MORFOLOGÍA DEL ESPORÓFITO Y EL GAMETÓFITO DE *ASPLENIUM DAREOIDES* (ASPLENIACEAE, PTERIDOPHYTA)

María del Carmen Lavalle[1] & Carmen Prada[2]

[1]*Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, calle 64 Nº3, La Plata, Buenos Aires, Argentina; mdelclavalle@hotmail.com* (autor corresponsal).
2Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, Madrid, España.

Abstract. Lavalle, M. C. & C. Prada. 2007. Sporophyte and gametophyte morphology of *Asplenium dareoides* (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Darwiniana* 45(1): 13-22.

Sporophyte morphology of *Asplenium dareoides* was reviewed, and development and morphology of its gamethophytes were studied for the first time from spore culture on mineral agar. Spores germinated 10 days after sown, and cultures reached a low percentage of germination (1 to 5%). Filamentous phase was initiated at 15 days. Gametophytes followed the *Aspidium* type of development, which leads to a hairy adult state, with cylindrical, marginal and superficial hairs. The morphological study of the sporophyte was based on foliar architecture, indument, epidermal patterns of pinnulae and indusium, spore size (mean values between 28.9 and 39.7 µm) and spore morphology. Gametic chromosome number found was n = 72. Morphological and palynological characters of *A. dareoides* do not support the close relationship with *A. flabellifolium*, recently suggested from molecular data.

Keywords. *Asplenium*, development, epidermis, gametophyte, South America, spores.

Resumen. Lavalle, M. C. & C. Prada. 2007. Morfología del esporófito y el gametófito de *Asplenium dareoides* (Aspleniaceae, Pteridophyta). *Darwiniana* 45(1): 13-22.

Se revisó la morfología del esporófito y se estudió por primera vez el desarrollo y la morfología del gametófito de *Asplenium dareoides*, a partir de esporas cultivadas en un medio nutritivo solidificado con agar. Las esporas germinaron a partir de los 10 días en un porcentaje muy bajo (1 al 5%). La fase filamentosa se inició a los 15 días. Los gametófitos siguieron un modelo de desarrollo de tipo *Aspidium*, y en la madurez presentaron pelos marginales y superficiales, cilíndricos y algo ensanchados en el ápice. El estudio morfológico del esporófito se basó en la arquitectura foliar, el indumento, el modelo epidérmico de las pínnulas y de los indusios, y en la morfología y el tamaño de las esporas (longitud media de 28,9 a 39,7 µm). El estudio de la meiosis arrojó un número cromosómico gamético n = 72. Los caracteres morfológicos externos y palinológicos de *A. dareoides* no reflejan su parentesco con *A. flabellifolium*, recientemente sugerido sobre la base de caracteres moleculares.

Palabras clave. *Asplenium*, epidermis, esporas, desarrollo, gametófito, Sudamérica.

INTRODUCCIÓN

Las Aspleniaceae son una de las familias más ricas dentro de los helechos leptosporangiados; incluyen alrededor de 700 especies, la mayoría tropicales, pero también están presentes en regiones templadas de todos los continentes. Aún no existe un acuerdo sobre su sistemática. La mayoría de las especies nunca han sido ubicadas en una clasificación infragenérica. Holttum (1947, 1949), Pichi Sermolli (1977) y Tryon & Tryon (1982) dividen a las Aspleniaceae en un número variable de pequeños géneros satélite, y citan a *Asplenium L.* como uno de los géneros más abarcadores que incluye aproximadamente el 90% de las especies. Posteriormente, Kramer & Viane (1990) reconocen a *Asplenium* como único género dentro de la familia.

Original recibido el 7 de febrero de 2007; aceptado el 28 de mayo de 2007

Estudios recientes han aportado datos sobre la sistemática y la filogenia del grupo basándose en el análisis de caracteres morfológicos del esporófito (Brownsey, 1976; Salvo et al., 1982); en estudios palinológicos (Viane & van Cotthem, 1977; Puttock & Quinn, 1980; Tryon & Lugardon, 1991), citológicos (Reichstein, 1981; Sleep, 1983) y moleculares (Gastony, 1986; Murakami et al., 1999; Schneider et al., 2004), abordándose en ellos el análisis de un limitado número de especies.

Asplenium es un género cosmopolita que incluye especies terrestres, rupícolas o epífitas. Para Argentina se han citado cerca de 29 especies, 17 de las cuales se hallan en las provincias del NO (de la Sota, 1977) y 3 en la región patagónica (Looser, 1944; de la Sota et al., 1998).

Asplenium dareoides Desv. está restringida al cono sur de América meridional, a los bosques subantárticos y andino-patagónicos. Su área de distribución incluye a Chile central, austral e insular, y en Argentina crece desde la región del Lago Nahuel Huapí hasta Tierra del Fuego, en la Isla de Los Estados e Islas Malvinas (de la Sota et al., 1998). Capurro (1969) menciona la presencia de esta especie en las sierras de Curamalal y Ventana, en la provincia de Buenos Aires, con referencia a dos ejemplares, uno de ellos depositado en BA y el otro en LP, que no ofrecen dudas acerca de su identidad. Ponce (1996) la cita para la provincia de Buenos Aires, y Delucchi (2006) la incluye en el catálogo de plantas amenazadas de dicha provincia, en la categoría de especie con datos insuficientes y posibles causas de amenaza desconocidas. Desde 1924 no se ha vuelto a coleccionar para la provincia de Buenos Aires (Ramos Giacosa, com. pers.). Es una especie que crece sobre troncos entre musgos y raíces, sobre piedras o terrestre, en bosques húmedos y barrancas de arroyos, desde el nivel del mar hasta los 2000 m.

Asplenium dareoides es tratada en las floras por Capurro (1969), Rodríguez R. (1995) y de la Sota et al. (1998). Schneider et al. (2004) la incluyen en un estudio cladístico basado en las secuencias de ADN cloroplástico, junto a otras 70 especies de *Asplenium*, siendo *A. flabellifolium* Cav. de Australia y Nueva Zelanda la más próxima genéticamente a *A. dareoides*, ambas agrupadas en un clado junto a otras especies de *Aspleni*um de las regiones templadas del Hemisferio Sur. Jara-Seguel et al. (2006) estudiaron su número cromosómico en raíces de material chileno y encontraron que se trata de una especie tetraploide, con 2n=144.

No hay contribuciones morfológicas completas que analicen los diferentes aspectos del esporófito (indumento de ejes y láminas, modelos epidérmicos, tipos de estomas, entre otros) ni existen antecedentes bibliográficos sobre la generación gametofítica. El objetivo de este trabajo es aportar datos que contribuyan a actualizar la taxonomía y a mejorar el conocimiento de la especie caracterizando a sus dos generaciones, puesto que *A. dareoides* es una de las pocas especies de *Asplenium* con distribución tan austral. Además se compara a esta especie con *A. flabellifolium* de Australia y Nueva Zelanda, especie afín según los datos moleculares. Se estudió la arquitectura foliar, el patrón de venación, la morfología y distribución del indumento, el modelo epidérmico de las pínnulas, el tamaño de los estomas y de las esporas, la morfología de las mismas; el color, margen y modelo epidérmico del indusio. Además se completó el conocimiento citológico con el estudio del número cromosómico gamético. Se aportan datos sobre el tipo de desarrollo del gametófito y la secuencia de formación de los gametangios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con material coleccionado por las autoras y procedente de los herbarios BA, LP, MA, MACB y SI (Holmgren et al., 1990).

Se seleccionaron muestras representativas de la variación morfológica del esporófito (Prada et al. s.n., MACB 94515-94523, Rodríguez & Grau 2165, Aedo 6942, 7306, MA) para los estudios anatómicos y palinológicos (Tabla 1).

Para el estudio de los modelos epidérmicos se diafanizó el material con hidróxido de sodio al 3% acuoso, se trató con hipoclorito de sodio comercial diluido 1:1 y se coloreó con azul de toluidina O (TBO) 1% acuoso. Se midieron 30 estomas en cada ejemplar. La terminología usada para describir las células epidérmicas es la propuesta por Rolleri & Deferrari (1986).

Las esporas se montaron en DePex y se midió la longitud en 30 esporas de cada muestra con microscopio óptico, en vista polar o ecuatorial longitudinal excluyendo el perisporio. El estudio morfológico

Tabla 1. Longitud de esporas y estomas en *Asplenium dareoides*. Los números entre paréntesis indican los valores medios. Abreviaturas: **NE,** Neuquén; **TF,** Tierra del Fuego; **R,** Región.

Muestra	Longitud Esporas	Longitud Estomas (µm)	Coleccionistas
NE: Hua-Hum	30.0 (35.8) 45.0	42.5 (54.0) 70.0	*Prada et al. s.n.* MACB 94516
NE: Quila Quina	27.5 (35.0) 40.0	45.0 (56.6) 65.0	*Prada et al. s.n.* MACB 94517
NE: Puerto Blest	30.0 (35.7) 52.5	40.0 (52.5) 67.5	*Prada et al. s.n.* MACB 94518
TF: Lapataia, Lago Roca	22.5 (30.1) 37.5	37.5 (50.1) 55.0	*Prada et al. s.n.* MACB 94519
TF: Laguna Alejandro	22.5 (28.9) 40.0	37.5 (46.4) 52.5	*Prada et al. s.n.* MACB 94520
TF: Camino Las Termas	32.5 (38.6) 42.5	42.5 (47.4) 52.5	*Prada et al. s.n* .MACB 94521
TF: Rancho Hambre	27.5 (33.3) 42.5	35.0 (44.3) 57.5	*Prada et al. s.n*. MACB 94515
TF: Las Termas-Ruta 3	32.5 (39.7) 45.0	42.5 (47.7) 50.0	*Prada et al. s.n.* MACB 94522
TF: Ruta J-Almanza	22.5 (31.9) 40.0	32.5 (51.2) 67.5	*Prada et al. s.n.* MACB 94523
R VIII: Antuco	-----	52.5 (57.1) 62.5	*Rodríguez & Grau* 2165 BA
R VIII: Hualpén	30.0 (39.6) 47.5	-----	*Aedo* 6942 BA
R X: Alerce Costero	32.5 (35.9) 40.0	45.0 (50.5) 57.5	*Aedo* 7306 BA

del perisporio se realizó con microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-T 330 A (15 KV).

Para el estudio de la meiosis, se fijaron los esporangios en el campo en una mezcla de alcohol absoluto-ácido acético (3:1). La tinción se realizó con hematoxilina de Wittman durante 6-12 horas, a continuación los esporangios se lavaron con ácido acético glacial y se montaron en medio Hoyer diluido para realizar los aplastados y obtener preparaciones semipermanentes.

Para la obtención de gametófitos se utilizaron esporas procedentes de las muestras de Neuquén y Tierra del Fuego (Tabla 1) que se sembraron en placas de Petri de 6 cm de diámetro, con un medio nutritivo solidificado con agar (Dyer, 1979), mantenidas en una cámara de cultivo a 20 ± 2ºC, con 12 horas de luz fluorescente (28 µEcm-2) y 12 horas de oscuridad. El tiempo transcurrido desde la colección de las plantas hasta la siembra de las esporas fue de 16 semanas, durante las cuales las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente.

Las ilustraciones se hicieron con microscopio óptico y microscopio estereoscópico equipados con tubo de dibujo, y las fotos se tomaron con una cámara digital.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esporófito

El esporófito tiene las frondes erguidas, con la lámina bipinnado-pinnatífida a tripinnado-pinnatífida y presenta en las muestras estudiadas una variación de formas, desde plantas achaparradas con el pecíolo de la misma longitud que la lámina y los segmentos próximos entre sí, anchos y lobulados, hasta formas alargadas, con el pecíolo más largo que la lámina, segmentos distantes, estrechos y profundamente incisos (Fig. 1 A, C, E, H). Esta diversidad de formas puede presentarse en una misma población. Las láminas llevan pinnas ascendentes, con la pínnula acroscópica ligeramente mayor que las restantes. Los últimos segmentos son sésiles o cortamente peciolulados, enteros o lobulados, con lóbulos más o menos profundos y dentados; estos dientes corresponden a células epidérmicas papilosas. Las venas son libres, divididas dicotómicamente varias veces y no llegan al margen (Fig. 1 B, D, F, G).

Asplenium flabellifolium es una especie de tamaño similar pero sus caracteres morfológicos

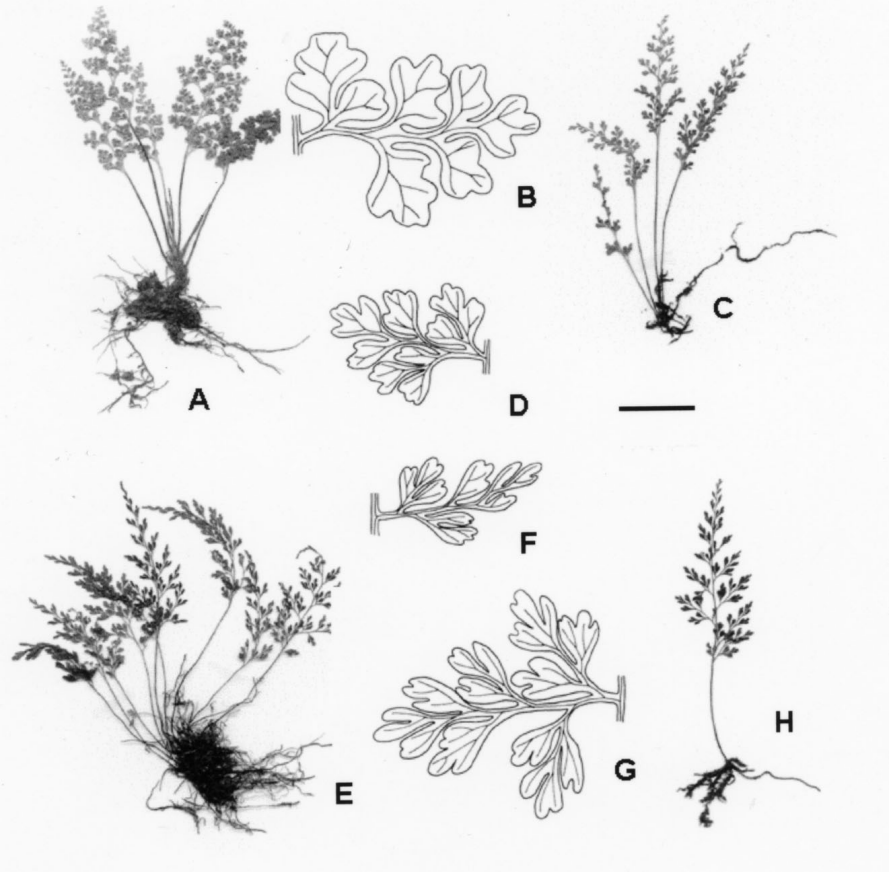

Fig. 1. Variación morfológica de los esporófitos y las pinnas en *Asplenium dareoides*. **A-B,** Neuquén, Puerto Blest, camino al Lago Frías, *MACB 94518*. **C-D,** Tierra del Fuego, camino de Las Termas, *MACB 94521*. **E-H,** Tierra del Fuego, camino a la Laguna Alejandro, *MACB 94520*. Escala: A, C, E, H, 2 cm; B, D, F, G, 0,5 cm.

externos difieren notablemente por presentar láminas postradas, lineares, monopinnadas, con pinnas flabeladas que disminuyen de tamaño gradualmente desde la base hacia el ápice, y raquis prolongado más allá de las últimas pinnas formando una estructura filiforme radicante.

Indumento

Los rizomas llevan escamas de color castaño oscuro, clatradas, deltoides a ovado-lanceoladas, de ápice acuminado y margen entero con cortos, y aislados apéndices marginales que rematan en una célula glandular, al igual que el ápice de la escama (Fig. 2 A-C). Los estípites, los raquis y las costas son casi glabros, con algunos pelos glandulosos esparcidos, tricelulares, con la célula basal claviforme. Las láminas son glabras en la superficie adaxial y escasamente pubescentes, con pelos semejantes a los del pecíolo, en la superficie abaxial y sobre las venas.

Modelos epidérmicos

Las pínnulas presentan, en la mayoría de las muestras, un modelo epidérmico sinuoso distante, similar en el haz y en el envés. En los epifilos se encuentran células más largas que anchas (radio celular 2:1) con algunas células isodiamétricas (radio celular 1:1) con ondas curvas uniformes, profundas y amplias. Los hipofilos muestran células alargadas con un radio celular de 2-3:1, con ondas curvas de amplitud y profundidad no uniformes (Fig. 3 A-B). En la muestra de Almanza se observaron células epidérmicas más pequeñas, con

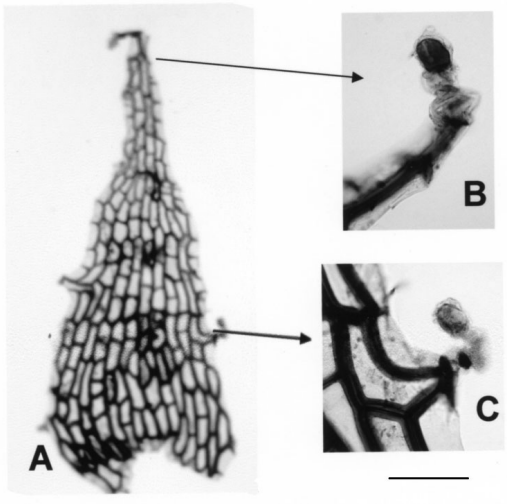

Fig. 2. Indumento en *Asplenium dareoides*. **A,** escama del rizoma. **B-C,** detalle de las células glandulares del ápice y de los apéndices laterales, respectivamente. Escala: A, 350 µm; B, C, 150 µm. De *MACB 94518*.

epifilos de ondas curvas uniformes poco profundas e hipofilos con ondas curvas frecuentes de amplitud más o menos uniforme. En la muestra del Lago Roca las células del epifilo presentan ondas curvas de amplitud y profundidad no uniformes con el seno engrosado, mientras que las células del hipofilo tienen ondas angulosas, cuadrangulares y curvas, profundas y engrosadas (Fig. 3 C-D).

Los estomas son siempre polocíticos, con predominio de parietocíticos y ocasionales anomocíticos. La longitud media de los mismos varía desde 44.3 hasta 56.6 µm (Tabla 1).

Indusios

Las pínnulas llevan de 1 a 3 soros ovalados recubiertos por un indusio blanquecino abovedado, glabro, de margen entero, recurvado sobre el soro e inserto en la lámina por su tercio medio, lo que le confiere un contorno reniforme. El indusio tiene un modelo epidérmico sinuoso diferente al de la epidermis de la lámina, presenta ondas curvas de paredes engrosadas en forma desigual, más espesas en los senos, profundas, a muy profundas hacia el margen (Fig. 3 E-F). Este carácter es estable en todas las muestras observadas.

Esporas

Las esporas son monoletes, elípticas en vista polar, ligeramente reniformes en vista ecuatorial longitudinal, lofadas, con pliegues anastomosados de superficie escabra que dejan aréolas más o menos poligonales, de tamaño variable, perforadas, con una trama de elementos esculturales entrelazados y anastomosados que producen una superficie equinulada (Fig 4 A-B). Estos caracteres son coincidentes con los que menciona Viane (1993) para las esporas de especímenes procedentes de Chile. El tamaño de las esporas es variable, con valores medios que van desde 28.9 hasta 39.7 µm (Tabla 1). En la población de Almanza se encontraron algunas plantas con una proporción elevada de esporas abortivas, mezcladas con otras de apariencia normal.

Las muestras procedentes de la provincia de Tierra del Fuego (Camino a Las Termas, Rancho Hambre, Ruta J-Almanza) fueron estudiadas citológicamente. Se pudieron analizar cinco células madre de las esporas, en las que se observaron meiosis regulares con metafases I de 72 bivalentes, lo que ratifica que se trata de tetraploides, con un número cromosómico gamético n = 72 (Fig. 5 A-B).

En *Asplenium*, como en otros géneros de pteridófitos, es frecuente que haya relación entre el nivel de ploidía y los tamaños de esporas y estomas (Barrington et al., 1986; Pangua et al., 1989). En *A. dareoides* se ha encontrado una variación en el promedio de la longitud de las esporas de 11 µm, lo que supone un rango de variación de los tamaños más amplio que en otras especies del género para un mismo nivel de ploidía. Por otra parte, las plantas con esporas de menor tamaño no son en *A. dareoides* las que presentan los estomas más pequeños.

Brownsey (1977), Puttock & Quinn (1980) y Braggins & Large (1990) señalan en sus descripciones de las esporas de *A. flabellifolium* que el perisporio es plegado, con abundantes pliegues alados de superficie lisa, irregulares, no fenestrados, con crestas fimbriadas, caracteres que difieren de los que presentan las esporas de *A. dareoides*. La longitud de las esporas comprende un rango de variación muy grande, de 37 a 62 µm, lo que probablemente está relacionado con la existencia de citotipos hexaploides y octoploides en *A. flabellifolium* (Brownsey, 1977).

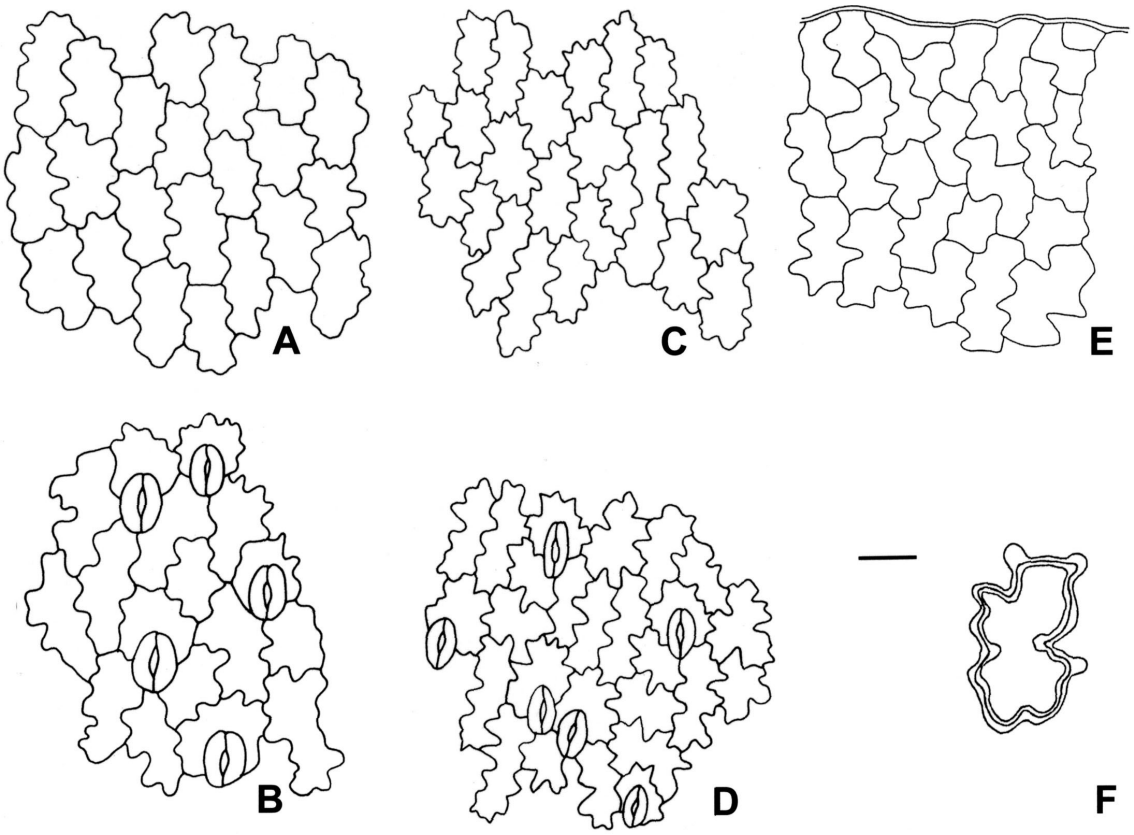

Fig. 3. Modelos epidérmicos en *Asplenium dareoides*. **A-D,** lámina, epifilos en la fila superior, hipofilos en la fila inferior. **A-B,** modelo típico con ondas curvas (paredes anticlinales), Las Termas, *MACB 94521*. **C-D,** modelo con ondas angulosas (paredes anticlinales), Lago Roca, *MACB 94519*. **E,** lámina y margen del indusio. **F,** detalle de una célula del indusio con los engrosamientos de la pared. Escala: A-E, 50 µm; F, 25 µm.

Gametófitos

La germinación de las esporas, evidenciada por la formación del primer rizoide, se inició diez días después de la siembra. De las nueve muestras sembradas sólo germinaron dos, los porcentajes de germinación alcanzados fueron muy bajos, de 1% en la muestra de Lapataia y 5% en la de Las Termas. Este bajo porcentaje de germinación sugiere que la reproducción por vía sexual tendría un papel secundario respecto a la vegetativa que se lleva a cabo mediante raíces gemíferas.

La fase filamentosa del gametófito, formada por 3 a 5 células, se inició alrededor del día 15 y el desarrollo del mismo sigue el tipo *Aspidium* (Nayar & Kaur 1969, 1971), caracterizado por la formación más o menos temprana de un pelo en el joven gametófito. A medida que el gametófito, crece se van produciendo nuevos pelos, que se localizan en el margen y en la superficie del gametófito. Se trata de pelos unicelulares cilíndricos, más o menos alargados, a veces ligeramente ensanchados en la base y en el ápice. Los gametófitos maduros son cordados y ligeramente alargados (Fig. 6 A-C). Los anteridios se desarrollan antes que los arquegonios, esta secuencia en la formación de los gametangios es la más común en los helechos homospóreos (Atkinson & Stockey, 1964). En los anteridios la célula opercular es algo prominente, y en los arquegonios los cuellos están formados por cuatro hileras de 5-7 células de longitud (Fig. 6 D-F).

No hemos encontrado datos sobre las características morfológicas de la generación gametofítica de *A. flabelifolium*; Lovis (1973) y Brownsey (1977) obtuvieron evidencias sobre la condición

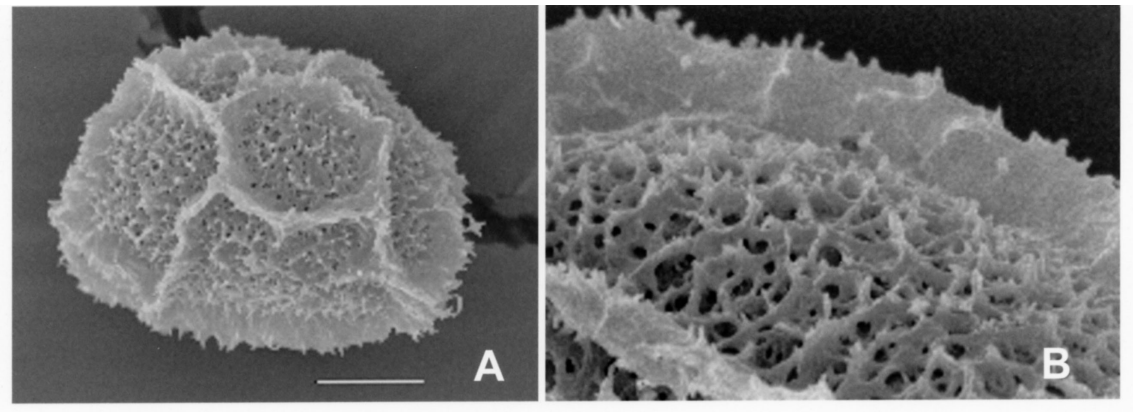

Fig. 4. Esporas de *Asplenium dareoides* (microscopia electrónica de barrido). **A,** vista ecuatorial longitudinal, *MACB 94519*. **B,** detalle del perisporio. Escala: A, 10 µm; B, 5 µm.

apógama de esta especie, que se multiplica activamente por vía vegetativa gracias a sus ápices foliares radicantes.

TRATAMIENTO TAXONÓMICO

Asplenium dareoides Desv., Ges. Naturf. Freunde Berlin Mag. Neuesten Entdeck. Gesammten Naturk. 5: 322. 1811. "Habitat in America australi" [holotipo P(?)].

La sinonimia completa puede consultarse en Rodríguez (1995).

Plantas de pequeño tamaño. Raíces muy abundantes y gemíferas, horizontalmente extendidas. Rizomas cortos, suberectos y escamosos. Estípites lisos, negros en la parte basal y verdes en la parte distal, de aproximadamente la mitad a dos tercios de la longitud total de la fronde. Raquis y costas surcados en el haz y lisos en el envés. Frondes en fascículos, en pequeño número. Láminas bipinnado-pinnatífidas a tripinnado-pinnatífidas, aovado-lanceoladas, herbáceas. Pinnas alternas, asimétricas, ascendentes, de contorno similar al de las láminas. Pínnulas enteras o lobuladas. Venas exclusivamente bifurcadas varias veces. Indumento escaso, glandular, formado por escamas clatradas y pelos paucicelulares.

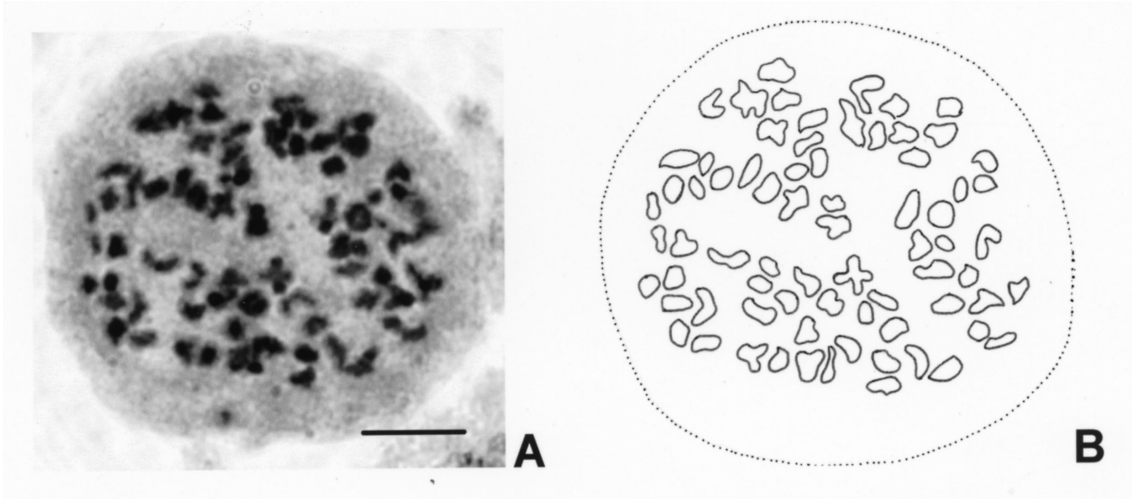

Fig. 5. Cromosomas en *Asplenium dareoides*. **A,** metafase de una célula madre de las esporas de la muestra *MACB 94515*. **B,** diagrama explicativo. Escala: 10 µm.

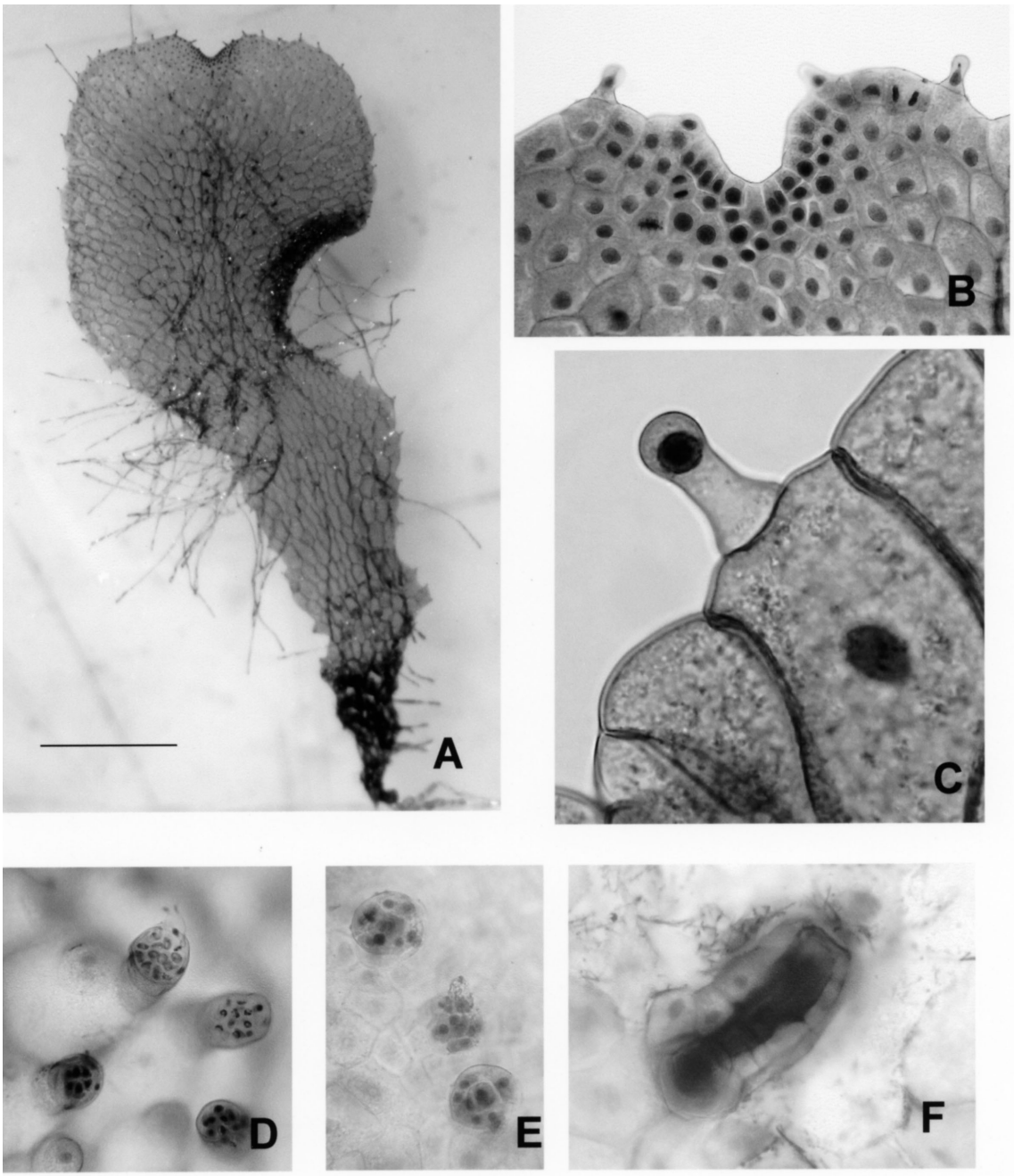

Fig. 6. Gametófito en *Asplenium dareoides*, **A,** gametófito maduro. **B,** detalle de la escotadura. **C,** detalle del pelo. **D,** anteridios. **E,** arquegonios en vista superficial. **F,** arquegonio maduro en vista lateral. Escala: A, 150 µm; B, 50 µm; C-F, 10 µm. De *MACB 94521.*

Modelos epidérmicos sinuosos distantes, similares en haz y envés. Estomas polocíticos. Soros ovalados. Indusio blanquecino, glabro, de margen entero. Esporas monoletes, lofadas. Número cromosómico gamético n= 72. Gametófitos pelosos con desarrollo de tipo *Aspidium*. Anteridios con célula opercular prominente. Arquegonios con cuellos de cuatro hileras de células.

Material examinado

ARGENTINA. **Buenos Aires.** Depto. Saavedra, Sierra de Cura-Malal, Pigüé, I-1924, *L. Hauman 24/5052* (BA). **Chubut.** Depto. Tehuelches, Valle de la Laguna Blanca, 10-II-1902, *J. G. Koslowsky 49* (SI); Depto. Futaleufú, Parque Nacional Los Alerces, Brazo Norte del Lago Menéndez, *M. J. Dimitri 9356* (BA). **Neuquén.** Depto. Huilliches, Parque Nacional Lanín, Bosques de Quila Quina, 28-XI-2005, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Depto. Lácar, Hua Hum, bosque valdiviano al noroeste del lago Lácar, 30-XI-2005, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Depto. Los Lagos, Lago Nahuel Huapi, Puerto Blest, camino al Lago Frías, 3-XII-2005, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Lago Correntoso, 21-III-39, *A. L. Cabrera 5068* (LP). Río Negro, Depto. Bariloche, Puerto Frías, 19-III-63, *E. de la Sota 2857* (LP); Nahuel Huapí, Laguna Frías, 8-XI-65, *I. Gamundi & Ramalli 3001* (LP). Santa Cruz, Lago Argentino, s/c, 91643 (BA). **Tierra del Fuego.** Isla de los Estados, Pto. Cook, al E, en turbera, 25-XII-67, *M. A. Torres 1123* (LP); Depto. Río Grande, Camino de Las Termas, 15-III-05, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Las Termas, desde Tolhuin a 12 km por la ruta 3, 22-4-06, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Depto. Ushuaia, Ruta J, desvio a Almanza, 23-IV-2006, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Rancho Hambre, 23-IV-2006, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Parque Nacional Tierra del Fuego, Lapataia, Lago Roca, 17-III-2005, *C. Prada et al. s/n* (MACB); Camino a la Laguna Alejandro, 18-III-2005, 28-IV-2006, *C. Prada et al. s/n* (MACB).

CHILE. **IV Región de Coquimbo.** Talimay, 15-IX-57, *C. Ricardi & C. Marticorena 4306/691* (LP). **V Región de Valparaíso.** Islas Juan Fernández: Masafuera, quebrada just below and SE of ridge above Las Tres Torres, probably the upper part of Quebrada Inocentes, 4-II-1986, *T. F. Stuessy & L. Gaete 9506* (MA). **VIII Región de Bio Bio.** Parque Hualpén, 21-XI-2001, *C. Aedo 6942* (MA); Isla Mocha, camino entre el faro oeste y La Hacienda Portezuelo, 14-III-71, *E. Weldt & R. Rodríguez 1059/354* (LP); Antuco, Cerro Pilque, 1-IV-1987, *R. Rodríguez & J. Grau 2165* (MA). **X Región de Los Lagos.** Valdivia, Reserva Natural del Alerce Costero, 31-XII-2001, *C. Aedo 7306* (MA). **XII Región de Magallanes y Antártica Chilena.** Puerto Natales, entre Puerto Toro y el glaciar Serrano, 19-I-2002, *C. Aedo 7643* (MA); Puerto Toro, Río Serrano, 2 km from mouth, 17-I-77, *D. Moore & A. Pisano 226* (LP).

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, llevado a cabo en el Departamento de Biología Vegetal I, de la Facultad de Biología, de la Universidad Complutense de Madrid, España.

BIBLIOGRAFÍA

Atkinson, L. R. & A. G. Stockey. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. *Phytomorphology* 14: 51-71.

Barrington, D. S.; C. A. Paris A. & T. A. Ranker. 1986. Systematic inferences from spore and stomate size in the ferns. *Amer. Fern J.* 76: 149-159.

Braggins, J. E. & M. F. Large. 1990. Spore morphology as a taxonomic data source in *Cyathea* J. E. Smith and *Asplenium L. Rev. Palaeobot. Palynol.* 64: 149-158.

Brownsey, P. J. 1976. A biosystematic investigation of the A*splenium lepidum* complex. *Bot. J. Linn. Soc.* 72: 235-267.

Brownsey, P. J. 1977. A taxonomic revision of the New Zealand species of *Asplenium*. *New Zealand J. Bot.* 15: 39-86.

Capurro, R. H. 1969. División Pteridophyta, en A. L. Cabrera (ed.), Flora de la Provincia de Buenos Aires I. Pteridófitas, Gimnospermas y Monocotiledóneas (excepto Gramíneas). *Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.* 4(1): 123-246.

de la Sota, E. R.1977. Familia Aspleniaceae, en A. L. Cabrera (ed.), Flora de la provincia de Jujuy,.Pteridophyta. *Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.* 13(2): 161-181.

de la Sota, E.R.; M. M. Ponce, M. A. Morbelli & L. Cassá de Pazos. 1998. Pteridophyta, en M. N. Correa (ed.), Flora Patagónica. *Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.* 8(1) 252-369.

Delucchi, G. 2006. Las especies vegetales amenazadas de la provincia de Buenos Aires: una actualización. *Boletín Científico APRONA (Asociación para la protección de la naturaleza)* 39: 19-31.

Dyer, A. F. 1979. The culture of fern gametophytes for experimental investigation, in A. F. Dyer (ed.), T*he experimental biology of ferns*, pp. 253-305. London: Academic Press.

Gastony, G. J. 1986. Electrophoretic evidence for the origin of a fern species by unreduced spores. *Amer. J. Bot.* 73: 1563-1569.

Holmgren, P. K.; N. H. Holmgren & L. Barnett. 1990. *Index Herbariorum*, Part I, Herbaria of the World, ed. 8. New York: New York Botanical Garden.

Holttum, R. E. 1947. A revised classification of leptosporangiate ferns. *J. Linn. Soc., Bot.* 53: 123-158.

Holttum, R. E. 1949. The classification of ferns. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc*. 24: 267-296.

Jara-Seguel, P.; M. Romero-Mieres & C. Palma-Rojas. 2006. Chromosome numbers of chilean pteridophytes: first contribution. *Gayana Bot*. 63: 115-118.

Kramer, K. U. & R. Viane. 1990. Aspleniaceae, en K. Kubitzki (ed.), *The families and genera of vascular plants,* vol. I. Pteridophytes and Gymnosperms. Heidelberg: Springer.

Looser, G. 1944. Sinopsis de los *Asplenium* (Filices) de Chile. *Lilloa* 10: 233-264.

Lovis, J. D. 1973. A biosystematic approach to phylogenetic problems and its applications to the Aspleniaceae. *Bot. J. linn. Soc.* 67 (Suppl. 1): 211-228.

Murakami, N.; S. Nogami, M. Watanabe & K. Iwatsuki. 1999. Phylogeny of Aspleniaceae inferred from rbcL nucleotide sequences. *Amer. Fern J.* 89: 232-243.

Nayar, B. K. & S. Kaur. 1969. Types of prothallial development in homosporous ferns. P*hytomorphology* 19: 179-188.

Nayar, B. K. & S. Kaur. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev. (Lancaster)* 37: 295-396.

Pangua, E.; C. Prada & A. Marquina. 1989. Las subespecies de *Asplenium trichomanes* L. en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Bot. Complut*. 14: 87-108.

Pichi Sermolli, R. E. G. 1977. Tentamen pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. *Webbia* 31: 313-512.

Ponce, M. 1996. Pteridophyta, en F. O. Zuloaga & O. Morrone (eds.), *Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina* I, pp. 5-9. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 60. Missouri: Missouri Botanical Garden.

Puttock, C. F. & C. J. Quinn. 1980. Perispore morphology and the taxonomy of the Australian Aspleniaceae. *Australian J. Bot.* 28: 305-322.

Reichstein, T. 1981. Hybrids in European Aspleniaceae (Pteridophyta). *Bot. Helv.* 91: 89-139.

Rodríguez R., R. 1995. Pteridophyta, en C. Marticorena & R. Rodríguez (eds.), *Flora de Chile I, Pteridophyta-Gymnospermae*, pp. 260-269. Concepción: Universidad de Concepción.

Rolleri, C. & A. Deferrari. 1986. Modelos epidérmicos y otros caracteres foliares en la sistemática y ecología de especies de *Lycopodium* L. Sección Crassistachys Herter. *Revista Mus. La Plata, Secc. Bot.* 14: 63-79.

Salvo, A. E.; C. Prada & T. Díaz. 1982. Revisión del género *Asplenium* subgénero Pleurosorus. *Candollea* 37: 457-484.

Schneider, H; S. J. Russell, C. J Cox, F. Bakker, S. Henderson, F. Rumsey, J. Barrett, M. Gibby & J. C. Vogel. 2004. Chloroplast phylogeny of Asplenioid ferns based on *rbcL* and *trnL-F* spacer sequences (Polypodiidae, Aspleniaceae) and its implications for biogeography. *Syst. Bot.* 29: 260-274.

Sleep, A. 1983. On the genus *Asplenium* in the Iberian Peninsula. *Acta Bot. Malac.* 8: 11-46.

Viane, R. 1993. *A multivariate morphological-anatomical analysis of the perispore in Aspleniaceae (Pteridophyta)*. Tesis doctoral. Universidad de Gante. Bélgica.

Viane, R. & W. van Cotthem. 1977. Spore morphology and stomatal characters of some Kenyan *Asplenium* species. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 90: 219-239.

Tryon A. F. & B. Lugardon. 1991. *Spores of pteridophytes.* New York: Springer.

Tryon R. M. & A. Tryon. 1982. *Ferns and allied plants, with special reference to tropical América.* New York: Springer.