

## ASPLENIACEAE DAS ILHAS MACARONÉSICAS — II

ESPOROS DOS TAXA UNIPINADOS DO GÉNERO *ASPLENIUM* L.

por

J. ORMONDE \*

Instituto Botânico da Universidade de Coimbra

Recebido em 30 de Dezembro de 1987.

### RESUMO

Estudou-se a micromorfologia do esporo das espécies de frondes unipinadas de *Asplenium*, grex *trichomanes*, que ocorrem nas Ilhas Macaronésicas e que são *A. anceps*, *A. azoricum*, *A. trichomanes* subsp. *quadriavalens*, *A. monanthes* e *A. marinum*. Supõe-se que *A. azoricum* é uma espécie allotetraplóide cujos progenitores são os taxa diplóides *A. anceps* e *A. trichomanes* subsp. *trichomanes* e que cada uma das espécies, *A. monanthes*, triplóide apogâmica, e *A. marinum*, diplóide, representam linhas evolutivas diferentes.

### ABSTRACT

This paper presents spore micromorphology studies of the unipinates species of *Asplenium*, grex *trichomanes*, from the Macaronesian Islands: *A. anceps*, *A. azoricum*, *A. trichomanes* subsp. *quadriavalens*, *A. monanthes* and *A. marinum*. *A. azoricum* is an allotetraploid species being the diploid progenitors *A. anceps* and *A. trichomanes* subsp. *trichomanes*, and *A. monanthes*, triploid and apogamous, and *A. marinum*, diploid, represent different evolutionary patterns.

### I — INTRODUÇÃO

FOI sobretudo a partir dos anos sessenta que se intensificaram os estudos das *Aspleniaceae* (*Pteridophyta*) das Ilhas Macaronésicas, sendo de realçar os relativos ao género *Asplenium* L.

\* Centro de Fito-sistemática e Fito-ecologia, Ec C2, do Instituto Nacional de Investigação Científica (I. N. I. C.).

Sob o ponto de vista taxonómico e nomenclatural, foram empreendidas investigações em algumas espécies daquele género que ocorrem nos Açores por R. FERNANDES (1980a, b; 1983a, b, c) e nas Canárias por KUNKEL (1966a, b), BENL (1967; 1969) e BENL & SVENTENIUS (1970).

Estudos citotaxonómicos foram efectuados no género *Asplenium* por LOVIS & al. (1977) em taxa dos Açores, SHIVAS (1969) e MANTON & al. (1986) em plantas da Madeira, e BRAITHWAITE (1964) e RASBACH & al. (1981) em espécimes provenientes das Canárias.

São bastante raros os trabalhos palinológicos efectuados em plantas dos arquipélagos macaronésicos. De entre eles, salientamos o estudo relativo ao complexo *A. adiantum-nigrum* das Canárias e da Europa (incluindo a Córsega), realizado sobre o comprimento e a micromorfologia do esporo por BENNERT & al. (1982), visto R. FERNANDES (1984) e ORMONDE (1988) apenas utilizarem o comprimento como uma das características do esporo.

Por outro lado, a maioria dos investigadores que se têm debruçado sobre a micromorfologia do esporo em diversos grupos de *Pteridophyta*, têm-se servido dos seus resultados para estabelecer os caracteres diferenciais de cada uma das espécies afins. Nos últimos anos alguns pteridologistas (NAYAR & DEVI, 1968; TRYON & TRYON, 1973; WOOD, 1973; WAGNER JR, 1974; GASTONY & TRYON, 1976; VIANE & VAN COTTHEM, 1977; DEVI, 1979; PUTTOCK & QUINN, 1980) têm empreendido estudos sobre a estrutura do perisporo em grandes grupos de espécies, géneros e famílias, o que irá permitir entender melhor as interrelações existentes entre os grupos.

No prosseguimento dos nossos estudos (ORMONDE, 1988), pretendemos apresentar neste trabalho os diversos tipos de esporos dos taxa do género *Asplenium* que têm frondes unipinadas e que ocorrem nas Ilhas Macaronésicas. Com esses resultados e outros obtidos em estudos citotaxonómicos como os efectuados por LOVIS & al. (1977), REICHSTEIN & SCHNELLER (REICHSTEIN, 1981), MANTON & al. (1986), RASBACH & al. (1981), QUEIRÓS & ORMONDE (1987), tentamos estabelecer as prováveis relações entre os taxa que são *A. anceps* Solander ex Lowe, *A. azoricum* Lovis, Rasbach & Reichstein, *A. trichomanes* L. subsp. *quadrivalens* Meyer, *A. monanthes* L. e *A. marinum* L.

## II — MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de esporos foram retiradas de frondes férteis maduras provenientes de espécimes pertencentes aos herbários da Secção de História Natural do British Museum (BM) e do Museu, Laboratório e Jardim Botânico de Coimbra (COI) e que foram herborizados em algumas ilhas dos arquipélagos dos Açores e da Madeira.

Para o estudo da forma e da micromorfologia do esporo de cada taxon, os respectivos esporos foram metalizados com uma liga de ouro-paládio e observados com uma lupa electrónica ISI DS-130 com ampliações diversas.

Seguimos a nomenclatura palinológica utilizada por CIAMPOLINI (FERRARINI & *al.*, 1986), recorrendo-nos por vezes de alguns termos que foram propostos por NAYAR & DEVI (1964) e por VIANE & VAN COTTHEM (1977).

A ordenação das espécies foi baseada no grau de afinidade que se considera existir entre elas segundo as características morfológicas e as evidenciadas pelas pesquisas citogenéticas que reconheceram os progenitores e os processos de especiação, semelhante à que foi utilizada por PICHI-SERMOLLI para a flora italiana em 1986 (FERRARINI & *al.*, *op. cit.*).

As várias ilhas são designadas por abreviaturas iguais ou semelhantes às que foram convencionadas por *The Committee for Mapping the Flora of Europe*, com sede em Helsínquia (Finlândia) e que foram utilizadas por FRANCO em 1971 e por JALAS & SUOMINEM em 1972 para as ilhas dos Açores.

## III — OBSERVAÇÕES

Embora nos tenhamos proposto estudar a forma e a micromorfologia do esporo das espécies do grex *trichomanes* do género *Asplenium*, devemos dizer que os esporos de todas as espécies dos outros grupos que ocorrem nas Ilhas Macaronésicas são bilaterais simétricos e costado-alados.

No grex *trichomanes*, todas as espécies apresentam esporos biconvexos, de perfil elíptico quando vistos pela face distal, de perfil ligeiramente reniforme quando em vista lateral e de perfil circular a elíptico quando em vista polar.

**1 — *Asplenium anceps* Solander ex Lowe**

MAD — Rabaçal, pr. do Risco, 1045 m alt., 6.VIII.1970, *G. Benl* 8062 (BM) (Est. I A-D).

Pregas baixas e grossas, de cristas lisas, anastomosando-se formando grandes aréolas de formas irregulares; superfície das aréolas lofo-reticulada, da qual se elevam curtas protuberâncias mais ou menos agudas anastomosando-se por vezes.

**2 — *Asplenium azoricum* Lovis, Rasbach & Reichstein**

TER — Terra Chã, Canada do Negro, 5.I.1973, *Ormonde* (COI) (Est. II A-D).

Pregas baixas e irregularmente grossas, de cristas angulares, anastomosando-se e formando aréolas relativamente grandes; superfície das aréolas irregularmente lofo-retículo-venulada, podendo surgir nos nós do retículo algumas protuberâncias mais ou menos agudas, anastomosando-se por vezes.

**3 — *Asplenium trichomanes* L. subsp. *quadrivalens* D. E. Meyer**

JOR — Manadas, Ladeiras, na Estrada Calheta-Velas, 125 m alt., 4.VII.1974, *Ormonde* 1473 (COI) (Est. III A-C).

Pregas altas e irregularmente grossas, de cristas ligeiramente onduladas, anastomosando-se e formando aréolas bastante profundas; superfície das aréolas reticulado-venulada, podendo surgir nos nós do retículo no centro das aréolas protuberâncias agudas, podendo estas anastomosar-se.

**4 — *Asplenium monanthes* L.**

FAI — Cabeço do Fogo, 500 m alt., 25.X.1962, *B. Gonçalves* 765 (BM) (Est. IV A-D).

Pregas altas e finas, de cristas miudamente dentadas, anastomosando-se e formando numerosas aréolas de formas sinuosas; superfície das aréolas foveo-reticulada com pequenas protuberâncias baculares podendo anastomosar-se formando pequenas pregas de cristas angulares.

5 — *Asplenium marinum* L.

PIC — Entre o Porto da Madalena e a Ponta do Arieiro, ca. 10 m alt., 15.VIII.1985, Ormonde 2385 (COI) (Est. V A-C).

Pregas irregularmente altas e finas, providas de protuberâncias irregulares nas costas, de cristas angulares com uma ou outra protuberância, parcialmente anastomosadas de modo a formar aréolas incompletas; superfície do perisporo lofo-reticulada até à base das pregas e provida com algumas protuberâncias irregulares.

## IV — DISCUSSÃO

Admitindo o género *Asplenium* tal como é circunscrito por PICHI-SERMDLLI (1977) e baseados no quadro em que SALVO (1982) põe em evidência as relações e os processos microevolutivos que terão dado lugar às actuais Aspleniáceas ibéricas e na divisão que este último autor faz do género, consideramos a existência de quatro grupos de espécies, grex na designação de SALVO (op. cit.), com o mesmo tipo de fronde e que ocorrem nas Ilhas Macaronésicas.

A ordenação dos grupos baseia-se na hipótese de que os fetos com frondes divididas são mais primitivos do que as formas com frondes inteiras. Esta opinião foi apresentada por TRYON quando, em 1964, estudou a filogénese da fronde e foi aceite por SALVO (op. cit.), SALVO & al. (1982) e por QUEIRÓS & ORMONDE (1987). Critério semelhante foi seguido por PICHI-SERMOLLI (1977) para a ordenação dos géneros do seu sistema de classificação e pelo mesmo autor para a das espécies do género *Asplenium* que fazem parte da flora italiana (FERRARINI & al., op. cit.).

O primeiro grupo é constituído por espécies cujas frondes são 2 a 4-pinadas e que na Macaronésia são *A. onopteris* L., *A. adiantum-nigrum* L., *A. billotii* F. W. Schultz e *A. aethiopicum* (N. L. Burm.) Becherer. É designado grex *adiantum-nigrum* por SALVO (op. cit.).

Do segundo grupo fazem parte as espécies em que as frondes são unipinadas, ocorrendo naquela região *A. anceps* Solander ex Lowe, *A. azoricum* Lovis, Rasbach & Reichstein, *A. trichomanes* L. subsp. *quadrivalens* D. Meyer, *A. monanthes* L. e *A. marinum* L. É o grex *trichomanes* na designação de SALVO (op. cit.).

No terceiro grupo integramos as espécies com frondes geralmente divididas 1 a 2-dicotomicamente, às vezes simples, como em *A. septentrionale* (L.) Hoffm. subsp. *septentrionale* e *Asplenium* sp. (hexaploide, Madeira). SALVO (op. cit.) designa-o por *grex septentrionale*.

Agrupamos no quarto grupo as espécies com frondes simples, sendo *A. hemionitis* L. o seu único representante nos arquipélagos macaronésicos. Segundo SALVO (op. cit.), é o *grex hemionitis*.

Em trabalho anterior (ORMONDE, 1988) tínhamos verificado que havia uma relação entre o comprimento dos esporos e a morfologia das frondes relativamente a cada uma das espécies dos diversos grupos em que dividimos o género *Asplenium*. Embora a relação entre o grau de poliplóidia e o comprimento do esporo fosse mais evidente para cada uma das espécies estudadas, o estudo efectuado no *grex trichomanes* revelou que *A. anceps*, espécie diplóide (LOVIS & al., 1977; RASBACH & al., 1981; MANTON & al., 1986) e *A. azoricum*, espécie alotetraplóide (LOVIS & al., op. cit.), tinham um tamanho quase igual, com  $27,896 \mu\text{m} \pm 2,743 \mu\text{m}$  e com  $30,038 \mu\text{m} \pm 2,648 \mu\text{m}$  respectivamente (ORMONDE, op. cit.).

As investigações sobre a estrutura do perispofo que empreendemos, e baseando-nos na classificação para os diversos tipos de esporos proposto por PUTTOCK & QUINN (1980) para as Aspleniaceae da Austrália e da Malásia, parecem revelar que *A. azoricum* será uma espécie alotetraplóide em que *A. anceps* é um dos progenitores (REICHSTEIN & SCHNELLER in REICHSTEIN, 1981), podendo ser o outro progenitor qualquer das subespécies diplóides de *A. trichomanes*.

A superfície do perispofo nas aréolas de *A. azoricum* é lofo-reticulada como em *A. anceps*, embora menos densamente, e é venulada e com protuberâncias mais ou menos agudas nos nós do retículo da parte central das aréolas, podendo aquelas anastomosar-se, tal como encontramos em *A. trichomanes* subsp. *trichomanes* (TIGERSCHIÖLD, 1981; FERRARINI & al., op. cit.: NYHUS, 1987). Este carácter venulado com protuberâncias nas aréolas observamo-lo na subespécie autotetraplóide *quadrivalens* (FERRARINI & al., op. cit.; NYHUS, op. cit.; QUEIRÓS & ORMONDE, 1988). Nesta subespécie e em *A. azoricum* as aréolas são mais pequenas e mais numerosas do que em *A. trichomanes* subsp. *trichomanes*.

No entanto devemos salientar que as imagens por nós obtidas estão inteiramente de harmonia com as de TIGERSCHIÖLD (op. cit.)

e NYHUS (op. cit.), mas um pouco diferentes das apresentadas em FERRARINI & al. (1986).

Continuando a aplicar a classificação de PUTTOCK & QUINN (op. cit.), parece-nos que *A. monanthes*, espécie triplóide e apogâmica (LOVIS & al., op. cit.; MANTON & al., op. cit.) representa uma outra linha evolutiva no grex *trichomanes*. Esta espécie apresenta um tipo de esporos diferente do das outras espécies. As pregas têm cristas miudamente dentadas e pequenas pregas entre as numerosas aréolas, e nestas a superfície do perisporo é esparsamente foveo-reticulada.

Em *A. marinum*, espécie diplóide (MANTON & al., op. cit.; QUEIRÓS & ORMONDE, 1988), vamos encontrar um outro tipo de esporo que poderá representar outra linha de evolução, talvez já estabilizada, no grupo de espécies que estudámos. A superfície do perisporo é provida de protuberâncias irregulares desigualmente distribuídas e é lofo-reticulada até à base das pregas, sendo as aréolas incompletas.

#### AGRADECIMENTOS

Estamos profundamente gratos à Prof. D.<sup>ra</sup> CARMEN PRADA, do Departamento de Botânica da Universidade Complutense de Madrid, pelos valiosos esclarecimentos que por várias ocasiões teve a amabilidade de nos prestar, à D.<sup>ra</sup> ISABEL NOGUEIRA e Dr. JORGE PAIVA pelas discussões por vezes acaloradas mas esclarecedoras que mantivemos, ao Prof. Dr. ABÍLIO FERNANDES pela paciência com que nos escutou e encorajou, e à Prof. D.<sup>ra</sup> TERESA ALMEIDA todo o seu apoio e incentivo que nos deu na execução deste nosso trabalho.

Ao Prof. Eng.<sup>o</sup> MIGUEL MOTA, do Departamento de Microscopia Electrónica da Estação Agronómica Nacional, Oeiras, queremos manifestar o nosso profundo reconhecimento por ter permitido utilizar a L. E. sem a qual dificilmente poderíamos levar a bom termo o nosso estudo.

#### BIBLIOGRAFIA

BENL, G.

1967 Die Farne der Insel Tenerife. *Nova Hedwigia* 14 (1): 69-105.

1969 Zur Variabilität der Blattgestalt bei *Asplenium hemionitis* L. *Ber. Naturwiss. Ges. Bayreuth* 18: 63-68.

BENL, G. & SVENTENIUS, E. R.

- 1970 Beiträge zur Kenntnis der Pteridophyten Vegetation und — Flora in der Kanarischen Westprovinz (Tenerife, La Palma, Gomera, Hierro). *Nova Hedwigia* 20 (3-4): 413-462.

BENNERT, H. W., JÄGER, W. & THEREN, G.

- 1982 Sporenmerkmale von Sippen der *Asplenium adiantum-nigrum* — Komplexes und ihre systematische Bedeutung. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 95 (2): 297-312.

BRAITHWARTE, A. F.

- 1964 A new type of apogony in ferns. *New Phytol.* 63 (3): 293-305.

DEVI, S.

- 1979 Spores types, morphological evolution and phylogeny in the Pteridaceae. *Grana* 18 (1): 41-46.

FERNANDES, R.

- 1980a *Asplenium hemionitis* (Aspleniaceae). Fernandes, A. & Fernandes, R. (ed.), *Iconogr. Sel. Fl. Azoricae* 1 (1): 90-96, tab. XVIII.

- 1980b *Asplenium azoricum* (Aspleniaceae). Fernandes, A. & Fernandes, R. (ed.), *Iconogr. Sel. Fl. Azoricae* 1 (1): 97-101, tab. XIX.

- 1983a *Asplenium billotii* (Aspleniaceae). Fernandes, A. & Fernandes, R. (ed.), *Iconogr. Sel. Fl. Azoricae* 1 (2): 199-202, tab. XXXVII.

- 1983b *Asplenium adiantum-nigrum* (Aspleniaceae). Fernandes, A. & Fernandes, R. (ed.), *Iconogr. Sel. Fl. Azoricae* 1 (2): 205-209, tab. XXXVIII.

- 1983c *Asplenium onopteris* (Aspleniaceae). Fernandes, A. & Fernandes, R. (ed.), *Iconogr. Sel. Fl. Azoricae* 1 (2): 211-214, tab. XXXIX.

- 1984 Sur l'occurrence de l'*Asplenium adiantum-nigrum* L. aux Açores. *Mem. Soc. Brot.* 27: 5-26.

FERRARINI, E., CIAMPOLINI, F., PICHI-SERMOLLI, R. E. G. & MARCHETTI, D.

- 1986 Iconographia Palynologia Pteridophytorum Italiae. *Webbia* 49 (1): 1-202.

FRANCO, J. A.

- 1971 Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Lycopodiaceae-Umbelliferae. Lisboa.

GASTONY, G. J. & TRYON, R. M.

- 1976 Spore morphology in the Cyatheaceae. II. The genera *Lophosoria*, *Metajuga*, *Sphaeropteris*, *Alsophila*, and *Nephalea*. *Am. J. Bot.* 63 (6): 738-758.

JALAS, J. & SUOMINEN, J. (ed.)

- 1972 Atlas Florae Europaeae I. Pteridophyta. Helsinki.

KUNKEL, G.

- 1966a Eine monströse Form von *Asplenium hemionitis* 2.: f. *cristatum*. *Nova Hedwigia* 11 (1-4): 351-352.

- 1966b Zur Pteridophyten flore der Insel Gran Canaria. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 76: 42-58.

LOVIS, J. D., RASBACH, H., RASBACH, K. & REICHSTEIN, T.

- 1977 *Asplenium azoricum* and other ferns of the *A. trichomanes* group from the Azores. *Am. Fern. J.* 67 (3): 81-93.



- MANTON, J., LOVIS, J. D., VIDE, G. & GIBBY, M.  
1986 Cytology of the fern flore of Madeira. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 15 (2): 123-161.
- NAYAR, B. K. & DEVI, S.  
1964 Spore morphology of Indian Ferns II. Aspleniaceae and Blechnaceae. *Grana Pal.* 5 (2): 222-246.  
1968 Spore morphology of the Pteridaceae. IV. Taxonomic and phyletic considerations. *Grana Pal.* 8 (2-3): 517-535.
- NYHUS, G. C.  
1987 The subspecies of *Asplenium* in Norway. *Blyttia* 45 (1): 12-24.
- ORMONDE, J.  
1988 Aspleniaceae das Ilhas Macaronésicas. I. Frondes e esporos (comprimimento). *An. Jard. Bot. Madrid* 45 (in publ.).
- PICHI-SERMOLLI, R. E. G.  
1977 Tentamen Pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. *Webbia* 31 (2): 313-512.
- PUTTOCK, C. F. & QUINN, C. J.  
1980 Perispore morphology and the taxonomy of the Australian Aspleniaceae. *Aust. J. Bot.* 28 (3): 305-322.
- QUEIRÓS, M. & ORMONDE, J.  
1987 Contribuição para o conhecimento citotaxonómico da flora dos Açores. III. *Rev. Biol. Univ. Aveiro* 1: 31-46.  
1988 Estudo citotaxonómico de *Asplenium trichomanes* L. em Portugal. *An. Jard. Bot. Madrid* 45 (in publ.).
- RASBACH, H., RASBACH, K. & SCHNELLER, J. J.  
1981 A chromosome count for *Asplenium anceps* from the Canary Islands. *Fern Gaz.* 12 (3): 157-159.
- REICHSTEIN, T.  
1981 Hybrids in European Aspleniaceae (Pteridophyta). *Bot. Helvetica* 91: 89-139.
- SALVO TIERRA, A. E.  
1982 Flora Pteridofítica da Andalucía. Málaga.
- SALVO, A. E., PRADO, C. & DIAZ, T.  
1982 Revision del género *Asplenium* L., subgénero *Pleurosorus* (Fée) Salvo, Prado & Diaz. *Candollea* 37 (2): 4437-484.
- SHIVAS, M. G.  
1969 A cytotaxonomic study of the *Asplenium adiantum-nigrum* complex. *Brit. Fern Gaz.* 10 (2): 68-79.
- TIGERSCHIÖLD, E.  
1981 The *Asplenium trichomanes* in East Central Sweden. *Nord. J. Bot.* 1 (1): 12-16.
- TRYON, R. M.  
1964 Evolution in the leaf of living ferns. *Mem. Torrey Bot. Club* 21: 75-85.
- TRYON, R. M. & TRYON, A. F.  
1973 Geography, spores and evolutionary relations in the cheilantoid ferns. Jermy, A. C., Crable, J. A. & Thomas, B. A. (ed.), the Phylogeny

and classification of the Ferns in *Bot. J. Linn. Soc.* **87**, Suppl. 1: 145-153.

VIANE, R. & VAN COTTHEM, W.

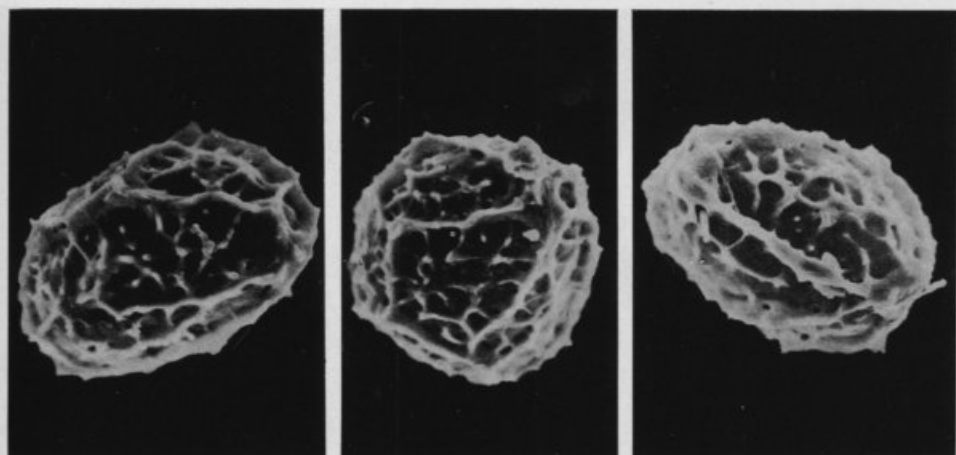
1977 Spore morphology and stomatal characters of some kenyan *Asplenium* — species. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **90** (1-2): 219-239.

WAGNER JR, W. H.

1974 Structure of spores in relation to fern phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **81** (2): 332-353.

WOOD, C. C.

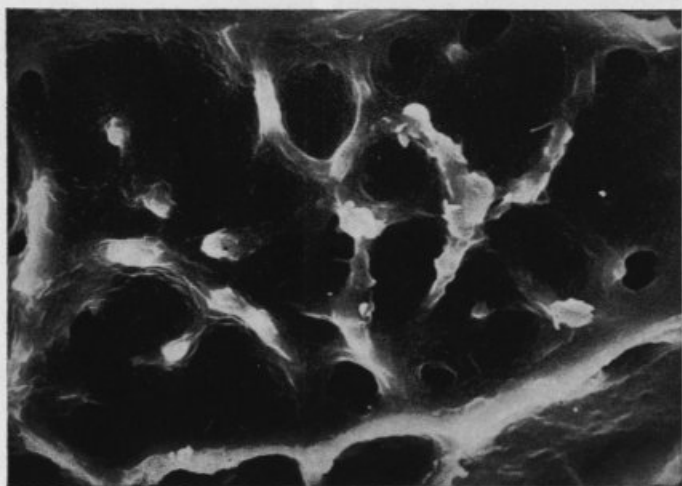
1973 Spore variation in the Thelypteridaceae. Jermy, A. C., Crable, J. A. & Thomas, B. A. (ed.), the Phylogeny and Classification of the Ferns in *Bot. J. Linn. Soc.* **67**, Suppl. 1: 191-201.



A

B

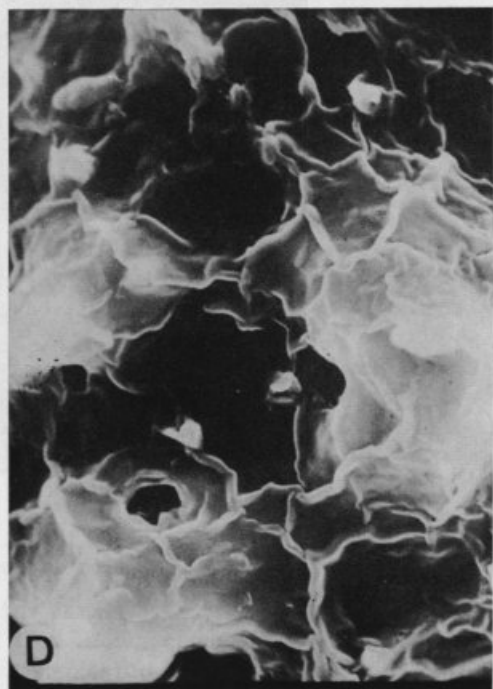
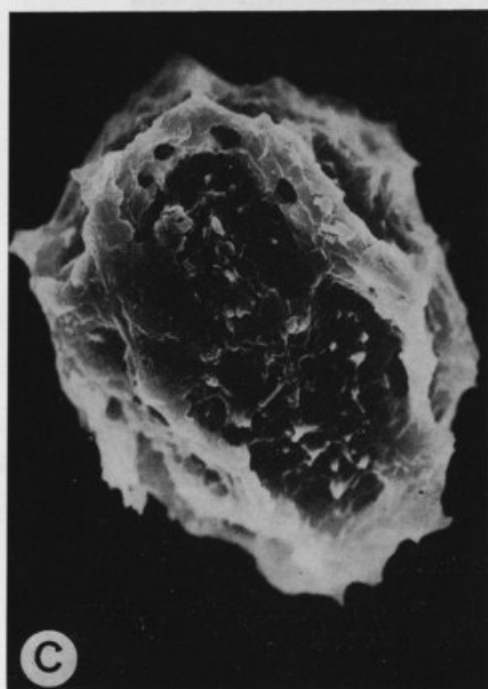
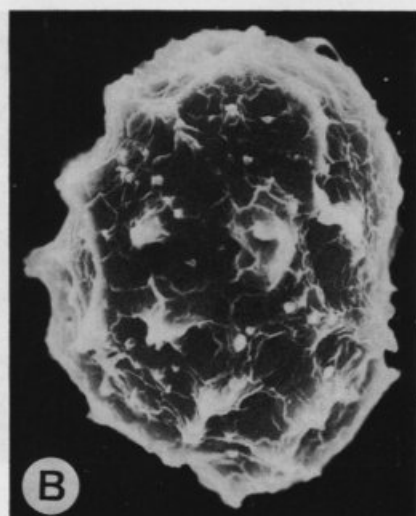
C



D

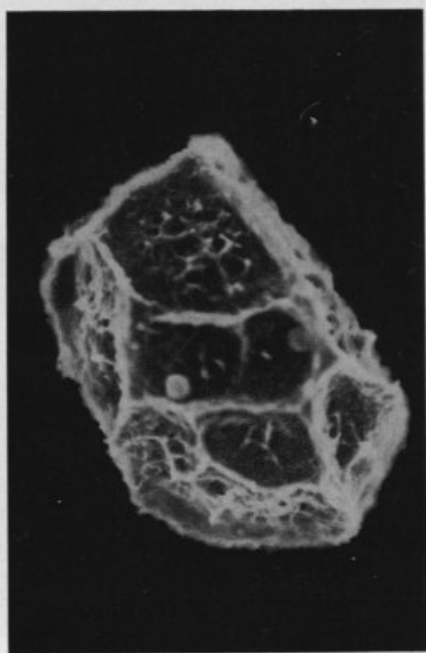
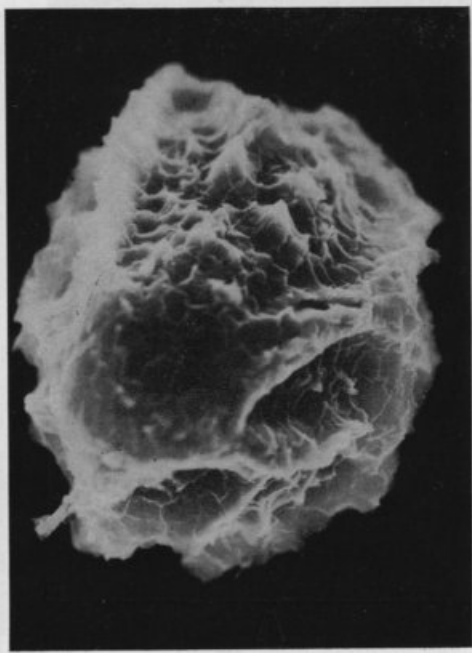
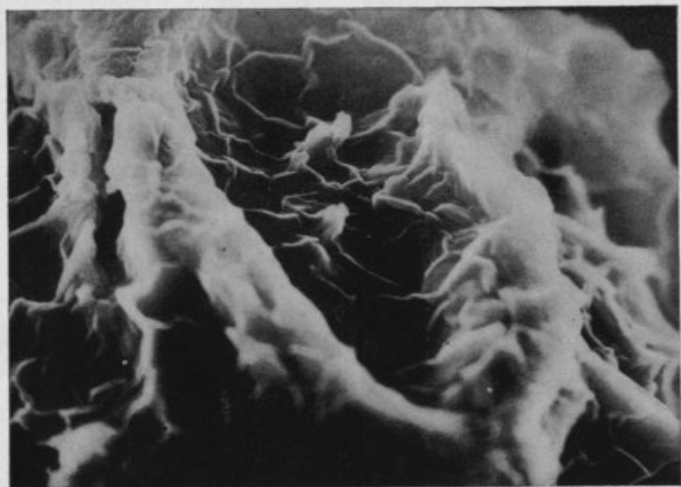
Esporos de *Asplenium anceps*

A. vista distal, B. vista polar, C. vista proximal, D. superfície do perisporo numa aréola. A-C  $\times 2080$  e D  $\times 8010$ .



Esporos de *Asplenium azoricum*

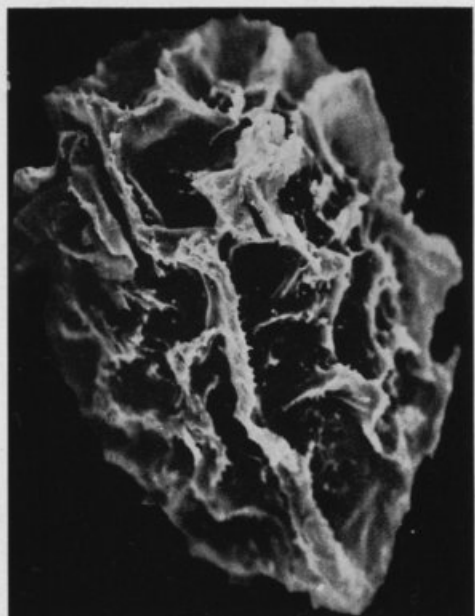
A. vista lateral, B. vista polar, C. vista proximal, D. superfície do perisporo numa aréola. A-C  $\times 3090$  e D  $\times 10\ 800$ .

**A****B****C**

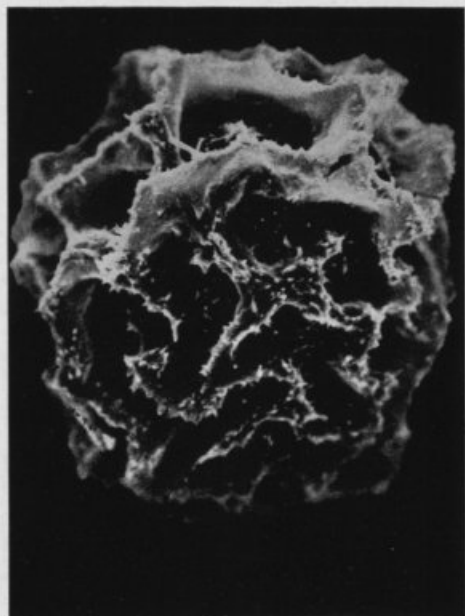
Esposos de *Asplenium trichomanes* subsp. *quadrivalens*

A. vista lateral, B. vista polar, C. superfície do perispoço numa aréola.

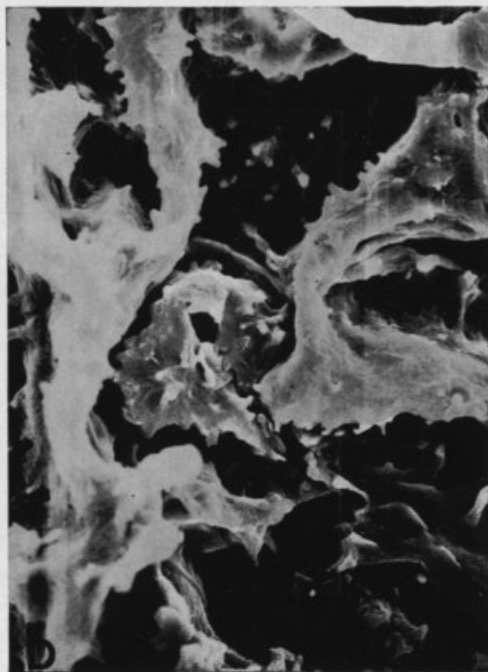
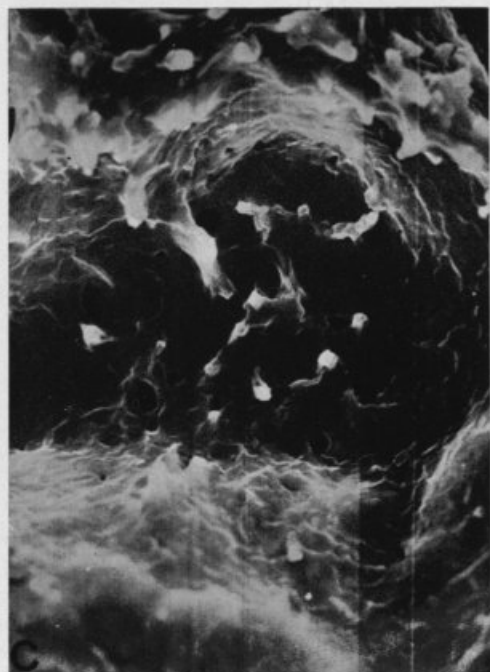
A  $\times 2080$ , B  $\times 3090$  e C  $\times 8010$ .



A

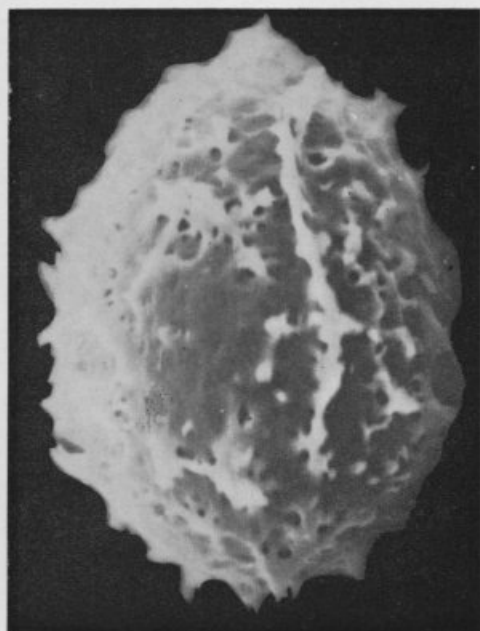


B

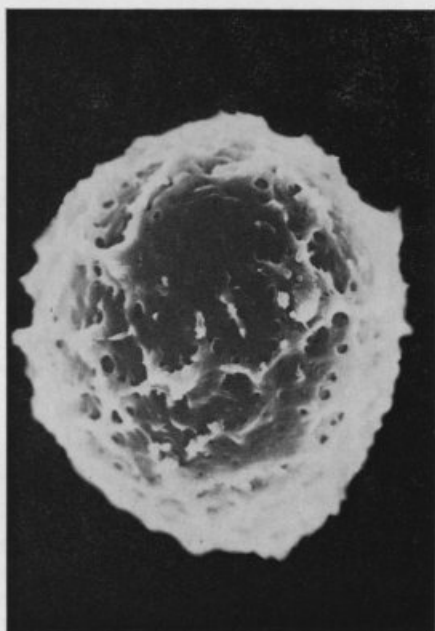


Esposos de *Asplenium monanthes*

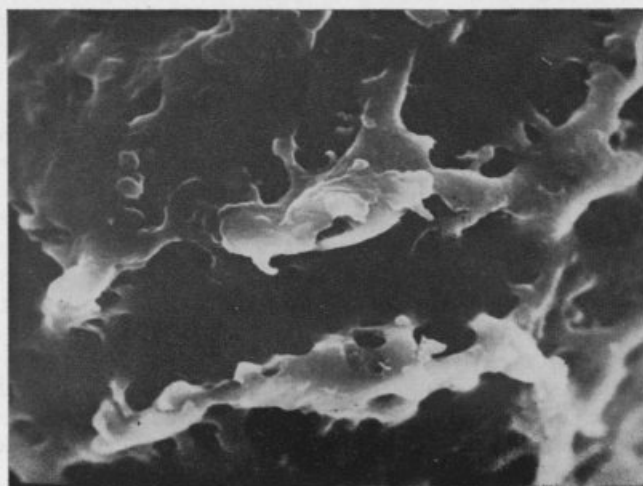
A vista proximal, B. vista polar, C. superfície do perisporo na área de contacto.  
 A e B  $\times 2080$ , C  $\times 10\ 800$  e D  $\times 5060$ .



A



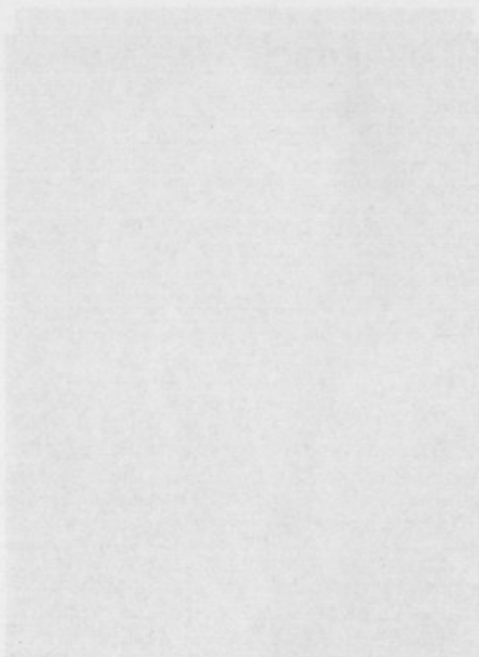
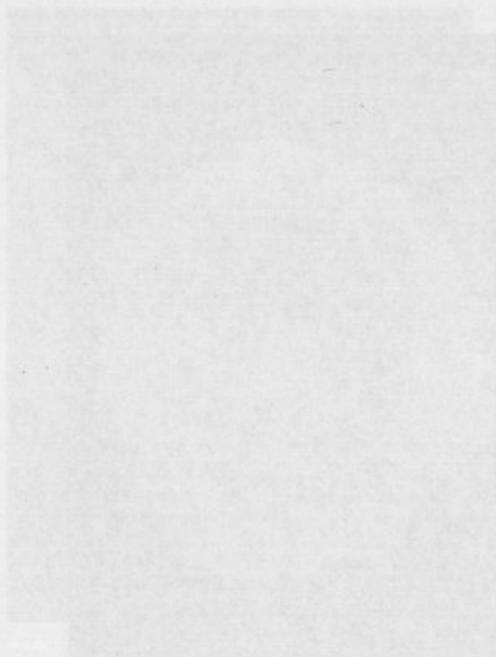
B



C

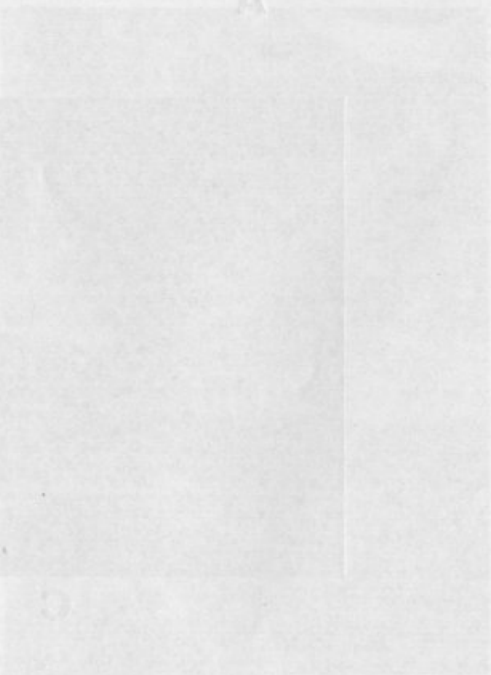
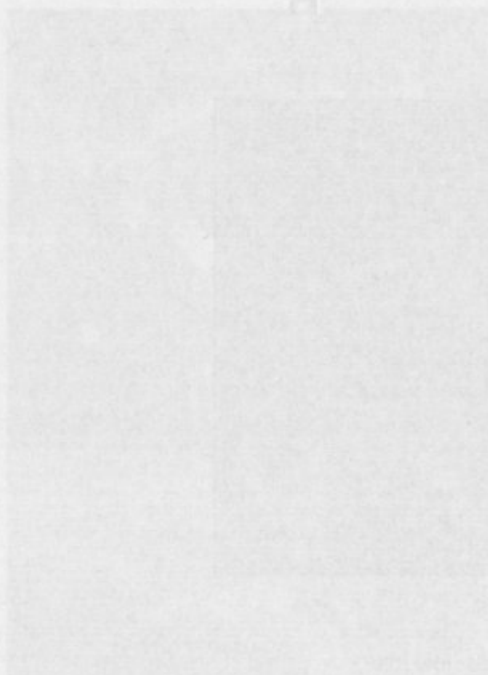
Esposos de *Asplenium marinum*

A. vista proximal, B. vista polar, C. superfície do perisporo com pregas e algumas aréolas. A  $\times 4080$ , B  $\times 3090$  e C  $\times 8000$ .



A

B



C

A: 100x magnification, B: 200x magnification, C: 400x magnification, D: 800x magnification. The specimens were prepared by the method of ...



## TOMATO LEAFROLL VIRUS. PURIFICATION, SEROLOGY AND HOST CELL ULTRASTRUCTURE

by

J. C. SEQUEIRA & M. DE LOURDES V. BORGES

Estação Agronómica Nacional, 2780 OEIRAS

Received December 30, 1987.

### RESUMO

O vírus responsável pela doença do enrolamento, detectada em culturas de tomateiro, numa área restrita do Alentejo, foi estudado e caracterizado como geminivírus, com base na morfologia dos viriões, nas anomalias causadas em células do hospedeiro e na relação serológica com o vírus do encaracolado da beterraba, que pertence ao grupo dos geminivírus.

A identificação definitiva do vírus, que foi designado por vírus do enrolamento do tomateiro (VET), foi feita após purificação e estudo serológico. As suspensões purificadas a partir de folhas de tomateiro, com sintomas severos de enrolamento, continham viriões geminados, típicos dos geminivírus e possuíam espectro de absorção em ultravioleta característico das nucleoproteínas, com a relação  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  próxima de 1,5.

Soro específico preparado para o VET, com o título de 1:128, em difusão em agar, e soro específico para o vírus do encaracolado da beterraba, reagiram de forma semelhante com o antigénio viral. O soro obtido para o VET foi também adequado para a técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), permitindo detectar antigénio viral em tomates, pimenteiros e outras plantas hortícolas, na zona onde a doença surgiu.

Em núcleos de células infectadas, verificou-se a presença de inclusões em anel e partículas, por vezes em pares, que se pensa serem viriões.

Todas as características e propriedades determinadas para o vírus do enrolamento do tomateiro estão em concordância com a sua inclusão no grupo dos geminivírus e confirmam a etiologia da doença do enrolamento.

### SUMMARY

The virus responsible for leafroll disease, detected in tomato crops in a restricted area of Alentejo, has been studied and characterized as a geminivirus, on the basis of virion morphology, abnormalities caused in

host cells and serological relationship to beet curly top virus, which belongs to the geminivirus group.

Conclusive information leading to the identification of the virus was obtained, after purification and serological study. Suspensions purified from tomato leaves, with severe symptoms of leafroll, contained geminate virions, typical of the geminiviruses, and had UV absorption spectra characteristic of nucleoproteins, with A<sub>260</sub> nm/A<sub>280</sub> nm ratio close to 1.5.

Specific antiserum prepared to TLRV, with the titre of 1:128, in gel-diffusion, and antiserum to beet curly top virus, reacted similarly with virus antigen. The antiserum obtained was also adequate for ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), enabling virus antigen to be detected in tomato, pepper and some other vegetables, in the area where the disease occurred.

All the characteristics and properties determined for tomato leafroll virus are in agreement with its assignment to the geminivirus group and confirm the etiology of leafroll disease.

#### INTRODUCTION

**I**N August 1983, tomato plants in several fields of a restricted area in Alentejo, showed severe symptoms of a disease likely to be caused by a virus, as previously reported (BORGES & SEQUEIRA, 1986). Some years before, similar symptoms had been observed, near that area, but only in scattered plants at the end of the crop season, and the etiology of the disease could not be established.

The symptoms of leafroll were similar to the ones described for curly top virus, known in the United States of America since the end of the 19th Century and affecting several crops, particularly sugarbeet. Apart from the United States, the geographical distribution of this virus includes Canada, Mexico, Brazil, Costa Rica, Argentina, Turkey and Iran (Fig. 1).

BENNETT (1971) admitted that curly top virus could also be present from India to the Mediterranean Region. In this region, the leafhopper vector *Circulifer tenellus* (Baker) has been identified in Algeria, Tunisia, Egypt and Spain (FRAZIER, 1953).

Beet curly top has more than 300 species of plant hosts, belonging to 44 Families of Dicotyledones. From these species, about one hundred exist in Portugal as spontaneous, cultivated or ornamental plants (Table I). In the United States, the virus is limiting factor for tomato crops and for several cucurbitaceous plants. It used to be also limiting factor for sugarbeet, before resistant varieties could be obtained. In years particularly favou-

rable to the vectors, however, the disease still has great economic importance for sugarbeet and bean crops.

Attempts to purify and observe beet curly top virus particles were not successful until recently when MUMFORD (1974) purified, from infected plants, small particles appearing frequently in pairs. In 1984, LARSEN & DUFFUS purified the virus from experimentally infected *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic., and were able to separate, by density-gradient centrifugation, the different types of particles usually reported for geminiviruses: typical geminate particles (dimers), isometric particles (monomers) and tri-partite particles (trimers).

The great economic importance of beet curly top virus, which affects several valuable crops, as well as the severity of symptoms caused in tomato plants, encouraged the study of leafroll disease, in order to determine its etiology and help in establishing possible means of protection for the crops. This study included sympto-

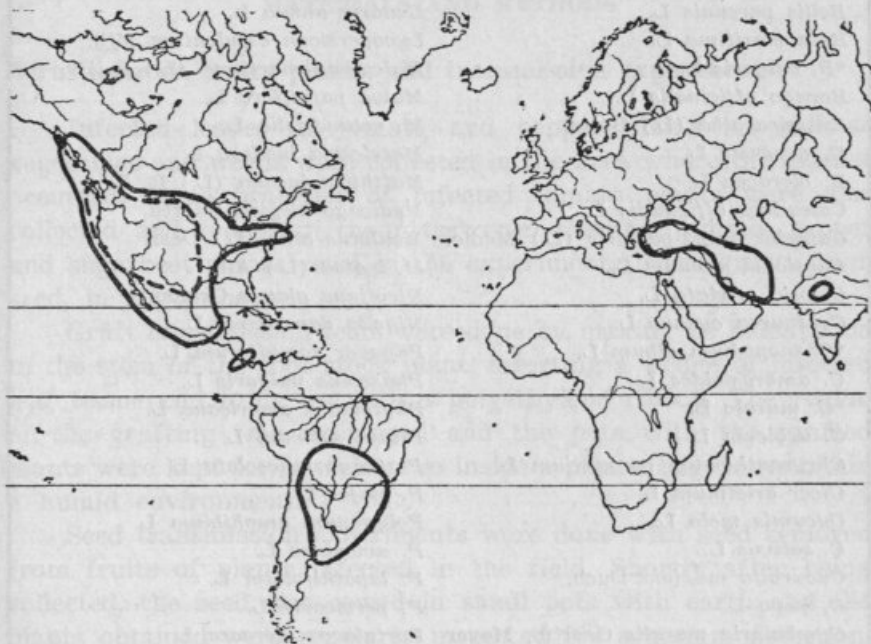


Fig. 1. — Geographical distribution of beet curly top virus, in 1942 (----) and 1977 (—). (Adapted from Commonwealth Mycological Institute Distribution Maps of Plant Diseases, n° 24).

TABLE I

Beet curly top virus hosts present in Portugal as wild, cultivated or ornamental plants

<i>Althaea rosea</i> (L.) Cav.	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.
<i>Amaranthus caudatus</i> L.	<i>Digitalis purpurea</i> L.
<i>A. deflexus</i> L.	* <i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér.
<i>A. graecizans</i> L.	* <i>E. moschatum</i> (L.) L'Hér.
<i>A. retroflexus</i> L.	<i>Euphorbia peplus</i> L.
<i>Anagallis arvensis</i> L.	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.
<i>Anchusa azurea</i> Mill.	<i>Gomphrena globosa</i> L.
<i>Anethum graveolens</i> L.	<i>Kochia scoparia</i> (L.) Schrad.
<i>Anthemis cotula</i> L.	<i>Lactuca sativa</i> L.
<i>Apium graveolens</i> L.	<i>Lathyrus odoratus</i> L.
<i>Atriplex hortensis</i> L.	<i>Lavatera trimestris</i> L.
<i>A. patula</i> L.	<i>Lepidium virginicum</i> L.
* <i>A. rosea</i> L.	<i>Limonium sinuatum</i> (L.) Mill.
<i>Atropa belladonna</i> L.	<i>Linum usitatissimum</i> L.
<i>Barbarea vulgaris</i> (L.) Br.	<i>Lobelia erinus</i> L.
<i>Bellis perennis</i> L.	<i>Lunaria annua</i> L.
<i>Beta maritima</i> L.	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
* <i>B. vulgaris</i> L.	<i>Malcolmia maritima</i> (L.) R. Br.
<i>Borago officinalis</i> L.	<i>Malva parviflora</i> L.
<i>Brassica alba</i> (L.) Boiss.	<i>M. rotundifolia</i> L.
<i>B. arvensis</i> L.	<i>Matricaria inodora</i> L.
<i>B. oleracea</i> L.	<i>Matthiola incana</i> (L.) R. Br.
<i>Calendula officinalis</i> L.	<i>Medicago hispida</i> Gaertn.
<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medic.	<i>Melilotus alba</i> (L.) Desr.
<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>M. indica</i> (L.) All.
<i>Celosia cristata</i> L.	<i>Nicotiana glauca</i> Graham
<i>Centaurea cyanus</i> L.	<i>Nigella damascena</i> L.
* <i>Chenopodium album</i> L.	<i>Papaver somniferum</i> L.
<i>C. ambrosioides</i> L.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
* <i>C. murale</i> L.	<i>Phytolacca americana</i> L.
<i>C. urbicum</i> L.	<i>Pisum sativum</i> L.
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	<i>Plantago lanceolata</i> L.
<i>Cicer arietinum</i> L.	<i>P. major</i> L.
<i>Cucumis melo</i> L.	<i>Polygonum amphibium</i> L.
<i>C. sativus</i> L.	<i>P. aviculare</i> L.
<i>Cucurbita maxima</i> Duch.	<i>P. lapathifolium</i> L.
<i>C. pepo</i> L.	<i>P. persicaria</i> L.
<i>Cymbalaria muralis</i> Gaertn., Meyer & Scherb.	<i>Portulacca oleracea</i> L.
<i>Datura stramonium</i> L.	<i>Raphanus sativus</i> L.
	<i>Ricinus communis</i> L.

\* Hosts of *Circulifer tenellus* (Baker).

TABLE I (Contd)

<i>Rumex acetosella</i> L.	<i>Stellaria media</i> (L.) Cyr.
<i>R. crispus</i> L.	<i>Trifolium incarnatum</i> L.
<i>R. scutatus</i> L.	<i>T. pratense</i> L.
* <i>Salsola kali</i> L.	<i>T. repens</i> L.
<i>Senecio vulgaris</i> L.	<i>Tropeolum majus</i> L.
<i>Solanum nigrum</i> L.	<i>Urtica urens</i> L.
<i>S. tuberosum</i> L.	<i>Vicia faba</i> L.
<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	<i>V. sativa</i> L.
<i>S. oleraceus</i> L.	<i>Vigna sinensis</i> (L.) Savi
<i>Spinacea oleracea</i> L.	<i>Zinnia elegans</i> Jacq.

matology, transmission, purification of the causal agent, preparation of a specific antiserum and serology, as well as electron microscopy both of virions and infected cells.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Virus sources, assay plants, and transmission experiments

Infected leaves of tomato and pepper plants as well as vegetables and weeds were collected in the area where the disease occurred. Some branches of infected tomato plants were also collected and rooted in the glasshouse. Healthy tomato, pepper and sugarbeet plants, used in the experiments, were grown from seed, in a glasshouse.

Graft transmission tests were done by making an indentation in the stem of the root stock plant, inserting a wedge of infected leaf tissue and tying up with a polyethylene ribbon. The region of the grafting was moistened and the pots with the grafted plants were kept for a week or so inside a plastic bag, to maintain a humid environment.

Seed transmission experiments were done with seed removed from fruits of plants infected in the field. Shortly after being collected, the seed was sowed in small pots with earth and the plants obtained were regularly inspected for symptom detection.

Leafhoppers captured in the fields were kept in a glasshouse, in cages with tomato, pepper, sugarbeet and ryegrass plants.

## Purification

Tomato leaves for purification attempts were collected from infected plants, in the fields or in the glasshouse. The purification method used is described under RESULTS.

For centrifugation, the Sorvall RC-5B centrifuge (low-speed) and the Beckman L5-50 ultracentrifuge were used.

## Serology

Specific antiserum to tomato leafroll virus was obtained by injecting intramuscularly a rabbit with purified suspensions of virus particles, emulsified with Freund's complete adjuvant.

Gel-diffusion tests were done in 0.75% agarose gel, prepared in 0.07 M phosphate buffer, pH 7.0.

ELISA was done as described by TAMADA & HARRISON (1980), coating globulin being used at 1 µg/ml and enzyme-conjugated globulin diluted 1/500.

## Spectrophotometry

Ultra violet (UV) spectra of virus preparations were obtained in a PYE Unicam SP 800 spectrophotometre, with recorder.

Density-gradient UV absorbance profiles at 254 nm were obtained in the ISCO Model D fractionator, equiped with a Model UA-2 ultraviolet analyser and recorder.

## Electron microscopy

Purified virus suspensions were negatively stained with 4% aqueous solution of uranyl acetate at pH 5.0 or 2% aqueous solution of ammonium molybdate at pH 7.0.

For ultrastructure studies, leaf tissue was prepared as described by BORGES *et al.* (1981).

The preparations were observed and electron micrographs were taken in the Philips 300 electron microscope.

## RESULTS

### Symptom analysis and transmission experiments

The symptoms of leafroll in tomato plants, in the field, are very striking. They consist mainly of severe upward rolling of

the leaflets (Plate II, Fig. 1) and typical sulphur yellow discoloration of the affected leaves, easily noticed even from a great distance (Plate I, Fig. 1). Infected leaflets become also brittle, suggesting that there is accumulation of starch in the cells, as a result of the infection. Unlike the rolling of leaflets caused by dehydration of tomato plants, the rolling due to tomato leafroll occurs mainly in the younger leaves.

Less severe symptoms were observed in infected pepper plants (Plate I, Fig. 2), which showed yellow discoloration and mild downward rolling.

Branches of infected plants with severe symptoms were collected and rooted in the glasshouse for transmission studies.

Graft transmission experiments proved that leafroll is caused by an infectious pathogen. In fact, healthy plants, a few days after being grafted with infected material, showed the first symptoms of infection which consisted of downward bending of some leaflets (hook-shaped). Eventually these leaflets became severely distorted showing peculiar aspects (corkscrew-shaped), as a result of leaf tissue rolling and rib twisting (Plate II, Fig. 2). The leaf tissue, however, never appeared as brittle as that of plants in the fields and showed only mild yellow discoloration in the leaflet tips. It is worth mentioning that the new leaves of tomato plants, obtained from branches collected in the field and rooted in the glasshouse, developed symptoms similar to the ones displayed by the plants grafted in the glasshouse.

Grafting sugarbeet plants with tomato infected tissue did not provide conclusive results even though some mild leaf curling was noticed in a few grafted plants.

Seed transmission experiments were done with tomato seed, collected from fruits of infected plants in the fields. From the results obtained, it was concluded that freshly collected seed might transmit the virus. In fact, some plants grown from that seed displayed typical symptoms, indicating that seed transmission had occurred.

Attempts to find the vector of tomato leafroll virus, thought to be a leafhopper, had little success due the difficulty in keeping leafhoppers for a long time under laboratory conditions. Several leafhopper species were captured in the area where the disease occurred (Plate I, Fig. 2). They were maintained in cages with different plants but, most of them, died a few days after being

captured. The leafhoppers collected were identified as *Exitianus taeniaticeps* Kbm, *Empoasca* sp., *Agallia* sp. and *Peragallia* sp.

### Purification

Some characteristics of tomato leafroll suggested that it could be the curly top disease, which is caused by a geminivirus. Therefore, the attempts to purify the virus, were based on methods of purification that were successfully used with geminiviruses.

The method described by SEQUEIRA & HARRISON (1982) was tried first but did not give satisfactory results, even after a few modifications. In fact, no typical virus particles were obtained in the final suspensions and the presence of some small isometric particles was not conclusive.

Using the method described by LARSEN & DUFFUS (1984) for beet curly top virus, however, suspensions were obtained in which the presence of typical geminivirus particles was clearly observed. Along with many isometric particles (monomers), also several geminate particles (dimers), characteristic of the geminivirus group, were present in the preparations observed under the electron microscope (Plate III, Fig. 2 and 3). A few tri-partite particles (trimers), described for some geminiviruses, were also observed.

The high concentration of monomers in the purified suspensions led to the conclusion that breakage of dimer particles had occurred during the purification procedure, probably as a result of the deleterious effect of tomato leaf sap on the virus particles. However, no other host plant for purification was possible to be used.

We tried to improve the results by introducing a few modifications in the method used by LARSEN & DUFFUS (1984), but the final concentration of geminate particles could not be substantially increased. The method which provided the better results was based mainly in the method described by LARSEN & DUFFUS (1984) and included the following steps:

- a) 100 grams of tomato leaves were homogenized in a blender with 200 ml of SPE buffer (0.1 Na/K phosphate, pH 7.2, containing 0.0025 M EDTA and 0.01 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ).
- b) The extract was then homogenized for 3-4 minutes in a Virtis «45» homogeneizer at full speed.



- c) After filtering through muslin, the extract was stirred overnight with Triton X-100 (2% v/v), at 4° C.
- d) Chloroform (1/10 volume) was added and, after stirring for 15 min., the aqueous phase was separated by low-speed centrifugation.
- e) NaCl (0.2 M) and polyethylene glycol 6000 (12%) were added and the aqueous phase was stirred for 2 hours at 4° C.
- f) After centrifugation at 10 000 g, 10 min., the sediment was resuspended with 20 ml SPE buffer containing Triton X-100 (1% v/v) and the suspension stirred for 2 hours at 4° C.
- g) After centrifugation at 10 000 g, the sediment was discarded and the supernatant centrifuged at 90 000 g for 2.5 hours over a sucrose cushion (25% in SPE buffer).
- h) The sediment was resuspended in 5 ml SPE buffer and the suspension was left overnight in the deep freeze.
- i) After thawing, the suspension was centrifuged at 5000 g, for 10 min. and the supernatant was layered on sucrose gradients (10-40%) and centrifuged for 2 hours at 36 000 r.p.m., in the Beckman Sw 40 Ti rotor.
- j) The virus-containing fractions were collected and centrifuged at 90 000 g for 2.5 hours, after dialysis or dilution with SPE buffer.
- k) The final preparation was cleaned by low speed centrifugation.

The UV absorbance profiles of the gradients, after centrifugation in the Beckman SW 25 rotor (Fig. 2, A), indicated that two main components were present in the samples. Fractions corresponding to each component were collected and observed in the electron microscope. The slower migrating component (1), corresponded mainly to host material whereas the other component (2) corresponded to virus particles. The final preparation, obtained from pooling fractions 2, contained mostly monomers but also some dimers and possibly a few trimers.

Attempts to increase the resolution of density-gradient centrifugation, by using the Beckman SW 40 Ti rotor, have been partially successful. In fact, the UV absorbance profiles that were obtained (Fig. 2, B), indicated the presence of a component (3), at low concentration, corresponding to virus dimers.

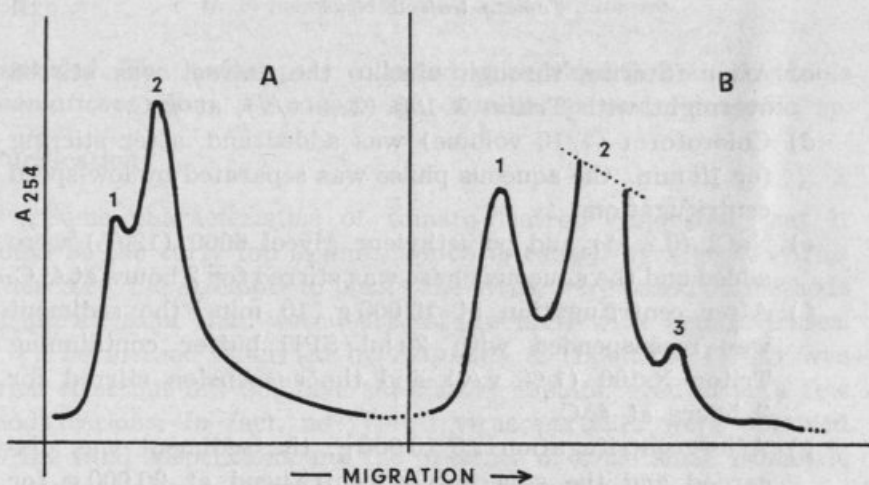


Fig. 2.— Absorbance profiles at 254 nm of density gradients, after centrifugation with TLRV suspensions, in Beckman SW 25 (A) and SW 40 Ti (B) rotors.

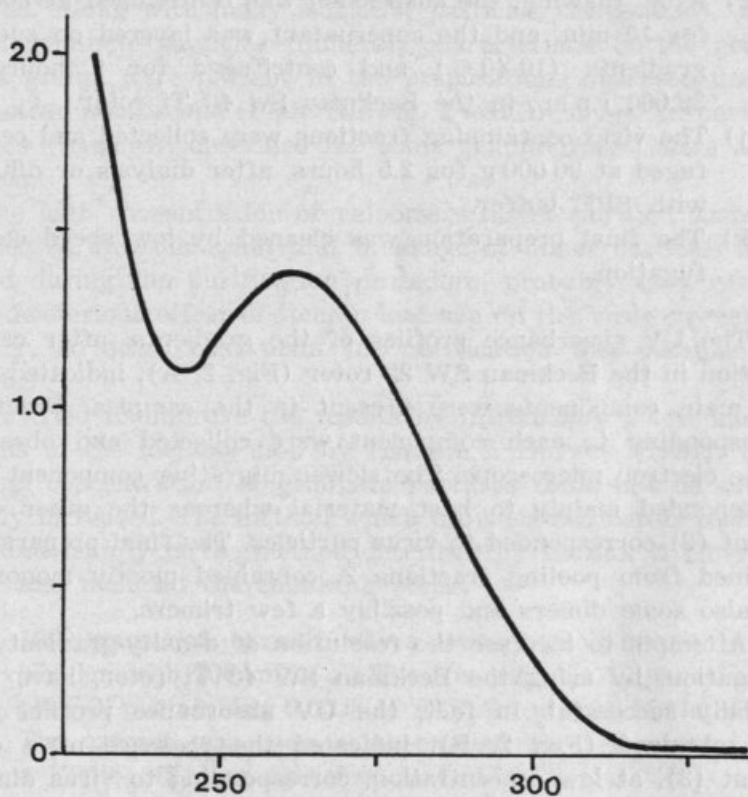


Fig. 3.— UV absorbance spectrum of TLRV in purified suspension.

The UV absorbance spectrum of the purified suspension (Fig. 3) was typical of a nucleoprotein with a maximum close to 260 nm and a minimum near 243 nm. The A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> ratio was near 1.5 which is in the range of values reported for geminiviruses.

### Serological tests

The purified suspensions of TLRV appeared relatively free of impurities and the concentration of virus particles was high. Therefore, they seemed suitable for preparing a specific antiserum. Suspensions of TLRV were then injected intramuscularly into a rabbit to obtain antiserum. This antiserum proved suitable for gel-diffusion and ELISA tests.

**Gel-diffusion.** — The antiserum prepared to TLRV was tested, at several dilutions, against the virus antigen in purified suspensions, using gel-diffusion. The titre obtained was 1:128 and negligible reaction was detected between concentrated antiserum and healthy plant sap.

Gel-diffusion was also used to determine the serological relationship of TLRV to beet curly top virus (BCTV). Purified preparations of TLRV were used, as antigen, in tests with antisera to TLRV and to BCTV. Antiserum to BCTV was kindly supplied by Dr. DUFFUS from the Agricultural Research Service, Salinas, U. S. A. When antiserum to TLRV and antiserum to BCTV were used at dilutions of  $1/16$  and  $1/4$ , respectively, the precipitation lines were very similar (Plate III, Fig. 1), indicating that the two antisera at those dilutions behaved identically against TLRV antigen. This reveals a fairly close relationship between the two viruses, as homologous and heterologous titres seem to differ approximately by a factor of 4.

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** — When the detection of TLRV antigen by ELISA was possible, tests were done to assess the presence of virus in plants near the tomato nurseries, in order to locate possible sources of virus. The presence of virus antigen was detected in some plants growing in vegetable gardens next to those nurseries. Besides tomato, also pepper plants showed high concentrations of virus antigen (Table II). *Empoasca* sp. leafhoppers feeding on these plants were also collected and

their extracts tested by ELISA. The results indicated that low amounts of virus antigen might be present in those extracts. Some weeds were also collected and tested but only two of them, mentioned on Table II, seemed to contain virus antigen at low concentration.

TABLE II

Detection of TLRV antigen by ELISA in leaf and leafhopper extracts

Samples	A 405 nm *
A. Tomato (infected) in the fields	0.90 ± 0.29
B. Tomato in the greenhouse	
1. Infected	0.88 ± 0.17
2. Healthy	0.14 ± 0.07
C. Other plants in the fields	
1. Potato	0.33 ± 0.09
2. Pepper	0.59 ± 0.19
3. <i>Solanum nigrum</i>	0.21 ± 0.04
4. <i>Physalis</i> sp.	0.30 ± 0.01
D. Leafhopper ( <i>Empoasca</i> sp.) **	0.23 ± 0.01

\* Readings 1 hour after adding substrate.

\*\* 70 insects/ml buffer.

Since there were possible sources of virus, near the tomato nurseries, the growers were advised to set up the nurseries far from those sources. After the nurseries were transferred to other fields, about 5 km away from the previous ones and surrounded by pine trees, the disease has not been detected even in areas where it had occurred before.

### Electron microscopy

**Purified virus.** — In purified suspensions of TLRV, negatively stained with uranyl acetate and observed in the electron microscope, several particles with the geminate morphology, typical of the geminiviruses, were seen among many isometric and some tri-partite particles (Plate III, Fig. 2).

Although it was difficult to visualize the fine structure of the virions, in some electron micrographs of preparations stained with ammonium molybdate (Plate III, Fig. 3), it was possible to see, in some particles, doughnut-shaped capsomers, similar to the ones described by HATTA & FRANCKI (1979), for chloris striate mosaic virus, another geminivirus.

**Ultrastructure of infected cells.**—Thin sections of tomato leaf tissue, collected in the field, were observed in the electron microscope and some abnormalities similar to the ones caused by other geminiviruses were noticed, in the nuclei of some infected cells of vascular tissues. These abnormalities consisted mainly of hypertrophy of nucleoli, presence of ring-shaped inclusions (Plate IV, Fig. 1) and possibly virus particles, often seen in pairs, like those encircled in Plate IV, Fig. 2.

#### DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The characteristics and properties of the virus isolated from tomato plants with leafroll, clearly indicate that this disease is caused by a geminivirus. Unequivocal evidence was obtained when suspensions from tomato leaves, with severe symptoms, showed under the electron microscope the presence of geminate particles, typical of the geminivirus group.

The high concentration of isometric particles, in purified suspensions, is most probably due to breakage of geminate particles during the purification procedure. Tomato leaf sap seemed responsible for most of this breakage but no other host was possible to use for virus purification. The high concentration of monomers was reflected in the UV absorbance profiles of density gradients. In fact, the peak due to the monomers hides the peak of the dimers and only by using a gradient allowing better separation this small peak was detected. Trimer particles, also described for beet curly top virus (LARSEN & DUFFUS, 1984), were seen occasionally.

The analysis of leafroll symptoms in tomato plants, in the fields and in the glasshouse, indicated that the environment has a marked influence on the type of symptoms displayed. Although leaf distortion was always severe, the leaf tissue of infected plants in the glasshouse was much less brittle and only the leaf tips

showed some yellow discolouration. This is an aspect to be taken into account when inspecting tomato plants grown under protecting cover.

Serological tests by gel-diffusion proved the close relationship of tomato leafroll virus (TLRV) to beet curly top virus (BCTV). It is possible that, like in Brazil, leafroll is caused by a strain of BCTV. In fact, BENNETT (1949) described symptoms of the brazilian curly top of tomato which are very similar to the ones caused by TLRV.

Detection of virus antigen by ELISA was quite convenient for locating possible sources of virus. It was found that plants in vegetable gardens near the tomato nurseries contained virus antigen and could be sources of infection. This finding led to the change of the nurseries to a different place, which seems to have been important for limiting the spread of the disease.

ELISA tests with extracts of *Empoasca* sp. leafhoppers, collected on infected pepper plants, did not provide evidence of the transmission capability of these leafhoppers, although the results suggested that some viral antigen may exist in those extracts. This does not prove that the leafhoppers are vectors, since the antigen could be passively present inside the leafhoppers. It may be possible, however, that *Empoasca* or other leafhopper species, different from *Circulifer tenellus*, is the vector of TLRV, similarly to what happens with the virus strains in Brazil and Argentina (BENNETT, 1949, 1971).

Seed transmission has not been reported for geminiviruses and we think that the results we obtained in this respect, with freshly collected seed, would probably be different if dried seeds were used. BENNETT & TANRISEVER (1958), have reported the presence of beet top virus at high concentration on tomato seeds but they have not found the occurrence of seed transmission. This is a point that deserves to be clarified in future experiments.

Electron microscopy of purified suspensions revealed sometimes the subunit structure of the virions. Although the micrographs were not particularly good, some of them showed particles where the capsomers appeared doughnut-shaped as described by HATTA & FRANCKI (1979).

The ultrastructure study of infected tissue revealed abnormalities in the cell nuclei which are similar to those described for geminiviruses. Ring-shaped inclusions and virus-like particles,

some of them appearing clearly in pairs, were observed in the nucleus of a few cells. Although we have not found reports on ultrastructure studies of curly top-infected tomato leaves, aspects similar to the ones we describe, were observed by Russo *et al.* (1980) in tomato plants with yellow leaf curl, a disease also caused by a geminivirus.

In conclusion, it can be pointed out that all the characteristics determined for tomato leafroll virus are in favour of its assignment to the geminivirus group. Further work on purification, serological relationships, transmission by insect vectors, and study of the viral nucleic acid would be of most interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Dr. J. DUFFUS, from the Agricultural Research Service, Salinas, U. S. A., for providing antiserum to beet curly top virus. Thanks are also due to Dr. ANA M. CARDOSO and Miss M. EUGÉNIA MENDES, from Estação Agronômica Nacional, respectively for leafhopper identification, and technical assistance.

#### REFERENCES

- BENNETT, C. W.  
1949 The brazilian curly top of tomato and tobacco resembling north american and argentine curly top of sugar beet. *J. agric. Res.* **78** (12): 675-693.  
1971 *The curly top disease of sugarbeet and other plants*. Monograph n° 7. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- BENNETT, C. W. & TANRISEVER, A.  
1958 Curly top disease in Turkey and its relationship to curly top in North America. *J. Am. Soc. Sugarbeet Technologists* **10** (3): 189-211.
- BORGES, M. L. V. & SEQUEIRA, J. C.  
1986 Viruses recorded in Portugal in tomato protected crops. *Acta horticulturnae* **191**: 293-302.
- BORGES, M. L. V., SEQUEIRA, J. C. & LOURO, D.  
1981 Potyviruses recorded in Portugal. Purification, serology and host-virus ultrastructural relationships. *Bolm Soc. broteriana* **53** (2): 933-942.
- FRAZIER, N. W.  
1953 A survey of the Mediterranean region for the beet leafhopper. *J. econ. Ent.* **46**: 432-435.
- HATTA, T. & FRANCKI, R. I. B.  
1979 The fine structure of chloris striate mosaic virus. *Virology* **92**: 428-435.

LARSEN, R. C. & DUFFUS, J. E.

- 1984 A simplified procedure for the purification of curly top virus and the isolation of its monomer and dimer particles. *Phytopathology* **74**: 114-118.

MUMFORD, D. L.

- 1974 Purification of curly top virus. *Phytopathology* **64**: 136-139.

RUSSO, M., COHEN, S. & MARTELLI, G. P.

- 1980 Virus-like particles in tomato plants affected with yellow leaf curl disease. *J. gen. Virol.* **49**: 209-213.

SEQUEIRA, J. C. & HARRISON, B. D.

- 1982 Serological studies on cassava latent virus. *Ann. appl. Biol.* **101**: 33-42.

TAMADA, T. & HARRISON, B. D.

- 1980 Factors affecting the detection of potato leafroll in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. appl. Biol.* **95**: 209-219.





Symptoms of TLRV in tomato crops (1). Capture of leafhoppers on pepper plants with symptoms (2).

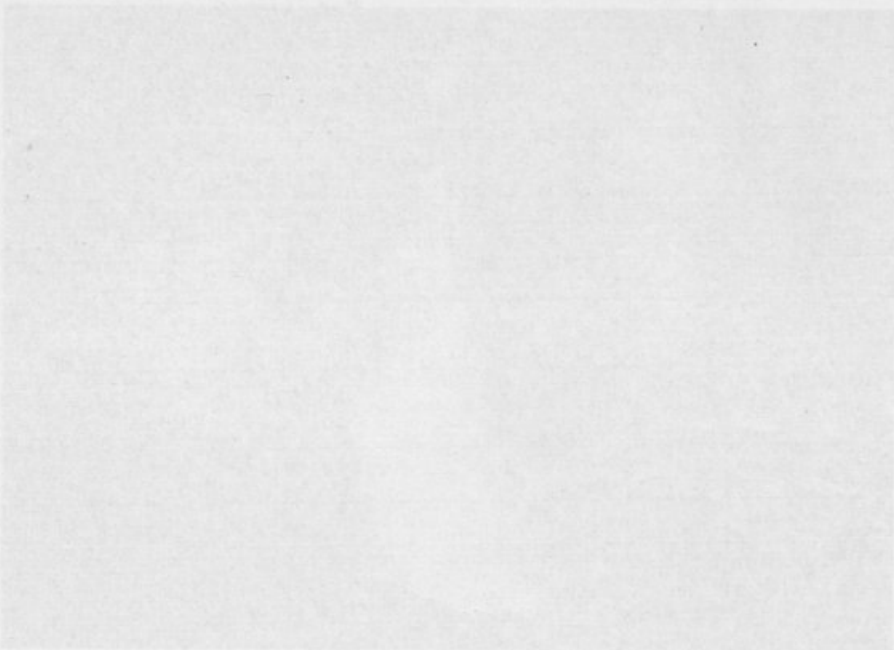
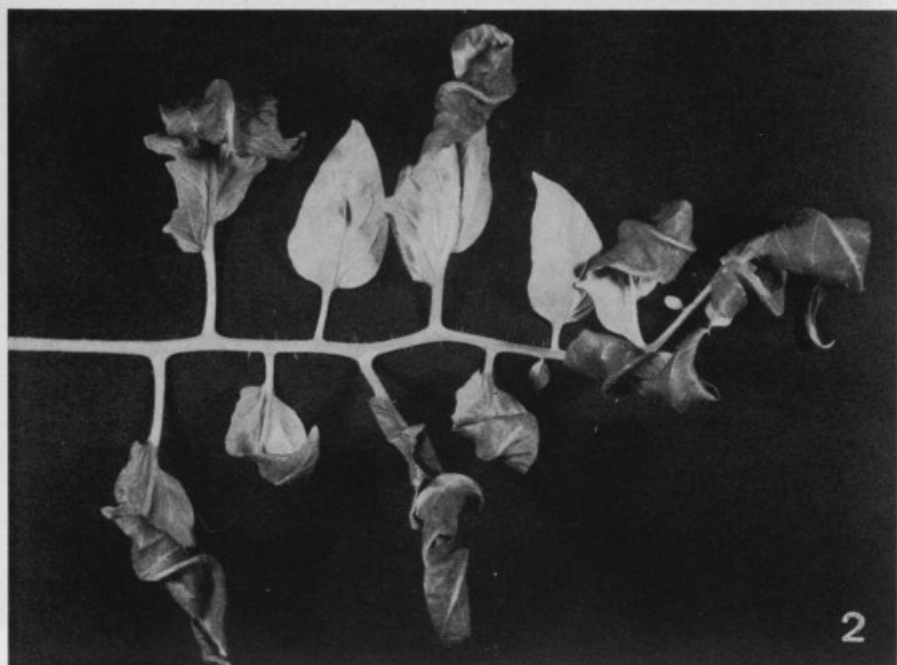


Fig. 1. (Left) and Fig. 2. (Right) showing the results of the experiment.



Distortion of leaflets. Infection in the field (1) and experimental infection (2).

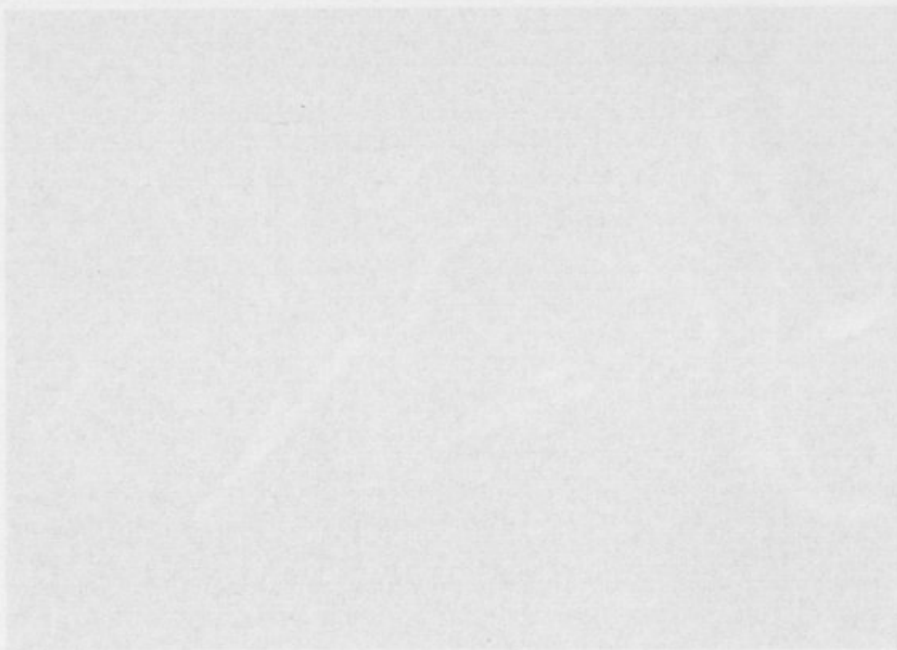
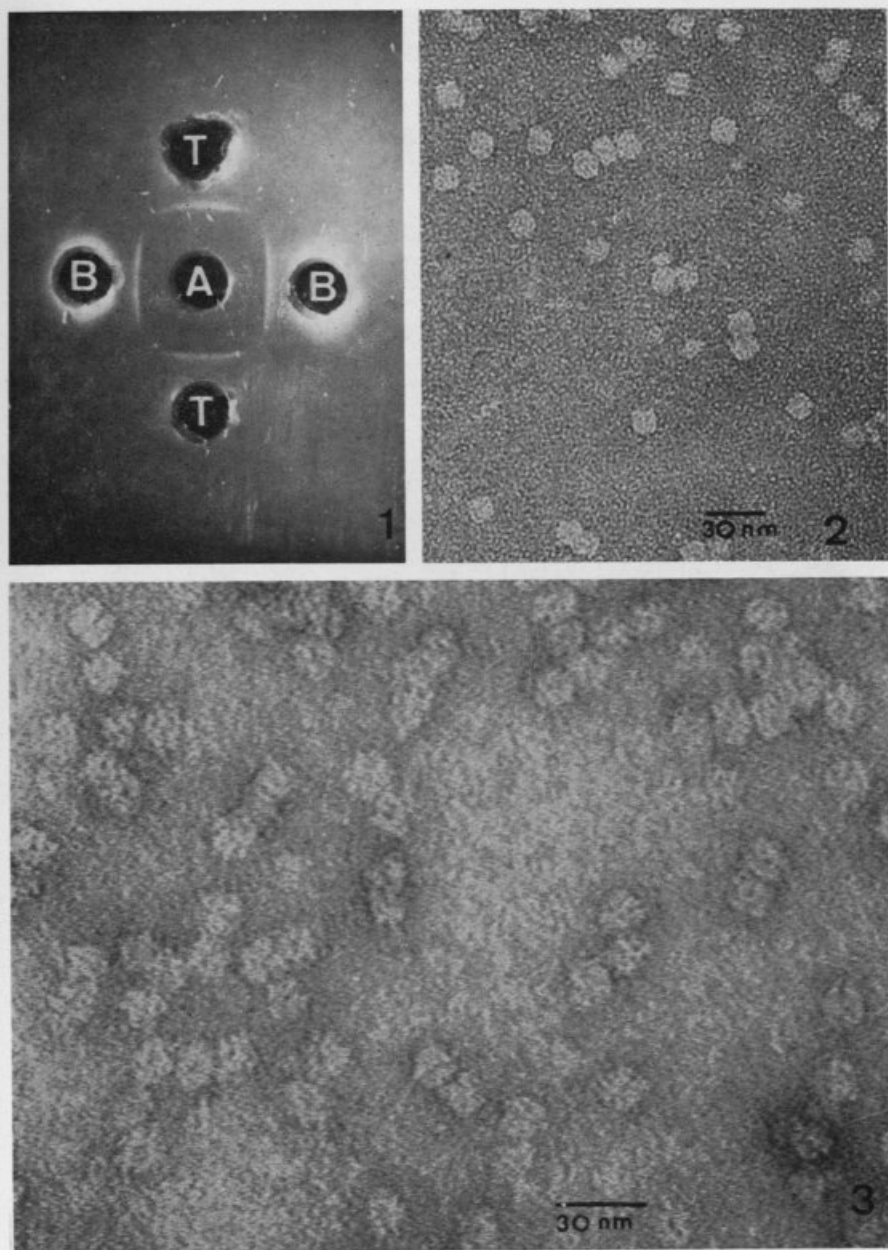
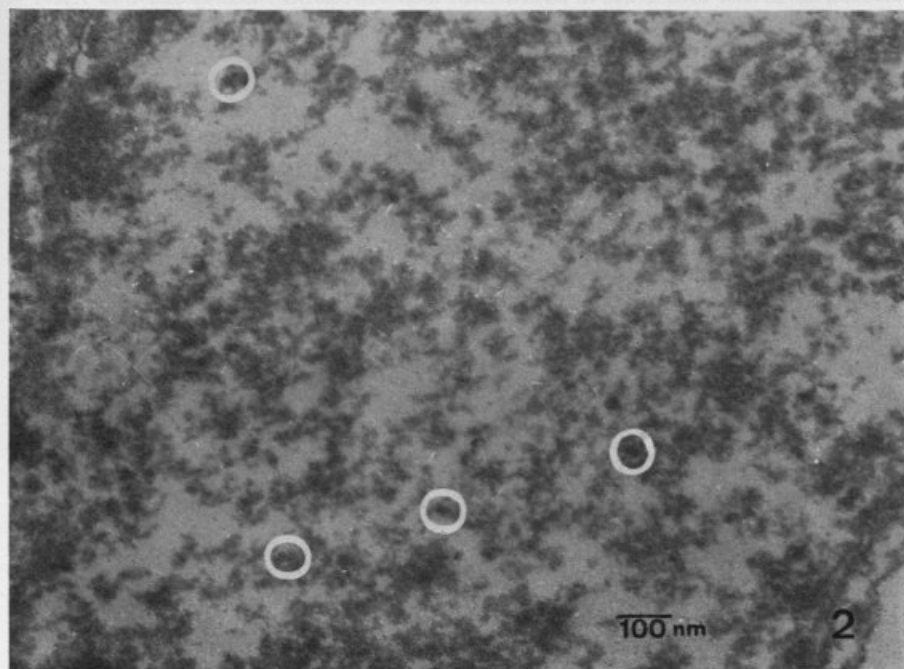
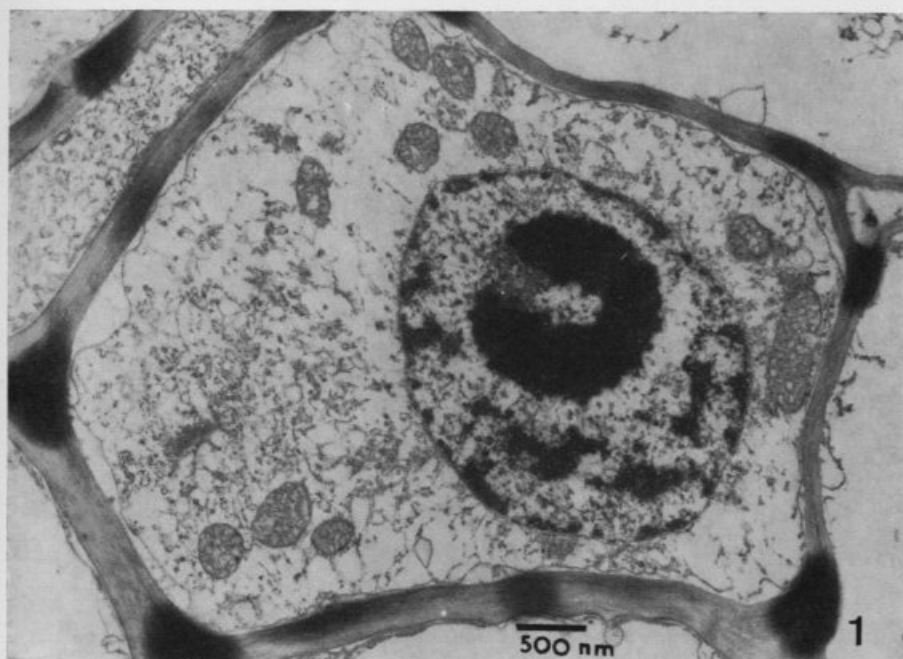


FIGURE 1. (a) Cellular infection in the field (1) and experimental infection (2).

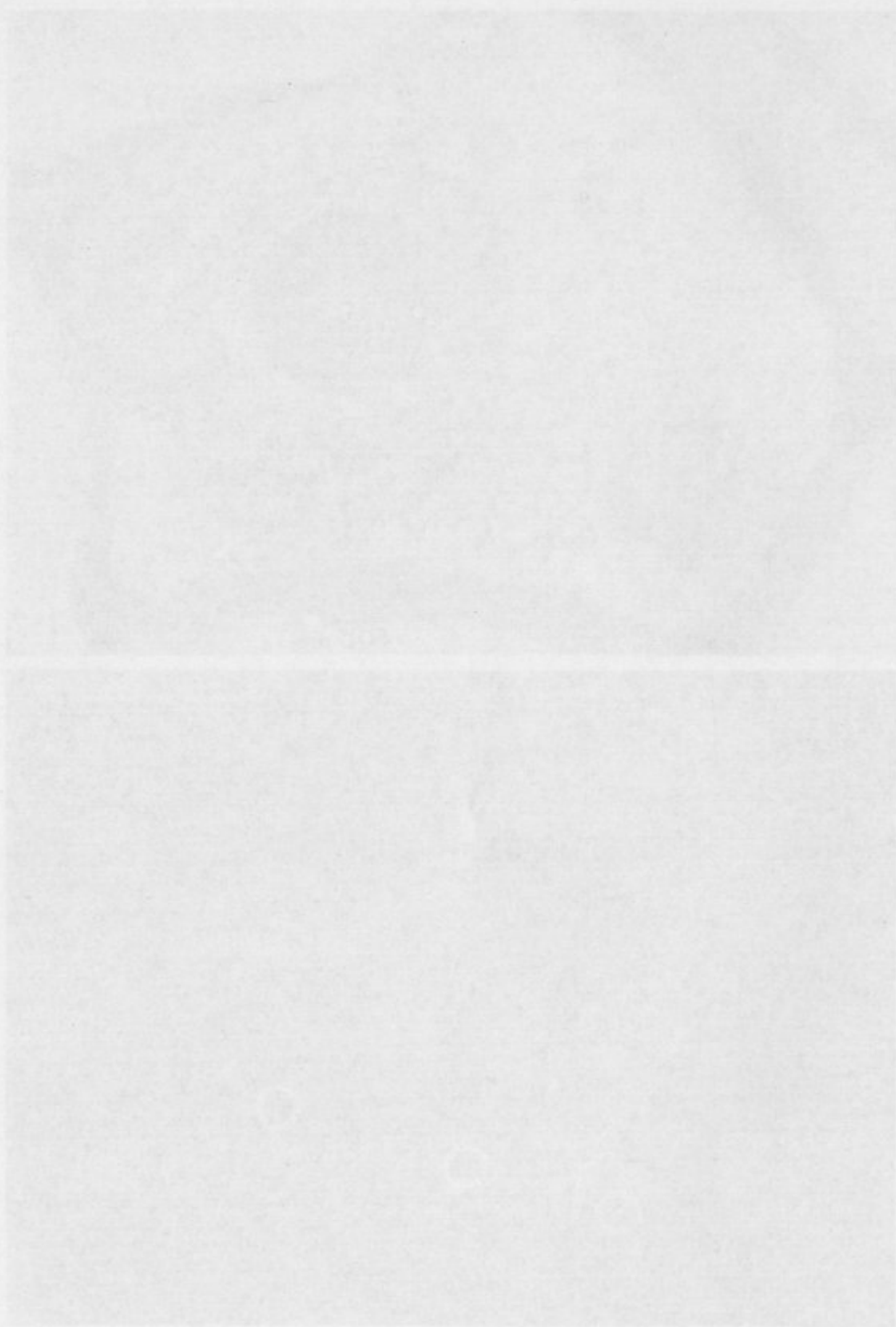


Gel-diffusion test (1): TLRV antigen (A), TLRV antiserum (T) and BCTV antiserum (B). Purified suspension of TLRV (2). Virions showing doughnut-shaped capsomers (3).





Infected cell nuclei. Ring-shaped inclusion (1) and virus dimers (2).



(1) and (2) are the same as in Plate 76, but with the addition of the following details:



## IN VITRO MULTIPLICATION OF *ACTINIDIA CHINENSIS* PLANCH. BY CULTURE OF YOUNG LEAVES \*

J. M. CANHOTO & G. S. CRUZ

Centro de Fisiologia e Citologia Vegetal do INIC  
Instituto Botânico, Universidade de Coimbra

Received December 20, 1987.

### ABSTRACT

Pieces of young leaves from male and female plants of *Actinidia chinensis* Planch. inoculated in basic MS medium supplemented with different NAA and BA concentrations formed buds which evolved into leaves or shoots. Buds arised mainly from swellings (nodules) at the leaf margin and about the leaf veins. Bud initiation occurred only in the presence of auxin (NAA), however addition of BA to the medium greatly enhanced bud formation, the best results being obtained when 0.1 or 0.5 mg/l NAA were combined with 2 mg/l BA.

Shoots, 1-2 cm long, rooted in MS medium, containing 1 mg/l IBA, and transferred to pots with soil developed into complete normal plants. Only minor differences of morphogenetic potencial were found among explants of different origin.

### INTRODUCTION

*Actinidia chinensis* Planch. is a fruiting plant which has aroused in recent years, in different countries, great interest among agriculturists and cientists alike.

Such an interest derives from its fruits — the kiwis — which are an excellent source of C-vitamin, mineral salts and amino acids (HIRSCH, 1970; 1975; MOINET, 1986).

---

\* Part of the results of this work have been presented in the form of Poster in the 8th National Congress of Biochemistry, Póvoa de Varzim 28th November — 1 December, 1987.

The agronomical importance of this species has promoted several studies specially in the search for ways of propagating this plant by *in vitro* culture techniques in substitution to the traditional methods of raising new plants from seeds and rooted cuttings. To this end, explants of different origin have been tested, with whole plants being regenerated from roots (CHRIQUI and TRIPATHI, 1984; HARADA, 1975; TRIPATHI and SAUSSAY, 1980), stems (GUI, 1979; GUI and XU, 1982; STANDARDI, 1982; VELAYANDOM *et al.*, 1985), endosperm (GUI *et al.*, 1982), petiole (PAIS *et al.*, 1985) and apical meristems (STANDARDI, 1981).

Histological studies have shown that cellular activation leading to callus formation initiates at the vascular bundles level or from cells in their periphery either in stems (GUI and XU, 1982), staminal filaments and roots (CHRIQUI and TRIPATHI, 1984). On the other hand, bud differentiation from callus has been reported to have a superficial origin (GUI and XU, 1982).

Conflicting claims have been made about the regenerative potential of explants of male and female origin (CHRIQUI and TRIPATHI, 1984; GUI, 1979; HARADA, 1975).

Since leaves have received comparatively little attention [beyond the communication of PAIS *et al.* (1985), where petiole segments were used, only brief reference was made in CHRIQUI and TRIPATHI (1984) indicating the possibility of obtaining buds from leaves] we thought that some of the above mentioned problems could be further investigated using the leaves of *Actinidia chinensis* Planch. The present work reports the results of this investigation.

#### MATERIALS AND METHODS

Fragments of petiole and leaf blade of young leaves from two female cultivars (BRUNO and HAYWARD) and from a male plant of *Actinidia chinensis* Planch. were surface sterilized with a 7% calcium hypochlorite solution during 10 minutes and subsequently rinsed three times with sterile distilled water.

After disinfection, fragments were inoculated in culture media (AT) composed of the mineral salts and the vitamins of MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962) basal medium, 2.5% sucrose and several concentrations of NAA (naphthaleneacetic acid) (0.01-1.0 mg/l) and BA (benzylaminopurine) (1.0-4.0 mg/l).

Formed shoots were rooted in a modified MS medium (E) containing half the concentration of major salts, micronutrients and vitamins at normal strength, 1% sucrose and 1.5 mg/l IBA (Indolbutyric acid). All media had their pH adjusted to 5.7 before autoclaving and cultures were maintained at  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  in continuous fluorescent light.

Histological studies of FAA (Formalin aceto-acid, 70% alcohol) fixed material were carried out on  $10 \mu$  sections obtained by using the normal dehydration and paraffin embedding sequence and stained by the safranin fast green method.

## RESULTS

### Morphogenetic response of cultured explants

Petiole and leaf blade fragments from young leaves of *Actinidia chinensis* Planch. cultured in AT media containing distinct NAA and BA concentrations (Table 1) produced buds which developed into leaves or shoots. Some roots were also occasionally formed but no record of its occurrence was taken.

In the first few days after inoculation, blade explants showed a considerable increase in size which was followed by cell proliferation in some areas of the explant. Fifteen days later, small, fairly organized nodules (Figs. 1-4) could already be seen at the leaf margin and in the vicinity of the main vascular bundles. Some callusing was also occasionally found, especially in the cut sections of petiole segments.

After four-five weeks from the beginning of experiments, previously formed nodules differentiated buds (Figs. 5-7) which evolved into new leaves or shoots (Figs. 8-11). Independently of the source of material used (male or female) more buds per explant were produced from blade than from petiole fragments (Table 2). The latter formed shoots occasionally but only in some media. Best results were always obtained when in the media were present moderate concentrations of auxin (0.1 or 0.5 mg/l NAA) in combination with 2 mg/l of BA. Departure in either way from these concentrations resulted in the decrease of the number of explants responding positively and in less buds per explant being formed. A summary of above mentioned results, after 7 weeks in culture, is presented in Table 1.

TABLE 1  
Response of leaf blade fragments of the cultivars tested to the different culture media used

CULTURE MEDIA			CULTIVARS TESTED											
MG/L			HAYWARD				BRUNO				MALE			
NAA	BA	NE	NEB	NS/NE	NE	NEB	NS/NE	NE	NEB	NS/NE	NE	NEB	NS/NE	
AT <sub>1</sub>	0.05	1	4	(71)	++	15	4	(151)	++	20	7	(154)	++	
AT <sub>2</sub>	0.05	2	5	(108)	++	17	4	(13)	+	15	4	(80)	++	
AT <sub>3</sub>	0.05	4	4	(19)	+	13	5	(79)	++	18	8	(125)	++	
AT <sub>4</sub>	0.1	1	10	(219)	++++	11	8	(371)	++++	22	17	(303)	++++	
AT <sub>5</sub>	0.1	2	12	(729)	++++	17	17	(815)	++++	21	19	(688)	++++	
AT <sub>6</sub>	0.1	4	5	(97)	+++	17	10	(12)	+	25	10	(27)	+	
AT <sub>7</sub>	0.5	1	6	(291)	++++	10	7	(251)	++++	18	15	(574)	++++	
AT <sub>8</sub>	0.5	2	15	(637)	++++	11	11	(547)	++++	18	17	(748)	++++	
AT <sub>9</sub>	0.5	4	3	(102)	++	14	2	(7)	+	21	3	(31)	+	
AT <sub>10</sub>	1	1	8	(31)	+	12	6	(19)	+	22	5	(18)	+	
AT <sub>11</sub>	1	2	5	(137)	+++	12	11	(244)	+++	27	20	(446)	+++	
AT <sub>12</sub>	1	4	5	(39)	+	12	7	(69)	++	26	11	(43)	+	
AT <sub>13</sub>	—	1	—	—	—	8	—	(0)	—	9	—	(0)	—	
AT <sub>14</sub>	—	2	—	—	—	8	—	(0)	—	8	—	(0)	—	
AT <sub>15</sub>	0.1	—	2	(9)	+	11	—	(0)	—	9	1	(3)	+	
AT <sub>16</sub>	0.5	—	3	(15)	+	8	1	(3)	+	9	1	(2)	+	

NE = Number of explants inoculated  
 NEB = Number of explants with buds  
 NS = Number of visible buds or shoots

+ = 0 < NS/NE < 5  
 ++ = 5 < NS/NE < 10  
 +++ = 10 < NS/NE < 20  
 ++++ = 20 < NS/NE < 40  
 — = NS/NE > 40

TABLE 2

Response differences of leaf blade and petiole fragments from studied cultivars to the different culture media

CULTURE MEDIA	LEAF BLADE			PETIOLE		
	NE	NEB	NEB (%)	NE	NEB	NEB (%)
AT <sub>1</sub>	47	15	32	19	—	—
AT <sub>2</sub>	47	13	27,6	17	—	—
AT <sub>3</sub>	40	17	42,5	17	—	—
AT <sub>4</sub>	49	35	71,5	17	3	17,6
AT <sub>5</sub>	50	48	96	16	2	12,5
AT <sub>6</sub>	54	25	46,3	18	1	5,6
AT <sub>7</sub>	39	20	51,3	19	3	15,8
AT <sub>8</sub>	45	43	95,5	20	1	5
AT <sub>9</sub>	47	8	17	16	—	—
AT <sub>10</sub>	47	19	40,4	16	—	—
AT <sub>11</sub>	47	36	76,6	17	1	5,9
AT <sub>12</sub>	50	23	46	19	—	—
AT <sub>13</sub>	24	—	0	13	—	—
AT <sub>14</sub>	25	—	0	16	—	—
AT <sub>15</sub>	30	3	10	15	—	—
AT <sub>16</sub>	26	5	19,2	18	—	—

A similar pattern emerged when comparing the budding response of explants from the female cultivars and the male plant (Table 1). Only minor differences, of a rather quantitative nature, may perhaps be pointed out. For instance, it seems that female explants presented a slightly higher regenerative potential. Another possible distinction refers to a higher sensitiveness of female explants to lower auxin concentrations (Table 1).

Histological studies carried out on serial sections of leaf segments, 3 weeks after inoculation, showed that bud primordia originated mostly from pockets of meristematic cells in some areas at the periphery of explants (Figs. 16-17). Meristematic cells differed by its smaller size, prominent nucleus and abundant cytoplasm content from the much more vacuolized cells of subjacent tissue. Some buds showed already a typical shoot apex organization with the apical meristem surrounded by leaf primordia and strands of procambial cells extending back into the parenchymatous tissue (Fig. 18).

### Rooting of shoots and plantlet development

Shoots, 1-2 cm long, obtained from cultured leaf fragments were excised and had the cut end inserted into modified MS media (E) supplemented with different IBA concentrations to induce root formation. Root development took place after transferring treated shoots to MS growth regulators free-medium. The period of contact with the rooting media needed to induce root differentiation depended on the concentration of IBA used. Treatment during one week of excised shoots with 1 mg/l IBA was the procedure normally adopted since it was found that higher concentrations also induced a considerable amount of callus formation.

Rooted plantlets (Figs. 12-13) were first transferred to pots with sand and then to a mixture of sand and soil and kept for 3-4 weeks in a humid atmosphere before being exposed to field conditions. During this process there was about 40 % of losses, and the remaining plants, although presenting some juvenile characters in their leaves (Figs. 14-15), developed well.

### DISCUSSION

Leaves of several plants have been used in tissue culture programs due to their high morphogenetic potential (ARNOLD and ERIKSSON, 1979; BHARAL and RASHID, 1981; DAVIES and DALE, 1978; KUKULCZANKA and SUSZYNSKA, 1972; MELJER and BROUGHTON, 1981; MUDGAL *et al.*, 1981; YANG and CHANG, 1979). In *Actinidia chinensis* Planch. explants from different sources (roots, stems, staminal filaments, petioles, meristems, endosperm) have been tested in the search for new ways of meeting the demande for new plants (CHRIQUI and TRIPATHI, 1984; GUI, 1979; GUI *et al.*, 1982; GUI and XU, 1982; HARADA, 1975; PAIS *et al.*, 1985; STANDARDI, 1981; 1982; TIPATHI and SAUSSAY, 1980; VELAYANDOM *et al.*, 1985). *Actinidia* leaves, however, have received comparatively little attention. Although petiole segments had already been tried and the production of buds reported (PAIS *et al.*, 1985), our results show that leaf blade fragments are a better choice of material. In the varieties tested they showed higher sensitivity to the combinations of growth regu-

lators used and produced higher yields of buds in those media where both types of explants responded positively.

Bud differentiation from leaf explants required the presence of NAA in the culture medium. Benzyladenine alone was unable to induce organogenesis. However, in combination with auxin greatly increased the organogenic response. In the literature there are several cases of plants that form buds in response to treatment with cytokinins alone (ARNOLD and ERIKSSON, 1979; BHARAL and RASHID, 1981; KUKULCZANKA and SUSZYNSKA, 1972; MUDGAL *et al.*, 1981; YANG and CHANG, 1979).

Such diverse behaviour of distinct plant species may be due to the occurrence of different levels of endogenous hormones, including auxins.

It is a well known fact that the type of organ formed and the amount of response obtained is normally controlled by the interaction between auxins and cytokinins (ABO EL-NIL *et al.*, 1976; SKOOG and MILLER, 1957) and this equally holds for *Actinidia chinensis* leaves. Although *Actinidia* leaf blade explants responded positively to a relatively wide range of combinations of NAA and BA, best results were achieved when 0.1 or 0.5 mg/l NAA were combined with 2 mg/l BA. These concentrations are not very different from those reported to give maximum response with explants from other parts of the plant (CHRIQUI and TRIPATHI, 1984; GUI, 1979; HIRSCH and FORTUNE, 1984; PAIS *et al.*, 1985).

In segments of roots and stems, zeatin was found to be more efficient in inducing bud formation than any other cytokinin, BA included (GUI, 1979; GUI and XU, 1982; VELAYANDOM *et al.*, 1985). There was even some cases where zeatin alone was able to induce bud formation (GUI, 1979; GUI and XU, 1982; HARADA, 1975).

In previous studies some differences of regenerative potential of male and female explants have been found (CHRIQUI and TRIPATHI, 1984; GUI, 1979; HARADA, 1975). In the present work we also have obtained slightly higher frequencies of bud production in explants coming from female plants especially at lower auxin concentrations. Similar results were observed by GUI (1979) in stem segments. On the other hand, HARADA (1975) and CHRIQUI and TRIPATHI (1984) found out that root segments from male plants had higher budding potential. Such discrepancies are probably due to the fact that organs of distinct nature have been

used as explants. It has been suggested that sex related morphogenetic differences may perhaps be correlated with quantitative and qualitative differences at the biochemical level, namely of total soluble peroxidase activity and isoperoxidase composition (HIRSCH and FORTUNE, 1979; 1984).

Histological studies have shown that leaves and buds were formed close the periphery of the explant, after some callusing had occurred. These observations agree with other references on this subject (CHRIQUI and TRIPATHI, 1984; GUI and XU, 1982).

Rooting of formed shoots was achieved with different IBA concentrations. However, lower concentrations were found more desirable since less callus is produced a situation that favours plantlet survival. Regenerated plants although presenting some juvenile characters developed well.

#### REFERENCES

- ABO EL-NIL, M. M., HILDEBRANDT & EVERT, R. F.  
1976 Effect of auxin-cytokinin interaction on organogenesis in haploid callus of *Pelargonium hortorum*. *In Vitro* 12: 602-604.
- ARNOLD, S. & ERIKSSON, T.  
1979 Bud induction on isolated needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) grown *in vitro*. *Plant. Sci. Lett.* 15: 363-372.
- BHARAL, S. & RASHID, A.  
1981 Tissue culture of *Alhagi camelorum* — a legume of high regenerative capacity. *Physiol. Plant.* 53: 497-500.
- CHRIQUI, D. B. & TRIPATHI, B. K.  
1984 Comparaison des aptitudes morphogénétiques des étamines fertiles ou stériles d'*Actinidia chinensis* cultivées *in vitro*. *Can. J. Bot.* 62: 1940-1946.
- DAVIES, M. E. & DALE M. M.  
1979 Factors affecting *in vitro* shoot regeneration of leaf discs of *Solanum laciniatum* Ait. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 51-60.
- GUI YAO-LIN  
1979 Induction of callus and regeneration of plantlets in stem segment culture of chinese gooseberry. *Acta Bot. Sin.* 21: 339-344.
- GUI YAO-LIN, MU XI-JIN & XU TING-YU  
1982 Studies on morphological differentiation of endosperm plantlets of chinese gooseberry *in vitro*. *Acta Bot. Sin.* 24: 216-221.
- GUI YAO-LIN & XU TING-YU  
1982 Studies on histology and histochemistry of the morphogenesis of stem segment in chinese gooseberry cultures *in vitro*. *Acta Bot. Sin.* 24: 301-306.



HARADA, H.

- 1975 In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* Pl. as a technique for vegetative multiplication. *J. Hort. Bot. Sci.* **50**: 81-83.

HIRSCH, A. M.

- 1970 Identification et dosage des acides aminés libres de fragments de tiges d'*Actinidia chinensis* Planch. Mise en culture in vitro de ces fragments. *C. R. Acad. Sci Paris* **270**: 1462-1464.

- 1975 Sur la culture de tissus de fruits d'*Actinidia chinensis* et le métabolisme des acides aminés libres de fragments de tiges cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris* **280**: 1369-1372.

HIRSCH, A. M. & FORTUNE, D. B.

- 1979 Organogénèse dans les cultures de tissus de deux plants appartenant au genre *Actinidia* (*Actinidia chinensis* et *Actinidia polygama*). Relations entre organogénèse et peroxidases. *C. R. Acad. Sci Paris* **288**: 1159-1163.

- 1984 Peroxidase activity and isoperoxidase composition in culture stem tissue, callus and cell suspensions of *Actinidia chinensis*. *Z. Pflanzenphysiol.* **113**: 129-139.

KUKULCZANKA, K. & SUSZYNSKA, G.

- 1972 Regenerative properties of *Saintpaulia ionantha* Wendl. leaves cultured in vitro. *Acta Soc. Bot. Pol.* **41**: 503-509.

MEIJER, E. G. M. & BROUGHTON, W. J.

- 1981 Regeneration of whole plants from hypocotyl-root-, and leaf-derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. *Physiol. Plant.* **52**: 230-284.

MOINET, M.-L.

- 1986 Le kiwi conquiert nos vergers. *Science et Vie* **820**: 104-107.

MUDGAL, A. K.; GOEL, S.; GUPTA, S. C. & CHOPRA, R. N.

- 1981 Regeneration of *Iberis amara* plants from in vitro cultured leaf and stem explants. *Z. Pflanzenphysiol.* **101**: 179-182.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F.

- 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

PAIS, M. S. S.; OLIVEIRA, M. M. & BARROSO, J.

- 1985 On the use of petiole fragments of *Actinidia chinensis* (kiwi) for plant differentiation. In: Symp. of in vitro Problems Related To Mass Propagation of Horticultural Plants. pp. 36, Gembloux-Belgium.

SKOOG, F. & MILLER, C. O.

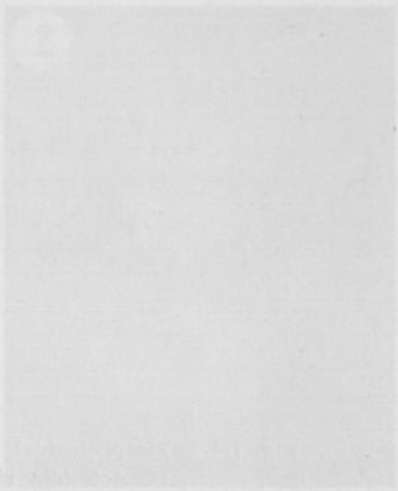
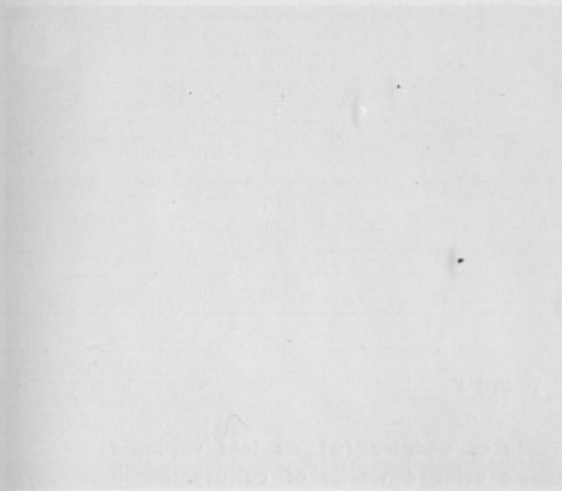
- 1957 Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**: 118-131.

STANDARDI, A.

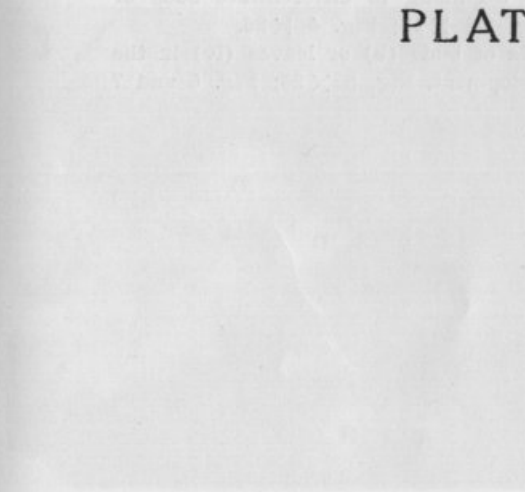
- 1931 Micropropagazione dell'*Actinidia chinensis* Pl. mediante coltura «in vitro» di apici meristematici. *Fruticcoltura* **53** (1).

- 1982 Effetti di subcolture ripetute in germogli di *Actinidia chinensis* (Pl.) coltivati «in vitro». *Riv. Ortoflorofrutt. It.* **66**: 419-429.

- TRIPATHI, B. K. & SAUSSAY, R.  
1980 Sur la multiplication végétative de l'*Actinidia chinensis* Pl. «Chinese gooseberry» par culture de racines issus de filets staminaux. *C. R. Acad. Sci. Paris* **291**: 1067-1069.
- VELAYANDOM, L.; HIRSCH, A.-M. & FORTUNE, D.  
1985 Propagation du kiwi, *Actinidia chinensis* (L.) Planchon, par microbouturage *in vitro* de noeuds. *C. R. Acad. Sci. Paris* **301**: 597-600.
- YANG, Y. W. & CHANG, W. C.  
1979 *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Z. Pflanzenphysiol.* **93**: 337-343.



PLATES



## TERRILL, D. H. &amp; SHERMAN, R.

1965. The morphology and development of nodules on leaf explants of *Actinidia chinensis* L. and *Actinidia speciosa* (L.) Merr. and the effect of auxin on the development of nodules. *Journal of Horticultural Science*, **46**, 1-10.

## WELLS, J. G. &amp; HARRIS, J. W. &amp; HARRIS, J. W.

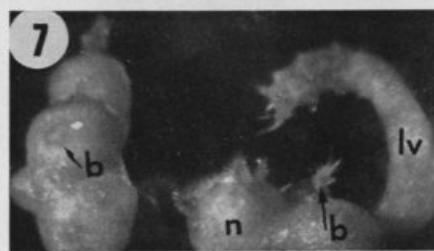
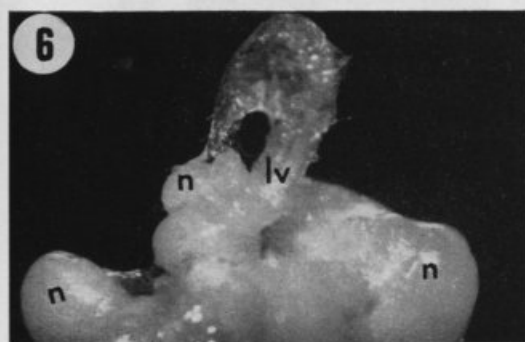
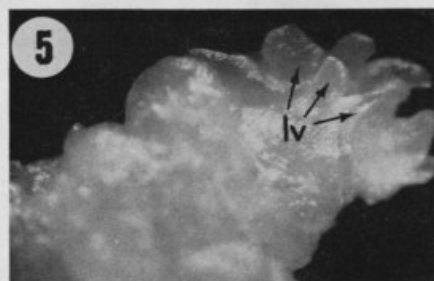
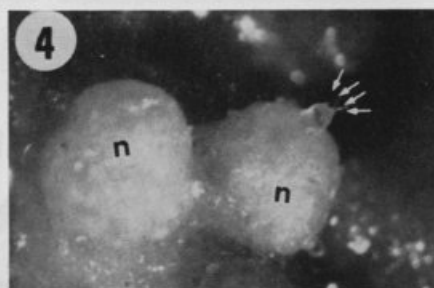
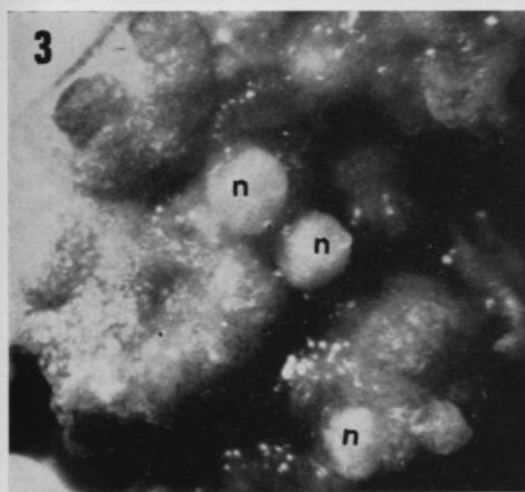
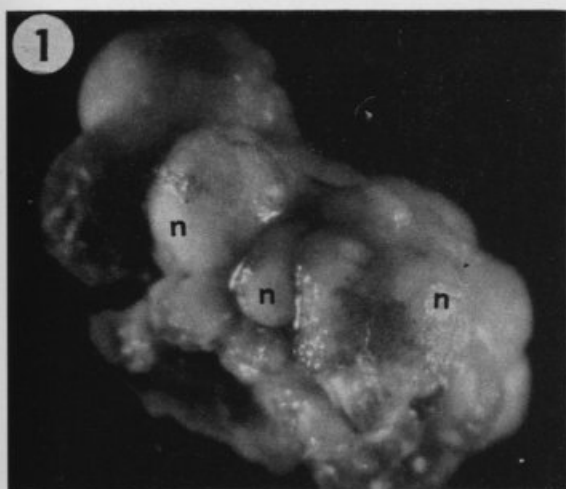
1965. Propagation of *Actinidia chinensis* (L.) Merr. and *Actinidia speciosa* (L.) Merr. by leaf explants. *Journal of Horticultural Science*, **46**, 11-15.

## YANG, Y. W. &amp; CHANG, J. H.

1972. An ultrastructural study of the early stages of nodulation in *Actinidia chinensis* L. *Journal of Horticultural Science*, **53**, 117-122.

## PLATE I

- Fig. 1-4. — Morphological aspects of nodules (n) on leaf explants of *Actinidia chinensis* after 4 weeks of culture. Some nodules are already beginning to differentiate buds or leaves (arrows). Fig. 1-3  $\times 13$ ; Fig. 4  $\times 26$ .
- Fig. 5-7. — Morphological aspects of buds (b) or leaves (lv) in the early stages of development. Fig. 5  $\times 26$ ; Fig. 6 and 7  $\times 13$ .



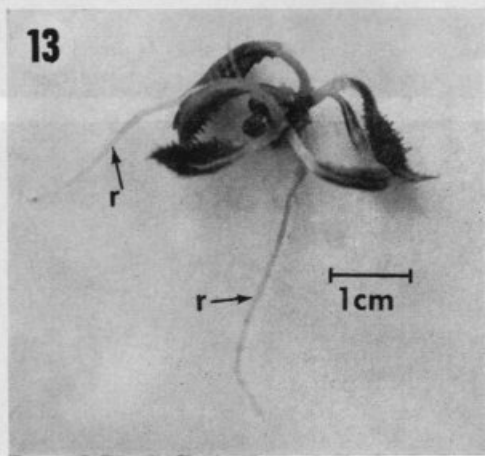
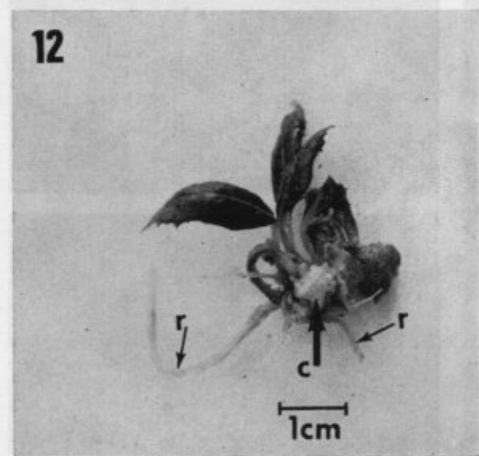
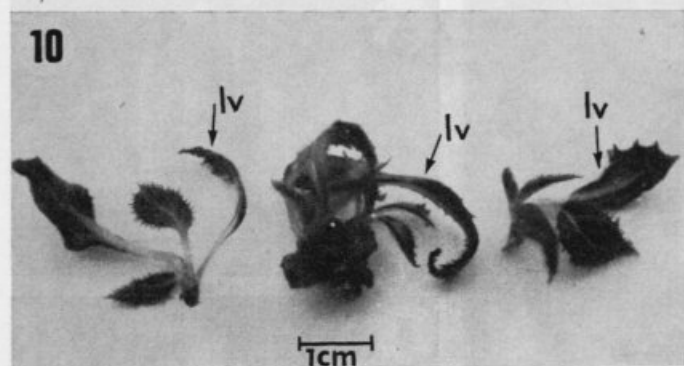
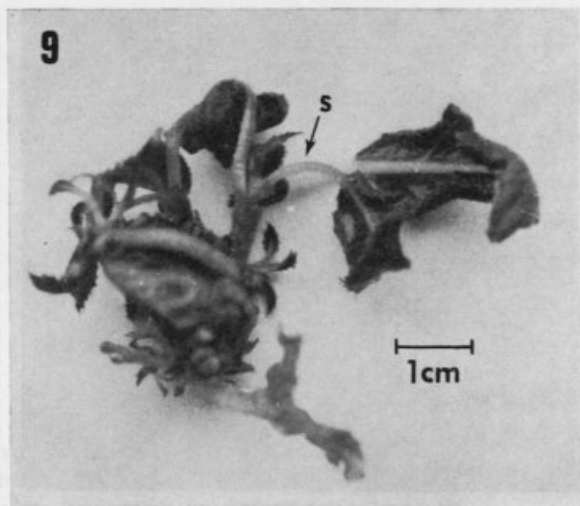
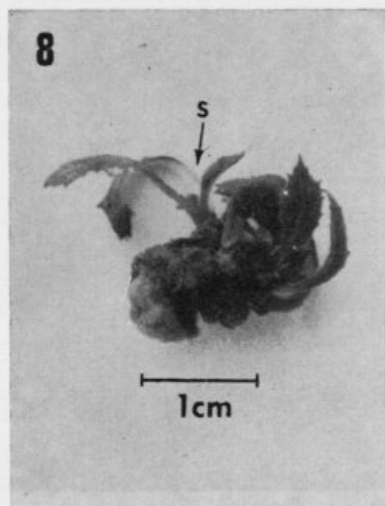


PLATE II

Fig. 8-11. — Aspects of shoots (s) and leaves (lv) formed on leaf blade explants of *Actinidia chinensis* after 8 weeks in culture.

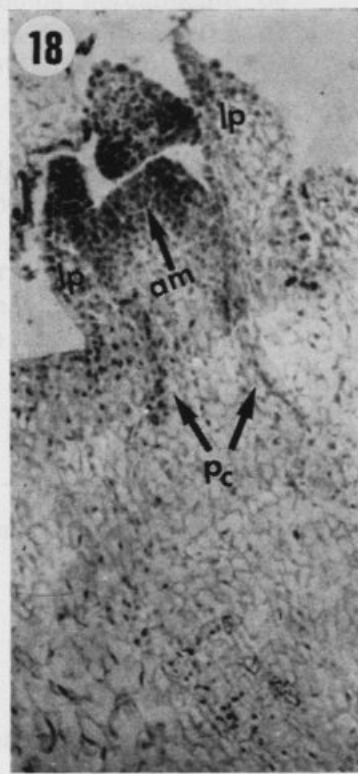
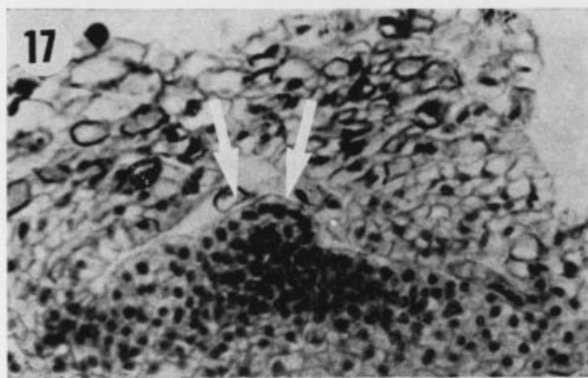
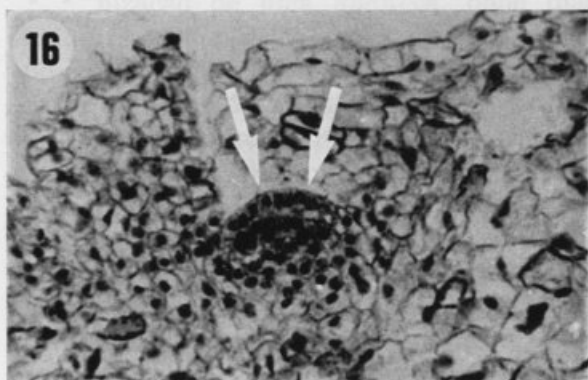
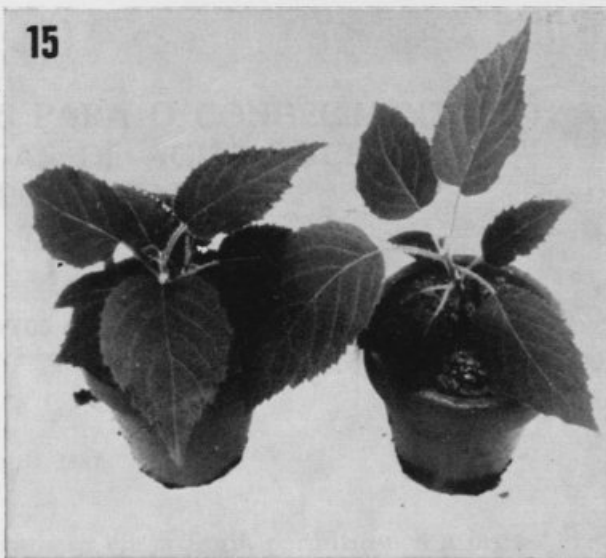
Fig. 12-13. — Aspects of shoots with roots (r) also showing some callus (c) formed during the rooting process.

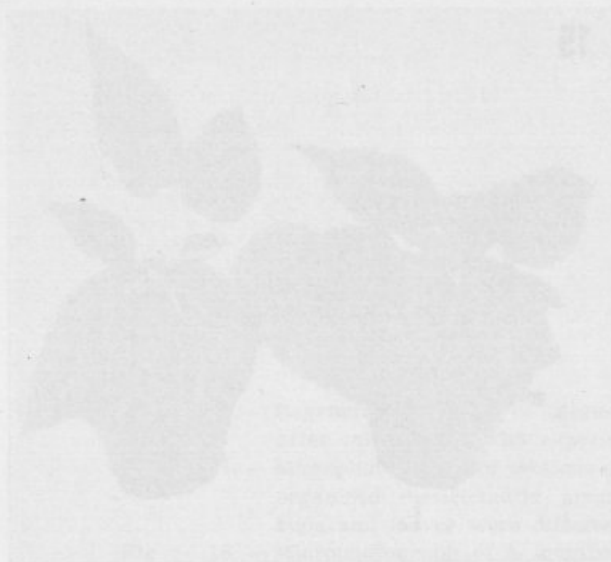


PLATE III

- Fig. 14-15. — Regenerated plants of *Actinidia chinensis* one year after initiation of the experiment.
- Fig. 16-17. — Microphotographs of sections on blade explants showing organized meristematic areas (arrows) from which buds and leaves were differentiated.  $\times 210$ .
- Fig. 18. — Microphotograph of a longitudinal section of a young developing bud from a leaf blade explant after 4 weeks in culture, showing the apical meristem (am) leaf primordia (lp) and the differentiating procambium (pc).  $\times 84$ .







## CONTRIBUIÇÕES PARA O CONHECIMENTO DAS ALGAS DE ÁGUA DOCE DE PORTUGAL — VI

por

M. FÁTIMA SANTOS & M. HELENA MORGADINHO

Instituto Botânico da Universidade de Coimbra

Recebido em 30 de Dezembro de 1987.

A construção de uma câmara climatizada permitiu-nos a organização de uma algoteca, onde dispomos actualmente de algumas centenas de culturas unialgais, em boas condições de desenvolvimento (M. FÁTIMA SANTOS & J. F. MESQUITA, Bol. Soc. Brot., Sér. 2, 54: 415-423, 1981).

Em prosseguimento de uma série de trabalhos intitulada «Contribuições para o conhecimento das algas de água doce de Portugal» e aproveitando o material disponível nesta algoteca, apresentamos agora a descrição e desenho de algumas espécies novas para o País, colhidas na região da Serra da Estrela. Embora as nossas observações tenham incidido fundamentalmente sobre o material cultivado, por vezes, recorreremos também ao material original conservado em formol.

### CYANOPHYTA

#### CHROOCOCCALES

*Eucapsis minor* (Skuja) Hollerbach in Starmach, Fl. Slodkowodna Polski 2: 130 (1966).

*Eucapsis alpina* Clem. & Schantz var. *minor* Skuja in Acta Horti Bot. Univ. Latv. 1, 3: 155 (1926). — Geitler in Rabenh., Krypt. Fl. 14: 258 (1932).

Colónia composta, constituída por células dispostas em pequenos agregados cúbicos envolvidos por uma bainha incolor rela-

tivamente espessa. Células esféricas ou subesféricas com conteúdo azul esverdeado. Dim.: diâmetro das células 2-3  $\mu$  (nos nossos exemplares: células 4,5  $\times$  3  $\mu$  ou 2,5-3,5  $\mu$  de diâmetro). — Est. I, fig. 1.

Serra da Estrela, água corrente, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 821 (COI). — Cultura 121.

*Chlorogloea purpurea* Geitler in Arch. Protist. 62: 98 (1928). — Geitler in Rabenh. Krypt. Fl. 14: 311 (1932). — Starmach, Fl. Slodkowodna Polski 2: 157 (1966).

Talo microscópico envolvido por uma bainha estreita, hialina e homogénea, constituído por células esféricas, alongadas ou poligonais, sem bainha própria. A disposição das células em pseudo-filamentos em regra não é evidente. Conteúdo celular arroxeadado. Dim.: diâmetro das células 1,5-2,5  $\mu$  (nos nossos exemplares: diâmetro 1,5-2,5  $\mu$ ; células em divisão 3,5  $\times$  2-2,5  $\mu$ ). — Est. I, fig. 2.

Serra da Estrela, vala de água corrente, próximo da Lagoa do Lageado, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 823D (COI). — Cultura 122.

## CHLOROPHYTA

### TETRASPORALES

*Chaetopeltis orbicularis* Berthold in Nova Acta Acad. Caes. Leop.-Carol. Germ. Nat. Curiosorum 40: 219 (1878). — Prescott, Algae of the Western Great Lakes Area: 124 (1951). — Printz in Hydrob, 24, 1-3: 319 (1964).

Talo com a forma de um disco monostromático, constituído por células poligonais ou retangulares, dispostas radialmente. Algumas células apresentam 1 ou 2 pêlos gelatinosos que são pseudoflagelos; o plasto é laminar e parietal provido de um pirenóide e nas células jovens é evidente a presença de dois vacúolos contrácteis. A reprodução ocorre por formação de zoósporos tetraflagelados. Dim.: comprimento das células 15-30  $\mu$ ; largura 15-20  $\mu$  (nos nossos exemplares: células 12-20  $\times$  13-17  $\mu$ ). — Est. II, fig. 1.

Serra da Estrela, Lagoa do Lageado, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 823D (COI). — Cultura 100.

**Monoraphidium griffithii** (Berkel.) Komárkova-Lagnerová in *Studies in Phycology*: 98 (1969). — Hindák in *Biologické Práce* 26, 4: 100 (1977).

Células alongado-fusiformes, direitas ou levemente encurvadas, gradualmente afiladas e terminadas em pontas finas. Plasto parietal, sem pirenóide, estendendo-se até às extremidades com uma incisão lunada, bem visível, na região mediana onde se localiza o núcleo. Autósporos em número de (2)-4-8-(16), libertados por divisão transversal da parede mãe, que persiste nas culturas. Os autósporos podem permanecer durante algum tempo presos à parede da célula mãe ou unidos pelas extremidades, adquirindo um aspecto estipitado e formando por vezes grandes colónias. É ainda frequente a fixação das células ao substrato. Dimensões: comprimento das células 50-110  $\mu$ ; largura 1,5-4  $\mu$  (nos nossos exemplares: células 50-65  $\times$  2-3,5  $\mu$ ). — Est. II, fig. 2; Est. III, fig. 1.

Serra da Estrela, Lagoa Comprida, água estagnada, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 824Y (COI). — Cultura 109.

**Botryosphaera sudetica** (Lemm.) Chodat in *Bull. Soc. Bot. Genève*, Sér. 2, 13: 93 (1921). — Skuja in *Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsal.* Ser. IV, 18, 3: 138 (1964). — Bourrelly, *Les algues d'eau douce* I: 201 (1966).

Colónias gelatinosas, constituídas por densos agregados de células esféricas unidas entre si por pedúnculos gelatinosos ramificados e anastomosados que envolvem a parte basal de cada célula. Plasto em forma de taça com lobos digitados, apresentando grânulos de amido não organizados em pirenóide. Multiplicação por autósporos, 2 ou 4, que permanecem unidos pela base a pedúnculos geralmente ramificados dicotomicamente e resultantes da gelificação da parede mãe. Dimensões: diâmetro da colónia 35-50-130  $\mu$ ; comprimento das células 10-14  $\mu$ , largura 7-12  $\mu$ ; espessura da bainha gelatinosa podendo atingir 40  $\mu$  (nos nossos exemplares: colónia 120  $\times$  60  $\mu$  ou 80  $\mu$  de diâmetro; diâmetro das células 15  $\mu$ ). — Est. IV, fig. 1.

Serra da Estrela, Lagoa do Lageado, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 823 (COI). — Cultura 102.

**Enallax coelastroides** (Bohl.) Skuja in *Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsal. Ser. IV*, 18, 3: 139 (1964) — Komarek & Fott in *Phytoplankton des Susswassers*, 7, 1: 802 (1893).

Cenóbios de 4 ou 8 células dispostas em 2 séries não complanares. Os eixos das células formam um ângulo agudo pois estão unidas pela zona polar. Células largamente fusiformes ou ovóides com o polo superior arredondado e o inferior levemente pontegudo. A parede apresenta 2-9 cristas longitudinais. Plasto parietal, irregular, mais ou menos lobado ou dividido, provido de um grande pirenóide. Multiplicação por 2-4-8 autósporos, podendo estes permanecer temporariamente no interior da parede mãe, donde se libertam através de uma fenda longitudinal. Dim.: comprimento das células 10-24  $\mu$ ; largura 7-15  $\mu$  (nos nossos exemplares 14-19  $\times$  8-12  $\mu$ ). — Est. IV, fig. 2.

Serra da Estrela, Lagoa Comprida, água estagnada, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 824K (COI). — Cultura 235.

**Elakatothrix bplex** Hindák in *Preslia* 34: 285 (1962). — Nygaard in *Biologiske Skrifter* 21, 1: 80 (1977).

Colónias cilíndrico-filiformes com um número relativamente pequeno de células envolvidas por uma bainha gelatinosa comum, relativamente espessa. Células fusiformes, com as extremidades arredondadas, dispostas linearmente; após a divisão, as duas células podem permanecer temporariamente unidas e apresentam uma forma ovóide. Plasto laminar e parietal com pirenóide. A multiplicação ocorre por divisão celular transversal, seguida de alongamento das extremidades neoformadas. Dim.: comprimento de uma colónia com duas células 21-51  $\mu$ ; largura 6-15  $\mu$ ; comprimento das células 7-27  $\mu$ ; largura 2,5-5,5  $\mu$  (nos nossos exemplares: colónia com 4 células 56  $\times$  12  $\mu$ ; células 10-15  $\times$  3-3,5  $\mu$ ). — Est. V, fig. 1.

Serra da Estrela, Lagoa Comprida, água estagnada, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 824F (COI).

**Geminella minor** (Nägeli) Heering in A. Pascher, Sussw. Deutsch., Oest. und der Schweiz. **6**: 41 (1914). — Prescott, Algae of the Western Great Lakes Area: 100 (1951). — Printz in Hydrob. **24**, 1-3: 52 (1964). — Skuja in Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsal. IV, **18**, 3: 149 (1964). — Starmach, Fl. Slodkowodna Polski **10**: 78 (1972).

Filamentos unisseriados envolvidos por uma espessa bainha hialina e homogénea. As células são curtamente cilíndricas, por vezes elipsóidais, unidas topo a topo. Plasto laminar e parietal em anel incompleto e provido de pirenóide. Dim.: comprimento das células 3-14  $\mu$ ; largura 2-10  $\mu$ ; espessura da bainha 8-22  $\mu$  (nos nossos exemplares: células 9-15  $\times$  6-9  $\mu$ ; diâmetro do filamento com bainha 20-35  $\mu$ ). — Est. V, fig. 2.

Serra da Estrela, Lagoa do Lageado, solo encharcado, 6-VII-1981, *Fátima Santos & H. Morgadinho* 823A (cor). — Cultura 108.

Colônias cilíndricas, com um número relativamente pequeno de células envolvidas por uma haste papilosa comum, menos espessa e mais curta que a das espécies relacionadas. Células cilíndricas, com as extremidades arredondadas, dispostas alternadamente, após a divisão, em duas células perpendiculares, formando uma haste papilosa. Placa laminar com papilas cilíndricas, com o eixo por dentro e o ápice para fora. Comprimento das células 10-15 µm; largura 5-7 µm; comprimento das células 7-10 µm; largura 3-5 µm. Exemplos: colônia com 4 células 10 x 12 µm; células 10-15 x 3-5 µm. -- Bot. V, fig. 1.

Serra da Estrela, Lagoa Comprida, água estagnada, 6-VII-1961. Fátima Santos & H. Menezes (det.). -- Culture 232.

*Eladobryx duplex* Hordik in Frestia 34: 287 (1962). -- Negandi in Biologisk Skrift 21, 1: 59 (1977).

Colônias cilíndricas, com um número relativamente pequeno de células envolvidas por uma haste papilosa comum, menos espessa e mais curta que a das espécies relacionadas. Células cilíndricas, com as extremidades arredondadas, dispostas alternadamente, após a divisão, em duas células perpendiculares, formando uma haste papilosa. Placa laminar com papilas cilíndricas, com o eixo por dentro e o ápice para fora. Comprimento das células 10-15 µm; largura 5-7 µm; comprimento das células 7-10 µm; largura 3-5 µm. Exemplos: colônia com 4 células 10 x 12 µm; células 10-15 x 3-5 µm. -- Bot. V, fig. 1.

Serra da Estrela, Lagoa Comprida, água estagnada, 6-VII-1961. Fátima Santos & H. Menezes (det.). -- Culture 232.

*Eladobryx duplex* Hordik in Frestia 34: 287 (1962). -- Negandi in Biologisk Skrift 21, 1: 59 (1977).

Colônias cilíndricas, com um número relativamente pequeno de células envolvidas por uma haste papilosa comum, menos espessa e mais curta que a das espécies relacionadas. Células cilíndricas, com as extremidades arredondadas, dispostas alternadamente, após a divisão, em duas células perpendiculares, formando uma haste papilosa. Placa laminar com papilas cilíndricas, com o eixo por dentro e o ápice para fora. Comprimento das células 10-15 µm; largura 5-7 µm; comprimento das células 7-10 µm; largura 3-5 µm. Exemplos: colônia com 4 células 10 x 12 µm; células 10-15 x 3-5 µm. -- Bot. V, fig. 1.

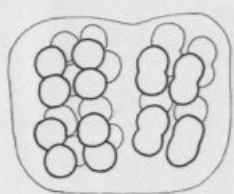
Serra da Estrela, Lagoa Comprida, água estagnada, 6-VII-1961. Fátima Santos & H. Menezes (det.).



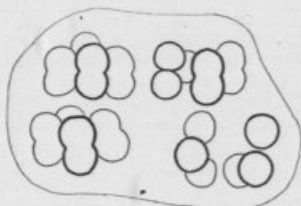
ESTAMPAS

ESTAMPA I

- Fig. 1. — (a-d) — *Eucapsis minor* (Skuja) Hollerbach.  $\times 1710$ .
2. — (a-i) — *Chlorogloea purpurea* Geitler.  $\times 2280$ .
- a-d — Colónias jovens.  $\times 2280$ .
- e, f — Primeira camada de células de colónias adultas.  
 $\times 2280$ .
- g-i — Cortes em colónias, mostrando a disposição das  
células em pseudofilamentos.  $\times 2280$ .



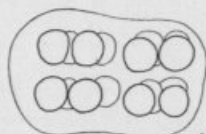
1a



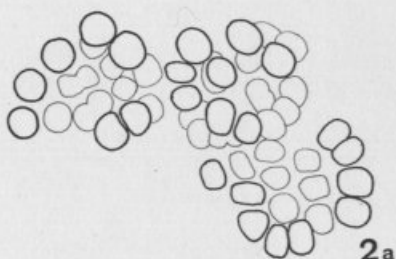
1b



1c



1d



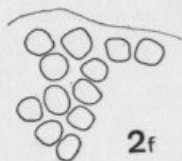
2a



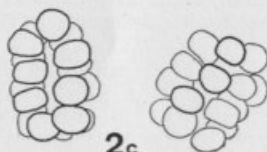
2b



2e



2f



2c



2d



2g



2h



2i

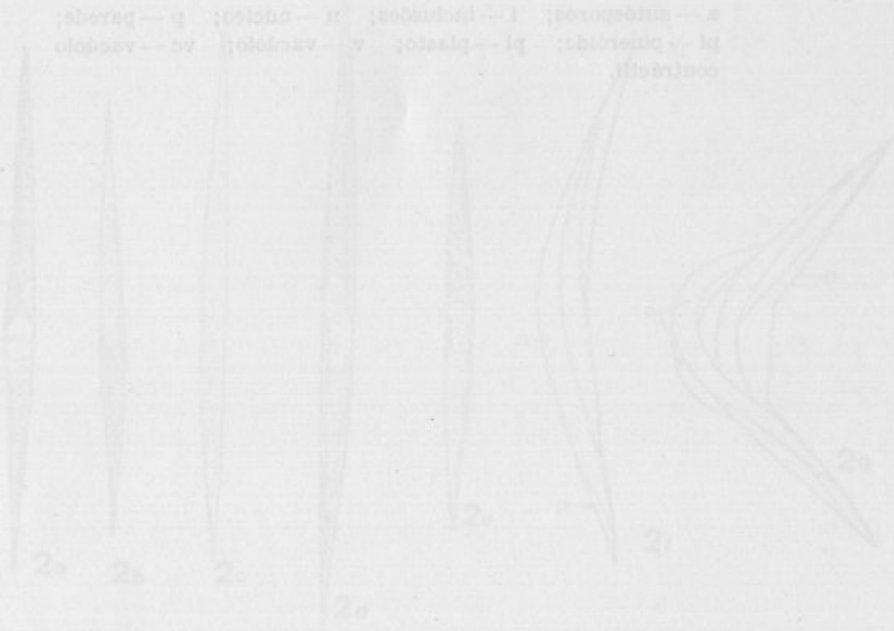




ESTADIA II



Fig. 1 -- *Cratogeomys cylindrica* (L.)  
 a -- aspecto do topo, X 750;  
 b -- porção do topo com portanetes de algas ciliares, X 1150;  
 c -- células epiteliais em 2 planos de foco, X 1150;  
 d -- formação de câmbio celular, X 750;  
 e -- *Cratogeomys cylindrica* (L.) (K. K. K.);  
 f -- células musculares com câmbio celular, X 750;  
 g -- Vistas sucessivas da divisão para formação de auto-  
 pózoa, X 250; e X 1000.



a -- autozózo; l -- lã; n -- núcleo; p -- parede;  
 pl -- plasmídeo; v -- vacúolo; vc -- vacúolo  
 central.

ESTAMPA II

Fig. 1. — (a-e) — *Chaetopeltis orbicularis* Berthold.

a — Aspecto do talo.  $\times 710$ .

b — Porção do talo com pormenores de algumas células.  
 $\times 1140$ .

c — Célula observada em 3 planos de focagem.  $\times 1140$ .

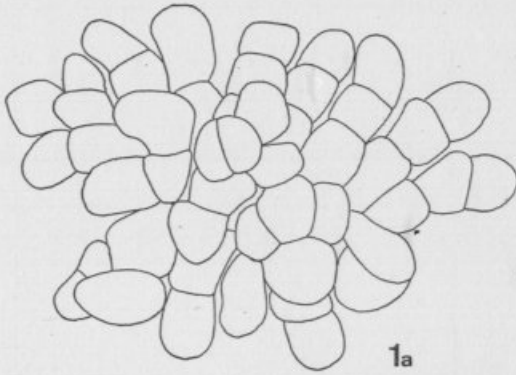
d, e — Pormenor do conteúdo celular.  $\times 1710$ .

2. — (a-g) — *Monoraphidium griffithii* (Berk.) Komárková-Legnerová.

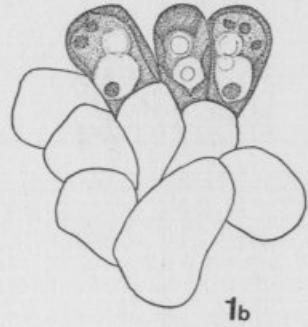
a-c — Células mostrando conteúdo celular. a  $\times 710$ ;  
b, c  $\times 1140$ .

d-g — Vários aspectos da divisão para formação de autósporas.  $\times 1710$ ; e  $\times 1060$ .

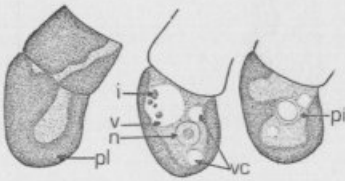
a — autósporas; i — inclusões; n — núcleo; p — parede;  
pi — pineróide; pl — plasto; v — vacúolo; vc — vacúolo  
contráctil.



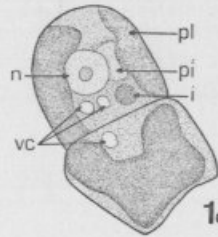
1a



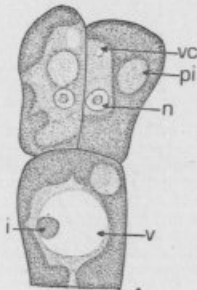
1b



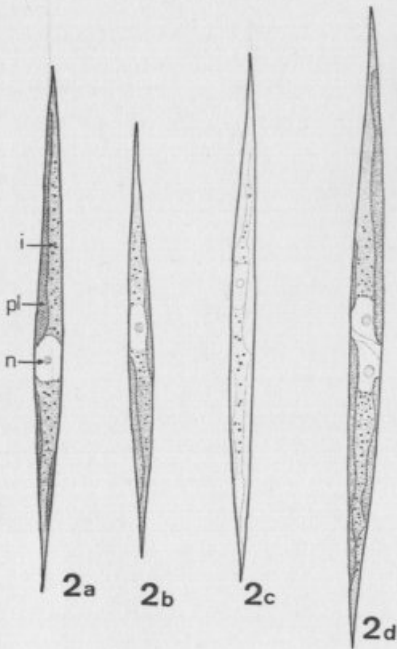
1c



1d



1e



2a

2b

2c

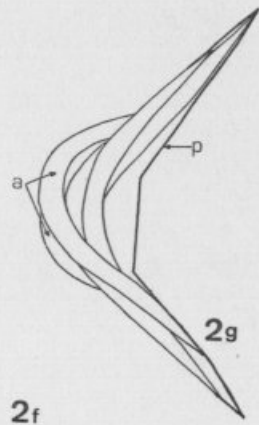
2d



2e



2f



2g



Figura II

Fig. 1 - *Chlorella vulgaris* (L.) Grun.

a - Aspecto da tala. x 1100

b - Porção da tala com peroxissomos de algas vivas. x 1100



c - Célula cloroplastada em 2 pólos de formação. x 1100

d - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

e - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

f - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

g - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

h - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

i - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

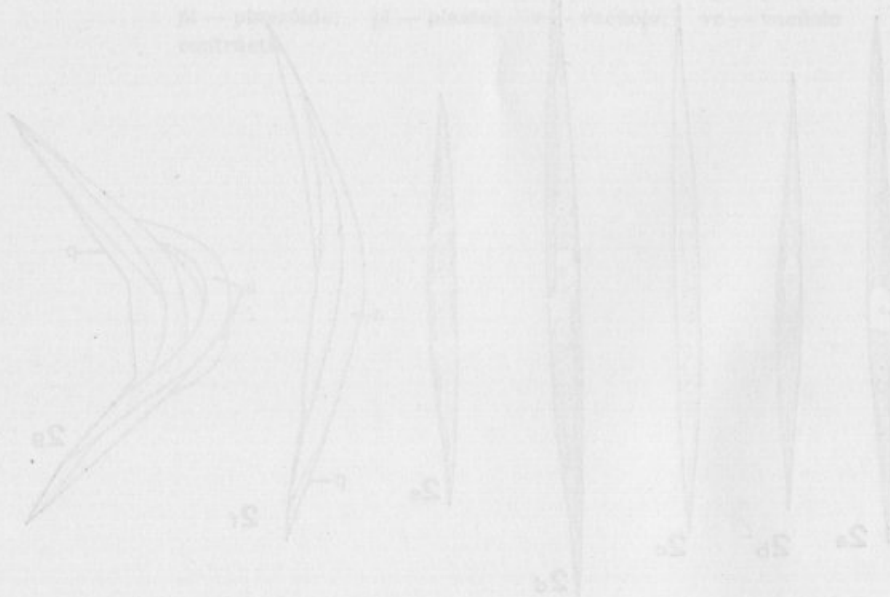
j - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

k - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

l - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

m - Formação de cloroplasto em tala. x 1100

n - Formação de cloroplasto em tala. x 1100



(a)





ESTAMPA III

Fig. 1. — (a-d) — *Monoraphidium griffithii* (Berk.) Komárková-Legnerová.

a — Saída dos autósporos.  $\times 1710$ .

b-d — Vários aspectos das colónias. b, d  $\times 1060$ ; c  $\times 580$ .

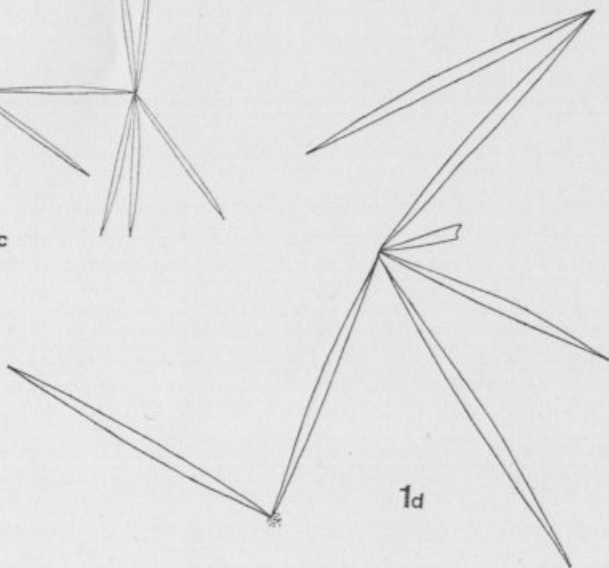
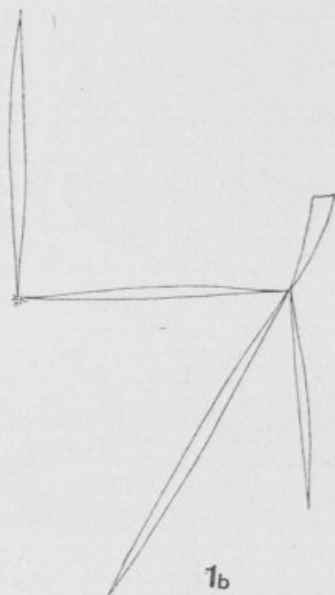
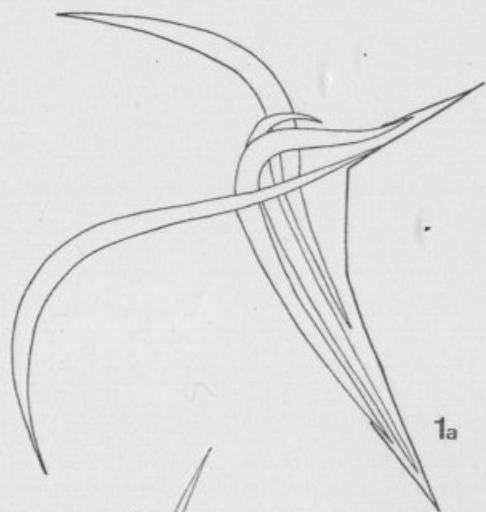




Figura III

Fig. 111. — *Eschscholzia* (Czek.) *Eschscholzia*  
*Eschscholzia*  
 — *Eschscholzia* x 1000  
 — *Eschscholzia* des *Eschscholzia* 2, 3 x 1000



Fig. 112



ESTAMPA IV

Fig. 1. — (a-d) — *Botryosphaera sudetica* (Lemm.) Chodat

a — Aspecto de uma colónia.  $\times 710$ .

b, c — Porções de colónias com pormenor de uma célula.  
b  $\times 1420$ ; c  $\times 1710$ .

d — Pormenor do conteúdo celular de células em divisão.  
 $\times 1710$ .

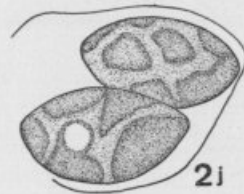
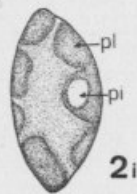
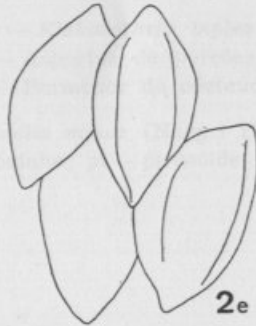
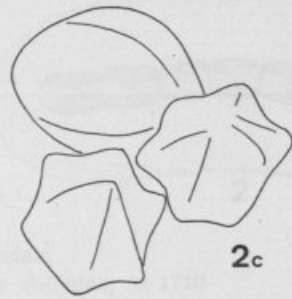
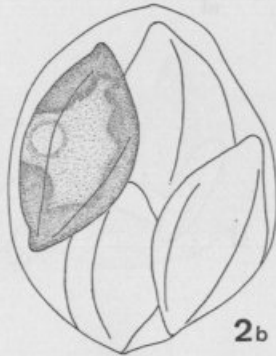
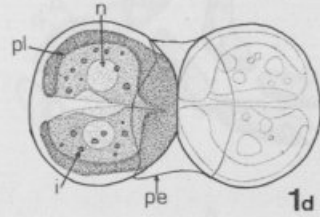
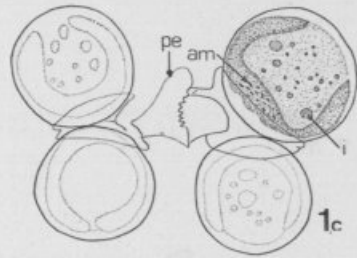
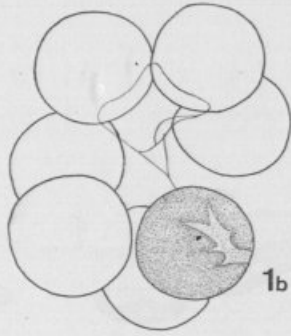
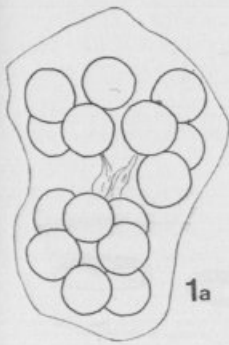
2. — (a-j) — *Enallax coelastroides* (Bohl.) Skuja.

a-e — Vários aspectos do cenóbio.  $\times 2280$ .

f — Vista apical de uma célula.  $\times 2280$ .

g-j — Pormenor do conteúdo celular.  $\times 2280$ .

am — amido; i — inclusões; n — núcleo; pe — pedúnculo gelatinoso; pi — pirenóide; pl — plasto.







(NEW TAXA  
IN SCROPHULARIACEAE FROM SOUTHERN  
TROPICAL AFRICA

EST. V

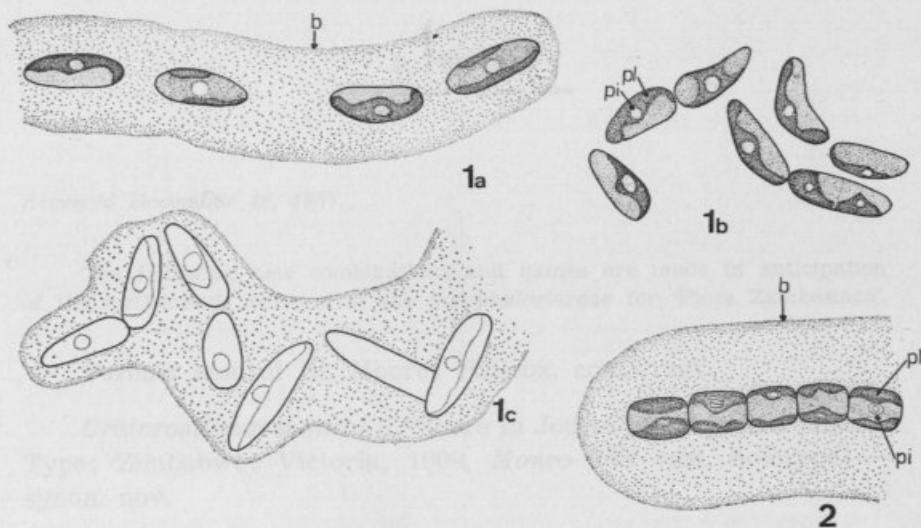


Fig. 1. — (a-c) — *Elakatothrix biplex* Hindak.

a, c — Aspectos de porções das colônias.  $\times 1710$ .  
b — Pormenor do conteúdo celular.  $\times 1710$ .

2. — *Geminella minor* (Naeg.) Heering.  $\times 1140$ .

b — bainha; pi — pirenóide; pl — plasto

*Torula* *torulata* (Naeg.) Heering, *Species a T. lat-*  
*brucata* (Skar) Hepp; *caulis* *nuda* *non* *est* *et* *hinc* *rami-*  
*ficantibus* *et* *inflorescentiis* *bracteatis* *gracilibus* *foliis* *circum-*  
*scissis* *differt*. *Typus*: *Zambia*: *Mwankunde* *District*, *25* *km* *N*  
*of* *Kaokopo* *Gorge*, *19* *April* *1953*; *Richard* *5837* (*n. holotypus*,  
*syn. holotypus*).

*Torula* *tennifolia* *Palmer*, *sp. nov.*, *haec* *species* *a* *T. lat-*  
*brucata* *Hepp* *caulis* *omnino* *glabra*, *foliis* *subulnar* *linearibus*  
*et* *lobis* *calycis* *quam* *torula* *longioribus* *differt*. *Typus*:  
*Zambia*: *Mwankunde* *District*, *Chikungowelo*, *15* *May* *1953*  
*Richard* *5838* (*n. holotypus*).



Fig. 7. 1 - *Chlamydomonas* (green alga).  
 2 - *Chlamydomonas* (green alga) with flagella X 1110.  
 3 - *Chlamydomonas* (green alga) with flagella X 1110.  
 4 - *Chlamydomonas* (green alga) with flagella X 1110.

NEW TAXA  
IN *SCROPHULARIACEAE* FROM SOUTHERN  
TROPICAL AFRICA

D. PHILCOX

Royal Botanic Gardens, Kew

Received December 30, 1987.

The following new combinations and names are made in anticipation of the forthcoming revision of the *Scrophulariaceae* for 'Flora Zambesiaca'.

***Torenia monroi*** (S. Moore) Philcox, comb. nov.

*Craterostigma monroi* S. Moore in Journ. Bot. 57: 214 (1919).  
Type: Zimbabwe: Victoria, 1909, *Monro* 788 (BM, holotype) —  
synon. nov.

***Torenia latibracteata*** (Skan) Hepper subsp. ***parviflora*** Philcox, subsp. nov., a subspecie typica floribus minoribus foliis caulinis longioribus et caule piloso differt. Typus: Zambia: Kawimbe, 1524 m, 20 May 1955, *Richards* 5792 (K, holotypus).

***Torenia involucrata*** Philcox, sp. nov., haec species a *T. latibracteata* (Skan) Hepper caulibus nudis non nisi e basi rami-  
ficantibus, et inflorescentiis bracteis grandibus foliaceis circum-  
cinctis differt. Typus: Zambia: Mwinilunga District, 25 km N  
of Kabompo Gorge, 19 April 1965, *Robinson* 6657 (K, holotypus;  
SRGH, isotypus).

***Torenia tenuifolia*** Philcox, sp. nov., haec species a *T. leder-  
mannii* Hepper caulibus omnino glabris, foliis subtiliter linearibus  
et lobis calycis quam tubo multo longioribus differt. Typus:  
Zambia: Mbala District, Chilongowelo, 1525 m, 15 May 1952,  
*Richards* 1690 (K, holotypus).

**Lindernia conferta** (Hiern) Philcox, comb. nov.

*Ilysanthes conferta* Hiern in Dyer, Fl. Cap. 4, 2: 365 (1904). Type: South Africa: Transvaal, *Baines* s. n. (K, syntype); Natal, Imbelecome, Rovelo Hills, *Sutherland* s. n. (K, syntype) — synonym. nov.

*Ilysanthes plantaginella* S. Moore in Journ. Bot. 43: 49 (1905). Type: Zimbabwe: Matopos Hills, *Eyles* 47 (BM, holotype: SRGH, isotype) — synonym. nov.

**Lindernia pulchella** (Skan) Philcox, comb. nov.

*Ilysanthes pulchella* Skan in Fl. Trop. Afr. 4, 2: 348 (1906). Type: Malawi: Mt Zomba Plateau, 1500-1800 m, *Whyte* s. n. (K, holotype) — synonym. nov.

*Ilysanthes purpurascens* Hutch., Botanist in Southern Africa: 461 (1946). Type: Zimbabwe: near Lundi River, 30 June 1930, *Hutchinson & Gillett* 3269 (K, holotype; BM, isotype) — synonym. nov.

*Ilysanthes saxatilis* T. Norlindh in Bot. Not. 1951: 115, fig. 4d-e (1951). Type: Zimbabwe: Inyanga District, Mt Inyanga, c. 2400 m, 14 February 1931, *Norlindh & Weimarck* 4969 (LD, holotype (n. v.); K, isotype) — synonym. nov.

*Ilysanthes pulchella* subsp. *rhodesiana* T. Norlindh in Bot. Not. 1951: 113, fig. 4f & h (1951). Type: Zimbabwe: Inyanga District, near Inyanga village, c. 1700 m, December 1930, *Fries, Norlindh & Weimarck* 3225 [K, syntype (fruiting 3255b)] — synonym. nov.

**Lindernia subreniformis** Philcox, sp. nov., a *L. insularis* Skan habitu procumbenti, floribus longi-pedicellatis in axillis foliorum subreniformium solitariis, sepalis erectis nec patentibus differt. Typus: Tanzania: Miombo Valley, c. 19 km SSW of Kingupira, c. 175 m, 15 August 1976, *Volleson* in MRC 3931 (K, holotypus; EA, WAG, isotypi).

**Lindernia wilmsii** (Engl. & Diels) Philcox, comb. nov.

*Ilysanthes wilmsii* Engl. & Diels in Engl., Bot. Jahrb, 26: 123 (1898). Type: South Africa: Transvaal, Hells Gate, Spitzkop, *Wilms* 900 (K, isotype) — synonym. nov.

*Ilysanthes muddii* Hiern in Dyer, Fl. Cap. 4, 2: 366 (1904).  
Type: South Africa: Transvaal, Macmac, *Mudd* s. n. (K, holotypus)  
— synon. nov.

*Lindernia exilis* Philcox, nom. nov.

*Ilysanthes gracilis* Skan in Fl. Trop. Afr. 4, 2: 349 (1906),  
non *Lindernia gracilis* (Bonati) Bonati. Type: Nigeria: Nupe,  
Jebba on River Quorra (Niger), *Barter* s. n. (not seen) —  
synon. nov.

*Alectra glandulosa* Philcox, sp. nov., a *A. rigida* (Hiern) Hemsl.  
floribus laxis non confertim racemosis et a *A. dolichocalyce* Philcox  
calyce et corolla glandulosa differt. Typus: Zambia: Mwinilunga  
District, 42 km from Mwinilunga on road to Solwezi, Mindwizi  
Dambo, 1700 m, 17 May 1986, *Philcox, Pope, Chisumpa & Ngoma*  
10350 (K, holotypus; BR, LISC, MO, NDO, SRGH, isotypi).

*Alectra dolichocalyx* Philcox, sp. nov., a *A. aurantiaca* Hemsl.  
habitu prostrato foliis sessilibus lineari-lanceolatis et calyce maiore  
differt. Typus: Zambia: Kabulamwanda, 120 km N of Choma,  
c. 1000 m, 21 April 1955, *Robinson* 1238 (K, holotypus).

*Alectra pubescens* Philcox, sp. nov., a *A. asperrima* Benth.  
pilis foliorum albo-tuberculatis destitutis, floribus subsessilibus  
et capsulis maioribus ovato-ellipsoideis nec globosis differt. Typus:  
Zambia: Mbala District, Chilongowelo Escarpment, 1500 m, 6 April  
1962, *Richards* 16254 (K, holotypus).

*Buchnera cryptocephala* var. *mwinilungensis* Philcox, var.  
nov., a varietate typica inflorescentia subglabra, marginibus cos-  
tisque loborum calycis bractearum et bracteolarum tantum indu-  
mento indutis, bracteis grandibus foliaceis inflorescentiam cir-  
cumcinctis deficientibus, caule inferna tantum dense folioso differt.  
Typus: Zambia: 28 km E of Mwinilunga, 17 April 1960, *Robinson*  
3667 (K, holotypus; SRGH isotypus).

*Buchnera lastii* subsp. *pubiflora* Philcox, subsp. nov., a  
subspecie typica spicis florentibus multo longioribus et tubo  
corollae extus pubescenti differt. Typus: Zambia: Mbala District,

above Ndundu, 1500 m, 16 February 1957, *Richards* 8196 (K, holotypus).

My grateful thanks are due to Mr ALAN RADCLIFFE-SMITH for his kind help with the Latin diagnoses.

TRANSFER OF THREE TROPICAL AFRICAN  
SPECIES OF *CRATEROSTIGMA* TO *TORENIA*  
(SCROPHULARIACEAE)

F. N. HEPPEL

Royal Botanic Gardens, Kew

Received December 31, 1987.

During research on Scrophulariaceae for 'Flora of Tropical East Africa' I have concluded that the genus *Craterostigma* shall be limited to those acaulous species with a rosette habit. This removes the following species with stems to *Torenia*, which already comprises some 50 species across the tropics.

***Torenia goetzei*** (Engl.) Hepper comb. nov.

*Craterostigma goetzei* Engl., Bot. Jahrb. 28: 477 (1900). Type: Tanzania, Uhehe, Uchungwe (as Ubschungwe) Mt, near Kissinga, *Goetze* 581 (holotype B†).

***T. latibracteata*** (Skan) Hepper comb. nov.

*Craterostigma latibracteatum* Skan in Thiselton-Dyer, Fl. Trop. Afr. 4, 2: 333 (1906). Type: Zaire, Dolo, *Schlechter* 12 440 (holotype K!).

***T. ledermannii*** Hepper nom. nov.

*Craterostigma gracile* Pilger in Engl. Bot. Jahrb. 45: 213 (1910); A. Raynal in *Adansonia*, sér. 2, 6: 431, pl. (1966), non *Torenia gracilis* Benth. (1884). Type: Cameroon, Garua, Tchambutu, *Ledermann* 5047 (holotype B†, photo K!).





## SUR LE RÔLE DE LA TRIPLOÏDIE DANS L'ÉVOLUTION CHEZ LA SECTION *BULBOCODII* DC. DU GENRE *NARCISSUS* L.

par

ABÍLIO FERNANDES \*

Institut Botanique de l'Université de Coimbra

Reçu le 30 Décembre 1987.

### RÉSUMÉ

L'étude des échantillons de 4 feuilles d'herbier (COI) d'un *Narcissus* appartenant à la section *Bulbocodii* DC., croissant au district de Guarda (Portugal), a montré l'existence, parmi ces plantes, de triploïdes et d'hexaploïdes, les nombres chromosomiques, respectivement  $2n = 21$  et  $42$ , étant déduits des dimensions des grains du pollen. La variation de la longueur du grand axe des grains des plantes triploïdes a mis en évidence qu'elles produisent du pollen à  $n = 7, 14$  et  $21$  chromosomes, les deux premiers types dans une proportion ne s'écartant pas beaucoup de 1:1 et le dernier dans un pourcentage assez bas. D'autre part, le volume des grains pris dans son ensemble a varié depuis  $43\,096 \mu\text{m}^3$  jusqu'à  $60\,407 \mu\text{m}^3$ . Le pourcentage des grains fertiles s'est révélé aussi variable.

Les plantes hexaploïdes engendrent des grains à  $n = 7, 14, 21$  et  $28$ . Les deux premiers types se présentent dans un pourcentage variable, le second étant, cependant, toujours plus élevé que le premier, le troisième se montre dans un pourcentage bien plus élevé que chez les triploïdes et le quatrième dans un pourcentage assez bas. Le volume du pollen dans son ensemble est plus élevé que chez les triploïdes. Le pourcentage de pollen fertile est variable.

Dans la localité de Martiana, on a trouvé une plante dont le même bulbe a produit deux hampes florales, une triploïde et une autre hexaploïde. Il est probable que la dernière ait été produite par endomitose suivie de mitoses normales, qui ont engendré un bourgeon à nombre double de chromosomes. Chez les plantes récoltées près du croisement de la route Guarda-Vilar Formoso avec celle vers Cerdeira on a trouvé une autre plante, qui

\* Centro de Fito-sistemática e Fito-ecologia (Ec2) do Instituto Nacional de Investigação Científica.

a produit aussi deux hampes florales à partir du même bulbe, dont une portait une fleur jaunâtre à couronne 6-lobée et l'autre une fleur intensément jaune à couronne crénelée, toutes les deux produisant du pollen avec les caractères des plantes hexaploïdes. On admet que soit l'apparition de la couronne 6-lobée, soit le changement de coloration sont dues à des mutations somatiques.

Des plantes diploïdes de *N. bulbocodium* L. subsp. *bulbocodium* se trouvent sur les bords moins humides le long des marges des rivières et des prés mouillés. Il est probable que les triploïdes aient été issus du croisement de gamètes réduits avec des gamètes non réduits produits par ces plantes et que les individus ainsi engendrés se soient adaptés à vivre dans les prés arrosés artificiellement et dans les terrains marécageux. Ces plantes sont fauchés avant que les graines soient mûres et, de cette façon, les triploïdes se maintiendront par multiplication végétative, la dissémination des caïeux et des bulbes entiers se faisant par les eaux courantes des rivières. Ces plantes peuvent produire aussi des hexaploïdes par voie végétative, comme il arrive chez la plante de Martiana. Cependant, il y en aura des endroits où les triploïdes, ne seront pas fauchés et, dans ce cas, ils pourront se reproduire par voie sexuée. Ces plantes donneront alors origine à des hexaploïdes au moyen du croisement de gamètes mâles et femelles à  $n = 21$ , probablement par le fait qu'il y a sélection de ces gamètes par rapport à ceux à  $n = 7$  et  $14$ , une fois que dans le premier cas la valeur du rapport endosperm/embryon au point de vue chromosomique est  $1,5$ , tandis que dans le croisement entre  $7$  et  $14$  elle s'écarte du normal  $1,5$ . D'autre part, les grains à  $n = 21$  produiront peut-être des tubes polliniques à croissance plus rapide, ce qui leur donneraient des avantages.

La production des types de grains de pollen trouvés chez les triploïdes et les hexaploïdes est attribuée au fait que ces plantes sont encore hautement homozygotiques. Cependant, des gamètes aneuploïdes, particulièrement hyperhaploïdes et hyperdiploïdes, seront aussi produits.

La comparaison de ces plantes avec *N. bulbocodium* L. subsp. *bulbocodium* a amené à distinguer la nouvelle sous-espèce *N. bulbocodium* L. subsp. *Quintanilhae* A. Fernandes.

#### SUMMARY

Herbarium specimens of a *Narcissus* of the *Bulbocodium* DC. section from four localities at Guarda District (Portugal) were studied. From the shape and size of the pollen grains, it was possible to conclude that some plants were triploid ( $2n = 21$ ) and others hexaploid ( $2n = 42$ ).

By measuring the longest axis of the grains in triploids plants 3 types were inferred:  $n = 7$ ,  $14$  and  $21$ . The grains with  $7$  and  $14$  chromosomes appear in a proportion near  $1:1$ , whereas  $n = 21$  occurs in a very low percentage. The volume of the grains varies from  $43.096-60.407 \mu m^3$  and the percentage of fertile pollen is also variable.

Hexaploid plants showed 4 types of pollen:  $n = 7$ ,  $14$ ,  $21$  and  $28$ . The proportion of the first two types is variable, but always with a higher

percentage of the second. The percentage of the third type is higher than in triploids and the percentage of the fourth type (28) is very low.

One bulb from Martiana locality has two scapes: one triploid and the other hexaploid. This one may result from somatic chromosome duplication by endomitosis in the initial scape meristem, followed by normal mitosis. Another bulb from a plant collected at the cross of the roads Guarda-Vilar Formoso and Cerdeira also had two different scapes. One had a yellow flower with crenulate corona and the other a yellowish flower with a 6-lobed corona. Probably this was also a triploid plant that produced two hexaploid scape tips following the same process as in Martiana plant. Somatic mutation is probably the cause for the flower colour and the crenulate to 6-lobed changes.

Diploid plants of *N. bulbocodium* L. subsp. *bulbocodium* are found in Guarda District in not so humid places bordering margins of streams, and meadows artificially irrigated. Triploids in this region probably arise through conjugation of reduced and non-reduced gametes of these diploids. Triploids became adapted to the marshy grounds of meadows and margins of streams where diploids do not survive. Meadows are harvested before *Narcissus* bears seeds, then these plants multiply through bulbs which are spread north by the streams. Triploids may also produce hexaploids like in Martiana plants and these hexaploid can multiply also by bulb division.

Triploid that are not cut by man reproduce sexually. Then these plants can produce hexaploids by conjugation of gametes with 21 chromosomes. These gametes are probably selected because the ratio between the endosperm and the embryo chromosome numbers is normal (1,5), while in crosses  $7 \times 14$  that ratio is abnormal. The selection may also be probably connected with more rapid growth of the pollen tube of  $n = 21$  grains.

Triploid and hexaploid plants studied showed the types of pollen grains indicated above because of their very high degree of homozygosity. Aneuploid pollen grains, mainly hyperhaploids and hyperdiploids, may also have been produced.

Comparing these triploid and hexaploid plants with the diploid *N. bulbocodium* subsp. *bulbocodium*, we conclude that they belong to a new subspecies: *N. bulbocodium* L. subsp. *Quintanilhae* A. Fernandes.

## INTRODUCTION

EN faisant la révision de quelques spécimens de *Narcissus bulbocodium* L. ramassés dans le district de Guarda, nous avons trouvé quatre récoltes qui se sont révélées intéressantes par le fait que nous y avons rencontré des individus triploïdes et hexaploïdes, constitutions qui ont été déduites au moyen de l'examen du pollen. C'est le résultat des observations que nous avons menées à bout sur la morphologie externe, le pollen, l'écologie et la distribution géographique de ces plantes, ainsi que les idées

que les données rassemblées nous ont suscitées sur l'évolution chez les Narcisses de la section *Bulbocodium* DC. qui constituent l'objet de ce travail.

### MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Comme nous l'avons dit, les matériaux sont les spécimens de quatre feuilles d'herbier de *N. bulbocodium* L. conservés dans les collections de l'Institut Botanique de l'Université de Coimbra (COI). Étant donné que, dans une certaine mesure, le pollen traduit le cours de la méiose, nous l'avons étudié dans le but d'avoir une idée de la régularité ou des irrégularités de ce phénomène si important dans la vie des êtres se reproduisant par voie sexuée. D'autre part, comme on le sait, les dimensions des grains du pollen peuvent nous donner des indications sur le nombre des chromosomes et, par conséquent, sur le degré de polyploïdie.

La technique employée pour l'étude du pollen est très simple et elle consiste essentiellement dans le suivant :

Dans le but de n'endommager pas les fleurs, des anthères d'étamines exsertes étaient détachées et mises dans l'alcool à 70°. Lorsque ce type de fleurs n'existait pas, nous avons réussi quelquefois à ouvrir, sans les rompre, les fleurs avec des aiguilles et à retirer des anthères incluses appartenant généralement au verticille externe des étamines. Ces anthères étaient aussi mises dans l'alcool à 70°. La permanence des anthères dans l'alcool ne les modifie pas et donne lieu au gonflement des grains de pollen, en les devenant adéquats pour la coloration au carmin acétique. De cette façon, les préparations peuvent être faites après une permanence des anthères dans l'alcool pendant une nuit, plusieurs jours ou même des mois.

Le milieu de montage était constitué par un mélange en parties égales de lacto-phénol et carmin acétique<sup>1</sup>. L'addition du carmin

<sup>1</sup> La composition du lacto-phénol est la suivante :

Acide phénique cristallisé . . . . .	10 gr.
Acide lactique . . . . .	10 gr.
Glycerine . . . . .	20 gr.
Eau distillée . . . . .	10 gr.

Le carmin acétique est la bien connue solution employée dans les techniques caryologiques.

acétique au lacto-phénol nous permet de distinguer les grains fertiles, qui se colorent en rouge, et les stériles, qui sont vides et ne se colorent pas. Quelquefois, des grains possédant du contenu qui se colore, mais présentant des parois très déformées existent. Les grains de ce type, peu fréquents, ont été considérés comme imparfaits et, par conséquent, non fertiles. Donc seuls les grains à paroi normale et à contenu rouge ont été classés comme fertiles.

Pour exécuter les préparations, quelques gouttes du milieu de montage étaient placées sur une lame. En général, une seule anthère était mise dans cette goutte et elle était ensuite dissociée au moyen de deux aiguilles pour libérer le pollen dans le liquide. Alors, après avoir retiré les parois et le connectif de l'anthère, la lamelle était appliquée et la préparation était en conditions d'être examinée. Quelquefois, pour rendre la préparation plus durable, le bord de la lamelle était fermé par la paraffine.

Les préparations étaient observées avec l'emploi d'un microscope monoculaire Reichert, équipé avec les objectifs  $\times 10$ ,  $\times 60$  et  $\times 100$  (immersion) et une oculaire micrométrique.

Pendant les observations, les valeurs du grand axe et du petit axe des grains parfaits étaient prises au moyen de la combinaison objectif  $\times 60$  — oculaire micrométrique et exprimées en divisions de l'oculaire micrométrique. En sachant que chacune de ces divisions correspondait à  $2,5 \mu\text{m}$ , la valeur en  $\mu\text{m}$  était obtenue.

Les préparations étaient parcourues en faisant les mensurations des grains parfaits et en prenant note des grains vides, en évitant qu'un même grain soit compté deux fois.

Après les mensurations, nous avons donné aux résultats la forme graphique concernant le grand et le petit axe et ensuite nous avons calculé le volume moyen approximatif de l'ensemble des grains, en supposant (ce qui n'est pas tout à fait exact) qu'ils sont des ellipsoïdes de révolution, par l'emploi de la formule  $V = \frac{4}{3} \pi a b^2$ , dans laquelle  $a$  désigne la moitié du grand axe et  $b$  la moitié du petit axe.

## OBSERVATIONS

La Fig. 1 est une reproduction d'une carte géographique correspondant à une ancienne délimitation du district de Guarda, montrant la rivière Coa et le réseau de ses affluents, les routes les plus importantes, ainsi que quelques villes et villages et les localités où les plantes ont été ramassées, indiquées par I, II, III et IV. Cette numérotation est faite du nord vers le sud et de l'est vers l'ouest.

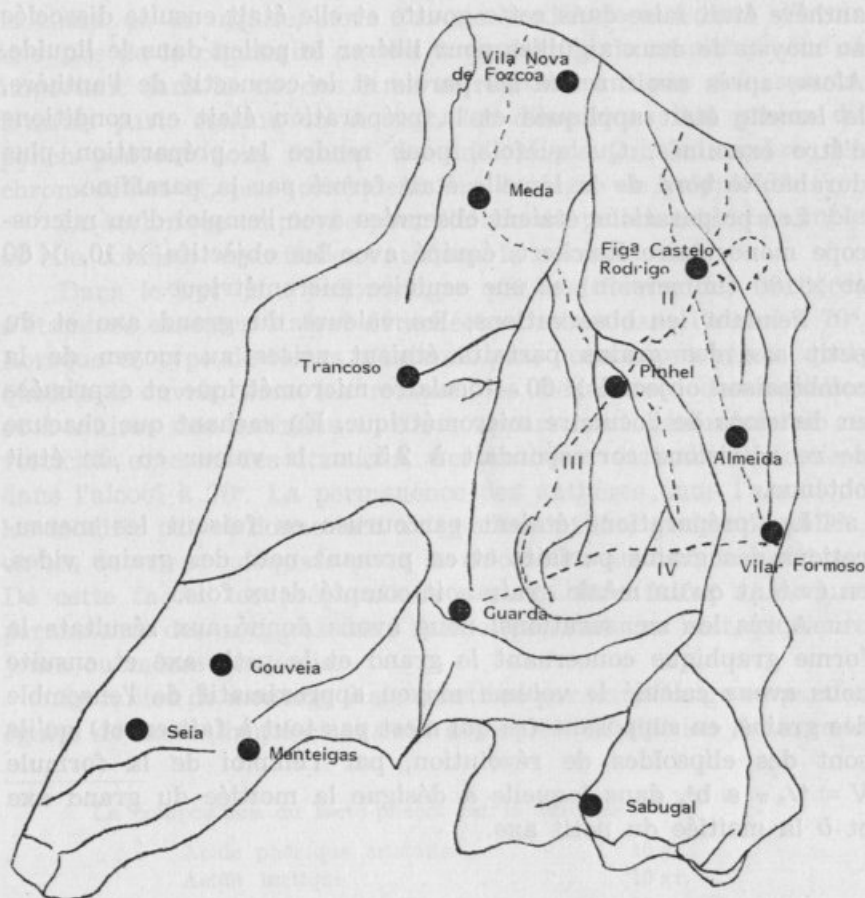


Fig. 1. — Carte correspondant à une ancienne délimitation du district de Guarda, avec l'indication des localités (I, II, III et IV), où les plantes étudiées ont été herborisées. D'autres détails dans le texte.

I — Entre Figueira de Castelo Rodrigo et Mata de Lobos, dans un pré arrosé produisant du foin pour l'alimentation du bétail, 25-IV-1962, *J. Paiva, J. Matos & A. Marques* 8433 (COI).

La correspondante feuille d'herbier (Pl. I) comporte 4 échantillons. Il s'agit de plantes robustes dont l'hauteur varie de 23 jusqu'à 40 cm, avec les feuilles à peu près demi-cylindriques, larges de ca. 3 mm, s'avoisinant de l'hauteur des fleurs, quelquefois les dépassant. Chaque bulbe possède en générale plus d'une hampe florale, le nombre étant plus grand chez les plantes possédant des bulbes en voie de division végétative. Les fleurs sont ascendantes, à pédicelle longue et à périanthe jaunâtre (malheureusement, nous n'avons pas vu des plantes vivantes). Les ovaires semblent commencer à se gonfler après l'anthèse. Toutes les fleurs présentent des étamines incluses et, seulement dans la fleur de l'échantillon à gauche, le stigmate trilobé dépasse un peu l'ouverture de la couronne.

Les anthères produisent des grains de pollen fertiles et stériles (Pl. II, fig. *a, b, c* et *d*), le pourcentage des premiers étant 66 %. Les résultats obtenus par la mensuration de 170 de ces grains est mis en évidence par les graphiques 1*a* et 1*b* (Fig. 2), qui montrent, respectivement, la variation de la longueur du grand et du petit axe. En ce qui concerne le grand axe, nous constatons qu'il présente 4 pics, le premier ayant le mode correspondant à 42,5  $\mu$ m, le deuxième à 50, le troisième à 62,5 et le quatrième, détaché à droite, à 75. Une analyse plus détaillée montre qu'au premier pic correspond une fréquence de 2. Étant donné les petites dimensions de ces grains et leur basse fréquence de 1,1 %, il s'agit certainement de grains hypohaploïdes qui, en se colorant tout d'abord, finiront pour avorter. Le deuxième pic, auquel correspond une fréquence de 38, est plus haute que celle du troisième (32). D'autre part, on constate que, après le premier pic, la fréquence tombe jusqu'à 14 pour s'élever ensuite. À notre avis, cette conformation du graphique justifie qu'il puisse être sectionné par la ligne tracée entre les classes 55 et 57,5  $\mu$ m et nous croyons que cette section correspondra aux grains de pollen à  $n = 7$  chromosomes<sup>1</sup> (Pl. II, figs. *a* et *d*). En effet,

<sup>1</sup> Nous désignons par  $n$  le nombre chromosomique des gamètes.

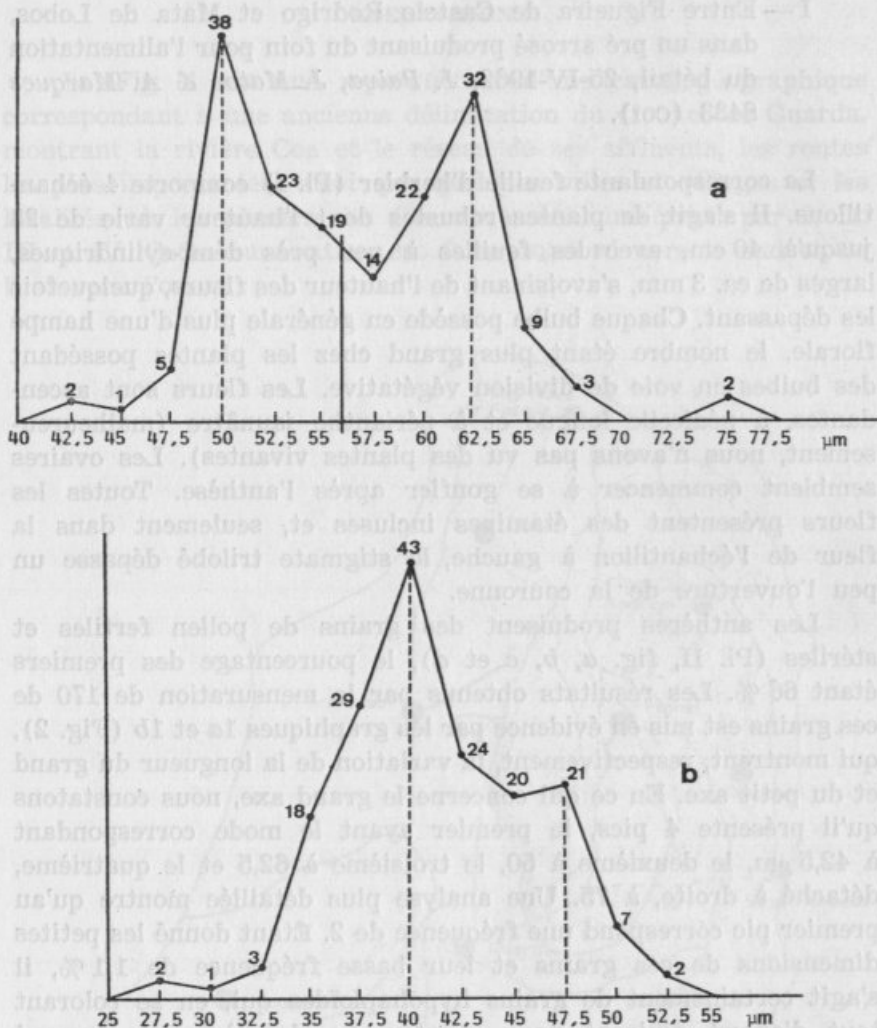


Fig. 2. — Graphiques 1a et 1b. Explication dans le texte.

en déterminant la valeur moyenne du grand axe correspondant à cette section du graphique (espace compris entre les classes 45 et 55), nous trouvons  $51,37\mu\text{m}$ , qui s'approche sensiblement des valeurs que nous avons trouvées chez *N. bulbocodium* var. *nivalis* ( $52,3$  et  $52,6\mu\text{m}$ ) et *N. × brevitubulosus* nothovar. *javieri* ( $51,6$  et  $51\mu\text{m}$ ), toutes les deux plantes de la Serra da Estrela qui



possèdent  $2n = 14$  (voir FERNANDES, 1987). Cette plante produira donc approximativement 51,7 % de grains à  $n = 7$ .

La section suivante doit certainement correspondre aux grains à  $n = 14$  (Pl. II, figs. *b* et *d*), puisque la valeur moyenne de son grand axe ( $61,18 \mu\text{m}$ ) s'approche sensiblement des dimensions trouvées dans le pollen d'une forme tétraploïde (ou presque) ramassée près de S. Martinho do Porto (voir FERNANDES, 1934). Le pourcentage de ces grains est de 47,05 %.

Le quatrième pic, qui, comme nous l'avons signalé, se trouve détaché, correspondra à des grains non réduits (Pl. II, figs. *c* et *d*) à  $n = 21$ , cette déduction s'accordant avec les résultats fournis par l'étude du pollen de plantes hexaploïdes à méiose régulière. Le pourcentage de ces derniers grains, dont la longueur moyenne est de  $75 \mu\text{m}$ , est de 1,17 %.

Le graphique représentant la variation de la longueur du grand axe nous amène donc à la conclusion de la production de 3 types de grains fertiles chez les plantes de la population I.

Le graphique de la variation de la longueur du petit axe, probablement par le fait qu'il n'est pas suffisamment long, ne donne pas la discrimination montrée par le grand axe. Par ce fait, nous n'avons utilisé les données de ces graphiques (ça s'applique à toutes les plantes étudiées) que pour calculer les valeurs moyennes des petits axes que nous avons utilisées pour déterminer les volumes moyens de l'ensemble des grains mesurés. Pour cette population, nous avons déterminé  $47\,162 \mu\text{m}^3$ .

II — Quinta da Serra, à 6 km de Figueira de Castelo Rodrigo,  
25-IV-1962, J. Paiva, J. Matos & A. Marques 8430 (COI).

Malheureusement, l'étiquette des collecteurs ne comportait aucune référence à l'écologie de la plante. Cependant, étant donné que, à Quinta da Serra, la route vers Figueira de Castelo Rodrigo longe ce qui la carte des Services Cartographiques de l'Armée du Portugal appelle Prado Grande, il est probable que les conditions écologiques soient semblables à celles des plantes antérieures, c'est-à-dire, un pré moins arrosé que le premier, mais où le foin serait aussi moissonné et emmagasiné pour alimenter le bétail particulièrement pendant l'hiver.

La feuille d'herbier (Pl. III) comporte 5 échantillons hautes de 15-27 cm, moins robustes que ceux de la première localité.

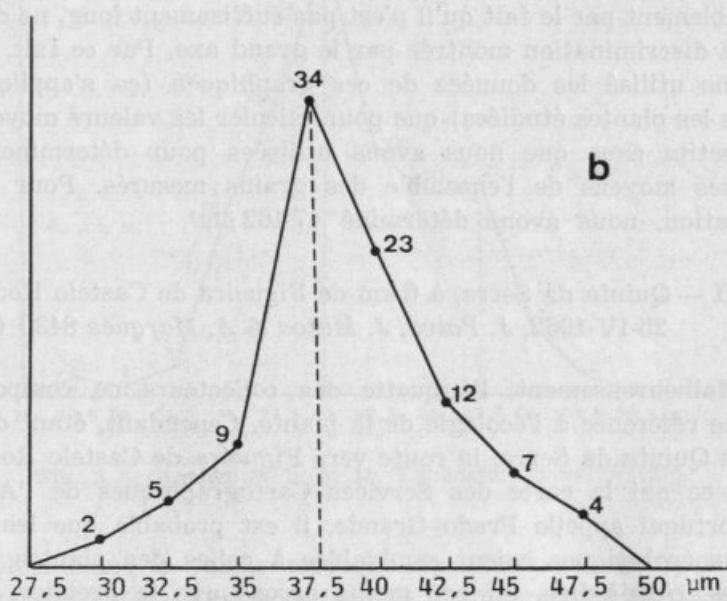
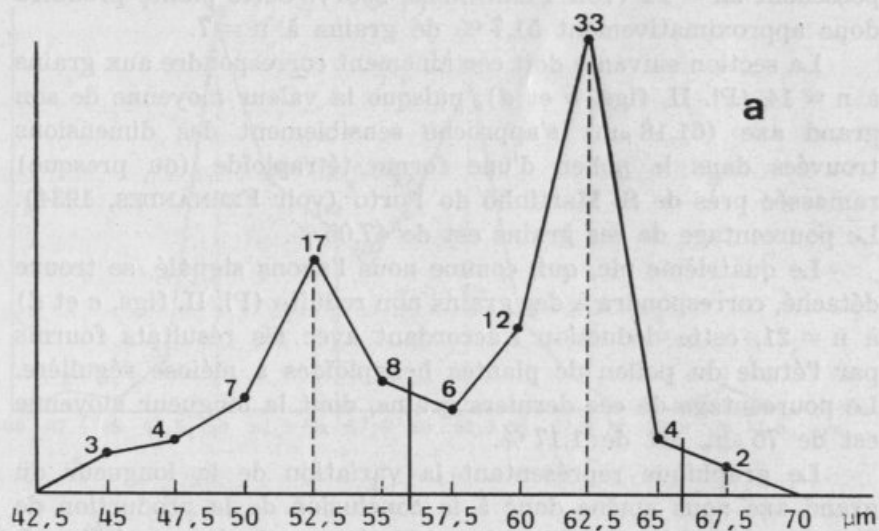


Fig. 3. — Graphiques 2a et 2b. Explication dans le texte.

Les feuilles, larges de ca. 3 mm, dépassent considérablement les fleurs, qui montrent les mêmes caractères de celles des plantes de la récolte I.

L'étude du pollen a donné lieu à la construction des graphiques 2a et 2b (Fig. 3), qui, comme dans le cas antérieur, concernent, respectivement, le grand et le petit axe.

Le graphique 2a est irrégulier, présentant deux pics, le premier, correspondant au mode de 52,5  $\mu\text{m}$  et le deuxième à celui de 62,5. Sa comparaison avec le graphique 1a montre qu'ils se ressemblent beaucoup. Il est très probable qu'on y puisse faire aussi une section entre les classes 55 et 57,5  $\mu\text{m}$  et que la fréquence 8 appartiendra au premier pic et 6 au deuxième. En admettant le sectionnement que nous considérons comme très probable, nous aurons la longueur moyenne de 51,47  $\mu\text{m}$  pour cette partie du graphique, dimension qui s'accorde très bien avec la valeur trouvée chez les formes diploïdes de *N. bulbocodium* et chez le deuxième pic du graphique 1a. Quant au deuxième pic, nous avons déterminé 61,59  $\mu\text{m}$ , qui s'accorde aussi bien avec la valeur trouvée dans la plante de la récolte I.

La conformation du graphique à son extrémité droite nous autorise à faire un autre sectionnement entre les classes 65 et 67,5  $\mu\text{m}$ . De cette façon, la population II produira, comme la première, trois types de grains de pollen: 1) grains à  $n = 7$  (Pl. IV, fig. a) auxquels correspond une longueur moyenne de 51,47  $\mu\text{m}$  et un pourcentage de 40,62 %; 2) grains à  $n = 14$  (Pl. IV, fig. b) avec la longueur moyenne de 61,59  $\mu\text{m}$  et un pourcentage de 57,29 %; et 3) grains à  $n = 21$  (Pl. IV, figs. c et e), avec une longueur moyenne de 67,5  $\mu\text{m}$  et un pourcentage de 2,08 %.

Le graphique relatif au petit axe est unimodal et il a été utilisé pour obtenir la valeur moyenne de cet axe pour déterminer le volume des grains qui est de 45 870  $\mu\text{m}^3$ . D'autre part, le pourcentage de pollen fertile est de 72,6 %, lequel est morphologiquement bien distinct du pollen stérile (Pl. IV, figs. c et d).

La comparaison des populations I et II montre donc qu'elles se ressemblent beaucoup.

III — Martiana, entre Pinhel et Guarda; terrain marécageux, 25-IV-1962, J. Paiva, J. Matos & A. Marques 8403 (COI).

Tout près de cette localité la route suit la rivière de Pega, étant probable que les plantes aient été récoltées dans les prés

existant dans les marges de cette rivière, qui cours vers le nord en traversant des terrains schisteux.

La respective feuille d'herbier (Pl. V) comporte 4 échantillons dont l'hauteur est comprise entre 18 et 40 cm. Les feuilles sont dans la plupart cassées, mais la plante de la droite montre que beaucoup d'entre elles dépassent les fleurs. Celles-ci présentent la même couleur des deux récoltes antérieures. Les étamines sont incluses dans toutes les fleurs et dans un cas seulement (plante de la gauche) le style est saillant.

L'analyse du pollen nous a offert beaucoup de difficultés, puisque les anthères de trois des plantes se présentaient presque vides.

Cependant, la plante à gauche, qui possède un bulbe volumineux qui a engendré deux hampes florales, nous a permis de résoudre le problème. En effet, la fleur plus âgée, déjà ouverte (fleur A), nous a permis de mesurer 81 grains fertiles et le résultat des mensurations est traduit par les graphiques 3a et 3b (Fig. 4). Le premier, concernant le grand axe, montre 3 pics. En faisant une section entre les classes 57,5 et 60  $\mu\text{m}$ , nous aurons le premier pic, comprenant 50 grains à longueur moyenne de 53,66  $\mu\text{m}$ , qui doit correspondre aux grains à  $n = 7$  (Pl. VI, fig. a-flèche) dont le pourcentage est de 61,7 %; le deuxième pic, comportant 29 grains, présentant une moyenne de 62,48  $\mu\text{m}$  et dont le pourcentage est 35,8 %, correspondra aux grains à  $n = 14$  (Pl. VI, fig. b-flèche); et le troisième pic, incluant 2 grains avec une longueur moyenne de 70  $\mu\text{m}$  et dont le pourcentage est de 3,7 %, correspondra aux grains à  $n = 21$  (Pl. VI, fig. c).

Comme dans les cas antérieurs, le graphique 3b ne montre pas la discrimination donnée par le grand axe et il a été employé seulement pour déterminer le volume moyen de l'ensemble des grains qui est de 43 096  $\mu\text{m}^3$ , c'est-à-dire de l'ordre de celui des plantes des récoltes I et II.

D'autre part, le pourcentage de pollen fertile est de 38,3 %, le pollen stérile étant, par conséquent, en quantité élevée (Pl. VI, figs a et b). Le pollen de la fleur ouverte du bulbe de la plante à gauche montre donc nettement qu'il présente un comportement caractéristique d'une plante triploïde, comme celles des récoltes I et II.

La fleur de l'autre hampe florale, qui n'était pas encore complètement ouverte (fleur B), nous a fourni une anthère avec

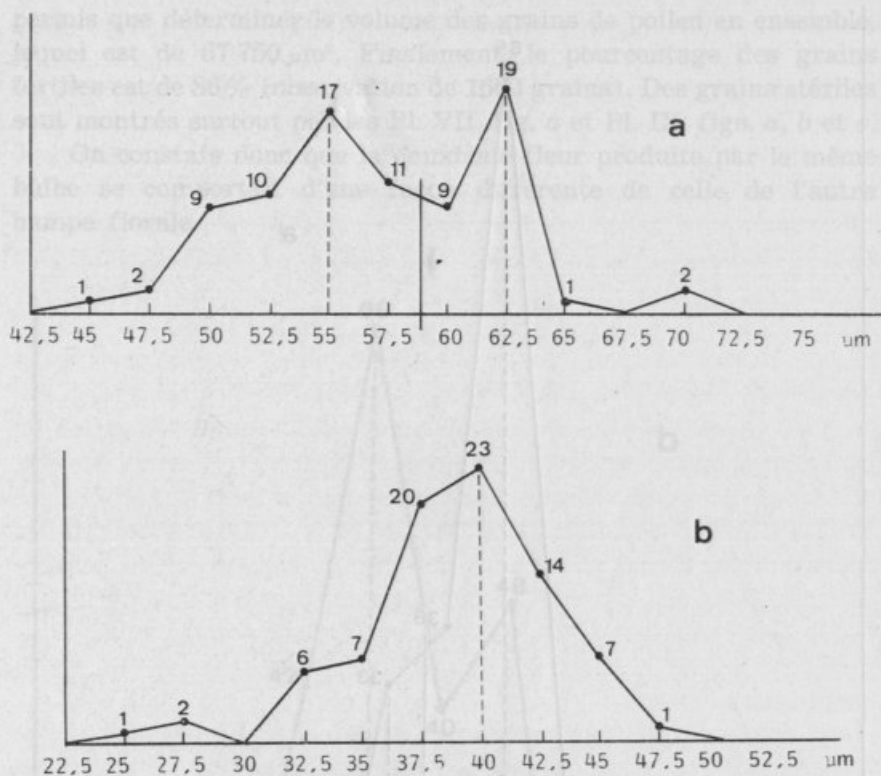


Fig. 4. — Graphiques 3a et 3b. Explication dans le texte.

du pollen abondant (Pl. VII, fig. a) dans lequel nous avons fait les mensurations, qui nous ont permis de construire les graphiques 4a et 4b (Figs. 5 et 6).

Le premier, construit d'après les résultats des mensurations de 243 grains, montre le suivant: 1) un pic délimité par la première section entre les classes 57,5 et 60 µm, dont le mode est 55 et la longueur moyenne 54,94 µm; 2) un deuxième pic correspondant à la région limitée par la première et la deuxième section (celle-ci entre les classes 65 et 67,5 µm) dont le mode est 62,5 µm et auquel correspond une moyenne de 62,05 µm; 3) partie restante du graphique, à laquelle correspond la longueur moyenne de 68,97 µm.

À notre avis, la première section du graphique comprend les grains à  $n = 7$  (Pl. VII, figs. b, c, Pl. VIII, fig. a et Pl. IX, figs. a et b) dans un pourcentage de 18,93 %; la deuxième aux

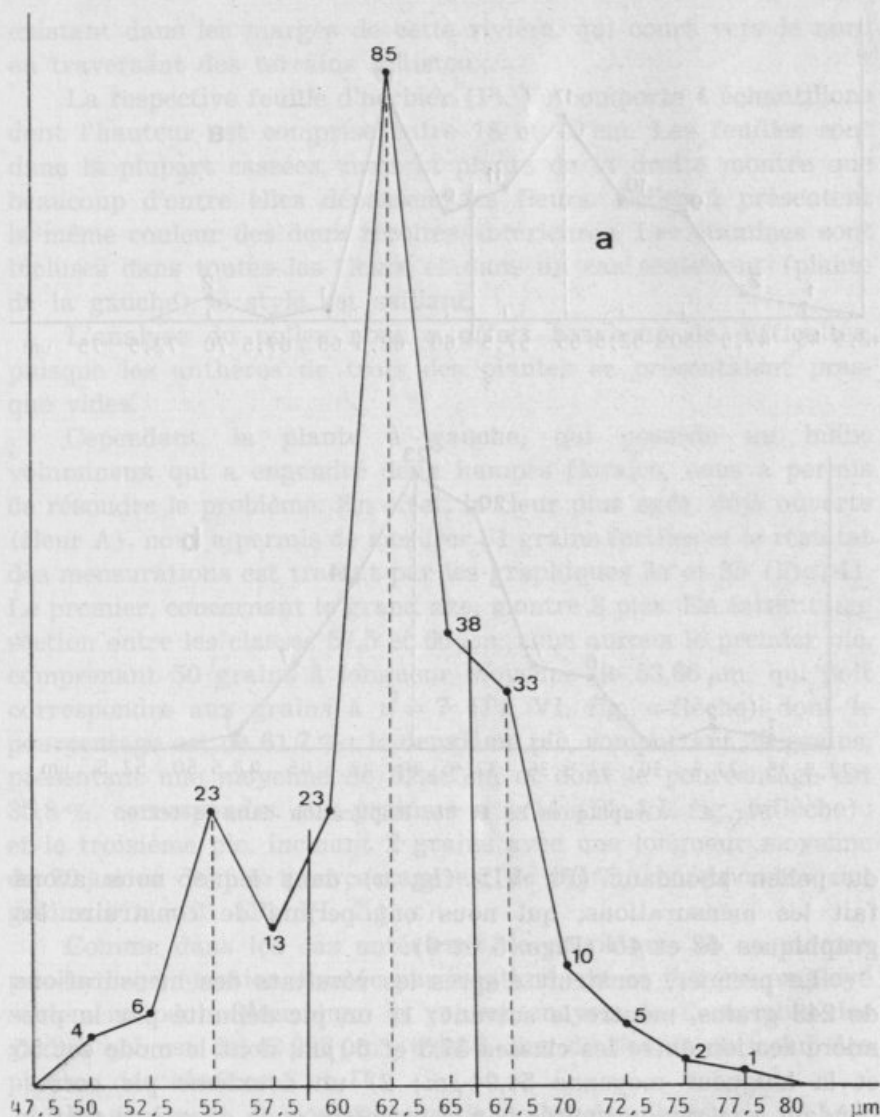


Fig. 5. — Graphique 4a. Explication dans le texte.

grains à  $n = 14$  (Pl. VII, fig. c, Pl. VIII, figs. a et b et Pl. IX, figs. a et c) dans un pourcentage de 60,08 %; et la troisième aux grains à  $n = 21$  (Pl. VIII, fig b) dans un pourcentage de 20,9 %.

Le graphique 4b (Fig. 6) se montre bimodal, mais il ne révèle pas du parallélisme avec celui du grand axe. Donc, il ne nous a

permis que déterminer le volume des grains de pollen en ensemble, lequel est de  $67\,750\ \mu\text{m}^3$ . Finalement, le pourcentage des grains fertiles est de 86% (observation de 1660 grains). Des grains stériles sont montrés surtout par les Pl. VII, fig. *a* et Pl. IX, figs. *a*, *b* et *c*.

On constate donc que la deuxième fleur produite par le même bulbe se comportait d'une façon différente de celle de l'autre hampe florale.

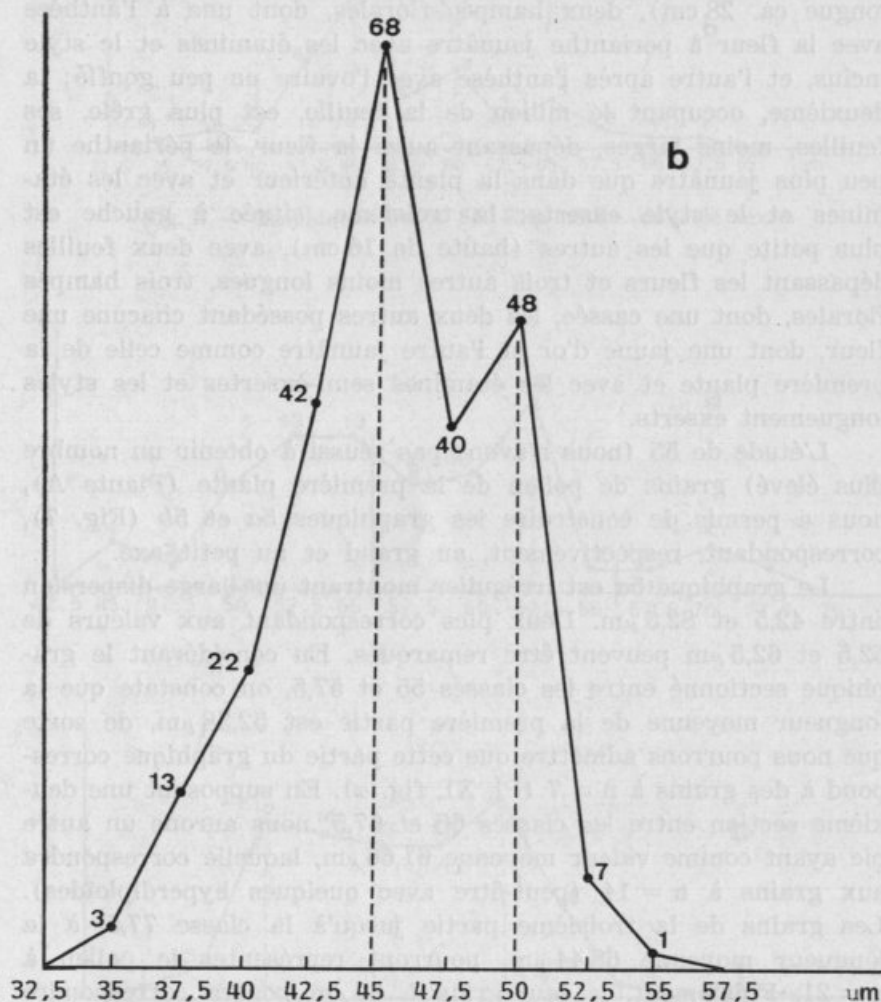


Fig. 6. — Graphique 4b. Explication dans le texte.

IV — Route Guarda-Vilar Formoso, près du croisement vers Cerdeira, 19-IV-1952, A. Fernandes, F. Sousa & J. Matos 3997 (col).

Cette feuille d'herbier (Pl. X) comporte 3 plantes: la première, à droite, c'est la plus vigoureuse, possédant un bulbe à peu près sphérique, avec 2,5 cm de diamètre, des gaines foliaires hyalines, hautes de 5 cm, 4 feuilles, dont trois dépassent les fleurs (la plus longue ca. 28 cm), deux hampes florales, dont une à l'anthèse avec la fleur à perianthe jaunâtre avec les étamines et le style inclus, et l'autre après l'anthèse avec l'ovaire un peu gonflé; la deuxième, occupant le milieu de la feuille, est plus grêle, ses feuilles, moins larges, dépassant aussi la fleur, le périanthe un peu plus jaunâtre que dans la plante antérieure et avec les étamines et le style exserts; la troisième, située à gauche est plus petite que les autres (haute de 16 cm), avec deux feuilles dépassant les fleurs et trois autres moins longues, trois hampes florales, dont une cassée, les deux autres possédant chacune une fleur, dont une jaune d'or et l'autre jaunâtre comme celle de la première plante et avec les étamines semi-exsertes et les styles longuement exserts.

L'étude de 55 (nous n'avons pas réussi à obtenir un nombre plus élevé) grains de pollen de la première plante (Plante A), nous a permis de construire les graphiques 5a et 5b (Fig. 7), correspondant, respectivement, au grand et au petit axe.

Le graphique 5a est irrégulier montrant une large dispersion entre 42,5 et 82,5  $\mu\text{m}$ . Deux pics correspondant aux valeurs de 52,5 et 62,5  $\mu\text{m}$  peuvent être remarqués. En considérant le graphique sectionné entre les classes 55 et 57,5, on constate que la longueur moyenne de la première partie est 52,38  $\mu\text{m}$ , de sorte que nous pourrions admettre que cette partie du graphique correspond à des grains à  $n = 7$  (Pl. XI, fig. a). En supposant une deuxième section entre les classes 65 et 67,5, nous aurons un autre pic ayant comme valeur moyenne 61,66  $\mu\text{m}$ , laquelle correspondra aux grains à  $n = 14$  (peut-être avec quelques hyperdiploïdes). Les grains de la troisième partie jusqu'à la classe 77,5, à la longueur moyenne 69,44  $\mu\text{m}$ , pourront représenter le pollen à  $n = 21$ . Finalement, le seul grain à 80  $\mu\text{m}$  pourra correspondre au pollen à  $n = 28$ .



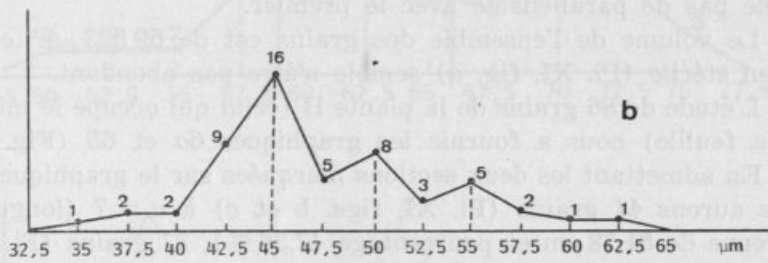
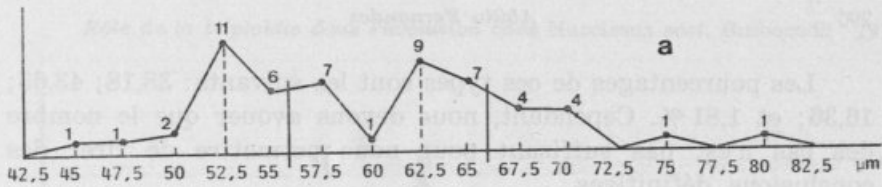


Fig. 7. — Graphiques 5a et 5b. Explication dans le texte.

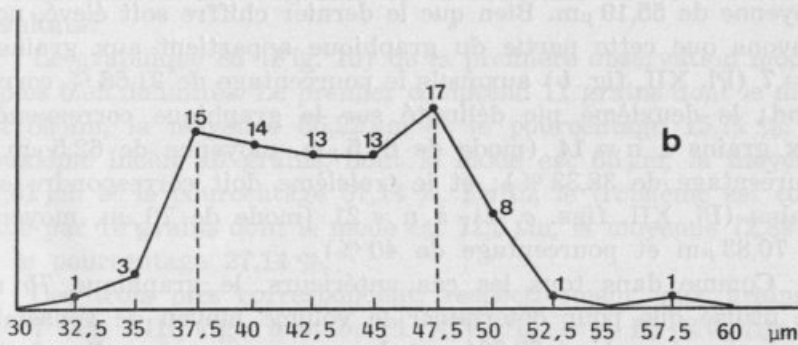
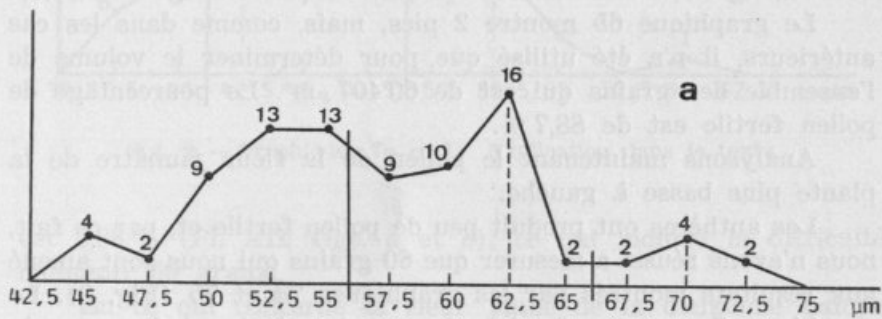


Fig. 8. — Graphiques 6a et 6b. Explication dans le texte.

Les pourcentages de ces types sont les suivants: 38,18; 43,63; 16,36; et 1,81 %. Cependant, nous devons avouer que le nombre des cas n'est pas suffisant pour nous permettre de tirer des conclusions définitives.

Le graphique 5b (Fig. 7) montre plusieurs pics, mais il ne révèle pas de parallélisme avec le premier.

Le volume de l'ensemble des grains est de  $69\,523\ \mu\text{m}^3$  et le pollen stérile (Pl. XI, fig. a) semble n'être pas abondant.

L'étude de 86 grains de la plante B (celui qui occupe le milieu de la feuille) nous a fournies les graphiques 6a et 6b (Fig. 8).

En admettant les deux sections marquées sur le graphique 6a, nous aurons 41 grains (Pl. XI, figs. b et c) à  $n = 7$  (longueur moyenne de  $51,78\ \mu\text{m}$  et pourcentage 47,56 %), 37 grains (Pl. XI, fig. d) à  $n = 14$  ( $60,74\ \mu\text{m}$  de longueur moyenne et un pourcentage de 44,18 % et, en considérant que les 3 dernières classes appartiennent à l'amplitude de la variation des grains à  $n = 21$  (Pl. XI, fig. e), à ceux-ci correspondra un pourcentage de 9,3 %).

Le graphique 6b montre 2 pics, mais, comme dans les cas antérieurs, il n'a été utilisé que pour déterminer le volume de l'ensemble des grains qui est de  $60\,407\ \mu\text{m}^3$ . Le pourcentage de pollen fertile est de 88,7 %.

Analysons maintenant le pollen de la fleur jaunâtre de la plante plus basse à gauche.

Les anthères ont produit peu de pollen fertile et, par ce fait, nous n'avons réussi à mesurer que 60 grains qui nous sont amenés aux résultats montrés par les graphiques 7a et 7b (Fig. 9). Le graphique 7a montre 3 pics: le premier, incluant à peu près 13 grains, présente le mode correspondant à  $57,5\ \mu\text{m}$  et une moyenne de  $55,19\ \mu\text{m}$ . Bien que le dernier chiffre soit élevé, nous croyons que cette partie du graphique appartient aux grains à  $r = 7$  (Pl. XII, fig. b) auxquels le pourcentage de 21,66 % correspond; le deuxième pic délimité sur le graphique correspondra aux grains à  $n = 14$  (mode de  $62,5\ \mu\text{m}$ , moyenne de  $62,5\ \mu\text{m}$  et pourcentage de 38,33 %); et le troisième doit correspondre aux grains (Pl. XII, figs. c, d), à  $n = 21$  (mode de  $70\ \mu\text{m}$ , moyenne de  $70,83\ \mu\text{m}$  et pourcentage de 40 %).

Comme dans tous les cas antérieurs, le graphique 7b n'a été utilisé que pour déterminer le volume moyen de l'ensemble des grains, lequel est  $69\,204\ \mu\text{m}^3$ . Le pourcentage de pollen fertile

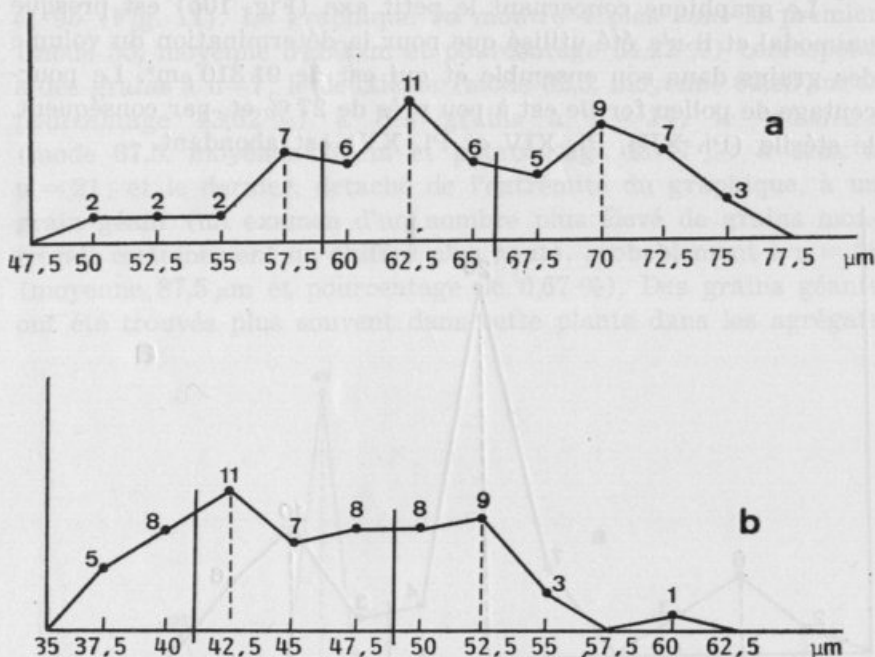


Fig. 9. — Graphiques 7a et 7b. Explication dans le texte.

est 3,88 % (Pl. XII, figs. a et c), ce qui montre la difficulté d'obtenir 60 grains.

En ce qui concerne la fleur jaune de la deuxième hampe florale, nous avons fait deux observations, la première comportant la mensuration de 70 grains et la deuxième de 149. Voici les résultats :

Le graphique 8a (Fig. 10) de la première observation montre 3 pics bien délimités. Le premier comprend 11 grains dont le mode est 55  $\mu\text{m}$ , la moyenne 55,22  $\mu\text{m}$  et le pourcentage 15,71 %. Le deuxième inclut 40 grains, dont le mode est 65  $\mu\text{m}$ , la moyenne 64,81  $\mu\text{m}$  et le pourcentage 57,14 %. Enfin, le troisième est constitué par 19 grains dont le mode est 72,5  $\mu\text{m}$ , la moyenne 72,89  $\mu\text{m}$  et le pourcentage 27,14 %.

Ces trois pics correspondent, respectivement, aux grains à  $n = 7$  (Pl. XIII, figs. a et b; Pl. XIV, fig. a et Pl. XV, fig. a),  $n = 14$  (Pl. XIII, figs. a, b; Pl. XIV, fig. a et Pl. XV, fig. a) et  $n = 21$  (Pl. XIII, figs. a, b; Pl. XIV et Pl. XV).

Le graphique concernant le petit axe (Fig. 10b) est presque unimodal et il n'a été utilisé que pour la détermination du volume des grains dans son ensemble et qui est de  $91\,310\ \mu\text{m}^3$ . Le pourcentage de pollen fertile est à peu près de 27 % et, par conséquent, le stérile (Pl. XIII, Pl. XIV et Pl. XV) est abondant.

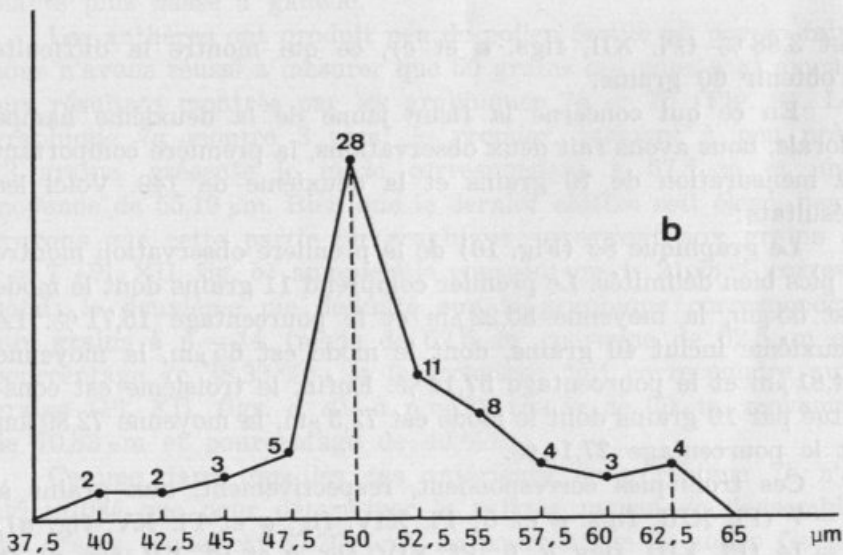
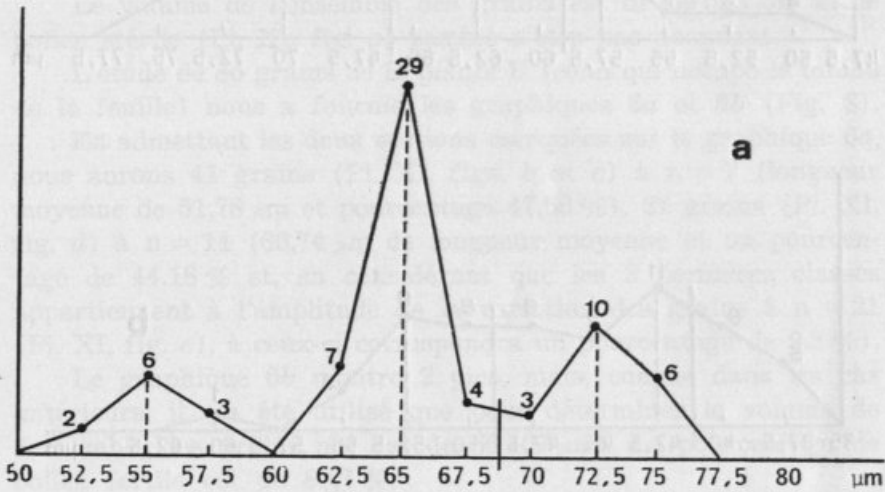


Fig. 10. — Graphiques 8a et 8b. Explication dans le texte.

Dans la deuxième observation, nous avons mesuré 149 grains et nous sommes abouti aux résultats montrés par les graphiques 9a et 9b (Fig. 11). Le graphique 9a montre 4 pics dont le premier (mode 55, moyenne 54,80  $\mu\text{m}$  et pourcentage 34,22 %) correspond à des grains à  $n=7$ ; le deuxième (mode 62,5, moyenne 62,53  $\mu\text{m}$  et pourcentage 43,62 %) à des grains à  $n=14$ ; le troisième (mode 67,5, moyenne 70  $\mu\text{m}$  et pourcentage 21,47 %) à ceux à  $n=21$ ; et le dernier, détaché de l'extrémité du graphique, à un grain géant (un examen d'un nombre plus élevé de grains montrerait certainement un chiffre plus haut), probablement à  $n=28$  (moyenne 87,5  $\mu\text{m}$  et pourcentage de 0,67 %). Des grains géants ont été trouvés plus souvent dans cette plante dans les agrégats

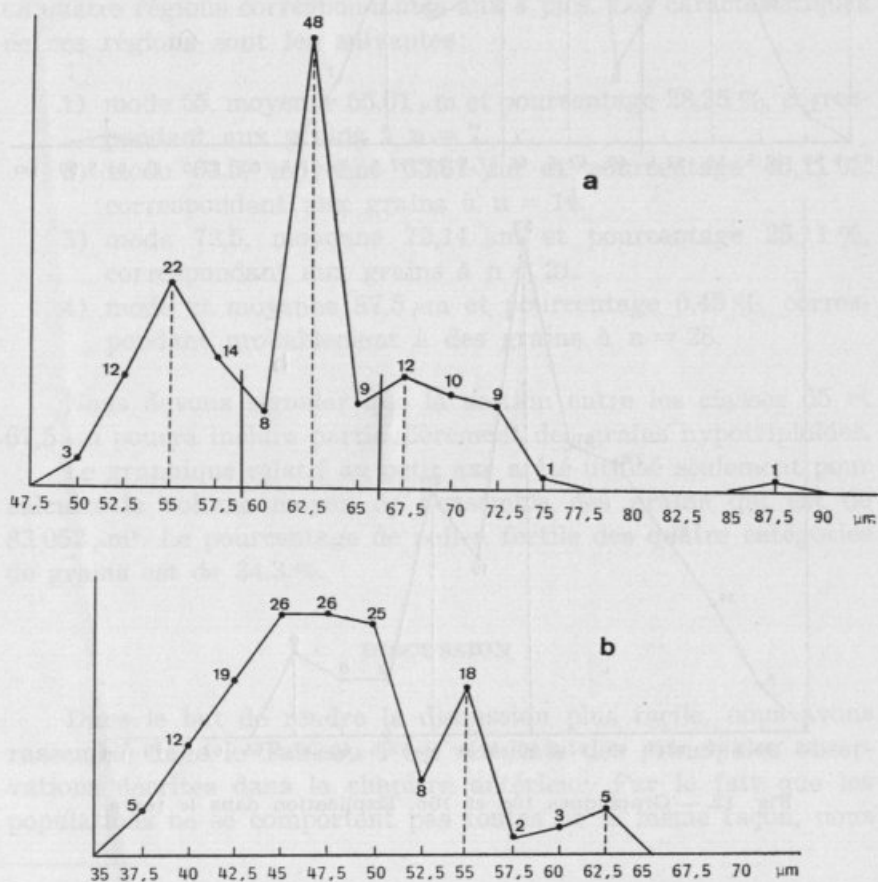


Fig. 11. — Graphiques 9a et 9b. Explication dans le texte.

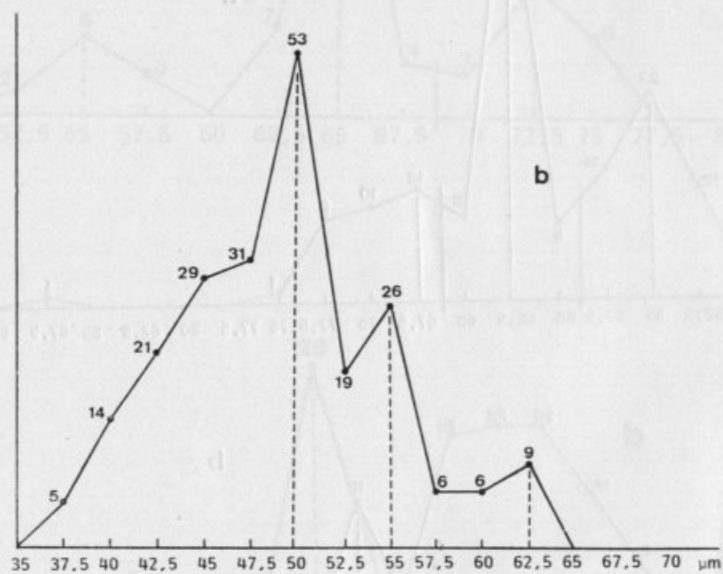
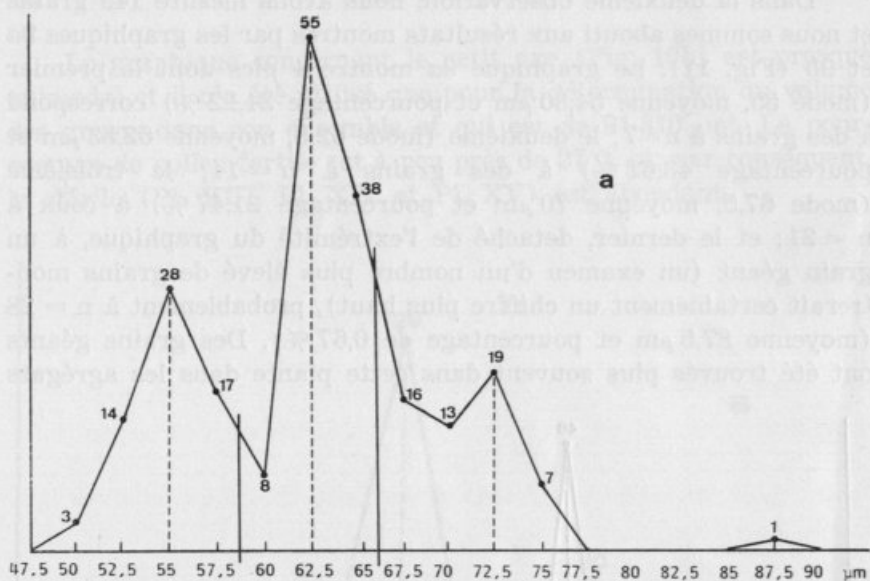


Fig. 12. — Graphiques 10a et 10b. Explication dans le texte.

polliniques montrés par les Pl. XIII, fig. *b*, Pl. XIV, figs. *a*, *b* et qui doivent posséder un nombre chromosomique élevé. Une triade à grains géants est montrée dans la Pl. XVI, fig. *a*<sup>1</sup>.

Le graphique concernant le petit axe montre 3 pics (Fig. 11*b*), dont le premier n'est pas bien défini. Cependant, par le fait qu'il n'y a pas de parallélisme avec le graphique du grand axe, il n'a été utilisé que pour le calcul du volume de l'ensemble des grains, qui est de 74 795  $\mu\text{m}^3$ . D'autre part, le pourcentage du pollen fertile est de 41,6 %.

En additionnant les données des deux observations, nous avons obtenu les graphiques 10*a* et 10*b* (Fig. 12), dans un total de 219 grains. Quant au grand axe, le graphique peut être sectionné en quatre régions correspondantes aux 4 pics. Les caractéristiques de ces régions sont les suivantes:

- 1) mode 55, moyenne 55,01  $\mu\text{m}$  et pourcentage 28,35 %, correspondant aux grains à  $n = 7$ .
- 2) mode 62,5, moyenne 63,67  $\mu\text{m}$  et pourcentage 46,11 %, correspondant aux grains à  $n = 14$ .
- 3) mode 72,5, moyenne 72,14  $\mu\text{m}$  et pourcentage 25,11 %, correspondant aux grains à  $n = 21$ .
- 4) mode et moyenne 87,5  $\mu\text{m}$  et pourcentage 0,45 %, correspondant probablement à des grains à  $n = 28$ .

Nous devons signaler que la section entre les classes 65 et 67,5  $\mu\text{m}$  pourra inclure particulièrement des grains hypotriploïdes.

Le graphique relatif au petit axe a été utilisé seulement pour calculer le volume moyen de l'ensemble des grains qui est de 83 052  $\mu\text{m}^3$ . Le pourcentage de pollen fertile des quatre catégories de grains est de 34,3 %.

#### DISCUSSION

Dans le but de rendre la discussion plus facile, nous avons rassemblé dans le Tableau I les résultats des principales observations décrites dans le chapitre antérieur. Par le fait que les populations ne se comportent pas toutes de la même façon, nous

<sup>1</sup> L'étude des agrégats polliniques et des dimensions et de l'origine des grains géants est réservée pour un travail ultérieur.

les analyseront séparément, en se suivant après une discussion générale.

La population I produit du pollen à  $n = 7$ ,  $n = 14$  et  $n = 21$ , dont chaque classe peut se reconnaître par la valeur moyenne de la longueur de son grand axe, comme le montre le Tableau I. Le fait que les grains fertiles à  $n = 7$  et  $n = 14$  se trouvent sensiblement dans la proportion 1:1 montre que le plus souvent il y a formation de trivalents à la méiose de ces plantes, lesquels se séparent à l'anaphase I de telle façon qu'un des éléments du trivalent marche vers un pôle et les deux autres vers le pôle opposé, en engendrant ainsi un noyau télophasique avec 7 chromosomes et un autre pourvu de 14. De ces deux noyaux, une tétrade à 2 noyaux à 7 et les deux autres à 14 sera produite. Dans d'autres cas, les trivalents se séparent à l'anaphase I, allant un élément vers chaque pôle, tandis que le troisième demeure au plan équatorial. Celui-ci peut se diviser et les chromatides marcher vers les pôles respectifs, mais ils peuvent ou non arriver à temps d'être inclus dans les noyaux télophasiques. Dans le premier cas, des noyaux à chromosomes surnuméraires peuvent se former, mais en général les chromatides résultants d'une division des chromosomes à l'anaphase I ne se divisent pas à la division II et alors sont rejetés dans le cytoplasme. Dans le deuxième cas, deux noyaux télophasiques à 7 chromosomes en résultent. Dans d'autres cas, il y a formation de bivalents et d'univalents. Les éléments des bivalents peuvent se séparer et donner des noyaux normaux ou bien des noyaux déficients qui avortent et les univalents sont rejetés dans le cytoplasme où ils engendrent, isolés ou en groupes, des micronoyaux qui peuvent s'envelopper de cytoplasme, en terminant par avorter et former des grains vides<sup>1</sup>.

La fertilité de cette plante est relativement élevée (66%), ce qui montre que le type de ségrégation décrite tout d'abord a souvent lieu. Des grains à  $n = 21$  se forment dans un pourcentage assez bas. Ces grains, qui nous pouvons considérer géants par rapport aux autres, résultent en général de ce qui s'appelle non réduction et qui provient du fait que tous les 21 chromosomes demeurent comme des univalents et ne se divisent pas à la divi-

<sup>1</sup> En ce qui concerne la complexité de la méiose dans les triploïdes de *N. bulbocodium* avec un certain degré d'hétérozygotie, voir FERNANDES & FRANÇA (1970).



TABLEAU I

Résumé des caractères du pollen chez les plantes du district de Guarda étudiées

Populations, nombre des grains de pollen mesurés et numéro des graphiques	Pourcentage approximatif des grains fertiles à n = 7 et respective longueur moyenne du grand axe	Pourcentage approximatif des grains fertiles à n = 14 et respective longueur moyenne du grand axe	Pourcentage approximatif des grains fertiles à n = 21 et respective longueur moyenne du grand axe	Pourcentage approximatif des grains fertiles à n = 28 et respective longueur moyenne du grand axe	Présence ou absence de grains à nombres chromosomiques plus élevés	Présence ou absence de grains aneuploïdes et respectifs types probables	Volume moyen de l'ensemble des grains (en $\mu\text{m}^3$ )	Pourcentage de pollen fertile
I Entre Figueira de Castelo Rodrigo e Mata de Lobos 170-1a, b	51,7 % 51,37 $\mu\text{m}$	47,05 % 61,18 $\mu\text{m}$	1,17 % 75 $\mu\text{m}$	—	—	Présence Hypohaploïdes Hypodiploïdes	47 162	66
II Quinta da Serra, à 6 km de Figueira de Castelo Rodrigo 96-2a, b	40,62 % 51,47 $\mu\text{m}$	57,29 % 61,59 $\mu\text{m}$	2,98 % 67,5 $\mu\text{m}$	—	—	Présence Hypodiploïdes	45 870	72,6
III Martiana, le long de la route Pinhel-Guarda 81-3a, b Fleur A 243-4a, b Fleur B	61,7 % 53,66 $\mu\text{m}$ 18,93 % 54,94 $\mu\text{m}$	35,8 % 62,8 $\mu\text{m}$ 60,08 % 62,05 $\mu\text{m}$	2,46 % 70 $\mu\text{m}$ 20,9 % 66,97 $\mu\text{m}$	— 1,23 % 75,83 $\mu\text{m}$	— —	Présence Hypodiploïdes Présence Hyperhaploïdes Hyperdiploïdes	43 096 67 750	38,3 86
IV Route Guarda - Vilar Formoso, près du croisement vers Cerdeira 55-5a, b Plante A 86-6a, b Plante B Plante C 60-7a, b Fleur jaunâtre 70-8a, b Fleur jaune (1ère obs.) 149-9a, b Fleur jaune (2ème obs.) 219-10a, b Fleur jaune (ensemble des 2 obs.)	38,18 % 52,38 $\mu\text{m}$ 47,56 % 51,78 $\mu\text{m}$ 21,66 % 55,19 $\mu\text{m}$ 15,71 % 55,22 $\mu\text{m}$ 34,22 % 54,80 $\mu\text{m}$ 28,35 % 55,01 $\mu\text{m}$	43,63 % 61,66 $\mu\text{m}$ 44,18 % 60,74 $\mu\text{m}$ 38,33 % 62,5 $\mu\text{m}$ 57,14 % 64,81 $\mu\text{m}$ 43,62 % 62,53 $\mu\text{m}$ 46,11 % 63,67 $\mu\text{m}$	16,36 % 69,44 $\mu\text{m}$ 9,3 % 70 $\mu\text{m}$ 40 % 70,83 $\mu\text{m}$ 27,14 % 72,89 $\mu\text{m}$ 21,47 % 70 $\mu\text{m}$ 25,11 % 72,14 $\mu\text{m}$	1,81 % 80 $\mu\text{m}$ — — — — — — 0,67 % 87,5 $\mu\text{m}$ 0,45 % 87,5 $\mu\text{m}$	— — — — Présence probable Présence probable Présence probable	Présence Hypodiploïdes Présence Hyperhaploïdes Hyperdiploïdes Présence Hyperhaploïdes Présence Hyperdiploïdes Présence Hyperdiploïdes	69 523 60 407 69 204 91 310 74 795 83 052	71 88,7 3,88 27 41,6 34,3



sion I. Ils se divisent alors à la division II et produisent une dyade dont chaque noyau possède 21 chromosomes. Ils nous a semblé que, dans cette plante, des grains à nombre chromosomique polyploïde plus haut que 21 ne se forment pas et que des grains aneuploïdes se seraient formés. Les trois types de grains de pollen pris dans son ensemble présentent un volume de  $47\,162\ \mu\text{m}^3$ .

Les plantes de la population II montrent un comportement semblable à celles de l'antérieure, bien qu'ici la proportion entre les grains à  $n = 7$  et à  $n = 14$  soit différente (voir le Tableau I), ce qui provient des irrégularités des ségrégations. Des grains à  $n = 21$  ont été aussi mis en évidence. Le volume des grains et la fertilité s'approchent sensiblement de ceux des plantes de la population I (voir Tableau I).

Seule une plante de la population III possédait du pollen en conditions d'être mesuré. Cette plante, comme nous l'avons signalé, présentait un bulbe duquel sortaient deux hampes florales, une desquelles avec une fleur déjà ouverte (fleur A dans le Tableau I) et l'autre avec une fleur au commencement de l'épanouissement (fleur B dans le même Tableau).

L'analyse du pollen de la plante A a montré qu'il s'agissait d'une plante triploïde typique, produisant 61,7 % de pollen fertile à  $n = 7$ , 35,8 % à  $n = 14$  et 2,46 % à  $n = 21$ , le volume du pollen ensemble étant de  $43\,096\ \mu\text{m}^3$ . Cette plante ne s'écartait donc de celles des deux populations antérieures que par le fait que sa fertilité était 38,3 %, c'est-à-dire, plus basse que dans les deux autres populations mentionnées.

Par rapport à la fleur A, la fleur B a produit 18,93 % de pollen fertile à  $n = 7$ , 60,08 % à  $n = 14$  et 20,9 % à  $n = 21$ , tandis que, dans la plante antérieure, le dernier pourcentage n'était que 2,46 %. D'autre part, le volume moyen du pollen était bien plus grand ( $67\,750\ \mu\text{m}^3$  par rapport à  $43\,096\ \mu\text{m}^3$ ) et une fertilité plus élevée (86 % par rapport à 38,3 %) que dans l'autre fleur issue du même bulbe.

Cette fleur était donc remarquable et son analyse montre que la hampe florale qui l'a produite est hexaploïde, ce qui est mis en évidence par le bas pourcentage de grains à  $n = 7$  et le pourcentage de grains à  $n = 21$ . Le volume du pollen et la fertilité élevée parlent aussi en faveur de cette interprétation.

L'origine de la hampe florale qui a produit cette fleur doit être attribuée à quelque phénomène de duplication somatique qui a eu lieu au point végétatif à partir duquel la hampe florale s'est engendrée. Chez *Narcissus*, des phénomènes de ce type ont été rencontrés par FERNANDES (1936) chez *N. triandrus* L. subsp. *triandrus*. Cependant, nous croyons, contrairement à ce qui nous pensions à cette date, que la formation des secteurs polyploïdes doit être due, non à la fusion de noyaux somatiques, mais à des phénomènes d'endomitose, c'est-à-dire, de division des chromosomes somatiques qui n'est pas suivie de phénomènes anaphasiques séparant les chromatides. Un noyau dans lequel l'endomitose a eu lieu peut se diviser par mitoses normales, mais il présentera un nombre double de chromosomes. Les divisions successives amènent soit à la formation de secteurs hexaploïdes, soit à celle de points végétatifs complets. Un de celui-ci aurait engendré la hampe florale.

Étant donné l'origine de la fleur B, nous sommes en présence d'une partie hexaploïde de la plante et les phénomènes qui peuvent avoir lieu pendant la méiose chez les hexaploïdes<sup>1</sup> expliquent l'apparition des types de grains de pollen que nous avons mentionnés, ainsi que le volume des grains et la haute fertilité de la fleur<sup>2</sup>.

En faisant le recensement des formes polyploïdes de *N. bulbocodium* au Portugal, nous avons constaté (FERNANDES, 1963, 1968) que, dans le district de Guarda, des formes diploïdes existent particulièrement dans les terrains moins humides situés au voisinage des marécageux. Il est donc probable que ces formes diploïdes aient engendré des triploïdes au moyen de la fusion de gamètes non réduits à 14 chromosomes avec des gamètes haploïdes. Les tri-

<sup>1</sup> En ce qui concerne la complexité de la méiose des hexaploïdes ou de plantes à constitution voisine de *N. bulbocodium* n'ayant pas acquis encore une division méiotique régulière, voir FERNANDES & FRANÇA (1971).

<sup>2</sup> D'après une note contenue dans notre registre des cultures des Narcisses, nous constatons que nous avons dénombré  $2n = 42$  chez une plante récoltée à Martiana, entre Pinhel et Guarda, c'est-à-dire, dans la même localité où J. Paiva, J. Matos & A. Marques ont récolté le n° 8403 qui a fourni les échantillons de la feuille d'herbier utilisée. C'est dommage que nous n'ayons pas trouvé du pollen suffisant dans les autres plantes. En tout cas, il est probable que cette population soit mixte, c'est-à-dire, constituée par des triploïdes et des hexaploïdes.

ploïdes auraient pu s'adapter aux terrains marécageux où les diploïdes n'ont pas pu survivre.

Par le fait que les Narcisses sont allogamiques, les gamètes non réduits et réduits ont été produits probablement par des plantes différentes. Les triploïdes de cette localité seront donc des hétérozygotes à un certain degré. Les hexaploïdes, bien qu'issus d'une duplication somatique, seront aussi des hétérozygotes, mais l'action de l'hétérozygotie pourra ici être moins accentuée que chez les primitifs triploïdes, par suite de l'apparition de paires chromosomiques entièrement homologues.

Les résultats obtenus sont donc d'accord avec ce qui nous savons sur la ségrégation des hexaploïdes à un bas degré d'hétérozygotie dont la méiose est très irrégulière (voir note 1 pag. 298).

Toutes les plantes en herbier de la population IV ont été étudiées.

La mensuration de 55 grains (nous n'avons pas réussi à obtenir un nombre plus élevé) de la plante A nous a montré que soit le grand axe, soit le petit axe présentent une amplitude de variation assez étendue et qu'il y a production de pollen à  $n = 7$  et  $n = 14$  dans une proportion approximative de 1:1, ainsi que du pollen à  $n = 21$  dans le pourcentage de 16,36 % et encore du pollen à  $n = 28$  dans le pourcentage de 1,81 %. D'autre part, on constate que cette plante est la plus vigoureuse de celles qui ont été mises en herbier et que le volume des grains est de  $69\,523\ \mu\text{m}^3$ , s'approchant, par conséquent, des valeurs présentées par les fleurs B de la localité III et les fleurs jaunâtre et jaune de la plante C de la localité IV (voir Tableau I), c'est-à-dire de celle à laquelle elle appartient aussi. De cette façon, bien que le nombre des cas observés soit bas, nous concluons que cette plante est hexaploïde.

La plante B, comme on peut le constater sur le Tableau I, s'est comportée comme un véritable triploïde, mais nous considérons probable que des grains hypo- et hyper-diploïdes se seraient formés. Le pourcentage de pollen fertile est très élevé, ce qui peut être attribué au petit nombre de cas observés par suite du manque de pollen. En tous cas, par le fait que le pourcentage de grains à  $n = 21$  est plus élevé que dans les autres cas, nous pourrions penser que cette plante pourra être aussi hexaploïde.

La plante C, comme nous l'avons remarqué, est très intéressante, rappelant la plante étudiée de la population III. En effet,

deux hampes florales sortaient du même bulbe. La fleur produite par une de ces hampes était jaunâtre et à couronne nettement lobulée comme il arrive chez la forme horticole «Buttonhole» de *N. pseudonarcissus*, qui possède  $2n = 21 + B$  (BRANDHAM & KIRTON, 1987), bien que chez cette plante les lobes soient plus profonds. Malheureusement, cette fleur était presque dépourvue de pollen fertile (3,88 %) et nous n'avons réussi à examiner que 60 grains.

Malgré cela, nous n'avons pas de doutes concernant la constitution hexaploïde de cette fleur, comme on peut le constater par l'étude du graphique respectif (7a) et des données rassemblées sur le Tableau I. La fleur jaune est aussi hexaploïde, comme les graphiques 8a, 9a et 10a, ainsi que le Tableau I le montrent.

L'explication de l'apparition de ces deux types de fleurs formées à partir du même bulbe serait facile si la fleur jaunâtre fusse triploïde et la jaune hexaploïde. En effet, nous avons montré (FERNANDES, 1957a, b) que, en croisant des plantes de *N. cantabricus* à fleur blanche avec *N. bulbocodium* à fleur jaune, la descendance ( $F_1$ ) était constituée seulement par des plantes à fleur blanche, ce qui montre que blanc domine le jaune. Étant donné que les plantes triploïdes en étude possèdent des fleurs jaunâtres, il est probable qu'il n'y a pas dans ces plantes dominance absolue du blanc sur le jaune, mais une hérédité intermédiaire et que du nombre de gènes en présence résultera le phénotype. De cette façon, nous pourrions supposer que le triploïde aurait la constitution Bbb. De la duplication dans l'hexaploïde résulterait BBbbbb. L'action des 4 gènes *b* serait plus forte que celle des deux gènes *B* et alors la couleur jaune en résulterait. L'autre fleur continuerait avec la constitution Bbb et elle se présenterait jaunâtre.

Par le fait que les deux fleurs sont hexaploïdes, nous devons recourir à une autre hypothèse plus complexe. Tout d'abord, nous devons admettre que la plante qui produit les deux hampes florales est un triploïde et non un hexaploïde. S'il en est ainsi, nous admettons que dans les tissus primordiaux des hampes florales des phénomènes d'endomitose aient eu lieu comme pour le cas de la hampe florale de la fleur B de la population III. Cependant, dans le cas de la plante de la population IV il y aurait division du méristème hexaploïde pour que deux hampes puissent se déve-

lopper (alternativement nous pourrions penser à deux points végétatifs indépendants).

Dans la lignée de la cellule qui irait subir l'endomitose une mutation somatique de *B* vers *b* aurait eu lieu et ainsi les cellules hexaploïdes deviendraient *bbbbbb* et alors la fleur développerait la couleur jaune. La fleur de l'autre hampe florale aurait la constitution *BBbbbb* et une couleur jaunâtre se manifesterait. Quant à la lobulation de la couronne de la dernière fleur, son origine serait la même, c'est-à-dire par mutation somatique.

Le cas de la plante *B* de Martiana et probablement celui de la plante *C* de la population *IV* montrent que, tout au moins chez *Narcissus*, outre la production de polyploïdes au moyen du croisement de gamètes non réduits, ce type de plantes peut être aussi engendré par duplication somatique. Nous ne savons pas si le moissonnage avant la production des graines par les Narcisses aura de l'influence (soit hormonale soit d'autre sorte) sur la duplication chromosomique. En tout cas, il nous semble que nous devrions attirer l'attention des cultivateurs de ces intéressantes plantes pour la possibilité qu'ils auront d'essayer à obtenir des amphidiploïdes — qui représenteront de nouvelles espèces stables et fertiles — à partir d'hybrides stériles que les Narcisses produisent en profusion, en provoquant la formation de méristèmes de hampes florales à nombre double de chromosomes.

L'étude de la carte concernant la distribution des formes polyploïdes de *N. bulbocodium* L. au Portugal, que nous avons publiée en 1968, met en évidence que dans une localité située à l'ouest de Guarda et dans deux autres situées au nord, nous avons dénombré 42 chromosomes chez ces plantes. Nous ne savons pas si ces trois populations sont pures (constituées seulement par des hexaploïdes) ou mixtes (mélange de triploïdes avec des hexaploïdes) et nous n'avons pas réussi à éclaircir ce point par manque de matériel.

En tout cas, il nous semble que nous sommes maintenant en position de raconter l'histoire probable du *N. bulbocodium* au district de Guarda.

Les formes diploïdes à 14 chromosomes et à fleur jaune sont descendues de la région de l'Estrela et probablement d'autres sont venus de l'ouest de l'Espagne dans leur progression vers le nord et l'ouest. Au bord des prés mouillés et au bord des rivières qui coulent vers le nord, les diploïdes se sont arrêtés à maintes fois,



puisque les terrains marécageux et les prés inondés ne leur convenaient pas. Cependant, à ces endroits, un très important événement a eu lieu: la fécondation d'un gamète à 14 chromosomes par un autre à 7. De ce croisement, des formes triploïdes à 21 chromosomes auraient pris naissance et ces plantes ont pu s'adapter aux conditions de vie défavorables aux formes diploïdes.

Une fois adaptés aux terrains marécageux des prés situés particulièrement le long des rivières, les triploïdes ont été soumis à une terrible pression sous l'action de l'homme qui les a empêchés d'accomplir une des principales fonctions de leur vie: la maturation des graines issues de la reproduction sexuée. En effet, tous les années les prés sont fauchés, généralement au mois de Mai, pour obtner du foin pour l'alimentation du bétail. Le moissonnage ayant lieu avant la maturation des graines qui a lieu à la fin de Mai, les Narcisses ont recouru à la multiplication végétative, principalement au moyen de la formation de cayeux par les bulbes qui sont transportés par les eaux courantes ainsi que les bulbes eux-mêmes. La dissémination a eu lieu du sud vers le nord en suivant le cours des affluents du fleuve Douro. Un autre phénomène très important pour la vie de ces plantes est en cours: celui d'obtenir une méiose équilibrée par voie végétative par le fait que la voie de la reproduction sexuée leur est interdite. On constate alors l'apparition de la duplication somatique des chromosomes amenant à la formation de hampes florales et de fleurs hexaploïdes. Ceci est arrivé chez la fleur B de la population III (Martiana), ainsi que chez la plante C de la population IV, mais cette tentative n'a pas réussi le plus souvent, puisque les fleurs des hexaploïdes sont fauchées comme celles des triploïdes. Cependant, simultanément avec la formation de hampes florales hexaploïdes, des cayeux aussi hexaploïdes pourront s'engendrer et des plantes à ce degré de polyploïdie pourront apparaître et se multiplier par voie végétative.

Comme nous l'avons remarqué, les Narcisses triploïdes croissant dans les prés destinés à être moissonnés, ne pouvant pas produire des graines, se multiplient végétativement. Mais ni toutes les plantes seront coupées, puisque dans beaucoup d'endroits (bords et lits des rivières, etc.) quelques-unes échapperont à la faux du faucheur. Alors, ces plantes fleurissent, peuvent attendre la visite des insectes pollinisateurs et auront du temps pour mûrir et disséminer les graines. Ces plantes pourront donc donner de la



descendance par voie sexuée, malgré l'élevé degré d'infertilité de plusieurs de ces plantes (voir Tableau I). Toutefois, ces plantes, dans le cas de la continuation de la reproduction allogamique, pourront acquérir une méiose équilibrée plus rapidement que celles se multipliant végétativement.

Nos observations ont montré que les triploïdes examinés engendrent en général des grains de pollen et, par conséquent, des gamètes mâles et femelles, à  $n = 7, 14, 21, 28$  et probablement d'autres nombres plus élevés de chromosomes, les deux premiers étant les plus fréquents. De cette façon, on attendrait une descendance constituée particulièrement par des plantes à 14, 21, 28, 35 et 42 chromosomes et encore d'autres à nombres irréguliers, particulièrement hyperdiploïdes, hypo- et hypertriploïdes, etc.

Il est curieux de remarquer que nous n'avons pas trouvé encore des tétraploïdes dans la région étudiée. Par contre, on trouve des hexaploïdes faisant partie de populations mixtes (avec des triploïdes) ou constituant probablement aussi des populations pures.

Le fait que des formes tétraploïdes n'ont pas été rencontrées dans la région révèle que les hexaploïdes ont été ici engendrés à partir de triploïdes et non à partir de tétraploïdes. Le Tableau I montre que, bien que dans un pourcentage peu élevé, tous les triploïdes produisent des grains de pollen à  $n=21$ . Il est très probable que les gamètes mâles avec ce nombre chromosomique produiront des tubes polliniques croissant plus rapidement que ceux provenant des grains à 7 et à 14 et, d'autre part, il pourra-t'arriver que des oosfères à 21 se soient formées dans un pourcentage plus élevé que celui des grains du pollen. Quelques auteurs (voir BRANDHAM, 1982 et la bibliographie y citée) croient qu'il pourrait y avoir aussi une sélection d'embryons résultante du manque d'équilibre chromosomique du rapport endosperme/embryon (qui normalement est égal à 1,5) dans les croisement entre certains polyploïdes. S'il en est ainsi, le croisement entre les gamètes à 7 et à 14 produits par les triploïdes ne donnerait pas origine à des graines plus aptes, puisque le rapport mentionné serait 1,33 dans le cas du croisement  $7♀ \times 14♂$  et 1,66 dans le croisement réciproque. De cette façon, seuls les croisements entre des gamètes à 7 entre eux et 14 aussi entre eux donneraient naissance à des graines plus compétitives. Dans le croisement entre des gamètes mâles et femelles à 21 il n'y aurait pas de tels problèmes. De cette façon, des plantes à  $2n = 42$  seraient produites plus fréquemment

que celles d'autres types et ainsi les triploïdes donneraient origine à des hexaploïdes.

On constate que les hexaploïdes ainsi produits ont une méiose irrégulière, puisqu'ils produisent du pollen à  $n = 7$  et à  $n = 14$ , comme les triploïdes, bien que le pourcentage de ceux à  $n = 21$  devient bien plus haut.

Ce comportement des hexaploïdes n'a rien d'étonnant, puisqu'il résultera du fait que leur degré d'hétérozygotie sera bas, ce qui amènera à la formation de multivalents que, comme on le sait, ségrèguent irrégulièrement. Par suite de mutations de gènes et surtout par l'action d'altérations structurelles, les garnitures réunies dans ces plantes subiront, dans le cours du temps, une diversification plus ou moins considérable qui amènerait à la différenciation de paires chromosomiques qui s'apparieront à la méiose. Il est évident que ce processus, comme nous l'avons remarqué, sera favorisé par la fécondation croisée qui a lieu dans ces plantes. Et ainsi, peu à peu, les hexaploïdes peuvent acquérir une méiose régulière, avec la formation de 21 bivalents.

Dans le but d'obtenir une méiose équilibrée, un autre processus peut agir quelquefois chez les polyploïdes: apparition, par mutation, d'un gène controlant la formation exclusive de bivalents et empêchant celle des multivalents (voir FERNANDES & LEITÃO, 1986 et la bibliographie y citée).

Ce mécanisme serait plus simple et plus rapide que le premier. Cependant, on constate que, même dans les plantes dans lesquelles le deuxième processus joue son rôle, le premier fonctionne aussi. Le fonctionnement simultané de ces deux mécanismes serait avantageux pour les plantes, puisque le deuxième est sous la dépendance d'un seul gène qui peut subir une mutation supprimant son action, tandis que le premier est plus sûre en se maintenant dans l'avenir.

Des individus triploïdes de *N. bulbocodium* ont été trouvés au Portugal intégrés dans des populations diploïdes, comme par exemple aux environs de Porto. En considérant seulement les gamètes produits plus fréquemment par ces plantes, la descendance suivante est à attendre (plantes indiquées par les nombres somatiques des chromosomes): 14, 21, 28, 35 et 42. Par le fait que leur méiose est irrégulière, les plantes à 21 et à 35 chromosomes ne pourront pas concourir avec les autres, en finissant par disparaître si ce n'est que des conditions favorables du milieu

puissent apparaître qui soient défavorables aux autres degrés de polyploïdie et dans lesquelles elles pourront se multiplier végétativement.

Des populations triploïdes de *N. bulbocodium* ont été trouvées au Portugal à Leça do Balio, à Varzielas (Caramulo) (FERNANDES, 1963; 1968) et à présent au district de Guarda. Dans cette dernière région, elles se maintiennent grâce à la multiplication végétative et à la dissémination par les eaux courantes, mais, comme nous l'avons signalé (FERNANDES, 1968), elles commencent à être substituées par des hexaploïdes, ce qui arrive à l'ouest de Guarda et au nord de cette ville.

Chez *Haworthia reinwardtii*, BRANDHAM & CUTLER (1981) ont rencontré des individus triploïdes dans une population diploïde et remarquent que d'autres auteurs ont rencontré sporadiquement des plantes triploïdes parmi d'autres *Aloineae*.

Les mêmes auteurs signalent aussi que *H. reinwardtii* var. *peddiensis* Smith est triploïde et que la forma *chalumnensis* est triploïde ou tétraploïde. Chez *H. coarctata*, BRANDHAM & CUTLER (1981) ont trouvé une population apparemment constituée seulement par des triploïdes. Par le fait que toutes les plantes étaient des triploïdes, les auteurs croient qu'il s'agit d'un clone se multipliant végétativement.

#### TAXONOMIE

En comparant les plantes des populations diploïdes du district de Guarda qui appartiennent au *N. bulbocodium* L. subsp. *bulbocodium* (en ce qui concerne la distribution de ces formes dans le district, voir FERNANDES, 1968, fig. 2) avec les triploïdes et les hexaploïdes, on trouve des différences qui nous ont amené à distinguer une nouvelle sous-espèce:

***Narcissus bulbocodium* L. subsp. *Quintanilhae*, subsp. nov.**

A typo planta validiore, 15-40 cm alta; foliis in quoque bulbo 3-7, usque ad 28 cm longis et 1-3 mm latis, plerumque florem excedentibus; scapo usque ad 33 cm alto, irregulariter cylindraceo; spatha longiore usque ad 4,5 cm longa; pedicello longiore usque ad 3,3 cm longo nec usque ad 2(2,5) cm longo; flore ascendenti; perianthio 2,2-3(3,5) cm longo; tubo 1,5-2 cm longo, longitudinaliter vittato, vittis 6 viridibus (per dorsum tepalorum pro-

longatis) cum vitis 6 luteolis ac latioribus alternantibus; tepalis 1,3 cm longis et ad basin 3 mm latis, intus luteolis, ascendentibus vel patentibus usque reflexis; corona (0,8)1,3-2 cm longa, luteola, rare lutea, margine crenulata, rare 6-lobata; chromosomatum numero 21 vel 42 nec 14 praecipue differt.

Habitat in Lusitania, Guarda distr. ad locos infra citatos:

«Entre Figueira de Castelo Rodrigo e Mata de Lobos, num lameiro», 25-IV-1962, *J. Paiva, J. Matos & A. Marques* 8433 (COI, holotypus). — «Quinta da Serra, a 6 km de Figueira de Castelo Rodrigo», 25-IV-1962, *J. Paiva, J. Matos & A. Marques* 8430 (COI, paratypus). — «Martiana, entre Pinhel e Guarda, terreno alagado», 25-IV-1962, *J. Paiva, J. Matos & A. Marques* 8403 (COI, paratypus). — «Estrada Guarda-Vilar Formoso, no cruzamento para a Cerdeira», 19-IV-1952, *A. Fernandes, F. Sousa & J. Matos* 3997 (COI, paratypus).

Colore perianthii *N. Graellsii* Webb ex Graells similis, sed ab eo dimensionibus onmium partium et chromosomatum numero 21 vel 42 neque 14 valde distinctus.

Subspecies in memoriam Doctoris A. QUINTANILHAЕ, Professoris eximii Universitatis Conimbrigensis, dicata.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. le Prof. Doutor PAULO MENDES, qui a bien voulu nous obtenir dans son ordinateur les données statistiques qui figurent dans l'Appendice.

Nous remercions Madame ROSETTE BATARDA FERNANDES de l'aide qu'elle nous a accordée dans la préparation de la description latine de la nouvelle sous-espèce ici publiée.

Nous remercions aussi Mlle. la Prof.<sup>a</sup> M. T. ALMEIDA et M. le Dr. JORGE PAIVA de l'aide prêtée dans la préparation du Summary.

À MM. les techniciens de l'Institut Botanique de Coimbra, FERNANDO CARDOSO, JORGE MASCARENHAS, CARLOS MORATO et ARLINDO CARDOSO, nous remercions de l'aide qu'ils nous ont accordée dans l'exécution de la partie technique de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

BRANDHAM, P. E. & CUTLER, D. F.

- 1981 Polyploidy, chromosome interchange and leaf surface anatomy as indicators of relationships within *Haworthia* section *coarctatae* Baker (Liliaceae-Aloineae). *Journ. Soc. Afr. Bot.* **47** (3): 507-546.

BRANDHAM, P. E.

- 1982 Inter-embryo competition in the progeny of autotriploid *Aloineae* (Liliaceae). *Genetica* **59**: 29-42.

BRANDHAM, P. E. & KIRTON, P. R.

- 1987 The chromosomes of species, hybrids and cultivars of *Narcissus* L. (*Amaryllidaceae*). *Kew Bull.* **42** (1): 65-102.

FERNANDES, A.

- 1934 Nouvelles études caryologiques sur le genre *Narcissus* L. *Bol. Soc. Brot.* sér. 2, **11**: 3-201.

- 1936 La mixoploïdie chez *Narcissus reflexus* Brot. *Bol. Soc. Brot.*, sér. 2, **9**: 27-42.

- 1957a La réhabilitation du *Narcissus cantabricus* DC. *Rev. Fac. Ciênc. Univ. Coimbra* **26**: 71-94.

- 1957b The réhabilitation of *Narcissus cantabricus* DC. *Kew Bull.* **3**: 373-385.

- 1963 Sobre a evolução no subgénero *Corbularia* do género *Narcissus* L. *Mem. Acad. Ciênc. Lisboa, Cl. Ciênc.*, **8**: 1-21.

- 1968 Contribution à la connaissance de la biosystème de quelques espèces du genre *Narcissus* L. *Port. Acta Biol.* **9**: 1-44.

- 1987 L'hybride *Narcissus* × *brevitubulosus* A. Fernandes et ses dérivés à la Serra da Estrela. *Fontqueria* **13**: 1-25.

FERNANDES, A. & FRANÇA, FILOMENA

- 1970 Sur la méiose d'un descendant du croisement de formes triploïdes de *Narcissus bulbocodium* L. *Bol. Soc. Brot.*, sér. 2, **44**: 27-53.

- 1971 Sur la méiose d'une plante de *Narcissus bulbocodium* L. à 40 chromosomes. *Bol. Soc. Brot.*, sér. 2, **45**: 123-142.

FERNANDES, A. & LEITÃO, M. T.

- 1986 Sur la caryologie de *Lavandula latifolia* Medicus, II — La microsporigénèse chez les plantes du Portugal à  $2n = 24, 50, 54$  et  $60$ . *Bro-téria Genética* **7** (LXXXII): 13-39.

## APPENDICE

Données statistiques obtenues par ordinateur concernant les principaux pics des graphiques 1a-10a

	Mean	Std. Dev.	Std. Error	Variance	Coef. Var.	Count
1a, Pic 1	51.364	2.678	.285	7.171	5.214	88
1a, Pic 2	61.406	2.573	.288	6.621	4.19	80
2a, Pic 1	51.474	2.909	.466	8.46	5.651	39
2a, Pic 2	61.591	1.946	.262	3.788	3.16	55
3a, Pic 1	53.65	3.122	.442	9.747	5.819	50
3a, Pic 2	61.81	1.319	.245	1.74	2.134	29
4a, Pic 1	54.946	2.204	.325	4.858	4.011	46
4a, Pic 2	62.757	1.601	.132	2.563	2.551	146
4a, Pic 3	68.542	1.697	.245	2.881	2.476	48
5a, Pic 1	52.381	2.559	.558	6.548	4.885	21
5a, Pic 2	61.667	3.01	.614	9.058	4.881	24
5a, Pic 3	70.5	4.048	1.28	16.742	5.742	10
6a, Pic 1	51.768	3.125	.488	9.764	6.036	41
6a, Pic 2	60.743	2.272	.373	5.161	3.74	37
6a, Pic 3	69.643	1.725	.652	2.976	2.477	7
7a, Pic 1	55.192	2.969	.823	8.814	5.379	13
7a, Pic 2	62.5	1.846	.385	3.409	2.954	23
7a, Pic 3	70.833	2.408	.491	5.797	3.399	24
8a, Pic 1	55.227	1.752	.528	3.068	3.172	11
8a, Pic 2	64.812	1.314	.208	1.727	2.027	40
8a, Pic 3	72.895	1.721	.395	2.961	2.36	19
9a, Pic 1	54.804	2.17	.304	4.711	3.96	51
9a, Pic 2	62.538	1.288	.16	1.659	2.059	65
9a, Pic 3	69.924	2.208	.484	4.877	3.158	33
10a, Pic 1	54.879	2.095	.266	4.391	3.818	62
10a, Pic 2	63.243	1.523	.151	2.318	2.407	101
10a, Pic 3	70.773	2.585	.349	6.684	3.653	55

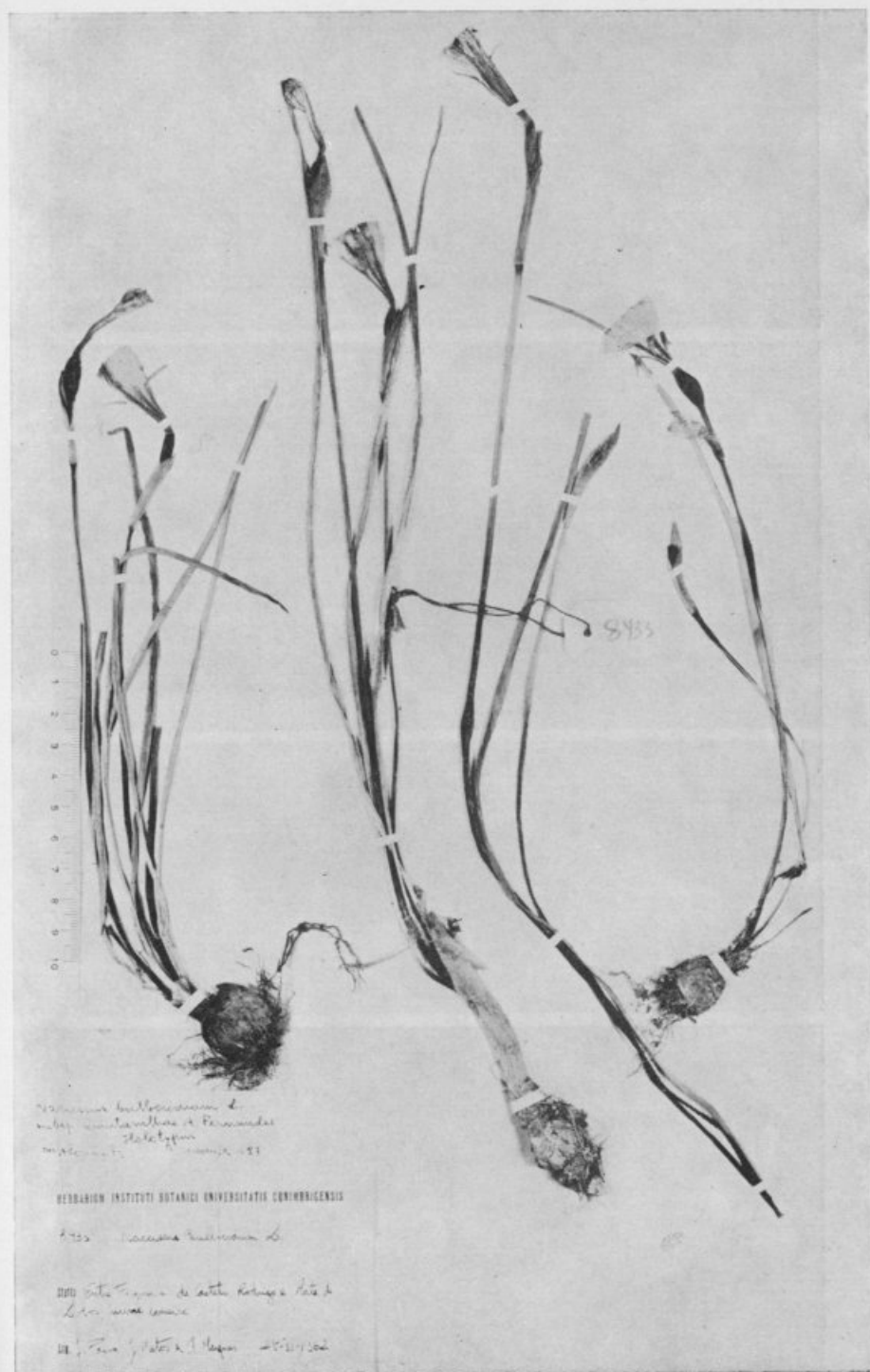
## PLANCHES

## APPENDICE

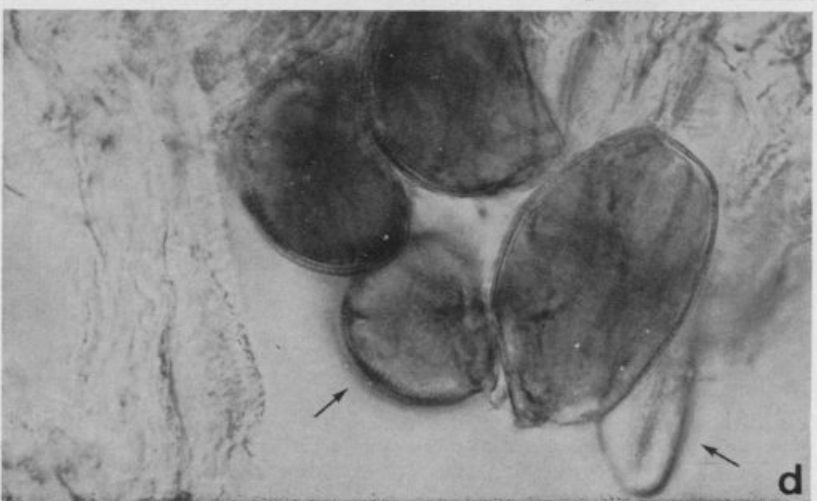
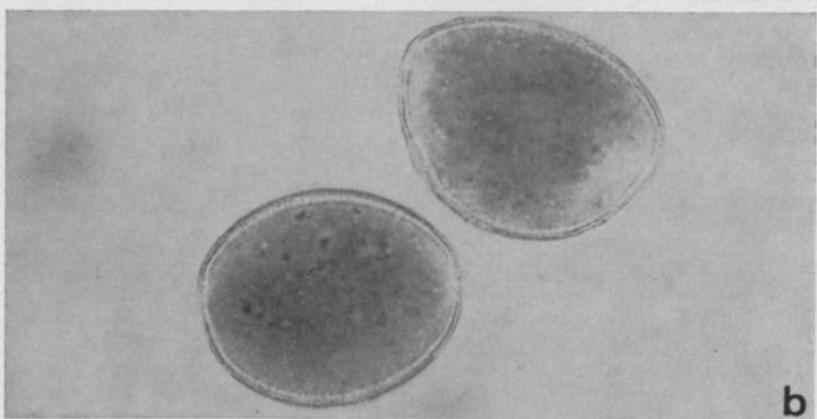
Données statistiques obtenues par un traitement statistique des données  
 plus des graphiques en 1924

	Area	Vol. Dry	Vol. Wet	Wetness	Vol. Wet	Wetness
1a. Pic 1	51.584	2.878	265	5.153	5.018	88
1a. Pic 2	51.606	2.853	262	5.128	4.993	85
2a. Pic 1	51.474	2.851	262	5.126	5.012	87
2a. Pic 2	51.591	2.851	262	5.126	5.012	87
3a. Pic 1	51.535	2.813	253	5.071	4.926	85
3a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
4a. Pic 1	51.546	2.811	252	5.069	4.924	85
4a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
4a. Pic 3	51.542	2.801	251	5.067	4.914	85
5a. Pic 1	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
5a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
5a. Pic 3	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
6a. Pic 1	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
6a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
6a. Pic 3	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
7a. Pic 1	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
7a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
7a. Pic 3	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
8a. Pic 1	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
8a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
8a. Pic 3	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
9a. Pic 1	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
9a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
9a. Pic 3	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
10a. Pic 1	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
10a. Pic 2	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85
10a. Pic 3	51.551	2.811	252	5.069	4.924	85





Feuille d'herbier des plantes herborisées entre Figueira de Castelo Rodrigo et Mata de Lobos. Holotype de *Narcissus bulbocodium* L. subsp. *Quintanilhae* A. Fernandes.



PL. II

Population I—Entre Figueira de Castelo Rodrigo  
et Mata de Lobos

- a—Grain de pollen à  $n = 7$  (flèche) et des grains stériles.  $\times 225$ .  
b—Deux grains à  $n = 14$ .  $\times 1350$ .  
c—Un grain à  $n = 21$ .  $\times 1350$ .  
d—Un grain à  $n = 7$  (flèche), deux à  $n = 14$ , un à  $n = 21$  et un  
stérile (flèche).  $\times 1350$ .



11

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY

Acquired through the University of Chicago Library  
from the University of Chicago Press  
on 11/11/11





HERBARIUM INSTITUTI BOTANICI UNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

8450 *Nerium bulbosum* L.

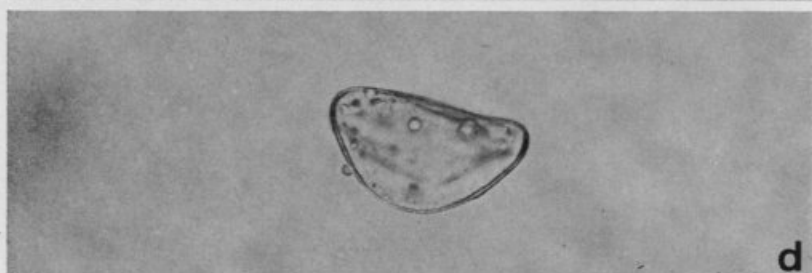
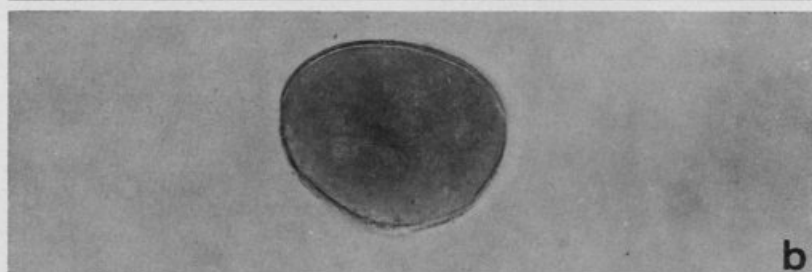
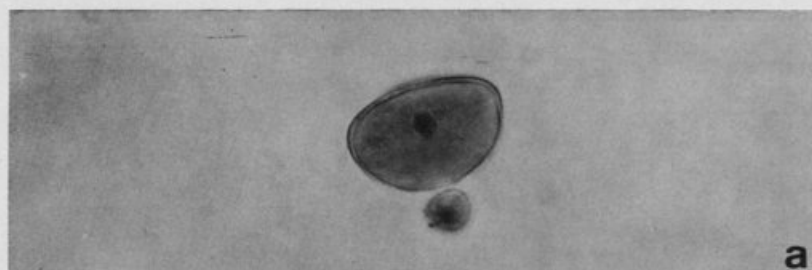
Quinta da Serra, a 6 km de Figueira de Castelo Rodrigo

Dr. F. Paes, J. Neto & A. Marques 25-11-1962

*Nerium bulbosum* L.  
 subsp. *Quintanilhae* A. Fernandes  
 ex A. Fernandes & Parag. x 83

HERBARIUM INSTITUTI BOTANICI  
 UNIVERSITATIS CONIMBRIGENSIS

Feuille d'herbier des plantes ramassées à Quinta da Serra, à 6 km de Figueira de Castelo Rodrigo.



PL. IV

Population II — Quinta da Serra, à 6 km de Figueira  
de Castelo Rodrigo

- a — Grain de pollen à  $n = 7$  (au dessous de celui-ci, on voit un grain  
de pollen d'une autre plante, qui a été déposé sur l'anthere du  
Narcisse).  $\times 900$ .
- b — Grain de pollen à  $n = 14$ .  $\times 900$ .
- c — Grain de pollen vide et un autre à  $n = 21$ .  $\times 900$ .
- d — Grain de pollen stérile.  $\times 900$ .
- e — Grain à  $n = 21$ .  $\times 384$ .

PL. V

Feuille d'herbier des plantes herborisées à Martiana, entre Pinhel et Guarda. A gauche, la plante qui a produit deux fleurs, desquelles l'ouvert (hampe florale à gauche) s'est comportée comme triploïde et la fermée comme hexaploïde.





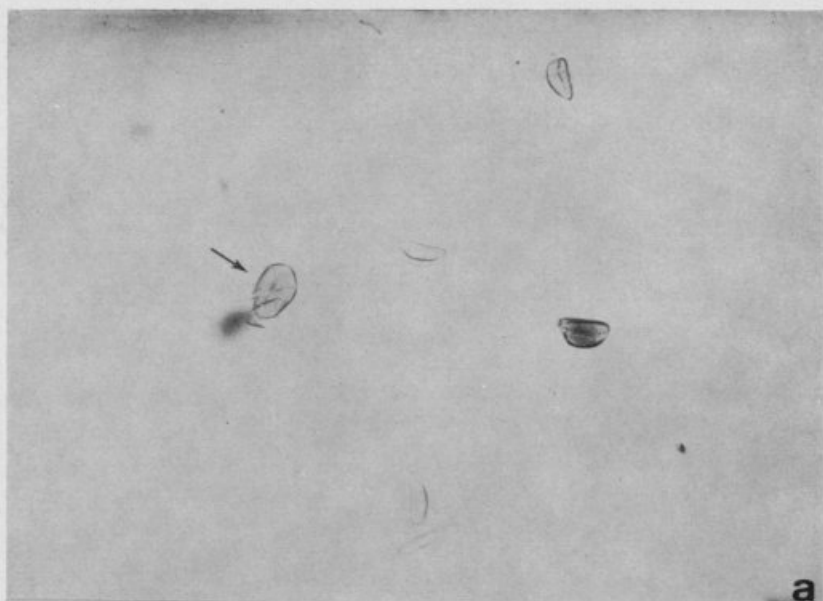
*Narcissus bulbosidum* L.  
 ex herb. Quintero & A. Fernandez  
 in N. S. P. Paratyque  
 1952

HERBARIUM INSTITUTI BOTANICI UNIVERSITATIS COBRINCENSIS

8403 *Narcissus bulbosidum* L.

1952 Maciana, sive Pichel s.a. Quenda,  
 f. c. S. J. de Matos

Dr. J. P. de Matos & A. S. de Matos 26-IV-1962



PL. VI

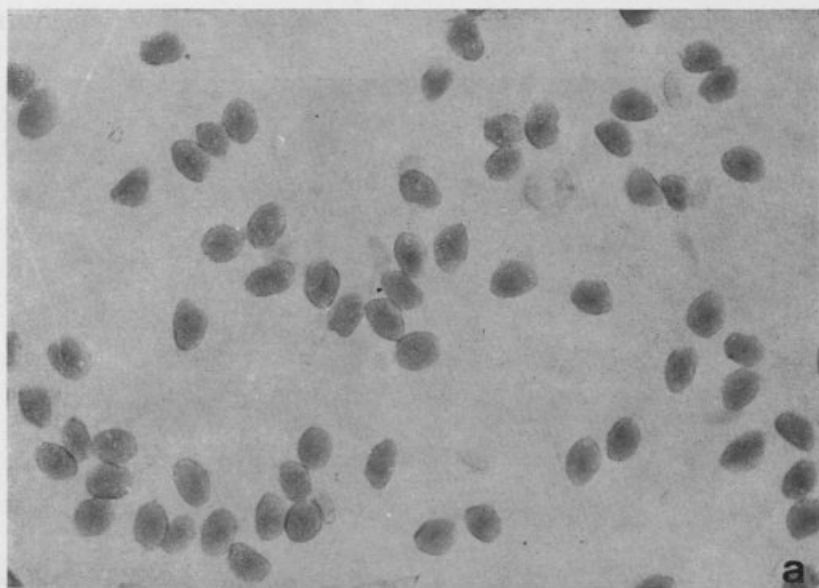
Population III — Martiana, route Pinhel-Guarda.  
Fleur A

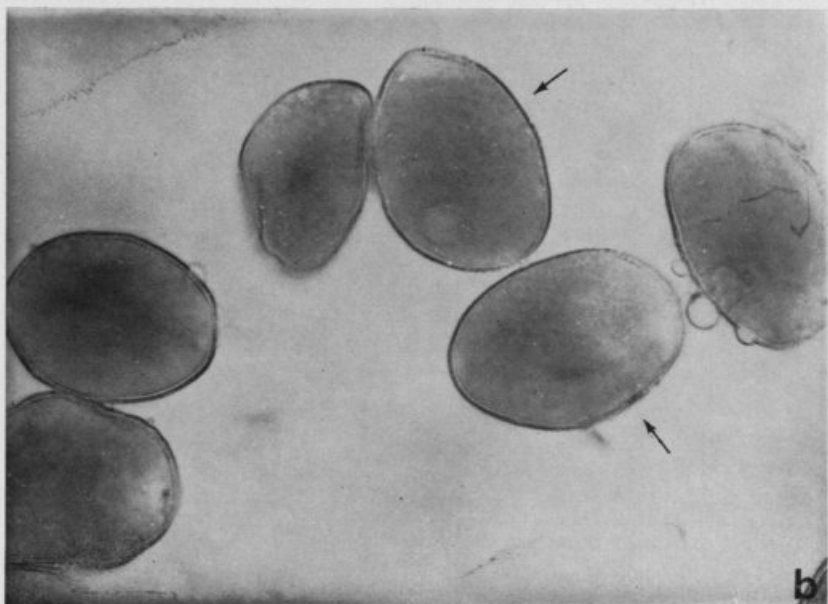
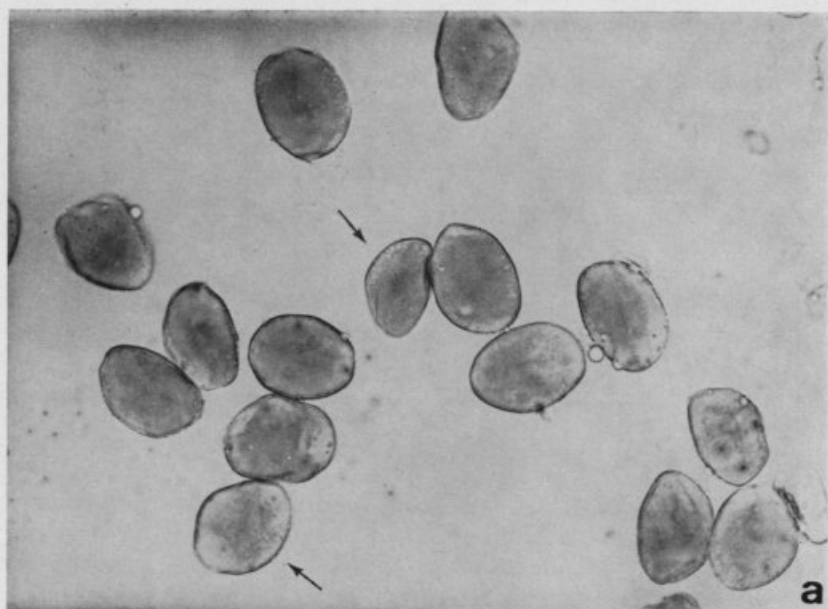
- a — Grain de pollen à  $n = 7$  (flèche) et grains vides.  $\times 225$ .
- b — Grain à  $n = 14$  (flèche) et un autre vide. = 900.
- c — Grain à  $n = 21$ .  $\times 900$ .

PL. VII

Population III — Martiana, route Pinhel-Guarda.  
Fleur B

- a — Aspect général, montrant pollen fertile et stérile.  $\times 96$ .
- b — Deux grains à  $n = 7$ .  $\times 384$ .
- c — Grains à  $n = 7$  (flèche), 14 et 21.  $\times 384$ .





PL. VIII

Population III — Martiana, route Pinhel-Guarda.  
Fleur B

- a — Des grains à  $n = 7$  (flèches), d'autres à  $n = 14$  et d'autres à  $n = 21$ .  $\times 450$ .
- b — Une partie de la photo antérieure à un plus fort grossissement. Les deux flèches indiquent des grains à  $n = 21$ .  $\times 900$ .

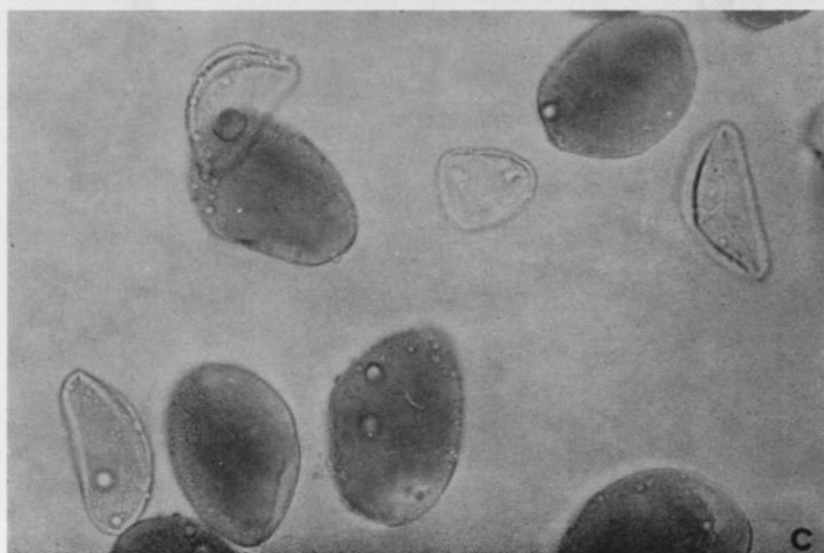
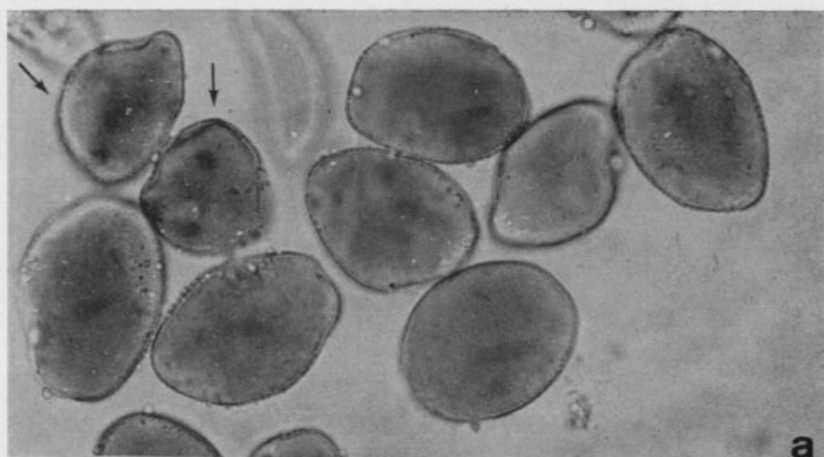
PL. IX

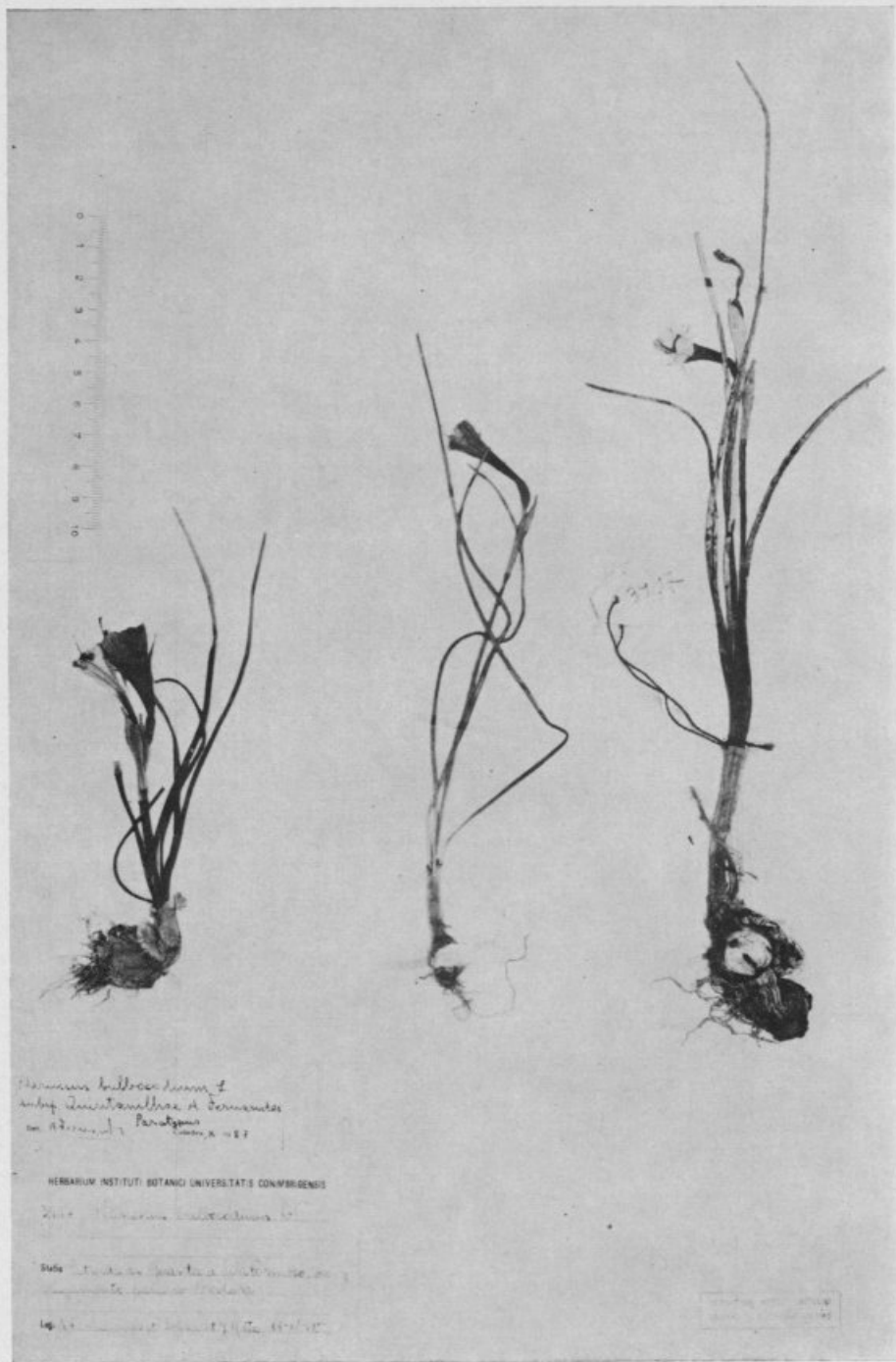
Population III — Martiana, route Pinhel-Guarda.

Fleur B

- a — Grains de pollen à  $n = 7$  (flèches), à  $n = 14$  et à  $n = 21$  (les plus volumineux).  $\times 900$ .
- b — Grain à  $n = 7$  et un autre vide.  $\times 384$ .
- c — Grains à  $n = 14$  et d'autres vides.  $\times 384$ .







PL. X

Feuille d'herbier des plantes herborisées près du croisement de la route  
Guarda-Vilar Formoso avec celle vers Cerdeira. Détails dans le texte.

PL. XI

Population IV — Route Guarda-Vilar Formoso,  
près du croisement vers Cerdeira.

Plante A

a — Grain fertile et deux stériles.  $\times 450$ .

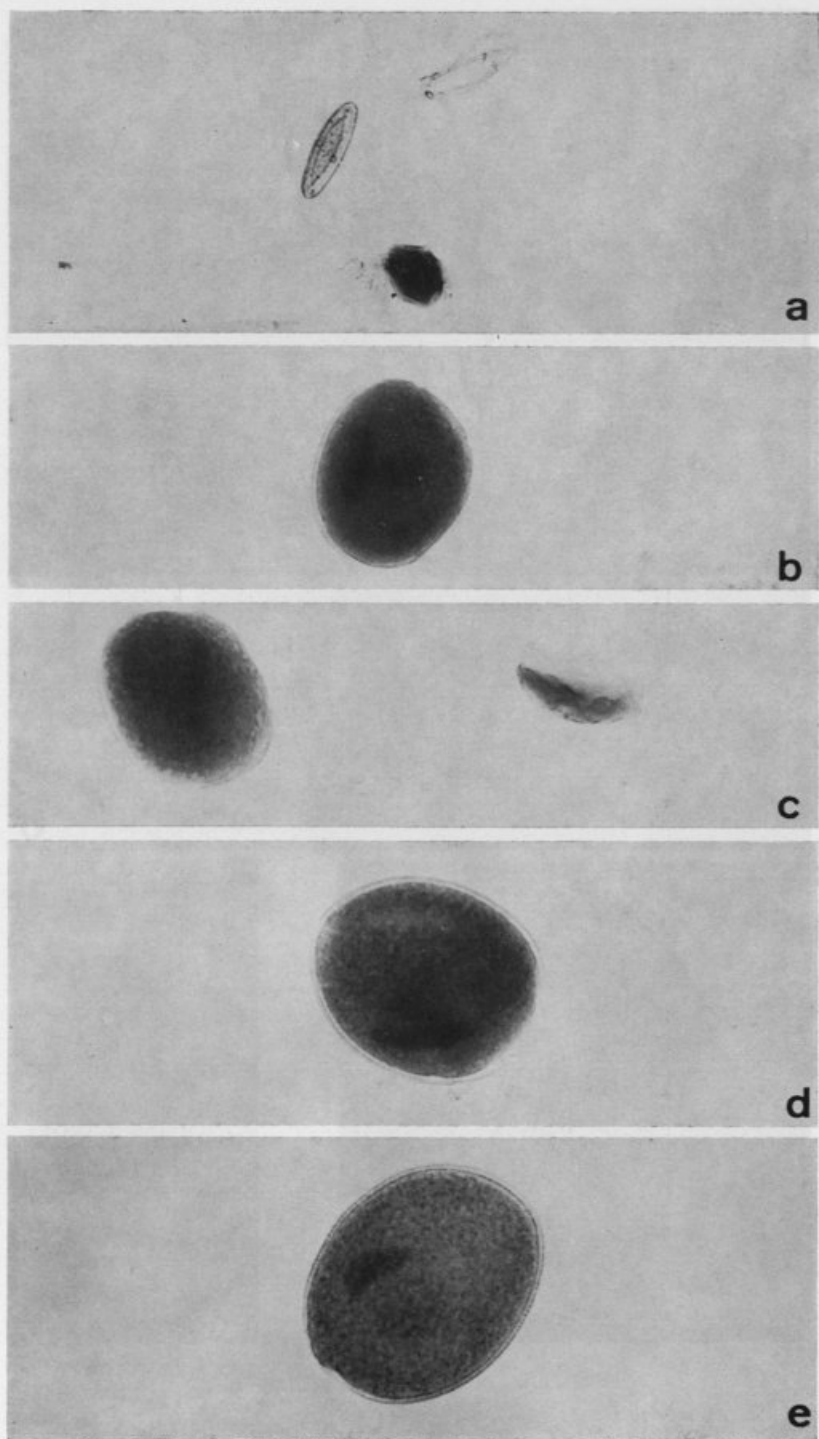
Plante B

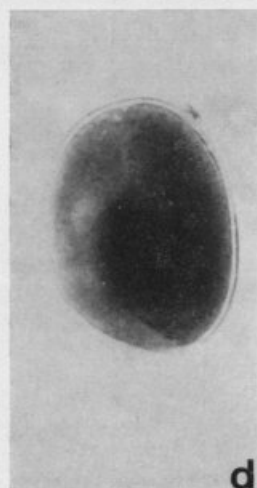
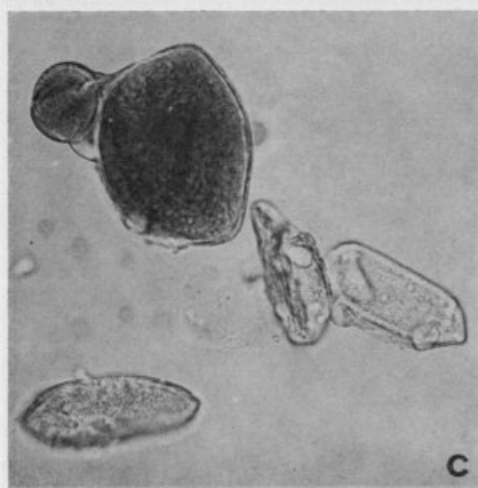
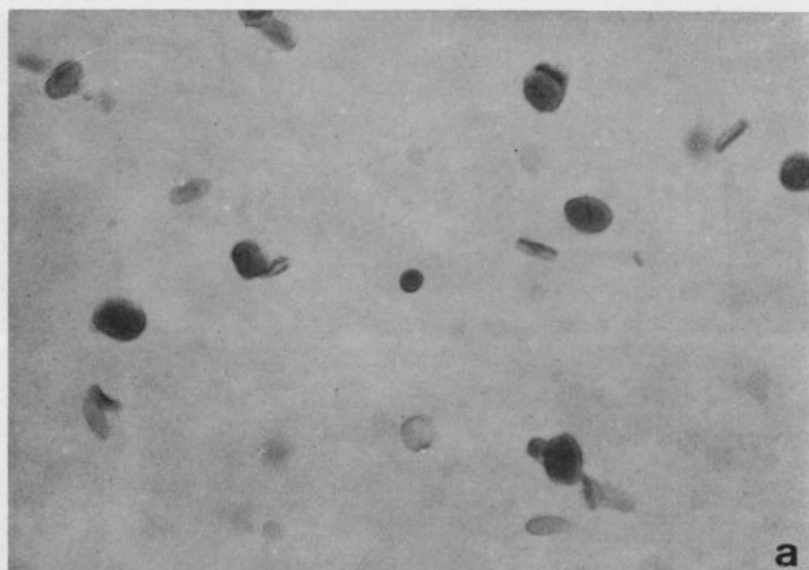
b — Grain à  $n = 7$ .  $\times 900$ .

c — Grain à  $n = 7$  et un autre stérile.  $\times 900$ .

d — Idem à  $n = 14$ .  $\times 900$ .

e — Idem à  $n = 21$ .  $\times 900$ .





## PL. XII

Population IV — Route Guarda-Vilar Formoso,  
près du croisement vers Cerdeira.

Plante C, fleur A (jaunâtre)

a — Grains de pollen fertiles et stériles.  $\times 96$ .

b — Grain à  $n = 7$ .  $\times 900$ .

c — Grain à  $n = 21$  et d'autres stériles.  $\times 900$ .

d — Grain à  $n = 21$ .  $\times 900$ .

PL. XIII

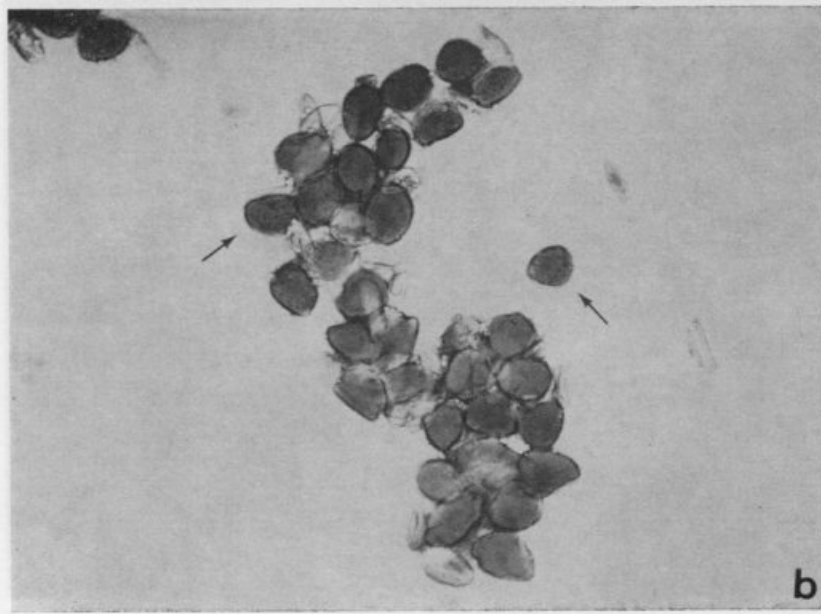
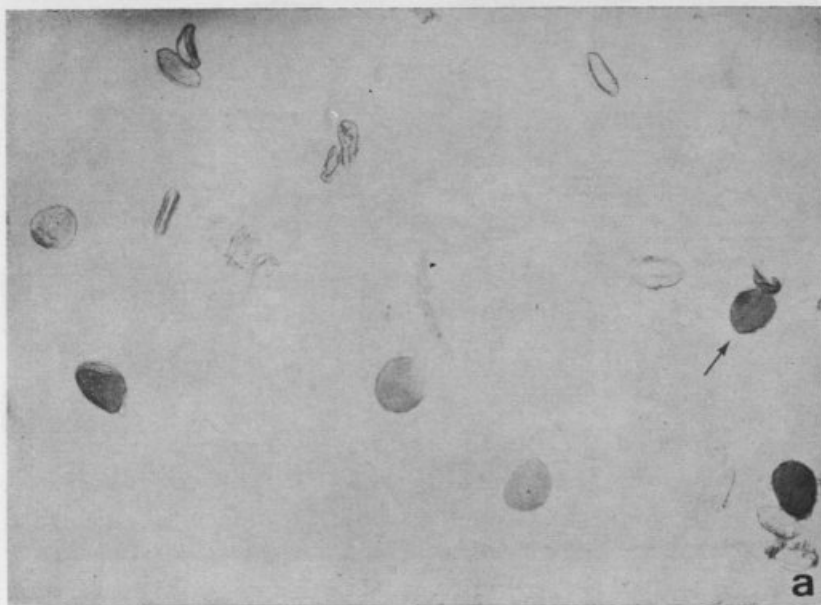
Population IV — Route Guarda-Vilar Formoso,  
près du croisement vers Cerdeira.

Plante C, fleur B (jaune)

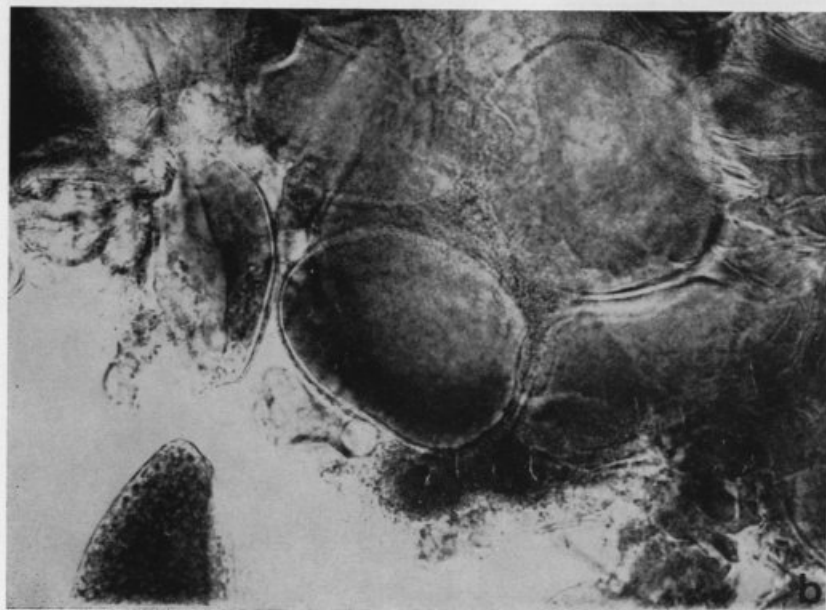
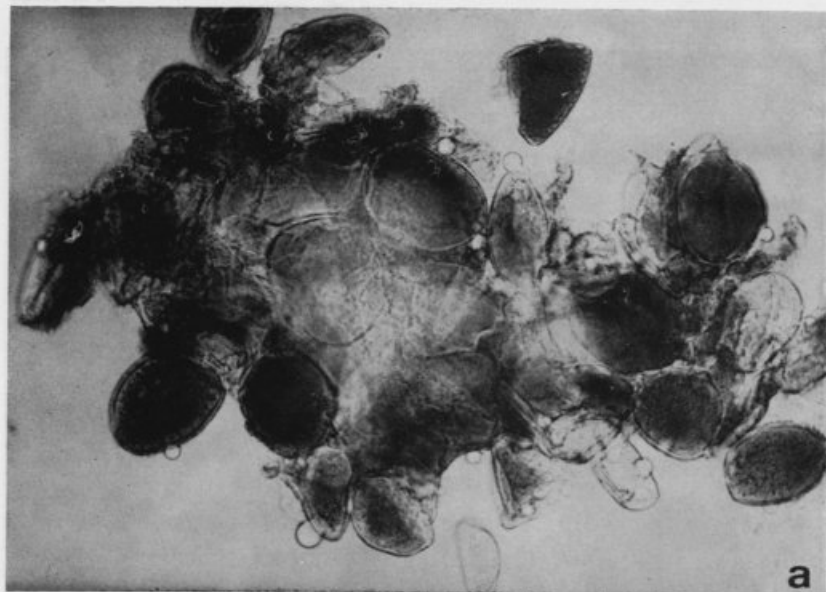
a — Grains fertiles et stériles.  $\times 225$ .

b — Amas de grains de pollen fertiles et stériles de plusieurs  
dimensions. Les flèches indiquent des grains à  $n = 7$ .  $\times 225$ .





a — Amas sphériques à base de la partie supérieure d'un fruit  
 dans le milieu d'un fruit. (Grossissement X 400).  
 b — Une partie de l'amas montrant les grains réunis à un plus  
 fort grossissement X 800.



Population IV — Route Guarda-Vilar Formoso,  
près du croisement vers Cerdeira.

Plante C, fleur B (jaune)

- a — Amas semblable à celui de la photo antérieure pressé entre lame et lamelle montrant des grains géants dans la région centrale et des grains stériles.  $\times 450$ .
- b — Une partie de l'amas montrant les grains géants à un plus fort grossissement.  $\times 900$ .