

la estructura anatómica de la testa, la forma y disposición del embrión y el número de semillas presentes en cada cápsula.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

El material para la realización del estudio procede tanto de recolecciones propias (cuyos pliegos testigo se hallan depositadas en los herbarios del Jardí Botànic de València, VAL y del Departament de Biologia Vegetal de la Universitat de València, VAB) como de extracciones efectuadas del material cedido por los herbarios del Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia de Granada (GDA), el Jardín Botánico de Madrid (MA) y el Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia de Madrid (MAF). La lista completa de localidades se detalla en el **Anexo 1**. En todos los casos han sido tomadas semillas maduras y bien desarrolladas.

De cada taxon se eligieron 4 ó 5 poblaciones, excepto de *F. paradoxa* y *F. fontanesii*, de las que sólo se estudió una, debido a lo restringido de su área de dispersión y la escasez del material disponible.

De un número mínimo de veinte semillas por población han sido medidos, los dos ejes mayores, calculándose posteriormente los valores medios, rangos de variación y desviación típica de las medias (Tabla I). Con estos datos se confeccionaron los test de Simpson y Roe (PLUYM & HIDEUX, 1977) de los valores obtenidos (Fig. 1). Dichas medidas fueron tomadas con microscopio esteroscópico a 40 aumentos.

El estudio de la ornamentación de las semillas se efectuó con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 25S. Fue realizado sobre semillas al natural, para observar la ornamentación de la envuelta externa; y sobre semillas previamente hidratadas y sometidas a un baño de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado durante 3-5 minutos, para eliminar la envuelta externa y poder apreciar la ornamentación de la capa interna. En ambos casos fueron depositadas en los portaobjetos y recubiertas con oro-paladio durante cuatro minutos en un Ion-Sputer Jeol JFC-1100. Las fotografías se realizaron sobre película Agfapan-100 Professional  $6 \times 7$ .

La anatomía de la testa fue estudiada tras la realización de cortes con un microtomo de congelación Reichert. Para evitar la rápida hidratación de la cubierta externa, las semillas

TABLA 1

Dimensiones de las semillas en mm. M = valor máximo; m = valor mínimo; x = media; σ = desviación típica

Taxon	Muestra	Procedencia	Longitud			Anchura				
			M	m	x	σ	M	m	x	σ
F. ericoides subsp. ericoides	er1	Huercal (Al)	2.30	2.00	2.18	0.10	1.85	1.51	1.67	0.11
	er2	S <sup>a</sup> de Cartagena (Mu)	2.30	1.95	2.12	0.16	1.63	1.28	1.45	0.12
	er3	Torrente (V)	2.40	2.10	2.27	0.23	1.76	1.48	1.61	0.21
	er4	S <sup>a</sup> de Sancho (A)	2.40	2.03	2.23	0.10	1.75	1.40	1.58	0.13
	er5	Sorbas (Al)	2.30	2.00	2.17	0.08	1.72	1.46	1.58	0.13
F. ericoides subsp. montana	sp1	Las Cabrejas (Cu)	2.38	2.16	2.26	0.08	1.83	1.50	1.68	0.17
	sp2	S <sup>a</sup> de España (Mu)	2.45	2.15	2.30	0.10	1.80	1.48	1.63	0.11
	sp3	Alfarp-Catadau (V)	2.03	1.75	1.89	0.08	1.63	1.33	1.46	0.13
	sp4	Tlbidabo (B)	2.23	1.90	2.06	0.15	1.78	1.53	1.64	0.14
	sp5	Lucena del Cid (Cs)	2.38	2.10	2.26	0.11	1.76	1.48	1.62	0.11
F. scoparia	sc1	Caudete (Ab)	2.53	2.25	2.40	0.10	1.85	1.58	1.72	0.21
	sc2	Villena (A)	2.55	2.20	2.38	0.12	1.55	1.33	1.45	0.12
	sc3	Contreras (Cu)	2.27	1.95	2.11	0.17	1.68	1.35	1.53	0.20
	sc4	Segorbe (Cs)	2.40	2.10	2.25	0.11	1.90	1.58	1.73	0.13
F. paradoxa	pa1	S <sup>a</sup> Cazorla (J)	2.48	2.20	2.32	0.06	1.85	1.63	1.75	0.06
F. procumbens	pr1	Barracas (Cs)	2.80	2.54	2.65	0.21	2.10	1.87	1.98	0.13
	pr2	Pinto (M)	2.90	2.60	2.74	0.16	2.30	1.92	2.13	0.15

		S <sup>a</sup> Altana (A)	2.65	2.50	2.62	0.12	2.15	1.90	2.01	0.13
pr3		Mirantes de Luna (Le)	2.98	2.70	2.85	0.12	2.40	2.12	2.27	0.10
pr4		Talayuelas (Cu)	2.95	2.60	2.77	0.16	2.21	1.90	2.03	0.16
pr5										
ft1		S <sup>a</sup> de España (Mu)	3.16	2.80	3.00	0.12	2.15	1.85	1.98	0.10
th1		Cuevas (Al)	2.18	1.91	2.06	0.07	1.45	1.10	1.26	0.19
th2		Écija (Se)	2.18	2.00	2.09	0.05	1.37	0.98	1.16	0.20
th3		San Miguel de Salinas (A)	2.23	1.98	2.12	0.07	1.50	1.15	1.30	0.20
th4		Pto de Santa Maria (Ca)	2.00	1.88	1.94	0.04	1.20	0.95	1.06	0.15
th5		Dos Aguas (V)	1.98	1.78	1.88	0.07	1.30	0.98	1.13	0.18
lv1		Polop (A)	1.90	1.73	1.80	0.05	1.28	0.98	1.16	0.11
lv2		Játiva (V)	1.96	1.78	1.87	0.09	1.25	0.88	1.04	0.19
lv3		Barranc de Fontanars (V)	2.00	1.83	1.92	0.05	1.05	0.80	0.90	0.17
lv4		Jalón (A)	1.96	1.81	1.88	0.12	1.13	1.00	1.05	0.04
hi1		Dehesa de la Albufera (V)	2.63	2.27	2.46	0.16	1.54	1.37	1.44	0.06
hi2		S <sup>a</sup> de España (Mu)	2.71	2.43	2.58	0.11	1.76	1.66	1.71	0.06
hi3		Alborea (Ab)	2.45	2.25	2.35	0.08	1.70	1.50	1.61	0.07
hi4		Venta del Moro (V)	2.73	2.28	2.52	0.17	1.73	1.45	1.57	0.14
hi5		Domeño (V)	2.52	2.33	2.44	0.06	1.78	1.63	1.70	0.09
lp1		S <sup>a</sup> Ohanes (Al)	2.50	2.30	2.38	0.06	1.20	0.95	1.08	0.08
lp2		Cabo de palos (Mu)	2.43	2.25	2.32	0.06	1.30	0.97	1.15	0.20
lp3		Quarteria (Portugal)	2.33	2.18	2.24	0.05	1.28	0.99	1.13	0.20
lp4		Benicarló (Cs)	2.50	2.20	2.35	0.17	1.41	1.15	1.30	0.20
lp5		Aguadulce (Al)	2.35	2.10	2.22	0.11	1.48	1.16	1.34	0.19

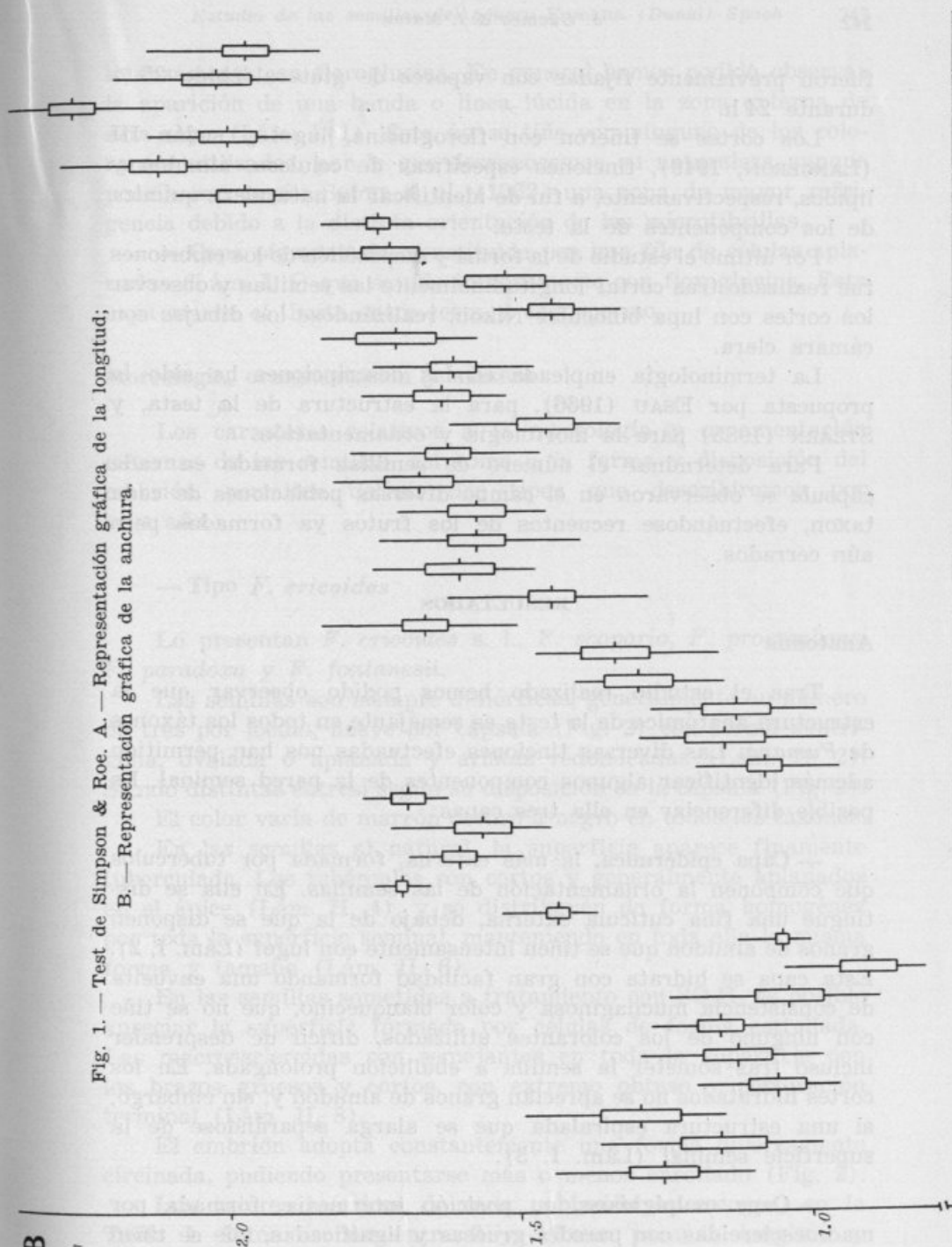




**B**

mm

Fig. 1. — Test de Simpson & Roe. A. — Representación gráfica de la longitud;  
 B. — Representación gráfica de la anchura.



thi the ths thd thl thm thn thp thq thr ths tht thv thw thx thy thz th1 th2 th3 th4 th5 th6 th7 th8 th9 th0

fueron previamente fijadas con vapores de glutaraldehído 25 % durante 24 h.

Los cortes se tiñeron con floroglucina, lugol y sudán III (LANGERON, 1949), tinciones específicas de celulosa, almidón y lípidos, respectivamente, a fin de identificar la naturaleza química de los componentes de la testa.

Por último el estudio de la forma y disposición de los embriones fue realizado tras cortar longitudinalmente las semillas y observar los cortes con lupa binocular Nikon, realizándose los dibujos con cámara clara.

La terminología empleada en las descripciones ha sido la propuesta por ESAU (1966), para la estructura de la testa, y STEARN (1985) para la morfología y ornamentación.

Para determinar el número de semillas formado en cada cápsula se observaron en el campo diversas poblaciones de cada taxon, efectuándose recuentos de los frutos ya formados pero aún cerrados.

## RESULTADOS

### Anatomía

Tras el estudio realizado hemos podido observar que la estructura anatómica de la testa es semejante en todos los táxones de *Fumana*. Las diversas tinciones efectuadas nos han permitido además identificar algunos componentes de la pared seminal. Es posible diferenciar en ella tres capas:

— **Capa epidérmica**, la más externa, formada por tubérculos que componen la ornamentación de las semillas. En ella se distingue una fina cutícula externa, debajo de la que se disponen granos de almidón que se tiñen intensamente con lugol (Lám. I, 2). Esta capa se hidrata con gran facilidad formando una envuelta de consistencia mucilaginoso y color blanquecino, que no se tiñe con ninguno de los colorantes utilizados, difícil de desprender incluso tras someter la semilla a ebullición prolongada. En los cortes hidratados no se aprecian granos de almidón y, sin embargo, si una estructura espiralada que se alarga separándose de la superficie seminal (Lám. I, 3).

— **Capa malpighiana**, en posición intermedia, formada por macroesclereidas con paredes gruesas y lignificadas, que se tiñen

intensamente con floroglucina. En general hemos podido observar la aparición de una banda o línea lúcida en la zona externa de esta capa (Lám. I, 1). Ésta no se tiñe con ninguno de los colorantes utilizados, por lo que desconocemos su naturaleza aunque podría ser, según SCOTT & al. (1962) una zona de mayor refringencia debido a la distinta orientación de las microfibrillas.

— **Capa pigmentaria**, constituida por una fila de células aplanadas (Lám. I, 1) que se tiñe intensamente con floroglucina. Esta capa marca el límite entre testa y endospermo.

### Morfología, ornamentación y número

Los caracteres relativos a la morfología y ornamentación externas de las semillas, así como a la forma y disposición del embrión, permiten definir dos tipos que describiremos por separado.

#### — Tipo *F. ericoides*

Lo presentan *F. ericoides* s. l., *F. scoparia*, *F. procumbens*, *F. paradoxa* y *F. fontanesii*.

Las semillas son siempre dimórficas, generalmente en número de tres por lóculo, nueve por cápsula (Fig. 2) con forma subtrigona, ovalada o aplanada y aristas redondeadas (Lám. II, 2). Siendo distintas entresí según su disposición en la cápsula (Fig. 2).

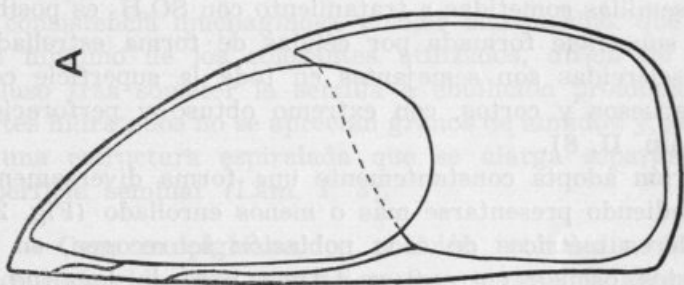
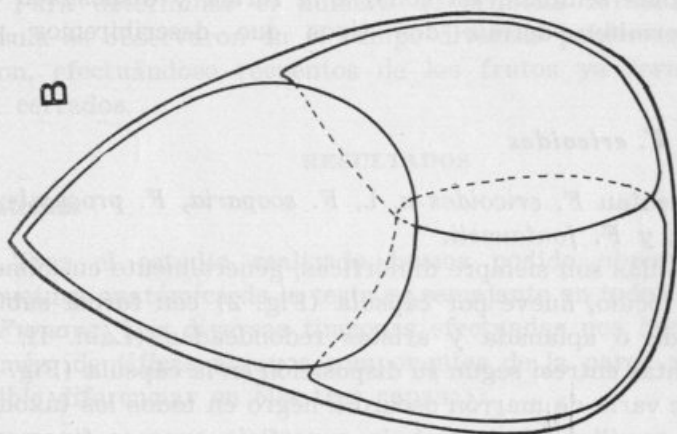
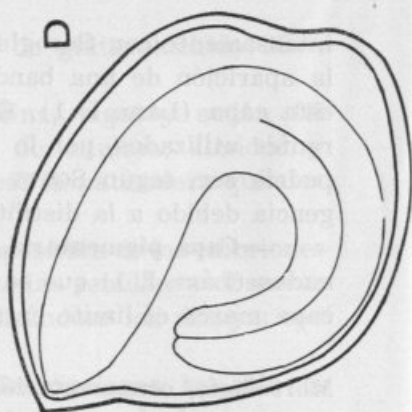
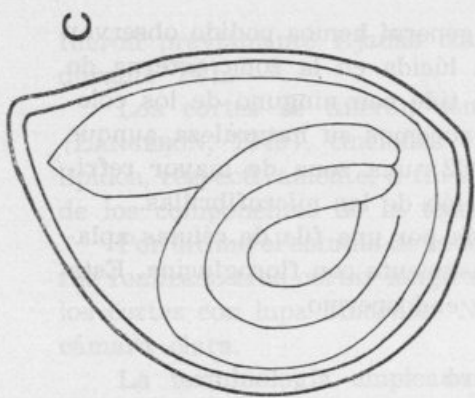
El color varía de marrón oscuro a negro en todos los táxones.

En las semillas al natural, la superficie aparece finamente tuberculada. Los tubérculos son cortos y generalmente aplanados en el ápice (Lám. II, 4), y se distribuyen de forma homogénea por toda la superficie seminal, manteniendo en toda ella la misma forma y tamaño (Lám. II, 6).

En las semillas sometidas a tratamiento con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  es posible apreciar la superficie formada por células de forma estrellada. Las macroesclereidas son semejantes en toda la superficie con los brazos gruesos y cortos, con extremo obtuso y perforación terminal (Lám. II, 8).

El embrión adopta constantemente una forma diversamente circinada, pudiendo presentarse más o menos enrollado (Fig. 2).

Los valores métricos de cada población se recogen, en la Tabla I. Éstos oscilan entre 2 y 3.5 mm para la longitud y



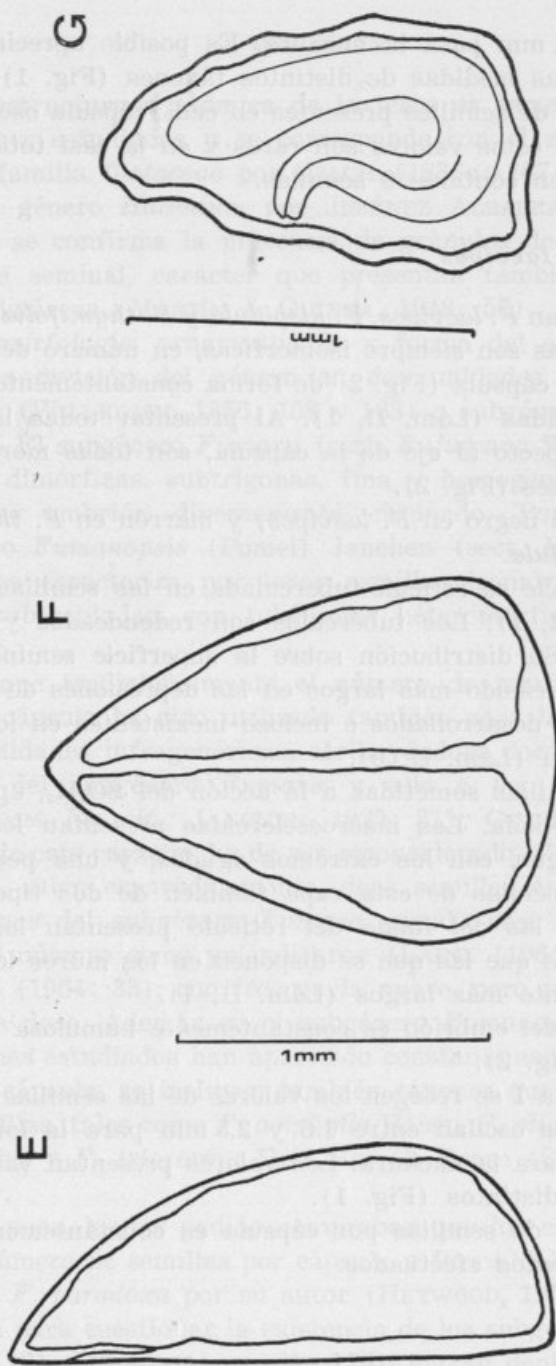


Fig. 2. — A-D. — Semillas subgénero *Fumana*: A. — Disposición de semillas en la cápsula, vista lateral; B. — Idem, vista posterior; C y D. — Forma del embrión. E-G. — Semillas subgénero *Fumanopsis*: E. — Disposición de las semillas en la cápsula, vista lateral; F. — Idem, vista posterior; G. — Forma del embrión.



entre 1.5 y 2.1 mm para la anchura. Es posible apreciar cierta diferencia en las medidas de distintos táxones (Fig. 1).

El número de semillas presentes en cada cápsula oscila entre 6 y 12, aunque estos valores son raros y en la casi totalidad de los casos pueden contarse 9 semillas.

#### — Tipo *F. laevipes*

Lo presentan *F. laevipes*, *F. hispidula* y *F. thymifolia* s. l.

Las semillas son siempre isomórficas, en número de dos por lóculo, seis por cápsula (Fig. 2) de forma constantemente trígona y aristas acusadas (Lám. II, 1). Al presentar todas la misma disposición respecto al eje de la cápsula, son todas morfológicamente semejantes (Fig. 2).

El color es negro en *F. laevipes*; y marrón en *F. thymifolia* s. l. y *F. hispidula*.

La superficie es retículo-tuberculada en las semillas no tratadas (Lám. II, 1). Los tubérculos son redondeados y obtusos (Lám. II, 3). Su distribución sobre la superficie seminal no es uniforme, apareciendo más largos en las depresiones de los retículos; y menos desarrollados e incluso inexistentes en los muros que los separan (Lám. II, 5).

En las semillas sometidas a la acción del  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , aparece la superficie estrellada. Las macroesclereídas presentan los brazos delgados y largos, con los extremos agudos, y una perforación terminal. Las células de esta capa también de dos tipos según su disposición, las del fondo del retículo presentan los brazos cortos, mientras que las que se disponen en los muros los tienen considerablemente más largos (Lám. II, 7).

La forma del embrión es constantemente hamulosa en todos los táxones (Fig. 2).

En la Tabla I se recogen los valores de las semillas en cada población. Estos oscilan entre 1.6 y 2.5 mm para la longitud y 1.1 y 1.8 mm para la anchura. Los valores presentan variaciones entre táxones distintos (Fig. 1).

El número de semillas por cápsula es constantemente 6 en todos los recuentos efectuados.

## DISCUSIÓN

La estructura anatómica de la testa es semejante en todos los táxones estudiados y se corresponde con el modelo descrito para la familia *Cistaceae* por SPACH (1836a: 267; ROCHE, 1906: 32) y el género *Halimium* por JIMÉNEZ ALBARRÁN (1985: 69). También se confirma la presencia de gránulos de almidón en la epidermis seminal, caracter que presentan también la mayoría de las Cistáceas (MARTÍN & GUINEA, 1948: 57).

La morfología, ornamentación y forma del embrión apoyan la clásica división del género en dos unidades infragenéricas, secciones (WILLKOMM, 1856: 158 y 163) o subgéneros (JANCHEN, 1920: 8). El subgénero *Fumana* (sect. *Eufumana* Willk.) presenta semillas dimórficas, subtrigonas, fina y homogéneamente tuberculadas y embrión diversamente circinado. Por su parte el subgénero *Fumanopsis* (Pomel) Janchen (sect. *Helianthemoides* Willk.) se caracteriza por tener semillas isomórficas, trigonas, retículo-tuberculadas, con tubérculos heteromórficos, y embrión hamuloso.

Aunque tradicionalmente el número de semillas producidas en cada cápsula ha sido utilizado también para la diferenciación de las unidades infragenéricas, atribuyéndose doce semillas a las especies del subgénero *Fumana* y seis a las de *Fumanopsis* (WILLKOMM, *loc. cit.*; JANCHEN, 1925: 311; GUINEA, 1954: 162), el valor de este carácter ha de ser reconsiderado. No hemos podido observar, salvo esporádicamente, doce semillas en los frutos de los táxones del subgénero *Fumana*, siendo casi constantemente menor el número como ya indicaron (LAÍNIZ (1964: 21) y COODE & DAVIS (1964: 33), con frecuencia nueve, pero pudiendo oscilar de seis a doce. Además en el subgénero *Fumanopsis*, aunque en los táxones estudiados han aparecido constantemente seis semillas en cada cápsula, se incluyen también táxones que sólo presentan tres semillas, tales como *F. aciphylla* Boiss., *F. oligosperma* Boiss. & Kotschy y *F. trisperma* Hub.-Mor. & Reese (COODE & DAVIS, *loc. cit.*).

Así pues, hemos podido comprobar que los caracteres seminales (número de semillas por cápsula y forma del embrión) atribuidos a *F. paradoxa* por su autor (HEYWOOD, 1954: 174), y que sirvieron para cuestionar la existencia de los subgéneros (GUINEA, *op. cit.*: 161; HEYWOOD, *op. cit.*: 176), entran dentro de la varia-

bilidad de estos caracteres en otros táxones del subgénero *Fumana*, por lo que coincidimos con COODE & DAVIS (*loc. cit.*) en no considerar rota la división infragenérica de *Fumana* por el hallazgo de *F. paradoxa*.

Por último el tamaño se ha mostrado bastante homogéneo entre los táxones de un mismo subgénero (Fig. 1). En *Fumanopsis* cabe destacar el tamaño significativamente mayor de las semillas de *F. hispidula* respecto a las de *F. thymifolia* s. l., ya observado por MOLERO & ROVIRA (1987: 507), confirmándose la separación taxonómica de estas dos especies habitualmente agrupadas. Por su parte en el subgénero *Fumana* destaca el tamaño de las semillas de *F. procumbens* y *F. fontanesii*, con valores significativamente mayores que los de otros táxones.

#### CONCLUSIONES

Se han observado dos tipos fundamentales de semillas, definidas por los caracteres morfológicos, la ornamentación y la forma del embrión. La estructura anatómica de la testa es semejante en ambos tipos.

La agrupación de las especies, que resulta de la consideración de los caracteres de forma y ornamentación de las semillas, así como disposición del embrión en las mismas, se corresponde con la clásica división del género en dos unidades infragenéricas.

Es muy raro encontrar doce semillas en las cápsulas de las especies del subgénero *Fumana*, siendo habitualmente nueve el número de ellas presentes.

El tamaño resulta un buen carácter para la discriminación de *F. thymifolia* subsp. *laevis* y *F. hispidula*, táxones morfológicamente muy semejantes. También permite la discriminación de *F. ericoides* subsp. *montana* y *F. procumbens*, táxones en ocasiones confundidos.

No hemos encontrado caracteres en las semillas que permitan la discriminación de otros táxones próximos.

#### BIBLIOGRAFIA

BOISSIER, E.

1867 *Fumana* (Dunal) Spach. In: *Flora Orientalis* 1: 447-450. Basilea.

COODE, M. J. E. & P. H. DAVIS

1964 A neglected mediterranean *Fumana*. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 26: 27-34.

- ESAU, K.  
1966 Anatomy of seed plants. New York.
- GARD, M.  
1908 Sur la graine des *Cistus*. *J. Bot. (Morot)*, ser. 2, 1: 34-39.  
1912 Recherches sur les hybrides artificiels de Cistes. *Beih. Bot. Centr.* 29: 306-394.
- GAUME, R.  
1912 Germination, développement et structure anatomique de quelques Cistinées. *Rev. Gén. Bot.* 24: 273-295.
- GRENIER, J. C. M. & D. A. GODRON  
1847 *Cistaceae*. In: *Flore de France* 1: 159-175. Paris.
- GROSSER, W.  
1903 *Cistaceae*. in: A. ENGLER (Ed.). *Das Pflanzenr.* 14: 1-161.
- GUINEA, E.  
1954 *Fumana* (Dunal) Spach. In: Cistáceas españolas (con excepción del género *Cistus*). *Bol. Inst. For. Inv. Exper. Madrid* 71: 161-184.
- HEYWOOD, V. H.  
1954 *Fumana paradoxa* Heywood. In: E. GUINEA. Cistáceas españolas (con excepción del género *Cistus*). *Bol. Inst. For. Inv. Exper. Madrid* 71: 174-176.  
1968 *Fumana* (Dunal) Spach. In: T. G. TUTIN & al. (Eds.). *Flora Europaea* 2: 291-292. Cambridge.
- JANCHEN, E.  
1920 Die systematische Gliederung der Gattung *Fumana*. *Österr. Bot. Z.* 69: 1-30.  
1925 *Cistaceae*. In: H. G. A. ENGLER & K. A. E. PRANTL (Eds.). *Nat. Pflanzenfam.*, 2ª Ed. 21. Leipzig.
- JIMÉNEZ ALBARRÁN, M. J.  
1985 Contribución al estudio de las semillas del género *Halimium* (Dun.) Spach (*Cistaceae*). *Collect. Bot. (Barcelona)* 16: 67-76.
- LAÍNZ, M.  
1963 Aportaciones al conocimiento de la flora Cántabro-Astur, VIII. *Bol. Inst. Estud. Asturianos, Supl. Ci.* 7: 35-81.
- LANGERON, M.  
1949 Précis de Microscopie. Paris.
- MARTÍN, M. & E. GUINEA  
1948 Jarales y jaras. *Bol. Inst. For. Inv. Exper. Madrid* 49.
- MOLERO, J. & A. M. ROVIRA  
1987 Taxonomía del grupo «*Fumana thymifolia*» (*Cistaceae*). *Candollea* 42: 501-531.
- PLUYM, A. & M. HIDEUX  
1977 Application d'une methodologie quantitative a la palynologie d'*Erin-gium maritimum* (*Umbelliferae*). *Pl. Syst. Evol.* 127: 55-85.
- PONZO, A.  
1921 Considerazioni sulle *Cistaceae*. *Nuovo Gior. Bot. Ital., Nov. Ser.* 28: 157-163.



## RAYNAUD, C.

1976 Recherche des caracteres permettant la revision du genre *Helianthemum* Miller dans la section *Bracehyptalum* Dunal. *Nat. Monsp. (Bot.)* 26: 181-210.

1987 *Atlantenum* Raynaud, nouveau genre pour la famille des *Cistaceae*. *Anales Jard. Bot. Madrid* 44 (2): 309-317.

## ROCHE, J.

1906 Anatomie comparée de la feuille des Cistacées. *Trav. Lab. Mat. médic.* 4: 1-108.

## ROUY, G. C. C. &amp; J. FOUCAUD

1895 *Cistaceae*. In: *Flore de France* 2: 255-316. Asnières, Paris & Rochefort.

## SCOTT, F. M.; B. G. BISTROM &amp; E. BOWLER

1962 *Cercidium floridum* seed coat, lighth and electron microscope study. *Amer. J. Bot.* 49: 421-450.

## SPACH, E.

1836a Organographie des Cistacées. *Ann. Sci. Nat. Sér. 2*, 6: 257-272.

1836b Conspectus monographiae cistacearum. *Ann. Sci. Nat. Sér. 2*, 6: 357-375.

1938 Les Cistacées. *Hist. Nat. Veg. Phaner.* 4: 1-114.

## STEARNS, W. T.

1985 *Botanical latin* (3<sup>a</sup> Ed.). Newton Abbot.

## WILLKOMM, H. M.

1856 *Icones et Descriptiones Plantarum novarum criticarum et rariorum Europae austro-occidentalis praecipue Hispaniae* 2. Lipsiae.

## WOJCIECHOWSKA, B.

1969 Morfologia i anatomia nasion niektórych gatunków *Helianthemum* Mill. *Monogr. Bot. (Warszawa)* 29: 121-131.



ANEXO 1 — Material estudiado

*F. ericoides* (Cav.) Gandoger in Magnier subsp. *ericoides*

ALICANTE: S<sup>a</sup> de Sancho, 5-V-1933. M. Martínez. MA 81661; ALMERIA: Huercal, 9-V-1933. H. Villar. MA 159435; Sorbas, 28-I-1960. MAF 88731; MURCIA: S<sup>a</sup> de Cartagena, 28-I-1942. C. Vicioso. MA 81659; VALENCIA: Torrente, 22-V-1947. C. Vicioso. MA 81669.

*F. ericoides* (Cav.) Gandoger in Magnier subsp. *montana* (Pomel)

J. Güemes & Muñoz Garmendia

BARCELONA: Tibidabo, Junio 1910. Sennen. MA 81682; CASTELLÓN: Lucena del Cid, 11-VI-1933. H. Villar. MA 159440; CUENCA: Las Cabrejas, 10-VII-1969. Rivas Goday. MAF 80977; MURCIA: S<sup>a</sup> de Espuña, 28-VI-1947. C. Vicioso. MA 81582; VALENCIA: Alfarp-Catadau, 19-VIII-1973. D. Sánchez-Mata. MAF 103837.

*F. scoparia* Pomel

ALBACETE: Caudete, 30-V-1984. G. Mateo & R. Figuerola. VAB 84606; ALICANTE: Villena. A. Rigual. MA 368426; CASTELLÓN: Segorbe, Mayo 1936. C. Pau. MAF 8230; CUENCA: Contreras, 15-V-1975. G. López. MA 322264.

*F. paradoxa* Heywood in Guinea

JAEN: S<sup>a</sup> de Cazorla, 7-VII-1988. J. Güemes & M. B. Crespo, VAL 14846.

*F. procumbens* (Dunal) Gren. & Godron

ALICANTE: S<sup>a</sup> de Aitana, Junio 1979. Mansanet & Mateo. VAB; CASTELLÓN: Barracas, 18-V-1985. G. Mateo. VAB 851525; CUENCA: Talayuelas, Junio 1980. G. Mateo. VAB 80200; LEÓN: Mirantes de Luna, 11-VII-1974. M. Ladero. MAF 90575; MADRID: Pinto, 1-VI-1958. Rivas Goday. MAF 22545.

*F. fontanesii* Clauson ex Pomel

MURCIA: S<sup>a</sup> de Espuña, Alhama de Murcia, 15-III-1988. J. Güemes & al. VAL 10835.

*F. thymifolia* (L.) Spach ex Webb subsp. *thymifolia*

ALICANTE: San Miguel de Salinas, 17-IV-1979. Amich, Rico & Sánchez. MA 221601; ALMERIA: Cuevas, 8-V-1933. H. Villar. MA 159455; CÁDIZ: Pto. de Santa María, Abril 1961. J. Borja & H. Villar. MA 159456; VALENCIA: Dos Aguas, 7-VI-1984. J. Güemes. VAL 3699.



*F. thymifolia* (L.) Spach ex Webb subsp. *laevis* (Cav.) J. Molero  
& A. M. Rovira

ALICANTE: Jalón, 22-V-1985. G. Mateo & R. Figuerola. VAB; Polop, 11-VII-1933. M. Martínez. MA 81841; VALENCIA: Barranc de Fontanars, 26-IV-1985, J. R. Nebot. VAB 852185; Játiva, 19-VI-1985. J. Güemes. VAL 3005.

*F. hispidula* Loscos & Pardo ex Willk.

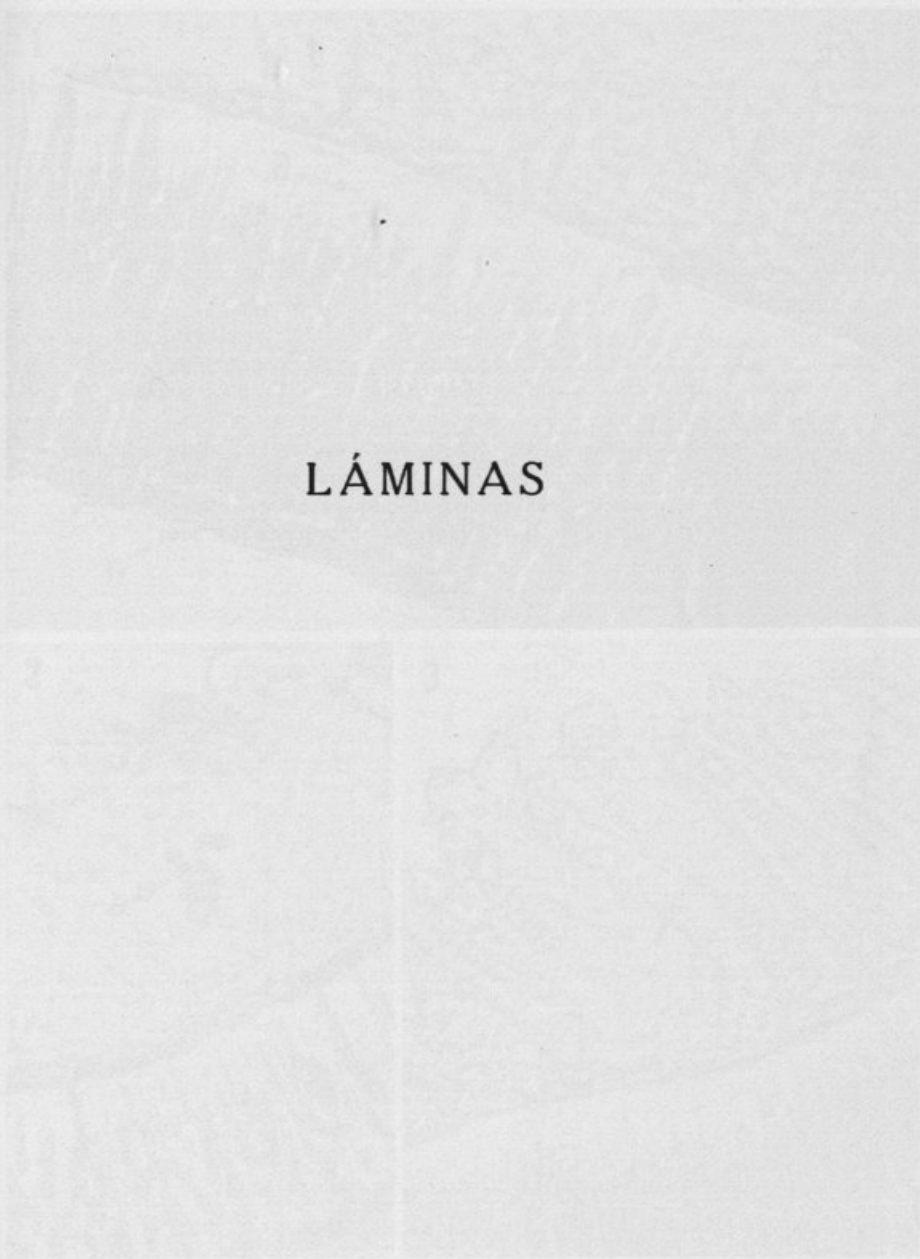
ALBACETE: Alborea, Octubre 1981. Mansanet, Currás & Mateo. VAB; MURCIA: S<sup>a</sup> de Espuña, 8-VII-1929. Sennen & Gonzalo. MA 81838; VALENCIA: Dehesa de la Albufera, 25-V-1946. C. Vicioso. MA 81823; Venta del Moro, Octubre 1980. Mansanet & Mateo. VAB 80198; Domeño, 15-IV-1984. J. Güemes. VAL 3069.

*F. laevipes* (L.) Spach

ALMERIA: Aguadulce, Abril 1957. Losa. MAF 88733; S<sup>a</sup> Ohanes, 16-IV-81615; MURCIA: Cabo de Palos, 20-III-1970. Rivas Goday & Ladero. MAF 75305.

PORTUGAL: Quarteira, 23-IV-1968. J. Borja. MAF 76894.





# LÁMINAS

*F. thymifolia* (L.) Spach ex Webb subsp. *serotia* (Cav.) J. Molero & A. M. Rojas.

ALICANTE: JARD. 27-V-1955, G. Miro & R. Paredes. VAR. *Polyp.* 21-VII-1955, M. Martínez. MA. 2181. VALENCIA: Jardines de Fontanera. 26-IV-1955, J. R. Nebot. VAR. *Siliq.* 18-VI-1953, J. Gómez. VAL. 2005.

*F. hispidula* Loew & Pardo ex Turk.

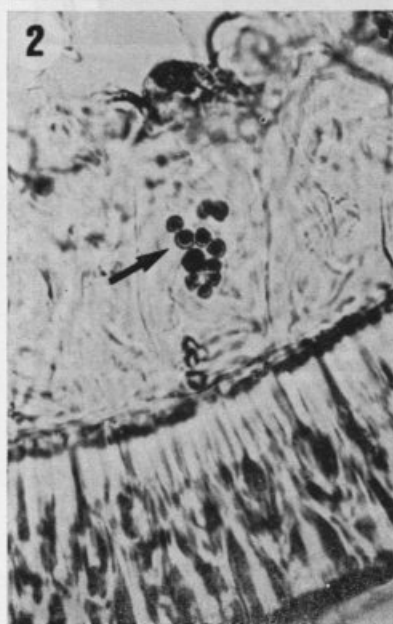
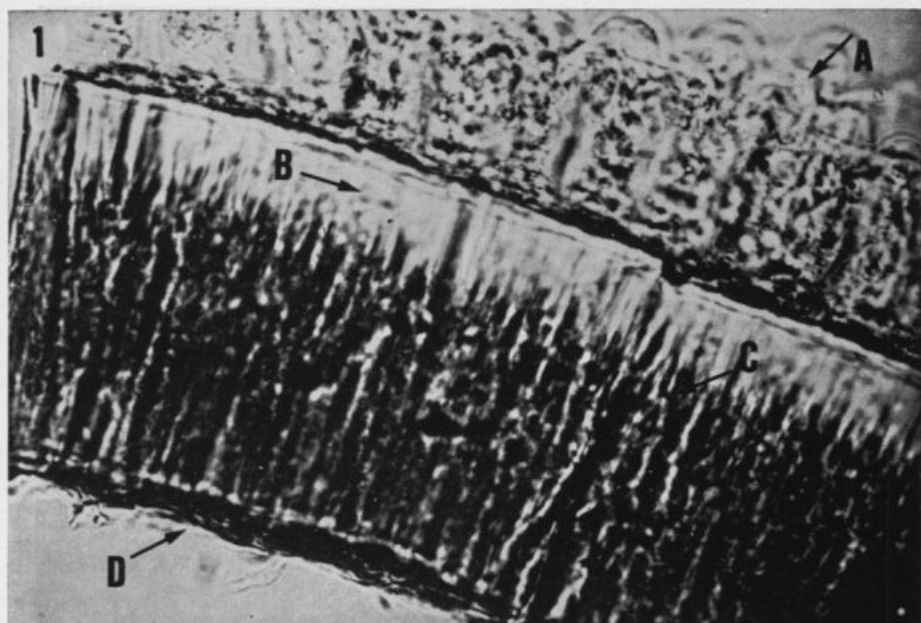
ALBACETE: Alameda, Octubre 1954, M. Martínez. CUBA & MATEO. VAR. MURCIA: St. de España. 3-VII-1954, Sordani & Gómez. MA. 2182. VALENCIA: Odeón de B. Albufera. 23-V-1955, C. Utrilla. MA. 2183. Jard. del Mar. Octubre 1950, M. Martínez & Mateo. VAR. *Siliq.* 15-IV-1954, J. Gómez. VAL. 2006.

#### LÁMINA I

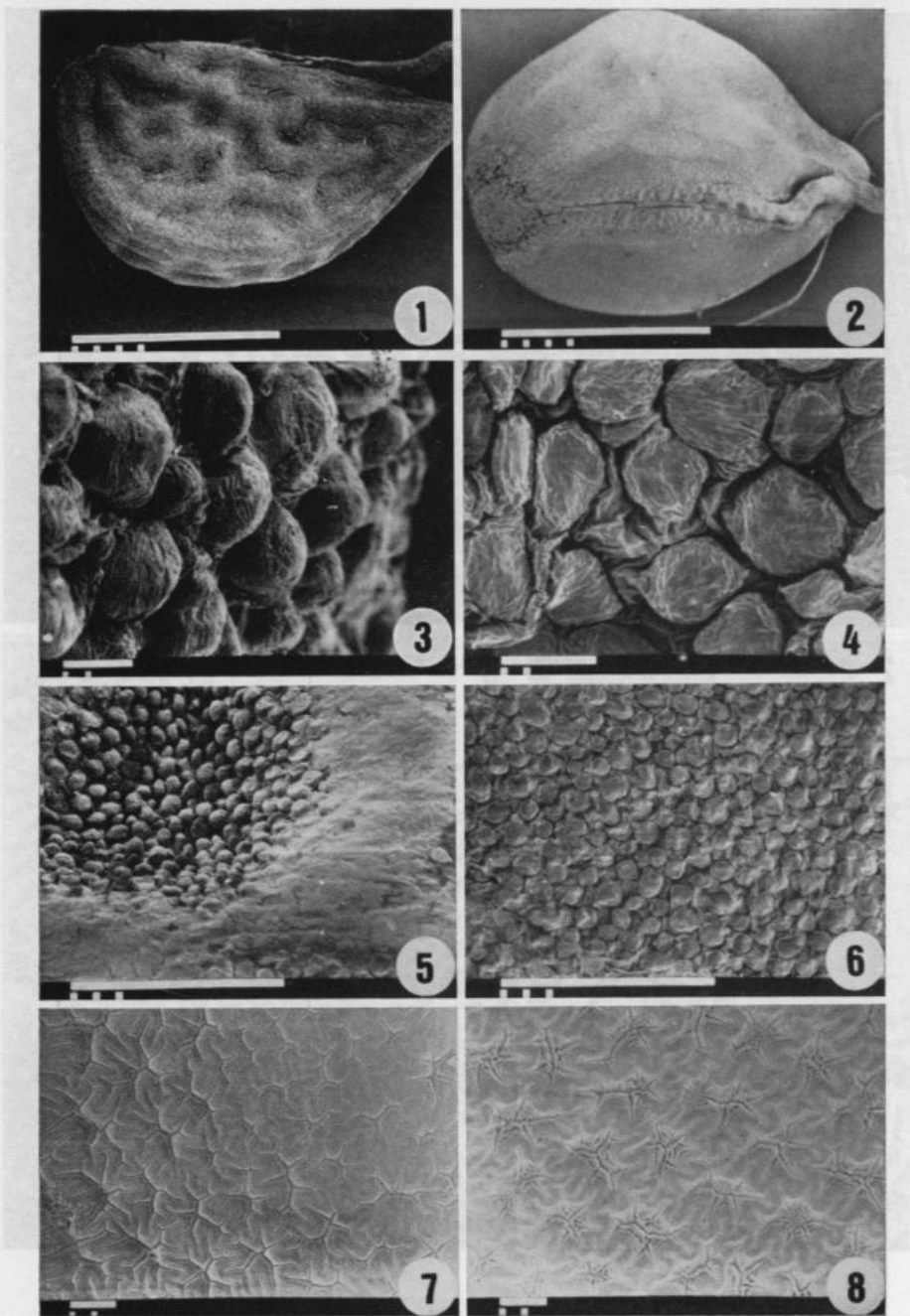
*F. leucostachya* (L.) Spach.

1. — *F. procumbens*: A. — Capa epidérmica; B. — Línea lúcida; C. — Capa malpighiana; D. — Capa pigmentaria ( $\times 500$ ).
2. — *F. hispidula*: Gránulos de almidón ( $\times 600$ ).
3. — *F. thymifolia*: Capa epidérmica hidratada ( $\times 300$ ).

PORTUGAL: Quinta de S. João. 1954, J. Gómez. VAL. 2007.







# ULTRASTRUCTURE AND DEVELOPMENT OF POLLEN WALL IN *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

ARISTO SOTO DE SALAZAR

## LÁMINA II

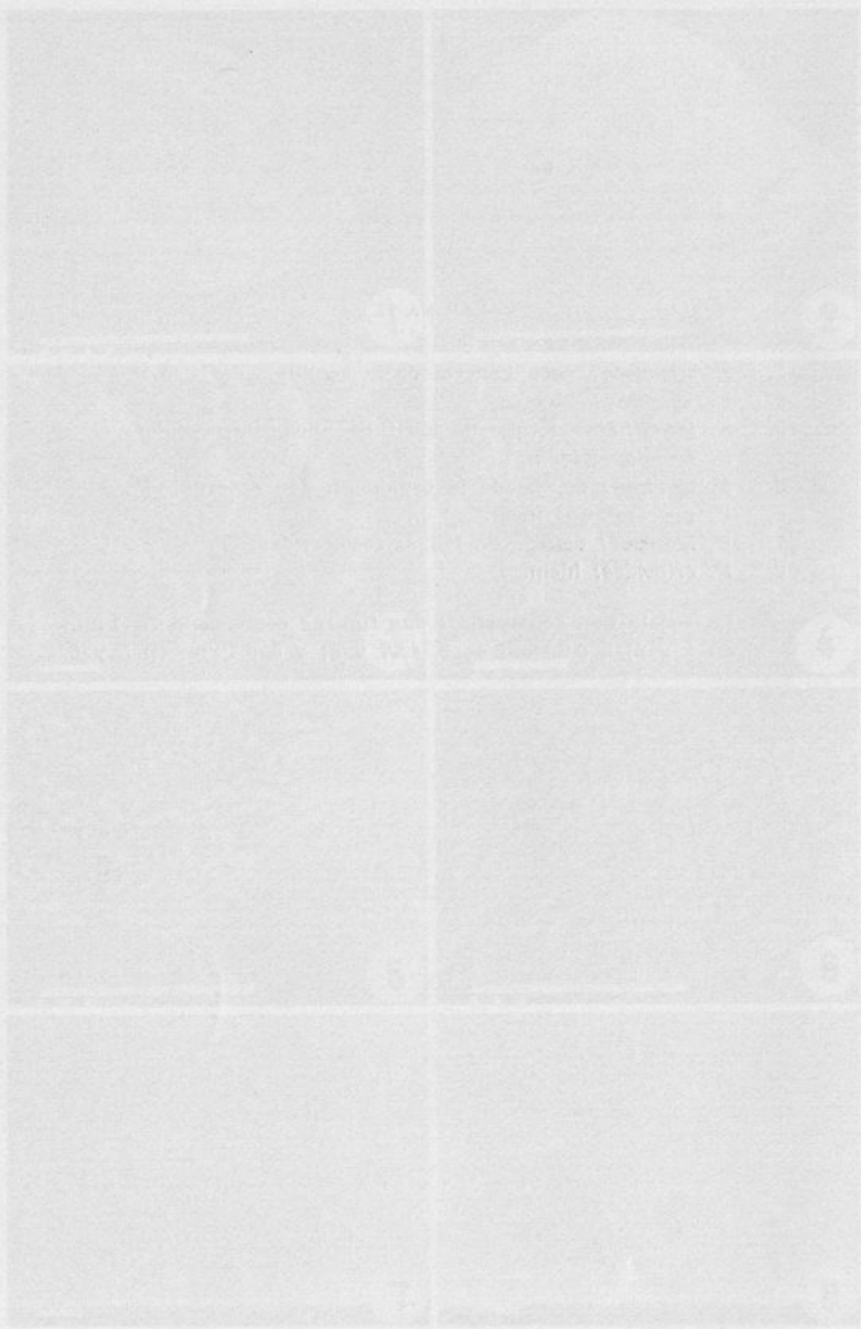
- 1.— *F. hispidula*: vista general de la semilla.
- 2.— *F. scoparia*: idem.
- 3.— *F. thymifolia*: detalle de los tubérculos superficiales.
- 4.— *F. ericoides*: idem.
- 5.— *F. laevipes*: detalle de la ornamentación externa.
- 6.— *F. procumbens*: idem.
- 7.— *F. laevipes*: detalle de las astrosclereidas.
- 8.— *F. ericoides*: idem.

La escala que acompaña a las figuras corresponde a 1 mm en 1 y 2; a 0.01 mm en 3, 4, 7 y 8; y a 0.1 mm en 5 y 6.

### INTRODUCTION

THE wall of pollen grains of flowering plants is one of the most complex and elaborate among plant cell walls.

Pollen grains of *Cucurbita polymorpha* display interesting characteristics. They are spheroidal in shape, with a diameter of 130-170  $\mu$ m. The wall is composed of two fundamental layers: the cuticular lining covered by an elaborate exine. This sporopollenine layer consists of two different strata: a continuous



[we]

## ULTRASTRUCTURE AND DEVELOPMENT OF POLLEN WALL IN *CUCURBITA POLYMORPHA* DUCH.

ARLETE SANTOS & R. SALEMA

Experimental Cytology Centre and Institute of Botany  
University of Porto — Portugal

Recebido em 12-IV-1990.

### SUMMARY

The development of pollen wall in *Cucurbita polymorpha* Duch. was initiated during the tetrad stage by the deposition of a fibrous primexine between callose wall and plasmalemma. Electron dense material of sporopolleninic nature was deposited within primexine, constituting the probacula, which became held together at their bases by a basal layer or nexine 1, except at apertural areas where this layer was interrupted. Sporopollenin deposition was associated with lamellae of unit membrane dimensions. After release of the tetrads, the microspores rounded up and enlarged. At this time, a granular sporopolleninic layer (nexine 2) was laid down outside the plasmalemma and osmiophilic granules could be seen at this layer and within cytoplasm near plasma membrane. Wall ontogeny was completed by the deposition of intine; the participation of dictyosomes derived vesicles in intine formation is proposed. At maturity, wall layers increased in thickness and complexity. Probacula have also evolved to spines of different size and shape, constituting the sexine layer.

### INTRODUCTION

THE wall of pollen grains of flowering plants is one of the most complex and elaborate among plant cell walls.

Pollen grains of *Cucurbita polymorpha* display interesting characteristics. They are spheroidal in shape, with a diameter of 150-170  $\mu\text{m}$ . The wall is composed of two fundamental layers: the cellulosic intine covered by an elaborate exine. This sporopolleninic layer consists of two different strata: a continuous

and homogeneous nexine outside the cytoplasm and over it a spined sexine (SANTOS *et al.*, 1984; SANTOS & SALEMA, 1989).

Numerous investigations, both at light as well as at electron microscope levels, concerning the various features of pollen wall ontogeny have been reported. In spite of some divergences in interpretation, it has been conclusively established that the initiation and the patterning of pollen wall takes place when the young microspores are contained within the tetrad (HESLOP-HARRISON, 1968*a*, 1971*a, b*; GODWIN, 1968; DICKINSON, 1976; SHELDON & DICKINSON, 1983; DICKINSON & SHELDON, 1986).

In *Cucurbita polymorpha* anthers, pollen wall formation also begins at the tetrad stage. This study reports on pollen wall ontogeny of this Cucurbitaceae species. To further corroborate and clarify pollen wall development, ultrastructural study has been approached by histochemical methods (SANTOS & SALEMA, 1988) which provided new data and deeper insight into the subject.

#### MATERIAL AND METHODS

Anthers of *Cucurbita polymorpha* Duch. at various developmental stages were processed for transmission electron microscopy as described elsewhere (SANTOS *et al.*, 1979). Fixation in 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer pH 7.2, was followed by post-fixation in 1% osmium tetroxide in the same buffer. After rinsing, the materials were dehydrated in an acetone series and embedded in Epon 812. Ultrathin sections routinely made with a LKB Ultratome III and collected on uncoated grids, were stained with uranyl acetate followed by lead citrate and observed in a Siemens Elmiskop IA electron microscope.

#### RESULTS

During meiosis, pollen mother cells of *Cucurbita polymorpha* became progressively surrounded by a thick callose wall that at the end of this process of nuclear division also surrounded the four microspores.

At this developmental stage began the deposition of the pollen grain wall, laid down between plasmalemma and callose wall. The early development of sporoderm was defined by the apposition of endoplasmic reticulum, just beneath the plasmalemma (Pl. I, fig. 1). Soon after, the plasmalemma became convoluted



and detached from the callose wall, a process which was less pronounced at the places of endoplasmic reticulum apposition (Pl. I, fig. 2). At the same time that fibrillar primexine appeared (Pl. I, fig. 3), numerous small vesicles, containing somewhat electron dense material similar to those associated with the large number of dictyosomes, spread out through the cytoplasm (Pl. I, fig. 4). It was possible to observe some of them located outside the plasmalemma, in contact with primexine (Pl. I, fig. 5).

The first elements of sporopolleninic nature with rod like aspect were deposited within the primexine, extending from the plasmalemma out to the callose wall (Pl. II, fig. 1). At this stage it was already possible to distinguish two types of probacula, that will become the spines of the exine.

At the late tetrad stage, flattened protusions of the plasmalemma could be distinguished (Pl. II, fig. 2) and electron dense material, similar to that of the probacula, was laid down at the plasma membrane site (Pl. II, fig. 3). The formation of this lamellae, white lines or tapes has been initially described by ROWLEY & SOUTHWORTH (1967) and by DICKINSON & HESLOP-HARRISON (1968) and represents the sites where sporopollenin precursors condense and polymerise. The deposition of this dense material at the plasmalemma initiated the deposition of the basal layer (nexine 1) that holded together the bases of the probacula and originated a new continuous layer around microspores.

At certain places it was observed pronounced outpocketings of the plasmalemma which presaged the future apertures of the pollen wall (Pl. II, fig. 4). Curiously enough primexine also appeared at this region; nexine 1 was interrupted at this place but bacula similar to those found in non-apertural regions were also present here.

After dissolution of callose wall, the microspores rounded up and enlarged. Nexine 1 greatly thickened and a new sporopolleninic layer (nexine 2) was deposited between plasmalemma and nexine 1 (Pl. III, fig. 1). At nexine 2, which filled the aperture regions, numerous white lines were observed in continuity with nexine 1 (Pl. III, fig. 2). At a higher magnification (Pl. III, fig. 2, inset) it could be seen that these lamellae were 100-400 nm long, with a central area of low electron density (5-8 nm thick) surrounded by two electron dense areas (15-30 nm thick).

During this stage of sporoderm thickening, osmiophilic granules exhibiting an electron density similar to sporopollenin, were deposited throughout nexine 2 and between plasmalemma and nexine 2 and also within the cytoplasm near plasma membrane (Pl. III, figs. 3, 4).

Intine deposition followed (Pl. IV, fig. 1). Extensive penetration of the intine by tubular evaginations of the plasmalemma was evident, particularly in the thickened intine associated with apertures (Pl. IV, fig. 2). Dictyosomes were very active during intine formation and vesicles derived from them could be seen near the cell surface probably fusing with plasma membrane (Pl. IV, fig. 1).

At maturity (Pl. IV, fig. 3), the spines have also evolved. They displayed two very distinct types, differing in shape but more distinctly in size. The larger, less numerous, had a conical shape and were surrounded by others, more numerous, rod like with rounded tip. They constituted the sexine covering nexine layers.

#### DISCUSSION

As in other Angiosperms, pollen wall formation in *Cucurbita polymorpha* results from the important contribution of both gametophytic and sporophytic cells of the anther during microsporogenesis.

The development of sporoderm is initiated when the four microspores, resulting from the meiotic division of pollen mother cells, are still surrounded by the special callose wall. It has been suggested that pollen wall is not initiated before callose deposition and that it represents the pattern for exine (GODWIN, 1968; ECHLIN & GODWIN, 1968; WATERKEYN & BIENFAIT, 1968, 1970). This relationship has also been described for other Gymnospermae (WILLEMSE, 1971) and Angiospermae (MEPHAM & LANE, 1970; MEPHAM, 1970; HORNER & LERSTERN, 1971; WILLEMSE, 1972; DUNBAR, 1973a). In *Pergularia daemia* (VIJAYARAGHAVAN & SHUKLA, 1977) rudimentary exine has been attributed to the absence of callose wall although at *Heliconia* (STONE *et al.*, 1979) it was described a poor development of exine but the special callose wall is prominent.

In *Cucurbita*, pollen wall is initiated in the tetrad stage but before the deposition of primexine, elements of rough endoplasmic

reticulum have been addressed to the plasma membrane, situation which has been related to the initiation of pore placement (HESLOP-HARRISON, 1963; SKVARLA & LARSON, 1966; ECHLIN & GODWIN, 1968; GODWIN, 1968; DICKINSON, 1970; CHRISTENSEN & HORNER, 1974; HORNER & PEARSON, 1978; NABLI, 1979; RODRÍGUEZ-GARCIA *et al.*, 1982; EL-GHAZALY & JENSEN, 1986b). There is evidence that the apposition of endoplasmic reticulum cisternae to the plasma membrane blocks the secretion of the primexine matrix in those special areas. However, in *Cucurbita polymorpha*, this layer is continuous over the grain, situation also observed at *Nelumbo nucifera* Gaertner (FLYNN & ROWLEY, 1971), *Campanula rapunculoides* (DUNBAR, 1973b), *Ulmus* (ROWLEY & ROWLEY, 1986) and *Poinciana* (SKVARLA & ROWLEY, 1987). Surprisingly, at *Epilobium angustifolium* (ROWLEY, 1975 1976) primexine was thicker at aperture regions, but at *Ipomoea* (GODWIN *et al.*, 1967) and *Triticum aestivum* (EL-GHAZALY & JENSEN, 1986b) was thinner than on the rest of the microspore surface.

In *Cucurbita polymorpha* as in other species (ECHLIN & GODWIN, 1969; WILLEMSE, 1971; ROLAND-HEYDACKER, 1979; AUDRAN, 1981) dictyosomes have been involved in the deposition of the cellulosic material of the primexine, where the first sporopolleninic elements are laid down.

Histochemical tests performed during pollen wall ontogeny (SANTOS & SALEMA, 1988) revealed that neutral polysaccharides have been detected at the plasma membrane and the primexine but not found at callose and probacula which incidently stain positively for acidic polysaccharides. These results are in good agreement with those reported at *Soja hispida* Moench. by MADJD & ROLAND-HEYDACKER (1987). Similar histochemical results in *Triticum aestivum* (EL-GHAZALY & JENSEN, 1987), showed that stainability of the callose wall is not homogeneous referring that it stains for both acidic and neutral polysaccharides.

In this Cucurbitaceae species it was not possible to relate the formation of sporopolleninic probacula with any cytoplasmic organelles but the deposition of nexine 1 occurs on flattened vesicles, originated by the plasmalemma. The formation of these lamella also referred as «tapes» or «white lines» has been considered a ubiquitous form of sporopollenin deposition, in Angiosperms and Gymnosperms and also in Algae, Briophyta and Pteridophyta spores. Their origin has been attributed to various

cytoplasmic organelles but in some, plasmalemma has been referred (ROHR, 1977; EL-GHAZALY, 1982; GUÉDÈS, 1982; EL-GHAZALY & JENSEN, 1986a).

After the dissolution of callose wall, it was observed a large increase of sexine and nexine 1 and the deposition, between plasmalemma and nexine 1, of a new layer — nexine 2. This ontogenic process takes place around the spore cytoplasm, at apertural and non-apertural regions, and it was possible that exine components undergo chemical modifications as suggested by the changes of staining characteristics (SANTOS & SALEMA, 1988).

Finally, before the onset of pollen mitosis, intine development begins as a cellulosic layer surrounding the haploid cell. The participation of vesicles derived from dictyosomes in intine formation has been observed here and is a known process in other species (ECHLIN & GODWIN, 1969; MEPHAM & LANE, 1970; DUNBAR, 1973a; HESLOP-HARRISON, 1968b, 1975; ROLAND-HEYDACKER, 1979; STONE *et al.*, 1979; WILLEMSE & REZNICKOVA, 1980; SANGWAN & CAMEFORT, 1982). It is worth to mention the protein nature of the intine revealed by histochemical methods (SANTOS & SALEMA, 1988). Indeed, it is well documented the presence of various proteins in this wall layer, namely enzymes responsible for pollen germination and stigma penetration (KNOX & HESLOP-HARRISON, 1969, 1970, 1971; KNOX *et al.*, 1975; HESLOP-HARRISON *et al.*, 1973; VITHANAGE & KNOX, 1976, 1979, 1980; NAKAMURA, 1979; HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1980).

The results obtained during pollen wall ontogeny in *Cucurbita polymorpha* point that primexine produced by the microspore cytoplasm determines the pattern to the sexine (spines) as well as to the initial deposition of nexine 1 as they are laid down during tetrad period, assuming that callose wall is impermeable to sporopollenin precursors derived from tapetum. Sporopollenin accumulation associated with the growth of these layers, after microspore release, may be predominantly a process of incorporation of precursors from tapetal cells. Sporophytic cells may also participate in the formation of nexine 2 but the presence of osmiophilic granules, with similar sporopollenin electron density, at microspore cytoplasm and over plasma membrane also suggest the contribution of haploid microspore to the formation of this wall layer.



It is very reasonable to admit the concurrent work of both gametophytic and sporophytic generations in the formation of pollen wall, situation already proposed for both Angiospermae and Gymnospermae anthers (HESLOP-HARRISON & DICKINSON, 1969; DICKINSON & BELL, 1972; DICKINSON, 1976; ROHR, 1977; CERCEAU-LARRIVAL *et al.*, 1980-1981; HIDEUX & ABADIE, 1980-1981). This relationship between the tapetum and the pollen grains has been confirmed by the results obtained from various studies concerning tapetum disfunctioning caused by genetic, parasitic, chemical and physical factors as reviewed by ALBERTINI *et al.*, 1987.

Nevertheless, the interactions between sporophytic and gametophytic cells need to be deeply researched. Although some recent works points to the presence of phenolic compounds at sporopollenin (HERMINGHAUS *et al.*, 1987; SCHULZE OSTHOFF & WIERMANN, 1987; RITTSCHER & WIERMANN, 1988) it is widely accepted that this biopolymer derives from carotenoids and carotenoid esters (BROOKS & SHAW, 1968, 1977, 1978). In this context, it is relevant the utilization of radioactive precursors for sporopollenin carotenoids. It would be also useful the isolation of tapetal cells as well as the *in vitro* anther culture, to study metabolic pathways of sporopollenin synthesis during pollen embryogenesis.

## BIBLIOGRAPHY

- ALBERTINI, L.; SOUVRE, A. & AUDRAN, J. C.  
 1987 Le tapis de l'anthere et ses relations avec les microsporocytes et les grains de pollen. *Rev. Cytol. Biol. Végét.-Bot.* 10: 211-242.
- AUDRAN, J.-C.  
 1981 Pollen and tapetum development in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaeae): sporal origin of the exinic sporopollenin in Cycads. *Rev. Paleobotany and Palynology* 33: 315-346.
- BROOKS, J. & SHAW, G.  
 1968 Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature. *Nature* 219: 532-533.  
 1977 Recent advances in the chemistry and geochemistry of pollen and spore walls. *Trans. Bose Res. Inst.* 40: 19-38.  
 1978 Sporopollenin: a review of its chemistry, paleochemistry and geochemistry. *Grana* 17: 91-97.
- CERCEAU-LARRIVAL, M.-T.; ABADIE, M.; ALBERTINI, L.; AUDRAN, J.-C.; CORNU, A.; COUSIN, M.-T.; DAN DICKO-ZAFIMAHOVA, L.; DUC, G.; FERGUSON, I. K.; HIDEUX, M.; NILSSON, S.; ROLAND-HEYDACKER, F. & SOUVRE, A.  
 1980-81 Relations sporophyte — gametophyte: assise tapétale — pollen. *Ann. Sci. Naturelles, Bot., 3<sup>e</sup> Série*, 2/3: 69-92.



- CHRISTENSEN, J. E. & HORNER, H. T. JR.  
1974 Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor*. *Amer. J. Bot.*, **61**: 604-625.
- DICKINSON, H. G.  
1970 Ultrastructural aspects of primexine formation in the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*. *Cytobiologie* **1**: 437-499.  
1976 Common factors in exine deposition. In *The evolutionary significance of the exine*, pp. 67-89. Ed. by I. K. Ferguson & J. Muller. Academic Press, London.
- DICKINSON, H. G. & BELL, P. R.  
1972 The role of tapetum in the formation of sporopollenin structures during microsporogenesis in *Pinus banksiana*. *Planta* **107**: 205-215.
- DICKINSON, H. G. & HESLOP-HARRISON, J.  
1968 Common mode of deposition for the sporopollenin of sexine and nexine. *Nature* **207**: 926-927.
- DICKINSON, H. G. & SHELDON, J. M.  
1986 The generation of patterning at the plasma membrane of the young microspore of *Lilium*. In *Pollen and Spores: Form and Function*, pp. 1-17. Ed. by S. Blackmore & I. K. Ferguson. Academic Press, London.
- DUNBAR, A.  
1973a Pollen development in the *Eleocharis palustris* Group (Cyperaceae). I. Ultrastructure and ontogeny. *Bot. Notiser* **126**: 197-254.  
1973b Pollen ontogeny in some species of Campanulaceae. A study by electron microscopy. *Bot. Notiser* **126**: 277-315.
- ECHLIN, P. & GODWIN, H.  
1968 The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus*. II. Pollen grain development through the callose special wall stage. *J. Cell Sci.* **3**: 175-186.  
1969 The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus*. III. The formation of the pollen grain wall. *J. Cell Sci.* **5**: 459-477.
- EL-GHAZALY, G.  
1982 Ontogeny of pollen wall of *Leontodon autumnalis* (Hypochoeridinae, Compositae). *Grana* **21**: 103-113.
- EL-GHAZALY, G. & JENSEN, W. A.  
1986a Studies of the development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen. I. Formation of the pollen wall and Ubisch bodies. *Grana* **25**: 1-29.  
1986b Studies of the development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen: formation of the pollen aperture. *Can. J. Bot.* **64**: 3141-3154.  
1987 Development of wheat (*Triticum aestivum*) pollen. II. Histochemical differentiation of wall and Ubisch bodies development. *Amer. J. Bot.* **74**: 1396-1418.
- FLYNN, J. J. & ROWLEY, J. R.  
1971 The primexine of *Nelumbo nucifera*. *Experientia* **27**: 227-228.
- GODWIN, H.  
1968 The origin of the exine. *New Phytol.* **67**: 667-676.

- GODWIN, H.; ECHLIN, P. & CHAPMAN, B.  
1967 The development of the pollen grain wall in *Ipomoea purpurea* (L.)  
*Rot. Rev. Palaeob. Palynol.* 3: 181-195.
- GUEDES, M.  
1982 Exine stratification, ectexine structure and angiosperm evolution.  
*Grana* 21: 161-170.
- HERMINGHAUS, S.; GUBATZ, S.; ARENDT, S. & WIERMANN, R.  
1987 The occurrence of phenols as degradation products of natural sporopollenin — a comparison with «synthetic sporopollenin». *Z. Naturforsch.* 43c: 491-500.
- HESLOP-HARRISON, J.  
1963 An ultrastructural study of pollen grain wall ontogeny in *Silene pendula*. *Grana* 4: 7-24.  
1968a Wall development within the microspore tetrad of *Lilium longiflorum*.  
*Can. J. Bot.* 46: 1185-1192.  
1968b Some fine structural features of intine growth in the young microspore of *Lilium henryi*. *Portugalia Acta Biologica, Sér. A* 10: 235-246.  
1971a *Pollen: Development and Physiology*. Butterworths, London.  
1971b Wall pattern formation in Angiosperm microsporogenesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 25: 277-300.  
1975 The physiology of the pollen grain surface. *Proc. R. Soc. Lond.* 190: 275-299.
- HESLOP-HARRISON, J. & DICKINSON, H. G.  
1969 Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in *Lilium*. *Planta* 84: 199-214.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y.  
1980 Cytochemistry and function of the Zwischenkorper in grass pollen.  
*Pollen et Spores* 22: 5-10.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; KNOX, R. B. & HOWLETT, B.  
1973 Pollen wall proteins: «gametophytic» and «sporophytic» fractions in the pollen walls of the Malvaceae. *Ann. Bot.* 37: 403-412.
- HIDEUX, M. & AÉADIE, M.  
1980-1981 The anther of *Saxifraga cymbalaria* L. sp. *huetiana* (Boiss.) Engl. and Irmsh.: a study by electron microscopy (SEM and TEM). 3 — Dynamics of the relationships between tapetal and sporal cells. *Ann. Sci. Naturelles, Bot., 13<sup>e</sup> Série* 2/3: 27-37.
- HORNER, H. T. JR. & LERSTEN, N. R.  
1971 Microsporogenesis in *Citrus limon* (Rutaceae). *Amer. J. Bot.* 58: 72-79.
- HORNER, H. T. JR. & PEARSON, C. B.  
1978 Pollen wall and aperture development in *Helianthus annuus* (Compositae: Heliantheae). *Amer. J. Bot.* 65: 293-309.
- KNOX, R. B. & HESLOP-HARRISON, J.  
1969 Cytochemical localization of enzymes in the wall of the pollen grain. *Nature* 223: 92-94.  
1970 Pollen wall proteins: localization and enzymic activity. *J. Cell. Sci.* 6: 1-27.

- 1971 Pollen wall proteins: electron microscopic localization of acid phosphatase in the intine of *Crocus vernus*. *J. Cell Sci* **8**: 627-733.
- KNOX, R. B.; HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y.
- 1975 Pollen wall proteins: localization and characterization of gametophytic and sporophytic fractions. In *The biology of the male gamete*, pp. 177-187. Ed. J. G. Duckett & P. A. Racey.
- MADJD, A. & ROLAND-HEYDACKER, F.
- 1987 Evolution de la paroi spéciale au cours de la microsporogénèse du *Soja hispida* (Papilionaceae). *Grana* **26**: 213-221.
- MEPHAM, R. H.
- 1970 Development of the pollen grain wall: further work with *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* **71**: 39-54.
- MEPHAM, R. H. & LANE, G. R.
- 1970 Observations on the fine structure of developing microspores of *Tradescantia bracteata*. *Protoplasma* **70**: 1-20.
- NABLI, M. A.
- 1979 Différents aspects de l'ontogénèse de l'exine chez quelques Angiospermes. *Ann. Sci. Naturelles, Bot., 13<sup>e</sup> Série* **1**: 192-149.
- NAKAMURA, S.
- 1979 Development of the pollen wall in *Lilium longiflorum*. *J. Electron Microsc.* **28**: 275-284.
- RITTSCHER, M. & WIERMANN, R.
- 1988 Studies on sporopollenin in *Tulipa* anthers. II. Incorporation of precursors and degradation of the radiolabeled polymer. *Sex Plant Reprod.* **1**: 132-139.
- RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. L.; RISUENO, M. C. & SÁNCHEZ-PINA, M. A.
- 1982 Estructura y formación de la exina en el grano de polen de Liliaceas. *Actas del IV Simposio de Palinología* pp. 141-148. Barcelona, España.
- ROHR, R.
- 1977 Étude comparée de la formation de l'exine au cours de la microsporogénèse chez une Gymnosperme (*Taxus baccata*) et une Préphanérogame (*Ginkgo biloba*). *Cytologia* **42**: 157-167.
- ROLAND-HEYDACKER, F.
- 1979 Aspects ultrastructuraux de l'ontogénèse du pollen et du tapis chez *Mahonia aquifolium* Nutt. Berberidaceae. *Pollen et Spores* **21**: 259-278.
- ROWLEY, J. R.
- 1975 Germinal aperture formation in pollen. *Taxon* **24**: 17-25.
- 1976 Dynamic changes in pollen wall morphology. In *The evolutionary significance of the exine*, pp. 39-65. Ed. by I. K. Ferguson & J. Muller. Academic Press, London.
- ROWLEY, J. R. & ROWLEY, J. S.
- 1986 Ontogenic development of microspores of *Ulmus* (Ulmaceae). In *Pollen et Spores: Form and Function*, pp. 19-33. Ed. by Linnean Society of London.
- ROWLEY, J. R. & SOUTHWORTH, D.
- 1967 Deposition of sporopollenin on lamellae of unit membrane dimensions. *Nature* **213**: 703-704.

- SANGWAN, R. S. & CAMEFORT, H.  
1982 Microsporogenesis in *Datura metel* L. *Rev. Cytol. Biol. Veg. Bot.* **5**: 265-282.
- SANTOS, A.; ABREU, I. & SALEMA, R.  
1979 Elaborate system of RER and degeneration of tapetum during pollen development in some dicotyledons. *J. Submicr. Cytol.* **11**: 99-107.
- SANTOS, A. & SALEMA, R.  
1988 Histochemistry of *Cucurbita polymorpha* Duch. pollen wall. in «*Polen, Especies y Sus Aplicaciones*. Actas del VII Simposio de Palinología. Granada, España (in press).
- 1989 Pollen morphology of *Cucurbita polymorpha* Duch.: a scanning electron microscope study. *Bol. Soc. Brot.* **62**: 107-116.
- SANTOS, A.; SALEMA, R. & SÁ, C.  
1984 Ultrastructural characteristics of the pollen grain wall of *Cucurbita polymorpha* Duch. *Cien. Biol.* **9**: 258 (abstract).
- SCHULZE OSTHOFF, K. & WIERMANN, R.  
1987 Phenols as integrated compounds of sporopollenin from *Pinus* pollen. *J. Plant Physiol.* **131**: 5-15.
- SHELDON, J. M. & DICKINSON, H. G.  
1983 Determination of patterning in the pollen wall of *Lilium henryi*. *J. Cell Sci.* **63**: 191-208.
- SKVARLA, J. J. & LARSON, D. A.  
1966 Fine structural studies of *Zea mays* pollen. I. Cell membranes and exine ontogeny. *Amer. J. Bot.* **53**: 1112-1125.
- SKVARLA, J. J. & ROWLEY, J. R.  
1987 Ontogeny of pollen in *Poinciana* (Leguminosae). I. Development of exine template. *Rev. Palaeob. Palynol.* **50**: 293-311.
- STONE, D. E.; SELLERS, S. C. & KRESS, W. J.  
1979 Ontogeny of exineless pollen in *Heliconia*, a banana relative. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **66**: 701-730.
- VIJAYARAGHAVAN, M. & SHUKLA, A. K.  
1977 Absence of callose around the microspore tetrad and poorly developed exine in *Pergularia daemia*. *Ann. Bot.* **41**: 923-926.
- VITHANAGE, H. I. M. V. & KNOX, R. B.  
1976 Pollen wall proteins: quantitative cytochemistry of the origins of intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*. *J. Cell Sci.* **21**: 423-435.  
1979 Pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in sunflower *Helianthus annuus*. *Ann. Bot.* **44**: 95-106.  
1980 Periodicity of pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymes in the grasses *Lolium perenne* L. and *Phalaris tuberosa* L. *Ann. Bot.* **45**: 131-141.
- WATERKEYN, L. & BIENFAIT, A.  
1968 La paroi spéciale callosique et les premiers dépôts de l'exine chez *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. *C. R. Acad. Sc. Paris* **267**: 56-58.  
1970 On a possible function of the special callosic wall in *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. *Grana* **10**: 13-20.



WILLEMSE, M. T. M.

1971 Morphological and quantitative changes in the population of cell organelles during microsporogenesis of *Pinus sylvestris* L. III. Morphological changes during the tetrad stage and in the young microspore. A quantitative approach to the changes in the population of cell organelles. *Acta Bot. Neerl.* **29**: 498-521.

1972 Morphological and quantitative changes in the population of cell organelles during microsporogenesis of *Gasteria verrucosa*. *Acta Bot. Neerl.* **21**: 17-31.

WILLEMSE, M. T. M. & REZNICKOVA, S. A.

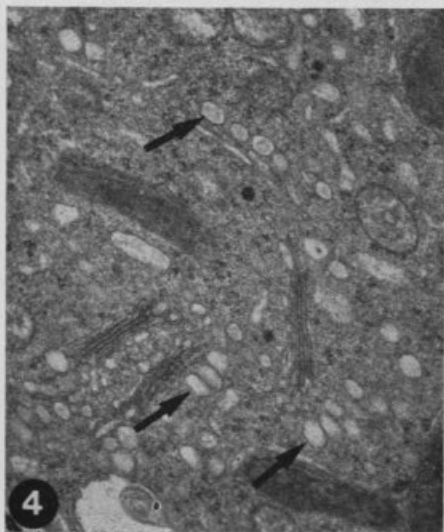
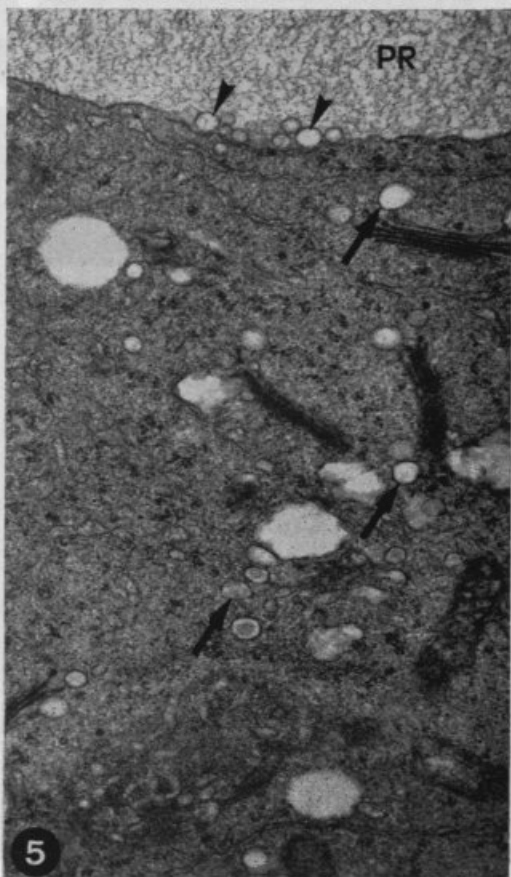
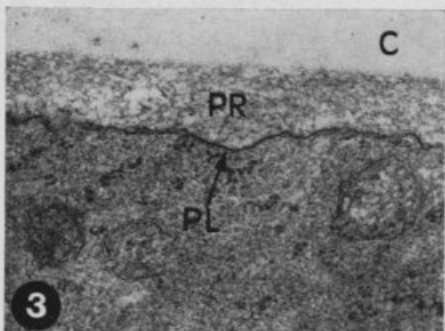
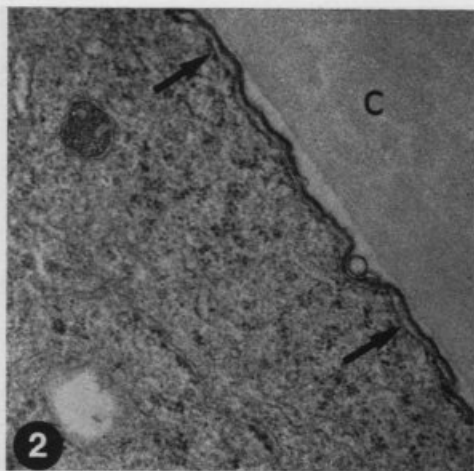
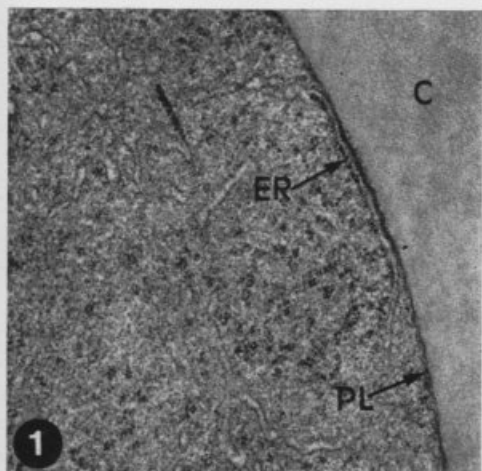
1980 Formation of the pollen in the anther of *Lilium*. 1. Development of the pollen wall. *Acta Bot. Neerl.* **29**: 127-140.



PLATES

PLATE I

- Fig. 1. — Portion of young microspore tetrad enveloped by callose wall (C). Endoplasmic reticulum cisternae (ER) was closely associated with plasma membrane (PL).  $\times 18,000$ .
- Fig. 2. — Plasma membrane appeared slightly wavy in profile, detached from callose wall (C) except in areas of endoplasmic reticulum apposition (arrow).  $\times 25,000$ .
- Fig. 3. — Developing primexine (PR) between callose wall (C) and plasmalemma (PL).  $\times 22,800$ .
- Fig. 4. — During primexine deposition, dictyosomes derived vesicles (arrow), with electron dense material, spread out through the cytoplasm.  $\times 19,000$ .
- Fig. 5. — Dictyosome derived vesicles (arrowhead) were also observed outside the plasmalemma, in contact with primexine (PR), similar to ones observed in cytoplasm (arrow).  $\times 21,000$ .



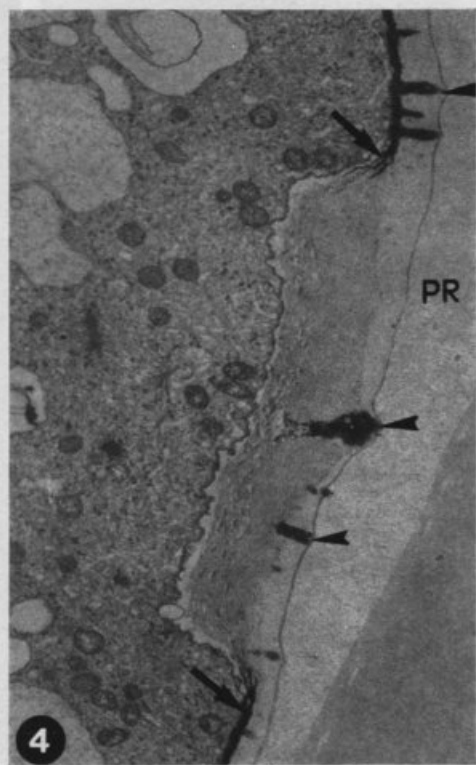
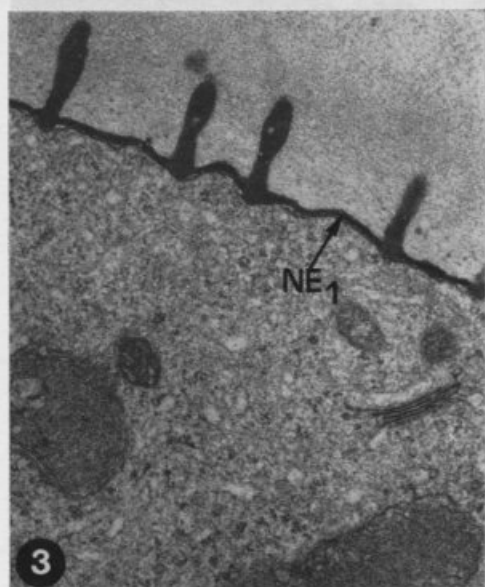
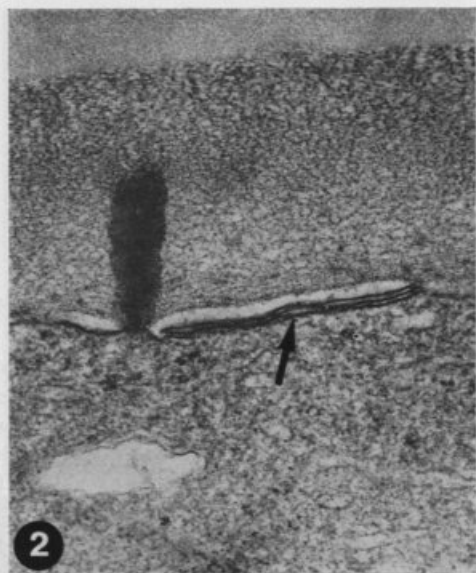
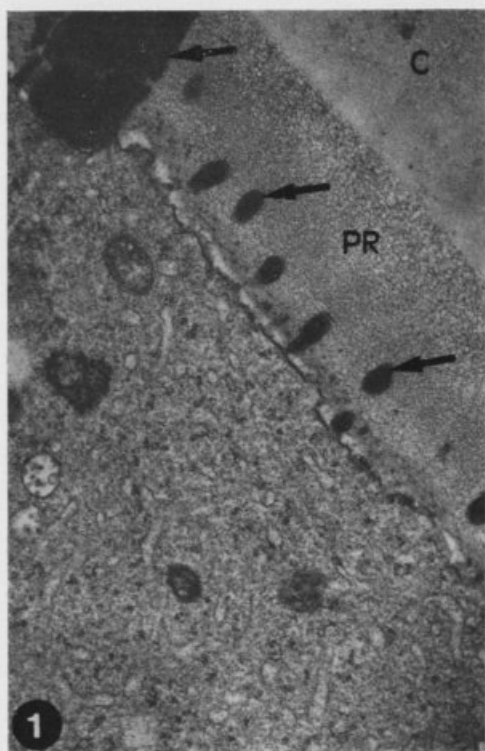


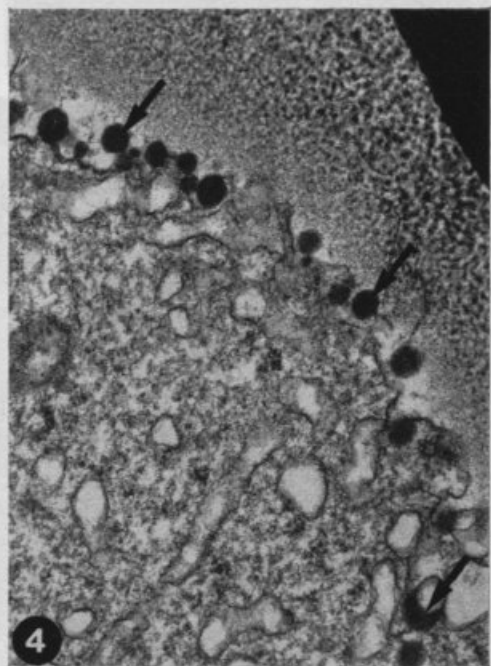
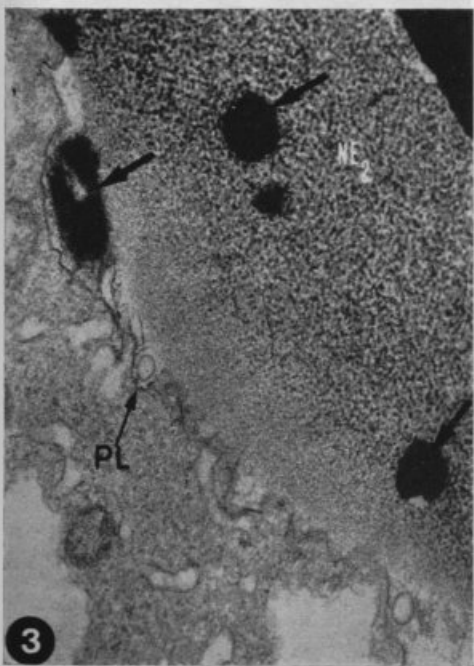
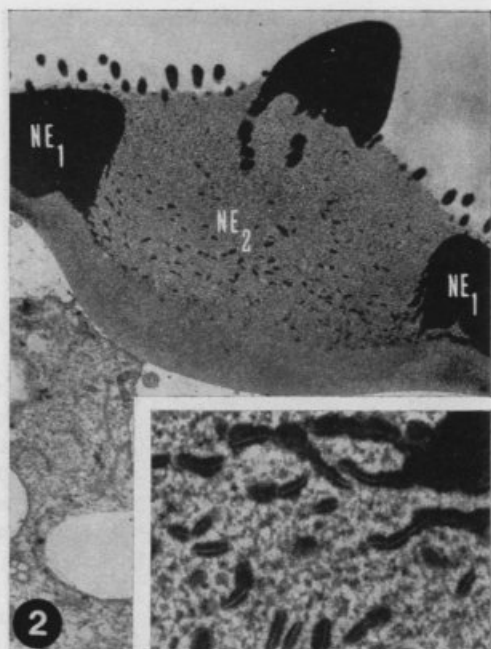
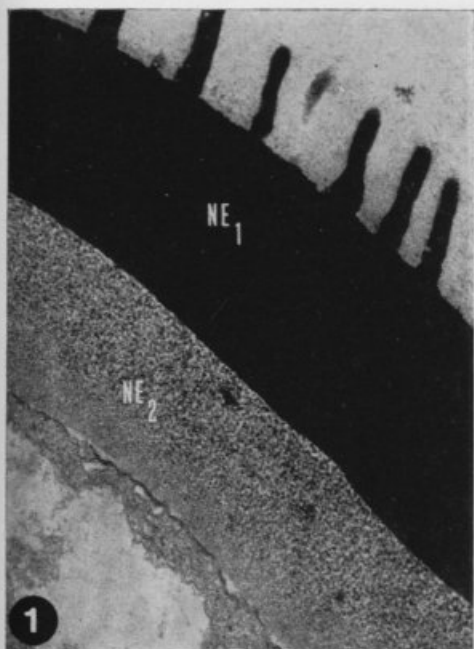
PLATE II

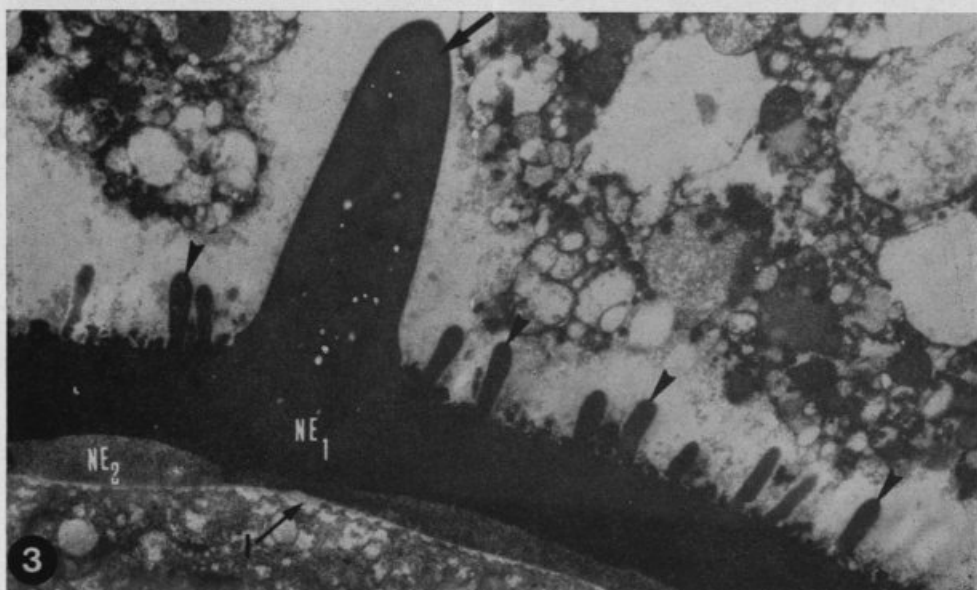
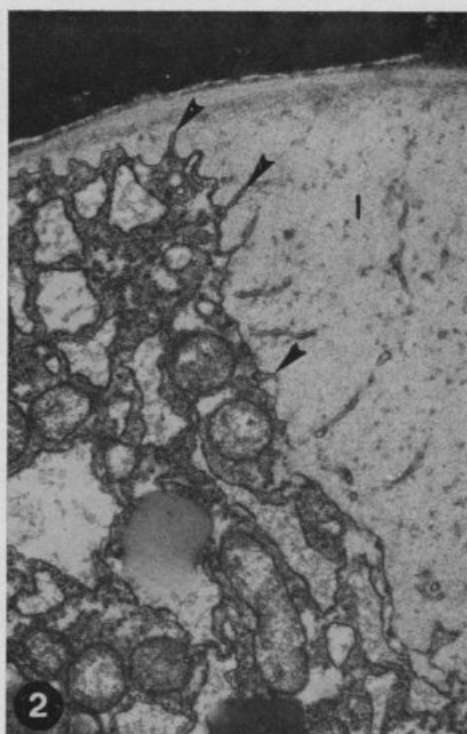
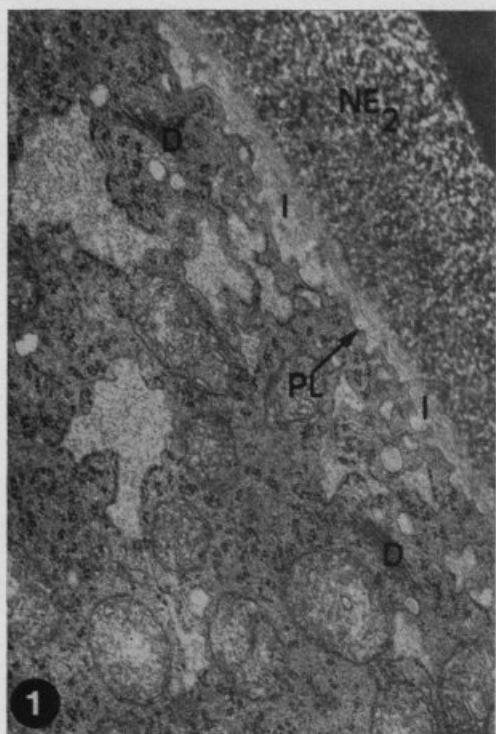
- Fig. 1. — Aspect of the first elements of sporopollenin — probacula (arrow) deposited at primexine (PR). Note two types of probacula, differing in shape and size. C-callose wall.  $\times 16,800$ .
- Fig. 2. — At certain places, plasmalemma displayed flattened protrusions (arrow).  $\times 34,200$ .
- Fig. 3. — Electron dense material was laid down at the plasmalemma, forming a continuous layer or nexine 1 (NE<sub>1</sub>).  $\times 19,000$ .
- Fig. 4. — Aspect of an incipient apertural region of the pollen wall. Note the interruption of nexine 1 (arrow) and the presence of primexine (PR) and probacula (arrowhead).  $\times 7,200$ .



PLATE III

- Fig. 1. — Aspect of pollen wall at free microspore stage. A new sporopollenin layer — nexine 2 ( $NE_2$ ) was deposited above nexine 1 ( $NE_1$ ).  $\times 15,000$ .
- Fig. 2. — At apertural regions, nexine 2 ( $NE_2$ ) which filled the pore, showed distinct white lines with little sporopollenin deposition. Note the interruption of nexine 1 ( $NE_1$ ). Inset — Higher magnification of white lines.  $\times 4,800$ . Inset —  $\times 28,200$ .
- Fig. 3. — Osmiophilic granules (arrow) deposited at nexine 2 ( $NE_2$ ) and between this layer and plasmalemma (PL).  $\times 21,000$ .
- Fig. 4. — Adjacent to plasmalemma and within the cytoplasm osmiophilic granules (arrow) could be seen.  $\times 29,000$ .





SAXIFRAGA GRANULATA L.  
EN EL NW IBERICO

N. REDONDO & M. BARRAL

Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Salamanca, Salamanca, España

PLATE IV

- Fig. 1. — Intine (I) was laid down between nexine 2 ( $NE_2$ ) and plasmalemma (PL). Dictyosomes (D) and associated vesicles were seen near the cell surface and in contact with plasmalemma (PL).  $\times 20,000$ .
- Fig. 2. — Thickened intine (I) associated with pores and penetrated by evaginations of plasmalemma (arrowhead).  $\times 10,800$ .
- Fig. 3. — Final aspect of pollen grain wall. It comprised intine (I), nexine 2 ( $NE_2$ ), nexine 1 ( $NE_1$ ) and spines of two different dimensions, larger (arrow) and smaller (arrowhead), derived from development of probacula and constituting the sexine layer.  $\times 5,600$ .

SUMMARY

The study of the Saxifraga granulata L. from natural populations in the Iberian NW is presented. We have observed that there are two ecotypes: the first one with  $n=31$  and the other with  $n=23, 24, 25$  and 26. The ecotype predominant was found  $n=31$ . A cluster analysis of some 2211 has been made and number of variables (26). The following characters best distinguish variables: number of inflorescence, number of flowers and number of calyx leaves.

The pollen and seeds morphology (by light and scanning electron microscopy) have turned out to have diagnostic value, not only in the base of the pollen.

A new subspecies is described: Saxifraga granulata L. subsp. leonensis N. Redondo & M. Barral.

Key words: Saxifraga granulata.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In addition, the document outlines the procedures for handling discrepancies. If there is a difference between the recorded amount and the actual amount received or paid, it is crucial to investigate the cause immediately. This could be due to a clerical error, a missing receipt, or a more serious issue like fraud.

The second part of the document provides a detailed breakdown of the financial data for the quarter. It includes a table showing the total revenue, expenses, and net profit for each month. The data shows a steady increase in revenue over the period, which is a positive sign for the business.

However, there is a concern regarding the rising expenses, particularly in the area of marketing and advertising. While these costs are necessary for growth, it is important to evaluate their effectiveness and ensure they are not exceeding the budget.

Overall, the document concludes that the business is performing well, but there is a need for continued monitoring and adjustment of the financial strategy to ensure long-term success.

The following table provides a summary of the key financial metrics for the quarter:

Metric	Q1	Q2	Q3
Total Revenue	\$120,000	\$135,000	\$150,000
Total Expenses	\$80,000	\$95,000	\$110,000
Net Profit	\$40,000	\$40,000	\$40,000

The data indicates that while revenue and expenses have both increased, the net profit has remained stable. This suggests that the business is maintaining its profitability despite the higher costs.

It is recommended that the management team review the expense categories, particularly marketing, to identify areas for cost reduction without compromising the quality of the products or services offered.



## SAXIFRAGA GRANULATA L. EN EL NW IBÉRICO

N. REDONDO & M. HORJALES

Colegio Universitario de Vigo, Universidade de Vigo.  
Ap. 874, Vigo, España

Recibido el 16 Mayo, 1990.

### RESUMEN

Se presenta el estudio realizado sobre varias poblaciones naturales de *Saxifraga granulata* L. en el NW Ibérico. Se ha constatado que existen dos citotipos: uno con  $n = 11$  y otro con  $n = 22, 24, 26$  y  $28$  (con predominio de  $n = 22$ ). Se realizó un cluster análisis de casos (331) y otro de análisis de variables (16). Tienen valor diagnóstico los siguientes caracteres: número de cromosomas, tipo de inflorescencia, número de flores y número de hojas caulinares.

La morfología de polen y semillas (a microscopía óptica y electrónica) también resultaron tener valor diagnóstico, así como, en la epidermis foliar, los tricomas.

Se describe una nueva subespecie: *Saxifraga granulata* L. subsp. *fernandesii* N. Redondo & M. Horjales.

Palabras clave: *Saxifraga*, taxonomía.

### SUMMARY

The study of the *Saxifraga granulata* L. from natural populations in the Iberian NW is presented. We have observed that there are two cytotypes: the first one with  $n = 11$  and the other with  $n = 22, 24, 26$  and  $28$  (the cytotype predominant was found  $n = 22$ ). A cluster analysis of cases (331) has been made and another of variables (16). The following characters have diagnosis value: chromosome number, kind of inflorescence, number of flowers and number of cauline leaves.

The pollen and seeds morphology (by light and scanning electron microscopy) have turned out to have diagnosis value too, as well as the hairs in the leaves.

A new subspecies is described: *Saxifraga granulata* L. subsp. *fernandesii* N. Redondo & M. Horjales.

Key words: *Saxifraga*, taxonomy.

ESTA especie ha sido designada como la especie tipo de este género, es la única especie conocida por los autores de los S. XVII y principios del XVIII a la que se aplica correctamente el nombre de *Saxifraga* (las otras especies a las que se referían eran *Sedum*, *Geum*, *Cotyledon*...) Webb & Gornall (1988).

Posee una amplia distribución: desde el N. de Europa, toda Centroeuropa hasta el sur de Italia, Península Ibérica, llegando hasta el norte de Marruecos y Argelia.

*S. granulata* ha sido estudiada por numerosos autores: ENGLER & IRMSCHER (1916), HAMEL (1953), CONTANDRIOPOULOS (1962), CONOLLY (1972), LÖVE & KJELLQUIST (1974), WEBB (1963, 1965, 1987, 1988), FERGUSON & WEBB (1970), FAVARGER & al. (1979), KÜPFER & RAIS (1983), STEVENS & RICHARDS (1985), GORNALL (1986, 1987) ..., y todos coinciden en señalar que se trata de una especie muy polimorfa, presentando también una gran variación en los números cromosómicos.

ENGLER & IRMSCHER (1916) dividen el taxon en cuatro subespecies: subsp. *eugranulata*, con cuatro variedades; subsp. *hochstetteri*; subsp. *rusii* y subsp. *graeca*.

WEBB & GORNALL (1987, 1988) hacen una revisión exhaustiva del género, reajustando los rangos infragenéricos.

Según WEBB & GORNALL (1987, 1988), *S. granulata* tiene en la actualidad dos subespecies: subsp. *granulata*, que incluye tres de las cuatro variedades de la subsp. *eugranulata* de Engler, con dos variedades: var. *granulata* y var. *glaucescens* (Reuter) Engler y la subespecie *graniticola* Webb (= subsp. *eugranulata* var. *gracilis* Engler), las otras subespecies incluidas en *S. granulata* L. por ENGLER, tienen rango específico.

En cuanto a los números cromosómicos, la mayor parte de los recuentos son bastante antiguos (anteriores a 1950): SCHÜRHOFF 1925:  $2n = 32$ ; MARSDEN-JONES & TURRIL (1928)  $2n = 32$ ; WHYTE (1930)  $n = 16-22$ , siendo más frecuente  $n = 16$  (en HAMEL 1953); SKOVSTED (1934)  $2n = 46-60$ ; PHILP (1934)  $2n = 48-49$ ; TISCHLER (1934)  $2n = 48-56$ ; SCHÖENNAGEL (1931)  $2n = 56-60$ ; JUEL (1907)  $2n = 60$  y HARMSSEN (in LÖVE & LÖVE 1948)  $2n = 52$ . Los números posteriores a 1950 también son divergentes, pero no tanto: LÖVE & LÖVE (1951 y 1956)  $2n = 52$ ; HAMEL (1953) en *S. granulata* subsp. *granulata* var. *borealis*,  $2n = 52$ ; SORSA (1963)  $2n = 52$ ; CONTANDRIOPOULOS (1962)  $2n = 52$ ;

LÖVE & KJELLQUIST (1974), sobre material de Jaén,  $2n = 52$ ; KÜPFER & RAIS (1983)  $n = 26$ ,  $2n = 52$ ; FAVARGER, GALLARD & KÜPFER (1980)  $n = 15$  en Marruecos; REDONDO & HORJALES (1989), en el NW Ibérico,  $n = 11, 22, 24, 26$  y  $28$ , siendo más frecuentes  $n = 11$  y  $n = 22$ .

De todos estos autores, sólo HAMEL precisa la subespecie y la variedad sobre la que realizó el recuento cromosómico.

STEBBINS, en 1984, señala que el género *Saxifraga* es uno de los más amplios y más complejos géneros, característicos de las regiones artico-alpinas. En la actualidad, la distribución de citotipos en las numerosas especies que poseen diferente número de cromosomas está pobremente conocida.

STEBBINS compara la distribución del número de cromosomas en las especies, teniendo en cuenta tres niveles: probablemente diploide (12-22), diploide con respecto a sus más próximos relacionados, pero quizás de antigua derivación poliploide ( $2n = 24-28$ ); y más probablemente poliploides de reciente derivación ( $2n = 30-112$ ). Establece: 1º que con un incremento en el número de cromosomas, la proporción de especies que ocupa las regiones artico-alpinas decrece a expensas de un incremento en la proporción de especies adaptadas a las regiones templadas. 2º En cada uno de los tres niveles de número de cromosomas, las especies alpinas que no se extienden en el ártico constituyen la categoría más pequeña. Ello sugiere que el género pudo haber evolucionado primero a las más altas latitudes, y que tanto las especies templadas como las que ocupan hábitats alpinos a más bajas latitudes son en su mayor parte derivadas.

Considerando sólo los trabajos posteriores a 1950, *S. granulata* presenta los números:  $n = 11, 15, 22, 24$  y  $26$ ;  $n = 26$  sería el número más extendido (por casi toda Europa),  $n = 15$  se ha encontrado sólo en el N. de Marruecos y  $n = 11, 22$  y  $24$  sólo en el NW. Ibérico, lo que hace pensar que tal vez los recuentos hayan sido realizados sobre materiales distintos.

En las poblaciones del NW. Ibérico se han encontrado  $n = 11, 22, 24, 26$  y  $28$ . En un grupo de poblaciones aparecía de manera constante  $n = 11$ , en otro  $n = 22, 24, 26$  y  $28$  (el número no sólo variaba dentro de la población, sino que estudiando individuo a individuo también aparecía esta variación, incluso en la misma antera, aunque siempre con claro predominio de  $n = 22$ ). En otras poblaciones aparecían conjuntamente  $n = 11$  y  $n = 22$ . Estu-

diando individuo a individuo se llegó a constatar una correspondencia entre una serie de caracteres morfológicos y el nivel de ploidía.

Se hizo un análisis cluster en el que se estudiaron 15 variables en 331 individuos pertenecientes a 30 poblaciones. Las variables estudiadas fueron:

- nh : número de hojas caulinares,
- r : número de hojas caulinares reniformes,
- c1 : número de hojas caulinares de base cuneda, 5-9 fida,
- c2 : número de hojas caulinares de base cuneda, 3-5 fida,
- c3 : número de hojas caulinares de base cuneda, 1-3 fida,
- nb : número de brácteas,
- br : número de brácteas reniformes,
- b1 : número de brácteas de base cuneda 5-9 fida,
- b2 : número de brácteas base cuneda 3-5 fida,
- b3 : número de brácteas 1-3 fida,
- nf : número de flores,
- co : inflorescencia basal,
- sub : inflorescencia subterminal,
- umb : inflorescencia terminal,
- n : número de cromosomas.

Haciendo un análisis cluster de variables, se observan las correlaciones de caracteres formando dos grupos:

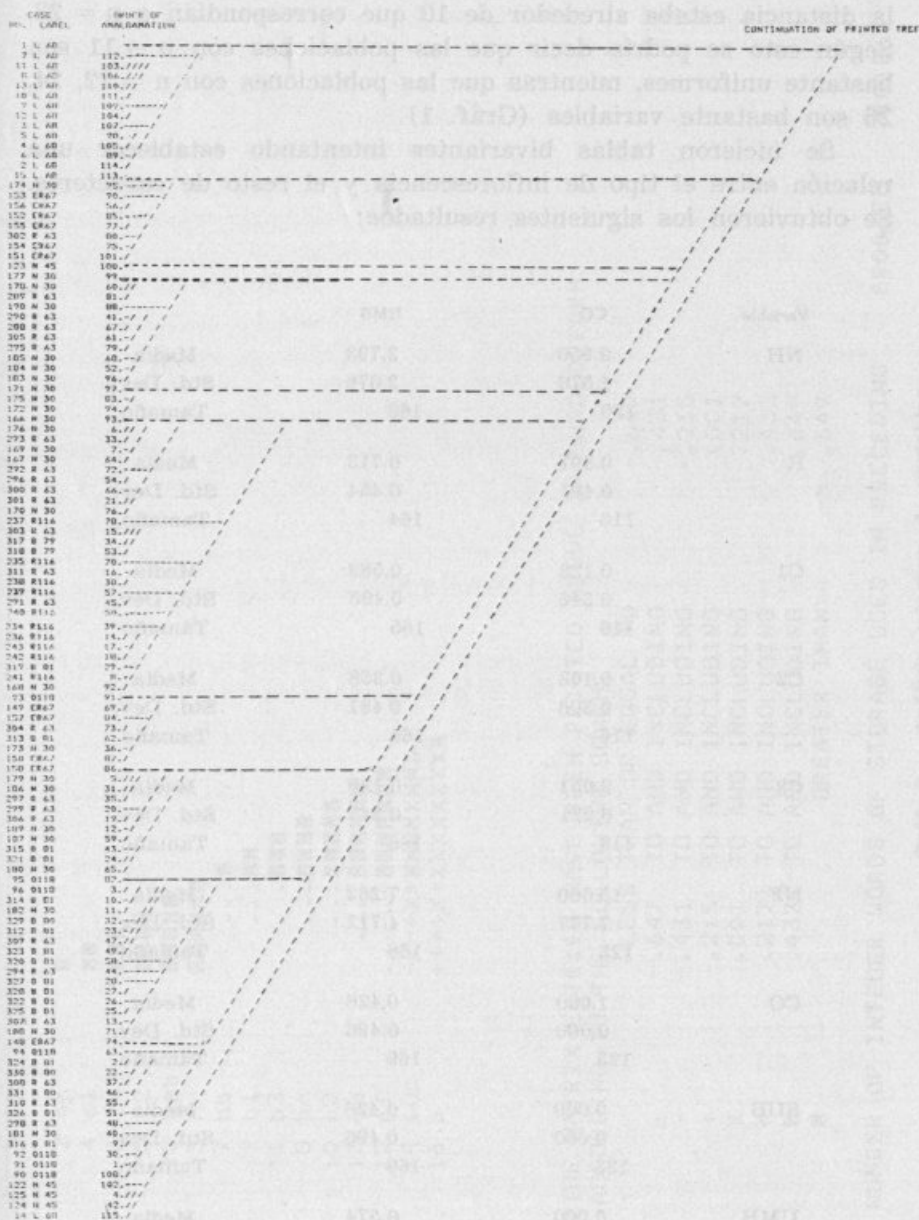
A: nh, c1, c3, c2, umb, r

B: nb, b1, b3, br, co, nf, sub, n.

La menor correlación corresponde a n. Teniendo en cuenta que el número de cromosomas se obtenía a partir de células madres del polen, los números obtenidos corresponden en su mayor parte a plantas jóvenes en las que aún es difícil observar la morfología del escapo floral, y por otra parte el número de ejemplares en los que se había hecho este recuento era inferior al número de individuos en los que se estudiaron el resto de caracteres (Gráf. 2).

Se realizó también un cluster análisis de casos, en el que solamente incluyó 116 individuos, ya que en el resto faltaban datos para alguna de las variables, fundamentalmente n. En el cluster se observa un gran grupo central y homogéneo entre sí, con una distancia media entre casos de 3'272 que correspondía





Gráf. 1. — Análisis «cluster» de casos.

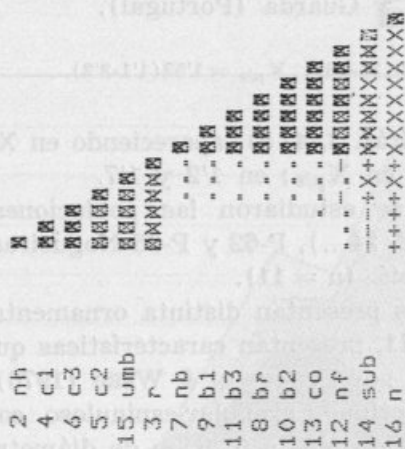


a individuos en los que  $n = 11$  y otros dos grupos en los que la distancia estaba alrededor de 10 que correspondían a  $n = 22$ . Según esto se podría decir que las poblaciones con  $n = 11$  son bastante uniformes, mientras que las poblaciones con  $n = 22, 24, 26$  son bastante variables (Gráf. 1).

Se hicieron tablas bivariantes intentando establecer una relación entre el tipo de inflorescencia y el resto de caracteres. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Variable	CO	UMB	
NH	0.950	2.793	Media
	1.576	2.076	Std. Dev.
	120	169	Tamaño
R	0.397	0.713	Media
	0.491	0.454	Std. Dev.
	116	164	Tamaño
C1	0.138	0.582	Media
	0.346	0.495	Std. Dev.
	116	165	Tamaño
C2	0.103	0.358	Media
	0.306	0.481	Std. Dev.
	116	165	Tamaño
C3	0.051	0.139	Media
	0.221	0.347	Std. Dev.
	118	166	Tamaño
NF	15.000	7.262	Media
	7.777	4.712	Std. Dev.
	123	168	Tamaño
CO	1.000	0.426	Media
	0.000	0.496	Std. Dev.
	123	169	Tamaño
SUB	0.000	0.426	Media
	0.000	0.496	Std. Dev.
	123	169	Tamaño
UMB	0.000	0.574	Media
	0.000	0.496	Std. Dev.
	123	169	Tamaño

## CORRELATIONS IN SORTED AND SHADED FORM



THE MATRIX ENTRIES HAVE BEEN PRINTED ABOVE IN SHADED FORM ACCORDING TO THE FOLLOWING SCHEME

.	LESS THAN OR EQUAL TO	-.647
-	TO AND INCLUDING	-.431
+	TO AND INCLUDING	-.215
X	TO AND INCLUDING	.001
X	TO AND INCLUDING	.217
X	TO AND INCLUDING	.433
X	TO AND INCLUDING	.649
X	GREATER THAN	.649

NUMBER OF INTEGER WORDS OF STORAGE USED IN PRECEDING PROBLEM

1018

Gráf. 2. — Análisis «cluster» de variables.

Se ha estudiado también otros caracteres a microscopía óptica y electrónica (polen, semillas y epidermis), que no se incluyeron en el cluster debido a que el número de individuos estudiados era muy inferior, y no permitía comparar los resultados desde el punto de vista estadístico.

En cuanto al polen (REDONDO y HORJALES, en prensa) no se observaron variaciones de tamaño entre las poblaciones  $n = 11$  y  $n = 22$ ; aunque el tamaño de polen y estomas, típicamente es un buen carácter taxonómico, produciéndose un incremento del mismo en función del nivel de ploidía, RANDHAWA & BEAMISH, 1970 in LEWIS, 1980, no encontraron diferencias efectivas en el tamaño del polen entre las razas diploides y tetraploides de *Saxifraga ferruginea* Graham.

Las poblaciones estudiadas al microscopio óptico son: P-1: Nogueiras-Carballino ( $n = 11$ ); P-5: Peares ( $n = 11$ ) y P-39: Castro-Dozón ( $n = 22, 24, 26$  y  $28$ ).

$$P-1: X_p = 32'8(26-37); X_e = 20'34(16-23); X_{p/e} = 1'62(1'4-2).$$

$$P-5: X_p = 32'7(26-36); X_e = 20'21(16-25); X_{p/e} = 1'62(1'3-2'1).$$

En P-1 y P-5 la moda para  $X_{p/e}$  está en 1'7, los datos son homogéneos (Gráf. 3, 4, 5) y coinciden con los aportados sobre materiales de Somport (España) y Guarda (Portugal).

$$P-39: X_p = 28'4(19-35); X_e = 18'9(12-26); X_{p/e} = 1'53(1'1-2'2).$$

Los datos son divergentes (Gráf. 3, 4, 5), apareciendo en  $X_e$  dos modas: en 17 y 21 así como en  $X_{p/e}$ : en 1'2 y 1'7.

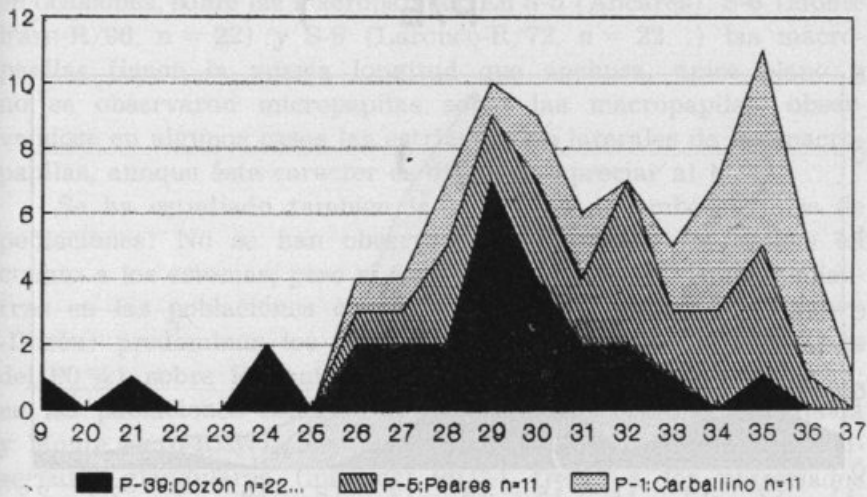
Al microscopio electrónico se estudiaron las poblaciones: P-60 y P-90 Castro-Dozón ( $n = 22, 24...$ ), P-62 y P-86 Nogueiras-Carballino ( $n = 11$ ) y P-63 Rubiá ( $n = 11$ ).

Ambos grupos de poblaciones presentan distinta ornamentación: P-86, P-62 y P-63 con  $n = 11$ , presentan características que coinciden con los datos aportados por FERGUSON & WEBB (1970): el polen presenta un tectum continuo, granular-espinuloso con punteaduras. Las espínulas miden de 0'22 a 0'28  $\mu\text{m}$  de diámetro y las punteaduras de 0'05 a 0'1  $\mu\text{m}$ , más o menos en la misma proporción que las espínulas.

En P-60 y P-90 con  $n = 22$ , el polen es granular, espinuloso-verrucoso con espínulas de 0'3 a 0'5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 0'2

# S. granulata L.

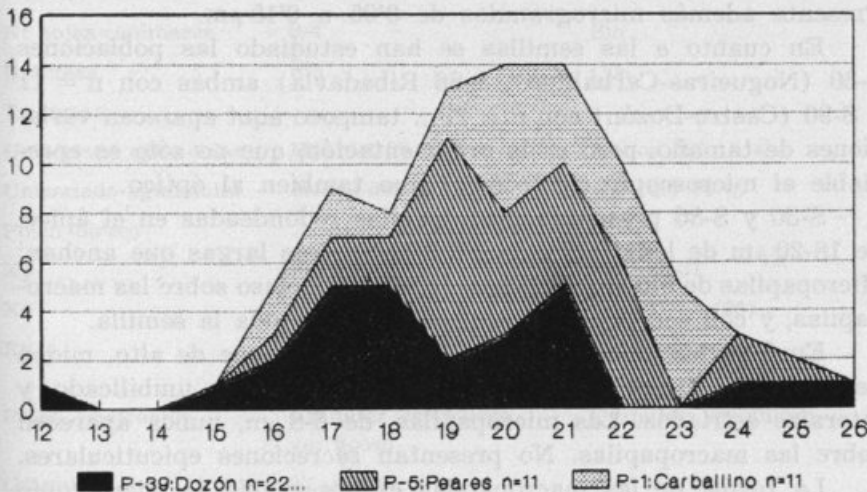
P



Gráf. 3. — Polen, diámetro polar.

# S. granulata L.

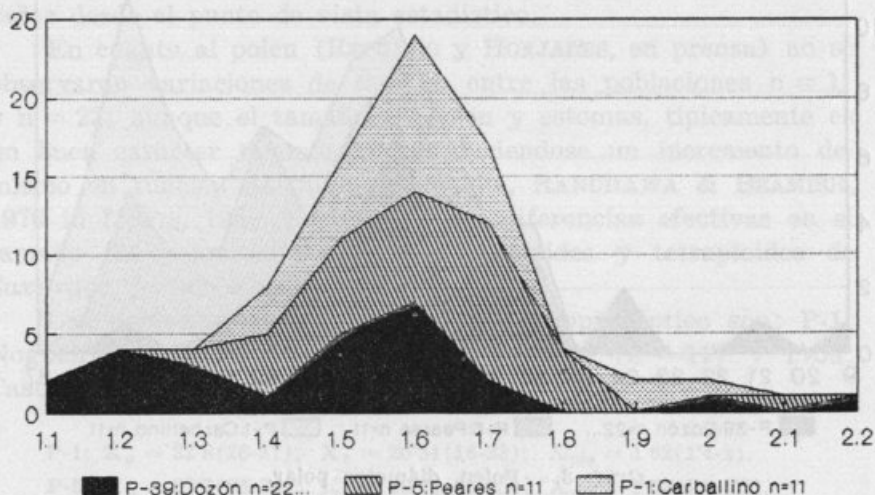
E



Gráf. 4. — Polen, diámetro ecuatorial.

# S. granulata L.

## P/E



Gráf. 5. — Polen, diámetro polar/diámetro ecuatorial.

a 0'4 de altura; las punteaduras son más pequeñas y están en menor proporción, siendo más abundantes al acercarse al colpo. Presenta además microgránulos de 0'05 a 0'15  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a las semillas se han estudiado las poblaciones S-30 (Nogueiras-Carballino), S-86 Ribadavia) ambas con  $n = 11$  y S-90 (Castro-Dozón) con  $n = 22$ ... tampoco aquí aparecen variaciones de tamaño, pero sí de ornamentación, que no sólo es apreciable al microscopio electrónico, sino también al óptico.

S-30 y S-86 presentan macropapilas redondeadas en el ápice, de 18-20  $\mu\text{m}$  de longitud y de 1'5-2 veces más largas que anchas; Micropapilas de 5-6  $\mu\text{m}$ , dispersas, situadas incluso sobre las macropapilas, y con secreciones epicuticulares por toda la semilla.

En S-90 las macropapilas, igual de ancho que de alto, miden de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , presentan un ápice de plano a umbilicado y laterales estriados. Las micropapilas, de 5-8  $\mu\text{m}$ , nunca aparecen sobre las macropapilas. No presentan secreciones epicuticulares.

La forma de las macropapilas es observable al microscopio óptico: S-1 (Rubiá,  $n=11$ ), S-21 (Ribadavia,  $n=11$ ), S-4 (A Rúa),



S-2 (Viana do Bolo), presentan al M. O. macropapilas con ápice redondeado, con longitud doble que la anchura y micropapilas, en ocasiones, sobre las macropapilas. En S-5 (Ancares), S-6 (Monte Faro-R/96, n = 22) y S-8 (Larouco-R/72, n = 22...) las macropapilas tienen la misma longitud que anchura, ápice plano y no se observaron micropapilas sobre las macropapilas, observándose en algunos casos las estrías de los laterales de las macropapilas, aunque éste carácter es difícil de apreciar al M. O.

Se ha estudiado también la epidermis de ambos grupos de poblaciones: No se han observado diferencias entre ambas en cuanto a los estomas, pero sí en cuanto al tipo de tricomas, mientras en las poblaciones con n = 22 (Monte Faro-R/96, Castro-Dozón) predominan los tricomas uniseriados eglandulares (más del 90 %) sobre los uniseriados glandulares (menos del 10 %); en las poblaciones con n = 11 (Nogueiras-Carballiño, Ribadavia y Monte Faro-R/57), hay un claro predominio de tricomas uniseriados glandulares (más del 90 %) frente a los uniseriados

Resumiendo, ambos grupos de poblaciones se diferencian morfológicamente por los siguientes caracteres:

n	22, 24, 26, 28	11
Inflorescencia	Terminal, umbeliforme	Panoja amplia, basal
Número de flores	(2)-4-5-(8)	(10)-25-(50)
Nº hojas caulinares	3-4	Sin
Brácteas	Sin	Con
Tricomas		
Uniseriado eglandular	Más del 90 %	Menos del 10 %
Uniseriado glandular	Menos del 10 %	Más del 90 %
Polen óptico		
Xp	(19)-28-(35)	(26)-35-37
Xe	(16)-20-(23)	(12)-17-21-(26)
Xp/e	2 máximos: en 1'2 y en 1'7	1 máx.: en 1'675
Polen electrónico	Granular espinuloso, verrucoso	Granular espinuloso
Gránulos	0'1 a 0'4 $\mu$ m	0'22 a 0'28 $\mu$ m
Microgránulos	0'05 a 0,1 $\mu$ m	Sin

n	22, 24, 26, 28	11
Punteaduras	0'05 a 0'1 $\mu$ m, más abundantes en el colpo	0'1 a 0'15 $\mu$ m uniformemente distribuidas, mas o menos en la misma proporción que las espinulas
Semillas		
Macropapilas	12 $\times$ 12 $\mu$ m	18-20 $\times$ 10-12 $\mu$ m
Apice macropapilas	De plano umbilicado	Redondeado
Laterales macropapilas	Estriados	Lisos
Micropapilas	5 $\times$ 5-6 $\mu$ m, nunca sobre las macropapilas	5 $\times$ 8, m dispersas incluso sobre las macropapilas
Secreciones epicuticulares	Sin	Abundante por toda la semilla
Hábitat	En lugares expuestos	En lugares protegidos, sobre taludes o rocas
Floración	A principios de primavera, pero entre 15 días y un mes más tarde	A principios de primavera

A la vista de estos resultados, creemos poder concluir que nos encontramos ante dos entidades biológicas diferentes.

Consultado el tipo de Linneo, presenta las mismas características morfológicas que las poblaciones que presentan  $n = 11$ , el número más bajo del que tenemos noticia, por lo que pensamos sería el diploide (pendiente todavía de efectuar la electroforesis que resolvería la duda y correspondería a la subespecie *granulata*, mientras que las poblaciones con  $n = 22, 24, 26, 28$ , serían tetraploides y corresponderían al nuevo taxon que proponemos *S. granulata* L. subsp. *fernandesii* Redondo & Horjales que proponemos.

Asimismo, hemos consultado el tipo de *S. granulata* L. subsp. *graniticola* D. A. Webb y no parece que corresponda a este taxon el material que ha sido dado como tal para Galicia.

Orense: prox. Barrio, suelos ácidos, 5-IV-1977, C. Morla; de Sobradelo a Casaio, 14-LV-1981, S. Ortiz, SANT 14062 que corresponden a *S. granulata* L. subsp. *granulata* y Orense: Carbadella, refugio de Trevinca, 1750 m.s.m., 27-V-1983, S. Ortiz, SANT 16271 que corresponde a *S. granulata* L. subsp. *fernandesii* N. Redondo & M. Horjales.

**Saxifraga granulata L. subsp. granulata**

Foliis lobatis, caule erecto. Saxifraga foliis caulinis reniformibus, caule ramoso, radice granulata. Tricomae copiosae, equibus generatim, plus quam 90 % sunt uniseriatae glandulares et minus quam 10 %, uniseriatae eglandulares.

Pollen granulatum spinulosum habet granulos a 0,22 ad 0,28  $\mu\text{m}$ , sine microgranulis et cum poris a 0,1 ad 0,15  $\mu\text{m}$ , uniformiter distributis, pari modo, plus minusve, ad spinulae.

Semina ferunt micropapillis rectangularibus (longitudine duplici quam latitudine), apice globato et lateribus politis, micropapillis dispersis etiam super macropapillas, et copiosis secretionibus epicuticularibus.

n = 11.

Habitat: in locis apricis, super declivia vel saxa.

Floritio: primo vere.

Hojas lobadas, tallo erecto. Saxifraga con hojas caulinares reniformes, tallo ramoso, raíz granulosa. Tricomas abundantes, con predominio de tricomas uniseriados glandulares (más del 90 %) sobre los uniseriados eglandulares (menos del 10 %).

Inflorescencia formando una panoja amplia, basal con (10)-25-(50) flores.

Polen granular espinuloso con gránulos de 0,22 a 0,28  $\mu\text{m}$ , sin microgránulos y con punteaduras de 0,1 a 0,15  $\mu\text{m}$ , uniformemente distribuidos, más o menos igual que las espínulas.

Semillas con macropapilas rectangulares (doble largo que ancho) con ápice redondeado y laterales lisos, con micropapilas dispersas, incluso sobre las macropapilas y abundantes secreciones epicuticulares.

n = 11.

Habitat: en lugares protegidos, sobre taludes o rocas.

Floración: a principios de primavera.

**Saxifraga granulata L. subsp. fernandesii Redondo & Horjales subsp. nova**

Holotypus Pontevedra: Castro-Dozón, 29TNH81, 1-IV-1981, 800 m.s.m., en prados, Redondo & Horjales. In MA.

Isotypus in SANT y COI.

Caule erecto, simplici. Foliis basilaribus lobatis-reniformis.

Foliis caularibus n° 3-4, a reniformibus ad 3-5 fida. Tricomae unius seriei eglandulares sunt plus quam 90 %, dum glandulares minus quam 10 %.

Inflorescentia eius terminalis est umbelliformis, paucis floribus (2)-3-5-(8).

Pollen granulare spinuloso-verrucosum habet granulos a 0,2 ad 0,4  $\mu\text{m}$  et podis a 0,5 ad 0,1  $\mu\text{m}$  abundantiores in colpo, tamen semper minore numero quam granula.

Semina ferunt macropapillis quadrangularis (aequali latitudine et longitudina), apice vel planum vel umbilicatum et lateribus striatis; micropapillae numquam supra macropapillas apparent et carent secretionibus epicuticularibus.

n = 22, 24, 26, 28 magis invenitur quam n = 22.

Habitat: in locis apertis, in pratis.

Floritio: primo vere, sed intra 15-30 dies serius quam *S. granulata* L. *granulata*.

Subspecies magistro luso Dri. Abilio Fernandes dicata.

Tallo erecto, simple. Hojas basales lobadas-reniformes.

Hojas caulinares en número de 3-4, desde reniformes a 3-5 fida. Predominio de los tricomas uniseriados eglandulares (más del 90 %) sobre los uniseriados glandulares (menos del 10 %).

Inflorescencia terminal umbelliforme, con pocas flores (2)-3-5-(8).

Polen granular espinuloso-verrucoso, con gránulos de 0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$  y microgránulos de 0,05 a 0,1  $\mu\text{m}$ , más abundantes en el colpo y siempre en menor proporción que los gránulos.

Semillas con macropapilas cuadrangulares (igual ancho que largo) con el ápice de plano a umbilicado y los laterales estriados; micropapilas nunca sobre las macropapilas y sin secreciones epicuticulares.

n = 22, 24, 26, 28, con predominio de n = 22.

Habitat: lugares expuestos, praderas.

Floración: a principios de primavera, pero entre 15-30 días más tarde que *S. granulata* L. subsp. *granulata*.



## MATERIAL ESTUDIADO

**S. granulata** L. subsp. **granulata**

Pontevedra: Cerdedo, 29TNH50, 1-IV-1990, N. Redondo et M. Horjales; Monte Xiabre, 29TNH22, 20-III-1990, N. Redondo et M. Horjales; río Toxa, Pazos, cascada, 29TNH63, 8-V-1987, M. Horjales et N. Redondo; Id, 8-IV-89, R/131, M. Horjales et N. Redondo.

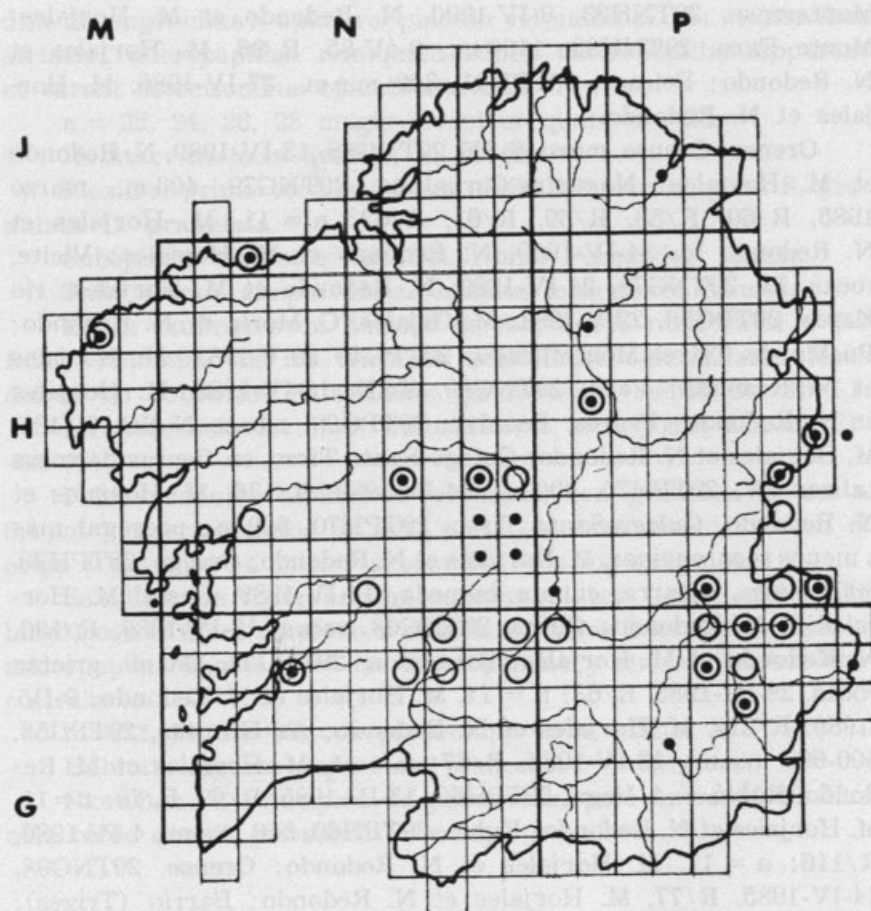
Lugo: Calde, 29TPH15, 9-IV-1990, N. Redondo et M. Horjales; Monterroso, 29TNH93, 9-IV-1990, N. Redondo et M. Horjales; Monte Faro, 29TNH83, 1100 m., 9-6V-85, R/96, M. Horjales et N. Redondo; Belesar, 29TPH01, 300 m.s.m., 27-IV-1986, M. Horjales et N. Redondo.

Orense: Orense, muro, S-SE, 29TNG98, 13-IV-1989, N. Redondo et M. Horjales; Nogueira-Carballino, 29TNG79, 400 m., marzo 1985, R/60, R/58, R/59, R/61, R/62: n = 11, M. Horjales et N. Redondo Id, 24-IV-1989, N. Redondo et M. Horjales; Vieite, rocas, E., 29TNG78, 24-IV-1989, N. Redondo et M. Horjales; río Xares, 29TPG58, 22-V-1981, M. Orjales, C. Morla et N. Redondo; Puebla de Trives-Montefurado, 29TPG49 20-V-1981, M. Horjales et N. Redondo; Velle, 29TNG99, S-SE, 13-IV-1989, M. Horjales et N. Redondo; Peares, Penalva, 29TPG09, ribazo N-NO, R/135, M. Horjales et N. Redondo; Oulego-Santo Tirso, en fisuras de rocas calizas, W, 29TPH70, 800 m., 14-IV-1989, R/136, M. Horjales et N. Redondo, Oulego-Santo Tirso, 29TPH70, 800 m., pedregal más o menos seco, encinar, M. Horjales et N. Redondo; Oulego, 29TPH70, 800 m.s.m., pizarra, cuneta humeda, 14-IV-1989, Oeste, M. Horjales et N. Redondo; Quins, 29TNG68, rocas, 13-IV-1989, R/130, N. Redondo et M. Horjales; Ribadavia, 29TNG78, 290 m., grietas rocas, 28-III-1985, R/63: n = 11, M. Horjales et N. Redondo; 9-IV-1989, R/21s, M. Horjales et N. Redondo; As Ermitas, 29TPG58, 500-600 m.s.m., 13-IV-1985, R/67: n = 11, M. Horjales et N. Redondo. Rubiá — A Vega, 29TPH60, 13-IV-1985, R/69, R/78: n=11, M. Horjales et N. Redondo; Rubiá, 29TPH60, 550 m.s.m., 4-IV-1986, R/116: n = 11, M. Horjales et N. Redondo; Orense, 29TNG98, 14-IV-1985, R/77, M. Horjales et N. Redondo; Barrio (Trives), 29TPG59, 600-900 m.s.m., 14-IV-1985, R/79: n=11, R/80; n=11, R/81, M. Horjales et N. Redondo; Montefurado, 29TPG49, 300



m.s.m., 14-IV-1985, R/73:  $n = 11$ , M. Horjales et N. Redondo; Peares, Penalva, 29TPG09, 12-IV-1989, R/135, M. Horjales et N. Redondo; Ribadavia, 25-III-1990, M. Horjales et N. Redondo.

León: Ancares, Ambasmestas, 700 m., 29TPH62, 3-IV-1986, M. Horjales et N. Redondo; Ancares, O Castro, 29TPH63, 1000 m., 5-III-1986, R/118:  $2n = 24, 28$ , M. Horjales et N. Redondo.



- *S. granulata* L. subsp. *fernandesii* N. Redondo & M. Horjales.
- *S. granulata* L. subsp. *granulata*.

**Saxifraga granulata** L. subsp. **fernandesii** Redondo et Horjales

Coruña: Playa de Razo, Carballo, 29TNH29, 9-IV-1990, M. Horjales et N. Redondo; Playa do Trece, Cabo Vilán, 29TMH87, 9-IV-1990, M. Horjales et N. Redondo.

Orense: Viana do Bolo, Embalse do Bao, 29TPG57, 24-V-1981, 800 m.s.m., R/4s, R/4p, M. Horjales et N. Redondo; Peña Trevinca, 29TPG88, 2000 m.s.m., 1-VII-1983, R/16s, R/18s, R/18p, N. Redondo et M. Horjales; Alto das Chas, 29TPG88, 1500 m.s.m., 2-VII-1983, R/20p, N. Redondo et M. Horjales; A Rúa, 29TPG59, 14-IV-1985, R/76, M. Horjales et N. Redondo; Larouco, 29TPG59, 500-600 m.s.m., 14-IV-1985, R/68: n = 22, N. Redondo et M. Horjales; Larouco, río Bibey, 29TPG48, 14-IV-1985, R/72, R/75, M. Horjales et N. Redondo; Invernadeiro, Ribeira Grande, 29TPG36, 1300 m.s.m., 16-VI-1988, Oulego, 29TPH70, N-NW, prado inclinado húmedo, 13-IV-1989, R/133, M. Horjales et N. Redondo; río Budal, 29TPH00, 500-600 m.s.m., 14-III-1985, R/51: n = 22, M. Horjales et N. Redondo; Oulego, 29TPH70, 600 m.s.m., W, pizarra en cuneta húmeda, 14-IV-1989, R/138, M. Horjales et N. Redondo; Oulego-Santo Tirso, 29TPH70, 800 m.s.m., 14-IV-1989, pedregal más o menos seco, encinar, R/139, M. Horjales et N. Redondo.

Pontevedra: Monte Faro, 29TNH83, 800 m.s.m., 28-III-1985, R/57: n = 22, M. Horjales et N. Redondo; Castro-Dozón, 29TNH81, 24-IV-1989, 800 m.s.m., M. Horjales et N. Redondo; Idem, 1-V-1982, R/41s, R/39p, R/4, R/8: n = 22, R/29, R/38: n = 24, R/45: n = 22, 24, 28; R/46, R/54: n = 26, M. Horjales et N. Redondo; Idem, 24-IV-1989, N. Redondo et M. Horjales; Idem, 1-IV-1990, N. Redondo et M. Horjales; Idem, 9-IV-1990, M. Horjales et N. Redondo; Peneda, 29TNH38, 19-III-1990, R/150, M. Horjales et N. Redondo, río Deza, Merza, 29TNH63, 100 m.s.m., 3-IV-1982, R/31s, R/32p, M. Horjales et N. Redondo.

Lugo: Monte Faro, 29TNH83, 1100 m.s.m., 9-VI-1985, R/96, M. Horjales et N. Redondo; Os Peares, 29TPH00, 300 m.s.m., 14-III-1985, R/49, R/50, R/53, M. Horjales et N. Redondo; Ancares, Fuente María González, 29TPH74, 1900 m.s.m., 11-7-1987, N. Redondo et M. Horjales; Penasillas-Monte Faro, 29TNH91, praderas, 24-IV-1989, N. Redondo et M. Horjales; Trasulfe, 29TNH82, ribazo carretera, 22-IV-1989, N. Redondo et M. Horjales; Saavedra, 29TPH17, 9-IV-1990, M. Horjales et N. Redondo; Martul, 29TPH17, 9-IV-1990, M. Horjales et N. Redondo; Calde, 29TPH15, 9-IV-1990,

N. Redondo et M. Horjales; Laxe, 29TNH92, 25-III-1990, N. Redondo et M. Horjales.

León: Tejado de Ancares, bosque de la Magdalena, 29TPH84, 1100 m.s.m., 2-VII-1985, M. Horjales et N. Redondo.

Agradecemos la colaboración prestada a M. J. REIGOSA, al Personal de los Servicios Informáticos de la Universidad de Vigo, a CELSO RODRÍGUEZ por su transcripción latina, a C. MORLA por los pliegos prestados, a MIGUEL JEREZ por su ayuda en la microscopía electrónica y a los herbarios SANT, MA, COI LOURIZAN, B y DBN.

#### BIBLIOGRAFIA

- CONOLLY, A. P.  
1972 Scanning electron microscope photographs of *Saxifraga* seeds. *Watsonia* 9 (1): 58.
- ENGLER, A. & E. IRMSCHER  
1916 Das Pflanzenreich.
- FAVARGER, C.; GALLARD, N. & P. H. KÜPFER  
1979 Recherches cytotaxonomiques sur la flora orophile du Maroc. *Naturalia Monspeliensia, Sér. Bot.* 29: 1-64.
- FERGUSON, I. K. & D. A. WEBB  
1970 Pollen morphology in the genus *Saxifraga* and its taxonomic significance. *Bot. J. Linn. Soc.* 63: 295-311.
- GORNALL, R. J.  
1986 Trichome anatomy and taxonomy of *Saxifraga*. *Nord. J. Bot.* 6: 257-275.  
1987 An outline of a revised classification of *Saxifraga* L. *Bot. J. Linn. Soc.* 95: 273-292.
- HAMEL, J. L.  
1953 Contribution à l'étude cytotaxinomique des Saxifragaceae. *Rev. de Cytologie et de Biologie Végétales.* 14 (3-4): 113-311.
- KÜPFER, P. H. & RAIS  
1983 Index n chrom. Suisse I. *Saxifraga*. *Trav. Inst. Bot. Neuchâtel* 29: 11-25.
- LEWIS, W. H.  
1980 Poliploidy in Angiosperms: Dicotyledons, in Poliploidy. Plenum Press, New York.
- LÖVE & KJELLQUIST  
1974 Cytotaxonomy of Spanish plants III. Dicotyledons, Salicaceae-Rosaceae. *Lagascalia* 4 (1): 3-32.
- REDONDO, N. & HORJALES, M.  
1989 Datos cariológicos del gen. *Saxifraga* L. en el NW Ibérico. *Bol. Soc. Brot.* 62: 193-201.  
Aportación al conocimiento polínico del gen. *Saxifraga* L. en NW Ibérico (en prensa).

WEBB, D. A.

1963 Saxifragaceae. Iris Flora.

WEBB, D. A. in HEYWOOD

1963 Flora Europaea: Notulae Systematica n. 2. In notes from the Botanical School (1965) 6 (5): 198-210.

WEBB, D. A.

1987 Taxonomic and nomenclatural notes on *Saxifraga* L. *Bot. Journal of the Linn. Soc.* 95: 227-257.

WEBB, D. A. & R. J. GORNALL

1988 Saxifrages of Europe. Christopher Helm (Publishers) London.

STEVENS, D. P. & A. J. RICHARDS

1985 Ginodiocy in *S. granulata* L. (Saxifragaceae): *Pl. Syst. Evol.* 151: 43-54.

STEBINS, G. L.

1984 Polyploidy and the distribution of the Arctic-alpine flora: new evidence and a new approach. *Botanica Helvetica* 94 (1): 1-12.

N. Redondo et M. Horyak: *Las plantas de la zona de los Andes de M. Horyak.*  
1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

Aplicación de la clasificación de M. J. Rostk y Schmidt al Personal de los servicios técnicos de la Universidad de Córdoba. *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

REVISTA

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

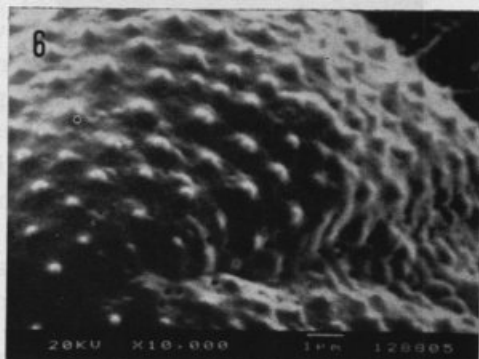
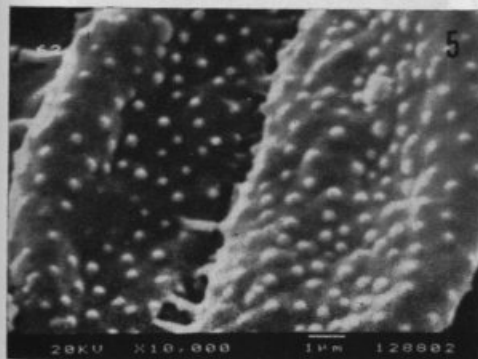
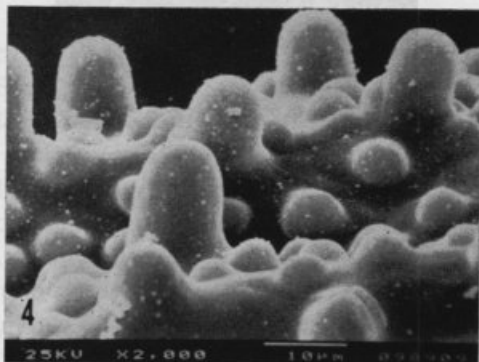
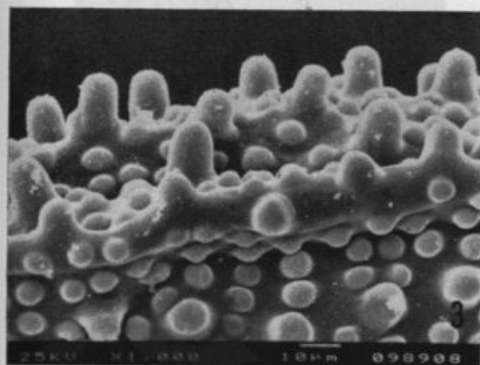
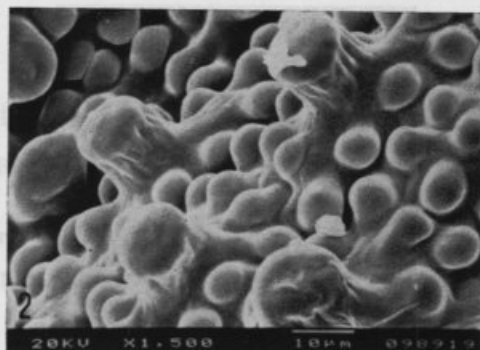
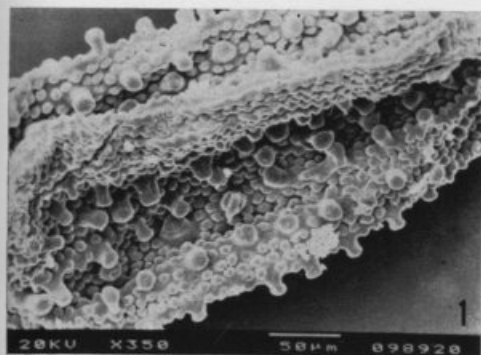
1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

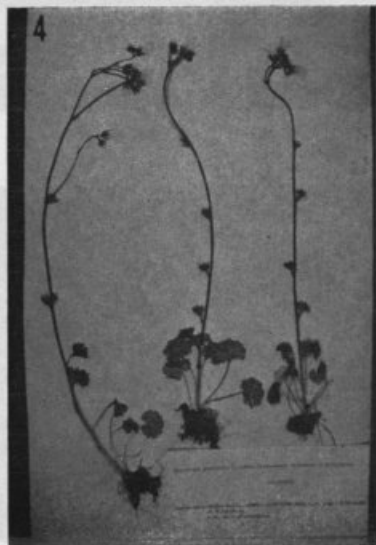
1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.

1961 *Revista de la Asociación Argentina de Botánica* 11: 1-11.





- 1-2. — Semillas de *S. granulata* L. subsp. *fernandesii* N. Redondo & H. Horjales. Castro-Dozón (Pontevedra).  
 3-4. — Semillas *S. granulata* L. subsp. *granulata* Ribadavia (Orense).  
 5. — Polen *S. granulata* L. subsp. *granulata* Nogueiras-Carballiño (Orense).  
 6. — Polen *S. granulata* L. subsp. *fernandesii* N. Redondo & M. Horjales Castro-Dozón (Pontevedra).



1-3. — *S. granulata* L. subsp. *granulata* Ribadavia (Orense).

2-4. — *S. granulata* L. subsp. *fernandesii* N. Redondo & M. Horjales  
Castro-Dozón (Pontevedra).

## NOTES SUR LES VERBENACEAE

### VIII — DEUX NOUVELLES COMBINAISONS DANS *CHASCANUM* E. MEY.

par

ROSETTE B. FERNANDES \*

Reçu le 29-VI-1990.

DANS un article antérieur (*Plexipus* Rafin. versus *Chascanum* E. Mey. in Bol. Soc. Brot., Sér. 2, 57: 265-273, 1984), nous avons démontré que le genre *Plexipus* Rafin. avait la priorité sur *Chascanum* E. Mey., puisqu'il avait été publié en 1837, tandis que le dernier était de 1838. Et, d'accord avec la règle de la priorité du Code International de Nomenclature, nous avons fait le transfert dans *Plexipus* des taxa de *Chascanum* connus jusqu'à cette date-là, en décrivant encore une nouvelle sous-espèce. Cependant, un groupe de botanistes anglais (cf. Taxon 35, 2: 391-393, 1986), en se basant sur quelques faits dont quelques uns nous semblent discutables, a présenté à la Section de Nomenclature du 14ème Congrès International de Botanique (Berlin, 1987) une proposition concernant la conservation de *Chascanum*. Cette proposition étant acceptée, comme on le peut constater en consultant la dernière édition du Code (pag. 259, 1988), *Chascanum* ayant été, donc, considéré comme *nomen conservandum*, la plupart des taxa envisagés dans notre travail doivent reprendre leur ancien nom. Toutefois, deux nouvelles combinaisons s'imposent:

*Chascanum angolense* Moldenke subsp. *zambesiicum* (R. Fernandes) R. Fernandes, comb. nov.

Basion.: *Plexipus angolensis* (Moldenke) R. Fernandes subsp. *zambesiicus* R. Fernandes in Bol. Soc. Brot., Sér. 2, 57: 267 (1984).

\* Centro de Fito-sistemática e Fito-ecologia, EcC2, de l'I. N. I. C.

**Chascanum schlechteri** (Gürke) Moldenke forma **torrei** (Moldenke)  
R. Fernandes, comb. et stat. nov.

Basion.: *Chascanum schlechteri* var. *torrei* Moldenke in  
Bol. Soc. Brot., Sér. 2, 40: 121 (1966).

*Plexipus schlechteri* (Gürke) R. Fernandes var. *torrei*  
(Moldenke) R. Fernandes in Bol. Soc. Brot., Sér. 2, 57: 273  
(1984).

Nous prions les conservateurs des herbiers où se trouvent les  
échantillons des taxa de *Chascanum* avec nos déterminations  
comme *Plexipus* de faire les changements des noms qui s'imposent.

## NOTES SUR LES *VERBENACEAE*

### IX — REMARQUES SUR QUELQUES TAXA AFRICAINS DU GENRE *PREMNA* L.

par

ROSETTE B. FERNANDES \*

Reçu le 29-V-1990.

#### 1 — IDENTIFICATION DE *Premna holstii* Gürke var. *glandulifera* Moldenke

Le fait que le type de *Premna holstii* Gürke n'a pas été trouvé au sud de la Tanzanie et que, d'autre part, la seule espèce de *Premna* référée pour l'Afrique du Sud (Natal et Transvaal) est le *P. mooiensis* (H. Pearson) Pieper, cité aussi pour le sud du Mozambique (cf. MOLDENKE, Fifth Summ. Verbenaceae: 257 et 252, 1971), nous a porté à croire que le var. *glandulifera* Moldenke de *P. holstii*, décrit sur du matériel de Goba (Mozambique), devrait se rapporter plutôt à l'espèce sud-africaine. Nos suppositions se sont montrées correctes d'après l'étude que nous avons faite des types respectifs. Étant donné qu'une variété — var. *rudolphii* H. Pearson — avait été déjà décrite dans *P. mooiensis*, laquelle possède sur les calices des poils capités-glanduleux, principal caractère qui la sépare du type, et que, précisément, MOLDENKE distingue son var. *glandulifera* du type de *P. holstii* par la présence de poils capités-glanduleux non seulement sur les calices mais aussi sur les «ramulis pedicellisque», nous croyons que le var. *rudolphii* de *P. mooiensis* est identique au var. *glandulifera* de *P. holstii*. Cette identité a été établie même sans que nous ayons vu le type du premier taxon<sup>1</sup>, lequel, comme

\* Centro de Fito-sistemática e Fito-ecologia, EcC2, de l'I. N. I. C.

<sup>1</sup> Il nous a été impossible de localiser l'échantillon *Schlechter* 11935, récolté à Ressano Garcia, Maputo, Mozambique, type du var. *rudolphii* H. Pearson de *Premna mooiensis* (H. Pearson) Pieper.



celui du second, est une plante de la province de Maputo (Mozambique), en nous basant sur la description et la figure. De cette façon, dans la catégorie de variété, le nom à adopter est celui de H. PEARSON et non celui de MOLDENKE. Cependant, d'accord avec le critère que nous avons suivi pour d'autres entités dont la différence principale relativement au type est la présence d'un indument différent, nous préférons attribuer à la plante du Mozambique la catégorie de forme. Et, dans cette catégorie, nous choisissons l'épithète de MOLDENKE — *glandulifera* — bien plus suggestive que celle de H. PEARSON.

Il est curieux que MOLDENKE, à la même date — Janvier de 1966 — a identifié sur les étiquettes, comme *P. mooiensis*, deux autres échantillons de LISC (*Barbosa 707* et *Torre 2037*) récoltés au *locus classicus* — Goba — de *P. holstii* var. *glandulifera*.

Nous présentons dans le Tableau I les principales différences entre *P. mooiensis* (type et forma *glandulifera* en excluant l'indument) et *P. holstii*, parmi lesquelles il faut signaler les types

TABLEAU I

<i>Premna mooiensis</i> (H. Pearson) Piper	<i>P. holstii</i> Gürke
Arbre ou arbuste	Arbuste
Limbe des feuilles atténué vers et en coin à la base	Limbe des feuilles généralement plus grand, arrondi ou sous-cordé à la base
Pétioles relativement (à la longueur du limbe) plus longs	Pétioles relativement plus courts
Inflorescence racémiforme, laxa, pauciflore	Inflorescence corymbiforme, dense, pluriflore
Bractées linéaires, longues jusqu'à 3 mm.	Bractées triangulaires, bien plus courtes
Calice florifère long de 3-4,5 mm. (avec les lobes)	Calice long de 3-4 mm. (avec les lobes)
Lobes du calice égalant le tube, plus longs que larges, oblongs, obtus ou sous-aigus	Lobes du calice bien plus courts que le tube (hauts de moins de 0,5 mm.), plus larges que hauts, obtus ou arrondis
Lobes de la corolle ciliés	Lobes de la corolle non ciliés

de l'inflorescence et la forme et les dimensions des lobes du calice comme les plus remarquables.

Chez le forma *glandulifera* de *P. mooiensis*, les poils capités-glanduleux se trouvent sur les rameaux de l'inflorescence, les pédicelles, les calices et la partie des drupes saillante du calice, particulièrement à leur partie supérieure.

Nous présentons ci-dessous la nouvelle combinaison, sa synonymie et l'énumération des spécimens que nous avons examinés:

***Premna mooiensis*** (H. Pearson) Pieper forma *glandulifera* (Moldenke) R. Fernandes stat. et comb. nov.

*Premna holstii* Gürke var. *glandulifera* Moldenke in Bol. Soc. Brot., Sér. 2, 40: 121 (1966); Fifth Summ. Verbenaceae: 252 (1971), basion.

*Vitex mooiensis* H. Pearson var. *rudolphii* H. Pearson in Hook., Ic. Pl. 28: t. 2705 (1891); in Thiselt.-Dyer, Fl. Cap. 5, 1: 719 (1912).

*Premna mooiensis* var. *rudolphii* (H. Pearson) Moldenke in...; Fifth Summ. Verbenaceae 1: 257 (1971).

*Premna mooiensis* sensu Moldenke, op. cit.: 252 (1971) non (H. Pearson) Pieper.

**Mozambique.** Maputo: Goba-frontière, 12.xii.1947, *Barbosa* 707 (LISC, arbuste rameux, de 3-4 m., aromatique; fleurs blanches; fruits noirs; dans un sol compact, châtain-rougeâtre, pierreux); Goba, 6.xii.1942, *Mendonça* 1654 (LISC, holotype du var. *glandulifera* Moldenke; arbuste de 3 m.; fleurs blanches; dans les fourrés à feuilles caduques); près de la Gare de Goba, 16.xi.1940, *Torre* 2037 (COI; LISC; LMU; MOLDENKE; WAG; arbre de 4-5 m. des fourrés denses, le long des ruisseaux; tronc de 2 dm. de diam.; fleurs blanchâtres, aromatiques).

L'échantillon *Torre* 2037, par l'indument de poils capités-glanduleux moins denses, fait la transition vers le type de l'espèce.

## 2 — NOTES SUR QUELQUES ESPÈCES DU MOZAMBIQUE

### a — *Premna obtusifolia* R. Br.

L'échantillon *Kirk* s. n. a été récolté près du fleuve Rovuma (Mars, 1861); il est cité par BAKER (in Thiselt.-Dyer, Fl. Trop. Afr. 4: 290, 1900, sous *P. serratifolia* L.) comme provenant de

la Tanzanie («German East Africa»). Mais, d'après l'étiquette, il fut recueilli au Mozambique.

Ce spécimen diffère de la plupart des autres échantillons de *P. obtusifolia* du Mozambique, lesquels sont glabres à la page supérieure du limbe des feuilles et possèdent des poils sur les nervures à la page inférieure vers leur base et des touffes de poils aux angles formés par la nervure médiane avec les secondaires, par le suivant: ie pétiole, plus fort, est couvert de poils sétiformes, blancs, étalés; le limbe des feuilles présente sur la page supérieure les mêmes poils sétiformes, étalés, épars, et des poils semblables mais plus denses, surtout vers leur base à la page inférieure (surface et nervures); les touffes de poils axillaires sont absentes. MOLDENKE a décrit le var. *pubescens* de *P. obtusifolia*, basé sur une plante cultivée à Java. Cependant, cette variété, par le type de l'indument, diffère du spécimen du Mozambique. Il est possible que la plante du Rovuma corresponde à une forme nouvelle. Néanmoins, un autre échantillon (*Mogg* 32569, SRGH), aussi du Mozambique et de la même province (Nyassa, Ile de Caldeira), est intermédiaire entre *Kirk* s. n. et les autres exemplaires en ce qui concerne l'indument, puisqu'il présente des poils fins (non sétiformes) sur la page supérieure, entre les caractéristiques poils sur les nervures et les aisselles de celles-ci à l'inférieure. De cette façon, nous préférons ne pas séparer le spécimen du Rovuma dans une nouvelle forme, avant que d'autres récoltes de plantes avec les mêmes caractères ne soient faites.

b — *Premna senensis* Klotzsch et *P. oligotricha* Bak.

*Clerodendrum kibwesense* a été décrit par MOLDENKE (in *Phytologia*, 61: 404, 1986) qui lui a référé seulement deux échantillons, le type (*Scheffler* 62, BR, holotype; s, isotype) de Tanzanie (Kibesi) et *Hornby* 2499 du Mozambique (Nyassa, Mandimba). Comme VERDCOURT (information *in litt.*) a identifié *Scheffler* 62 comme *P. oligotricha* Bak., on pourrait s'attendre à que le spécimen du Mozambique appartenait à cette dernière espèce. Cependant, son étude nous a montré qu'il s'agit de *Premna senensis* Klotzsch. *Hornby* 2499 est un échantillon sans fleurs, mais, malgré cela, à cause de son indument, des forme et dimensions des feuilles, forme et dimensions du calice fructifère et forme et dimensions des drupes, il appartient à l'espèce décrite par KLOTZSCH, assez

commune dans le Mozambique au nord du fleuve Save, particulièrement dans la province de Tete. Pour la province de Nyassa, *Hornby* 2499 est, néanmoins, la seconde récolte, ce qui peut être attribué à une exploration peu intensive de la région de Mandimba. En effet, cette localité se situe tout près de la frontière avec le Malawi et, du sud de ce pays, il y a plusieurs récoltes de *P. senensis*, quelques-unes [*Brummitt, Polhill & Patel* 15992 (K), de Mangochi; *Jackson* 1386 (FHO; K), de Nankumba] presque à la même latitude de celle de Mandimba. On peut, donc, conclure que *Clerodendrum kibwesense* Moldenke doit être supprimé de la liste des espèces du genre *Clerodendrum* et que, autant que le matériel du genre *Premna* étudié par nous le permet conclure, *P. oligotricha* ne se trouve pas au Mozambique.

c — *Premna* sp. A.

*Premna hildebrandtii* sensu Moldenke, Fifth Summ. Verbenaceae 1: 252 (1971).

L'échantillon *Mendonça* 1004 (LISC), récolté à Cabo Delgado, province de Nyassa, Mozambique (entre Nangade et Palma, à 17 km. de Palma, 20.x.1942), fut déterminé par MOLDENKE sur l'étiquette, en 1966, comme *P. hildebrandtii* Gürke. Sa confrontation avec un isosytype de ce taxon (*Hildebrandt* 2008, BM) nous a permis de constater qu'il en est très différent: poils du limbe des feuilles un peu épars et non formant un tomentum très dense; forme, consistance et couleur des feuilles différentes; inflorescence en corymbe et non en panicule; etc. Il est possible qu'il s'agit d'une espèce nouvelle. Cependant, comme le dit spécimen ne possède pas des fleurs ouvertes, nous préférons ne pas la décrire avant que d'autres récoltes ne soient faites dans la région.

MOLDENKE (loc. cit.) réfère *P. hildebrandtii* Gürke pour le Mozambique, basé possiblement sur le même échantillon *Mendonça* 1004. Comme nous n'avons vu aucun spécimen mozambicain de l'espèce de GÜRKE jusqu'à présent, il faut la supprimer de l'inventaire de la flore du Mozambique. D'autre part, elle ne se trouve pas aussi au Zimbabwe, malgré la citation de ce pays par le même auteur (op. cit.: 248) pour l'aire de *P. hildebrandtii*, puisque tout le matériel du Zimbabwe du genre *Premna* que nous avons examiné dans les herbiers appartient au *P. senensis* Klotzsch.





Par la forme et la couleur du limbe des feuilles (vert foncé sur les deux pages) et par l'inflorescence en corymbe, l'échantillon *Mendonça* 1004 est semblable aux *P. obtusifolia* R. Br. et *P. velutina* Gürke, en différant des deux, à première vue, par l'indument des feuilles, présent sur les deux faces de celles-ci, et par le pétiole plus long. En prenant en considération l'ensemble de ses caractères, il est possible qu'il soit un hybride entre *P. senensis* (espèce à longs pétioles et limbe des feuilles pubescent de chaque côté) et l'une ou l'autre des espèces ci-dessus mentionnées, lesquelles, comme *P. senensis*, ont été trouvées dans la province de Nyassa.

### 3 — NOUVEAUX SYNONYMES POUR *Premna angolensis* Gürke

L'observation des types respectifs se trouvant dans BR nous a permis de constater que les taxa suivants, décrits comme nouveaux, doivent être inclus, comme des synonymes, dans *P. angolensis*:

*Premna angolensis* var. *cuneata* De Wild. in Ann. Mus. Congo, Bot., Sér. 5, 3: 127 (1909).

La différence des feuilles, cunéiformes à la base, présentée par la variété relativement au type, ne se maintient pas, puisque la base des feuilles chez le *P. angolensis* Gürke varie depuis arrondie ou cordée jusqu'à sous-cunéiforme ou cunéiforme, parfois dans la même récolte. Des feuilles à base cunéiforme comme celles du type du var. *cuneata* du Zaïre (entre Tumba et Kimpese) ont été trouvées aussi chez des échantillons de l'Angola.

*Premna claessensii* De Wild., Pl. Bequaert. 5: 21 (1929).

Ce taxon, récolté à Foki (Zaïre) et dont le type est *Claessens* 1017 (BR), le seul échantillon lui référé par DE WILDEMAN, est placé par son auteur dans le groupe de *P. quadrifolia* Schumacher & Thonn. Malgré la pilosité un peu abondante des feuilles, par la marge entière de celles-ci, par les pétioles relativement longs, par le type de poils de l'indument (sur les pétioles, le limbe des feuilles et l'inflorescence), il nous semble que la plante s'écarte de *P. quadrifolia*, en se rapprochant plutôt du *P. angolensis*, dont elle



représente une forme à feuilles pubescentes comme celles signalées par HEPPEL (cf. Fl. W. Trop. Afr. éd. 2, 2: 438, 1963) pour *P. angolensis*.

*Premna elskensii* De Wild., Pl. Bequaert. 5: 22 (1929).

Il est tout-à-fait identique au *P. angolensis* en ce qui concerne les principaux caractères, en différant seulement par la présence de quelques poils vers la base du limbe des feuilles, à la page inférieure. Son type est *Elskens* 102 (BR), récolté à Kitele, Urundi, le 6.xi.1923, qui est le seul échantillon que DE WILDEMAN a référé à son espèce.

*Premna quadrifolia* var. *subglabra* Moldenke in Phytologia, 4, 3: 181 (1953).

Ce taxon, qui a pour type le spécimen *Luja* 119 (BR), du Zaïre, n'a rien à faire avec *P. quadrifolia*, dont il diffère non seulement par la presque glabrescence des feuilles, le seul caractère signalé par MOLDENKE pour le distinguer du type, mais aussi par la marge de celles-ci, entière et non crénelée, par l'acumen non brusquement rétréci à la base et plus court, par les pétioles plus longs, par les fleurs plus petites, etc. Cette variété, par l'ensemble de ses caractères, se rapporte au *P. angolensis*.

#### 4 — *Premna polita* Hiern et *P. congolensis* Moldenke

Le fait que MOLDENKE (Fifth Summ. Verbenaceae 1: 244, 1971) cite *Premna congolensis* Moldenke pour la province du Congo (Angola), tandis que R. GOOD (Gossweiler's Pl. in Journ. of Bot. 68, Suppl. 2: 140, 1930) réfère pour cette région seulement le *P. polita* Hiern (espèce que MOLDENKE signale dans l'Angola à peine pour Lunda) nous a porté à éclaircir ce cas. De cette façon, nous avons entrepris l'étude non seulement des échantillons de GOSSWEILER inclus par R. GOOD dans *P. polita*, de ceux appartenant au *P. polita* cités par HIERN (Cat. Afr. Pl. Welw. 4: 833, 1900), mais encore du type de *P. congolensis* Moldenke et d'autres exemplaires de ce taxon du Zaïre. De plus, le type de *P. congolensis* var. *integrifolia* Moldenke, ainsi que les types de *P. matadiensis* Moldenke et de *P. matadiensis* var. *parvifolia* Moldenke ont été encore étudiés, puisque MOLDENKE (loc. cit.) réfère la dernière

entité aussi pour l'Angola. Nous présentons ensuite notre étude des taxa décrits par MOLDENKE, en faisant leur confrontation avec *P. polita*.

*Premna congolensis* Moldenke in Phytologia, 4: 180 (1953)

Le type de ce taxon (*Dacrémont* 361bis, BR), le seul échantillon qui lui a été référé par MOLDENKE lors de sa publication, ce qui ne permettait pas alors d'avoir une connaissance de la variation de l'espèce, d'autant plus qu'il est assez pauvre (partie terminale d'un rameau fleuri, à cinq feuilles), a été récolté à Matadi. Les feuilles complètes qu'on a pu mesurer vont de 8,5 à 10,5 cm. de longueur et de 3 à 5,5 cm. de largeur et elles sont ovées, arrondies à la base, assez atténuées vers le sommet, à acumen long, étroit, aigu, et dentées à la marge; le pétiole mesure de 1 à 2 cm. L'indument de la partie supérieure du rameau, ainsi que de l'inflorescence, n'est pas «minutely puberulous» comme dit MOLDENKE, mais formé par des poils très courts, assez rigides et étalés.

Sa comparaison avec les syntypes de *P. polita* montre qu'il s'agit de deux taxa différents: non seulement les feuilles du dernier sont plus petites, ne dépassant pas 7,8 cm. de longueur et 3(3,2) cm. de largeur, mais elles sont relativement plus étroites, comme on le peut voir sur le Tableau II. De plus, l'indument de *P. polita* est différent et les dents du calice sont plus développés chez le *P. polita* que chez le *P. congolensis*.

*Premna congolensis* var. *integrifolia* Moldenke in Phytologia, 4: 181 (1953).

Après la description du type du *P. congolensis*, vient celle de la variété, la distinction entre celle-ci et le premier, d'après MOLDENKE, étant seulement la marge entière des feuilles du var. *integrifolia*. Un seul échantillon (*Gillet* 4022, BR), récolté à Moanda (Zaïre, sur la côte, un peu au nord de Banana) a été référé à la variété. L'observation de celui-ci nous a montré qu'il diffère du var. *congolensis* non seulement par les feuilles entières, mais aussi par les poils des pétioles, de la base des feuilles, de la partie supérieure du rameau et de l'inflorescence lesquels sont un peu plus longs que chez le type, ce qui leur confère une presque hispidité, et par les feuilles plus petites (longueur 4-7 cm., largeur

TABLEAU II

	Longueur des feuilles	Largeur des feuilles	Relation long./larg. des feuilles l. f.	Longueur des pétioles	Relation long. des feuilles/long. des pét. l. p.
<i>Premna matadiensis</i> (holotype)	4,2-11 cm.	3,5-7,5 cm.	1,2-1,5	1-3,8 cm.	2,4-2,8
<i>P. matadiensis</i> var. <i>parviflora</i> (holotype)	2,2-5,5 cm.	1,2-3,3 cm.	1,7-2,2	0,6-2 cm.	2,5-4,3
<i>P. congolensis</i> (holotype)	8,3-10,5 cm.	4-5,5 cm.	1,9-2,1	1-2 cm.	4,1-5,3
<i>P. congolensis</i> var. <i>integrifolia</i> (holotype)	4-7 cm.	2,3-4 cm.	1,5-2,0	1-1,6 cm.	3,8-5,2
<i>Gossweileri</i> 13838	4-7,7 cm.	2,3-4,2 cm.	1,6-2,0	0,7-2,4 cm.	2,7-5,7
<i>P. polita</i> (syntypes)	5,1-7,8 cm.	2-3,2 cm.	2,1-3,1	1-2,1 cm.	3,7-6,5

2,3-4 cm) et moins longuement acuminées (v. Tableau II). Sa confrontation avec *P. polita* montre aussi qu'il s'agit de deux entités distinctes.

*Premna matadiensis* Moldenke in Phytologia, 3: 422 (1951)

Le type de *P. matadiensis*, le seul échantillon que MOLDENKE a inclus dans sa nouvelle espèce, est *E. & M. Laurent* s. n. (BR) et il a été récolté à Matadi, c'est-à-dire, au même endroit (ou proche) où fut cueilli le type de *P. congolensis*. Matadi se situe sur la rive gauche du fleuve Zaïre dans la frontière avec l'Angola, non loin du village angolais de Noqui. L'échantillon, fructifié, se compose de quelques feuilles, la plupart détachées, qui varient de 4,2 à 11 cm. de longueur et de 3,5 à 7,5 cm. de largeur, le pétiole mesurant de 1 à 3,8 cm. Il diffère du type de *P. congolensis*, dont il possède un indument semblable et des feuilles aussi dentées, par la consistance plus grande de celles-ci, par leur forme (elles sont relativement plus larges, non atténuées vers le sommet et à acumen plus court), par les plus grandes dimensions de quelques-unes et par les pétioles plus longs en valeur absolue et en relation avec la longueur du limbe (v. Tableau II). Apparemment, il s'agit d'une espèce indépendante de *P. congolensis*, mais seulement d'autres récoltes de la même place pourront éclaircir en définitif ce cas.

*Premna matadiensis* var. *parvifolia* Moldenke in Phytologia, 4: 181 (1953).

Cette variété a comme type le spécimen *Wellens* 1015 (BR), récolté à Banana (Zaïre), un peu au sud de Moanda, *locus classicus* de *P. congolensis* var. *integrifolia* Moldenke, sur la côte, non très loin de l'embouchure du fleuve Zaïre. Il est aussi l'unique échantillon que, à cette date, l'auteur lui réfère. Tout au moins jusqu'à 1971 (Fifth Summ. Verbenaceae: 231), MOLDENKE continuait à mentionner les quatre entités ci-dessus énumérées pour le Zaïre, en référant les *P. congolensis* et *P. matadiensis* var. *parvifolia* aussi pour l'Angola (op. cit.: 244). L'observation du spécimen *Wellens* 1015 nous a montré que, par l'ensemble de ses caractères — feuilles plus minces, relativement plus étroites, plus atténuées vers le sommet et à acumen plus aigu et pétioles plus courts — il s'approche plus du *P. congolensis* que de *P. matadiensis*. De plus, l'indument est identique à celui de *P. congolensis* var. *integrifolia*, dont



les feuilles, bien que entières, sont plus petites que celles du var. *congolensis* (v. Tableau II); et les fleurs de Wellens 1015 sont aussi identiques à celles de *P. congolensis* (type et variété). Nous avons, donc, conclu que le var. *parvifolia*, à être maintenu, devra être transféré dans le *P. congolensis*. D'autre part, la récolte Gossweiler 13838, de l'Angola (Dundo), dont l'échantillon de B a été déterminé par MOLDENKE comme *P. matadiensis* var. *parvifolia*<sup>2</sup>, possède des feuilles atteignant  $7,7 \times 4,2$  cm., entières ou dentées, plus ou moins atténuées, à acumen un peu long ou court, se plaçant en ce qui concerne leurs dimensions entre le type de *P. congolensis* et le type du var. *parvifolia* de *P. matadiensis* (v. Tableau II). De plus, la variation de la relation longueur/largeur des feuilles (l. f.) est plus proche de celles de ces deux taxa (v. Tableau II) que de celle de *P. matadiensis* type. Cela s'accorde avec notre point de vue de considérer le var. *parvifolia* dans *P. congolensis* et non dans *P. matadiensis*, point de vue renforcé encore par l'observation d'autres échantillons du Zaïre déterminés comme *P. congolensis* (détermination qui nous semble correcte) et où, parfois chez le même exemplaire, on observe une variation de caractères comportant le var. *parvifolia*: ainsi, chez Compère 1638, de Nkusu, il y a des feuilles longuement atténuées-acuminées, relativement étroites (p. ex.:  $4,5 \times 1,5$  cm.) et d'autres non atténuées et courtement acuminés et relativement plus larges (p. ex.:  $5,7 \times 3,4$ ;  $3,7 \times 2,3$  cm.). Tout cela nous a porté à conclure que le var. *parvifolia* n'a pas de valeur taxonomique et qu'il doit être introduit comme un synonyme dans *P. congolensis*.

Étant donné que la présence de dents dans les marges des feuilles n'est pas aussi constante, en existant chez un même échantillon des feuilles entières et d'autres dentées, et que le nombre de dents est variable, parfois une seule d'un côté, il nous semble que le var. *integrifolia* de *P. congolensis* ne peut pas aussi être maintenu. Toutefois, par les feuilles relativement larges, quelques spécimens s'approchent de *P. matadiensis*, en s'éloignant cependant par leurs dimensions plus petites et surtout par les pétioles toujours relativement plus courts.

<sup>2</sup> La référence de ce taxon pour l'Angola (cf. Fifth Summ. Verbenaceae: 244, 1971) a été basée, probablement, sur cet exemplaire de GOSSWEILER, puisque nous n'avons vu aucun autre ainsi déterminé par MOLDENKE.



L'étude des échantillons de l'Angola référés par R. GOOD (loc. cit.) à *P. polita* nous a montré qu'ils ne peuvent pas s'inclure dans cette espèce mais que, par contre, ils sont très semblables à des spécimens du Zaïre considérés par nous et par d'autres détermineurs de BR comme *P. congolensis*. D'ailleurs, tous les exemplaires angolais considérés par nous dans *P. congolensis* ont été récoltés dans les provinces du nord de l'Angola, quelqu'uns tout près de la frontière avec le Zaïre, tandis que *P. polita* a été trouvé plus au sud, dans le Cuanza Norte.

Avant de conclure, nous voulons rappeler l'attention pour le suivant: étant donné que les types respectifs de *P. matadiensis* Moldenke et *P. congolensis* Moldenke ont été récoltés les deux à Matadi, des récoltes plus nombreuses de cette place sont nécessaires pour savoir si, en fait, il s'agit de deux espèces indépendantes. En présence du matériel actuellement vu par nous et en considérant, de plus, que le type de *P. matadiensis* ne possède pas de fleurs, nous l'avons interprété comme différent de *P. congolensis*. Cependant, si on vient à démontrer qu'une seule espèce existe à Matadi, alors le nom qu'on lui doit donner est *P. matadiensis*, puisque il est le plus ancien.

Nous présentons ci-dessous la synonymie que nous avons établie pour *P. congolensis* et la liste des spécimens de ce taxon que nous avons examinés:

***Premna congolensis*** Moldenke in *Phytologia*, 4: 180 (1953); Fifth Summ. *Verbenaceae* 1: 231 et 244 (1971). Type: Zaïre, *Dacré-mont* 361bis (BR).

*Premna congolensis* var. *integrifolia* Moldenke in *Phytologia*, 4: 181 (1953); Fifth Summ. *Verbenaceae* 1: 231 (1971). Type: Zaïre, *Gillet* 4002 (BR).

*Premna matadiensis* var. *parvifolia* Moldenke in *Phytologia*, 4: 181 (1953); Fifth Summ. *Verbenaceae* 1: 231 et 244 (1971). Type: Zaïre, *Wellens* 1015 (BR).

*Premna polita* sensu R. Good in *Journ. of Bot.* 68, Suppl. 2 (Gamopet.): 140 (1930) non Hiern (1900).

Outre les types, cités plus haut, nous avons vu:

**Zaïre:** *Cartier* 277 (BR), de Lemba; *Compère* 1638 (BR), de Nkusu, Thysville; *Dacré-mont* 193 (BR), de Matadi; *Gillet* s. n. (BR).

s. l.; *Gillet* 1191 (BR), de Kimuenza; *Pawels* 3360 (BR), de Kimuenza; *W. Robyns* 4274 (BR), de Kimuenza.

**Angola:** *Gossweiler* 8038 (BM; COI; LISU), de Pango Mongo (Cabinda); *Gossweiler* 8509 (BM), de Santo António do Zaire; *Gossweiler* 8963 (BM), 8963b (BM; LISJC), 9187 (BM) et s. n. (BM), tous de Sumba, Peco (Zaïre); *Gossweiler* 13838 (B; BM; K), de Dundo (Lunda).

L'échantillon *Gossweiler* 8617 (BM), d'accord avec les données de l'étiquette, a été récolté dans «Muanda stream, Lower Congo, pr. Congo R.». Selon la Gazetteer n° 20 (Angola), les coordonnées géographiques de la seule «Muanda stream» y référée sont 7° 23' lat. S et 15° 24' long. E, lesquelles correspondent à une localité située dans la province angolaise de l'Uïge, très loin, donc, du fleuve Congo. Il est possible que le «Muanda» de l'échantillon de GOSSWEILER corresponde à Moanda (prononcé en portugais de la même façon que Muanda), localité que se situe sur la côte du Zaïre (ancien Congo Belge), près de l'embouchure du fleuve Congo (actuel Zaïre), d'autant plus qu'elle est le *locus classicus* de *P. congolensis* var. *integrifolia* (= *P. congolensis*) et que, d'autre part, sur l'autre rive du même fleuve, en Angola, à Santo António do Zaïre, le *P. congolensis* a été aussi cueilli. De cette façon, le n° 8617 aurait été récolté au Zaïre et non dans l'Angola (à moins qu'une autre «Muanda stream» n'ait été pas enregistrée dans la citée Gazetteer).

The cellulase activity was assayed with the soluble substrate CMU (carboxymethyl cellulose) by reading at 120 min the O.D. of the turbidity degree obtained after a 4 hour incubation period at 30°C of a 1% solution of CMU with 1 ml of the extracellular extract from 4, 15, 22 and 30 day old cultures growing in a liquid medium containing CMU (1%) (see Fig. 2). The tests of use of viscosity of the CMU with the culture supernatants obtained with the corresponding extracts are outlined by Fig. 3.

The cellulose-degrading activity was tested by adding one or five mycelia suspensions (vegetal, fungal and putrefied, respectively), aseptically, to a nutrient medium containing 1% lignin and 1% tyrosine in the main agar growth medium. The results are given by the intensity of the colour, the diameter of the reaction and the growth of the mycelium in that medium (see Table 1 and Fig. 4).

These results were presented in the 1964 FECS, Brussels International Conference Centre Meeting, 24-29 July 1964.



## POLYPORACEAE

### IV — CELLULOLYTIC AND POLYPHENOLOXIDASIC ACTIVITIES OF *GANODERMA RESINACEUM* BOUD. IN PAT.\*

NATÉRCIA TEIXEIRA RODEIA; ANA M. GONÇALVES  
& LUÍS B. SIMÕES

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências,  
Bloco C2, Campo Grande, 1700 Lisboa — Portugal

Received 1 June, 1990.

#### SUMMARY

Out of 38 fungi species of *Polyporaceae* fifty-seven strains were tested for their ability to produce hydrolytic enzymes which degrade insoluble cellulose (Avicel, Whatman and dyed cotton cellulose). The cellulose powder was either incorporated into a basal medium containing agar, mineral salts and growth factors or layered on a basal medium containing agar, mineral salts, yeast extract and growth factors.

The white-rot species, *Ganoderma resinaceum* Boud. (456, 4595, 4644, 4646), was able to produce clearing zones on a cellulose soluble or insoluble medium. Most of these strains rapidly released the dye from the cotton cellulose (see Fig. 1).

The cellulasic activity was also tested with the soluble cellulose CMC (carboxymethylcellulose) by reading at 525 nm the O. D. of the reducing sugars obtained after a 4 hour incubation period of 10 ml of a 1% solution of CMC with 2 ml of the extracellular extract from 8, 15, 22 and 30 day old cultures growing in a liquid medium containing CMC (1%) (see Fig. 2). The tests of loss of viscosity of the CMC (with an Ostwald viscosimeter) obtained with the extracellular extracts are outlined in Fig. 3.

The polyphenoloxidasic activity was tested by adding one of nine phenolic compounds (catechol, gallic acid, guaiacol, hydroquinone, naphtol, phloroglucinol, resorcinol, tannic acid and tyrosine) to the malt agar growth medium. The results are given by the intensity of the colour, the diameter of the reaction and the growth of the mycelia in that medium (see Table 1 and Fig. 4).

\* These results were presented in the «15th FEBS, Brussels International Conference Centre, Meeting, 24-29 July 1983».

## INTRODUCTION

SINCE 1950, PINTO-LOPES and other authors drew attention to the devastation of the woody tissues of trees and timber caused by fungi of the *Polyporaceae* family.

Since 1969 a catalogue has been published by RODRIGUES listing the different species of *Polyporaceae* found in Portugal, showing the host trees and their geographical distribution. The species were identified by MELO (1978a, b; 1980, 1981a, b; 1983) and by MELO *et al.* (1980, 1983) according to the DONK system (1974).

Different types of rot are caused by species of *Polyporaceae* (white or brown-rot; alveolar, cubic or lamelar).

It is our aim to find out what substrate they prefer (cellulose or/and lignin) and to detect their cellulasic and polyphenoloxidasic activities. For these purposes tests on media with cellulose (soluble or insoluble) or with phenolic compounds were carried out and tests on lignin are now in process.

## MATERIAL AND METHODS

### Material

The cultures of *Ganoderma resinaceum* (456, 4595, 4644, 4646) were isolated from mycelium of fruity-bodies collected from trees and maintained by subculture on potato-dextrose-agar (PDA) or on malt agar (MA).

### Methods

All tests were carried out at an incubation temperature of  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . In order to inoculate the same quantity of mycelium, discs were cut-out from agar medium growing cultures using a 12 mm cork-borer.

Cellulase production was evaluated by the appearance of clearing zones on an insoluble cellulose medium around the inoculum and its extent recorded as the diameter in mm, according to NILSSON (1973, 1974a), RAUTELA & COWLING (1966) or the free dye diffused into the basal layer of medium (PETTERSON *et al.*, 1963; SMITH, 1977). The CMC activity was tested in a



liquid medium containing 1% of CMC in buffer (NORKRANS, 1967 with some modification).

For that purpose 5 ml of an inoculum prepared from a macerate of 5 mycelial plugs in 25 ml of water was added to 100 ml of the liquid medium containing 1% of CMC. After 8, 15, 22 and 30 days of incubation the mycelium was harvested by centrifugation (30 min. at 10,000 r.p.m. at 0° C) and then the extracellular extract stored frozen. Two ml of the supernatant was then added to 10 ml of a buffer containing 1% of CMC and after a 4 hour incubation period the concentration of the reducing sugars read at 525 nm following the SOMOGYI-NELSON method of evaluation (SOMOGYI, 1952; NELSON, 1944).

The activities were tested at different pH and temperature values and from differently aged cultures.

Polyphenoloxidasic activity was tested on malt agar medium containing one of nine phenolic compounds (catechol, gallic acid, guaiacol, hydroquinone, naphtol, phloroglucinol, resorcinol, tannic acid and tyrosine): the growth of the mycelium from the inoculum and the extent of the coloured zone around was recorded after 5 days of incubation.

## RESULTS

As for *G. resinaceum* it can be said that the cellulose powder degrades and that the dye is released from the cotton cellulose (Table 1 and Fig. 1). In CMC the activity was evaluated and the best conditions were pH 5.3-5.8, 50° C and a 22 day old culture (Fig. 2). The loss of viscosity was best at pH 5.8, 50° C and a 15 day old culture, which confirms the results obtained with CMC and reducing sugars (Fig. 3).

It has a good growth rate on malt agar and phenolic compounds and it also exhibits a phenoloxidasic activity with catechol, gallic acid, guaiacol, hydroquinone naphtol, phloroglucinol and tannic acid (see Fig. 4).

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The most important work carried out with Fungi species with cellulasic or polyphenoloxidasic activities does not make use of *Polyporaceae*.

TABLE 1

Effect of white-rot fungi *Ganoderma resinaceum* (*Polyporaceae*) on various insoluble celluloses or different phenols as measured by presence or absence of colored zones in an agar medium (a) (b)

	(c)	Strains		
		4595	4644	4646
Catechol ( $11 \times 10^{-3}M$ )	R	+	++	+
	ØR	45	40	20
	G	35	30	30
Gallic Acid (0.5%)	R	++++	++	+++
	ØR	40	40	42
	G	30	35	20
Guaiacol ( $1 \times 10^{-5}M$ )	R	+++++	+++	+++++
	ØR	50	50	40
	G	45	45	30
Hydroquinone ( $1 \times 10^{-5}M$ )	R	—	—	—
	ØR	—	—	—
	G	70	40	65
Naphtol (0.05%)	R	+++++	++++	+++
	ØR	35	55	75
	G	55	60	55
Pholoroglucinol (0.5%)	R	+	+	+
	ØR	48	30	35
	G	45	22	29
Resorcinol ( $1 \times 10^{-3}M$ )	R	—	—	—
	ØR	—	—	—
	G	65	50	50
Tannic Acid (0.5%)	R	++++	++++	++++
	ØR	70	67	40
	G	55	40	30
Tyrosine (0.5%)	R	—	—	—
	ØR	—	—	—
	G	30	18	30
Malt (2%)	D	white	white	white
	R	white	white	white
	G	85	50	55
Rot		white-rot	white-rot	white-rot
Cellulose azure (1%)	R	+	++	+
	CM	lilac	lilac	blue
Cellulose powder (1%) (Clear zones) (mm)		+	+	+
		38	35	35

- (a) All values are the average of six replicates after 5 days growth.
- (b) System used to record coloration: —, Negative, no colour discoloration of the agar under or about the mat. +, Diffusion zone light to dark colour, formed under inoculum at center of mat and visible only from under side of dish. In case no growth takes place, a faint colour discoloration under the inoculum. ++, Diffusion zone light to dark colour, formed under most of mat but not extending to margin. Visible from under side only. +++, Diffusion zone light to dark colour, extending a short distance beyond the margin of the mat and visible from the upper side. +++++, Diffusion zone dark colour, opaque, extending considerably beyond margin of fungus mat. ++++++, Diffusion zone very intense, dark colour, opaque, forming a wide corona about mat.
- (c) R = Reaction; ØR = Diameter (mm) of reaction; G = Mycelian Growth; CM = Colour of medium.



Fig. 1. — *Ganoderma resinaceum* (4595, 4644); first tube-control with cotton blue cellulose.

Some of the results obtained are in line with those of NILSSON (1974a, b), RAUTELA & COWLING (1966), SMITH (1977), KIRK & KELMAN (1965) but some of the species used in this work are different from those studied by those authors.

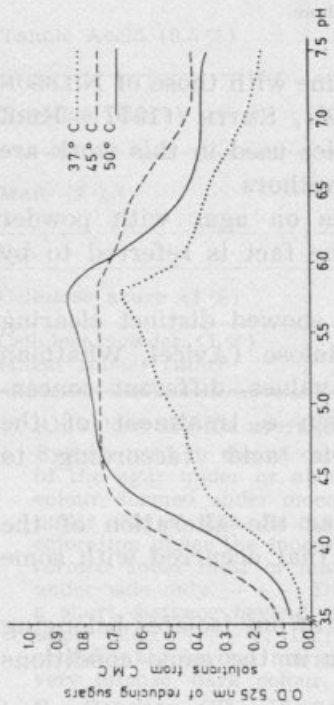
The visualization of clearing zones on agar with powder cellulose was very difficult but the same fact is referred to by SMITH (1977).

Among 25 white-rot fungi only 13 showed distinct clearing zones after using different powder cellulose (Avicel, Whatman or cotton dyed cellulose) different pH values, different concentrations, different temperatures or even a treatment of the cellulose powder with orthophosphoric acid (according to WALSETH, 1952).

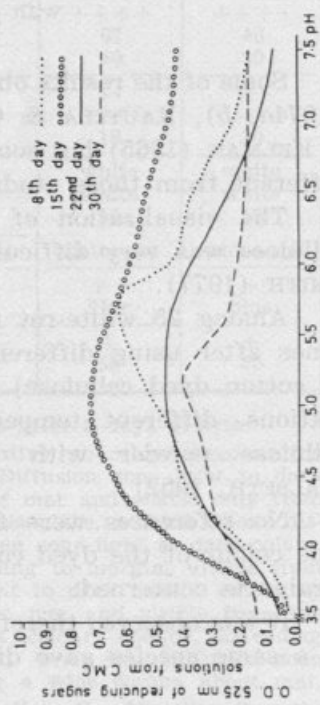
No references were found as far as the alteration of the blue colour of the dyed cotton cellulose that occurred with some strains is concerned.

It was observed therefore, that some of our isolates belonging to a same species gave different results in the same conditions

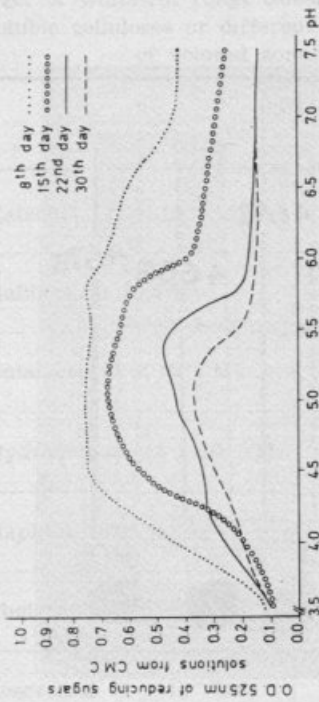
4646-8th day of culture



4646-37°C ± 1°C



4646-45°C ± 1°C



4646-50°C ± 1°C

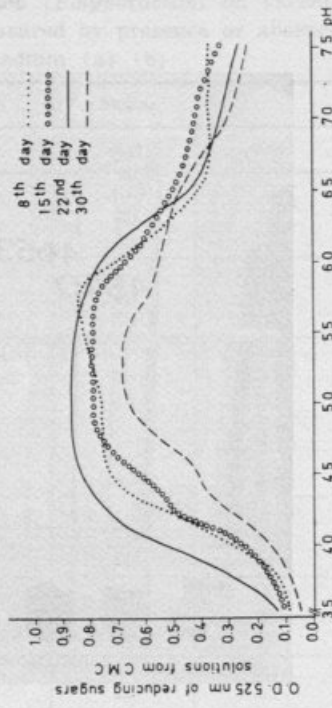


Fig. 2.—Cellulase activity of extracellular extracts of *G. resinaceum* by conversion of CMC in reducing sugars. Selection of the best activity depending on pH, temperature and age of cultures.



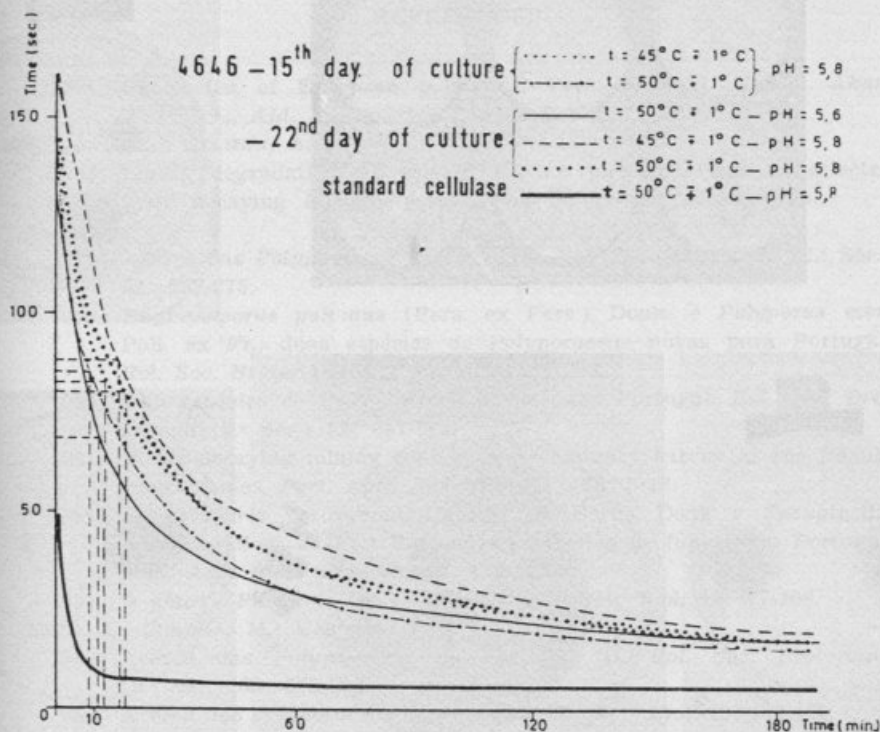


Fig. 3. — Cellulosic activity of extracellular extracts of *G. resinaceum* on CMC by loss of viscosity.

and it can be suggested that this fact can be attributed to differences related to host specificity or to geographical races within species fungi.

It is possible that numeric taxonomic analysis on the data collected in the course of this work (which we intend to carry out) will show that some of those isolates belong to a different variety.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank ALDA CORREIA, MANUEL CORREIA and JOSÉ CARDOSO (all technicians) for their co-operation and dedication as well as for their constant interest in our results. We are also grateful to them for the photographs which appear in this report.



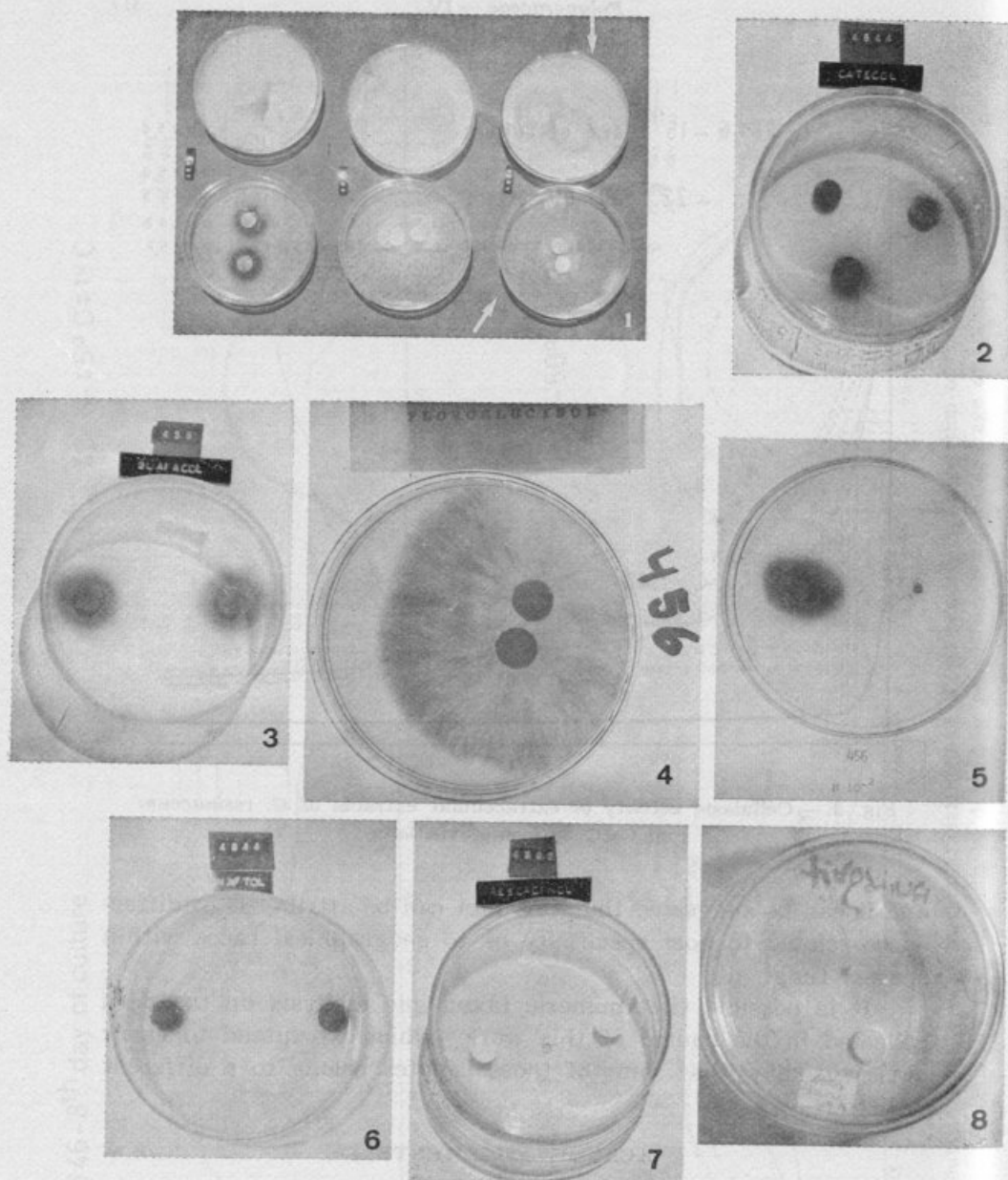


Fig. 4. — Phenoloxidase activity of *Ganoderma resinaceum* (456; 4595; 4644 or 4646) on malt agar with different phenolic compounds. Gallic and Tannic Acid, Catechol, Guaiacol, Hydroquinone, Naphthol, Phloroglucinol, Resorcinol or Tyrosine.

- |                 |                    |                |
|-----------------|--------------------|----------------|
| 1 — Tannic acid | 3 — Guaiacol       | 6 — Naphthol   |
| Gallic acid     | 4 — Phloroglucinol | 7 — Resorcinol |
| 2 — Catechol    | 5 — Hydroquinone   | 8 — Tyrosine   |

## REFERENCES

- DONK, M. A.  
 1974 Check list of European polypores. *Verh. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch., Afd. Natuurkde., Tweede Reeks, D.* 62.
- KIRK, T. K.; KELMAN, A.  
 1965 Lignin degradation as related to the phenoloxidases of selected wood decaying *Basidiomycetes*. *Phytopathology*, **55**: 739-745.
- MELO, I.  
 1978a *Acerca das Polyporaceae de Portugal*. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.) **52**: 257-275.  
 1978b *Buglossoporus pulvinus* (Pers. ex Pers.) Donk. e *Polyporus mori* Poll. ex Fr., duas espécies de *Polyporaceae* novas para Portugal. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.) **52**: 277-283.  
 1980 Sete espécies de *Polyporaceae* novas para Portugal. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.) **53**: 647-662.  
 1981a Fungi decaying mining timber. A preliminary survey at the Panasqueira mines. *Port. Acta Biol.* (Sér. B), **13**: 5-12.  
 1981b *Incrustoporia percardida* (Malenç. & Bert.) Donk e *Spongipellis spumeus* (Sow. ex Fr.) Pat., novas colheitas de fungos em Portugal. *Port. Acta Biol.* (Sér. B), **13**: 119-125.  
 1983 O género *Phellinus* Quéél. em Portugal. *Rev. Biol.* **12**: 77-108.
- MELO, I.; CORREIA, M.; CARDOSO, J.  
 1980 *Acerca das Polyporaceae de Portugal*. II. *Bol. Soc. Broteriana* (2.ª Sér.) **53**: 675-723.  
 1983 *Acerca das Polyporaceae de Portugal*. III. *Rev. Biol.* **13**: 103-120.
- NELSON, N.  
 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* **153**: 375-380.
- NILSSON, T.  
 1973 Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Stud. for. Sue.* n° 104.  
 1974a Comparative study on the cellulolytic activity of white-rot and brown-rot fungi. *Material und Organismen* **9** (3): 173-198.  
 1974b The degradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannanase and amylase by wood-attacking microfungi. *Stud. for. Sue.* n° 114.
- NORKRANS, B.  
 1967 Cellulose and cellulolysis. *Advances in Applied Microbiology* **9**: 91-129.
- PETTERSSON, G. E.; COWLING, B.; PORATH, J.  
 1963 Studies on cellulolytic enzymes. I. Isolation of a low-molecular-weight cellulase from *Polyporus versicolor*. *Biochem. Biophys. Acta* **67**: 1-8.
- PINTO-LOPES, J.  
 1950 Poliporosos e fungos da decomposição da madeira em Portugal. *Rev. Fac. Ciências* (2.ª Sér.-C) **1**: 4-25.
- RAUTELA, G. S.; COWLING, B. B.  
 1966 Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiology* **14** (6): 892-898.

RODRIGUES, C. C.

- 1969 Nova contribuição para o estudo das *Polyporaceae* de Portugal. *Bol. Soc. Port. Ciênc. Nat.* (2.<sup>a</sup> Sér.) 12: 155-185.

SMITH, R. E.

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

SOMOGYI, M.

- Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23.

WALSETH, C. S.

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

## POLYPORACEAE

### V — CELLULOLYTIC AND POLYPHENOLOXIDASIC ACTIVITIES OF *INONOTUS HISPIDUS* (BULL.: FR.) KARST. AND *FOMES FOMENTARIUS* (FR.: FR.) FR. \*

N. T. RODEIA, M. T. MARTINS, M. J. RODRIGUES & L. SIMÕES

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências,  
Bloco C2, Campo Grande, 1700 Lisboa — Portugal

Received 1 June, 1990.

#### ABSTRACT

The strains of *Polyporaceae* — *Inonotus hispidus* (Fr.) Karst. and *Fomes fomentarius* (Fr.: Fr.) Fr., were tested for their ability to degrade cellulose (insoluble-modified or not by Walseth method-Avicel, Whatman and dyed cotton cellulose) and carboxymethylcellulose (soluble cellulose = CMC) as the sole carbon source. The celluloses were incorporated into a basal medium containing mineral salts and growth factors, with or without agar.

The white-rot species *Inonotus hispidus* and *Fomes fomentarius* were able to produce clearing zones on medium containing Avicel, Whatman powder or carboxymethylcellulose. These strains were also able to promote the release of the dye from the cotton cellulose (blue cellulose azure). The cellulosic activity was tested with the soluble cellulose by reading at 525 nm the O. D. of the reducing sugars obtained after 4 hours of incubation of 10 ml of a 1% solution of CMC with 2 ml of the extracellular extracts from 8, 15, 22, 30, 40 and or 50 day old cultures growing in a liquid medium containing CMC (1%). That activity was also tested (quantitative and qualitatively) on the same medium but with 2% agar and 0.1% CMC and according to the Teather & Wood (1982) method (the clearing zones were visualized by flooding the Petri dishes after inoculation and incubation). The tests of loss of viscosity of the CMC (determined with an Ostwald viscosimeter) were done with the extracellular extracts and with cellulase of *Trichoderma viride* (Sigma). The carboxymethylcellulase activity was determined in different conditions of age, pH and temperature.

---

\* These results were presented at the «II Congresso Luso-Español de Bioquímica», September 26-30, 1983, Barcelona, Spain.

The phenoloxidasic activity was tested by the oxydation of the different phenolic compounds added, one by one, to the malt agar growth medium (nine phenolic compounds were tested-catechol, gallic acid, guaiacol, hydroquinone, naphthol, phloroglucinol, resorcinol, tannic acid and tyrosine). These results are given by the intensity of the colour, the diameter of the reaction and by the growth of the mycelia in that medium.

## INTRODUCTION

SINCE 1950 PINTO-LOPES and other authors drew attention to the devastation of the woody tissues of trees and timber caused by fungi of the *Polyporaceae* family. Some works were published (such as ALMEIDA *et al.*, 1964 and TEIXEIRA, N., 1964) and a catalogue was also published (RODRIGUES, 1969) listing the different species of *Polyporaceae* found in Portugal, showing the host trees and their geographical distribution. The species have recently been identified by MELO (1978*a, b*; 1980; 1981*a, b*; 1983) and by MELO *et al.* (1980, 1983) according to the Donk system (1974).

Different types of rot are caused by species of *Polyporaceae* (white or brown-rot; alveolar, cubic or lamellar rot.).

It is our aim to find out what substrate they prefer (cellulose or/and lignin) and to detect their cellulasic and phenoloxidasic activities. For that purpose, tests on media with cellulose (soluble or insoluble) or with phenolic compounds were carried out and the tests on lignin are now in process.

## MATERIAL AND METHODS

### Material

The cultures were isolated from mycelium of fruity-bodies collected from trees or from different substrates and they were maintained by sub-culture on potato-dextrose agar (PDA) or on malt agar (MA). In this work we tested *Inonotus hispidus* (strains n<sup>os</sup> 452 and 4527) and *Fomes fomentarius* (strains n<sup>os</sup> 157 and 488).

### Media

Screening for cellulolytic fungi occurred in the synthetic media described by:

RAUTELA & COWLING (1966) — carbon source cellulose Avicel and Whatman (0.25%, 0.5% or 1% cellulose) modified by the WALSETH method (1952).



NILSSON (1974*a, b, c*) — carbon source cellulose Avicel and Whatmon (0.5 % or 1 % cellulose) modified or not by the WALSETH method (1952).

NORKRANS & HAMMARSTRÖM (1963) — carbon source carboxymethylcellulose 0.1 % and 1 %.

### Methods

All growth tests were carried out at an incubation temperature of 25° C + 1° C.

In order to inoculate the same quantity of mycelium, discs were cut-out from cultures which had grown on an agar medium using a 12 m cork-borer.

Cellulase production was evaluated by the appearance of clearing zones on insoluble cellulose (AVICEL and WHATMAN) or soluble cellulose agar medium (CMCA) around the inoculum and its extent recorded as the diameter in mm, according to RAUTELA & COWLING (1966), NILSSON (1973, 1974*a*) TEATHER & WOOD (1982). After inoculation, the Petri dishes extracellular extracts in the wells and CMC as substrate, maintained in the refrigerator for 30 min. and were stained with Congo red according to the TEATHER & WOOD method (1982). The cellulosic activity was quantified using a direct relation between log enzyme concentration and the diameters of the cleared zones induced on the medium by the mycelia or by the extracellular extracts placed in wells made previously in the medium containing 0.1 % of CMC. Cellulase production was also evaluated by the release of the cotton cellulose dye that had diffused into the basal layer of the medium (PETERSON *et al.*, 1963; SMITH, 1977).

The CMC<sub>ase</sub> activity was also tested, in a liquid medium containing 1 % of CMC in phosphate buffer with different pHs. For that purpose 5 ml of an inoculum prepared from a macerate of 5 mycelial plugs in 25 ml of water was added to 50 ml of the liquid medium also containing 1 % CMC.

After 8, 15, 22, 30 and 40 days of incubation the mycelia were harvested by centrifugation (30 min. at 10,000 r.p.m., at 0° C), and then stored frozen. Two ml of the supernatant was then added to 10 ml of a buffer containing 1 % of CMC and after 4 hours of incubation (at the optimal temperatures) the concentration of the reducing sugars read at 525 nm following the SOMOGYI-

NELSON method (SOMOGYI, 1937; NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952). The activities were determined at different pH and temperature values and from differently aged cultures. The decrease in viscosity of CMC solution at 1% was measured with an Ostwald viscosimeter adding 6 ml of an extracellular extract and 30 ml of 1% CMC in buffer, and the time taken to elapse was appointed and compared with a standard CMC<sub>ase</sub> of *Trichoderma viride* (10 mg ml<sup>-1</sup>) in the best conditions of pH, temperature and age of those cultures.

Protein concentration in culture supernatants was estimated according to LOWRY *et al.* (1951) using bovine serum albumin as a standard.

Phenoloxidasic activity was tested on a malt agar medium containing one of the following phenolic compounds (in different concentrations 0.5%, 0.05%, 0.005% or 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup> of medium) — catechol, gallic acid, guaiacol, hydroquinone, naphthol, phloroglucinol, resorcinol, tannic acid and tyrosine. The growth of the mycelium from the inoculum (discs with 12 mm in diameter) and the extent of the coloured zone under or around was recorded after 5 days of incubation. We tested the phenolic compounds according to BAVENDAMM (1928), NOBLES (1958), KÄARIK (1965), KIRK & KELMAN (1965) and GILBERTSON *et al.* (1975) methods.

## RESULTS

### Enzymic hydrolysis of cellulose

*Fomes fomentarius* is able to degrade cellulose powder (Avicel and/or Whatman) and can release the dye from cellulose and produce extracellular carboxymethylcellulase which is clearly shown by the results presented in Table I and Fig. 1 (CMC stained by Congo red: CMC<sub>ase</sub> coloured yellow or lilac) and Fig. 3 (production of reducing sugars from CMC). The cellulasic activity is at its best from an extracellular extract of a 15 day old culture using CMC and the highest activity is at pH 5.8 and at a temperature of 50° C.

The loss of viscosity is higher at pH 5.8, after 40 days of culture and at a temperature of 50° C (refer to Fig. 4). This species produced extracellular CMC<sub>ase</sub> with higher concentration

TABLE I

Effect of white-rot fungi (*Polyporaceae*) on various celluloses as measured by presence or absence of clearing zones or diffusion of the blue dye. Contents of extracellular extracts in CMC<sub>ase</sub>, proteins, reducing sugars and decrease of viscosity from CMC (a, b, c)

		Species	<i>Fomes fomentarius</i> (L.: Fr.) Fr.		<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.: Fr.) Karst.	
			157	488	452	4527
		Strains	157	488	452	4527
Insoluble cellulose	Avicel	pH 5.4 6.8	— 22	— —	45-52 28-50	— —
	Whatman	pH 5.1 6.6	— —	— —	— —	— —
	Azure	R Ch. md. colour	+++++ Reddish	+++ Reddish	++ —	+++++ —
Soluble cellulose	Myce- lia	R	+++	++	++	++
		ØR	33	33	32	36
		ØG	29	32	18	14
		CMC <sub>ase</sub> (µg/ml)	3,100 10 days old	Wasn't tested	3,800 30 days old	2,250 30 days old
		Reducing su- gars (µg/ml)	206,0	»	254,8	226,3
		Proteins (µg/ml)	321,5	»	166,0	204,0
		Decrease of viscosity (%)	86,27	»	92,12	87,11
	Relat. activity (AR)	100	»	250	250	

- (a) All values are the average of six replicates after 5-30 days' growth.
- (b) Degradation of insoluble (Avicel, Whatman) cellulose or soluble cellulose (CMC) — The activities have usually been measured by formation of clearing zones (mm) in soluble cellulose agar.
- (c) R = Reaction; ØR = Diameter (mm) of reaction; ØG = Diameter (mm) of mycelian growth; ++ = Faint diffusion of blue dye or of Congo red reaction; +++ = Diffusion of blue dye to dark colour or less intensity of Congo red reaction; ++++ = Great intensity of diffusion of blue dye to dark colour, extending considerably on the lower layer of medium or better intensity of CMC<sub>ase</sub> and CMC substrate; +++++ = Diffusion of blue dye very intense, dark colour, opaque, staining all lower layer of medium or the best reaction between CMC and CMC substrate.

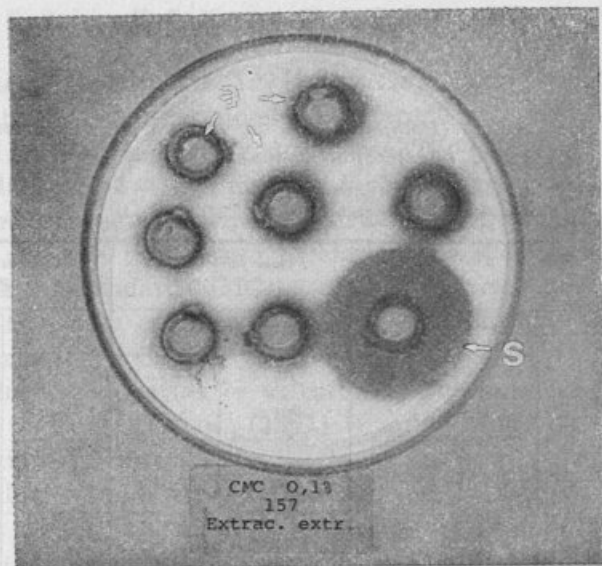


Fig. 1.— Cellulasic activity of extracellular extracts of *Fomes fomentarius* on carboxymethylcellulose (TEATHER & WOOD method, 1982). a) extracellular extract reaction; s) Standard cellulase from *Trichoderma viride*.

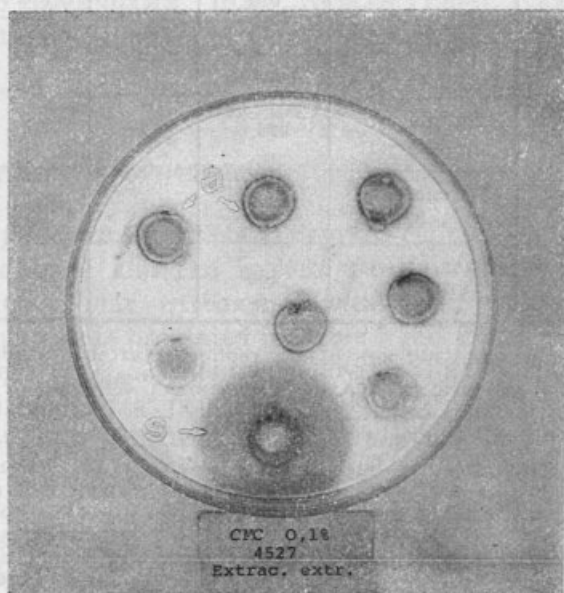
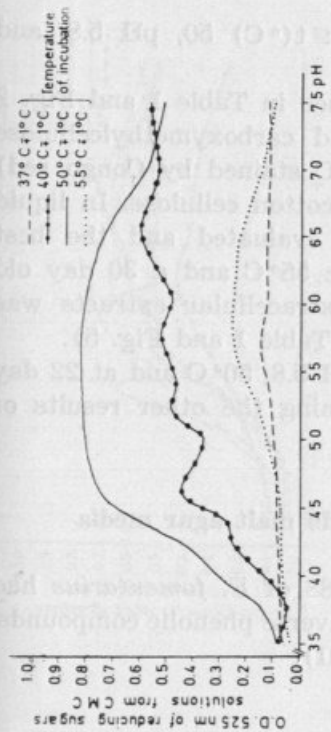


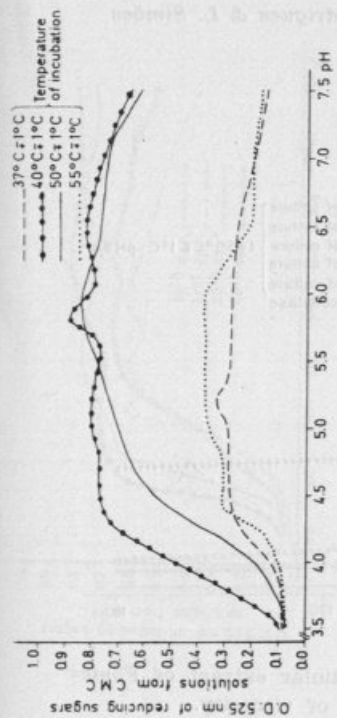
Fig. 2.— Cellulasic activity of extracellular extracts of *Inonotus hispidus* on carboxymethylcellulose (TEATHER & WOOD method, 1982). a) extracellular extract reaction; s) Standard cellulase from *Trichoderma viride*.



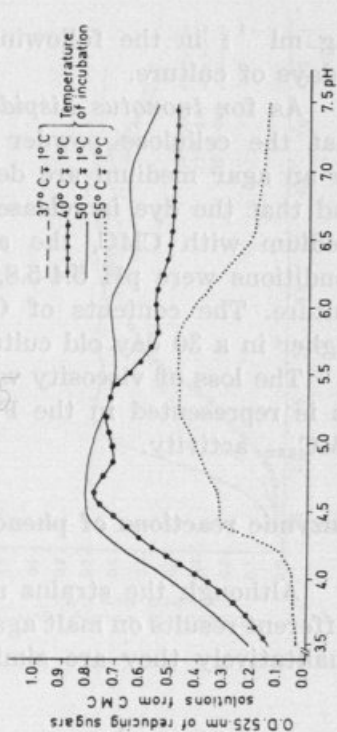
157- 8<sup>th</sup> day of culture



157-15<sup>th</sup> day of culture



157-30<sup>th</sup> day of culture



157-40<sup>th</sup> day of culture

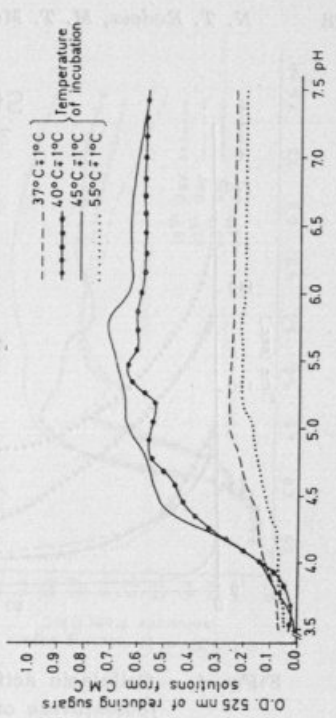
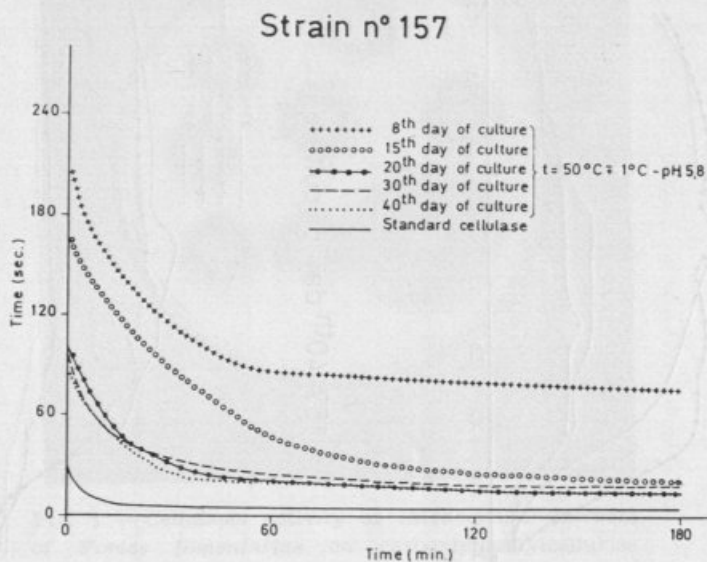


Fig. 3.—Cellulasic activity of extracellular extracts of *Fomes fomentarius* by conversion of CMC in reducing sugars. Selection of the best activity depending on pH, temperature and age of cultures.





FiFig. 4. — Cellulasic activity of extracellular extract of *Fomes fomentarius* on CMC by loss of viscosity.

( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) in the following conditions:  $t(^{\circ}\text{C})$  50, pH 5.8, and 8 days of culture.

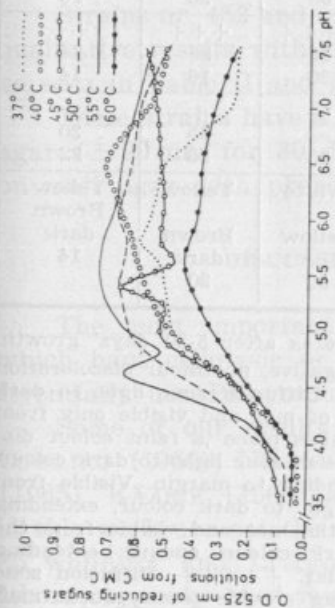
As for *Inonotus hispidus* one can see in Table I and Fig. 2 that the cellulose powder (Avicel) and carboxymethylcellulose on an agar medium are degraded (CMC stained by Congo red) and that the dye is released from the cotton cellulose. In liquid medium with CMC, the activity was evaluated and the best conditions were pH 5.4-5.8, temperature 55°C and a 30 day old culture. The contents of  $\text{CMC}_{\text{ase}}$  in extracellular extracts was higher in a 30 day old culture (consult Table I and Fig. 5).

The loss of viscosity was best at pH 5.8, 50°C and at 22 day as is represented in the Fig. 6 confirming the other results of  $\text{CMC}_{\text{ase}}$  activity.

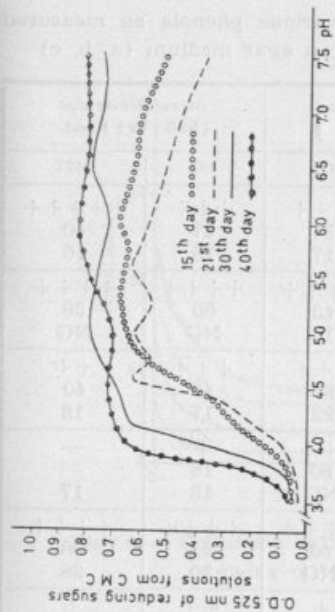
#### Enzymic reactions of phenolic compounds malt agar media

Although the strains n° 157 and 488 of *F. fomentarius* had different results on malt agar with the diverse phenolic compounds, qualitatively they are similar (Table II).

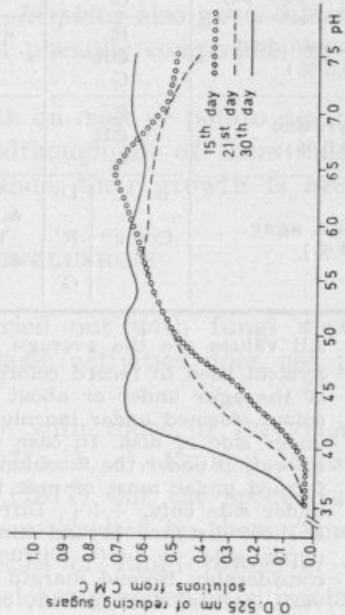
452 - 15th day of culture



452 - 50°C ± 1°C



452 - 40°C ± 1°C



452 - 55°C ± 1°C

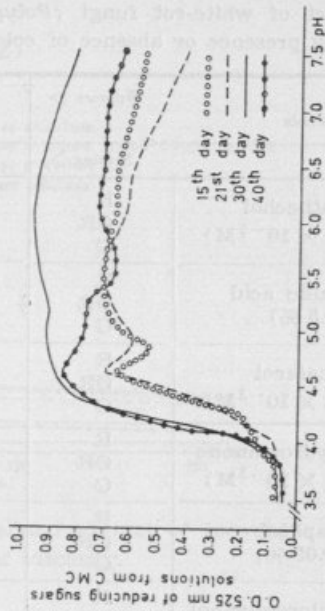


Fig. 5. — Cellulasic activity of extracellular extracts of *Inonotus hispidus* by conversion of CMC in reducing sugars. Selection of the best activity depending on pH, temperature and age of cultures.

TABLE II

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

Phenols	Species >		<i>Fomes fomentarius</i> (L.: Fr.) Fr.		<i>Inonotus hispidus</i> (Bull.: Fr.) Karst.	
	Strains >		157	488	452	4527
Cathechol ( $1 \times 10^{-3}$ M)	R		+++	+++	+++	+++++
	ØR		35	37	17	40
	G		30	17	16	16
Gallic acid (0.5 %)	R		++++	++++	++++	++++
	ØR		20	43	50	39
	G		NG	15	NG	NG
Guaiacol ( $1 \times 10^{-3}$ M)	R		+	+++	+++	++
	ØR		25	35	40	40
	G		30	22	17	18
Hydroquinone ( $1 \times 10^{-3}$ M)	R		+	++	+	—
	ØR		40	80	18	—
	G		NG	NG	18	17
Naphtol (0.05 %)	R		+	++++	++++	++++
	ØR		35	40	42	28
	G		NG	NG	30	28
Phloroglucinol (0.5 %)	R		++	+	++	+
	ØR		30	20	48	18
	G		78	20	27	13
Resorcinol ( $1 \times 10^{-3}$ M)	R		++	+++	+	—
	ØR		90	25	20	—
	G		90	50	20	16
Tannic acid (0.5 %)	R		++++	++++	+++	++
	ØR		27	29	28	24
	G		25	30	16	14
Tyrosine (0.5 %)	R		++	—	+	+
	ØR		35	—	25	20
	G		40	25	30	22
Malt agar (2 %)	Colour	D	White & brown	White	Yellow	Yellow
		R'	Yellow & brown	Yellow	Brown dark	Brown dark
		G	50	30	20	14

- (a) All values are the average of six replicates after 5-30 days' growth.
- (b) System used to record coloration: —, Negative, no colour discoloration of the agar under or about the mat. +, Diffusion zone light to dark colour, formed under inoculum at center of mat and visible only from under side of dish. In case no growth takes place, a faint colour discoloration under the inoculum. ++, Diffusion zone light to dark colour, formed under most of mat but not extending to margin. Visible from under side only. +++, Diffusion zone light to dark colour, extending a short distance beyond the margin of the mat and visible from the upper side. +++++, Diffusion zone dark colour, opaque, extending considerably beyond margin of fungus mat. ++++++, Diffusion zone very intense, dark colour, opaque, forming a wide corona about mat.
- (c) R = Reaction; ØR = Diameter (mm) of reaction; G = Mycelian growth (mm); NG = Non Growth; D = Direct; R' = Reverse.

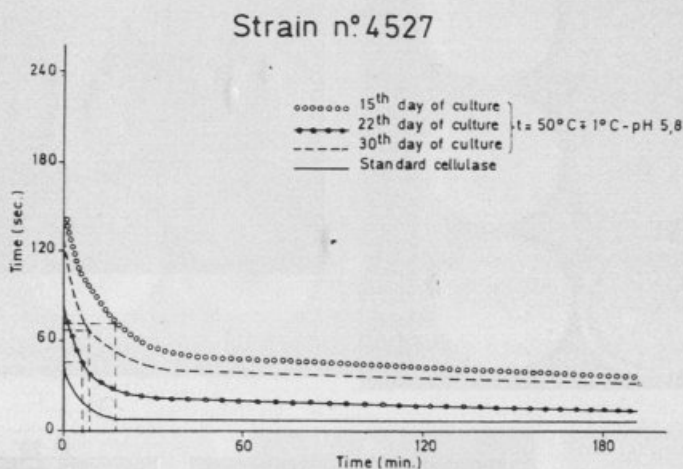


Fig. 6. — Cellulosic activity of extracellular extract of *Inonotus hispidus* on CMC by loss of viscosity.

They gave intense reactions with some phenolic compounds and grew well on the medium with or without that substrate. The results are expressed in Table II and can be observed in Fig. 7).

Strains nr. 452 and nr. 4527 of *I. hispidus* also gave, different qualitative results with the different phenolic compounds as can be seen in Table II and Fig. 8.

These strains have a slow growth on malt or potato dextrose agar ( $\pm 90$  mm for 30 days) and although all of them oxidize on malt agar with phenolic compounds, their growth is better.

#### DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The most important work carried out with fungi species which have cellulosic or phenoloxidasic activities does not preferentially use *Polyporaceae*.

Some of our results are in line with those of RAUTELA & COWLING (1966), NILSSON (1973, 1974a, b, c), KIRK & KELMAN (1965), KÄARIK (1965) and SMITH (1977) but the species used in this work are not the same as those studied by them. Among 25 white-rot and 13 brown-rot species of fungi tested in our laboratory, only 14 showed distinct clearing zones on an insoluble cellulose agar medium. The visualization of clearing zones on

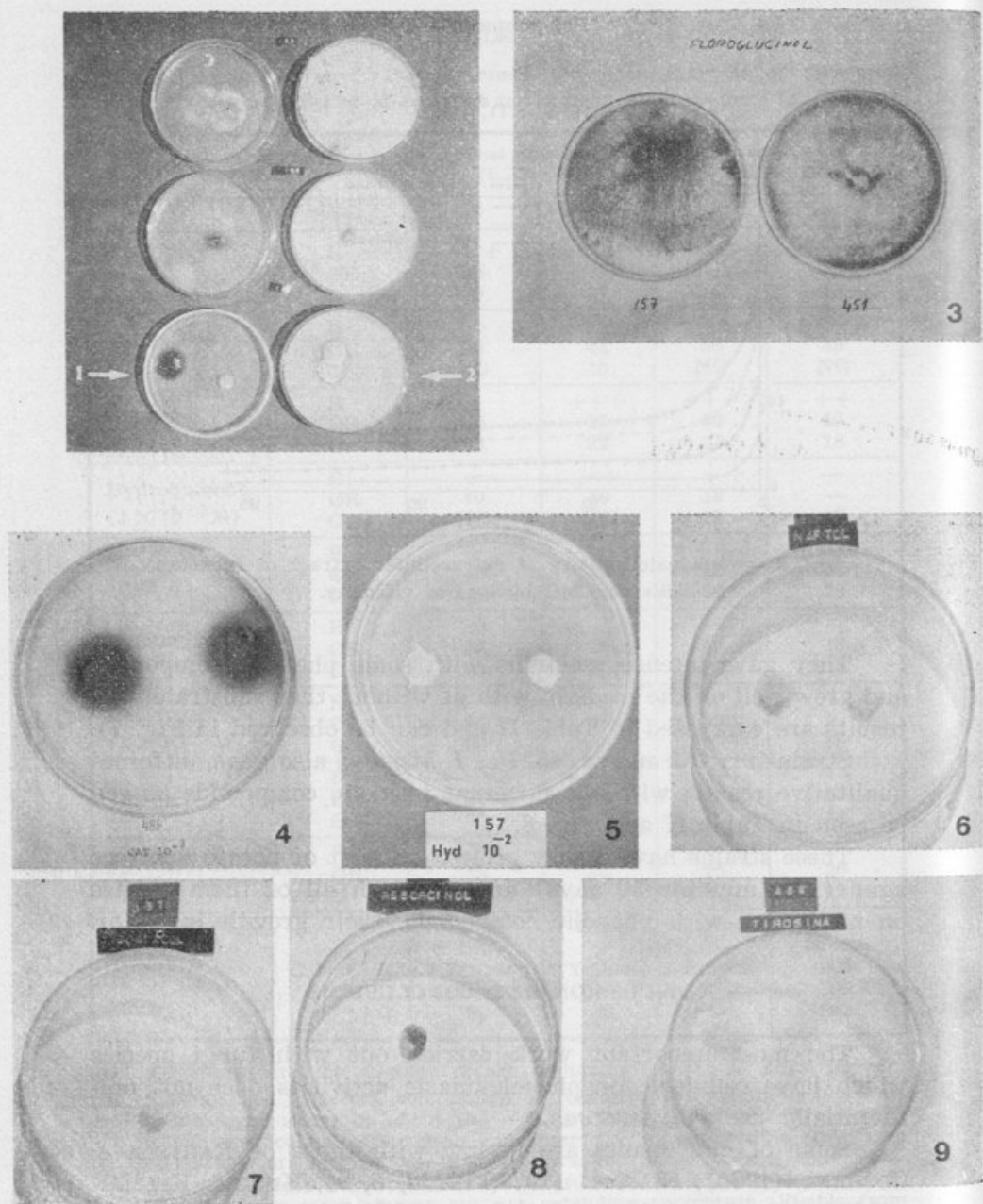


Fig. 7. — Effect of *Fomes fomentarius* on diversous phenolic compounds — Gallic and tannic acid, catechol, guaiacol, hydroquinone, naphtol, phoroglucinol, resorcinol and tyrosine.

- |                    |                  |                 |
|--------------------|------------------|-----------------|
| 1 — Gallic acid    | 4 — Catechol     | 7 — Guaiaacol   |
| 2 — Tannic acid    | 5 — Hydroquinone | 8 — Ressorcinol |
| 3 — Phloroglucinol | 6 — Naphtol      | 9 — Tyrosine    |



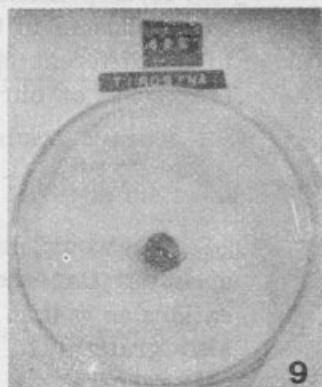
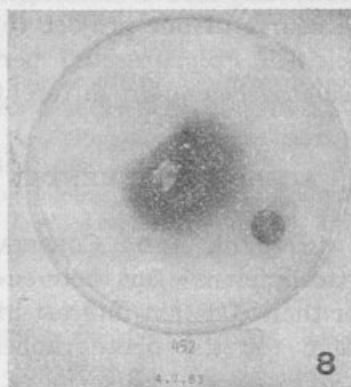
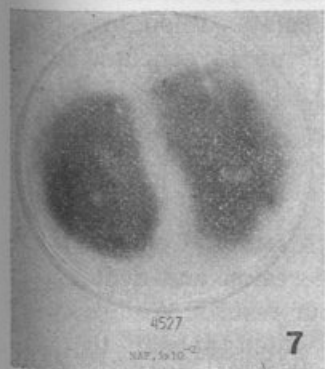
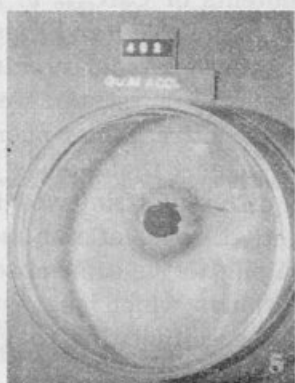
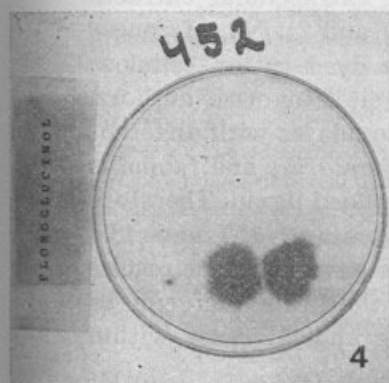
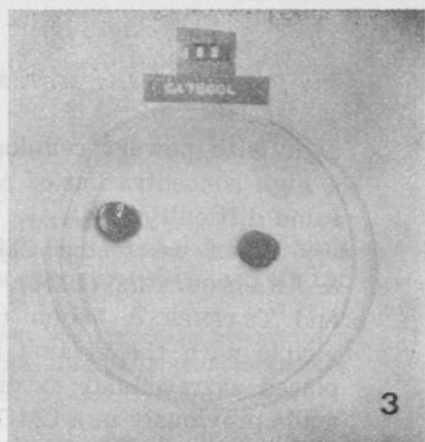
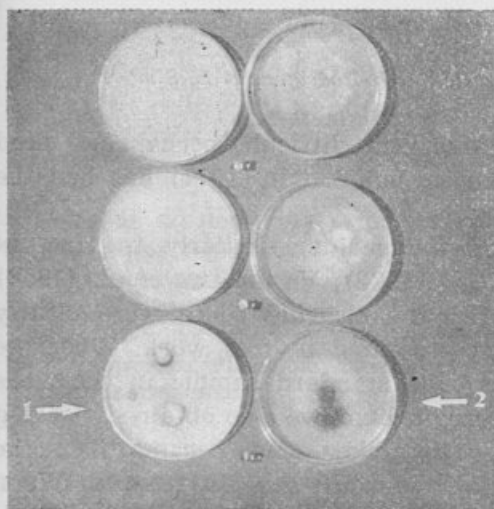


Fig. 8.—Effect of *Inonotus hispidus* on diversus phenolic compounds—Gallic and tannic acid, catechol, guaiacol, hydroquinone, naphthol, phoroglucinol, resorcinol and tyrosine.

1—Tannic acid  
2—Gallic acid  
3—Catechol

4—Phloroglucinol  
5—Guaiacol  
6—Hydroquinone

7—Naphthol  
8—Resorcinol  
9—Tyrosine

agar with powder cellulose was very difficult, perhaps we used a high concentration of cellulose, but SMITH (1977) has had the same difficulty.

When we tested CMC agar medium similarly to HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1977), WOOD (1980), VANDAMME *et al.* (1982) and TEATHER & WOOD (1982) the clearing zones were clearly visible with the strains now presented in this work. When we placed extracellular extracts or a standard sample in the wells made previously in a CMC agar medium, we also obtained clearing zones but after a short time the yellow zones became lilac (the standard sample had the same shade). As TEATHER & WOOD suggested (and as it is common in tests with antibiotics) we can find out the contents of CMC<sub>ase</sub> in the extracellular extracts of the tested strains (see Table I and Figs. 1 and 2). No references to the alteration of the blue colour of the dyed cotton cellulose that occurred with some of our strains were cited by other authors.

The reaction of the extracellular phenoloxidases with different phenolic compounds suggest that *Fomes fomentarius* and *Inonotus hispidus* will have a different affinity to degraded lignin. Therefore we have observed, that some of our isolates (n<sup>os</sup> 157 and 488, 452 and 4527) belonging to the same species gave different results (in the same conditions) which suggests that this fact can be attributed to a host specificity or to geographical races within the species.

It is possible that the numeric taxonomic analysis in the data collected in the course of our project (57 isolates belonging to 38 different species of *Polyporaceae*) permit us to conclude that some of our isolates belong to different varieties.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank ALDA CORREIA, MANUEL CORREIA and JOSÉ CARDOSO (technicians) for their co-operation and dedications as well as for their constant interest in our results. We are also grateful to them for the photographs which appear in this report.

## REFERENCES

- ALMEIDA, M. G.; RODRIGUES, C. C. & TEIXEIRA, NATÉRCIA J.  
1964 Novos registos de colheitas de *Polyporaceae* em Portugal. *Bolm Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais* (2.<sup>a</sup> Sér-C), 10: 149-164.
- BAVENDAMM, V.  
1928 Über das vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. I. Mitteilung. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz.* 38: 257-276.
- DONK, M. A.  
1974 *Check list of European polypores*. Verh. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch., Afd. Natuurkde., Tweede Reeks, D. 62.
- GILBERTSON, R. L.; LOMBARD, F. F.; CANFIELD, E. R.  
1975 Gum gualac in field tests for extracellular phenoloxidasen of wood-rotting fungi. *For. Prod. Lab. For. Serv., USDA* (23 pags.).
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L.  
1977 Solid medium containing carboxymethylcellulose to detect C<sub>1</sub> cellulase activity of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 98: 109-115.
- KÄÄRIK, A.  
1965 The identification of the mycelia of wood-decaying fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Stud. for. Suec.* nr. 31.
- KIRK, T. K.; KELMAN, A.  
1965 Lignin degradation as related to the phenoloxidasen of selected wood decaying *Basidiomycetes*. *Phytopathology*, 55: 739-745.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.  
1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MELO, I.  
1978a *Acerca das Polyporaceae de Portugal*. *Bol. Soc. Broteriana* (2.<sup>a</sup> Sér.), 52: 257-275.  
1978b *Buglossoporus pulvinus* (Pers. ex Pers.) Donk. e *Polyporus mori* Poll. ex Fr., duas espécies de *Polyporaceae* novas para Portugal. *Bol. Soc. Broteriana* (2.<sup>a</sup> Sér.), 52: 277-283.  
1980 Sete espécies de *Polyporaceae* novas para Portugal. *Bol. Soc. Broteriana* (2.<sup>a</sup> Sér.), 53: 647-662.  
1981a Fungi decaying mining timber. A preliminary survey at the Panasqueira mines. *Port. Acta Biol.* (Sér. B), 13: 5-12.  
1981b *Incrustoporia percandida* (Malenc. & Bert.) Donk e *Spongipellis spumeus* (Sow. ex Fr.) Pat., novas colheitas de fungos em Portugal. *Port. Acta Biol.* (Sér. B), 13: 119-125.  
1983 O género *Phellinus* Qué! em Portugal. *Rev. Biol.*, 12: 77-108.
- MELO, I.; CORREIA, M.; CARDOSO, J.  
1980 *Acerca das Polyporaceae de Portugal*. II. *Bol. Soc. Broteriana* (2.<sup>a</sup> Sér.), 53: 675-723.  
1983 *Acerca das Polyporaceae de Portugal*. III. *Rev. Biol.*, 12: 109-120.

NELSON, N.

- 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, **153**: 375-380.

NILSSON, T.

- 1973 Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Stud. for. Sue.* n° 104.
- 1974a Comparative study on the cellulolytic activity of white-rot and brown-rot fungi. *Material und Organismen*, **9** (3): 173-198.
- 1974b The degradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannanase and amylase by wood-attacking microfungi. *Stud. for. Sue.* nr. 114.
- 1974c Microscopic studies on the degradation of cellophane and various cellulosic fibres by wood-attacking microfungi. *Stud. for. Sue.* nr. 117.

NOELES, M. K.

- 1958 A rapide test for extracellular oxidase in cultures of wood-inhabiting Hymenomyces. *Can. J. Bot.* **36**: 91-99.

NORKRANS, B.; HAMMARSTROM, A.

- 1963 Studies of *Rhizina undulata* Fr. and its production of cellulose — and pectin decomposing enzymes. *Physiologia plantarum*, **16**: 1-10.

PETTERSEON, G. E.; COWLING, B.; PORATH, J.

- 1963 Studies on cellulolytic enzymes. I. Isolation of a low-molecular-weight cellulase from *Polyporus versicolor*. *Biochem. Biophys. Acta*, **67**: 1-8.

PINTO-LOPES, J.

- 1950 Políporos e fungos da decomposição da madeira em Portugal. *Rev. Fac. Ciências* (2.ª Sér.-C), **1**: 4-25.

RAUTELA, G. S.; COWLING, E. B.

- 1966 Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Appl. Microbiology*, **14** (6): 892-898.

RODRIGUES, C. C.

- 1969 Nova contribuição para o estudo das *Polyporaceae* de Portugal. *Bol. Soc. Port. Ciênc. Nat.* (2.ª Sér.), **12**: 155-185.

SMITH, R. E.

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

SOMOGYI, M.

- 1937 A reagent for the Copper Iodometric determination of very small amounts of sugar. *J. biol. Chem.* **117**: 771-776.
- 1952 Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, **195**: 19-23.

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

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

TEEXEIRA, NATÉRCIA J.

- 1964 Contribuição para o estudo dos Hymenomyces de Portugal. *Bolm Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais* (2.ª Sér.), **10**: 133-148.







## ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE EXTRATOS LIQUÊNICOS

por

ROSÁLIA C. LIMA<sup>1</sup>  
SILENE C. NASCIMENTO<sup>1</sup>  
EUGÊNIA C. G. PEREIRA<sup>2</sup>  
GALBA M. CAMPOS-TAKAKI<sup>1</sup>

Recebido em 21 de Junho de 1990.

### ABSTRACT

This paper shows that crude extracts of lichens obtained from *Cladonia* species, collected on tableland relieve, sandy soil of Santa Rita and Alhandra, Paraíba state, Northeastern part of Brazil, exhibit cytotoxic activity on KB cells in vitro, and inhibit the growth of the sarcoma-180 and Ehrlich carcinoma in vivo. It is demonstrated that the *Cladonia substellata* and the *Cladonia verticillaris* crude extracts inhibited both 80 % of the Ehrlich carcinoma growth and 73 % and 64 % respectively of the sarcoma-180 growth. The other species of lichens tested such as *Cladonia crispatula*, *Cladonia* sp. and *Cladina dendroides* did not show significant activity.

### INTRODUÇÃO

A comprovada eficiência das substâncias liquênicas contra diversas enfermidades, vem sendo pesquisada há várias décadas (LLANO<sup>19</sup>, 1951; HARKSWORTH & HILL<sup>11</sup>, 1984).

O poder inibidor de extratos brutos e substâncias puras no crescimento de bactérias, é comprovado a partir de 1944, por BURKHOLDER<sup>2</sup> e seus colaboradores.

Por outro lado, atribui-se a esses produtos de metabolismo secundário dos líquens, atividade farmacológica, hipotensiva, anal-

Departamento de Antibióticos<sup>1</sup> e Botânica<sup>2</sup>, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50 739, Cidade Universitária, Recife — PE, Brasil.

gésica, anti-inflamatória, anti-espasmódica e neuromuscular (CORREIA DA SILVA<sup>3</sup>, 1976; CORREIA DA SILVA<sup>4</sup>, 1979; APPA-RAO & PRABHAKAR<sup>1</sup>, 1987).

Os polissacarídeos extraídos de líquens foram largamente estudados, quanto à sua ação inibidora do crescimento de tumores cancerígenos.

SHIBATA *et alii*<sup>26, 27</sup> (1968a; 1968b) reportaram a completa regressão do sarcoma-180 quando tratado com frações de polissacarídeos isolados de diferentes espécies de líquens, tendo sido exemplificada, pela primeira vez, a atividade antitumoral de glicopeptídeos de líquens em um manano e um glucano isolados de *Lobaria orientalis* (TAKAHASHI *et alii*<sup>29</sup>, 1974; NISHIKAWA *et alii*<sup>21</sup>, 1979).

Heteroglicanos obtidos de espécies de *Lasallia*, *Usnea* e *Cladonia* foram considerados por NISHIKAWA *et alii*<sup>22</sup> (1974), como de atividade moderada frente a tumores ascíticos do tipo carcinoma de Ehrlich. Compostos liquênicos nitrogenados impediram o completo desenvolvimento deste mesmo tipo de tumor, porém essas mesmas substâncias não exerceram influência contra o sarcoma-180 do tipo sólido (FUJIKAWA *et alii*<sup>9</sup>, 1973; TAKAHASHI *et alii*<sup>30</sup>, 1981).

Substâncias de natureza ácida como a atranorina e os ácidos D-protoliqueterínico e nefrosferínico, foram também ativos contra a carcinoma de Ehrlich do tipo sólido, bem como o ácido úsnico com atividade inibidora significativa contra o carcinoma de Lewis (HIRAYAMA *et alii*<sup>12</sup>, 1980; HIROSHI<sup>13</sup>, 1972; KUPCHAN & KOPPERMANN<sup>16</sup>, 1975).

Segundo TAKAI *et alii*<sup>13</sup> (1979), o ácido úsnico e seus derivados lipofílicos apresentaram citotoxicidade em testes com leucemia murina P 388 e células L 1210. Esses compostos de comprovada eficácia são também reportados como substâncias componentes de diversas espécies da família Cladoniaceae, dentre outros (HUOVINEN & AHTI<sup>14</sup>, 1986a; HOUVINEN & AHTI<sup>15</sup>, 1986b; LEGAZ *et alii*<sup>17</sup>, 1986; CULBERSON *et alii*<sup>6</sup>, 1977; XAVIER-FILHO *et alii*<sup>32</sup>, 1985). Por esta razão, foram selecionadas espécies desta família para testes de atividade antineoplásica.

Este trabalho teve como objetivo detectar possíveis efeitos citotóxicos e antitumorais de extratos liquênicos, obtidos a partir de espécies da família Cladoniaceae, ocorrentes em diferentes áreas de tabuleiros arenosos (cerrado), no Estado da Paraíba,

Nordeste do Brasil, visando um melhor conhecimento dos recursos naturais a nível regional, além de uma provável contribuição ao estudo de substâncias com atividade anticancerígena.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Líquens: coleta e preparação

Neste trabalho foram utilizadas as espécies *Cladina dendroides* (des Abb.) Ahti e *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. coletadas em Alhandra e Santa Rita, *Cladonia substellata* Vainio e *Cladonia crispatula* (Nyl.) Ahti coletadas em Santa Rita e *Cladonia* sp. coletada em Alhandra.

Os extratos foram preparados a partir dos talos secos à temperatura ambiente (cerca de 30° C) e extraídos com solventes orgânicos em série eluotrópica, a citar: heptano, clorofórmio, acetona e metanol, por sistema de esgotamento a frio. Os extratos obtidos foram evaporados e mantidos em dessecador até peso constante.

### 2. Atividade citotóxica

O estudo «in vitro» foi realizado pelo método de cultura de tecido. Células KB (carcinoma nasofaríngeo) foram desenvolvidas em «Minimal Essential Medium» MEM (EAGLE 7, 1959), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de glutamina e 1 % de antibiótico (penicilina, streptomina e kanamicina).

As células foram cultivadas rotineiramente em dias alternados, e semeadas em 10<sup>6</sup> células por frasco. O material foi empregado no ensaio de citotoxicidade de acordo com o «Protocol for Screening Chemical Agents and Natural Products» (GERAN *et alii*<sup>10</sup>, 1972), e repicadas 24 h antes do experimento em monoextrato, removidas com 0,25 % de tripsina (EDWARDS & FOGH<sup>8</sup>, 1959) e diluídas no meio a 30 000 células/ml.

Os extratos líquênicos testados foram acrescentados a 4,0 ml do meio a uma concentração de 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0 µcg/ml. As placas foram incubadas por 72 h em uma atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

A atividade citotóxica foi avaliada pela percentagem de inibição de crescimento do tratado em relação ao grupo controle.

A proliferação celular foi medida pela concentração de proteínas (OYAMA & EAGLE<sup>24</sup>, 1956).

### 3. Atividade antineoplásica

Os extratos liquênicos foram submetidos a teste preliminar de toxidez aguda para a determinação de  $DL_{50}$  aproximada (OETTEL & WILHELM<sup>23</sup>, 1955) e empregados na quimioterapia usando a décima parte da dose letal média. Os extratos apresentaram uma boa diluição quando adicionados de tween 80 a 10% e soro fisiológico. A atividade antitumoral foi verificada nos tumores experimentais sólidos sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich, para camudongos albinos suíços variação musmusculos. Nos experimentos, os animais doadores mantinham tumores com 12 a 15 dias de implantados. A técnica empregada foi a de implantação de fragmento tumoral via subcutânea por meio de trocáter (STOCK *et alii*<sup>28</sup>, 1955). Após 24 h do implante foi iniciada a quimioterapia por 7 dias. Ao término do tratamento os animais foram sacrificados, pesados e os tumores dissecados para avaliação do cálculo de inibição tumoral, obedecendo à fórmula  $TWI\% = C - Tx100$  (NACHON *et alii*<sup>20</sup>, 1981).

## RESULTADOS

A cultura de células é um meio específico utilizado nos testes «in vitro», objectivando selecionar substâncias com atividades antiproliferativa, oferecendo a vantagem da obtenção de respostas imediatas em relação à dose tóxica da substância estudada, sob condições controladas de crescimento.

Na Tabela I, encontram-se os dados de efeito tóxico dos extratos liquênicos sobre as células de câncer da linha contínua KB.

A atividade antitumoral dos extratos liquênicos testados está expressa na Tabela II para os resultados obtidos com liquens colectados em Santa Rita, e na Tabela III encontram-se os dados de atividade antitumoral de liquens ocorrentes em Alhandra.

## DISCUSSAO

Das espécies de Cladoniaceae utilizadas neste trabalho, apenas duas, ocorrentes em Santa Rita, demonstraram atividade citotóxica e antineoplásica relevante.



TABELA I

Atividade citotóxica de extratos liquênicos sobre células da linha KB — Determinação da  $DI_{50}$

Espécies	Procedência	$DI_{50}$
<i>Cladonia</i> sp.	Alhandra	$\approx 23 \mu\text{cg/ml}$
<i>Cladina dendroides</i>	Alhandra	$\approx 16 \mu\text{cg/ml}$
	Santa Rita	$\approx 12 \mu\text{cg/ml}$
<i>Cladonia verticillaris</i>	Alhandra	$\sim 17 \mu\text{cg/ml}$
	Santa Rita	$\approx 30 \mu\text{cg/ml}$
<i>Cladonia crispatula</i>	Santa Rita	$\approx 26 \mu\text{cg/ml}$
<i>Cladonia substellata</i>	Santa Rita	$\approx 12 \mu\text{cg/ml}$

TABELA II

Atividade antitumoral de extratos brutos de líquens coletados em Santa Rita, PB-Brasil

Espécies	Tipo de tumor	Dose mg/kg $\times$ 7ip	M. diferença de peso C/T (g)	M. do peso do tumor C/T (g)	Inibição (%)
<i>Cladonia verticillaris</i>	S. 180	60	+ 1,5/- 0,4	1,0 $\pm$ 0,54/0,36 $\pm$ 0,17	64,0
	Ehrlich	60	+ 2,1/- 1,6	1,2 $\pm$ 0,92/0,25 $\pm$ 0,12	80,0
<i>Cladonia substellata</i>	S. 180	60	+ 1,5/- 2,4	1,0 $\pm$ 0,54/0,27 $\pm$ 0,19	73,0
	Ehrlich	60	+ 2,1/- 3,2	1,27 $\pm$ 0,92/0,25 $\pm$ 0,17	80,0
<i>Cladonia crispatula</i>	S. 180	60	+ 1,4/- 1,1	0,81 $\pm$ 0,34/0,60 $\pm$ 0,20	26,0
	Ehrlich	60	+ 2,1/- 0,5	1,27 $\pm$ 0,92/0,65 $\pm$ 0,43	48,8
<i>Cladonia dendroides</i>	S. 180	60	+ 1,5/- 0,0	1,0 $\pm$ 0,54/0,54 $\pm$ 0,42	46,0
	Ehrlich	60	+ 2,8/- 2,5	1,25 $\pm$ 0,49/0,79 $\pm$ 0,29	36,8

TABELA III

Atividade antitumoral de extratos brutos de líquens coletados em Alhandra, PB-Brasil

Espécies	Tipo de tumor	Dose mg/kg $\times$ 7ip	M. diferença de peso C/T (g)	M. do peso do tumor C/T (g)	Inibição (%)
<i>Cladina dendroides</i>	S. 180	80	+ 1,4/ - 1,2	0,81 $\pm$ 0,34/0,46 $\pm$ 0,30	43,2
	S. 180	25	+ 1,4/+ 0,6	0,81 $\pm$ 0,34/0,40 $\pm$ 0,35	50,6
<i>Cladonia</i> sp.	Ehrlich	25	+ 2,1/+ 1,6	1,27 $\pm$ 0,92/0,62 $\pm$ 0,44	51,2
	S. 180	60	+ 0,6/ - 1,2	0,88 $\pm$ 0,54/0,75 $\pm$ 0,60	15,0
<i>Cladonia verticillaris</i>	Ehrlich	60	+ 2,8/ - 1,0	1,25 $\pm$ 0,99/0,97 $\pm$ 0,48	22,4

Os ensaios de ação antiproliferativa dos extratos liquênicos realizados com células da linha contínua KB demonstraram que a *Cladina dendroides* e a *Cladonia substellata* foram as espécies cujos extratos apresentaram maior citotoxicidade, com uma  $DI_{50}$  em torno de  $12 \mu\text{cg/ml}$  para ambas, resultado considerado satisfatório em comparação com as demais espécies testadas (Tabela I).

Na interpretação dos resultados dos testes de atividade antitumoral, foram considerados fortes inibidores aqueles extratos que impediram o desenvolvimento tumoral acima de 60 %.

Nos testes de atividade antineoplásica realizados foi demonstrado que os preparados obtidos de *Cladonia substellata* e *Cladonia verticillaris* coletadas em Santa Rita possuem poder de inibição de 80 % do crescimento do carcinoma de Ehrlich, além de inibirem respectivamente em 73 % e 64 % o desenvolvimento do sarcoma-180 (Tabela II).

Por outro lado, ainda na mesma Tabela, é possível observar que a *Cladonia verticillaris* coletada em Alhandra no mesmo período não apresentou inibição significativa dos tumores testados. PEREIRA<sup>25</sup> (1989) reporta uma influência da sazonalidade na atividade antimicrobiana de extratos liquênicos, para espécies coletadas nas mesmas regiões.

É provável que no período chuvoso os fenóis contidos no talo sejam lixiviados, enquanto durante o período seco haja uma provável retenção desses compostos através da cristalização. Outrossim, os espécimens aqui estudados, foram coletados apenas no período seco, o que descartaria a possibilidade de uma influência sazonal. Entretanto, LEGAZ *et alii*<sup>17</sup> (1986) mencionam diferentes quantidades de fenóis e pigmentos em *Cladonia verticillaris*, considerando apenas se o tufo liquênico ocorria sob arbustos, ou estavam expostos ao sol.

PEREIRA<sup>25</sup> (1989) sugere ainda, que as variações dos componentes microclimáticos das áreas em estudo (Santa Rita e Alhandra), sejam os responsáveis pela alteração do teor de substâncias ativas contidas no talo, atribuindo diferentes microclimas para essas áreas de solos e vegetação de constituição similares.

É também possível observar na Tabela II que os extratos de *Cladonia crispatula* e *Cladina dendroides* não exerceram relevante inibição, frente aos tumores testados.

Na Tabela III, onde foram expressos os resultados dos testes antitumorais com extratos de Cladoniaceae coletadas em Alhan-

dra, é possível constatar que a *Cladina dendroides*, *Cladonia* sp. e *Cladonia verticillaris* foram ineficazes nos ensaios de inibição tumoral.

CULBERSON<sup>5</sup> (1969) refere o ácido fumarprotocetrárico como substância em maior concentração em *Cladonia verticillaris*, enquanto AHTI, em comunicação pessoal, sugere, ainda, o ácido protocetrárico e a substância Cph<sub>2</sub> para esta espécie. LEGAZ *et alii*<sup>17</sup> (1986), detectaram por HPLC (cromatografia líquida de alta eficácia) em *Cladonia verticillaris* além do ácido fumarprotocetrárico e orcinol,  $\beta$  metil-orsinol carboxilato e atranorina. PEREIRA<sup>25</sup> (1989) identificou em TLC de extratos desta espécie, seis bandas que correspondiam às substâncias referidas pelos autores supra mencionados.

A *Cladonia substellata*, segundo CULBERSON *et alii*<sup>6</sup> (1977) possui o ácido úsnico em maior concentração e, ainda, os ácidos estético, constítico e, segundo AHTI (comunicação pessoal), também o ácido criptoestético.

Em comunicação pessoal, AHTI sugere para *Cladonia crispatula* os ácidos tamnólico e decarboxitamnólico; para *Cladina dendroides* os ácidos fumarprotocetrárico e protocetrárico e a substância Cph<sub>2</sub>. PEREIRA<sup>25</sup> (1989) sugere ainda para *C. dendroides* o ácido úsnico, o que confirma os dados de LEGAZ *et alii*<sup>18</sup> (1987).

De acordo com HIRAYAMA *et alii*<sup>12</sup> (1980) e HIROSHI<sup>13</sup> (1972), os ácidos D-protoliqueterínico e nefrosferínico, além da atranorina são ativos contra o carcinoma de Ehrlich do tipo sólido, enquanto o ácido úsnico é apontado por estes autores bem como por KUPCHAN & KOPPERMANN<sup>16</sup> (1975) como inibidor do carcinoma de Lewis. Segundo TAKAI *et alii*<sup>31</sup> (1979) este composto possui atividade citotóxica contra células de leucemia P 388 e L 1210.

#### CONCLUSÃO

Face ao exposto, é possível atribuir aos ácidos úsnico e fumarprotocetrárico a atividade antineoplásica detectada neste trabalho, visto que das espécies que apresentaram poder inibidor, *Cladonia substellata* possui o primeiro em alta concentração, enquanto que o segundo ocorre em *Cladonia verticillaris* juntamente com a atranorina, também referida como eficiente na ação antitumoral.

Vale salientar que a maioria dos trabalhos de atividade antineoplásica de substâncias liquênicas refere-se aos seus polissacarídeos. Portanto, para que seja possível tecer considerações acerca dos princípios ativos contidos nas espécies estudadas, posteriormente serão realizados testes com frações obtidas dos extratos brutos lipofílicos, ou seja a partir de solventes orgânicos, bem como dos aquosos.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores des trabalho são agradecidos ao Dr. TEUVO AHTI (Finlândia) pela colaboração através das comunicações pessoais.

#### REFERÊNCIAS

01. APPA-RAO, A. V. N. & PRABHAKAR, M. C. (1987) — Pharmacological actions of leprapinic acid, a lichen metabolite. *Fitoterapia*, **58** (4): 221-228.
02. BURKHOLDER, P. R.; EVANS, A. W. (1944) — Further studies on the antibiotic activity of lichens. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **30** (9): 250-255.
03. CORREIA DA SILVA, J. A. (1976) — Action of *Parmelia caperata* extracts on smooth muscle organs. *Arch. Farmacotoxicol* **2** (2): 143-152.
04. CORREIA DA SILVA, J. A. (1979) — Action of usnic acid on smooth muscle organs. *Plant. Med. Phytother.* **13** (1): 26-33.
05. CULBERSON, C. F. (1969) — *Chemical and Botanical Guide of Lichen Products*, Chapel Hill, N. C., 628 p.
06. CULBERSON, C. F.; CULBERSON, W. L. and JOHNSON, A. (1977) — *Second Supplement to «Chemical and Botanical Guide to Lichen Products»*. St. Louis, 400 p.
07. EAGLE, H. (1959) — Amino acid metabolism in mamalian cell cultures. *Science* **130**: 432-437.
08. EDWARDS, G. A. and FOGH, J. (1959) — Micromorphologic changes in human amnion cells during trypsinization. *Jour. Canc. Res.* **19**: 608-611.
09. FUJIKAWA, F.; HIRAYAMA, T.; WATANABE, M.; NAKAZAWA, S. and KURODA, H. (1973) — Studies on antitumor activities on nitrogen containing compounds from the lichen. *Chemotherapy*, **21** (11): 16.
10. GERAN, R. H.; GREENBERG, N. H.; MACDONALD, M. M.; SCHUMACHER, A. M. and ABBOTT, B. J. (1972) — Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Canc. Chemoth. Rep.*
11. HARKSWORTH, D. L. & HILL, D. J. (1984) — *The Lichen Forming Fungi*, New York, Chapman & Hall, 158 p.
12. HIRAYAMA, T.; FUJIKAWA, F.; KASSAHARA, T.; OTSUKA, M.; NISHIDA, N. and MIZUNO, D. (1980) — Anti-tumor activities of some lichen products and their degradation products. *Yakugaku Zasshi*, **100** (7): 755-59.



13. HIROSHI, O. (1972) — *J. Tak Res. Lab.*, 31 (2): 247-254.
14. HUOVINEN, K. & AHTI, T. (1986a) — The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladonia*. *Ann. Bot. Fenn.* 23: 173-188.
15. HUOVINEN, K. & AHTI, T. (1986b) — The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladina*. *Ann. Bot. Fenn.* 23: 93-106.
16. KUPCHAN, S. M. & KOPPERMAN, H. L. (1975) — L-usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. *Experientia*, 31 (6): 625.
17. LEGAZ, M. E.; VICENTE, C.; ASCASO, C.; PEREIRA, E. C. and XAVIER-FILHO, L. (1986) — Pigment analysis of sun and shade populations of *Cladonia verticillaris*. *Biochem. System. Ecol.*, 14 (6): 575-582.
18. LEGAZ, M. E.; VICENTE, C.; GALLO, M. and XAVIER-FILHO, L. (1987) — Lichen phenols from *Cladonia dendroides* thalli. *Lich. Phys. and Bioch.* 2: 13-21.
19. LLANO, G. A. (1951) — Economic use of lichens. *Smithsonian Institute Publ.* 4040: 385-422.
20. NACHON, S.; KUOZYNSKI, L.; GIEDANOWSKI, Y.; WEICZSEK, Z.; ZIMECKI, M.; BLASCZYB, B.; MORDANKI, M.; WICZORSK, Y. and FIOZERRALISZE-WASKA, L. (1981) — Chemical and biological properties of 2 pyridil-benzil-carbinol. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 29 (2): 217-233.
21. NISHIKAWA, Y.; YOSHIMOTO, K.; HORIUCHI, R.; MICHISTHITA, K.; OKABE, M. and FUKUOKA, F. (1979) — Studies on water-soluble constituents of lichens. 3) Changes in antitumor effect caused by modifications of pustulan-type and lichenan-type glucans. *Chem. Pharm. Bull.* 27 (9): 2065-2072.
22. NISHIKAWA, Y.; OKKI, R.; TAKAHASHI, K.; KURONO, G.; FUKUOKA, F. and EMORI, M. (1974) — Studies on water-soluble constituents of lichens. II) Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea* and *Cladonia* species. *Chem. Pharm. Bull.* 22 (11): 2692-2702.
23. OETTEL, H. & WILHELM, C. (1955) — Test of compounds against Ehrlich ascites tumor sarcoma-180 and Walker carcino-sarcoma 256. *Canc. Res. Supp.* 12 (15): 2-3, 129-146.
24. OYAMA, V. I. & EAGLE, H. (1956) — Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-ciocalteus). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 91: 305-307.
25. PEREIRA, E. C. G. (1989) — *Influência da sazonalidade na detecção de atividade antimicrobiana de Cladonia e Cladina (Líquên)*. Dissertação de mestrado, 193 p.
26. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T. and TANAKA, M. (1986a) — Polysaccharides in lichens and fungi I) Antitumor active polysaccharides of *Gyrophora esculetina* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano. *Chem. Pharm. Bull.* 16: 2362-2369.
27. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F. and NAKANISHI, M. (1968b) — Antitumor activities of lichen polysaccharides. *Zeit. Fur Krebs.* 71: 102-104.



28. STOCK, C. C.; CLARKE, D. A.; PHILIPS, F. S. and BARCLAY, R. K. (1955) — sarcoma-180 inhibition screening data. *Cancer Research Supplement*, 2 (15): 2-3, 179-132.
29. TAKAHASHI, K.; TAKEDA, T.; SHIBATA, S.; INOMATA, M. and FUKUOKA, F. (1974) — Polysaccharides of lichens and fungi. VI Antitumor active polysaccharides of lichen Stictaceae. *Chem. Pharm. Bull.* 22 (2): 404-408.
30. TAKAHASHI, R.; KON, T.; YOKOTO, I. and SHIBATA, S. (1981) — Chemo-taxonomic studies on the polysaccharides of stereocaulaceous lichens. *Carboh. Res.*, 89: 166-173.
31. TAKAI, M.; UEHARA, Y. and BEISLER, J. A. (1979) — Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. *J. Med. Chem.*, 22 (11): 1380-1384.
32. XAVIER-FILHO, L.; PAULO, M. Q.; VICENTE, C. and LEGAZ, M. E. (1985) — Phenols from *Cladonia sandstedei* analyzed by HPLC. *Crypt. Bryol. Lichenol.* 6 (2): 143-150.

## ALGUNS FUNGOS LENHÍCOLAS DO PARQUE NACIONAL DA PENEDA-GERÊS, NOVOS PARA PORTUGAL

I. MELO \* & M. T. TELLERÍA \*\*

\* Museu, Laboratório e Jardim Botânico, Rua da Escola Politécnica, 58,  
1200 Lisboa — Portugal.

\*\* Real Jardín Botánico, Plaza de Murillo, 2, 28014 Madrid — Espanha.

*Recebido em 6 de Julho de 1990.*

### SUMMARY

Thirty four species of Aphyllophorales (Fungi, Basidiomycetes), mainly corticia and polypores, are reported as new to Portugal. Specimens were collected at the Peneda-Gerês National Park, the selected area for the first foray of the Iberian Mycological Flora project. Short descriptions, ecological and chorological notes referring to the Iberian Peninsula are provided for every fungus species, and many are illustrated.

### SUMARIO

Trinta e quatro espécies de Aphyllophorales (Fungi, Basidiomycetes), em grande parte Corticiaceae e Polyporaceae, são referidas pela primeira vez para Portugal. Os espécimes foram todos colhidos no Parque Nacional da Peneda-Gerês, a área seleccionada para a realização da primeira campanha integrada no projecto «Flora Micológica Ibérica». É dada uma breve descrição dos himenóforos, bem como alguma informação adicional sobre a ecologia e corologia das espécies na Península Ibérica; grande parte delas está ilustrada.

**S**ITUADO no NW de Portugal, ao longo da fronteira espanhola (Galiza), o Parque Nacional da Peneda-Gerês ocupa o limite NE e NW das províncias do Minho e de Trás-os-Montes e Alto Douro, respectivamente, ocupando uma área aproximada de 72 000 ha. Pela sua situação, riqueza de vegetação, diversidade de microclimas e espécies vegetais, foi considerado como local prioritário para a realização de uma primeira campanha micoló-

gica, integrada no projecto Flora Micológica Ibérica. No decurso do estudo dos fungos colhidos durante esta campanha, encontramos, juntamente com outras bastante comuns, um número considerável de espécies de Aphyllophorales nunca referidas para Portugal. Grande parte destas espécies possuem himenóforos reduzidos, passando muitas vezes despercebidos. Talvez seja esta a razão porque só foram colhidas em uma ou duas localidades.

Este estudo é baseado em colecções depositadas em LISU e MA-Fungi. As espécies estão dispostas por ordem alfabética, independentemente das suas relações sistemáticas e, para cada uma, é feita uma pequena descrição baseada nos espécimes examinados, acentuando-se os caracteres que as distinguem das espécies próximas, suplementada, em alguns casos, com dados sobre a sua ecologia e distribuição na Península Ibérica.

***Aleurocystidiellum disciforme* (DC.: Fr.) Tellería**

Fig. 1

*Biblioth. Mycol.* 135: 25, 1990

Terras de Bouro, Gerês, Albergaria, 29TNG7227, 750 m, *Quercus robur*, em tronco, 1989.04.29, I. Melo, J. Cardoso, M. T. Tellería, K. Hjortstam & M. Dueñas 4022 (LISU, MA-Fungi).

Himenóforos discóides de 1-2,5 cm de diâmetro, coriáceos, creme-esbranquiçados, lisos ou ligeiramente tuberculados, com margens espessadas, pouco aderentes ao substrato. Sistema de hifas monomítico, hifas hialinas, septadas, com ansas, de paredes finas ou muito espessadas nas hifas basais, 2-3,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro; gloecistídios 55-85  $\times$  7-10  $\mu\text{m}$ , sulfopositivos, com ápice moniliforme; basídios subaclarados, 75-80  $\times$  8-12  $\mu\text{m}$ , com 4 esterigmas longos atingindo 18  $\mu\text{m}$  de comprimento; esporos hialinos, subglobosos a elipsóides, de membrana irregularmente verrucosa, com apículo pronunciado, amilóides, medindo cerca de 16-20  $\times$  10-13,5  $\mu\text{m}$ .

*A. disciforme* desenvolve-se, como parasita, em troncos vivos de caducifólias, geralmente espécies de *Quercus* (LEMKE, 1964).

A ausência de acanto e dendrohifídios no himénio, associada à forma dos himenóforos e ornamentação dos esporos levaram BOIDIN *et al.* (1968; 1985) a transferirem a espécie do género *Aleurodiscus* para o género *Aleurocystidiellum*; a nova combi-

nação, porém, não foi válida, uma vez que os autores não publicaram o respectivo basiónimo, falha que foi depois reparada por TELLERÍA (1990).

**Aleurodiscus aurantius** (Pers.: Fr.) Schroet.

Fig. 2

*Krypt.-Fl. Schlesien* 3 (1): 429, 1988

Terras de Bouro, Gerês, Albergaria, 29TNG7227, 750 m, *Arbutus unedo*, em ramos finos, 1989.04.29, I. Melo, J. Cardoso, M. T. Tellería, K. Hjortstam & M. Dueñas 4032 (LISU, MA-Fungi).

Himenóforos corticóides, resupinados, fortemente aderentes ao substrato, pálidos, com tonalidade alaranjada, sem margem bem definida. Sistema de hifas monomítico, hifas hialinas, de paredes finas, septadas e com ansas, 2,5-4  $\mu\text{m}$  de diâmetro; cistídios quase sempre ampuliformes, de ápice moniliforme, sulfopositivos; presença de numerosos dendrohiáfídios, fortemente ramificados no ápice, cobertos de cristais; basídios cilíndricos a subclavados, 60-75  $\times$  12-17  $\mu\text{m}$ , com 4 esterigmas longos, até 20  $\mu\text{m}$  de comprimento; esporos hialinos, elipsóides, finamente equinulados, amilóides, com cerca de 16-20  $\times$  12-14  $\mu\text{m}$ .

Espécie cosmopolita, conhecida na Península Ibérica de vários pontos de Espanha: no norte, para as províncias de Astúrias (DUEÑAS & TELLERÍA, 1988: 17-18), Álava (SALCEDO LARRALDE, 1989: 36-37), Guipúzcoa (TELLERÍA & NAVARRO, 1980: 9) e Huesca (HJORTSTAM *et al.*, 1981: 528) e no sul para a província de Granada (ORTEGA *et al.*, 1982: 54). Desenvolve-se como saprófita em ramos e troncos mortos de angiospérmicas, na Europa com uma preferência marcada pela família das *Rosaceae* (LEMKE, 1964). O material português, apesar de escasso, era facilmente reconhecido como *A. aurantius*, pelos grandes esporos equinulados, cistídios ampuliformes e dendrohiáfídios ramificados.

**Amylostereum laevigatum** (Fr.) Boidin

Fig. 3

*Rev. Mycol.* 23: 345, 1958

Arcos de Valdevez, Mezio, Entre Outeiros, 29TNG5937, 630 m, em madeira não identificada, 1989.04.30, M. T. Tellería, 9631Tell. (LISU, MA-Fungi).





Himenóforos resupinados, adnados, lisos ou quando secos finamente fendilhados, castanhos claros. Sistema de hifas monomítico, hifas hialinas ou ligeiramente amareladas, septadas, com ansas, fortemente ramificadas, de membrana fina ou espessa, difíceis de diferenciar. Cistídios, quando jovens, subulados, de paredes finas, mais tarde tornando-se mais espessas, castanhas amareladas a castanhas, fortemente incrustadas na parte apical; basídios estreitamente aclavados,  $25-35 \times 4-6 \mu\text{m}$ , com 4 esterigmas; esporos subcilíndricos a cilíndricos, de membrana fina, amilóides,  $7-10 \times 3-4 \mu\text{m}$ .

Em Portugal, a espécie mais próxima de *A. laevigatum* é *A. areolatum* que se distingue da anterior por possuir himenóforos geralmente efuso-reflexos, com estrutura dupla, sistema de hifas dimítico e esporos de menores dimensões.

Com a presença desta espécie no Parque Nacional da Peneda-Gerês, é ampliada a sua área de distribuição na Península Ibérica onde até agora só era conhecida do quadrante NW de Espanha, Álava, Burgos (SALCEDO LARRALDE, 1989: 43-44), Soria, Huesca (TELLERÍA, 1990: 28) e da zona centro, Madrid e Guadalajara (TELLERÍA, l. c.).

***Boidinia furfuracea* (Bres.) Stalp. & Hjortst.**

Fig. 4

*Mycotaxon* 14: 77, 1982

Terras de Bouro, Gerês, Leonte, 29TNG7124, 850 m, em soca de *Cryptomeria japonica*, 1989.04.29, I. Melo, J. Cardoso, M. T. Tellería, K. Hjortstam & M. Dueñas 3971 (LISU); Terras do Bouro, Gerês, Malhadoura, 29TNG7418, 650 m, em *Pinus sylvestris*, 1989.04.28, M. T. Tellería, 9544Tell. (MA-Fungi).

Himenóforos resupinados, adnados, primeiro farinoso-porosos, depois peliculares, finos, esbranquiçados a cremes, com margem indistinta. Sistema de hifas monomítico, hifas de membrana fina a ligeiramente espessada, apresentando por vezes dilatações, septadas, com ansas; gloeocistídios tubulares, alguns com base dilatada, terminais ou, por vezes, laterais,  $35-80 \times 4-8 \mu\text{m}$ ; basídios tubulares a suburniformes, flexuosos, com um ou mais septos adventícios,  $22-30 \times 4-6 \mu\text{m}$ , com 4 esterigmas; esporos subglobosos a globosos, de  $5-6,5 \mu\text{m}$  de diâmetro, equinulados, amilóides.