-Laur., *B. sclerocarpa* Revel and *B. cichoriifolia* Loisel. which are sparsely hairy and more importantly, those of *B. intermedia*, *B. microcarpa* and *B. auriculata* L. which are totally devoid of hairs. The glabrous nature of the cotyledons in these species provides a key character for distinguishing them from other species of the genus. VOGEL (1980) observed that indumentum is almost always absent on the cotyledons of tropical primary forest seedlings. This contrasts with the situation in *Biscutella* — a mediterranean genus — in which about 80 % of the species investigated are densely pubescent. The apex of the cotyledon is usually rounded in most taxa except in *B. coronopifolia* L. and *B. polyclada* Jordan which have obtuse apices. This differs sharply from the apices of many genera of the tribe *Brassicaceae* where cotyledons are deeply notched (GOMEZ-CAMPO & TORTOSA, 1974).

Well-developed buds are found in the axils of the cotyledons of all four subspecies of *B. laevigata* L. subsp. *kernerii* Mach.-Laur. (Fig. 14), subsp. *gracilis* Mach.-Laur. (Fig. 15), subsp. *laevigata* (Fig. 16, 17, 18), subsp. *guestphalica* Mach.-Laur. (Fig. 19) and all specimens of *B. coronopifolia* (Fig. 3) and *B. polyclada* (Fig. 4). This character represents a useful diagnostic feature for these taxa and may account for the early formation of lateral branches in these taxa. Two species, *B. auriculata* and *B. cichoriifolia*, have distinctly red hypocotyl which indicates the presence of anthocyanin in these taxa. While the presence or absence of anthocyanin is an interesting phenomenon to note, NOZZOLILLO (1977) has observed that it is too subject to environmental influence to be a useful key character.

Juvenile leaf characters

The shape of the first pair of juvenile leaves varies considerably both within and between taxa (Table 3). In most species about two or even three different leaf-shapes occur. However a few taxa can be readily identified by the shape of their leaves and these include *B. gredensis* Guinea with cuneate leaves; *B. coronopifolia* and *B. polyclada* which have deltoid leaves; *B. valentina* and *B. scaposa* with their characteristic spatulate leaves. The two varieties of *B. glacialis* may also be distinguished by their linear leaves, although elliptic leaves also occur among these taxa.

The length and width of the juvenile leaves vary little within each species but the variation between species is taxonomically significant (Table 3). Figure 36 shows that these two leaf characters are roughly positively correlated and that three groups can be recognized as in the cotyledon but with minor differences. Within the first group are *B. glacialis* var. *glacialis* (11), *B. glacialis* var. *harana* (12) and *B. intermedia* (13) which have the shortest and narrowest leaves. Nineteen taxa fall within the second group where the leaves range from 2.4 cm and 0.8-1.6 cm in length and width respectively. At the other extreme, group three, are *B. lyrata* (23), *B. auriculata* (24) and *B. cichoriifolia* (25). The leaf petioles are usually short, being about one quarter or less, the length of the lamina. The general pattern observed here is that seedling with long lamina usually have long petioles.

The incisions of the leaf margin vary both within and between species. Some species have both entire and dentate leaves while others are either dentate or entire. In a few cases the margin may be lobed or even subpinnatifid. Species with characteristic margins include *B. valentina*, *B. scaposa*, *B. gredensis*, *B. coronopifolia*, *B. polyclada* and *B. didyma*. Subpinnatifid leaves which resemble those found in the adult stage are found in some seedlings of *B. auriculata* and *B. cichoriifolia* while in *B. lyrata*, the characteristic lyrate leaves may also make an early appearance. Trichomes on the leaves are relatively very common. Most taxa have densely pubescent leaves except *B. lyrata*, *B. auriculata*, *B. cichoriifolia* and *B. coronopifolia* which have sparse indumentum. It is worthy of note that some types of trichomes characte-

ristic of some species at the mature stage can be noticed on their seedlings. Notable examples include *B. glacialis* with the villous hairs, *B. valentina* with rigid setiform hairs and *B. frutescens* Cosson with its densely tomentose indumentum. These features may indicate genetic differences which have found expression at the early stage in the life-cycle of these species and, according to DAVIS and HEYWOOD (1963), may be of vital selective value.

As a general rule, taxa which are closely related produced seedlings similar in morphology, e. g. *B. variegata* Boiss. & Reuter, *B. megacarpaea* Boiss. & Reuter and *B. foliosa* Mach.-Laur. are almost impossible to separate. The results of biometrical analyses and hybridization experiments have shown that these three taxa are conspecific (OLWOKUDEJO & HEYWOOD, unpubl.). The four subspecies of *B. laevigata* included in this study also display striking similarity in their morphology. Moreover these seedlings are very similar to those of the *B. variegata* group which OLWOKUDEJO & HEYWOOD (1984) suggested may have been derived from crosses between diploid and tetraploid subspecies of *B. laevigata*. The varieties of each of *B. glacialis*, *B. valentina* and *B. sempervirens* are also very similar in their seedling morphology. The seedlings of *B. coronopifolia* and *B. polyclada*, which are regarded as one single variable species (OLWOKUDEJO, 1980), are also difficult to distinguish. However there are exceptions to this rule, there are some cases of taxa which are not closely related but producing morphologically similar seedlings. For example, seedlings of *B. gredensis* (Fig. 8) are similar to those of *B. scaposa* (Fig. 7); seedlings of *B. frutescens* (Fig. 1, 2) also resemble those of *B. variegata* group. On the other hand, there are a few instances of related species producing quite dissimilar seedlings, e.g. *B. glacialis* and *B. sempervirens*; *B. didyma* and *B. lyrata*; *B. sclerocarpa* and *B. coronopifolia*.

CONCLUSION

This investigation has revealed that juvenile characters may be used to separate *Biscutella* seedlings into groups of one to several taxa. In some cases, identification may be made with confidence to species, while in others two or three taxa may be difficult to separate. The data presented in tables 2 and 3 give some indications of potential taxonomic usefulness of seedling characters within the genus. Despite the differences in the geo-

graphical localities of the populations intraspecific variability of seedling morphology is very little within the genus and this confers a good degree of taxonomic significance on seedling characters.

The seedlings of the two species of subgenus *Iondraba* (Medik.) Cosson, *B. auriculata* and *B. cichoriifolia*, differ from other species of the other subgenus, *Biscutella*, by a number of characters and occupy a well-defined region in the scatter diagrams (Fig. 35 & 36). The two species can also be distinguished from each other by at least four characters. The other subgenus, *Biscutella*, is divisible into two sections: *Biscutella* with 5 species, and section *Laevigatae* which consists of 27 species and other intraspecific taxa. Of the 5 species in section *Biscutella*, the seedlings of 3 have been studied: *B. microcarpa*, *B. didyma* and *B. lyrata*, and they all have characteristic and recognizable appearance which would make their identification possible by a combination of characters. Although these 3 species cannot be distinguished as a group from species of the other section, *Laevigatae*, of the subgenus.

Section *Laevigatae* contains the largest number of taxa and 20 of these have been studied. Some species are readily recognised by their peculiar morphological characteristics, e.g. *B. glacialis*, *B. valentina*, *B. scaposa* and *B. frutescens* by their indumentum type, *B. valentina*, *B. scaposa*, *B. gredensis*, *B. coronopifolia* and *B. polyclada* by their leaf shape, *B. intermedia* by its glabrous cotyledons, *B. glacialis* and *B. intermedia* by their relatively small size and the buds present in the axils of the cotyledons of all subspecies of *B. laevigata* (s. l.) constitute useful key characters.

KEY TO BISCUTELLA SEEDLINGS

1. Cotyledons more than 2.8×1.3 cm in size
 2. Juvenile leaf more than 7.5 cm long, cotyledon glabrous *B. auriculata*
 2. Juvenile leaf less than 7 cm long, cotyledon pubescent *B. cichoriifolia*
- 1 Cotyledons less than 2×1.2 cm in size
 3. Buds present in the axil of the cotyledons
 4. Juvenile leaf deltoid
 5. Juvenile leaf sparsely pubescent *B. coronopifolia*
 5. Juvenile leaf densely pubescent *B. polyclada*

4. Juvenile leaf ovate, obovate or elliptic, never deltoid
 6. Juvenile leaf more than 3 cm long
 7. Cotyledon more than 1 cm wide, leaf petiole more than 0.6 cm long *B. laevigata* subsp. *laevigata*
 7. Cotyledon less than 1 cm wide, leaf petiole less than 0.5 cm long *B. laevigata* subsp. *gracilis*
 6. Juvenile leaf less than 3 cm long
 8. Cotyledon densely pubescent *B. laevigata* subsp. *guestphalica*
 8. Cotyledon sparsely pubescent *B. laevigata* subsp. *kernerii*
3. Buds absent in the axil of the cotyledons
 9. Juvenile leaf spatulate, sectiform or hispid
 10. Cotyledon orbiculate and more than 0.7 cm wide *B. scaposa*
 10. Cotyledon ovate and less than 0.7 cm wide *B. valentina*
 9. Juvenile leaf never spatulate, neither setiform nor hispid
 11. Cotyledon less than 1×0.65 cm in size
 12. Cotyledon densely pubescent and juvenile leaf densely villous *B. glacialis* (s. l.)
 12. Cotyledon glabrous, and juvenile leaf densely pubescent, never villous
 13. Juvenile leaf ovate, less than 2 cm long *B. intermedia*
 13. Juvenile leaf lanceolate, more than 3 cm long *B. microcarpa*
 11. Cotyledon more than 1×0.65 cm in size
 14. Juvenile leaf more than 5.48 cm long *B. lyrata*
 14. Juvenile leaf less than 4 cm long
 15. Juvenile leaf cuneate
 16. Juvenile leaf dentate with one tooth on each side *B. gredensis*
 16. Juvenile leaf dentate with 2, 3 or 4 teeth on each side *B. didyma*
 15. Juvenile leaf never cuneate
 17. Cotyledon petiole less than 0.3 cm long
 18. Juvenile leaf petiole less than 1 cm long
 19. Cotyledon orbiculate and sparsely pubescent *B. steroearpa*
 19. Cotyledon ovate or oblong and densely pubescent *B. megacarpaea*, *B. foliosa*
 18. Juvenile leaf petiole more than 1 cm long *B. variegata*
 17. Cotyledon petiole more than 0.3 cm long
 20. Indumentum densely tomentose with soft hairs, juvenile leaf petiole less than 1 cm long *B. frutescens*
 20. Indumentum densely pubescent with stiff hairs, juvenile leaf petiole more than 1 cm long *B. sempervirens* (s. l.)

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank Prof. V. H. HEYWOOD, the Head of Botany Department, Reading University, England, for his advice and for providing the necessary facilities. Prof. C. GÓMEZ-CAMPO (Madrid), Dr. J. VARO ALCALA and staff of Botany Department, University of Granada, Dr. B. VALDÉS and staff of the Biology Department, University of Seville, assisted the author in various ways during his field work in Spain; their invaluable help is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- BRAYSHAW, T. C.
1959 Tree seedlings of eastern Canada. *Can. Dep. North Aff., Bull.* 122.
- BURZER HZN., D.
1972 *Seedlings of some tropical trees and shrubs, mainly of South East Asia*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen.
- CHANCELLOR, R. J.
1966 *The identification of weed seedlings of farm and garden*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- COSSON, E. S. C.
1872 *Bull. Soc. Bot. Fr.* Vol. 19. Paris.
- DAVIS, P. H. & HEYWOOD, V. H.
1963 *Principles of Angiosperm Taxonomy*. Oliver & Boyd, Edinburgh and London.
- DUKE, J. A.
1965 Keys for the identification of seedlings of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 52: 314-350.
1969 On Tropical tree seedlings. I. Seeds, Seedlings, Systems and Systematics. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 56: 125-161.
- GÓMEZ-CAMPO, C. & TORTOSA, M. E.
1974 The Taxonomic and evolutionary significance of some juvenile characters in the Brassiceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 69: 105-124.
- GUINEA, E.
1963 El genero *Biscutella*. *Anales del Instituto Botanico A. J. Cavanilles* 21: 387-405.
- GUINEA, E. & HEYWOOD, V. H.
1964 *Biscutella*, in TUTIN, T. G. & al. (Eds.): *Flora Europaea* I: 325-330. Cambridge University Press.
- MACHATSCHKI-LAURICH, B.
1926 Die Arten de Gattung *Biscutella* L. sect. *Thlaspidium* (MED.) DC. *Bot. Arch.* 13: 1-115.

MALINOWSKI, E.

1910 Monographie du genre *Biscutella* L. I. Classification et distribution géographique. *Bull. Acad. Sci. Cracovie* 1910, Series B, 111-139.

MULLER, F. M.

1978 *Seedlings of the North-Western European lowland*. A flora of seedlings. W. Junk, The Hague/Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen.

NOZZOLILLO, C.

1977 Identification of *Vicia* seedlings. *Can. J. Bot.* 55: 2439-2462.

OLWOKUDEJO, J. D.

1980 Systematic Studies in the Genus *Biscutella* L. Ph. D. Thesis, University of Reading, England.

OLWOKUDEJO, J. D. & HEYWOOD, V. H.

1984 Cytotaxonomy and Breeding System of the Genus *Biscutella* (Cruciferae). *Plant Systematics and Evolution* 145: 291-309.

VOGEL, E. F. DE

1980 *Seedlings of dicotyledons*. Structure, development, types. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen.

WILLKOMM, H. M.

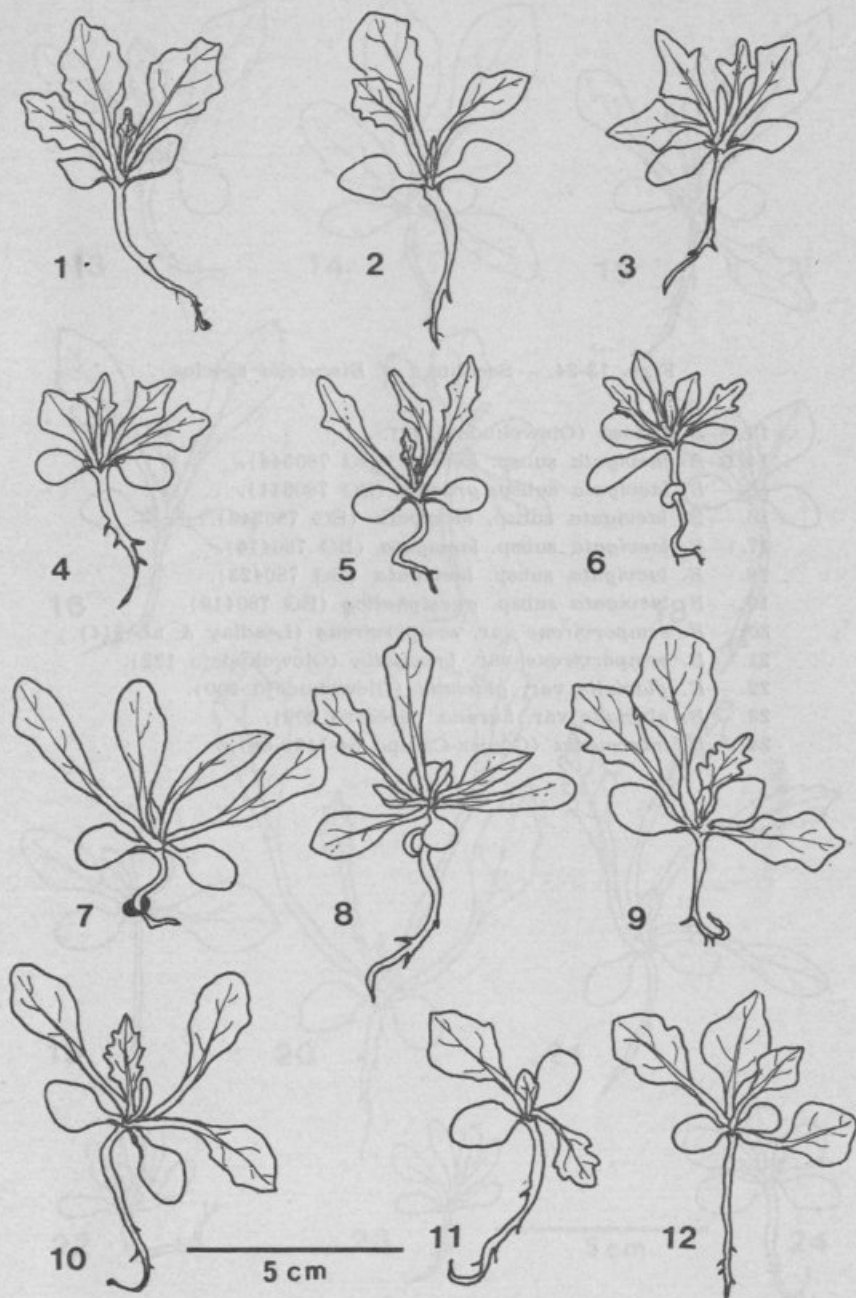
1880 *Biscutella*, in WILLKOMM, H. M. & LANGE, J. M. C. 1880. *Prodromus Flora Hispanicae*. Vol. 3. Stuttgartiae.



FIG. 1. Seedlings of *Biscutella* species.

Figs. 1-12. — Seedlings of *Biscutella* species.

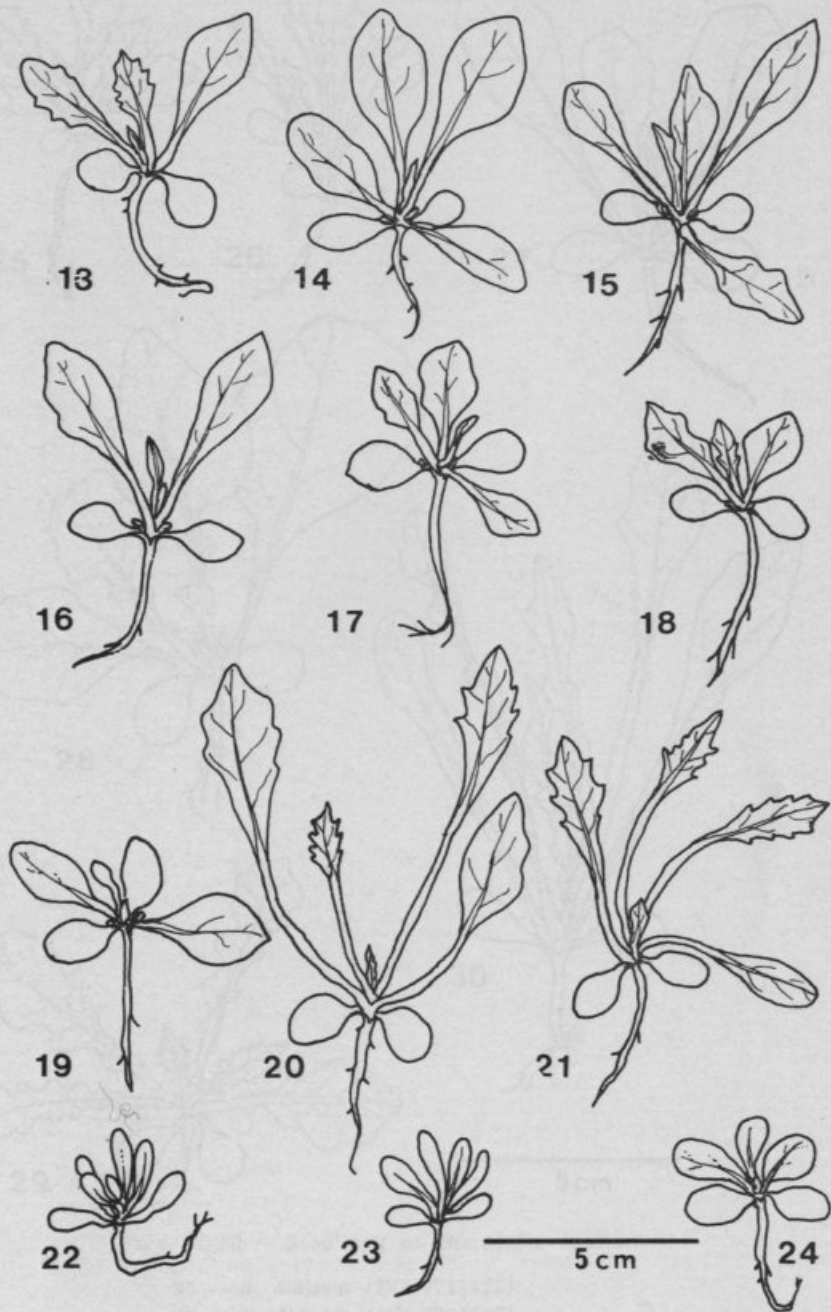
1. — *B. frutescens* (Olowokudejo 187).
2. — *B. frutescens* (Olowokudejo 188).
3. — *B. coronopifolia* (BG 780336).
4. — *B. polyclada* (BG 780429).
5. — *B. valentina* var. *valentina* (Olowokudejo 72).
6. — *B. valentina* var. *leptophylla* (Olowokudejo 6).
7. — *B. scaposa* (Olowokudejo 94).
8. — *B. gredensis* (Gómez-Campo 2295).
9. — *B. variegata* (Olowokudejo 60).
10. — *B. variegata* (Olowokudejo 90).
11. — *B. megacarpaea* (Olowokudejo 91).
12. — *B. megacarpaea* (Olowokudejo 92).



Figs. 1-12. — Seedlings of *Biscutella* species.

Figs. 13-24. — Seedlings of *Biscutella* species.

13. — *B. foliosa* (Olowokudejo 93).
14. — *B. laevigata* subsp. *keneri* (BG 780544).
15. — *B. laevigata* subsp. *gracilis* (BG 780311).
16. — *B. laevigata* subsp. *laevigata* (BG 780349).
17. — *B. laevigata* subsp. *laevigata* (BG 780416).
18. — *B. laevigata* subsp. *laevigata* (BG 780423).
19. — *B. laevigata* subsp. *guestphalica* (BG 780419).
20. — *B. sempervirens* var. *sempervirens* (Leadlay & al. 314).
21. — *B. sempervirens* var. *brevifolia* (Olowokudejo 122).
22. — *B. glacialis* var. *glacialis* (Olowokudejo 200).
23. — *B. glacialis* var. *harana* (Socorro 209).
24. — *B. intermedia* (Gómez-Campo 54-1199-68).



Figs. 13-24. — Seedlings of *Biscutella* species.

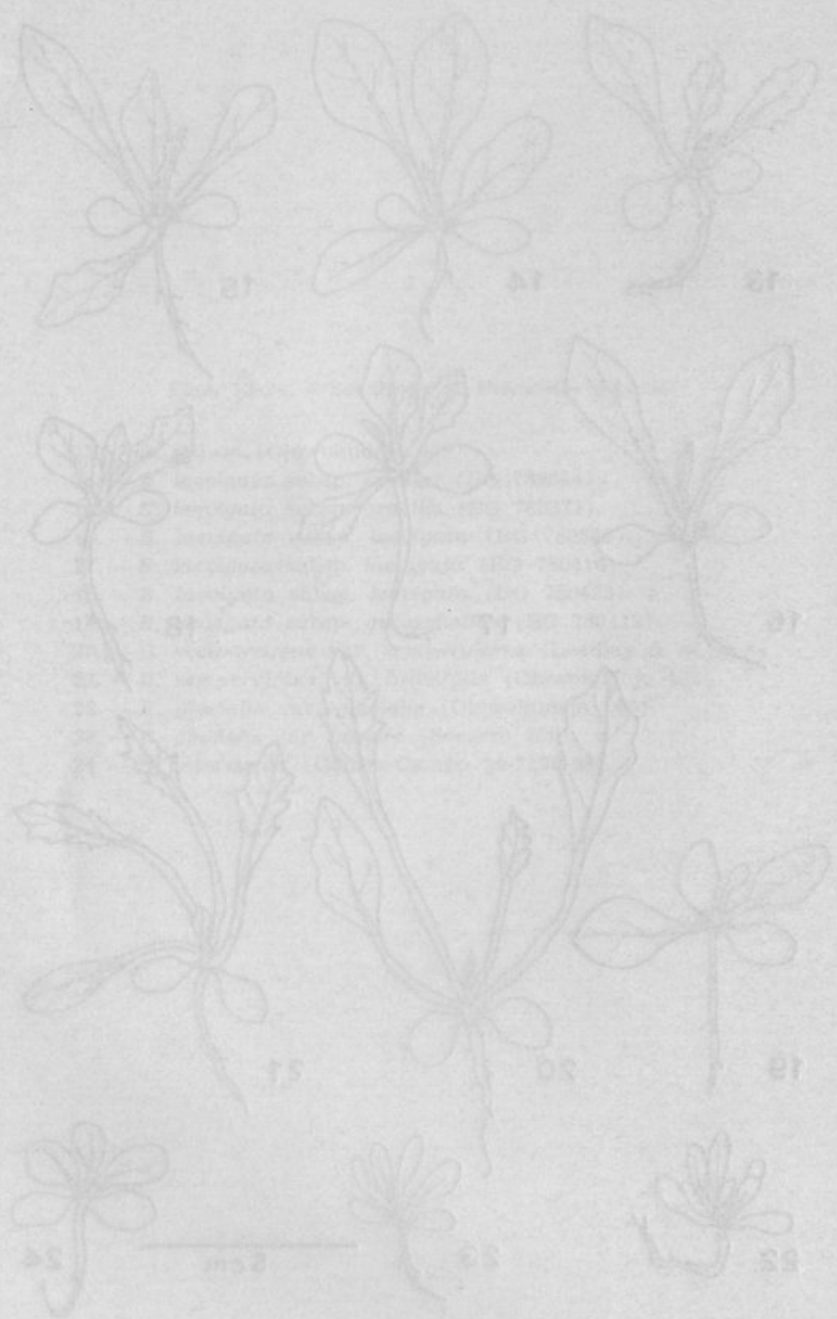
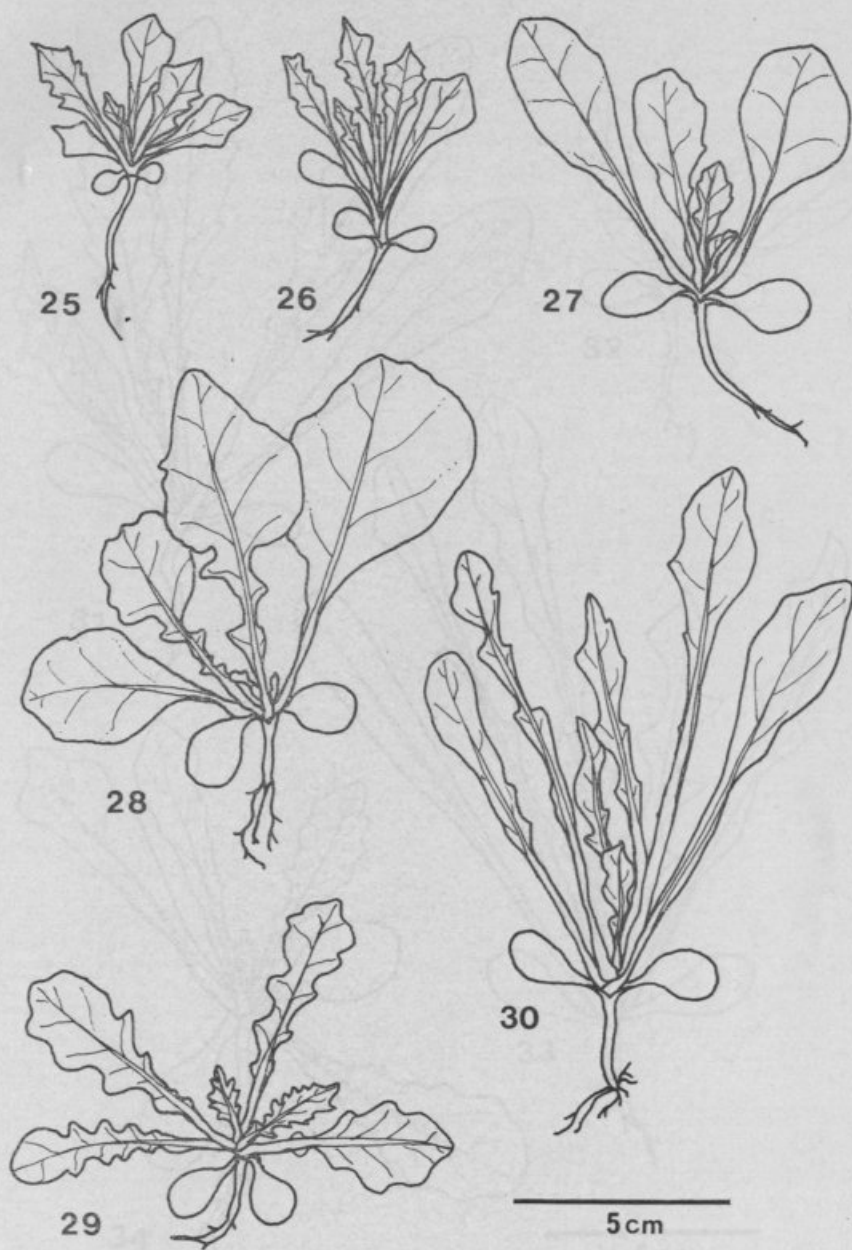


PLATE 1201. — Habit of *Brickellia* species.



Figs. 25-30. — Seedlings of *Biscutella* species.

25. — *B. didyma* (BG 7711425).

26. — *B. didyma* (BG 7700337).

27. — *B. lyrata* (BG 771147).

28. — *B. lyrata* (BG 780185).

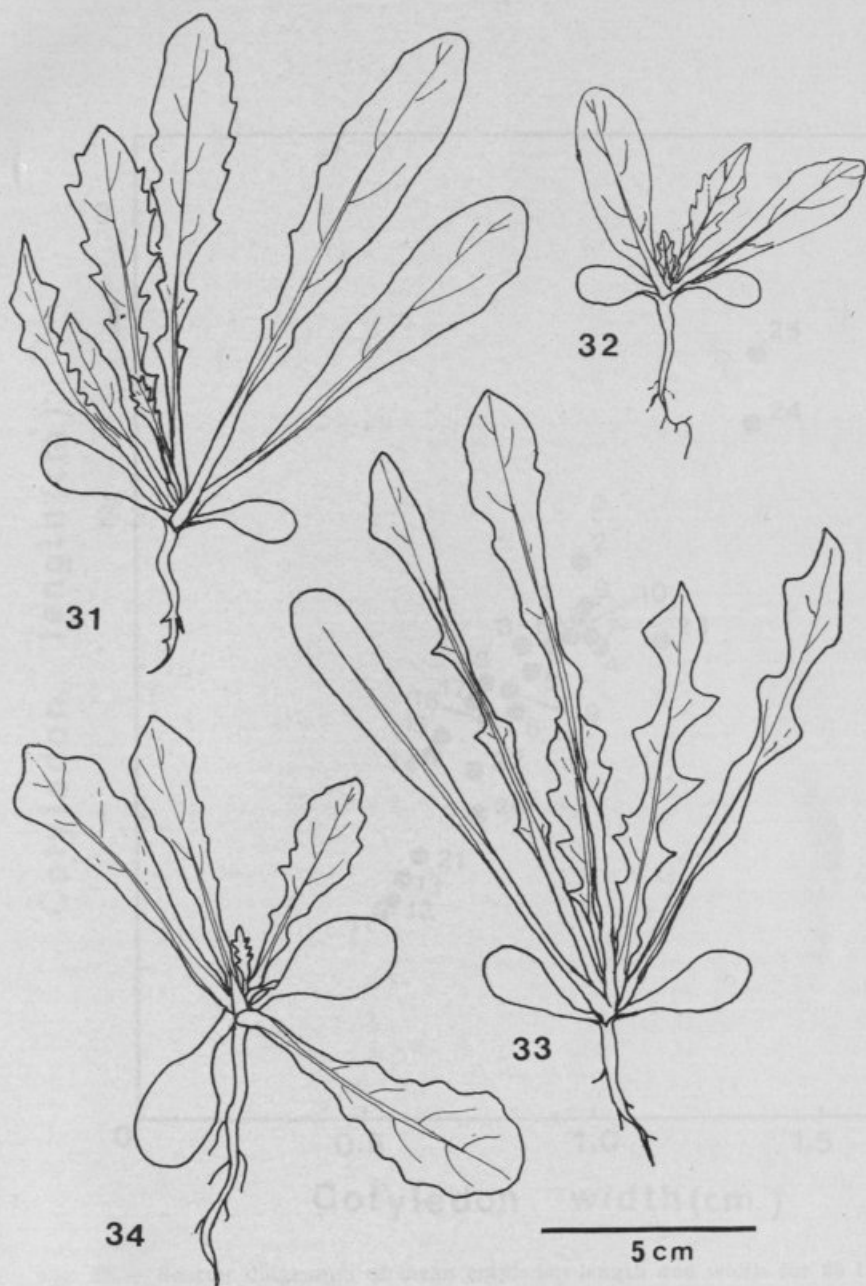
29. — *B. lyrata* (BG 780356).

30. — *B. auriculata* (Olowokudejo 5).



Fig. 25-30. Habit of *Brassica* species.

- 25. *B. napus* (L.) Tuckerm.
- 26. *B. oleracea* (L.) Tuckerm.
- 27. *B. caulorapa* (L.) Tuckerm.
- 28. *B. pekinensis* (L.) Tuckerm.
- 29. *B. parachinensis* (L.) Tuckerm.
- 30. *B. campestris* (L.) Tuckerm.



Figs. 31-34. — Seedlings of *Biscutella* species.

- 31. — *B. auriculata* (Olowokudejo 7)
- 32. — *B. microcarpa* (Heywood & al. 138)
- 33. — *B. auriculata* (Olowokudejo 9).
- 34. — *B. cichoriifolia* (BG 780335).



Fig. 31-34. *Helianthus* of the *Helianthus* group.

31 - *H. scaberrimus* (L.) Link.

32 - *H. scaberrimus* (L.) Link. var. *scaberrimus* (L.) Link.

33 - *H. scaberrimus* (L.) Link. var. *scaberrimus* (L.) Link.

34 - *H. scaberrimus* (L.) Link. var. *scaberrimus* (L.) Link.

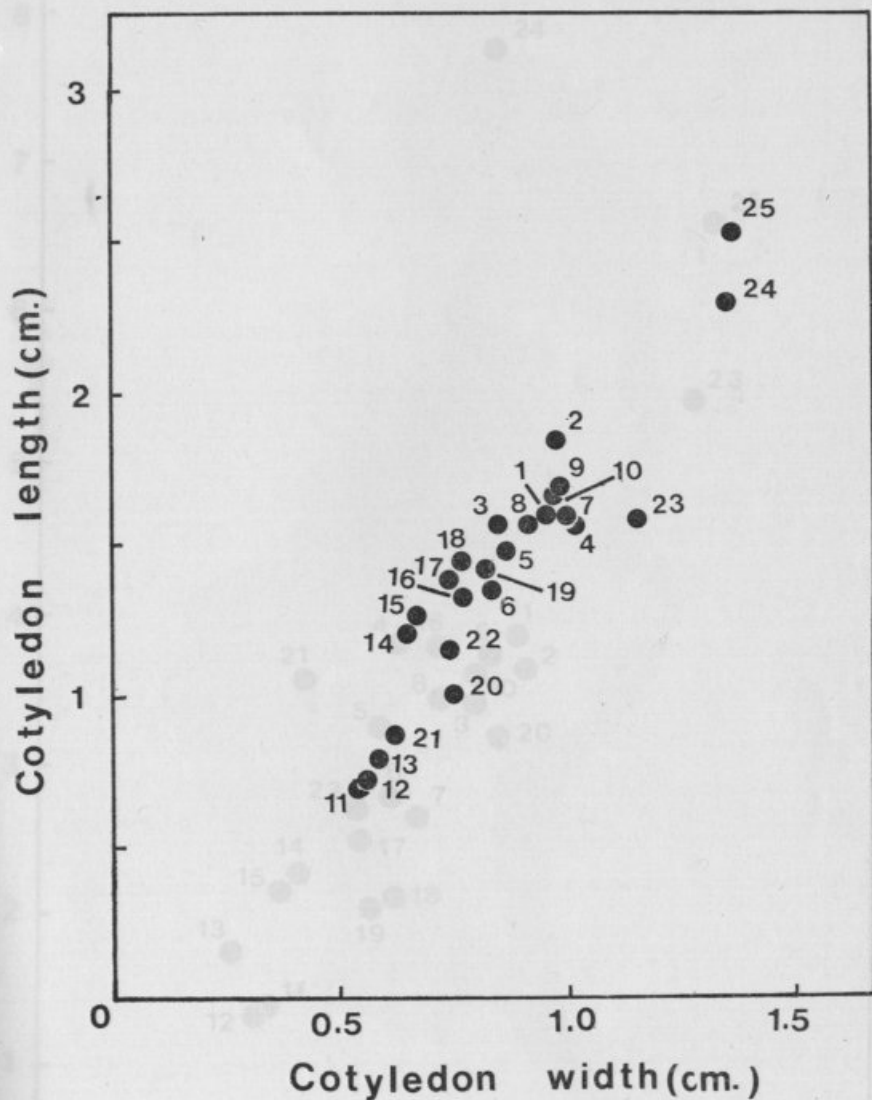


Fig. 35. — Scatter diagram of mean cotyledon length and width for 25 taxa of *Biscutella*. The numbers follow the ordering of taxa in tables 1, 2 and 3.

Fig. 36. — Scatter diagram of mean juvenile leaf length and width for 25 taxa of *Biscutella*. The numbers follow the ordering of taxa in tables 1, 2 and 3.

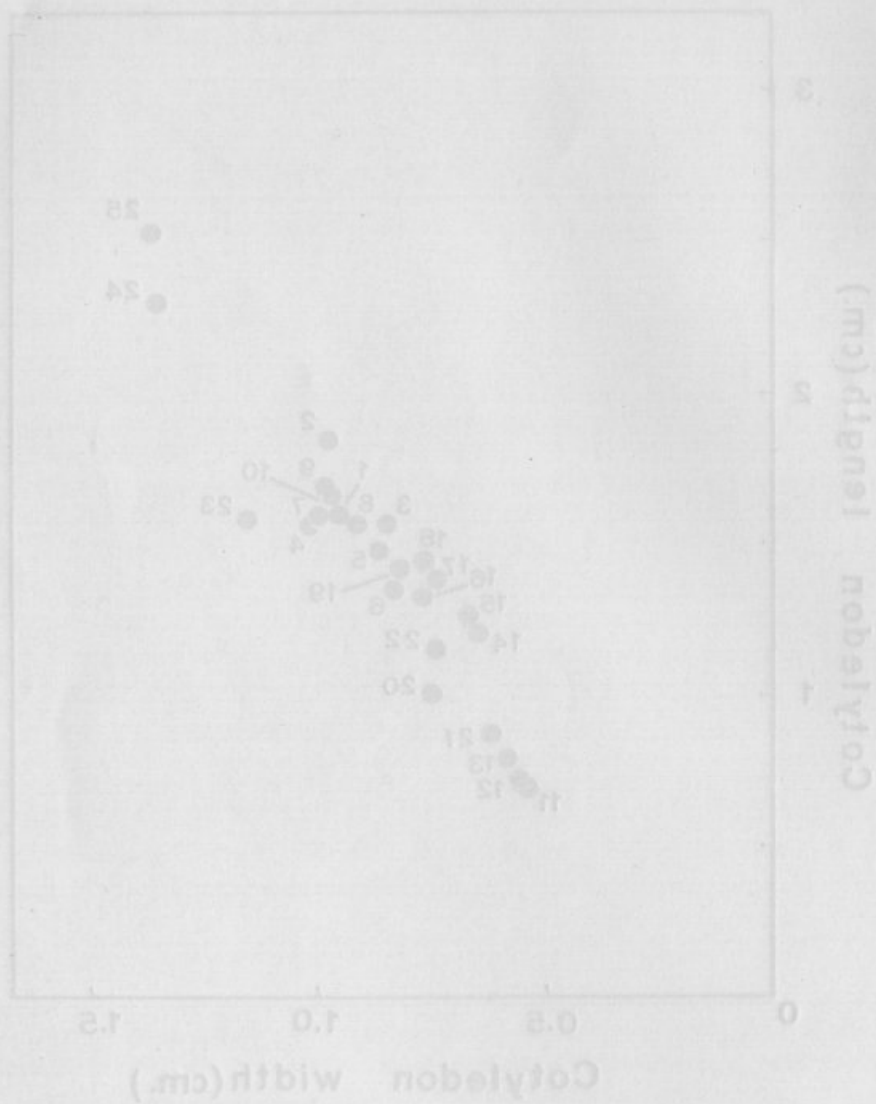


Fig. 32. Scatter diagram of mean cotyledon length and width for 32 taxa of *Blattella*. The numbers follow the ordering of taxa in tables 1, 2 and 3.

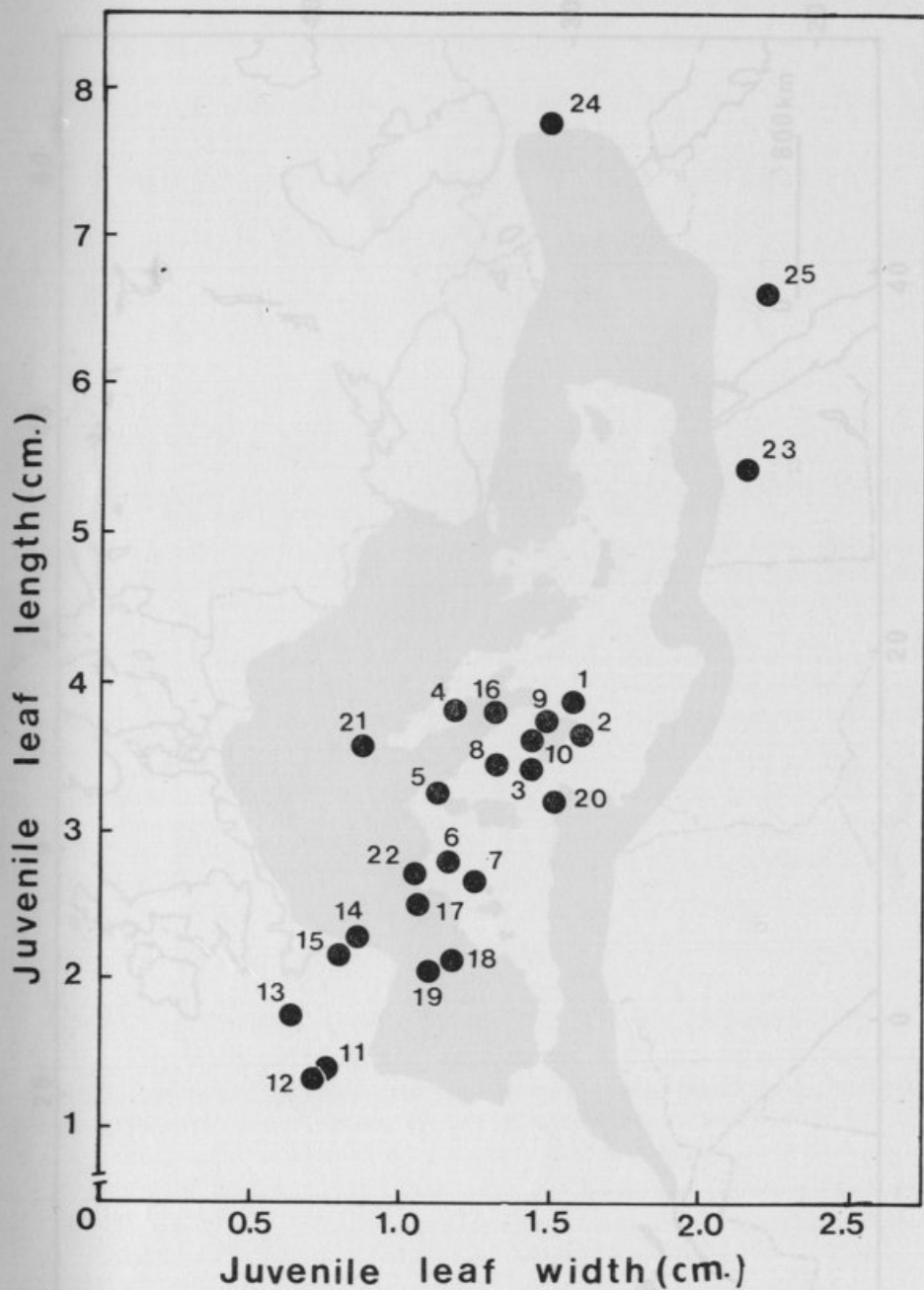


Fig. 36. — Scatter diagram of mean juvenile leaf length and width for 25 taxa of *Biscutella*. The numbers follow the ordering of taxa in tables 1, 2 and 3.

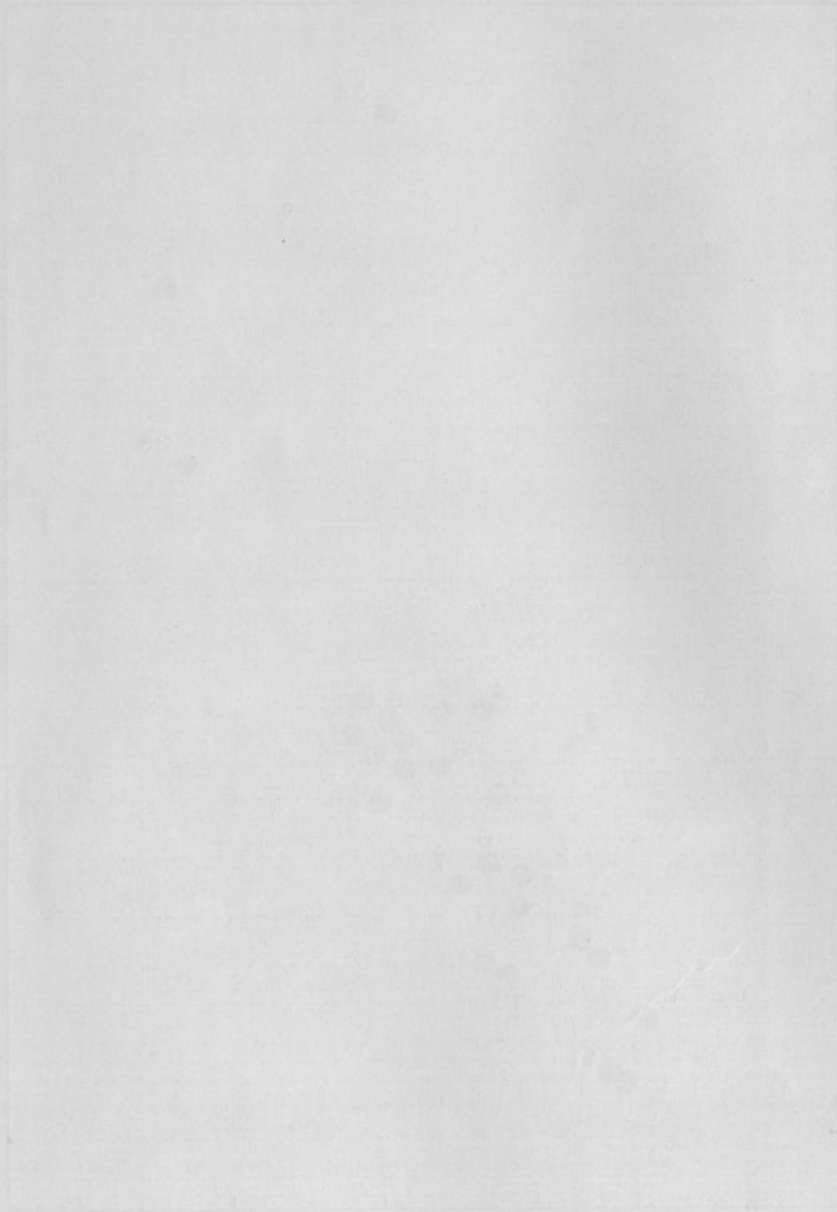


TABLE 1

TABLE 1
TABLE 1
TABLE 1

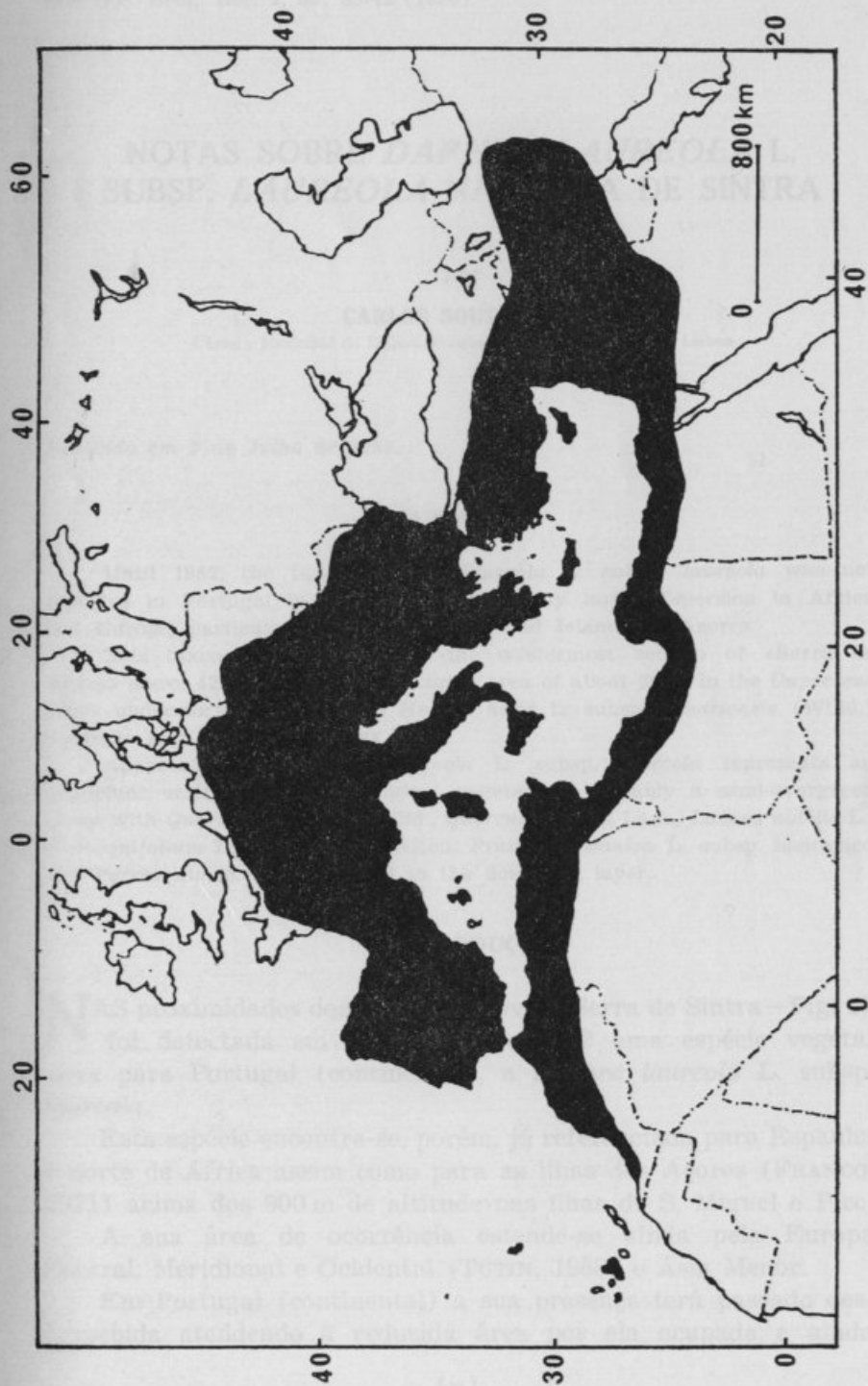
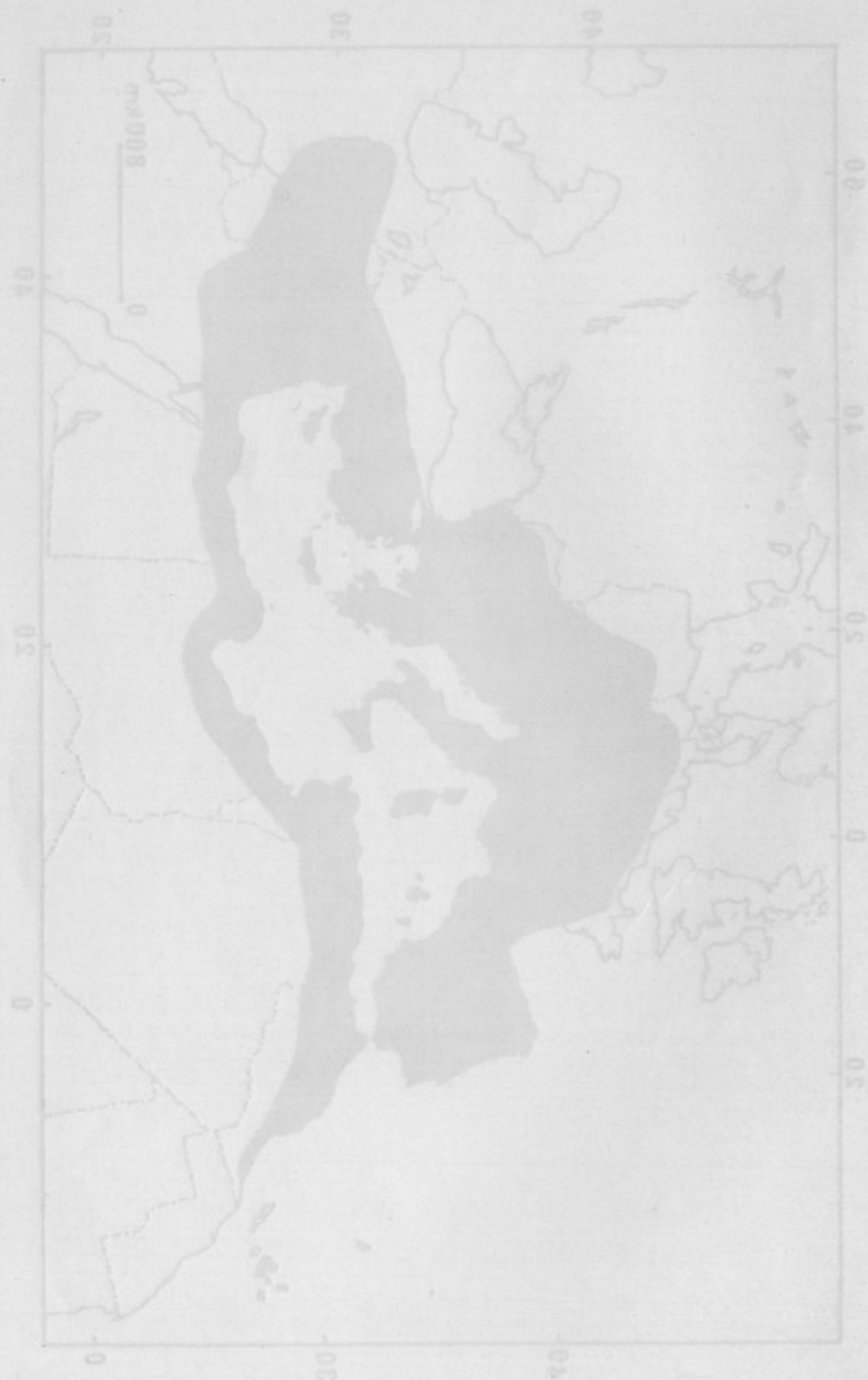


Fig. 37. — Map showing the geographical distribution of the genus *Biscutella*.

Fig. 2. — Subarctic ice distribution at 100 Ka BP.



NOTAS SOBRE *DAPHNE LAUREOLA* L. SUBSP. *LAUREOLA* NA SERRA DE SINTRA

por

CARLOS SOUTO CRUZ

Câmara Municipal de Lisboa, Parque Florestal de Monsanto, Lisboa

Recebido em 5 de Julho de 1985.

SUMMARY

Until 1982, the taxon *Daphne laureola* L. subsp. *laureola* was not reported in Portugal in spite of its relatively large dispersion in Africa and Europe, particularly Spain, Morocco and Islands of Azores.

This taxon was detected on the westernmost section of «Serra de Sintra» above 420 m high in a very small area of about 20 ha in the *Cupressus* grove understory together with *Hedera helix* L. subsp. *canariensis* (Willd.) Coutinho and *Ruscus aculeatus* L.

Apparently the *Daphne laureola* L. subsp. *laureola* represents an important vestige from the original vegetation, probably a semi-evergreen forest with *Quercus pyrenaica* Willd., *Quercus faginea* Lam., *Laurus nobilis* L., *Ilex aquifolium* L., *Myrica faya* Aiton, *Prunus lusitanica* L. subsp. *lusitanica* and *Persea indica* (L.) Sprengel in the dominant layer.

1. INTRODUÇÃO

NAS proximidades dos Píncaros Novos (Serra de Sintra - Fig. 1) foi detectada em Novembro de 1982 uma espécie vegetal nova para Portugal (continental), a *Daphne laureola* L. subsp. *laureola*.

Esta espécie encontra-se, porém, já referenciada para Espanha e norte de África assim como para as ilhas dos Açores (FRANCO, 1971) acima dos 900 m de altitude nas ilhas de S. Miguel e Pico.

A sua área de ocorrência estende-se ainda pela Europa Central, Meridional e Ocidental (TUTIN, 1968) e Ásia Menor.

Em Portugal (continental) a sua presença terá passado despercebida atendendo à reduzida área por ela ocupada e ainda

devido à sua grande semelhança morfológica (fora do período da floração) com a *Euphorbia characias* L. subsp. *characias* e a *Euphorbia amygdaloides* L. subsp. *amygdaloides*, ocorrendo mesmo em situações ecológicas similares à deste último táxon.

Esta semelhança morfológica é inclusive revelada pela designação «spurge laurel», como é conhecida em língua inglesa a *Daphne laureola* L. subsp. *laureola*.

2. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE (FRANCO, 1971)

Nanofanerófito perénifolio de 50-100 cm ou mais, com ramos sub-erectos; rebentos esverdeados, glabros; folhas na maioria fasciculadas no cimo dos ramos, com 30-120 cm, obovado-oblancoeladas, glabras; flores amarelo-esverdeadas, dispostas em curtos cachos axilares, 5-10-floros, inseridos no crescimento do ano anterior; hipanto com 5-9 mm, cerca do triplo das sépalas ovado-agudas; drupa ovóide, negra.

3. OCORRÊNCIA EM PORTUGAL (CONTINENTAL)

A espécie foi detectada exclusivamente na parte ocidental da Serra de Sintra, na zona delimitada pelos cumes de PICOTOS (cota 475 m), PENINHA (cota 487 m) e PÍNCAROS NOVOS (cota 485 m), em estações situadas sempre acima da cota dos 420 m, num perímetro que cobre uma área de cerca de 20 ha (Fig. 2).

4. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA FITOCENOSE ENVOLVENTE

A ocorrência da espécie encontra-se relacionada com cobertos de porte arbóreo denso (em particular à base de *Cupressus* sp.) e cujo sub-bosque apresenta quase que exclusivamente a forma de um estrato sub-arbustivo baixo (0,3 a 1 m de altura) em que a *Hedera helix* L. subsp. *canariensis* (Willd.) Coutinho constitui o elemento dominante, formando um denso manto. Pontualmente ou em manchas de reduzida expressão associam-se-lhe, como elementos arbustivos, *Ruscus aculeatus* L. e *Daphne laureola* L. subsp. *laureola*.

De assinalar que este tipo de formação de sub-bosque é frequente na Serra de Sintra, mas a presença de *Daphne laureola* L. subsp. *laureola* apenas se verifica nas áreas assinaladas na Fig. 1.

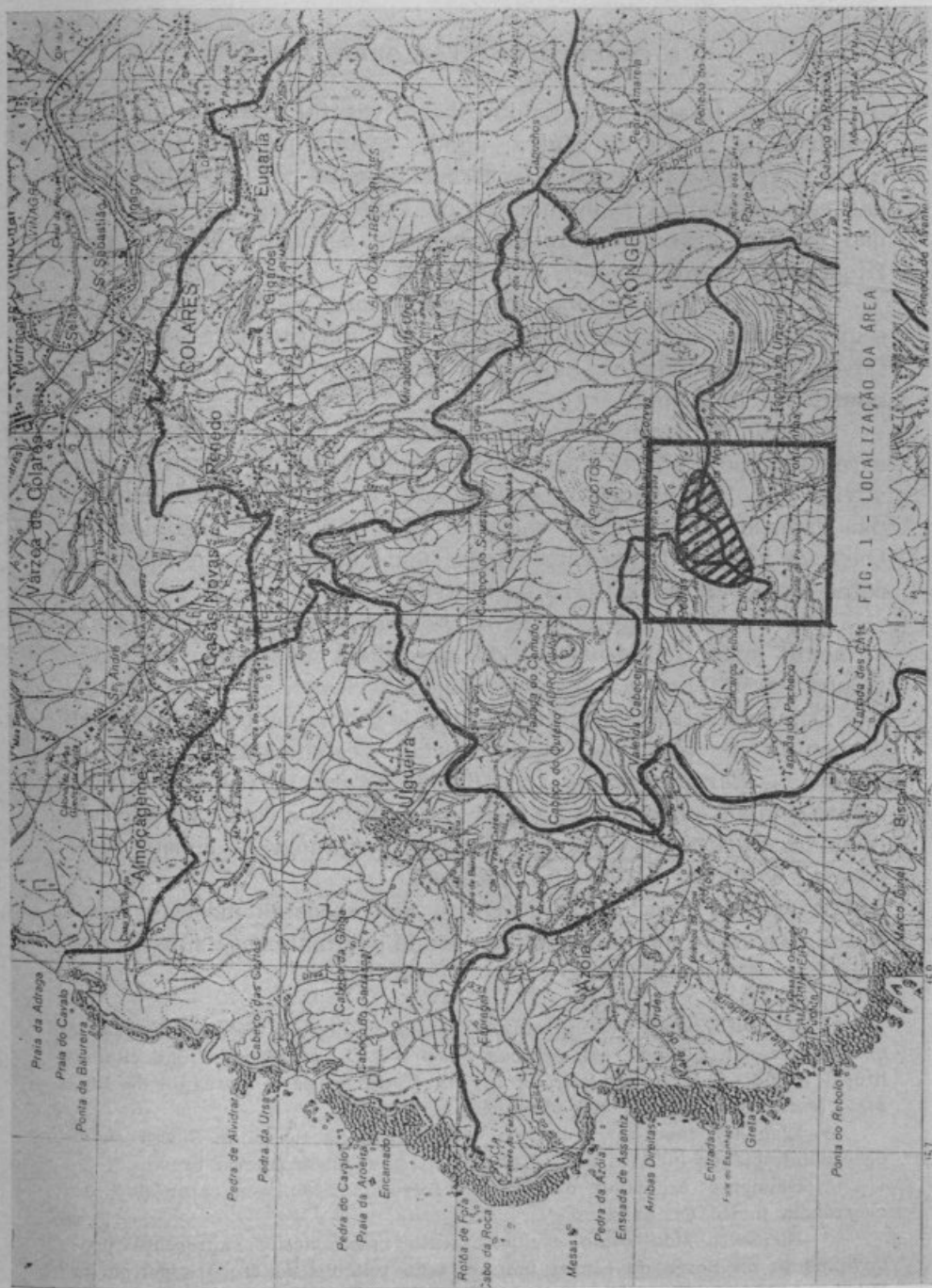


FIG. 1 - LOCALIZAÇÃO DA ÁREA

5. COBERTO VEGETAL ORIGINAL

A quase total destruição do coberto vegetal existente na zona ocidental da Serra de Sintra, aliada a uma pressão antrópica contínua e elevada, traduzida essencialmente por incêndios não naturais, pastoreio e introdução de espécies vegetais exóticas, não permite grande segurança quanto à estrutura original das fitocenoses naturais.

A peculiaridade climática dessa mesma zona, praticamente sem situações similares susceptíveis de comparação (à excepção, talvez, das ocorrentes nas ilhas dos Açores), agrava sobremaneira o problema.

O próprio domínio do carvalho pode inclusive ser sujeito a contestação embora a *Quercus pyrenaica* Willd. constitua sem dúvida um dos elementos codominantes das estruturas climax nas estações mésicas em encostas N e NW, com presença de *Quercus faginea* Lam. em estações mais xéricas assim como às cotas mais baixas da Serra de Sintra.

Nas encostas meridionais a *Quercus faginea* Lam. seria o elemento mais representativo do carvalho, substituído por carvalhos parénifolios nas estações mais xéricas¹.

Dominados pelo carvalho ou com ele codominantes, ocorreriam elementos de uma laurisilva finícola designadamente *Laurus nobilis* L., *Ilex aquifolium* L. e *Erica arborea* L. (estes relativamente comuns em Portugal e mesmo na Europa e Norte de África) e ainda *Myrica faya* Aiton², *Prunus lusitanica* L. subsp. *lusitanica*³ e *Persea indica* (L) Sprengel⁴.

A *Myrica faya* Aiton ocorreria nas encostas mésicas associada à *Quercus pyrenaica* Willd., sendo gradualmente substituída

¹ *Quercus suber* L. em solos siliciosos e *Quercus rotundifolia* Lam. nos de origem calcária. A *Quercus coccifera* L. constituiria um climax litoral (aliado à *Phillyrea latifolia* L.) na transição para matagais de *Pistacia lentiscus* L. e *Juniperus phoenicea* L.

² Elemento ibero-macaronésico, considerado na Serra de Sintra como de espontaneidade incerta onde é conhecido como medronheiro bravo.

³ Elemento ao nível da espécie ibero-mauritânico-macaronésico de ocorrência muito localizada.

⁴ Elemento tido como exclusivamente macaronésico, apresenta provavelmente na Serra de Sintra uma estação reliquia no troço superior da Ribeira de Maceira onde é conhecido localmente pela designação de louro-régio.

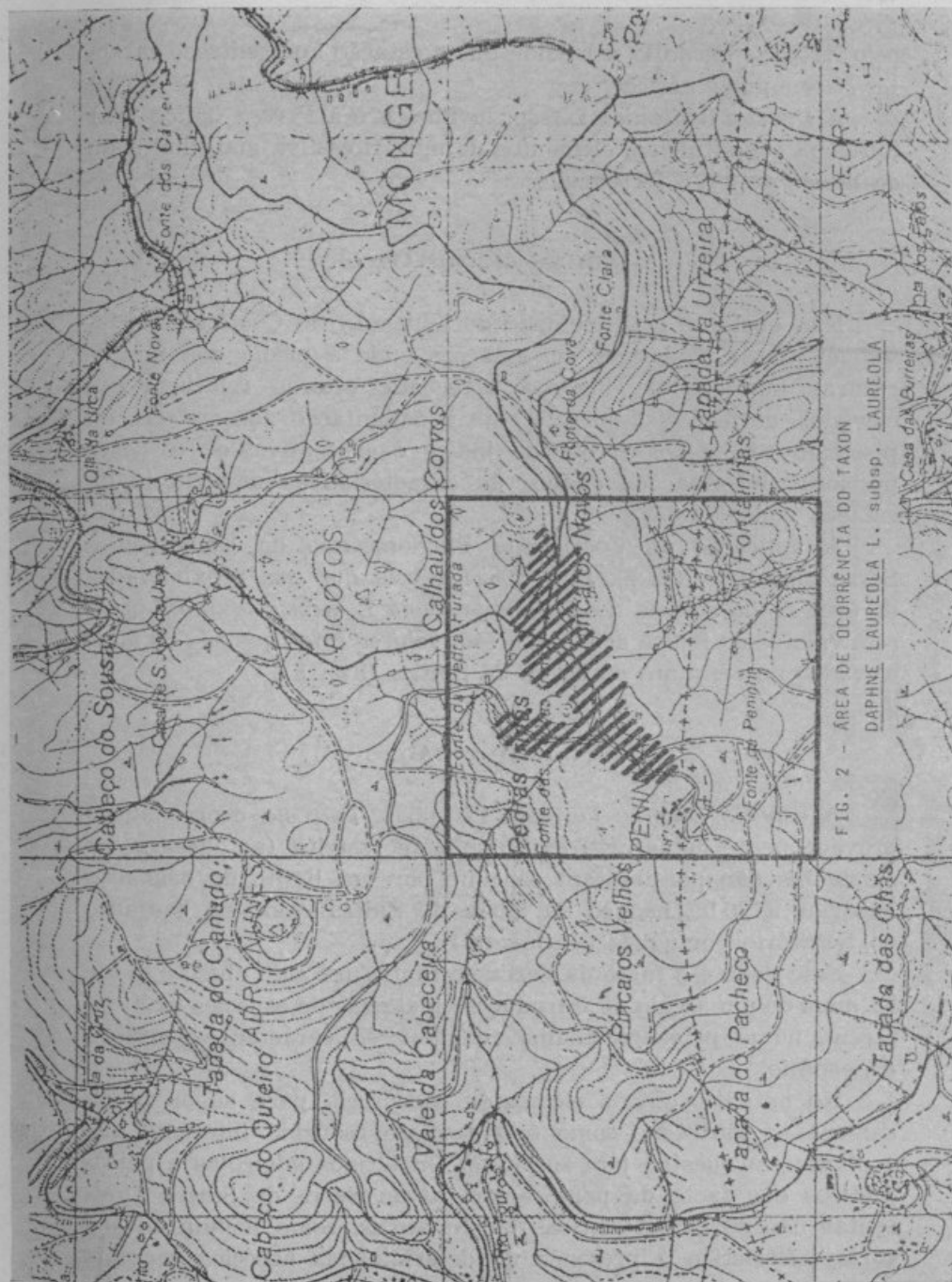


FIG. 2 - ÁREA DE OCORRÊNCIA DO TAXON
DAPHNE LAUREOLA L. subsp. *LAUREOLA*

Casa das Burrelas
 da Pousalga

pelo *Arbutus unedo* L. à medida que a estação apresentasse características mais xéricas.

A *Prunus lusitanica* L. ssp. *lusitanica* e a *Persea indica* (L.) Sprengel constituiriam elementos de uma ripissilva marginal e/ou de linhas de água torrenciais.

6. ÍNDICES BIOCLIMÁTICOS

Não obstante a dificuldade de aplicação do Coeficiente Pluviométrico de Emberger em estações onde a média das temperaturas mínimas de inverno apresenta valores relativamente elevados, em especial no referente à delimitação dos andares ou pisos de vegetação, o referido índice é susceptível de fornecer preciosas informações quanto às características ambientais da estação considerada.

A aplicação do Coeficiente Pluviométrico de Emberger à Serra de Sintra (S. E. A. — 1982) revela que nas proximidades da área de ocorrência de *Daphne laureola* L. subsp. *laureola* ocorrem valores do índice acima dos 440, valores estes que são os mais elevados no conjunto da Serra de Sintra (Fig. 3).

7. NOTA FINAL

A espécie *Daphne laureola* L. subsp. *laureola* ocorre muito provavelmente numa área extremamente restrita (as observações existentes não possibilitam concluir por um limite de ocupação superior a 20 ha não só na Serra de Sintra como no conjunto do território português continental).

Este dado e o facto da Serra de Sintra ter sido objecto desde há mais de um século de introduções massiças de espécies exóticas fazem, numa primeira análise, duvidar do carácter espontâneo da espécie.

No entanto, outros elementos concorrem para supor precisamente o contrário, como é o caso do reduzido interesse que a planta em questão tem suscitado em termos silvícolas e paisagísticos e o facto da parte ocidental da Serra de Sintra apresentar não só características bioclimáticas, como incluir no seu cortejo florístico a presença de determinadas espécies vegetais

que sugerem, no seu conjunto, um elevado paralelismo de ordem ecológica com as ilhas dos Açores⁵.

Os elementos expostos revelam portanto que no conjunto da Serra de Sintra, a zona ocidental, não obstante a acentuada degradação do seu coberto vegetal e a sua infestação por espécies exóticas, apresenta ainda um interesse fora do comum e as poucas áreas onde ainda ocorram elementos vegetais espontâneos ou como tal supostos, devem ser objecto de estudos aprofundados e como medida imediata, *protegidas a todo o custo*.

BIBLIOGRAFIA REFERENCIADA

FRANCO, J. DO AMARAL

1971 Nova Flora de Portugal (Continente e Açores), vol. 1 (Lycopodiaceae — Umbelliferae). Lisboa.

SERVIÇOS DE ESTUDOS DO AMBIENTE

1982 Ordenamento Biofísico dos Concelhos de Cascais e Oeiras. Relatório bioclimático.

TUTIN, T. G.; e outros

1968 Flora europaea. Vol. II (Rosaceae to Umbelliferae). Cambridge.

⁵ Região ainda mais isolada das estações continentais que a Serra de Sintra e onde a *Daphne laureola* L. subsp. *laureola* é tida por espontânea (FRANCO, 1971).

POLYPORACEAE-CELLULASIC AND PHENOLOXIDASIC ACTIVITIES

II — ENZYMATIC ACTIVITIES OF *CORIOLUS VERSICOLOR*
(L. EX FR.) QUÉL. (742)

by

N. TEIXEIRA RODEIA* & A. M. GONÇALVES *

‡ Department of Plant Biology, Faculty of Science and Mycology Center (INIC)
— Lisbon University

Received August 2, 1985.

SUMMARY

A strain (n° 742) of *Coriolus versicolor* was tested for hydrolytic enzymes degrading insoluble (Avicel, Whatman and Cellulose azure — dyed cotton cellulose) or soluble cellulose (carboxymethylcellulose — CMC). The white-rot fungus, *C. versicolor* was able to produce clearing zones in Whatman or Avicel cellulose agar and release the dye from the cotton blue cellulose very slowly (after 15 days of culture). The cellulasic activity was also tested with soluble cellulose by the following methods: 1) measurement of discoloured zones (after staining with Congo red) induced by mycelia or extracellular extracts as a function of time, pH and temperature; 2) loss of viscosity of CMC solution; 3) increase in reducing sugars after 4 hours incubation. The phenoloxidasic activity was tested by adding one of nine phenolic compounds to the malt agar and given by colour intensity diameter of the reaction and by the growth of the mycelia in that media.

INTRODUCTION

PINTO-LOPES (37) and other authors drew attention to the damage of the woody tissues of trees and timber caused by fungi of *Polyporaceae* family. Some work (1, 51) and a catalogue (42) listing the different species of *Polyporaceae* found in Portugal their hosts and geographical distribution, were published.

* Some results were presented in the 15th FEBS Meeting, 1983, Belgium.

The collection of isolates maintained in our laboratory was obtained from fruit-bodies growing on trees and timber later identified by MELO (21-26) and MELO *et al.* (27, 28), according to the DONK system (5). Fifty-seven isolates of the different *Polyporaceae* (causing different types of white-rot or brown-rot, alveolar, cubic or lamellar rot) were previously selected, and tested as to preferred (cellulose or/and lignin) and cellulosic and phenoloxidasic activities.

MATERIAL AND METHODS

Material

Whatman and Avicel standard grade cellulose powder for chromatography and a cotton derivative (cellulose azure-Sigma and also a soluble cellulose-carboxymethylcellulose, BDH) were selected for the cellulosic substrates.

The organism selected was a strain of *C. versicolor* [= *Polyporus versicolor* (L.) Fr. = *Polystictus versicolor* (L.) Fr.], sub-cultured on potato dextrose agar or on malt agar.

Standard carboxymethylcellulase of *Trichoderma viride*-Sigma.

Methods

I — *Culture procedure* — The mycelium was grown at 25° C. In order to inoculate the same quantity of mycelium, discs were cut out from agar medium growing cultures using a 12 mm cork borer. One or two plugs were inoculated on media in Petri dishes, Erlenmeyers flasks or tubes with: 1) insoluble cellulose (1%) (30, 31, 35, 38-40, 46) treated or not by the Walseth method (54); 2) soluble cellulose (1%) in 250 ml Erlenmeyers flasks with 100 ml of the sterile liquid (34). The flasks were inoculated with 10 ml of an inoculum prepared from a macerate of 10 mycelial plugs in 50 ml of sterile water and all were held at 25° C. The fungal cultures were harvested at different dates and the growth on agar media observed periodically; 3) soluble cellulose (0.1%) (10, 34, 41, 50) agar plates were inoculated with the extracellular extracts (besides mycelia), placed in wells previously cut in the agar; nine phenolic compounds were added separately to 2% malt agar (3, 8, 15, 17, 32), Tables I and II.

II — *Assay procedures* — Cellulase production was evaluated, on agar media, by the extent of clearing zones around the inoculum recorded as the diameter in mm, or by the blue colour diffusing to the bottom of the agar medium (31, 35, 38, 46, 50).

Replicated culture flasks were harvested after 8, 15, 22, 30, 40 and 50 days incubation time. The suspensions were centrifuged at 10,000 r.p.m. for 30 min., at 0° C to remove mycelia, substrate and other insoluble constituents, and then stored at 4° C after the addition of 0.02% of sodium azide and the mycelia was stored frozen.

III — *Cellulase assay procedures* — The influence of pH, temperature and age on activity of the supernatant were evaluated (within the pH range 3.5-7.5; 37, 40, 50 and 55° C; 8, 15, 22, 30, 40 and 45 days old). The assay systems employed were as follows:

1) *Increase in reducing sugar values* — The CMC solution was prepared by adding 1 g of air dried CMC to 100 ml of phosphate citrate buffer at the indicated pH values. A magnetic blender was used to dissolve the CMC.

2 ml of supernatant were added to 10 ml CMC solution and then incubated at different temperatures for 4 hours. Controls were set up using 10 ml CMC + 2 ml water, and 10 ml phosphate citrate buffer + 2 ml supernatant, the later to determine the amount of reducing substances already present in the centrifuged and the former to serve as a blank for setting the spectrophometer. The amount of reducing sugars present in 1 ml of the mixture was determined using the standard Somogy-Nelson method (29, 47-48) by measuring at 525 nm in a SP₅₀₀ spectrophometer. Cellulolytic activity (Cx) was expressed in O. D. of glucose equivalents per culture, using a glucose standard curve (Fig. 1).

2) *Loss of viscosity of carboxymethylcellulose solution* — The viscosity of CMC solution was determined with 26 ml of the solution in an Ostwald viscosimeter at a pH and temperature selected previously. This solution of CMC was used, also, to measure reducing sugars.

The supernatants were assayed adding 6 ml of an extracellular extract and 30 ml of 1% CMC in buffer, and noting the time

of flow compared with a standard CMC_{ase} of *Trichoderma viride* and determining the time in minutes to reach the reading of 50% loss of viscosity (t_{50}) (9).

Cellulolytic activity (CMC_{ase}) was expressed in terms of relative activity (RA — Table II) calculated by the formula $-1/t_{50} \times 100$.

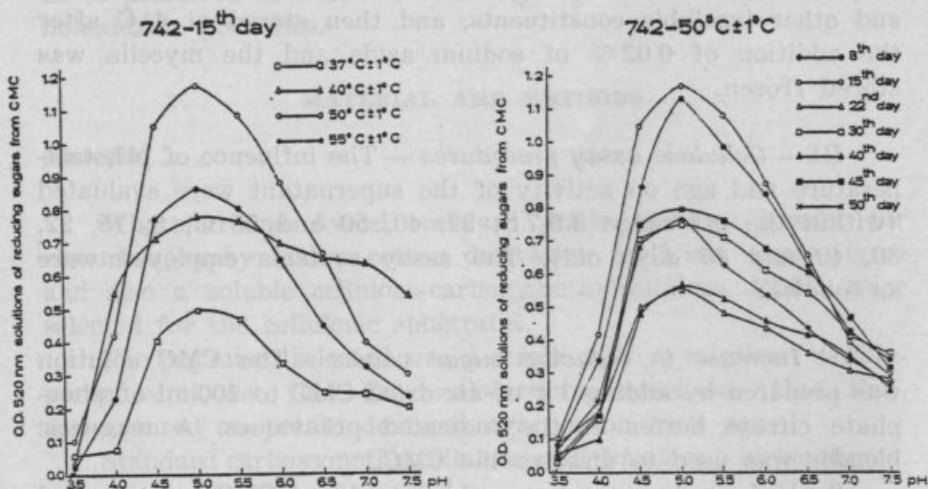


Fig. 1. — Cellulasic activity of extracellular extracts of *C. versicolor* by conversion of CMC in reducing sugars.

Measurements were run for one hour, at least; the cellulolytic activity was thus determined at pH 5.0 and 50° C (Fig. 2). The results are expressed as the percentage decrease in viscosity mainly according to the formula $P = \frac{t_0 - t_{60}}{t_0 - t_w} \times 100$, where P is the percentage decrease in viscosity, t_0 the initial flow time, t_{60} the flow time after 60 min, and t_w the flow time of water (10.2 sec.) (34) (cf. Table II and Fig. 2).

3) *Cleared zones on CMC agar plates* — The CMC_{ase} activity of extracellular extracts (or mycelia) obtained after centrifugation, was also tested (50) in 2% agar, 0.1% CMC (34) medium. For testing CMC_{ase} activity and to know the concentration of the different aged extracellular extracts, 0.1 ml aliquots of the extracts (or of CMC_{ase} of *Trichoderma viride* — solution — 10 mg/ml —

were used as standard sample) were placed in wells cut in agar plates containing the substrate. After inoculation, they were maintained in the refrigerator for 30 min. followed by incubation at 40° or 50° C for 24 hours and then, stained with Congo red (50).

IV) *Protein assay* — Protein concentration in the supernatant was estimated by adding 1 ml of extracellular extract and 0.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent (20) and the protein content was expressed in μg of protein equivalents per 1 ml of culture, using a bovine serum albumin as standard.

V) *Phenoloxidasic activity assay* — This was tested on malt agar medium containing one of the following phenolic compounds: catechol, gallic acid, guaiacol, hydroquinone, naphthol, phloroglucinol, resorcinol, tannic acid and tyrosine (3, 8, 15, 17, 32).

The micelium's growth (inoculum = discs with 12 mm of diameter) and the presence and extent of the coloured zone under or around it, was recorded after 1-30 days incubation.

RESULTS

1) Enzymic hydrolysis of cellulose

TABLE I

Effect of white-rot fungi, *C. versicolor* — 742, on insoluble cellulose (a), (b)

Avicel pH		Whatman pH		Cotton blue cellulose (Cellulose azure)	
5.4	6.8	5.1	6.6		Change of medium colour
Depth of clearing (mm)				R	
—	—	18-32	14-20	±	Reddish

(a) All values are average of six replicates after 5-30 days' growth.

(b) Degradation of insoluble cellulose 1% (Avicel, Whatman or cellulose azure 1%). The activities usually measured by formation of clearing zones (mm) in cellulose agar or by release of the blue dye (R); ± Slow reaction after 15 days incubation.

Table I shows that *C. versicolor* degrades cellulose powder and releases the dye from cotton blue cellulose. Cellulolytic activity is stronger from an extracellular extract from a 15 days old culture in liquid medium, using CMC the maximum activity being at pH 5.0 and at 50° C (see Table II and Fig. 1).

TABLE II

Effect of white-rot fungi, *C. versicolor* — 742, on soluble cellulose — carboxymethylcellulose

Mycelia (a)			Extracellular extracts (b) 15 days old culture				
Reaction	ϕ of Reaction (mm)	ϕ of Growth (mm)	Reducing sugars (μg/ml)	Proteins (μg/ml)	Decrease of viscosity (%) P	Relative Activity (RA) (c)	CMC _{ase} (μg/ml)
+++	40	30	294,00	231,00	81,20	100,00	850 (15 days old)

(a) All values are averages of six replicates after 5-30 days growth.

(b) The CMC_{ase} activity was measured by formation of yellow zones (after staining by Congo red) around the wells cut on the CMC agar.

(c) $RA = 1/t_{50} \times 100$ (9).

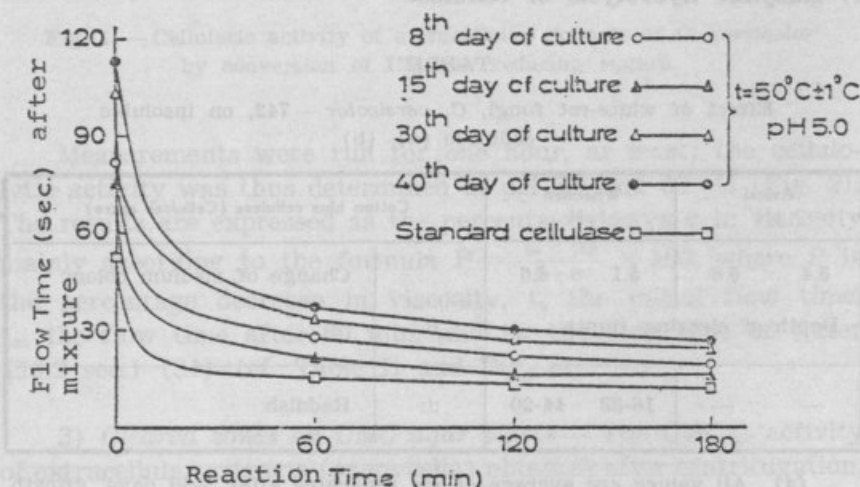


Fig. 2. — Cellulasic activity of extracellular extracts of *C. versicolor* on CMC by loss viscosity. Ord.: The flow time of mixture CMC different extracellular extracts. Absc.: Elapsed time reaction of mixture in the viscosimeter.

TABLE III
Effect of white-rot fungi, *C. versicolor* — 742, on various phenols
(a), (b), (c)

Species	Strain	Catechol			Gallic Acid			Guaiscol			Hydroquinone			Naphitol		
		R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G
<i>Coriolus versicolor</i> (L. ex Fr.) Quel.	742	++++	30	NG	++++	25	20	++++	40	40	+	40	55	+++	39	NG
		Phloroglucinol			Resorcinol			Tannic acid			Tyrosine			Malt		
		R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G	D	R'	G
		+	60	71	+	80	80	+++	53	50	+	30	45	white	white	32

(a) All values are averages of six replicates after 5 days' growth.
 (b) Catechol (1×10^{-3} M); Gallic Acid — 0.5%; Guaiacol (1×10^{-3} M); Hydroquinone (1×10^{-3} M); Naphtol — 0.05%; Phloroglucinol — 0.5%; Resorcinol (1×10^{-3} M); Tannic acid — 0.5%; Tyrosine — 0.5%; Malt — 2%.
 (c) System for recording coloration: —, Negative, no colour discoloration of the agar under or around the mat. +, Diffusion zone light to dark colour, formed under inoculum at center of mat; visible only from under side of dish. In case no growth takes place, a faint discoloration under the inoculum. ++, Diffusion zone light to dark colour, formed under most of mat but not extending to margin. Visible from under side only. +++, Diffusion zone light to dark colour, extending a short distance beyond the margin of the mat and visible from above. +++++, Diffusion zone dark colour, opaque, extending considerably beyond margin of fungus mat. ++++++, Diffusion zone very intense, dark colour, opaque, forming a wide corona around mat.
 R = Reaction; ØR = Diameter (mm) of reaction; G = Mycelian Growth; NG = Non Growth; D = Direct; R' = Reverse.

The CMC_{ase} activity of the mycelium or of the extracellular extracts on solid medium was evaluated by appearance of yellow or lilac zones around the inocula. That activity was quantified using a direct relation between log enzyme concentration and the diameter of the cleared zones around the wells. Thus the coloured zones were measured in mm and the contents of CMC_{ase} of the extracts plotted against a carboxymethylcellulase standard curve (Table II).

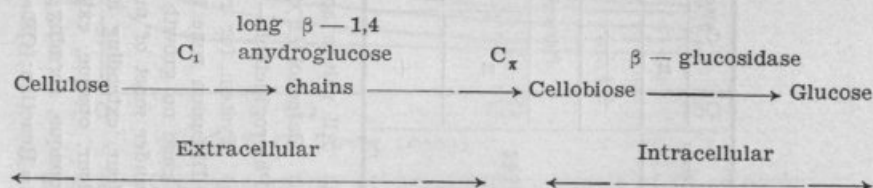
The loss of viscosity recorded in an Ostwald viscosimeter in the previously selected conditions, is shown in Fig. 2.

2) Enzymic reactions of phenolic compounds in malt agar

Table III shows, in reference to phenoloxidasic activity, *C. versicolor* growing well on malt agar with phenolic compounds. The extent of the coloured zones vary with time after inoculation and concentration of the different substrates, and essentially on the extracellular fungic phenoloxidases promoting oxidation of phenolic compounds to quinones.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

It is generally accepted that cellulose is more readily degraded by microorganisms after it has been modified either chemically or physically. Often organisms which are unable to attack native cellulose, e. g., in wood cell wall, are found to have cellulolytic activities with substituted or modified cellulose, e. g., in relatively accessible substrates (9). However, in *C. versicolor*, cellulose appears to induce in abundance all the necessary enzymes for breaking down the carbohydrate cell wall components of both hardwoods and softwoods (13). SIU and REESE (45) have suggested that cellulose would be degraded according to:



In our assays the content of CMC_{ase} activity (C_x) depends on the age of cultures.

Probably, under normal conditions accumulation of sugars results in a feedback inhibition of cellulase enzyme, which are more readily used instead cellulose. Sugar depletion would switch off the feedback mechanism; extracellular enzyme can be secreted by the fungus accompanied by an increase of reducing sugars again (7).

Thus, in Figure 1 the change in Optical Density of solutions of reducing sugars at different pH values temperature and culture age could be attributed to the utilization of cellulose breakdown products, since as these substances accumulate, inhibition of cellulase occurs (9).

PETTERSSON *et al.* (35) found that high M. W. β — glucosidase from *P. versicolor* was separable from other cellulolytic components by gel filtration. PETTERSSON & PORATH (36) have isolated four cellulolytic components from culture filtrates of *P. versicolor* and determined the respective molecular weights. The occurrence of multiple enzymes of varying cellulolytic activity provides synergistic effects (19, 35, 49, 56) for crystalline cellulose, but not for CMC.

We agree with SMITH (46) that it is very difficult to visualize the clearing zones on agar with powdered cellulose, although COWLING (4) states that: «*P. versicolor* degraded the crystalline and amorphous cellulose simultaneously». However, the use of Congo red as indicator for β -D-glucan degradation in an agar medium provided the basis for a rapid and sensitive screening test for cellulolytic fungi (50).

Thus, there will be a strong correlation between the ability of fungi isolates to degrade soluble β (1-4) D-glucans and their ability to degrade cellulose. Some extracts gave yellow clearing zones on CMC which became lilac after a short time (the standard sample had the same shade). This was not mentioned by HANKIN & ANAGOSTAKIS (10), WOOD (57), VANDAMME *et al.* (53) or TEATHER & WOOD (50) nor did other authors refer to the alteration of the blue colour of the dyed cotton cellulose occurring with some of our strains. These colour changes are probably consequence of the simultaneous presence of cellulases and oxidases in the extracellular extracts.

Our data showing variation of activity (Cx) with age suggests, in agreement with GREAVES (9), that more of the



component Cx is bound to the white-rot fungi, because some CMCase remains attached to the mycelium in *P. versicolor*.

HIGHLEY (12, 13) found that *C. versicolor* readily degraded insoluble cellulose and that cellulose and carboxymethylcellulose were the best inducers of glycosidase and CMCase activities, respectively.

The term phenoloxidase is used to refer to any enzymes catalyzing oxidation of phenols with subsequent colour formation (17). We detected reactions between extracellular enzymes and all the phenolic compounds tested, indicating that our strain synthesizes different phenoloxidases since the colours obtained and the phenolic compounds used belong to different chemical groups. NORKRANS (33) states that «the white-rotting group is a more heterogenous collection of organisms having in common a capacity for decomposing lignin, and for producing enzymes oxidizing phenolic compounds-probably related to lignin-a fact which has been utilized in diagnostic colour tests for identifying white-rotting fungi ever since it was first described by BAVENDAMM (3)». Other authors (11, 14, 52) have shown that phenoloxidases cause demethylation of lignin and lignin phenols. KIRK & CHANG (16) in previous studies, in which polymeric lignins heavily degraded by *C. versicolor*, indicate that the degradative reactions are largely oxidative, and that cleavages of ether linkages and aromatic nuclei occur in the polymeric lignin. This led to speculation that extracellular oxygenases play a central role. An extracellular enzyme was reported from *P. versicolor* catalyzing the oxidation of cellobiose and simultaneously the reduction of quinones. As the enzyme utilizes a carbohydrate derived from cellulose and an oxidized phenol derivable from lignin, the suggestion was made that this enzyme may play an important role both in lignin and in cellulose breakdown. The enzyme has been called cellobiose-quinone-oxireductase, or cellobiose dehydrogenase (55). ANDER & ERIKSSON (2) showed that phenoloxidases may function in regulating the production of both lignin and polysaccharide degrading enzymes by oxidation of lignin and lignin-related phenols when the fungus is growing on the wood. It was reported (18) that *C. versicolor* requires a growth substrate with glucose or cellulose in order to metabolize lignin to CO₂ and several culture parameters with pronounced

effect on the ligninolytic activity of white-rot fungi, applicable to white-rot fungi in general.

RYAN *et al.* (43) in assays with polyphenoloxidases detected that catechol was rapidly oxidized whereas several other phenolic substrates were either oxidized at much lower rates (guaiacol, gallic acid and others) or remained unoxidized (phloroglucinol).

In the peroxidase assays all the substrates, except catechol, were oxidized more rapidly than in the polyphenoloxidase assays but the guaiacol oxidation rates were higher and the phloroglucinol which had not been oxidized in the polyphenoloxidase test, was oxidized slowly in the peroxidase assay. Two laccases were isolated from *C. versicolor* (44) dependent on culture medium, the amount of these enzymes increases with age of culture. Secretion of enzymes synthesized especially for extracellular action and therefore present in the mycelium remains almost constant. FAHRAEUS & LJUNGGREEN (6) showed the pH (4-5) dependence of the laccase reaction in *Polyporus versicolor*.

The results obtained, *in vitro*, with mycelia of *C. versicolor* may be summarized as follows:

- 1 — The strain exhibits growth on agar or in liquid media with insoluble cellulose or carboxymethylcellulose as the sole source of carbon.
- 2 — It degrades the above mentioned substrates.
- 3 — It synthesized phenoloxidases oxidizing phenolic compounds.

Therefore the strain studied synthesizes C_1 and C_x cellulases and some phenoloxidases (e. g. laccases and others) which are able to oxidize aromatic ring phenolic compounds found in the polymeric lignin.

C. versicolor like other white-rotting fungi collected from host trees or timber, must use, cellulose and lignin, and this led us to presume that it would be able to degrade lignin *in vitro*, even though in the presence of another carbohydrates such as cellulose, cellobiose or glucose.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Prof. Doctor Eng.^o ARTUR GARCIA for valuable suggestions on the English version of our manuscript.

We also wish mention the dedicated co-operation of technicians ALDA CORREIA, MANUEL CORREIA and JOSÉ CARDOSO, from their constant interest in the Scientific results of the team.

REFERENCES

1. ALMEIDA, M. G.; C. C. RODRIGUES & N. J. TEIXEIRA (1964) — Novos registos de colheitas de *Polyporaceae* em Portugal. *Bolm Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais* (2.^a Sér.), **10**: 149-164.
2. ANDER, P. & K. E. ERIKSSON (1976) — The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* **109**: 1-8.
3. BAVENDAMM, W. (1928). — Über das vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstorenden Pilzen. I. Mitteilung. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz.* **38**: 257-276.
4. COWLING, E. B. (1961) — Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. *U. S. Dep. Agri. Tech. Bull.* **1258**: 79 p.
5. DONK, M. A. (1974) — *Check list of European polypores*. Verh, Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch., Afd. Natuurkde., Tweede Reeks, D. 62.
6. FAHRAEUS, G. & H. LJUNGGREEN (1961) — Substrate specificity of a purified fungal laccase. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.) **46**: 22-32.
7. GASCOIGNE, J. A. & M. M. GASCOIGNE (1960) — *Biological degradation of cellulose*. 264 pp. Butterworths Scientific Publications, London.
8. GILBERTSON, R. L.; F. F. LOMBARD & E. R. CANFIELD (1975) — Gum guaiac in field tests for extracellular phenoloxidases of wood-rotting fungi. *For. Prod. Lab. For. Serv., USDA* (23 pags.).
9. GREAVES, H. (1971) — The effect of substrate availability on cellulytic enzyme production by selected wood-rotting microorganisms. *Aust. J. biol. Sci.* **24**: 1169-1180.
10. HANKIN, L. & S. L. ANAGNOSTAKIS (1977) — Solid medium containing carboxymethylcellulose to detect C_x cellulase activity of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 109-115.
11. HARKIN, J. M. & J. R. OBST (1974) — Demethylation of 2, 4, 6-trimethoxyphenol by phenol oxidase. A model for chromophore formation in wood and pulp. *Tappi* **57**: 118-121.
12. HIGHLEY, T. L. (1975) — Inhibition of cellulases of woody-decay fungi. *USDA Forest Service Research paper*, **247**: 1-8.
13. HIGHLEY, T. L. (1976) — Hemicellulases of white and brown-rot fungi in relation to host preferences. *Forest Products Laboratory. Material and Organismen* **11**: 33-46.

14. ISHIIHARA, I. & M. MIYAZAKI (1974) — Demethylation of lignin and lignin models by fungal laccase. *J. Jap. Wood Res. Soc.* **20**: 39-41.
15. KÄARIK, A. (1965) — The identification of the mycelia of wood-decaying fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Stud. for. Suec.* n° **31**.
16. KIRK, T. K. & H. M. CHANG (1975) — Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforschung*, **29**: 56-64.
17. KIRK, T. K. & A. KELMAN (1965) — Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying *Basidiomycetes*. *Phytopathology* **55**: 739-745.
18. KIRK, T. K.; E. SCHULTZ; W. J. CONNORS, L. F. LORENZ & J. G. ZEIKUS (1978) — Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **117**: 277-285.
19. LAMOT, E. & E. J. VANDAMME (1982) — Improved cellulolytic activity at *Actinomycetes* in Axenic mixed fermentation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **32**: 735-743.
20. LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH; A. L. FARR & R. J. RANDALL (1951) — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**: 265-275.
21. MELO, I. (1978a) — Acerca das *Polyporaceae* de Portugal. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.), **52**: 257-275.
22. MELO, I. (1978b) — *Buglossoporus pulvinus* (Pers. ex Pers.) Donk e *Polyporus mori* Poll. ex Fr., duas espécies de *Polyporaceae* novas para Portugal. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.), **52**: 277-283.
23. MELO, I. (1980) — Sete espécies de *Polyporaceae* novas para Portugal. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.), **53**: 647-662.
24. MELO, I. (1981a) — Fungi decaying mining timber. A preliminary survey at the Panasqueira mines. *Port. Acta Biol.* (Sér. B), **13**: 5-12.
25. MELO, I. (1981b) — *Incrustoporic percandida* (Malenc. & Bert.) Donk e *Spongipellis spumeus* (Sow. ex Fr.) Pat., novas colheitas de fungos em Portugal. *Port. Acta Biol.* (Sér. B), **13**: 119-125.
26. MELO, I. (1983) — O género *Phellinus* Quél. em Portugal. *Rev. Biologia* **12**: 77-108.
27. MELO, I.; M. CORREIA & J. CARDOSO (1980) — Acerca das *Polyporaceae* de Portugal. II. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.), **53**: 675-723.
28. MELO, I.; M. CORREIA & J. CARDOSO (1983) — Acerca das *Polyporaceae* de Portugal. III. *Rev. Biologia*, **12**: 109-120.
29. NELSON, N. (1944) — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem.* **153**: 375-380.
30. NILSSON, T. (1973) — Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Stud. for Suec.* n° **104**.
31. NILSSON, T. (1974) — Comparative study on the cellulolytic activity of white-rot and brown-rot fungi. *Material und Organismen* **9** (3): 173-198.
32. NOBLES, M. K. (1958) — A rapide test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhabiting *Hymenomycetes*. *Can. J. Bot.* **36**: 91-99.

33. NORKRANS, B. (1967) — Cellulose and cellulolysis. *Adv. in Applied Microbiology* 9: 91-129.
34. NORKRANS, B. & A. HAMMARSTRÖM (1963) — Studies of *Rhizina undulata* Fr. and its production of cellulose- and Pectin decomposing enzymes. *Physiologia plantarum* 16: 1-10.
35. PETTERSON, G. E.; B. COWLING & J. PORATH (1963) — Studies on cellulolytic enzymes. I. Isolation of a low-molecular-weight cellulase from *Polyporus versicolor*. *Biochem. biophys. Acta*, 67: 1-8.
36. PETTERSON, G. & J. PORATH (1963) — Studies on cellulolytic enzymes. II. Multiplicity of the cellulolytic enzymes of *Polyporus versicolor*. *Biochim. biophys. Acta* 67: 9-15.
37. PINTO-LOPES, J. (1950) — Poliporoses e fungos da decomposição da madeira em Portugal. *Rev. Fac. Ciências de Lisboa* (2.^a Sér.-C), 1: 4-25.
38. RAUTELA, G. S. & E. B. COWLING (1966) — Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiology*, 14 (6): 892-898.
39. RODEIA, N. T. (1983) — *Polyporaceae* — Actividade celulásica. *Rev. Biologia* 12 (3/4): 435-448.
40. RODEIA, N. T.; A. M. GONÇALVES; M. T. MARTINS; J. RODRIGUES & L. B. SIMÕES (1983a) — *Polyporaceae* — cellulolytic and polyphenoloxidasic activities. 15th FEBS Meeting, July, Brussels, Belgium (Abstract).
41. RODEIA, N. T.; A. M. GONÇALVES; M. T. MARTINS; J. RODRIGUES & L. B. SIMÕES (1983b) — Cellulolytic and polyphenoloxidasic activities of *Inonotus hispidus* (Bull. ex Fr.) Karst., *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Fr. and *Lenzites betulina* (Fr.) Fr. II Congresso Luso-Espanhol de Bioquímica, Setembro, Barcelona, Espanha (Abstract).
42. RODRIGUES, C. C. (1969) — Nova contribuição para o estudo das *Polyporaceae* de Portugal. *Bol. Soc. Portuguesa de Ciências Naturais* (2.^a Sér.), 12: 155-185.
43. RYAN, J. D.; P. GREGORY & W. M. TINGEY (1982) — Phenolic oxidase activities in glandular trichomes of *Solanum berthaultii*. *Phytochemistry*, 21: 1885-1887.
44. SCHANEL, L.; R. BLAICH & K. ESSER (1971) — Function of enzymes in wood decaying fungi. I. Comparative studies of intracellular and extracellular enzymes in *Trametes versicolor* and *Trametes hirsuta*. *Arch. Mikrobiol.* 77: 140-150.
45. SIU, R. G. H. & E. T. REESE (1953) — Decomposition of cellulose by microorganisms. *Botanical Review* 19: 377-416.
46. SMITH, R. E. (1977) — Rapid tube test for detecting fungal cellulase production. *Appl. Environ. Microbiology*, 33 (4): 980-981.
47. SOMOGYI, M. (1937) — A reagent for the Cooper Iodometric determination of very small amounts of sugar. *J. biol. Chem.*, 117: 771-776.
48. SOMOGYI, M. (1952) — Notes on sugar determination. *J. biol. Chem.*, 195: 19-23.
49. STEWART, J. C. & J. B. PARRY (1981) — Factors Influencing the Production of Cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). *J. Gen. Microbiol.* 125: 33-39.

50. TEATHER, R. M. & P. J. WOOD (1982) — Use of Congo Red-Polysaccharide interactions in Enumeration and characterization of cellulolytic Bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiology*, **43** (4): 777-780.
51. TEIXEIRA, N. J. (1964) — Contribuição para o estudo dos Hymenomyces de Portugal. *Bol. Soc. Portuguesa de Ciências Naturais* (2.ª Sér.), **10**: 133-148.
52. TROJANOWSKI, J. & A. LEONOWICZ (1969) — The biodeterioration of lignin by fungi. *Microbios* **3**: 247-251.
53. VANDAMME, E. J.; J.-M. LOGGHE & H. A. M. GEERAERTS (1982) — Cellulase activity of a thermophilic *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) strain. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **32**: 968-974.
54. WALSETH, C. S. (1952) — Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms. *Tappi*, **35**: 228-233.
55. WESTERMARK, U. & K. E. ERIKSSON (1974) — Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta chem. scand.* (B) **28**: 209-214.
56. WOOD, T. M. (1975) — In: *Cellulose as a Chemical and Energy Source*. Wilke, C. R. (Ed.) Wiley, New York: p. 111.
57. WOOD, P. J. (1980) — The interaction of direct dyes with water soluble substituted celluloses and cereal β -glucans. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **19**: 19-23.

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work done during the year. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments. The report concludes with a summary of the work done and a statement of the resources available for the coming year.

The work done during the year has been very satisfactory and has resulted in a number of important discoveries. The most important of these are the discovery of the new element, the discovery of the new compound, and the discovery of the new process.

The resources available for the coming year are estimated to be sufficient to carry out the work planned for the year. It is hoped that the work done during the year will result in a number of important discoveries.

COMENTARIOS TAXONÓMICOS Y COROLÓGICOS SOBRE ALGUNOS TÁXONES DEL NOROESTE IBÉRICO

por

C. BENEDÍ & J. MOLERO

Departament de Botànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

Recibido el 4 de Agosto de 1985.

SUMMARY

Some taxa collected in the provinces of León and Zamora which show corological or taxonomic interest, are commented. As a regard to nomenclature the following new combinations are proposed: *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *pyrenaicum* (L.) Lainz fma. *glabrum* (Duvigneaud) C. Benedí & J. Molero, *Verbascum simplex* Hoffmanns. & Link var. *compositum* (Mariz) C. Benedí & J. Molero and *Vicia sativa* L. subsp. *terana* (Losa) C. Benedí & J. Molero; *Cota aligulatae* Losa and *Vicia terana* Losa are lectotypified.

RESUMEN

Se comentan algunos táxones herborizados en las provincias de León y Zamora, que presentan interés desde el punto de vista corológico y taxonómico. En lo nomenclatural se proponen tres nuevas combinaciones: *Seseli libanotis* (L.) Koch subsp. *pyrenaicum* Lainz fma. *glabrum* (Duvigneaud) C. Benedí & J. Molero, *Verbascum simplex* Hoffmanns. & Link var. *compositum* (Mariz) C. Benedí & J. Molero y *Vicia sativa* L. subsp. *terana* (Losa) C. Benedí & J. Molero; se lectotifican *Cota aligulatae* Losa y *Vicia terana* Losa.

Adenocarpus complicatus (L.) Gay subsp. *aureus* (Cav.) Vicioso
Anal. Inst. Bot. Cavanilles 6 (2): 43 (1946).

ZAMORA: Rivadelago, 29TPG86, base del Barranco del Fornillo, 18-VII-1984, C. Benedí & J. Molero, BCF 31854. Nuestra indicación viene a confirmar la de LOSA (1949: 94), concretando la subespecie.

Anthemis triumfetti (L.) All. fma. *flosculosa* (Briq. & Cavill.)
R. Fernandes in Anu. Soc. Brot. **37**: 62 (1972).

- ≡ *Anthemis tinctoria* L. subsp. *triumfetti* (L.) Briq. & Cavill.
fma. *flosculosa* Briq. & Cavill. in Burnat, Fl. Alpes Marit.
6: 162 (1916).
- ≡ *Cota aligulatae* Losa, Contr. Fl. Veg. Prov. Zamora: 127
(1949). *Lectotypus* BC 114326: «Cota aligulatae M. T.
Losa/Rivadelago (Zamora) Barranco del Fornillo/1400-
-1500 m, 20-6-48/M. Losa & P. M. Montserrat». *Isotypi* in
BCF: 5474, 5475, 31004; *Syntypus* in MA 127279.
- ≡ *A. triumfetti* (L.) DC. fma. *aligulata* (Losa) Talavera
in B. Valdés & al., Herb. Univ. Hisp. Fl. Selec. Cent. I:
30 (1982).
- ≡ *A. triumfetti* (L.) DC. var. *aligulata* (Losa) J. Sánchez
in B. Casaseca & al., Fl. Esp. 3ª Cent.: 36 (1982).

De seguir el criterio actual predominante en el género *Anthemis* L., de conferir rango de forma a los taxones aligulados de una misma especie, el nombre correcto para la *Cota aligulatae* Losa sería el que emplea R. FERNANDES (l. c.: 62), para denominar por primera vez en Portugal lo que, tradicionalmente, se había citado de forma errónea como *A. montana* L. var. *discoidea* J. Gay [= *A. alpestris* (Hoffmanns. & Link) R. Fernandes].

Centaureum suffruticosum (Griseb.) Ronniger in Naturwiss. Verein
Steiermark **52**: 321 (1916).

ZAMORA: Rivadelago, 29TPG86, base del Barranco del Fornillo,
18-VII-1984, C. Benedí & J. Molero, BCF 31857. No tenemos
constancia de cita anterior a la nuestra en la provincia.

Ortegia hispanica L., Sp. Pl.: 560 (1753).

ZAMORA: Villarino de Manzanas, hacia Mahide, 29TQG04, en
barbechos, C. Benedí & J. Molero, BCF 31855. Citada con pro-
fusión de Galicia y regiones portuguesas limítrofes, no nos constan
indicaciones zamoranas.

Scabiosa columbaria L. subsp. *gramuntia* (L.) Burnat, Fl. Alpes Marit. 5: 243 (1915).

LEÓN: Ponferrada, Montes Aquilianos, hacia Peñalba de Santiago, 29TQG09, en pastos calcícolas, 1200 m, 29-IX-1984, J. Molero, J. M^a Montserrat & A. Romo, BCF 31866. De ser ajustada la corología que expone DEVESA (1984: 163), nuestra indicación viene a ser la primera para el noroeste peninsular.

Seseli libanotis (L.) Koch subsp. *pyrenaicum* (L.) Lainz fma. *glabrum* (Duvigneaud) C. Benedí & J. Molero, comb. nova.

≡ *Libanotis pyrenaica* (L.) Bourg. ex Nyman subsp. *pyrenaica* fma. *glabra* Duvigneaud in Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique 98 (2): 226 (1965).

= *Libanotis montana* var. *leiocarpa* Heuffel, Enum. pl. Banat.: 79 (1858), p. p. ≡ *Seseli libanotis* subsp. *leiocarpum* (Heuffel) Rouy & Camus, Fl. France 7: 276 (1901), p. p.

LEÓN: Coriscao, VII-1952, T. M. Losa & P. Montserrat, BCF 31988; Peña Redonda, 26-VII-1950, T. M. Losa & P. Montserrat, BCF 31989; Riaño, sin fecha, T. M. Losa, BCF 31990; pr. Ponferrada, San Pedro de Montes, 29TPH90, en enclaves rocosos del encinar de umbría, 29-IX-1984, J. Molero, J. M^a Montserrat & A. Romo, BCF 31922.

Tanto los materiales de LOSA, que vienen a refrendar sus antiguas citas (LOSA, 1957: 330), como los nuestros, presentan los frutos glabros en la madurez. Las formas con aquenios glabros del *S. libanotis*, fueron descritos inicialmente como *Libanotis montana* var. *leiocarpa*. DUVIGNEAUD (*l. c.*) tras un documentado estudio, concluye que el carácter de la glabrescencia en los aquenios debe considerarse secundario frente a los que parecen más estables del grado de división de las hojas y forma de los segmentos de último orden. Según este autor, formas con frutos glabros aparecen conviniendo junto a las formas, más comunes, de frutos pubescentes, en el área de distribución de todo el complejo *S. libanotis* (subsp. *libanotis*, subsp. *pyrenaicum* y subsp. *sibiricum*), a veces incluso intrapoblacionalmente. De ahí la complejidad nomenclatural que ha producido el considerar este carácter como priori-

tario. Las poblaciones leonesas que hemos estudiado, parecen responder con homogeneidad a este carácter de la glabrescencia de los aquenios, por lo que creemos merecen algún valor taxonómico.

En el aspecto corológico, nuestra cita representa uno de los límites occidentales del área de distribución del taxon, si se exceptúa la referencia bibliográfica para los Montes de Courel (Lugo), que se debe al P. MERINO (1905: 591).

Verbascum simplex Hoffmanns. & Link, Fl. Port. 1: 216 (1800) — non sensu Murbeck in Acta Univ. Lund. 29 (2): 113 (1933) — var. **compositum** (Mariz) C. Benedí & J. Molero, comb. nova.

≡ *V. linckianum* Mariz var. *compositum* Mariz, Bol. Soc. Brot. 23: 34 (1907).

— *V. henriquesii* Lange ex Henriques in Bol. Soc. Geogr. Lisboa, sec. bot.: 80 (1883), p. p.

ZAMORA: Villarino de Manzanas, hacia Mahide, 29TTG04, en un barbecho, 18-VII-1984, C. Benedí & J. Molero, BCF 31856. Al parecer, novedad provincial.

FERGUSON (1972: 211) incluye la especie que comentamos dentro de la variabilidad de *V. thapsus* L. utilizando un criterio, a nuestro parecer, excesivamente amplio. Este aspecto ya fue denunciado por LAÍNZ (1974: 14) que, al citar como novedad gallega *V. thapsus* puntualiza: «exclúyase del concepto específico *V. simplex*, naturalmente».

El monógrafo MURBECK (1933: 113) mantiene la especie propuesta por HOFFMANNSEGG & LINK, si bien amplia su ámbito específico al incluir en él *V. giganteum* Willk., tal vez inducido por el hecho de que algunos materiales que estudió, atribuibles a este último taxon, procedentes de las Sierras de Cazorla y Mágina, presentan el estigma poco capitado, así como la inflorescencia ocasionalmente ramificada; el abundante tomento blanquecino que presentan estos ejemplares, sin embargo, aproximan estas formas al *V. thapsus*. NYMAN (1811: 257) ya supeditó como subespecie el *V. giganteum* al *V. thapsus*, tratamiento que es el aceptado por FERGUSON (l. c.) en Flora Europaea.

En cuanto a *V. henriquesii*, la autoría correcta del binomen es la empleada más arriba. La descripción de la especie de Lange (*in litt.* a Julio Henriques, octubre 1882) fue publicada válidamente por JULIO HENRIQUES un año después (cf. A. FERNANDES, *Anu. Soc. Brot.* 45: 92-93. 1979).

MARIZ (l. c.: 32) en un detallado estudio de los *Verbascum* portugueses, concluye acertadamente que *V. henriquesii* y *V. simplex* son en realidad la misma entidad específica, para la cual,

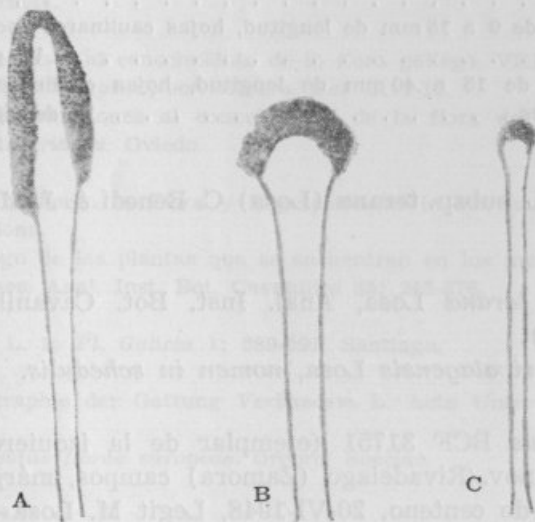


Fig. 1. — Estigmas de (A) *Verbascum phlomoides*,
(B) *V. thapsus*, (C) *V. simplex*.

sin embargo (y según el autor para obviar graves inconvenientes nomenclaturales), propone el nombre nuevo de *V. linkianum*. Evidentemente el protólogo y el estudio de la fotografía del material tipo de la nueva creación de MARIZ, corroboran su sinonimización con *V. simplex*, coincidiendo así con lo apuntado por MURBECK (l. c.: 114) y en contra de la opinión de FERGUSON (l. c.: 368), que sinonimiza, un tanto incomprensiblemente, el *V. linkianum* con el *V. densiflorum* Bertol.

A continuación proponemos una clave para las especies ibéricas de *Verbascum* próximas a la que tratamos, todas ellas con las hojas caulinares decurrentes y pertenecientes a la sección *Bothros-*

perma Murbeck subsección *Fasciculata* Murbeck serie *Heterandra* Frach.

- 1a. — Filamentos estaminales glabros *V. litigiosum* Samp.
 1b. — Filamentos estaminales pilosos, al menos en su base 2
 2a. — Corola de 12 a 30 mm Ø, estigma no decurrente en el estilo 3
 2b. — Corola de 25 a 50 mm Ø, estigma decurrente en el estilo 4
 3a. — Cáliz de 5 a 7 mm, estilo filiforme, no claviforme bajo el estigma
 *V. simplex* Hoffmanns. & Link
 3b. — Cáliz de 8 a 14 mm, estilo filiforme y claviforme bajo el estigma
 *V. thapsus* L.
 4a. — Brácteas de 9 a 15 mm de longitud, hojas caulinares poco decurrentes
 *V. phlomoides* L.
 4b. — Brácteas de 15 a 40 mm de longitud, hojas caulinares largamente
 decurrentes *V. densiflorum* Bertol.

Vicia sativa L. subsp. *terana* (Losa) C. Benedí & J. Molero, comb. nova.

≡ *Vicia terana* Losa, Anal. Inst. Bot. Cavanilles, 9: 439 (1950).

≡ *Vicia rivalagensis* Losa, *nomen in schedulis*.

Lectotypus BCF 31751 (ejemplar de la izquierda): «*Vicia Rivalagensis* nov./Rivadelaço (Zamora) campos, márgenes y en/los cultivos de centeno. 20-VI-1948, Legit M. Losa». *Isotypi* in BCF 31751, 31752, 31753, 31754.

Dentro de la extrema variabilidad que caracteriza a la especie *V. sativa*, el taxon descrito por LOSA presenta evidentes analogías con la subespecie *nigra* (L.) Ehrh. (= *V. angustifolia* L.). Pero algunos rasgos morfológicos parecen individualizarlo, en especial sus flores, de hasta 22 mm, reunidas en racimos de (3)4-6 y pedunculos acrescentes que alcanzan hasta los 22 mm en fruto.

En cuanto a la tipificación, una primera dificultad surgió al no poder localizar material tipo alguno, atribuible al binomen *V. terana*, ni en el BCF ni en BC. Aparecieron, en cambio, varios pliegos etiquetados como *V. rivalagensis*, cuya localidad y fecha coincidían con las indicadas en el protólogo de *V. terana*. El estudio del material, a partir de la descripción original y su comparación con el icón que acompaña al trabajo de Losa, disipan las dudas sobre su correcta identificación: el material que, *in*

schedulis, LOSA designó como *V. rivalagensis*, fue el que utilizó posteriormente para la diagnosis de su *V. terana*.

BIBLIOGRAFIA

- DEVESA, S.
 1984 Revisión del género *Scabiosa* en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Lagasalia* 12(2): 143-212.
- FERGUSON, I. K.
 1972 *Verbascum* L. in TUTIN & al. (Eds.), *Florae Europaeae* 3: 205-216. Cambridge.
- LAÍNIZ, M.
 1974 Aportaciones al conocimiento de la flora gallega. VIII. *Comun. Inst. Nac. Invest. Agrar., ser. Recurs. Nat.* 2: 1-16.
 1982 Mis contribuciones al conocimiento de la flora de Asturias. *Inst. Est. Asturianos*. Oviedo.
- LOSA, T. M.
 1949 Contribución a la Flora y Vegetación de la Provincia de Zamora. Barcelona.
 1957 Catálogo de las plantas que se encuentran en los montes palentino-leoneses. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 35: 243-376.
- MERINO, B.
 1905 *Seseli* L. in *Fl. Galicia* 1: 589-591. Santiago.
- MURBECK, S.
 1933 Monographie der Gattung *Verbascum* L. *Acta Univ. Lund.* 29 (2).
- NYMAN, C. F.
 1881 *Conspectus florae europaeae*. Örebro. Sueciae.

POLYPORACEAE-CELLULASIC AND PHENOLOXIDASIC ACTIVITIES

III — ENZYMATIC ACTIVITY IN *LENZITES BETULINA* (L. EX FR.) FR.-STRAIN 379 *

by

N. TEIXEIRA RODEIA & M. T. MARTINS

Department of Plant Biology, Faculty of Science, Lisbon University
and Mycological Center of Lisbon University (INIC).

Received August 10, 1985.

SUMMARY

The white-rot species *Lenzites betulina* (379) (L. ex Fr.) Fr. was tested to their ability to produce clearing zones on agar medium containing insoluble cellulose (Avicel, Whatmann-submitted to Walseth (1952) method or not) or to release the blue dye, from a cotton cellulose, what diffuses to the lower layer of medium. The carboxymethylcellulasic activity was tested against a soluble cellulose (CMC = carboxymethylcellulose) and the reducing sugars detected by reading at 525 nm the absorbance of solutions, obtained after 4 hours incubation of 10 ml of a 1% of CMC (in phosphate citrate buffer pH 3.5-7.5) with 2 ml of extracellular extracts from 8, 15, 22, 30 and 40 days old cultures growing in a liquid medium containing CMC (1%) as sole source of carbon.

That activity was also tested by loss of viscosity of CMC (1%) using an Ostwald viscosimeter and the same extracellular extracts.

CMC (0.1%) agar medium and the extracellular extracts or mycelia were tested and the clearing zones stained with Congo red and the contents on CMC_{ase} evaluated using a standard sample of CMC_{ase} of *Trichoderma viride* (Sigma). The protein contents in the extracellular extracts was also determined.

The phenoloxidasic activity was tested by adding one of the nine phenolic compounds (catechol, gallic acid, guaiacol, hydroquinone, naphthol, phloroglucinol, resorcinol, tannic acid and tyrosine) to the malt agar growth medium.

* Some results were presented in the 15th FEBS Meeting, 1983, Brussels, Belgium and in the II Congresso Luso-Español de Bioquímica, September, Barcelona.

INTRODUCTION

SINCE 1981 that we have initiated a screening for cellulosic and phenoloxidasic activities out of 38 fungi species of *Polyporaceae* and fifty-seven strains were tested to their ability to produce hydrolytic enzymes which degrade insoluble cellulose (Avicel or Whatmann and dye cotton blue cellulose) and to promote the oxidation of different phenolic compounds induced by fungi phenoloxidases. Some results were already published (RODEIA, 1983; RODEIA *et al.*, 1983a, b).

MATERIAL AND METHODS

Material

The culture of *L. betulina* (379) was isolated from a fruitbody and it is maintained by sub-culture on potato dextrose agar (PDA) or on malt agar (MA) or in mineral oil.

Media

Screening for cellulosic activity of fungi species occurred on the synthetic media described by: 1) RAUTELA & COWLING (1966) — source of carbon cellulose Avicel and Whatmann (0.25; 0.5 or 1% cellulose powder); 2) NILSSON (1974a) — source of carbon like reference in RAUTELA & COWLING (1966); 3) NORKRANS & HAMMARSTRÖM (1963) — source of carbon carboxymethyl-cellulose.

Methods

Most methods have been described already in previous publications (RODEIA, 1983; RODEIA *et al.*, 1983)¹.

So, there it is described the cultural mycelia, the extract preparations, the spectrophotometric and viscosimeter assays, the clarified growth on insoluble or soluble cellulose and the release of the dye blue. There is also mentioned the evaluation of the reactions with the phenolic compounds.

¹ RODEIA & GONÇALVES, 1986.

RESULTS

Enzymatic hydrolysis of cellulose

Table 1 shows that *L. betulina* is able to degrade cellulose powder and can release the dye (altered from blue to a reddish shade) from cotton blue cellulose and produced extracellular carboxymethylcellulase what is clearly shown by the results presented also in the Table 1.

Fig. 1 shows that *L. betulina* promoted the hydrolysis of CMC with production of reducing sugars induced by extracellular extracts from different ages cultures, pH and temperatures, during 4 hours. In CMC liquid medium *L. betulina* has its best CMC_{ase} from 30 days old culture, at pH 5.2 and 50° C of temperature (see Fig. 1).

The decrease of viscosity of 1% CMC was stronger at pH 5.2 and 40 days old cultures as it is represented on Fig. 2. Higher concentration of extracellular extracts in CMC_{ase} was produced by the cultures 20 days old as we refer in the Table 1 and as it can be visualized by Fig. 2 observations.

Enzymatic reactions of phenolic compounds in malt agar media

L. betulina has a good growth on malt agar with or without phenolic compounds and the phenoloxidasic activities exhibited was sometimes very intense, what can be seen by the results quantitatively registered in Table 2.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Numerous methods have been used for assays of cellulolytic activity among microorganisms. A list of various assays methods used for determining cellulolytic activity was suggested by ERIKSSON (1969) as it follows: 1) Loss in weight of insoluble substracts; 2) decrease in mechanical properties of fibres or fibers; 3) change in turbidity of cellulose suspension; 4) increase in reducing sugars groups; 5) decrease of viscosity of cellulose derivatives; 6) colorimetric determination of dissolved decomposed products of cellulose; 7) measurements of clearance zones in cellulose agar. To this list, NILSSON (1974a, b) added; 8) microscopic observations of morphological changes in a cellulosic substract (like fibres or cellophane); 9) growth on cellulose agar.

TABLE 1

Effect of *Leucobates betulina* (L. ex Fr.) Fr. on various celluloses as measured by presence or absence of clearing zones or diffusion of the blue dye. Contents of extracellular extracts in CMC_{ase}, proteins, reducing sugars and decrease of viscosity from (CMC a), b), c)

Insoluble cellulose				Soluble cellulose							
Avicel pH		Whatmann pH		Mycelia			Extracellular extracts				
		Azure		R	ØR	ØG	Reducing sugars (µg/ml)	Proteins (µg/ml)	Decrease of viscosity (%)	Relative activity RA	CMC _{ase} (µg/ml)
5.4	6.8	5.4	6.8	R	ØR	ØG					
							230.00	456.50	89.94	200.00	(20 days old)
	22	20		+++++	60	65					1550
	--	--									
	39	24	Reddish	+++++							

a) All values are the average of six replicates after 5-30 days' growth.

b) Degradation of insoluble (Avicel, Whatmann) cellulose or soluble cellulose (CMC) — The activities have usually been measured by formation of clearing zones (mm) in cellulose agar.

c) R = Reaction; ØR = Diameter (mm) of reaction; ØG = Diameter (mm) of mycelian growth.
 ++++ Diffusion of blue dye to the lower layer.
 +++++ The best reaction between CMC_{ase} and CMC substrate.

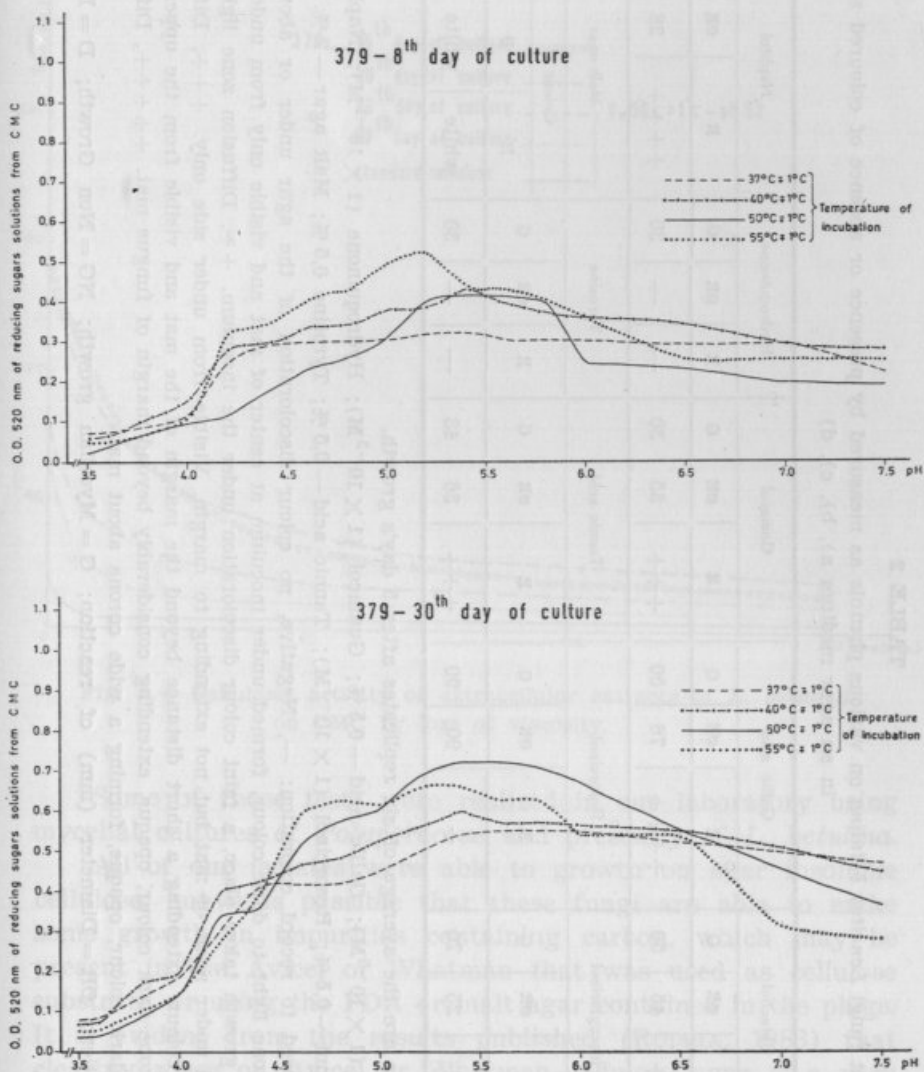


Fig. 1.— Cellulosic activity of extracellular extracts of *L. betulina* by conversion of CMC in reducing sugars. Selection of best activity depending of pH, temperature and age of culture (four hours of incubation).

TABLE 2

Effect of white-rot fungi *Leucospora betulina* on various phenols as measured by presence or absence of coloured zones in an agar medium a), b), c), d)

Species	Strains	Catechol		Gallic acid		Guaiacol		Hydroquinone		Naphthol						
		R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G			
<i>Leucospora betulina</i> (L. ex Fr.) Fr.		++	45	50	++++	76	50	+++	35	30	—	—	30	+++	28	NG
		Phloroglucinol		Resorcinol		Tannic acid		Tyrosine		Malt agar						
		R	ØR	G	R	ØR	G	R	ØR	G	Colour					
											R'	D	G			
379		++	25	70	+	90	90	+++	36	43	—	—	30	white	55	

a) All values are the average of six replicates after 5 day's growth.

b) Catechol ($1 \times 10^{-3}M$); Gallic acid — 0.5%; Guaiacol ($1 \times 10^{-3}M$); Hydroquinone ($1 \times 10^{-3}M$); Naphthol — 0.05%; Phloroglucinol — 0.5%; Resorcinol ($1 \times 10^{-3}M$); Tannic acid — 0.5%; Tyrosine 0.5%; Malt agar — 2%.

c) System used to record coloration: —, Negative, no colour discoloration of the agar under or about the mat. +, Diffusion zone light to dark colour, formed under inoculum at center of mat and visible only from under side of dish. In case no growth takes place, a faint colour discoloration under the inoculum. ++, Diffusion zone light to dark colour, formed under most of mat but not extending to margin. Visible from under side only. ++++, Diffusion zone light to dark colour, extending a short distance beyond the margin of the mat and visible from the upper side. +++++, Diffusion zone dark colour, opaque, extending considerably beyond margin of fungus mat. ++++++, Diffusion zone very intense, dark colour, opaque, forming a wide corona about mat.

d) R = Reaction; ØR = Diameter (mm) of reaction; G = Mycelian growth; NG = Non Growth; D = Direct; R' = Reverse.

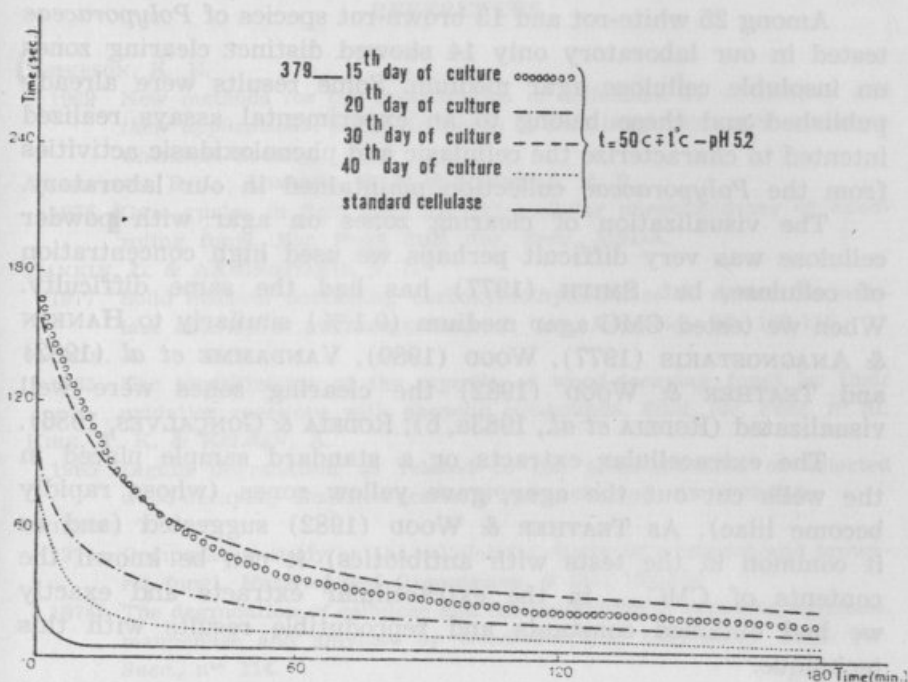


Fig. 2. — Cellulasic activity of extracellular extracts of *L. betulina* on CMC by loss of viscosity.

Some of those tests were realized in our laboratory using mycelial cultures of *Polyporaceae* and presently of *L. betulina*.

All of our isolates were able to growth on agar insoluble cellulose, but it is possible that these fungi are able to make some growth in impurities containing carbon, which may be present in the Avicel or Whatman that was used as cellulose substrate, or using the PDA or malt agar contained in the plugs. It is evident from the results published (RODEIA, 1983) that clearing zones on Avicel or Whatman cellulose agar is a very uncertain zones. It follows that all fungi which are able to degrade wood must produce C_1 enzymes (NILSSON, 1974b) although it was difficult to detect the synthesis of C_1 *in vitro*.

Some of our results are in line with those of RAUTELA & COWLING (1966), NILSSON (1974), KIRK & KELMAN (1965), KÄARIK (1965), GILBERTON *et al.* (1975) and SMITH (1977) but the species used in this work aren't been studied by them.

Among 25 white-rot and 13 brown-rot species of *Polyporaceae* tested in our laboratory only 14 showed distinct clearing zones on insoluble cellulose agar medium. Some results were already published and these belong to an experimental assays realized intended to characterize the cellulosic and phenoloxidasic activities from the *Polyporaceae* collection maintained in our laboratory.

The visualization of clearing zones on agar with powder cellulose was very difficult perhaps we used high concentration of cellulose, but SMITH (1977) has had the same difficulty. When we tested CMC agar medium (0.1%) similarly to HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1977), WOOD (1980), VANDAMME *et al* (1982) and TEATHER & WOOD (1982) the clearing zones were well visualized (RODEIA *et al.*, 1983a, b), RODEIA & GONÇALVES, 1986).

The extracellular extracts or a standard sample placed in the wells cut out the agar, gave yellow zones (whose rapidly become lilac). As TEATHER & WOOD (1982) suggested (and as it common in the tests with antibiotics) it can be known the contents of CMC_{ase} in the extracellular extracts and exactly we had obtained constants and reproducible results with this technique.

No references to the alteration of the blue colour of cotton cellulose or to the lilac shades of cellulosic activity in agar cellulose media was referred by other authors.

The reaction of the extracellular phenoloxidases with different phenolic compounds suggested us that *L. betulina* like we have concluded to *Coriolus versicolor* will have affinity to degrade lignin *in vitro* (the white-rot growing in woods can degrade cellulose and lignin).

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. MÁRIO SANTOS for the valuable suggestions on the English version of our manuscript presented in the II Congresso Luso-Español de Bioquímica, September, 1983, Barcelona, where some of these results were presented. A special mention to the dedicated co-operation of the technicians of Mycological Center (INIC) ALDA CORREIA, MANUEL CORREIA, JOSÉ CARDOSO during the experiments, apart the constant interest in the scientific results of our team.

REFERENCES

- ERIKSSON, K. E.
1969 New methods for the investigation of cellulases. In «*Cellulases and their application*», p. 83. Advances in chemistry, Series 95. American Chemical Society.
- GILBERTSON, R. L.; LOMBARD, F. F. & CANFIELD, E. R.
1975 Gum guaiac in field tests for extracellular phenoloxidases of wood-rotting fungi. *For. Prod. Lab. For. Serv.*, USDA.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S. L.
1977 Solid medium containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 109-115.
- KÅARIK, A.
1965 The identification of the mycelia of wood-decaying fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Stud. for. Suec.* n° 31.
- KIRK, T. K. & KELMAN, A.
1965 Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood-decaying *Basidiomycetes*. *Phytopathology*, **55**: 739-745.
- NILSSON, T.
1974a Comparative study on the cellulolytic activity of white-rot and brown-rot fungi. *Material und Organismen*, **9** (3): 173-198.
1974b The degradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannanase and amylase by wood-attacking microfungi. *Stud. for. Suec.*, n° 114.
1974c Microscopic studies on the degradation of cellophane and various cellulosic fibres by wood-attacking microfungi. *Stud. for. Suec.*, n° 117.
- NORKRANS, B. & HAMMARSTRÖM, A.
1963 Studies of *Rhizina undulata* Fr. and its production of cellulose- and pectin decomposing enzymes. *Physiologia plantarum*, **16**: 1-10.
- RAUTELA, G. S. & COWLING, E. B.
1966 Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiology*, **14** (6): 892-898.
- RODEIA, N. T.
1983 *Polyporaceae* — Actividade celulásica. *Rev. Biologia* **12**: 435-448.
- RODEIA, N. T. & GONÇALVES, A. M.
1986 *Polyporaceae*-Cellulasic and Phenoloxidasic activities. II — Enzymatic activities of *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quél. 1742). *Bol. Soc. Brot.*, Sér. 2, **59**: 43-57.
- RODEIA, N. T.; GONÇALVES, A. M.; MARTINS, M. T.; RODRIGUES, J. & SIMÕES, L. B.
1983a *Polyporaceae*-cellulolytic and polyphenoloxidasic activities. 15th FEBS Meeting, July, Brussels, Belgium (Abstract).
1983b Cellulolytic and polyphenoloxidasic activities of *Inonotus hispidus* (Bull. ex Fr.) Karst., *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Fr. and *Lenzites betulina* (Fr.) Fr. II Congresso Luso-Espanhol de Bioquímica, Setembro, Barcelona, Espanha (Abstract).

SMITH, R. E.

1977 Rapid tube test for detecting fungal cellulase production. *Appl. Environ. Microbiology*, **33** (4): 980-981.

TEATHER, R. M. & WOOD, P. J.

1982 Use of Congo Red-Polysaccharide interactions in Enumeration and characterization of cellulolytic Bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiology*, **43** (4): 777-780.

VANDAMME, E. J.; LOGGHE, J. M. & GEERAERTS, H. A. M.

1982 Cellulase activity of a thermophilic *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) strain. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**: 968-974.

WALSETH, C. S.

1952 Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms. *Tappi*, **35**: 228-233.

WOOD, P. J.

1980 The interaction of direct dyes with water soluble substituted celluloses and cereal β -glucans. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **19**: 19-23.

MUSGOS Y HEPÁTICAS DE DOÑANA (HUELVA, ESPAÑA)

por

J. GUERRA * & E. C. WALLACE **

Recibido el 23 de Agosto de 1985.

RESUMEN

Se realiza el primer estudio de la flora briofítica de Doñana (Huelva, España), mencionándose 66 táxones, de los cuales *Bryum gemmiferum* Wilcz. & Demar., es novedad para la flora española y *Ephemerum sessile* (Bruch) C. Müll., amplía considerablemente su areal en la Península Ibérica.

RÉSUMÉ

On réalise la première étude de la flore bryophytique de Doñana (Huelva, Espagne), en mentionnant 66 taxons, desquels *Bryum gemmiferum* Wilcz. & Demar., est nouveau pour la flore espagnole et *Ephemerum sessile* (Bruch) C. Müll. étend considérablement son aire dans la Péninsule Ibérique.

INTRODUCCION

EL territorio conocido genéricamente como Doñana, situado a la derecha de la desembocadura del Río Guadalquivir y comprendido en las provincias de Sevilla y Huelva, ha sido objeto de amplios estudios botánicos, sobre todo de su flora y vegetación fanerogámica, entre los que cabe destacar los de GALIANO & CABEZUDO (1976) y RIVAS-MARTÍNEZ & al. (1980). Las criptógamas de esta área, sin embargo, son bastante desconocidas, aunque existe una aportación al conocimiento de los hongos de este territorio (CALONGE & TELLERÍA, 1980).

* Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga (España).

** 2, Strathearn Road, Sutton, Surrey, England.

Por lo que respecta a su flora briofítica, el desconocimiento de la misma es total. Probablemente, las características edáficas y topográficas de la zona han hecho poco atractivo su estudio a otros briólogos. Sin embargo, el resultado de nuestras recolecciones en varias campañas realizadas a Doñana, ha mostrado que el interés de su flora briofítica es superior al que podría esperarse y por ello nos ha parecido oportuno dar a conocer esta lista, suficientemente amplia — 66 táxones — que recoge una novedad para la flora española, *Bryum gemmiferum* Wilcz. & Demar. y un importante hallazgo corológico, *Ephemerum sessile* (Bruch) C. Müll.

Para la ordenación y nomenclatura de musgos y hepáticas se han seguido, respectivamente, las obras de CORLEY & al. (1981) y GROLE (1984).

CATALOGO

HEPATICOPHYTINA

Phaeoceros bulbiculosus (Brotero) Prosk.

Encontrado en una sola localidad, La Rocina. En suelo arenoso-arcilloso húmedo en el dominio de *Erico ciliaris-Ulicetum lusitanici*.

Targionia hypophylla L.

En un muro del jardín en el Palacio del Acebrón.

Lunularia cruciata (L.) Lindb.

Muy frecuente en suelos húmedos, umbríos y algo nitrificados, sobre todo formando parte de la asociación *Urtico dubiae-Anthriscetum caucalidis*.

Exormotheca bulbosa (Link ex Lindenb.) K. Müll.

Suelo arenoso seco en el camino de acceso a la Reserva Biológica, ocupando biótupos de *Linario-Carduetum meonanthi*.

Corsinia coriandrina (Spreng.) Lindb.

Solo encontrada en una localidad, La Rocina, en suelos arenosos húmedos en el dominio de *Erico ciliaris-Ulicetum lusitanici*.

Ricciocarpos natans (L.) Corda

Citada por RIVAS-MARTÍNEZ & al. (1980, tabla 2) en la Algaida. No ha sido encontrada por nosotros.

Riccia crystallina L. emend. Raddi

Suelos arenoso-arcillosos muy húmedos, en comunidades de *Isoeto-Ñanojuncetea*. Relativamente frecuente en toda la zona.

Riccia perennis Steph.

En suelos arenosos no excesivamente húmedos. Resulta muy frecuente en los dominios de alcornocales (*Oleo-Quercetum suberis*) y matorrales de *Asparago-Rhamnetum oleoidis*.

Riccia fluitans L. emend. Lorbeer

Al igual que *Ricciocarpos natans* aparece citada por RIVAS-MARTÍNEZ & al. (l. c.) en la Algaida.

Riccia beyrichiana Hampe ex Lehm.

Suelos arenosos no excesivamente húmedos, casi siempre en el dominio de alcornocales. Muy frecuente.

Riccia ciliata Hoffm.

Suelos arenoso-arcillosos, a veces nitrificados. Especie frecuente en toda la zona.

Riccia gougetiana Durieu et Mont. var. *erinacea* Schiffn.

Suelos arenosos frescos. Frecuente en toda la zona.

Riccia lamellosa Raddi

Suelos nitrificados y pisoteados. Muy frecuente por toda la zona al borde de caminos.

Riccia macrocarpa Levier

Aunque se trata de una especie relativamente frecuente en Doñana, tan solo la hemos visto ligada a la vegetación de *Erico ciliaris-Ulicetum lusitanici*, formando extensos céspedes al abrigo de estas comunidades camefíticas.

Riccia sorocarpa Bisch.

En protosuelos formados entre las piedras del patio en el Palacio de Doñana.

Fossombronia pusilla (L.) Nees var. **decipiens** Corb.

Taxon muy frecuente en la zona, aparece ligada con regularidad a *Riccia perennis*, con la cual forma una asociación propia del dominio de los alcornocales termomediterráneos de Doñana.

Fossombronia caespitiformis De Not. ex Rabenh.

Especie frecuentísima en Doñana, prefiere suelos arenoso-arcillosos secos en los claros de pastizales, sobre todo en el *Trifolium resupinatum*-*Caricetum chaetophyllae*.

Frullania dilatata (L.) Dum.

Epífita sobre *Pistacia lentiscus* en el *Oleo-Quercetum suberis*. Frecuente en Doñana y alcornocales del Preparque.

BRYOPHYTINA

Archidium alternifolium (Hedw.) Schimp.

Especie solo frecuente en el *Erico ciliaris-Ulicetum lusitanici*.

Fissidens viridulus (Sw.) Wahlenb.

Suelos muy húmedos en el dominio del *Erico ciliaris-Ulicetum lusitanici*, encontrado en solo una localidad, El Acebrón.

Dicranella howei Ren. & Card.

Suelos temporalmente encharcados o húmedos. Encontrada siempre en los dominios de *Erico ciliaris-Ulicetum lusitanici*.

Pseudoephemerum nitidum (Hedw.) Reim.

Suelos arenosos más o menos húmedos. Especie frecuente en toda la zona en los dominios de *Erico scopariae-Ulicetum australis*.

Cheilothela chloropus (Brid.) Lindb.

Recolectada en una sola localidad, El Puntal, en los claros de un pastizal de *Trifolium resupinati-Caricetum chaetophyllae*.

Ditrichum subulatum Hampe

En un pequeño talud en el dominio de una saucedá (*Viti viniferae-Salicetum atrocinnereae*). La Rocina.

Pleuridium acuminatum Lindb.

Suelos arenoso-arcillosos húmedos, muy frecuente en todo Doñana.

Tortula laevipila (Brid.) Schwaegr.

Epífito sobre *Pistacia lentiscus* en el alcornocal de la Rocina y sobre palmeras en el patio del Palacio de Doñana.

Tortula marginata (B. & S.) Spruce

En las paredes del pozo en el patio del Palacio de Doñana. Formando parte de un *Eucladio-Adiantetum*.

Tortula muralis Hedw.

Paredes de un muro en el Palacio del Acebrón.

Aloina aloides (K. F. Schultz) Kindb.

Frecuente en los suelos arcilloso-arenosos secos de toda Doñana.

Aloina ambigua (B. & S.) Limpr.

Suelos arenoso-arcillosos y algo ruderalizados. Frecuente en toda la zona.

Crossidium squamiferum (Viv.) Jur.

En las paredes de un muro en el Palacio del Acebrón.

Pottia starckeana (Hedw.) C. Müll.

En suelos salinos, arcillosos secos, encontrada en los dominios de *Inulo-Limonietum ferulacei* y *Polygono equisetiformis-Limoniastretum monopetali*.

Pottia davalliana (Sm.) C. Jens.

Recolectada en dos localidades, La Rocina y cercanías a Laguna de Santa Olalla. En ambas ocasiones en suelos arenosos húmedos en los dominios de *Erico ciliaris-Ulicetum lusitanici*.

Pottia commutata Limpr.

En un suelo temporalmente encharcado por agua dulce, en la asociación *Galio palustri-Juncetum maritimi*. El Puntal de Doñana.

Barbula unguiculata Hedw.

Encontrada en dos localidades, El Puntal de Doñana y Las Marismillas. En los claros de pastizales de *Trifolio-Caricetum chaetophyllae*.

Barbula convoluta Hedw.

En protosuelos entre las piedras del patio del Palacio de Doñana. Formando parte de la asociación *Solivetum stoloniferae*.

Didymodon acutus (Brid.) K. Saito

Suelos algo nitrificados en los jardines del Palacio del Acebrón.

Didymodon luridus Hornsch. ex Spreng.

Frecuente en todo Doñana en suelos arenoso-limosos en los claros de pastizales de *Trifolio-Caricetum chaetophyllae*.

Didymodon vinealis (Brid.) Zander

Frecuente en los claros de pastizales y gramales de los bordes de las marismas (*Centaureo exaratae-Armerietum gaditanae* y *Trifolio-Caricetum chaetophyllae*).

Eucladium verticillatum (Brid.) B., S. & G.

Recubriendo las paredes del pozo en el Palacio de Doñana.

Gymnostomum luisieri (Sérgio) Sérgio ex Crundw.

En suelos arcillosos de los jardines del Palacio del Acebrón.

Trichostomum brachydontium Bruch

En suelos arenoso-limosos. Frecuente en Doñana.

Weissia controversa Hedw.

Suelos arenoso-arcillosos secos o ligeramente húmedos. Especie relativamente frecuente en Doñana.

Pleurochaete squarrosa (Brid.) Lindb.

Suelos de textura arenosa y secos. Frecuente en Doñana en los sabinares de paleodunas (*Rhamno-Juniperetum lyciae*).

Tortella flavovirens (Bruch) Broth.

Especie frecuente en Doñana en suelos arenosos secos.

Funaria hygrometrica Hedw.

Frecuente en suelos muy nitrificados y algo húmedos.

Entosthodon obtusus (Hedw.) Lindb.

Frecuente en suelos arenoso-limosos húmedos ocupados por *Erico scopariae-Ulicetum australis*.

Ephemerum sessile (Bruch) C. Müll.

Conocida en España de dos localidades catalanas (cf. SÉRGIO, 1982), resulta, por tanto, especialmente interesante el hallazgo de esta especie en Doñana. Es, sin embargo, relativamente abundante en los dominios de *Erico scopariae-Ulicetum australis*.

Epipterigium tozeri (Grev.) Lindb.

Suelos arenosos más o menos húmedos. Relativamente frecuente en Doñana.

Bryum torquescens B. & S.

En suelos arenosos ligeramente húmedos, Dunas de Matascañas. En el dominio de *Halimio halimifolii-Stauracanthetum genistoidis*.

Bryum argenteum Hedw.

En suelos arenoso-arcillosos algo nitrificados. Cercanías al Palacio del Acebrón.

Bryum gemmiferum Wilcz. & Demar.

Suelos arcillosos y algo nitrificados en los jardines del Palacio del Acebrón. Esta especie del grupo de *Bryum bicolor*, descrita por WILCZEK & DEMARET (1976), es novedad para la flora briofítica española.

Bryum bicolor Dicks.

Especie muy frecuente en Doñana. Abundante especialmente en suelos arenosos ocupados por *Erico scopariae-Ulicetum australis*.

Bryum dunense Smith & Whitehouse

Su existencia en Doñana ya había sido manifestada por nosotros (GUERRA & PUCHE, 1984). Se confirma como especie muy frecuente en los arenales cercanos al mar, encontrándose ligado a la vegetación de sabinares de paleodunas (*Rhamno-Juniperetum lyciae*).

Bryum versicolor A. Braun ex B. & S.

En suelos arenosos más o menos húmedos ocupados por *Erico scopariae-Ulicetum australis*. Cercanías al Palacio de Doñana.

Bryum mildeanum Jur.

Suelos arenoso-arcillosos bajo pinares de *Pinus pinea*. Los Cabezudos.

Zygodon baumgartneri Malta f. *mediterranea* (Malta) Cros

Epífito sobre *Pistacia lentiscus* en el *Oleo-Quercetum suberis*. Encontrado en dos localidades, Coto del Rey y Alcornocal del Ajonjolí.

Orthotrichum lyelii Hook. & Tayl.

Epífito sobre *Quercus suber* y *Pistacia lentiscus*. Frecuente en los bosquetes de *Oleo-Quercetum suberis*.

Orthotrichum tenellum Bruch ex Brid.

Epífito sobre *Pistacia lentiscus*. Encontrado en una localidad, Alcornocal del Ajonjolí en *Asparago-Rhamnetum* y *Oleo-Quercetum suberis*.

Orthotrichum pallens Bruch ex Brid.

Epífito sobre *Pistacia lentiscus*, Alcornocal del Ajonjolí, en *Oleo-Quercetum suberis*.

Orthotrichum diaphanum Brid.

Epífito sobre *Pistacia lentiscus*, La Rocina, en *Oleo-Quercetum suberis*.

Habrodon perpusillus (De Not.) Lindb.

Epífito sobre *Pistacia lentiscus* en *Oleo-Quercetum suberis*. Alcornocal del Ajonjolí.

Amblystegium riparium (Hedw.) B., S. & G.

En una pared junto al borde del agua en el Caño Madre de las Marismas.

Homalothecium sericeum (Hedw.) B., S. & G.

Epífito sobre *Pistacia lentiscus* en *Asparago-Rhamnetum oleoidis*. Alcornocal del Ajonjolí.

Rhynchostegium megapolitanum (Web. & Mohr) B., S. & G.

En suelos arenosos con materia orgánica bruta. Encontrado en una sola localidad, El Puntal de Doñana.

Eurhynchium praelongum (Hedw.) B., S. & G.

En un cauce de agua cercano al Palacio de Doñana.

BIBLIOGRAFIA

- CALONGE, F. DE D. & TELLERÍA, M. T.
1980 Introducción al conocimiento de los hongos de Doñana (Huelva, España). *Lazaroa* 2: 271-326.
- CORLEY, M. F., CRUNDWELL, A. C., DÜLL, R., HILL, M. O. & SMITH, A. J. E.
1981 Mosses of Europe and the Azores: an annotated list of species, with synonyms from the recent literature. *J. Bryol.* 11: 609-689.
- GALIANO, E. F. & CABEZUDO, B.
1976 Plantas de la Reserva Biológica de Doñana (Huelva). *Lagascalia* 6 (1): 117-176.
- GROLLE, R.
1883 Hepatics of Europe including the Azores: an annotated list of species, with synonyms from the recent literature. *J. Bryol.* 12: 403-459.
- GUERRA, J. & PUCHE, F.
1984 *Bryum dunense* Smith & Whitehouse en la Península Ibérica y Baleares. Observaciones taxonómicas, corológicas y fitosociológicas. *Acta Bot. Malacitana* 9: 85-92.
- RIVAS-MARTÍNEZ, S., COSTA, M., CASTROVIEJO, S. & VALDÉS, E.
1980 Vegetación de Doñana (Huelva, España). *Lazaroa* 2: 271-326.
- SERGIO, C.
1982 Contribuição para o conhecimento do género *Ephemerum* Hampe na Península Ibérica. *Acta Bot. Malacitana* 7: 87-96.
- WILCZEK, R. & DEMARET, F.
1976 Les espèces belges du «complexe *Bryum bicolor*» (*Musci*). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 46: 511-541.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LÍQUENS BRASILEIROS — I

por

JOSÉ OLIVEIRA DA SILVA ¹
JOAQUIM EFIGÊNIO MAIA LEITE ²
MARÇAL DE QUEIROZ PAULO ²
LAURO XAVIER FILHO ²

Recebido em 28 de Setembro de 1985.

RESUMO

Foram analisadas 25 espécies de líquens coletados no Brasil quanto a sua atividade antimicrobiana. Deles extraímos o(s) princípio(s) ativo(s) através de 5 solventes: metanol, benzeno, clorofórmio, acetona e solução tampão de água fosfatada pH 7,0, a cuja ação foram submetidos os seguintes 5 microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*. Dos testes realizados 12 % não demonstraram atividade antimicrobiana, 20 % apresentaram amplo espectro e os demais tiveram comportamentos variáveis frente a cada germe. As bactérias mais sensíveis foram *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*. *Escherichia coli* foi a menos sensível e a levedura *Candida albicans* apresentou resistência a todos. O metanol liberou extratos líquênicos e, entre os solventes utilizados, o metanol liberou princípio(s) ativo(s) de 20 espécies das 25 testadas.

INTRODUÇÃO

CONFORME cita a literatura, remonta a milênios o emprego dos líquens em medicina. L. MÜLLER apud RIZZINI (1952) ¹⁵ usou extrato de *Evernia furfuracea* no tratamento de doenças causadas por *Staphylococcus aureus*, ainda o mesmo Autor apud RIZZINI (1952) ¹⁵ cita certas espécies dos gêneros *Usnea* e *Cladonia* úteis no combate à Tuberculose Pulmonar.

¹ Departamento de Biologia Especial, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

² Núcleo de Biotecnologia, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

Inúmeros líquens são citados pela literatura para cura de certas moléstias. Antigamente dava-se uma especificidade em relação a cada doença. Por exemplo: *Lobaria pulmonaria* atuava sobre enfermidades pulmonares e *Usnea barbata* aplicada no crescimento dos cabelos.

Hoje em dia os líquens são reconhecidos como agentes quimioterápicos, responsáveis pela cura de inúmeras doenças, que acometem homens e animais, por exemplo: *Cladonia miniata* var. *sanguinea* na cura das estomatites cremosas ou sapinhos.

BURKHOLDER *et alii* (1944)⁴ foi o primeiro pesquisador a estudar a atividade antimicrobiana dos líquens, comprovando a potencialidade dos ácidos liquênicos frente a certos microrganismos, principalmente bactérias e fungos. Em seguida surgiram vários trabalhos nos dando uma grande quantidade de ácidos liquênicos, onde os primeiros isolados foram ácido cetrárico, a partir de *Cetraria islandica* e o ácido úsnico de *Usnea barbata*.

Embora as pesquisas feitas com os líquens tenham muitos anos, os mesmos têm sido pouco manipulados, neste sentido, mesmo assim conhecem-se alguns trabalhos sobre atividade antimicrobiana como os de AHATI (1961)¹, ASAHINA & SHIBATA (1954)², BURKHOLDER & EVANS (1945)³, BURKHOLDER *et alii* (1966)⁵, BUSTINZA (1950)⁶, (1951)⁷, (1952)⁸, BUSTINZA & LOPES (1948)⁹, CAPRIOTTI (1961)¹⁰, CAVALCANTI (1983)¹¹, CULBERSON (1970)¹², MARSHAK (1947)¹³, SHIBATA (1948)¹⁶, (1968)¹⁷, STOLL (1947)¹⁸, JHOMSON (1967)¹⁹, VARTIA (1949)²⁰, (1950)²¹, (1973)²².

No Brasil apenas tomamos conhecimento de um trabalho, o de MITIDIERI *et alii* (1964)¹⁴ sobre a ação antimicrobiana dos extratos de 2 líquens — *Parmelia tinctorum* e *Cora pavonia*, cujos resultados obtidos, pouca contribuição ofereceram para uma definição sobre o assunto abordado.

MATERIAL

Neste trabalho utilizamos 25 espécies de líquens pertencentes a 7 gêneros distintos, provenientes de diversos estados brasileiros, predominantemente de Pernambuco, encontrando-se as excidatas depositadas no herbário da UFPe., Departamento de Biologia Especial do Centro de Ciências Biológicas.

São as seguintes as espécies de líquens: 1 — *Anaptychia casa-rettiana* Mass.; 2 — *A. comosa* Mass.; 3 — *A. flabellata* Mass.;

4 — *A. speciosa* Zahlbr.; 5 — *Cladonia arcuata* Ahti.; 6 — *C. calycantha* Nyl.; 7 — *C. confusa* Santss.; 8 — *C. dilleniana* Flk.; 9 — *C. furfuracea* Wain.; 10 — *C. miniata* Mey.; 11 — *C. miniata* var. *sanguinea* Wain.; 12 — *C. polia* Santss.; 13 — *C. sprucei* Ahti.; 14 — *C. sullivanii* Mull. Arg.; 15 — *Coenogonium leprieurii* Nyl.; 16 — *Dictyonema sericium* Berk.; 17 — *Herpothallon sanguineum* (Sw). Töbler.; 18 — *Lobaria dissecta* C. M.; 19 — *L. glaberrina* Trevis.; 20 — *L. pseudoglaberrina* Zahlbr.; 21 — *L. quercizans* Michx.; 22 — *Parmelia aberrans* (Wain.) des Abbayes; 23 — *P. andina* Müll. Arg.; 24 — *P. argentina* Krph.; 25 — *P. cetrata* var. *caniculata* Müll. Arg.

Empregamos nos biotestes, culturas dos seguintes microrganismos:

Bactérias

<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	9-IAUR
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (Trevisan) Lehmann & Neumann	71-IAUR
<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani & Charlmers	25-IAUR
<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	1-IAUR

Levedura

<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	2253-IAUR
--	-----------

METODOLOGIA

Preparação das amostras de líquens

De cada espécie de líquens foram preparadas 5 amostras. Cada amostra era constituída por 200 mg de líquens, seco à temperatura ambiente, triturado em almofariz e acondicionado em tubos de ensaio estéreis. Dessa maneira, preparado um total de 125 amostras, com os quais foram realizados 625 ensaios, efetuando-se 5 repetições para cada teste.

Preparação dos extratos

Na liberação dos princípios ativos, presentes em cada espécie de líquen, empregamos os seguintes solventes:

- 1 — Solução Tampão de Água Fosfatada pH 7,0;
- 2 — Metanol;
- 3 — Propanona;
- 4 — Clorofórmio;
- 5 — Benzeno.

Para conhecimento da atividade antimicrobiana, submetemos amostra de uma mesma espécie de líquen à ação dos 5 solventes acima relacionados. Nos tubos de ensaios, contendo 200 mg do líquen triturado, adicionamos 2 ml de solvente, deixando-se macerar por 60 minutos à temperatura ambiente ($\pm 27^\circ \text{C}$). Findo o período de maceração, o extrato líquênico estava pronto para o teste.

Preparação dos discos

Nos testes de atividade antimicrobiana de cada espécie de líquens, empregamos cultura de microrganismos, em placas de Petri, sobre as quais foram colocados discos impregnados com extrato líquênico. Cada disco esterilizado, constituído por papel de filtro com 7 mm de diâmetro, foi posto em contato com um tipo de extrato, absorvendo o sobrenadante, e deixado secar em estufa, durante 60 minutos, à temperatura de 37°C , para evaporação do solvente. Em cada placa de Petri, contendo a cultura de um microorganismo, foram colocados 5 discos assim preparados, relativos aos diferentes extratos, obtidos a partir de cada uma das espécies de líquens testados.

Preparação das culturas

A única amostra de levedura empregada *Candida albicans*, foi semeada no meio de Sabouraud dextrose agar (glicose 40 g, peptona 10 g, agar 15 g, água 1000 ml, pH 6,5). As amostras de bactérias foram mantidas em meio AN (peptona 10 g, cloreto de sódio 5 g, extrato de carne 3 g, agar 15 g, água destilada 1000 ml, pH 7,0), excepto *Mycobacterium smegmatis* que foi cultivado em GL (peptona 10 g, cloreto de sódio 3 g, extrato de carne 3 g, extrato de levedura 10 g, glicose 10 g, agar 15 g, água destilada 1000 ml, pH 6,5).

Após confecção e esterilização, os meios distribuídos em placas de Petri e tubos de ensaios foram colocados em estufa

a 37° C, por um período de 24 horas, para comprovação de sua esterilidade. E em seguida, transferidos aptos a receberam a semeadura dos germes.

Na preparação das suspensões aquosas dos microrganismos, utilizamos culturas de bactérias, com 24 horas de incubação, a 37° C, e cultura de levedura, com 48 horas de incubação, à temperatura ambiente. «Swabs» estéreis de algodão, embebidos nessas suspensões foram passados, suave e uniformemente, na superfície dos meios contidos em placas de Petri. Após 5 minutos, distribuímos, equidistantemente, na superfície do meio, os 5 discos de papel impregnados com extratos liquênicos. As placas foram incubadas em posição invertida, por 24 horas, a 37° C (bactérias) ou 48 horas, à temperatura ambiente (levedura).

Paralelamente, foram realizados dois tipos de controle:

- 1 — Para comprovar a esterilidade dos discos de papel de filtro colocamos, sem extrato, em placas contendo meios empregados;
- 2 — Para testar a possível interferência dos solventes, na formação dos halos, colocamos, nos meios com germe, discos embebidos apenas no solvente puro e secados a 37° C, durante 60 minutos.

Leitura dos resultados

Decorrido o período de incubação, procedeu-se a leitura dos resultados, para constatação da presença ou ausência de halo de inibição. Nos casos em que se obteve resultado positivo, realizou-se a mensuração, com régua milimetrada, dos diâmetros apresentados em cada halo.

RESULTADOS

Entre os 25 líquens testados apenas 12 % não demonstraram atividades, enquanto que 88 % tiveram número de espécies atuantes variáveis frente a cada microorganismo usado, ver Tab. I.

Ao mesmo tempo os líquens não exerceram atividade antimicrobiana frente a levedura utilizada.

Alguns líquens demonstraram especificidade de ação aos microrganismos testados.

Os extratos liquênicos testados não apresentaram especificidade sobre os microrganismos, apenas ocorreu que com a

Escherichia coli atuaram 2 espécies, o *Bacillus subtilis* sofreu ação de 3 líquens, ver Tab. I.

Alguns extractos liquênicos exerceram um amplo espectro de ação, inibindo o desenvolvimento de todas as espécies de bactérias, ver Tab. II.

Todos os solventes apresentaram-se absolutamente inócuos em relação aos microorganismos testados, embora tenham apresentado diferentes graus de capacidade na extracção de substâncias com atividade antimicrobiana, ver Tab. III.

Quanto à sensibilidade dos microorganismos estudados, notamos que o *Bacillus subtilis* sofreu ação inibidora dos extratos de 19 espécies de líquens pertencentes a 6 gêneros. Em escala decrescente segue-se *Mycobacterium smagmatis*, que sofreu ação dos extratos de 16 espécies também pertencentes a 6 gêneros. *Staphylococcus aureus* apresentou sensibilidade apenas a 12 espécies liquênicas distribuídas em 6 gêneros. Finalmente, *Escherichia coli* que foi a bactéria menos sensível, tendo o seu crescimento inibido, apenas 10 espécies distribuídas em 4 gêneros. A única levedura testada apresentou total resistência aos 125 tipos de extratos empregados, ver Tab. I.

No tocante à mesuração dos halos, os microrganismos apresentaram as seguintes variações expressas em milímetros:

<i>Mycobacterium smegmatis</i>	9 a 20 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 a 18 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	9 a 19 mm
<i>Escherichia coli</i>	10 a 12 mm

Pelo que verificamos, a variação de diâmetros dos halos de inibição entre os microrganismos foi praticamente uniforme exceto em relação a *Escherichia coli*, ver Tab. I.

DISCUSSÃO

Dos 25 líquens que foram testados a sua ação antimicrobiana, verificamos que os resultados obtidos, até certo ponto foram comparáveis com os precursos neste tipo de investigação.

Entre as espécies de líquens testadas apenas 9 tiveram capacidade de inibir o desenvolvimento de *Escherichia coli*. Embora tenham empregado técnicas, um pouco diferente, os nossos resultados com relação a este microrganismo, estão de acordo com o que já existe na literatura relativo a ação de substâncias liquênicas

TABELA I

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COMPARATIVA ENTRE 25 EXTRATOS DE LIQUENS ANALISADOS
FRENTE A 5 SOLVENTES E 5 MICRORGANISMOS, COM OS DIÂMETROS DAS ZONAS DE INIBIÇÃO EXPRESSOS EM mm.

MICRORGANISMOS	Bacillus subtilis					Staphylococcus aureus					Escherichia coli					Mycobacterium smegmatis					Candida albicans								
	SOLVENTES						SOLVENTES						SOLVENTES						SOLVENTES						SOLVENTES				
Espécie de Líquens	Solução tampão de água fosfatada	Metanol	Propanona	Clorofórmio	Benzeno	Solução tampão de água fosfatada	Metanol	Propanona	Clorofórmio	Benzeno	Solução tampão de água fosfatada	Metanol	Propanona	Clorofórmio	Benzeno	Solução tampão de água fosfatada	Metanol	Propanona	Clorofórmio	Benzeno	Solução tampão de água fosfatada	Metanol	Propanona	Clorofórmio	Benzeno				
<i>Anaptychia casaretiana</i>	-	-	-	-	9	12	-	-	12	12	-	10	10	10	-	10	10	-	10	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Anaptychia comosa</i>	-	-	10	-	10	-	-	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	12	10	12	-	-	-	-	-	-			
<i>Anaptychia flabellata</i>	-	-	10	12	11	10	-	10	10	-	-	12	-	11	10	-	10	-	10	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Anaptychia speciosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia arcuata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia calycantha</i>	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia confusa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia dilleniana</i>	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	11	12	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia furfuraceae</i>	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia miniata</i>	15	15	15	17	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia</i> var. <i>Sanguinea</i>	-	15	15	-	13	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	12	11	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia polia</i>	-	-	15	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	13	-	13	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia sprucei</i>	-	-	12	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-			
<i>Cladonia sullivanii</i>	-	16	19	17	17	18	11	11	10	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Coenogonium leprieurii</i>	-	10	-	9	-	-	-	-	13	-	-	-	-	12	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Dictionema sericum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Herpothallon sanguineum</i>	-	13	12	13	12	-	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-	13	14	14	13	-	-	-	-	-	-			
<i>Lobaria dissecta</i>	-	9	9	9	-	-	10	-	-	-	-	-	-	12	-	-	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-			
<i>Lobaria glaberrina</i>	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	10	11	10	-	-	-	-	-	-	-			
<i>L. pseudoglaberrina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	11	11	-	-	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-			
<i>Lobaria guercizans</i>	10	-	10	-	10	-	10	-	10	10	10	10	10	10	10	-	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-			
<i>Parmelia aberrans</i>	-	10	-	12	12	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	18	20	20	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Parmelia andina</i>	-	12	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>Parmelia argentina</i>	-	12	9	9	9	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-			
<i>P. cetrata</i> var. <i>caniculata</i>	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			



TABELA 1

ESTADO COMPARATIVO ENTRE OS DESEMPENHOS DOS PROGRAMAS DE DESEMPENHOS DAS EMPRESAS

CATEGORIA	1970		1971		1972		1973		1974		1975		1976		1977		1978		1979		1980		TOTAL
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Industria																							
Comércio																							
Serviços																							
Transporte																							
Alimentação																							
Outros																							
Total																							



TABELA II

ESPECIES LIQUENICAS DE LARGO ESPECTRO

MICROORGANISMOS	<u>Bacillus subtilis</u>					<u>Staphylococcus aureus</u>					<u>Escherichia coli</u>					<u>Mycobacterium smegmatis</u>					
	Aquoso	Metanólico	Propanônico	Cloroformico	Benzenico	Aquoso	Metanólico	Propanônico	Cloroformico	Benzenico	Aquoso	Metanólico	Propanônico	Cloroformico	Benzenico	Aquoso	Metanólico	Propanônico	Cloroformico	Benzenico	
EXTRATO LIQUENICO																					
ESPECIES DE LIQUENS																					
<u>Anaptychia casateriana</u>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<u>Anaptychia flabelata</u>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<u>Coenogonium lepreurii</u>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Lobaria dissecta</u>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Lobaria guercizans</u>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-



TABELA III

GÊNEROS DE LÍQUENS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE OS MICROORGANISMOS USADOS

GÊNERO	Nº DE ESPÉCIES ENSAIADAS					Nº DE ESPÉCIES COM ATIVIDADE INIBIDORA				
	Bacillus subtilis	Micobacterium smegmatis	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Bacillus subtilis	Micobacterium smegmatis	Staphylococcus aureus	Escherichia coli		
<u>Anaptychia</u>	4	4	4	4	3	3	3	3		
<u>Cladonia</u>	10	10	10	10	7	4	3	1		
<u>Coenogonium</u>	1	1	1	1	1	1	1	1		
<u>Hepothallon</u>	1	1	1	-	1	1	1	-		
<u>Lobaria</u>	4	4	4	4	3	4	2	4		
<u>Parmelia</u>	4	4	4	4	4	3	2	-		

sobre o desenvolvimento de germes Gram Negativos. Os princípios ativos que mais exerceram suas ações sobre *Escherichia coli* foram pela propanona. Vale destacar que a espécie *Lobaria quercizans* mostrou atividade em todos os 5 extratos testados.

Apesar da diversidade dos solventes que empregamos e do grande número de líquens que usamos constatamos que não ocorreu atuação sobre a levedura *Candida albicans* «in vitro», admitimos ser possível obter-se resultados positivos em relação a esta levedura através de um aprimoramento da técnica empregada na extração do princípio ativo.

Analisando as espécies com largo espectro de ação em relação aos solventes que extraímos as substâncias antimicrobianas, observamos que deve existir mais de um princípio ativo em *Anaptychia casaretiana*, *Anaptychia flabellata* e *Lobaria quercizans*. Por exemplo os extratos obtidos com as 12 espécies de *Anaptychia* por meio de solução tampão fosfatada tiveram atuação sobre *Staphylococcus aureus* mas não agiram sobre *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Estas bactérias, entretanto, foram inibidas pela ação dos extratos benzênicos e clorofôrmicos. O mesmo pode ser observado com relação aos diferentes extratos obtidos a partir de *Lobaria quercizans* dessa vez, a solução tampão fosfatada extraiu um princípio ativo que atuou sobre o *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, mas não sobre o *Mycobacterium smegmatis* e o *Staphylococcus aureus*, enquanto o extrato obtido pela propanona não teve atuação apenas sobre o *Staphylococcus aureus*. Cremos pois, ter razão em supor que, em uma mesma espécie líquênica deve existir mais de um princípio ativo com ação antimicrobiana, e que o largo espectro de ação encontrado em algumas delas deve-se à sua riqueza nesses princípios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — AHTI, T. — Taxonomic Studies on Reindeer Lichens (*Cladonia*, subgenus *Cladina*). *Annales Botanici Societatis Zoologicae. Botanicae Fennicae, Helsinki*, 32 (1): 1-160 (1961).
- 2 — ASAHINA, Y. & SHIBATA, S. — Chemistry of Lichens Substances. Japan Society of the Promotion of Science, Tokyo, 239 p. (1954).
- BURKHOLDER, P. R. & EVANS, A. W. — Further Studies on the Antibiotic Activity of Lichens. *Bull. Torrey Bot. Club*, New York, 72 (2): 157-164 (1945).
- 4 — BURKHOLDER, P. R. et alii. — Antibiotic Activity of Lichens. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 30: 250-255 (1944).

- 5 — BURKHOLDER, P. R. *et alii*. — Estudio De Los Líquens de Tierra do Fuego com Especial Consideración de su Actividad Antibiótica. Centro de Investigación de Biología Marinha. (Contribución Científica N.º 21), 19 p. (1966).
- 6 — BUSTINZA, F. — Contribución al Estudio de la Actividad Antibacteriana de *Cetraria islandica*. *An. Jar. Bot. Madrid*, 10: 143-149 (1950).
- 7 — BUSTINZA, F. — A Note on the Antibacterial Activity of *Cladonia rangiferina*, *C. sylvatica* and *C. implexa*. *Revue Bryologique et Lichenologique*, 20 (1-2): 208-211 (1951).
- 8 — BUSTINZA, F. — Nota Sobre la Actividad Antimicrobiana *Lichina pygmaea*. *An. del J. Botánico A. J. Cavanilles de Madrid*, 11 (2): 521-527 (1952).
- 9 — BUSTINZA, F. & LOPEZ, A. C. — Contribución al Estudio de los Antibióticos Procedentes de Líquens. *An. J. Bot. Madrid*, 7: 511-533 (1948).
- 10 — CAPIRIOTTI, A. — The Effects of «USNO» on Easts Isolated from the Excretions of Tuberculous Patients. *Antibiot. Chemother* 11: 409-410 (1961).
- 11 — CAVALCANTI, L. H. DA S.; MAIA, R. F.; LIMA, E. DE O. & XAVIER FILHO, L. — Atividade Anti-microbiana «in vitro» da Atranorina. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 14 (3): 168-171, Jul/Set. (1983).
- 12 — CULBERSON, C. F. — Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. The American Bryological and Lichenological Society and the Supplement, 465 p. (1970).
- 13 — MARSHAK, A. — A Crystalline Antibacterial Substance from the Lichen *Ramalina reticulata*. *Pub. Health Rep.* 62: 3-19 (1947).
- 14 — MITIDIERI, J. *et alii*. — Estudo da Ação Antimicrobiana do Extrato de Líquens Brasileiros. In: Congresso da Sociedade de Botânica do Brasil, 13.º, Recife, 1962. Anais... Janeiro, 1962. Recife, Instituto de Micologia, p. 345 (1964).
- 15 — RIZZINI, C. T. — Emprego dos Líquens, Principalmente em Medicina. *Brasil-Médico* (38 e 39): 589-596 (1952).
- 16 — SHIBATA, S. & MIURA, Y. — Antibacterial Effects of Lichens Substances. I. Comparative Studies of Various Lichen Substances. *Jap. Med. J.*, 1: 518-521 (1948).
- 17 — SHIBATA, S. *et alii*. — Antitumour Activities of Lichen Polysaccharides, *Z. Krebsforsch.* 71: 102-104 (1968).
- 18 — STOLL, A. *et alii*. — Antibiotics from Lichens. *Experientia*, 3: 111-114 (1947).
- 19 — JHOMSON, J. W. — The Lichen Genus *Cladonia* in North America. Toronto, University Press, 172 p. (1967).
- 20 — VARTIA, K. O. — Antibiotics in Lichens. I. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 27 (1): 45-54 (1949).
- 21 — VARTIA, K. O. — Antibiotics in Lichens. II. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 28: 7-19 (1950).
- 22 — VARTIA, K. O. — Antibiotics in Lichens. In: AHMADJIAN, V. & HALE, M. E., Eds. The Lichens. New York, Academic Press, p. 547-561 (1973).

APORTACIONES COROLÓGICAS A LA FLORA CENTRO-OCCIDENTAL

por

J. A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, F. AMICH GARCÍA
& F. HERRERO MARTÍNEZ

Departamento de Botánica. Facultad de Biología. Salamanca

Recibido el 21 Enero 1986.

RESUMEN

Se indican cerca de una treintena de táxones recogidos por los autores en el CW español. Se discute la validez del rango subespecífico de *Juncus tenageia* Ehrh. subsp. *perpusillus* Fdez-Carvajal & Navarro; se comenta asimismo la distribución peninsular de *Paradisea lusitanica* (Coutinho) Samp., aportando igualmente nuevas localidades de endemismos ibéricos tan relevantes como *Angelica major* Lag. (= *A. angelicastrum* Hoffmanns. & Link) y *Allium schmitzii* Coutinho, para un mejor conocimiento de su corología. De entre los táxones restantes destacaremos *Thlaspi stenopterum* Boiss. & Reuter, novedad para el macizo bejarano, y *Orchis ustulata* L., *Campanula scheuchzeri* Vill. y *Allium ampeloprasum* L., que constituyen, respectivamente, novedades florísticas para Avila, Salamanca y Zamora.

SUMMARY

In this paper 27 taxa collected by the authors in western central Spain are commented. We discuss the validity of subspecific range of *Juncus tenageia* Ehrh. subsp. *perpusillus* Fdez-Carvajal & Navarro; more over, we comment the peninsular distribution of *Paradisea lusitanica* (Coutinho) Samp., showing new localities of iberian endemical, as *Angelica major* Lag. (= *A. angelicastrum* Hoffmanns. & Link) and *Allium schmitzii* Coutinho. Several other plants of chorologic interest are recorded, most of them are new for the province, as *Thlaspi stenopterum* Boiss. & Reuter, *Orchis ustulata* L., *Campanula scheuchzeri* Vill. and *Allium ampeloprasum* L.

EN esta aportación florística comentamos un grupo de táxones con la pretensión de lograr algún avance en el conocimiento de sus respectivos areales. Iniciamos así una serie de notas tendientes a contribuir a un mejor conocimiento de diversas plantas críticas, nuevas o poco conocidas en el centro-oeste hispano.

Las localidades referidas en la misma pertenecen, administrativamente, a las provincias de Avila, Cáceres, Salamanca y Zamora, zonas del occidente español donde venimos realizando estudios florísticos.

Ha sido estudiado material de herbario preferentemente en MA, MAF, SALA y SALAF, consultando igualmente las bibliotecas de dichos centros, a cuyos directores expresamos nuestro agradecimiento por las facilidades recibidas.

Los testimonios de los táxones citados se encuentran depositados en el herbario SALA.

Ophioglossum lusitanicum L.

SALAMANCA: Valle de las Batuecas, riberas del río Batuecas, 29T QE4284, 500 m, suelos arenosos, 13-IV-1985, Amich, Elías & Sánchez Rodríguez, SALA 36.913.

Segunda cita provincial de este pteridófito raro y escaso en la misma (cf. CASASECA & al., 1982: 11), que en la vecina provincia cacereña parece bastante más extendido (cf. RICO & ROMERO, 1984: 336).

Polygonum alpinum All.

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, Circo de la Peña Negra, 30T TK7272, 1900 m, gleras y cascajares, 10-VII-1984, Amich, Herrero & Sánchez Rodríguez, SALA 33.444.

La señalaremos ahora en el extremo noroccidental del macizo, donde aparece copiosa en pedreras graníticas. Su presencia de manera finícola en estas localidades del Sistema Central ya fue comentada por CASTROVIEJO & al. (1983: 155).

Dianthus langeanus Willk.

= *D. gredensis* Pau ex Caballero, Anales Jard. Bot. Madrid 5: 513 (1945).

= *D. brachyanthus* Boiss. subsp. *gredensis* (Pau ex Caballero) Rivas-Martínez, Anales Inst. Bot. Cavanilles 21 (1): 212 (1963).

AVILA: Sierra de Béjar, Ceja del Calvitero, 30T TK6864, 2200 m, pastizales psicoxerófilos, 18-VII-1980, *Casaseca, Amich, Fdez Diez, Rico & Sánchez*, SALA 33.914.

SALAMANCA: Sierra de Béjar, subida al Calvitero, 30T TK6863, 2000 m, pastizales psicoxerófilos, 30-VII-1974, *Fdez Diez*, SALA 6.615; La Hoya, Sierra de Béjar, La Covatilla, 30T TK7272, 1850 m, pastizales psicoxerófilos, 15-VII-1983, *Amich & Herrero*, SALA 33.915.

Como de manera reciente comentaba LAÍNZ (1985: 476), las confusiones entre el taxon willkommiano y el de BOISSIER *D. brachyanthus* han sido frecuentes; así, en alguna ocasión material bejarano-gredense de la especie de WILLKOMM ha sido etiquetado en SALA como *D. brachyanthus* — ya debidamente revisado —; de igual modo, la reciente cita de la vertiente abulense de la Sierra de Béjar) cf. CARRASCO, 1981: 35) del taxon de BOISSIER, corresponde a *D. langeanus* (cf. LAÍNZ, loc. cit.).

Nuestra actual señalización salmantina creemos puede tratarse de la primera en firme para esta provincia después de la muy poco creíble de GANDOGGER (1909: 132) en la Sierra de Francia.

Ranunculus aconitifolius L.

AVILA: San Bartolomé de Béjar, Sierra de Béjar, Regaja de Peña Negra, 30T TK7373, 1800 m, bordes de arroyos en comunidades megafórbicas, 10-VII-1984, *Amich, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.496.

Interesante novedad para la flora abulense, que junto con la reciente cita salmantina de HERRERO & AMICH (1986: 514), marcan el límite occidental de la especie en el Sistema Central; en éste, la cita más cercana que conocemos es la de RIVAS-MARTÍNEZ (1963: 218) en la Laguna de Peñalara, autor que la considera como rarísima en el macizo.

Myosurus minimus L.

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, La Covatilla, 30T TK7272, 1850 m, en el fondo de pequeñas charcas y pozetas, 15-VII-1983, *Amich & Herrero*, SALA 33.487.

Aunque bien conocida de otras zonas del centro de la provincia (cf. LAÍNZ, 1955: 476; CASASECA & *al.*, 1980: 8), queremos destacar la elevada altitud a la que ha sido herborizado en la Sierra de Béjar, posiblemente debido al transporte de los aqúenios por el ganado.

Ionopsidium abulense (Pau) Rothm.

CACERES: Hervás, subida al Puerto de Honduras, 30T TK5658, 1500 m, márgenes de arroyos, 28-V-1984, *Amich & Elías*, SALA 33.452.

RIVAS MATEOS (1932: 132) citó de Gredos y el Valle de Plasencia *I. prolongoi* (Boiss.) Batt.; aunque no hemos encontrado testimonios de estas localidades en el herbario MAF, creemos estas citas claramente asimilables al taxon pauano. De Extremadura conocemos únicamente la mención que SAINZ OLLERO & HERNANDEZ BERMEJO (1981: 51) recogen para Guadalupe-Villuerca, si bien esta especie no es mencionada por LADERO (1970) en su trabajo referente a dicha zona; este autor nos ha puesto asimismo de manifiesto (com. ver.) que tampoco ha tenido ocasión de herborizarla en los últimos años.

Aparece localmente copiosa, aunque siempre de forma esporádica, en márgenes encharcados de pequeños arroyos montanos.

Thlaspi stenopterum Boiss. & Reuter

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, La Covatilla, 30T TK7272, 1980 m, pastizales vivaces, 11-VII-1984, *Amich, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33. 493.

Primicia florística provincial; desconocemos también cualquier referencia pretérita para el macizo bejarano. Es muy factible que este hallazgo constituya la irradiación finícola para esta crucífera en el Sistema Central, dada su ausencia en el vecino país ibérico (cf. AMARAL FRANCO, 1971).

Se presenta localmente abundante por encima de los 1800-1900 m en pastizales vivaces entre piornos.

Lepidium perfoliatum L.

SALAMANCA: Navacarros, cercanías de la población, 30T TK6976, 1100 m, cunetas de carreteras, 13-V-1984, *Herrero*, SALA 33.486; La Hoya, Sierra de Béjar, La Covatilla, 30T TK7272, 1800 m, pastos, 11-VII-1984, *Amich, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.485.

Al igual que comentábamos para *Myosurus minimus* L., se trata de una especie conocida de diversos enclaves subsalinos del Norte y centro provincial (cf. LAÍNZ, 1955: 477; CASASECA & al., 1980: 10), pero no detectada hasta ahora de las zonas montanas meridionales, donde es de destacar la elevada altitud de la segunda localidad en que ha sido herborizada.

Saxifraga tridactylites L.

SALAMANCA: San Cristóbal de la Cuesta, 30T TL7945, 825 m, taludes, 25-V-1986, *Amich & Sánchez Rodríguez*, SALA 40.812.

Copiosa localmente en pequeñas cunetas y taludes de La Armuña; también hemos tenido oportunidad de verla abundante en las fisuras de calizas cámbricas que afloran en algunos puntos de la Sierra de Tamames, en la zona meridional de la provincia. Para ésta sólo conocemos la mención de BELLOT & al. (1966: 37) en una lista de Thero-Brachypodietalia, pero no se conservan testimonios en el herbario SALA.

Potentilla pyrenaica Ramond

AVILA: Mengamuñoz, Puerto de Menga, 30T UK2883, 1500 m, humedales, 12-VII-1985, *Amich & Sánchez Rodríguez*, SALA 36.926.

Nueva localización para el Sistema Central (cf. CASTROVIEJO & al., 1983: 156) de una planta escasa en dicho Sistema, en donde no era señalada por SAINZ OLLERO & HERNANDEZ BERMEJO (1981: 67).



Viola palustris L. subsp. **palustris**

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, Circo de la Peña Negra, 30T TK7272, 1900 m, enclaves higroturbosos, 10-VII-1984, *Amich, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.443.

Las formas de hojas basales obtusas y pecíolos glabros, correspondientes a esta subespecie tipo, aparecen también en ambientes turfófilos del Sistema Central, al menos en el macizo bejarano (cf. RIVAS-MARTÍNEZ, 1980: 306). Muy recientemente NIETO FELINER (1985: 79) las detectaba asimismo en la Sierra de La Cabrera.

Angelica major Lag., Gen. Sp. Nov.: 13 (1816)

= *A. angelicastrum* (Hoffmanns. & Link) Coutinho, Fl. Port.: 455 (1913).

Hs, AVILA: Solana de Avila, Sierra de Béjar, Laguna del Duque, 30T TK7266, 1800 m, márgenes de arroyos, 24-VII-1985, *Amich, Elías & Sánchez Rodríguez*, SALA 36.930.

SALAMANCA: Navacarros, Sierra de Béjar, arroyo del Oso, 30T TK7172, 1500 m, márgenes de arroyos, 13-VII-1983, *Amich & Herrero*, SALA 33.477.

Po, BEIRA ALTA: Manteigas, Serra da Estrela, PE 1, 1200 m, prados húmedos, 20-VI-1980, *Amich, Rico & Sánchez*, SALA 33.476.

AMICH & *al.* (1981: 159) la señalaron como novedad en el macizo bejarano, de donde GUTIÉRREZ BUSTILLO (1982: 155) no indica ninguna localidad; tampoco SAINZ OLLERO & HERNÁNDEZ BERMEJO (1981: 18) indican el taxon lagascano — bajo el sinónimo de *A. laevis* Gay — en el macizo bejarano-gredense, ni en el resto del Sistema Central. En cuanto al endemismo lusitano *A. angelicastrum* (Hoffmanns. & Link) Coutinho, ya la monógrafa del género (loc. cit.) señaló que no se justificaba la existencia independiente de este taxon.

Añadiremos ahora que aparece muy frecuente y abundante por toda la Sierra, en sus vertientes meridional y septentrional, aunque sobre todo en esta última.



Angelica sylvestris L.

AVILA: Mombeltrán, márgenes del río Herradero, 30T UK2858, 600 m, prados húmedos, 3-X-1984, *Amich*, SALA 33.456.

SALAMANCA: Candelario, 30T TK6772, 1150 m, cunetas húmedas, 23-XI-1984, *Amich*, *Elías & Herrero*, SALA 33.381.

Aunque GUTIERREZ BUSTILLO (loc. cit.: 149) la indica en el sector bejarano-gredense, no refleja material de estas dos provincias. Añadiremos ahora que también alcanza el sector salmantino (cf. FERNANDEZ DIEZ, 1977: 22).

Mimulus moschatus Douglas

SALAMANCA: Navacarros, 30T TK 6976, 1100 m, márgenes de arroyos, 17-IX-1983, *Amich & Herrero*, SALA 33.441; íbidem, 30-VIII-1984, *Amich & Elías*, SALA 33.440; La Hoya, 30T TK7276, 1250 m, orillas de fuentes, 11-VII-1984, *Amich*, *Herrero & Sánchez-Rodríguez*, SALA 36.918.

Aparece copiosa y frecuente por las zonas basales de la Sierra, sobre todo en el trecho La Hoya-Navacarros-Candelario, situándose preferentemente en emplazamientos húmedos como fuentes, paredones rezumantes, bordes de pequeños arroyos, etc., siempre en zonas con marcada influencia antropozoógena. De la última de las localidades reseñadas (Candelario) MAYOR (1968: 145) estudió su ecología.

Antirrhinum grosii Font Quer

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, La Covatilla, 30T TK7272, 1900 m, fisuras graníticas, 13-VII-1983, *Amich & Herrero*, SALA 33.442.

Nueva localización en la vertiente salmantina del macizo bejarano (cf. AMICH & *al.*, 1981: 159-160), en la que sin duda es mucho más escaso y raro que en la abulense.

Utricularia minor L.

AVILA: Navarredonda de Gredos, 30T UK2070, 1500 m, pequeñas pozas entre esfagnos, 12-VII-1985, *Amich & Sánchez-Rodríguez*, SALA 36.920.

Aunque hasta fecha recentísima se desconocía de la provincia (cf. CASTROVIEJO & *al.*, 1983: 158), ya LUCEÑO (1985: 428) consideró que debía estar distribuída por todo el macizo. Nueva localización, más oriental, a añadir a las dos anteriores.

Campanula scheuchzeri Vill.

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, La Covatilla, 30T TK7272, 1900 m, fisurícola en paredones graníticos, 15-VII-1983, *Amich & Herrero*, SALA 33.510.

Consideramos pertenecientes a esta especie los ejemplares herborizados en fisuras graníticas de las zonas cacuminales; si bien se trata sin duda de un grupo crítico, caracteres tales como los botones florales nutantes, junto con las corolas de mayor tamaño, anchamente campanuladas, permitirían diferenciarlos de la muy próxima *C. rotundifolia* L.

Novedad provincial y para el macizo bejarano.

Phyteuma spicatum L. subsp. **pyrenaicum** (R. Schulz) Laínz, Bol. Inst. Est. Ast. sér. C. 5: 30 (1962)

AVILA: Solana de Avila, Sierra de Béjar, Laguna del Duque, 30T TK7266, 1800 m, umbrías en márgenes de arroyos, 24-VII-1985, *Amich, Elías & Sánchez Rodríguez*, SALA 36.919.

También aparece copiosa localmente en puntos dispersos de la vertiente sur bejarana (cf. CASTROVIEJO & *al.*, 1983: 158).

Anthemis alpestris (Hommmanns. & Link) R. Fernandes

AVILA: Mengamuñoz, Puerto de Menga, 30T UK2883, 1500 m, suelos arenosos, 5-VII-1984, *Amich, Elías & Herrero*, SALA 33.488; Piedrahíta, Puerto de la Peña Negra, 30T UK0578, 1850 m, suelos arenosos, 5-VII-1984, *Amich, Elías & Herrero*, SALA 33.489; Puerto de Villatoro, 30T UK1889, 1400 m, suelos arenosos, *Amich, Elías & Herrero*, SALA 33.490.

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, subida a La Covatilla, 30T TK 7375, 1450 m, taludes, 11-VII-1984, *Amich, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.482.

RICO & al. (1982: 36) consideraron la especie como novedad salmantina; desconocíamos entonces la herborización (MA 127.021) y cita bejarana de LACAITA (1928: 6).

Recientemente SÁNCHEZ RODRÍGUEZ (1983: 170) contribuía a un mejor conocimiento de la corología del taxon. Por nuestra parte lo señalaremos ahora de algunas sierras occidentales del Sistema Central, donde se presenta bastante frecuente en pastizales del *Plantagini-Jasonietum sessiliflorae*.

Paradisea lusitanica (Coutinho) Samp. (Lám. I)

AVILA: Mombeltrán, márgenes del río Herradero, 30T UK2858, 600 m, entre granitos rezumantes, 8-VI-1984, *Amich & Elías*, SALA 33.451.

SALAMANCA: Valle de las Batuecas, 29T QE4284, 500 m, márgenes del río Batuecas junto al monasterio, 14-VI-1985, *Amich & Elías*, SALA 36.917.

Recientemente RICO (1985: 417) señalaba esta especie como novedad abulense en el extremo suroeste de la provincia; no es por ello de extrañar esta nueva localización en Avila, que significa hasta el momento su límite oriental de distribución en nuestro país (Fig. 1). Muy escasa en los emplazamientos indicados.

En cuanto a la localidad salmantina, de la misma fue citada como novedad para nuestro país por CABALLERO (1947: 650), y desde entonces no habíamos tenido oportunidad de recogerla nuevamente.

Anthericum liliago L. (Lám. II)

AVILA: Pinar de Hoyocasero, 30T UK3374, 1350 m, pequeños taludes en márgenes de robledales y pinares, 5-VII-1984, *Amich, Elías & Herrero*, SALA 33.447.

AMICH (1980: 16) la señaló como novedad salmantina; creemos que esta localización puede representar ahora la primera cita para la provincia de Avila.

Se trata de una especie bastante afín al endemismo ibérico occidental que acabamos de comentar, si bien pueden separarse con claridad tanto morfológica como ecológicamente. Algunos caracteres referentes a las hojas, pedicelos y tépalos permiten

ciones entre 650 y 1000 mm (ombroclima subhúmedo) siendo capaz de soportar períodos notables de sequía.

Por su parte, *P. lusitanica* aparece sobre gleysoles de origen aluvial integrándose en las fitocenosis herbáceas que acompañan las alisedas riparias mediterráneas del *Osmundo-Alnion* (Tab. I) — aunque en otras localidades más occidentales y oceánicas puede aparecer en pastizales de *Molinio-Arrhenatheretea* —, siempre contactando con los robledales y castañares del *Quercion robori-pyrenaicae*; por tanto, a diferencia de *A. liliago*, precisa para su desarrollo humedad edáfica constante, con el nivel freático muy próximo a la superficie del suelo.

Allium schmitzii Coutinho

SALAMANCA: Saldeana, riberas del Huebra, 29T PF9941, 500 m, entre cuarcitas, 11-VI-1985, *Amich, Elías & Sánchez Rodríguez*, SALA 36.924; Yecla de Yeltes, riberas del Yeltes, 29T QF8834, 600 m, entre cuarcitas, *Amich & Sánchez Rodríguez*, SALA 36.923.

Dos nuevas localidades de este relevante endemismo ibérico que significan una notable contribución al conocimiento de su corología centro-occidental, donde hasta ahora sólo era conocido de las cuencas del Agueda y del Alagón (cf. RICO, 1980: 253; VALDÉS FRANZI, 1983: 199).

Allium ampeloprasum L.

SALAMANCA: La Fregenda, Muelle de Vegaterrón, 29T PF7444, 165 m, márgenes arenosos del río Duero, 17-VI-1977, *Amich*, SALA 15.670.

ZAMORA: Fermoselle, 29T QF1274, 500 m, márgenes arenosos del Tormes, 12-VIII-1981, *Sánchez Rodríguez*, SALA 36.929.

Aparece de forma esporádica en los Arribes del Duero salmantinos y zamoranos. Estas localidades quedan ya alejadas de las centrooccidentales reseñadas por PASTOR & VALDÉS (1983: 33) que no estudiaron material de ninguna de las dos provincias. Para la segunda de ellas creemos representa una novedad florística, mientras que en lo referente a la primera es claro el desierto en este caso, como tantas otras veces, de HOYOS DE ONIS (1898: 58): «encuétrase esta especie en los alrededores de los

TABLA I

Número de inventario	1	2	3	4	5
Superficie (m ²)	50	100	100	30	50
Cobertura (%)	100	100	90	90	100
Inclinación (°)	25	25	40	15	30
Exposición	NW	NW	NNW	NE	NNE
Altitud (1 = 10 m)	110	110	110	65	65
Número de especies	8	6	13	24	36

Características de alianza y unidades superiores (*Osmundo-Alnion*, *Populeta-lia albae*, *Quercu-Fagetea*):

<i>Alnus glutinosa</i>	1.1	1.2	1.1	4.4	2.2
<i>Teucrium scorodonia</i>	.	.	+	+	+1
<i>Athyrium filix-foemina</i>	.	.	2.2	+	.
<i>Omphalodes nitida</i>	.	.	+	2.2	.
<i>Galium rotundifolium</i>	.	.	.	2.2	+1
<i>Brachypodium sylvaticum</i>	.	.	.	+	2.1
<i>Physospermum cornubiense</i>	.	.	.	1.1	+
<i>Aquilegia vulgaris</i>	.	.	+	.	1.1
<i>Crataegus monogyna</i>	.	.	.	+	+1
<i>Ornithogalum pyrenaicum</i>	.	.	.	+	+
<i>Clinopodium vulgare</i>	.	.	.	+	+

Compañeras:

<i>Paradisea lusitanica</i>	4.4	4.5	3.4	3.3	4.5
<i>Rubus</i> sp.	1.1	+	+1	1.2	1.2
<i>Lysimachia vulgaris</i>	2.3	+	2.2	.	+
<i>Hedera helix</i>	.	.	.	+	2.2
<i>Centaurea nigra</i> subsp. <i>carpetana</i>	.	.	.	+1	1.2
<i>Frangula alnus</i>	1.1	1.1	.	.	.
<i>Potentilla erecta</i>	.	.	.	1.1	+
<i>Tamus communis</i>	.	.	.	+	+1
<i>Dactylorhiza maculata</i> subsp. <i>maculata</i>	.	.	.	+	+1
<i>Bromus asper</i>	+	.	.	.	1.1
<i>Aristolochia paucinervis</i>	.	.	.	+	.
<i>Ranunculus repens</i>	.	.	+	.	+
<i>Carex divulsa</i>	.	.	1.2	.	1.2

Además: Características de alianza y unidades superiores: *Dryopteris filix-mas*, 2.3 en 1; *Thalictrum flavum* subsp. *glaucum*, 1.1 en 2; *Lonicera peryclimenum* subsp. *hispanica*, +1 en 3; *Quercus pyrenaica*, +1 en 5; *Geum sylvaticum*, + en 5; *Polystichum setiferum*, + en 5; *Primula vulgaris*, 1.1 en 5; *Fragaria vesca*, + en 5; *Mercurialis perennis*, +1 en 5; *Ilex aquifolium*, +1 en 4; *Hyacinthoides non-scripta*, + en 4. Compañeras: *Betula celtiberica*, 2.2 en 3; *Carex distans*, + en 1; *Geranium purpureum*, +1 en 3; *Oenanthe croata*, + en 3; *Dactylis glomerata*, 1.1 en 4; *Carex distachia*, 2.3 en 4; *Stachys officinalis*, 2.3 en 4; *Luzula lactea*, 2.1 en 4; *Epilobium tetragonum*, + en 4; *Agrimonia eupatoria*, + en 5; *Pteridium aquilinum*, 1.2 en 5; *Anthoxanthum odoratum*, + en 5; *Thapsia villosa*, + en 5; *Carex vulpina*, + en 5; *Asphodellus albus*, + en 5; *Rosa* sp., + en 5.

Localidades:

1 y 2 Candelario (22/6/1984).

2 Candelario Navacarros (22/6/1984).

4 y 5 Cepeda (19/5/1983).

arroyos de la capital, Alba de Tormes, Ciudad Rodrigo y muchos más puntos de la provincia».

Juncus tenageia Ehrh. subsp. **perpusillus** Fdez-Carvajal & Navarro, Pub. Dep. Bot. Fac. Farmacia Salamanca 1: 28 (1979)

SALAMANCA: Candelario, Sierra de Béjar, Hoyamoro, 30T TK6667, 1850 m, pequeñas pozas y cubetas, 30-VII-1984, *Amich, Elías & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.457; La Hoya, Sierra de Béjar, Circo de la Peña Negra, 30T TK7272, 1900 m, pequeñas pozas y cubetas, 24-IX-1984, *Elías, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.458.

Copioso y frecuente en la vertiente salmantina de la Sierra de Béjar. Hemos estudiado con detenimiento diversas poblaciones y los caracteres enunciados en el protólogo por los autores no son ni mucho menos constantes: así, son frecuentes los ejemplares que alcanzan e incluso sobrepasan los 6-7 cm de longitud, que el tamaño de las flores rebasa los 2 mm indicados, que aparezcan en la planta hojas caulinares, y que se ramifique. En consecuencia, pensamos que tal vez el rango subespecífico no sea el más adecuado, sino el varietal o el de forma, ya propuestos con anterioridad por otros autores (cf. FDEZ-CARVAJAL & NAVARRO, loc. cit.). También RIVAS-MARTÍNEZ (1963: 286) comentaba que no se podía considerar la planta más que como una forma propia de la región alpinizada del Sistema Central.

Juncus bulbosus L. fma. **fluitans** (Lam.) Navarro, Sánchez & Valle ex Fdez-Carvajal, Anales Jard. Bot. Madrid 39 (2): 330 (1983)

SALAMANCA: La Hoya, Sierra de Béjar, Circo de la Peña Negra, 30T TK7272, 1900 m, flotante en pequeñas lagunas y cubetas, 10-VII-1984, *Amich, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.507; íbidem, 24-X-1984, *Elías, Herrero & Sánchez Rodríguez*, SALA 33.506.

fma. **nanus** (Petterm.) Soó, Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 16 (3-4): 366 (1971)

SALAMANCA: Candelario, Sierra de Béjar, Hoyamoro, 30T TK6667, 1850 m, bordes de cubetas, 27-IX-1979, *Amich, Rico & Sánchez*, SALA 20.135.

La primitiva combinación de NAVARRO & al. (1979: 40) era a todas luces inválida. Ambas formas significan sendas novedades para la flora salmantina, constituyendo además la primera de ellas novedad para el Sistema Central (cf. FDEZ-CARVAJAL, loc. cit.). Aparecen relativamente abundantes en zonas culminícolas de la Sierra en pequeñas pozas y cubetas.

Orchis ustulata L.

AVILA: Pinar de Hoyocasero, 30T UK3374, 1350 m, herbazales húmedos, 5-VII-1984, Amich, Elías & Herrero, SALA 33.449.

Creemos puede tratarse de la primera cita de este taxon en la provincia abulense; de la vecina Salamanca la indicó RICO (1980: 253). Estas localidades centro-occidentales quedan ya algo alejadas del área general de distribución de la especie en nuestro país.

BIBLIOGRAFIA

- AMARAL FRANCO, J.
1971 *Nova Flora de Portugal (continente e Açores)*. Vol. I. Lisboa.
- AMICH GARCÍA, F.
1980 Datos acerca de la flora salmantina. II. *Trab. Dep. Bot. Salamanca* 9: 5-18.
- AMICH GARCÍA, F.; E. RICO HERNÁNDEZ & J. SÁNCHEZ SÁNCHEZ
1981 Sobre «*Delphinium sordidum* Cuatrec.» y otras aportaciones a la flora del Sistema Central español. *Anales Jard. Bot. Madrid* 38 (1): 153-164.
- BELLOT RODRÍGUEZ, F.; B. CASASECA MENA & M. C. FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ
1966 *Mapa de la Vegetación de Salamanca*. Excma. Diputación. Salamanca.
- CABALLERO, A.
1947 Dos excursiones botánicas a los alrededores de La Alberca (Salamanca, Cáceres). *Anales Jard. Bot. Madrid* 7: 645-653.
- CARRASCO, M. A.
1981 Notas florísticas del Valle del Jerte (Cáceres). *Trab. Dep. Bot. y Veg. Madrid* 11: 23-47.
- CASASECA, B.; F. J. FDEZ, Díez; F. AMICH; E. RICO & J. SÁNCHEZ
1980 *Flora Española. Primera Centuria*. Ed. Univ. Salamanca.
- 1982 Catálogo de las Plantas Vasculares de la Provincia de Salamanca. I. Pteridophyta. *Trab. Dep. Bot. Salamanca* 10: 5-28.
- CASTROVIEJO, S.; G. NIETO FELINER & RICO HERNÁNDEZ
1983 Notas y comentarios sobre la flora del Sistema Central español: Sierras de Villafraña, El Barco y Béjar. *Anales Jard. Bot. Madrid* 40 (1): 151-161.

FERNÁNDEZ CARVAJAL, M. C.

- 1983 Revisión del género *Juncus* L. en la Península Ibérica. IV. Subgéneros *Juncinella* (Furr.) Krecz. & Gontsch., *Septati* Buchenau y *Alpini* Buchenau. *Anales Jard. Bot. Madrid* 39 (2): 301-379.

FERNÁNDEZ CARVAJAL, M. C. & F. NAVARRO

- 1979 Un taxon nuevo del género *Juncus*: *Juncus tenageia* Ehrh subsp. *perpusillus* nova. *Trab. Dep. Bot. Fac. Farm. Salamanca* 1: 27-36.

FDEZ DÍEZ, F. J.

- 1977 Flora Vascular de la Sierra de Tamames y Peña de Francia (Salamanca). V. *Trab. Dep. Bot. Salamanca* 4: 5-32.

GANDOGER, M.

- 1909 VIII. Notes sur la flore espagnole et portugaise. Troisième voyage en Portugal. *Bull. Soc. Bot. France* 56 (4.^a sér., Tome 9): 132-138.

GUTIERREZ BUSTILLO, M.

- 1982 Revisión del género *Angelica* L. (*Umbelliferae*) en la Península Ibérica. *Lazaroa* 3: 137-161.

HERRERO, F. & F. AMICH

- 1986 Fragmenta chorologica occidentalia, 265-289. *Anales Jard. Bot. Madrid* 42 (2): 512-515.

HOYOS DE ONÍS, F.

- 1898 *Notas para la flora de la provincia de Salamanca*. Salamanca.

LACAITA, C.

- 1928 *Novitia quaedam et notabilia hispanica*. *Cavanillesia* 1 (1-3): 6-15.

LADERO, M.

- 1970 *Contribución al estudio de la Flora y Vegetación de las comarcas de la Jara, Serranía del Ibor y Guadalupe-Villuercas, en la Oretana Central*. Tesis Doctoral, manuscrito. Madrid.

LAÍNZ, M.

- 1955 Contribución al Catálogo de la Flora Salmantina. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* 13: 469-498.

- 1985 *Dianthus langeanus* Willk., buena especie y lusitana por añadidura? *Anales Jard. Bot. Madrid* 41 (2): 476-477.

LUCEÑO GARCÉS, M.

- 1985 Aportaciones al conocimiento de la flora de Gredos. *Anales Jard. Bot. Madrid* 41 (2): 425-428.

MAYOR, M.

- 1968 *Mimulus moschatos* Dougl. en Candelario (Sierra de Béjar). *Trab. Dep. Bot. y F. Veg. Madrid* 1 (3): 145-147.

MUÑOZ, J. & E. DOMÍNGUEZ

- 1984 *Orchis ustulata* L. in *Notas Breves. Lagascalia* 12 (2): 276.

NAVARRO, F.; J. A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ & C. J. VALLE

- 1979 Comentarios florísticos y ecológicos sobre *Subularia aquatica* L. *Pub. Dep. Bot. Fac. Farm. Salamanca* 1: 37-44.

NIETO FELINER, G.

- 1985 Estudio crítico de la flora crófila del suroeste de León: Montes Aquilianos, Sierra del Teleno y Sierra de la Cabrera. *Ruizia* 2: 1-239.

PASTOR, J. & VALDÉS, B.

1983 *Revisión del género Allium (Liliaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares*. Pub. Univ. Sevilla.

RICO HERNÁNDEZ, E.

1980 Aportaciones a la flora salmantina. *Anales Jard. Bot. Madrid* **36**: 245-255.

1985 Aportaciones y comentarios sobre la flora del centro-oeste español. *Anales Jard. Bot. Madrid* **41** (2): 407-423.

RICO HERNÁNDEZ, E. & T. ROMERO MARTÍN

1984 Aportaciones corológicas a los pteridófitos del Sistema Central. *Anales Jard. Bot. Madrid* **40** (2): 335-339.

RICO HERNÁNDEZ, E.; J. SÁNCHEZ SÁNCHEZ & F. AMICH GARCÍA

1982 Contribución a la flora del centro-oeste español. *Trab. Dep. Bot. Salamanca* **10**: 29-40.

RIVAS-MARTÍNEZ, S.

1963 Estudio de la Vegetación y Flora de las Sierras de Guadarrama y Gredos. *Anales Inst. Bot. Cavanilles* **21** (1): 5-325.

1980 De plantis Hispaniae notulae systematicae, chorologicae et ecologicae, IV. *Anales Jard. Bot. Madrid* **36**: 301-309.

RIVAS MATEOS, M.

1931 *Flora de la Provincia de Cáceres*. Serradilla.

SAINZ OLLERO, H. & J. E. HERNÁNDEZ BERMEJO

1981 *Síntesis corológica de las Dicotiledóneas endémicas de la Península Ibérica e Islas Baleares*. I. N. I. A. **31**: 1-111. Madrid.

SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, J. A.

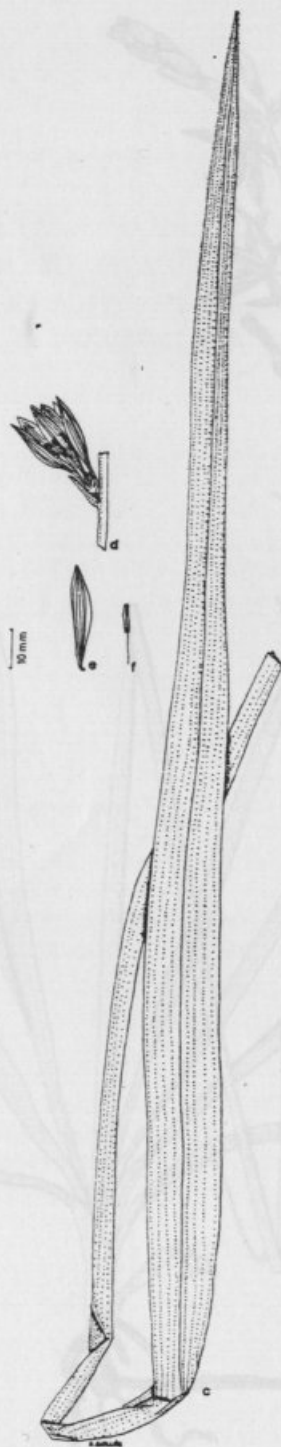
1983 *Flora y Vegetación vascular de la comarca de Sayago (Zamora)*. Tesis Doctoral, manuscrito. Salamanca.

VALDÉS FRANZI, A.

1983 Algunas plantas interesantes de la Sierra de Gata (Cáceres). *Studia Bot.* **2**: 195-200.

WEBB, D. A.

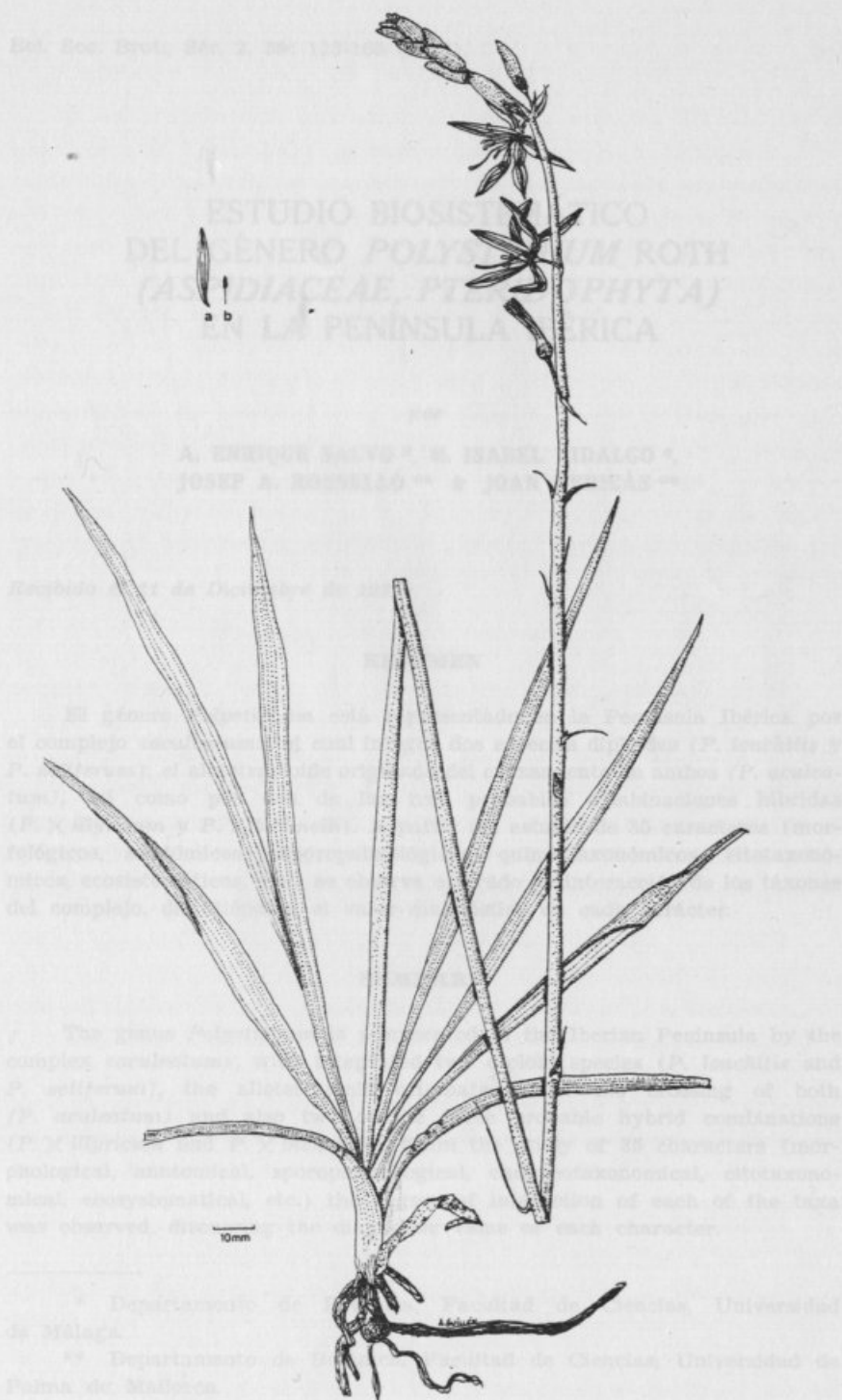
1980 *Anthericum* L. & *Paradisea* Mazzuc. In: T. G. TUTIN & al. (Eds.), *Flora Europaea* **5**: 18. Cambridge.



Detalles de *Paradeisa lusitanica*: c) hoja; d) pedicelo floral, flor y bráctea; e) pétalo; f) estambre.

- PARDO, J. & VALDES, B.
1953 *Revisión de la flora de Sierra de Guadarrama en la Península Ibérica y Islas Baleares*. Pub. Inst. Sevilla.
- PERO HERNÁNDEZ, E.
1931 Aportaciones a la flora de Guadarrama. *Anales Jard. Bot. Madrid* 20: 245-253.
1937 Aportaciones y comentarios sobre la Flora del macizo de Guadarrama. *Anales Jard. Bot. Madrid* 43: 457-458.
- PERO HERNÁNDEZ, E. & T. HERRERA-MAYNÍN
1934 Aportaciones botánicas a los pleistocenos del Sistema Central. *Anales Jard. Bot. Madrid* 40 (2): 235-239.
- PERO HERNÁNDEZ, E., J. SÁNCHEZ-SÁNCHEZ & J. AMICH-GARCÍA
1939 Contribución a la flora del macizo de Guadarrama. *Trab. Dep. Bot. Salamanca* 10: 29-49.
- PERO-MARTÍNEZ, E.
1931 Estudio de la Vegetación y Flora de las Sierras de Guadarrama y Gredos. *Anales Jard. Bot. Madrid* 21 (1): 5-325.
- 1932 De plantas ibéricas nuevas y antiguas nuevas, chorológicas et vegetales. IV. *Anales Jard. Bot. Madrid* 20: 193-202.
- PERO-MARTÍNEZ, E.
1931 Flora de la Provincia de Cáceres. *Cerradilla*.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, J. A. & J. E. HERRERA-MAYNÍN
1934 Estudios botánicos de las montañas castellano-leonesas de la Península Ibérica e Islas Baleares. I. N. L. A. 21: 1-111. Madrid.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, J. A.
1935 Flora y Vegetación de Sierra de Guadarrama (España). Tesis Doctoral, Universidad Salamanca.
- VALDES, FRANCIS, A.
1933 Algunas plantas interesantes de la Sierra de Guadarrama. *Estudo Bot.* 3: 185-200.
- WILLD., D. A.
1800 *Abhandlung L. & Perennial Pflanzen der T. C. Thier- & al. (Eds.). Flora Europaea* 5: 15. Kassel.

Detalles de *Parasitaxia bellanosa*: a) hoja; b) pedicelo floral; flor y bráctea; c) pétalo; d) estambre.



Anthecicum liliago, Pinar de Hoyocasero, Avila (SALA 33.447):
hábito; a) pétalo; b) estambre.



Andropogon distachyos (L.) Stapf (BACA 2247)
habit: a) habit; b) étamine.

ESTUDIO BIOSISTEMÁTICO
DEL GÉNERO *POLYSTICHUM* ROTH
(*ASPIDIACEAE*, *PTERIDOPHYTA*)
EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

por

A. ENRIQUE SALVO *, M. ISABEL HIDALGO *,
JOSEP A. ROSSELLÓ ** & JOAN PERICÁS **

Recibido el 11 de Diciembre de 1985.

RESUMEN

El género *Polystichum* está representado en la Península Ibérica por el complejo «*aculeatum*», el cual integra dos especies diploides (*P. lonchitis* y *P. setiferum*), el alotetraploide originado del cruzamiento de ambos (*P. aculeatum*), así como por dos de las tres probables combinaciones híbridas (*P. × illyricum* y *P. × bicknellii*). A partir del estudio de 35 caracteres (morfológicos, anatómicos, esporopalinológicos, quimiotaxonómicos, citotaxonómicos, ecosistemáticos, etc.) se observa el grado de interacción de los táxones del complejo, discutiéndose el valor diagnóstico de cada carácter.

SUMMARY

The genus *Polystichum* is represented in the Iberian Peninsula by the complex «*aculeatum*», which integrated two diploid species (*P. lonchitis* and *P. setiferum*), the allotetraploid originated from the crossing of both (*P. aculeatum*) and also two of the three probable hybrid combinations (*P. × illyricum* and *P. × bicknellii*). From the study of 35 characters (morphological, anatomical, sporopalynological, chemiotaxonomical, citotaxonomical, ecosystematical, etc.) the degree of interaction of each of the taxa was observed, discussing the diagnostic value of each character.

* Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

** Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Palma de Mallorca.

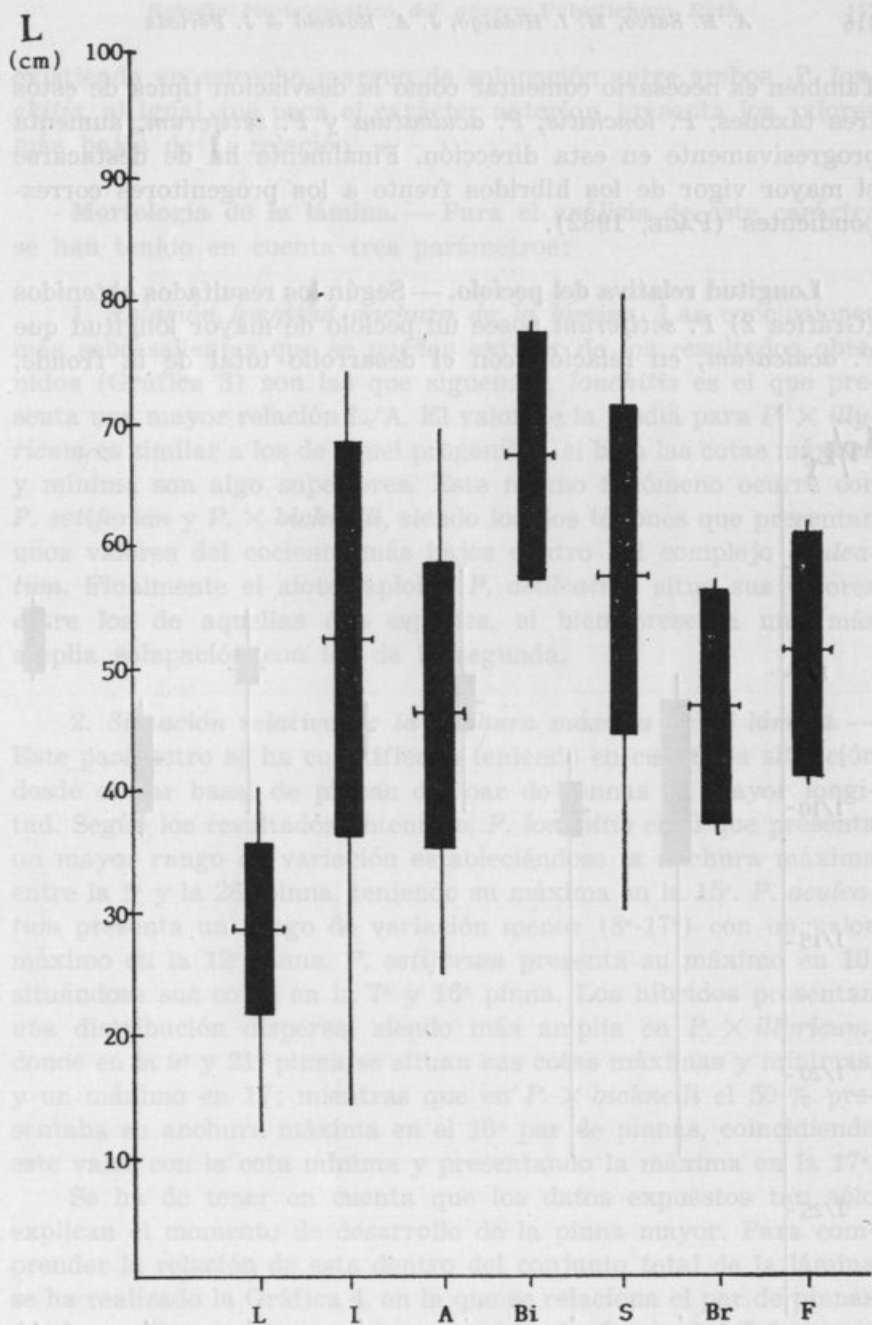
DURANTE las dos últimas décadas las investigaciones pteridológicas han estado enmarcadas por unos tópicos muy definidos en los que los sorprendentes resultados justificaban una continuidad de los mismos, decrementando el valor de los trabajos taxonómicos integrales. Sin embargo es evidente que la conjunción de los resultados por ellos aportados y los ofrecidos por la utilización de técnicas modernas dentro del marco metodológico ortodoxo, no solamente pueden conllevar a un mejor conocimiento de los táxones, sino además a nuevos planteamientos. En este sentido se ha creído oportuno realizar un tratamiento de esta índole con los táxones ibéricos del género *Polystichum*. Al estar perfectamente definido el sistema reticular de especiación en el complejo «*aculeatum*», se pretende observar a través del análisis del mayor número posible de caracteres el comportamiento fenético de los táxones.

ANÁLISIS DE LOS CARACTERES

Para este apartado, además de los cinco táxones ibéricos autóctonos (*P. aculeatum*, *P. lonchitis*, *P. setiferum*, *P. × illyricum* y *P. × bicknelli*), se han tenido en cuenta como elementos de referencia a *P. braunii* y *P. falcatum*. Este segundo taxon, como se reiterará posteriormente, si bien es aceptada su mejor inclusión en el género *Cyrtomium*, sin embargo a efectos de manipulación se mantendrá dentro del género *Polystichum*.

Páleas. — La valoración de las páleas infralaminares como carácter taxonómico tiene interés tanto desde el punto de vista de presencia o no, como de su morfología. Así, mientras que *P. braunii* es paleáceo en la haz y en el envés, las otras tres especies europeas presentan en mayor o menor densidad formaciones paleáceas sólo en su envés. Dentro de estas se observa que en *P. lonchitis* poseen una morfología lanceolada, a diferencia de *P. aculeatum* y *P. setiferum* en las que son mayormente lineares.

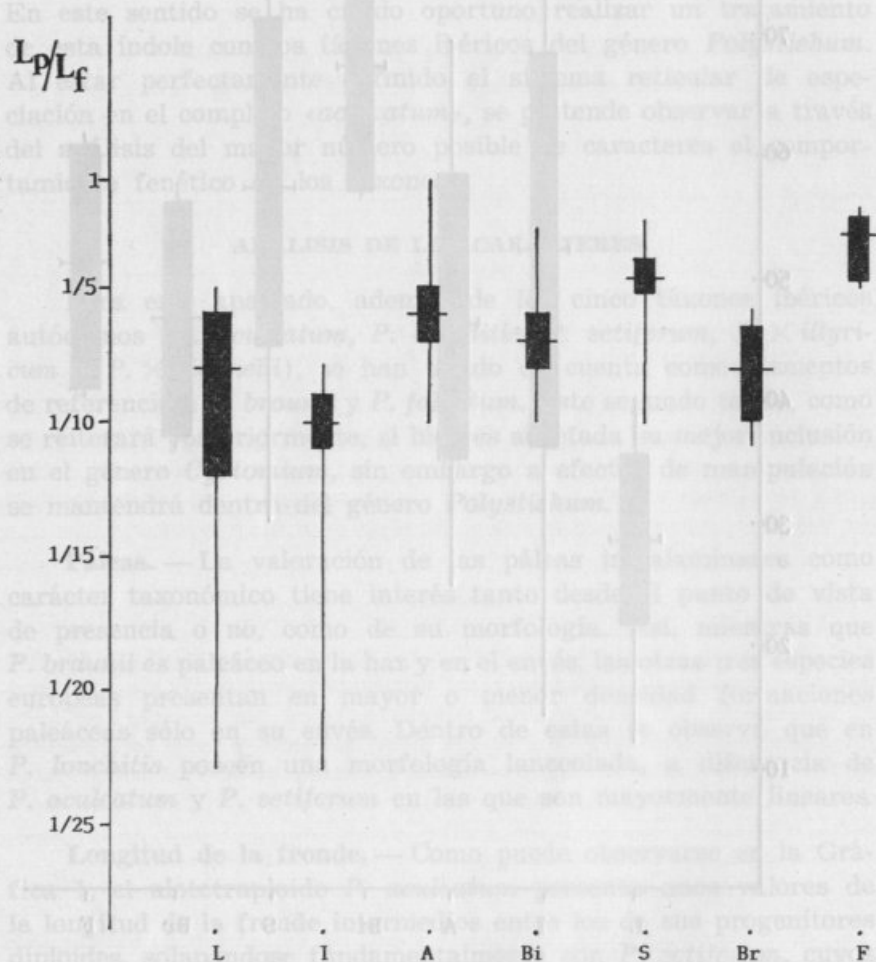
Longitud de la fronde. — Como puede observarse en la Gráfica 1, el alotetraploide *P. aculeatum* presenta unos valores de la longitud de la fronde intermedios entre los de sus progenitores diploides, solapándose fundamentalmente con *P. setiferum*, cuyos valores situados entre la media y la cota mínima coinciden con los de *P. aculeatum* situados entre la media y la cota máxima.



Gráfica 1.—Representación de los rangos de variación de la longitud de la fronde (L: *P. lonchitis*; I: *P. × illyricum*; A: *P. aculeatum*; Bi: *P. × bicknelli*; S: *P. setiferum*; Br: *P. braunii*; F: *P. falcatum*).

También es necesario comentar como la desviación típica de estos tres táxones, *P. lonchitis*, *P. aculeatum* y *P. setiferum*, aumenta progresivamente en esta dirección. Finalmente ha de destacarse el mayor vigor de los híbridos frente a los progenitores correspondientes (PAGE, 1982).

Longitud relativa del peciolo. — Según los resultados obtenidos (Gráfica 2) *P. setiferum* posee un peciolo de mayor longitud que *P. aculeatum*, en relación con el desarrollo total de la fronde,



Gráfica 2. — Representación de los rangos de variación de la longitud del peciolo/longitud de la fronde.

existiendo un estrecho margen de solapación entre ambos. *P. lonchitis*, al igual que para el carácter anterior, presenta los valores más bajos de la relación.

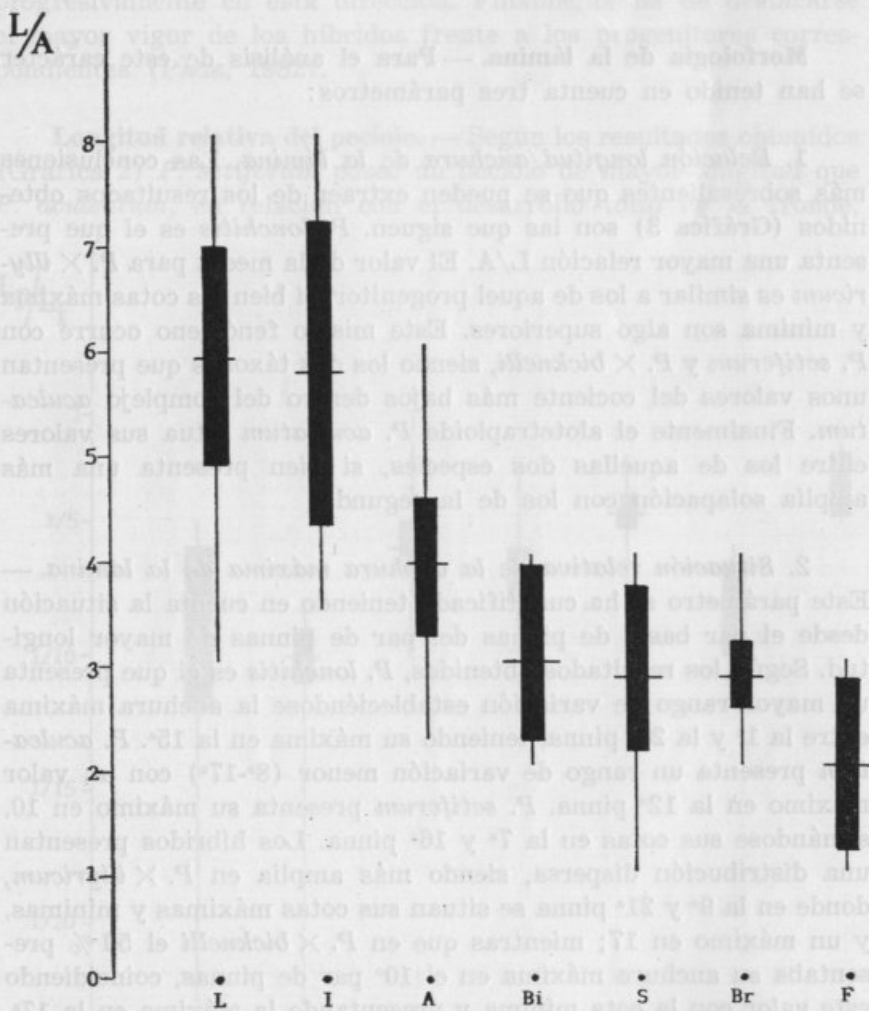
Morfología de la lámina. — Para el análisis de este carácter se han tenido en cuenta tres parámetros:

1. *Relación longitud/anchura de la lámina.* Las conclusiones más sobresalientes que se pueden extraer de los resultados obtenidos (Gráfica 3) son las que siguen. *P. lonchitis* es el que presenta una mayor relación L/A. El valor de la media para *P. × illyricum* es similar a los de aquel progenitor, si bien las cotas máxima y mínima son algo superiores. Este mismo fenómeno ocurre con *P. setiferum* y *P. × bicknelli*, siendo los dos táxones que presentan unos valores del cociente más bajos dentro del complejo *aculeatum*. Finalmente el alotetraploide *P. aculeatum* sitúa sus valores entre los de aquellas dos especies, si bien presenta una más amplia solapación con los de la segunda.

2. *Situación relativa de la anchura máxima de la lámina.* — Este parámetro se ha cuantificado teniendo en cuenta la situación desde el par basal de pinnas del par de pinnas de mayor longitud. Según los resultados obtenidos, *P. lonchitis* es el que presenta un mayor rango de variación estableciéndose la anchura máxima entre la 1ª y la 26ª pinna, teniendo su máxima en la 15ª. *P. aculeatum* presenta un rango de variación menor (8ª-17ª) con un valor máximo en la 12ª pinna. *P. setiferum* presenta su máximo en 10, situándose sus cotas en la 7ª y 16ª pinna. Los híbridos presentan una distribución dispersa, siendo más amplia en *P. × illyricum*, donde en la 9ª y 21ª pinna se sitúan sus cotas máximas y mínimas, y un máximo en 17; mientras que en *P. × bicknelli* el 50 % presentaba su anchura máxima en el 10º par de pinnas, coincidiendo este valor con la cota mínima y presentando la máxima en la 17ª.

Se ha de tener en cuenta que los datos expuestos tan sólo explican el momento de desarrollo de la pinna mayor. Para comprender la relación de esta dentro del conjunto total de la lámina se ha realizado la Gráfica 4, en la que se relaciona el par de pinnas donde se sitúa la pinna mayor respecto al número total de pares de pinnas, pudiéndose deducir que, efectivamente, se establece un gradiente entre las especies *P. lonchitis*, *P. aculeatum* y *P. seti-*

ferum y que los híbridos sitúan sus rangos hacia las cotas máximas de los parentales.



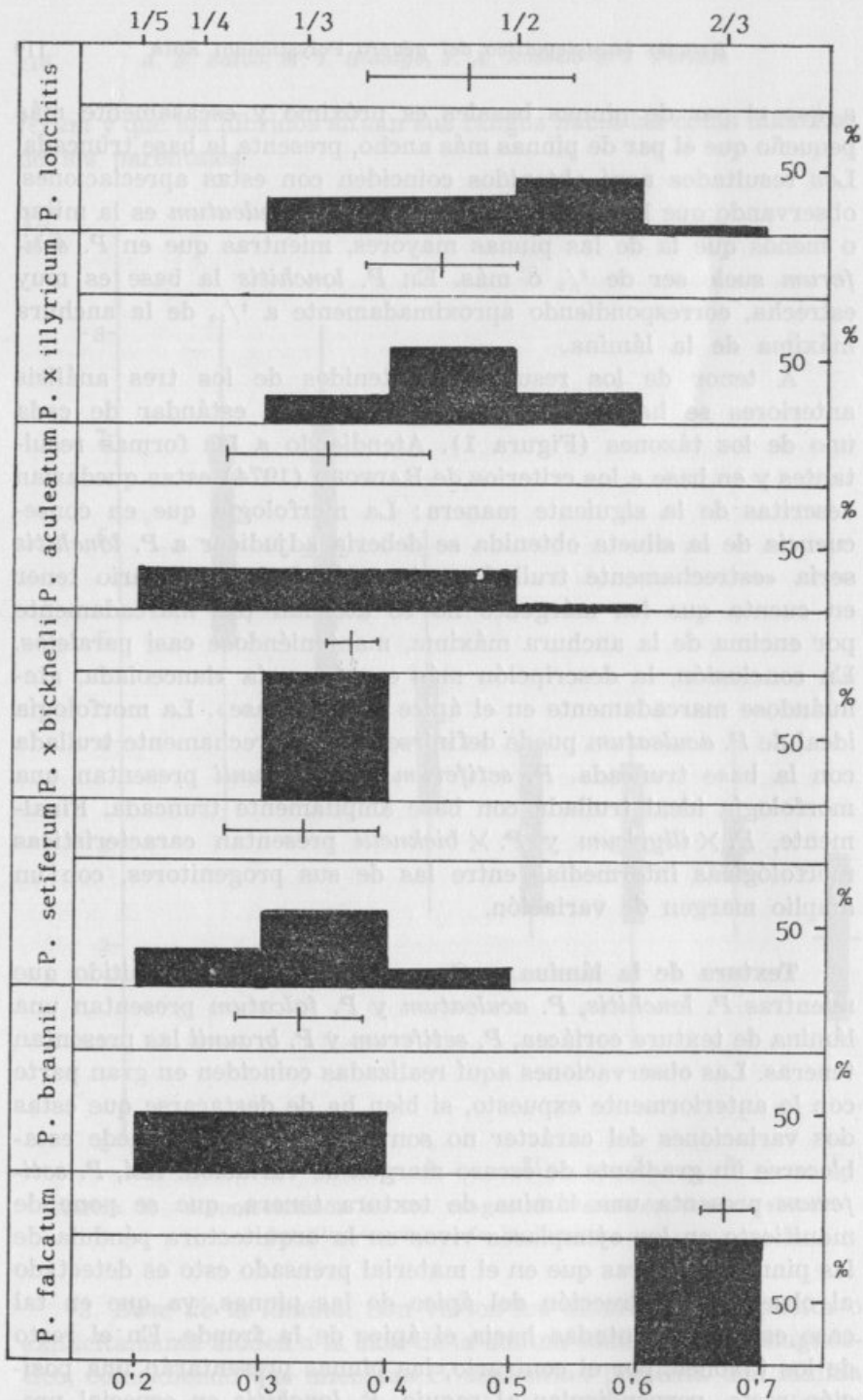
Gráfica 3.— Representación de los rangos de variación de la relación longitud/anchura de la lámina.

3. *Base de la lámina.* Son varios los autores que implícita o explícitamente aluden a la base de la lámina como carácter diagnóstico, coincidiendo que mientras *P. aculeatum* presenta una lámina que se estrecha marcadamente en la base, *P. setiferum*, debido

a que el par de pinnas basales es próximo y escasamente más pequeño que el par de pinnas más ancho, presenta la base truncada. Los resultados aquí obtenidos coinciden con estas apreciaciones, observando que la anchura de la base en *P. aculeatum* es la mitad o menos que la de las pinnas mayores, mientras que en *P. setiferum* suele ser de $\frac{2}{3}$ o más. En *P. lonchitis* la base es muy estrecha, correspondiendo aproximadamente a $\frac{1}{10}$ de la anchura máxima de la lámina.

A tenor de los resultados obtenidos de los tres análisis anteriores se ha reconstruido la morfología estándar de cada uno de los táxones (Figura 1). Atendiendo a las formas resultantes y en base a los criterios de RADFORD (1974) estas quedarían descritas de la siguiente manera: La morfología que en consecuencia de la silueta obtenida se debería adjudicar a *P. lonchitis* sería «estrechamente trullada», sin embargo es necesario tener en cuenta que los márgenes no se atenuan tan marcadamente por encima de la anchura máxima, manteniéndose casi paralelos. En conclusión, la descripción más exacta sería «lanceolada, atenuándose marcadamente en el ápice y en la base». La morfología ideal de *P. aculeatum* puede definirse como estrechamente trullada con la base truncada. *P. setiferum* y *P. braunii* presentan una morfología ideal trullada con base ampliamente truncada. Finalmente, *P. × illyricum* y *P. × bicknelli* presentan características morfológicas intermedias entre las de sus progenitores, con un amplio margen de variación.

Textura de la lámina. — Generalmente se ha admitido que mientras *P. lonchitis*, *P. aculeatum* y *P. falcatum* presentan una lámina de textura coriácea, *P. setiferum* y *P. braunii* las presentan teneras. Las observaciones aquí realizadas coinciden en gran parte con lo anteriormente expuesto, si bien ha de destacarse que estas dos variaciones del carácter no son extremas y que puede establecerse un gradiente de escaso margen de variación. Así, *P. setiferum* presenta una lámina de textura tenera, que se pone de manifiesto en los ejemplares vivos en la arquitectura péndula de las pinnas, mientras que en el material prensado esto es detectado al observar la dirección del ápice de las pinnas, ya que en tal caso estarán orientadas hacia el ápice de la fronde. En el resto de los táxones, por el contrario, las pinnas presentarán una posición recta, perpendicular al raquis. *P. lonchitis* en especial pre-



Gráfica 4. — Histogramas de frecuencia y rangos de variación de la relación situación del par de pinnas mayor respecto al número total de pares de pinnas.

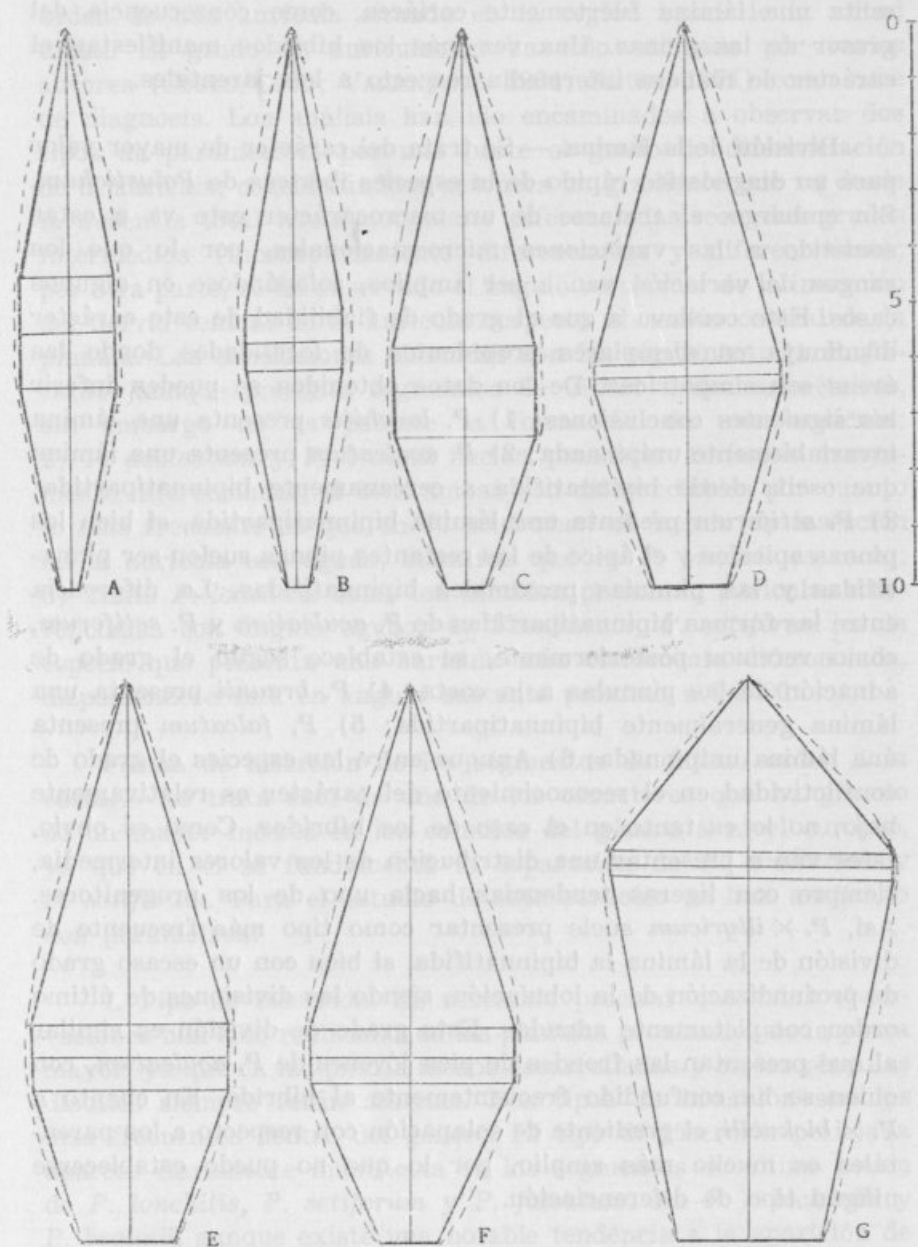


Fig. 1. — Reconstrucción ideal de la morfología estándar de la lámina.
 A: *P. lonchitis*; B: *P. x illyricum*; C: *P. aculeatum*; D: *P. x bicknelli*;
 E: *P. setiferum*; F: *P. braunii*; G: *P. falcatum*.

senta una lámina fuertemente coriácea, como consecuencia del grosor de las pinnas. Una vez más los híbridos manifiestan el carácter de manera intermedia respecto a los parentales.

División de la lámina. — Se trata del carácter de mayor valor para un diagnóstico rápido de la especies ibéricas de *Polystichum*. Sin embargo, al tratarse de un macrocarácter este va a estar sometido a las variaciones microestacionales, por lo que los rangos de variación van a ser amplios, solapándose en algunos casos. Esto conlleva a que el grado de fiabilidad de este carácter disminuya en ejemplares procedentes de localidades donde las áreas son simpátricas. De los datos obtenidos se pueden inferir las siguientes conclusiones: 1) *P. lonchitis* presenta una lámina invariablemente unipinnada; 2) *P. aculeatum* presenta una lámina que oscila desde bipinnatífida a cercanamente bipinnatipartida; 3) *P. setiferum* presenta una lámina bipinnatipartida, si bien las pinnas apicales y el ápice de las restantes pinnas suelen ser pinnatífidas y las pínulas proximales bipinnatífidas. La diferencia entre las formas bipinnatipartidas de *P. aculeatum* y *P. setiferum*, como veremos posteriormente, se establece según el grado de adnación de las pínulas a la costa; 4) *P. braunii* presenta una lámina generalmente bipinnatipartida; 5) *P. falcatum* presenta una lámina unipinnada; 6) Aunque entre las especies el grado de conflictividad en el reconocimiento del carácter es relativamente bajo, no lo es tanto en el caso de los híbridos. Como es obvio, estos van a presentar una distribución de los valores intermedia, siempre con ligeras tendencias hacia uno de los progenitores. Así, *P. × illyricum* suele presentar como tipo más frecuente de división de la lámina la bipinnatífida, si bien con un escaso grado de profundización de la lobulación, siendo las divisiones de último orden completamente adnadas. Este grado de división es similar al que presentan las frondes de pies jóvenes de *P. aculeatum*, con quien se ha confundido frecuentemente al híbrido. En cuanto a *P. × bicknellii*, el gradiente de solapación con respecto a los parentales es mucho más amplio, por lo que no puede establecerse ningún tipo de diferenciación.

Auriculación de los segmentos de último orden. — Una de las características más sobresalientes de este género dentro de las filicofitinas europeas es la presencia en los segmentos de último

orden de una aurícula situada en la región basal de la mitad distal. El grado de auriculación ha sido utilizado por varios autores (COSTE, 1906; VALENTINE, 1964; SLEEP, 1971) como base de diagnosis. Los análisis han ido encaminados a observar dos tipos de parámetros; por una parte el grado de diferenciación de la aurícula, considerándose entonces un gradiente que va desde la ausencia total hasta netamente diferenciadas, con dos grados intermedios (inconspicuamente diferenciadas y diferenciadas); por otra parte, se ha observado el ángulo resultante de la inserción del nervio central de la aurícula respecto al nervio central de la pínula. Las conclusiones obtenidas son las siguientes: 1) *P. falcatum* aunque presenta segmentos de último orden asimétricos, sin embargo no es patente la formación de una aurícula; 2) *P. aculeatum* y *P. braunii* suelen presentar aurículas escasamente diferenciadas, si bien ambas son diferenciables por cuanto lo más frecuente es que en *P. aculeatum* el ángulo de inserción de la aurícula sea agudo, mientras que en *P. braunii* es recto; 3) Tanto *P. lonchitis* como los híbridos presentan aurículas diferenciadas con ángulo agudo; 4) Finalmente, *P. setiferum* es la especie que presenta una aurícula más claramente diferenciada, disponiéndose esta en ángulo bastante próximo a los 90°.

Forma de inserción de los segmentos de último orden a la costa.— Se trata este de uno de los caracteres que ha gozado de un mayor interés en los estudios del género a nivel europeo, ya que en él se fundamenta la separación de *P. aculeatum* y *P. setiferum*. Para el estudio de este carácter se han analizado dos parámetros:

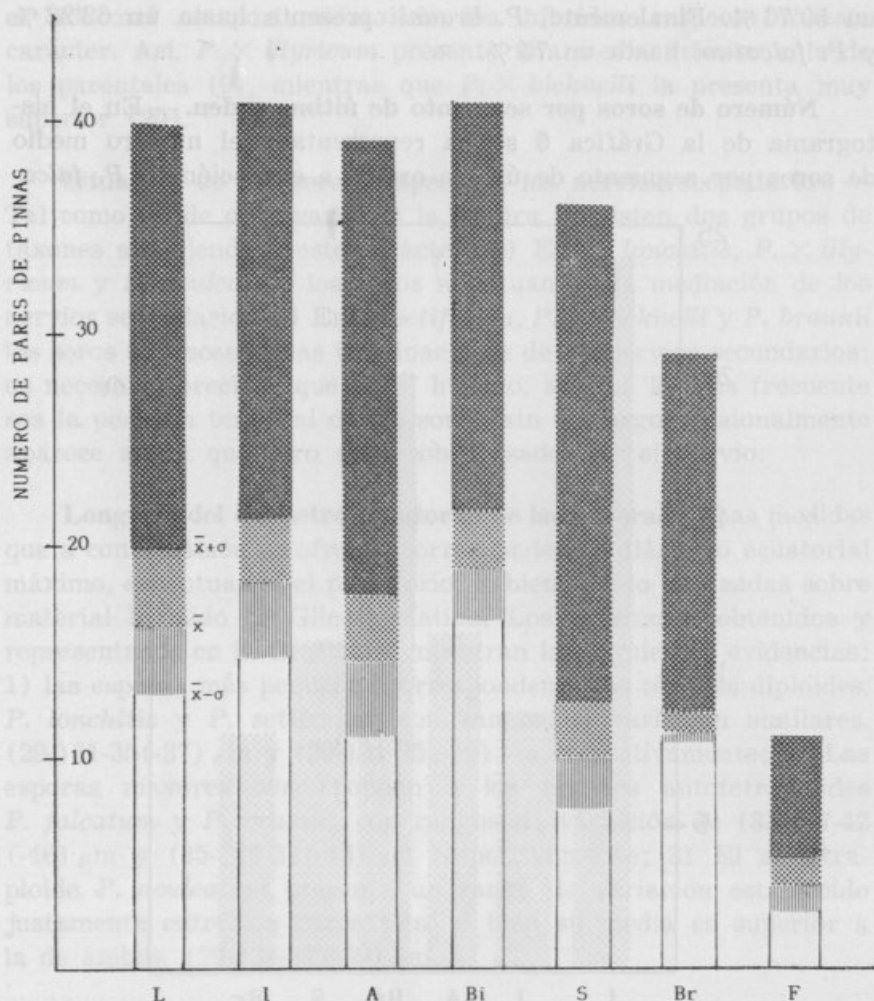
1. *Tipo de inserción.* Es necesario precisar que estas observaciones han sido realizadas en las pínulas proximales de la pinna mayor, ya que en las pinnas menos desarrolladas y en las pínulas distales siempre serán adnatas. Dos tipos de inserción son los más frecuentes dentro del género. El tipo de inserción peciolada aparece claramente manifiesta en los segmentos de último orden de *P. lonchitis*, *P. setiferum* y *P. falcatum*. En *P. × bicknellii* y *P. braunii*, aunque existe una notable tendencia a la aparición de peciólulo en las pínulas, sin embargo en ejemplares pequeños la inserción es adnata. Donde la adnación es más conspicua es en los ejemplares normales de *P. aculeatum*, ya que en los espe-

címenes muy desarrollados existe una clara tendencia a la formación de peciólulo en el que es notable cierta decurrencia. Finalmente, en *P. × illyricum*, al ser escaso el grado de lobulación y por tanto no alcanzar la costa, el tipo de inserción se considera totalmente adnata.

2. *Ángulo de inserción.* El tipo de inserción aguda aparece en los segmentos de último orden de *P. falcatum*, *P. × bicknelli*, *P. braunii* y *P. aculeatum*, mientras que la inserción se produce perpendicularmente en *P. setiferum* y *P. lonchitis*.

Margen de los segmentos de último orden. — Además de los caracteres cualitativos propios del margen, también se ha observado el número de espinas que aparecen en los segmentos de último orden. Los resultados obtenidos muestran que: 1) *P. setiferum* presenta el margen serrado, si bien a veces por ser los dientes ampliamente agudos ofrece una morfología dentada. Los dientes llevan en su ápice una arista corta y blanda. El número de espinas por segmento de último orden oscila entre 8-12; 2) *P. aculeatum* presenta el margen irregularmente serrado, con dientes cortos y agudos. Las espinas son rígidas y cortas, siendo su número por segmento de último orden de 9-13; 3) *P. lonchitis* presenta el margen netamente serrado con dientes largos y estrechamente agudos, en cuyo ápice aparecen duras espinas muy largas, lo que le confiere un aspecto espinoso a la fronde. El número de espinas por segmento de último orden oscila entre 16-32; 4) *P. braunii* presenta el margen dentado, con amplios dientes obtusiúsculos, con espinas grandes y blandas, que en número próximo a 12 aparecen bordeando los segmentos de último orden; 5) *P. falcatum* presenta el margen sinuado crenado, no espinescente; 6) *P. × illyricum* presenta el margen netamente denticulado, al igual que *P. lonchitis*, pero sin embargo las espinas suelen ser más cortas y aparecen en menor cantidad por segmento de último orden (8-12); 7) *P. bicknelli* presenta el margen serrado irregularmente, si bien la diversidad no es tan aparente como en *P. aculeatum*.

Situación de los soros en la lámina. — En la Gráfica 5 se representa la porción de la lámina (cuantificada en número de pares de pinnas) en la que se distribuyen los soros, quedando en blanco la porción permanentemente estéril. Como puede obser-

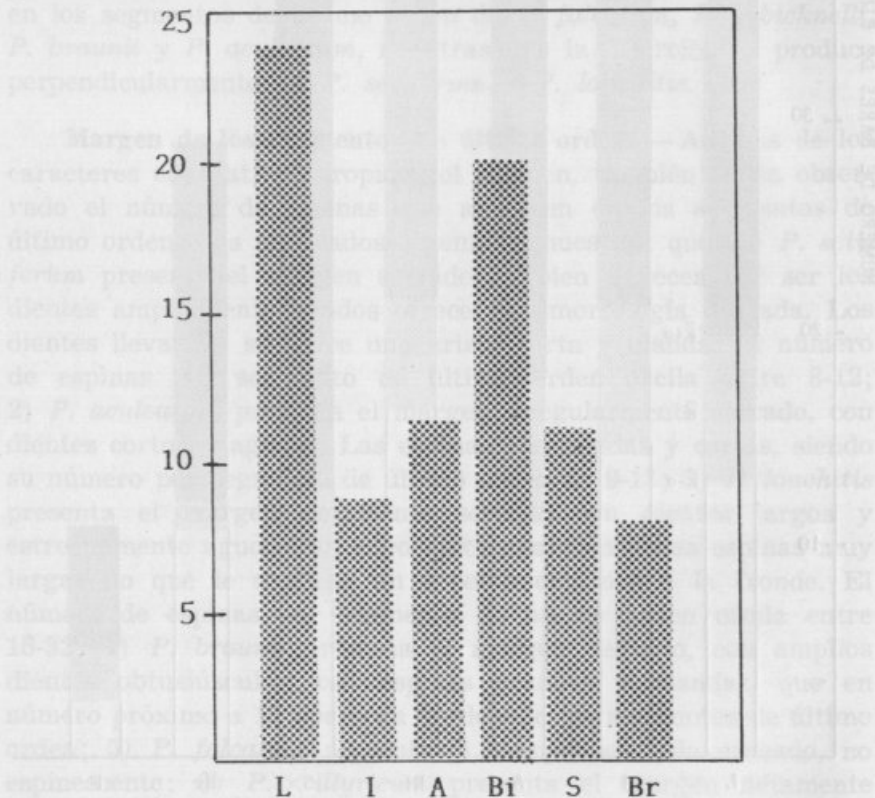


Gráfica 5. — Distribución de los soros en la lámina.

serse la fertilidad se distribuye entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{2}{3}$ superior de la lámina, existiendo escasas variaciones. En *P. lonchitis*, la fertilidad sobrepasa hasta $\frac{2}{3}$ de la lámina (68'75 %), mientras que en *P. setiferum* alcanza los $\frac{4}{5}$ (79'17 %). *P. aculeatum* si bien sitúa sus valores de manera intermedia, sin embargo estos tienden más aproximarse a los de *P. lonchitis*. En cuanto a los híbridos, una vez más los valores sobrepasan a la media de los parentales; así, *P. × illyricum* presenta hasta un 64'25 % fértil y *P. × bicknelli*

un 59'76 %. Finalmente, *P. braunii* presenta hasta un 62'22 % y *P. falcatum* hasta un 75 %.

Número de soros por segmento de último orden. — En el histograma de la Gráfica 6 se ha representado el número medio de soros por segmento de último orden, a excepción de *P. falca-*



Gráfica 6. — Histograma donde se representa el número medio de soros por segmento de último orden.

tum, cuyo número es extremadamente grande y variable. Como puede observarse, *P. lonchitis* es el taxon de los comparados con un mayor número de soros, estableciéndose su media en 23. *P. setiferum* y *P. aculeatum* presentan similares valores medios del número de soros por pínula (12 y 13, respectivamente). *P. braunii* es la especie que menos soros por segmento de último orden presenta, estableciéndose la media en 8. Es necesario destacar

el anormal comportamiento de los híbridos respecto a este carácter. Así, *P. × illyricum* presenta una media inferior a la de los parentales (9), mientras que *P. × bicknelli* la presenta muy superior (20).

Situación de los soros respecto a los nervios secundarios.— Tal como puede observarse en la Figura 2 existen dos grupos de táxones atendiendo a este carácter: 1) En *P. lonchitis*, *P. × illyricum* y *P. aculeatum* los soros se sitúan en la mediación de los nervios secundarios. 2) En *P. setiferum*, *P. × bicknelli* y *P. braunii* los soros aparecen en las terminaciones de los nervios secundarios; es necesario precisar que en el híbrido, aunque lo más frecuente sea la posición terminal de los soros, sin embargo ocasionalmente aparece algún que otro soro sobrepasado por el nervio.

Longitud del diámetro ecuatorial de las esporas.— Las medidas que a continuación se ofrecen corresponden al diámetro ecuatorial máximo, exceptuando el perisporio, habiendo sido realizadas sobre material incluido en Glicerogelatina. Los resultados obtenidos y representados en la Gráfica 7, muestran las siguientes evidencias: 1) las esporas más pequeñas corresponden a los táxones diploides, *P. lonchitis* y *P. setiferum*, con rangos de variación similares, (29-)31-35(-37) μm y (29-)31-35(-39) μm respectivamente; 2) Las esporas mayores corresponden a los táxones autotetraploides *P. falcatum* y *P. braunii*, con rangos de variación de (33-)37-42 (-46) μm y (35-)36-39(-43) μm respectivamente; 3) El alotetraploide *P. aculeatum* presenta un rango de variación establecido justamente entre los parentales, si bien su media es superior a la de ambos, (29-)34-37(-39) μm .

Morfología del perisporio.— Con el fin de llevar a cabo las descripciones lo más completas posible se han realizado dos tipos de análisis dependiendo del instrumento utilizado. Primeramente se efectuó un estudio al microscopio óptico, con el que se pretendía evaluar el color y la estructura general de las esporas. Posteriormente, se realizó un estudio al microscopio electrónico de barrido del perisporio.

1. *Estudio al M. O.* El método seguido para la observación al M. O. fue la preparación en fresco del material y su posterior inclusión en Glicerogelatina. En las Figuras 3 y 4 se muestran las

microfotografías de las esporas de cada uno de los táxones estudiados. Las deducciones que podemos extraer son las siguientes: 1) *P. lonchitis* presenta esporas castaño-oscuras, bilaterales, monoletas, elipsoidales y con perisporio densamente fimbriado; 2) Las de *P. aculeatum* difieren de las de la especie anterior por presentar el perisporio cristulado, de borde dentado; 3) Las esporas de

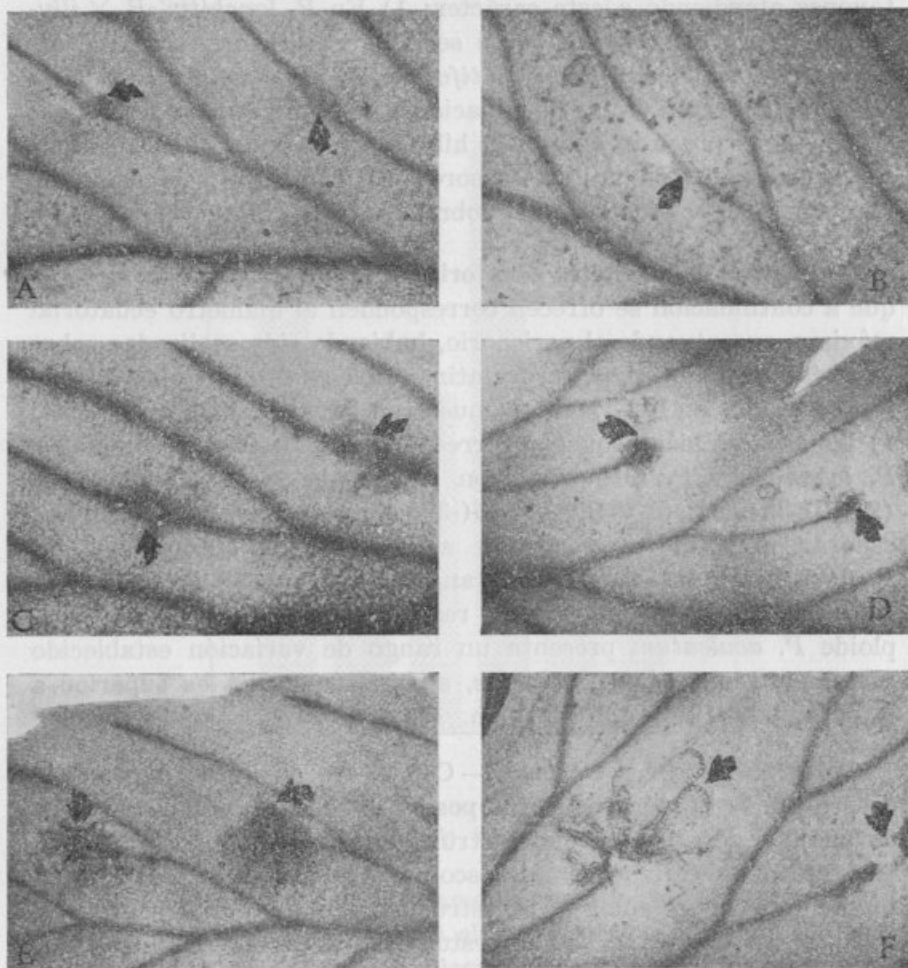
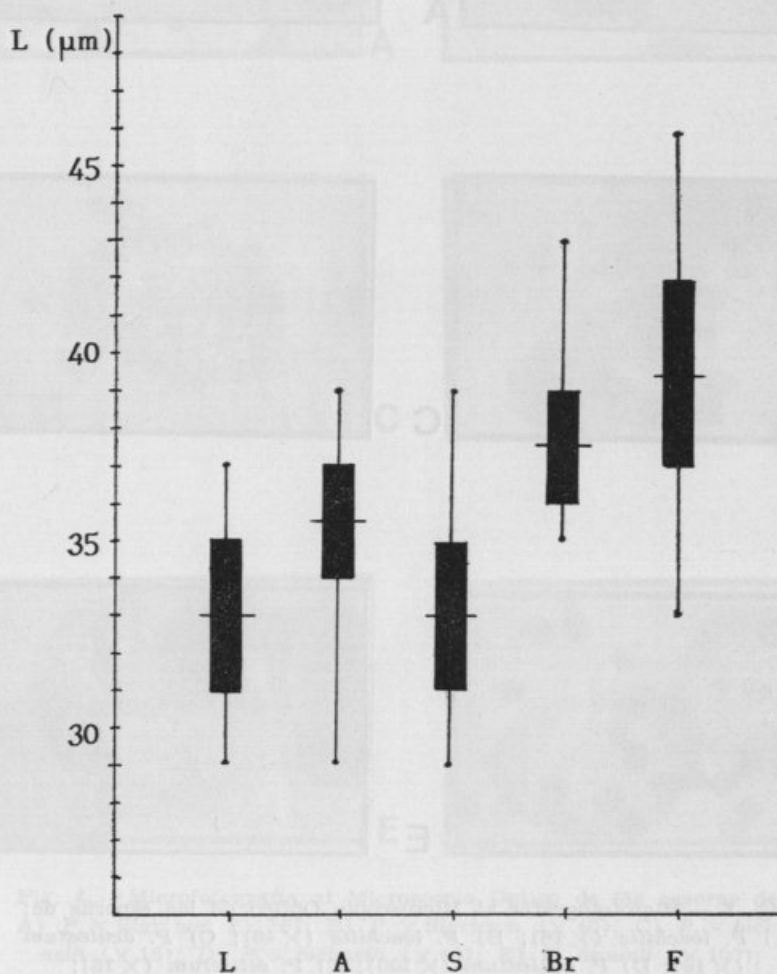


Fig. 2. — Microfotografía de los segmentos de último orden en las que se aprecian la posición de los soros respecto a los nervios secundarios (A: *P. lonchitis*; B: *P. × illyricum*; C: *P. aculeatum*; D: *P. × bicknellii*; E: *P. setiferum*; F: *P. braunii*).

P. setiferum, a diferencia de las anteriores, son castaño-claras, ovoides y con perisporio laxamente crestado, con crestas de borde liso; 4) *P. braunii* presenta esporas castaño-claras, elipsoidales y con perisporio constituido por fibras columniformes que tienden a unirse formando crestas puntiagudas y prominentes; 5) *P. falcatum* presenta esporas castaño-amarillentas, ovoides y con perisporio rugoso con tendencia a formar pequeños pliegues poco prominentes; 6) Los híbridos *P.* × *illyricum* y *P.* × *bicknelli* pre-



Gráfica 7. — Rangos de variación de la longitud del diámetro ecuatorial de las esporas.