

# CARACTERES DIAGNÓSTICOS FOLIARES EN TÁXONES IBÉRICOS DE *ISOETES* L. (ISOETACEAE, PTERIDOPHYTA)

por

CARMEN PRADA<sup>1</sup> & CRISTINA H. ROLLERI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Biología, Departamento de Biología Vegetal I, Universidad Complutense de Madrid. E-28040 Madrid <cpm@bio.ucm.es>

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Paseo del Bosque, s/n. 1900 La Plata (Argentina) <tinar@uolsinectis.com.ar>

## Resumen

PRADA, C. & C.H. ROLLERI (2003). Caracteres diagnósticos foliares en táxones ibéricos de Isoetes L. (Isoetaceae, Pteridophyta). *Anales Jard. Bot. Madrid* 60(2): 371-386.

Se presenta un estudio de morfología foliar comparada en los táxones del género *Isoetes* que crecen en la Península Ibérica: *I. durieui* e *I. histrix* (terrestres), *I. setaceum*, *I. velatum* subsp. *velatum* (anfíbios) e *I. bronchonii*, *I. echinosporum*, *I. × hickeyi*, *I. lacustre*, *I. longissimum* e *I. velatum* subsp. *asturicense* (acuáticos). Se incluye también en la comparación un taxon anfibio tetraploide no descrito, relacionado morfológicamente con *I. velatum*, que hasta su descripción se designa provisionalmente como *Isoetes* sp. Se estudiaron varias colecciones ibéricas y, en el caso de algunos táxones, se incluyeron ejemplares procedentes de otras localidades de Europa y América, con el fin de contrastar los rasgos analizados. Los caracteres estudiados fueron: ornamentaciones cuticulares, modelos epidérmicos y estomas (morfología, distribución y dimensiones), contorno de las secciones transversales foliares, epidermis en corte (membrana cuticular, cutícula, ornamentaciones cuticulares), desarrollo relativo del mesofilo, presencia o ausencia y distribución del colénquima, diafragmas foliares y presencia o ausencia de protuberancias intercelulares pécticas de las células de los diafragmas (de tipo filamento). Todos los caracteres son independientes de la edad de los microfílos, de la madurez de las plantas y, en general, del hábitat, y se observan por igual en material fresco o restaurado mediante una técnica que se propone en este trabajo.

Palabras clave: mesofilo, modelos epidérmicos, morfología foliar, ornamentaciones cuticulares, protuberancias intercelulares pécticas.

## Abstract

PRADA, C. & C.H. ROLLERI (2003). Foliar diagnostic characters in Iberian species of *Isoetes* L. (Isoetaceae, Pteridophyta). *Anales Jard. Bot. Madrid* 60(2): 371-386 (in Spanish).

This is a comparative study of foliar morphology of the species of *Isoetes* L. growing in the Iberian Peninsula. The taxa included are *I. durieui* and *I. histrix* (terrestrial), *I. setaceum*, and *I. velatum* subsp. *velatum* (amphibious), and *I. bronchonii*, *I. echinosporum*, *I. × hickeyi*, *I. lacustre*, *I. longissimum* and *I. velatum* subsp. *asturicense* (aquatic). Material of an undescribed amphibious tetraploid taxon related to *I. velatum* was also included in this study and referred as *Isoetes* sp. until proper description. Several Iberian collections, together with European and American specimens of some of the taxa were analyzed. Selected diagnostic characters of the microphylls are: cuticular ornamentation (striae, ridges and warts), cuticular flanges, epidermal patterns, stomata distribution and dimensions, foliar transverse sections outline, degree of development of the mesophyll, presence or absence, and distribution of the mechanical tissues (collenchyma), diaphragms, and presence or absence and type of intercellular pectic protuberances. All characters are stable, and do not vary with the age of the plants or the microphylls. Cuticular striae, ridges and warts, as well as stomata develop early in plantlets. Stomata present in the microphylls of two aquatic taxa (*I. longissimum*, *I. velatum* subsp. *asturicense*) suggest

that their absence is not entirely due to influence of aquatic environment. Collenchyma occurs, also, in species growing in different habitats. Restored herbarium material proved to be as useful as fresh or fixed material, an important advantage in the case of *Isoetes* species, many of which grow in vulnerable areas or are known only through herbarium specimens due to destruction of their pristine habitats.

Key words: mesophyll, epidermal patterns, foliar morphology, cuticular ornamentation, intercellular pectic protuberances.

## INTRODUCCIÓN

El género *Isoetes* L. es cosmopolita y está representado por c. 150 táxones (TRYON & TRYON, 1982), cuya clasificación se ha basado principalmente en las adaptaciones al hábitat que ocupan (BAKER, 1880; MOTELAY & VENDRYÈS, 1882) o en la ornamentación de las esporas (PFEIFFER, 1922). En este género llama la atención la escasez de rasgos diagnósticos que se utilizan para la delimitación de los táxones. Los trabajos sobre caracteres vegetativos foliares son pocos y su aplicación a la sistemática es muy infrecuente. PFEIFFER (1922) registra por primera vez la presencia de tejidos mecánicos hipodérmicos, a los que considera de sostén y no conductores (“peripheral bast”). HALL (1971) analiza caracteres diversos, como la longitud de los microfilos, el número de canales protoxilemáticos presentes en la venilla media de éstos, los tejidos mecánicos hipodérmicos (que interpreta como colénquima), los tipos de células de los diafragmas foliares y la presencia de protuberancias intercelulares pécticas (POTGIETER & VAN WYK, 1992; ROLLERI & al., 1999), a las que denomina “pelos internos”. También es el primero en registrar ciertos rasgos epidérmicos, como las cuñas cuticulares sobrelevadas, las verrugas cuticulares (“tiny papillae”) y la epidermis esporangial, aunque duda acerca del valor taxonómico de todos estos caracteres. PRADA (1979) realiza un estudio de los táxones ibéricos de *Isoetes* y retoma los caracteres analizados por HALL (1971), sobre la base de los cuales propone una clave para su determinación. SHARMA & SINGH (1984) describen la epidermis de la lígula y los pelos glandulares marginales de dicha estructura. KOTT & BRITTON (1985) estudian caracteres foliares como la longitud, posición y color de los microfilos, a los que otorgan escaso valor taxonómico en los táxones trata-

dos, mientras que consideran otros rasgos, como la presencia o ausencia de estomas y cordones de sostén, como variables y dependientes del hábitat. HICKEY (1986) y TAYLOR & HICKEY (1992) interpretan la presencia de algunos caracteres morfológicos y anatómicos de los microfilos, tales como los filopodios, las bases foliares escamosas persistentes o los cordones colenquimáticos subepidérmicos, en ciertos grupos de táxones, como resultado de la convergencia morfológica debida a los cambios de hábitat ocurridos a lo largo de la historia evolutiva del género, y utilizan dichos caracteres para proponer una nueva división infragenérica. Más recientemente, ROMEO & al. (1999) estudian la estructura de los canales presentes en la vena de los microfilos, y TROIA & al. (1999), la anatomía foliar comparada de dos táxones terrestres, *I. durieui* Bory e *I. histrix* Bory, pero la única diferencia significativa que destacan es el mayor tamaño de las células oclusivas de los estomas de *I. durieui*; también mencionan las verrugas cuticulares (“papilas”) y las cuñas cuticulares sobrelevadas (“ribbon-like structures”), pero no les dan ninguna relevancia taxonómica. Las verrugas cuticulares han sido ilustradas con fotografías de microscopio electrónico de barrido por MUSSELMAN (2002) en un taxon sudafricano terrestre, no descrito, del que se ilustran papilas, sin describirlas ni analizarlas.

Aquí se presenta un estudio de caracteres foliares en los táxones del género *Isoetes* que PRADA (1986) reconoce para la Península Ibérica: *I. durieui* Bory, *I. echinosporum* Durieu, *I. histrix* Bory, *I. lacustre* L., *I. longissimum* Bory, *I. setaceum* Lam., *I. velatum* A. Braun subsp. *velatum*, *I. velatum* A. Braun subsp. *asturicense* (Laínz) Rivas-Mart. & Prada. De todos ellos se conoce la ploidía (PRADA, 1983; TAYLOR & HICKEY, 1992; GIOVANNINI & al., 2001; TROIA, 2001), que se indica en la ta-

bla 1. *Isoetes durieui* e *I. histrix* son terrestres; *Isoetes setaceum* e *I. velatum* subsp. *velatum* son acuáticos, y el resto de los analizados son acuáticos, de ríos o de lagos de montaña. También se ha incluido en el estudio a *I. bronchonii* Motelay, taxon pirenaico dodecaploide, acuático, derivado por alopoliploidía de *I. echinosporum* e *I. lacustre* (TAYLOR & HICKEY, 1992), a un híbrido hexaploide, *I. × hickeyi* Taylor & Luebke (*I. echinosporum* × *I. lacustre*) y a un taxon nuevo, anfibio, tetraploide (Prada, inéd.), relacionado morfológicamente con *I. velatum*, que por no haber sido descrito formalmente aún se designará como *Isoetes* sp. De algunos de estos táxones se estudiaron ejemplares procedentes de localidades de Europa y América, con el fin de poner a prueba los rasgos analizados.

*Isoetes durieui* e *I. histrix* se caracterizan por la presencia de filopodios (BORY, 1844; PFEIFFER, 1922; PRADA, 1986; CESCA & PERUZZI,

2001), generalmente de mayor longitud en *I. histrix*. Debido a que la longitud de los filopodios es un carácter variable, se seleccionaron para este estudio ejemplares de ambos táxones con filopodios cortos y largos, para comprobar si este rasgo se correlacionaba con otros.

Los caracteres foliares estudiados fueron: la epidermis en superficie, incluyendo ornamentaciones cuticulares, modelos epidérmicos y estomas (morfología, distribución, células periestomáticas y dimensiones); secciones transversales foliares, con análisis del contorno de las secciones, epidermis en corte (membrana cuticular, cutícula, ornamentaciones cuticulares), grado de desarrollo relativo del mesofilo, presencia o ausencia, desarrollo comparado y distribución del colénquima subepidérmico, tipos de diafragmas foliares de las cámaras aeríferas y presencia o ausencia de protuberancias intercelulares pécticas en las células de los diafragmas.

TABLA 1  
CARACTERES EPIDÉRMICOS EN ISOETÁCEAS IBÉRICAS

Especie	Ploidía	Radio celular <sup>1</sup>	Dimensiones estomas <sup>2</sup>	N.º de células vecinas <sup>3</sup>	N.º de grupos de colénquima	PIP <sup>4</sup>
<i>I. echinosporum</i>	2x	3-4:1	—	—	3-2(1)	
<i>I. × hickeyi</i>	6x	4-14:1	—	—	—	
<i>I. lacustre</i>	10x	8-10:1	—	—	—	+
<i>I. bronchonii</i>	12x	10-14:1	—	—	2(1)	+
<i>I. histrix</i>	2x	7-8:1 / 2-3:1	(35)54(59) × (22)24(30)	4-5(6)	4	
<i>I. durieui</i>	10x	6-9:1 / 4-8:1	(65)70(80) × (27,5)33(49)	4-5(6)	4	
<i>I. setaceum</i>	2x	5-7:1 / 2-3:1	(70)77(89) × (34)38(42)	6-7	4	+
<i>I. velatum</i> subsp. <i>velatum</i>	2x	2,5-3:1 / 2-3:1	(40)57,5(65) × (15)16(20)	6-8	30-40	
<i>I. velatum</i> subsp. <i>asturicense</i>	2x	2-3:1 / 2-1:1	(37,5)45(62,5) × (13)20(30)	6-8	8(10)	
<i>I. longissimum</i>	4x	2-5:1 / 2-3:1	(50)63(70) × (12)17(22,5)	6-8	3(4)	
<i>Isoetes</i> sp.	4x	2-3:1 / 2-1:1	(40)48(52,5) × (14,5)17(22)	6-8	30-40	

<sup>1</sup> Relación longitud/anchura.

<sup>2</sup> Largo por ancho, en µm; entre paréntesis, valores extremos.

<sup>3</sup> Número más frecuente de células periestomáticas (vecinas).

<sup>4</sup> Presencia o ausencia de protuberancias intercelulares pécticas en las paredes de las células del mesofilo.

El estudio fue realizado con material fresco y también con material de herbario restaurado, con el propósito de valorar hasta qué punto puede ser utilizado con asiduidad y confianza el material herborizado, ya que en *Isoetes* no sólo resulta importante ampliar el número de rasgos disponibles para sistematizar el género, sino que en algunos casos el material de herbario es el único disponible para un estudio, ya que muchos de los táxones crecen en medios vulnerables, fácilmente perturbados o incluso provienen de hábitat parcial o totalmente destruidos en la actualidad.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el siguiente material de las colecciones efectuadas por una de las autoras (C. Prada) y de los herbarios BC, COI, JACA, LISE, MA, MACB, MAF y SEV (HOLMGREN & al., 1990):

#### *Isoetes bronchonii* Motelay

FRA, Les Bouillouses, Lac du Vive, *Prada s/n.* Lac du Vive, 31TDH21, *Prada s/n.*, MA 38687. Etang des Dougnés, *Herrero s/n.* Ariège, vallée d'Orlu, près Aix-les-Thermes, lac de Naguilles, *Neyraut & al. s/n.*, MA 471413.

#### *Isoetes durieui* Bory

SPA, CÁDIZ: Ubrique, Collado del Cuervo, *Silvestre 65*, SEV. Entre Tarifa y Algeciras, *Luque & al. 2176/78*, SEV. MADRID: Entre Hoyo de Manzanares y Colmenar Viejo, *Prada s/n.* Torreledones, *Prada s/n.*

#### *Isoetes echinosporum* Durieu

AN, Estanys de Pessons, *Prada s/n.*  
SPA, SORIA: Laguna Larga de Urbión, *Montserrat s/n.*, JACA.  
FRA, Les Bouillouses, Lac du Vive, *Prada s/n.*, MACB 38686. Lac Noir, *Herrero s/n.* Les Bouillouses, Lac de Pradeilles, *Prada s/n.*

#### *Isoetes* × *hickeyi* W.C. Taylor & N. Luebke

SPA, LÉRIDA: Llac Petit de la Pera, *Prada s/n.*  
FRA, Les Bouillouses, Lac du Vive, *Prada s/n.*

#### *Isoetes histrix* Bory (incluyendo *I. chaeturetii* Mendes)

SPA, CÁCERES: Plasencia, *Prada s/n.* Abadía, hacia el embalse de Gabriel y Galán, *Ramos & al. s/n.* CÁDIZ: Entre Tarifa y Algeciras, *Luque & al., 2176/78* SEV. Sierra del Aljibe, Puerto de Gáliz, *Silvestre 64*, SEV. Ubrique,

Collado del Cuervo, *Silvestre 65*, SEV. CIUDAD REAL: Alcoba, Parque Nacional de Cabañeros, *Bernal & Hernández s/n.* HUELVA: Laguna de la Dehesilla, *Fuertes s/n.* Coto de Doñana, *Cubas s/n.* LA CORUÑA: Torre de Hércules, *Prada s/n.* MADRID: Torreledones, *Prada s/n.* Entre Hoyo de Manzanares y Colmenar Viejo, *Prada s/n.* PONTEVEDRA: Cabo Silleiro, *Prada. s/n.*

FRA, FINISTÈRE: Bigouden, *Citoleux s/n.*

POR, ALGARVE: Alrededores de Pinhal do Ludo, *Sobrinho & Mendes*, COI. Santa Margarida do Sado, *Volk 82-910*. Évora, carretera N-18, km 46, *Volk 82-459*, Leiria versus Marinha Grande, *Silva & al. s/n.*, LISE 80350.

#### *Isoetes lacustre* L.

AN, Estanys Furcat, *Losa & Montserrat s/n.*, MAF.  
BUL, Montes Pirin, Lago Muratovo, *Burgaz & al. s/n.*, MACB 51516.

SPA, LÉRIDA: Pallars Sobirà, Estanys d'Unarre, *Masalles & Minot s/n.*, MA18850. Estanys de la Pera, *Prada s/n.*, MACB 38685. Lac d'Anglade, Vieille Aure, *Montserrat s/n.*, JACA. Estanque hacia el Estany Negre, *Montserrat s/n.*, JACA. Estany de Cavallers, Val d'Aran, MA 2357. Etang de Garguilles, au cirque de Colomés, *Estival s/n.*, BC 82417.

USA, WISCONSIN: Oneida Co., Pelican Lake, *Prada s/n.*, MA 32678.

FRA, Aix-les-Thermes, lac de Naguilles, *Neyraut & al. s/n.*, MA 471413. Les Bouillouses, Lac Long, *Prada s/n.* Lac d'Oredon, *Dussaussois s/n.*

#### *Isoetes longissimum* Bory

SPA, LA CORUÑA: Teijeiro, río Mandeo, *Prada s/n.*

#### *Isoetes setaceum* Lam.

SPA, HUELVA: Laguna de la Dehesilla, *Fuertes s/n.*

#### *Isoetes velatum* A. Braun subsp. *velatum*

SPA, HUELVA: Coto de Doñana, laguna del Navazo del Toro, *Prada s/n.* MADRID: Gargantilla del Lozoya, *Prada s/n.* ZAMORA: Ribadelago, *Prada s/n.*

#### *Isoetes velatum* subsp. *asturicense* (Láinz) Rivas-Mart. & Prada

SPA, ASTURIAS: Leitariegos, laguna de Arvás, *Prada s/n.*

#### *Isoetes* sp.

SPA, CÁCERES: Río Búrdalo, *Prada s/n.*

Las observaciones se han realizado con microscopio óptico y electrónico de barrido, y en los estudios se utilizó material de herbario restaurado y material fresco, este último directamente o bien mantenido en una solución con-

servadora formada por una mezcla de alcohol 95 (54 %), glicerina (24 %), agua (21 %) y formol (1 %).

La restauración del material de herbario se efectúa hirviendo los microfilos o trozos de ellos en agua y detergente, en agitador, durante 5-6 minutos, colocándolos luego en estufa a 50 °C durante 4-6 días sumergidos en éter monobutílico del etilenglicol (butil cellosolve o "aerosol OT"; AYENSU, 1967) diluido en agua en proporción 3:1. Tras ese período se retiran de la estufa y se fijan durante 3-4 semanas en la solución mencionada arriba (mezcla fijadora y conservadora para material frágil), que sirve para completar el efecto de expansión del butil cellosolve, pero que adicionalmente fija y da coherencia y elasticidad al material tratado. Éste recupera casi por completo el tamaño y la forma previos a la herborización y puede tratarse como si fuera fresco.

Para estudios de epidermis en superficie se efectuaron aclarados. El material fresco y de herbario se diafanizó (aclaró) con hidróxido de sodio 2 % acuoso durante 20-40 minutos, se trató con hipoclorito de sodio comercial diluido 1:1 hasta su vaciado completo, se lavó repetidamente con agua corriente, se coloreó con TBO (azul de toluidina O) 1 % acuoso durante 15 minutos y se montó en glicerina. Para los estudios de epidermis en superficie con ejemplares de herbario el material puede aclararse sin necesidad de restauración previa.

Para cortes transversales de material fresco y fijado se procedió directamente, efectuando cortes a mano alzada que se observaron montados en glicerina. Para cortes transversales de material de herbario los microfilos se restauraron como se indicó arriba, se colorearon con TBO 1 % acuoso y se cortaron a mano alzada una vez coloreados. El TBO (FEDER & O'BRIEN, 1968; POTGIETER & VAN WYK, 1992; ROLLERI & *al.*, 1999) es un colorante efectivo para poner en evidencia paredes pectinadas (colénquima, protuberancias intercelulares pécticas) y polifenoles (paredes incipientemente esclerosadas).

Las medidas de los estomas y los radios celulares (relación longitud/anchura) se tomaron en todos los ejemplares estudiados. Los valores de los radios celulares representan la

media de las medidas tomadas en todas las células presentes en diez campos elegidos al azar, tanto en epifilos como en hipofilos, observados con 200 aumentos (c. 0,25 mm<sup>2</sup>). Las dimensiones de los estomas representan la media de veinticinco medidas por cada microfilo, efectuadas en todos los ejemplares revisados. Las ilustraciones de los diversos aspectos de la morfología interna se realizaron con un microscopio Olympus CX 41 provisto de cámara clara.

Para los estudios con microscopio electrónico de barrido los fragmentos de microfilos se sometieron a fijación en punto crítico, se montaron sobre los soportes en plata coloidal y durofix, se metalizaron con oro bajo vacío y se fotografiaron con un microscopio JEOL JSM-T330A a 15 KV.

La terminología utilizada para la membrana cuticular es de STACE (1965); la correspondiente a ornamentaciones cuticulares es la de WILKINSON (1979); la referente a epidermis y estomas es la utilizada por ROLLERI & *al.* (1987, 1991, 2002, 2003), y la referente a las protuberancias intercelulares pécticas sigue las propuestas por POTGIETER & VAN WYK (1992) y ROLLERI & *al.* (1999). Las autoras consideran al estoma como el conjunto formado por las dos células oclusivas y el poro u ostíolo. El término "anexas" designa las células periestomáticas morfológicamente diferentes de las epidérmicas adyacentes (FONT QUER, 1953; ROLLERI & *al.*, 1987) y el término "vecinas" a las que no se distinguen de células epidérmicas (ROLLERI & *al.*, 1987). En este sentido, "anexas" es equivalente al término inglés *subsidiary cells*, y el término "vecinas", al inglés *neighbouring cells* (ROLLERI & *al.*, 1987; LELLINGER, 2002). La designación "verruca cuticular" reemplaza a *tiny papillae* (HALL, 1971) o *papillae* (TROIA & *al.*, 1999), ya que el término papila se usa aquí para las células marginales prominentes, de acuerdo con el concepto de las autoras y el de otros, como FONT QUER (1953) y WILKINSON (1979). Otros términos pteridológicos se encuentran definidos y justificados en LELLINGER (2002). Los nombres específicos, largamente utilizados en femenino, se utilizan aquí en neutro, de acuerdo con PRADA (1986).

## RESULTADOS

*Epidermis en superficie*

*Ornamentaciones cuticulares.*—Las células epidérmicas de los táxones estudiados de *Isoetes* están cutinizadas. La cutícula suele estar ornamentada y la ornamentación está constituida por estrías, pliegues y verrugas cuticulares (WILKINSON, 1979).

Las estrías son arrugas finas y paralelas que discurren longitudinalmente pasando por encima de las paredes de contacto transversales de las células epidérmicas; los pliegues son arrugas notablemente más gruesas que las estrías, igualmente longitudinales y aproximadamente paralelas. Los pliegues se presentan en los táxones terrestres, como *I. durieui* (fig. 1a) e *I. histrix*. Las estrías aparecen en los táxones anfibios y acuáticos (fig. 1b-d); de estas últimas, *I. bronchonii* se destaca por tener estrías discontinuas y muy someras. *Isoetes echinosporum* es el único taxon con cutícula lisa y sin ornamentación apreciable.

Las verrugas cuticulares se distribuyen tanto en las paredes externas como sobre los pliegues y suelen ser heterogéneas en tamaño y prominencia. Solamente se encuentran en los táxones terrestres (fig. 1a).

Las paredes de contacto de las células epidérmicas desarrollan cuñas cuticulares (“cuticular flanges”; WILKINSON, 1979) que pueden estar muy engrosadas y ser externamente prominentes. Se observan como un grueso lomo o un gran pliegue continuo, sobrelevado, situado sobre las paredes de contacto longitudinales. Las cuñas cuticulares están particularmente desarrolladas en *I. durieui*, *I. histrix*, *I. lacustre* e *I. setaceum* (fig. 1b), mientras que están ausentes en los táxones restantes. TROIA & al. (1999) las observaron en microfílos de *I. durieui*, pero las registraron someramente como “ribbon-like structures”. Las ilustraciones de MUSSELMAN (2002) indican que también están presentes en táxones sudafricanos y que las verrugas cuticulares se alinean sobre estas cuñas. Es un carácter que, por el momento, parece vincularse con táxones terrestres.

Así, la cutícula es lisa, sin cuñas cuticu-

lares, en *I. echinosporum*; someramente estriada, con estrías discontinuas y sin cuñas cuticulares, en *I. bronchonii*; estriada y sin cuñas cuticulares, en *I. × hickeyi*, *I. velatum* subsp. *velatum* (fig. 1c), *I. longissimum* (fig. 1d), *I. velatum* subsp. *asturicense* e *Isoetes* sp.; estriada y con cuñas cuticulares sobresalientes, en *I. setaceum* e *I. lacustre*, y, finalmente, plegada y verrucosa, con cuñas cuticulares prominentes, en *I. durieui* e *I. histrix*. Todos estos rasgos se observan bien en superficie, tanto mediante el microscopio óptico como con el electrónico de barrido. Son visibles por igual en microfílos centrales o periféricos del cormo y se forman tempranamente en los microfílos juveniles de las plántulas. En los táxones terrestres son independientes de la ausencia o presencia y longitud de los filopodios.

*Modelos epidérmicos.*—En vista superficial, las células epidérmicas tienen paredes rectas y se disponen con un modelo poligonal en todos los táxones estudiados. No se han observado células epidérmicas con paredes sinuosas, aunque SHARMA & SINGH (1984) las ilustran para la epidermis de la lígula.

La epidermis de los microfílos presenta variaciones en las células marginales, en los espesores relativos de las paredes celulares y en el radio celular (relación longitud/anchura de las células).

Arbitrariamente se han considerado delgadas las paredes celulares cuyo espesor es menor de 1 µm, moderadamente gruesas aquellas cuyo espesor está entre 1 y 1,5 µm, y muy gruesas las paredes cuyo espesor excede 2 µm.

Las paredes celulares son delgadas en las epidermis de *I. lacustre*, *I. longissimum*, *I. velatum* subsp. *velatum* e *I. velatum* subsp. *asturicense* y moderadamente gruesas en los demás táxones, mientras que son muy gruesas solamente en *I. bronchonii*. Este carácter se aprecia en superficie solo con 1000 aumentos y es más obvio cuando se analiza la epidermis en sección transversal.

En la epidermis de algunos táxones, como *I. × hickeyi*, *I. lacustre* (fig. 2a,b), *I. longissima* e *I. bronchonii* (fig. 2e,f), se encuentran

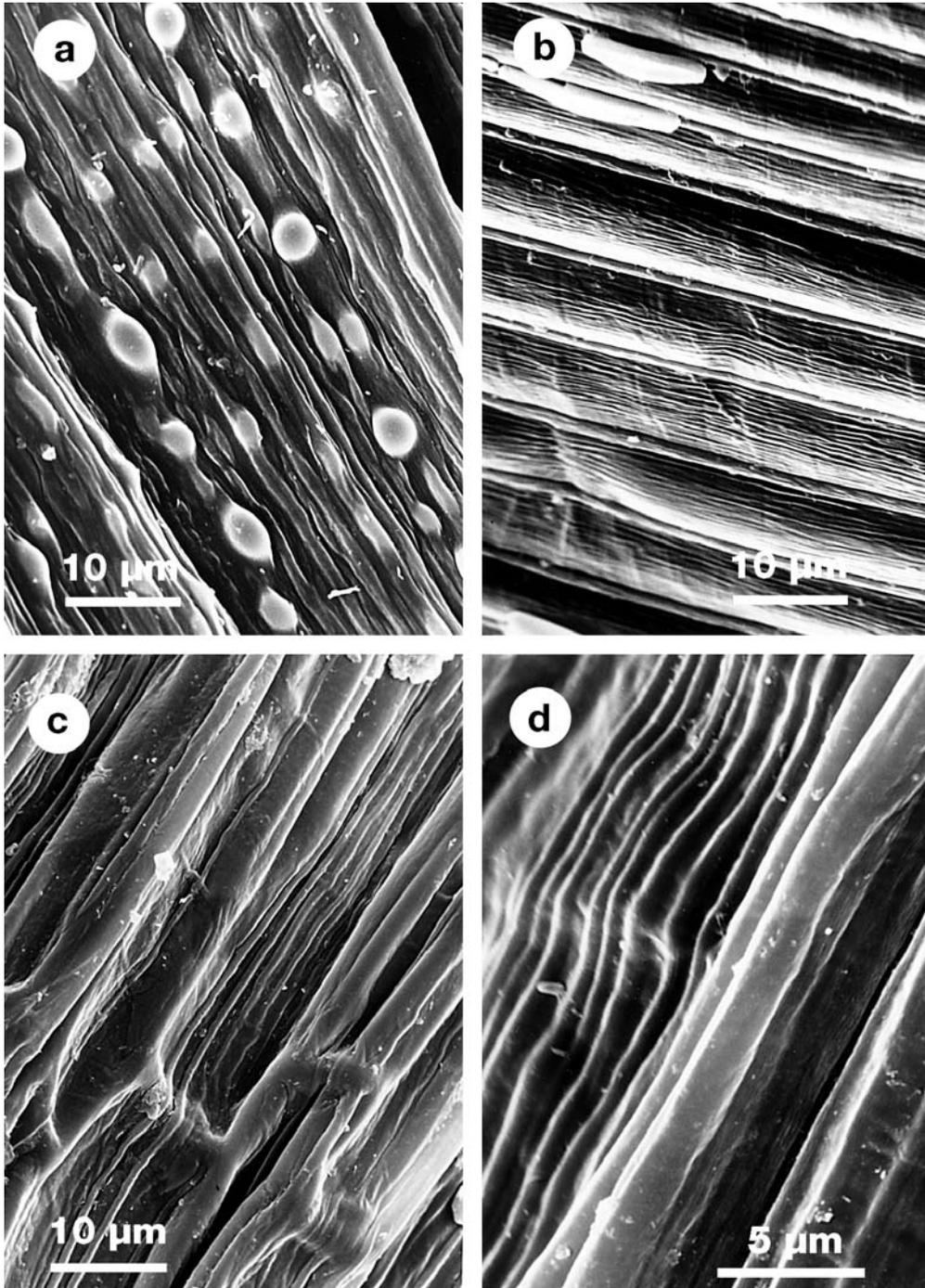


Fig. 1.—Ornamentaciones cuticulares en especies ibéricas de *Isoetes* L.: a, *I. durieui*, pliegues y verrugas cuticulares (*I. hystrix* similar); b, *I. setaceum*, estrías y cuñas cuticulares externamente sobrelevadas; c, *I. velatum* subsp. *velatum*, estrías; d, *I. longissimum*, estrías.

grupos paucielulares formados por unas 3-8 células, cuyas paredes son notablemente más gruesas que las de células adyacentes; estos grupos están intercalados entre las células epidérmicas comunes y el carácter se aprecia con escaso aumento (desde 10×) o con microscopio estereoscópico.

El radio celular es diferente en cada taxon y ocasionalmente varía en distintas partes de la epidermis del mismo microfilo (tabla 1). El radio celular es similar en toda la epidermis en los siguientes táxones: *I. echinosporum* (3-4:1), *I. lacustre* (8-10:1), *I. bronchonii* (10-14:1), *I. × hickeyi* (4-14:1), *I. velatum* subsp. *velatum* (2,5-3:1) e *I. longissimum* (2-5:1). En *I. histrix*, *I. durieui*, *I. setaceum*, *I. velatum* subsp. *asturicense* e *Isoetes* sp. se presentan dos radios celulares diferentes, los más altos en la epidermis y los más bajos en las bandas celulares que contienen estomas. Así, *I. histrix* tiene radios celulares de 7-8:1 y 2-3:1; *I. du-*

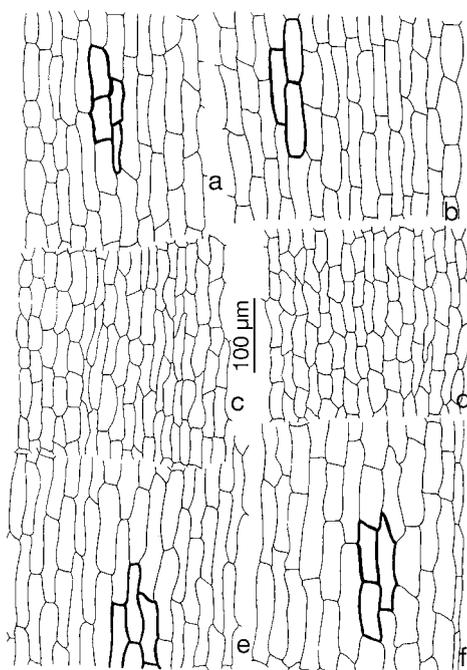


Fig. 2.—Modelos epidérmicos en especies ibéricas acuáticas de *Isoetes* L.: a,b, *I. lacustre*; c,d, *I. echinosporum*; e,f, *I. bronchonii* (*I. × hickeyi* similar) (izquierda, epifilos; derecha, hipofilos).

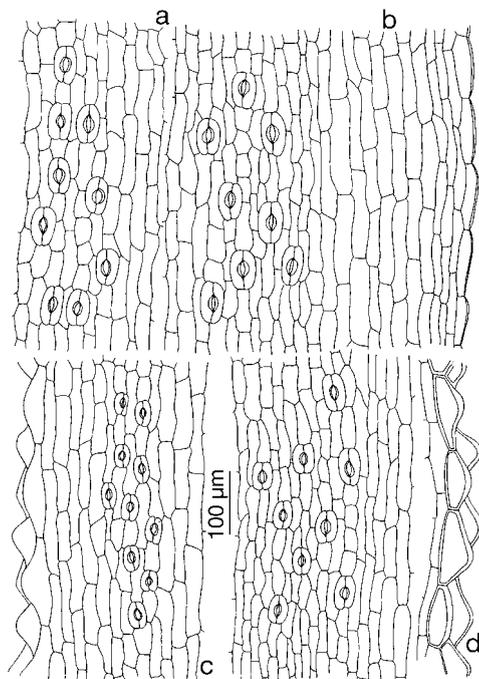


Fig. 3.—Modelos epidérmicos en especies ibéricas terrestres de *Isoetes* L.: a,b, *I. durieui*; c,d, *I. histrix* (izquierda, epifilos; derecha, hipofilos), ambos con papilas marginales.

*rieui*, radios de 6-9:1 y 4-8:1; *I. setaceum*, radios de 5-7:1 y 2-3:1; mientras que *I. velatum* subsp. *asturicense* e *Isoetes* sp. tienen radios celulares de 2-3:1 y 2-1:1.

**Estomas.**—Los microfilos de los táxones estudiados de *Isoetes* son anfigmáticos o carecen de estomas. Los estomas se distribuyen en dos bandas adaxiales y dos abaxiales en casi todos los casos, aunque el número de hileras de estomas en las bandas puede variar. En *I. durieui* (fig. 3a,b) e *I. histrix* (fig. 3c,d) hay 2-3(4) hileras en las bandas adaxiales y 4-5(6) hileras en las abaxiales; en *I. setaceum* aparecen en 2-3(4) hileras adaxiales y 2-3(5) hileras abaxiales (fig. 4a,b), mientras que en *Isoetes* sp. (fig. 4c,d) e *I. velatum* subsp. *velatum* (fig. 4e,f) suele haber 2-3 hileras, raramente 4. En dos táxones acuáticos, *I. longissimum* (fig. 5a,b) e *I. velatum* subsp. *asturicense* (fig. 5c,d) se encuentran 1-2(3) hileras de estomas tanto en la cara abaxial como en la ada-

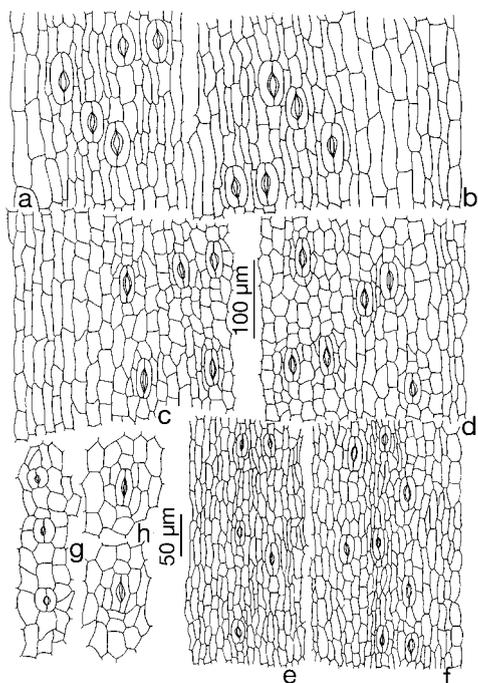


Fig. 4.—Modelos epidérmicos en especie ibéricas anfibias de *Isoetes* L.: a,b, *I. setaceum*; c,d, *Isoetes* sp.; e,f, *I. velatum* subsp. *velatum*; g, *Isoetes* sp., detalle de estomas juveniles en plántulas; h, *Isoetes* sp., detalle de estomas adultos en plantas maduras (izquierda, epifilos; derecha, hipofilos).

xial, mientras que los estomas faltan por completo en otros cuatro: *I. lacustre* (fig. 2a,b), *I. echinosporum* (fig. 2c,d), *I. bronchonii* (fig. 2e,f) e *I. × hickeyi*. Como se mencionó antes, en los táxones terrestres y anfibios las células epidérmicas de las bandas estomáticas tienen menor radio celular que las del resto de la epidermis, mientras que en los acuáticos con estomas la banda está menos definida o no existen diferencias importantes en el radio celular de sus células y el de las epidérmicas adyacentes.

Los estomas adultos tienen contorno elíptico angosto y son 2-4 veces más largos que anchos (figs. 3-5). Tienen 4-8 células periestomáticas vecinas (tabla 1), indistinguibles morfológicamente de las epidérmicas adyacentes, que se ordenan con disposiciones aproximadamente bipolares, más o menos tetracíticas o hexacíticas, o bien se disponen

formando una corona, de manera más bien actinocítica. Esta última disposición es la menos común y se encontró solamente en *I. longissimum* (fig. 5b) e *Isoetes* sp. (fig. 4c,d), aunque en ambos táxones pueden coexistir las dos disposiciones.

Los estomas se diferencian tempranamente y maduran con rapidez: se han encontrado estomas completamente desarrollados en microfílos de 1-2 cm y en plántulas de tamaño aún menor, aunque tales estomas son claramente juveniles (fig. 4g), con el contorno circular y células oclusivas más cortas y anchas que los estomas adultos de los microfílos maduros (fig. 4h). La orientación bipolar o actinocítica de las células periestomáticas también es temprana. No se encontraron iniciales estomáticas ni estomas inmaduros y no hay datos bibliográficos sobre la vía de desarrollo ontogenético, presumiblemente perígena por la rapidez con que parece establecerse el tipo adulto.

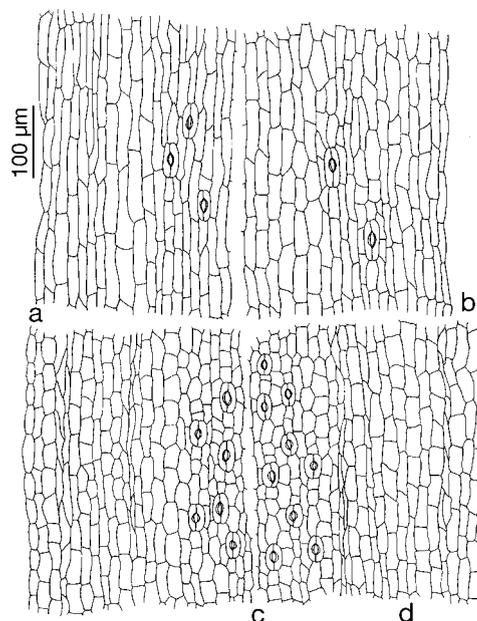


Fig. 5.—Modelos epidérmicos en especies ibéricas acuáticas de *Isoetes* L.: a,b, *I. longissimum*; c,d, *I. velatum* subsp. *asturicense* (izquierda, epifilos; derecha, hipofilos).

Las dimensiones estomáticas son variables: los estomas de mayor tamaño se presentan en *I. durieui* y en *I. setaceum*, mientras que los más pequeños se encontraron en *I. velatum* subsp. *velatum* y subsp. *asturicense*, *I. hystrix* e *Isoetes* sp.; los demás táxones tienen dimensiones intermedias (tabla 1). Las dimensiones de los estomas son características de cada taxon y en los táxones poliploides el tamaño parece relacionarse con el grado de ploidía.

La ausencia de estomas no parece relacionarse exclusivamente con el hábitat acuático. Todos los táxones anfibios presentan estomas, mientras que en los acuáticos los estomas aparecen en *I. longissimum* (fig. 5a,b) e *I. velatum* subsp. *asturicense* (fig. 5c,d), pero faltan en los otros cuatro.

#### *Secciones transversales foliares*

Los microfílos son crasos, más o menos triquetros, cuadrangulares o casi teretes. Se atenúan largamente en un ápice gradualmente más fino e igualmente craso, aunque en los táxones terrestres este ápice puede estar tapizado por una epidermis cuyas células presentan paredes más engrosadas que las restantes epidérmicas del microfilo, frecuentemente coloreadas de castaño.

El contorno de las secciones foliares es triangular, desde plano-convexo hasta casi deltoide en *I. durieui* (fig. 6d), *I. hystrix* (fig. 6a) e *I. setaceum* (fig. 6g); y desde más o menos trapezoidal a subcircular en los restantes táxones (fig. 7a,c,e,g,j,l,m). En corte transversal se observan los siguientes tejidos: epidermis, mesofilo y tejidos vasculares. La epidermis es uniestratificada y en táxones terrestres o anfibios con secciones foliares más o menos triangulares, los márgenes foliares pueden estar claramente diferenciados y formados por células sobresalientes a papilosas. El mesofilo está constituido por clorénquima y presenta colénquima como tejido de sostén. El grado de desarrollo de ambos tejidos es variable en los táxones y en todos se presentan cuatro cámaras aeríferas de posición más o menos simétrica en torno al haz vascular central. Las cámaras aeríferas tienen diafragmas

transversales y en el caso de *I. echinosporum*, la capa del mesofilo en contacto con la cámara aerífera está tapizada por parches de células cuyas paredes hexagonales contactan sin espacios intercelulares y dan positiva la prueba para lignina o sus precursores. El tejido vascular es muy escaso y está reducido a una venilla media, rodeada de tejido parenquimático algo compacto y formada exclusivamente por xilema parcialmente reabsorbido que deja una laguna protoxilemática.

La epidermis tiene una cutícula delgada, generalmente ornamentada y capas cuticulares de espesor variable. La porción cutinizada de la pared o membrana cuticular está separada de la pared celulósica por una delgada capa péctica, que solo se aprecia con más de 400 aumentos y con coloraciones adecuadas (WILKINSON, 1979). En la membrana cuticular se distinguen dos partes: la cutícula y las capas cuticulares (STACE, 1965). La cutícula es delgada y químicamente está formada por cutina pura; los pliegues, estrías y verrugas generalmente involucran solo esta porción de la membrana cuticular. Las capas cuticulares están compuestas por cutina y celulosa, tienen mayor espesor que la cutícula y a veces participan parcialmente en la formación de las verrugas cuticulares. Los espesores de la membrana cuticular son variables: las más delgadas se observaron en *I. lacustre* (fig. 7k), mientras que son moderadamente gruesas en casi todos los demás táxones, aunque las más gruesas son características de *I. bronchonii* (fig. 7o) e *I. echinosporum* (fig. 7n). Como en otros caracteres observados, *I. × hickeyi* es muy similar a *I. bronchonii*.

Las cuñas cuticulares se aprecian tanto en corte transversal como en superficie. Están particularmente bien desarrolladas y son prominentes en *I. durieui* (fig. 1a; fig. 6e,f), *I. hystrix* (fig. 6b,c), *I. setaceum* (fig. 1b; fig. 6h,i) e *I. lacustre* (fig. 7k); mientras que están ausentes en *I. bronchonii* (fig. 7o), *I. echinosporum* (fig. 7n), *I. × hickeyi*, *I. longissimum* (fig. 7d), *I. velatum* subsp. *velatum* (fig. 7b), *I. velatum* subsp. *asturicense* (fig. 7d) e *Isoetes* sp. (fig. 7h).

Las células epidérmicas marginales, desde

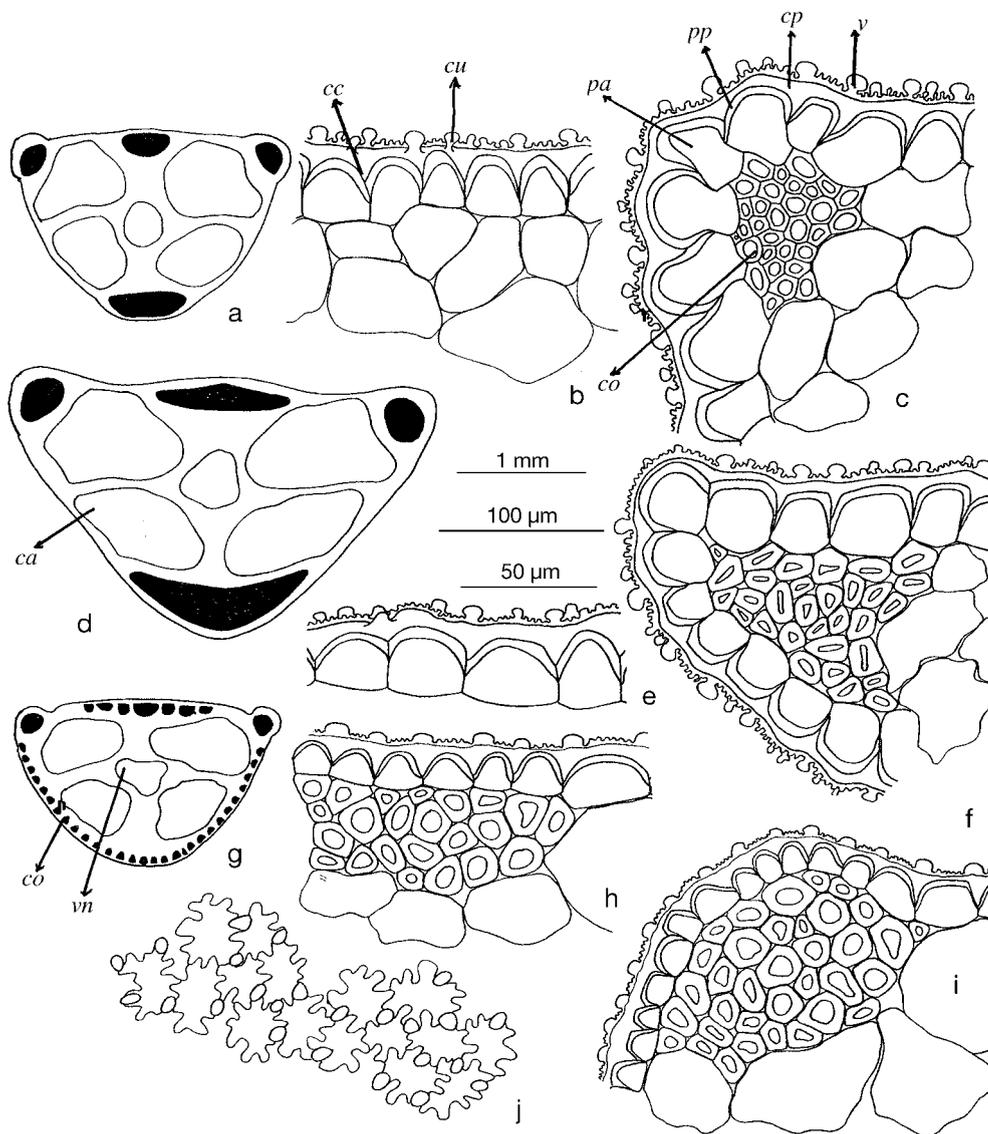


Fig. 6.—Secciones transversales de microfilos en especies ibéricas de *Isoetes* L.: a, *I. hystrix*, sección foliar completa; b, *I. hystrix*, epifilo; c, *I. hystrix*, área marginal; d, *I. durieui*, sección foliar completa; e, *I. durieui*, epifilo; f, *I. durieui*, área marginal; g, *I. setaceum*, sección foliar completa; h, *I. setaceum*, epifilo; i, *I. setaceum*, área marginal; j, *I. setaceum*, detalle del diafragma foliar. En negro, colénquima; ca, cámaras aeríferas; cc, cuñas cuticulares; co, colénquima; cp, capas cuticulares; cu, cutícula; pa, células papilosas marginales; pp, pared primaria; v, verrugas; vn, vena media. (Escala: a, d, g: 1 mm; j: 50 µm; b, c, e, f, h, i: 100 µm).

prominentes hasta papilosas, son características de los táxones con sección foliar más o menos triangular, como *I. durieui*, *I. hystrix* e *I. setaceum*. Las células epidérmicas marginales se disponen en 2-5 hileras longitudi-

nalmente alargadas y con las paredes algo más engrosadas que las restantes epidérmicas. Son sobresalientes y papilosas en *I. hystrix* (fig. 3c,d; fig. 6c) y son apenas prominentes, con las paredes externas muy engrosadas pero

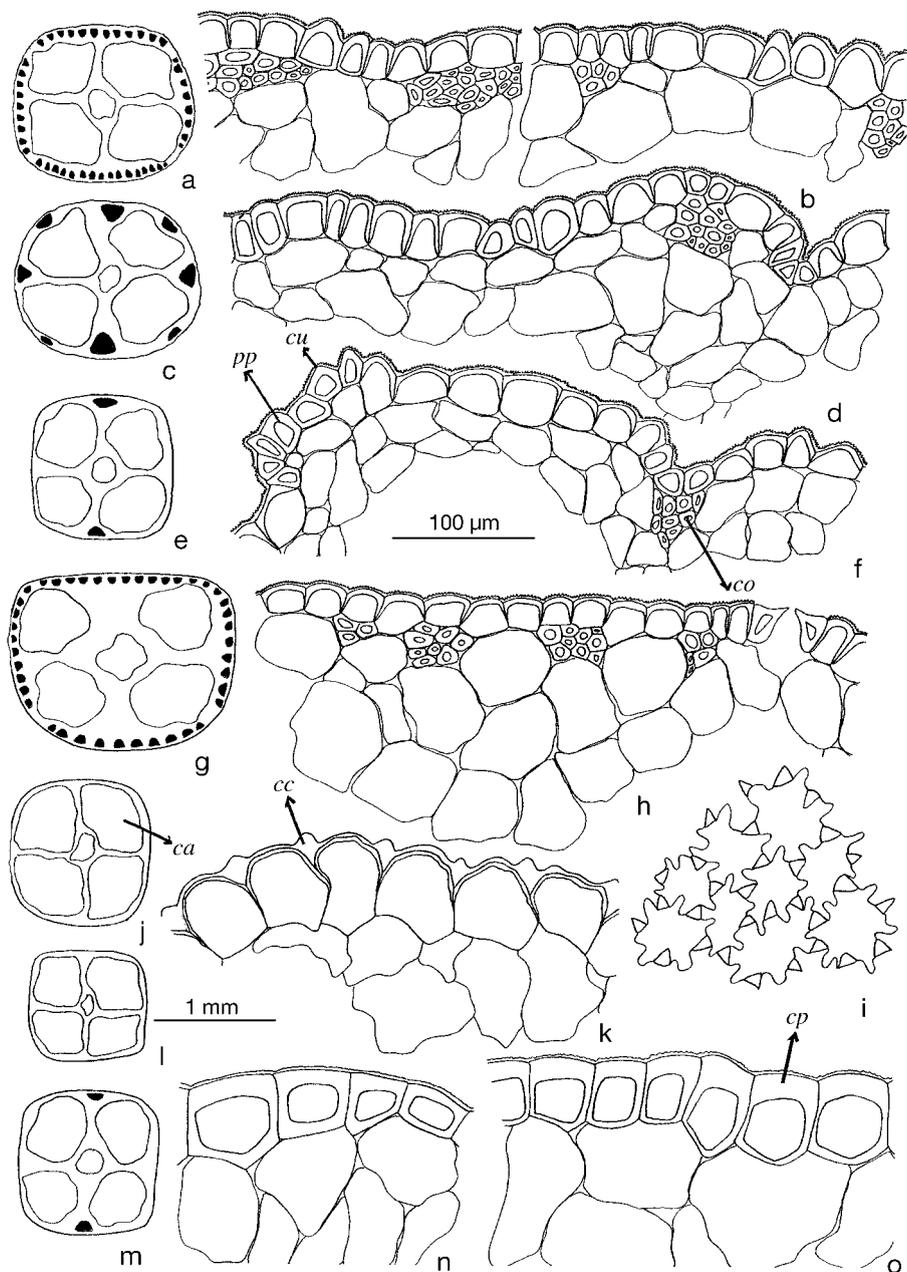


Fig. 7.—Secciones transversales de microfilos en especies ibéricas de *Isoetes* L.: a, *I. velatum* subsp. *velatum*, sección foliar completa; b, *I. velatum* subsp. *velatum*, epifilo-hipofilo; c, *I. velatum* subsp. *asturicense*, sección foliar completa; d, *I. velatum* subsp. *asturicense*, hipofilo; e, *I. longissimum*, sección foliar completa; f, *I. longissimum*, epifilo; g, *Isoetes* sp., sección foliar completa; h, *Isoetes* sp., hipofilo; i, *I. lacustre*, células de los diafragmas foliares; j, *I. lacustre*, sección foliar completa; k, *I. lacustre*, hipofilo; l, *I. echinosporum*, sección foliar completa; m, *I. bronchonii*, sección foliar completa; n, *I. echinosporum*, detalle en l; o, *I. bronchonii*, detalle en m. En negro, colénquima; ca, cámaras aeríferas; cc, cuñas cuticulares; co, colénquima; cu, cutícula; pp, pared primaria. (Escala: a, c, e, g, j, l, m: 1 mm; b, d, f, h, i, k, n, o: 100 µm).

no papilosas en *I. durieui* (fig. 3b; fig. 6f) e *I. setaceum* (fig. 6i). En *I. durieui* e *I. histrix* estas células marginales presentan verrugas cuticulares y la cutícula está plegada o estriada, al igual que en *I. setaceum*. En los demás táxones, con secciones transversales foliares trapezoidales, cuadrangulares o casi circulares, no se distinguen los márgenes.

La variación de los caracteres epidérmicos en corte transversal, en relación con los táxones es la siguiente:

- 1) Cutícula plegada, verrucosa, capas cuticulares 2-4 veces más gruesas que la cutícula, cuñas cuticulares presentes y muy prominentes, márgenes papilosos: *I. histrix*.
- 2) Cutícula plegada, verrucosa, capas cuticulares 2-4 veces más gruesas que la cutícula, cuñas cuticulares presentes y muy prominentes, márgenes engrosados no papilosos: *I. durieui*.
- 3) Cutícula estriada, capas cuticulares 2-4 veces más gruesas que la cutícula, cuñas cuticulares muy prominentes, márgenes engrosados no papilosos: *I. setaceum*.
- 4) Cutícula lisa, capas cuticulares 3-4 veces más gruesas que la cutícula, cuñas cuticulares ausentes: *I. echinosporum*.
- 5) Cutícula estriada, capas cuticulares 1-2 veces más gruesas que la cutícula, cuñas cuticulares prominentes: *I. lacustre*.
- 6) Cutícula someramente estriada, capas cuticulares como *I. echinosporum* o más gruesas, cuñas cuticulares ausentes: *I. bronchonii*.
- 7) Cutícula someramente estriada a finamente estriada, capas cuticulares como *I. echinosporum* o menos engrosadas, cuñas cuticulares ausentes: *I. × hickeyi*.
- 8) Cutícula estriada, capas cuticulares 2-3 veces más gruesas que la cutícula, cuñas cuticulares ausentes: *I. longissimum*, *I. velatum* subsp. *velatum*, *I. velatum* subsp. *asturicense*, *Isoetes* sp.

*El mesofilo* es extremadamente simple en *I. lacustre*: en corte transversal está formado por 1-2 capas de clorénquima de posición hi-

podérmica y 1-2 capas de clorénquima separando las cámaras aeríferas. El número de capas de clorénquima llega a 4-5 en los demás táxones acuáticos, mientras que el mesofilo de los táxones terrestres y anfibios es comparativamente más compacto y puede presentar más capas celulares en corte transversal.

El tejido de sostén tiene posición hipodérmica y está constituido por colénquima. Todos los táxones, con excepción de *I. lacustre*, lo presentan aunque es escaso y su desarrollo algo variable en *I. bronchonii* e *I. echinosporum* (tabla 1). Los cordones de colénquima fueron llamados "fascículos hipodérmicos" por ROUY (1912); "peripheral bast", por PFEIFFER (1922), la primera autora en considerarlos tejido de sostén y no conductor; "fascículos fibrosos periféricos", por MAIRE (1952); "fibrous strands", por HALL (1971), el primero en interpretarlos como colenquimáticos, y "fascículos fibrosos", por PRADA (1979). Esta última autora los describe por primera vez para los táxones ibéricos, indicando que estarían ausentes en *I. echinosporum* e *I. lacustre*.

De acuerdo con lo observado aquí, el colénquima se distribuye en cuatro grupos pluricelulares extensos, uno abaxial, uno adaxial central y dos marginales, en los táxones terrestres *I. histrix* (fig. 6a) e *I. durieui* (fig. 6d). En los anfibios, como *I. setaceum*, puede estar fragmentado en numerosos grupos paucicelulares de 10-20 células por grupo (a veces más) distribuidos en 5-8 cordones adaxiales y 30-32 (a veces más) abaxiales (fig. 6g); mientras que en *I. velatum* subsp. *velatum* e *Isoetes* sp. se presenta en numerosos cordones paucicelulares (40-42 o más), a veces formados solamente por 8-10 células en sección transversal (fig. 7 a y g, respectivamente). En los táxones acuáticos se presenta de manera variable: es muy escaso en *I. echinosporum*, que presenta por lo común un solo cordón de colénquima, abaxial, aunque a veces también se encuentra un pequeño grupo adaxial central (fig. 7 l); se presenta en 3(4) grupos en *I. longissimum* (fig. 7e) y en 8(10) en *I. velatum* subsp. *asturicense* (fig. 7c). En *I. echinosporum* e *I. longissimum* es probable que los cordones de sostén sean longitudinal-

mente discontinuos, ya que la posición puede variar a lo largo del microfilo (tabla 1).

Las cámaras aeríferas están cruzadas transversalmente por diafragmas, formados por células globosas, de paredes delgadas y lisas, sin lobulaciones ni sinuosidades, en *I. durieui* e *I. hystrix*. En los restantes táxones los diafragmas están formados por células lobuladas o profundamente sinuosas, que dejan entre una y otra poros de contorno triangular o elíptico. Los poros son triangulares en los diafragmas de *I. bronchonii* (fig. 7i), *I. echinosporum*, *I. lacustre* e *I. velatum* subsp. *velatum* y son de circulares a elípticos en los diafragmas de *I. setaceum* (fig. 6 j), *I. longissimum*, *I. velatum* subsp. *asturicense* e *Isoetes* sp.

En las paredes de contacto de las células de los diafragmas pueden aparecer protuberancias intercelulares pécticas (POTGIETER & VAN WYK, 1992; ROLLERI & *al.*, 1999). Estas protuberancias (PIP) son proyecciones de las paredes celulares, que en este caso tienen el aspecto de cortos filamentos, muy delgados. Fueron llamadas “pelos internos” por HALL (1971), el primer autor en registrar su presencia en *Isoetes*, indicando, pese a la designación que les dio, que no se trataba de pelos típicos desde el punto de vista anatómico. PRADA (1979) las detectó en *I. lacustre* e *I. setaceum* y las designó con el mismo nombre. Hasta el momento se han registrado solamente en dos táxones acuáticos, *I. bronchonii* e *I. lacustre*, ambas con diafragmas foliares de poros triangulares y en uno anfibio, *I. setaceum*, con diafragmas foliares de poros elípticos.

#### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los caracteres foliares que se han estudiado aquí por primera vez para un número significativo de táxones de *Isoetes*, son diagnósticos en los niveles específico, infraespecífico y aplicables a intertáxones (híbridos). El hecho de que sean apreciables por igual en material fresco y de herbario, que sean independientes de la edad de las plantas, del tamaño de los microfilos o de la posición de éstos en el corio, que se mantengan estables aunque varíe

la longitud de los filopodios en los táxones terrestres, que se presenten igualmente en ejemplares de áreas separadas de los mismos táxones (caso de *I. lacustre*) o que parezcan relativamente independientes del medio (presencia de estomas y colénquima en táxones acuáticos) es altamente significativo en un género en que la disponibilidad de caracteres es baja y en el que la clasificación se apoya casi exclusivamente en la ornamentación de las esporas.

Los modelos epidérmicos poligonales son comunes a todos los táxones, pero el radio celular, el tamaño de las células epidérmicas, la especialización marginal y la distribución de los estomas varían a nivel específico. La ornamentación cuticular (verrugas, estrías y pliegues), el espesor de las capas cuticulares y la presencia o ausencia de cuñas cuticulares sobresalientes también son diagnósticos a nivel específico. La presencia de grupos celulares epidérmicos con paredes engrosadas es característica de los táxones acuáticos con menor desarrollo de colénquima, y su función se interpreta como mecánica.

La presencia de estomas parece ser un carácter propio de los táxones y su ausencia no sería enteramente el resultado de una adaptación al medio acuático, ya que están presentes en dos táxones acuáticos y ausentes en otros cuatro. Las dimensiones de los estomas difieren para cada taxon diploide; *I. setaceum* los presenta notablemente más grandes que el resto de los diploides estudiados. Es posible que las variaciones halladas en las células epidérmicas y en los estomas en los táxones diploides y poliploides relacionados estén vinculadas, adicionalmente, con los distintos niveles de ploidía de los mismos, como son los casos de *I. velatum* subsp. *velatum* (2x) e *I. longissimum* (4x), o el de *I. bronchonii* (12x), alopoliploide derivado de *I. echinosporum* (2x) e *I. lacustre* (10x). La relación entre los tamaños celulares y el nivel de ploidía se ha constatado en otros muchos grupos de pteridófitos (BARRINGTON & *al.*, 1986; PANGUA & *al.*, 1990).

La distribución y extensión del colénquima son características de cada taxon. El colénquima está particularmente bien desarrollado en

los táxones terrestres y también está presente en microfilos de táxones acuáticos, pero en este caso los fascículos pueden estar interrumpidos longitudinalmente, son delgados y están formados por pocas células, de modo que en secciones transversales foliares la cantidad y grosor de tales cordones pueden variar a lo largo del microfilo.

Ciertos táxones se distinguen claramente por sus caracteres foliares (epidérmicos u otros); tales son los casos de *I. durieui*, *I. hixtrix*, *I. echinosporum*, *I. lacustre* e *I. setaceum*. Los dos primeros, con verrugas y cuñas cuticulares y estomas en dos bandas abaxiales y dos adaxiales, se diferencian entre sí por sus secciones foliares y la especialización marginal (esta última muy fácilmente observable con escaso aumento). *Isoetes setaceum* se distingue por su cutícula regularmente estriada y la presencia de cuñas cuticulares. *Isoetes echinosporum* se caracteriza por su cutícula lisa, las capas cuticulares comparativamente más gruesas y la ausencia de cuñas cuticulares, mientras que *I. lacustre* se diferencia por la cutícula estriada, las capas cuticulares más delgadas de todos los táxones, la presencia de cuñas cuticulares y de grupos paucicelulares de paredes más engrosadas intercalados en la epidermis. *Isoetes bronchonii* combina caracteres de sus progenitores y se diferencia por la cutícula someramente estriada o casi lisa, la ausencia de cuñas cuticulares, capas cuticulares de grosor similar a las de *I. echinosporum* y grupos paucicelulares de paredes más engrosadas intercalados en la epidermis, como *I. lacustre*. *Isoetes* × *hickeyi* es similar a *I. bronchonii*. Estas diferencias registradas son particularmente interesantes en el caso de *I. setaceum* e *I. velatum*, que conviven en las mismas localidades y que resultaban difíciles de determinar cuando ambos táxones se encuentran en etapas juveniles.

Los caracteres epidérmicos, además de mostrar diferencias, también estarían indicando afinidades: *I. velatum* subsp. *velatum*, *I. velatum* subsp. *asturicense*, *I. longissimum* e *Isoetes* sp. coinciden en muchos caracteres de la epidermis (cutícula estriada, desarrollo de las capas cuticulares) y forman un grupo muy uniforme en este aspecto. La sección foliar, el

grado de desarrollo del mesofilo y el número de cordones de colénquima difieren algo en cada uno de los cuatro táxones, pero podrían interpretarse como variaciones cuantitativas. Estos táxones también presentan afinidades en los caracteres esporales, de modo que este grupo requiere una investigación más profunda para establecer los límites y relaciones de las entidades taxonómicas involucradas.

Todos los resultados aquí obtenidos son sugerentes y es posible que su aplicación a otros grupos de táxones suministre nuevos enfoques y abra nuevas perspectivas en la taxonomía actual del género. La utilización de material de herbario restaurado es muy prometedora. Las técnicas de restauración y fijación posterior propuestas aquí permiten que el material seco y prensado recupere tamaños y volúmenes propios de material fresco. El proceso no afecta a los caracteres foliares aquí descritos y tiene particular interés en un género en el que muchas veces, por razones diversas —estación del año, dificultades de recolección, hábitat destruidos—, no se cuenta más que con ejemplares de herbario para trabajar.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo del Ministerio de Educación, Cultura y Deportes de España (MECD), organismo que facilitó la participación de la Dra. Cristina H. Rolleri en un proyecto de investigación pteridológica realizado en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense (Madrid), mediante el otorgamiento de una ayuda para profesores extranjeros en régimen de año sabático (SAB2002-0005).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYENSU, E.S. (1967). Aerosol-OT solution- an affective softener of herbarium specimens for anatomical studies. *Stain Techn.* 42: 155-156.
- BAKER, J.G. (1880). A synopsis of the species of the Isoetes. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 27: 69-73.
- BARRINGTON, D.S., C.A. PARIS & T.A. RANKER (1986). Systematic inferences from spore and stomate size in the ferns. *Amer. Fern J.* 76(3): 149-159.
- BORY DE SAINT VINCENT (1844). Sur les Isoetes et les espèces nouvelles de cette famille découvertes en Algérie. *Compt. Rend. Acad. Scien. Paris* 18: 1163-1168.

- CESCA, G. & L. PERUZZI (2001). Isoetes (Lycophytina, Isoetaceae) with terrestrial habitat in Calabria (Italy). New karyological and taxonomical data. *Fl. Medit.* 11: 303-309.
- FEDER, N. & T.P. O'BRIEN (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer. J. Bot.* 55: 23-142.
- FONT QUER, R. (1953). *Diccionario de Botánica*. Ed. Labor, Barcelona.
- HALL, J.B. (1971). Observations on Isoetes in Ghana. *Bot. J. Linn. Soc.* 64: 117-139.
- HOLMGREN, P.K., N.H. HOLMGREN & L. BARNETT (1990). *Index herbariorum*, Part I: Herbaria of the World, Ed. 8, New York Botanical Garden, Bronx, Nueva York.
- KOTT, L.S. & D.M. BRITTON (1985). Role of morphological characteristics of leaves and the sporangial region in the taxonomy of Isoetes in northern North America. *Amer. Fern. J.* 75(2): 44-55.
- LELLINGER, D.B. (2002). *A Modern Multilingual Glossary for Taxonomic Pteridology*. *Pteridologia* 3, 263 pp., Washington.
- MAIRE, R. (1952). Flore de l'Afrique du Nord. *Encyclopedie Biologique* 33: 87-94.
- MOTELAY, I. & H. VENDRYÈS (1883). Monographie des Isoetaceae. *Actes Soc. Linn. Bordeaux* 36: 309-406.
- MUSSELMAN, L.J. (2002). Old Dominion University Quillwort page, <[http:// web.odu.edu](http://web.odu.edu)>.
- PANGUA, E., C. PRADA, A. CASTILLO & A.E. SALVO (1990). *Asplenium obovatum* Viv. en la Península Ibérica, pp. 191-208. In: J. Rita (ed.), *Taxonomía, Biogeografía y Conservación de Pteridófitos*. Soc. Hist. Nat. Bal. IME, Palma de Mallorca.
- PFEIFFER, N.E. (1922). Monograph of the Isoetaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 9(2): 79-217.
- POTGIETER, M.J. & A.E. VAN WYK (1992). Intercellular pectic protuberances in plants: their structure and taxonomic significance. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 33: 295-316.
- PRADA, C. (1979). Estudio de la anatomía foliar de las especies españolas del género Isoetes. *Lagasalia* 9(1): 107-113.
- PRADA, C. (1986). Isoetaceae, pp. 15-20. In: S. Castroviejo & al. (eds.), *Fl. Iber. I, Lycopodiaceae-Papaveraceae*. CSIC, Madrid.
- ROLLERI, C.H. (2002). Caracteres diagnósticos y taxonomía del género *Angiopteris* Hoffm. (Marattiaceae) I, Los caracteres. *Rev. Museo La Plata, Bot.* 15(115): 23-49 <[www.ibiblio.org/revista/botanica](http://www.ibiblio.org/revista/botanica)>.
- ROLLERI, C.H., A.M. DEFERRARI & M.C. CICIARELLI (1987). Epidermis y estomatogénesis en Marattiaceae. *Rev. Museo La Plata, n.s., Bot.* 14(91): 129-147.
- ROLLERI, C.H., A.M. DEFERRARI & M.C. LAVALLE (1991). Epidermal morphology of pinnae of *Angiopteris*, *Danaea* and *Marattia*. *Amer. Fern. J.* 81(2): 41-64.
- ROLLERI, C.H., A.M. DEFERRARI & M.C. LAVALLE, A. MENGASCINI & M. RODRÍGUEZ (1999). Protuberancias intercelulares pécticas en especies de *Angiopteris* Hoffm. y otras Marattiales. *Physis (Buenos Aires)*, C, 57(132-133): 1-11.
- ROLLERI, C.H., A.M. DEFERRARI & M.C. LAVALLE, A. MENGASCINI & M. RODRÍGUEZ (2003). Sistemática de los helechos eusporangiados (Marattiaceae-Marattiales). *Rev. Museo la Plata, Bot.* 16(117): 49-64 <[www.ibiblio.org/revista/botanica](http://www.ibiblio.org/revista/botanica)>.
- ROMEO, D., A. TROIA, C. BURGARELLA & E. BELLINI (1999). Structure of intraestelar canals of leaves of mediterranean Isoetes species (Isoetaceae, Lycopodiophyta). 94th Congress of the Italian Society of Botany, Ferrara.
- ROUY, G. (1912). Flore de France ou description des plantes que croissent spontanément en France, en Corse et en Alsace-Lorraine 13: 472-481.
- SHARMA, B.D. & R. SINGH (1984). The ligule in Isoetes. *Amer. Fern. J.* 74(1): 22-28.
- STACE, C.A. (1965). Cuticular studies as an aid to plant taxonomy. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 4: 1-78.
- TAYLOR, W.C. & J. HICKEY (1992). Habitat, evolution and speciation in Isoetes. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 613-622.
- TROIA, A., D. ROMEO, C. BURGARELLA & E. BELLINI (1999). Comparative leaf anatomy of *Isoetes histrix* Bory and *I. durieui* Bory (Isoetaceae, Lycopodiophyta). 94th Congress of the Italian Society of Botany, Ferrara.
- TRYON, R.M. & A.F. TRYON (1982). *Ferns and allied plants with special reference to tropical America*. Springer-Verlag, New York.
- WILKINSON, H. (1979). The plan surface (mainly leaf), pp. 97-165. In: C. Metcalfe & T. Chalk (eds.), *Anatomy of the Dicotyledons*, vol. II. Clarendon Press, London.