



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



# Estudios morfológicos y ultraestructurales en esporas de Dennstaedtiaceae de la Provincia Fitogeográfica Paranaense

**Yañez, Agustina**

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Márquez, Gonzalo

Co-dirección: Morbelli, Marta Alicia

Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
2015

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20160328001445>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



**Naturalis**

Repositorio Institucional  
FCNyM - UNLP



**Estudios morfológicos y ultraestructurales  
en esporas de Dennstaedtiaceae de la  
Provincia Fitogeográfica Paranaense**



**Tesis Doctoral**

**Doctorado en Ciencias Naturales**

**Lic. Agustina Yañez**



**Directores: Dr. Gonzalo Marquez**

**Dra. Marta Alicia Morbelli**



**Facultad de Ciencias Naturales y Museo**

**Universidad Nacional de La Plata**

**2015**



*Esta tesis está dedicada a la maravillosa selva paranaense pasada, presente y (casi como una expresión de deseo) futura... definitivamente mi lugar en el mundo.*

## **Agradecimientos**

A Cosme por proteger, permitir, acompañar, alentar, socorrer y garantizar mi crecimiento académico y, fundamentalmente, humano.

A Marta por otorgarme libertad de acción, confianza plena, apoyo constante y abrazos interminables.

A Ceci por ser la mejor amiga y compañera de trabajo que podría haber tenido durante mis largas horas en el pabellón de 64.

A Gabi, Luján y Juan Pablo por su predisposición para contestar mis preguntas, ayudarme con sus opiniones y permitirme que la Cátedra de Morfología Vegetal sea mi segundo lugar de trabajo.

A Mari y Diego por auxiliarme académicamente en mis inquietudes sistemáticas desesperadas y afectuosamente en mis inquietudes existenciales desesperadas.

A Pedro Bond Schwartsburd por su invaluable ayuda en la obtención de muestras de *Hypolepis* y en el esclarecimiento de todos los aspectos referidos a la sistemática de este género.

A los guardaparques de la zona Centro y Norte de la Provincia de Misiones por sumarle familiaridad, camaradería, anécdotas y risas a los viajes de campaña.

Al Ministerio de Ecología y RNR de la Provincia de Misiones por la celeridad para otorgar los permisos de colección.

A los curadores de los herbarios LP, SI, BA, CTES, UPCB, BHCB, SP, PACA, HB, MO, NY por los imprescindibles préstamos de material.

A la Isabel Farías por su paciencia en el procesamiento de las muestras, independientemente de las condiciones en las cuales estas le llegaran.

Al Lic. Rafael Urrejola por los turnos más que entretenidos en el microscopio electrónico de barrido de la FCNyM.

Al Ing. Lisandro Anton por su auxilio paciente y esclarecedor en el uso del microscopio electrónico de transmisión del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica (LANAISMIE/CONICET).

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata por brindar la oportunidad de realizar un doctorado de excelencia académica de manera gratuita.

A la Universidad Nacional de La Plata, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por los subsidios otorgados. A este último, especialmente, por financiarme la vida durante mis estudios de posgrado.

A Pe, Jessi, Dolfi, Jime y Tincho por enriquecerme con sus visiones heterogéneas de la vida y con su amistad llena de música.

A papá, mamá, Edgardo, Lidia y Gon por su amor, sin el cual hubiese sido muy difícil sortear los obstáculos de un trabajo semejante.

A Ana y Luchi (y todos sus niños en orden de aparición: Miqui, Antü, Cande, Marcel y Fran) por ser un refugio para distraerme de esta tesis y, también, para concentrarme en ella.

A mi amor Pini, por crecer conmigo.

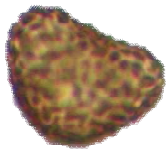
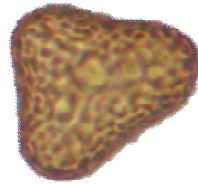
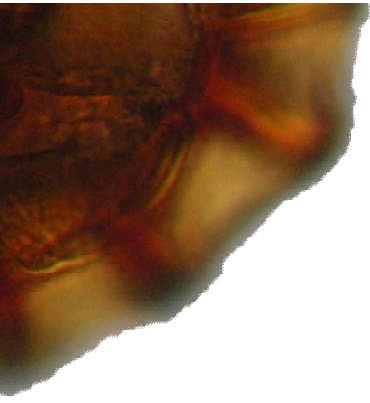
<b>1. Resumen/Abstract</b> .....	9
<b>1.1 Resumen</b> .....	10
<b>1.2. Abstract</b> .....	14
<b>2. Introducción</b> .....	17
<b>2.1. Familia Dennstaedtiaceae: distribución, morfología y circunscripción taxonómica</b> .....	18
<b>2.2. Antecedentes sistemáticos de Dennstaedtiaceae</b> .....	19
<b>2.3. Observaciones sobre la circunscripción sistemática de algunos géneros estudiados.</b> .....	22
<i>Pteridium</i> Gled. ex Scop. ....	22
<i>Dennstaedtia</i> Lotsy.....	24
<i>Hypolepis</i> Bernh .....	25
<i>Blotiella</i> R. M. Tryon.....	27
<b>2.4. Antecedentes palinológicos de Dennstaedtiaceae</b> .....	28
<b>2.5. Antecedentes de Dennstaedtiaceae en estudios florísticos de América</b> .....	37
<b>2.6. Objetivos e Hipótesis de trabajo</b> .....	38
2.6.1. Objetivo principal.....	38
2.6.2. Objetivos particulares primarios .....	38
2.6.3. Objetivos particulares secundarios.....	38
2.6.4. Hipótesis .....	39
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	40
<b>3.1. Área de estudio</b> .....	41
<b>3.2. Material estudiado</b> .....	43
3.2.1. Especies estudiadas .....	43
3.2.2. Obtención del material .....	44
3.2.3 Determinación de ejemplares.....	46
3.2.4 Descripción vegetativa de especies.....	47
3.2.5. Ejemplares estudiados para el estudio palinológico.....	47
<b>3.3. Métodos</b> .....	55
3.3.1. Estudios con microscopio óptico (MO).....	55

3.3.2. Estudios con microscopio electrónico de barrido (MEB) .....	56
3.3.3. Estudios con microscopio electrónico de transmisión (MET).....	57
<b>3.4. Parámetros y terminología utilizada en la descripción palinológica .....</b>	<b>60</b>
3.4.1. Caracteres cuantitativos.....	60
3.4.2. Caracteres cualitativos.....	64
<b>3.5. Ilustraciones .....</b>	<b>68</b>
<b>3.6. Organización de los resultados.....</b>	<b>70</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1 Géneros con esporas triletes .....</b>	<b>73</b>
4.1.1. Grupo morfológico verrucoso (Láminas 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9) .....	75
<i>Dennstaedtia</i> Bernh. ....	76
<i>Dennstaedtia cicutaria</i> (Sw.) T. Moore.....	76
<i>Dennstaedtia cornuta</i> (Kaulf.) Mett . ....	81
<i>Dennstaedtia dissecta</i> (Sw.) T. Moore .....	90
<i>Dennstaedtia obtusifolia</i> (Willd.) T. Moore.....	92
<i>Dennstaedtia globulifera</i> (Poir.) Hieron. ....	100
<i>Ultraestructura</i> .....	106
<i>Discusión</i> .....	116
<i>Observaciones respecto de los métodos de fijación utilizados</i> .....	119
<i>Aplicaciones de la morfología de las esporas en la taxonomía de Dennstaedtia</i> .....	119
4.1.2. Grupo morfológico con cordones (Láminas 10, 11, 12, 13, 14 y 15) .....	123
<i>Microlepidia</i> Presl.....	124
<i>Microlepidia speluncae</i> (L.) T. Moore .....	124
<i>Pteridium</i> Gled. ex Scop.....	133
<i>Pteridium arachnoideum</i> (Kaulf.) Maxon subsp. <i>arachnoideum</i> .....	133
<i>Ultraestructura</i> .....	141
<i>Discusión</i> .....	147
<i>Pteridium: Relación entre la ploidía de la especie y el tamaño de las esporas</i> .....	154
<b>4.2. Géneros con esporas monoletes.....</b>	<b>155</b>
4.2.1. Grupo morfológico baculado (Láminas 16 y 17).....	157

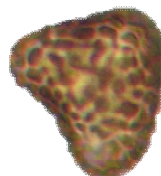
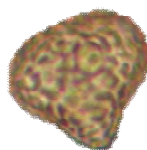
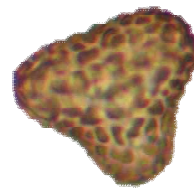
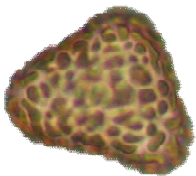
<i>Blotiella</i> R.M. Tryon .....	157
<i>Blotiella lindeniana</i> (Hook.) R.M. Tryon .....	157
<b>Ultraestructura</b> .....	164
<b>Discusión</b> .....	167
4.2.2. Grupo morfológico rugulado (Láminas 18, 19 y 20) .....	170
<i>Paesia</i> J. St.-Hil.....	170
<i>Paesia glandulosa</i> (Sw.) Kuhn .....	170
<b>Ultraestructura</b> .....	179
<b>Discusión</b> .....	182
4.2.3. Grupo morfológico tuberculado (Láminas 21 y 22) .....	185
<i>Histiopteris</i> (J. Agardh) J. Sm.....	185
<i>Histiopteris incisa</i> (Thunb.) J. Sm.....	185
<b>Ultraestructura</b> .....	193
<b>Discusión</b> .....	196
4.2.4. Grupo morfológico equinado (Láminas 23, 24 y 25).....	199
<i>Hypolepis</i> Bernh.....	199
<i>Hypolepis mitis</i> Kunze ex Kuhn.....	200
<i>Hypolepis x paulistana</i> Schwartsb. & J. Prado.....	203
<i>Hypolepis repens</i> (L.) C. Presl.....	207
<i>Hypolepis stolonifera</i> Fée.....	210
<b>Ultraestructura</b> .....	218
<b>Discusión</b> .....	222
<b>Observaciones sobre el origen híbrido de <i>Hypolepis x paulistana</i></b> (Lámina 25)	
.....	225
4.2.5. Grupo morfológico crestado (Láminas 26 y 27).....	232
<i>Hypolepis</i> Bernh.....	232
<i>Hypolepis rugosula</i> subsp. <i>pradoana</i> Schwartsb. ....	232
<b>Ultraestructura</b> .....	239
<b>Discusión</b> .....	242
<b>5. Discusión general</b> .....	245
<b>5.1. Clases de esporas y grupos morfológicos en la familia Dennstaedtiaceae</b> .....	246



<b>5.2. Análisis ultraestructural</b> .....	248
5.2.1. Presencia de cordones en el perisporio.....	252
5.2.2 Presencia de cuerpos esferoidales .....	254
<b>5.3. Utilidad de los caracteres palinológicos en la identificación de géneros o grupos sub-genéricos</b> .....	254
<b>5.4. Aporte de los caracteres palinológicos a las filogenias existentes</b> .....	256
5.4.1 Caracteres palinológicos coincidentes con otras familias filogenéticamente no emparentadas .....	260
<b>5.5. Caracteres palinológicos y rangos de distribución geográfica. Perspectivas...</b>	267
<b>5.6. Aportes a la asignación de material fósil</b> .....	268
<b>6. Conclusiones</b> .....	270
<b>7. Perspectivas futuras</b> .....	274
<b>8. Referencias</b> .....	277



# 1. Resumen/Abstract



## 1.1 Resumen

En el presente trabajo se estudió la morfología y ultraestructura de las esporas de las Dennstaedtiaceae de la Provincia Fitogeográfica Paranaense (extremo sur de Brasil, desde los faldeos occidentales de la Serra do Mar hasta el centro de Río Grande do Sul, el extremo nordeste de la Argentina y el este de Paraguay). Para realizar este trabajo se utilizó material de herbario y fresco, coleccionado en viajes de campo. Se usaron diversas técnicas de fijación y tinciones diferenciales y las observaciones se realizaron con microscopio óptico (MO) y electrónico de barrido y de transmisión (MEB y MET).

Dennstaedtiaceae es una familia de helechos ampliamente distribuida en el mundo, con representantes predominantemente pantropicales, ocasionalmente boreales y de regiones templadas. Desde el punto de vista morfológico, la familia incluye grupos muy diversos lo que ha dificultado la delimitación taxonómica de taxa subordinados a lo largo de la historia. Los caracteres reproductivos dentro de la familia son los que presentan la mayor variación.

En base a observaciones propias en el campo, la consulta de herbarios y la revisión bibliográfica, se pudo determinar la presencia de 7 géneros y 17 especies de Dennstaedtiaceae: *Blotiella lindeniana* (Hook.) R. M. Tryon, *Dennstaedtia cicutaria* (Sw.) T. Moore, *Dennstaedtia cornuta* (Kaulf.) Mett. , *Dennstaedtia dissecta* (Sw.) T. Moore, *Dennstaedtia globulifera* (Poir.) Hieron., *Dennstaedtia obtusifolia* (Willd.) T. Moore, *Histiopteris incisa* (Thunb.) J. Sm., *Microlepidia speluncae* (L.) T. Moore, *Paesia glandulosa* (Sw.) Kuhn, *Pteridium arachnoideum* subsp *arachnoideum* (Kaulf.) Maxon, *Hypolepis mitis* Kunze ex Kuhn, *Hypolepis paulistana* Shwartzb. & J. Prado, *Hypolepis repens* (L.) C. Presl, *Hypolepis rugosula* (Labill.) J. Sm., *Hypolepis stolonifera* Fée, *Hypolepis rigescens* (Kunze ex Mart.) T. Moore. No obstante, esta última podría estar extinta en el área. Se actualizó la distribución de los taxa y se describió una nueva variedad de *Hypolepis stolonifera* (*Hypolepis stolonifera* var. *delasotae* Arana, Yañez & Schwartsburd).

Como características generales, las esporas son de dos clases. Las especies de *Dennstaedtia*, *Microlepidia* y *Pteridium* presentan esporas triletes, de lados rectos, cóncavos o convexos y ángulos redondeados, triangulares o subcirculares en vista polar, convexo-hemisféricas a plano-hemisféricas en vista ecuatorial. Las especies de *Blotiella*,

*Histiopteris*, *Hypolepis* y *Paesia* presentan esporas monoletes, bilaterales, elípticas a oblongas en vista polar y plano-convexas a plano-hemisféricas en vista ecuatorial.

A partir de la diversidad de esculturas observadas y los elementos predominantes de la ornamentación, se identificaron 7 grupos morfológicos en la familia. Las esporas del grupo morfológico verrucoso, observadas en *Dennstaedtia*, se caracterizan por presentar verrugas con distintas dimensiones, formas y superficies, a veces fusionadas formando lomos o retículos, lo que permite a su vez diferenciar a las especies del género. Las verrugas están constituidas por el perisporio que se distingue como castaño claro a castaño oscuro con MO y posee una o dos capas distinguibles en secciones delgadas observadas con MET.

Las esporas del grupo morfológico con cordones, presentes en *Pteridium* y *Microlepia*, están tapizadas por redes tridimensionales de cordones ramificados y fusionados entre sí que se disponen tangenciales o perpendiculares a la superficie y que se originan a partir del perisporio. El perisporio se observa castaño claro a marrón al MO y, a nivel ultraestructural, presenta tres capas. Las especies incluidas en este grupo pueden diferenciarse por la morfología, subestructura y organización de los cordones de la red. El grupo morfológico baculado, que incluye a *Blotiella*, presenta esporas tapizadas por báculas, con frecuencia rodeadas por engrosamientos de la pared que conforman mamelones. Las báculas están conformadas por el perisporio que es hialino y presenta dos capas.

Las esporas del grupo morfológico rugulado, presentes en *Paesia*, están tapizadas por lomos angostos, sinuosos, que definen un arreglo laberíntico o se ordenan perpendiculares a la lesura. Los lomos están conformados por el perisporio que se posee una colocación gris-oscuro a la madurez y tiene dos capas a nivel ultraestructural.

Todas las especies de *Hypolepis*, excepto *H. rugosula* subsp. *pradoana*, se incluyeron en el grupo morfológico equinado, debido a que presentan esporas ornamentadas por espinas que se fusionan lateralmente para formar crestas sinuosas y que, con frecuencia, están tapizadas por cordones que las conectan lateralmente. Las espinas están conformadas por un perisporio castaño claro al MO, en el cual se pueden identificar cuatro capas con MET.

Particularmente en *H. x paulistana*, se hallaron caracteres palinológicos que sustentarían el origen híbrido de esta especie. Por otra parte, *H. rugosula* subsp. *pradoana* es la única especie del género que pertenece al grupo morfológico crestado debido a que presenta

esporas tapizadas por crestas de margen irregular, ocasionalmente fenestradas en la base. En esta especie las crestas también están conformadas por el perisporio que es hialino al MO, y a nivel ultraestructural presenta tres capas.

Finalmente, *Histiopteris* se incluyó en el grupo morfológico tuberculado. Presenta esporas tapizadas por tubérculos que se fusionan entre sí para formar retículos. A diferencia del resto de las especies estudiadas, en este grupo los tubérculos están originados por el exosporio, mientras que el perisporio acompaña la ornamentación. El perisporio es castaño al MO, y presenta dos capas distinguibles con MET.

En relación al exosporio, todas las especies de Dennstaedtiaceae paranaenses poseen un exosporio constituido por dos capas de características ultraestructurales similares.

Asimismo, el margen del exosporio resultó ser ornamentado en todas las especies con esporas monoletes.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la diversidad morfológica observada en los esporofitos de las especies de la familia Dennstaedtiaceae es comparable con la diversidad observada respecto a las características esculturales de las esporas. En este sentido, dentro de la familia la mayoría de los géneros estudiados pertenecen a un grupo morfológico que los caracteriza, excepto *Hypolepis* cuyas especies se incluyen en dos grupos distintos y *Microlepia* y *Pteridium* que comparten un mismo grupo morfológico.

En relación historia evolutiva de la familia, los resultados ponen de manifiesto que algunos caracteres palinológicos como la clase de esporas y el margen del exosporio aportarían datos que avalan las hipótesis filogenéticas recientes. Asimismo, se hallaron similitudes entre algunas especies estudiadas y especies pertenecientes a familias filogenéticamente no emparentadas. Esto permite sugerir que los caracteres palinológicos no poseen por sí solos un valor evolutivo que permita establecer relaciones entre grupos por encima del nivel de género.

Adicionalmente, se realizó una evaluación preliminar sobre la posible relación entre la distribución geográfica de las especies y géneros y algunos caracteres palinológicos. En este sentido, no se observó un patrón de variación evidente en el tamaño de las esporas o la ornamentación que pueda relacionarse con la distribución geográfica de las especies paranaenses de Dennstaedtiaceae.

Finalmente, las descripciones detalladas de la ornamentación tanto del exosporio como del perisporio de las especies estudiadas, así como las imágenes capturadas con microscopía óptica aportadas por esta tesis, representarían un aporte de información útil para ser utilizada en la comparación con material fósil.

## 1.2. Abstract

The spore morphology and wall ultrastructure of the Dennstaedtiaceae species from Paranaense Phytogeographic Province (Southern Brazil, from the margins of Serra do Mar Serra do Mar to the center of Rio Grande do Sul, northeastern Argentina and eastern Paraguay) were studied. The study was based on herbarium specimens and fresh material, collected in field trips. Several techniques of fixation and differential stains applied and the observations were performed with light microscopy (LM) and scanning and transmission electron microscopes (SEM and TEM).

Dennstaedtiaceae is a family of ferns broadly distributed in the World, with representatives mainly pantropical, occasionally boreal and in temperate regions. From the morphologic point of view, the family includes different groups. This fact has brought difficulties for the taxonomic circumscription of the subordinated taxa along the history. The reproductive features inside the family are the ones that show the broader variation.

Based on observations in the field, the consult of herbaria and the bibliographic revision, it was possible to determine the presence of 7 genera and 17 species of Dennstaedtiaceae: *Blotiella lindeniana* (Hook.) R. M. Tryon, *Dennstaedtia cicutaria* (Sw.) T. Moore, *Dennstaedtia cornuta* (Kaulf.) Mett., *Dennstaedtia dissecta* (Sw.) T. Moore, *Dennstaedtia globulifera* (Poir.) Hieron., *Dennstaedtia obtusifolia* (Willd.) T. Moore, *Histiopteris incisa* (Thunb.) J. Sm., *Microlepia speluncae* (L.) T. Moore, *Paesia glandulosa* (Sw.) Kuhn, *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* (Kaulf.) Maxon, *Hypolepis mitis* Kunze ex Kuhn, *Hypolepis paulistana* Schwartsb. & J. Prado, *Hypolepis repens* (L.) C. Presl, *Hypolepis rugosula* (Labill.) J. Sm., *Hypolepis stolonifera* Fée, *Hypolepis rigescens* (Kunze ex Mart.) T. Moore. Nevertheless, the last one could be extinguished in the area. It was actualized the taxa distribution and it was described a new variety of *Hypolepis stolonifera* (*Hypolepis stolonifera* var. *delasotae* Arana, Yañez & Schwartsb.).

As general characteristics, the spores of *Dennstaedtia* species are of two kinds, monolete and trilete. The *Microlepia* and *Pteridium* species produce trilete spores, triangular to subcircular in polar view, convex-hemispheric to plane-hemispheric in equatorial view with, straight, concave to convex sides and round corners. The species of *Blotiella*,

*Histiopteris*, *Hypolepis* and *Paesia* produce monolet spores, bilateral, elliptic to oblong in polar view and plane-convex to plane-hemispheric in equatorial view.

Based on the diversity of sculptures observed and the predominant elements of the ornamentation, 7 morphological groups were recognized within the family. The spores of the verrucose group, present in *Dennstaedtia*, are characterized for having verruca of varied sizes, shapes and surfaces. Sometimes these verrucae are fused forming ridges or reticules which let us differentiate species and genera. The verrucate surface is the outer part of perispore what let us to distinguish as light brown to dark brown with LM and they have one or two layers, distinguished in thin sections when observed with TEM.

The spores of the morphologic group with strands, present in *Pteridium* and *Microlepia*, are covered by a tridimensional network of branched and fused strands, arranged tangentially or perpendicular to the spore surface and that are part of the perispore. The perispore is light brown to brown when observed with the MF and at ultrastructural level it has three layers. The species included in this group can be differentiated by the threads network organization, their morphology and the substructure.

The morphological group baculate, that includes *Blotiella*, produce spores covered by bacules, frequently covered with thickenings of the wall that form mammilons. The bacules are the perispore surface (hyaline) with two layers.

The spores of the morphological group regulate, as in *Paesia*, are covered of sinuous, narrow ridges, that conform an arrangement laberhentic or they are orientated perpendicular to the laesura. The ridges constitute the perispore surface that is dark-grey when mature and has two layers at ultrastructural level.

All *Hypolepis* species, with exception of *H. rugosula* subsp. *Pradoana*, were included within the morphological group equinate (echinate), since they have spores with spines which are fused laterally forming frequently sinuous crests and covered by threads connections between them. The spines are located on the perispore surface, which is light brown with LM, in which can be distinguished four layers with TEM. Especially in *H. x paulistana*, palynological characteristics were found that would give support to its hybrid origin. On the other side, *H. rugosula* subsp. *pradoana* is the only species within the genus that belongs to the morphological group cristate since it has spores with a surface with crests covered of crests with irregular margin, occasionally fenestrated at the base. In this



species the crests belong to the perispore that is hyaline when seen with FM, and at ultrastructural level has three layers.

The genus *Histiopteris* was included in the morphological group tuberculate.

It presents spores covered of tubercles which are fused, forming reticules. Unlike the rest of the species studied, the tubercles, in this group, constitute the exospore surface, and the perispore covers the exospore ornamentation. The perispore is brown with LM, and has two layers distinguishable with TEM.

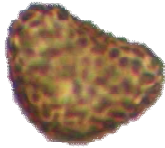
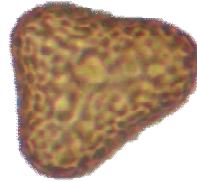
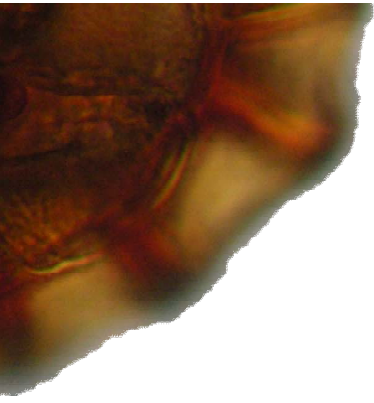
Respect to the exospore, all the Dennstaedtiaceae paranaenses species have an exospore two-layered with similar ultrastructural characteristics. In the same way, the exospore margin has ornamentation in all the species with monolet spores.

The results obtained in this study show that the morphological variability observed in the sporophytes of the family Dennstaedtiaceae species, is equivalent to the variability observed in the sculpture characteristics of the spores. In this sense, within the family the main part of the genera studied belong to one morphologic group that characterized them, except *Hypolepis* since their species are included into two different groups and *Microlepia* and *Pteridium* that belong to a same morphologic group.

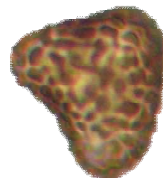
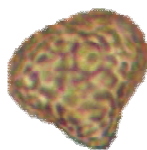
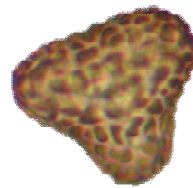
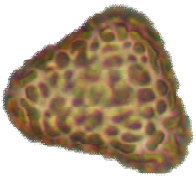
In relation to evolutionary history of the family, the results have shown that some palynological characteristic like the kind of spores and the exospore margin would bring data that would support the recent phylogenetic hypothesis. Likewise, there were found similarities between some species studied and species that belong to families phylogenetically not related. These results let us suggest that the palynological characteristics do not have in itself any evolutionary value that allows us to suggest relationships between groups above generic level.

In addition it was made a preliminary evaluation about the possible relation between the geographic distribution species and genera and some palynological characteristics. At this respect, there was not observed an evident pattern of variation in the spore size or the ornamentation that could be related with the geographical distribution of the Dennstaedtiaceae species that grow in the Paranaense Province.

The detailed descriptions made with LM in the studied species about the exospore and perispore ornamentation, as the images recorded with LM given in this Thesis, will be and useful information for comparison with those spores found in fossil material.



## **2. Introducción**



## **2.1. Familia Dennstaedtiaceae: distribución, morfología y circunscripción taxonómica**

Dennstaedtiaceae es una familia de helechos ampliamente distribuida en el mundo, con representantes predominantemente pantropicales, ocasionalmente boreales y de regiones templadas (Tryon & Tryon, 1982). Particularmente en América, la familia se extiende desde el sur de los Estados Unidos y México hasta el sur de Brasil y Argentina (Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Córdoba, Buenos Aires, Chubut, Mendoza, Neuquén y Río Negro) ocupando diversos hábitats como sotobosques y claros de selvas primarias húmedas, espacios abiertos en selvas secundarias, barrancas en el margen de arroyos, bordes de senderos y zonas modificadas por la actividad antrópica.

Desde el punto de vista morfológico, la familia incluye grupos muy diversos lo que ha dificultado la delimitación taxonómica de taxa subordinados a lo largo de la historia. Son plantas terrestres o saxícolas, que crecen erectas o escandentes entre la vegetación circundante. Presentan un rizoma corto o largamente rastrero, a menudo sifonostélico o polistélico, con pelos articulados u, ocasionalmente, escasas escamas entremezcladas con los pelos. Los pecíolos poseen uno a varios haces vasculares dispuestos en U y presentan, en algunos casos, yemas epipetiolares que originan raíces y, en algunos casos ramas. Las láminas se caracterizan por sus grandes dimensiones y son pinnadas a tetrapinnado-pinnatífidas, generalmente pilosas. Las mismas poseen venas libres, bifurcadas o pinnadas, raramente anastomosadas, nunca con venas inclusas, y el raquis generalmente surcado en el dorso.

Los caracteres reproductivos dentro de la familia son los que presentan la mayor variación. Los soros son marginales o submarginales, circulares a elípticos, naciendo en el extremo de las venillas o sobre una vena colectora marginal y, en este caso, constituyen cenosoros. El indusio puede estar ausente o ser doble y formar una estructura cupuliforme, valvada, extendida a lo largo del margen de la lámina. El labio inferior del indusio puede estar reducido o ausente, y el labio superior fusionarse con el margen de la lámina. Los esporangios son de tipo leptosporangio y las esporas son triletes tetraédricas o monoletes reniformes, con diversos tipos de ornamentación. El gametófito es verde, cordado (Smith, 1995).

Las Dennstaedtiaceae presentan, asimismo, una gran diversidad citológica ya que los números cromosómicos citados hasta el momento para los distintos taxa son  $x = 26, 29, 30, 31, 33, 34, 38, 46, 47, 48$  (Holttum & Sen, 1962; Alston, 1956; Mickel, 1973).

Según los más recientes sistemas de clasificación propuestos para helechos y Lico fitas (Smith *et al.* 2006; Christenhusz *et al.* 2011; Christenhusz *et al.* 2014), las Dennstaedtiaceae constituyen una familia monofilética representada por 10 géneros (*Blotiella, Dennstaedtia, Hypolepis, Histiopteris, Leptolepia, Monanchosorum, Microlepia, Paesia, Pteridium* y *Oenotrichia*) y con alrededor de 170 especies. En este estudio se seguirá este esquema debido a que es, hasta el momento, el único que tiene en cuenta tanto los análisis de los caracteres morfológicos como moleculares. Se utilizará el término “Dennstaedtiaceae sensu Smith *et al.* (2006)” para referirse a la misma.

## **2.2. Antecedentes sistemáticos de Dennstaedtiaceae**

La sistemática de la familia Dennstaedtiaceae ha sido objeto de estudio de los taxónomos desde la aparición de las primeras clasificaciones de helechos y Lico fitas. Esto se debe a la posición basal que tradicionalmente se asignó al clado en la historia evolutiva respecto a otras familias más modernas de helechos leptosporangiados. Asimismo, diversos autores destacaron la dificultad de delimitar taxonómicamente a las Dennstaedtiaceae (Mickel, 1973; Pichi Sermolli, 1973; Lovis, 1977) y la posición de esta familia en los esquemas de clasificación se ha modificado del mismo modo que los grupos subordinados.

Los primeros intentos de clasificar a los géneros incluidos actualmente en Dennstaedtiaceae sensu Smith *et al.* (2006), fueron los de Presl (1836), Hooker (1844), Kuhn (1882), Prantl (1892) y Diels (1902). No obstante, estos esquemas incluyen grupos artificiales de helechos filogenéticamente no emparentados.

Más tarde, los representantes dennstaedtioides mencionados fueron incluidos en diversas familias polimórficas basadas en caracteres vegetativos y reproductivos.

Bower (1923, 1926, 1928) describió a la familia Dicksoniaceae dentro de la cual reconoció tres subgrupos: dicksonioides, davallioides y pteridoides. En todos los casos el autor distinguió formas primitivas, entre las que incluyó a *Dennstaedtia* y *Microlepia*, formas intermedias como *Pteridium*, y avanzadas como *Paesia, Histiopteris* e *Hypolepis*. Las

principales tendencias evolutivas destacadas por el autor comprendieron cambios en la maduración de los esporangios, desplazamiento de los soros en la lámina desde una posición marginal a una abaxial, reducción de indusios bilabiados en indusios simples, fragmentación de la solenostela rizomática y aparición, en algunos representantes, de venación reticulada y escamas en el rizoma.

De forma similar, estas tendencias evolutivas fueron reconocidas por Christensen (1938) quien basó sus conclusiones en las características de los soros, indusios y el indumento del rizoma. Este autor reconoció a la familia Polypodiaceae con 15 subfamilias entre las que incluyó a Dennstaedtiaceae (con *Dennstaedtia*, *Microlepia* y *Leptolepia*) provista de caracteres primitivos, a Pteridoideae (con *Pteridium*, *Paesia*, e *Histiopteris*) como subfamilia avanzada y a Hypolepidoideae (con *Hypolepis*) como subfamilia intermedia entre las dos últimas. Más tarde, Ching (1940), dividió a las Polypodiaceae en 33 familias y fue el primer autor en reconocer a Dennstaedtiaceae e Hypolepidaceae como familias independientes. No obstante, no las publicó válidamente.

En 1947, Copeland describió a las Pteridaceae como una familia muy diversa constituida por varias líneas evolutivas descendientes de un ancestro común. Dentro de esta familia señaló a *Dennstaedtia* como un género primitivo del cual surgirían tres líneas representadas por *Microlepia*, *Histiopteris* e *Hypolepis*. Estos dos últimos géneros estarían relacionados a su vez con *Paesia* y *Pteridium*. Sus observaciones estuvieron basadas fundamentalmente en las características de coloración e indumento de pecíolos y raquis. Más tarde, Manton (1958) sugirió la separación de los géneros de Pteridaceae *sensu* Copeland en familias independientes de manera que la clasificación refleje la historia filogenética de los mismos. Si bien muchos autores reconocieron formalmente a las Dennstaedtiaceae, difirieron respecto a la circunscripción de los taxa subordinados. Holttum (1947, 1949) dividió a la familia en 11 subfamilias entre las que reconoció a Dennstaedtioidae, con *Dennstaedtia*, *Microlepia*, *Leptolepia*, *Oenotrichia*, *Hypolepis* y *Monachosorum*, y Pteridoideae con *Paesia*, *Pteridium* e *Histiopteris*. El autor identificó en estas subfamilias las mismas tendencias evolutivas en soros e indusios anteriormente descritas por Bower (1928) y Christensen (1938) y señaló a Dennstaedtioidae como un grupo con características incuestionablemente primitivas. Asimismo, destacó que la presencia de esporas con un perisporio complejo es característico de líneas evolutivas distintas y que son necesarios

estudios más detallados de la estructura y desarrollo del perisporio para identificar caracteres de importancia filogenética. Más tarde, Alston (1956) propuso elevar el rango taxonómico de las subfamilias reconocidas por Holttum (1949) y unificó bajo Dennstaedtiaceae a Dennstaedtioideae y Pteridoideae en base a la morfología de las esporas, anatomía e indumento del estípite y números cromosómicos. Esta circunscripción fue asimismo seguida por Pichi Sermolli (1958). En contraposición, utilizando también evidencia citológica, Mehra (1961) recomendó separar a los géneros *Hypolepis*, *Histiopteris*, *Paesia* y *Pteridium* bajo una familia distinta: Hypolepidaceae.

A partir de las discusiones generadas en los trabajos mencionados, los sistemas de clasificación posteriores propusieron dos modos distintos de delimitar a la familia reconociéndola como Dennstaedtiaceae en sentido amplio o como Dennstaedtiaceae en sentido estricto. Nayar (1970) y Pichi Sermolli (1970, 1977) reconocieron como válido este último, e incluyeron en las Dennstaedtiaceae *sensu stricto* a *Dennstaedtia*, *Microlepia*, *Leptolepia*, *Monachosorum*, *Oenotrichia*, caracterizados por poseer soros aislados con venas fértiles siempre libres e indusios dobles, abiertos hacia el margen, cupuliformes a bilvalvados. Asimismo, los autores reconocieron a la familia Hypolepidaceae como probablemente derivada de Dennstaedtiaceae *sensu stricto*, e integrada por *Pteridium*, *Paesia*, *Lonchitis*, *Hypolepis*, *Blotiella*, *Histiopteris*. Esta familia se diferenció por poseer venas fértiles fusionadas formando una comisura marginal y soros protegidos por un indusio superior fusionado con el margen de la lámina y uno inferior reducido o ausente, ambos abiertos hacia el centro de la pinna.

En contraposición, en otros sistemas de clasificación Dennstaedtiaceae *s.s.* e Hypolepidaceae formaron parte de una única familia Dennstaedtiaceae *sensu lato*, dividida a su vez en grupos subordinados que variaron según los autores.

En este sentido Lovis (1977) reconoció a las subfamilias Dennstaedtioideae e Hypolepidoideae e hizo hincapié en que los números cromosómicos diversos observados en la familia podrían explicarse por cambios en la ploidía, que permitirían ubicar a los géneros en una larga serie aneuploide. Asimismo, el autor incluyó dentro de las Dennstaedtiaceae *s.l.* a la subfamilia Lindsaeoideae, integrada por los géneros *Lindsaea*, *Ormoloma*, *Sphenomeris*, *Odontosoria*, *Tapeinidium* y *Xyropteris*. Anteriormente, estos taxa fueron

reconocidos por otros autores como derivados de Dennstaedtiaceae pero ubicados bajo la familia Lindsaeaceae (Ching, 1940; Nayar, 1970; Pichi Sermolli, 1977).

Por su parte Tryon & Tryon (1982) redefinieron a las subfamilias de Lovis (1977) como tribus y distinguieron a Dennstaedtieae (antes Dennstaedtioideae e Hypolepidoideae), Lindsaeae (antes Lindsaeoideae) y Monachosoreae (integrada por el género *Monachosorum*). Los autores, no obstante, reconocieron dentro de la familia distintas líneas evolutivas representadas por la diversidad en el tipo de esporas y complejidad en los números cromosómicos observados para los distintos géneros.

La diversidad morfológica entre los géneros de la familia también fue mencionada en el esquema de Kramer (1990), quien subdividió a las Dennstaedtiaceae *s.l.* en las subfamilias Saccolomatoideae, Dennstaedtioideae y Lindsaeoideae. Entre los caracteres morfológicos más variables dentro de la familia, Mickel (1973, 1974) y Smith (1995) señalaron la anatomía vascular e indumento del rizoma y pecíolo, posición de soros sobre la lámina, presencia y tipo de indusios y la forma y ornamentación de las esporas.

Recientemente, nuevos datos sobre las relaciones entre los géneros tradicionalmente reconocidos dentro de Dennstaedtiaceae fueron aportados por estudios basados en genes nucleares (18S rRNA) y de ADN del cloroplasto (*rbcL*, *atpB*, *atpA*, *rps4*). En este sentido, Dennstaedtiaceae *s.l.* (Lovis, 1977) resultó ser un grupo polifilético (Hasebe *et al.*, 1994, 1995) o parafilético (Wolf, 1994, 1995; Pryer *et al.*, 1995, 2004; Schuettpelz & Pryer, 2007) integrado por dos clados: Lindsaeaceae y Dennstaedtiaceae *s.s.* En todas las hipótesis filogenéticas resultantes, Dennstaedtiaceae *s.s.* fue identificado como un grupo monofilético, dividido a su vez en dos subclados monofiléticos de helechos Dennstaedtioides (con *Dennstaedtia*, *Leptolepia* y *Microlepia*) e Hypolepidooides (*Hypolepis*, *Paesia*, *Pteridium*, *Histiopteris*, *Blotiella* y *Monachosorum*). Asimismo, esta circunscripción es la que Smith *et al.* (2006) y Christenhusz *et al.* (2011, 2014) consideraron válida en sus esquemas de clasificación de helechos y Licofitas, los cuales se aceptan como marco sistemático en esta tesis.

### **2.3. Observaciones sobre la circunscripción sistemática de algunos géneros estudiados.**

***Pteridium* Gled. ex Scop.**

Entre los trabajos sistemáticos dedicados a la clasificación del género *Pteridium*, existen diversas opiniones respecto a la delimitación de taxa subordinados.

Tryon (1941) en su revisión del género, reconoció una única especie cosmopolita, *P. aquilinum*, e identificó dos subespecies, *P. aquilinum* subsp. *typicum* y *P. aquilinum* subsp. *caudatum*, del hemisferio norte y hemisferio sur respectivamente. Asimismo, dentro de la primer subespecie describió 8 variedades (var. *wightianum*, var. *typicum*, var. *decompositum*, var. *feei*, var. *pubescens*, var. *africanum*, var. *latiusculum* y var. *pseudocaudatum*) y dentro de la segunda cuatro (var. *caudatum*, var. *arachnoideum*, var. *esculentum* y var. *yarrabense*). El autor argumentó esta decisión en base a la ausencia de segregación específica entre los morfotipos identificados a partir de la existencia de especímenes morfológicamente intermedios entre las variedades, la “inestabilidad” de caracteres diagnósticos y la posible plasticidad fenotípica de los mismos frente a variables ambientales a lo largo del rango geográfico. Esta postura fue seguida por Cooper-Driver (1976), Van Cotthem (1970) y Taylor (1990).

Más tarde, diversos autores cuestionaron la hipótesis de *Pteridium* como género monotípico y presentaron evidencias de la presencia de más de una especie. La observación de híbridos estériles producto del cruce entre distintos taxa (Brownsey, 1989) y la identificación de caracteres genéticos y morfométricos propios de cada morfotipo (Thomson, 2000) fueron utilizados para elevar al rango de subespecie o especie algunas de las variedades anteriormente reconocidas en América Central y Sudamérica (Thomson & Alonso-Amelot, 2002), Africa sub-sahariana (Thomson *et al.*, 2005), Norteamérica y Europa (Thomson *et al.*, 2008; Thomson, 2004, 2008).

Como resultado de los tratamientos sistemáticos mencionados, se pueden reconocer tres especies diploides para el género: *P. aquilinum* con 11 subespecies segregadas entre la región Holártica y África, *P. esculentum* en Australasia y *P. arachnoideum*, en el Neotrópico. Asimismo, también se reconocen dos especies alotetraploides, *P. caudatum* del noreste de Sudamérica y *P. semihastatum* de Australasia, originadas por el cruzamiento de *P. aquilinum* y las dos especies diploides del Hemisferio Sur. Los resultados obtenidos por Der *et al.* (2009) a partir de la filogenia molecular y el análisis biogeográfico del género concuerdan a grandes rasgos con esta delimitación de las especies.



Debido al sustento morfológico, molecular y biogeográfico, en este trabajo se seguirá este último esquema de clasificación. En este sentido, de las 5 especies mencionadas, la única presente en la Provincia Paranaense es *P. arachnoideum* (Sehnem, 1972; Mickel & Smith, 2004; Prado, 2004; Assis & Salino, 2011). En un reciente artículo, Schwartsburd *et al.* (2014) determinaron dos variedades dentro de esta especie, en base a caracteres morfológicos de la fronde: *P. arachnoideum* subsp. *campestre*, del noreste de Brasil, y *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum* del este de Sudamérica. Este último taxón es el que será tenido en cuenta para el estudio.

Asimismo, en esta tesis se adoptará la sugerencia de estos últimos autores de no considerar la propuesta de Thomson (2012) que unifica a *P. esculentum* y *P. arachnoideum* como una única especie con dos variedades geográficas (*P. esculentum* var *esculentum* y *P. esculentum* var *arachnoideum* respectivamente). Esta decisión podría causar una confusión con los nombres adoptados por Tryon (1941) y una inestabilidad nomenclatural respecto a los basónimos de las especies involucradas.

### ***Dennstaedtia* Lotsy**

La delimitación taxonómica de algunas especies de *Dennstaedtia* sigue siendo en la actualidad difícil de resolver. Esto se debe, en muchos casos, a que los ejemplares de herbario se encuentran incompletos y los caracteres diagnósticos, como los referidos al rizoma, pecíolo o base de pinnas y pínulas no se conservan (Navarrete & Øllgaard, 2000). Asimismo, en algunos casos, la morfología de especímenes jóvenes puede diferir de la de los adultos, lo cual conlleva a errores en la identificación (Tryon, 1960).

En la Provincia Paranaense las especies *Dennstaedtia dissecta* y *D. obtusifolia* han sido frecuentemente relacionadas debido a su similitud morfológica y su rango de distribución superpuesto en América Central, Colombia, sur de Bolivia y sudeste de Brasil. Mientras que algunos autores identificaron a *Dennstaedtia obtusifolia* como sinónimo de *Dennstaedtia dissecta* (Stolze, 1981; Tryon & Stolze, 1989; Moran, 1995), otros la reconocieron como una especie diferente (Tryon, 1960, 1964; Sehnem, 1972; Tryon & Tryon, 1982; Kieling-Rubio & Windisch, 2002), basándose únicamente en diferencias de tamaño y forma de los soros. No obstante, todos coincidieron en que ambas especies podrían ser variantes de un mismo taxón y que son necesarios estudios más exhaustivos

para resolver el problema. Por su parte, en su trabajo sobre el género *Dennstaedtia* en Ecuador, Navarrete & Øllgaard (2000) señalaron otros elementos que distinguirían ambas especies, tales como la presencia o ausencia de pelos en la base del pecíolo, la textura de la lámina o el margen de los últimos segmentos de las pínulas.

De manera similar la especie *Dennstaedtia cornuta* ha sido reconocida por diversos autores como sinónimo de *D. dissecta* (Tryon, 1960, 1964; Sehnem, 1972; Stoltze, 1981; Kielling-Rubio & Windisch, 2002). Por su parte, Navarrete & Øllgaard (2000), la identificaron como una especie diferente a partir de las características del rizoma, pecíolo y soros. Adicionalmente, estos autores señalaron que lo que Tryon (1960) considera como *D. dissecta*, es en realidad *D. cornuta*. No obstante, esta última observación no estuvo basada en el estudio del material tipo de dicha especie debido a que el mismo está destruido, por lo que en este trabajo se decidió no considerarla.

El único registro de *D. cornuta* en la Provincia Paranaense fue publicado por Assis y Salino (2011) quienes describieron a la especie para Minas Gerais, utilizando los caracteres señalados por Navarrete & Øllgaard (2000).

En este trabajo, *D. dissecta*, *D. obtusifolia* y *D. cornuta* se consideraran como entidades independientes. No obstante, como parte de los objetivos del mismo, se intentará determinar si las características de las esporas aportan información de utilidad para contribuir a la correcta circunscripción de las especies mencionadas.

### ***Hypolepis* Bernh**

*Hypolepis* es un género sub-cosmopolita con dos principales centros de distribución: el primero hacia el sudeste de Asia y Australasia, con algunas especies extendidas en África, Korea, este del Pacífico y Nueva Zelanda, y el segundo en el Neotrópico, desde el sur de Estados Unidos, México y el Caribe, hasta el Centro y Sur de América (Brownsey & Chinnock, 1984).

A partir de su primera descripción (Bernhardi, 1806), la delimitación de *Hypolepis* fue cambiando según la opinión de los diversos autores (Presl, 1836; Smith, 1846; Kuhn 1868; Christensen & Scottsberg, 1920; Christensen, 1925). Debido a distintas interpretaciones sobre la morfología y protección de los soros marginales característicos del género, especies actuales de *Adiantopsis*, *Cheilanthes* y *Dennstaedtia* fueron anteriormente incluidas en el mismo y, asimismo, especies de *Hypolepis* fueron ubicadas en *Dryopteris* y

*Phegopteris* (Schwartzburd, 2012). Adicionalmente, el género fue asociado a diversas familias de helechos como Polypodiaceae (Christensen, 1938), Pteridaceae (Copeland, 1947), Hypolepidaceae (Ching, 1940; Pichi-Sermolli, 1977), y finalmente Dennstaedtiaceae (Tryon & Tryon, 1982; Kramer, 1990).

En un estudio más moderno sobre casos de poliploidía y aneuploidía en *Hypolepis*, Brownsey (1983), señaló que existen numerosas dificultades para establecer los límites de las especies del género: la presencia de taxones polimórficos ampliamente distribuidos, la existencia de distintos niveles de ploidías y la considerable capacidad de hibridación de las especies. Asimismo, el autor indicó que la delimitación se ve agravada por la pobre preservación de numerosas características taxonómicas diagnósticas en los especímenes de herbario.

La incertidumbre sobre la identidad y el número total de especies incluidas en *Hypolepis* así como la necesidad de una revisión completa del género fue manifestada por diversos autores en trabajos florísticos (Tryon & Tryon, 1982; Proctor, 1985; Tryon & Stolze, 1989; Moran, 1995; Mickel & Smith, 2004). En este sentido, Brownsey & Chinnock (1984) llevaron a cabo la revisión taxonómica de *Hypolepis* para Nueva Zelanda y, mediante la descripción y análisis de caracteres morfológicos diagnósticos, reconocieron 13 especies para el área, de las cuales 6 resultaron ser híbridos. Posteriormente, Brownsey (1987) continuó sus estudios sobre el género en Malasia y regiones del Pacífico y reconoció 14 especies.

Los primeros intentos de ordenar la información fragmentada y dispersa de *Hypolepis* para el Neotrópico fueron llevados a cabo en revisiones sobre floras locales para Argentina (Arana, 2004), Brasil (Schwartzburd, 2010, 2012a, 2012b) y la región de Roraima (Schwartzburd *et al.*, 2012) y en revisiones taxonómicas para especies como *Hypolepis nigrescens* (Schwartzburd & Prado, 2009) e *Hypolepis rugosula* (Schwartzburd & Prado, 2011, 2014).

Recientemente, Schwartzburd (2012) llevó a cabo la revisión de *Hypolepis* para América del Sur (incluyendo Costa Rica) y reconoció 27 especies y 31 taxones (considerando subespecies y variedades). Entre las mismas, presentó 11 novedades nomenclaturales incluyendo a *H. x paulistana* Schwartzb. & Prado, *H. rugosula* subsp. *pradoana* Schwartzb. y *H. stolonifera* var. *nebularis* Schwartzb de la Provincia Paranaense, y re-circunscribió

numerosos taxones como *Hypolepis repens* (L.) Presl y *Hypolepis stolonifera* var. *stolonifera* también presentes en la región. Debido a que este último trabajo representa la revisión más completa realizada hasta el momento en el género, en esta tesis se tomará como referencia para la identificación de las especies de *Hypolepis* presentes en el área de estudio.

Asimismo, a partir de información proporcionada por el autor de la revisión, y debido a la imposibilidad de conseguir material para el estudio palinológico, se decidió excluir del análisis a la especie *Hypolepis rigescens* (Kunze ex E. Mart) T. Moore. Según la bibliografía consultada (Schwartzburd *et al.*, 2012) esta especie se distribuye en las zonas de gran altitud en Bolivia, Ecuador, Colombia, Costa Rica, Venezuela, Guyana y Surinam y presenta poblaciones disyuntas en el noreste de Brasil entre los 500-2500 msn. No obstante, según Pedro Bond Schwartzburd (com. pers.) estas últimas poblaciones muy probablemente se encuentren extintas, y por lo tanto, la especie ya no se distribuya en la Provincia Paranaense. Luego de una exhaustiva y fallida búsqueda de ejemplares en las bases de datos de herbarios nacionales e internacionales, y de sucesivos pedidos a los curadores, no fue posible hallar material de herbario fértil para esta tesis.

### ***Blotiella* R. M. Tryon**

*Blotiella* es un género reconocido por su rizoma provisto de pelos, grandes frondes 1-2 pinnado-pinnatífidas densamente pubescentes, nervaduras areoladas sin venillas inclusas y soros marginales, protegidos por indusios simples, que nacen generalmente en la base de un seno. No obstante, las especies reconocidas actualmente para *Blotiella* fueron tradicionalmente incluidas por diversos autores en *Lonchitis* (Hooker & Baker, 1867; Smith, 1875) debido a su similitud respecto a los rizomas provistos de pelos, soros marginales, indusios simples y pecíolos con dos haces vasculares. Asimismo, *Lonchitis* (y las especies actuales de *Blotiella*) también fueron incluidos en otros esquemas de clasificación dentro de *Pteris* (Kuhn, 1868; Christensen, 1905; Copeland, 1947) por sus semejanzas en relación a la posición de los soros y por erróneas interpretaciones respecto al indumento de los rizomas.

Posteriormente, Tryon (1962) revisó el género *Lonchitis* y señaló que pueden reconocerse dos grupos de especies distintos diferenciados por las características de la venación. En este

sentido, identificó a las especies de venación libre como pertenecientes a *Lonchitis* y a las especies de venación areolada, sin venillas inclusas, como pertenecientes a un género nuevo que describió por primera vez como *Blotiella*. Según el autor las similitudes que, hasta el momento, reunían a ambos grupos de especies se deben a convergencias evolutivas de dos líneas ancestrales distintas.

Respecto a la relación con *Pteris*, el autor señaló que tanto *Lonchitis* como *Blotiella* se diferencian de este género a partir de sus números cromosómicos (*Pteris* = 29, *Lonchitis* = 50 y *Blotiella* = 38), y por la presencia de pelos en el rizoma en lugar de escamas. No obstante, sugirió que existe una relación entre *Lonchitis* y *Pteris* sustentada en características de las esporas, soros y pínulas. Del mismo modo, relacionó a *Blotiella* con el género *Hypolepis* por sus similitudes respecto a las esporas monoletes, reniformes, y a la morfología del indusio, que se observa como una continuación del tejido marginal de la lámina.

Debido a lo expuesto anteriormente, en esta tesis se seguirá la propuesta de Tryon (1962) y se considerará su descripción de *Blotiella lindeniana* (Hook.) R. M. Tryon como modelo para identificar a los ejemplares hallados en el área de estudio.

#### **2.4. Antecedentes palinológicos de Dennstaedtiaceae**

Las esporas de las Dennstaedtiaceae han sido descritas en diversas revisiones florísticas, atlas y monografías palinológicas junto con otros grupos de Helechos y Licofitas. No obstante, los trabajos dedicados particularmente a la palinología de la familia son escasos y la información disponible de los géneros y especies se encuentra dispersa.

Entre las primeras observaciones con microscopía óptica (MO), Knox (1938) realizó un análisis de las esporas de las Pteridofitas de Bower (1926, 1928) con el fin de compararlas con aquellas halladas en carbones del Carbonífero. El autor describió a las esporas de *Dennstaedtia* y *Microlepia* como triletes, psiladas, granuladas, lomadas o tuberculadas y a las de *Hypolepis* como monoletes, provistas de espínulas o proyecciones redondeadas. En su trabajo con MO de las esporas de las Pteridofitas de Hawaii, Selling (1946) coincidió con esta última descripción de *Hypolepis* y observó que las espinas estaban formadas por un perisporio que se corroe con la acetólisis. En *Microlepia*, identificó esporas con lesuras

bordeadas de lomos prominentes, exosporio liso y marrón y, particularmente en *M. speluncae*, perisporio espinuloso. Asimismo, el autor identificó en *Pteridium* esporas monoletes, con perisporio granuloso que se desprende fácilmente. En contraposición, Harris (1955) ubicó a *Pteridium aquilinum* en el grupo de especies sin perisporio junto con *Histiopteris incisa*, esta última monolete. En el primer caso identificó un exosporio escabrado o subgranulado y en el segundo un exosporio provisto de verrugas o rúgulas coalescentes. Por otro lado, describió ejemplos de especies monolete con perisporio escabrado o estriado como *Paesia* o cavado, escabrado, papilado, con proyecciones esbeltas y curvadas como *Hypolepis*. En este último caso el autor identificó además lomos o crestas a los lados de la lesura.

En 1957, Erdtman publicó un manual sobre la morfología del polen y esporas de diversos grupos, en donde esquematizó la ornamentación y estratificación de la pared de *Dennstaedtia* como finamente rugosa, *Histiopteris* como tuberculada, *Hypolepis* como provista de báculas o espinas de ápice redondeado, *Microlepis* como lisa y *Pteridium* como granulosa o provista de pequeñas espinas. No obstante, el autor no acompañó dichos esquemas con una descripción.

Tardieu-Blot (1963) realizó un estudio palinológico aplicado a la sistemática de las Pteridofitas de Madagascar, donde describió las esporas de *Dennstaedtia* y *Microlepis* como triletes, con una ornamentación escabrada la primera y finamente verrucosa la segunda, y a *Hypolepis* como monolete, sin ornamentación o con una ornamentación provista de espinas. Adicionalmente, el autor destacó la gran diversidad palinológica de la familia.

Entre los primeros trabajos que compilaron información sobre la palinología de las principales familias de Pteridofitas se encuentra el de Nayar (1964). El autor hizo hincapié en el valor diagnóstico del perisporio por sobre el del exosporio y dividió a las Dennstaedtiaceae (descriptas como Pteridaceae) según produzcan esporas monoletes o triletes. En el primer grupo incluyó a *Paesia* con perisporio finamente ornamentado que se desprende fácilmente, *Hypolepis* con perisporio fuertemente adherido al exosporio, espinoso o rugulado, e *Histiopteris* y *Blotiella* sin perisporio, con exosporio tuberculado y granuloso respectivamente. Entre los representantes triletes reconoció a *Microlepis* con exosporio liso o granuloso y a *Dennstaedtia* con exosporio verrucoso o tuberculado.

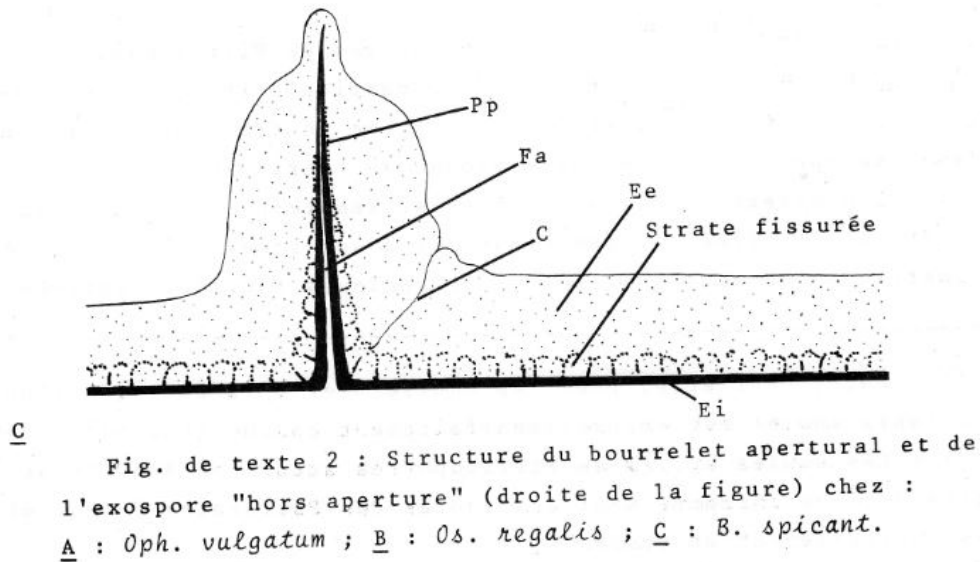
Siguiendo el mismo esquema de clasificación, Tschudy & Tschudy (1965) llevó a cabo en Venezuela una de las primeras floras palinológicas locales de Sudamérica. El autor también identificó espinas y báculos en la ornamentación de las esporas de *Hypolepis* (*H. nuda*). Asimismo, observó en *Dennstaedtia cicutaria* (bajo *D. rubiginosa*) una superficie toscamente gemada, con espinas superficiales. Esta última escultura fue señalada como única entre las especies estudiadas.

Welman (1970) realizó un análisis de las esporas de los helechos de Sudáfrica y, en relación con la ornamentación de las Dennstaedtiaceae, coincidió con muchas de las observaciones que hasta ese momento se habían realizado en trabajos previos. No obstante, difirió respecto a la presencia de perisporio en cada grupo. El autor identificó en *Hypolepis* y *Blotiella* un perisporio equinado, en *Pteridium* de tipo granuloso o rugulado y en *Microlepia* e *Histiopteris*, ausente. El exosporio en estos últimos taxa fue granuloso y verrucoso-rugulado respectivamente. Estas descripciones fueron confirmadas por Erdtman & Sorsa (1971), excepto en el caso de *Microlepia* donde los autores sugirieron la presencia de un perisporio fosulado o foveolado, en algunas especies.

Como un primer intento de dar significado filogenético a la morfología de las esporas y entender mejor las relaciones entre géneros, Nayar & Devi (1968a, 1968b) estudiaron al MO a las Pteridaceae sensu Copeland (1947). En primer lugar, discutieron la posible cercanía entre *Dennstaedtia* y *Microlepia* y concluyeron que la ornamentación del exosporio distingue a ambos géneros, siendo verrucoso en el primer caso y granuloso en el segundo. En segundo lugar, los autores sugirieron que, a pesar de la diversidad de ornamentaciones existentes en el exosporio, puede establecerse una relación entre *Hypolepis* y el resto de los géneros “pteridoides”, *Paesia*, *Histiopteris*, *Blotiella* y *Pteridium*, a partir de las esporas monoletes presentes en todos los casos. Finalmente, concordaron Copeland (1947) en que los helechos “pteridoides” se habrían originado a partir de un ancestro similar a *Dennstaedtia* y evolucionado a través del género *Leptolepia*. Este último taxón tiene esporas de exosporio verrucoso, tanto triletes como monoletes, que recuerdan a *Dennstaedtia* e *Hypolepis* respectivamente.

Debido al importante grado de variación de la forma y ornamentación de las esporas observado por los distintos autores hasta ese momento, Mickel (1973) señaló la necesidad de llevar a cabo cuidadosos estudios comparativos de las esporas de Dennstaedtiaceae

utilizando microscopía electrónica. Asimismo, mencionó que las características palinológicas podrían ser útiles para diferenciar a los géneros dentro de la familia. Las primeras observaciones con microscopía de barrido (MEB) y transmisión (MET) fueron realizadas por Lugardon (1971, 1974) en *Pteridium aquilinum* y *Dennstaedtia bipinnata*. En ambos casos el exosporio fue definido como “blechnoide” (Fig. 1). Según lo descrito por el autor, este tipo de exosporio se caracteriza por poseer una capa interna, continua, más gruesa en la base de la lesura y de estructura compacta, y una capa externa formada por dos estratos. El estrato interno, denominado “estrato fisurado”, presenta numerosas y pequeñas fisuras y finos canalículos llenos de material fibrilo-granular que constituyen una red de cavidades. Adicionalmente, canales originados en este estrato tienen continuidad en el estrato externo.



**Figura 1:** Exosporio Blechnoide. Lugardon 1971, p. 197. Ei = Exosporio interno. Ee = Exosporio externo. C = Canal. Fa = Ranura apertural. Pp = Pliegue proximal.

En relación al perisporio, el autor describió al de *D. bipinnata* como continuo, de estructura granular y adherido al exosporio, con mamelones hemisféricos irregularmente distribuidos sobre la superficie, que constituyen la ornamentación. En *P. aquilinum* observó que la superficie del perisporio está formada por expansiones verticales similares a báculos o clavav. Respecto este último taxón, Moe (1974) advirtió que la parte más externa de la



pared se desprende o desgasta fácilmente y, por lo tanto, las esporas pueden observarse psiladas en el registro fósil.

Murillo & Bless (1974) describieron brevemente las especies de pteridofitas con esporas trilete de Colombia. Los autores observaron sobre las esporas de *Dennstaedtia cicutaria*, *D. dissecta* y *D. globulifera* verrugas cubriendo la superficie que se fusionan para formar tubérculos y definieron que la ornamentación está formada por el exosporio. A una conclusión similar llegó Devi (1977), pero detectó sobre el exosporio de *D. globulifera* una fina capa que cubre la ornamentación y que se desprende durante la acetólisis. El autor identificó, asimismo, la ausencia de perisporio y presencia de exosporio granuloso en *Microlepia* y espinuloso en *Blotiella*.

Más tarde Murillo & Bless (1978) continuaron su estudio palinológico sobre las pteridofitas colombianas y analizaron los representantes con esporas monolete, entre los que incluyeron taxones de Dennstaedtiaceae. Los autores identificaron en *Blotiella lindeniana* perisporio baculado y exosporio liso, en *Histiopteris incisa* exosporio verrucoso y en diversas especies de *Hypolepis* exosporio baculado o equinado. Tanto en *Histiopteris* como en *Hypolepis* no identificaron la presencia de perisporio.

Soepadmo & Khoo (1977) realizaron el intento de sustentar un esquema sistemático con datos palinológicos. Estos autores discutieron las clasificaciones propuestas por Holttum (1954), Copeland (1947) y Pichi Sermolli (1958) a través del estudio de las especies de Dennstaedtiaceae de Malasia. Debido a la gran diversidad de morfologías existentes en las esporas, separaron a los diferentes géneros en 7 tipos morfológicos según el número de lesuras, presencia o ausencia de perisporio, tamaño y ornamentación de las mismas. Como resultado, los autores concluyeron que la gran diversidad palinológica observada en la familia no permite sustentar las subfamilias o grupos subordinados propuestos en los esquemas mencionados. No obstante, sugirieron que son necesarios más estudios palinológicos, sobre todo de taxa tropicales y que, para la construcción de un sistema de clasificación natural, los caracteres de las esporas deben ser considerados en conjunto con otros atributos.

Más tarde, Devi (1979) también discutió el esquema sistemático de Copeland (1947) y sugirió una posible tendencia evolutiva en relación al número de lesuras y la estratificación de la esporodermis. Los autores indicaron como un estado primitivo la presencia de esporas

triletes sin perisporio (perisporio no visible al MO) en *Dennstaedtia*, *Microlepia* y *Pteridium*, seguido de esporas triletes con perisporio, monoletes sin perisporio en *Histiopteris* e *Hypolepis* y, finalmente, monoletes con perisporio como el estado más derivado. También señalaron que en géneros donde el perisporio está presente, la capa más externa de la pared tiende a romperse y ocasionalmente despegarse. En relación a esta última observación, Morbelli (1980) observó en *Hypolepis rugosula* un perisporio compuesto por una capa delgada, apenas separada de la exina, donde se observan en superficie procesos baculiformes irregulares, frecuentemente unidos en su ápice. Asimismo, Mutui (1981) estudió, en *Hypolepis punctata*, la formación de los procesos del perisporio sobre el exosporio a partir de la depositación de sustancias secretadas por las células del tapete. En este trabajo, el autor hizo hincapié en la importancia que los estudios ontogenéticos al MEB tienen para identificar la presencia o ausencia del perisporio.

Las Dennstaedtiaceae también fueron estudiadas en la flora palinológica de Taiwan (Huang 1981). Los autores estudiaron especies de esporas triletes como *Dennstaedtia* con un exosporio liso y un perisporio granuloso, verrucoso o tuberculoso, *Pteridium* donde se observó un perisporio granuloso con procesos escabridos, y *Microlepia* con un perisporio variable, finamente estriado, reticulado, granuloso, psilado o con verrugas redondeadas. Los autores también estudiaron las esporas monoletes de *Histiopteris*, con un perisporio ornamentado por tubérculos coalescentes, e *Hypolepis* con un perisporio ornamentado por acículas, espinas o báculos.

En América Tropical, Tryon & Tryon (1982) llevaron a cabo el estudio de los helechos y grupos emparentados haciendo hincapié en las características de las esporas observadas con MEB y correlacionándolas con la distribución geográfica. En *Dennstaedtia* los autores identificaron un patrón verrucoso a tuberculoso en las especies del Nuevo Mundo, reticulado en las especies paleotropicales y superficialmente tuberculoso con lomos en el ecuador en las especies de ambientes templados. En *Pteridium* observaron un perisporio de superficie uniformemente granulada formada por partículas fusionadas en masas o cortas barras y, por debajo, un exosporio grueso. En *Microlepia* el perisporio resultó estar diferenciado en un estrato externo equinado, uno medio granuloso, y uno interno compuesto por una malla de cordones. Con respecto a las especies de esporas monoletes, los autores identificaron en *Paesia* un perisporio externo rugoso sobre un exosporio

papilado, en *Hypolepis* y *Blotiella* una superficie equinada, con cordones que conectan los elementos de la ornamentación y en *Histiopteris* una superficie tuberculada a rugosa, al parecer formada por la capa más interna del perisporio. Finalmente, los autores relacionaron la variabilidad observada en el tamaño de las esporas con posibles diferencias en los niveles de ploidía.

Respecto al tamaño de las esporas, Tryon (1986) señaló que, en las familias de helechos primitivos, puede estar correlacionado con el número de esporas por esporangio mientras que, dentro de un mismo género, grandes diferencias de tamaño pueden indicar poliploidía. En relación al perisporio, sugirieron que los tipos de superficie usualmente caracterizan géneros o subgéneros, mientras que no son aplicables a nivel de familias o tribus. En un sentido evolutivo, identificaron cinco niveles de complejidad respecto al desarrollo de la pared y ubicaron a los géneros de Dennstaedtiaceae en el nivel caracterizado por un perisporio moderadamente desarrollado que forma el contorno de la superficie y frecuentemente oculta al exosporio. Más tarde, Tryon (1990) desarrolló esta última idea y describió para la familia una pared de estructura especializada, diversa en cuanto a la ornamentación, con un perisporio de varios estratos, más grueso que el exosporio. Para cada género, identificó un patrón morfológico distinto: granulado en *Pteridium*, conformado por cordones de núcleo claro en *Microlepia*, equinulado o reticulado en *Hypolepis* y *Blotiella*. La esporas monoletes presentes en los primeros dos taxa fueron señaladas como primitivas debido a que aparecen tempranamente en el registro fósil. En 1991, Large & Braggins elaboraron un atlas detallado de las esporas de los helechos de Nueva Zelanda. A partir de observaciones con MEB y MET, ampliaron la descripción de algunos géneros de Dennstaedtiaceae anteriormente estudiados por otros autores. En *Hypolepis* describieron esporas con un perisporio que varió entre escabrado, baculado o equinado, y cuyos elementos están fusionados formando crestas o cordones los cuales constituyen un retículo. En *Paesia*, observaron un perisporio rugulado frecuentemente fracturado en la zona de la lesura, y un exosporio escabrado o papilado. Finalmente, en *Histiopteris* señalaron la presencia de un exosporio constituido por tubérculos generalmente fusionados entre sí, de márgenes microtuberculados o papilados. El perisporio en este último género fue descrito por los autores como una delgada capa superficial papilada que acompaña la ornamentación del exosporio.

Los resultados obtenidos por Tryon & Lugardon (1991) coincidieron con las descripciones elaboradas en este último trabajo. Adicionalmente, los autores analizaron con MEB y MET a *Dennstaedtia* donde describieron un perisporio verrucoso-tuberculado, a veces con cortos cordones, y un exosporio plano o escabrado. Asimismo, en *Microlepia* observaron un perisporio con dos capas, la interna irregular y la externa constituida por cordones, sobre un exosporio plano, y en *Pteridium* un perisporio irregularmente granulado sobre un exosporio de margen ondulado. Finalmente, observaron en *Blotiella* una superficie muy similar a la de *Hypolepis*, pero no estudiaron la ultraestructura de la pared.

Discutiendo los resultados de este último trabajo, Wolf *et al.* (1994) superpuso la morfología de las esporas con la filogenia molecular que obtuvo de la familia y grupos cercanos. El autor concluyó que el estado más primitivo es el tetraédrico globoso, presente en algunas Dennstaedtiaceae *s.s.* y que las esporas monoleté habrían evolucionado dos veces de manera independiente, una de ellas en el clado hermano de *Pteridium*, integrado por *Hypoepis*, *Histiopteris*, *Blotiella* y *Paesia*. Asimismo, Wolf (1995) señalaron que los patrones observados en la filogenia molecular sugieren que las esporas, en conjunto con otros caracteres morfológicos, puede ser una herramienta útil a nivel de familia. Por esto último, concluyó que son necesarios trabajos que estudien la morfología, desarrollo y ultraestructura de las Dennstaedtiaceae para proveer adicionales datos filogenéticos y contribuir al entendimiento de la historia evolutiva de la familia.

Entre los estudios palinológicos más recientes donde se estudiaron especies de Dennstaedtiaceae se destaca, para el Sureste asiático, el de Faridah-Hanum *et al.* (2008) en la península de Malasia. Los autores analizaron al MO y MEB las esporas de *Histiopteris incisa* e *H. stipulacea* y describieron un exosporio verrucoso-ruguloso y foveolado respectivamente. Asimismo, concluyeron que las características de las esporas podrían resultar de utilidad para diferenciar al género con otros géneros de Dennstaedtiaceae. En Sudamérica, las descripciones palinológicas de especies de Dennstaedtiaceae realizadas recientemente pertenecen a trabajos locales. Arreguin-Sanchez *et al.* (1996) llevaron a cabo un análisis morfológico de las esporas de las Pteridofitas del estado de Querétaro, México, donde se describió a *D. globulifera* con esporas estriadas, a *D. distenta* con esporas reticuladas y a *D. cicutaria* y *D. bipinnata* con esporas papiladas, Verrucosas o tuberculadas.

Más tarde, Contreras-Duarte & Bogotá-Ángel (2004) en el Municipio de Chipaqué, Colombia, estudiaron al MO las esporas de *Histiopteris incisa* y las describieron como desprovistas de perisporio, con exosporio de ornamentación variable, predominantemente papiloso. Asimismo, los autores estudiaron tres especies de la familia con perisporio: *Hypolepis stuebelii*, *H. viscosa* y *Pteridium aquilinum*. En *Hypolepis* describieron un perisporio psilado y un exosporio equinulado y en *P. aquilinum* un perisporio escabrado y un exosporio psilado.

Entre los estudios más actuales con microscopía electrónica de transmisión realizados en la familia se encuentra el de Giudice *et al.* (2006), quienes estudiaron a las Dennstaedtiaceae del Noroeste argentino. Los autores observaron en todos los casos un exosporio con dos capas, liso en *D. cicutaria*, *D. glauca* y *Dennstaedtia globulifera*, irregular en *Pteridium aquilinum* y dentado-papilado en *Hypolepis repens*. En relación al perisporio, describieron una única capa ornamentada por procesos radialmente elongados en *P. aquilinum* y una capa con tres estratos que constituyeron procesos de forma variada en *H. repens*. En las tres especies de *Dennstaedtia* estudiadas los autores observaron verrugas, lomos y retículos conformados por el perisporio de una capa en *D. glauca* y *globulifera*, y de dos en *D. cicutaria*.

Respecto a la Provincia Fitogeográfica Paranaense, los únicos estudios palinológicos que mencionan especies de Dennstaedtiaceae son los de Lorscheitter *et al.* (2002) en Rio Grande do Sul y Esteves & Coelho (2007) en São Paulo.

Desde el punto de vista experimental, la germinación de las esporas y la morfología y desarrollo de la fase gametofítica han sido estudiados por diversos autores en representantes de Dennstaedtiaceae. En este sentido, entre los trabajos más recientes se encuentran los de Lindsay *et al.* (1995) y Aschcroft & Sheffield (2000) en *Pteridium aquilinum*, Zhang *et al.* (2008) en *Microlepia strigosa* y *M. platyphylla*, Ramirez-Trejo *et al.* (2010, 2012) en *Pteridium caudatum*, Martínez *et al.* (2014) y Juárez-Orozco *et al.* (2013) en *Dennstaedtia globulifera* e *Hypolepis poeppigii* y Willyams & Daws (2014) en *Pteridium esculentum*. En el caso particular de *Pteridium aquilinum*, diversos autores han comprobado los efectos de ruptura que extractos de esporas causan sobre las cadenas de ADN de células animales y humanas, provocando enfermedades tumorales (Villalobos-Salazar *et al.*, 1995; Povey *et al.*, 1996; Simán *et al.*, 1999, 2000).

## 2.5. Antecedentes de Dennstaedtiaceae en estudios florísticos de América

Los representantes americanos de la familia Dennstaedtiaceae fueron analizados en trabajos regionales (Tryon & Tryon, 1982; Kramer, 1990; Moran, 1995; Zuloaga *et al.*, 2008) así como también en floras y estudios locales de México (Mickel & Smith, 2004), Antillas menores (Proctor, 1977), Guatemala (Stoltze, 1981 como Polypodiaceae), Ecuador (Navarrete & Øllgaard, 2000), Venezuela (Vareschi, 1968), Perú (Tryon, 1964 como Polypodiaceae, Tryon & Stolze, 1989), Bolivia (Nee, 2010), Chile (Looser, 1971; Marticorena & Rodríguez, 1995), Uruguay (Legrand & Lombardo, 1958) y Brasil (Prado & Sylvestre, 2010; Schwartsburd, 2010).

Asimismo, diversos autores estudiaron aspectos morfológicos (Campbell, 1937; Nayar & Kaur, 1963; Nayar *et al.*, 1967; Kaur, 1972; Nayar & Molly, 1980; Gruber, 1981; Schwartsburd & Prado, 2014), ecológicos (Alonso-Amelot & Rodulfo-Baechler 1996, Hill & Silander 2001, Quitete Portela *et al.* 2009, Roos *et al.* 2010), citológicos (Brownlie, 1957; Mehra & Khanna, 1959; Mehra, 1961; Brownsey 1983) y químicos (Oliveros-Bastidas & Alonso-Amelot, 2010) de las especies presentes en el Nuevo Mundo, algunas de ellas estudiadas en el presente trabajo.

Particularmente para la Provincia Fitogeográfica Paranaense, las Dennstaedtiaceae fueron mencionadas en listados florísticos llevados a cabo en los estados brasileños de Paraná (Sakagami, 2006; Schwartsburd & Labiak, 2007; De Souza Pereira, 2009; Michelon, 2012; Kaehler *et al.*, 2014), São Paulo (Siqueira & Windisch, 1999; Prado, 2004; Nóbrega & Prado, 2008; Salino & Almeida, 2008; Prado & Hirai, 2011), Santa Catarina (Sehnem 1972 como Pteridaceae, Gasper de 2012), Minas Gerais (Costa Assis & Salino 2011) y Rio Grande do Sul (Kieling-Rubio 2002). Especies pertenecientes a la familia también fueron citadas para diversas regiones de Paraguay (Peña-Chocarro *et al.* 1999, Basualdo *et al.* 2005, Soria *et al.* 2006) y, en nuestro país para la provincia de Misiones (Tressens *et al.* 2008, Marquez *et al.* 2006).

Asimismo, recientemente, se han descrito nuevas especies (Rojas-Alvarado & Tejero Díez, 2002; Shwartsburd, 2012b) para el área de estudio.

## 2.6. Objetivos e Hipótesis de trabajo

### 2.6.1. Objetivo principal

Ampliar el conocimiento palinológico de los taxa incluidos en la familia Dennstaedtiaceae para la Provincia Fitogeográfica Paranaense.

### 2.6.2. Objetivos particulares primarios

- Realizar el análisis de la morfología general de las esporas, con y sin tratamiento químico al Microscopio Óptico (MO), de la superficie y fracturas con Microscopio electrónico de Barrido (MEB) y de la ultraestructura de sus paredes con Microscopio electrónico de Transmisión (MET).
- Reconocer grupos morfológicos definidos por la ornamentación, estructura y/o ultraestructura dentro de la familia Dennstaedtiaceae.
- Reconocer si existen características en la morfología y/o estructura de las esporas propias de Dennstaedtiaceae.
- Reconocer si existen características en la morfología y/o estructura de las esporas que distinguen a los géneros de Dennstaedtiaceae.
- Comparar la diversidad morfológica del esporofito con las características morfológicas de las esporas.
- Evaluar la uniformidad o variabilidad de las características de las esporas en función de los rangos de distribución geográfica de las especies o géneros.

### 2.6.3. Objetivos particulares secundarios

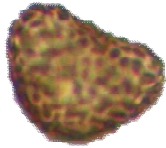
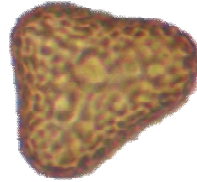
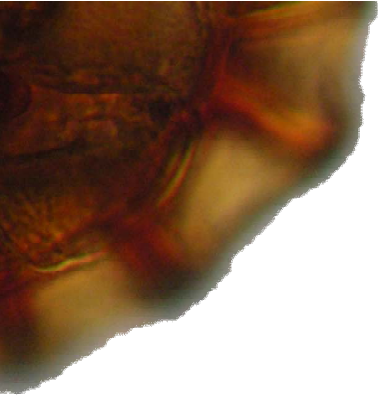
- Aportar información palinológica que permita la correcta circunscripción de los géneros incluidos dentro de Dennstaedtiaceae y que puedan contribuir la resolución de las relaciones filogenéticas dentro del grupo.

- Aportar la información obtenida en este estudio al campo Paleontológico con el objeto de que los mismos contribuyan a facilitar asignaciones botánicas más precisas que permitan reconstruir las condiciones paleoambientales.

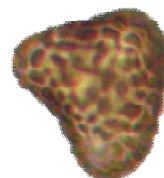
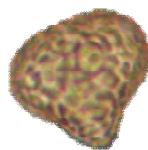
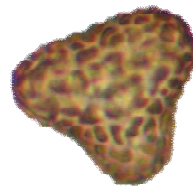
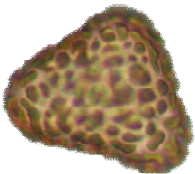
#### 2.6.4. Hipótesis

Las características de las esporas de los géneros incluidos dentro de las Dennstaedtiaceae para la Provincia Fitogeográfica Paranaense reflejan la diversidad morfológica del esporofito dentro del grupo.





### **3. Materiales y Métodos**



### 3.1. Área de estudio

La Provincia fitogeográfica Paranaense, delimitada por Cabrera & Willink (1973), está incluida en el Dominio Amazónico y abarca el extremo sur de Brasil, desde los faldeos occidentales de la Serra do Mar hasta el centro de Río Grande do Sul, el extremo nordeste de la Argentina y el este de Paraguay (Fig. 2). Junto con la Provincia Atlántica, también definida por dichos autores, forma parte de lo que en la actualidad se conoce como Bosque Atlántico. Desde el punto de vista de la biodiversidad, el Bosque Atlántico es identificado por la WWF (World Wildlife Fund for Nature) como una de las 200 ecorregiones globales prioritarias para ser conservadas (Olson & Dinerstein, 2002). Dicha ecorregión está caracterizada por bosques tropicales y subtropicales continuos que comparten una historia biogeográfica en común y forman un importante corredor biológico (Di Bitetti *et al.*, 2003). Asimismo, es considerada un “hotspot” por su elevado número de especies (Myers *et al.*, 2000) y un área con hipotéticos centros de endemismos (Prance, 1987; Thomas *et al.*, 1998). Particularmente para Helechos y Licofitas, el Bosque Atlántico representa una de las más importantes áreas de evolución y especiación (Prado & Hirai, 2014).

En un esquema de clasificación biogeográfico más moderno, Morrone (2001, 2014) dividió a la Provincia Paranaense sensu Cabrera & Willink (1973), en Provincia de los Bosques Paranaenses y Provincia de los Bosques de *Araucaria angustifolia*. Asimismo, incluyó a estas últimas dentro de la Región Neotropical. Los Bosques Paranaenses se caracterizan por las comunidades de palmito (*Euterpe edulis*) y palo rosa (*Aspidosperma polyneuron*), comunidades de bambú (cuatro especies de cañas de bambú) y la comunidad del laurel (diversas especies del género *Nectandra* y *Ocotea*). Por otro lado, los Bosques de *Araucaria angustifolia* se caracterizan, además del taxón dominante, por la presencia de representantes del género *Podocarpus* y *Leptasthenura setaria*. Ambas provincias, no obstante, comparten muchas especies y están muy relacionadas biogeográficamente (Di Bitetti *et al.*, 2003).

Finalmente, cabe destacar que la biodiversidad del área de estudio se encuentra actualmente amenazada por las profundas transformaciones que la expansión de la actividad agrícola, la explotación no sustentable de bosque nativo y la actividad ilegal de cazadores y recolectores furtivos (Placi & Di Bitetti, 2005). Es por ello que todos los estudios

realizados sobre las especies nativas que habitan en la región cobran una mayor relevancia debido a que pueden contribuir a aumentar el conocimiento de las mismas, y posteriormente protegerlas.

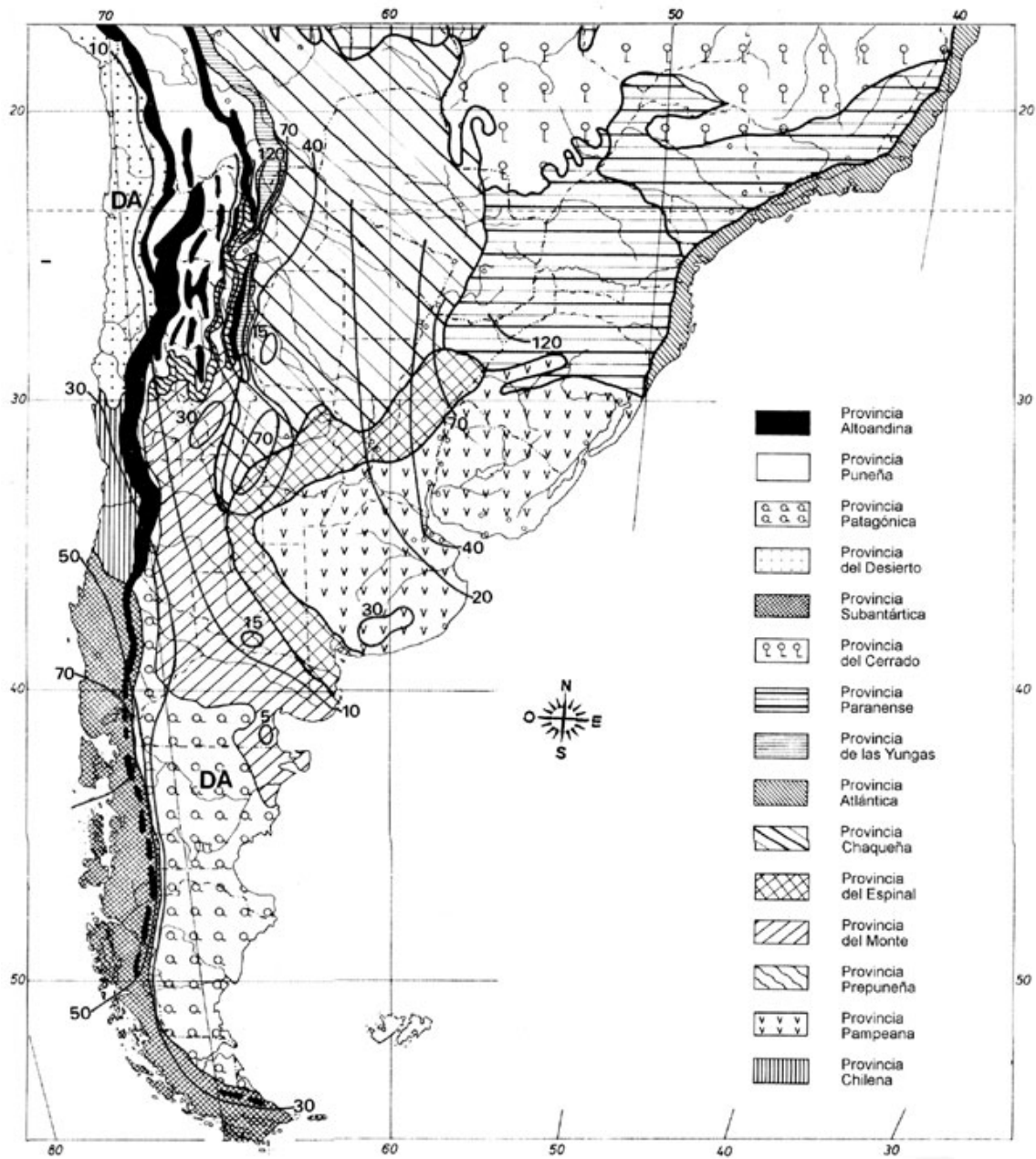


Figura 2. Mapa extraído de Cabrera & Willink (1973).

## 3.2. Material estudiado

### 3.2.1. Especies estudiadas

A partir de los trabajos florísticos mencionados en el apartado 2.5, hasta el momento se han citado para la Provincia Fitogeográfica Paranaense 7 géneros y 16 especies de Dennstaedtiaceae.

*Blotiella*

*Blotiella lindeniana* (Hook.) R. M. Tryon

*Dennstaedtia* Bernh.

*Dennstaedtia cicutaria* (Sw.) T. Moore

*Dennstaedtia cornuta* (Kaulf.) Mett.

*Dennstaedtia dissecta* (Sw.) T. Moore

*Dennstaedtia globulifera* (Poir.) Hieron.

*Dennstaedtia obtusifolia* (Willd.) T. Moore

*Histiopteris* (J. Agardh) J. Sm.

*Histiopteris incisa* (Thunb.) J. Sm.

*Hypolepis mitis* Kunze ex Kuhn

*Hypolepis x paulistana* Shwartzsb. & J. Prado

*Hypolepis repens* (L.) C. Presl

*Hypolepis rigescens* (Kunze ex Mart.) T. Moore

*Hypolepis rugosula* (Labill.) J. Sm.

*Hypolepis stolonifera* Fée

*Microlepis* C. Presl

*Microlepis speluncae* (L.) T. Moore

*Paesia* J. St.-Hil.

*Paesia glandulosa* (Sw.) Kuhn

*Pteridium* Gled. ex Scop.

*Pteridium arachnoideum* subsp *arachnoideum* (Kaulf.) Maxon.

### 3.2.2. Obtención del material

En esta tesis se utilizaron esporas provenientes de material de herbario y fresco, coleccionado en el campo. En el primer caso, se visitaron los siguientes herbarios nacionales:

- ♣ Herbario de la Fundación Miguel Lillo (LIL), Tucumán, Argentina. Noviembre de 2010.
- ♣ Herbario del Museo de La Plata (LP), La Plata, Argentina. Mayo de 2011.
- ♣ Herbario del Instituto de Botánica Darwinion (SI), San Isidro, Buenos Aires, Argentina. Julio de 2011.
- ♣ Herbario del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (BA), Buenos Aires, Argentina. Septiembre de 2011.

En cada oportunidad, se separaron los ejemplares fértiles de cada especie y los mismos fueron posteriormente pedidos en préstamo a las respectivas instituciones.

Asimismo, fueron consultadas las siguientes bases de datos de instituciones nacionales y extranjeras: CTES (Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina), BHCB (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil), BM (The Natural History Museum, Londres, Inglaterra), F (Field Museum of Natural History, Illinois, Estados Unidos), FCQ (Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay), G (Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Ginebra, Suiza), GH (Harvard University, Cambridge, Estados Unidos), H (University of Helsinki, Helsinki, Finlandia), HASU (Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil), HB (Herbarium Bradeanum, Rio de Janeiro, Brasil), HBG (Biozentrum Klein-Flottbek, Hamburgo, Alemania), HBR (Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil), ICN (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil),

MBM (Museu Botânico Municipal, Paraná, Brasil), MO (Missouri Botanical Garden, Missouri, Estados Unidos), MVFA (Universidad de la República, Montevideo, Uruguay), NSW (Royal Botanic Gardens and Domain Trust, Sydney, Australia), NY (New York Botanical Garden, New York, Estados Unidos), P (Muséum National d'Histoire Naturelle, París, Francia), PACA (Instituto Anchieta de Pesquisas/UNISINOS, São Leopoldo, Brasil), PY (Centro de Estudios y Colecciones Biológicas para la Conservación, Asunción, Paraguay), RB (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), SP (Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil), SPF (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil), UPCB (Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil) y US (Smithsonian Institution, Washington, Estados Unidos). A través del herbario del Museo de La Plata (LP) se solicitaron en préstamo los ejemplares seleccionados a los herbarios: BHCB, HB, MO, NY, PACA, SP y UPCB.

En relación con la obtención de material fresco se realizaron viajes de colección a las áreas protegidas de la provincia de Misiones, Argentina, según se detalla a continuación:

- ▲ Parque Provincial Esmeralda y P. P. Caá Yari, Dpto. de San Pedro. En colaboración con la Dra. Cecilia Macluf (UNLP). Diciembre de 2010.
- ▲ P. P. Moconá, Departamento de San Pedro. En colaboración con el Lic. Agustín Pinillos (UBA). Enero de 2011.
- ▲ P. P. Esmeralda y P. P. Cruce Caballero, Dpto. de San Pedro. En colaboración con el Dr. Gonzalo Marquez (UNLP). Marzo de 2011.
- ▲ P. P. Urugua-í, Dpto. Gral. Manuel Belgrano. En colaboración con el Lic. Renato García (UNLP). Octubre de 2011.
- ▲ P. P. Cruce Caballero y P. P. Piñalito, Dpto. de San Pedro. En colaboración con el Dr. Gonzalo Marquez (UNLP). Febrero-marzo de 2012
- ▲ P. P. Moconá y P. P. Esmeralda, Dpto. de San Pedro. En colaboración con el Dr. Gonzalo Marquez y el Sr. Santiago Kelly (UNLP). Mayo de 2014.
- ▲ P. P. Moconá y P. P. Esmeralda, Dpto. de San Pedro. En colaboración con el Dr. Gonzalo Marquez (UNLP). Febrero 2015.

Durante los viajes de campo se relevaron datos del hábitat y se georeferenciaron y documentaron fotográficamente las poblaciones halladas. Asimismo, cada ejemplar fue herborizado como material de referencia, según las técnicas convencionales, y fueron incorporados posteriormente al herbario LP.

Con el objetivo de establecer una comparación con los resultados provenientes del estudio de material de herbario, se fijaron esporas in situ de la especie *Dennstaedtia dissecta*. Esta especie fue seleccionada debido a que representa de manera acabada las características principales de las esporas de este género, el cual se encuentra muy bien representado en Argentina.

Debido a que para las especies *Dennstaedtia cicutaria*, *Dennstaedtia obtusifolia*, *Dennstaedtia dissecta*, *Microlepia speluncae*, *Blotiella lindeniana*, *Histiopteris incisa*, *Hypolepis stolonifera*, *H. mitis*, *H. repens* los ejemplares obtenidos provenientes de la Provincia Paranaense resultaron escasos para el análisis, se utilizaron excepcionalmente ejemplares de la Provincia Atlántica (Cabrera & Willink 1973) o Bosque Atlántico Brasileiro (Morrone 2001). Asimismo, si bien las especies *Hypolepis x paulistana* e *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* están presentes en la Provincia Paranaense, únicamente pudieron analizarse ejemplares provenientes de la Provincia Atlántica facilitados por el Dr. Pedro Bond Scharsburd, autor de los últimos dos taxones. Cabe destacar que la mayoría de las especies estudiadas en el presente trabajo se distribuyen en las provincias fitogeográficas mencionadas.

### 3.2.3 Determinación de ejemplares

Antes de realizar los estudios palinológicos correspondientes es necesario chequear si las determinaciones existentes en las etiquetas del material de herbario son correctas con el objetivo de evitar errores en el análisis de los resultados y confusiones futuras en relación a las características morfológicas de las especies estudiadas.

Para la determinación taxonómica de los ejemplares colectados se utilizaron los trabajos florísticos y específicos de de la Sota (1977), Tryon & Stolze (1989), Moran (1995) y Assis & Salino (2011). En el caso particular del género *Dennstaedtia*, se utilizaron las revisiones de Tryon (1960) y Navarrete & Øllgaard (2000). Para asegurar la correcta identificación de

las especies *D. dissecta*, *D. obtusifolia* y *D. cornuta*, y hallar los caracteres diagnósticos que permitan diferenciarlas, se consultaron los protólogos y las imágenes digitales del material tipo.

En *Hypolepis*, se tuvieron en cuenta los aportes de Swartzburd (2012a, 2012b), quien realizó la revisión más actual del género para América del Sur.

La determinación de aquellos ejemplares de herbario que contaban con una asignación botánica previa, fue corroborada.

#### 3.2.4 Descripción vegetativa de especies

Para elaborar la descripción vegetativa del esporofito a nivel específico, se consideraron tanto los especímenes de herbario como aquellos colectados en el campo. Para la observación en detalle se utilizó una lupa binocular Nikon SMZ1000.

Se analizaron caracteres cualitativos y cuantitativos. Entre los primeros describió la forma y grado de división de la lámina, presencia/ausencia de indumento, características de la venación, y la disposición y forma de soros e indusios. Entre los caracteres cuantitativos, se tomaron medidas del ancho del rizoma, largo de raquis y pecíolo, ancho y largo de frondes, lámina, pinnas y diámetro de soros.

Se siguió la terminología propuesta por Lellinger (2002) y Font Quer (1993).

#### 3.2.5. Ejemplares estudiados para el estudio palinológico

Los ejemplares estudiados se indican como marcas rojas en los mapas de distribución de cada especie.

***Dennstaedtia cicutaria*** (Sw.) T. Moore.

**ARGENTINA.** Misiones: Dpto. General Manuel Belgrano, San Antonio, 03-12-1957, *Capurro 1275* (BA); Dpto. San Pedro, Parque Provincial Moconá, 23-04-1993, *R. Guillén, J. Daviña & M. Rodríguez 135* (CTES); 22-09-1993, *M. Rodríguez et al. 694* (LP).

**BRASIL.** Paraná: Morretes, 13-05-1977, L. Th. Dombrowsky s.n. (PACA); 30-04-2005, *B. Matos & M. O. Silva 538* (SP). Rio Grande do Sul: São Leopoldo, 29° 45' 37,97'' S 51° 9' 5,69'' W, s.d., *J. Dutra 234* (SI), MP 4204 (MEB y MET). São Paulo: 15-07-1972, *B.*



*Siegel 24* (PACA, HB); Jacareí, 16-07-1914, *P. Dusén 15288* (MO), MP 4211 (MEB); Serra Negra, 06-06-1927, *F. C. Hoehne s.n.* (SP); Mendonça, Fazenda Santa Maria, Reserva forestal da Fazenda, 21° 12' S 49° 35' W, 21-12-1996, *M. R. Pietrobon-Silva 3873* (HB). Santa Catarina: Blumenau, 1906, *E. Rosentstock 173* (SI), MP 4205 (MEB).

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** Espírito Santo: Itaguaçu, Sta. Maria 23-05-1946, *A. C. Brade & A. P. Duarte 18371* (NY, MO). Paraná: Antonina, Reserva Natural Rio Cachoeira (SPVS), 25° 15' S 48° 41' W, 50 msm, 16-01-2005, *F. B. Matos 212* (UPCB); Guaraqueçaba, Reserva Natural Salto Morato, 19-12-1999, *G. Gatti & A. L. S. Gatti 574* (UPCB), MP 4209 (MEB). São Paulo: Eldorado, Parque Estadual do Jacupiranga, 24° 38' 13'' S 48° 28' 1,7'' W, 400 msm, 22-03-2005, *A. Salino et al. 10121* (BHCB).

***Dennstaedtia cornuta*** (Kaulf.) Mett.

**BRASIL.** Minas Gerais: Parque Natural do Ribeirão do Campo, 19° 6' 19,4'' S 43° 34' 4,9'', 1179 msm, W, 30/05/2003, *A. Salino et al. 8749* (BHCB), MP 4222 (MEB); Lambari, Parque Estadual de Nova Baden, 21° 56' 15,2'' S 45° 19' 23,9'' W, 890-1000 msm, 13/07/2007, *A. Salino et al. 12539* (BHCB), MP 4225 (MEB). Paraná: Ponta Grossa, Parque Estadual de Vila Velha, 25° 15' 20,49'' S 49° 59' 53,81'' W, 21/08/2004, *P. B. Schwartsburd et al. 322* (UPCB), MP 4221 (MEB). Rio de Janeiro: Teresópolis, 22° 23' S 42° 55' W, 800 msm, 28/03/1997, *M. Almeida-Neto 122* (HB).

***Dennstaedtia obtusifolia*** (Willd.) T. Moore

**BRASIL.** Minas Gerais: Nova Lima, bacia do córrego do Capitão do Mato, 24/09/1995, *A. Salino 2227* (BHCB); Km 163 da Br 162, Olaria, S. Francisco do Prata, Serra das Flores, 06/09/1979, *Bacharelados 16558* (UPCB, PACA). Paraná: Serra do Mar, Porto de Cima, 200 sms, 17/03/1914, *P. Dusén 14678* (UPCB), MP 4210 (MEB).

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** Rio de Janeiro: Itatiaia. Parque Nacional do Itatiaia, Trilha para a Cachoeira Itaporani, Floresta Atlântica, 22° 25' 42'' S 44° 37' 10'' W, 09/01/2008, *P. H. Labiak, M. Kaehler & P. B. Schwartsburd 4410* (UPCB), MP 4208 (MEB).

***Dennstaedtia dissecta*** (Sw.) T. Moore

**ARGENTINA.** Misiones: Dpto. General Manuel Belgrano, 23/02/1971, *Palacios 1296* (LP), MP 4190 (MEB); 15/12/1970, *E. R. de la Sota 6153 et al.* (LP y MO); Arroyo Urugua-í, 07/02/1951, *R. H. Capurro 826* (BA); *R. H. Capurro 858* (BA); *R. H. Capurro 859* (BA); Parque Provincial Urugua-í, destacamento Uruzú, Sendero Islas Malvinas, 12/10/2011, *A. Yañez & R. A. García 99* (LP); San Antonio, 03/12/1957, *R. H. Capurro 1279* (BA); Dpto. San Pedro, P. P. Cruce Caballero, Sendero Curi-y, 14/03/2012, *A. Yañez & G. J. Marquez 103* (LP), *A. Yañez & G. J. Marquez 104* (LP); *A. Yañez & G. J. Marquez 107* (LP); Sendero Carayá Pitá, 14/03/2012, *A. Yañez & G. J. Marquez s.n.* (LP), (MET). **BRASIL.** Paraná: Telemaco Borba, Parque Ecológico da Klabin, 24° 17' 4,3'' S 50° 35' 15,3'' W, 18/01/2005, *C. R. Sakagami & N. K. Sakagami 229* (UPCB), MP 4212 (MEB, MET); São Jerônimo da Serra; Rio Potingaímun, 09/02/1996, *G. Hatschbach 13822 et al.* (PACA). Rio Grande do Sul: Bento Gonçalves, 20/04/1963, *O. R. Camargo 3906* (PACA). São Paulo: Cubatão, Anchieta, 23° 53' S 46° 26' W, 11/05/1995, *M. R. Silva 1766* (MO); Teodoro Sampaio, Parque Estadual Morro Do Diabo, 22° 32' S 52° 11' W, 250-350 msm, 16/01/1995, *M.R. da Silva 1566* (MO). Santa Catarina: Blumenau, Morro spitzkopf, 27° 1' 51'' S, 49° 7' 59'' W, 500 msm, 02/04/2008, *P. B. Schwartsburd & L. M. Ceolin 1627* (SP); Dionísio Cerqueira, 900-1000 msm, 29/12/1956, *L. B. Smith et al. 9629* (SI), MP 4207 (MEB). **PARAGUAY.** Caaguazú: 04/1927, *T. Rojas 5026* (MO); Caazapá: Abai, 05/1932, *T. Rojas 5949* (MO); Canindeyú: Jejui-mí, 30/03/1996, *B. Jiménez & G. Marín 129* (CTES).

**Provincia Fitogeográfica Atlántica**

**BRASIL.** Paraná: Guaraquecaba, 27/11/1970, *G. Hatschbach & O. Guimaraes 24831* (PACA). Rio de Janeiro: Itatiaia, 17/07/1937, *A. Castellanos s.n.* (BA). São Paulo: Eldorado, Parque Estadual do Jacupiranga, 24° 38' 13 S 48° 28' 1,7'' W, 400 msm, 22/03/2005, *A. Salino 10089 et al.* (BHCB); Iguape, Rio Peroupava, 1922, *A. C. Brade 8351* (HB); 14/02/1924, *A. C. Brade 21469* (HB); São Sebastião, Ilha de São Sebastião, 26/07/1972, *Siegel 36* (HB); *Siegel 37* (HB); Paraibuna, coletada à beira de um riacho, próximo à Rodovia SP 99, 09/02/1977, *A. Tosta Silva 79* (SP). Santa Catarina: Itajaí, Morro da Ressacada, 30 msm, 20/12/1955, *R. Reitz & Klein 2321* (PACA).

***Dennstaedtia globulifera*** (Poir.) Hieron.

**ARGENTINA:** Misiones: Alto Paraná, 1901, *R. Riemel* 26 (SI); Dpto. Candelaria, Loreto, 03/1932, *Vallega* 46 (SI); Santa Ana, 10/1912, *M. Rodriguez* 664 (LP, BA, SI); Dpto. Concepción, Santa María, 12/02/1947, *A. M. R. Huidobro* 5086 (MO); Dpto. Eldorado, camino a Eldorado, 14/10/1996, *O. Morrone et al.* 1318 (SI, MO, NY); Dpto. General Manuel Belgrano, Deseado, 28/12/1957, *R. H. Capurro* 1188 (BA); Frontera, 19/04/1957, *E. R. de la Sota & A. Cuerzzo* 1413 (BA); P. P. Uruguay-í, destacamento Uruzú, 12/10/2011, *A. Yañez & R. A. García* 98 (LP); Reserva Nacional Estricta San Antonio, 15/10/1996, *O. Morrone et al.* 1450 (SI, MO, NY); Ruta 101 entre Parque Nacional Iguazú y San Antonio, 14/12/1970, *E. R. de la Sota et al.* 6110 (LP, MO); San Antonio, 03/12/1957, *R. H. Capurro* 1227 (BA); Dpto. General San Martín, Gruta y Salto 3 de Mayo, 12/12/1970, *E. R. de la Sota et al.* 6086 (LP); Dpto. Guaraní, Fracran, 13/02/1952, *R. H. Capurro* 1037 (BA); Predio Guaraní, 23/11/1993, *S. G. Tressens et al.* 4636 (LP); Dpto. Iguazú, 17/01/1908, *s.c.* 51 (SI); Parque Nacional Iguazú, 03/12/1993, *R. Vanni et al.* 3184 (LP); Puerto Bossetti, 07/10/2003, *H. A. Keller & F. Moskovich* 2495 (CTES); Dpto. Montecarlo, Colonia Santa Teresa, 17/10/1993, *R. Guillen & A. Perez* 1 (CTES); Dpto. San Pedro, Ruta Prov. 17, camino a Eldorado, 22/01/1973, *A. Schinini & A. Fernández* 5986 (LP, MO, CTES); *A. Schinini & A. Fernandez* 5990 (LP, MO, CTES); desvío a Tobuna, 26/01/1973, *A. Schinini & A. Fernández* 6069 (LP); Las Ratas, 15/12/1957, *R. H. Capurro* 1416 (BA); P. P. Cruce Caballero, 14/03/2012, *A. Yañez & G. J. Marquez* 105 (LP); Reserva Biosfera Yabotí, P. P. Esmeralda, 12/2010, *A. Yañez & C. C. Machuf* 70 (LP); *A. Yañez & C. C. Machuf* 71 (LP); 14/03/2011, *A. Yañez & G. J. Marquez* 86 (LP). **BRASIL:** Paraná: 1906, *E. Rosenstock* 247 (SI, BA); Mun. Cerro Azul, Rio Ponta Grossa, 16/12/1992, *G. Hatschbach & O. S. Ribas* 59449 (MO); Francisco Beltrão, Parque Municipal Irmão Sirilo, 25/10/2006, *P. B. Schwartsburd & M. Nogueira Jr.* 1113 (UPCB). Rio Grande do Sul: Ipeas, Horto Botánico, 24/01/1973, *A. Krapovickas et al.* 22918 (LP); Vila Oliva, 07/01/2000, *A. Kegler* 520 (MO). São Paulo: São Roque da Fartura, complejo da Serra da Mantiqueira, 15/06/1995, *M. R. Pietrobom da Silva* 1862 (MO). **PARAGUAY:** Alto Paraná: Puerto Bertoni, 06/1938, *T. Rojas* 8094 (MO); Tacuru Pucu, 10/1901, *R. Riemel* 27 (SI). Caazapá: Camino a la toldería de los Mby'a, 09/12/1989, *N. Soria* 4080 (MO); Tavai, 30/10/1988, *E. Zardini* 7846 (MO); 21/12/1988, *I. Basualdo* 2031 (MO); Canindeyú: Guadalupe, ca. 30 Km al noroeste de

Puerto Adela, 17/12/1982, *A. Schinini 23161* (LP, CTES); Jejuí-mí, 14/10/1997, *M. Peña-Chocarro 362* (CTES). Guairá: Colonia Independencia, 03/1924, *T. Rojas 4791* (MO).

***Microlepia speluncae* (L.) T. Moore**

**BRASIL:** São Paulo: Tietê, 02/12/1906, *Gerdes 94* (HB); Mun. Teodoro Sampaio, Pontal do Paranapanema, Parque Estadual Morro Do Diabo, 22° 32' S 52° 11' W, 300 msm, 30/01/1995, *M. R. Silva 1680* (MO). Santa Catarina: Hammonia, 07/1910, *H. Luederwaldt s/n* (SP), MP 4216 (MEB). **PARAGUAY:** Guairá: Cerro de Villa Rica, 04/1924, *T. Rojas 4878* (MO).

***Provincia Fitogeográfica Atlántica***

**BRASIL.** São Paulo: Ubatuba, Parque Estadual da Serra do Mar, 23° 21' 5,8'' S 44° 48' 35,9'' W, 30 msm, 04/08/2001, *A. Salino et al. 7199* (BHCB). Rio de Janeiro: Estrada de la Covanca, 30/09/1959, *E. R. de la Sota 2298* (LP); Teresópolis: Parque Nacional da Serra dos Órgãos, 22° 29' 37'' S 43° 0' 5'' W, 350 msm, 14/01/2008, *P. H. Labiak 4522 et al.* (UPCB, 59230<sup>a</sup> y 59230<sup>b</sup>), MP 4217 (MEB).

***Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon *subsp arachnoideum***

**ARGENTINA:** Corrientes: Dpto. Ituzaingó, Isla Apipé Grande, Panco cué, 05/10/1978, *A. Schinini & R. Vanni 15792* (MO); Dpto. Santo Tomé, Ea. San Benito, 09/06/1992, *S. G. Tressens 4051* (MO). Misiones: Dpto. Cainguás, 2 de Mayo, Colonia 2 de Mayo, 22/05/1951, *A. L. Cabrera et al. 335* (LP), MP 4197 (MEB); Dpto. Candelaria, Santa Ana, 19/09/1912, *M. Rodriguez 627a* (SI); Dpto. Manuel Belgrano, 22/05/1991, *G. Delucchi 519* (LP); Dpto. San Ignacio, Teyú Cuaré, 15/07/1945, *A. Krapovickas 2421*; 12/12/1992, *R. Guillén 19* (CTES); Dpto. San Pedro, ruta 14 entre San Pedro y Fracran, km 327, 16/12/1970, *E. R. de la Sota et al. 6167* (LP), MP 4198 (MEB). **BRASIL:** Paraná: Telemaco Borba, Parque Ecológico da Klabin, 18/07/2005, *C. R. Sakagami 398* (UPCB); Mun. Tijucas do Sul, Capina 46 Km S de Curitiba, 14/02/1978, *A. Krapovickas & C. L. Cristóbal 33652* (LP), MP 4199 (MEB, MET); Mun. São Mateus do Sul, BR-476, km 152, 26-/06/1985, *A. Krapovickas & C. L. Cristóbal 39667* (LP), MP 4196 (MEB). Rio Grande do Sul: Caxias do Sul, 05/03/1949, *I. L. Afonso 46* (LP). São Paulo: estrada entre São Paulo e São Roque, 15/07/1972, *B. Siegel 25* (HB); Parque Estadual de Campos do Jordão,

22/10/1974, *P. Carauta 1731* (SP); Borde de carretera 116, 05/01/1974, J. Conrad & W. Dietrich 2010 (MO). **PARAGUAY:** Caazapá: Tavai, 2 km del destacamento, 21/12/1988, N. Soria 3020 (MO), MP 4215 (MEB); F. Mereles 2349 (MO); Tavai, Cerro Tupasy, 29/01/1988, R. Degen 905 (MO). Guairá: San Agustín, 06/1932, T. Rojas 6011 (MO); Río Paraná, Alto Paraná, 1910, K. A. G. Fiebrig 6138 (SI),

***Blotiella lindeniana*** (Hook.) R. M. Tryon

**BRASIL.** Minas Gerais, Simonésia, RPPN Mata do Sossego, 20° 4' 10'' S, 42° 4' 52'' W, 1391 msm, 20/03/2009, A. Salino 14240 et al (BHCB), MP 4227-4228 (MEB, MET).

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** Rio de Janeiro, Teresópolis, Varzea, 23/09/1929, A. C. Brade 9390 (NY). Santa Catarina, Limoeiro, Sta. Maria, 17/05/1946, A. C. Brade & Apariccio 18285 (NY).

***Paesia glandulosa*** (Sw.) Kuhn

**BRASIL.** Minas Gerais. Catas Altas, Parque Natural do Caraça, 11/11/2000, A. Salino 5813 (BHCB), MP 4226 (MEB, MET); Ouro Preto, Itacolomy, 14/02/1884, A. F. M. Glaziou s.n. (NY).

***Histiopteris incisa*** (Thunb.) J. Sm.

**BRASIL.** Minas Gerais, Lima Duarte, 26/08/1978, L. Krieger 15917 (CTES), MP 4229 (MEB). Rio Grande do Sul, São Leopoldo, 15/01/1933, A. Sehnem s.n. (SP), MP 4219 (MEB); São Leopoldo, J. Dutra 288 (SI); Potreiro Novo, 23/02/1978, A. Sehnem 15886 (PACA); Guanabara, 01/06/1967, A. C. Brade 9670 (CTES). Santa Catarina, Hammonia, 06/1913, H. Luederwaldt s.n. (SP); Foinville, 1905, E. Rosentstock 124 (SI), MP 4218 (MEB, MET); Campo dos Padres, Bom Retiro, 17/01/1957, A. Sehnem 6955 (PACA).

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

Santa Catarina. Represa dos Pilares, Mun. de São José, 26/05/1955, Rohn 3022 (HB). Sao Paulo, Estac. Alto da Serra, Luederwaldt s.n. (SP).

***Hypolepis mitis*** Kunze ex Kuhn

**BRASIL.** Santa Catarina: Itapacú, 1904, *Hans 20* (NY), MP 4244 (MEB). São Paulo, Jundiaí, Serra do Japi, 23° 14' S 46° 56' W, 966 msm, 13/11/2009, *J. Prado 2057 et al.* (LP), MP 4251 (MEB).

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** Paraná: Alexandra, 05/09/1910, *P. Dusen 10222* (SI). Rio de Janeiro: Itatiaia. Parque Nacional do Itatiaia, 22° 26' 2'' S 44° 37' 26'' W, 1036 msm, 19/01/2010, *P. B. Schwartsburd 2291 et al.* (LP); *P. B. Schwartsburd 2292* (LP); 1140 msm, 22/01/2010, *P. B. Schwartsburd 2296 et al.* (LP), MP 4253 (MEB); Guapimirim, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, 08/01/2011, *P. B. Schwartsburd 2317* (LP), MP 4237 (MEB); Parque Nacional Serra dos Órgãos, 06/01/2011, *P. B. Schwartsburd & J. B. S. Pereira 2308* (LP), MP 4242 (MEB).

*Hypolepis x paulistana* Schwartsb. & J. Prado

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** São Paulo: Pindamonhangaba, 22° 46' 2'' S 45° 32' 17'' W, 1881 msm, 23/06/2012, *P. B. Schwartsburd 2298 et al.* ISOTIPO (LP), MP 4236 (MEB).

*Hypolepis repens* (L.) C. Presl

**BRASIL.** Santa Catarina: Hammonia, s.d., *H. Luederwaldt 21797* (NY)

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** Minas Gerais: Santa Maria do Salto, 16° 24' 23'' S 40° 3' 16'' W, 950 msm, 09/02/2006, *F. B. Matos 961 et al.* (UPCB, 68981a, b y c), MP 4240 (MEB). Ceará: Maranguape, Serra de Maranguape, 3° 54' 5'' S 38° 43' 12'' W, 900 msm, 14/04/2011, *P. B. Schwartsburd & J. A. P. Araújo 2510* (LP), MP 4237 (MEB).

*Hypolepis rugosula subsp. pradoana* Schwartsb.

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** Rio de Janeiro: Teresópolis, Parque Nacional Serra dos Órgãos, 22° 27' 42'' S 43° 1' 50'' W, 2120 msm, 07/06/2011, *P. B. Schwartsburd & J. B. S. Pereira 2310* (LP), MP 4248 (MEB, MET).

***Hypolepis stolonifera*** Fée

*Hypolepis stolonifera* var *delasotae* Arana, A. Yañez, Schwartsb.

**ARGENTINA.** Misiones: Dpto. San Antonio, 03/12/1957, *R. H. Capurro 1275* (BA); Dpto. San Pedro, 12/12/1957, *R. H. Capurro 1354 TIPO* (BA), MP 4239 y 4249 (MEB y MET).

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

**BRASIL.** Minas Gerais: Delfim Moreira, Fazenda da Onça, 22° 36' 37'' S 45° 20' 53'' W 1729 msm, 15/03/2011, *L. L. Giacomini 1338 et al.* (BHCB).

*Hypolepis stolonifera* var *nebularis* Schwartsb.

**BRASIL.** Paraná: Campina Grande do Sul, Parque Estadual Pico Paraná, 25° 15' S 48° 52' W, 1200-1300 msm, 08/02/2009, *J. B. S. Pereira 440 et al.* (UPCB, 68070a y b). Santa Catarina: Urupema, 1550 msm, 05/02/2009, *P. B. Schwartsburd & A. C. Corazzini 1969* (LP), MP 4235 (MEB).

*Provincia Fitogeográfica Atlántica*

Rio de Janeiro: Itatiaia, 07/1913, *A. C. Brade 6502* (NY).

*Hypolepis stolonifera* var *stolonifera*

**ARGENTINA.** Misiones: Dpto. San Antonio, 04/12/1957, *R. H. Capurro 1321* (BA); Dpto. San Pedro, P. P. Cruce Caballero, 14/03/2012, *A. Yañez & G. J. Marquez 101* (LP); Dpto. Guaraní, Predio Guaraní, 26° 54' 59'' S 54° 12' 18'' W, 08/12/2001, *H. Keller 1470* (BA). **BRASIL.** Minas Gerais: Ouro Preto, Parque Estadual Itacolomi, 20° 17' 16'' S 43° 30' 29'' W, 09/06/2005, *J. Jascone 409* (NY); Vila Vis do Rio Branco, 650 msm, 01/1974, *J. Piveta 850* (PACA). Paraná: Curitiba, Parque Barigui, 13/12/1996, *V. A. de O. Dittrich & C. Kozera 295* (NY); 02/1974, *L. Th. Dombrowsky 5105* (PACA); Mananciais da Serra, Piraquara, 12/1967, *L. Dombrowsky & Y. Saito Kuniyoshi 2760* (PACA); Villa Nova, 1905, *J. Annies 92* (NY). Rio Grande do Sul: Gramado, 800 msm, 28/12/1949, *A. Sehnem 4188* (PACA); *A. Sehnem 4190* (PACA); Paso do Socorro, Vacaria, 800 msm, 28/01/1951, *A. Sehnem 5728* (PACA); *A. Sehnem 5743* (PACA); Vila Oliva, Caxias do sul, 01/1946, *B. Rambo 1248* (PACA); 750 msm, 14/01/1974, *A. Sehnem 2565* (PACA); San Salvador, Montenegro, 550 msm, 10/01/1943, *A. Sehnem 1156* (PACA); Silveira Martins,

05/03/1983, *C.A.M. Lindman 1321* (NY); São Francisco de Paula, 850 msm, 24/03/2002, *R. Wasum 1438* (PACA). Santa Catarina: Lages, 12/1904, *C. Spannagel 28* (NY); Painei, Base de Pesquisa do IBAMA, 03/02/2009, *P.B. Schwartzburd & A. C. Corazzini 1928* (LP), MP 4232 y 4250 (MEB).

#### Provincia Fitogeográfica Atlántica

Rio de Janeiro: Itatiaia, Parque Nacional do Itatiaia, 22° 25' 49'' S 44° 36' 2'' W, 1220 msm, 10/01/2008, *P. H. Labiak 4419 et al* (LP).

### **3.3. Métodos**

#### 3.3.1 Estudios con microscopio óptico (MO)

Entre los especímenes obtenidos a partir de colecciones de herbario y viajes de campo, se seleccionaron en primera instancia aquellos fértiles, con esporangios maduros. Se extrajeron esporas de la porción basal, media y apical de la fronde con el objetivo de identificar el grado de maduración de las esporas y seleccionar las más desarrolladas. Para la elaboración de preparados ópticos se utilizó gelatina-glicerina como medio de montaje. Las esporas fueron muestreadas de los ejemplares con cubos de gelatina-glicerina que se apoyaron sobre los esporangios previamente abiertos mediante una aguja. Posteriormente, los cubos se colocaron sobre un portaobjetos que se calentó en mechero. Una vez que la gelatina-glicerina tomó estado líquido, el preparado se cubrió con cubreobjetos y se selló con parafina o esmalte sintético.

Las observaciones se realizaron con microscopios ópticos Olympus BH2 y Nikon Eclipse E200 de la Cátedra de Palinología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.

Los preparados ópticos que resultaron de este trabajo se encuentran depositados en la Palinoteca de la Cátedra de Palinología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, identificados con el nombre y número de colector del ejemplar de origen.

En ninguno de los casos las esporas fueron sometidas previamente a la técnica de acetólisis de Erdtman (1960). Esto se debe a que las características de la ornamentación fueron fácilmente evidenciables sin necesidad de un tratamiento químico previo. Asimismo,



existen estudios palinológicos en representantes de la familia en los cuales este tipo de metodología provocó rupturas y desprendimientos en el perisporio (Nayar & Devi, 1968a; Soepadmo & Khoo, 1977; Estevez & Cohelo, 2007). A nuestro entender, dichas modificaciones podrían provocar interpretaciones erróneas sobre la morfología de la pared. En este mismo sentido, otros autores señalaron que la acetólisis puede modificar el tamaño, forma y ornamentación tanto de esporas como de granos de polen (Brown, 1960; Reitsma, 1969; Hese & Waha, 1989; Large & Braggins, 1991).

Durante los estudios con MO, se seleccionaron aquellos ejemplares en donde se observó el mayor grado de maduración de las esporas, los cuales fueron estudiados posteriormente con microscopía electrónica de barrido.

### 3.3.2. Estudios con microscopio electrónico de barrido (MEB)

Las esporas de los ejemplares seleccionados para los estudios con MEB se sometieron a un tratamiento químico previo con el fin de limpiar la superficie y preservar el perisporio, (*cf.* Morbelli, 1980). En algunos casos, antes de ser tratadas las esporas se mantuvieron durante 3 días en agua destilada y detergente con fines de rehidratación.

Las esporas fueron sumergidas  $\text{CO}_3 \text{Na}_2$  al 3% y llevadas al calor de un mechero durante 3'. Posteriormente fueron tamizadas en mallas de 45  $\mu\text{m}$  y 67  $\mu\text{m}$ , según la especie, y colocadas en tubos de ensayo con agua destilada. Se realizaron tres centrifugados sucesivos a 2500 rpm, de 5', 5' y 10' respectivamente, volcando el líquido sobrenadante y equilibrando con agua destilada entre uno y otro. Luego del último lavado el residuo fue deshidratado con etanol al 96% del cual se tomó una muestra con un microcapilar, que fue transferida a platinas de acetato de 1  $\text{cm}^2$ .

Adicionalmente, en algunas muestras se provocó la ruptura intencional del perisporio con el objetivo de observar la estratificación de la esporodermis. Para ello, los tubos de precipitado conteniendo las esporas en agua destilada fueron sometidos a ultrasonido durante 10'-20' según la especie, luego del segundo centrifugado. Posteriormente se continuó con el protocolo ya descrito.

Antes de la observación, las muestras fueron cubiertas con oro en campana de bajo vacío. Las observaciones se realizaron en los microscopios Jeol JSMT-100 del Servicio de

Microscopia de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, Philips MEB 505 del Servicio de Microscopía del Centro de investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas Dr. Jorge J. Ronco (CINDECA) y FEI ESEM Quanta 200 del Servicio de Microscopia del Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física "Ing. Gregorio Cusminsky" (LIMF) de la Facultad de Ingeniería, UNLP.

Los residuos resultantes fueron sumergidos en fenol y glicerina y depositados en la Palinoteca de la Cátedra de Palinología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (Yañez *et al.* 2014). Los datos de cada procesamiento, con o sin residuo resultante, fueron registrados en una ficha que se archivó en dicha Palinoteca, identificados mediante un número de muestra palinológica (MP).

Durante los análisis al MEB se seleccionaron las especies cuyas esporas resultaron ser representativas de cada tipo de ornamentación, o grupo morfológico, identificado para la familia. Estas fueron: *Blotiella lindeniana*, *Dennstaedtia cicutaria*, *D. dissecta*, *D. globulifera*, *Histiopteris incisa*, *H. mitis*, *H. repens*, *H. rugosula*, *H. stolonifera*, *Microlepia speluncae*, *Paesia glandulosa* y *Pteridium arachnoideum*. Para la selección se tuvieron en cuenta los ejemplares cuyas esporas presentaron la esporodermis completamente desarrollada y donde las características de la ornamentación se identificaron con facilidad. Los ejemplares seleccionados se estudiaron posteriormente con microscopía electrónica de transmisión (MET).

### 3.3.3. Estudios con microscopio electrónico de transmisión (MET)

Las esporas seleccionadas para los estudios con MET fueron procesadas según los protocolos que se detallan a continuación. Se realizaron diferentes tratamientos a las esporas provenientes de material vivo y de herbario.

Los agentes fijadores utilizados fueron glutaraldehído (GA) para la fijación y tetróxido de osmio (O<sub>4</sub>Os) para la posfijación. En el primer caso, el GA reacciona con las proteínas y preserva la continuidad de las membranas. Posteriormente, el O<sub>4</sub>Os reacciona con los lípidos que no fueron fijados por el GA.

En ambos pasos de la fijación, el agente fijador se mezcló con compuestos como rojo de rutenio (RR) o alcian blue (AB). Estos compuestos mejoran la visualización de los

elementos constitutivos de la pared, principalmente la de los polisacáridos, ya que facilitan la combinación de los mismos con las sustancias contrastantes utilizadas como citrato de plomo o acetato de uranilo (Rowley & Nilsson, 1972; Rowley, 1973; Echandi & Hernández, 1998). El AB se utilizó para la fijación de ejemplares de herbario pues, en este tipo de material, tendría mejores resultados (Rowley & Nilsson, 1972).

### ***Protocolo para el procesamiento de esporas colectadas en el campo***

*Fijación:* El material fue fijado con GA al 3% con 0,001% de RR en 0,1 M de buffer de fosfato durante 72 horas (pH 7.4, 4° C, vacío 1 atm).

*Lavado:* Se realizaron dos lavados de 15 minutos cada uno en 0,01% de RR en 0,1 M de buffer de fosfato (pH 7.4, 4° C, vacío 1 atm).

*Posfijación:* El material fue transferido posteriormente a una mezcla de 0,01% de RR y O4Os 1% en solución acuosa durante 2 horas (4° C, vacío 1 atm).

*Lavado:* Se realizaron tres lavados de 30 minutos cada uno en 0,01% de RR en 0,01 M de buffer de fosfato (pH 7.4, 4° C, vacío 1 atm).

*Deshidratación:* La deshidratación se efectuó en series de etanol de 50%, dos veces durante 10 minutos (4° C), 70% durante 20 minutos (4° C), 80% durante 20 minutos (4° C), 95% durante 30 minutos (T° ambiente, vacío 1 atm), 100%, tres veces durante 12 horas (T° ambiente).

*Infiltración:* El material se infiltró en resina epoxi Spurr de naturaleza media, en proporción alcohol / resina 1:1 durante 12 horas (T° ambiente) y posteriormente en proporción alcohol / resina 1:2 durante 3 horas (T° ambiente).

*Inclusión:* El material se incluyó en resina epoxi Spurr de dureza media en estado puro durante 1 hora (T° ambiente).

*Polimerización:* El material se colocó en resina epoxi Spurr de dureza media en estado puro y se realizaron dos cambios de la resina cada 12 horas. Finalmente, fue volcado en cápsulas y moldes de plástico flexible y colocado en una estufa al vacío a 70° C durante 24 horas para endurecer la resina.

### ***Protocolo para el procesamiento de esporas provenientes de material de herbario***

El siguiente protocolo es el propuesto por Rowley & Nilsson (1972) con la finalidad de recuperar estructuras transformadas.

*Hidratación:* La esporas fueron sumergidas en una solución de 1% de AB en buffer de fosfato durante 24 horas (pH 7.4, T° ambiente).

*Fijación:* Se realizó con 2% GA más 1% AB en buffer de fosfato durante 12 horas (pH 7.4, T° ambiente).

*Postfijación:* se realizó con 1% O4Os en solución acuosa mas 1% AB en buffer de fosfato, durante 1 hora (T° ambiente).

*Lavado:* El material se lavó con buffer de fosfato más AB.

*Deshidratación:* Las esporas fueron deshidratadas con una serie creciente de acetona de 30%, 50%, 80% y 100%.

*Infiltración:* El material se infiltro en resina Spurr de dureza media.

### ***Cortes***

Luego del procesamiento, se analizaron y seleccionaron las esporas más adecuadas para la visualización al MET. Para ello se realizaron, con ultramicrotomo, cortes semifinos de 3µm de espesor aptos para la observación con MO.

Una vez realizada la selección, se realizaron cortes ultrafinos de 60-80 nm. Los cortes se montaron sobre grillas de cobre u acero inoxidable apropiadas para la observación con MET.

### ***Tinción***

Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina a pH 4.5.

Los cortes ultrafinos, montados sobre las grillas, se trataron con 1% de acetato de uranilo durante 15 minutos y, posteriormente, con citrato de plomo durante 5 minutos.

Asimismo, en el caso de *Microlepidia speluncae* y *Pteridium arachnoideum* algunos cortes ultrafinos se trataron con 1% de acetato de uranilo durante 15 minutos y, posteriormente,

con citrato de plomo durante 2'3'' minutos y otros cortes no fueron expuestos al citrato de plomo.

### ***Observación***

Las muestras fueron examinadas en el microscopio electrónico de transmisión M 109-Turbo Zeiss perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios (LANAIS/CONICET) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

## **3.4. Parámetros y terminología utilizada en la descripción palinológica**

### **3.4.1 Caracteres cuantitativos**

En el análisis de las esporas se tuvieron en cuenta las siguientes medidas:

*Diámetros:* teniendo en cuenta la naturaleza de las aperturas y la polaridad de las esporas, se midieron los diámetros polar (DP), ecuatorial mayor ( $DE_1$ ) y ecuatorial menor ( $DE_2$ ) incluyendo la ornamentación de la pared (Lámina 1). En las descripciones se expresa el valor mínimo, máximo y el más frecuente en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). Estas dimensiones fueron estimadas en base a medidas de 25 esporas por ejemplar analizado.

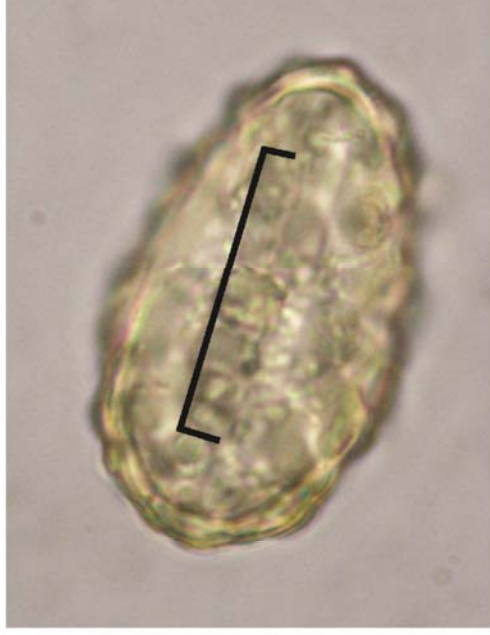
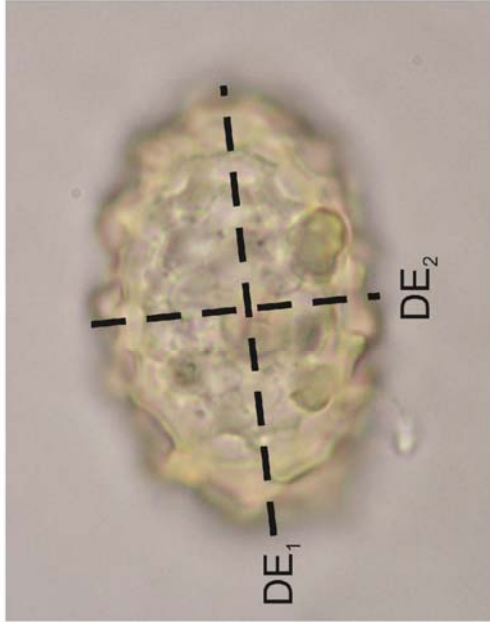
*Longitud de la lesura:* Se midió la longitud de la lesura (Lámina 1) y, en el caso de las esporas monolete, la relación con el  $DE_1$ . En las descripciones se expresan los valores mínimos y máximos en  $\mu\text{m}$ . Estas dimensiones fueron estimadas en base a medidas de 15 esporas por ejemplar analizado. En los casos en los que la ornamentación cubre parcialmente la lesura, la longitud fue medida utilizando microscopía electrónica de barrido.

*Espesor de las paredes:* Se tomaron medidas del espesor del perisporio y del exosporio así como de los estratos que los constituyen. Estas dimensiones fueron estimadas en base a

medidas de 15 esporas por ejemplar analizado. En las descripciones se expresan los valores mínimos y máximos en  $\mu\text{m}$ .

*Elementos de la ornamentación:* según el caso, se tomaron medidas de la altura, ancho y diámetro de los elementos esculturales de la esporodermis. En las descripciones se expresan los valores mínimos y máximos en  $\mu\text{m}$ .

**Lámina 1. Caracteres cuantitativos relevados: diámetros de la espora y longitud de la lesura.**



DE<sub>1</sub> = Diámetro ecuatorial mayor  
 DE<sub>2</sub> = Diámetro ecuatorial menor

DP = Diámetro polar  
 [ ] Lesura

# Lámina 1

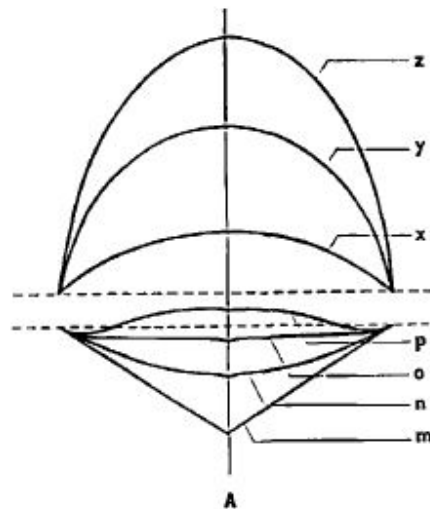


Las medidas fueron tomadas durante las observaciones al MO mediante una reglilla ocular de medición. Para medir el espesor del perisporio y exosporio se utilizó un micrómetro filar. No obstante, en algunas especies las paredes no son distinguibles entre sí con MO, al igual que los estratos dentro de cada pared. En esos casos las medidas fueron tomadas únicamente con microscopía electrónica.

Todas las medidas fueron corroboradas en base a fotomicrografías obtenidas en los microscopios electrónicos de barrido y transmisión. Las medidas en este último caso se tomaron a través del programa ImajeJ 1.46r.

### 3.4.2 Caracteres cualitativos

*Forma:* para definir la forma de las esporas en vista ecuatorial, se adoptaron los términos propuestos por Nayar & Devi (1966) (Fig. 3) mientras que, para describir la vista polar, se siguió a Kremp (1965) y Morbelli (1980).



**Figura 3:** Representación de una espora tetraédrica en vista ecuatorial, que explica la forma de la cara proximal (m-p) y distal (x-z) (la línea punteada representa el ecuador de la espora); cara proximal: m = cónica, n = convexa, o = plana, p = cóncava; cara distal: x = convexa, y = hemisférica, z = subcónica. Extraído y traducido al español de Nayar & Devi (1966).

### *Caracteres de la esporodermis*

En la descripción de la esporodermis se utilizaron los siguientes términos palinológicos. Para cada caso se cita la bibliografía considerada, no obstante, algunas definiciones fueron parcialmente modificadas.

**Bácula:** Elemento positivo, radialmente alargado, cilíndrico, siempre recto, al menos 1,5 veces más largo que ancho, de ápice obtuso o redondeado y lados paralelos. En *Blotiella lindeniana* (Perisporio), *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* (Exosporio). Lellinger (2002), Punt *et al.* (1994, 2007). (Lámina 2, Fig. A)

**Cresta (muro afilado):** Elemento positivo, lateralmente alargado, estrecho, recto o sinuoso, al menos una vez más alto que ancho, de base curvada y margen superior afilado. En *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* (Perisporio). En el resto de las especies de *Hypolepis* como resultado de la fusión de elementos. Nayar & Devi (1964), Viane & Cotthem (1977), Punt *et al.* (1994, 2007), Ybert *et al.* (2012). (Lámina 2, Fig. F)

**Cordón:** Elemento positivo, tangencial o perpendicular a la superficie de la spora, cilíndrico, sinuoso, de ápice redondeado o aguzado, a veces fusionado con otros formando redes. En *Microlepis speluncae* y *Pteridium arachnoideum* (Perisporio). Ocasionalmente en *B. lindeniana*, *H. acantha*, *H. mitis*, *H. repens* y *H. stolonifera* conectando los elementos de la ornamentación. Tryon & Lugardon, (1991).

**Electrón-densidad:** Propiedad que indica el grado de retención de electrones de una estructura determinada, sometida a un proceso previo de tinción con sustancias de contraste (ej. Citrato de plomo o Acetato de uranilo), y observada con microscopía electrónica de transmisión. Las diferencias de electrondensidad entre estructuras sugieren composiciones químicas distintas. Tryon & Lugardon (1991).

**Espina:** Elemento positivo, radialmente alargado, mayor a 1  $\mu\text{m}$ , de base ancha y lados paralelos o no en la porción media, confluentes en un extremo agudo. En *Hypolepis stolonifera*, *H. acanta*, *H. mitis* y *H. repens* (Perisporio). Lellinger (2002), Punt *et al.* (1994, 2007), Ybert *et al.* (2012). (Lámina 2, Fig. B)

**Espínula:** Elemento similar a una espina, menor a 1  $\mu\text{m}$ . *Hypolepis stolonifera* (Exosporio). Sobre verrugas en *Dennstaedtia cicutaria*, como resultado de la fusión de cordones en *Microlepis speluncae* (Perisporio). En *Pteridium arachnoideum* los cordones

de extremos aguzados asemejan a espínulas (Perisporio). Lellinger (2002), Punt *et al.* (1994, 2007), Ybert *et al.* (2012).

**Estructura alveolar** (*ref.* esporodermis): Estructura que presenta alvéolos de distintas dimensiones, rellenos o no de material electrón-denso.

**Estructura homogénea:** Estructura que no presenta variaciones respecto a las dimensiones y distribución de sus elementos constitutivos.

**Exosporio:** pared de la esporodermis, de esporopolenina, que envuelve a la espora por fuera del endosporio y es interna respecto del perisporio. Formada a partir del tapete, con desarrollo centrífugo. Morbelli (1980), Tryon & Lugardon, (1991), Lellinger (2002).

**Lesura:** En esporas trilete, uno de los brazos de la abertura o fisura de dehiscencia situada en el polo proximal. Las esporas monolete poseen una única lesura. Erdtman (1958), Punt *et al.* (1994, 2007).

**Lomo** (muro redondeado): Elemento positivo, lateralmente alargado, recto o sinuoso, de base curvada y margen superior redondeado. Como resultado de la fusión de verrugas en *Dennstaedtia cornuta*, *D. dissecta*, *D. obtusifolia* y *D. globulifera* (Perisporio). Lellinger (2002). (Lámina 2, Fig. G).

**Mamelón:** Elemento positivo, constituido por una parte basal ancha, similar a una verruga, y una porción superior al menos 2 veces más estrecha que la anterior, similar a una bacula o espina. *Blotiella lindeniana* (Perisporio). Huang (1981). (Lámina 2, Fig. C).

**Monolete:** espora de simetría bilateral, con una lesura simple. En *Blotiella*, *Histiopteris*, *Hypolepis* y *Paesia*. Tryon & Tryon (1991), Lellinger (2002), Punt *et al.* (2007).

**Perisporio:** pared de la esporodermis, de esporopolenina, que envuelve a la espora por fuera del exosporio. Originada a partir del tapete, luego de la formación del exosporio. Tryon & Lugardon (1991), Lellinger (2002).

**Pila:** Elemento positivo, constituido por una parte basal estrecha, de lados paralelos, y una parte apical ensanchada. Punt *et al.* (1994, 2007) utilizan este término para referirse a los elementos originados a partir de la sexina de los granos de polen de angiospermas y gimnospermas. No obstante, debido a la analogía morfológica existente con los elementos que ornamentan el exosporio de *B. lindeniana*, en esta tesis se decidió utilizar el mismo término para describir a estos últimos. Sáenz Laín (2004). (Lámina 2, Fig. D).

**Retículo:** Tipo de ornamentación constituido por lomos o crestas que se anastomosan y definen areolas o lúmenes conformando una red. En *Histiopteris incisa* (Exosporio). Como resultado de la fusión de lomos en *Dennstaedtia globulifera* (Perisporio). Como resultado de la fusión de crestas en *Hypolepis* (Perisporio). Lellinger (2002).

**Rugulada** (o rugada): Tipo de ornamentación constituida por lomos sinuosos, no paralelos, irregularmente dispuestos, que configuran un arreglo laberíntico sin fusionarse entre sí. En *Paesia glandulosa* y *Dennstaedtia cornuta* (Perisporio). Huang (1981), Punt *et al.* (2007). (Lámina 2, Fig. H).

**Tubérculo:** Elemento positivo más alto que ancho, de forma regular, similar a un botón o perilla, y ápice obtuso o redondeado. En *Paesia glandulosa* e *Histiopteris incisa* (Exosporio). Lellinger (2002).

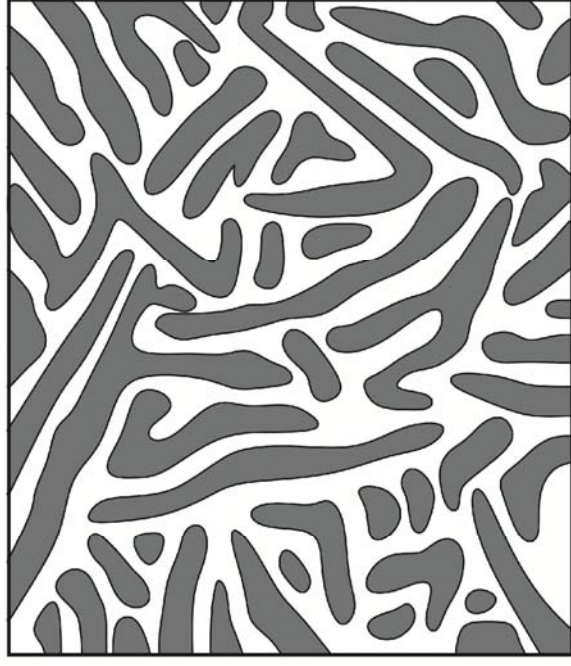
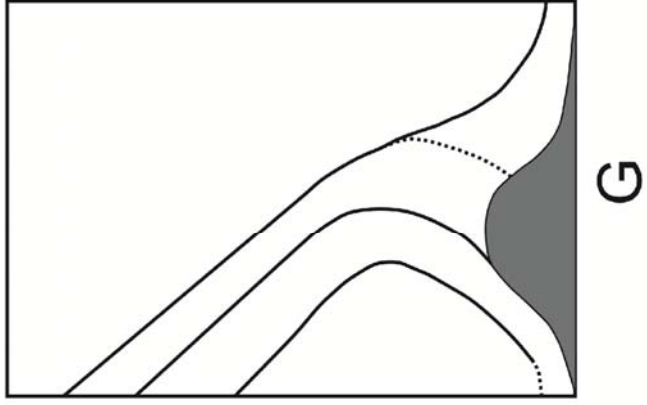
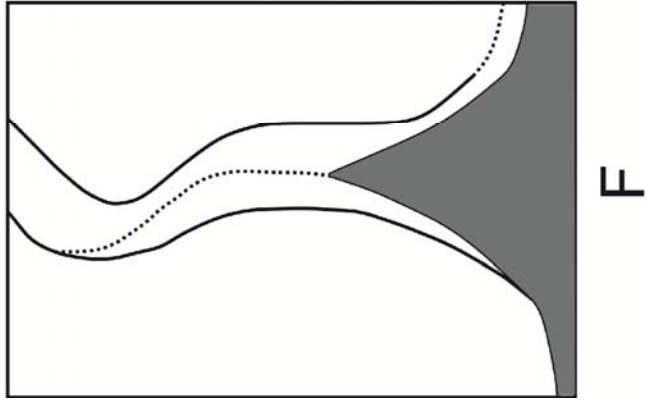
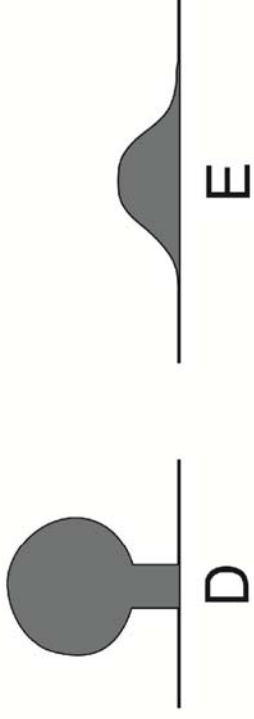
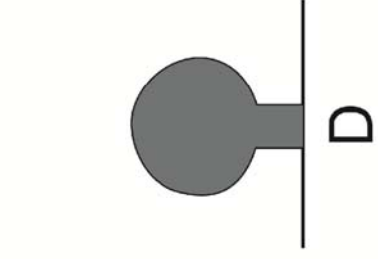
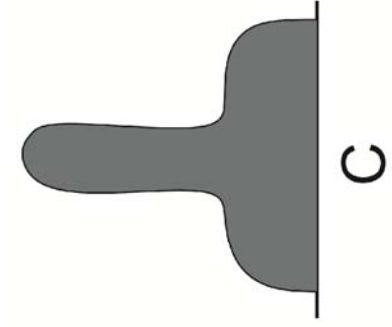
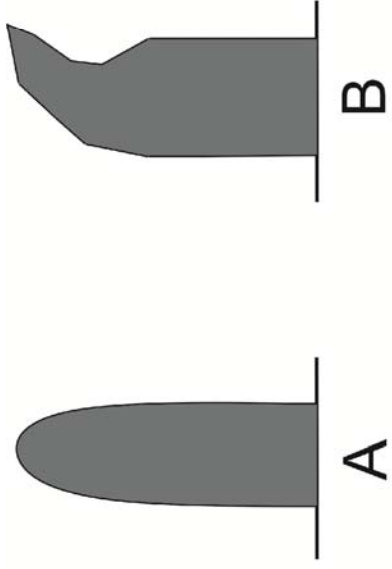
**Trilete:** Espora de simetría radial, con tres lesuras. En *Dennstaedtia*, *Microlepia* y *Pteridium*. Tryon & Tryon (1991), Lellinger (2002), Punt *et al.* (2007).

**Verruga:** Elemento positivo más ancho que alto, de forma irregular, aplanado, de base no estrecha y ápice obtuso a redondeado. *Dennstaedtia* (Perisporio), *Hypolepis rugosula* var *pradoana* e *Histiopteris incisa* (Exosporio). Morbelli (1980), Lellinger (2002), Punt *et al.* (2007). (Lámina 2, Fig. E).

**Lámina 2. Elementos esculturales de la esporodermis.**

**Figura A.** Báculo. **B.** Espina. **C.** Mamelón. **D.** Pila. **E.** Verruga. **F.** Cresta. **G.** Lomo. **H.**

Tipo de ornamentación rugulada (o rugada).



### **3.5. Ilustraciones**

Para las fotografías capturadas al microscopio óptico y lupa binocular se utilizó una cámara Nikon Coolpix S10.

Las fotografías con microscopios electrónicos de barrido y transmisión se capturaron utilizando las cámaras digitales incorporadas a los respectivos equipos.

La edición de las fotografías se realizó a través del programa Corel Photo Paint X6.

Las láminas ilustrativas se elaboraron utilizando el programa Corel Draw X6.

### **3.6. Organización de los resultados**

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, las especies estudiadas fueron agrupadas en grupos morfológicos de esporas, independientemente de su clasificación sistemática.

Este tipo de organización de los resultados está directamente relacionado con los objetivos de esta tesis sobre ampliar el conocimiento palinológico de la familia Dennstaedtiaceae a través del análisis de la morfología y ultraestructura de las esporas para correlacionarlo posteriormente con los grupos taxonómicos existentes y patrones de distribución de los mismos.

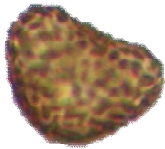
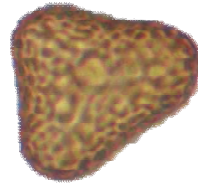
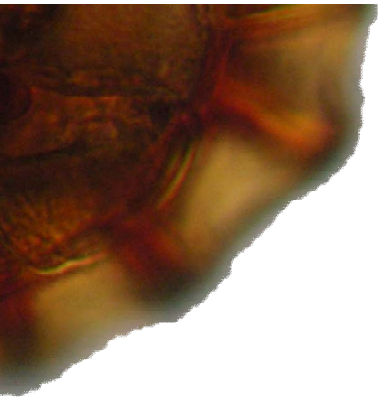
Para la delimitación de los grupos morfológicos se tuvo en cuenta como carácter principal la ornamentación de las esporas y, de forma secundaria, las paredes que participan en su constitución. Debido a que de la morfología externa se extraen los principales caracteres que usualmente los botánicos sistemáticos utilizan en sus asignaciones taxonómicas, agrupar a las especies según la ornamentación de las esporas permitiría probar su utilidad sistemática. Adicionalmente, los caracteres ornamentales superficiales son herramientas frecuentemente utilizadas en las asignaciones paleopalinológicas.

Cada grupo morfológico se definió por un tipo particular de elemento ornamental representativo: verrugas, cordones, báculas, lomos, tubérculos, espinas y crestas. En algunos casos donde se observaron patrones reticulados o rugulados, éstos se hallaron siempre asociados con alguno de los elementos ornamentales mencionados, y fueron interpretados como resultado de la fusión de estos elementos. En este sentido, los elementos

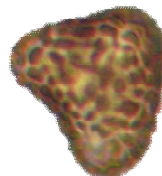
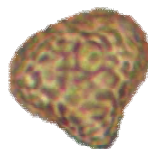
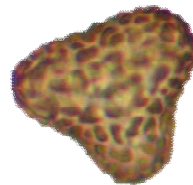
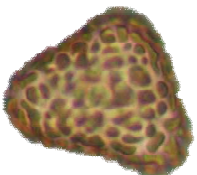
de menor complejidad se tomaron como componentes ornamentales representativos de cada grupo morfológico.

El agrupamiento de taxones según la morfología de las esporas en grupos no sistemáticos también fue propuesta por Soepadmo & Khoo (1977) en su estudio palinológico sobre las especies de Malasia. Los autores reconocieron 7 grupos morfológicos según el tipo de lesura, la presencia de perisporio y la ornamentación del mismo y, posteriormente, contrastaron los resultados con el esquema de clasificación de Holttum (1947, 1949, 1954).





## **4. Resultados**

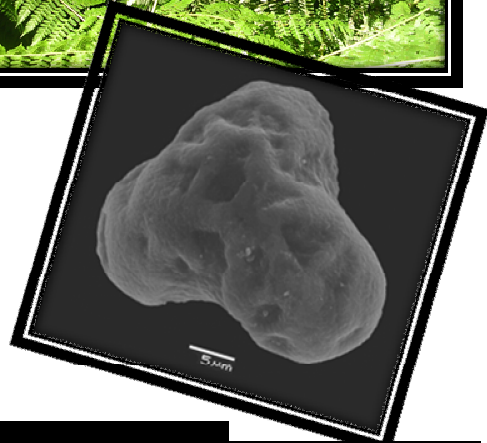
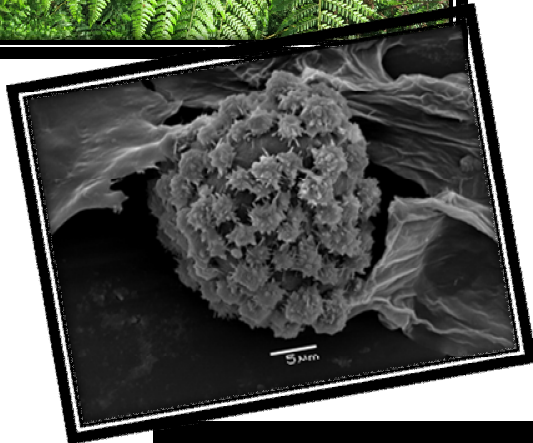


#### 4.1 Géneros con esporas triletes

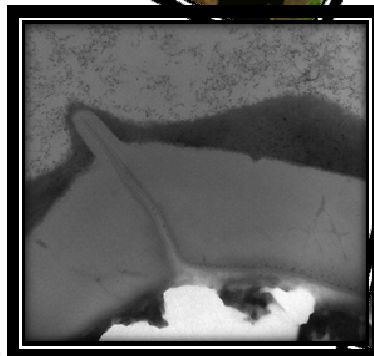
Dentro de la familia Dennstaedtiaceae se identificaron tres géneros que producen esporas triletes, incluidos en dos grupos morfológicos distintos: verrucoso y con cordones.

El grupo morfológico verrucoso está integrado por todas las especies del género *Dennstaedtia*. Estas especies se caracterizan por la presencia de verrugas lisas y ornamentadas constituidas por perisporio, las cuales pueden fusionarse formando lomos y/o retículos.

Las especies pertenecientes al segundo grupo morfológico, *Microlepia speluncae* y *Pteridium arachnoideum*, presentan cordones superficiales formados por el perisporio, orientados en distintas direcciones, que se ramifican y fusionan entre sí para formar redes tridimensionales con diferente grado de complejidad.



# VERRUGAS



#### 4.1.1. Grupo morfológico verrucoso (Láminas 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9)

Este tipo morfológico está presente en todas las especies del género *Dennstaedtia*.

Las esporas son triletes, con ángulos redondeados y lados rectos a cóncavos, triangulares en vista polar (Lámina 3, Fig. A, C, D, F, G-H, J-K). En vista ecuatorial, el polo distal es hemisférico y el polo proximal es plano, excepto en *D. cicutaria* que puede ser convexo (Lámina 3, Fig. B, E, I, L). Las lesuras son rectas y alcanzan  $\frac{3}{4}$  partes del diámetro de la espora.

El perisporio es castaño claro a castaño oscuro al MO, y presenta verrugas que constituyen la ornamentación de las esporas. Al MET el perisporio presenta una o dos capas, y tiene un grosor entre 0,4 y 6,4  $\mu\text{m}$ .

El exosporio es castaño claro al MO, psilado, de margen irregular y tiene un grosor de 0,1-2,7  $\mu\text{m}$ . Presenta dos capas que se observan con MET.

La forma, distribución, ornamentación de la superficie de los elementos ornamentales y grado de fusión de las verrugas distinguen entre sí a las distintas especies de este tipo morfológico.

### ***Dennstaedtia* Bernh.**

Género de ca. 45 especies de regiones tropicales, subtropicales a cálido-templadas de América, este de Asia e Islas del Pacífico Sur. En América se reconocen, hasta el momento, 20-22 taxa (Navarrete & Øllgaard, 2000; Rojas-Alvarado & Tejero-Díez, 2002; Mickel & Smith, 2004), la mayoría con un rango de distribución andino. Crecen en selvas nubladas, claros, bordes de arroyos y zonas de vegetación secundaria.

***Dennstaedtia cicutaria* (Sw.) T. Moore**, Index Filicum 97. 1857.

Basónimo: *Dicksonia cicutaria* Sw. Journal für die Botanik 2: 91. 1801. Tipo: Jamaica, s.d. Swartz s.n. (Holotipo S-R-1478!, Isotipo US 00066384! fragmento y foto ex S-R-1478).

Descripción de esporofito: *Rizoma* de 0,5-1 cm de diámetro, no ramificado, comúnmente subterráneo, pubescente, con tricomas ciliados, articulados, marrón claro. *Peciolos* de 0,6-1,2 m de longitud, castaño oscuros proximalmente, pajizo distalmente, con yemas peciolares que originan raíces en la base, surcados en cara adaxial. *Frondes* de 0,32-2,75- m de longitud, monomórficas. *Láminas* elíptico-lanceoladas, bipinnado-pinnatífidas a tripinnado-pinnatífidas, erectas a arqueadas. *Raquis* marrón-amarillento, surcado, densamente pubescente. *Pinnas* de 2-60 de longitud, 15-30 pares, lanceoladas a lineares, alternas, pecioladas. *Pinnulas* linear-lanceoladas, pecioladas; pinnas basales no reducidas o escasamente reducidas. *Costas* y *cóstulas* abaxialmente pubescentes, sin alas herbáceas perpendiculares en cara adaxial o, si presentes, las alas del lado basiscópico no decurrentes en el eje del siguiente orden de división. *Segmentos* oblongo-lanceolados, pinnatisectos en pinnulas basales. *Venas* pubescentes con tricomas catenados; ápice de venas estériles en cara adaxial delgado. Epidermis abaxial entre venas, pubescente con tricomas aciculares, hialinos. *Soros* redondeados, marginales, naciendo principalmente en los senos; indusios glabros.

Distribución en el área de estudio: ARGENTINA: Provincia de Misiones. BRASIL: Estados de Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo. PARAGUAY: Departamentos de Alto Paraná, Caazapá, Cordillera, Guairá, Caaguazú (Fig. 4). Fuera del

área: Sur de México, Panamá, Grandes Antillas, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y centro y norte de Brasil, noroeste de Argentina.

Hábitat: En bosques y selvas densas o abiertas, principalmente en los márgenes de la vegetación secundaria, o sobre bordes de caminos. Esta especie es pionera en hábitats disturbados y puede volverse invasora al igual que especies del género *Pteridium*. Crece entre los 100–2600 msm.

**Figura 4. Distribución de *Dennstaedtia cicutaria* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Dennstaedtia cicutaria*



Figura 4



### Descripción de las esporas

DP: 19-25-29  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 25-31-37  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 21-27-35  $\mu\text{m}$

Espesor del perisporio: 2,3-6,4  $\mu\text{m}$  incluyendo las verrugas, 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  entre verrugas.

Espesor del exosporio: 0,1-1  $\mu\text{m}$  (alcanza 2,7  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura)

Longitud de la lesura: 7-10  $\mu\text{m}$

Las esporas presentan verrugas de contorno circular a poligonal de 2,3-4,7  $\mu\text{m}$  diámetro, distribuidas al azar en toda la superficie y separadas entre sí por espacios de 0,2-2,3  $\mu\text{m}$  (Lámina 4, Fig. A-D). Al MO, las verrugas son castaño-oscuros mientras que los espacios sin ornamentación contrastan por su coloración castaño-claro a amarillenta (Lámina 3, Fig. A-C). En vista proximal, las verrugas más próximas a las lesiones se disponen en hileras paralelas a las mismas y cubren los extremos (Lámina 4, Fig. A).

La superficie de las verrugas es irregular y presenta espínulas de 0,3-0,7  $\mu\text{m}$  dispuestas de manera uniforme (Lámina 4, Fig. A-D). Adicionalmente, cordones de 0,1-1,3  $\mu\text{m}$  de alto tapizan las verrugas, los que se proyectan en distintas direcciones. Estos pueden fusionarse entre sí en la base o en los extremos (Lámina 4, B-D). Al MO los cordones se distinguen sobre las verrugas como gránulos de color negro.

Ocasionalmente las verrugas se fusionan parcialmente o se conectan por cordones o procesos angostos (Lámina 4, Fig. B-C).

La superficie entre las verrugas es psilada a microverrucosa.

***Dennstaedtia cornuta* (Kaulf.) Mett.**, Annales des Sciences Naturelles; Botanique, sér. 5, 2: 260. 1864.

Basónimo: *Dicksonia cornuta* Kaulf. Enumeratio Filicum 227. 1824. Tipo: Brasil "Sprengel communicavit", *Sello s.n.* (Holotipo B).

Descripción de esporófito: *Rizomas* de 0,5-0,8 cm de diámetro, erecto, raramente rastrero o subterráneo, glabro, con raíces creciendo en los nudos. *Pecíolos* de 2 m de largo, pajizos, lisos o con excrescencias irregulares, deciduas, surcados adaxialmente, sin yemas peciolares en la base, glabros en la base, pubescentes hacia el ápice, con tricomas esparcidos, castaños, catenados, subadpresos a ascendentes. *Frondes* de 0,9-2 m de largo, monomórficas. *Láminas* lanceolada a oval-lanceolada o elíptica, tripinnado-pinnatífidas a tetrapinnadas. *Raquis* adaxialmente surcado; porción lateral y cara abaxial glabra o con tricomas esparcidos catenados, marrones, cara adaxial con abundantes tricomas catenados, marrones. *Pinnas* de 1,6-27,6 cm, 10-25 pares, lanceadas a lineares, opuestas hacia la base, alternas hacia el ápice, sub-sésiles a sésiles. *Pínnulas* lanceadas, sésiles, pínnulas basales reducidas o no. *Cóstulas* sulcadas o no adaxialmente, pubescente o glabra, sin alas herbáceas perpendiculares en cara adaxial. *Segmentos* oblongos, con ápice crenado-redondeado, margen proximal entero y distal crenado. *Venas* pubescentes, con tricomas catenados, castaños, escasos en en cara adaxial, más abundantes en cara abaxial; ápices de venas estériles de la cara adaxial, clavados. Epidermis abaxial pubescente entre venas, con tricomas esparcidos, catenados, castaños a amarillentos. *Soros* alargados, oblongos, a lo largo del margen, naciendo en los senos de lóbulos adyacentes o en el margen anterior de los lóbulos; indusios con forma de copa o bolso, más anchos que largos, membranáceos.

Nota: Los segmentos de las frondes jóvenes en esta especie son similares a aquellos observados para *D. dissecta* y ambas especies pueden ser confundidas en estadios tempranos. No obstante, las características del rizoma y soros son constantes y constituyen una herramienta útil para diferenciarlas.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Estado de Minas Gerais, Rio de Janeiro y Paraná (Fig. 5). Fuera del área: México, América Central, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia.

Hábitat: Selvas húmedas montanas o submontanas, en márgenes de cursos de agua o sobre rocas húmedas junto a cascadas, raramente en espacios abiertos, entre los 200-2500 msm.

**Figura 5. Distribución de *Dennstaedtia cornuta* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Dennstaedtia cornuta*



Figura 5

### Descripción de las esporas

DP: 19-22-27  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 26-34-35  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 25-28-31  $\mu\text{m}$

Espesor del perisporio: 0,4-1,4  $\mu\text{m}$

Espesor del exosporio: 0,4-0,9  $\mu\text{m}$

Longitud de la lesura: 10-14  $\mu\text{m}$

Las esporas presentan verrugas de 0,5-2  $\mu\text{m}$  de diámetro, que usualmente se fusionan formando lomos rectos o sinuosos de 1 x 2-9  $\mu\text{m}$ . La disposición de verrugas y lomos define una ornamentación mixta verrucoso-rugulada (Lámina 4, Fig. E-G). Al MO, las verrugas son castaño-claras mientras que los espacios sin ornamentación contrastan por su coloración amarilla (Lámina 3, Fig. D-F).

En la cara proximal y lados de las esporas se observan verrugas y lomos cortos y rectos, distribuidos sin un ordenamiento definido, separados entre sí por espacios de 0,1-1,4  $\mu\text{m}$  y, en algunos casos, cubriendo parcialmente los extremos de las lesuras (Lámina 4, Fig. E). En la cara distal y ángulos, los elementos de la ornamentación son lomos de mayor longitud, sinuosos, separados entre sí por espacios de 0,1-1  $\mu\text{m}$ . Por su forma y disposición los lomos configuran un arreglo laberíntico. Asimismo, la fusión de lomos define ocasionalmente retículos de areolas pequeñas, de 0,1-0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro (Lámina 4, Fig. F-G).

La superficie de las verrugas es rugosa o verrucosa (Lámina 4, Fig. G).

Pequeños cuerpos esferoidales se distribuyen sobre la superficie (Lámina 4, Fig. G).

Observaciones: Del mismo modo que fue mencionado para *D. cicutaria*, en el análisis al MO existe cierta dificultad para diferenciar el perisporio del exosporio, por lo que los espesores no pueden ser medidos con facilidad utilizando micrómetro filar.

**Lámina 3. Esporas de *Dennstaedtia* de la Provincia Fitogeográfica Paranaense al MO.  
Grupo morfológico verrucoso.**

**Figuras A-C.** *Dennstaedtia cicutaria*. **A.** Espora en vista proximal. **B.** Espora en vista ecuatorial. **C.** Espora en vista distal. La ornamentación es verrucosa. **Figuras D-F.** *Dennstaedtia cornuta*. **D.** Espora en vista proximal. **E.** Espora en vista ecuatorial. **F.** Espora en vista distal. La ornamentación es rugulada. **Figuras G-I.** *Dennstaedtia globulifera*. **G.** Espora en vista distal. **H.** Espora en vista proximal. **I.** Espora en vista ecuatorial. La ornamentación es reticulada. **J.** Espora en vista distal de *Dennstaedtia dissecta*. La ornamentación es verrucoso-lomada. **Figuras K-L.** *Dennstaedtia obtusifolia*. **K.** Espora en vista proximal. **L.** Espora en vista ecuatorial. La ornamentación es verrucosa-lomada. Barra = 10µm.

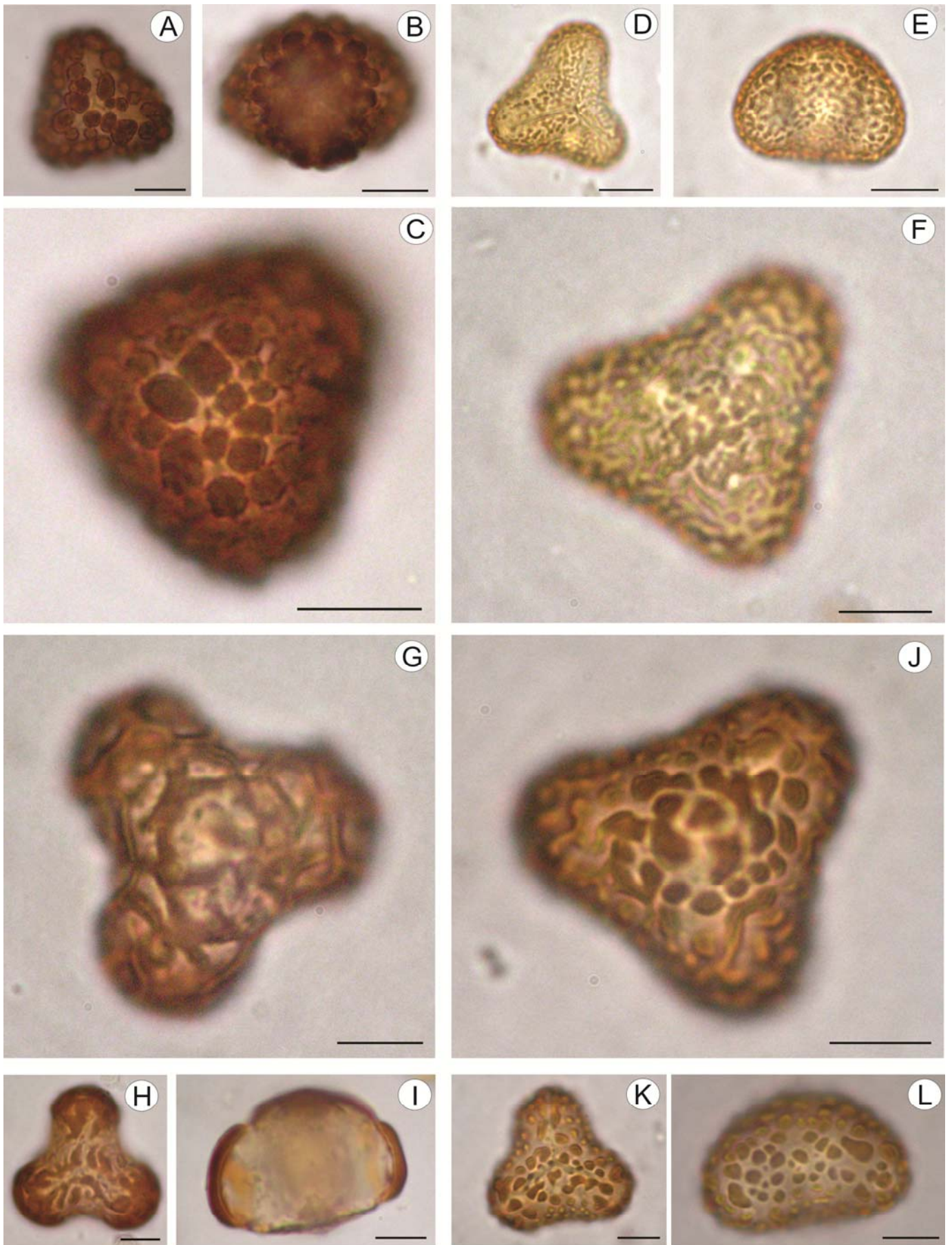


Lámina 3



**Lámina 4. Esporas de *Dennstaedtia cicutaria* y *Dennstaedtia cornuta* al MEB.**

**Grupo morfológico verrucoso.**

**Figuras A-D. *Dennstaedtia cicutaria*.** **A.** Espora en vista proximal. La superficie de las esporas está tapizada por verrugas ornamentadas, de superficie irregular y contorno circular (flechas). Los extremos de las lesuras se encuentran parcialmente cubiertos por las verrugas (círculo). **B.** Espora en vista distal. Las verrugas de la ornamentación se fusionan parcialmente o se conectan por cordones o elementos angostos (círculo). **Figuras C-D.** Detalle de la superficie distal. **C.** Las verrugas están ornamentadas por espínulas dispuestas de manera uniforme (flechas) y tapizadas por cordones que se proyectan en distintas direcciones (puntas de flecha). Las verrugas se conectan por cordones o elementos angostos (círculo). **D.** Los cordones se fusionan entre sí en la base (círculo incompleto) o en los extremos (círculo completo). **Figuras E-G. *Dennstaedtia cornuta*.** **E.** Espora en vista proximal. Se observan verrugas (flechas) y lomos cortos y rectos (puntas de flecha), distribuidos sin un ordenamiento definido. Los elementos de la ornamentación cubren parcialmente los extremos de las lesuras (círculo). **F.** Espora en vista distal. La ornamentación es rugada, los lomos son de mayor longitud, sinuosos, separados por espacios estrechos (puntas de flecha). **G.** Detalle de la superficie distal. Los lomos se fusionan parcialmente y definen retículos de areolas pequeñas (flechas). La superficie de la pared es rugosa o verrucosa (círculo). Cuerpos esferoidales se observan sobre la superficie (puntas de flecha). Barras: **A, F** = 10µm; **B, E** = 5 µm; **C, D y G** = 2 µm.

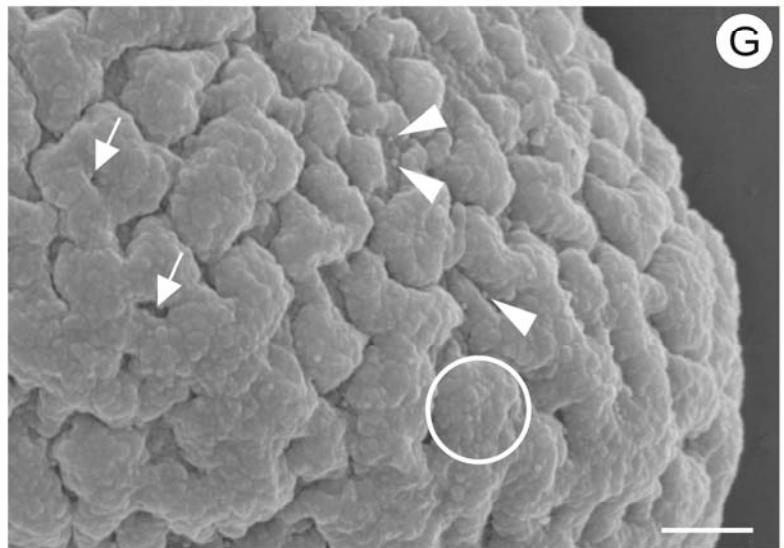
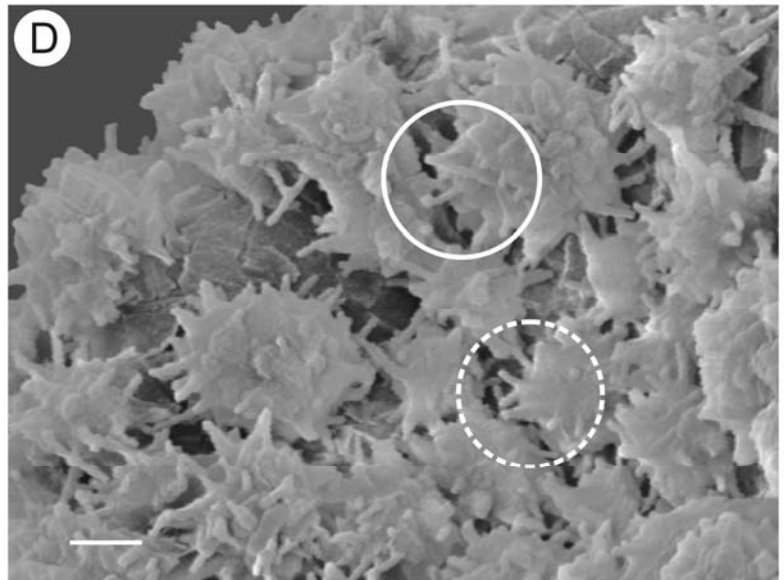
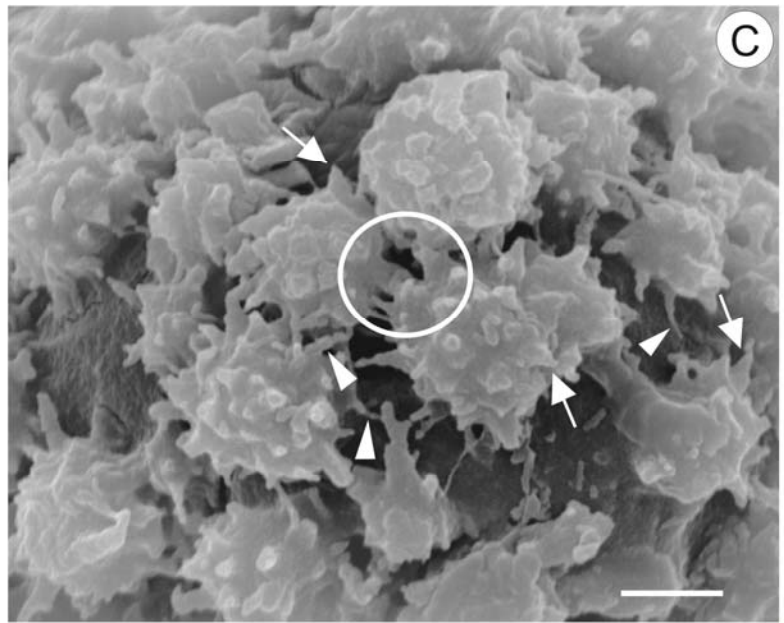
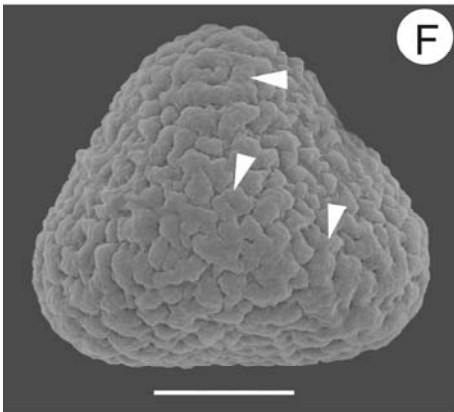
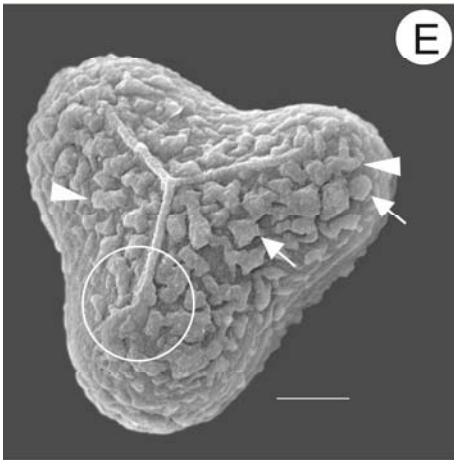
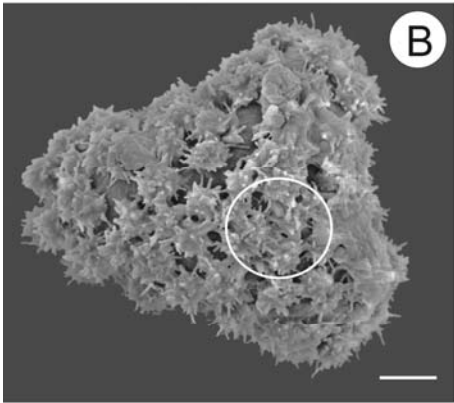
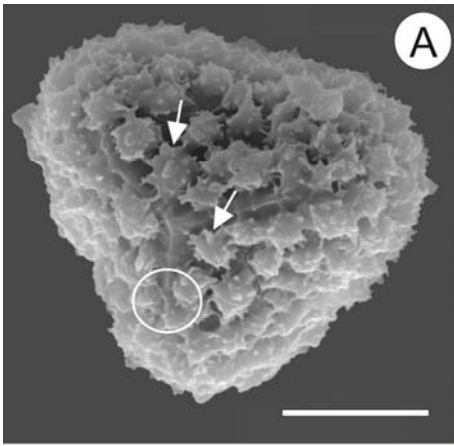


Lámina 4

***Dennstaedtia dissecta* (Sw.) T. Moore**, Index Filicum 305. 1861.

Basónimo: *Dicksonia dissecta* Sw., Journal für die Botanik 2: 91. 1801., nom. nov. para *Polypodium dissectum* Sw., Prodr. 1788: 134, non Forst. 1786. Tipo: Jamaica, s.d., Swartz s.n. (Holotipo S, foto S!, Isotipo BM, fragmento US, foto US!).

Descripción de esporófito: *Rizomas* de 0,3-0,8 cm de diametro, cortamente rastrero o subterráneo, glabro y escabroso, con raíces laterales y ventrales abundantes. *Pecíolos* de 0,5-1,5 m de largo, surcados adaxialmente, con yemas peciolares que originan raíces en la base, pubescente, con tricomas esparcidos, castaños, catenados, subadpresos a ascendentes. *Frondes* de 1,5-3,5 m de largo, monomórficas. *Láminas* ovadas a lanceoladas, tripinnadas en el tercio inferior, bipinnado-pinnatífidas en el tercio superior. *Raquis* adaxialmente surcado, pubescente, con tricomas aciculares, hialinos a castaño claros, abundantes en el surco, en la base de las pinnas y en cara adaxial. *Raquis secundario* adaxialmente surcado, pubescente, con tricomas catenados con células hialinas de paredes transversales rojiza. *Pinnas* de 3-56 cm de largo, 11-24 pares, oblongo-lanceoladas; pinnas basales opuestas a subopuestas, sésiles o cortamente pecioladas, pinnas apicales alternas. *Pínnulas* lanceoladas, sésiles, pínnulas basales reducidas. *Costas* y *cóstulas* abaxialmente pubescentes, sin alas herbáceas perpendiculares en cara adaxial o, si presentes, las alas del lado basiscópico no decurrentes en el eje del siguiente orden de división. *Segmentos* oblongos, con ápices truncado-denticulados a crenado-redondeados, pinnatífidos en pínnulas basales, simples en pínnulas apicales, pinnatilobados en el tercio superior de la lámina. *Venas* pubescentes en ambas caras; ápices de venas estériles de la cara adaxial, clavados. Epidermis abaxial entre venas pubescentes, con pelos cortos, catenados, a veces de ápices blanquecinos, esparcidos. *Soros* redondeados en la madurez, comúnmente naciendo en los senos de lóbulos adyacentes; indusios con forma de copa o bolso, membranáceos.

Nota: Diversos autores mencionan la presencia de yemas axilares en raquis y costas de *D. dissecta* (Navarrete & Øllgaard, 2000; Costa Assis & Salino, 2011). No obstante, dichas estructuras no se observaron en los ejemplares estudiados. Como consecuencia, la aparición

de yemas en esta especie podría deberse a factores medioambientales transitorios, y no a caracteres distintivos de las misma.

Distribución en el área de estudio: ARGENTINA: Provincia de Misiones. BRASIL: Estados de Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro y São Paulo. PARAGUAY: Departamento de Canindeyú, Caaguazú y Caazapá (Fig. 6). Fuera del área: Sur de México, América central, Antillas (Jamaica, La Española y Trinidad) a Colombia, sur de Bolivia y nordeste de Brasil. Potencialmente en provincias del noroeste argentino (ver discusión).

Hábitat: En sotobosque de selvas y bosques húmedos y humbrófilos entre los 30-2600 msm, generalmente al margen de cascadas o cursos de agua.

**Figura 6. Distribución de *Dennstaedtia dissecta* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Dennstaedtia dissecta*



Figura 6

***Dennstaedtia obtusifolia* (Willd.) T. Moore**, Index Filicum 306, 1861.

Basónimo: *Dicksonia obtusifolia* Willd., Species Plantarum. Editio quarta 5: 483. 1810.

Tipo: Venezuela, Caracas, s.d., *Bredemeyer s.n.* (Holotipo B-W-20163!, fragmento LE, foto US).

Descripción de esporófito: *Rizomas* de 0,5-1,8 cm de diámetro, largamente rastreros o subterráneos, glabros y escabrosos, con raíces laterales y ventrales abundantes. *Fronde*s de 1,4-4 m de largo, monomórficas. *Peciolos* de 0,5-1 m de largo, surcados adaxialmente, con yemas peciolares que originan raíces en la base, glabros o escasamente pubescentes, con tricomas castaños, catenados. *Láminas* deltoides a ovado-lanceoladas, bipinnado-pinnatífidas a tripinnadas en el tercio inferior, pinnado-pinnatífidas en el tercio superior. *Raquis* adaxialmente surcado y pubescente en ambas caras, con tricomas catenados, aciculares, marrones, abundantes en el surco y en la base de las pinnas. *Raquis secundario* surcado adaxialmente, pubescente en ambas caras, con tricomas similares a los del raquis primario, a veces castaño claro. *Pinna*s de 0,5-56 cm de long., 16-29 pares, ovado-lanceoladas, pecioladas, las apicales alternas, las basales opuestas a subopuestas, ocasionalmente con yemas axilares. *Pínnulas* lanceoladas, pecioladas. *Costas* y *cóstulas* sin alas herbáceas perpendiculares en cara adaxial o, si presentes, las alas del lado basiscópico no decurrentes en el eje del siguiente orden de división. *Segmentos* oblongos, de base adnata y ápice redondeado, crenado a dentado, pinnatífidos en pínnulas basales, simples en pínnulas apicales, sinuados a simples en el tercio superior de la lámina. *Venas* pubescentes, con tricomas catenados, castaños, abundantes en cara abaxial, escasos o ausentes en cara adaxial, ápices de venas estériles de la cara adaxial, clavados. Epidermis abaxial entre venas pubescentes, glabro o con pelos similares a los de las venas. *Soros* redondeados en la madurez, comúnmente naciendo en los senos de lóbulos adyacentes; indusios con forma de copa o bolso, membranáceos.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Estados de Paraná, Río Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro y São Paulo. PARAGUAY: Departamento de Central, Cordillera, Misiones y Paraguari (Fig. 7). Fuera del área: América Central, Antillas

mayores (excepto Cuba) y menores, Venezuela, Colombia, Ecuador, sur de Perú, sur de Bolivia y nordeste de Brasil.

Hábitat: Sotobosque y laderas de selvas húmedas, claros y bordes de selvas, entre los 100-2100 msm.



**Figura 7. Distribución de *Dennstaedtia obtusifolia* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Dennstaedtia obtusifolia*



Figura 7

### Descripción de las esporas

Las esporas de *D. dissecta* y *D. obtusifolia* no presentaron diferencias en cuanto al patrón de distribución de las verrugas y los lomos. Es por ello que se provee una única descripción para ambas especies (Tabla 1).

**Tabla 1. Diámetros observados en esporas de *Dennstaedtia dissecta* y *Dennstaedtia obtusifolia*.**

	<i>D. dissecta</i>	<i>D. obtusifolia</i>
DP	17-25-29	21-26-35
DE <sub>1</sub>	25-32-42	28-31-46
DE <sub>2</sub>	25-31-40	23-31-41
Espesor del perisporio	0,04-1,1 (1,7 en la zona de las verrugas)	0,5-1,1 (1,9 en la zona de las verrugas)
Espesor del exosporio:	0,2-0,8 (1,3-2,1 en la zona de la lesura)	0,4-1,3
Longitud de la lesura	7-17	7-16

Referencias: DP = Diámetro polar. DE<sub>1</sub> = Diámetro ecuatorial mayor. DE<sub>2</sub> = Diámetro ecuatorial menor.

El perisporio presenta verrugas de distinto tamaño de 1-3  $\mu\text{m}$  de diámetro que usualmente se fusionan para formar lomos de 1-2 x 2-10, rectos u ocasionalmente sinuosos, con márgenes redondeados o aplanados (Lámina 5, Fig. A-C). Al MO, las verrugas y lomos son castaños mientras que los espacios sin ornamentación contrastan por su coloración castaño-clara a amarillenta (Lámina 3, Fig. J-L). Los elementos de la ornamentación se distribuyen en toda la superficie de las esporas sin un ordenamiento definido, separados entre sí por espacios de 0,2-3,1  $\mu\text{m}$ . En el polo proximal, las verrugas y lomos adyacentes a las lesuras se disponen paralelos a las mismas y las pueden cubrir parcialmente (Lámina 5, Fig. C).

La superficie de la espora es lisa, rugosa o granulada. Se observan cuerpos esferoidales dispersos (Lámina 5, Fig. A, C).

El exosporio presenta una superficie lisa a rugosa (Lámina 7, Fig. C).

***Dennstaedtia globulifera* (Poir.) Hieron.**, Botanische Jahrbücher für Systematik 34: 455. 1904.

Basónimo: *Polypodium globuliferum* Poir. Encyclopédie Méthodique, Botanique 5: 554. 1804. Tipo: Hispaniola s.d. (Holotipo: Plumier 1705: tab. 30).

Descripción de esporófito: *Rizomas* de 0,5-1,8 cm de diámetro, largamente rastrero o subterráneo, densamente pubescente con tricomas catenados, castaño-dorados; raíces ventrales. *Frondes* de 1-4 m de largo, monomórficas. *Pecíolos* de 0,5-1 m de largo, surcados adaxialmente, pajizos, con tricomas catenados, aciculares, castaños, ascendentes en la base, glabros en porciones media y distal. *Láminas* ovado-lanceoladas, tripinnadas en tercio inferior, bipinnado-pinnatífidas en el tercio superior. *Raquis* surcado adaxialmente, surcos pubescentes con tricomas catenados, castaños, glabros abaxialmente. *Raquis secundario* surcado, pubescente abaxial y adaxialmente con tricomas catenados castaños. *Pinnas* de 1,2-58 cm de largo, 10-29 pares, alternas, elípticas o lanceoladas. *Pínnulas* lanceadas, pecioluladas. *Cóstulas* adaxiales bordeadas a cada lado por un ala herbácea, el ala del lado basiscópico, decurrente en el eje del siguiente orden de división. *Segmentos* oblongos, crenados, pinnatifidos en pínnulas basales. *Venas* pubescentes abaxialmente, con tricomas catenados, castaños, el ápice de las venas estériles adaxiales delgado. Epidermis abaxial y adaxial entre venas glabro. *Soros* redondeados, en el seno entre lóbulos de los segmentos acroscópicos; indusios globosos, algo más largos que anchos, membranáceos, con forma de copa o bolso.

Distribución en el área de estudio: ARGENTINA: Provincia de Misiones. BRASIL: Estados de Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro y São Paulo. PARAGUAY: Departamentos de Caazapá, Canindeyú y Cordillera (Fig. 8). Fuera del área: Sur de México, América Central y Antillas mayores, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Uruguay, nordeste de Brasil y noroeste y norte de Argentina.

Hábitat: En selvas húmedas primarias y secundarias, bordes de selvas, laderas húmedas, barrancos boscosos y márgenes de arroyos. Entre los 50-2400 msm.

**Figura 8. Distribución de *Dennstaedtia globulifera* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Dennstaedtia globulifera*



Figura 8

### Descripción de las esporas

DP: 17-21-27  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 24-32-39  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 21-27-34  $\mu\text{m}$

Espesor del perisporio: 0,4-2,3  $\mu\text{m}$  en las verrugas 0,1-0,3 entre las verrugas

Espesor del exosporio: 0,1-1,4  $\mu\text{m}$  (alcanza 2,1  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura)

Longitud de la lesura: 6-16  $\mu\text{m}$

El perisporio presenta verrugas de 0,7-3,7  $\mu\text{m}$  de diámetro que usualmente se fusionan para formar lomos anchos, de 1-5 x 3-12  $\mu\text{m}$  y márgenes redondeados (Lámina 5, Fig. D-G). Al MO, las verrugas y lomos son castaños mientras que los espacios sin ornamentación contrastan por su coloración castaño-clara a amarillenta (Lámina 3 Fig. G-I).

En el polo proximal, las lesuras son crasimarginadas, los lomos se disponen paralelos a las mismas (Lámina 5, Fig. E). En la zona ecuatorial las verrugas y lomos cortos se distribuyen sin un ordenamiento particular (Lámina 5, Fig. F). La superficie distal está cubierta por lomos generalmente rectos, que forman un retículo de muros anchos y grandes areolas de 1,6-5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Lámina 5, Fig. D). El mayor grado de fusión de los lomos se observa en los ángulos, donde forman casquetes que pueden cubrirlos por completo (Lámina 5, Fig. F). Al MO, el perisporio se observa muy engrosado en esa zona (Lámina 3, Fig. I).

La superficie del perisporio es lisa, rugosa o granulada. El exosporio presenta una superficie lisa a granulada (Lámina 8, Fig. B).

Se observan cuerpos esferoidales de distinto tamaño dispersos en toda la superficie de las esporas (Lámina 5, Fig. G).



**Lámina 5. Esporas de *Dennstaedtia dissecta*, *Dennstaedtia obtusifolia* y *Dennstaedtia globulifera* al MEB.**

**Grupo morfológico verrucoso.**

**A.** *Dennstaedtia dissecta*. Espora en vista proximal. La espora está tapizada por verrugas (flechas) y lomos (puntas de flecha) distribuidos sin un ordenamiento definido. Cuerpos esferoidales de distintos tamaños se observan dispersos sobre la superficie (círculo). **B.** *Dennstaedtia obtusifolia*. Espora en vista distal. La ornamentación es verrucoso-lomada. Los lomos tienen longitud variable, son rectos u ocasionalmente sinuosos, con márgenes redondeados o aplanados (flechas). **C.** *Dennstaedtia dissecta*. Detalle de una espora en vista proximal. Las verrugas y lomos adyacentes a las lesuras se disponen paralelos a las mismas y las cubren parcialmente (flechas). Cuerpos esferoidales de distintos tamaños se observan dispersos sobre la superficie (puntas de flecha). **Figuras D-G.** *Dennstaedtia globulifera*. **D.** Espora en vista distal. La ornamentación es reticulada, con rectos y anchos muros (flechas) y grandes areolas (puntas de flecha). **E.** Espora en vista proximal. La ornamentación es verrucoso-lomada. Las lesuras son crasimarginadas y los lomos se disponen paralelos a las mismas (flecha). **F.** Espora en vista ecuatorial. La ornamentación es verrucoso-reticulada. Verrugas y lomos se distribuyen sin un ordenamiento definido en los lados (flechas). Los lomos se fusionan y forman retículos o cubriendo por completo los ángulos (punta de flecha). **G.** Detalle de una espora en vista proximal. Cuerpos esferoidales de distintos tamaños se distribuyen sobre la superficie (flechas). Barras: **B y E** = 10 $\mu$ m; **A, D y F** = 5 $\mu$ m; **C y G** = 2 $\mu$ m.

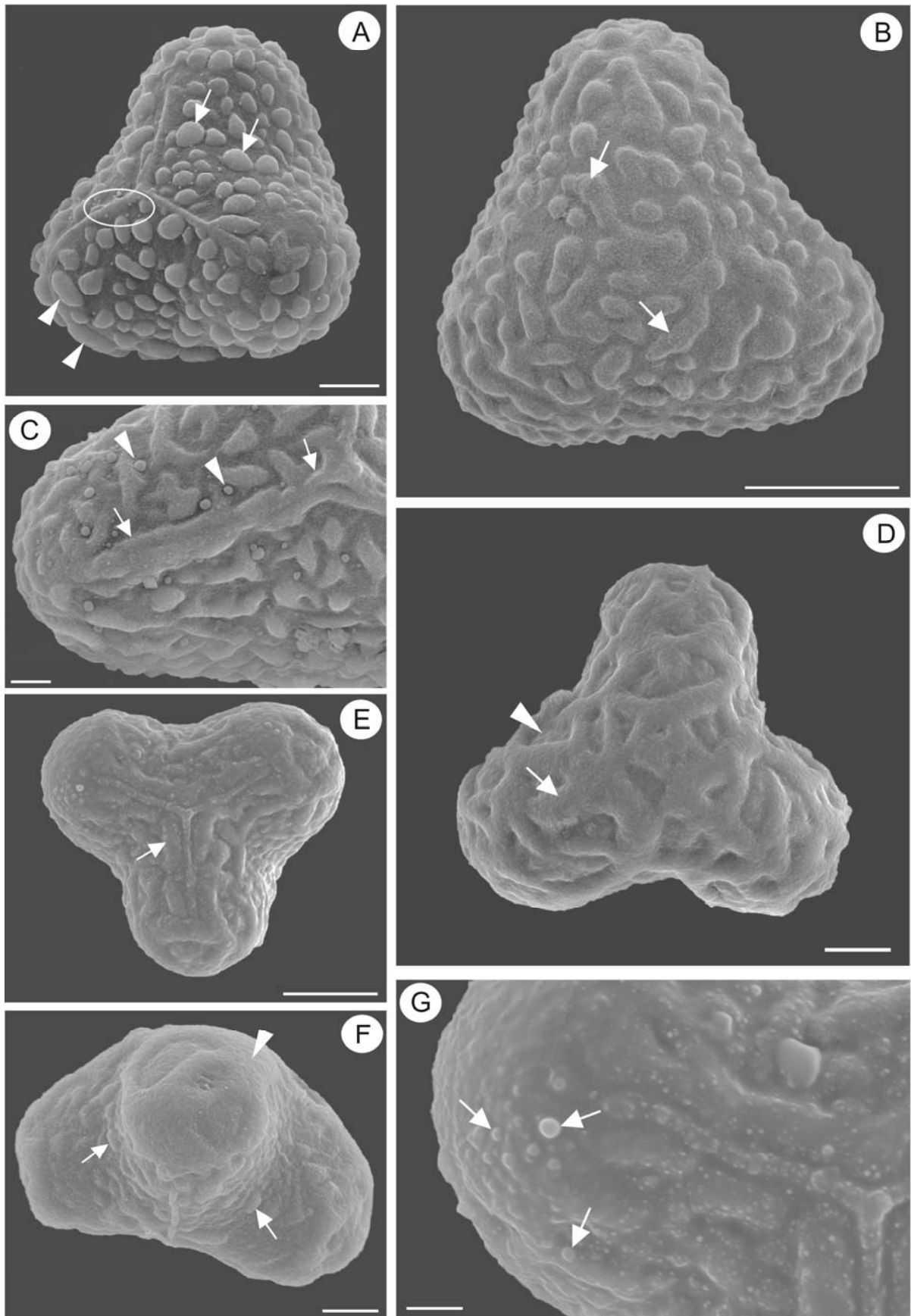


Lámina 5

## **Ultraestructura**

En todas las especies estudiadas bajo el tipo morfológico verrucoso, se observa con MET un exosporio con dos capas. La capa interna (Ei) tiene un grosor de 10-70 nm, baja electrodensidad, estructura homogénea se distingue fácilmente a los lados en las lesuras (Lámina 6, Fig. A-C; Lámina 8, Fig. A). La capa externa (Ee) es más gruesa que la anterior, tiene 0,1-1,4  $\mu\text{m}$  de grosor (2,7  $\mu\text{m}$  a la altura de la lesura) y está formada por dos estratos: el estrato interno (Ee<sub>2</sub>), donde se observan canales cortos, fisuras y cavidades en toda su extensión, y el estrato externo (Ee<sub>1</sub>) que es más grueso que el anterior, posee una estructura homogénea y margen irregular (Lámina 6, Fig. A, C; Lámina 8, Fig. A). En Ee<sub>1</sub> se observan cavidades y canales rellenos con contenido electrodensito, los cuales se ramifican y anastomosan formando una red (Lámina 8, Fig. A). Estos canales son más frecuentes en las lesuras, tienen continuidad hacia el interior de la pared con los canales y fisuras del estrato interno y se conectan hacia el exterior con el perisporio (Lámina 6, Fig. A).

El perisporio (P) es más electrón-denso que el exosporio y posee estructura microalveolar. Presenta una notable variación en el grosor debido a que constituye los elementos de la ornamentación. La porción más delgada, de 40 nm, se observa en el ápice de la cresta apertural (Lámina 6, Fig. A), mientras que el mayor espesor se observa a la altura de las verrugas y lomos y puede alcanzar los 6,4  $\mu\text{m}$  (Lámina 7, Fig. A; Lámina 8, Fig. A, C). Asimismo, en *D. cicutaria* las verrugas del perisporio poseen una base estrecha que se ensancha para conformar el cuerpo de las mismas y, en algunos casos, se encuentran unidas entre sí a través de procesos similares a “puentes” de distintos espesores (30-700 nm) (Lámina 9, Fig. C-D).

En *D. dissecta* y *D. globulifera* el margen del perisporio presenta una estructura más laxa, menos electrodensa que el resto de la pared, y adquiere un aspecto “deshilachado” (flayed) (Lámina 6, Fig. A; Lámina 7, Fig. A; Lámina 8, Fig. A). En estas especies el contorno de las verrugas es liso. En contraposición, en *D. cicutaria*, las verrugas tienen un contorno irregular por la presencia de espínulas de 0,3-0,7  $\mu\text{m}$  (Lámina 9, Fig. A-C).

Adicionalmente, en esta última especie pueden observarse sobre las verrugas, pequeños cordones de 0,1-0,5 x 0,2  $\mu\text{m}$  que se proyectan en distintas direcciones (Lámina 9, Fig. A, C-D).

Hacia el interior del perisporio se definen espacios de forma y tamaño variable. En *D. dissecta* y *D. globulifera* estos espacios se encuentran rellenos con contenido de alta densidad a los electrones (Lámina 8, Fig. A, C) mientras que en *D. cicutaria* se observan cavidades vacías bien delimitadas (Lámina 9, Fig. A, C).

En *D. cicutaria* el perisporio presenta una segunda capa delgada (Pe), homogénea y discontinua, que tapiza la superficie del perisporio interno (Pi) (Lámina 9, Fig. B).

Tanto en *D. cicutaria* como en *D. dissecta* se observan cuerpos esferoidales dentro del perisporio con una estructura interna semejante a la del exosporio (Lámina 7, Fig. B; Lámina 9, Fig. E). En esta última especie se observó una mayor cantidad de cuerpos esferoidales en aquellas esporas donde las verrugas de la ornamentación resultaron estar menos definidas (Lámina 6, Fig. B).

**Lámina 6. Esporas de *Dennstaedtia dissecta* al MET.**

**Grupo morfológico verrucoso.**

**A.** Sección de la esporodermis a través de la lesura. La capa interna del exosporio (Ei) es evidente en la base de la lesura y presenta estructura homogénea. La capa externa está formada por dos estratos: el interno (Ee<sub>2</sub>) presenta cavidades con material electrón-denso en su interior y el externo (Ee<sub>1</sub>) tiene estructura homogénea y margen irregular (círculo). Canales atraviesan el Ee<sub>1</sub> y se conectan hacia el exterior con el perisporio (flecha). El perisporio (P) posee estructura microalveolar y hacia el margen presenta una estructura más laxa, levemente menos electrón-densa que el resto de la pared (asterisco). **B.** Sección de la esporodermis a través de la lesura en una espora probablemente inmadura. Se observan cuerpos esferoidales dentro del perisporio (P) con una estructura interna que es semejante a la del exosporio (flechas). El margen del perisporio tiene una estructura alveolar laxa (asterisco). Ee = exosporio externo. Ei = exosporio interno. **C.** Sección de la esporodermis en la base de la lesura. El estrato externo del exosporio (Ee<sub>1</sub>) presenta canales (flechas) y cavidades (puntas de flecha) con material electrón-denso en su interior que tienen a su vez continuidad con el estrato interno (Ei). Barras = 0,2 μm.

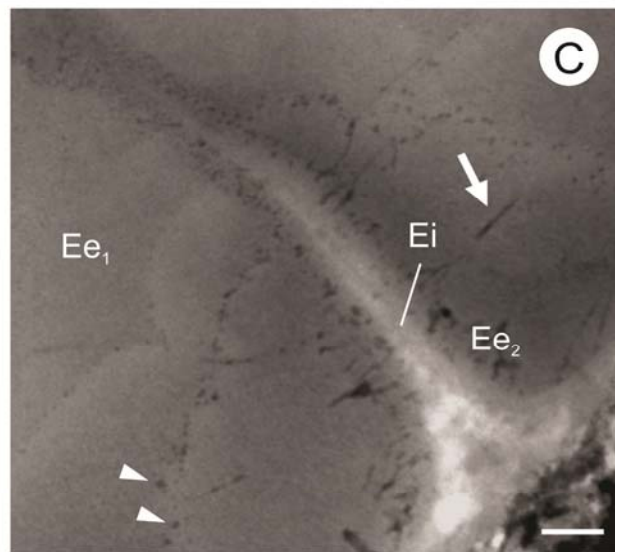
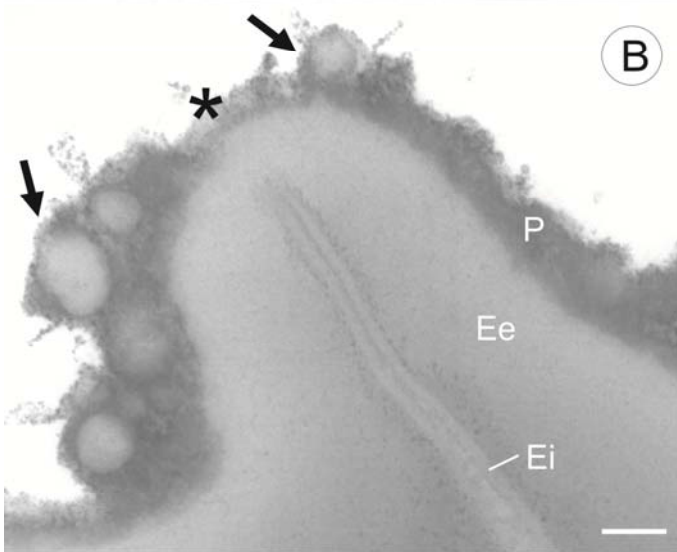
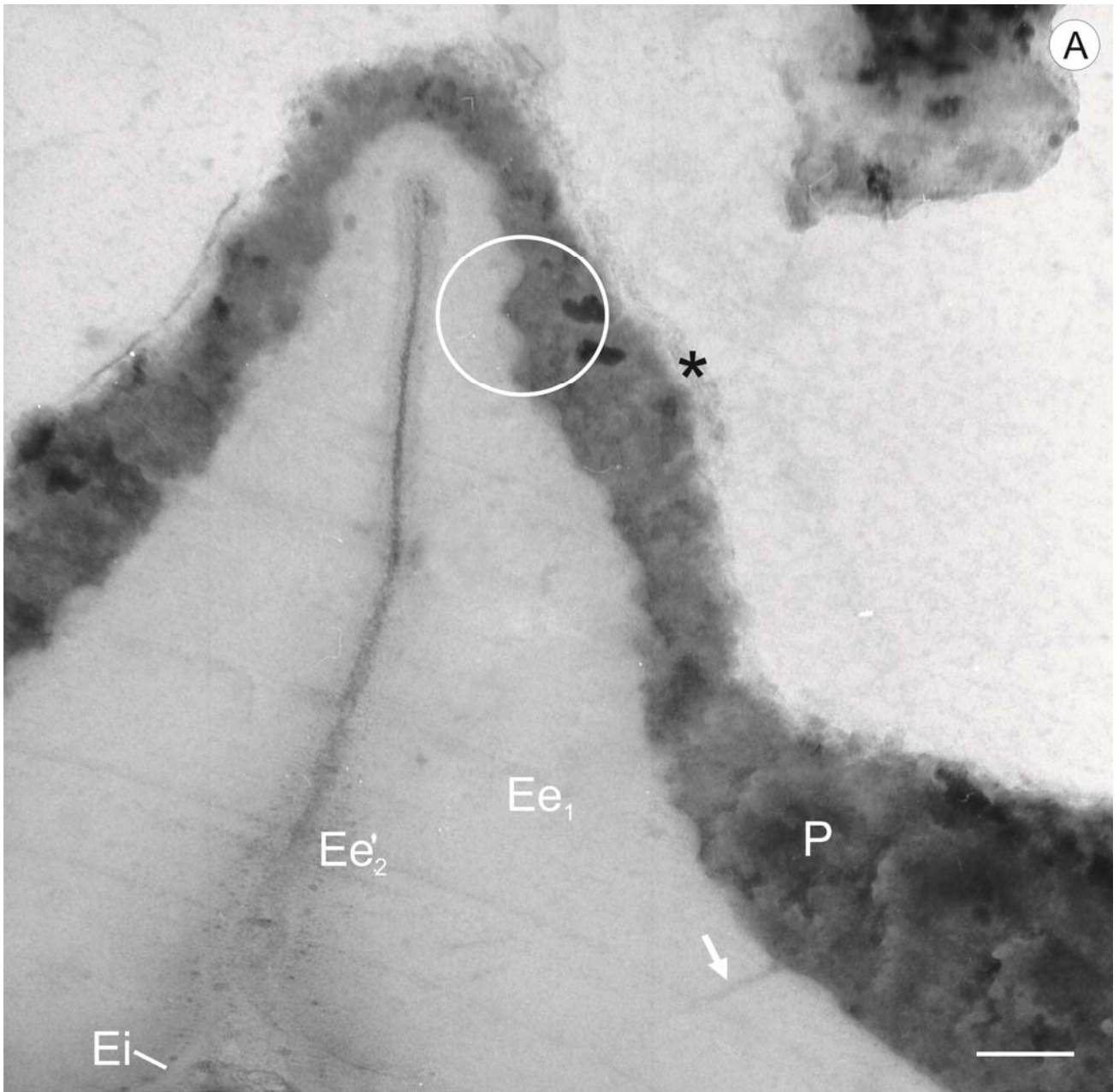


Lámina 6

**Lámina 7. Esporas de *Dennstaedtia dissecta* al MEB y MET.**

**Grupo morfológico verrucoso.**

**Figuras A-B.** Sección a través de la esporodermis. **A.** El exosporio es homogéneo de margen irregular (E). El perisporio (P) tiene variaciones en el espesor y constituye verrugas (asteriscos). La estructura es alveolar y es más laxa hacia el margen exterior, donde la pared presenta un aspecto “deshilachado” (flechas). **B.** Espora probablemente inmadura. El perisporio (P) tiene estructura alveolar y presenta espacios con material electrón-denso en su interior (puntas de flechas). Se observan cuerpos esferoidales sobre la superficie, rodeados de material similar al del perisporio con una estructura interna que es semejante a la del exosporio (flechas). E = Exosporio. **C.** Fractura del perisporio en vista proximal al MEB. El exosporio presenta una superficie lisa (E). Perisporio = P. Barras: **A** = 1  $\mu\text{m}$ ; **B** = 0,1  $\mu\text{m}$ ; **C** = 2  $\mu\text{m}$ .

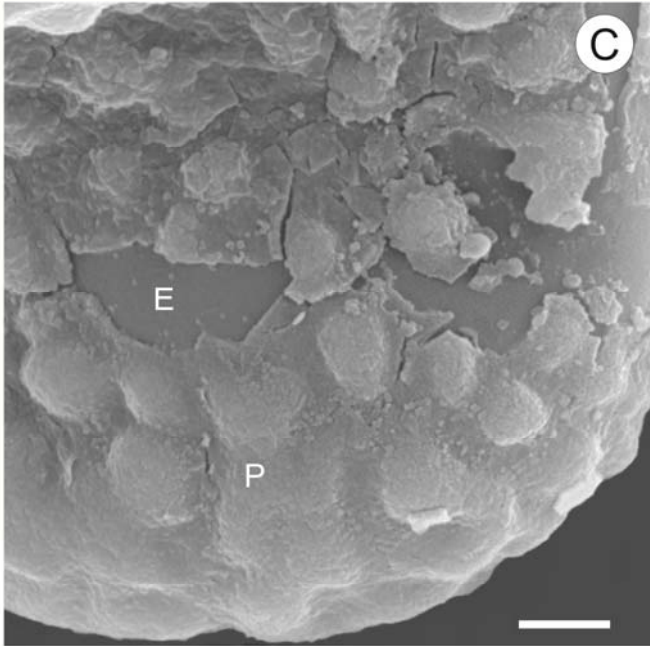
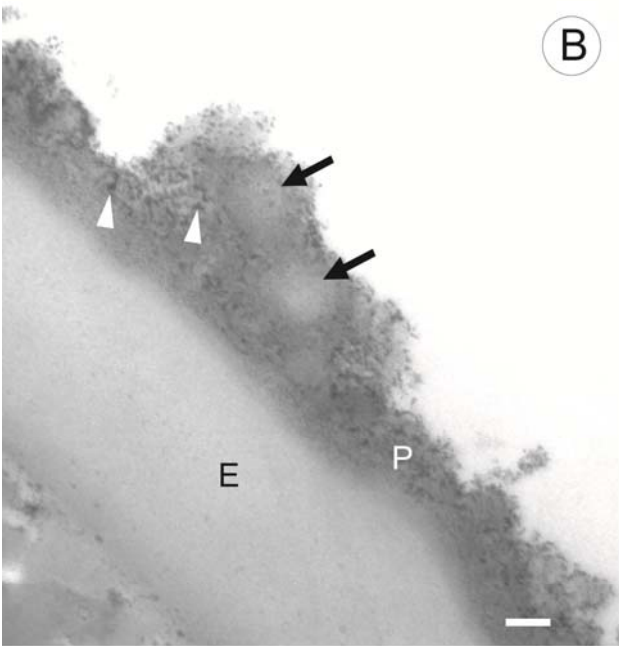
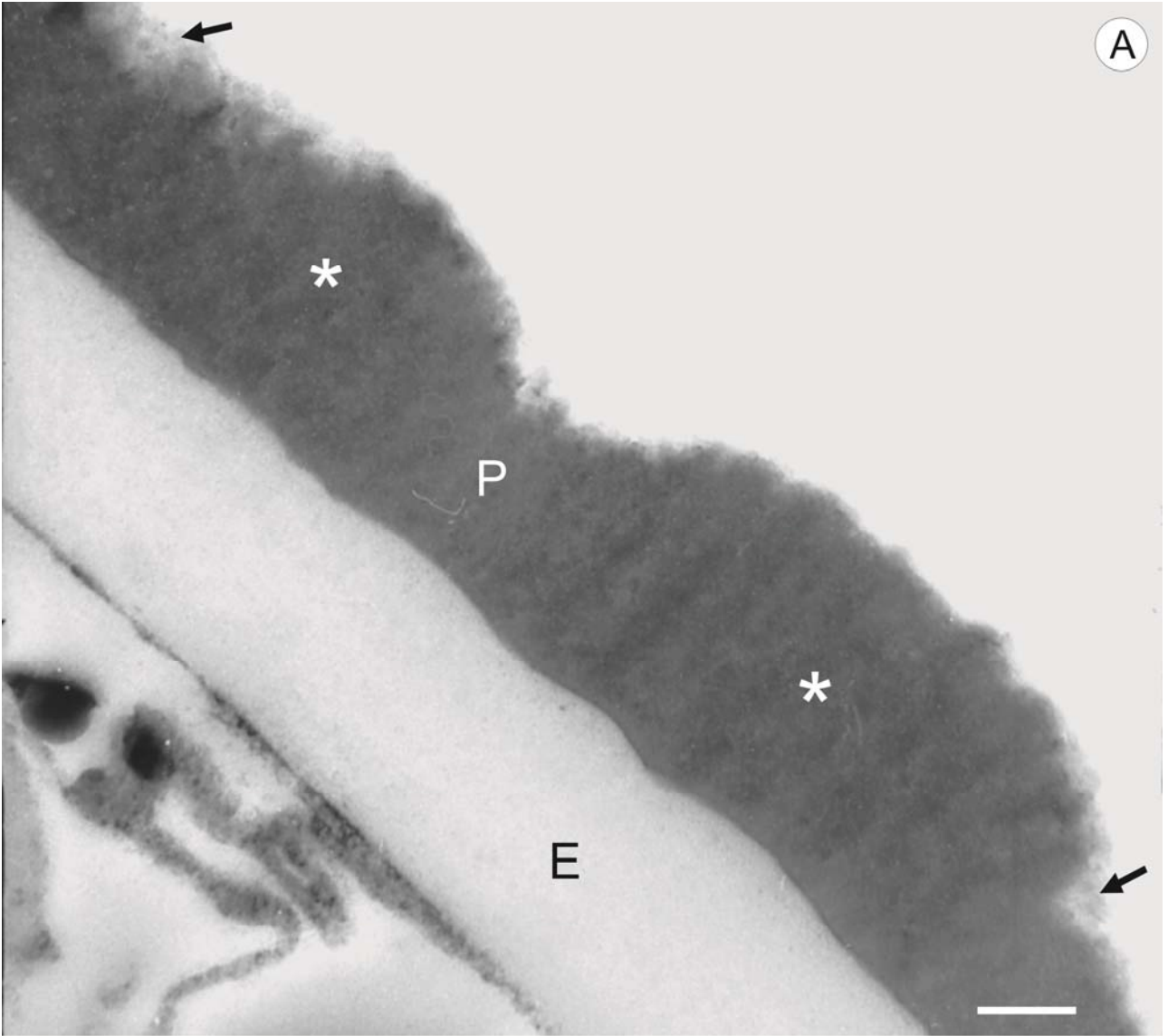


Lámina 7



**Lámina 8. Esporas de *Dennstaedtia globulifera* con MEB y MET.**

**Grupo morfológico verrucoso.**

**A.** Sección de la pared al MET. El exosporio interno (Ei) tiene estructura homogénea y baja densidad a los electrones. El estrato interno del exosporio externo (Ee<sub>2</sub>) presenta pequeños canales y fisuras con material electrón-denso en su interior. El estrato externo (Ee<sub>1</sub>) tiene estructura homogénea y está atravesado por canales que se ramifican y anastomosan formando una red (flechas) y tienen continuidad con el perisporio (P). El perisporio presenta variaciones en el espesor y constituye verrugas. Tiene estructura alveolar con espacios que presentan material denso a los electrones (puntas de flecha) y un margen “deshilachado” (asterisco). **B.** Fractura del perisporio en vista proximal con MEB. El exosporio presenta una superficie irregular (E). P = Perisporio. **C.** Sección de la pared al MET en uno de los ángulos de la espora. El perisporio presenta un mayor grosor en el ángulo de la espora. Se observan espacios con material electrón-denso en su interior (puntas de flecha) que forman parte de la estructura microalveolar. Barras: **A** = 0,2 μm; **B** = 1 μm; **C** = 0,5 μm.

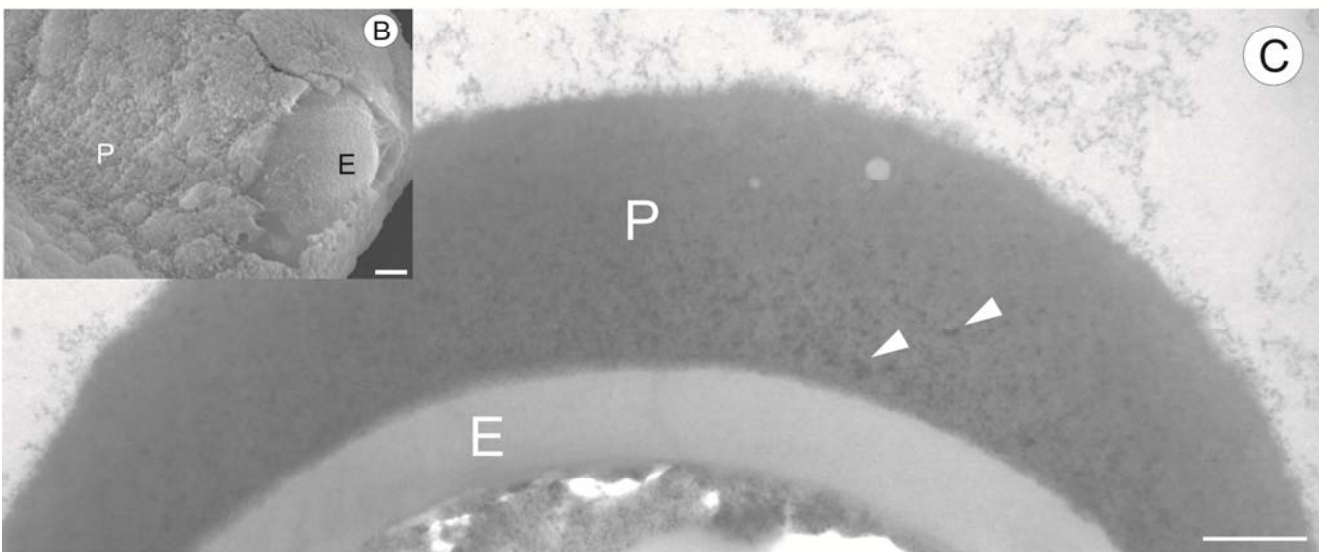
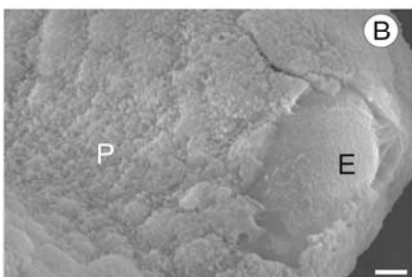
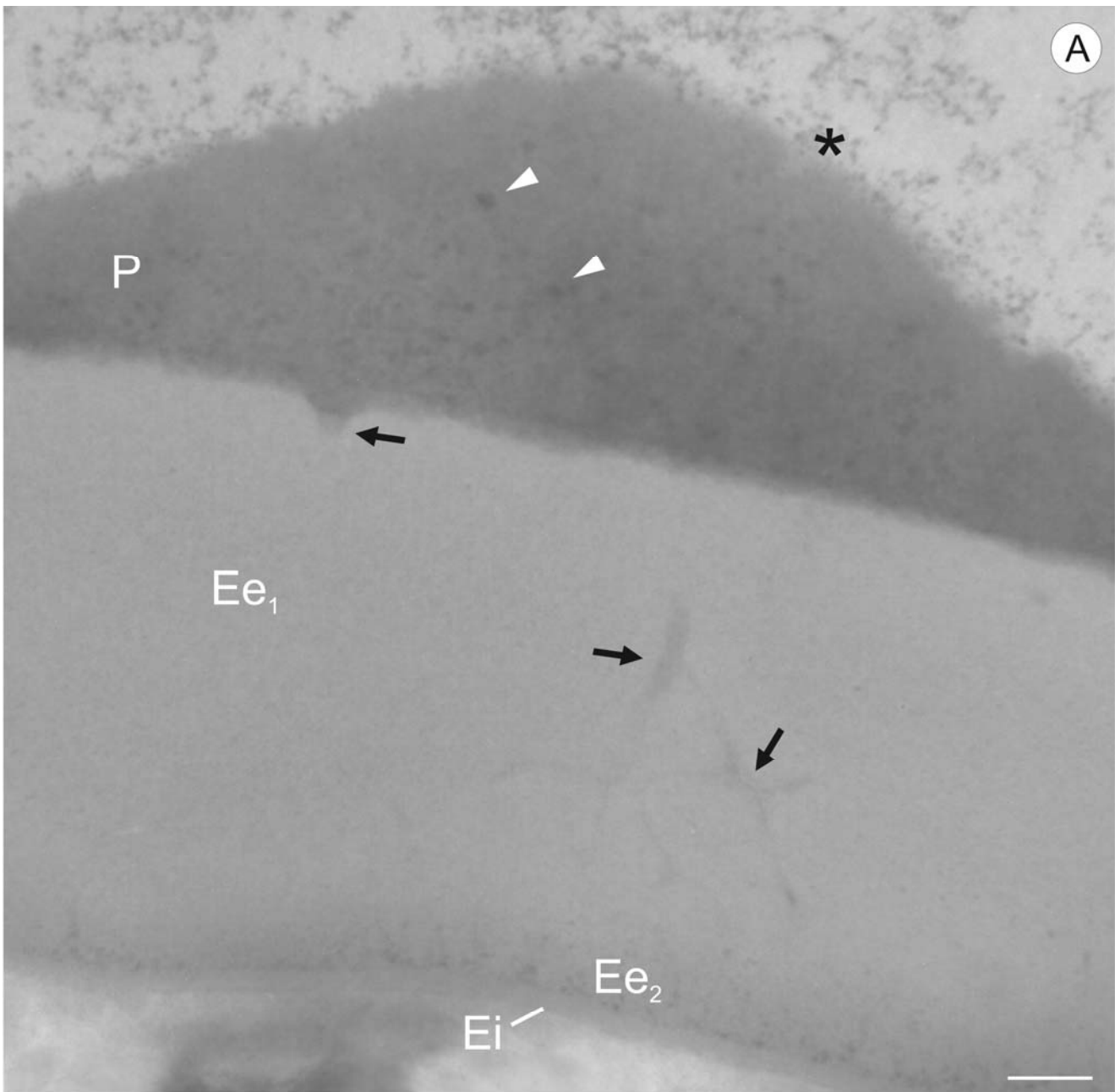
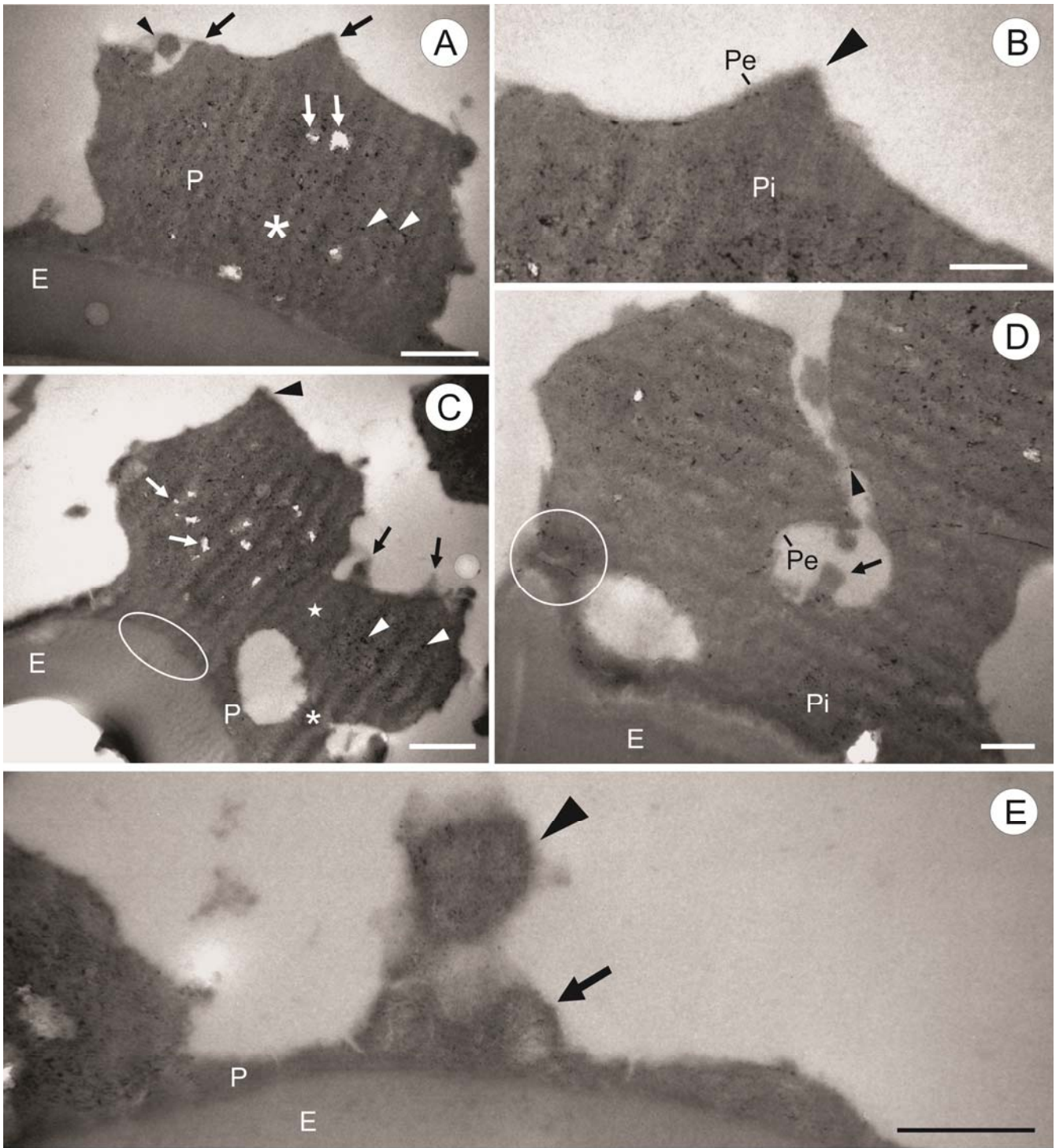


Lámina 8

**Lámina 9. Esporas de *Dennstaedtia cicutaria* con MET.**

**Grupo morfológico verrucoso.**

**Figuras A-E.** Sección de la pared al MET. **A.** El perisporio (P) constituye verrugas (asterisco) de contorno irregular definido por la presencia de espínulas (flechas negras). Presenta estructura microalveolar con cavidades (flechas blancas) y espacios con material electrón-denso en su interior (puntas de flecha blancas). Se observan cuerpos esferoidales de material similar al perisporio sobre la superficie (puntas de flecha negras). **B.** Detalle de la fig. A. La capa externa del perisporio (Pe) es discontinua y tiene estructura homogénea. Pi = Perisporio interno. **C.** El exosporio (E) presenta un margen irregular (círculo). Las verrugas del perisporio presentan una base estrecha (asteriscos) y se fusionan por procesos angostos (estrellas). Sobre las verrugas se proyectan en distintas direcciones pequeños cordones (flechas). Espacios con material electrón-denso (puntas de flechas blancas) y cavidades (flechas blancas) se observan en el interior del perisporio (P). **D.** Sección de la esporodermis a través de la lesura. La lesura está parcialmente cubierta por las verrugas de la ornamentación (círculo). Las verrugas se fusionan por elementos angostos (puntas de flecha). Desde la superficie se proyectan cordones (flecha). E= Exosporio. Pe = Perisporio externo. **E.** Cuerpos esferoidales se observan inmersos en el perisporio (flecha) o inmersos en el mismo (puntas de flecha). Los mismos presentan un núcleo central con estructura similar a la del exosporio rodeado por una capa similar a la del perisporio. Exosporio (E), Perisporio (P). Barras: **A, B y E** = 0,8  $\mu\text{m}$ ; **C** = 1  $\mu\text{m}$ ; **D** = 0,2  $\mu\text{m}$ .



## ● **Discusión**

Las esporas de las especies de *Dennstaedtia* que crecen en la Provincia Paranaense comparten un mismo tipo morfológico: verrucoso. La ornamentación está compuesta por verrugas, las cuales pueden fusionarse para formar lomos y retículos de longitud y grosores variables. Estas observaciones coinciden en líneas generales con las descripciones realizadas por Nayar & Devi (1968a), Erdman & Sorsa (1971), Murillo & Bless (1974), Arreguín Sanchez *et al.* (1996), Lorscheitter *et al.* (2002) y Giudice *et al.* (2006) y con la morfología hallada en otras especies del género como *D. hirsuta* (Sw.) Mett. ex Miq., *D. scabra* (Wall. ex Hook.) T. Moore, *D. scandens* (Blume) T. Moore, y *D. smithii* (Hook.) T. Moore en Taiwan (Huang, 1981), *D. punctilobula* (Michx.) T. Moore en Norteamérica (Belling & Heusser, 1975) y *D. arborescens* (Willd.) Ekman & Maxon en Bolivia (Graf-Meier, 1985).

En todas las especies estudiadas, las verrugas observadas sobre la superficie de las esporas al MO y MEB coincidirían con aquellas observadas al MET en el perisporio. Esto se contradice con lo descrito por Murillo & Bless (1974) y Nayar & Devi (1968a) quienes señalaron que la ornamentación estaba formada por el exosporio, y el perisporio estaba ausente. Devi (1977), sin embargo, identificó “una capa similar a una piel, externa al exosporio, que a menudo se agrieta y se desprende durante la acetólisis”.

Es importante destacar que, en el análisis al MO, existió cierta dificultad para diferenciar el perisporio del exosporio en todas las especies estudiadas, excepto en *D. globulifera*. Por este motivo, los espesores de ambas capas no pudieron ser medidos con micrómetro filar y resultó imprescindible realizar observaciones con microscopía electrónica para relevar este carácter.

En base a la distribución, grado de fusión y superficie de las verrugas, las especies estudiadas se pueden agrupar en los siguientes subgrupos: 1- esporas con verrugas ornamentadas con rodlets, 2- esporas verrucoso-rugadas, con microornamentación lisa o rugosa, y 3- esporas reticuladas.

Al tipo 1 pertenece *D. cicutaria*. Tschudy & Tschudy (1965) describieron como espinas a los elementos que tapizan las verrugas y señalaron que esta ornamentación distingue a las *Dennstaedtia* venezolanas. Según nuestra interpretación, además de espínulas dispuestas de

manera uniforme, sobre las verrugas se observan cordones proyectados en distintas direcciones y fusionados en la base o en los extremos. Al MO, la ornamentación de las verrugas se distingue como puntos oscuros y le dan a las mismas una coloración castaño-oscuro, diferente a la coloración castaña de las verrugas del resto de las especies.

Los resultados registrados por Tryon & Tryon (1982) en ejemplares panameños de *D. cicuctaria*, no concuerdan con los datos obtenidos en el presente trabajo, ya que los autores describen estas esporas como provistas de verrugas compactas, lisas, que pueden fusionarse en “rugae”. Si bien Tryon & Lugardon (1991) coinciden en esta última descripción, en el análisis ultraestructural, señalan la presencia de “rodlets” (cordones) en la superficie del perisporio.

Especies del género *Taenitis* (*T. hookeri* y *T. requiniana*) y *Cyathea* (*C. caracasana*, *C. divergens* y *C. delgadii*) también presentan tubérculos y verrugas microornamentadas. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en *D. cicuctaria*, el exosporio externo constituye los elementos de la ornamentación y el perisporio forma cordones que tapizan tanto las zonas tuberculadas o Verrucosas como las no ornamentadas del exosporio (Tryon & Lugardon, 1991, pág. 262-265; Marquez, 2010b, 2012).

En el subgrupo 2 se encuentran *D. dissecta*, *D. obtusifolia* y *D. cornuta*. En las primeras dos, las esporas presentan verrugas y lomos psilados o rugosos, los cuales se distribuyen de manera uniforme en toda la superficie. En *D. cornuta* la ornamentación observada es similar, pero el espacio entre las verrugas y lomos es menos variable y generalmente es más estrecho y en la cara distal la fusión de lomos determina un patrón rugulado.

El tipo de ornamentación verrucoso y rugulado observado en las tres especies descritas anteriormente, es semejante al observado para el género *Loxoma* (Loxomataceae) (Tryon & Lugardon, 1991 pág. 211). Asimismo, también algunos géneros de la familia Pteridaceae, como *Anogramma* (Ramos Giacosa et al., 2001, 2004), *Pteris* (Martínez & Morbelli, 2009), *Pitirogramma* (*P. tartarea*) (Giudice et al., 1998), *Cheilantes* (*C. vellea*) y *Cryptogramma* (Tryon & Lugardon, 1991 págs. 154 y 176) presentan este patrón, con la diferencia que las verrugas y los lomos están formadas por el exosporio. En este sentido, la presencia de verrugas y rúgulas en grupos filogenéticamente no emparentados implicaría que el mismo no posee valor evolutivo.

El tercer tipo de esporas mencionado se observa en la especie *D. globulifera*, donde la fusión de verrugas y lomos determina un retículo en la cara distal.

Si bien existen diferencias en relación a las características de las verrugas (forma, distribución y superficie), a nivel ultraestructural el perisporio es alveolar en todas las especies de *Dennstaedtia* paranaenses y está formado por una única capa, excepto en *D. cicutaria* donde presenta dos. En contraste con lo observado en este trabajo, Giudice *et al.* (2006) describieron al perisporio de *D. dissecta* (bajo el nombre de *D. cicutaria*, ver Yañez *et al.*, 2012) con dos capas: una interna de estructura microlacunosa que forma el cuerpo de las verrugas, y una externa, muy delgada y aparentemente discontinua. Según la interpretación realizada en ese trabajo, a partir de los análisis al MET, en *D. globulifera* y *D. dissecta*, estas dos capas en realidad corresponden a variaciones en la densidad de la estructura alveolar de una única capa. Estas variaciones se ponen en evidencia como diferencias graduales de contraste desde la porción más interna hacia el margen del perisporio. Asimismo, el perisporio de *D. dissecta* y *D. globulifera* observado en este trabajo se ajusta, a grandes rasgos, con la descripción de *Dennstaedtia bipinnata* realizada al MET por Lugardon (1971, 1974). No obstante, para este autor, la ultraestructura de la pared es interpretada como compacta, compuesta de sustancias que presentan un aspecto granuloso y uniforme mientras que, según nuestra interpretación, el perisporio es heterogéneo y presenta alvéolos de distintas dimensiones rellenos o no de material electrónico.

Las características del exosporio en todas las especies estudiadas se ajustan al tipo blechnoide descrito por Lugardon (1971, 1974). Este tipo de exosporio se caracteriza por poseer dos capas, una interna delgada y más evidente en la zona apertural, y una externa compuesta por dos estratos. La red de canales y cavidades observadas en el estrato interno de las *Dennstaedtiaceae* paranaenses, coincide con el “estrato fisurado” del exosporio externo.

La presencia de cuerpos esféroidales dispersos sobre la superficie de las esporas observados al MEB fue común a todas las especies y, al MET, presentan una estructura interna que se asemeja a la del exosporio rodeada de un material de estructura similar al del perisporio. Lugardon (1974) describió en la superficie de *D. bipinnata* cuerpos similares que denominó “glóbulos”, los cuales también fueron observados por Giudice *et al.* (2006) en la pared de

*D. globulifera*. Más tarde, Tryon & Lugardon (1991) los definieron como pequeños cuerpos esferoidales de esporopolenina, con una estructura central semejante al exosporio envuelto en una capa semejante al perisporio. Asimismo, en *D. dissecta* los cuerpos esferoidales observados inmersos en el perisporio al MET, fueron más abundantes en esporas donde las verrugas del perisporio eran menos numerosas y presentaron menor espesor. Este menor desarrollo de la ornamentación podría vincularse a etapas tempranas del desarrollo de la pared, por lo que la presencia de cuerpos esferoidales podría estar relacionada con la formación de la esporodermis como fue señalado por Huysmans et al (1998). No obstante, son necesarios estudios detallados sobre el desarrollo de las esporas dentro de los esporangios para entender mejor la función de los glóbulos.

#### **Observaciones respecto de los métodos de fijación utilizados**

Las esporas de *D. dissecta* fijadas con GA y RR a partir de material fresco colectado en el campo no presentaron diferencias significativas en relación a las características morfológicas generales al MEB, ni de ultraestructura de la pared al MET, que aquellas fijadas con GA y AB a partir de material de herbario. No obstante, el grado de desarrollo observado en las verrugas de la ornamentación fue diferente, y las esporas del material de herbario parecerían presentar una mayor maduración en el perisporio, con verrugas más grandes y mejor definidas que aquellas observadas en el material fresco. Debido a esto, las muestras obtenidas en el campo no servirían para comparar los distintos procesamientos ya que pertenecerían a etapas distintas del desarrollo de la esporodermis.

#### **Aplicaciones de la morfología de las esporas en la taxonomía de *Dennstaedtia***

Los resultados obtenidos constituyen una herramienta útil para la identificación de las especies de *Dennstaedtia* estudiadas y, asimismo, aportan información valiosa para resolver conflictos taxonómicos dentro del género.

En primer lugar, durante la etapa de análisis bibliográfico e identificación de especímenes se observó que algunos de los caracteres vegetativos diagnósticos de *Dennstaedtia*, como los referidos al rizoma, pecíolo o base de pinnas y pínulas, son difíciles de observar en material herborizado si no se cuenta con ejemplares completos. En este sentido, Tryon (1960) destacó la dificultad de determinar material de herbario debido a que, por la



dimensión que adquieren las frondes en la mayoría de las especies de *Dennstaedtia*, frecuentemente los ejemplares se encuentran incompletos o fragmentados. En estos casos, las esporas resultaron una fuente de información de gran utilidad durante la realización de este estudio debido a que, como se mencionó anteriormente, las especies del género presentes en el área se diferencian por el grado de fusión y distribución de las verrugas de la ornamentación de las esporas.

Gracias a las diferencias mencionadas, fácilmente observables al MO, durante este estudio se identificaron correctamente como *Dennstaedtia dissecta* los ejemplares fragmentados *Palacios et al. 1296* (LP) y *de la Sota 6153* (LP). Estos ejemplares habían sido erróneamente citados como *Denstaedtia globulifera* y *Dennstaedtia cicutaria*, respectivamente por Giudice *et al.* (2006) y Ponce *et al.* (2008). A través de la correcta identificación de dichos ejemplares se amplió la distribución de *D. dissecta* hacia el sur y se identificó una nueva cita de la especie para la Argentina. Este nuevo registro se corroboró posteriormente con colecciones realizadas en los Parques Provinciales Cruce Caballero y Urugua-í (Misiones). Asimismo, el hallazgo de especímenes de herbario de *D. dissecta* en el sur de Bolivia, permite sugerir que la probable presencia de esta especie en el Noroeste argentino y su ausencia de registro hasta el momento podría deberse a una incorrecta determinación de ejemplares.

En este sentido, la identificación de caracteres palinológicos diagnósticos de fácil observación, posibilitó la determinación de ejemplares en donde otras características importantes no pudieron visualizarse.

En segundo lugar, la información obtenida a partir del análisis palinológico realizado en este trabajo contribuye a la clarificación de la circunscripción de algunas especies del género.

En relación a la identificación de *Dennstaedtia cornuta* como una especie válida, en el presente trabajo se estudiaron los tres ejemplares de Minas Gerais analizados por Assis & Salino (2011) y se identificaron los caracteres que Navarrete & Olgaard (2002) señalaron como diagnósticos de la especie. Las esporas observadas en dichos ejemplares resultaron ser diferentes a las observadas para *Dennstaedtia dissecta* lo que contribuiría a separar a *D. cornuta* de esta especie. Asimismo, se encontraron dos ejemplares (Almeida-Neto 122 y Schwartsburd 322) provenientes de Río de Janeiro y Paraná que también reunieron los

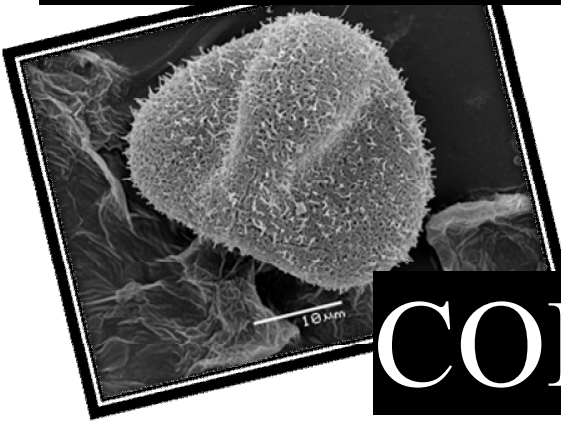
caracteres de *D. cornuta* y compartieron la morfología de las esporas. Esto significaría una ampliación de la distribución de la especie, hasta el momento únicamente citada para Minas Gerais, Brasil.

No obstante, si bien las características de las esporas aportan un carácter adicional para diferenciar a *Dennstaedtia cornuta* de *Dennstaedtia dissecta*, se considera que son necesarios estudios más exhaustivos sobre los materiales tipo de todas las especies involucradas para llegar a una conclusión sobre la validez de esta especie.

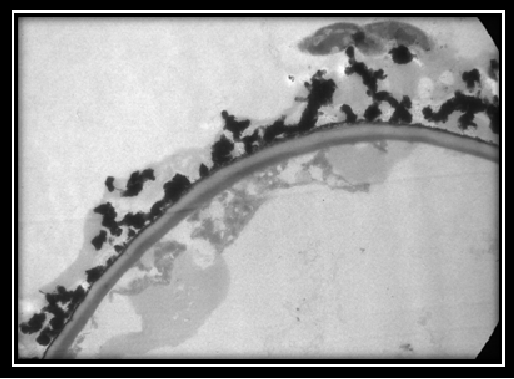
A diferencia de lo que se observó en *Dennstaedtia cornuta*, las características de las esporas no constituiría una herramienta que permita separar a *D. dissecta* de *D. obtusifolia*, señaladas por diversos autores como sinónimos (Stolze, 1981; Tryon & Stolze, 1989; Moran, 1995). Como se mencionó anteriormente, en ambos taxones las esporas presentan una forma y diámetros similares y comparten el mismo patrón de distribución y fusión de verrugas y lomos. A esta misma conclusión arribó Lorscheitter *et al.* (2002). Asimismo, durante el análisis del material de herbario perteneciente a ambas especies, no se observaron diferencias evidentes en la forma y tamaño de los soros señaladas anteriormente por otros autores (Tryon, 1960, 1964; Sehnem, 1972; Tryon & Tryon, 1982; Kieling-Rubio & Windisch, 2002). Además, los caracteres identificados por Navarrete & Øllgaard (2000) para diferenciar ambas especies se encontraron combinados en un mismo ejemplar (ej. distintos tipos de márgenes de segmentos en pinnulas de la misma lámina) por lo que no fueron considerados para la determinación. No obstante, el análisis de las descripciones originales y las imágenes digitales de los holotipos de ambas especies permitió hallar otros caracteres diagnósticos. Como resultado se observó que las especies difieren en el tercio superior de la lámina: mientras que el ápice de *D. obtusifolia* es pinnado-pinnatifido con segmentos sinuados a simples, en *D. dissecta* este es bipinnado-pinnatifido con segmentos pinnatilobados. Hasta el momento, la división de la lámina no había sido tenida en cuenta por otros autores como un carácter diagnóstico, el cual podría ser importante para distinguir ambas especies.



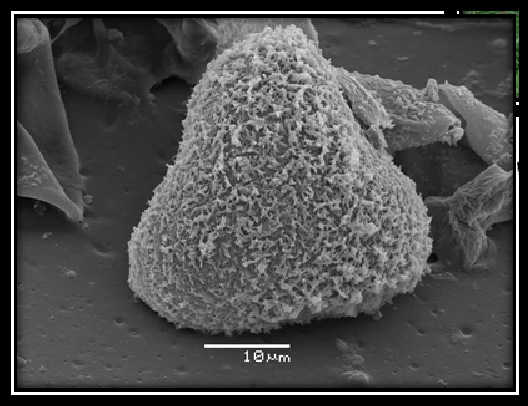
*Microlepia speluncae*



# CORDONES



*Pteridium arachnoideum*



#### 4.1.2 Grupo morfológico con cordones (Láminas 10, 11, 12, 13, 14 y 15)

Este tipo morfológico está presente en *Microlepidia speluncae* y *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*.

Las esporas son triletes, de lados rectos a cóncavos o convexos y ángulos redondeados, triangulares en vista polar, a veces subcirculares en *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum* (Lámina 10, Fig. A, C, D, F). En vista ecuatorial, el polo distal es hemisférico y el polo proximal es plano. Ocasionalmente *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum* presenta esporas convexo-subcónicas (Lámina 10, Fig. B, E).

Las lesuras son rectas, alcanzan  $\frac{3}{4}$  partes del diámetro de la espora y generalmente son cubiertas por la ornamentación.

El perisporio es castaño claro a marrón al MO. Está constituido por cordones cilíndricos, de ápice redondeado a aguzado, ramificados y fusionados entre sí, que forman redes tridimensionales tangenciales a la superficie de las esporas. Conectados con la red existen cordones perpendiculares a la superficie que se observan aislados o fusionados formando espínulas. El perisporio tiene un grosor de 0,03-3,3  $\mu\text{m}$  y, al MET, se observa que está formado por tres capas.

El exosporio es castaño-amarillento a hialino al MO, psilado, de margen irregular y tiene un grosor de 0,1-2,3  $\mu\text{m}$ . Presenta dos capas al MET.

La morfología, subestructura y organización de los cordones en la red del perisporio separan a las especies dentro de este tipo morfológico.

### ***Microlepia* Presl.**

Género con 60 especies que crecen en zonas tropicales de África y cálido-templadas del Océano Pacífico asiático, incluyendo India, China, Malasia, Corea, Australia, Nueva Zelanda, Japón e islas Hawaianas (Yuehong *et al.*, 2004). Una única especie, *Microlepia speluncae* (L.) T. Moore, está presente tanto en el Viejo Mundo como en América. Las especies del género crecen en selvas húmedas, en áreas sombrías y protegidas formando pequeñas poblaciones, sobre laderas de montañas, bordes de barrancos y arroyos. También están presentes en bosques secos, sobre laderas ligeramente sombreadas, menos a menudo al borde de caminos o espacios abiertos.

***Microlepia speluncae* (L.) T. Moore**, Index Filicum 93. 1857.

Basónimo: *Polypodium speluncae* L. Species Plantarum 2: 1093–1094. 1753. Tipo: Sri-Lanka s.d., *Herman s.n.* (Holotipo: BM!)

Descripción del esporofito: *Rizomas* de 0,3-2 cm de diámetro, corto o largamente rastrero, profusamente ramificado, glabrescente o con tricomas catenados, cortos, aciculares, hialinos a castaño-dorados; raíces en toda la superficie del rizoma, más abundantes abaxialmente. *Frondes* de 0,5- 2 m de largo, monomórficas. *Pecíolos* de 5-105 cm de longitud, surcados adaxialmente, pajizos a castaño-oscuros, usualmente con densos tricomas catenados, hialinos a castaño-claros. *Láminas* deltoides u ovado-lanceadas, bipinnadas a tetrapinnadas. *Ráquis* surcado adaxialmente, surcos no continuos con los siguientes órdenes de división, pajizos a castaño oscuros, pubescentes ambas caras, con tricomas catenados como los del pecíolo. *Ráquis secundario* surcado adaxialmente, con tricomas catenados en ambas caras. Epidermis abaxial y adaxial entre venas, glabro o con pelos aciculares, adpresos, hialinos. *Pinnas* de 0,8-60 cm de longitud, 10-20 pares, deltoide-lanceoladas, alternas. *Pínnulas* lanceoladas, con ápice acuminado, crenado; la pínula basal acroscópica más grande que la basiscópica. *Costas* y *cóstulas* pubescentes, con pelos catenados similares a los del rizoma. *Segmentos* últimos oblongos, de ápice redondeado y margen crenado. *Venas* inmersas en cara abaxial, pubescentes en ambas caras, con tricomas catenados similares a los del rizoma; ápice de las venas estériles adaxiales, delgado. *Soros*

orbiculares, con forma de media copa, ligeramente retirados del margen y abiertos hacia el mismo, más largos que anchos, membranáceos, fijos por la base y los lados, con forma de abanico, parduzcos.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Estados de Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro y Minas Gerais. PARAGUAY: Departamentos de Amambay, Alto Paraná, Caazapá, Central, Guairá y Paraguarí (Fig. 9). Fuera del área: En América: Antillas Mayores (excepto Puerto Rico), Ecuador, Guayana francesa y Bolivia. En el Viejo mundo: Sudáfrica, Madagascar, Vietnam, Laos, Camboya, Tailandia, China, India, Indonesia, Filipinas, Japón y Australia.

Hábitat: En selvas sombrías, sobre barrancos o laderas de montañas, formando densas matas en lugares abiertos cerca de claros de selvas. Entre los 400-850 msm.

**Figura 9. Distribución de *Microlepidia speluncae* en la Provincia Fitogeográfica**

**Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Microlepidia spelunca*



Figura 9



### Descripción de las esporas

DP: 22-26-31  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 29-35-45  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 27-34-39  $\mu\text{m}$

Espesor del perisporio: 0,1-0,8  $\mu\text{m}$ , 2,6  $\mu\text{m}$  incluyendo los cordones transversales a la superficie

Espesor del exosporio: 0,7-1  $\mu\text{m}$  (alcanza 1,8  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura)

Longitud de la lesura: 7-14  $\mu\text{m}$

Al MO, el perisporio es castaño claro (Lámina 10, Fig. A-C) y, al MEB, se observa que está formado por cordones cilíndricos, circulares en sección, de 100-300 nm de diámetro, ápice redondeado y superficie psilada. Los cordones se ramifican y fusionan entre sí para formar redes tridimensionales abiertas, superpuestas y distribuidas de manera uniforme, orientadas tangencialmente a la superficie de las esporas (Lámina 11, Fig. A-C). Algunos de estos cordones de 0,5-2,6  $\mu\text{m}$  de longitud se extienden perpendicularmente desde la superficie y pueden estar fusionados en sus extremos, constituyendo espínulas (Lámina 11, Fig. A, C). En ocasiones, un depósito granular denso, cubre todo el sistema de cordones y lo oculta parcialmente, de manera que sólo los cordones perpendiculares a la superficie pueden verse (Lámina 11, Fig E-F). Por debajo de la red de cordones, la superficie es irregular o microverrucosa (Lámina 11, Fig. D).

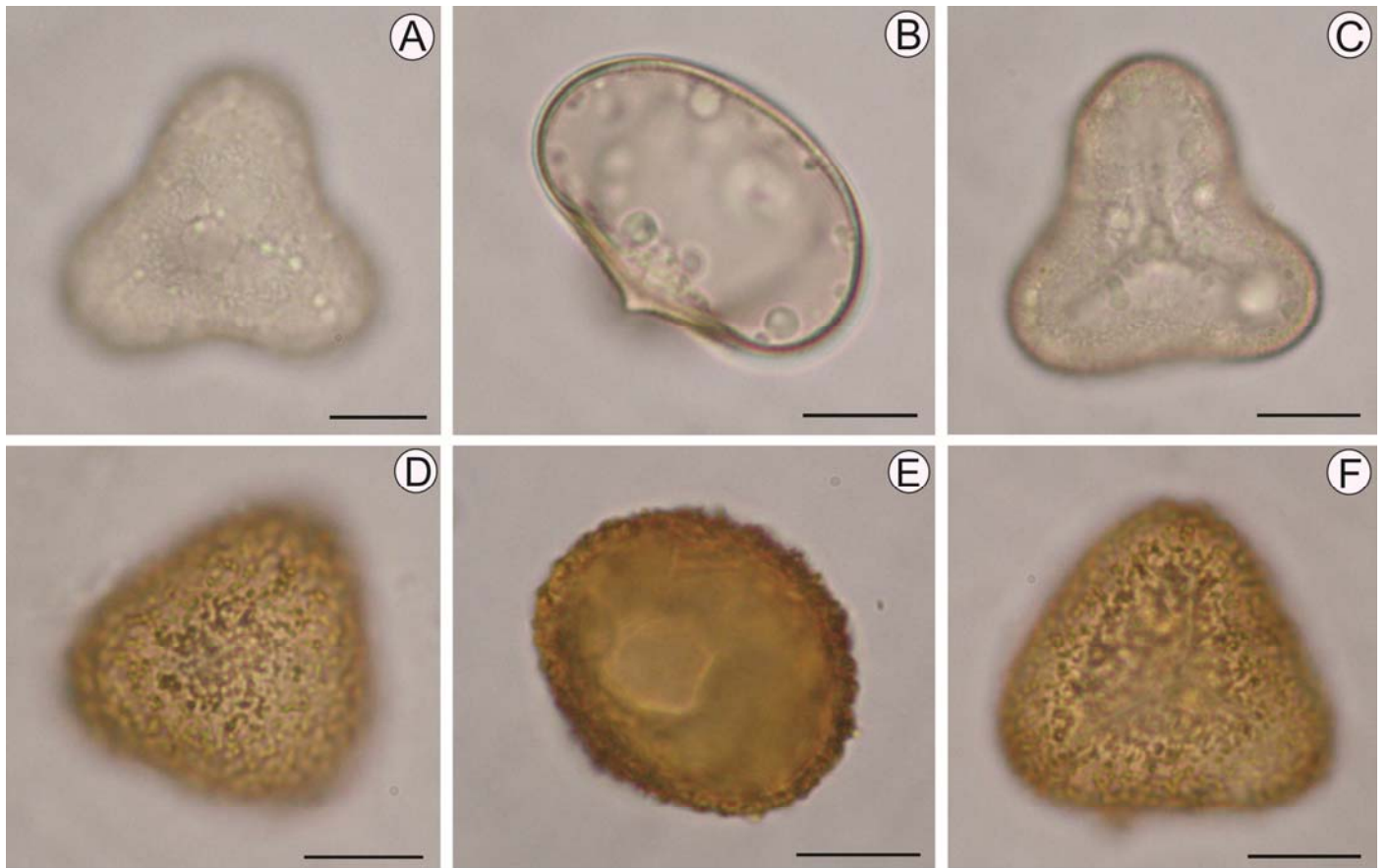
El exosporio es psilado (Lámina 13, Fig. B) y al MO es amarillento a hialino (Lámina 10, Fig. A-C).

Sobre la superficie de las esporas se observan cuerpos esferoidales dispersos (Lámina 11, Fig. B).

**Lámina 10. Esporas de *Microlepidia speluncae* y *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* de la Provincia Fitogeográfica Paranaense al MO.**

**Grupo morfológico con cordones.**

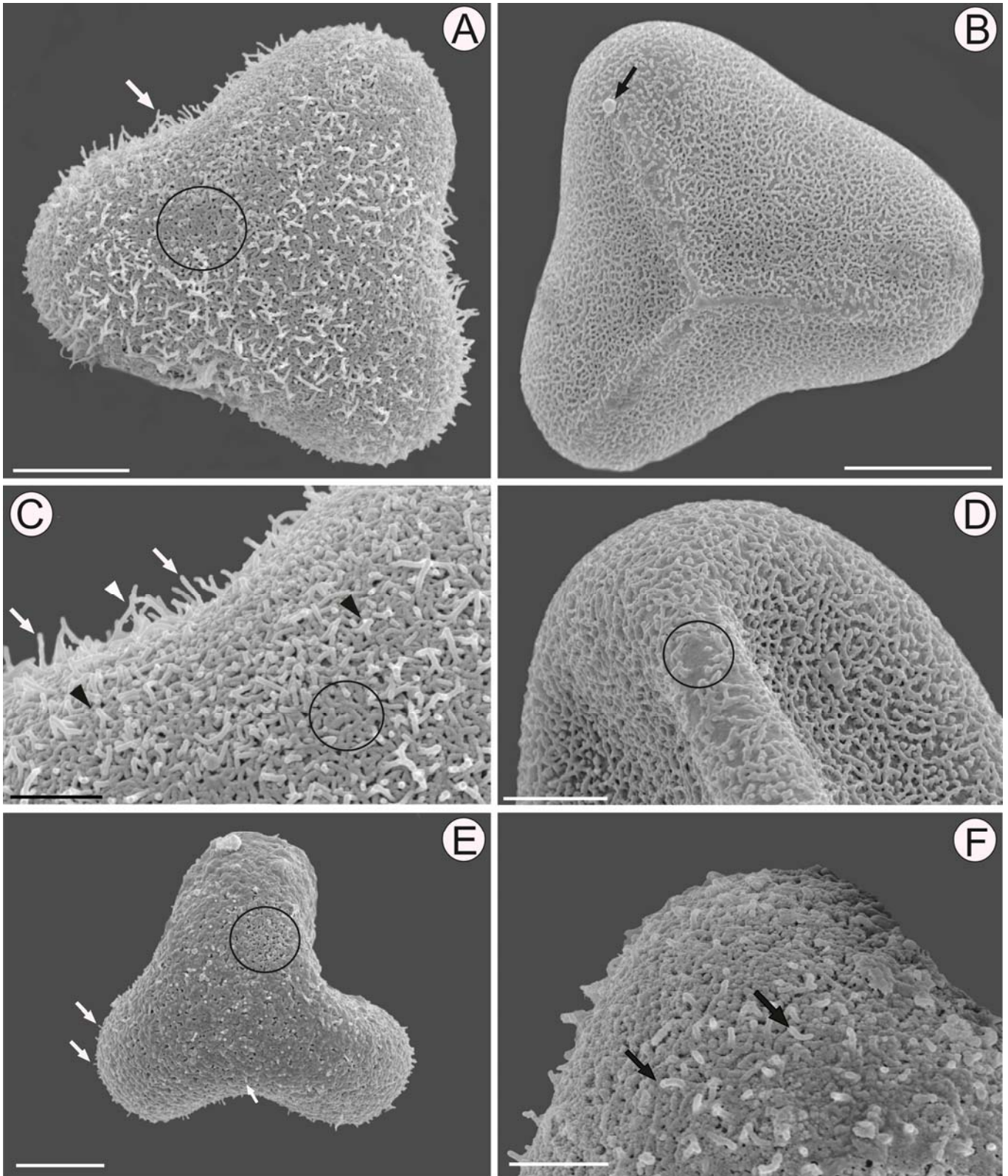
**Figuras A-C. *Microlepidia speluncae*.** **A.** Espora en vista distal. **B.** Espora en vista ecuatorial. **C.** Espora en vista proximal. **Figuras D-F. *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*.** **D.** Espora en vista distal. **E.** Espora en vista ecuatorial. **F.** Espora en vista proximal. Barras = 10  $\mu$ m.



**Lámina 11. Esporas de *Microlepidia speluncae* con MEB.**

**Grupo morfológico con cordones.**

**A.** Espora en vista distal. La ornamentación está formada por una red de cordones tridimensionales ramificados y fusionados entre sí (círculo). Asimismo, se observan cordones orientados perpendicularmente a la superficie (flechas). **B.** Espora en vista proximal. Una red tridimensional de cordones ramificados se dispone tangencial a la superficie. Sobre la misma se observa un cuerpo esférico (flecha). **C.** Detalle de una espora en vista distal. Se observan cordones dispuestos tangencialmente (círculos) y perpendicularmente (flechas) a la superficie. Estos últimos se fusionan por el ápice (puntas de flecha). **D.** Detalle de una espora en vista proximal. Los cordones de la ornamentación cubren parcialmente la lesura. Por debajo de la red de cordones, la superficie es irregular (círculo). **E.** Espora en vista distal. Un depósito granular cubre el sistema de cordones de manera que sólo los cordones perpendiculares a la superficie pueden observarse (flechas). Los cordones tangenciales a la superficie únicamente se observan donde el depósito granular está ausente (círculo). **F.** Detalle de espora en vista distal. Bajo el depósito granular, se observan los extremos de los cordones tangencialmente orientados (flecha).  
Barras: **A, B, E** = 10  $\mu\text{m}$ ; **C, D** = 6  $\mu\text{m}$ ; **F** = 5  $\mu\text{m}$ .



### ***Pteridium* Gled. ex Scop.**

Es un género cosmopolita con 5 especies ampliamente distribuidas en regiones tropicales y templadas del mundo. Su extenso rango de distribución se debe a que la mayoría de las especies de *Pteridium* son consideradas malezas que colonizan espacios abiertos, generalmente producto de la actividad antrópica. Poseen extensos y resistentes rizomas ramificados y una gran producción de esporas, que se dispersan fácilmente con el viento y germinan en cortos períodos de tiempo, lo que garantiza el rápido crecimiento de las poblaciones. En América se reconocen hasta el momento 3 especies distribuidas principalmente en selvas y bosques secundarios, áreas perturbadas (como claros y bordes de caminos), pastizales y campos cultivados originados del desmonte.

***Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon subsp. *arachnoideum***, Journal of the Washington Academy of Sciences 14: 89. 1924.

Basónimo: *Pteris arachnoidea* Kaulf., Enumeratio Filicum 190. 1824. Tipo: Brasil, Chamisso s.n. (LE!, foto GH).

#### Descripción del esporofito:

*Rizomas* de 0,6-1,8 cm de diámetro, largamente rastreros, subterráneos, muy ramificados, con rizomas secundarios de donde se originan las frondes, pubescentes, con tricomas simples, uni y pluricelulares, aciculares, retorcidos, castaño-oscuros. *Frondes* 1,2-5 m de long., monomórficas. *Pecíolo* de 0,4-1,5 m de longitud, robusto, pálido, pajizo a marrón claro, adaxialmente surcado, glabro. *Láminas* de contorno triangular a rómbico, bipinnadas a tetrapinnado-pinnatífidas, menos divididas en la porción media, distalmente pinnatífidas, coriáceas, con margen entero y siempre revoluto, aún en ausencia de soros. *Raquis y ejes menores* adaxialmente surcados, pajizos a marrón claros, pubescentes, con pelos esparcidos, catenados, cortos, castaño-claros o aciculares, diminutos, blancuzcos. *Pinnas* de 0,1-0,8 m de longitud, pecioluladas en la porción basal y media de la lámina, subsésiles o sésiles en la porción más apical, lanceadas o de contorno triangular a lineares, subopuestas, ocasionalmente con nectarios oscurecidos en sus axilas. *Pinnulas* pecioluladas, subsésiles o

sésiles lanceadas a lineares, pinnulas de último orden con lóbulos libres, semicirculares, entre segmentos en la porción distal y segmentos basales reducidos o ausentes en el lado acroscópico. *Costas* abaxialmente teretes y *cóstulas* abaxialmente aplanadas, ambas pubescentes en ambas caras con tricomas dispersos, catenados castaños y diminutos, aciculares y blancuzcos. *Segmentos* caudados, simples o pinnatisectos, últimos segmentos compuestos inequilaterales, irregularmente disectos, últimos segmentos simples lanceolados a lineares. *Venas* libres, furcadas, elevadas en cara abaxial, con pelos aracnoides, retorcidos, delgados, blancuzcos, adaxialmente glabras. Epidermis entre venas abaxial y adaxialmente glabro. *Soros* tipo cenosoros, lineares, continuos excepto en los senos, dispuestos a lo largo de una nervadura comisural, protegidos por el margen reflexo y el indusio. *Indusio* doble, el adaxial formado por el margen foliar recurvado y modificado, eroso, el abaxial hialino, membranoso, rudimentario u obsoleto.

Distribución en el área de estudio: ARGENTINA: Provincia de Corrientes y Misiones. BRASIL: Estados de Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro y São Paulo. PARAGUAY: Departamentos de Amambay, Paraguari, Cordillera, Caaguazú, Guairá y Caazapá (Fig. 10). Fuera del área: Sur de México, América Central, Antillas mayores, Trinidad, Colombia, Venezuela, Guyanas, Ecuador, Perú, Bolivia, sur de Uruguay Paraguay, norte y noreste de Argentina y noreste de Brasil.

En su trabajo sobre la especie, Schwartsburd et al (2014) sugirió que las poblaciones de América Central y oeste de Sudamérica poseen caracteres en el indumento de la lámina que las diferencian de aquellas presentes en el noreste de Argentina, este de Paraguay y sudeste de Brasil. Debido a esto los autores sugieren que deberían ser tratadas como una subespecie distinta. No obstante, no la definen. Por esta razón, en este trabajo se decidió considerar dichas poblaciones como parte de *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum*.

Hábitat: Crece en una amplia variedad de hábitats como bosques, matorrales y márgenes de selvas, principalmente en áreas abiertas, secas y soleadas. En condiciones naturales, la especie forma poblaciones poco densas debido a que la escasa luminosidad del sotobosque donde se desarrolla limita su crecimiento. La remoción de estratos superiores propicia la

proliferación de individuos y la formación de densas poblaciones de mayores dimensiones, debido al veloz crecimiento de sus extensos rizomas ramificados. Los rizomas de estos helechos poseen asimismo, una particular resistencia al fuego, característica que les provee importantes ventajas en regiones donde el incendio de la vegetación es el método más frecuente para limpiar campos destinados a la siembra. Es por esta razón que la presencia de esta especie está asociada a zonas disturbadas antrópicamente, campos abandonados y pasturas. Entre los 80-2600 msm.

Observaciones: La “red” de rizomas que se desarrollan bajo el sustrato representa un impedimento para el establecimiento de otros taxones arbóreos y arbustivos (Ouden, 2000). Las frondes de gran tamaño tienden a encimarse y forman una espesa cobertura que limita la germinación de semillas remanentes en el suelo (Gliessman *et al.*, 1978; Dolling, 1996; Silva Matos & Belinato, 2010). Dichas frondes contienen, a su vez, compuestos fenólicos y cianogénicos que, además de prevenir la acción de herbívoros, inhiben el desarrollo de posibles especies vegetales competidoras (Schreiner *et al.* 1984; Oliveros Bastidas & Alonso-Amelot, 2010). Finalmente, el éxito reproductivo de esta especie se debe también a la enorme producción de esporas que se dispersan fácilmente con el viento y germinan en cortos períodos de tiempo (Conway 1949; 1953).

Cabe destacar que en animales y seres humanos se ha registrado la aparición de tumores malignos y alteraciones genéticas causadas por ptaquilosidos presentes en especies del género (Smith & Seawright, 1995; Recouso *et al.*, 2003; Marrero Faz & Calderón Tobar 2012)



**Figura 10. Distribución de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*

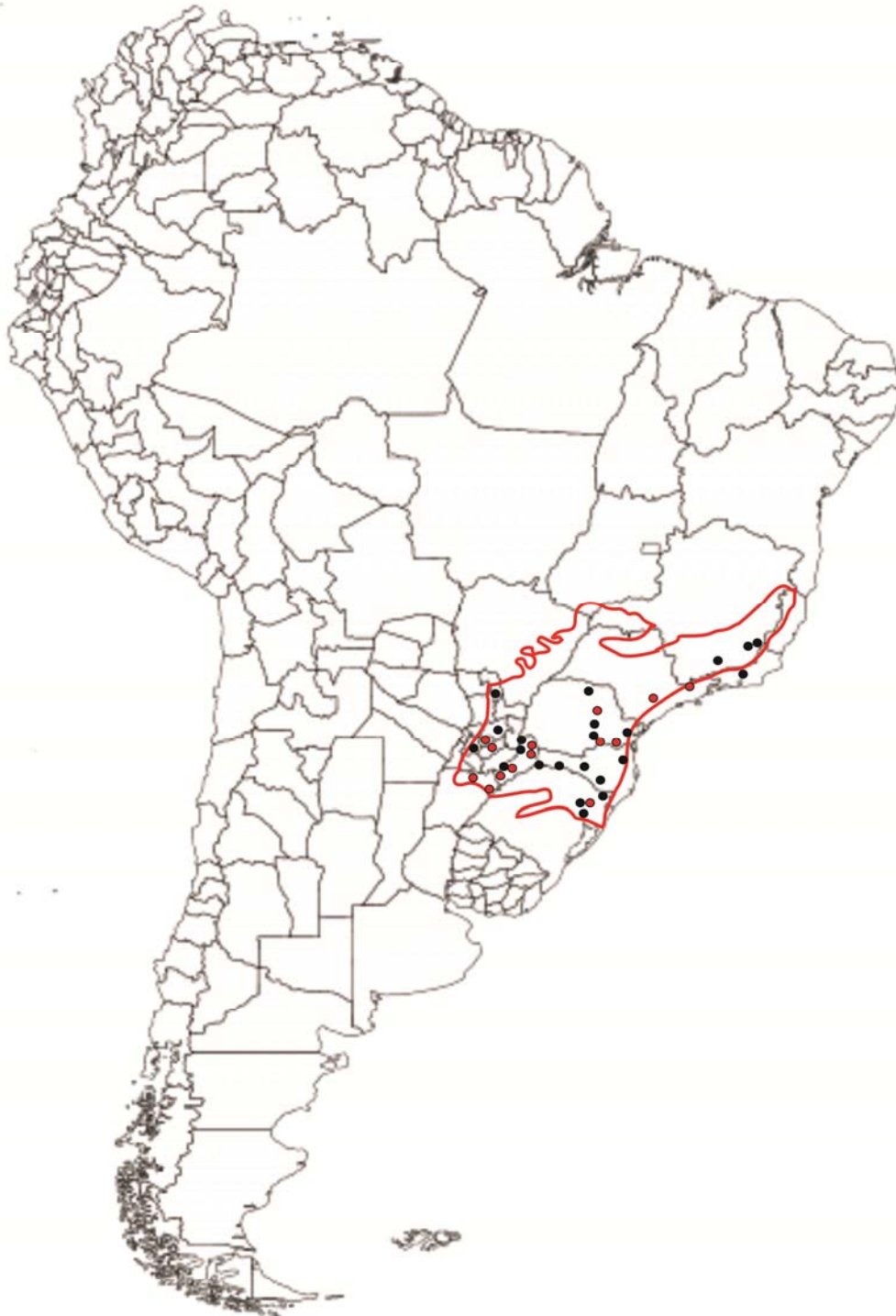


Figura 10

### Descripción de las esporas

DP: 22-28-39  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 27-36-42  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 22-34-44  $\mu\text{m}$

Espesor del perisporio: 0,03-1,5  $\mu\text{m}$ ; llegan a medir 3,3  $\mu\text{m}$  si se incluyen las masas o aglomeraciones de cordones

Espesor del exosporio: 0,1-0,8  $\mu\text{m}$  (alcanza 2,3  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura)

Longitud de la lesura: 7-16  $\mu\text{m}$

Al MO, el perisporio es castaño oscuro a marrón (Lámina 10, Fig. D-F) y al MEB presenta cordones cilíndricos a algo aplanados en sección transversal, de 100-300 nm de diámetro, extremos aguzados semejantes a una espínula y superficie microverrucosa. Éstos se disponen estrechamente, se ramifican y fusionan entre sí para formar redes tridimensionales superpuestas, compactas, tangenciales a la superficie (Lámina 12, Fig. E). Algunos de estos cordones de 0,2-1  $\mu\text{m}$  de long, se extienden perpendicularmente desde la superficie (Lámina 12, Fig. A-C). El grado de fusión de los cordones y la complejidad de las redes varían de forma heterogénea en toda la superficie de las esporas. En algunos casos, la acumulación de estos elementos forma masas o aglomeraciones sin una forma definida (Lámina 12, Fig. A-C).

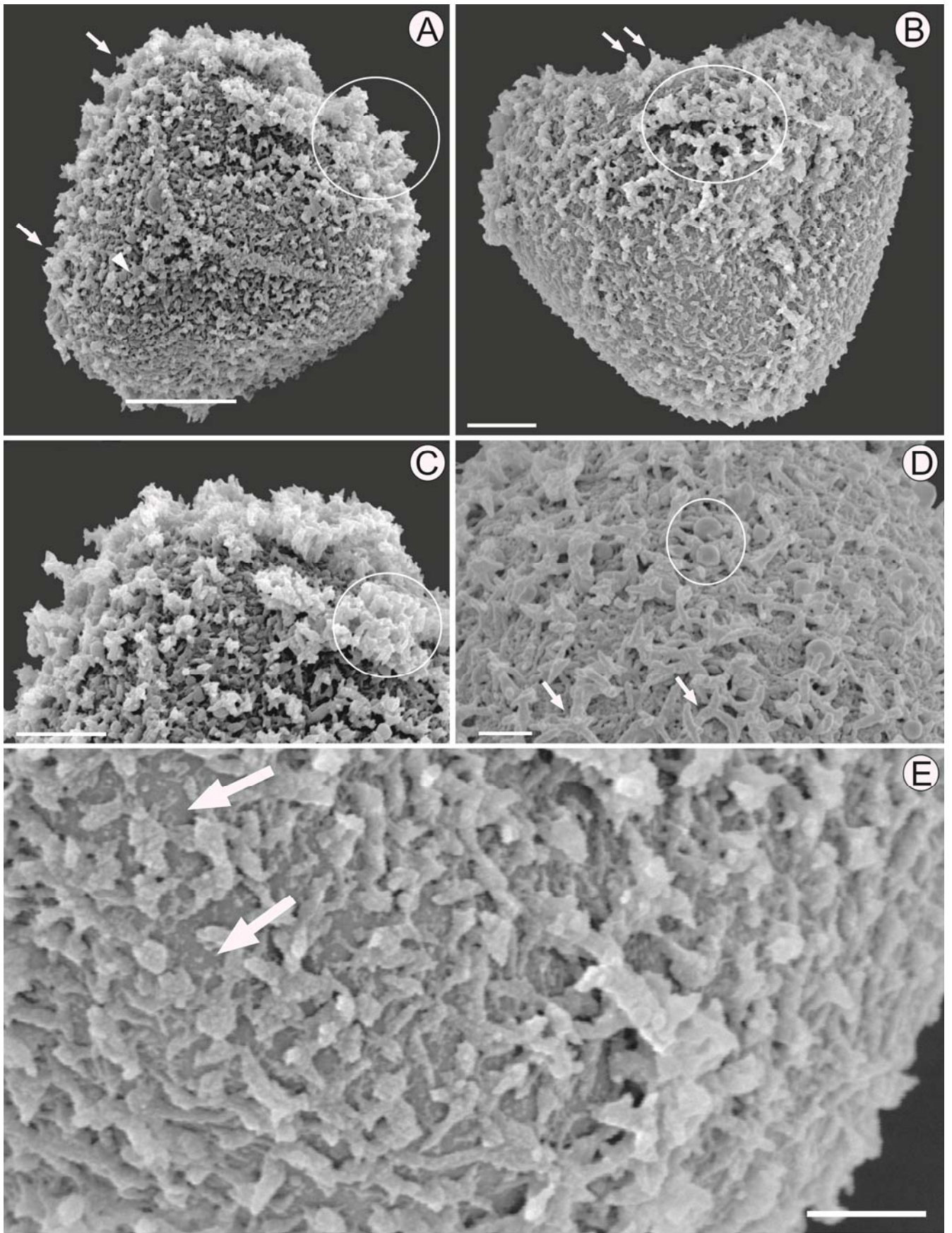
Por debajo de la red de cordones se observa una superficie irregular (Lámina 12, Fig. E). El exosporio es psilado (Lámina 14, Fig. E) y al MO posee una coloración castaño clara o amarillenta (Lámina 10, Fig. D-F).

Sobre la superficie de las esporas se observan cuerpos esferoidales dispersos (Lámina 12, Fig. D).

**Lámina 12. Esporas de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* con MEB.**

**Grupo morfológico con cordones.**

**A.** Espora en vista proximal. Se observan cordones cortos con extremos aguzados semejantes a una espínula (flechas) que pueden fusionarse y formar aglomeraciones (círculo). La ornamentación cubre la lesura (punta de flecha). **B.** Espora en vista distal. El grado de fusión de los cordones y la complejidad de las redes varían de forma heterogénea en toda la superficie de las esporas. Los cordones se disponen estrechamente, se ramifican y fusionan entre sí para constituir redes tridimensionales superpuestas (círculo). Algunos de estos cordones se extienden perpendicularmente desde la superficie (flechas). **C.** Detalle de una espora en vista proximal. La fusión de cordones forma aglomeraciones (círculo). **D.** Detalle de una espora en vista distal. Los cordones se ramifican y fusionan para formar redes compactas (flechas). Se observan cuerpos esferoidales dispersos sobre la superficie (círculo). **E.** Por debajo de la red de cordones se observa una superficie irregular (flechas).  
Barras: **A** = 10  $\mu\text{m}$ ; **B** y **C** = 5  $\mu\text{m}$ ; **D** y **E** = 2  $\mu\text{m}$ .



## Ultraestructura

Visto con MET, el exosporio presenta dos capas bien definidas. La interna (Ei) es delgada, de 20-100 nm, poco evidente y de estructura homogénea (Lámina 13, Fig. A, F; Lámina 14, Fig. A-B). La capa externa (Ee) es de 0,09-1  $\mu\text{m}$  (2,2  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura) y está formada por dos estratos: uno interno (Ee<sub>2</sub>) con cavidades y cortos canales ramificados, rellenos de material electrón-denso; y otro externo (Ee<sub>1</sub>) de mayor espesor con estructura homogénea y margen irregular (Lámina 13, Fig. A, F; Lámina 14, Fig. A). Los canales del estrato interno están en contacto con canales del estrato externo. Estos últimos pueden ramificarse y, a su vez, conectarse con el perisporio (Lámina 14, Fig. A-B).

El perisporio presenta mayor electrondensidad que el exosporio y está constituido por tres capas. La capa interna (Pi) es continua, de 20-80 nm de espesor, está adherida al exosporio, posee ultraestructura homogénea y margen irregular (Lámina 13, A, F; Lámina 14, C-D).

La capa media (Pm) forma el sistema tridimensional de cordones y su espesor varía en función de la longitud y orientación de los mismos (Lámina 13, Fig. A, E-F; Lámina 14, Fig. C-D). En *M. speluncae* los cordones se disponen separados entre sí y definen una red abierta. Son de 100-300 nm de diámetro y poseen una zona periférica y una central más electrón-densa. El núcleo electrón-denso de los cordones es de 40-60 nm de diámetro (Lámina 13, Fig. C). Asimismo, los cordones pueden fusionarse por sus extremos o por elementos transversales (Lámina 13, Fig. D-E). Las áreas en donde los cordones se orientan perpendiculares a la superficie de las esporas son aquellas donde el perisporio presenta un mayor espesor (Lámina 13, Fig. A, E).

En *P. arachnoieum* subsp. *arachnoideum* los cordones del Pm se encuentran estrechamente dispuestos e integran una red compacta. Son de 50-100 nm de diámetro y tienen una estructura homogénea (Lámina 14, Fig. C-D). En esta especie los cordones se fusionan para formar masas o aglomeraciones, por lo que pueden observarse cavidades vacías o rellenas de material electrón-denso en el interior de la capa (Lámina 14, Fig. A, C, F). La distribución heterogénea de los cordones, la variación en la complejidad de las redes que forman, y la presencia de aglomeraciones determina, en esta especie, la variación en el espesor del perisporio.

La capa externa del perisporio (Pe) tapiza los cordones de la capa media. Es discontinua, de 30-80 nm, estructura homogénea y tiene baja electrondensidad (Lámina 13, Fig. E-F; Lámina 14, Fig. C).

Dos tipos de cuerpos esferoidales se observan sobre la superficie o inmersos en el perisporio. En *M. speluncae* los cuerpos esferoidales tienen la misma electrondensidad que el perisporio y presentan una estructura homogénea (Lámina 13, Fig. F), mientras que en *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum* tienen un núcleo central de estructura similar a la del exosporio cubierto por material similar al del perisporio (Lámina 14, Fig. F).

**Lámina 13. Esporas de *Microlepidia speluncae* con MEB y MET.**

**Grupo morfológico con cordones.**

**A.** Sección de la esporodermis a través de la lesura. El estrato interno del exosporio externo ( $Ee_2$ ) presenta cavidades y canales con material electrón-denso en su interior (flecha). El estrato externo ( $Ee_1$ ) tiene margen irregular (elipse) y presenta estructura homogénea. Los canales del  $oE_2$  presentan continuidad con el  $oE_1$  (puntas de flecha). La capa interna del perisporio ( $Pi$ ) es continuo, de estructura homogénea. La capa media del perisporio ( $Pm$ ) presenta cordones con una zona periférica y central más electrón-densa (esquema). **B.** Fractura de la esporodermis al MEB. Los cordones del perisporio ( $P$ ) cubren al exosporio psilado ( $E$ ). **C.** Sección de la esporodermis con MET a través del ángulo de la espora. Los cordones (flechas) presentan una zona periférica y central más electrón-densa (esquema). Algunos cordones están fusionados (puntas de flecha).  $P$  = Perisporio. **D.** Detalle de la superficie proximal con MEB. Los cordones de la ornamentación se fusionan y forman redes tangenciales a la superficie (punta de flecha), de las cuales se proyectan cordones perpendiculares a la misma (flechas). Algunos cordones se fusionan por su ápice (círculos). **Figuras E-F.** Sección de la esporodermis con MET. **E.** La capa media del perisporio ( $Pm$ ) constituye una red tridimensional de cordones. Algunos cordones se fusionan en el ápice (círculo). La capa externa del perisporio ( $Pe$ ) es discontinua y presenta estructura homogénea.  $E$  = Exosporio. **F.** La capa interna del exosporio ( $Ei$ ) presenta estructura homogénea y baja electrodensidad. Cuerpos esferoidales de material similar al del perisporio se observan sobre la superficie (asterisco).  $Ee$  = Capa externa del exosporio.  $Ei$  = Capa interna del perisporio.  $Pm$  = Capa media del perisporio.  $Pe$  = Capa externa del perisporio. Barras: **A, C y F** = 0,4  $\mu m$ ; **B** = 1  $\mu m$ ; **D** = 2  $\mu m$ ; **E** = 0,1  $\mu m$ . Todas las secciones de la esporodermis observadas con MET fueron teñidas durante 5 min con  $Pb-c$ . El brillo y contraste de algunas fotografías fue modificado con el fin de dejar en evidencia elementos de la ultraestructura.



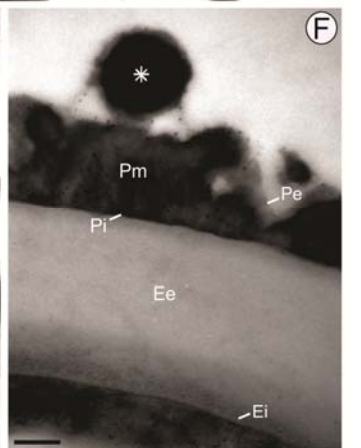
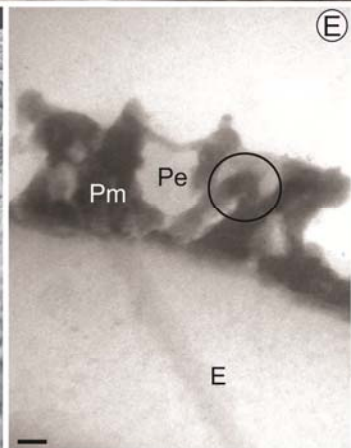
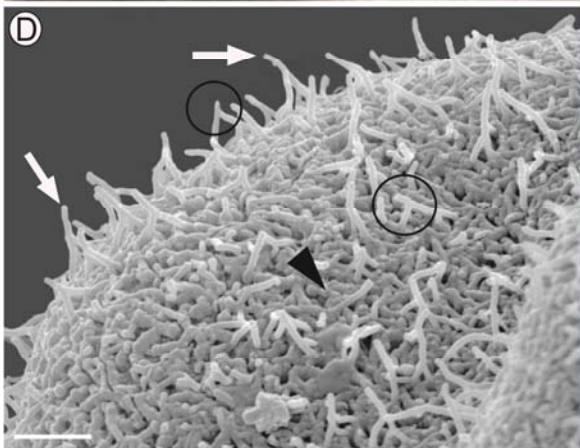
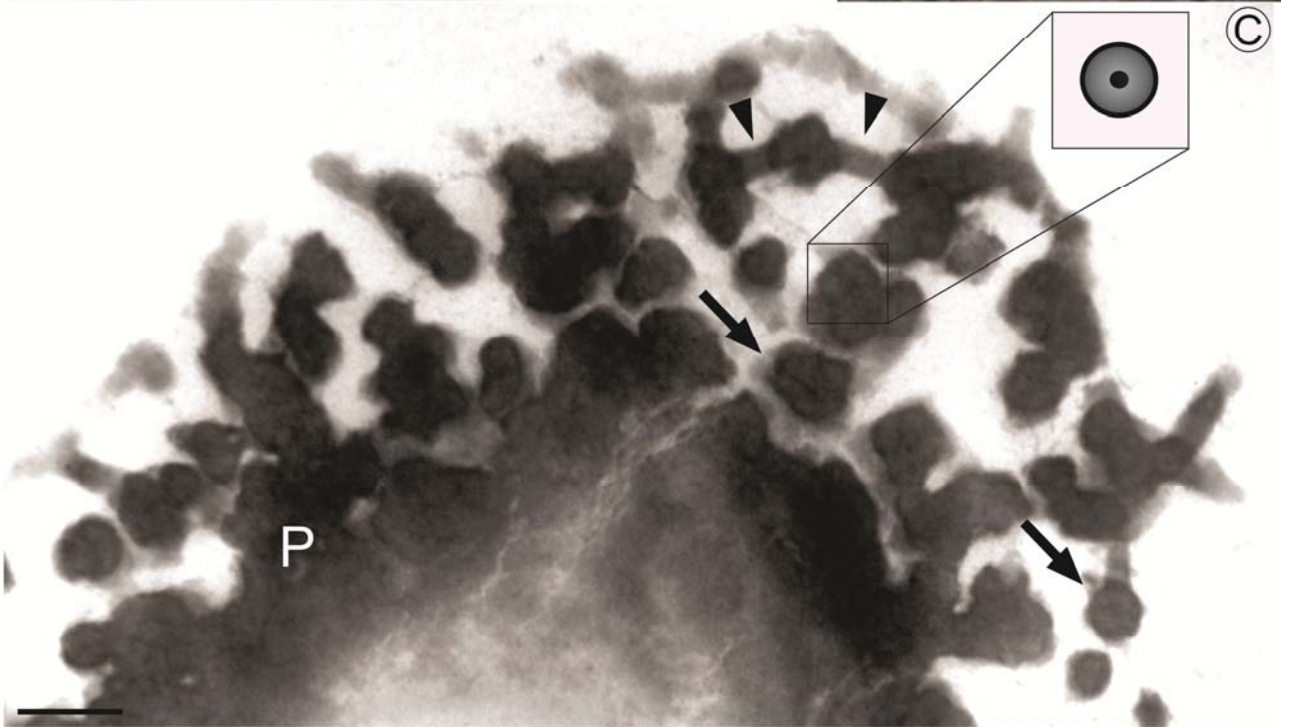
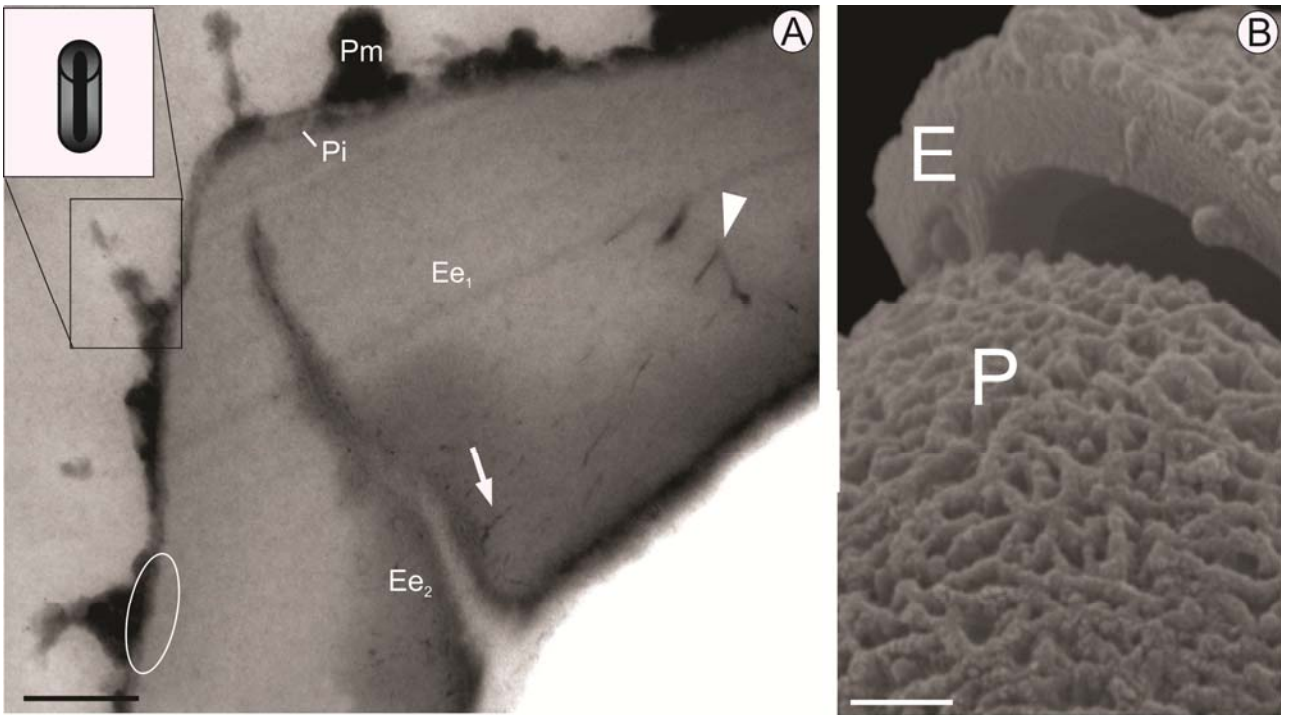


Lámina 13

**Lámina 14. Esporas de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* con MEB y MET.**

**Grupo morfológico con cordones.**

**Figuras A-D.** Sección de la esporodermis con MET. **A.** Los cordones del perisporio se fusionan y constituyen redes masivas (asterisco). El exosporio interno (Ei) presenta estructura homogénea. El estrato interno del exosporio (Ee<sub>2</sub>) tiene fisuras y canales cortos y ramificados (elipse). El estrato externo del exosporio (Ee<sub>1</sub>) presenta estructura homogénea y está atravesado por canales que tienen continuidad con el perisporio (flechas). P = Perisporio. Teñido durante 2,3 min con citrato de plomo. **B.** Sección de la esporodermis a través de la lesura. El exosporio interno (Ei) se observa a los lados de la lesura. Los canales del estrato externo del exosporio se ramifican (círculo) y muestran continuidad con el perisporio (flechas). Ee = Exosporio externo. P = Perisporio. Teñido durante 5 min con citrato de plomo. **C.** La capa externa del perisporio (Pe) es discontinua y presenta estructura homogénea. La capa media del perisporio (Pm) está constituida por cordones (puntas de flecha) que forman redes masivas. Entre los cordones de la red, se observan cavidades con material electrón-denso en su interior (flechas). La capa interna del perisporio (Pi) es continua, está adherida al exosporio y posee ultraestructura homogénea. E = Exosporio. Teñido durante 2,3 min con citrato de plomo. **D.** Los cordones del Pm (punta de flecha) presentan un margen microverrucoso (elipse). E = Exosporio. Pi = Perisporio interno. Pm = Perisporio medio. **E.** Fractura de la esporodermis al MEB. Los cordones del perisporio (P) cubren el exosporio psilado (E). **F.** Sección de la esporodermis con MET. Se observan cuerpos esferoidales inmersos en el perisporio con un núcleo central de material similar al del exosporio (flecha). Entre los cordones del perisporio se forman cavidades vacías (punta de flecha). E = Exosporio. Teñido durante 5 min con citrato de plomo. Barras: **A, E y F** = 0,2 µm. **B-D** = 0,1 µm.

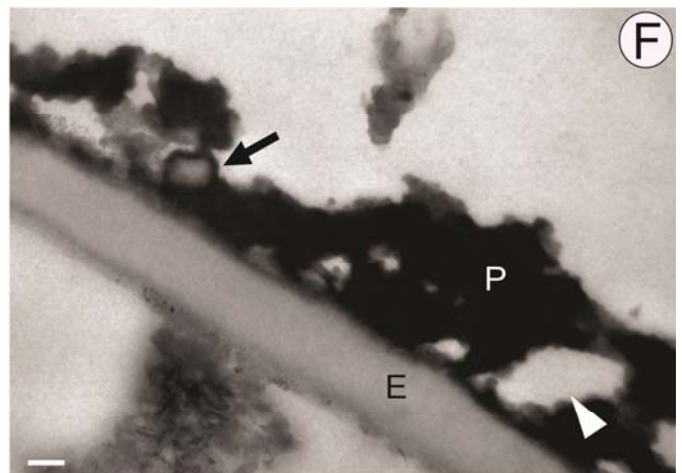
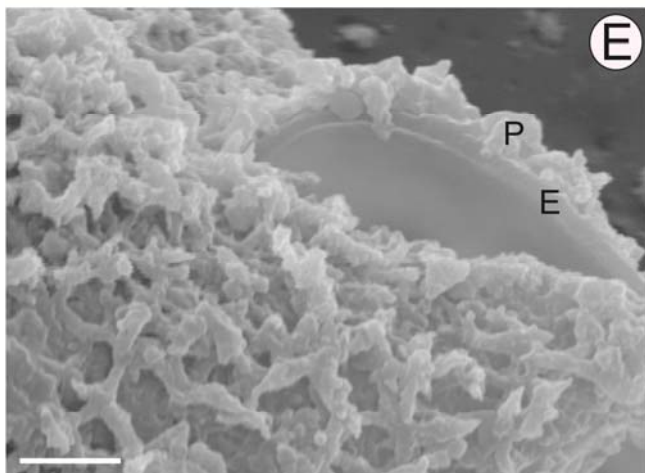
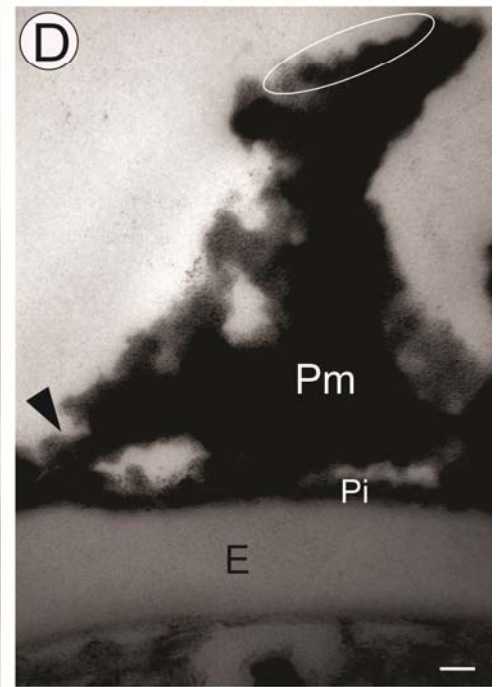
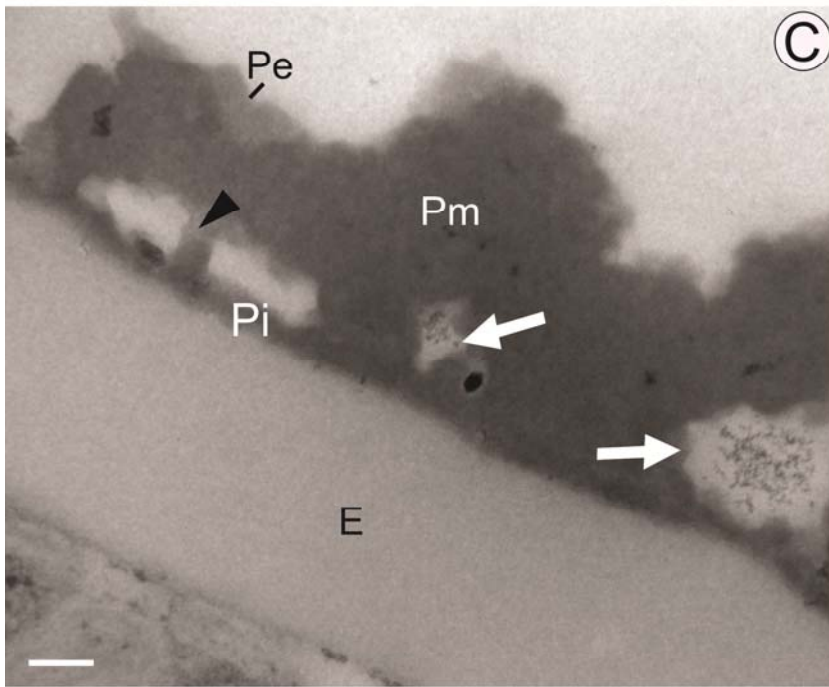
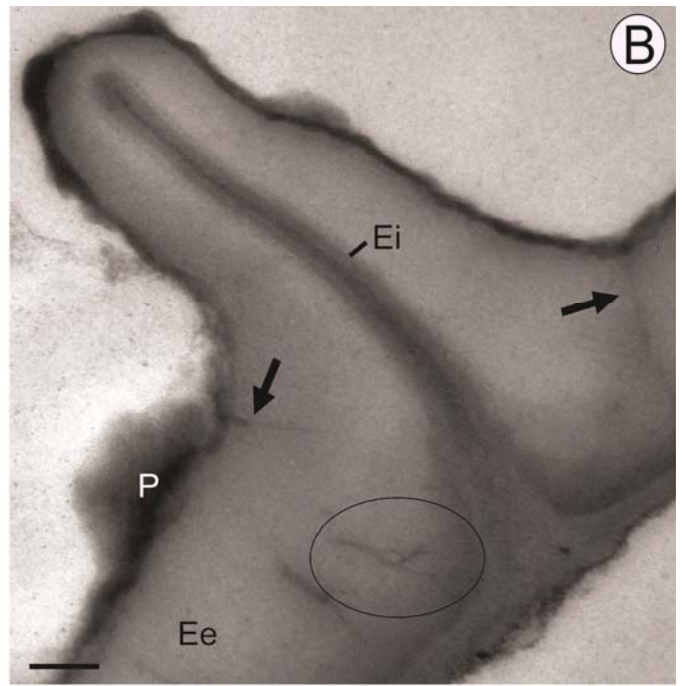
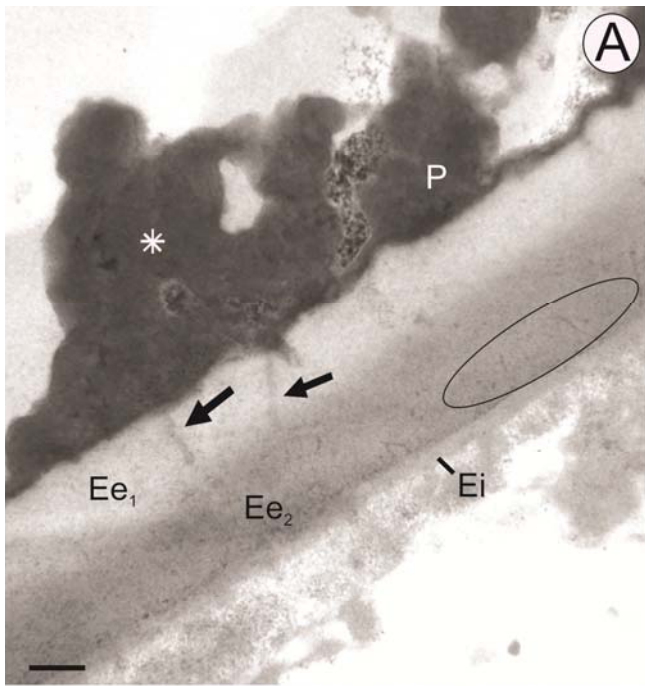


Lámina 14

## ● *Discusión*

Las esporas de *Microlepidia speluncae* y *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* están tapizadas por una red tridimensional de cordones ramificados y fusionados, que se disponen paralelos a la superficie. Desde la red se proyectan cordones perpendiculares a la superficie, de extremos libres o fusionados. A pesar de que en ambas especies estos últimos cordones varían entre los 1-3  $\mu\text{m}$ , los mismos sólo se observaron al MEB. Sin embargo, en todas las muestras analizadas, los cordones se observaron al MO como pequeños procesos esferoidales, independientemente del grado de desarrollo de las esporas. Es probable que por esta razón las esporas de ambas especies hayan sido descritas por otros autores como provistas de una ornamentación granular (Selling 1946; Nayar & Devi 1968a; Welman 1970; Lugardon 1971; Soepadmo & Khoo 1977; Devi 1977; Lorscheitter *et al.* 2002; Esteves & Coelho 2007), fosulada o foveolada (Erdtman & Sorsa 1971), escabrada (Harris 1955; Belling & Heusser 1975; Contreras-Duarte & Bogotá-Ángel 2004), verrucosa (Tardieu-Blot 1966) o psilada (Welman 1970; Kremp 1972). Únicamente Large & Braggins (1991) describieron gránulos compuestos por cordones, semejante a lo observado en este estudio. Las diferencias halladas entre lo observado al MO y al MEB, podría tener un origen metodológico. En este sentido, el vacío necesario para el análisis con MEB podría haber contribuido con la exposición de los cordones emergentes de la red, por lo que se considera que, tanto en *Microlepidia speluncae* como en *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* la utilización de microscopía electrónica de barrido resulta fundamental para lograr una mejor comprensión de la escultura de las esporas.

Si bien las especies estudiadas pertenecen al mismo grupo morfológico, el grado de fusión de los cordones y la distribución de las redes sobre la superficie de las esporas varió en ambos casos. En *Microlepidia speluncae* los cordones son cilíndricos, circulares en sección, de superficie psilada y usualmente se fusionan en los extremos. Los mismos dejan amplios espacios entre sí y forman redes tridimensionales abiertas. Adicionalmente, las redes de cordones se distribuyen de manera uniforme en toda la superficie de las esporas.

En contraste, en *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* la complejidad de las redes es variable y está relacionada con el grado de fusión alcanzada por los cordones. Los mismos se disponen separados por espacios estrechos y pueden fusionarse completamente

para formar redes compactas o aglomeraciones sin una forma definida. En esta especie, los cordones son más cortos, aplanados, con extremos aguzados que se asemejan a espínulas y poseen superficie microverrucosa.

En base a los análisis realizados en el presente estudio, los cordones observados al MEB y que forman la ornamentación de las esporas en ambas especies coinciden con aquellos que se visualizaron al MET conformando el perisporio medio. Respecto a la estratificación de la esporodermis, las observaciones realizadas en esta tesis coincidieron con los resultados obtenidos por Tryon & Tryon (1982) para *M. speluncae* pero difieren en la interpretación de la estructura de las capas del perisporio. Dichos autores describieron al MEB una capa interna formada por hebras, una media granular y una externa provista de cordones. Según la interpretación aquí volcada, la capa interna es delgada, homogénea y de margen irregular, la media está formada por los cordones y la externa es discontinua y poco evidente. Asimismo, la capa media granular mencionada por los autores coincidiría con la que en esta tesis se observó al MEB cubriendo y ocultando los cordones de la ornamentación. La misma no fue identificada en los análisis al MET y, por ello, no fue definida como parte de la esporodermis. Un depósito similar fue descrito por Tryon & Lugardon (1991, p. 299-300) cubriendo los cordones del perisporio de *Lindsaea austrosinica* y las papilas o pequeños tubérculos de *L. microphylla*.

Nuevos estudios son necesarios para corroborar si la misma es de naturaleza esporopolínica y forma parte de la pared de la spora o si podría asociarse con restos del tapete o material depositado durante el procesamiento.

En relación a la ultraestructura de la pared de *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, Tryon & Tryon (1982) describen un perisporio granulado con partículas fusionadas en masas o cortas barras que coincide con las observaciones de Lugardon (1971; 1974) y Tryon & Lugardon (1991). Según mi interpretación, dichos procesos de aspecto granular, que tapizan las esporas de la especie, serían el resultado de la fusión de cordones.

Las distintas orientaciones que los cordones adquieren dentro de la red tridimensional fueron definidas por Giudice *et al.* (2006) como distintos “niveles” en el perisporio de *P. arachnoideum* (bajo *P. psittacinum*). En este sentido, los autores definieron un “nivel interno” adherido al exosporio que coincidiría con los cordones orientados tangencialmente a la superficie observados en esta tesis, del cual se origina un “nivel externo” conformado

por elementos de tamaños variados, radialmente alargados, con extremos curvados y parcialmente fusionados, que coincidiría con los cordones perpendiculares a la superficie. Si bien dichos autores describen una membrana de bajo contraste cubriendo a los cordones, la cual podría coincidir con el perisporio externo (Pe), no observaron la capa interna y homogénea que constituye el perisporio interno.

La existencia de distintas opiniones sobre la estratificación y estructura de la pared, en ambas especies, puede deberse a que para un mismo ejemplar se observan esporas con distinto grado de desarrollo del perisporio.

Un perisporio formado por cordones descritos como varillas (“rodlets”) también está presente en otros grupos de helechos como Matoniaceae, Vittariaceae, Lindsaeaceae y Pteridaceae (Tryon & Lugardon, 1991). Asimismo, en los géneros *Syngamma*, *Ceratopteris* (Tryon & Lugardon, 1991), *Cheilanthes* (Morbelli & Michelena, 1989) los cordones forman redes tridimensionales. Desde el punto de vista ultraestructural, en todos los grupos mencionados los cordones presentan un centro o núcleo de baja electrodensidad y esto difiere con la subestructura de aquellos descritos en esta tesis para *M. speluncae*. En un corte transversal de los cordones de esta especie, se pueden ver márgenes y centros muy electrodensos que recuerdan a los presentes en algunas especies de *Dicksonia* (Tryon & Lugardon, 1991, pg. 323-233).

Diversos autores han discutido la presencia de cordones como elementos constitutivos de las paredes de granos de polen en *Poa*, *Alnus*, *Betula*, *Fagus*, *Rhododendron* (Claugher & Rowley, 1987; Rowley, 1995; Wittborn *et al.*, 1996; 1998) *Artemisia* (Rowley *et al.*, 1980; 1981; Rowley *et al.*, 1999), *Echinodorus* (El-Ghazaly & Rowley, 1999) *Epilobium* (Rowley & Skvarla, 2006) y *Rhoiptelea* (Skarby *et al.*, 2009); y de esporas en *Lycopodium* (Rowley, 1995; Wittborn *et al.*, 1996; 1998), *Cyathea* y *Sphaeropteris* (Marquez *et al.*, 2010a; 2010b; 2014). Si bien existen diferentes opiniones sobre la disposición de estos cordones en el espacio, todos los autores coinciden en que los mismos estarían conformados por subunidades, dispuestas helicoidalmente alrededor de un eje o canal central (Rowley 1981, 1988, 1990, & Dahl 1982) el cual podría llegar a intervenir en la transferencia de nutrientes desde el tapete al citoplasma de las esporas durante las etapas de desarrollo de las mismas Rowley *et al.* (2003). Si bien en las observaciones al MET de las esporas de *Microlepia speluncae* no se distinguen subunidades conformando los cordones, el diámetro de los

mismos y las diferencias de electrón-densidad halladas en el interior son muy similares a las descritas en el modelo mencionado.

En contraposición a lo observado en *Microlepidia speluncae*, en *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* los cordones no presentan diferenciación de electrondensidad a nivel subestructural. No obstante, presentan una gran similitud con las varillas o cordones enrollados helicoidalmente (“coiled rods” o “coiled threads”) observados en esporas de *Selaginella* (Morbelli 1995, et al. 2001) y *Alsophila* (Marquez et al. 2009, 2014). En este sentido, las microverrugas observadas sobre los cordones de *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum* podrían interpretarse como las vueltas de las subunidades de disposición espiralada (Lámina 14, Fig. D). Si bien en esta tesis no se observó la presencia de un canal central en los cordones de esta especie, son necesarios nuevos estudios con material fresco y otros tipos de fijación para corroborarlo.

Es importante destacar que en ambas especies los cordones del perisporio se observaron mejor al MET en aquellos cortes ultrafinos que fueron sumergidos en citrato de plomo durante 2,3 minutos respecto a los cortes ultrafinos sumergidos durante 5 minutos.

Particularmente en *Microlepidia speluncae*, las diferencias de electrondensidad que se observaron hacia el interior de los cordones fueron claramente identificadas cuando se disminuyó el tiempo de tinción de los cortes (Lámina 15, fig. A-B). En el caso de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, si bien hacia el interior de los cordones no se observaron diferencias de electrondensidad bajo ninguna de las dos condiciones de tinción, la ultraestructura del perisporio resultó más notoria luego de someter a los cortes a un menor tiempo de exposición al citrato de plomo (Lámina 15, fig. C-D).

De modo similar, Rowley (1987) concluyó que la intensidad de la tinción y el grado de detalle de los procesos de la esporodermis que pueden observarse son inversamente proporcionales a la duración de la inmersión de los cortes en dicho compuesto. Asimismo, Rowley (1986, 1988) y Rowley & Claugher (1996) sugirieron que el canal central y las subunidades periféricas que conformarían los cordones reaccionan de manera diferente al citrato de plomo, y que su densidad a los electrones puede relacionarse también con el grado de desarrollo de la pared de granos de polen y esporas, la disposición que las subunidades adquieren en el cordón y la funcionalidad del canal. Debido a esto último, las

diferencias observadas entre los cordones de *Microlepidia speluncae* y *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* podrían deberse a causas metodológicas.

En relación al exosporio, las características observadas para las especies de este grupo morfológico se ajustan al tipo blechnoide descrito por Lugardon (1971; 1974). El mismo se caracteriza por poseer dos capas, una interna delgada y una externa compuesta por dos estratos. Asimismo, la red de canales y cavidades del estrato más interno observadas en esta tesis, coinciden con el “estrato fisurado” descrito por el dicho autor.

Tanto en *Microlepidia speluncae* como en *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* se distinguieron con MEB cuerpos esferoidales dispersos sobre las esporas. En el análisis al MET se observó que los esferoides presentes en *Pteridium arachnoideum* subsp.

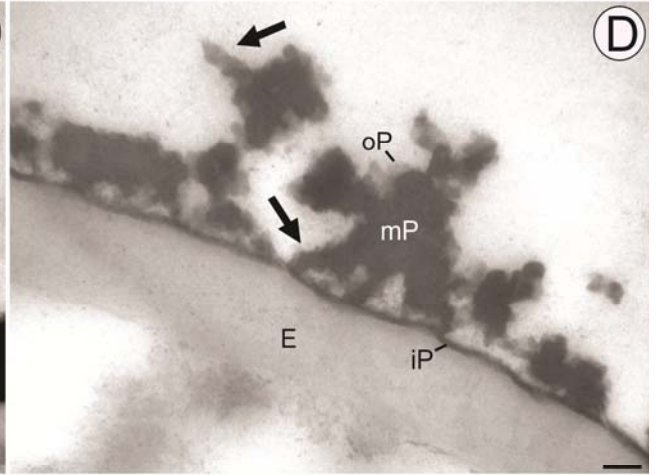
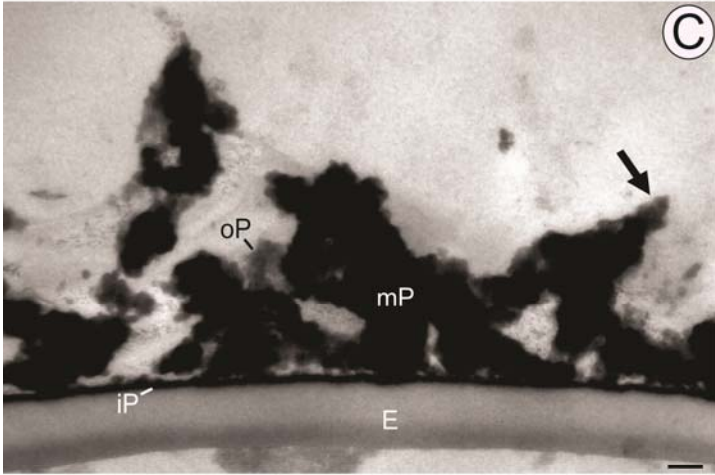
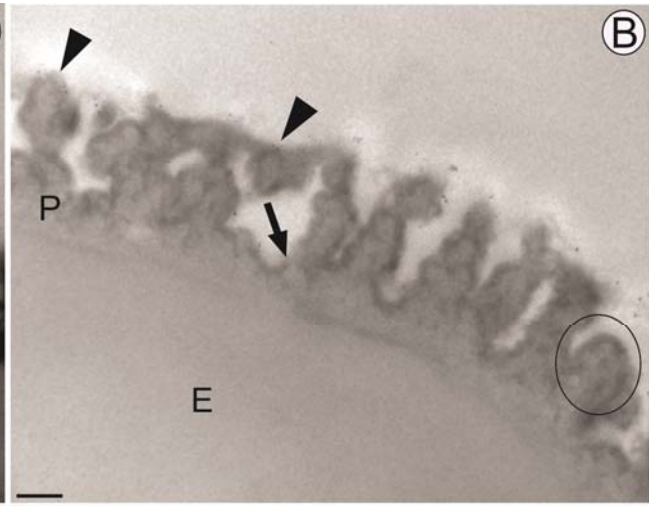
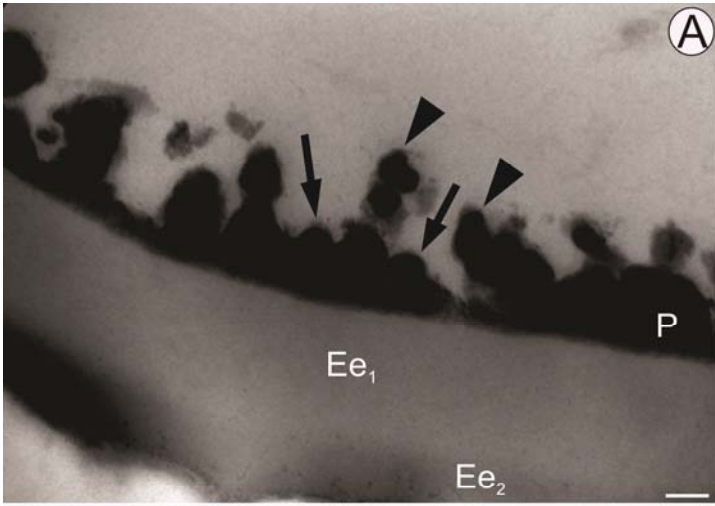
*arachnoideum* poseen una estructura central similar a la del exosporio y están rodeados por una capa similar al perisporio. Por presentar este tipo de estructura se determinó que serían glóbulos (Lugardon 1974; Tryon and Lugardon 1991). En contraposición, los esferoides hallados en *M. speluncae* no presentan variación en la electrondensidad y parecieran tener una composición similar a la del perisporio, por lo que se concluyó que son esférulas (Lugardon 1974; Tryon and Lugardon 1991).



**Lámina 15. Esporas de *Microlepidia spelunca* y *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* con TEM: diferencias en la tinción con citrato de plomo.**

**Grupo morfológico con cordones.**

**Figuras A-B.** Esporas de *Microlepidia spelunca*. **A.** Sección teñida durante 5 min. con citrato de plomo. No se observa con claridad la subestructura de los cordones tangenciales (flechas) o perpendiculares a la superficie (puntas de flecha). P = Perisporio. Ee<sub>1</sub> = Estrato externo del exosporio. Ee<sub>2</sub> = estrato interno del exosporio. **B.** Sección teñida durante 2,3 min. con citrato de plomo. Se evidencian diferencias subestructurales en los cordones tangenciales (flechas) y perpendiculares a la superficie (puntas de flecha). Los cordones presentan un margen y núcleo de mayor electrón-densidad (círculo). P = Perisporio. E = Exosporio. **Figuras C-D.** Esporas de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*. **C.** Sección teñida durante 5 min. con citrato de plomo. El perisporio presenta alta densidad a los electrones y la ultraestructura del mismo es menos notoria. Las flechas indican los cordones del perisporio medio, perpendiculares a la superficie de las esporas. Pe = Perisporio externo. Pm = Perisporio medio. Pi = Perisporio interno. E = Exosporio. **D.** Sección teñida durante 2,3 min. con citrato de plomo. La menor densidad que el exosporio presenta a los electrones permite observar mejor su ultraestructura y los límites entre los cordones del perisporio medio (flechas). Pe = Perisporio externo. Pm = Perisporio medio. Pi = Perisporio interno. E = Exosporio. Barras = 0,2 µm.



### **Pteridium: Relación entre la ploidía de la especie y el tamaño de las esporas**

Diversos autores relacionaron el tamaño de las esporas con la ploidía de los individuos que las producen y señalaron que las especies poliploides presentan esporas significativamente más grandes que las especies diploides (Manton, 1950; Wagner, 1974; Brownsey & Chinnock 1984; Tryon & Tryon, 1982).

Trabajos dedicados a dilucidar la identidad de las especies y las relaciones filogenéticas dentro de *Pteridium*, utilizaron el diámetro ecuatorial mayor de las esporas como una evidencia para comprobar la existencia de especies tetraploides originadas de la hibridación entre especies diploides. A partir del análisis de ejemplares provenientes de México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Perú, Brasil, Paraguay y Uruguay, Thomson & Alonso-Amelot (2002) y Thomson *et al.* (2008) definieron para *P. arachnoideum* (2n) (incluyendo *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum*) y *P. caudatum* (4n) diámetros promedio de 27,33 (+/- 0.51) - 33,92 (+/-0.58)  $\mu\text{m}$  y 38,1 (+/- 0.55) - 45,25 (+/- 0.70)  $\mu\text{m}$  respectivamente.

En comparación, las esporas de *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum* analizadas en esta tesis presentaron un diámetro ecuatorial mayor de 37,4 - 47,2  $\mu\text{m}$  que no coincide con los resultados obtenidos en los trabajos mencionados para esta especie, sino que se acercan más a las medidas observadas en la especie tetraploide.

Es importante destacar que el número de ejemplares estudiados tanto de *P. arachnoideum* como de *P. caudatum* fueron 7 en el trabajo de Thomson & Alonso-Amelot (2002) y 3 en el de Thomson (2008). Según mi opinión, este número de muestras es muy bajo y no permite obtener un resultado representativo de la variabilidad de tamaños que pueden observarse en las esporas de cada especie y, por lo tanto, de la ploidía de cada especie. En este sentido, sería incorrecto tener en cuenta los valores obtenidos por los autores mencionados para realizar conclusiones acerca de un origen poliploide de la subespecie estudiada en esta tesis. Adicionalmente, sería importante llevar a cabo estudios citológicos orientados a determinar el número cromosómico de la subespecie para corroborar si los diámetros observados se deben a una poliplodia o forman parte de la variabilidad característica del taxón.

## 4.2. Géneros con esporas monoletes

Dentro de la familia se identificaron cuatro géneros que producen esporas monoletes, incluidos en cinco grupos morfológicos distintos.

El grupo morfológico baculado está representado por *Blotiella lindeniana*. Esta especie posee un perisporio provisto de báculas rodeadas por engrosamientos de manera tal que conforman mamelones.

El grupo morfológico rugulado está representado por *Paesia glandulosa*. El perisporio en este caso presenta lomos sinuosos que conforman un arreglo laberíntico y pueden fusionarse definiendo areolas aisladas.

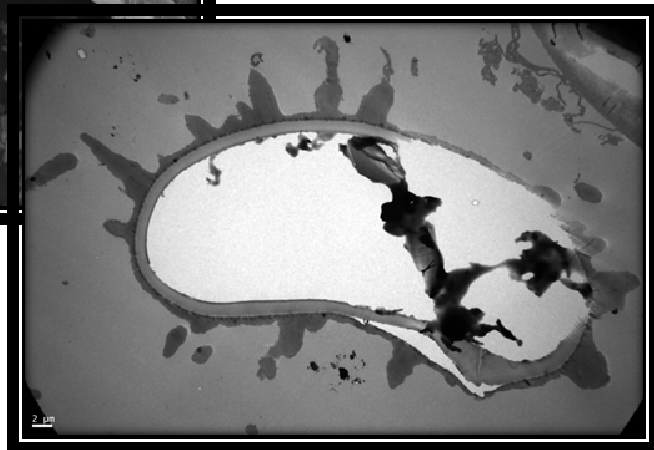
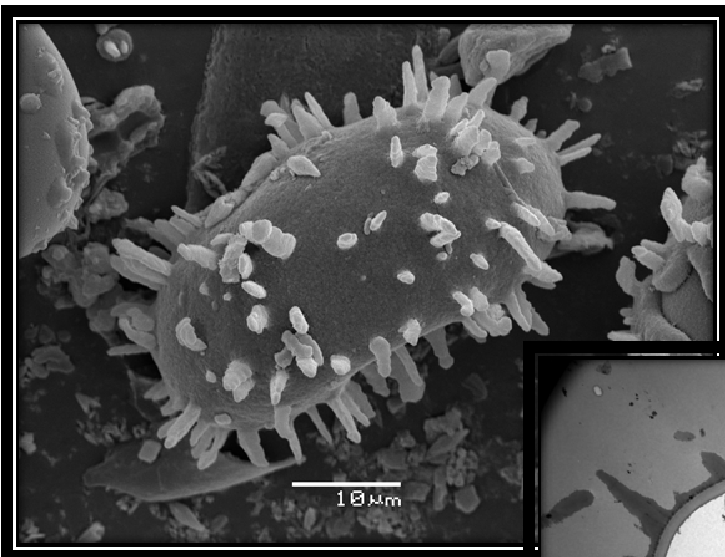
El grupo morfológico tuberculado se observó en *Histiopteris incisa*. En esta especie, la superficie de las esporas está tapizada por tubérculos que se fusionan hacia los polos para formar retículos más o menos conspicuos, de distintas dimensiones. Los tubérculos son formados por el exosporio y el perisporio acompaña la ornamentación.

Finalmente, las especies del género *Hypolepis* se segregaron en dos grupos morfológicos distintos. El grupo morfológico equinado incluyó a *H. mitis*, *H. repens* y *H. stolonifera*. En estas especies el perisporio presenta espinas aplanadas en sección transversal que pueden fusionarse lateralmente y formar crestas sinuosas. Sobre las espinas o crestas se observan cordones ramificados y fusionados entre sí.

El grupo morfológico crestado está representado por *H. rugosula* subsp. *pradoana*. En este grupo el perisporio está ornamentado con crestas de altura y longitud variables, margen irregular y, ocasionalmente, bases fenestradas. Al fusionarse, las crestas pueden formar areolas aisladas.



# BÁCULAS



#### 4.2.1 Grupo morfológico baculado (Láminas 16 y 17)

Este grupo morfológico está integrado por *Blotiella lindeniana*.

Las esporas son monoletes, bilaterales, oblongas a sub-elípticas en vista polar. En vista ecuatorial el polo distal es convexo y el polo proximal es plano (Lámina 16, Fig. A-C).

Las lesuras son rectas de 18–24  $\mu\text{m}$  y se extiende en 1/2 - 2/3 partes de la longitud de la espora. Los elementos que forman la ornamentación pueden cubrir parcialmente las lesuras.

El perisporio es hialino al MO y presenta báculos rodeadas por engrosamientos de la pared de manera tal que conforman “mamelones”. Posee un grosor de 0,3-7,6 y una superficie microVerrucosa. Al MET está formado por dos capas.

El exosporio es hialino-amarillento al MO y presenta pilas regularmente dispuestas en toda la superficie de la pared. Tiene un grosor de 0,8-4,4  $\mu\text{m}$  y al MET se observa que está dividido en dos capas.

#### ***Blotiella* R.M. Tryon**

El género presenta alrededor de 15 especies, la mayoría distribuidas en África tropical y subtropical y en Madagascar.

Las especies del género crecen en el sotobosque de selvas húmedas y nubladas, selvas montanas, ocasionalmente en espacios abiertos, sobre barrancos y a lo largo de arroyos. Las frondes suelen ser escandentes sobre arbustos y pequeños árboles. Una única especie, *B. lindeniana*, está presente en el Neotrópico.

***Blotiella lindeniana* (Hook.) R.M. Tryon**, Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University 191: 99. 1962.

Basónimo: *Lonchitis lindeniana* Hook., Species Filicum 2: 56, t. 89A. 1851. Tipo: Venezuela, Caracas, 1842, *Linden 543* (Lectotipo: K!, Isotipo: US!).

Descripción del esporofito: *Rizomas* de 0,82-1,1 mm de diámetro, erectos a decumbentes, pubescentes, con pelos pluricelulares, blancuzcos a marrones. *Frondes* 0,5-6 m de longitud,

monomórficas. *Pecíolo* de 32-91 cm de longitud, robusto, pajizo a castaño-oscuro, adaxialmente surcado, densamente pubescente con tricomas aciculares, catenados, marrón oscuro. *Láminas* lanceoladas o elípticas, pinnado pinnatífidas a bipinnado pinnatífidas, sésiles o cortamente pecioladas, con abundantes tricomas en ambas superficies, aciculares, glandulares o no. *Raquis* surcado adaxialmente, pajizos a pardo-amarillentos, moderada a densamente pilosos, con tricomas catenados, patentes, pardo-amarillos. Epidermis abaxial y adaxial entre venas densamente pubescente, con tricomas aciculares hialinos a pardo-amarillos. *Pinnas* de 17-45 cm de longitud, sésiles o cortamente pecioluladas, lanceoladas a elípticas, subopuestas. *Pínnulas* sésiles, lanceadas a lineares, las basales usualmente reducidas. *Costas* y *Cóstulas* con características similares al raquis. *Venas* generalmente areoladas, sin venillas inclusas, glabras. *Soros* marginales, reniformes, usualmente en la base de un seno, o en los lados basiscópico y acroscópico, continuos alrededor del seno o confinado al mismo o extendiéndose a cada lado, especialmente cuando el seno es amplio. *Indusios* a continuación del margen, bien diferenciados del mismo, membranáceos, amarillentos, de margen crenado, más o menos pubescentes, con tricomas aciculares.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Estados de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo (Fig. 11). Fuera del área: Costa Rica, Panamá, Antillas mayores, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia.

Ampliamente distribuido en América aunque poco común.

Hábitat: Selvas húmedas y lluviosas, selvas montanas. Entre los 1000-2000 msm.

**Figura 11. Distribución de *Blotiella lindeniana* en la Provincia Fitogeográfica**

**Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**



*Blotiella lindeniana*



Figura 10

### Descripción de las esporas

DP: 22-27-37  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 37-43-54  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 22-25-38  $\mu\text{m}$

Espesor del perisporio: 0,3-0,9  $\mu\text{m}$ , (7,6  $\mu\text{m}$  si se incluyen las báculos del perisporio)

Espesor del exosporio: 0,8-1,5  $\mu\text{m}$  (alcanza 4,4  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura)

Longitud de la lesura: 18–24  $\mu\text{m}$

El perisporio presenta báculos o muy ocasionalmente espinas de 1,5–7  $\mu\text{m}$  de alto, con ápice obtuso, elípticas en sección transversal y dispersas en la superficie sin un ordenamiento definido (Lámina 16, Fig D-E). Engrosamientos de la pared rodean la base de los elementos de la ornamentación y conforman mamelones, los cuales pueden fusionarse entre sí (Lámina 16, Fig E-F). En vista proximal, la ornamentación puede cubrir parcialmente la lesura (Lámina 16, Fig. D).

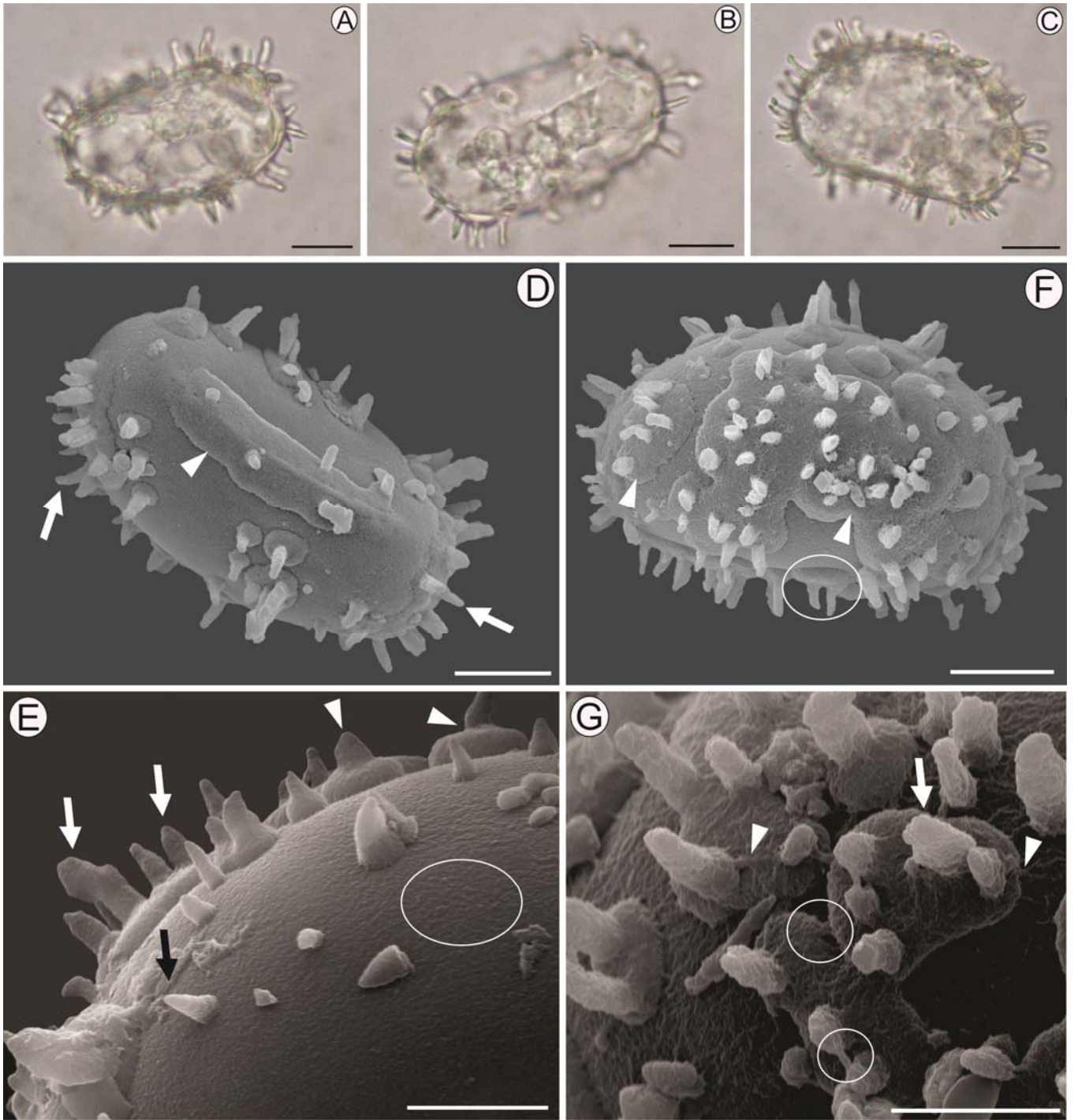
Al MO es hialino (Lámina 16, Fig. A-C), su superficie es microverrucosa y puede presentar cordones los cuales conectan a los elementos de la ornamentación (Lámina 16, Fig. E, G).

El exosporio al MO es hialino a amarillento (Lámina 16, Fig. A-C) y visto con MEB presenta una superficie finamente ornamentada.

**Lámina 16. Esporas de *Blotiella lindeniana* al MO y MEB.**

**Grupo morfológico baculado.**

**Figuras A-C.** Esporas al MO. **A.** Espora en vista distal. **B.** Espora en vista proximal. **C.** Espora en vista ecuatorial. **Figuras D-G.** Esporas al MEB. **D.** Espora en vista proximal. La ornamentación es baculada, con báculos separadas entre sí por amplios espacios (flechas). La lesura está cubierta parcialmente por engrosamientos de la pared (puntas de flecha). **E.** Detalle de espora en vista ecuatorial. Las báculos presentan ápice obtuso (flechas blancas). Ocasionalmente se observan elementos similares a espinas (flecha negra). Engrosamientos de la pared rodean basalmente los elementos de la ornamentación, y conforman mamelones (puntas de flecha). La superficie del perisporio es verrucosa (círculo). **F.** Espora en vista distal. Los mamelones (círculo) se fusionan entre sí masivamente a través de sus bases (puntas de flecha). **G.** Detalle de espora en vista ecuatorial. Las báculos son aplanadas en sección (flecha). Sobre la superficie de las esporas se disponen cordones (puntas de flecha) que conecta a los elementos de la ornamentación (círculos). Barras: **A, B, C, D y F** = 10  $\mu\text{m}$ ; **E y G** = 5  $\mu\text{m}$ .



## **Ultraestructura**

El exosporio presenta dos capas, la capa interna (Ei) es fácilmente distinguible a nivel de la lesura, tiene 20-70 nm de grosor, estructura homogénea, y baja electrondensidad (Lámina 17, Fig. B, E).

La capa externa es de 0,7-1,4  $\mu\text{m}$  (4,3  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura), presenta mayor densidad a los electrones que la anterior, estructura homogénea y tiene dos estratos. El estrato interno (Ee<sub>2</sub>) posee cavidades, fisuras y canales, rellenos de material electrón-denso (Lámina 17, Fig. B). La estructura del estrato externo (Ee<sub>1</sub>) es homogénea y posee canales ramificados (Lámina 17, Fig. B). El margen superior es pilado, con elementos de 30-60 nm de diámetro, densamente dispuestos a lo largo de toda la superficie (Lámina 17, Fig. D-F).

El perisporio es más denso a los electrones que el exosporio y presenta tres capas. La interna (Pi), de 0,05-0,4  $\mu\text{m}$  de espesor, tapiza los elementos pilados del exosporio. La estructura está dada por cordones densamente dispuestos en la base de la capa y más espaciados hacia el margen (Lámina 17, Fig. C-F). La capa media (Pm) es menos electrón-densa que la anterior y su espesor varía notablemente (0,1-7  $\mu\text{m}$ ) ya que constituye las báculos u ocasionalmente espinas de la ornamentación (Lámina 17, Fig. C-F). Las báculos ocasionalmente se fusionan entre sí a través de elementos (Lámina 17, Fig. C). La Pm presenta estructura alveolar, interrumpida por cavidades rellenas de material electrón-denso y un margen verrucoso (Lámina 17, Fig. C).

La capa externa (Pe) es discontinua y tapiza la superficie del perisporio medio (Lámina 17, Fig. C, E-F). Es delgada, de 0,03-0,2  $\mu\text{m}$ , baja electrondensidad y estructura generalmente heterogénea, si bien se pueden observar sutiles diferencias de electrondensidad en su interior. Ocasionalmente, cordones de 100 nm de diámetro se extienden desde esta capa y conectan a los elementos de la ornamentación (Lámina 17, Fig. C).

Sobre la superficie del perisporio se observan cuerpos esféricos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro con un núcleo central similar al exosporio y cubiertos por una pared de material más electrón-denso, similar al perispórico (Lámina 17, Fig. D).

**Lámina 17. Esporas de *Blotiella lindeni* al MEB y MET.**

**Grupo morfológico baculado.**

**A.** Fractura del perisporio en vista distal al MEB. El exosporio presenta una superficie finamente ornamentada. P = Perisporio. **Figuras B-E.** Sección de la pared al MET. **B.** Sección de la esporodermis a través de la lesura. El exosporio interno (Ei) posee estructura homogénea y baja electrondensidad. El estrato interno del exosporio externo (Ee<sub>2</sub>) posee cavidades, fisuras y canales que tienen continuidad con el estrato externo (Ee<sub>1</sub>). Este último tiene estructura homogénea y presenta canales ramificados (flechas). P = Perisporio. **C.** En el perisporio se observa una capa externa discontinua (Pe). La capa media (Pm) está ornamentada con báculas que se fusionan entre sí a través de procesos angostos (asterisco) y cordones del Pe (flechas). Tiene margen verrucoso (elipse discontinua) y estructura alveolar con cavidades de distintos tamaños (círculo continuo). La capa interna del perisporio (Pi) es más electrón-densa que las anteriores. **D.** Sobre el perisporio se observa un cuerpo esférico con un núcleo central similar al exosporio cubierto por una pared de material similar al perisporio (g). El margen del exosporio es ornamentado (elipse). Pm = Perisporio medio. Pi = Perisporio interno. **E.** Se observan el exosporio interno (Ei), exosporio externo (Ee), perisporio interno (Pi), perisporio medio (Pm) y perisporio externo (Pe). **F.** La capa externa del perisporio (Pe) presenta leves diferencias de electrondensidad en su interior. La capa interna (Pi) presenta cordones densamente dispuestos en la base de la capa y más espaciados hacia el margen irregular (flechas). El margen del exosporio (E) está ornamentado por pilas densamente dispuestas a lo largo de toda la superficie. Barras: **A** = 1 µm; **B, C, D** = 0,5 µm; **E** = 100 nm; **F** = 50 nm.

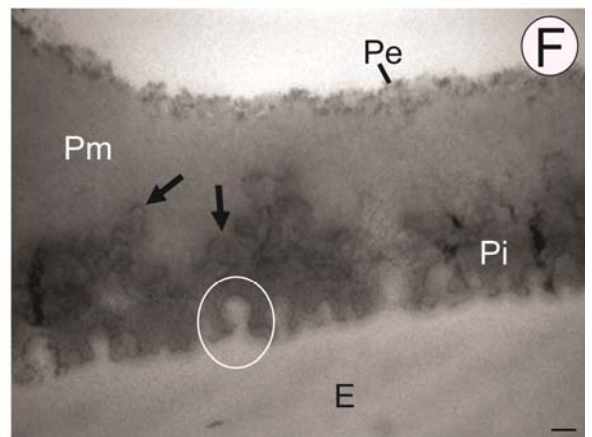
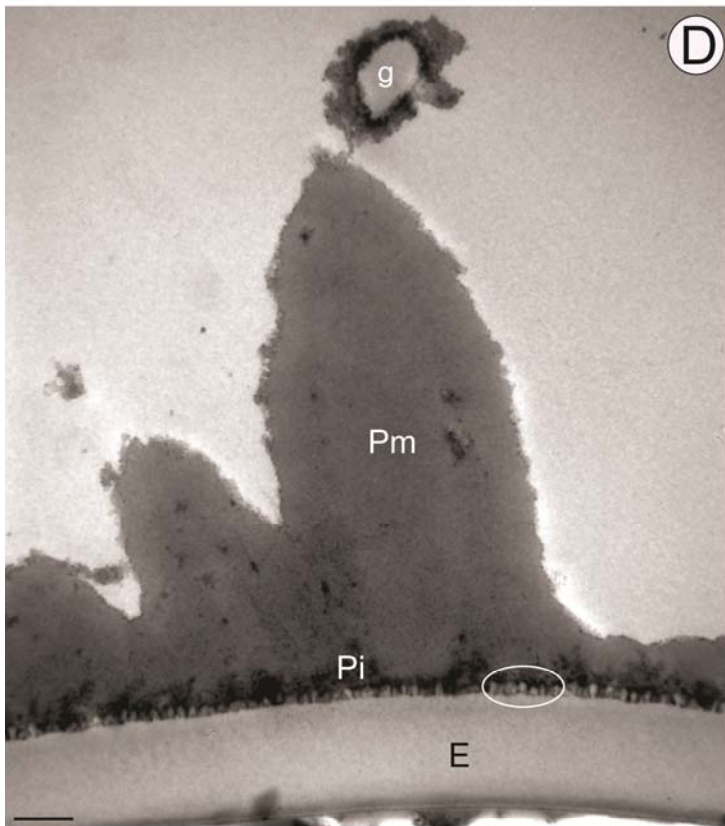
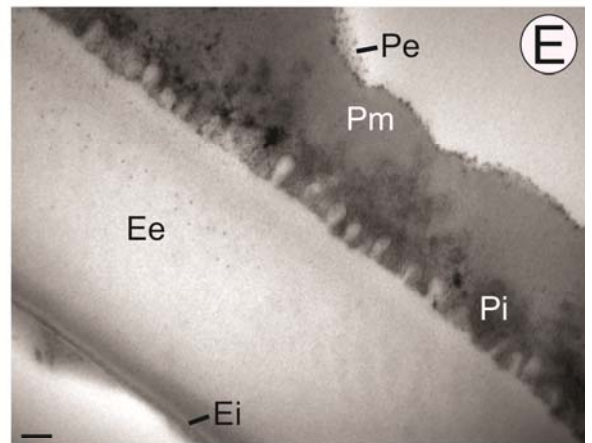
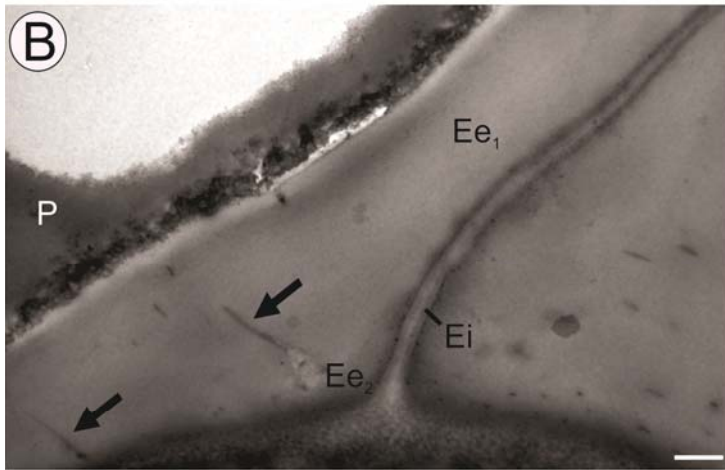
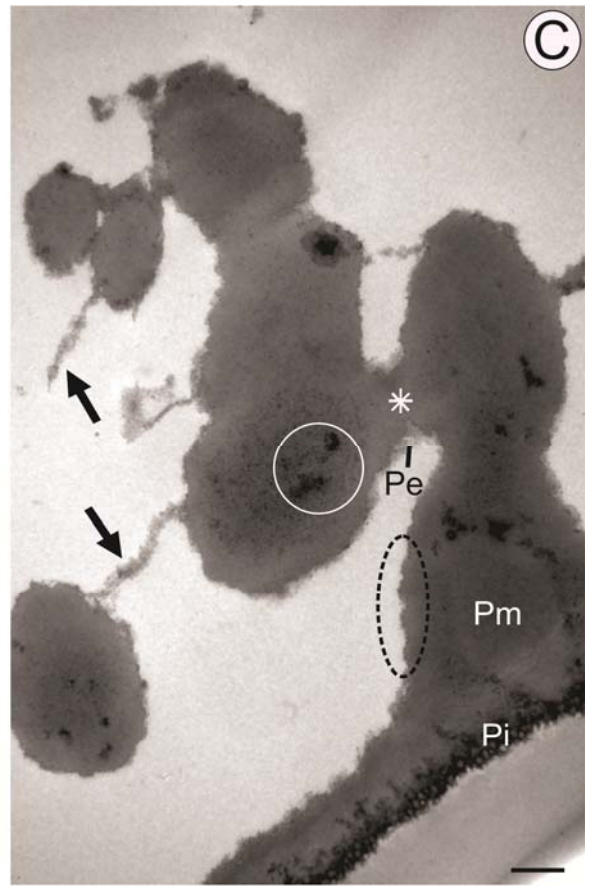
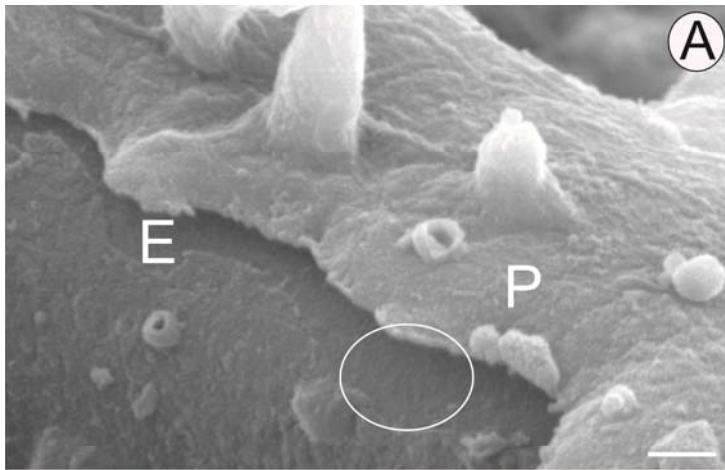


Lámina 17

## ● **Discusión**

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, las esporas de *Blotiella lindeniana* se caracterizan por presentar una ornamentación formada por báculos, rodeadas en la base por engrosamientos de la pared de forma tal que constituyen mamelones. Luego de realizados los análisis con MET se determinó que las báculos observadas con MO y MEB, y que se encuentran distribuidas en toda la superficie de las esporas, están constituidos por perisporio. Estas interpretaciones contradicen los resultados obtenidos por otros autores quienes señalaron la ausencia de perisporio en la especie (Nayar, 1964; Devi, 1977), identificaron restos de perisporio sin una ornamentación definida (Erdtman & Sorsa, 1971) o describieron un perisporio equinado (Welman, 1970; Tryon & Tryon, 1982; Tryon & Lugardon, 1991). Si bien en esta tesis pudieron observarse algunas espinas aisladas sobre la superficie de las esporas, la ornamentación predominante estuvo formada por elementos cilíndricos, siempre rectos, de ápice obtuso o redondeado y lados paralelos. La morfología de estos elementos se corresponde con las definiciones de “báculo” dadas por Lellinger (2002) y Punt *et al.* (1994, 2007), por lo que fue adoptada para nombrarlos. Hasta el momento, los únicos autores que describieron báculos sobre la superficie de *B. lindeniana* fueron Murillo & Bless (1978).

Báculos de ápice obtuso similares a las observadas en esta especie fueron descritas para los géneros *Aglaomorpha* y *Drynaria* de la familia Polypodiaceae (Tryon & Lugardon, 1991, pg. 309-311).

Con frecuencia, en los ejemplares estudiados se observaron con MEB y MET cordones en la superficie del perisporio que conectan a las báculos, como fue observado por Tryon & Lugardon (1991).

En relación a la ultraestructura de la esporodermis, es importante destacar que el análisis con MET llevado a cabo en esta tesis es el primer estudio de este tipo para la especie. En este sentido, los resultados indican que el perisporio posee tres estratos: el externo delgado y discontinuo, el estrato medio que constituye las báculos de la ornamentación y el interno conformado por cordones distintos a los cordones superficiales anteriormente mencionados. Respecto al exosporio, presenta dos capas, una interna delgada y una externa compuesta por dos estratos. El estrato interno está atravesado por una red de canales y cavidades



rellenas de material electrón-denso, que coinciden con el “estrato fisurado” descrito por Lugardon (1971; 1974) para los exosporios de tipo blechnoide.

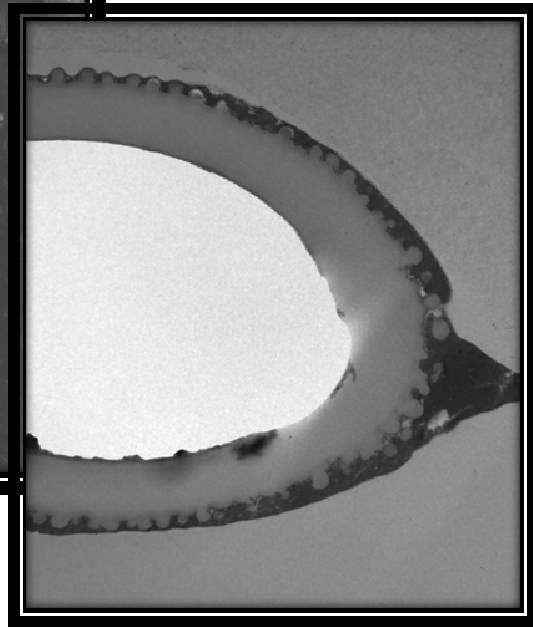
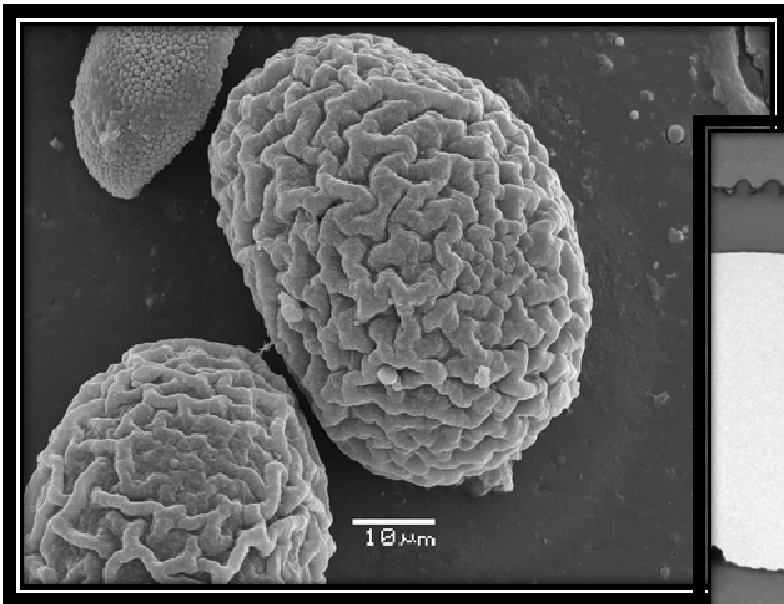
El estrato externo es más grueso y está ornamentado por pilas distribuidas regularmente en toda la superficie de la capa, fuertemente adheridas a los cordones del perisporio interno. Es probable que, por esta razón, para lograr la fractura de la esporodermis fuera necesario exponer a las esporas a ultrasonido durante 20'. Con MEB, en la ornamentación del margen del exosporio se observó un depósito granulado que coincide con el estrato granulado identificado bajo los elementos de la ornamentación por Tryon & Tryon (1982). A diferencia de nuestra interpretación, estos autores describieron a dicho estrato como parte del perisporio.

Dos tipos de cuerpos esféricos fueron identificados dispersos sobre la superficie de las esporas con MEB y MET e inmersos en el perisporio con MET. El primer tipo presentó un núcleo central de estructura similar a la del exosporio y rodeado por material perispórico, mientras que el segundo tipo se constituyó enteramente por material perispórico. Según lo descrito por Lugardon (1974) y Tryon & Lugardon (1991) estos esferoides podrían corresponder a “glóbulos” y “esférulas” respectivamente.

Si bien en el pasado el género *Blotiella* fue relacionado con *Lonchitis* y *B. lindeniana* y por esto fue identificada como *Lonchitis lindeniana*, la morfología de las esporas aporta evidencia adicional para separar los taxones incluidos en ambos géneros. En este sentido, las esporas monoletes, ornamentadas por báculas, de *B. lindeniana* difieren de aquellas triletes, granuladas, presentes en la mayoría de las especies de *Lonchitis* (Tryon & Lugardon 1991, pg. 406).



# RÚGULAS



#### 4.2.2 Grupo morfológico rugulado (Láminas 18, 19 y 20)

Este grupo morfológico está integrado por *Paesia glandulosa*.

Las esporas son monoletes, bilaterales. En vista polar son elípticas. En vista ecuatorial, el polo distal es convexo y el polo proximal es plano (Lámina 18, Fig. A-C).

La lesura es recta, de 26–41  $\mu\text{m}$ , y alcanza  $\frac{3}{4}$  partes de la longitud de la espora. La escultura es rugulada, con lomos sinuosos que conforman un arreglo laberíntico y se fusionan para formar areolas aisladas.

El perisporio es hialino en etapas tempranas del desarrollo y gris-oscuro a la madurez, al MO. Tiene un grosor de 0,09-4  $\mu\text{m}$  y, observado con MET, está formado por 2 capas.

El exosporio es hialino-amarillento al MO, con tubérculos de superficie microverrucosa, los cuales están regularmente distribuidos en toda la superficie de la espora. Tiene un grosor de 1,8-4,5  $\mu\text{m}$  y está formado por 2 capas al MET.

#### ***Paesia* J. St.-Hil.**

Género con ca. 12 especies, pantropical, distribuido desde Malasia a Tahiti y sur de Nueva Zelanda. Si bien necesita una revisión taxonómica completa, en América Tropical se reconocen 2 especies de *Paesia*: *P. anfractuosa* endémica de Costa Rica, *P. glandulosa* ampliamente distribuida. Son plantas escandentes presentes en selvas húmedas y nubladas, usualmente en espacios disturbados como claros y bordes de caminos. También en bosques rocosos, matorrales y hábitats montañosos. Puede formar grandes poblaciones.

***Paesia glandulosa* (Sw.) Kuhn**, Festschrift zum 50 Jährigen Jubiläum der Königstädtischen Realschule zu Berlin 347. 1882.

Basónimo: *Cheilanthes glandulosa* Sw., Vetenskaps Academiens Handlingar 1817(1): 77. 1817. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Villa Rica s.d., *Freyreis s.n.* (Holotipo S!, Isotipo S!).

Descripción del esporofito: *Rizoma* largamente rastrero de 1,3-2,5 mm de diámetro, pubescente, con tres tipos de tricomas: setiformes, catenados y glandulares, en todos los

casos castaño-oscuros. *Pecíolos* de 0,1-0,47 m de longitud, marrones a negros, surcados o no en cara adaxial, con tricomas catenados y glandulares. *Frondes* de 0,2-1,4 m, escandentes, monomórficas. *Láminas* elongado-elípticas a triangular, tripinnado-pinnatífidas, a veces tetrapinnado-pinnatífidas en la base. *Raquis* marrón-oscuro, a veces más claro hacia la zona media y distal, surcados adaxialmente, pubescentes en ambas caras, con tricomas catenados y glandulares. *Pinnas* de 12,5-41,7 cm de longitud, 15-30 pares, lanceoladas o lineares, alternas, pecioladas. *Pínnulas* lanceoladas, sésiles a cortamente pecioladas; pínnulas basales reducidas o no. *Cóstulas* surcadas adaxialmente, pubescentes en ambas caras, con tricomas catenados y glandulares. *Segmentos* oblongos, pinnatisectos en la base de las pínnulas, enteros hacia el ápice, de margen entero o crenado. *Venas* libres, pubescentes, con tricomas catenados, el ápice de las venas estériles en cara adaxial, delgado. Epidermis entre venas pubescentes en ambas superficies con tricomas glandulares. *Soros* oblongos, marginales, dispuestos en cortas comisuras vasculares que conectan 2 o varios ápices de nervaduras. *Indusio* doble, el adaxial formado por el margen escarioso recurvado, membranáceo y crenado, pubescente con tricomas catenados, aciculares y glandulares o glabro, el abaxial inconspicuo, abriéndose hacia afuera, membranáceo.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Estado de Minas Gerais (Fig 12). Fuera del área: Poco común en América tropical. Costa Rica, Panamá, Antillas Mayores, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia.

Hábitat: Selvas nubladas, claros de selvas, bordes de caminos, laderas arbustivas, campos rupestres, cimas expuestas, páramos. Crece entre los 1200-3600 msm.

**Figura 12. Distribución de *Paesia glandulosa* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Paesia glandulosa*



Figura 12

### Descripción de las esporas

DP: 34-39-50 $\mu$ m

DE<sub>1</sub>: 50-56-67 $\mu$ m

DE<sub>2</sub>: 29-37-42 $\mu$ m

Espesor del perisporio: 0,09-0,2  $\mu$ m (4  $\mu$ m incluyendo los lomos de la ornamentación)

Longitud de la lesura: 26-41  $\mu$ m

Espesor del exosporio: 1,8 en la zona inter-tubérculos, 3,8  $\mu$ m en los tubérculos (alcanza 4,5  $\mu$ m en la zona de la lesura)

El perisporio es gris-oscuro al MO (Lámina 17, Fig. A-C) y presenta una ornamentación rugulada con lomos de 1,4–3,6  $\mu$ m de ancho, sinuosos, no paralelos, dispuestos irregularmente en toda la superficie de la espora conformando un arreglo laberíntico, separados entre sí por espacios estrechos de 0,2-2,1  $\mu$ m (Lámina 18, Fig. D; Lámina 19, Fig. C). Ocasionalmente los lomos pueden fusionarse formando areolas abiertas y aisladas que no alcanzan a definir un patrón reticulado (Lámina 18, Fig. D). En cara proximal se distinguen lomos cortos de 5–6  $\mu$ m de longitud, paralelos entre sí, y adyacentes y perpendiculares a la lesura, fusionados por sus lados o extremos (Lámina 18, Fig. E). En algunos casos, las esporas presentan lomos aislados, más angostos que los descritos arriba, de márgenes afilados, similares a crestas (Lámina 19, Fig. A). La superficie del perisporio es granulosa y se observan cuerpos esferoidales sobre la misma (Lámina 19, Fig. C).

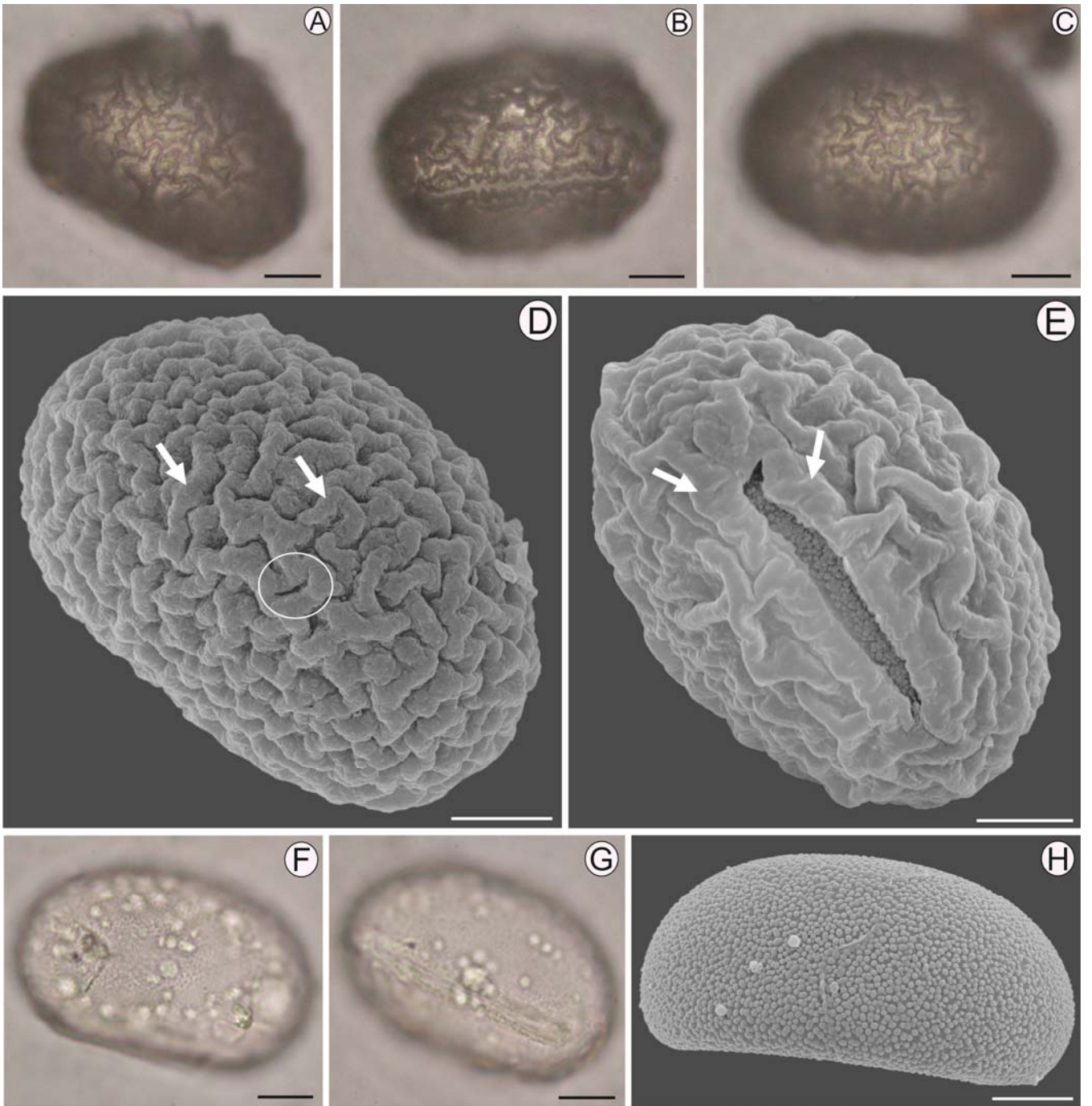
Al MO, el exosporio es hialino-amarillento (Lámina 17, Fig. A-C) y presenta tubérculos de 0,3–1,2  $\mu$ m de diámetro los cuales se encuentran regularmente distribuidos y están separados entre sí por espacios estrechos de 0,04-1,5  $\mu$ m (Lámina 18, Fig. H; Lámina 19, Fig. B, D). Los tubérculos pueden fusionarse parcialmente en grupos de dos o tres, sin perder completamente la individualidad (Lámina 19, Fig. D). La superficie de los mismos es rugosa a verrucosa.

**Lámina 18. Esporas de *Paesia glandulosa* al MO y MEB.**

**Grupo morfológico rugulado.**

**Figuras A-C.** Esporas maduras al MO. **A.** Espora en vista ecuatorial. **B.** Espora en vista proximal. **C.** Espora en vista distal. **Figuras D-E.** Esporas al MEB. **D.** Espora en vista distal. La ornamentación es rugulada. Se observan lomos sinuosos dispuestos conformando un arreglo laberíntico (flechas). Los lomos se fusionan y forman areolas aisladas (círculo). **E.** Espora en vista proximal. Perpendiculares a la lesura se distinguen lomos cortos fusionados por sus lados o extremos (flechas). **Figuras F-G.** Esporas desprovistas de perisporio al MO. **F.** Espora en vista distal. **G.** Espora en vista proximal. **H.** Espora al MEB en vista ecuatorial, desprovista de perisporio. El exosporio es tuberculado. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

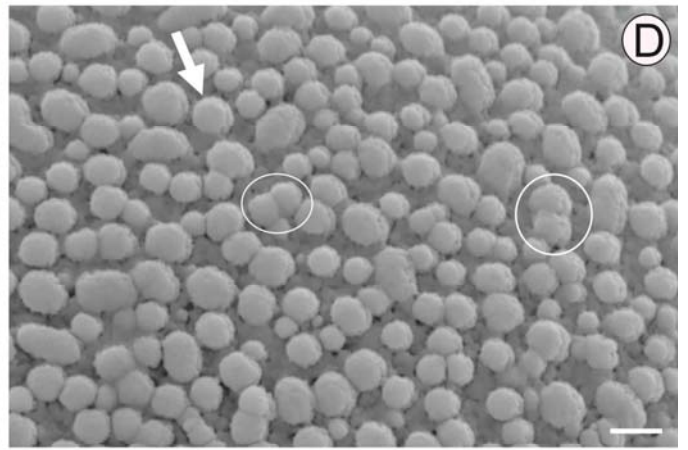
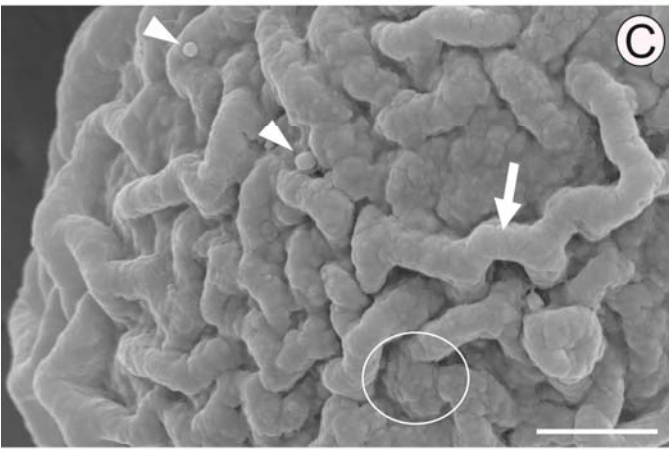
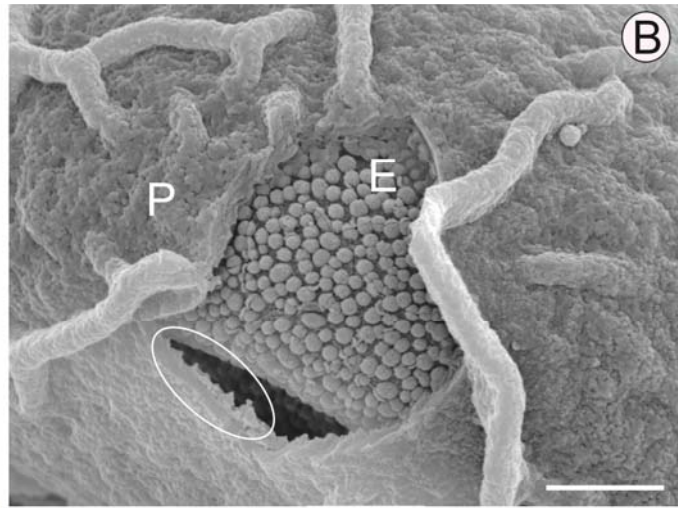
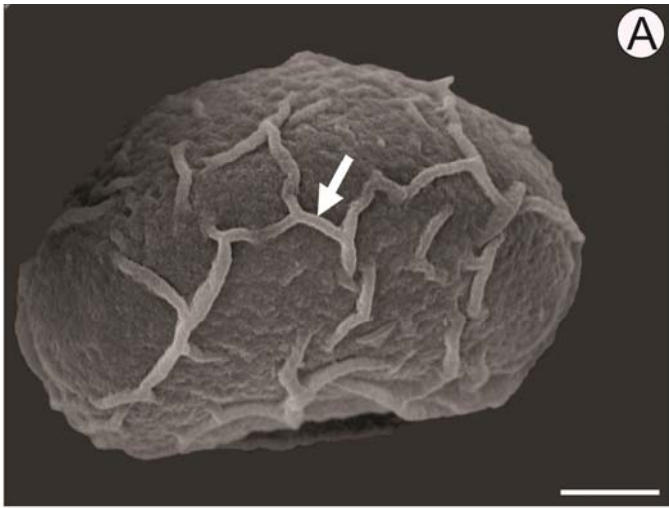




**Lámina 19. Esporas de *Paesia glandulosa* al MEB.**

**Grupo morfológico rugulado.**

**A.** Ocasionalmente los lomos del perisporio son más angostos, con márgenes afilados y están separados entre sí por espacios más anchos (flechas). **B.** Fractura de la esporodermis. La base del perisporio (P) acompaña la ornamentación del exosporio (elipse). El exosporio es tuberculado (E). **C.** Detalle de espora en vista distal. Se observan lomos sinuosos separados entre sí por espacios estrechos (flecha). La superficie de la pared es verrucosa (círculo) y se observan cuerpos esferoidales dispersos sobre la misma (puntas de flecha). **D.** Detalle de espora en vista distal desprovista de perisporio. El exosporio presenta tubérculos regularmente distribuidos en toda la superficie (flechas) que pueden fusionarse parcialmente en sin perder completamente la individualidad (círculos). Barras: **A** = 10  $\mu\text{m}$ ; **B, C** = 5  $\mu\text{m}$ ; **D** = 1  $\mu\text{m}$ .



## *Ultraestructura*

El exosporio está compuesto por dos capas bien definidas. La capa interna (Ei) la cual es más visible en la base y zona media de la lesura tiene un grosor de 10-300 nm, estructura homogénea y baja densidad a los electrones (Lámina 20, Fig. B). La capa externa es de mayor electrodensidad que la anterior y su espesor varía entre los 0,2-3,8  $\mu\text{m}$  dependiendo de la ornamentación tuberculada de la pared. Está compuesta por dos estratos: el estrato interno (Ee<sub>2</sub>) presenta cavidades y canales rellenos de material electrón-denso. Estos canales se ramifican, anastomosan y pueden extenderse hacia el estrato externo (Lámina 20, Fig. B). El estrato externo (Ee<sub>1</sub>) es más grueso que el interno y tiene estructura homogénea. En el margen presenta tubérculos de 0,3-1,2  $\mu\text{m}$  de diámetro, y superficie psilada o granulosa (Lámina 20, Fig. B-E).

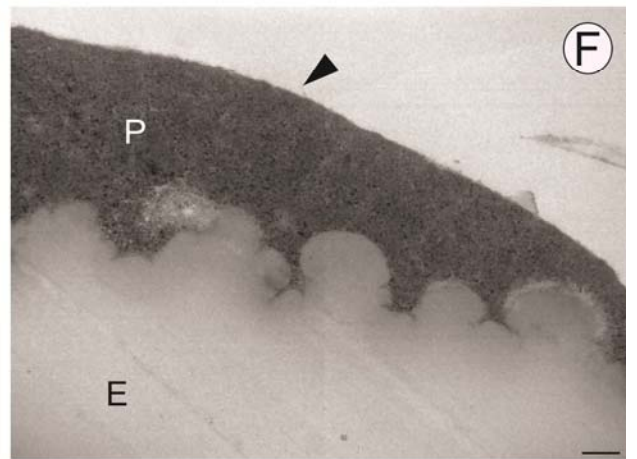
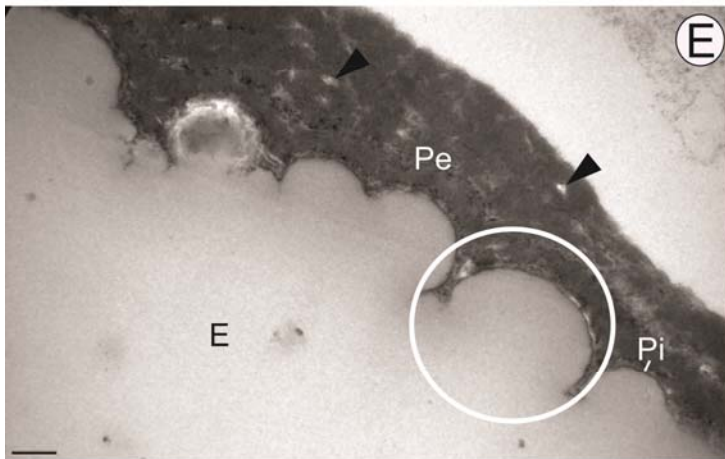
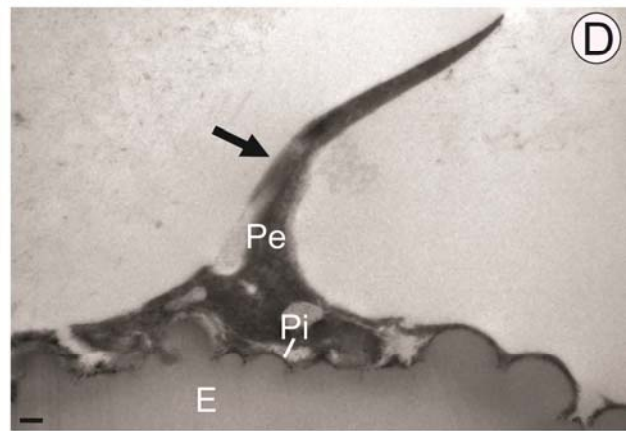
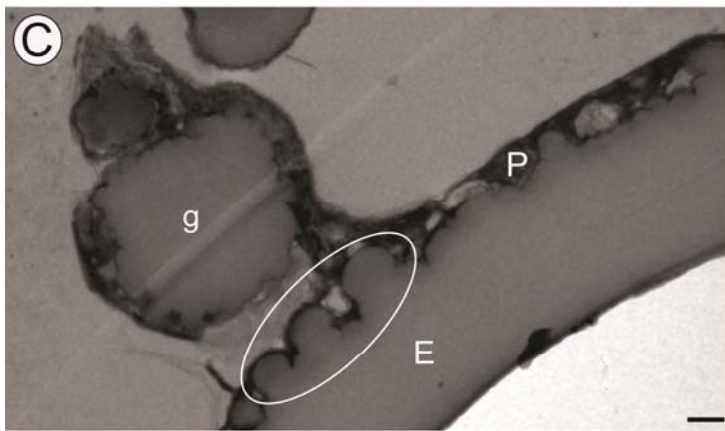
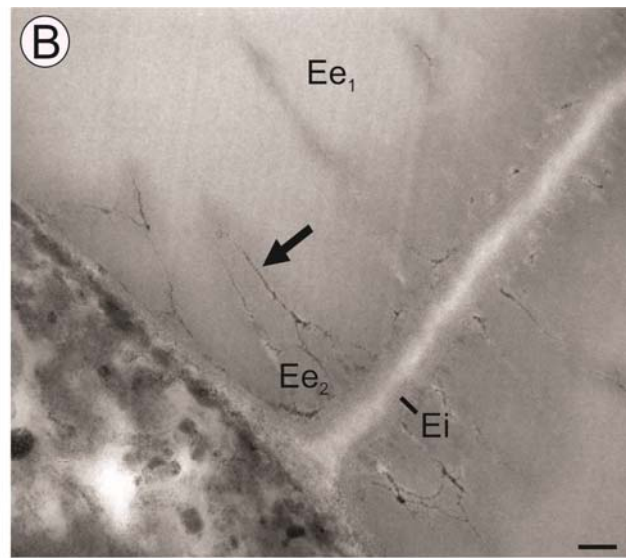
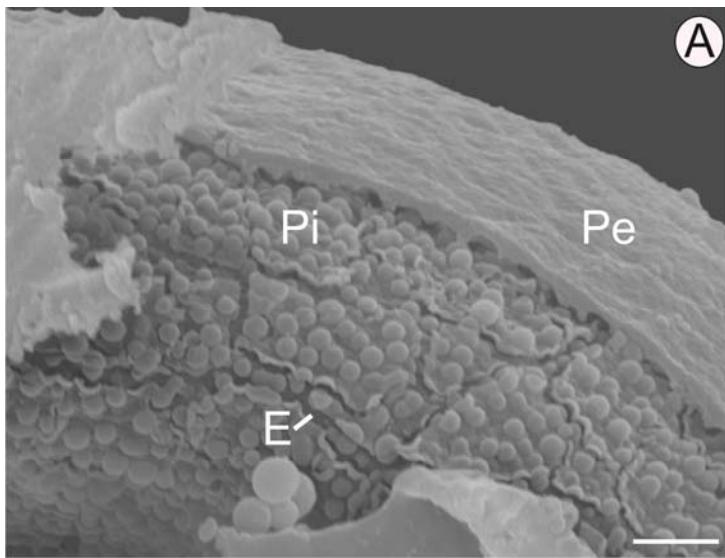
El perisporio es más electrón-denso que el exosporio y está formado por dos capas. La interna (Pi) es delgada, de 10-150 nm de grosor, estructura homogénea, continua y acompaña la ornamentación del exosporio (Lámina 20, Fig. A, D-E). La externa (Pe) posee un grosor de 0.1-4  $\mu\text{m}$  y constituye lomos bajos de ápices redondeados (Lámina 20, Fig. E, F) u, ocasionalmente, altos de extremos aguzados (Lámina 20, Fig. D). Presenta una estructura alveolar heterogénea, con cavidades de tamaño variable, vacías o rellenas de material denso a los electrones.

Sobre el perisporio o inmersos en él, se observan cuerpos esferoidales de 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro, constituidos por un núcleo central de estructura similar al del exosporio rodeados por material de la misma electrodensidad que el perisporio (Lámina 20, Fig. C).

**Lámina 20. Esporas de *Paesia glandulosa* al MEB y MET.**

**Grupo morfológico rugulado.**

**A.** Fractura de la esporodermis al MEB. El exosporio es tuberculado (E). La capa interna del perisporio (Pi) es delgada, está estrechamente adherida al exosporio y acompaña la ornamentación del mismo. Pe = Capa externa del perisporio. **Figuras B-E.** Sección de la pared al MET. **B.** El exosporio presenta estructura homogénea y baja electrodensidad (Ei). El exosporio externo presenta un estrato interno (Ee<sub>2</sub>) con cavidades y canales rellenos de material electrón-denso que se ramifican, anastomosan y pueden extenderse hacia el estrato externo (flecha). El estrato externo posee estructura homogénea (Ee<sub>1</sub>). **C.** El margen del exosporio (E) es ornamentado (elipse). Sobre el perisporio se observan cuerpos esferoidales con un núcleo central de estructura similar al del exosporio rodeados por material perispórico (g). P = Perisporio. **D.** La capa externa del perisporio (Pe) está ornamentada por lomos altos de extremos aguzados (flecha). La capa interna del perisporio (Pi) es delgada y muy densa a los electrones. E = Exosporio. **E.** La capa externa del perisporio (Pe) presenta una estructura alveolar heterogénea, con cavidades de tamaño variable (puntas de flecha). La capa interna del perisporio (Pi) tiene estructura homogénea, es continua y acompaña la ornamentación del exosporio. El exosporio está ornamentado por tubérculos (círculo) estrechamente dispuestos. **F.** La capa externa del perisporio está ornamentada por lomos bajos de margen redondeado (punta de flecha). Las cavidades presentes en dicha capa tienen material electrón-denso en su interior. E = Exosporio. Barras: **A** = 2 μm; **B** = 0,1 μm; **C** = 0,5 μm; **D, E y F** = 0,2 μm.



## ● *Discusión*

Los resultados obtenidos permiten caracterizar a las esporas de *Paesia glandulosa* como ruguladas, con lomos sinuosos formados por el perisporio y ocasionalmente fusionados en areolas abiertas y aisladas, sobre un exosporio tuberculado, con tuberculos regularmente dispuestos sobre la superficie. Los lomos y tubérculos que tapizan tanto el perisporio como el exosporio respectivamente se identificaron fácilmente al MO y MEB y se encontró una correspondencia con la ornamentación observada en ambas paredes al MET.

Esta interpretación no concuerda con las realizadas por otros autores, quienes describieron al perisporio como escabrado o rugoso y al exosporio como psilado, granulado, equinado o papilado (Harris, 1955; Erdtman & Sorsa, 1971; Tryon & Tryon, 1982).

En contraposición, la descripción de *P. glandulosa* elaborada en esta tesis coincide, en grandes líneas, con los resultados sobre las esporas del género *Paesia* obtenidos por Large & Braggins (1991) y Tryon & Lugardon (1991). Adicionalmente, estos últimos autores encontraron en la especie *P. lamiana*, la presencia de esporas donde el exosporio tuberculado se observó totalmente expuesto, sin rastros de perisporio. Del mismo modo, durante el presente estudio sobre *P. glandulosa* se distinguió, en un mismo esporangio, esporas con y sin perisporio. Si bien el desprendimiento frecuente del perisporio fue señalado para especies del género (Nayar, 1964; Soepadmo & Khoo, 1977), la ausencia de dicha pared podría estar relacionada a la variabilidad en el grado de maduración de las esporas dentro de los esporangios. Asimismo, ocasionalmente se observaron esporas ornamentadas con lomos aislados más angostos, de márgenes afilados. Esta morfología y distribución de los lomos también podría asociarse con estadios inmaduros de las esporas. En este sentido, son necesarios estudios de desarrollo de las esporas de esta especie para entender la forma de depositación de los distintos estratos de la esporodermis.

En el análisis ultraestructural se observó que el perisporio en *P. glandulosa* está formado por dos capas, la interna delgada, homogénea, que acompaña las irregularidades del margen del exosporio, y la externa gruesa, de estructura alveolar, que forma los lomos de la ornamentación. Capas similares fueron observadas en el análisis al MET realizado por Tryon & Lugardon (1991).

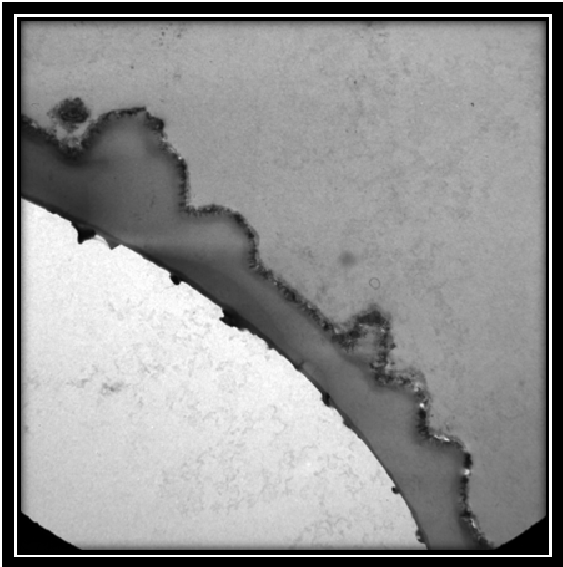
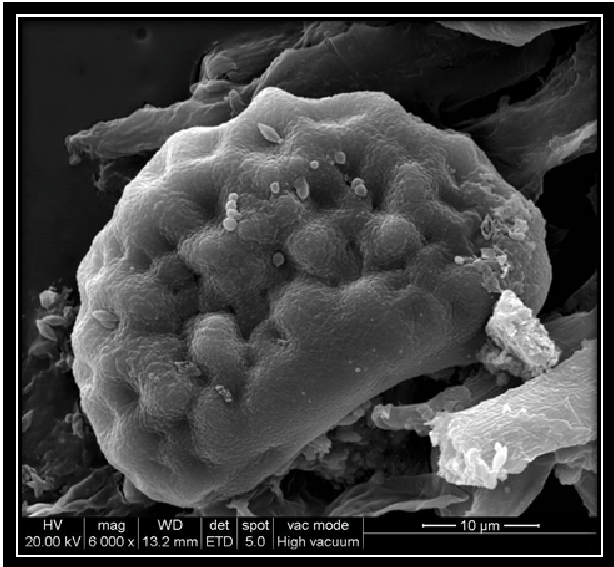
En relación al exosporio, la estratificación y ultraestructura del mismo, coinciden con el exosporio de tipo blechnoide identificado por Lugardon (1971; 1974) para diversos grupos de helechos. Este tipo de exosporio se caracteriza por poseer una capa interna delgada y compacta y una capa externa más gruesa. Esta última presenta a su vez dos estratos: uno interno con cavidades y canales rellenos de material electrón-denso que tienen continuidad con un estrato externo. En *P. glandulosa*, en el margen del estrato externo se observan los tubérculos del exosporio que pueden apreciarse con MEB en las esporas fracturadas. Una ornamentación similar fue identificada para el exosporio de otros géneros de Thelypteridaceae, grupo que no se encuentra emparentado filogenéticamente con *Pesia* como *Thelypteris*, *Phegopteris*, *Pseudophegopteris* (Tryon & Lugardon, 1991, pg. 393-396), en dichos casos la ornamentación fue definida como gemulada.

Esferoides de distintos tamaños se observaron sobre las esporas y, en los análisis con MET, los mismos se identificaron también inmersos en el perisporio. Estos esferoides presentan un núcleo central de estructura similar a la del exosporio rodeado por material del perisporio y pueden ser homologados a los “glóbulos” descritos por Lugardon (1974) y Tryon & Lugardon (1991).





# TUBÉRCULOS



#### 4.2.3. Grupo morfológico tuberculado (Láminas 21 y 22)

Este grupo morfológico está integrado por *Histiopteris incisa*.

Las esporas son monoletes, bilaterales, en vista polar elípticas. En vista ecuatorial mayor, son arriñonadas (kidney-shaped), la cara proximal es plana a cóncava y la distal es convexa (Lámina 21, Fig. A-D). La lesura es recta, crasimarginada y se extiende  $\frac{3}{4}$  partes de la longitud de la espora.

El perisporio es castaño al MO, psilado y tapiza la ornamentación del exosporio. Tiene 0,1-0,4  $\mu\text{m}$  de grosor y presenta dos capas, discernibles con MET.

El exosporio es castaño-claro a amarillento al MO. Presenta tubérculos evidentes en la zona ecuatorial, fusionados generalmente en retículos de dimensiones variables en el polo distal y proximal. Tiene 1,4-3,5 (12)  $\mu\text{m}$  de grosor y, al MET, se distinguen dos capas.

#### ***Histiopteris* (J. Agardh) J. Sm.**

Género con ca. 7 especies, pantropical, ampliamente distribuido en áreas subtropicales y templadas de la región del sur de África, Sudeste asiático, Nueva Zelanda, Australia (Tasmania) y cuenca del Pacífico. En el Neotrópico se encuentra representado por una única especie, *H. incisa*, ampliamente distribuida.

Las especies del género habitan selvas húmedas, principalmente en márgenes de senderos, claros y espacios abiertos. También están presentes en selvas de montaña, páramos, pastizales y, con menos frecuencia, en pendientes rocosas y acantilados.

***Histiopteris incisa* (Thunb.) J. Sm.**, Historia Filicum 295. 1875.

Basónimo: *Pteris incisa* Thunb., Prodrum Plantarum Capensium 171. 1800. Tipo: Sudáfrica, Provincia occidental del Cabo, 1774, *Thunberg s.n.* (UPS, Isotipo: S!)

Descripción del esporofito: *Rizoma* de 0,2-1 cm de diámetro, largamente rastrero, robusto, pubescente, escamas lineares, castañas, estrechas y subclatradas intercaladas con pelos de dos tipos: setiformes y catenados. *Pecíolos* de 0,2-0,7 m de longitud, castaño-amarillentos a castaño-oscuros, glabros, abaxialmente teretes, surcados o no adaxialmente. *Fronde*s de

0,3-6 m, monomórficas, escandentes. *Láminas* ovadas, casi oblongas a oblongo-deltoideas, bipinado-pinnatífida a pinnatisecta, raro tripinnada, ápice pinnatífido. *Ráquis* marrón-rojizo proximalmente, pajizo distalmente, lustrosos, generalmente surcados adaxialmente, glabros o con tricomas catenados. *Pinnas* de 4-55 cm de longitud, 7-15 pares, lanceoladas, elípticas, lineares u oblongas, sésiles, opuestas, patentes, las basales levemente atenuadas, superpuestas sobre el raquis. *Pínnulas* lanceoladas a oblongo-lanceoladas, enteras o profundamente lobadas, sésiles, las basales a la pinna con apariencia de estípulas. *Segmentos* divaricados, oblongos, de ápice redondeado unidos por la base a la cóstula. *Venas* areoladas, sin venillas inclusas, areolas paralelas a las venas medias y cóstulas, libres hacia los márgenes, varias veces bifurcadas, glabras o con pelos pardo oscuros, abaxiales. Epidermis adaxial entre venas, glabro, abaxial glauco, glabro o con tricomas dispersos, marrones, septados. *Soros* marginales, oblongos a lineares, continuos a lo largo del margen, interrumpidos en los senos y ápice de los segmentos, en los lados basiscópico y acroscópico, ocasionalmente ocupando además todo el seno. *Indusios* lineares, formados por el margen modificado y recurvado, puede ser uno largo extendiéndose a lo largo del margen o 2-5 más cortos, cercanos entre sí o separados, sin un indusio interior abaxial, membranáceos, enteros o de margen crenado, glabros.

Nota: Sehnem (1972) identificó para esta especie dos morfotipos que difieren por las características del pecíolo, la venación y las esporas. En este sentido, el autor identificó una “forma pálida” con pecíolos amarillo-castaños, venas libres y esporas pequeñas y “subpustulosas” y una “forma castaña” con pecíolos castaño-oscuros, nervaduras anastomosadas y esporas de mayor tamaño con ornamentación reticulada. Todos los ejemplares estudiados en esta tesis se correspondieron con este segundo morfotipo.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Paraná, Río Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Río de Janeiro, São Paulo (Fig. 13). Fuera del área: Desde el Sur de África al este de China, norte de Japón, Australia (Tasmania), Nueva Zelanda. En América, desde el sur de México, a través de América Central, Antillas Mayores y Menores, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile (Juan Fernandez), Centro y Nordeste de Brasil e Islas Antárticas.

*H. incisa* es una de las especies de Dennstaedtiaceae más ampliamente distribuidas en el mundo.

Hábitat: Selvas nubladas, especialmente en los barrancos y riberas. En páramos, praderas y espacios abiertos. También se observan poblaciones de esta especie sobre laderas arbustivas y pendientes rocosas. Entre los 1100 y 3000 msm.

**Figura 13. Distribución de *Histiopteris incisa* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Histiopteris incisa*



Figura 13

### Descripción de las esporas

DP: 22-28-37  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 36-43-52  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 22-28-37  $\mu\text{m}$

Espesor del exosporio: 1,4  $\mu\text{m}$  en la zona entre tubérculos, 3,5  $\mu\text{m}$  en los tubérculos (puede alcanzar 12  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura)

Espesor del perisporio: 0,1-0,4  $\mu\text{m}$

Longitud de la lesura: 29–33  $\mu\text{m}$

El perisporio es una capa delgada continua, que tapiza al exosporio (Lámina 22, fig. A) y, al MO se observa castaño (Lámina 21, fig. A-D).

El exosporio es castaño-claro a amarillento al MO (Lámina 21, fig. A-D) y presenta una ornamentación tuberculada-reticulada. Los tubérculos son de 2-5  $\mu\text{m}$  de diámetro y se fusionan entre sí para formar retículos prominentes con muros y areolas de grosor y tamaño variables muy evidentes en el polo distal de las esporas (Lámina 21, fig. F). En el ecuador, los tubérculos se disponen separados entre sí y ocupan los espacios entre los retículos (Lámina 21, fig. E, G-H), mientras que en el polo proximal se observan retículos menos conspicuos, de areolas más pequeñas y la zona adyacente a la lesura con frecuencia está desprovista de toda ornamentación. La lesura se encuentra elevada y se observan engrosamientos de la pared a ambos lados y en los extremos de la misma. En ocasiones dichos engrosamientos pueden incluso cubrirla parcialmente (Lámina 21, fig. E).

La superficie del exosporio es microverrucosa al MEB (Lámina 21, fig. H; Lámina 22, fig. A-B).

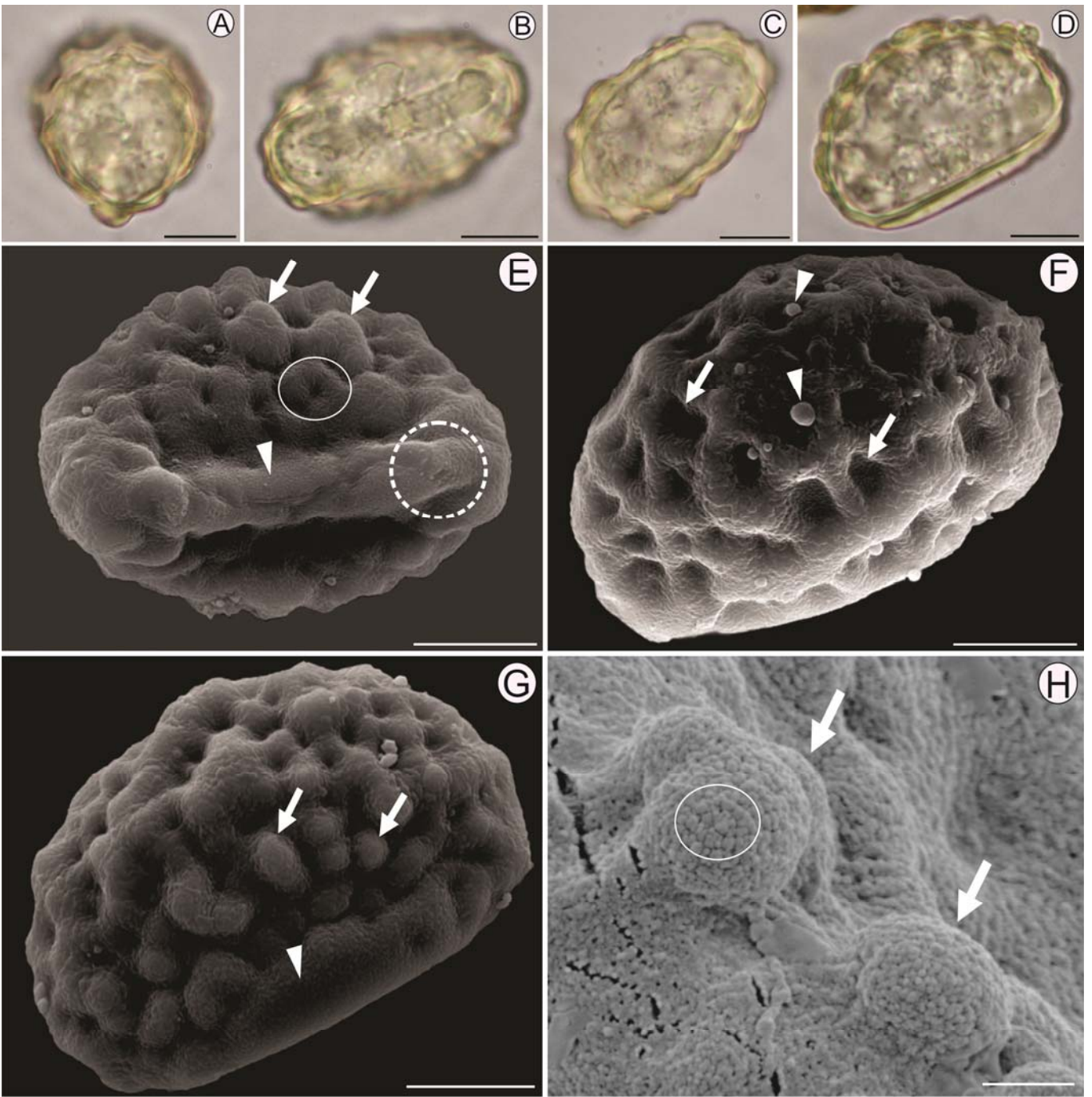
Sobre las esporas, se observan cuerpos esferoidales dispersos con el mismo tipo de superficie que el perisporio (Lámina 21, fig. F).

**Lámina 21. Esporas de *Histiopteris incisa* con MO y MEB.**

**Grupo morfológico tuberculado.**

**Figuras A-D.** Esporas maduras al MO. **A.** Espora en vista ecuatorial menor. **B.** Espora en vista proximal. **C.** Espora en vista distal. **D.** Espora en vista ecuatorial mayor. **Figuras E-H.** Esporas al MEB. **E.** Espora en vista proximal. La ornamentación es tuberculada. Los tubérculos se disponen separados entre sí, ocupando los espacios entre retículos (flechas). La fusión de tubérculos forma retículos poco conspicuos, de areolas más pequeñas (círculo continuo). Adyacentes a la lesura (punta de flecha) y cubriéndola parcialmente (círculo incompleto) se observan engrosamientos en la pared. **F.** Espora en vista distal. La ornamentación es reticulada. Los tubérculos de la ornamentación se fusionan entre sí para formar retículos prominentes con muros y areolas de tamaño variables (flechas). Sobre la superficie se observan cuerpos esferoidales dispersos (puntas de flecha). **G.** Espora en vista ecuatorial. En los lados de la espora se observan los tubérculos de la ornamentación parcialmente fusionados (flechas). Hacia la zona de la lesura la pared se engrosa y está desprovista de toda ornamentación (punta de flecha). **H.** Detalle de espora en vista ecuatorial. Se observan tubérculos aislados (flechas). La superficie de la pared es microverrucosa (círculo). Barras: **A, B, C, D, E, F y G** = 10  $\mu\text{m}$ ; **H** = 2  $\mu\text{m}$ .





## *Ultraestructura*

El exosporio presenta dos capas. La capa interna (Ei) es fácilmente distinguible en la zona de la lesura, posee 20–50 nm de grosor, estructura homogénea y baja electron-densidad (Lámina 22, fig. C). La capa externa es más electrón-densa, de 1,3–3,4  $\mu\text{m}$  de espesor y presenta dos estratos. El estrato interno (Ee<sub>2</sub>) con cavidades, fisuras y canales ramificados, rellenos de material electrón-denso, que se anastomosan y extienden hacia el estrato externo (Lámina 22, fig. C). La estructura del estrato externo (Ee<sub>1</sub>) es homogénea y su espesor es variable debido a que forma los tubérculos de la ornamentación (Lámina 22, fig. C-D).

El margen externo del exosporio está tapizado por báculos, espinas y verrugas densamente dispuestas, delimitadas por canales rellenos de material electrón-denso que se extienden hacia el interior de dicha capa (Lámina 22, fig. E-F).

El perisporio es más denso a los electrones que el exosporio y presenta dos capas: una interna (Pi), de 50–100 nm de espesor, continua, firmemente adherida al exosporio y de estructura homogénea, y una externa (Pe) discontinua, de 0,08–0,4  $\mu\text{m}$ , baja electrón-densidad, estructura microalveolar heterogénea y margen verrucoso, que se desprende fácilmente (Lámina 22, fig. E-F).

Sobre la superficie se observan cuerpos esféricos de 1,2  $\mu\text{m}$  de diámetro con un núcleo central de estructura similar a la del exosporio rodeado por una capa semejante al perisporio (Lámina 22, fig. D).

**Lámina 22. Esporas de *Histiopteris incisa* con MEB y MET.**

**Grupo morfológico tuberculado.**

**Figuras A-B.** Fractura de la esporodermis al MEB. **A.** El perisporio es una capa delgada, continua (P). La superficie del exosporio es microverrucosa (E). **B.** Las diferencias en el espesor del exosporio (E) constituyen los tubérculos de la ornamentación (flecha). **Figuras C-F.** Sección de la esporodermis con MET. **C.** Sección de la esporodermis a través de la lesura. La capa interna (Ei) es fácilmente distinguible en la zona de la lesura, posee estructura homogénea y baja electrondensidad. El estrato interno (Ee<sub>2</sub>) posee cavidades, fisuras y canales ramificados (elipse) que se anastomosan y extienden hacia el estrato externo (flecha). La estructura del estrato externo (Ee<sub>1</sub>) es homogénea. **D.** El espesor variable del Ee<sub>1</sub> constituye los tubérculos de la ornamentación. Sobre la superficie se observan cuerpos esferoidales con un núcleo central de estructura similar a la del exosporio rodeado por una capa semejante al perisporio (flecha). P = Perisporio. **E.** El margen exterior del exosporio (E) está tapizado por báculas (flechas), verrugas (puntas de flecha) y espinas (círculo). La capa interna del perisporio (Pi) es continua, acompaña la ornamentación del exosporio y posee estructura homogénea y alta electrondensidad. La capa externa (Pe) es menos electrón-densa y tiene estructura microalveolar heterogénea y margen microverrucoso. **F.** Los elementos que ornamentan el margen del exosporio están delimitados por canales con material electrón-denso, que se extienden hacia el interior de la capa (puntas de flecha). Pe = Perisporio externo. Pi = Perisporio interno. E = exosporio. Barras: **A, B y E** = 2 µm; **C y F** = 0,1 µm; **D** = 0,5 µm.

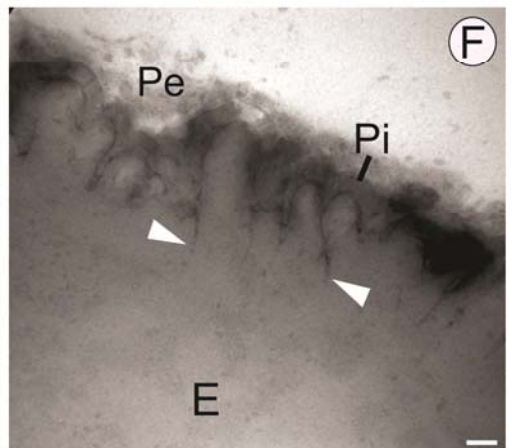
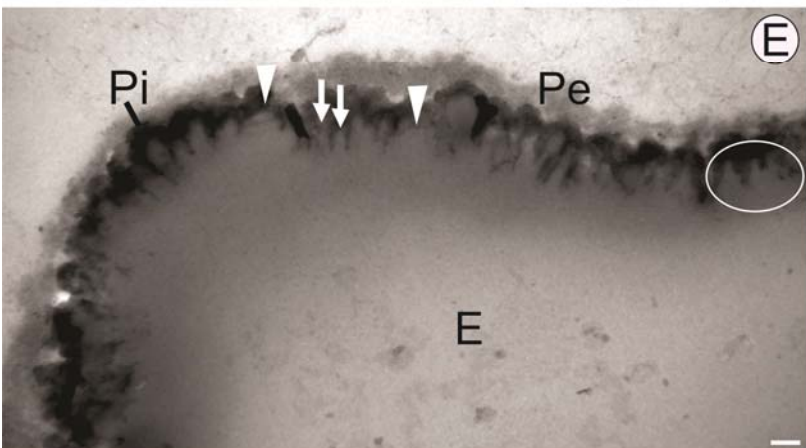
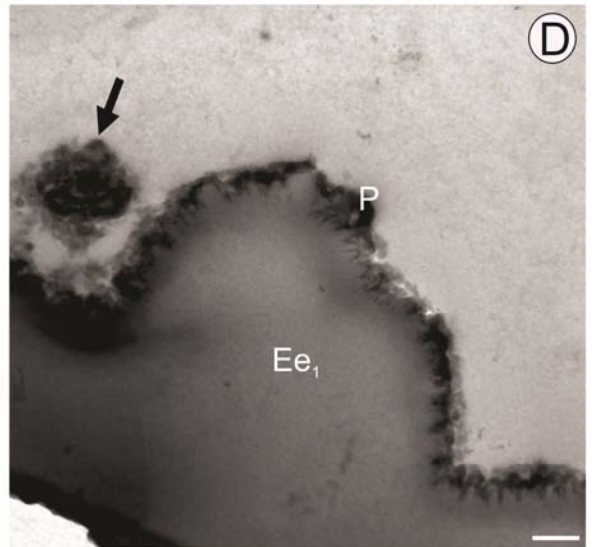
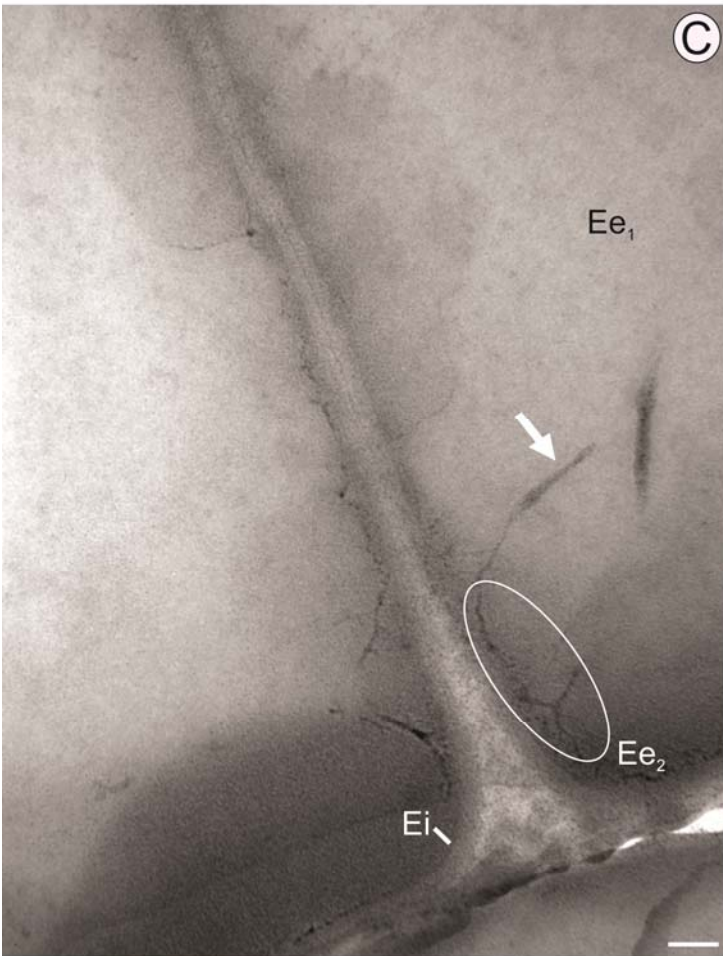
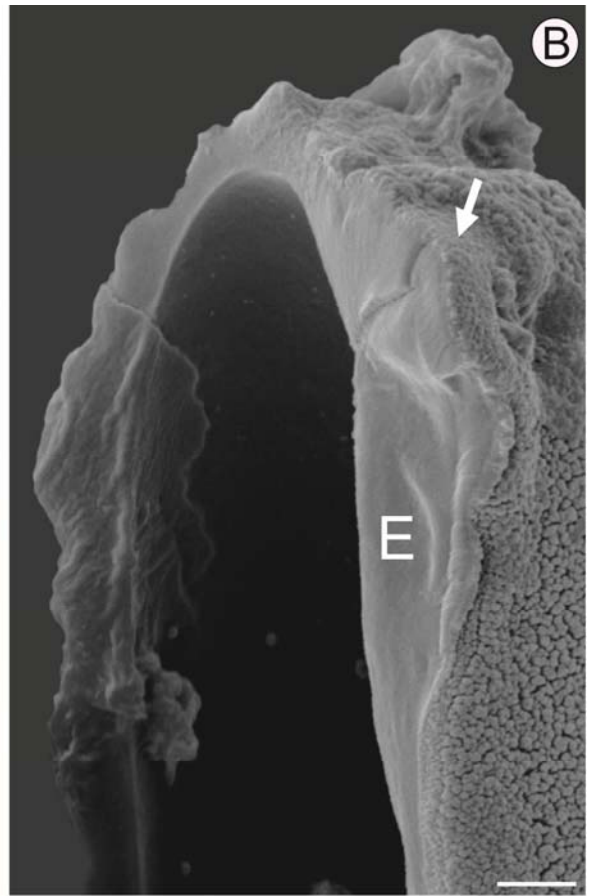
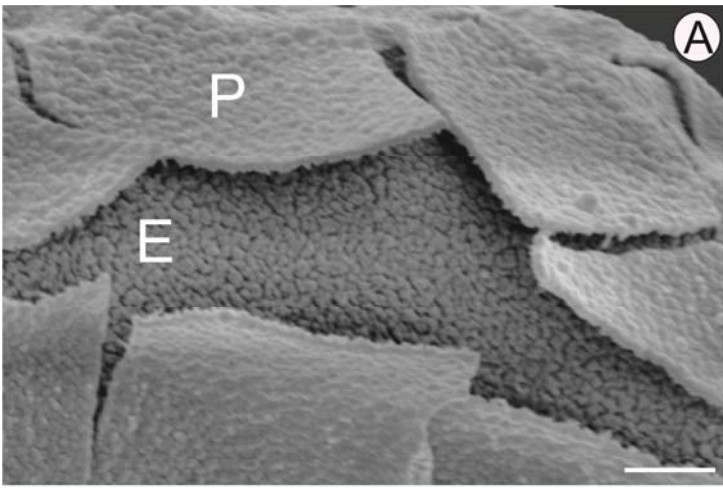


Lámina 22

## ● **Discusión**

*Histiopteris incisa* presenta esporas con tubérculos generalmente evidentes en el ecuador. Los tubérculos se fusionan para formar retículos de dimensiones variables y son menos conspicuos en el polo proximal, donde la ornamentación puede estar ausente a los lados de la lesura. Estos resultados coinciden con las observaciones de Nayar (1964), Nayar *et al.* (1967, 1968a), Huang (1981) y Lorscheitter *et al.* (2002) y son similares, en líneas generales, a las descripciones y fotografías publicadas por Harris (1955), Welman (1970), Murillo & Bless (1978) y Faridah-Hanum *et al.* (2008), aunque en estos cuatro últimos trabajos la ornamentación de las esporas fue señalada como Verrucosa-rugulada.

Los elementos de la ornamentación que se observaron sobre la superficie de las esporas al MO y MEB, coinciden con los tubérculos formados por el exosporio, los cuales se distinguieron en los cortes ultrafinos analizados al MET. Asimismo, se observó que el perisporio es una pared delgada, con dos capas, que tapiza al exosporio. Si bien Erdtman & Sorsa (1971), Soepadmo & Khoo (1977) y Contreras-Duarte & Giovanni Bogotá (2004) también señalaron que en esta especie el exosporio forma la ornamentación tuberculada de las esporas, estos autores resaltaron la ausencia de perisporio. Asimismo, la interpretación de la ornamentación de la esporodermis realizada en esta tesis también contradice la de Tryon & Tryon (1982) quienes indicaron que el contorno tuberculado de las esporas es definido por la capa más baja del perisporio.

Las diferentes opiniones existentes en relación a la presencia de perisporio en esta especie y su ornamentación podrían deberse a que el mismo resulta difícil de distinguir del exosporio a bajas magnitudes de observación.

Los análisis realizados al MEB y MET por Tryon & Lugardon (1991) y Dai *et al.* (2005) sobre la esporodermis de *H. incisa* coinciden con lo observado aquí. En este sentido, los autores describieron un perisporio delgado, irregular, fuertemente adherido al exosporio, el cual está ornamentado por tubérculos. Una morfología similar de la esporodermis puede observarse en el género *Pteridoblechnum* (Blechnaceae) (Hennipman, 1966; Tryon & Lugardon, 1991, pg 527).

En relación a los tubérculos del exosporio, Large & Braggins (1991) son los únicos que, hasta este momento, describieron para *H. incisa* un margen ornamentado. No obstante, a

diferencia de estos autores que observaron microtubérculos o papilas, en los presentes análisis con MET se observaron báculos, espinas y verrugas sobre los tubérculos.

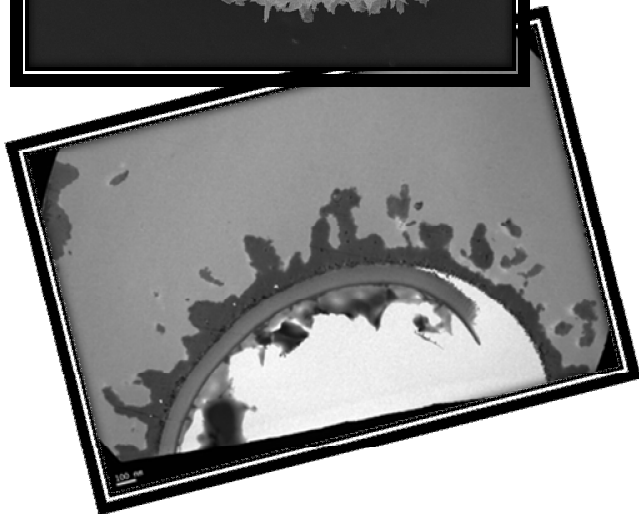
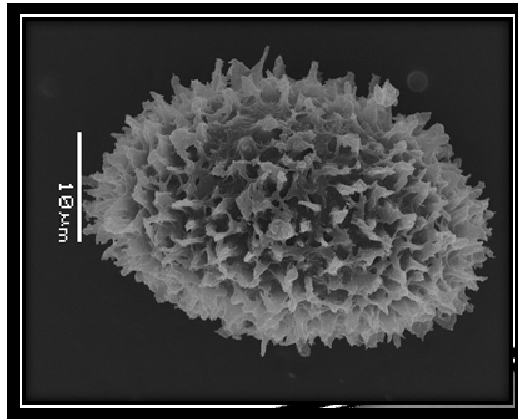
Respecto a la estratificación y estructura de la esporodermis, se identificó por primera vez la presencia de un perisporio constituido por dos capas: una interna, continua de estructura homogénea; y una externa, discontinua, de estructura microalveolar heterogénea y margen verrucoso. Esta última se desprende fácilmente y, por esta razón, puede no haber sido observada anteriormente por otros autores.

En coincidencia con lo descrito por Estevez & Coelho (2007), también se observaron dos capas conformando el exosporio. La capa interna es delgada, presenta estructura homogénea y baja electrondensidad. La capa externa es más gruesa y presenta dos estratos. En el estrato interno se observaron cavidades, fisuras y canales ramificados, que coinciden con los descritos por Lugardon (1971; 1974) en el “estrato fisurado” del exosporio Blechnoide, definido por el autor para diversas especies de helechos. El estrato externo, más grueso y de estructura homogénea, forma los tubérculos de margen micro-ornamentado que tapizan la superficie de las esporas. Este estrato también presenta canales cortos hacia el margen.

Finalmente, los cuerpos esferoidales observados al MEB y MET sobre la superficie de las esporas de *H. incisa* se asemejan a aquellos descritos por Lugardon (1974) y Tryon & Lugardon (1991) para numerosas y diversas especies de helechos y Licofitas. Estos esferoides se caracterizan por poseer un núcleo central de estructura similar a la del exosporio rodeado por una capa semejante al perisporio y fueron denominados “glóbulos” por dichos autores.



# ESPINAS



#### 4.2.4. Grupo morfológico equinado (Láminas 23, 24 y 25)

Este grupo morfológico incluye a las especies *Hypolepis mitis*, *Hypolepis x paulistana*, *Hypolepis repens* e *Hypolepis stolonifera* (var *nebularis*, var *stolonifera* y var *delasotae*). Las esporas son monoletes, bilaterales. En vista polar son elípticas, y en vista ecuatorial mayor, la cara proximal es plana y la distal hemisférica, excepto en *H. x paulistana* donde esta última varía de convexa a subcónica (Lámina 23, Fig. A-E). Adicionalmente, *H. x paulistana* puede presentar esporas aletes, esféricas, de simetría radiada o esporas muy irregulares, con formas que no pudieron definirse.

La lesura es recta, de 12-27  $\mu\text{m}$  de longitud y se extiende de 2/3 a 3/4 partes de la longitud de la spora. En *H. x paulistana* algunas esporas presentaron lesuras curvadas en los extremos.

El perisporio es castaño claro al MO, equinado, con espinas aplanadas en sección transversal, sobre las cuales se observan cordones. Tiene un grosor entre 0,4-7,5  $\mu\text{m}$  y presenta tres capas al MET.

El exosporio es amarillento a hialino al MO y posee ornamentación verrucosa y ocasionalmente se observan espínulas intercaladas entre las verrugas. Tiene 0,1-1,9  $\mu\text{m}$  de grosor y, al MET, se observa que está formado por dos capas.

#### ***Hypolepis* Bernh.**

Género cosmopolita con ca. 80 taxa (entre especies, subespecies y variedades), distribuidas en regiones tropicales y templadas del hemisferio sur con extensiones locales en regiones tropicales y templadas del hemisferio norte. Es especialmente diverso en Asia y Australasia (Oceanía, Sudeste y Este asiático), con algunas especies extendidas en el oeste de África y este del Pacífico y Nueva Zelanda. En América se encuentra representado por ca. 40-45 especies, de las cuales 27 se distribuyen en Sudamérica.

Las especies del género crecen en selvas húmedas, selvas montanas, bordes de selvas, bosques rocosos, también en campos, pastizales abiertos y sitios disturbados con vegetación secundaria. Algunas especies andinas pueden extenderse hacia el Páramo. Están presentes desde el nivel del mar hasta los 4200 m.



***Hypolepis mitis* Kunze ex Kuhn**, Linnæa 36. 1869.

Basónimo: *Pteris incisa* Thunb., Prodrömum Plantarum Capensium: 171. 1800. Tipo: Sudafrica, Cape, *Thunberg s.n.* (Holotipo UPS; Isotipo S!).

Descripción del esporofito: *Rizoma* de 0,2-0,4 cm de diámetro, erecto, rastrero, pubescente, con tricomas catenados o aciculares, castaño-rojizos. *Pecíolos* de 0,4-1,45 m de longitud, surcados abaxial y adaxialmente, con yemas que originan raíces en la base, rojizos a castaño oscuros proximalmente, amarillentos o pajizos distalmente, lustrosos, provistos de acúleos, glabros o escasamente pubescentes con tricomas catenados esparcidos. *Frondes* de 0,7-3 m de longitud, monomórficas. *Láminas* tripinnadas a tripinnado-pinnatífidas en la base, a veces tetrapinnadas, deltoide. *Ráquis* surcado adaxialmente, pajizos a marrón-claro, aculeados y pubescentes en ambas caras, con tricomas catenados, hialinos o amarillentos. *Pinnas*, de 0,5-48 cm de longitud, 10-20 pares, pecioladas, lanceadas. *Costas* sulcadas adaxialmente, pubescentes en ambas caras con tricomas como los del pecíolo. *Pinnulas*, lineares a lanceoladas, pecioluladas a sésiles. *Cóstulas* sulcadas o no adaxialmente, pubescentes. *Segmentos* oblongos a lineares, lobulados. *Venas* abaxialmente negras e inmersas, con tricomas catenados, aciculares, hialinos a amarillentos. Epidermis entre venas abaxialmente estrigoso, con pelos aciculares, esparcidos. *Soros* marginales, elípticos, naciendo en margen basiscópico y acroscópico de los segmentos, a menudo confluentes a la madurez. *Indusios* membranosos de margen crenado con tricomas catenados, aciculares.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Río de Janeiro y São Paulo (Fig. 14). Fuera del área: Nordeste de Brasil.

Esta especie es endémica de Brasil.

Hábitat: En bosques y selvas montanas y altomontanas. Entre los 1000-1900 msm

**Figura 14. Distribución de *Hypolepis mitis* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense.**

**● = material examinado en esta tesis.**

*Hypolepis mitis*



Figura 14

***Hypolepis x paulistana* Schwartsb. & J. Prado**, American Fern Journal 106, in press.

Tipo: Brasil, São Paulo: Pindamonhangaba, estrada para o Pico do Itapeva, 22°46'05"S, 45°32'17"W, 1881 m, 23 Jan 2010, P.B. Schwartsburd, J. Prado, G.

*Yatschievych & E. Schuettpelz 2298* (Holotipo: SP; Isotipo: DUKE, LP!-frag., MO, RB, VIC).

Descripción del esporofito: *Rizoma* de 0,15–0,3 cm de diámetro, pubescente, con tricomas catenados, aciculares, marrón-amarillentos. *Peciolos* de 0,25–0,60 m de longitud, marrones oscuros en la base, marrones claros distalmente, rugosos, pubescentes abaxial y adaxialmente, con dos tipos de tricomas, los primeros catenados, aciculares, hialinos o con paredes de las células rojizas, y el segundo tipo catenados-aciculares, enteramente marrón-amarillentos, esparcidos y caduceos. *Frondes* de 0,5–1 m de longitud, monomórficas. *Láminas* ovadas, tripinnado-pinnatífidas a tetrapinnadas proximalmente. *Raquis* marrón claro en la base, pajizo distalmente, rugoso, escasamente pubescente en cara abaxial, densamente pubescente en cara adaxial, con tricomas similares a los del peciolo. Epidermis entre venas abaxialmente y adaxialmente glabro, margen de la lámina glabro. *Pinnas* basales de 18–27 cm de longitud, subequilaterales. *Costas* adaxial y abaxialmente densamente pubescentes, con tricomas catenados, aciculares, hialinos. *Cóstulas* pubescentes en cara abaxial, esparcidamente pubescentes en cara adaxial. *Venas* pubescentes, con dos tipos de tricomas en cara abaxial: los primeros similares a los de las costas, el segundo tipo, catenados, glandulares, hialinos, en cara adaxial únicamente con tricomas esparcidos, catenados, aciculares. *Soros* marginales redondeados, naciendo en el seno entre lóbulos. Pseudoindusios proximalmente verdes, distalmente hialinos, con márgenes densamente ciliados.

Nota: *Hypolepis x paulistana* fue descrita por Schwartsburd & Prado (en prensa) como un híbrido entre *Hypolepis stolonifera* (var. *stolonifera*) y *H. rugosula* (subsp. *pradoana*). Según los autores, esta especie posee esporas bien formadas y una morfología intermedia entre las especies que le habrían dado origen. Presenta peciolos y raquis marrón claro a oscuro (similar a *H. stolonifera* var. *stolonifera*), pinnas basales subequilaterales (una condición que sería intermedia), venas abaxiales con pelos catenados, glandulares (como en

*H. rugosula* subsp. *pradoana*) y pseudoindusio desarrollado con márgenes ciliados (como en *H. stolonifera* var. *stolonifera*).

Distribución en el área de estudio: Conocido únicamente a partir de su material tipo. Probablemente endémico de zonas altas de São Paulo (Fig. 15).

Habitat: Alrededor de los 1900 msn.

**Figura 15. Distribución de *Hypolepis x paulistana* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Hypolepis x paulistana*



Figura 15

***Hypolepis repens* (L.) C. Presl.** Tentamen Pteridographiae 162. 1836.

Basónimo: *Lonchitis repens* L., Species Plantarum 2: 1078. 1753. Tipo: Plumiér 1705: *Traité. Foug. Amer.* t. 12! (Lectotipo designado por Underwood, 1906).

Descripción del esporofito: *Rizoma* de 0,2-1,2 cm de diámetro, ramificado, largamente rastrero, pubescente, con tricomas castaños a blancuzcos, catenados y aciculares. *Pecíolos* de 0,5-2 m de longitud, surcados adaxialmente, marrones en la base, pardo-amarillentos o pajizos hacia las porciones medias y distales, provistos por acúleos agudos, esparcidos, glabros o pubescentes con tricomas aciculares y catenados, comúnmente adpresos en la base. *Fronde*s de 6 m de longitud, monomórficas. *Láminas* tripinnado-pinnatífidas a tetrapinnado-pinnatífidas, lanceolada a elíptica. *Raquis* surcado adaxialmente, pardo-amarillentos a pajizos, aculeado, pubescente en el surco, con pelos similares a los del pecíolo. *Pinnas* de 1-50 cm de longitud, 8-25 pares, pecioladas, lanceadas a elípticas. *Costas y cóstulas* sulcadas adaxialmente, aculeadas y pubescentes en ambas caras. *Pínnulas* lanceadas a lineares, cortamente pecioluladas. *Segmentos* ampliamente oblongos, ovados o lineares, enteros o lobulados. *Venas* libres, pubescentes en cara adaxial, ocasionalmente en cara abaxial, con tricomas catenados, aciculares, hialinos o amarillentos. Epidermis entre venas abaxialmente glabro. *Soros* marginales, oblongos o flabelados, naciendo en el ápice de la vena basal acroscópica, en el seno entre dos segmentos o lóbulos. *Indusios* membranosos, blancuzcos a verdosos o marrón-amarillentos, de margen subentero a irregularmente dentado con tricomas catenados o glabros.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Santa Catarina, São Paulo, Río de Janeiro, Minas Gerais (Fig. 16). Fuera del área: Desde el sur de EEUU (Florida), sur de México, América Central, Antillas, Colombia, Venezuela, Guayanas, Ecuador, Perú, Bolivia y Centro, norte y nordeste de Brasil.

Hábitat: En bosques húmedos y selvas secundarias, márgenes de selvas, orillas de caminos, sobre barrancos, riberas arcillosas, áreas desmontadas o potreros. Entre los 80-1800 msm.



**Figura 16. Distribución de *Hypolepis repens* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Hypolepis repens*



Figura 16

*Hypolepis stolonifera* Fée, Cryptogames vasculaires (fougères, lycopodiáceas, hydroptéridéas, equisétáceas) du Brésil: Matériaux pour une flore générale de ce pays 2: 35. 1872-1873.

Tipo: Brasil, Rio Soberbo, Serra dos Orgãos, *Glaziou 4435* (Sintipo P!, GH!, B!); Brasil, Rio de Janeiro, Itatiaia, *Glaziou 5329* (US!, P!, B!).

Descripción del esporofito: *Rizoma* de 0,2-0,5 cm de diámetro, ramificado, largamente rastrero, pubescente, con tricomas catenados, aciculares, castaño-amarillentos a marrón-dorados. *Pecíolos* de 0,4-0,9 m de longitud, borravinos o marrones proximalmente, marrones en la porción media, castaño-dorados o pajizos distalmente, glabrescentes, con pelos catenados con bases persistentes, castañas y, a veces, con pelos aciculares, blancuzcos. *Frondes* de 0,8-1,5 m, monomórficas. *Láminas* rómbicas, proximalmente tripinnado-pinnatífidas a tetrapinnado-pinnatífidas (bipinnado-pinnatífidas a bipinnado-pinnatisectas en var. *nebularis*), pinnado-pinnatisectas en zona media, distalmente pnnatisectas. *Raquis* proximalmente marrón-dorado, distalmente marrón claro a verdoso, glabro o con pelos de dos tipos: catenados marrones y unicelulares hialinos. *Pinnas* de 25-55 cm de longitud, lanceoladas, pecioladas, las proximales fuertemente inequilaterales, opuestas. *Costas* sulcadas adaxialmente, pubescentes en ambas caras. *Pínnulas* estrechamente lineares, pecioladas; las basicópicas de las pinnas proximales más grandes y más disectas. *Cóstulas* pubescentes del mismo modo que las costas. *Segmentos* oblongos, enteros o lobulados. *Venas* pubescentes abaxialmente, con pelos similares a los de las cóstulas pero más pequeños. Epidermis entre venas adaxialmente glabro, abaxialmente glabro o con pelos catenados, aciculares, amarillentos o blancuzcos (var. *delasotae*). *Soros* marginales, a menudo confluentes a la madurez, elípticos, marginales, que nacen en los senos o más frecuentemente en los márgenes acrocópicos y basicópicos de los segmentos. Pseudo-indusios conspicuos, proximalmente verdosos, distalmente hialinos, membranáceos, márgenes ciliados.

\*Se identifican tres variedades en la zona de estudio, diferenciadas por los siguientes caracteres:

*H. stolonifera* var. *nebularis*: pecíolos y raquis con puntos rojos. Láminas amarillo verdosas. Pinnas ascendentes y segmentos contraídos. Frondes de 1,5 m longitud. Es una variedad ecológica que crece por encima de los 1300 msm. Las diferencias morfológicas que distinguen a esta variedad probablemente estén relacionadas con la elevación, oscilación de las temperaturas, humedad constante y alta exposición a la luz que caracteriza a los picos de las elevaciones. Descrita para Rio de Janeiro, Paraná y Santa Catarina (Brasil) por Schwartzburd (2012b).

*H. stolonifera* var. *stolonifera*: pecíolos y raquis immaculados. Láminas verde-oliva. Pinnas patentes y segmentos aplanados. Frondes de 1,2-2 m de longitud. Últimas pinnulas oblongas a ampliamente ovadas, usualmente con lóbulos redondeados en el margen y ápice. Epidermis abaxial glabra. Esta variedad es la más ampliamente distribuida de las tres, conocida para el sur y sudeste de Brasil y noreste de Argentina. Entre los 700-1500 msm

*H. stolonifera* var. *delasotae*: frondes de 0,2-0,8 m longitud. Últimas pinnulas estrechamente linear-lanceoladas, las pinnas distales a veces falcadas. Usualmente con lóbulos agudos en el margen y ápice. Epidermis abaxial con abundantes pelos catenados-aciculares. Variedad aparentemente endémica de la selva paranaense, hasta el momento conocida únicamente para la Provincia de Misiones (Argentina) y el Estado de Paraná (Brasil). La descripción reciente de esta variedad fue resultado de un trabajo en colaboración con el Dr. Marcelo Arana, quien contribuyó con especímenes del NEA, y el Dr. Pedro Bond Schwartzburd quien aportó información proveniente de las poblaciones del SE de Brasil (Arana *et al.* 2014).

Distribución en el área de estudio: ARGENTINA: Provincia de Misiones. BRASIL: Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Río Grande do Sul, Santa Catarina (Fig. 17).

Hábitat: En regiones montañosas de la Selva Paranaense y Atlántica, especialmente en claros de selvas, naturales o generados por disturbio antrópico y lugares semi-sombreados. Entre los 700-2400 msm. La variedad *nebularis* se encuentra en campos de altitud, y bordes de *matas nebulares* (selvas nubladas enanas), a partir de los 1300 msm.

**Figura 17. Distribución de *Hypolepis stolonifera* en la Provincia Fitogeográfica**

**Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Hypolepis stolonifera*



Figura 17

### Descripción de las esporas

Las esporas de todas las especies con tipo morfológico equinado no presentaron diferencias significativas en lo que se refiere a la escultura y la estratificación, particularmente en las características de las espinas y el patrón de distribución y fusión de las mismas. Es por ello que se realiza una única descripción para estos taxa.

**Tabla 2. Diámetros observados en esporas de *Hypolepis mitis*, *H. repens*, *H. stolonifera* y *H. x paulistana*.**

	<i>H. mitis</i>	<i>H. repens</i>	<i>H. stolonifera</i> *	<i>H. x paulistana</i>
DP	21-24-38	22-26-34	16-21-26	20-28-31
DE <sub>1</sub>	27-38-43	32-40-51	17-30-38	22-36-39
DE <sub>2</sub>	20-25-41	23-33-37	17-21-26	16-22-32
Espesor del perisporio	1,1-2 (7,5 en las espinas)	0,8-1,03-2,4 (5,03 en las espinas)	0,4-1 (3,7 en las espinas)	1,1-3,01
Espesor del exosporio	0,4-1,1	0,6-0,7-1	0,1-0,9 (1,9 en la lesura)	0,5-1,03
Longitud de la lesura	12-13	21-27	14-18	25-27

Referencias: DP = Diámetro polar. DE<sub>1</sub> = Diámetro ecuatorial mayor. DE<sub>2</sub> = Diámetro ecuatorial menor. \* = No se encontraron diferencias entre las variedades. Todas las medidas están dadas en micrones.

Al MO el perisporio es castaño claro (Lámina 23, A-E), equinado, con espinas de 1-5,03 µm de altura (2,5-7,3 en *H. mitis*) distribuidas en toda la superficie de las esporas sin un ordenamiento definido (Lámina 23, fig. F-J). La separación entre las espinas es menor cuanto mayor es la altura que presentan las mismas. Las espinas poseen lados paralelos

hasta la porción media que luego confluyen hacia la porción distal, presentan sección aplanada (Lámina 23, fig. I) y tienen la superficie microverrucosa (Lámina 23, fig. J).

Con frecuencia las espinas se fusionan lateralmente y forman crestas sinuosas de longitud variable (Lámina 23, fig. G-H). En cara proximal, las crestas se disponen paralelas a la lesura y forman márgenes adyacentes a la misma (Lámina 23, fig. H).

Cordones de 0,5-4,9  $\mu\text{m}$  de longitud y sección circular se observan sobre las espinas y, ocasionalmente, las conectan entre sí (Lámina 23, fig. F-G, J). Estos cordones pueden ramificarse y formar redes entre las espinas y crestas (Lámina 23, fig. G).

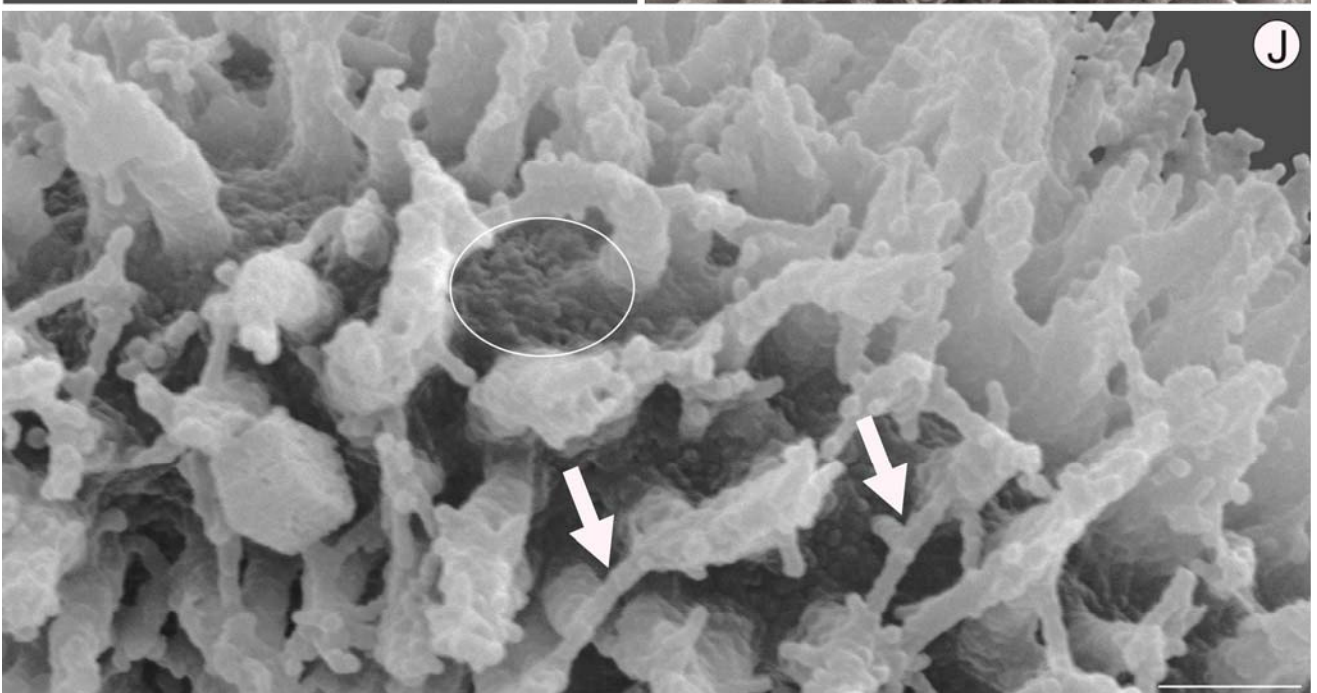
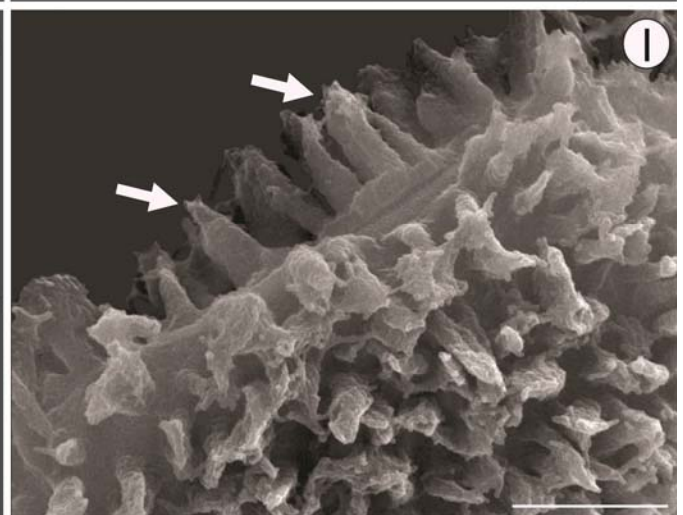
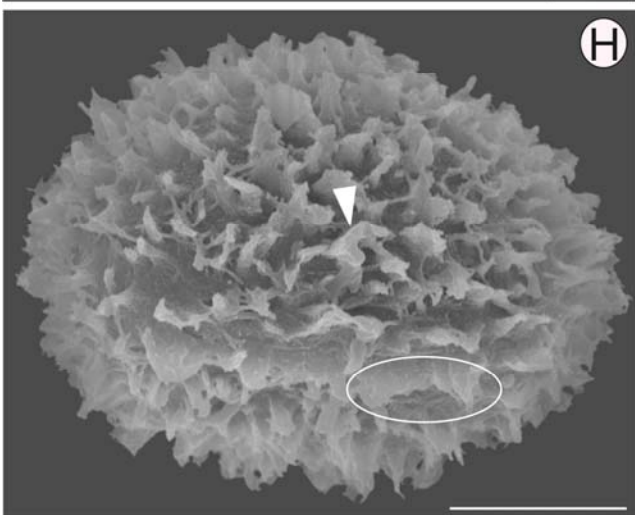
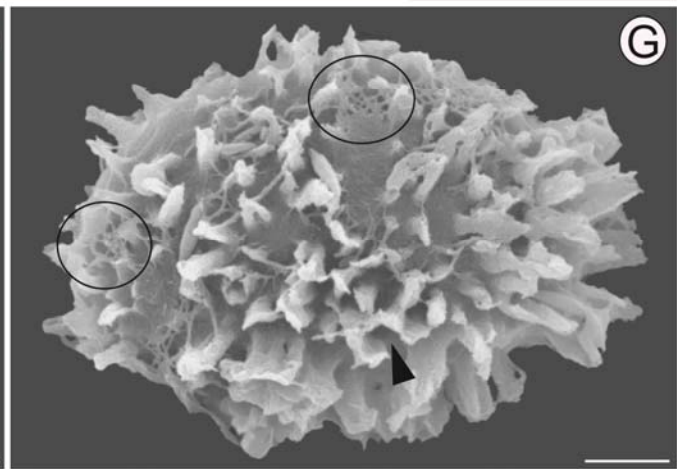
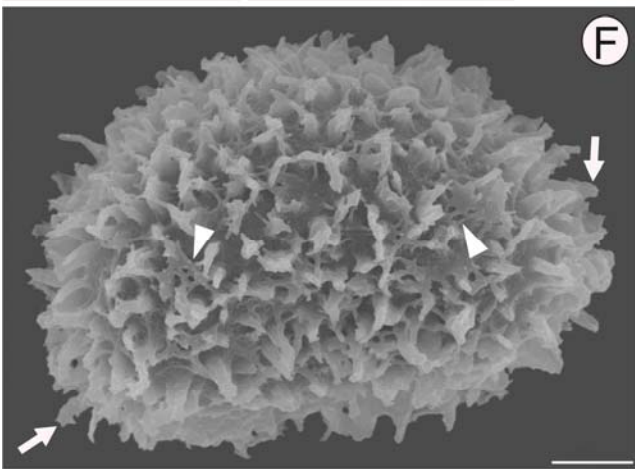
El exosporio está ornamentado por diminutas verrugas densamente dispuestas sobre toda la superficie (Lámina 24, fig. B) y, al MO es amarillento a hialino (Lámina 23, A-E).



**Lámina 23. Esporas de *Hypolepis* de la Provincia Fitogeográfica Paranaense con MO y MEB.**

**Grupo morfológico equinado.**

**Figuras A-E.** Esporas de *Hypolepis* con MO. **A.** Espora de *Hypolepis stolonifera* en vista ecuatorial menor. **B.** Espora de *Hypolepis stolonifera* en vista ecuatorial mayor. Se observan las espinas aisladas del perisporio. **C.** Espora de *Hypolepis mitis* en vista ecuatorial mayor. Se observan espinas fusionadas en crestas. **D.** Espora de *Hypolepis repens* en vista proximal. **E.** Espora de *Hypolepis repens* en vista distal. **Figuras F-J.** Esporas de *Hypolepis* con MEB. **F.** Espora de *Hypolepis stolonifera* en vista ecuatorial. Se observan espinas distribuidas sin un ordenamiento definido en toda la superficie de las esporas (flechas). Sobre las mismas hay cordones ramificados que las conectan (puntas de flecha). **G.** Espora de *Hypolepis mitis* en vista distal. Las espinas de la ornamentación se fusionan lateralmente y forman crestas sinuosas de longitud variable (punta de flecha). Redes de cordones se disponen sobre las mismas (círculos). **H.** Espora de *Hypolepis repens* en vista proximal. Se observan crestas formadas por la fusión de espinas (punta de flecha). Las crestas se disponen paralelas a la lesura y forman márgenes adyacentes a la misma (círculo). **I.** Detalle de espora de *Hypolepis mitis* en vista ecuatorial. Las espinas de la ornamentación poseen lados paralelos hasta la porción media que confluyen en la porción distal y presentan sección transversal aplanada (flechas). **J.** Detalle de espora de *Hypolepis stolonifera* en vista distal. Se observan cordones ramificados que conectan a las espinas de la ornamentación (flechas). La superficie de la pared es microverrucosa (círculo). Barras: **A, B, C, D, E y H** = 10  $\mu\text{m}$ ; **F, G y I** = 5  $\mu\text{m}$ ; **J** = 2  $\mu\text{m}$ .



## *Ultraestructura*

El exosporio presenta dos capas. La capa interna (E<sub>i</sub>) es delgada, de 40-60 nm, baja densidad a los electrones, estructura homogénea y se distingue fácilmente en la base y zona media de la lesura (Lámina 24, fig. C-D). La capa externa es más gruesa, de 0,1-0,8  $\mu\text{m}$  (1,8  $\mu\text{m}$  en la zona de la lesura) y está formada por dos estratos: el estrato interno (E<sub>e2</sub>) presenta cavidades y fisuras rellenas de material electrón-denso, más evidentes en la zona de la lesura (Lámina 24, fig. C-D) y el estrato externo (E<sub>e1</sub>) que es más grueso y presenta estructura homogénea (Lámina 24, fig. C-D). El margen del exosporio es irregular y está ornamentado por verrugas y, ocasionalmente espínulas de 40-100 nm de diámetro distribuidas en toda la superficie (Lámina 24, fig. D, F).

El perisporio es más electrón-denso que el exosporio y presenta cuatro capas. La capa 1 (P<sub>1</sub>) es delgada, de 20-50 nm, alta densidad a los electrones, estructura homogénea, y tapiza los elementos de la ornamentación del exosporio (Lámina 24, fig. F, H). La capa 2 (P<sub>2</sub>) posee estructura alveolar y varía notablemente en espesor (0,4-7,4  $\mu\text{m}$ ) debido a que forma el cuerpo de las espinas (Lámina 24, fig. D, F-H). En la zona de contacto con la P<sub>1</sub> se observan cavidades irregulares de 0,9-0,3  $\mu\text{m}$  diámetro, las cuales pueden estar vacías o rellenas de material electrón-denso (Lámina 24, fig. D, F). Cavidades de menor tamaño se identifican en el resto de la capa. El margen de la P<sub>2</sub> es verrucoso y de él se proyectan cordones de 0,1-0,2  $\mu\text{m}$  de grosor que ocasionalmente conectan a los elementos de la ornamentación (Lámina 24, fig. E, H). Estos cordones presentan una zona central de mayor electrodensidad de 20-60 nm de grosor (Lámina 24, fig. E-G).

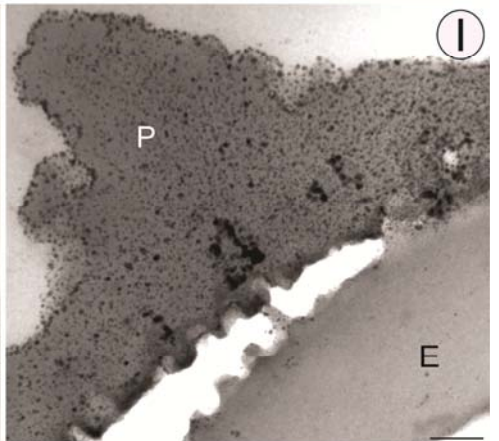
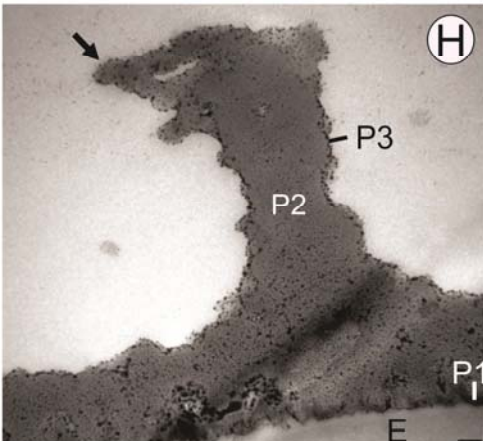
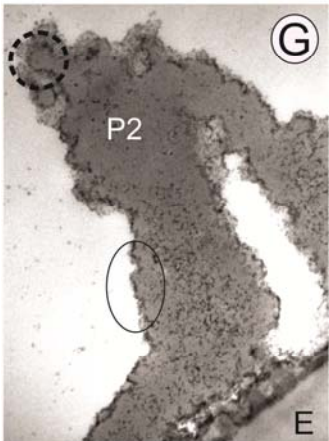
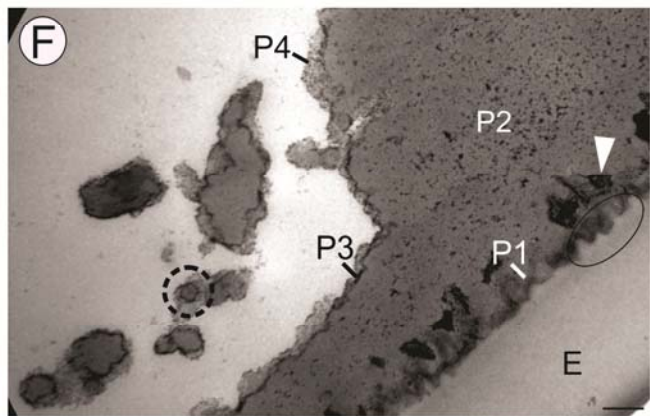
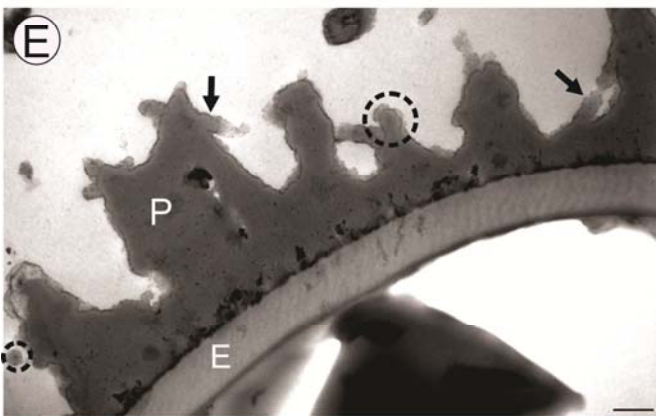
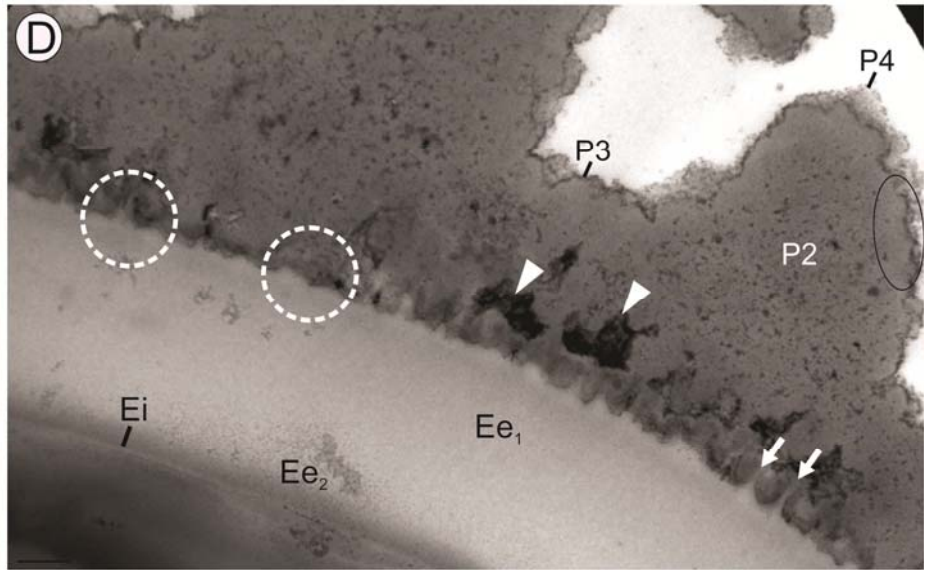
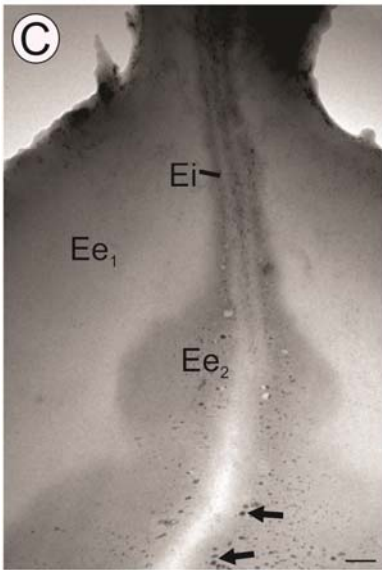
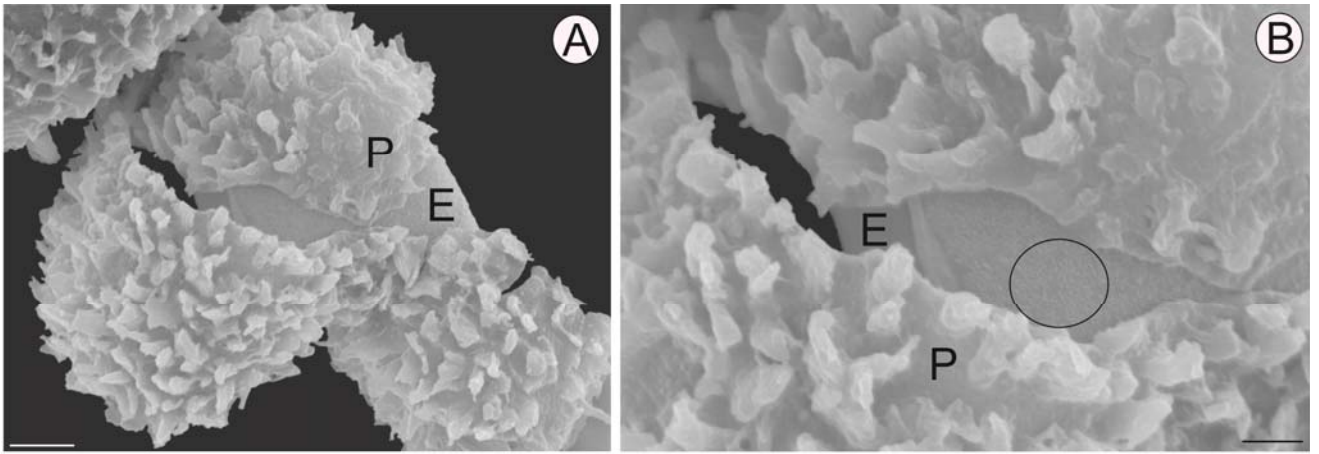
La capa 3 (P<sub>3</sub>) es muy delgada y se encuentra estrechamente adherida a la superficie de la P<sub>2</sub>. Presenta alta densidad a los electrones y estructura compacta (Lámina 24, fig. D, F, H). La capa 4 (P<sub>4</sub>) del perisporio tapiza la superficie de la espora por fuera de la P<sub>3</sub>. Es delgada, discontinua, de 30-100 nm, baja densidad a los electrones y de estructura heterogénea (Lámina 24, fig. D, F).

**Lámina 24. Esporas de *Hypolepis stolonifera* con MEB y MET.**

**Grupo morfológico equinado.**

**Figuras A-B.** Fractura de la esporodermis al MEB. **A.** P = Perisporio. E = Exosporio. **B.** El exosporio está ornamentado por diminutas verrugas densamente dispuestas sobre toda la superficie. P = Perisporio. **Figuras C-I.** Sección de la esporodermis con MET. **C.** Sección de la esporodermis a través de la lesura. La capa interna del exosporio (Ei) tiene estructura homogénea y se distingue fácilmente a los lados de la lesura. La capa interna del estrato interno del exosporio (Ee<sub>2</sub>) presenta cavidades evidentes en la zona de la lesura (flechas). El estrato externo (Ee<sub>1</sub>) presenta una estructura homogénea. **D.** El margen del exosporio está ornamentado por verrugas (círculo incompleto) y espínulas (flechas). La capa 1 del perisporio (P<sub>1</sub>) tiene estructura homogénea. La capa 2 (P<sub>2</sub>) tiene estructura alveolar y margen verrucoso (elipse). En la zona de contacto con la P<sub>1</sub>, se observan cavidades irregulares con material electrón-denso (puntas de flecha). La capa 3 (P<sub>3</sub>) tiene alta densidad a los electrones y estructura compacta. La capa 4 (P<sub>4</sub>) es delgada, discontinua, y de estructura heterogénea. Ei = Exosporio interno. Ee<sub>2</sub> = Estrato interno del exosporio. Ee<sub>1</sub> = Estrato externo del exosporio. **E.** Las diferencias de espesor en el perisporio constituyen espinas de lados paralelos que confluyen en el ápice. Del perisporio se proyectan cordones (flechas) que, en sección, tienen una zona central de mayor electrodensidad (círculo incompleto). E = Exosporio. **F.** En el perisporio se observan cordones con diferencias subestructurales en sección transversal (círculo incompleto). En la base de la capa hay cavidades con material electrón-denso en su interior (puntas de flecha). El exosporio presenta un margen verrucoso (elipse). P<sub>4</sub> = Perisporio 4. P<sub>3</sub> = Perisporio 3. P<sub>2</sub> = Perisporio 2. P<sub>1</sub> = Perisporio 1. Ei = Exosporio interno. Ee<sub>2</sub> = Estrato interno del exosporio. Ee<sub>1</sub> = Estrato externo del exosporio. **G.** Se observan dos espinas del perisporio 2 (P<sub>2</sub>) fusionadas en el ápice. El perisporio tiene margen verrucoso (elipse). Los cordones del perisporio tienen, en sección, una zona central de mayor electrodensidad (círculo incompleto). E = Exosporio. **H.** Los cordones del perisporio se fusionan entre sí (flecha). P<sub>3</sub> = Perisporio 3. P<sub>2</sub> = Perisporio 2. P<sub>1</sub> = Perisporio. E = Exosporio. **I.** La zona de contacto entre el perisporio y las verrugas del exosporio tiene una morfología semejante a un “cierre”. P = Perisporio. E

= Exosporio. Barras: **A** = 5  $\mu\text{m}$ ; **B** = 2  $\mu\text{m}$ ; **C** = 0,1  $\mu\text{m}$ ; **D, F, G, H e I** = 0,2  $\mu\text{m}$ ; **E** = 0,5  $\mu\text{m}$ .



## ● **Discusión**

En base a los estudios realizados durante esta tesis, se pudo determinar que las esporas de, *Hypolepis mitis*, *H. repens* y *H. stolonifera* tienen una ornamentación común, caracterizada por la presencia de espinas de sección aplanada y superficie verrucosa, ocasionalmente fusionadas en crestas sinuosas, y conectadas por cordones ramificados. De manera similar, numerosos autores describieron una escultura equinada o con báculas similares a espinas en *H. repens* (Knox, 1938; Murillo & Bless, 1978) así como en otras especies de *Hypolepis* (Nayar, 1964; Tschudy & Tschudy, 1965). Una ornamentación semejante a la de las especies aquí estudiadas fue observada en taxones filogenéticamente no emparentados como *Archangiopteris* (Marattiaceae) (Tryon & Lugardon 1991, pg. 44), *Cheilanthes papuana* (Pteridaceae) (Tryon & Lugardon 1991, pg. 155), *Thelypteris quelpartensis* (Tryon & Lugardon 1991, pg. 391) y *Cyclosorus albosetosus* (Thelypteridaceae) (Tryon & Lugardon 1991, pg. 403).

Si bien en esta tesis se observó cierta variabilidad en relación a la separación entre espinas y respecto a la longitud y fusión de las mismas, estas diferencias no resultaron útiles para distinguir especies debido a que también fueron identificadas entre ejemplares de una misma especie. *Hypolepis mitis* es el único taxón que podría separarse del resto de los incluidos en el grupo morfológico equinado por la longitud de las espinas, pero para corroborarlo es necesario analizar una mayor cantidad de ejemplares mediante métodos estadísticos. Especies del género no estudiadas en esta tesis fueron diferenciadas por otros autores por el tamaño de los elementos de la ornamentación (Erdtman, 1957; Harris, 1955). A partir de los análisis realizados con microscopía electrónica, se pudo concluir que las espinas que se distinguen al MEB en la superficie de las esporas se corresponderían con las elevaciones del perisporio vistas al MET. Mi interpretación sobre la capa que origina las espinas no coincide con las observaciones de Tardieu-Blot (1963), Nayar & Devi (1968a) y Contreras-Duarte *et al.* (2006) para otras especies del género, quienes describen a las mismas como constituidas por el exosporio. Asimismo, en este último trabajo los autores observaron al MO un perisporio psilado “como delgadas películas que rodean la espora”. En los análisis al MO también se pudo identificar en todas las especies estudiadas, algunas muestras donde una capa o membrana unía a las espinas de la ornamentación. No obstante,

se puede interpretar que las espinas en realidad están unidas por los cordones ramificados que se distinguen al MEB y que, ocasionalmente, pueden formar redes sobre las mismas. En concordancia con los resultados de esta tesis, Erdtman & Sorsa (1971) reconocieron, al MO y al MEB, espinas o báculos de las esporas de *H. repens* constituidas a partir del perisporio. Del mismo modo, otros autores describieron lo mismo para diversas especies de *Hypolepis* (Selling, 1946; Welman, 1970; Soepadmo & Khoo, 1977; Morbelli, 1980; Huang, 1981; Large & Braggins, 1991). En estos trabajos, sin embargo, se definió al exosporio como granuloso o libre de ornamentación, lo que no coincide con las observaciones realizadas aquí. Por medio de la fractura de la pared de las esporas se puede observar al MEB una superficie verrucosa por debajo del perisporio, que se correspondería con el exosporio verrucoso y espinulado observado al MET. Debido a las pequeñas dimensiones que tienen las verrugas y espínulas observadas en la superficie del exosporio, las mismas no se pueden distinguir al MO y, en los análisis al MEB, son fáciles de confundir con gránulos o papilas. Probablemente por esta razón existen discrepancias entre los autores en relación a la escultura del exosporio. En este sentido, el estudio con MET de los cortes ultrafinos de la esporodermis permite una interpretación más detallada de la ornamentación de dicha capa.

En relación a los estudios sobre la estratificación y ultraestructura de la esporodermis, se identificó un perisporio formado por cuatro capas: la capa P<sub>1</sub>, tapiza las verrugas del exosporio, es delgada y de estructura homogénea; la capa P<sub>2</sub>, tiene estructura alveolar y espesor variable debido a que forma las espinas de la ornamentación; la capa P<sub>3</sub>, muy delgada, de estructura compacta y alta densidad a los electrones; y la capa P<sub>4</sub>, tapiza de forma discontinua la superficie externa de las esporas y posee estructura heterogénea. Estos resultados contradicen con los estudios realizados hasta el momento sobre las especies de *Hypolepis* con esporas equinadas. En este sentido, Tryon & Lugardon (1991) identificaron un perisporio con una única capa y mencionaron que, ocasionalmente, puede observarse una fina capa interna en contacto con el exosporio. Más tarde, Giudice *et al.* (2006) describieron dos capas en el perisporio de *H. repens*. Debido a sus características ultraestructurales, la capa externa mencionada por estos autores podría homologarse a la capa P<sub>4</sub> descrita en esta tesis y la capa interna se correspondería con la capa P<sub>2</sub>. No obstante, los autores dividieron a la capa interna en tres estratos en función del espesor y de



la continuidad o discontinuidad sobre la superficie de las esporas. Según mi opinión, la diferencia de espesores a lo largo de esta capa, debida a la altura de las espinas de la ornamentación, sumado a la existencia de una uniformidad en la estructura alveolar, no permiten justificar una subdivisión de la misma en estratos distintos.

A partir de los análisis al MET realizados, se pudo determinar que los cordones ramificados que conectan a las espinas de la ornamentación, se proyectan desde la capa P<sub>2</sub> del perisporio. Estos cordones se observan generalmente cerca de los extremos de las espinas y en corte transversal, presentan un núcleo central de alta densidad a los electrones.

Si bien estos cordones fueron observados en la mayoría de los trabajos que se analizaron con MO y MEB en las esporas equinadas de *Hypolepis* (Tryon & Tryon, 1982), la subestructura de los mismos no había sido estudiada hasta este momento. Cordones de dimensiones y características similares fueron observados como parte de la ornamentación de las esporas de algunas especies de *Dicksonia* (Tryon & Lugardon 1991, pg. 323-233) y como elementos constitutivos de la pared de granos de polen de diversos géneros (Rowley, 1987; Rowley & Claugher, 1996; Wittborn *et al.* 1996; Rowley *et al.*, 1999). En estos casos los autores mencionados identificaron además, subunidades dispuestas helicoidalmente conformando los cordones y rodeando al núcleo central electrón-denso. Este último fue, más tarde, interpretado como un canal de transferencia de nutrientes desde el tapete al citoplasma de las esporas durante las etapas de desarrollo de las mismas (Rowley *et al.*, 2003). En este sentido, nuevos estudios con material fresco son necesarios para corroborar la presencia de subunidades en los cordones del perisporio de las especies paranaenses de *Hypolepis*.

Además de su potencial función en la translocación de nutrientes, los cordones presentes en las esporas de *Hypolepis* fueron asociados con el origen de la ornamentación durante el desarrollo de la pared. En este sentido Mutui (1981) describió, mediante observaciones realizadas al MO y MEB de *Hypolepis punctata*, el proceso por el cual a través de la anastomosis y fusión de cordones se forman las espinas del perisporio. Este proceso explicaría la continuidad entre los cordones y las espinas de la capa P<sub>2</sub> del perisporio observada en esta tesis. No obstante, es necesario realizar nuevos estudios con microscopía electrónica sobre esporas con distintos grados de maduración para comprender mejor el proceso de formación del perisporio.

En relación al exosporio, en los análisis al MET pudieron distinguirse dos capas: la capa interna, delgada, de baja densidad y estructura homogénea, y la capa externa más gruesa, formada por dos estratos. El estrato interno se caracteriza por poseer numerosas cavidades y fisuras y el estrato externo tiene estructura homogénea. La presencia de un exosporio formado por dos capas fue también señalado por Esteves & Coehlo (2007). En relación a las características ultraestructurales, el exosporio de las especies estudiadas coincide con el exosporio blechnoide definido por Lugardon (1971, 1974) para diversos grupos de helechos.

La zona de contacto entre la capa más interna del perisporio y las verrugas del margen del exosporio externo presenta una morfología particular semejante a un “cierre”. Esto puede observarse particularmente en aquellos cortes ultrafinos analizados con MET donde el perisporio se desprende del exosporio (Lámina 24, fig. I).

#### **Observaciones sobre el origen híbrido de *Hypolepis x paulistana*** (Lámina 25)

Como se mencionó anteriormente en la descripción de la especie, Schwartsburd & Prado (en prensa) fueron los primeros en describir a *Hypolepis x paulistana* como un híbrido entre *Hypolepis stolonifera* (var. *stolonifera*) y *H. rugosula* (subsp. *pradoana*). Entre sus observaciones los autores mencionaron la presencia de esporas bien formadas.

Gracias a la gentileza del Dr. Pedro Bond Schwartsburd, durante esta tesis pudo estudiarse detenidamente un fragmento del material tipo. A partir de las observaciones realizadas, *Hypolepis x paulistana* fue incluida en el grupo morfológico equinado debido a que, en la superficie de las esporas, se observaron las mismas espinas del resto de las especies incluidas en el grupo. No obstante, se identificaron esporas maduras con diversas anomalías que podrían estar asociadas con el origen híbrido de la especie.

- 1) Esporas irregulares en sus formas y de diámetros muy variables (Lámina 25, fig. A): Si bien pudieron reconocerse esporas elípticas de tipo monolete en *H. x paulistana*, las dimensiones de las mismas variaron considerablemente dentro de un mismo ejemplar: el diámetro ecuatorial mayor, entre los 22 y 39  $\mu\text{m}$ , y el menor entre los 16 y 32  $\mu\text{m}$ . En vista ecuatorial, el polo distal varió de convexo a subcónico. Adicionalmente, se hallaron esporas muy irregulares, con formas que no pudieron definirse.

La variabilidad en relación a la forma y dimensiones de las esporas ha sido relacionada por diversos autores con un origen híbrido de las especies que las producen. Taylor *et al.* (1985) observó para las megasporas de la especie híbrida *Isoetes harveyi* una gran diversidad de formas y tamaños. Por su parte, Morbelli (1974) halló una diversidad similar en híbridos interespecíficos del género *Blechnum*. Asimismo, Wagner & Boydston (1958) distinguieron en *Asplenium ebenoides x rhizophyllum* esporas anormalmente pequeñas entremezcladas con otras de tamaño mayor. Los autores señalaron que esta diferencia de tamaños podría deberse a una carga cromosómica desigual de las esporas hermanas. En este sentido, Hickok & Klekowski (1973) detectaron modificaciones en la división reduccional de las células madre de las esporas en híbridos de *Ceratopteris* lo que generó diferencias de tamaños en las esporas resultantes de dichas divisiones.

Por su parte, Wagner (1974) también afirmó que los híbridos derivados de dos o más especies suelen tener esporas muy variables, pero destacó que la hibridación puede no ser la única razón de la variación sino que también pueden influir variables ambientales.

- 2) Esporas colapsadas y sin protoplasto (Lámina 25, fig. B): Se hallaron esporas maduras retorcidas, con concavidades o pliegues en la pared. Al MO, muchas de ellas presentaron burbujas en su interior. Esporas similares se hallaron en especies híbridas como *Psilotum complanatum x nudum* (Wagner, 1968) y *Botrychium matricariifolium x simplex* (Wagner, 1980). Wagner (1986) señaló que el colapso de las paredes de las esporas es un carácter que frecuentemente se asocia a eventos de hibridación, y que en la mayoría de los casos está relacionado con la pérdida del protoplasto.
  
- 3) Anomalías o ausencia de lesura (Lámina 25, fig. C): Si bien en la mayoría de las esporas analizadas se pudo distinguir una única lesura recta similar a la de las otras especies de *Hypolepis*, en algunos casos se presenta cierta curvatura en los extremos, y se continuó hacia los ángulos de la spora. Asimismo, en las esporas que presentaron formas menos elípticas y más esferoidales no se detectó ningún tipo de abertura. En relación a estas observaciones, diversos autores también hallaron anomalías en las aberturas de distintas especies de helechos: se identificaron modificaciones en la abertura trilete de *Asleniopsis decipiens* y bifurcaciones en los extremos de la abertura monolete en *Dipteris chinensis* y

trilete en *Pityrogramma hybrida* (Erdtman, 1957, Erdtman & Praglowski, 1959).

Asimismo, además de esporas trilete, en esta última especie se observaron esporas monoletes, monoporadas y sin apertura. Todos los taxones mencionados presentaron un origen híbrido. Del mismo modo, Evans (1969), Brow (1960) y Wagner (1974) también asociaron casos de hibridación con la presencia de esporas con aberturas intermedias entre monolete y trilete o esporas sin apertura. No obstante, este último autor señaló que esas anomalías también pueden presentarse en especies apogámicas.

- 4) Esporas esféricas (Lámina 25, fig. D, G): Se hallaron esporas esféricas de simetría radiada, de 30-32  $\mu\text{m}$  de diámetro, aletas, que presentaron una ornamentación muy similar a la de las restantes esporas bilaterales, monoletes, descritas para el grupo morfológico. DeBenedictus (1969) denominó a este tipo de esporas como “esporas gigantes” o “basketball” y señaló que podrían ser células madre de las esporas no reducidas, producidas por interrupciones de la meiosis. Según el autor, estas esporas son viables y producen gametofitos.
- 5) Díades (Lámina 25, fig. E, H): Se hallaron díades de esporas maduras que, en la mayoría de los casos, presentaron formas irregulares y diversos tamaños. De modo similar, además de las tétrades habituales Hickok & Klekowski (1973) también observaron la presencia de díades y tríades en híbridos de *Ceratopteris*, donde las esporas presentaron distintas dimensiones. En ese caso, los autores señalaron que las mismas se producen por una división anormal de las células madre de las esporas y una distribución desigual de la carga cromosómica entre las células hijas. Esta distribución desigual, frecuente en especies híbridas, fue indicada también por Wagner & Boydston (1958) y Wagner & Chen (1965). Por su parte, Morbelli (1974) describió díades cuyas esporas presentaron paredes con un desarrollo incompleto en *Blechnum australe* subsp. *auriculatum* x *Blechnum occidentale*.
- 6) Cuerpos de material perispórico (Lámina 25, fig. F): En las muestras analizadas se hallaron pequeños cuerpos amorfos dispersos entre las esporas, ornamentados por espinas similares a las observadas en el perisporio de las mismas. De manera similar, Wagner & Boydston (1958) hallaron entre las esporas de *Asplenium ebenoides* x *rhizophyllum*

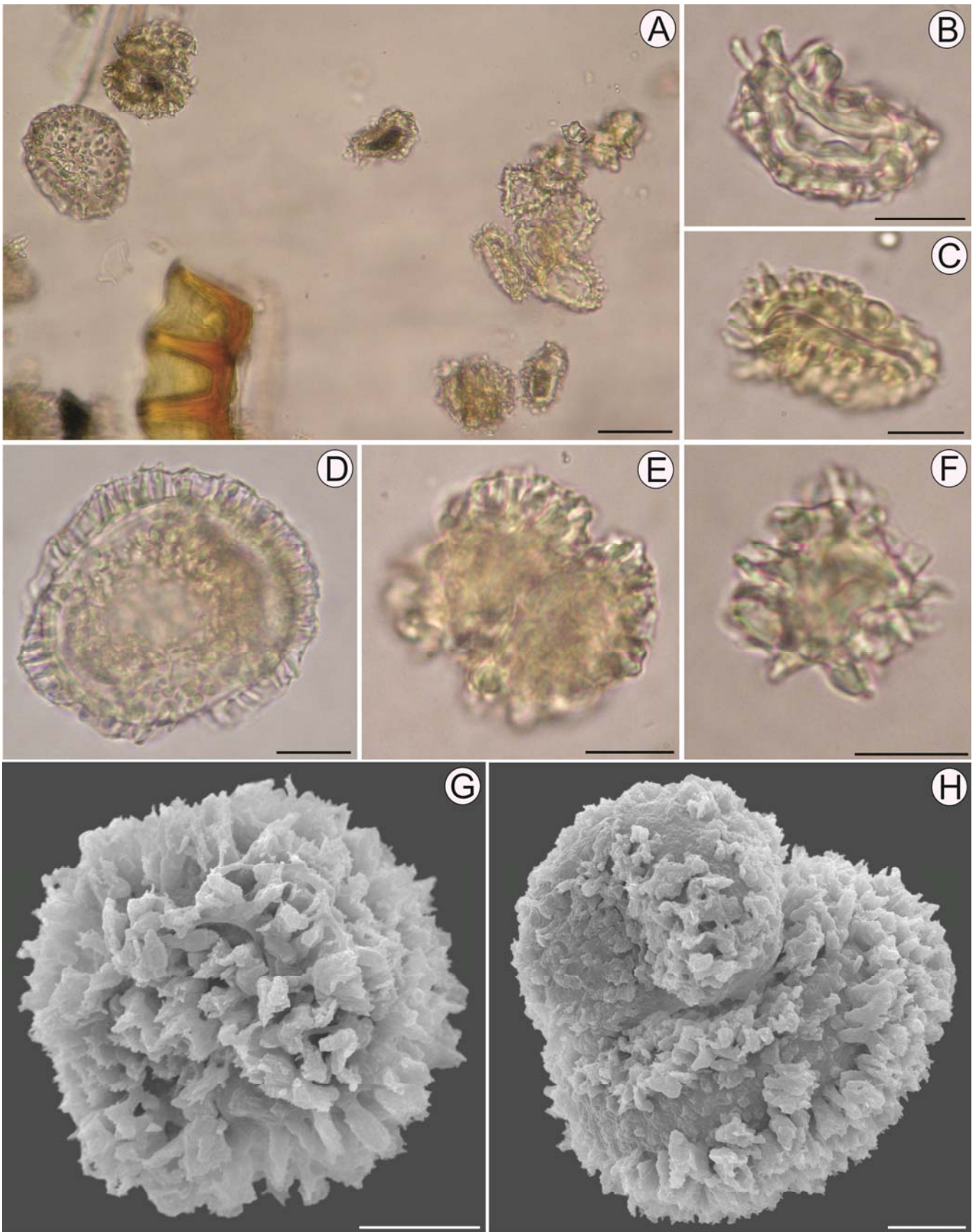
numerosos cuerpos pequeños parecidos a piezas del perisporio. En relación a estas observaciones, Wagner et al (1986) señalaron que en casos de hibridación pueden formarse, en el interior de la cápsula, depósitos con una coloración similar a la perisporio. En este sentido, estos depósitos podrían liberarse junto con las esporas luego de la ruptura del esporangio.

La diversidad de anomalías observadas en las muestras analizadas de *Hypolepis x paulistana* y las similitudes halladas con estudios previos realizados en otros taxones proveen nueva evidencia sobre el origen híbrido de la especie. En este sentido, en su revisión sobre aspectos citológicos del género, Brownsey (1989) señaló que las especies de *Hypolepis* son frecuentemente asociadas con eventos de hibridación. Según el autor, los híbridos son reconocidos por su morfología intermedia, esporas marchitas, arrugadas o consumidas y por el irregular apareamiento de los cromosomas en la meiosis. No obstante, es necesario estudiar una mayor cantidad de ejemplares y reunir evidencias citológicas para afirmarlo debido a que existen factores ambientales y genéticos que también pueden causar alteraciones en la producción de esporas de especies no híbridas (Wagner, 1986). Asimismo, sería interesante realizar ensayos de viabilidad en *H. x paulistana* para estudiar el porcentaje de esporas abortadas existente.

**Lámina 25. Esporas de *Hypolepis paulistana* con MO y MEB.**

**Observaciones sobre el origen híbrido de *Hypolepis x paulistana*.**

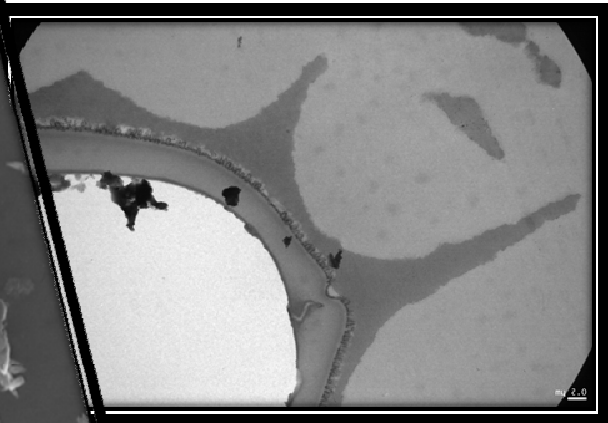
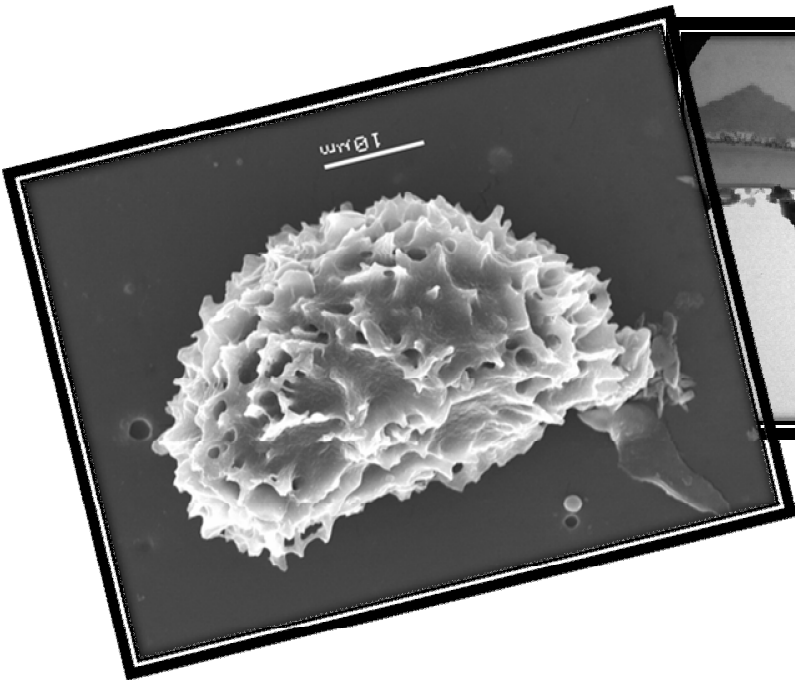
**Figuras A-F.** Esporas con MO. **A.** Las dimensiones de las esporas varían dentro de un mismo ejemplar y presentan formas irregulares. **B.** Espora madura con concavidades o pliegues en la pared y burbujas en su interior. **C.** Espora con lesura curvada en los extremos. **D.** Espora esférica de simetría radiada. **E.** Díades de esporas maduras. **F.** Cuerpo amorfo ornamentado por espinas similares a las del perisporio de las esporas. **Figuras G-H.** Esporas con MEB. **G.** Espora esférica de simetría radiada. **H.** Díade. Barras: 10 µm.



*Hypolepis rugosula*



# CRESTAS





#### 4.2.5. Grupo morfológico crestado (Láminas 26 y 27)

En el grupo morfológico crestado se incluye a la especie *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana*.

Las esporas son bilaterales, monoletes. En vista polar son oblongas o subelípticas. En vista ecuatorial mayor, la cara proximal es cóncava a plana y la distal es hemisférica (Lámina 26, Fig. A-C).

La lesura es recta, de 26-40 de longitud, se extiende  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$  partes de la longitud de la espora y, ocasionalmente, se encuentra parcialmente cubierta por la ornamentación.

El perisporio es hialino al MO, crestado, con crestas de margen irregular. Tiene 0,1-8,8  $\mu\text{m}$  de grosor y, al MET, se observan dos capas.

El exosporio es castaño claro al MO y en la superficie se observan verrugas y báculas.

Tiene 0,8-2,5  $\mu\text{m}$  de grosor y presenta dos capas con MET.

#### ***Hypolepis* Bernh.**

***Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana*** Schwartsb., Kew Bulletin 67, 2012.

Tipo: Brasil, Teresópolis, Parque Nacional da Serra dos Órgãos, *Schwartsburd & Pereira 2310* (Holotipo SP, Isisotipos B, FI, G, K, LP!, NY, P, PRC, RB, SI, SP, UC, UPCB, VIC, WELT).

Descripción del esporofito: *Rizoma* de 0,1-0,4 cm de diámetro, ramificado, largamente rastrero, pubescente, con tricomas catenados, aciculares o no, castaño-rojizos. *Peciolo*s de 0,06-0,5 m de largo, atropurpúreo en toda su extensión, pubescentes abaxial y adaxialmente, con tres clases de pelos: catenado-aciculares hialinos a rojizos, catenado-aciculares amarillentos a castaños y catenado-glandulares hialinos, caducos. *Fronde*s de 0,1-1,4 m, monomórficas. *Láminas* lanceoladas a ovadas, proximalmente pinnado-pinnatisectas a bipinnado-pinnatisectas, pinnatisectas en la parte distal. *Raquis* atropurpúreos, a veces pajizos en la cara adaxial, con pelos similares a los del peciolo. *Pinnas* de 2-30 cm de largo, equilaterales, 15-20 pares, lanceadas a lineares, subopuestas, cortamente pecioladas; *costas* pubescentes en ambas caras, con pelos catenado-aciculares hialinos a rojizos y catenado-glandulares hialinos. *Segmentos* oblongos, enteros o

lobulados. *Venas* pubescentes con pelos catenado-glandulares hialinos en ambas caras, y pelos catenado-aciculares hialinos a rojizos en cara adaxial. Tejido laminar adaxial entre venas con pelos catenado-aciculares hialinos a rojizos y catenado-aciculares amarillentos a castaños. *Soros* submarginales, no protegidos o ligeramente protegidos. Pseudo-indusios ausentes, a veces el margen de la lámina ligeramente revoluto, protegiendo el soro.

Distribución en el área de estudio: BRASIL: Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro. Probablemente en Rio Grande do Sul y São Paulo (Fig. 18). Fuera del área: Nordeste de Brasil.

Hábitat: En campos de altitud y bosques nublados bajos o *matas nebulares* (selvas nubladas enanas). Crece entre los 1200-2600 msm.

Observaciones: Esta subespecie fue descrita recientemente por Schwartsburd (2012) y es endémica de las tierras altas del sur-sureste de Brasil.

*Hypolepis rugosula* es una especie distribuida en regiones templadas del hemisferio sur y regiones tropicales de América, África (incluyendo Madagascar), Oceanía y Filipinas, así como islas oceánicas volcánicas del Atlántico. Además de la subespecie *rugosula*, se reconocen 14 subespecies segregadas geográficamente.

**Figura 18. Distribución de *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* en la Provincia Fitogeográfica Paranaense. ● = material examinado en esta tesis.**

*Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana*



Figura 18

### Descripción de las esporas

DP: 27-29-34  $\mu\text{m}$

DE<sub>1</sub>: 45-51-56  $\mu\text{m}$

DE<sub>2</sub>: 26-27-35  $\mu\text{m}$

Espesor del perisporio: 2,1-8,8  $\mu\text{m}$  en las crestas y 0,1-1,3  $\mu\text{m}$  entre crestas

Espesor del exosporio: 0,8-1,2  $\mu\text{m}$  (alcanza los 2,5  $\mu\text{m}$  a nivel de la lesura)

Longitud de la lesura: 26-40  $\mu\text{m}$

La ornamentación de las esporas es crestada. Las crestas son de longitud y altura variables, presentan un margen irregular, y son cónicas en sección (Lámina 26, Fig. D-G).

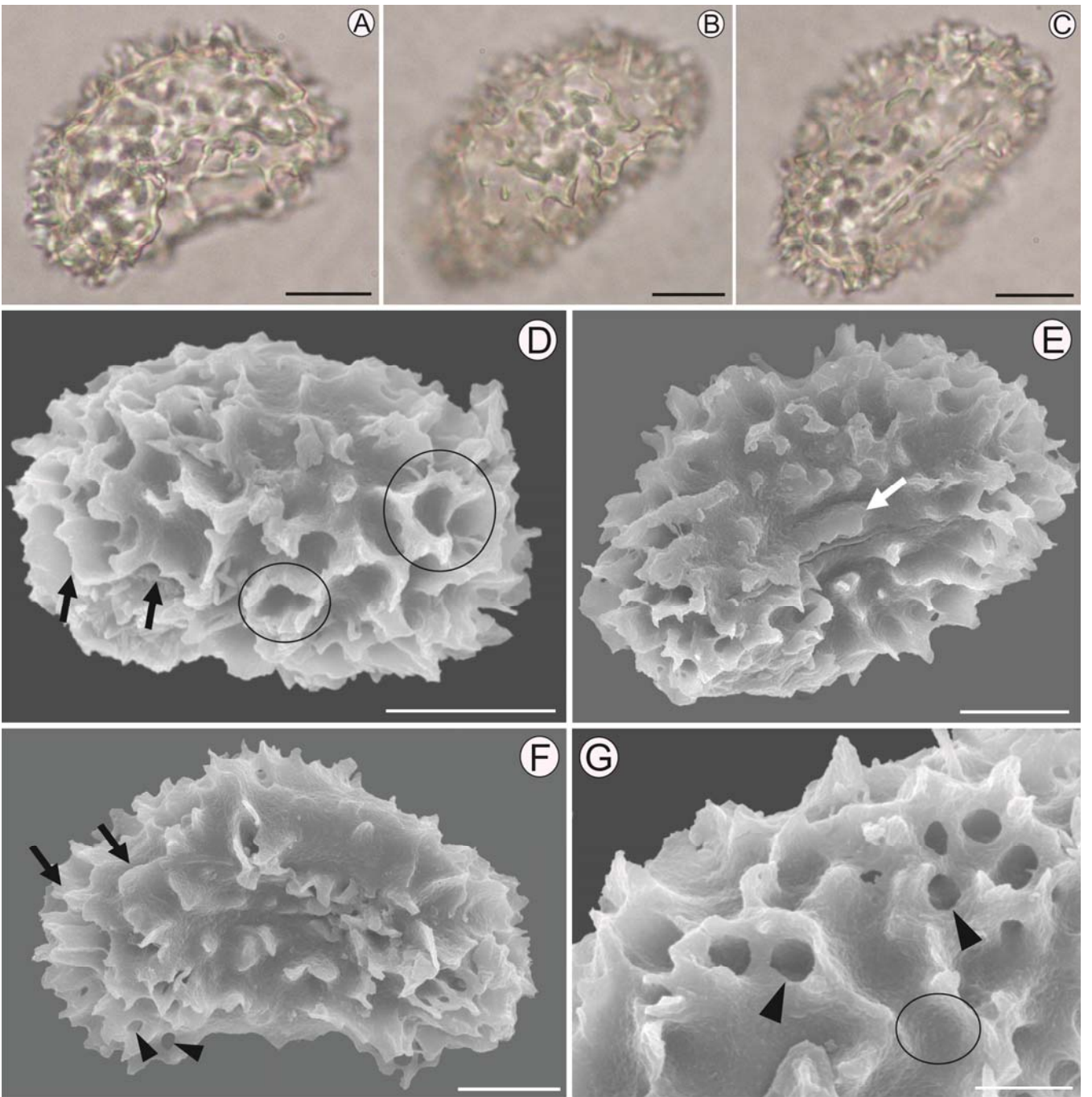
Ocasionalmente, las bases de las crestas son fenestradas (Lámina 26, Fig. F-G). En la cara distal y ecuatorial, las crestas generalmente cubren la mayor parte de la superficie y se disponen paralelas entre sí y respecto a los lados de la espora (Lámina 26, Fig. D, F). Las crestas se fusionan entre sí y, en algunos casos, forman areolas aisladas que no alcanzan a definir un patrón reticulado (Lámina 26, Fig. D). En cara proximal, las crestas son más cortas, bajas, menos numerosas y se distribuyen de manera más espaciada. Se ordenan paralelas a la lesura y frecuentemente forman un margen adyacente a la misma (Lámina 26, Fig. E).

La superficie es microverrucosa (Lámina 26, Fig. G).

**Lámina 26. Esporas de *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* al MO y MEB.**

**Grupo morfológico crestado.**

**Figuras A-C.** Esporas maduras al MO. **A.** Espora en vista ecuatorial. **B.** Espora en vista distal. **C.** Espora en vista proximal. **Figuras D-G.** Esporas al MEB. **D.** Espora en vista distal. La ornamentación de las esporas es crestada. Las crestas cubren la mayor parte de la superficie, se disponen paralelas entre sí (flechas) o se fusionan y, en algunos casos, forman areolas aisladas (círculos). **E.** Espora en vista proximal. Las crestas son cortas, bajas, se distribuyen de manera espaciada y se ordenan paralelas a la lesura (flecha). **F.** Espora en vista ecuatorial. Las crestas se disponen paralelas entre sí y respecto a los lados de la espóra (flechas). Las bases de las crestas son fenestradas (puntas de flecha). **G.** Se observan las bases de las crestas fenestradas (puntas de flecha). La superficie de la ornamentación es microverrucosa (círculo). Barra: **A, B, C, D, E y F** = 10  $\mu\text{m}$ ; **G** = 5  $\mu\text{m}$ .



## *Ultraestructura*

El exosporio presenta 2 capas. La capa interna (Ei) es delgada, de 30-40 nm, de baja electrondensidad, estructura homogénea y se observa principalmente a la altura de la lesura (Lámina 27, Fig. A, F). La capa externa (Ee) es más gruesa, de 0,1-2,4  $\mu\text{m}$  y presenta dos estratos. El estrato interno (Ee<sub>2</sub>) posee cavidades y canales ramificados rellenos de material electrón-denso (Lámina 27, Fig. A, F). El estrato externo (Ee<sub>1</sub>) es más grueso, tiene estructura homogénea (Lámina 27, Fig. A, F) y presenta canales que tienen continuidad con el Ee<sub>2</sub> y la porción más interna del perisporio (Lámina 27, Fig. C). La superficie del exosporio está ornamentada uniformemente con verrugas y báculos de 50-100 nm de diámetro (Lámina 27, Fig B-D).

El perisporio presenta 3 capas. La capa interna (Pi) es de 10-40 nm, estructura homogénea y alta electrondensidad. Se encuentra unida al exosporio y tapiza los elementos que forman parte de la ornamentación del mismo (Lámina 27, Fig. B, D).

La capa media (Pm) forma las crestas de superficie microverrucosa que pueden ser fenestradas en la base. Su espesor varía entre 2-8,7  $\mu\text{m}$  en las zonas más elevadas y 0,2-1,2  $\mu\text{m}$  entre estas zonas. Presenta estructura alveolar (Lámina 27, Fig. B, D-E). El perisporio medio se desprende fácilmente y pueden observarse espacios vacíos entre éste y el perisporio interno (Lámina 27, Fig. D-E).

La capa externa (Pe) es delgada, discontinua, de estructura homogénea y muy baja densidad a los electrones (Lámina 27, Fig. D-F).

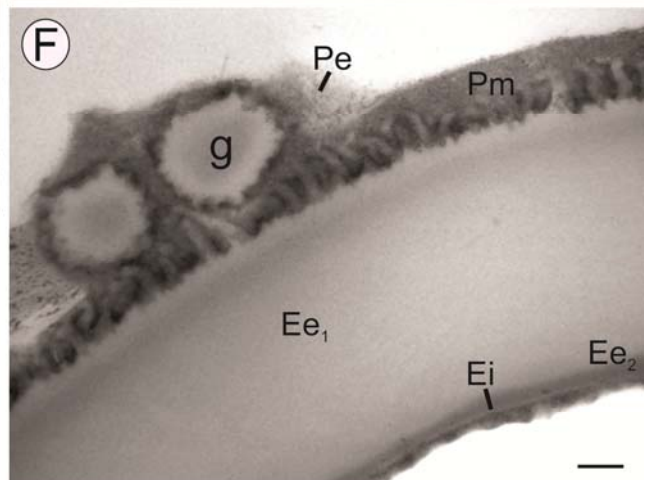
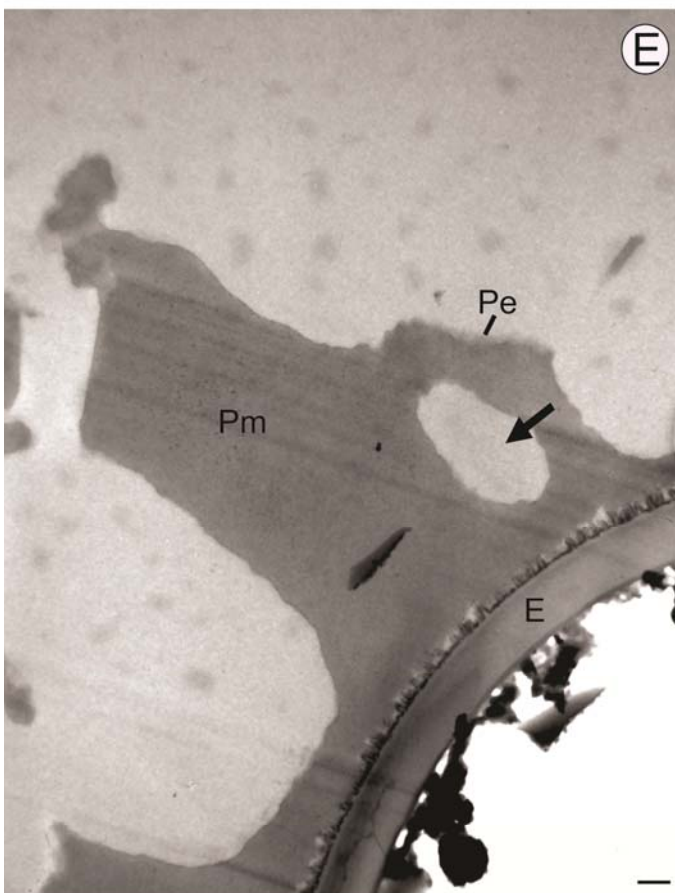
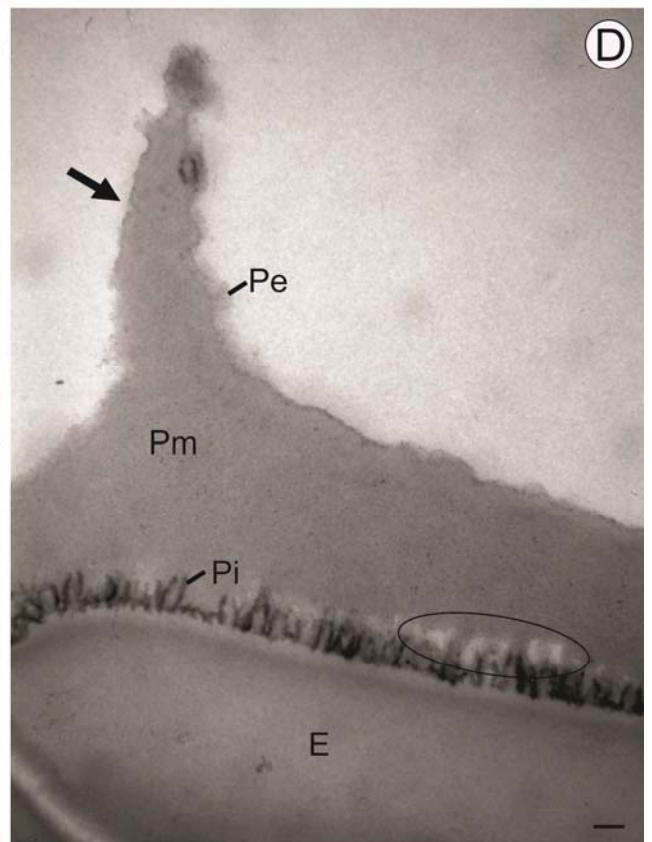
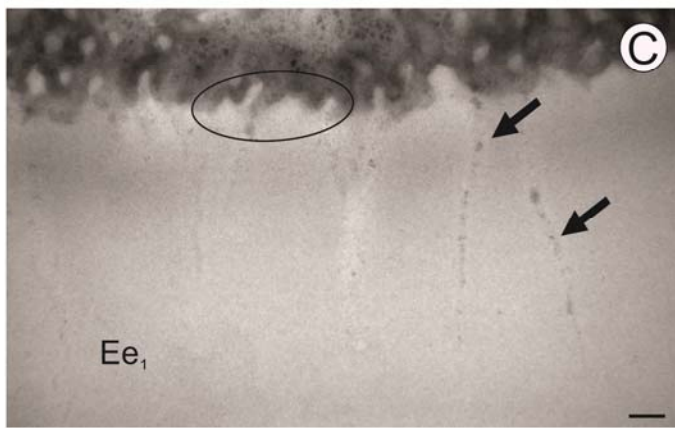
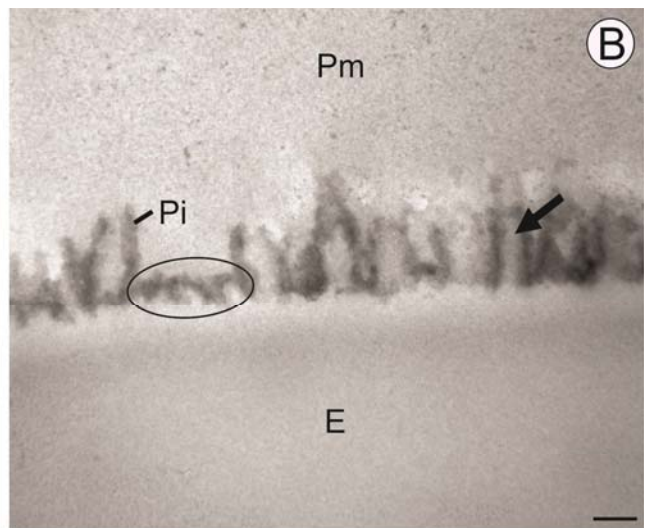
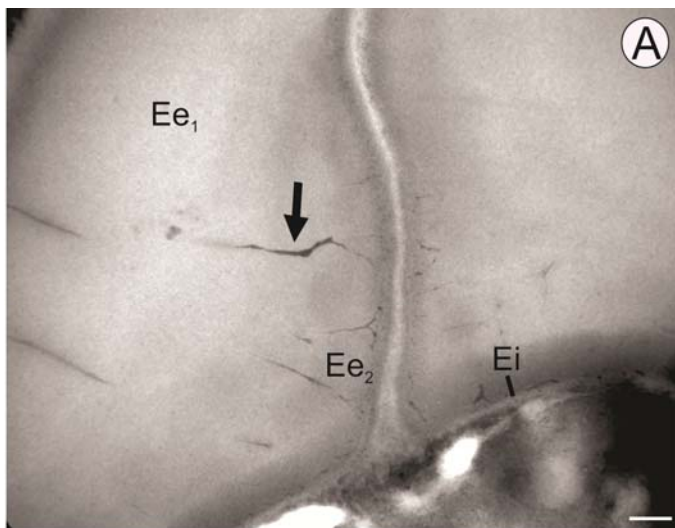
Inmersos en el perisporio, se observan cuerpos esferoidales de 0,6  $\mu\text{m}$  diámetro constituidos por un núcleo central de material similar al del exosporio y rodeado por una capa de estructura similar a la del perisporio (Lámina 27, Fig F).



**Lámina 27. Esporas de *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* al MET.**

**Grupo morfológico crestado.**

**Figuras A-F.** Sección de la pared al MET. **A.** La capa interna (Ei) es delgada, de baja electrondensidad y estructura homogénea. El estrato interno (Ee<sub>2</sub>) posee cavidades y canales ramificados rellenos de material electrón-denso. El estrato externo (Ee<sub>1</sub>) tiene estructura homogénea y presenta canales que tienen continuidad con la Ee<sub>2</sub> (flecha). **B.** La superficie del exosporio (E) está ornamentada uniformemente con verrugas (elipse) y báculos (flecha). La capa interna del perisporio (Pi) tiene estructura homogénea y alta electrondensidad. La capa media (Pm) presenta estructura alveolar. **C.** El estrato externo (Ee<sub>1</sub>) presenta canales que tienen continuidad con la porción más interna del perisporio (flechas). Hacia el margen de la capa se observan verrugas (elipse). **D.** La capa media del perisporio (Pm) forma crestas de margen irregular (flecha). El Pm se desprende fácilmente y pueden observarse espacios vacíos entre éste y el perisporio interno (Pi) (elipse). La capa externa del perisporio (Pe) es delgada, discontinua, de estructura homogénea y baja densidad. E = exosporio. **E.** La base de las crestas del Pm pueden ser fenestradas (flecha). Pe = perisporio externo. E = Exosporio. **F.** Inmersos en el perisporio, se observan cuerpos esferoidales constituidos por un núcleo central de material similar al del exosporio y rodeado por una capa de estructura similar a la del perisporio (g). Pe = perisporio externo. Pm (perisporio medio). Ee<sub>1</sub> = estrato externo del exosporio externo. Ee<sub>2</sub> = estrato interno del exosporio externo. Ei = exosporio interno. Barras: **A, D y F** = 0,2 µm; **B y C** = 0,1 µm; **E** = 0,5 µm.



## ● **Discusión**

Como resultado de los análisis realizados sobre las esporas *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* se pudo determinar que las mismas presentan una superficie ornamentada con crestas de margen irregular, bases fenestradas y, en ocasiones, fusionadas en areolas aisladas. Estos resultados contradicen los trabajos palinológicos previos realizados sobre la especie, donde las esporas fueron descritas como equinadas (Harris, 1955; Erdtman & Sorsa, 1971) o baculadas (Erdtman, 1957; Morbelli, 1980). Asimismo, la mayoría de las especies de *Hypolepis* estudiadas por otros autores también presentaron báculas (Knox, 1938; Selling, 1946; Tardieu-Blot 1963; Nayar, 1964; Tscudy & Tschudy, 1965; Nayar & Devi, 1968a; Welman, 1970; Heusser, 1971, Soepadmo & Khoo, 1977; Murillo & Bless, 1978; Huang, 1981; Mitui, 1981). Las esporas descritas por Large & Braggins (1991) en *Hypolepis rufobarbata*, una especie endémica de Nueva Zelanda, son las que más se asemejan a las observadas en el presente grupo morfológico crestado. Los autores mencionados observaron una superficie tapizada por proyecciones en forma de “ala” con bases fenestradas, muy similares a las crestas observadas para *H. rugosula* subsp. *pradoana*. No obstante, sobre las proyecciones de *H. rufobarbata* los autores describieron cordones que no se identificaron en ninguno de los ejemplares de *H. rugosula* subsp. *pradoana*.

A partir de las observaciones realizadas con distintos microscopios, se pudo concluir que las crestas observadas al MO y MEB sobre la superficie de las esporas de *H. rugosula* subsp. *pradoana* se corresponderían con las crestas que se distinguieron al MET en el perisporio. Diversos géneros de la familia Pteridaceae, como ser *Gymnopteris*, *Cheilanthes*, *Pellaea*, *Bommeria* y *Trachypteris* (Nayar & Bajpai, 1964; Tryon, 1972; Morbelli & Michelena, 1989; Ranker, 1989; Tryon & Lugardon 1991, pg. 153; Ramos Giacosa *et al.* 2011), así como especies del género *Asplenium* (Aspleniaceae) (Nayar & Devi, 1964a; Ganem *et al.*, 2013) y *Elaphoglossum* (Lomariopsidaceae) (Tryon & Lugardon, 1991, pg. 516) presentan esporas ornamentadas con crestas formadas por el perisporio, semejantes a lo observado para *H. rugosula* subsp. *pradoana*. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en esta última especie, en los grupos mencionados las crestas no se definen por una variación en el grosor del perisporio sino por pliegues en el mismo que, a su vez, forman

grandes cavidades hacia el interior de la pared. En contraposición, en *Megalastrum atrogriseum* y *M. subincisum* (Dryopteridaceae) (Tryon & Lugardon, 1991, pg. 459) las crestas del perisporio son macizas y están formadas enteramente por perisporio del mismo modo que ocurre en el grupo morfológico crestado definido en esta tesis.

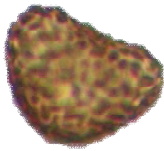
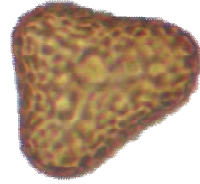
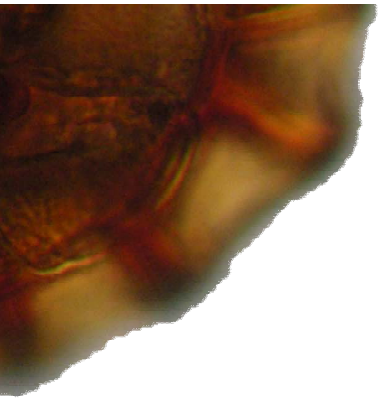
Los análisis realizados con MET de la estratificación y ultraestructura mostraron que el perisporio de *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* presenta tres capas: una interna de estructura homogénea y alta electrondensidad y una media de estructura alveolar y margen verrucoso, y una externa, discontinua, de baja electrondensidad y estructura homogénea. Si bien Giudice *et al.* (2006) identificaron dos capas en el perisporio de *Hypolepis repens*, la estructura de las mismas coincidió con las de las capas media y externa observadas en esta tesis. Tryon & Lugardon (1991) también estudiaron al MET la esporodermis de algunas especies de *Hypolepis* como *H. distans* y *H. crassa*, pero identificaron una única capa ornamentada u, ocasionalmente, una segunda capa interna, delgada, de la cual no detallaron su ultraestructura.

Adicionalmente, inmersos en el perisporio, se observaron cuerpos esferoidales constituídos por un núcleo central de material similar al exosporio, rodeado por una capa de estructura similar a la del perisporio. Lugardon (1974) y Tryon & Lugardon (1991) definieron esferoides similares a estos para diversas especies de helechos y los denominaron como “glóbulos”. Asimismo, estos autores también describieron “esférulas”, formadas únicamente por material del perisporio, que se asemejan a los cuerpos esferoidales que se observaron sobre la superficie, tanto al MEB como al MET.

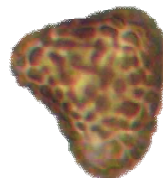
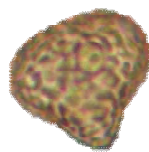
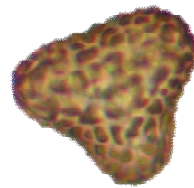
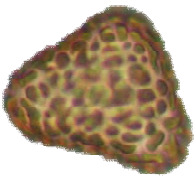
En relación al exosporio, los resultados obtenidos en esta tesis coinciden en líneas generales con lo descrito por Tryon & Lugardon (1991) y Giudice *et al.* (2006) para el género *Hypolepis*, quienes identificaron un exosporio de margen ornamentado compuesto por dos capas. Durante el análisis del exosporio de *H. rugosula* subsp. *pradoana* se pudo identificar una capa interna delgada, de estructura homogénea y una capa externa más gruesa, con dos estratos. El estrato interno posee cavidades y canales ramificados rellenos de material electron-denso y el estrato externo, de estructura homogénea, presenta un margen ornamentado por verrugas y báculos.

Las características ultraestructurales del exosporio se asemejan a las descritas por Lugardon (1971; 1974) para el exosporio tipo blechnoide presente en diversos grupos de

helechos. En este sentido, el “estrato fisurado” definido por este autor en la base del exosporio se corresponde con el estrato interno del exosporio externo que se distinguió en *H. rugosula* subsp. *pradoana*.



## 5. Discusión general



### 5.1. Clases de esporas y grupos morfológicos en la familia Dennstaedtiaceae

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que, desde el punto de vista palinológico, en la Provincia Fitogeográfica Paranaense la familia Dennstaedtiaceae se encuentra representada por dos grandes clases de esporas: triletes y monoletes.

Las especies de los géneros *Dennstaedtia*, *Microlepidium* y *Pteridium* presentan esporas triletes, de lados rectos a cóncavos y ángulos redondeados, triangulares en vista polar, excepto en *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum* donde los lados pueden ser convexos y las esporas subcirculares. En vista ecuatorial las esporas son convexo-hemisféricas en *Dennstaedtia cicutaria* y plano-hemisféricas en el resto de las especies. En todos los casos las lesuras son rectas.

El otro tipo de esporas se observó en las especies de *Blotiella*, *Histiopteris*, *Hypolepis* y *Paesia*. Estas son monoletes, bilaterales, elípticas a oblongas en vista polar. En vista ecuatorial son plano-convexas en *Blotiella lindeniana*, *Histiopteris incisa* y *Paesia glandulosa* y plano-hemisféricas en todas las especies de *Hypolepis*. Las lesuras en todos los casos son rectas, crasimarginadas en *Histiopteris incisa*.

Desde el punto de vista morfológico, se observaron esporas con una importante diversidad de esculturas y fue posible agrupar a las especies en grupos morfológicos según los elementos predominantes de la ornamentación. En este sentido, las especies de Dennstaedtiaceae de la Provincia Paranaense se encuentran representadas por 7 grupos morfológicos distintos:

- ▲ **Grupo morfológico verrucoso:** incluye a todas las especies de *Dennstaedtia* que tienen esporas tapizadas por verrugas de distintas dimensiones y formas, lisas u ornamentadas, distribuidas sobre toda la superficie, a veces fusionadas formando lomos o retículos. Asimismo, la forma, superficie, distribución y grado de fusión de las verrugas fueron útiles para diferenciar a las especies del género.
- ▲ **Grupo morfológico con cordones:** incluye a *Microlepidium speluncae* y *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*. Las esporas de estas especies se encuentran cubiertas por redes tridimensionales de cordones ramificados y fusionados entre sí, que se disponen tangenciales o perpendiculares a la superficie. Ambas especies

pueden diferenciarse, no obstante, por la morfología, subestructura y organización de los cordones de la red.

- ▲ Grupo morfológico baculado: incluye a *Blotiella lindeniana*, cuyas esporas están tapizadas por báculos dispersas uniformemente sobre la superficie; con frecuencia rodeadas en la base por engrosamientos de la pared que forman “mamelones”.
- ▲ Grupo morfológico rugulado: incluye a *Paesia glandulosa*. La ornamentación de las esporas en esta especie está formada por lomos angostos, sinuosos, que presentan un arreglo laberíntico y se fusionan ocasionalmente en areolas aisladas. Los lomos en cara proximal adquieren una disposición distinta de la que presentan en cara distal y se ordenan perpendiculares a la lesura.
- ▲ Grupo morfológico tuberculado: incluye a *Histiopteris incisa*. Las esporas están tapizadas por tubérculos, evidentes en la zona ecuatorial que, hacia los polos distal y proximal se fusionan entre sí para formar retículos con muros y areolas de grosor y tamaño variables.
- ▲ Grupo morfológico equinado: incluye a las especies de *Hypolepis* excepto *H. rugosula* subsp. *pradoana*. En todos los casos, las esporas están ornamentadas por espinas de lados paralelos y ápices confluentes, aplanadas en sección transversal, que se distribuyen en toda la superficie. Con frecuencia las espinas se fusionan lateralmente para formar crestas sinuosas y están tapizadas por cordones que las conectan lateralmente. En este grupo no se encontraron diferencias en la ornamentación que permitan diferenciar a las especies que lo integran.
- ▲ Grupo morfológico crestado: incluye a *H. rugosula* subsp. *pradoana*. Las esporas en esta especie están revestidas por crestas de margen irregular, ocasionalmente fenestradas en la base, paralelas entre sí, que cubren la mayor parte de la superficie distal y se distribuyen espaciadas en la cara proximal. Las crestas pueden fusionarse en areolas aisladas.

La diversidad de esculturas observadas en la pared de las esporas, es comparable con la diversidad hallada dentro de la familia respecto a otros caracteres morfológicos reproductivos (como la disposición y protección de los soros) y vegetativos (como el indumento, forma y grado de división de la lámina y venación). No obstante, en algunos



casos no se encontró una relación directa entre la morfología del esporofito y un grupo morfológico de esporas en particular. En este sentido, especies con esporofitos muy distintos como *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* y *Microlepidia speluncae* presentaron esporas tapizadas por redes de cordones similares. En contraposición, si bien en el género *Hypolepis* todas las especies presentan esporofitos de morfología similar, se hallaron dos grupos morfológicos muy distintos: equinado y crestado.

## 5.2. Análisis ultraestructural

En todas las especies estudiadas, excepto en *Histiopteris incisa*, los elementos que tapizan la superficie de las esporas y que permiten delimitar a los grupos morfológicos mencionados están constituidos por el perisporio. No obstante, la estratificación del mismo es variable, ya que presenta una capa en las especies de *Dennstaedtia* (excepto en *D. cicutaria* donde se observan dos), dos capas en *Paesia glandulosa*, *Histiopteris incisa* e *Hypolepis rugosula* subsp. *rugosula*, tres capas en *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* y *Microlepidia speluncae* y cuatro capas en las restantes especies de *Hypolepis*.

A pesar de las diferencias respecto al número de capas del perisporio, existen similitudes entre los grupos en relación a las características ultraestructurales de algunas de estas. En este sentido, excepto en el grupo morfológico verrucoso (*Dennstaedtia*) y baculado (*Blotiella*), la capa interna del perisporio del resto de los grupos podría ser homologada entre sí, ya que la misma se encuentra fuertemente adherida al exosporio, es de 20-100 nm, continua, homogénea y muy densa a los electrones.

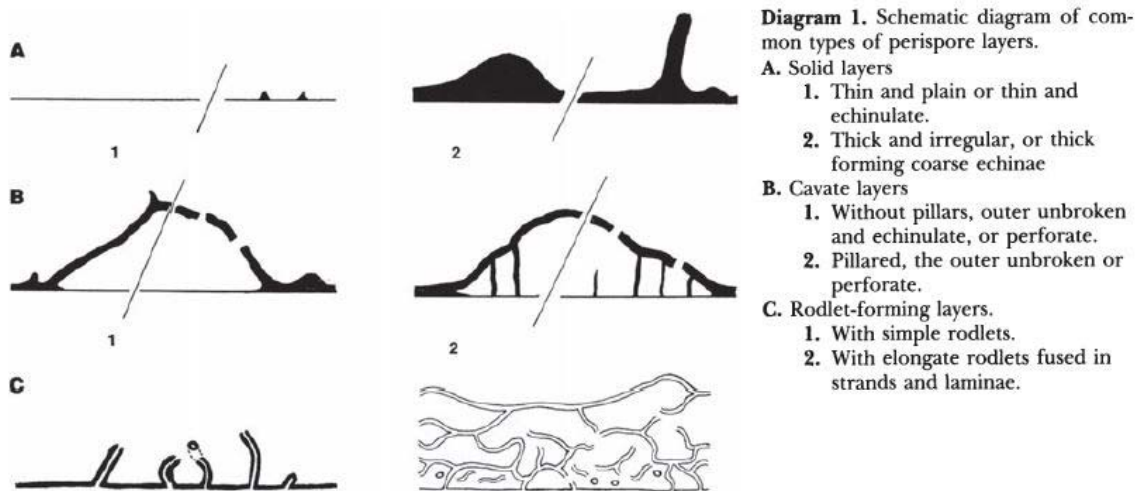
Otra semejanza ultraestructural se halló en relación a la naturaleza de los elementos de la ornamentación. Durante los análisis con MET pudo observarse que las verrugas de las especies de *Dennstaedtia*, lomos de *Paesia glandulosa*, báculas de *Blotiella lindeniana*, espinas de las especies de *Hypolepis* y crestas de *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* que se distinguen al MO y MEB, están formadas por una capa del perisporio de espesor muy variable, electrondensa, con alvéolos de distintas dimensiones, rellenos o no por un material oscuro. En contraposición, en *Microlepidia speluncae* y *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* la capa que constituye la ornamentación de las esporas está formada por

cordones. En el primer caso, los mismos presentan una diferenciación de electrón-densidad a nivel subestructural, con un margen y un núcleo más oscuro, mientras que en el segundo caso son homogéneos respecto a la densidad a los electrones. Finalmente, en *Histiopteris incisa* las dos capas del perisporio no están ornamentadas y acompañan la superficie irregular del exosporio que constituye los tubérculos de la ornamentación.

Al igual que sucede con la capa más interna del perisporio, también pudo identificarse una capa externa cuyas características ultraestructurales coinciden en todos los grupos morfológicos estudiados, excepto en el rugulado (*Paesia*), donde está ausente. Esta capa es discontinua, de 30-400 nm de grosor, baja electrondensidad y generalmente homogénea, excepto en *B. lindeniana* e *Histiopteris incisa* donde pueden observarse sutiles diferencias de densidad a los electrones. Adicionalmente, en estas últimas especies, la capa externa se observa parcialmente separada del resto de la pared.

Si bien las semejanzas estructurales mencionadas permiten generar hipótesis sobre una homología de las capas del perisporio de los géneros de Dennstaedtiaceae, son necesarios estudios de desarrollo de la esporodermis para confirmarlas.

Independientemente de su estratificación, Tryon & Lugardon (1991) elaboraron una clasificación que enumera distintos tipos de perisporio en relación al aspecto que tiene el mismo en sección y el modo en que conforma los elementos de la ornamentación (Fig. 19). Según esta clasificación, *Dennstaedia*, *Blotiella*, *Paesia*, *Histiopteris* e *Hypolepis* corresponderían al “tipo sólido”, en donde los elementos de la ornamentación están formados por la totalidad de la pared y donde la textura y el espesor son variables. En el caso de *Pteridium* y *Microlepia*, estos géneros coincidirían con el “tipo rodlet” donde el perisporio está representado por una capa en la cual se observan cordones cilíndricos.



**Figura 19.** Diagrama extraído de Tryon & Lugardon (1991) que muestra la clasificación elaborada por los autores de los distintos tipos de perisporio.

En relación al exosporio, todas las especies de Dennstaedtiaceae estudiadas en esta tesis presentaron la misma estratificación y ultraestructura, independientemente del grupo morfológico al cual pertenecen. El mismo se caracteriza por poseer dos capas: una interna (Ei) que se distingue fácilmente en la base de la lesura, de 20-300 nm, estructura homogénea y baja densidad a los electrones, y una externa, más electrodensa, de 0,1-4,5  $\mu\text{m}$ , formada por dos estratos. El estrato interno presenta fisuras, cavidades y canales ramificados que se observaron rellenos de un material denso a los electrones (Ee<sub>2</sub>). Estos canales presentaron, en el caso de las especies de *Dennstaedtia*, *Microlepis speluncae*, *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, *Paesia glandulosa*, *Histiopteris incisa* e *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana*, una continuidad con los canales del estrato externo, con los que se anastomosan y se conectan, a su vez, con los del perisporio. El estrato externo (Ee<sub>1</sub>) posee en todos los casos una estructura homogénea.

Un exosporio con estas características fue descrito por Lugardon (1971, 1974) para diversas especies de helechos como *Blechnum spicant*, *Pteridium aquilinum* o *Dennstaedtia bipinnata* en sus estudios sobre las Filicales isosporadas. El autor describió al exosporio interno como una “capa profunda relativamente fina, formada de una única lámina y no recubierta por láminas superficiales” y a su estructura como “perfectamente compacta”, coincidente con el Ei observado en esta tesis. Asimismo, inmediatamente por encima del

exosporio interno, el autor observó un estrato que se caracteriza por la presencia de “un número infinito de muy pequeñas fisuras y de finos canaliculos llenos de material fibrilo-granular” formando “una red tenue pero muy densa de cavidades pequeñas”. Este estrato, fue denominado por el autor como “estrato fisurado” y es semejante al Ee<sub>2</sub>. Del mismo modo, canales y grietas similares a los identificados por el autor en el estrato externo del exosporio externo, se hallaron formando parte del Ee<sub>1</sub>. Finalmente, el autor sugirió que la red de canales presentes en el exosporio podría participar en el intercambio entre el citoplasma celular y el lóculo del esporangio durante la maduración y la germinación de las esporas.

En relación a esta última observación, Pettit (1976) realizó estudios experimentales en esporas de *Lycopodium* y aportó evidencias del rol que tendrían los canales del exosporio en la transferencia de sustancias. Asimismo, Rowley & Flynn (1971) obtuvieron resultados similares en su estudio sobre los canales que atraviesan la exina de los granos de polen en *Epilobium* (Onagraceae) y, más tarde, Rowley (1995) sugirió que los canales presentes en la endexina de *Artemisia* así como aquellos que atraviesan el exosporio de *Lycopodium* son homólogos. Según Rowley et al. (2003), el transporte a través de la exina es comparable con el transporte entre las células de las plantas a través de plasmodesmos debido a que las unidades presentes en la exina podrían interpretarse como estructuralmente equivalentes a estos (Rowley & Claugher, 1996; El-Ghazaly & Rowley, 1998).

A nivel del exosporio, la única diferencia hallada entre las especies estudiadas está en relación a la superficie del mismo. Mientras que en los grupos con esporas triletes (*Dennstaedtia*, *Microlepia* y *Pteridium*) el exosporio es psilado o levemente irregular, en los grupos que presentaron esporas monoletes el mismo siempre está ornamentado. En este sentido, las variaciones en el espesor del exosporio definen pilas en *Blotiella lindeniana*, verrugas y espínulas en las especies de *Hypolepis* del grupo morfológico equinado, verrugas y báculas en *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* y tubérculos en *Paesia glandulosa* e *Histiopteris incisa*. Asimismo, en esta última especie el exosporio presenta el mayor nivel de complejidad debido a que la superficie de los tubérculos está tapizada por báculas, espinas y verrugas.

En relación al análisis de la estratificación de la esporodermis a través de fracturas de las esporas observadas con MEB, es interesante destacar que, a pesar de haber sometido a

ultrasonido muestras de todos los grupos y durante distintos periodos de tiempo, únicamente se logró un desprendimiento total del perisporio en *Paesia glandulosa*. Esto constituiría una evidencia de la alta adherencia entre el perisporio y el exosporio, existente en las especies estudiadas.

#### 5.2.1. Presencia de cordones en el perisporio

Si bien la presencia de cordones de 100-300 nm de diámetro como elementos constitutivos del perisporio caracterizó al grupo morfológico integrado por *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* y *Microlepidia speluncae*, los mismos no fueron exclusivos de dichas especies y se hallaron en otros grupos de Dennstaedtiaceae. En este sentido, cordones semejantes se observaron sobre la superficie o conectando las verrugas en *Dennstaedtia cicutaria*, las báculas en *Blotiella lindeniana* o las espinas en las especies equinadas de *Hypolepis*.

En las observaciones con MET, tanto los cordones que conforman las redes tridimensionales en *Microlepidia speluncae* como los que conectan las espinas del perisporio en *Hypolepis*, presentaron diferencias internas respecto a la densidad de electrones. Estos cordones poseen una zona periférica y una central más oscura, siendo esta última de 40-60 nm de diámetro en ambos casos. En contraposición, los cordones de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, *Dennstaedtia cicutaria* y *Blotiella lindeniana* no presentaron una diferenciación de electrondensidad a nivel subestructural. No obstante, como se mencionó anteriormente en la discusión del capítulo correspondiente al grupo morfológico con cordones, la presencia o ausencia de diferencias de electrondensidad podría deberse a causas metodológicas asociadas a la tinción de las muestras o estar relacionadas con el grado de desarrollo de la esporodermis (Rowley, 1986, 1987) por lo que son necesarios nuevos estudios comparativos para dilucidar detalladamente las similitudes entre los cordones de las especies mencionadas y evaluar una posible homología.

Además de las Dennstaedtiaceae, son diversos los grupos de plantas en los cuales se han registrado cordones de apariencia y dimensiones similares, los cuales forman parte de la pared de las esporas. Familias de Licofitas como Lycopodiaceae (Rowley 1995; Wittborn *et al.* 1996; 1998) y Sellaginellaceae (Morbelli 1995, *et al.* 2001) y de helechos como Dicksoniaceae, Matoniaceae, Vittariaceae, Lindsaeaceae, Pteridaceae (Tryon & Lugardon,

1991) y Cyatheaceae (Marquez *et al.* 2009, 2010a, 2010b, 2014) tienen representantes en donde la esporodermis está constituida por estos elementos. En el caso particular de *Lycopodium* (Rowley 1995), *Selaginella* (Morbelli 1995), *Cyathea*, *Alsophila* y *Spaeropteris* (Marquez *et al.* 2014), los autores acordaron en que los cordones estarían conformados por varias subunidades helicoidalmente dispuestas alrededor de un eje o canal central que coincidiría con el modelo de “tuft” propuesto por Rowley (1981, 1988, 1990, & Dahl 1982). Si bien en las especies de Dennstaedtiaceae estudiadas no se distinguen subunidades en el interior de los cordones, el diámetro de los mismos y las características del núcleo central, electrón-denso, en el caso de *Microlepia speluncae* e *Hypolepis*, se asemejan a lo descrito en el modelo mencionado y contradicen los resultados obtenidos por Lugardon (1971, 1974), Van Campo & Lugardon (1973), Southworth (1986) y Tryon & Lugardon (1991) quienes sugirieron que las unidades básicas de la esporodermis son gránulos.

El modelo de los cordones helicoidales también fue utilizado para explicar la estructura de la exina de granos de polen en diversos grupos de angiospermas (ej. *Poa*, *Alnus*, *Betula*, *Fagus*, *Rhododendron*-Claugher & Rowley 1987, Rowley 1995; Wittborn *et al.* 1996, 1998, *Artemisia*-Rowley *et al.* 1980, 1981, Rowley *et al.* 1999; *Echinodorus*-El-Ghazaly & Rowley, 1999; *Epilobium*-Rowley & Skvarla 2006; *Rhoiptelea*-Skarby *et al.* 2009), lo que permite sugerir que son elementos que con frecuencia constituyen las subunidades básicas de la esporodermis, independientemente del parentesco filogenético.

Finalmente, en los cortes analizados con MET de *Pteridium arachnoideum* se observó que, en algunos casos, los canales presentes en el exosporio se conectan con la base del perisporio. Como se mencionó en el apartado anterior, hay evidencias de que en *Lycopodium* los mismos intervendrían en la comunicación entre el citoplasma celular y el medio exterior (Pettit, 1976). En este sentido, la presencia de canales en el interior de los cordones del perisporio de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum* y su posible conexión con los canales del exosporio, permitiría inferir que este mismo sistema de comunicación podría ocurrir en la especie. La continuidad entre el sistema de canales del exosporio y del perisporio fue recientemente documentada para *Cyathea* por Marquez *et al.* (2014) y para *Cheilanthes squamosa* por Morbelli & Ponce (2015).

### 5.2.2 Presencia de cuerpos esferoidales

En la mayoría de las especies estudiadas se observaron cuerpos esferoidales distinguibles al MEB, dispersos sobre la superficie de las esporas. En relación a la ultraestructura al MET, los mismos resultaron ser de dos tipos: en algunos casos están constituidos enteramente por material similar al del perisporio mientras que en otros se componen de un núcleo central de material similar al del exosporio rodeado de material perispórico. Como se mencionó en la discusión correspondiente a cada tipo morfológico, cuerpos esferoidales semejantes fueron descritos por Lugardon (1974) y Tryon and Lugardon (1991) quienes definieron al primer tipo como esférulas y al segundo como glóbulos. La presencia de este tipo de estructuras es observada con frecuencia sobre la superficie de diversos grupos de helechos (Ramos Giacosa *et al.*, 2004; Piñeiro *et al.*, 2006; Ramos Giacosa *et al.*, 2007; Marquez *et al.*, 2009; Ramos Giacosa *et al.*, 2009; Marquez *et al.*, 2010a; 2010b; Morbelli & Giudice, 2010; Ramos Giacosa *et al.*, 2013).

En relación a los glóbulos, Morbelli (1977) y Lugardon (1981) homologaron a los mismos con las orbículas o corpúsculos de Ubisch producidas por el tapete secretor de algunas espermatofitas a partir de su morfología, ultraestructura y resistencia a la acetólisis. En este sentido los corpúsculos de Ubisch podrían estar asociados con la deposición de la esporopolenina, la dispersión del polen, la degradación de las células tapetales o podrían ser un subproducto del metabolismo celular tapetal (Huysmans *et al.*, 1998). También se observó que podrían tener proteínas estructurales esenciales para el desarrollo del polen (Wang *et al.* 2003).

### **5.3. Utilidad de los caracteres palinológicos en la identificación de géneros o grupos sub-genéricos**

Como se mencionó anteriormente, la escultura de las esporas permitió caracterizar distintos grupos morfológicos dentro de la familia. Asimismo, si se analizan los taxones que están incluidos dentro de cada grupo se puede concluir que, en la mayoría de los casos, los grupos morfológicos coinciden con los géneros de Dennstaedtiaceae. En este sentido, el género *Dennstaedtia* pertenece al grupo verrucoso, *Blotiella* al grupo baculado, *Paesia* al

grupo regulado e *Histiopteris* al grupo tuberculado. En el caso de *Hypolepis*, puede distinguirse una división sub-genérica en relación a la escultura de las esporas: *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* por un lado, que integra al grupo morfológico crestado y el resto de las especies de *Hypolepis* estudiadas (*H. mitis*, *H. stolonifera*, *H. x paulistana* y *H. repens*) que integran el grupo morfológico equinado. Finalmente, únicamente los géneros *Pteridium* y *Microlepia* comparten el mismo grupo morfológico con cordones. No obstante, la forma de los cordones y la disposición de los mismos en las redes distinguen a cada taxón.

A partir de lo expuesto se puede concluir que las características de la esporodermis son útiles para identificar géneros o grupos sub-genéricos dentro de la familia. A esta conclusión también arribó Mickel (1973) y coincidieron Tryon (1986), refiriéndose a los helechos en general, y Triana-Moreno (2012) en la familia Polypodiaceae.

En relación a los géneros en los que se estudió más de una especie, la utilidad de los caracteres palinológicos para distinguir a las mismas resultó variable. En el caso de *Hypolepis* la única especie que puede diferenciarse de las restantes es *H. rugosula* subsp. *pradoana* debido a que, como se dijo, es la única especie del género incluida en el grupo morfológico crestado. El resto de las especies de *Hypolepis*, incluidas en el grupo morfológico equinado, no presentaron diferencias notorias en cuanto a las características de las espinas y el patrón de distribución y fusión de las mismas, por lo que resulta imposible distinguirlas a través de sus esporas.

En contraposición, como se discutió en el capítulo del grupo morfológico verrucoso, la superficie, grado de fusión y distribución de las verrugas sobre las esporas permiten identificar a las diferentes especies de *Dennstaedtia* de la Provincia Paranaense. Asimismo, debido a que la ornamentación en este grupo es fácilmente distinguible al MO, ésta representa una herramienta útil para la determinación de aquellos materiales de herbario donde otros caracteres diagnósticos están ausentes.

Contrariamente a lo que ocurre con las especies de *Dennstaedtia*, en algunos géneros estudiados como *Microlepia* y *Pteridium* la utilización de microscopía electrónica es necesaria para lograr una interpretación correcta de la ornamentación de las esporas debido a que los elementos que la conforman, en este caso los cordones, no se distinguen con facilidad a bajas magnitudes de observación.

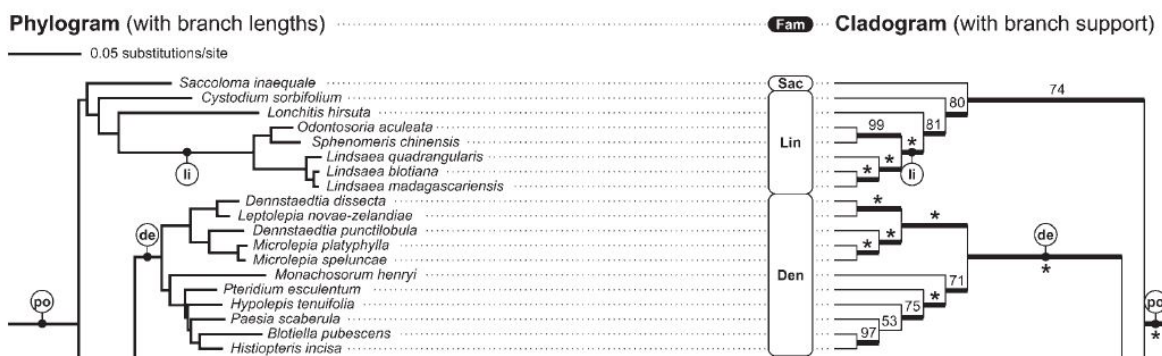


#### 5.4. Aporte de los caracteres palinológicos a las filogenias existentes

Las características morfológicas de las esporas han demostrado ser útiles para evaluar la relación entre géneros de helechos emparentados como *Bromeria*, *Anogramma*, *Coniogramme*, *Gymnopteris*, *Hemionitis*, *Pityrogramma*, *Trachypteris*, *Doryopteris* y *Saffordia* (Haufler & Gastony, 1978) y para aportar evidencias que sustenten los agrupamientos dados por análisis filogenéticos moleculares en la familia Selaginellaceae (Korall & Taylor, 2006), en el género *Elaphoglossum* (Moran *et al.*, 2007) y en los helechos “bolbitoides” (Moran *et al.*, 2010). Del mismo modo, algunos de los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con las observaciones realizadas por otros autores sobre la afinidad de los grupos dentro de las Dennstaedtiaceae.

Si bien existen numerosos estudios recientes que, a partir de un consenso de caracteres moleculares y morfológicos (Pryer *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2006) o únicamente moleculares (Wolf, 1994, 1995; Hasebe *et al.*, 1994, 1995; Pryer *et al.*, 1995, 2004) plantean hipótesis sobre las relaciones entre los géneros de la familia, la filogenia propuesta por Schuettpelz & Pryer (2007, 2008) resume los resultados de dichos trabajos y expone los principales clados que, hasta el momento, se reconocen dentro del grupo (Fig. 5).

#### Polypods



**Figura 20.** Recorte de la filogenia de los helechos Leptosporangiados resultante de un análisis de máxima verosimilitud utilizando datos de ADN del cloroplasto (rbcL, atpB, atpA). Los clados indicados con \* en el árbol de la derecha representan un 100% de porcentaje de bootstrap). Propuesta por Schuettpelz & Pryer (2007, 2008).

En este esquema pueden observarse dentro de las Dennstaedtiaceae, consideradas como un grupo monofilético, dos clados principales: uno constituido por *Dennstaedtia-Microlepidia-Leptolepia* (clado “dennstaedtioides”) y otro que incluye a *Monachosorum-Pteridium-Hypolepis-Paesia-Blotiella-Histiopteris* (clado “hypolepidoide”). Estos clados coinciden, a su vez, con líneas evolutivas planteadas en trabajos previos a partir de caracteres morfológicos principalmente reproductivos, como la posición de los soros y la morfología de los indusios (Bower, 1923, 1926, 1928; Christensen, 1938; Copeland, 1947; Mickel, 1973, 1974). En este sentido mientras que en *Dennstaedtia* y *Microlepidia* los soros son marginales y están protegidos por indusios dobles, en *Pteridium*, *Hypolepis*, *Paesia* y *Blotiella* existe una tendencia al desplazamiento de los esporangios hacia la cara abaxial de la lámina, una reducción y posterior aborto del indusio abaxial y un aplanamiento y fusión del indusio adaxial con el margen de la lámina. Asimismo, estudios citológicos aportaron evidencias que sustentan las relaciones mencionadas entre los géneros a partir de la evolución del número cromosómico (Brownlie, 1957; Mehra, 1961; Walker, 1973; Page, 1976; Brownsey, 1983).

Desde el punto de vista palinológico, las relaciones entre los géneros propuestas en la filogenia de la fig. 20 pueden analizarse desde tres atributos principales de las esporas: la clase de esporas, la superficie del exosporio y la ornamentación del perisporio.

En relación a la clase de esporas, se observa que aquellas especies que presentaron esporas trilete se ubican en los géneros del clado “dennstaedtioides”: *Dennstaedtia*, *Microlepidia* y *Leptolepia* (Tryon & Lugardon, 1991 p. 275) y en los géneros basales del clado “hypolepidoide”: *Pteridium* y *Monachosorum* (Tryon & Lugardon, 1991 p. 277).

Asimismo, las especies estudiadas que presentaron esporas monoletas se encuentran en una posición derivada del clado “hypolepidoide” conformando un grupo monofilético: *Hypolepis*, *Paesia*, *Blotiella* e *Histiopteris*.

En relación a estas últimas observaciones, Wolf *et al.* (1994) y Wolf (1995) superpusieron la clase de esporas con la filogenia elaborada en sus estudios sobre las Dennstaedtiaceae y los grupos más emparentados y concluyeron que el estado más primitivo es el tetraédrico globoso, presente en géneros como *Dennstaedtia*, *Microlepidia*, *Monachosorum* y *Pteridium*, mientras que el estado monoleta evolucionó independientemente en los helechos dryopteridoides (ej. *Tapeinidium*) y en el subclado formado por *Hypolepis*, *Paesia*,

*Blotiella* e *Histiopteris*. La condición primitiva de las esporas trilete fue también señalada por Tryon (1990) y Tryon & Lugardon (1991) quienes advirtieron que este tipo de esporas aparecen primero en el registro fósil. El carácter derivado de las esporas monoletes fue también señalado por Holttum (1973). Si bien posteriormente Tryon (1986) señaló que el origen de las esporas monolete en los helechos es polifilético, este carácter es útil para analizar las relaciones hacia el interior de la familia.

En relación a la superficie del exosporio, también se observan diferencias dentro de la familia entre los dos subclados mencionados: mientras que las especies estudiadas de *Dennstaedtia* y *Microlepia* (clado “dennstaedtioide”) comparten la presencia de un exosporio de margen psilado o irregular, los géneros derivados del clado “hypolepidoide” (*Hypolepis*, *Paesia*, *Blotiella* e *Histiopteris*) tienen un exosporio siempre ornamentado por verrugas, tubérculos, clavos, báculas y/o espinas. Asimismo, dentro de este último clado, *Pteridium* presenta un exosporio semejante al observado para el clado “dennstaedtioide”. En relación a esta característica, Wagner (1974) sugirió que lo más habitual entre los helechos es la presencia de un exosporio psilado o finamente ornamentado, similar al que se describió para las especies con esporas triletes. Asimismo, un exosporio más grueso y marcadamente ornamentado, como el observado en las especies con esporas monoletes, representarían un carácter derivado. Adicionalmente, el autor identificó como la condición más especializada la presencia de un exosporio biesculturado (con dos patrones de escultura superpuestos) similar al que tiene *Histiopteris incisa* cuyo género, junto con *Blotiella*, forman el clado más derivado de las Dennstaedtiaceae.

En relación a la cercanía de los géneros con esporas monoletes, Nayar & Devi (1968b) señaló que la morfología de las esporas tiende a soportar su agrupamiento.

Es interesante destacar que, a pesar de que todas las filogenias existentes para la familia ubican a *Monachosorum* como grupo hermano del clado que agrupa a *Pteridium* y las especies monoletes, este género también presenta un exosporio marcadamente ornamentado por verrugas similar al que se observa en los géneros más derivados del clado “hypolepidoide” (Tryon & Lugardon, 1991 p. 276-277). En este sentido, de comprobarse que todas las especies de *Pteridium* presentan el mismo exosporio observado en esta tesis para *P. arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, la aparición de este carácter en el género

podría explicarse como un paralelismo respecto al exosporio presente en el clado “dennstaedtioides”.

Asimismo, hasta el momento no se han realizado estudios ultraestructurales en el género monotípico *Leptolepia* que permitan corroborar la monofilia del clado “dennstaedtioides” respecto a la presencia de exosporio psilado.

Finalmente, como se mencionó anteriormente en relación con la ornamentación del perisporio, la familia Dennstaedtiaceae presenta una gran diversidad de patrones esculturales que resultaron útiles para caracterizar a los géneros de Dennstaedtiaceae. Es debido a esta diversidad que no pudieron establecerse tendencias evolutivas claras dentro de la filogenia. No obstante, existen aspectos llamativos para destacar.

Dentro del grupo “dennstaedtioides”, *Dennstaedtia* es un género parafilético, con *Microlepia* y *Leptolepia* dentro del mismo clado. Si bien es necesario considerar un mayor número de especies para resolver estas relaciones, la morfología de las esporas podría aportar información en ese sentido.

Las especies de *Dennstaedtia* y *Microlepia* estudiadas comparten únicamente la presencia de esporas triletas, triangulares en vista polar y de ángulos redondeados y difieren tanto en la ornamentación como en la ultraestructura de la pared: mientras que las especies de *Dennstaedtia* poseen esporas verrucosas, con verrugas constituidas a partir de un perisporio con 1 o 2 capas, las esporas de *Microlepia speluncae* están tapizadas por redes tridimensionales de cordones que se originan a partir de un perisporio de 3 capas. Muchos autores han destacado la gran similitud morfológica entre algunos representantes de *Dennstaedtia* y *Microlepia* (Copeland, 1947; Tryon, 1960; Holtum & Sen, 1961; Nayar & Devi, 1968; Lovis, 1977; Tryon & Tryon, 1982), y señalaron que únicamente se distinguen por la posición de los soros (marginal en *Dennstaedtia*, submarginal en *Microlepia*), y la morfología de las esporas. Asimismo, Mickel (1974) destacó la importancia de realizar nuevos estudios para definir claramente los límites genéricos entre ambos taxones. En este sentido, los resultados de este trabajo aportan nueva información que permite distinguirlos. En contraposición, si bien son escasos los estudios dedicados a describir la palinología de *Leptolepia*, este género monotípico representado por *L. novae-zelandiae* tiene esporas verrucosas muy similares a las observadas para las especies de *Dennstaedtia* (Tryon & Lugardon, 1991 p. 275), lo que aportaría evidencia para sustentar su cercanía en la

filogenia. Estos resultados concuerdan con las conclusiones de Nayar *et al.* (1968b) quienes también sugirieron una cercana relación evolutiva entre estos dos géneros a partir de sus similitudes palinológicas.

Finalmente, como se mencionó anteriormente, el tipo morfológico con cordones descrito para *Microlepia speluncae* y *Pteridium arachnoideum* subsp *arachnoideum* es el único que aparece en dos géneros distintos. Debido a la posición distante que *Microlepia* y *Pteridium* tienen en el árbol filogenético, la presencia de redes tridimensionales de cordones que tapizan a las esporas parecería haber surgido dos veces de manera independiente dentro de la familia.

#### 5.4.1 Caracteres palinológicos coincidentes con otras familias filogenéticamente no emparentadas

Como se mencionó en la discusión correspondiente a cada grupo morfológico, durante el análisis de las distintas especies de Dennstaedtiaceae se hallaron similitudes a nivel de la ornamentación con las de otras familias de helechos. No obstante, al comparar la ultraestructura se observaron diferencias respecto al origen de los elementos de la ornamentación. En la siguiente tabla se resumen estas características:

**Tabla 3. Origen de los elementos de la ornamentación en Dennstaedtiaceae y grupos con esporas de escultura similar.**

Escultura	Taxones	Constitución de la ornamentación
<b>Verrugas o tubérculos ornamentados por cordones (Lámina 28, Fig. A-D)</b>	<i>D. cicutaria</i> (Dennstaedtiaceae)	Verrugas + cordones = Perisporio
	<i>Taenitis hookeri</i> y <i>T. requiniana</i> (Pteridaceae), <i>Cyathea caracasana</i> , <i>C. divergens</i> y <i>C. delgadii</i> (Cyatheaceae)	Verrugas o tubérculos = Exosporio
		Cordones = Perisporio

<b>Verrugas o lomos formando patrón rugulado</b>	<i>D. dissecta</i> , <i>D. cornuta</i> , <i>D. obtusifolia</i> , <i>D. globulifera</i> (Dennstaedtiaceae)	Verrugas-lomos = Perisporio
	<i>Anogramma lorentzii</i> , <i>Pitrogramma tartarea</i> , <i>Cheilantes vellea</i> y <i>Cryptogramma crispera</i> (Pteridaceae)	Verrugas-lomos = Exoporio
<b>Crestas (Lámina 28, Fig. E-H)</b>	<i>Hypolepis rugosula</i> subsp. <i>pradoana</i> (Dennstaedtiaceae)	Crestas formadas por variación en el espesor del perisporio
	<i>Gymnopteris</i> , <i>Cheilanthes</i> , <i>Pellaea</i> , <i>Bommeria</i> y <i>Trachypteris</i> (Pteridaceae), <i>Asplenium</i> (Aspleniaceae) y <i>Elaphoglossum</i> (Lomariopsidaceae)	Crestas formadas por pliegues en el perisporio (crestas con cavidades)

A partir de estas diferencias en la constitución de la escultura a nivel estructural se puede concluir que, para realizar comparaciones válidas y evaluar un potencial alcance sistemático y filogenético de la ornamentación de las esporas, debe realizarse necesariamente el estudio de la estratificación y ultraestructura de la esporodermis con microscopía electrónica de transmisión.

Asimismo, pudieron identificarse otros casos en donde tanto la escultura como la ultraestructura de la esporodermis de algunas especies de Dennstaedtiaceae resultaron coincidentes con taxones de otras familias. En este sentido, se hallaron báculas formadas por el perisporio en *Drynaria rigidula* y *D. quercifolia* (Polypodiaceae) similares a las observadas para *Blotiella lindeniana*; tubérculos fusionados constituidos por exosporio en *Pteridoblechnum neglectum* (Blechnaceae) semejantes a los descritos para *Histiopteris incisa* (Lámina 29, Fig. A-D) y redes de cordones tridimensionales de perisporio en *Cheilanthes brandegei* (Pteridaceae) y *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae) afines a los elementos que tapizan las esporas de *Microlepia speluncae* (Lámina 29, Fig. E-H).

El hallazgo de esporas con características semejantes en familias filogenéticamente no emparentadas permite sugerir que los caracteres palinológicos no poseen un valor evolutivo que permita establecer relaciones entre grupos por encima del nivel de género. En este mismo sentido, una familia tradicionalmente emparentada con Dennstaedtiaceae como es Lindsaeceae (Ching, 1940; Nayar, 1970; Pichi Sermolli, 1977) presenta esporas muy distintas, provistas generalmente de perisporio granulado, papilado o psilado.

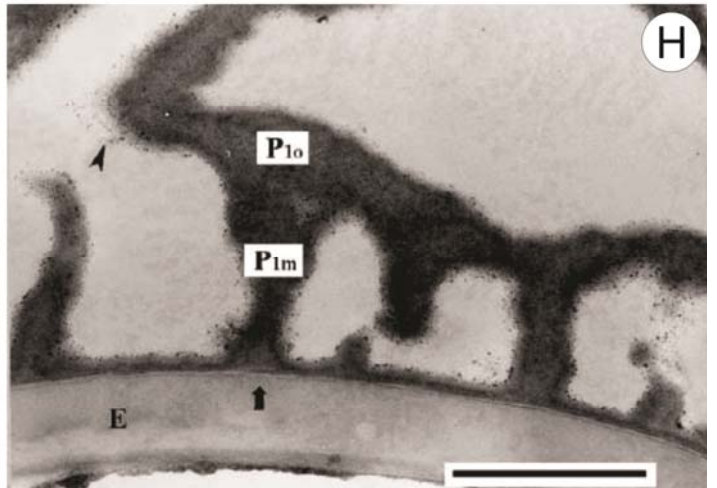
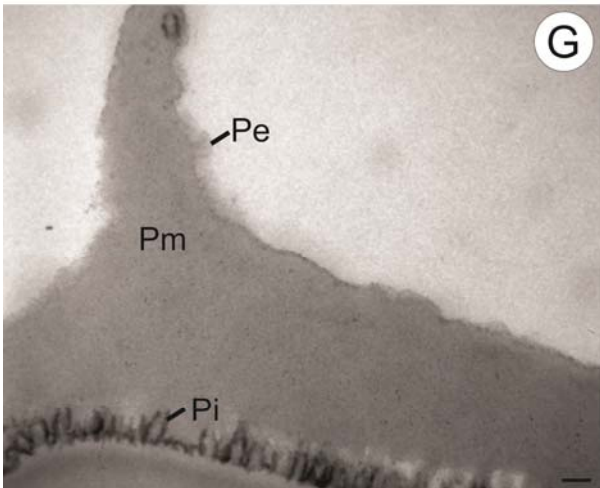
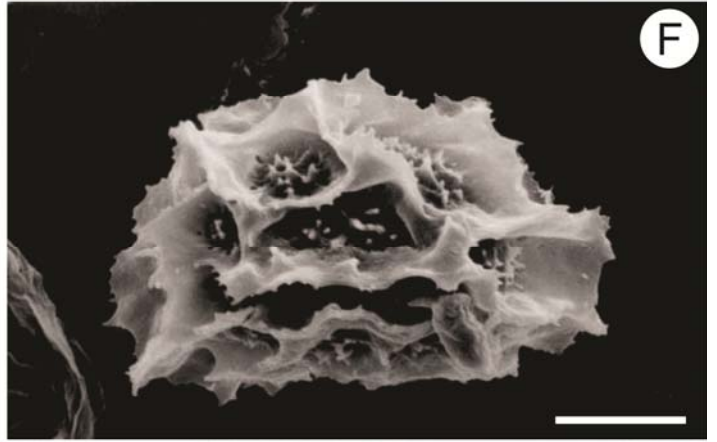
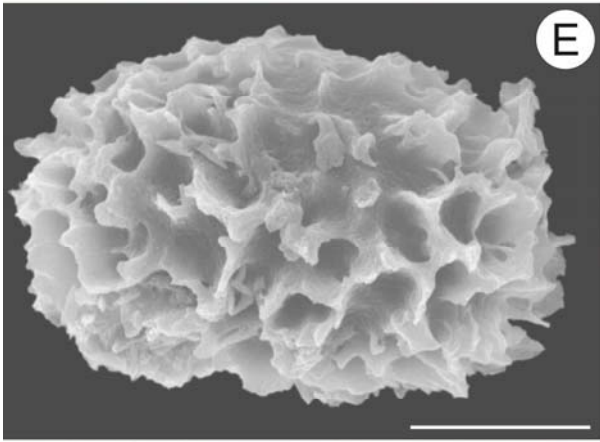
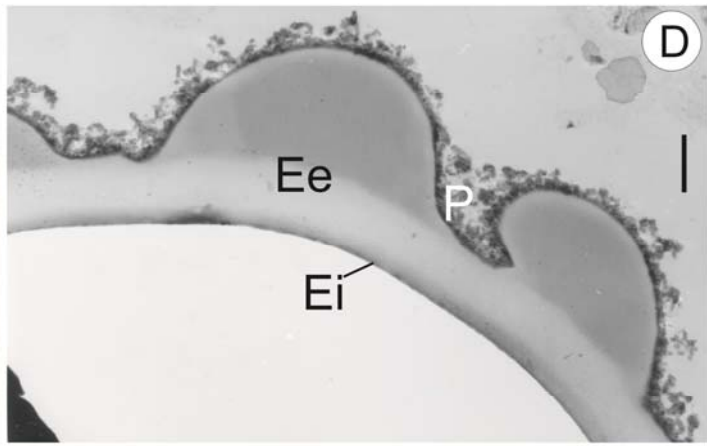
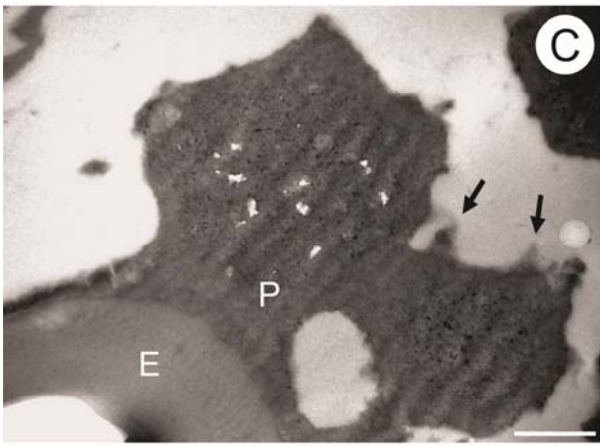
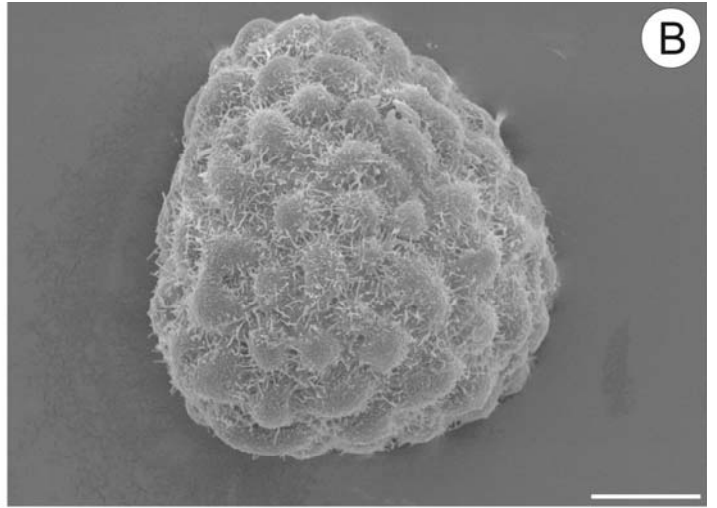
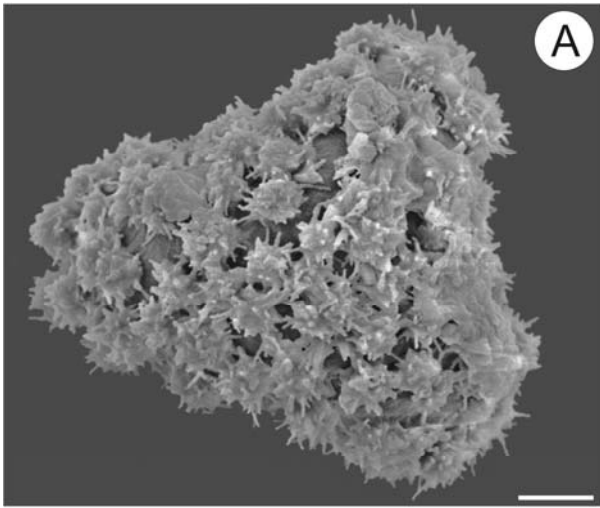
En coincidencia con las conclusiones expuestas, Soepadmo & Khoo (1977) señalaron que las características de las esporas deben ser consideradas como un atributo más, en conjunto con otros, en la construcción de un sistema de clasificación más natural.

**Lámina 28. Caracteres palinológicos coincidentes con otras familias filogenéticamente no emparentadas.**

**Figuras A-B.** Esporas de *Dennstaedtia cicutaria* (A) y *Cyathea delgadii* (B) en vista distal al MEB. En ambos casos se observan verrugas tapizadas por cordones. **C.** *Dennstaedtia cicutaria*, sección de la pared al MET. Tanto las verrugas como los cordones que tapizan las mismas (flechas) están formados por el perisporio (P). Exosporio = E. **D.** *Cyathea delgadii*, sección de la pared al MET. El exosporio externo (Ee) constituye las verrugas de la ornamentación mientras que los cordones están formados por el perisporio (P). **Figuras E-F.** Esporas de *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana* (E) y *Asplenium pumilum* (F). La ornamentación de las esporas en ambas especies es crestada. **G.** *Hypolepis rugosula* subsp. *pradoana*, sección de la pared al MET. Las crestas de la ornamentación están formadas por variaciones en el espesor del perisporio. Pi = Perisporio interno. Pm = Perisporio medio. Pe = Perisporio externo. **H.** *Asplenium pumilum*, sección de la pared al MET. Las crestas de la ornamentación están formadas por pliegues del perisporio. P1o = Perisporio 1 externo. P1m = Perisporio 1 medio. E = Exosporio. Barras: **B, E-F** = 10  $\mu\text{m}$ ; **A** = 5  $\mu\text{m}$ ; **C, H** = 1  $\mu\text{m}$ ; **D** = 0,5  $\mu\text{m}$ ; **G** = 0,2  $\mu\text{m}$ .

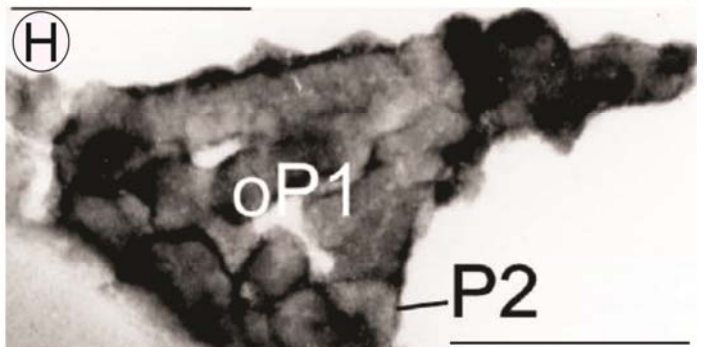
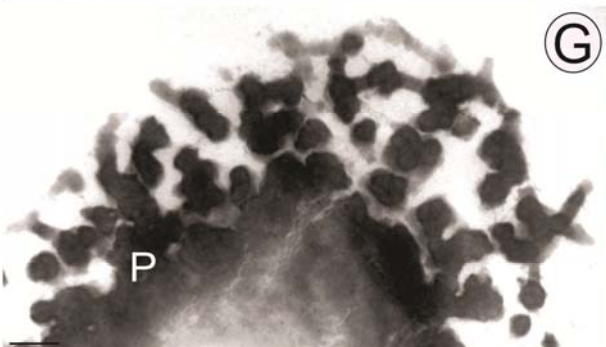
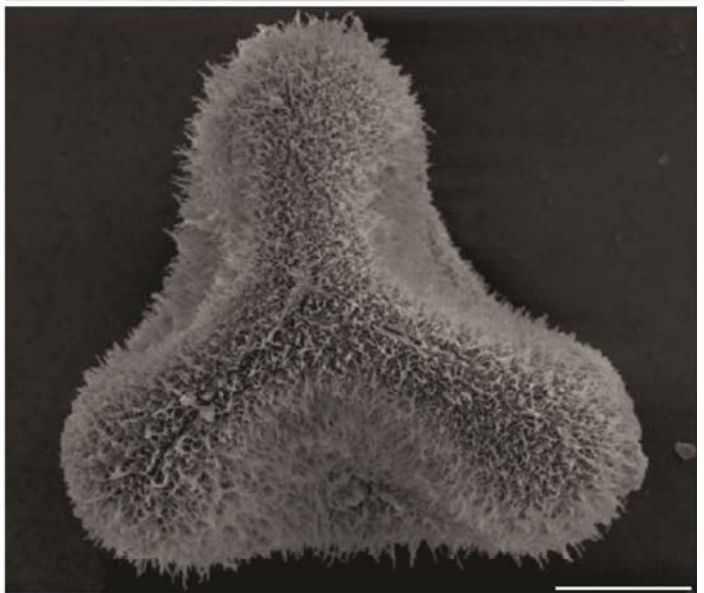
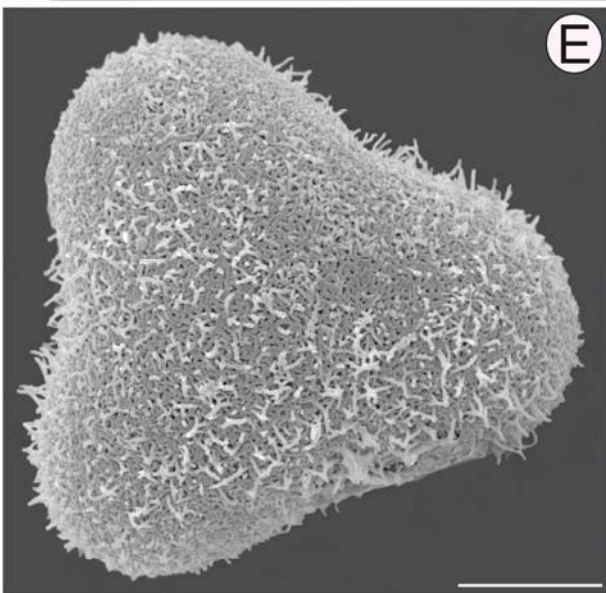
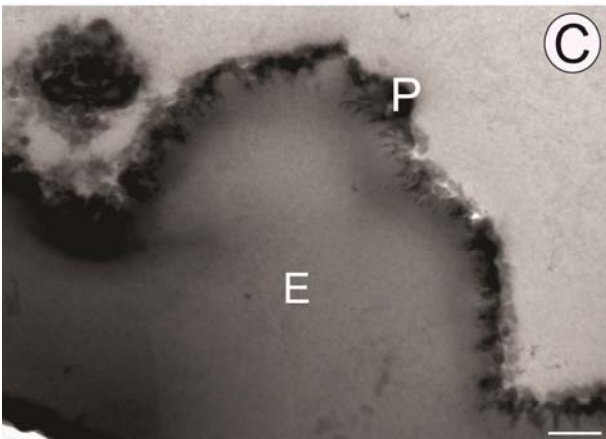
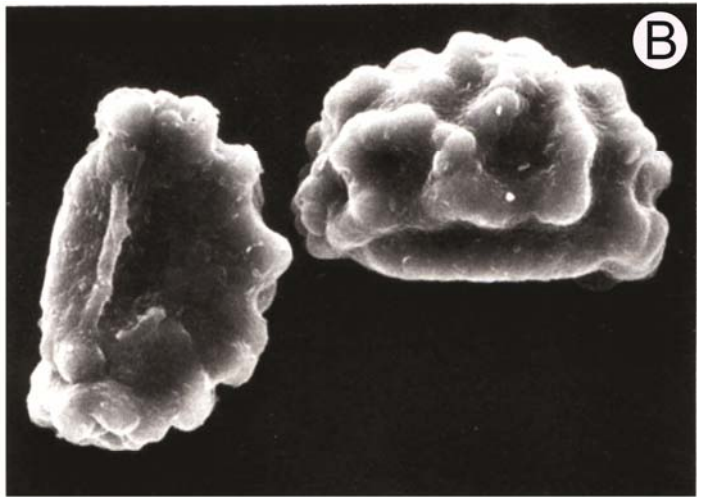
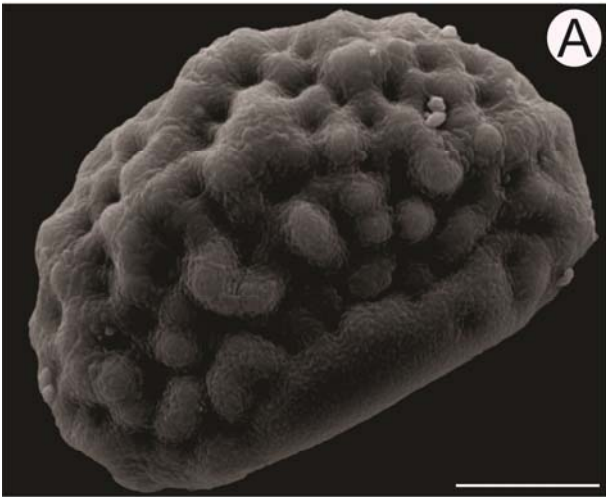
**B** = Gentileza del Dr. Gonzalo J. Marquez. **D** = Extraído de Marquez *et al.* (2010b) (Figura 4, E). **F, H** = Extraído de Morbelli & Giudice (2005) (Lámina IV, 23 y 25 respectivamente).





**Lámina 29. Caracteres palinológicos coincidentes con otras familias filogenéticamente no emparentadas.**

**Figuras A-B.** Esporas de *Histiopteris incisa* (A) y *Pteridoblechnum neglectum* (B) en vista ecuatorial al MEB. En ambos casos las esporas presentan tubérculos que se fusionan entre sí para formar retículos. **Figuras C-D.** Sección de la pared al MET de *Histiopteris incisa* (C) *Pteridoblechnum neglectum* (D). En ambas especies los tubérculos de la ornamentación están constituidos por el exosporio (E). P = Perisporio. **Figuras E-F.** Esporas de *Microlepia speluncae* (E) y *Cyathea atrovirens* (F). Las esporas de ambas especies están tapizadas por redes de cordones tridimensionales. **Figuras G-H.** Sección de la pared al MET de *Microlepia speluncae* (G) y *Cyathea atrovirens* (H). Los cordones son originados por el perisporio (P). En ambas especies se observan diferencias de electrondensidad hacia el interior de los mismos. oP1 = Estrato externo del perisporio interno. P2 = Perisporio externo. Barras: **A, E-F** = 10  $\mu\text{m}$ ; **C, H** = 0,5  $\mu\text{m}$ ; **G** = 0,4  $\mu\text{m}$   
**B, D** = Extraído de Tryon & Lugardon (1991) (Pag. 527, Fig. 204.1, x1000 y 204.4, x9000). **F, H** = Extraído de Marquez *et al.* (2010b) (Figura 1, A y Figura 5, C).



### **5.5. Caracteres palinológicos y rangos de distribución geográfica. Perspectivas.**

Con el fin de enriquecer el análisis palinológico de los grupos estudiados, se realizó una evaluación preliminar sobre la posible relación entre la distribución geográfica de las especies y géneros y algunos caracteres palinológicos, como el tamaño y la ornamentación de las esporas. Como resultado, en ninguno de los grupos morfológicos definidos se observaron patrones evidentes que señalen una variabilidad en los caracteres mencionados que pueda relacionarse con la distribución de las especies.

En relación al tamaño de las esporas, y debido al bajo número de ejemplares de herbario disponibles, sólo se pudo realizar un estudio parcial y cualitativo de este carácter. No obstante, sería interesante llevar a cabo nuevos estudios cuantitativos mediante métodos estadísticos con un mayor número de ejemplares y donde se tengan en cuenta variables ambientales. Un estudio de estas características fue llevado a cabo por Esteves & Coelho (2011) en el género *Serpocaulon* donde la autora analizó la posible influencia de las características fitofisionómicas del ambiente sobre el tamaño de las esporas. En este caso, tampoco se halló correlación alguna.

Respecto a la ornamentación, algunos de los resultados se pueden relacionar con lo que otros autores mencionaron en trabajos previos. En este sentido, en el género *Dennstaedtia* la relación entre los tipos de ornamentación observados y la distribución geográfica de las especies estudiadas se ajusta parcialmente a lo descrito por Tryon and Tryon (1982) y Tryon and Lugardon (1991). Estos autores definieron un patrón verrucoso para la mayoría de los taxa americanos que coincide a grandes rasgos con el de las especies paranaenses. En contraposición, si bien el patrón reticulado observado en *D. globulifera* y *D. cornuta* es menos regular y se restringe a la cara distal y ángulos de la espora, es similar al descrito por los autores para las especies paleotropicales. Esto permitiría concluir que la presencia de verrugas, lomos y retículos son elementos comunes de las especies de *Dennstaedtia*, independientemente de su distribución.

Tryon & Lugardón (1991) también describieron para el género *Hypolepis* dos variantes de la superficie equinada que serían coincidentes con la distribución geográfica de las especies. En este sentido, los autores describieron una superficie tapizada por espinas fusionadas lateralmente para las especies paleotropicales y una superficie más elaborada,

con retículos, para las especies neotropicales. Según lo observado en las especies de *Hypolepis* paranaenses con esporas equinadas, ambas variantes pueden estar presentes en una misma especie, e inclusive, en un mismo ejemplar, lo que permite sugerir nuevamente que la variabilidad observada dentro de cada tipo de ornamentación no estaría relacionada con la distribución geográfica de los taxones.

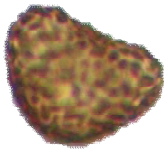
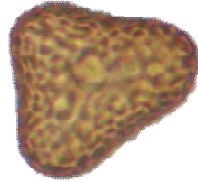
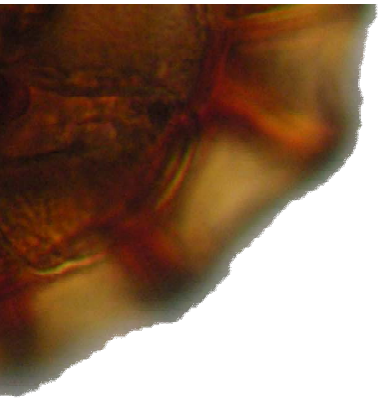
### **5.6. Aportes a la asignación de material fósil**

A pesar de que los granos de polen y esporas son muy frecuentes en los sedimentos fósiles, debido a la resistencia que la esporopolenina les confiere para su preservación en ciertos ambientes, la asignación de estas estructuras a los distintos grupos de plantas es dificultosa. Es por esta razón que el estudio morfológico de la esporodermis en taxones actuales representa una herramienta valiosa para una posterior comparación con material fósil (Tryon 1986). La existencia en los helechos de una enorme diversidad de ornamentaciones tanto a nivel del exosporio como del perisporio ofrece la posibilidad de contar con numerosos caracteres con los cuales realizar asignaciones botánicas precisas. No obstante, la falta de información sobre algunos aspectos particulares de cada grupo durante el análisis de material fósil podría derivar en errores durante dichas asignaciones. En este sentido, algunos resultados y conclusiones derivadas de esta tesis contribuyen a facilitar dicha tarea debido a que arrojan luz sobre los siguientes aspectos:

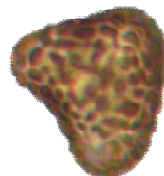
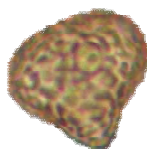
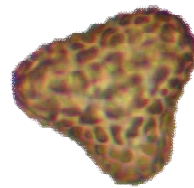
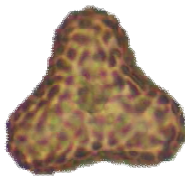
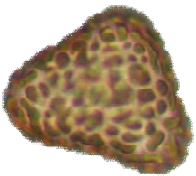
- Durante esta tesis se hizo hincapié en acompañar las descripciones de las esporas no sólo con fotografías tomadas en el microscopio óptico sino también en el microscopio electrónico de barrido. Es frecuente que durante los estudios paleopalínológicos no se cuente con el material suficiente para tomar fotografías con microscopía electrónica, por lo que contar con imágenes de microscopía óptica facilitaría las comparaciones. Asimismo debido a que, como se mencionó más arriba en la discusión, los patrones de la ornamentación no siempre se observan correctamente con bajos niveles de aumento, contar con imágenes de las esporas tomadas tanto al MO y como al MEB permite una mejor interpretación de los mismos.

- El hallazgo en otras familias de helechos de patrones ornamentales similares a los observados en las especies de Dennstaedtiaceae deja en evidencia la importancia de considerar tanto la morfología del exosporio como del perisporio durante las comparaciones del material fósil con el actual, así como el hecho de que en algunos casos (ej. *Microlepis speluncae* y *Cyathea atrovirens*) ambas paredes pueden ser semejantes en dos grupos distintos. Asimismo, es frecuente que, debido al proceso de fosilización o a la violencia de los métodos utilizados para la recuperación de material biológico de rocas y sedimentos, el perisporio se elimine parcial o totalmente dejando expuesto el exosporio. Contar con información acerca de la morfología tanto del exosporio como del perisporio puede contribuir con dichos casos de material deteriorado.

Hasta el momento, el material fósil asociado a las Dennstaedtiaceae se limita principalmente a macrorestos vegetales como frondes y ejes que podrían pertenecer a especies de los géneros *Hypolepis*, *Dennstaedtia* y *Microlepis*. (Knowlton, 1910, 1930; Hollick, 1936; Becker, 1961). Según este registro, la familia tendría su origen durante el Eoceno, aunque existen fósiles dudosos que la ubican en el Cretácico Superior (Arnold & Daugherty, 1964). En relación a los estudios paleopalinológicos, no son abundantes las esporas asignadas a la familia y pertenecerían a los géneros *Pteridium* (Couper, 1953; Kremp & Kawasaki, 1972), *Microlepis* (Archangelsky, 1994) y *Paesia* (Couper, 1953). Recientemente, se hallaron esporas asociadas con *Dennstaedtia* en sedimentos marinos del cuaternario del SE de Brasil, cerca del área de estudio de esta tesis (Freitas *et al.*, 2015). Se pretende que los resultados de este trabajo puedan contribuir a dilucidar el origen de materiales aún desconocidos para la ciencia debido a la falta de información.



## 6. Conclusiones



El análisis de la morfología general de las esporas, con y sin tratamiento químico al Microscopio Óptico (MO), de la superficie y fracturas con Microscopio electrónico de Barrido (MEB) y de la ultraestructura de sus paredes con Microscopio electrónico de Transmisión (MET) realizados en esta tesis representan un aporte significativo al conocimiento palinológico de los taxa incluidos en la familia Dennstaedtiaceae para la Provincia Fitogeográfica Paranaense. A continuación, se detallan las principales conclusiones relacionadas con los objetivos particulares primarios planteados al inicio de esta tesis:

- “Reconocer grupos morfológicos definidos por la ornamentación, estructura y/o ultraestructura dentro de la familia Dennstaedtiaceae”

Se reconocen, dentro de las Dennstaedtiaceae de la Provincia Fitogeográfica Paranaense, 7 grupos morfológicos definidos por los elementos ornamentales que tapizan la superficie de las esporas: verrucoso, con cordones, baculado, rugulado, tuberculado, equinado y crestado.

- “Reconocer si existen características en la morfología y/o estructura de las esporas propias de Dennstaedtiaceae”

En la mayoría de los grupos morfológicos pueden identificarse similitudes ultraestructurales en el perisporio respecto a la capa que constituye los elementos de la ornamentación, así como en las capas más interna y más externa. En relación al exosporio, todas las especies de Dennstaedtiaceae paranaenses poseen un exosporio constituido por dos capas, homologable al exosporio de tipo “Blechnoide” definido por Lugardon (1971, 1974).

- “Reconocer si existen características en la morfología y/o estructura de las esporas que distinguen a los géneros de Dennstaedtiaceae.”

Dentro de la familia, la mayoría de los géneros estudiados pertenecen a un grupo morfológico que los caracteriza: *Dennstaedtia*-verrucoso, *Blotiella*-baculado, *Paesia*-



rugulado, *Histiopteris*-tuberculado. No obstante, *Microlepia* y *Pteridium* pueden asignarse a un mismo grupo morfológico (con cordones) y las especies de *Hypolepis* se incluyen en dos grupos distintos (equinado y crestado), según el caso. Las características de la esporodermis son útiles para identificar géneros o grupos subgenéricos dentro de la familia.

- ▲ “Comparar la diversidad morfológica del esporofito con las características morfológicas de las esporas”

La diversidad morfológica observada en los esporofitos de las especies de la familia Dennstaedtiaceae es comparable con la diversidad observada respecto a las características esculturales de las esporas.

- ▲ “Evaluar la uniformidad o variabilidad de las características de las esporas en función de los rangos de distribución geográfica de las especies o géneros”

No se observó un patrón de variación evidente que señale una variabilidad en el tamaño de las esporas o la ornamentación que pueda relacionarse con la distribución de las especies paranaenses de Dennstaedtiaceae.

Asimismo, en relación a los objetivos particulares secundarios, es posible concluir lo siguiente:

- ▲ “Aportar información palinológica que permita la correcta circunscripción de los géneros incluidos dentro de Dennstaedtiaceae y que puedan contribuir la resolución de las relaciones filogenéticas dentro del grupo”

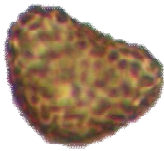
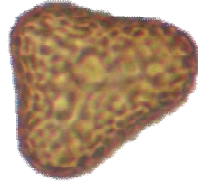
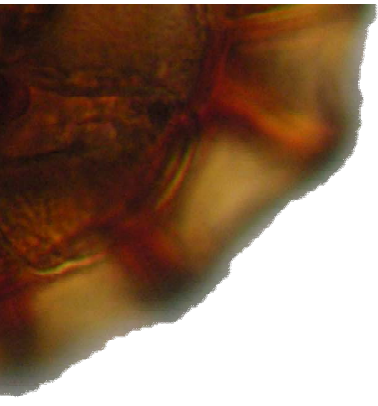
Existen caracteres que concuerdan con la posición de los géneros de Dennstaedtiaceae en las filogenias reconocidas hasta el momento. En este sentido, la presencia de esporas triletes con exosporios psilados o levemente irregulares son compartidas por los géneros del clado “dennstaedtioides” (*Dennstaedtia*, *Microlepia*) y por *Pteridium*, género basal en el clado “hypolepidoide”. Asimismo, la presencia de esporas monoletes con exosporios

ornamentados se hallan en las especies pertenecientes a géneros más derivados del clado “hypolepidoide” (*Hypolepis*, *Paesia*, *Blotiella* e *Histiopteris*). Si bien la ornamentación del perisporio caracterizó a la mayoría de los géneros estudiados, la presencia de cordones parece haber surgido independientemente más de una vez en la evolución de la familia.

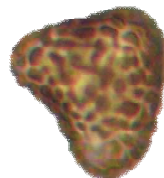
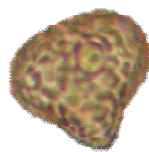
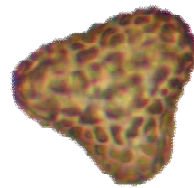
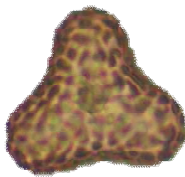
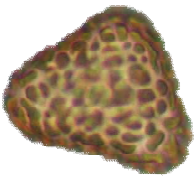
▲ “Aportar la información obtenida en este estudio al campo Paleontológico con el objeto de que los mismos contribuyan a facilitar asignaciones botánicas más precisas que permitan reconstruir las condiciones paleoambientales”

Las descripciones detalladas de la ornamentación tanto del exosporio como del perisporio de las especies estudiadas, así como las imágenes capturadas con microscopía óptica aportadas por esta tesis, representarían un aporte de información útil para ser utilizada en la comparación con material fósil.

En relación a la hipótesis de esta tesis es posible afirmar que los resultados obtenidos confirman que las características de las esporas de los géneros incluidos dentro de las Dennstaedtiaceae para la Provincia Fitogeográfica Paranaense reflejan la diversidad morfológica del esporofito dentro del grupo.



## **7. Perspectivas futuras**

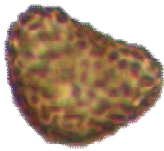
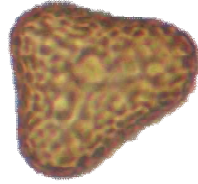
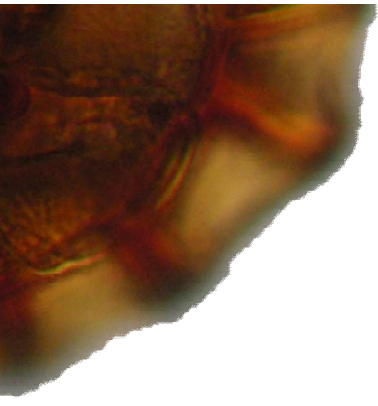


A partir de los resultados obtenidos y de las conclusiones elaboradas, naturalmente surgen nuevos objetivos relacionados con el estudio de la familia Dennstaedtiaceae en los que sería interesante trabajar:

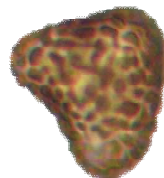
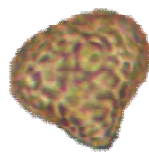
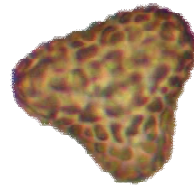
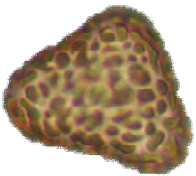
Realizar análisis cuantitativos para evaluar la relación entre el tamaño de las esporas y la ploidía de los individuos y su distribución geográfica. Sería interesante llevar a cabo este tipo de análisis en representantes paranaenses de *Hypolepis* y *Pteridium* debido a que estos géneros presentan antecedentes de poliploidia e hibridación en otras partes del mundo. En el caso particular de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, sería importante llevar a cabo estudios citológicos orientados a determinar el número cromosómico para corroborar si los diámetros observados aquí se deben a una poliplodia o forman parte de la variabilidad característica del taxón.

- ▲ En el caso particular de *Pteridium arachnoideum* subsp. *arachnoideum*, un estudio más exhaustivo sobre las poblaciones existentes en la Argentina sería relevante debido a la toxicidad y el comportamiento como maleza que presenta esta especie. En este sentido, un análisis detallado sobre la producción de esporas y los patrones y condiciones de germinación en esta especie podrían aportar información valiosa para su control.
- ▲ Continuar con el análisis de la especie *Hypolepis x paulistana* a través del análisis de una mayor cantidad de ejemplares, estudios de viabilidad de las esporas y comparación de caracteres palinológicos con otros caracteres morfológicos del esporofito.
- ▲ Analizar el desarrollo de las especies de la familia para entender como se forma la esporodermis y de que manera se definen los elementos de la ornamentación. Este tipo de estudios permitirían realizar nuevas comparaciones con otros grupos filogenéticamente no emparentados que poseen ornamentaciones similares con el fin de identificar patrones comunes de desarrollo para los helechos. En el caso particular de *Microlepia speluncae* y *Pteridium arachnoideum*, sería interesante continuar estudiando la subestructura de los cordones mediante la aplicación de nuevas formas de procesamiento y comenzar a indagar en el modo en que estos se forman durante la estabilización con esporopolenina, con el fin de evaluar si se ajustan o no a la teoría de los cordones helicoidales (tuft) de Rowley (1981).

- Analizar los patrones de germinación de las esporas y las características de los gametofitos con el fin de comprobar si las mismas reflejan la variabilidad morfológica observada en el esporofito y en las esporas.



## **8. Referencias**



- Alonso-Amelot, M. E. & S. Rodolfo-Baechler. 1996. Comparative spatial distribution, size, biomass and growth rate of two varietites of braken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) in a Neotropical montane habitat. *Vegetatio* 125: 137-147.
- Alston, A. H. G. 1956. The subdivision of polypodiaceae. *Taxon* 5: 23-25.
- Arana, M. D., M. Ponce & N. B. Vischi. 2004. Sinopsis de los helechos y grupos relacionados (Pteridophyta) de la provincia de Córdoba, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 39(1-2): 89-114.
- , A. Yañez & P. B. Schwartsburd. 2014. An updated synopsis of Hypolepis Bernh (Dennstaedtiaceae) from Argentina. *Phytotaxa*, 188(2): 91-102.
- Archangelsky, S. 1994. Estudios palinológicos de la Formación Baqueró (Cretácico), provincia de Santa Cruz, Argentina. VI. *Ameghiniana* 31(1): 41-53.
- Arnold, C. A. & L. H. Daugherty. 1964. A fossil dennstaedtioid fern from the Eocene Clarno Formation of Oregon. *Contributions from the Museum of Paleontology, The university of Michigan* 19(6): 65-88.
- Arreguín Sánchez, M. de la L., R. F. Nava, R. P. Chávez & D. L. Q. García. Morfología de las esporas de Pteridofitas isosporas del estado de Queretaro, Mexico. *Polibotanica* 2: 10-60.
- Ashcroft, C. J. & E. Sheffield. 2000. The effect of spore density on germination and development in *Pteridium*, monitored using a novel culture technique. *American Fern Journal* 90(3): 91-99.
- Assis, F. C. & A. Salino. 2011. Dennstaedtiaceae (Polypodiaceae) no estado de Minas Gerais, Brasil. *Rodriguesia* 62(1): 011-033.
- Basualdo, I, N. Soria, R. Degen, M. Orthiz & E. Zardini. 2005. Catalogo de la flora vascular de Tavai, Dto de Caazapa, Paraguay. *Rojasiana* 7(1): 27-99.
- Becker, H. F. 1961. Oligocene Plants from the Upper Ruby Basin, Southwestern Montana. *Geological Society of America Memoirs* 82: 1-122.
- Belling, A. J. & C. J. Heusser. 1975. Spore morphology of the Polypodiaceae of northeastern North America. II. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102(3): 115-127.
- Bernhardi, J. J. 1806. Dritter Versuch einer Anordnung der Farrnkräuter. *Neues Journal für Botanik* 1(2): 1-50.

- Bower, F. O. 1923. The Ferns (Filicales): Treated comparatively with a view to their natural classification. Vol 1. *University Press*, Cambridge, 359 pp.
- . 1926. The Ferns (Filicales). The Eusporangiate and other relatively primitive Ferns. Vol 2. *University Press*, Cambridge, 344 pp.
- . 1928. The Ferns (Filicales). The Leptosporangiate ferns. Vol. 3. *University Press*, Cambridge, 306 pp.
- Brown, C. A. 1960. What is the role of spores in fern taxonomy? *American Fern Journal* 50(1): 6-14.
- Brownlie, G. 1957. Cyto-taxonomig studies on New Zealand Pteridaceae. *New phytologist* 56(2): 207-209.
- Brownsey, P. J. 1983. Polyploidy and aneuploidy in *Hypolepis* and the evolution of the Dennstaedtiaceae. *American Fern Journal* 73 (4): 97-108.
- . 1987. A review of the fern genus *Hypolepis*. *Blumea* 32(2): 227-276.
- . 1989. The taxonomy of bracken (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) in Australia. *Australian Systematic Botany* 2(1): 113-128.
- . & R. J. Chinnock. 1984. A taxonomic revision of the New Zealand species of *Hypolepis*. *New Zealand journal of botany* 22(1): 43-80.
- Cabrera, A. & A. Willink. 1973. Biogeografía de América Latina. Monografía N° 13. *Organizacion de los Estados Americanos*, Washington, 117 pp.
- Campbell, E. O. 1937. The embryo and stelar development of *Histiopteris incisa*. *Royal Society of New Zealand* 66: 1-11.
- Ching, R. C. 1940. On natural classification of the family Polypodiaceae. *Sunyatsenia* 5: 201-268.
- Christenhusz, M., X. C. Zhang & H. Schneider. 2011. A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns. *Phytotaxa* 19: 7-54.
- & M. W. Chase. 2014. Trends and concepts in fern classification. *Annals of Botany* 113(4): 571-594.
- Christensen, C. F. 1905. Index filicum. Hagerup, Copenhagen, 744 pp.
- . 1925. Revised list of Hawaiian Pteridophyta. *Bernice P. Bishop Museum Bulletin* 25: 1-29.



- . 1938. Filicinae. *En*: Verdoorn V. (ed.). *Manual of Pteridology*. Nijhoff, The Hague, pp. 522-550.
- & C. J. F. Skottsberg. 1920. The Pteridophyta of the Juan Fernandez Islands. *The Natural History of Juan Fernandez and Easter Island 2*: 1-46.
- Claugher, D. & J. R. Rowley. 1987. *Betula* pollen grain substructure revealed by fast atom etching. *Pollen et spores* 29(1): 5-20.
- Contreras-Duarte, A. R. & R. G. Bogotá-Ángel. 2006. Atlas de las esporas de Pteridófitos de Chipaque (Cundinamarca, Colombia). *Caldasia* 28(2): 327-357.
- Conway, E. 1949. The Autecology of Bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn): The Germination of the Spore, and the Development of the Prothallus and the Young Sporophyte. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B. Biology* 63(03): 325-343.
- . 1953. Spore and sporeling survival in bracken (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn). *The Journal of Ecology* 41(2): 289-294.
- Copeland, E. B. 1947. Genera Filicum. *Annales Cryptogamici et Phytopathologici* 5: 1-247.
- Couper, R. A. 1953. Upper Mesozoic and Cainozoic spores and pollen grains from New Zealand. *New Zealand Geological Survey, Palaeontological Bulletin* 22: 1-77.
- Costa Assis, F & A. Salino. 2011. Dennstaedtiaceae (Polypodiopsida) no estado de Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 62(1): 011-033.
- Dai, X. L., Q. X. Wang & R. L. Yu. 2005. Spore Morphology of Pteridophytes from China VI, Pteridaceae. *Acta Botanica Yunnanica* 27(5): 489-500.
- DeBenedictus, V. M. M. 1969. Apomixis in ferns with special reference to sterile hybrids. *University of Michigan, Michigan*, 215 pp.
- De la Sota, E. R. 1977. Pteridophyta. *En*: Cabrera, A.L. (ed.) *Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* 13(2): 1-275.
- Der, J. P., J. A. Thomson, J. K. Stratford & P. G. Wolf. 2009. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany* 96(5): 1041-1049.
- Devi, S. 1977. Spores of Indian Ferns. *Today and Tomorrow's Printers & Publishers*, New Delhi, 228 p.

- . 1979. Spore types, morphological evolution and phylogeny in the Pteridaceae. *Grana*, 18(1): 41-46.
- Di Bitetti, M.S, G. Placci, & L.A. Dietz. 2003. Una Visión de Biodiversidad para la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná: Diseño de un Paisaje para la Conservación de la Biodiversidad y prioridades para las acciones de conservación. *World Wildlife Fund*, Washington D.C., 154 pp.
- Diels, L. 1902. Polypodiaceae. *En: Diels, L. Eufilicineae. En: Sadebeck, R. Pteridophyta. En: Engler, A. & K. Prantl. Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten insbesondere den Nutzpflanzen, unter Mitwirkung zahlreicher hervorragender Fachgelehrten. Wilhelm Engelmann, Leipzig.*
- Dolling, A. H. 1996. Interference of bracken (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) with Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) seedling establishment. *Forest Ecology and Management*, 88(3): 227-235.
- Echandi, K. & F. Hernández. 1998. Comparación de dos métodos de fijación para la estabilización de glicocalix bacteriano. *Revista Biomédica* 9: 7-11.
- El-Ghazaly, G. & J. R. Rowley. 1999. Microspore and tapetal development in *Echinodorus cordifolius* (Alismaceae). *Nordic Journal of Botany* 19(1): 101-120.
- Erdtman, G. 1957. Pollen and Spore Morphology, Plant Taxonomy: Gymnospermae, Pteridophyta, Bryophyta. *Almqvist & Wiksell*, Stockholm, 147 pp.
- . 1960. The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54: 561-4.
- & J. R. Pragłowski. 1959. Six notes on pollen morphology and pollenmorphological techniques. *Botaniska Notiser* 112: 175-84.
- & P. Sorsa. 1971. Pollen and spore morphology/Plant taxonomy. Pteridophyta (An introduction to palynology IV). *Almqvist & Wiksell*, Stockholm, 300 p.
- & Vishnu-Mittre. 1958. On terminology in pollen and spore morphology. *Grana* 1(3): 6-9.
- Esteves, L. M. & C. B. Coelho. 2007. Morfologia de esporos do pteridófitas do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (Sao Paulo, Brasil). *Hoehnea* 34(2): 245-252.

- & -----, 2011. Variabilidade morfológica dos esporos de *Serpocaulon* AR (Polypodiaceae J. Presl) em função de variáveis ambientais. *En: D. S. Rodriguez & A. de Oliveira Fidalgo (eds.). 18ª Reunião Anual do Instituto de Botânica. Instituto de Botânica, São Paulo.*
- Evans, A. M. 1969. Interspecific relationships in the *Polypodium pectinatum-plumula* complex. *Annals of Missouri Botanical Garden* 55: 193-283.
- Faridah-Hanum, I., M. Z. Mustapa & R. Jaman. 2008. Spore Micromorphology and Anatomy of the Fern Genus *Histiopteris* J. M. (Dennstaedtiaceae) in Peninsular Malaysia. *International Journal of Botany* 4(2): 236-240.
- Font Quer, P. 1993. Diccionario de Botánica. *Labor, S. A.*, Barcelona, 1244 p.
- Freitas, A. G. D., M. D. A. Carvalho, M. B. D. Toledo, C. B. F. Mendonça & V. Gonçalves-Esteves. 2015. Bryophyte and pteridophyte spores and other palynomorphs in quaternary marine sediments from Campos Basin, southeastern Brazil: Core BU-91-GL-05. *Acta Botanica Brasilica* 29(2): 161-174.
- Ganem, M. A., M. L. Luna, & G. E. Giudice. 2013. Estudio palinológico en especies de *Asplenium* (Aspleniaceae) de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 48(3-4): 465-476.
- Gaspar, Andre Luis de. 2012. Pteridofitas de Santa Catarina, Brasil: diversidade, distribuicao geografica e variaveis ambientais. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal. Belo Horizonte, Brasil, 86 pp.
- Giudice, G. E. & M. A. Morbelli. 1998. *Pityrogramma tartarea* (Pteridaceae, Pteridophyta), su presencia en Argentina. *Hickenia* 2(59): 277-280.
- , M. A. Morbelli, C. C. Macluf, M. Hernández & A. Ruiz, 2006. Morphology and ultrastructure of the spores of Dennstaedtiaceae from North West Argentina. *Review of Palaeobotany and Palynology* 141: 245-257.
- Gliessman, S. R. & C. H. Muller. 1978. The allelopathic mechanisms of dominance in bracken (*Pteridium aquilinum*) in southern California. *Journal of Chemical Ecology* 4(3): 337-362.

- Graf-Meier, K. 1985. Esporas triletes de helechos bolivianos. *Boletín del Servicio Geológico de Bolivia, Serie A* 3(1): 33-51.
- Gruber, T. M. 1981. The Branching Pattern of *Hypolepis repens*. *American Fern Journal* 71(2): 41-47.
- Harris, W. F. 1955. A manual of the spores of New Zealand Peridophyta. *N. Z. Wellington, Christchurch*, 187 pp.
- Hasebe, M., T. Omori, M. Nakazawa, T. Sano, M. Kato & K. Iwatsuki. 1994. RbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 730-5734.
- , P. G. Wolf, K. M. Pryer, R. Sano, G. J. Gastony, E. H. Crane, W. D. Hauk, C. H. Haufler, J. R. Manhart, N. Murakami, J. Yokoyama & M. Ito. 1995. Fern phylogeny based on rbcL nucleotide sequences. *American Fern Journal* 85: 134-181.
- Haufler, C. H. & G. J. Gastony. 1978. Systematic implications of spore morphology in *Bommeria* and related fern genera. *Systematic Botany* 3(3): 241-256.
- Hennipman, E. 1966. *Pteridoblechnum*, a new genus of blechnoid ferns from Australia. *Blumea* 13(2): 397-403.
- Hesse, M. & Waha, M. 1989. A new look at the acetolysis method. *Plant Systematics and Evolution* 163(3-4): 147-152.
- Heusser, C. J. 1971. Pollen and spores of Chile: modern types of the Pteridophyta, Gymnospermae, Angiospermae. *University of Arizona Press, Tucson*, 167 pp.
- Hickok, L. G. & E. J. Klekowski. 1973. Abnormal reductional and nonreductional meiosis in *Ceratopteris*: alternatives to homozygosity and hybrid sterility in homosporous ferns. *American Journal of Botany* 60(10): 1010-1022.
- Hill, J. D. & J. A. Silander. 2001. Distribution and dynamics of two ferns: *Dennstaedtia punctilobula* (Dennstaedtiaceae) and *Thelypteris noveboracensis* (Thelypteridaceae) in a Northeast mixed hardwoods–hemlock forest. *American Journal of Botany* 88: 894-902.
- Hollick, A. 1936. The Tertiary Floras of Alaska. *US Geological Survey professional paper* 182.

- Holtum, R. E. 1947. A revised classification of Leptosporangiate ferns. *Botanical Journal of Linnean Society* 51: 123-158.
- , 1949. The classification of ferns. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 24: 267-269.
- , 1954. A revised flora of Malaya – II Ferns of Malaya. *Gout. Printing Office*, Singapore, p. 299-574.
- , 1973. Posing the problems. *En: Crabbe A. C. & B. A. Thomas (eds). The phylogeny and classification of the ferns. Botanical Journal of Linnean Society* 67 (Suppl): 1-10.
- & U. Sen. 1961. Morphology and classification of the tree ferns. *Phytomorphology* 11: 406-20.
- Hooker, W. J. 1844. Species Filicum. Vol. I. *William Pamplin*, London.
- & J. G. Baker. 1867. Synopsis Filicum. *R. Hardwicke*, London, 482 p.
- Huang, T. C. 1981. Spore flora of Taiwan. *National Taiwan University*, Taiwan.
- Huysmans, S., G. El-Ghazaly & E. Smets. 1998. Orbicules in angiosperms: morphology, function, distribution, and relation with tapetum types. *The Botanical Review* 64(3): 240-272.
- Juárez-Orozco, S, A. Orozco-Segovia, A. Mendoza-Ruiz, B. Pérez-García. 2013. Spore germination of eight homosporous ferns in a temperature gradient. *South African Journal of Botany* 87: 112-117.
- Kaehler, M, R. Goldenberg, P. H. Labiak Evangelista, O. dos Santos Ribas, A. O. Santos Vieira & G. G. Hatschbach. 2014. Plantas vasculares do Paraná. *Universidade Federal do Paraná*, Curitiba, 192 pp.
- Kaur, S. 1972. Contributions to the morphology of *Dennstaedtia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B* 75(1)
- Kieling-Rubio, M.A. & P. G. Windisch. 2002. O género *Dennstaedtia* Moore (Dennstaedtiaceae, Pteridophyta) no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas Serie Botânica* 52: 185–194.
- Knox, E. M. 1938. The spores of Pteridophyta, with observations on microspores in coals of Carboniferous age. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh* 32 (3): 438-466.

- Knowlton, H. 1910. Descriptions of Fossil Plants from the Mesozoic and Cenozoic of North America I. *Smithsonian miscellaneous collections* 52(4): 489-496.
- , 1930. The Flora of the Denver and Associated Formations of Colorado. *U. S. Geological Survey Professional Paper* 155.
- Korall P. & W. A. Taylor. 2006. Megaspore morphology in the Selaginellaceae in a phylogenetic context: A study of the megaspore surface and wall structure using scanning electron microscopy. *Grana* 45(1): 22-60.
- Kramer, K. U. 1990. Dennstaedtiaceae. *En: Kubitzki K. (ed.): The families and genera of Vascular Plants. Springer-Verlag, Berlin, Alemania, pp. 81-94.*
- Kremp, G. O. W. 1965. Morphologic Encyclopedia of Palynology: An Internat. Collection of Definitions and Ill of Spores and Pollen. *University of Arizona Press, Arizona, 263 pp.*
- & T. Kawasaki. 1972. The spores of the Pteridophytes: Contribution No. 42. *Dept. of Geosciences, University of Arizona Press, Arizona, 398 pp.*
- Kuhn, M. 1868. Filices africanæ. *W. Engelmann, Leipzig, 233 pp.*
- , 1882. Die Gruppe der Chaetopterides unter den Polypodiadeen. *Festschrift zu dem Jubiläum der Königstädtischen Realschule zu Berlin: 323-348.*
- Large M. F. & J. E. Braggins. 1991. Spore atlas of New Zealand ferns and ferns allied. *New Zealand Journal of Botany* 29: 1-68.
- Legrand, D & A. Lombardo. 1958. Flora del Uruguay I: Pteridophyta. *Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, pp. 67.*
- Lellinger, D. B. 2002. A modern multilingual glossary for taxonomic pteridology. *Pteridologia* 3: 1-263.
- Lindsay, S., E., Sheffield & A.F. Dyer. 1995. Dark germination as a factor limiting the formation of soil spore banks by bracken. *En: Smith, R.T., J.A. Taylor, (eds.). Bracken: An Environmental Issue, International Bracken Group. Aberystwyth, UK, pp. 47-51.*
- Looser, G. El género Dennstaedtia (Filices) en Chile. 1971. *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso* 4: 53-61.
- Lorscheitter, M. L., A. Ashraf, P. Windisch & V. Mosbrugger. 2002. Pteridophyte spores of Río Grande do Sul, Brazil: Part IV. *Paleontographica Abteilung B* 263: 1-159.

- Lovis, J. D. 1977. Evolutionary patterns and processes in ferns. *Advances in Botanical Research* 4: 29-415.
- Lugardon, B. 1971. Contribution à la connaissance de la morphogénèse et de la structure des parois sporales chez les Filicinées isosporées. Thèse. *Univ. Paul Sabatier*, Toulouse, 257 p.
- , 1974. La structure fine de l'exospore et de la périspore des Filicinées isosporées II. *Pollen Spores* 16(2): 161-226.
- , 1981. Les globules des Filicinées, homologues des Corps d'Urbisch des Spermaphytes. *Pollen Spores* 23: 93 – 124.
- Manton, I. 1950. Problems of Cytology and evolution in the Pteridophyta. *Cambridge University Press*, Cambridge, 316 pp.
- , 1958. Chromosomes and fern phylogeny with special reference to Pteridaceae. *Zoological Journal of Linnean Society* 44(295): 73-92.
- Marquez, G. J. 2012. Palinología de los helechos arborescentes (Cyatheaceae) del Cono Sur. Morfología y ultraestructura de las esporas de las Cyatheaceae del Cono Sur de América. *Editorial académica española*, Saarbrücken, 139 p.
- Marquez G. J. & M. A. Morbelli. 2014. Substructural components in the sporoderm of the Family Cyatheaceae. *Palynology* 39(2): 37-41.
- , M. A. Morbelli & G.E. Giudice. 2009. Comparative analysis of spores of *Alsophila* (Cyatheaceae) species from southern South America. *Review of Palaeobotany and Palynology* 156: 165-176.
- , ----- & -----, 2010a. Palynological analysis of *Sphaeropteris gardneri* (Cyatheaceae, Pteridophyta). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82(2): 361-367.
- , ----- & -----, 2010b. Spore morphology and ultrastructure of *Cyathea* (Cyatheaceae, Pteridophyta) species from southern South America. *Grana* 49(4): 269-280.
- , G. E. Giudice & M. Ponce. 2006. Pteridofitas de la Reserva “Valle del Arroyo Cuñá Pirú” (Misiones, Argentina). *Darwiniana* 44: 108–126.

- Marrero Faz, E. & Á. Calderón Tobar. 2012. Plantas tóxicas e inocuidad alimentaria: Hematuria Enzoótica Bovina por *Pteridium* spp., un problema relevante de salud. *Revista de Salud Animal* 34(3): 137-143.
- Marticorena, C., & R. Rodríguez. 1995. Flora of Chile. v. 1: Pteridophyta-Gymnospermae. *Universidad de Concepción*, Chile, 351 pp.
- Martínez, O. G. & M. A. Morbelli. 2009. The spores of *Pteris cretica* complex (Pteridaceae-Pteridophyta) in America. *Grana*, 48(3): 193-204.
- , C. J. Chambi & Z. Avilés. 2014. Gametophytic phase of two Neotropical ferns, *Dennstaedtia globulifera* (Poir.) Hieron and *Hypolepis poeppigii* Mett. ex Maxon (Dennstaedtiaceae). *Plant systematic and evolution* 300(5): 909-915.
- Mehra, P. N. 1961. Chromosome numbers in Himalayan ferns. *Research bulletin of the Punjab University, New series* 12: 139-164.
- & K. R. Khanna. 1957. Cytology of some Himalayan Ferns. *Journal of Genetics* 56(2): 296-313.
- Mickel, J.T. 1973. The classification and phylogenetic position of the Dennstaedtiaceae. *En: Jeremy A. C., J. A. Crabbe & B. A. Thomas (eds.). The phylogeny and classification of the ferns. Botanical Journal of Linnean Society* 67: 135-144.
- , 1974. Phyletic lines in the modern ferns. *Annales Missouri Botanical Garden* 61(2): 474-482.
- , & A. R. Smith. 2004. Pteridophytes of Mexico. *Memoir of the New York Botanical Garden* 88: 1-1055.
- Michelon, C. 2012. Samambaias e Licófitas do Parque Estadual do Guartelá, Paraná. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas. *Universidade Federal do Paraná*, Curitiba, Brasil, 113 p.
- Mitui, K. 1982. Spore morphology of Japanese ferns. *Hogyo-shokan*, Tokyo, 206 pp.
- Moe, D. 1974. Identification key for trilete microspores of Fennoscandian Pteridophyta. *Grana* 14(2-3): 132-142.
- Moran, R. C., J. G. Hanks & G. Rouhan. 2007. Spore morphology in relation to phylogeny in the fern genus *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae). *International Journal of Plant Sciences* 168(6): 905-929.



- , -----, P. Labiak & M. Sundue. 2010. Perispore morphology of bolbitidoid ferns (Dryopteridaceae) in relation to phylogeny. *International journal of plant sciences* 171(8): 872-881.
- & R. Riba. 1995. Psilotaceae a Salviniaceae. En: Davise G., S. M. Sousa & S. Knapp (eds.): Flora Mesoamericana. Vol 1. *Universidad Autónoma de México, DF*, 470 pp.
- Morbelli, M. A. 1974. Análisis palinológico en híbridos interespecíficos del género *Blechnum* L., subgénero *Blechnum* (Blechnaceae-Pteridophyta). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15(4): 446-466.
- , 1977. Presencia de corpúsculos de Ubish en las esporas de las pteridofitas. *Obra del centenario del Museo de la Plata, Botánica* 3: 237-247.
- , 1980. Morfología de las esporas de Pteridophyta presentes en la región fuego-patagonica República Argentina. *Opera Lilloana*, 28: 138 pp.
- , 1995. Megaspore wall in Lycophyta-ultrastructure and function. *Review of Palaeobotany and Palynology* 85:1-12.
- & G. E. Giudice. 2005. Spore wall ultrastructure in Aspleniaceae (Pteridophyta) from North-West Argentina. *Review of Palaeobotany and Palynology* 135(3): 131-143.
- & ----- 2010. Spore wall ultrastructure of Polypodiaceae from north-western Argentina. *Grana*, 49(3): 204-214.
- & I. G. Michelena. 1989. Palynological analysis of *Cheilanthes* species (Adiantaceae-Pteridophyta) of northwestern Argentina. *Grana* 28(4): 295-304.
- & M. Ponce. 2015. Estudios palinológicos en el grupo *Cheilanthes squamosa* (Pteridaceae, Cheilanthesoideae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 50 (Supl.): 245.
- , J. R. Rowley & D. Claugher. 2001. Spore wall structure in *Selaginella* (Lycophyta) species growing in Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 36 (3-4): 315-368.
- Murillo, M. T., M. J. Bless. 1974. Spores of recent Colombian pteridophyta. I. Trilete spores. *Review of Palaeobotany and Palynology* 18(3): 223-269.

- & ----- . 1978. Spores of recent Colombian pteridophyta. II. Monolette spores. *Review of Palaeobotany and Palynology* 25(5): 319-365.
- Morrone J. J. 2001. Biogeografía de América Latina y el Caribe, Manuales & Tesis SEA. Vol. 2. *Sociedad Entomológica Aragonesa*, Zaragoza, 144 p.
- . 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782 (1): 1-110.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. Da Fonseca & J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772): 853-858.
- Navarrete, H. & B. Øllgaard. 2000. The fern genus *Dennstaedtia* (Dennstaedtiaceae) in Ecuador, new characters, new species and a new combination. *Nordic Journal of Botany* 20: 319–346.
- Nayar, B. K. 1964. Palynology of modern pteridophytes. En: Nair P.K.K. (Ed.): Advances in palynology. *National Botanic Gardens*, Lucknow, p. 101-141.
- . 1970. A phylogenetic classification of the homosporous ferns. *Taxon* 19: 229-236.
- . & M. J. Molly. 1980. Apical organisation and vascular differentiation in *Microlepia* in relation to stelar architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences* 89.5: 381-393.
- & N. Bajpai. 1964. Morphology of the gametophytes of some species of *Pellaea* and *Notholaena*. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 59(376): 63-76.
- & S. Devi. 1966. Spore morphology of the Pteridaceae I. The Pteridoid ferns. *Grana* 6(3): 476-502.
- & ----- . 1968a. Spore morphology of the Pteridaceae III. The Dicksonioid, Dennstaedtioid and Lindsaeoid ferns. *Grana* 8(1): 185-203.
- & ----- . 1968b. Spore Morphology of the Pteridaceae IV. Taxonomic and Phyletic Considerations. *Grana* 8(2-3): 517-535.
- Nayar, B. K. & S. Kaur. 1963. Ferns of India. VIII: *Microlepia* Presl. *Bulletin of the Lucknow National Botanic Gardens* 79: 1-25.

- Nee, M. H. 2010. Flora de la Región del Parque Nacional Amboró - Bolivia. Parte 1. Licofitas, Helechos y Gimnospermas. *Editorial FAN*, Santa Cruz de la Sierra, 445 pp.
- Nóbrega, G. A. & J. Prado. 2008. Pteridófitas da vegetação nativa do Jardim Botânico Municipal de Bauru, Estado de São Paulo, Brasil. *Hoehnea* 35(1): 7-55.
- Oliveros-Bastidas, A. J. & M. E. Alonso-Amelot. 2010. Cyanogenic polymorphism in Brakerns, *Pteridium arachnoideum* and *P. caudatum*, from the northern Andes. *Quimica nova* 33(7): 1520-1524.
- Olson, D. M., & E. Dinerstein. 2002. The Global 200: Priority ecoregions for global conservation. *Annals of Missouri Botanical Garden* 89(2): 199-224.
- \*Ouden, J. D. 2000. The role of bracken (*Pteridium aquilinum*) in forest dynamics. *Wageningen Agricultural University*, Wageningen, 221 pp.
- Page, C. N. 1976. The taxonomy and phytogeography of bracken-a review. *Botanic Journal of Linnean Society* 73(1-3): 1-34.
- Peña Chocarro, M., B. Jiménez, G. Marín & S. Knapp. 1999. Checklist of the pteridophytes of the Mbaracayú Forest Nature Reserve, Paraguay. *Fern Gazette* 15: 221-259.
- Pettitt, J.M. 1976. A route for the passage of substances through the developing pteridophyte exine. *Protoplasma* 88(1): 117-131.
- Pichi Sermolli, R. E. G. 1958. The higher taxa of the Pteridophyta and their classification. Systematics of today. *Uppsala Univ. Årsskrift* 6: 70-90.
- . 1970. A provisional catalogue of the family names of living Pteridophytes. *Webbia* 25: 219-297.
- . 1973. Historical review of the higher classification of the filicopsida. *En: Jeremy A. C., J. A. Crabbe & B. A. Thomas (eds.). The Phylogeny and classification of the ferns*, p. 11-40.
- . 1977. Tentamen Pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. *Webbia* 31: 13-512.
- Piñeiro, R. M., G. E. Giudice, & M. A. Morbelli. 2006. Spore morphology and sporoderm ultrastructure in *Adiantopsis* Fée (Pteridaceae-Pteridophyta) from Argentina. *Grana* 45(2): 101-108.

- Placi, G. & M. Di Bitetti. 2005. Situación ambiental en la ecorregión del bosque Atlántico del alto Paraná (selva paranaense). En: Brown A., U. Martinez Ortiz, M. Acerbi & J. Corcuera (eds.). La situación ambiental argentina. *Fundación Vida Silvestre Argentina*, Buenos Aires, p. 197-225.
- Povey, A. C., D. Potter, & P. J. O'Connor. 1996. 32P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the upper gastrointestinal tissue of mice fed bracken extract or bracken spores. *British Journal of Cancer* 74(9): 1342-1348.
- Prado, J. 2004. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, Sao Paulo, SP. Pteridophyta: 5. Dennstaedtiaceae. *Hoehnea* 31(1): 11-22.
- & R.Y. Hirai. 2011. Checklist das licófitas e samambaias do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 11(1): 161-190.
- & R.Y. Hirai. 2014. Biogeography of the Brazilian Atlantic Forest: evidence from phylogenetic data sets and perspectives for fern and lycophyte studies. *Fern Gazette* 19(7): 241–257.
- & L.S. Sylvestre. 2010. As samambaias e licófitas do Brasil. En: Forzza, R.C., J.F.A. Baumgratz, C.E.M. Bicudo, D. Canhos, A.A. Carvalho Junior, A. Costa, D.P. Costa, M. Hopkins, P.M. Leitman, L.G. Lohmann, E.N. Lughadha, L.C. Maia, G. Martinelli, M. Menezes, M.P. Morim, M. Nadruz, A.L. Peixoto, J.R. Pirani, J. Prado, L.P. Queiroz, S. De Souza, V.C. Souza, J.R. Stehmann, L.S. Sylvestre, B.M.T. Walter & D.C. Zappi, (Eds.): Catálogo de plantas e fungos do Brasil Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Vol 1. *Andrea Jakobsson Estúdio Editorial*, Rio de Janeiro, p. 69-74.
- Prance, G.T. 1987. Biogeography of Neotropical plants. En: Whitmore T.C. & G.T. Prance (eds). Biogeography and Quaternary History in Tropical America, *Claredon Press*, Oxford, p. 46–65.
- Prantl, K. 1892. System der Farne. *Arbeiten Königlich Botanischen Garten Breslau* 1(1): 1-38.
- Presl, C.B. 1836. Tentamen Pteridographiae, seu genera filicacearum praesertim juxta venarum decursum et distributionem exposita. *Typis Filiorum Theophili Haase Pragae*, 290 pp.
- Proctor, G. R. 1985. Ferns of Jamaica. British Museum (Natural History), London, pp. xx.

- , & R. A. Howard. 1977. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. Vol. 2. Pteridophyta. Arnold Arboretum. *Harvard University Press*, Cambridge, pp. 414.
- Pryer, K. M., A. R. Smith & J. E. Skoog. 1995. Phylogenetic relationships of extant pteridophytes based on evidence from morphology and rbcL sequences. *American Fern Journal* 85: 205-282.
- , E. Schuettpelez, P. G. Wolf, H. Schneider, A. R. Smith & R. Cranfill. 2004. Phylogeny and Evolution of ferns (Monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. *American Journal of Botany* 91(10): 1582-1598.
- Punt, W., S. Blackmore, S. Nilsson & A. Le Thomas. 1994. Glossary of pollen and spore terminology. *LPP foundation, University of Utrecht, The Netherlands*, 71 pp.
- , P. P. Hoen, S. Blackmore & A. Le Thomas. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 143(1): 1-81.
- Quitete Portela, R. C., D. M. Silva Matos, L. P. Ugliese de Sequeira, M. I. Guedes Bras, L. Silva-Lima & R. Hunter Marrs. 2009. Variation in aboveground biomass and necromass of two invasive species in the Atlantic rainforest, Southeast Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 23(2): 571-577.
- Ramírez Trejo, M. del R., B. Pérez-García, D. R. Pérez-Salicrup & A. Orozco-Segovia. 2010. Effect of fire on the germination of spores of *Pteridium caudatum*, an invasive fern. *Journal of Tropical Ecology* 26(04): 457-465.
- , B. Pérez-García, A. Mendoza-Ruiz, R. Valdez-Avila & S. Espinosa-Matías. 2013. Observations of the spore, gametophyte and young sporophyte of *Pteridium caudatum* (L.) Maxon using scanning electron microscopy. *Micron* 45: 37-44.
- Ramos Giacosa, J.P., M.A. Morbelli & G.E. Giudice. 2001. Estudio palinológico de las especies de *Anogramma* y *Trachypteris* (Pteridaceae, Pteridophyta) de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 36(3-4): 283-288.
- , ----- & ----- . 2004. Spore wall ultrastructure in *Anogramma* species (Pteridaceae) from Argentina. *Grana* 43(4): 231-237.

- , ----- & ----- . 2007. Morphology and ultrastructure of the spores of the Grammitidaceae from Argentina. *Review of palaeobotany and palynology* 143(3): 155-166.
- , ----- & ----- . 2009. Spore morphology and wall ultrastructure of *Blechnum* L. species from North West Argentina. *Review of Palaeobotany and Palynology* 156(1): 185-197.
- , ----- & ----- . 2011. Spore morphology and wall ultrastructure of *Trachypteris* species (Pteridaceae). *Plant Systematics and Evolution* 294(3-4): 227-237.
- , ----- & ----- . 2013. Comparative palynological analysis of *Lygodium venustum* Sw. and *L. volubile* Sw. (Lygodiaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(2): 699-707.
- Ranker, T. A. 1989. Spore morphology and generic delimitation of new world *Hemionitis*, *Gymnopteris*, and *Bommeria* (Adiantaceae). *American journal of botany* 76(2): 297-306.
- Recouso, R. C., R. C. Santos, R. Freitas, R. C. Santos, A. C. de Freitas, O. Brunner & C. J. Lindsey. 2003. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. *Veterinary and comparative oncology* 1(1): 22-29.
- Reitsma, T. 1969. Size modification of recent pollen grains under different treatments. *Review of Palaeobotany and Palynology* 9(3): 175-202.
- Rojas-Alvarado, A. F. & J. D. Tejero Díez. 2002. Una especie nueva de Dennstaedtia (Filicales: Dennstaedtiaceae) para México. *Revista de Biología Tropical* (3/4): 1007-1012.
- Roos, K., R. Rollenbeck, T. Peters, J. Bendix & E. Beck. 2010. Growth of Tropical Bracken (*Pteridium arachnoideum*): Response to weather variations and burning. *Invasive Plant Science Management* 3: 402-411.
- Rowley, J. R. 1973. Formation of pollen exine bacules and microchannels on a glycolyx. *Grana* 13: 129-138.
- . 1981. Pollen wall characters with emphasis upon applicability. *Nordic Journal of Botany* 1: 357-380.

- , 1986. A model for plasmodesmata. *En Cresti, M. & D. Dallai (eds.). Biology of reproduction and cell motility in plants and animals. University of Siena, Siena, p. 175-180.*
- , 1987. Plasmodesmata-like processes of tapetal cells. *Cellule 74: 229-241.*
- , 1988. Substructure within the endexine, an interpretation. *Journal of Palynology 24: 29-42.*
- , 1990. The fundamental structure of the pollen exine. *Plant Systematic and Evolution (Suppl.): 5:13-29.*
- , 1995. Are the endexines of pteridophytes, gymnosperms and angiosperms structurally equivalent?. *Review of Palaeobotany and Palynology 85(1): 13-34.*
- , A. O. Dahl & J. S. Rowley. 1980. Coiled construction of exinous units in pollen of *Artemisia*. En: G. W. Bailey (ed.). 38 th Annual Meeting of Electron Microscopy Society of America. *Claitor's Baton Rouge, La., p. 252-253.*
- , ----- & -----, 1981. Substructure in exines of *Artemisia vulgaris* (Asteraceae). *Review Palaeobotany Palynology 35: 1-38.*
- & A. O. Dahl. 1982. A similar substructure for tapetal surface and exine "tuft"-units. *Pollen Spores 24: 5-8.*
- & D. Claugher. 1996. Structure of the exine of *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Grana 35(2): 79-86.*
- , D. Claugher & J. Skvarla. 1999. Structure of the exine in *Artemisia vulgaris* (Asteraceae): a review. *Taiwania 44:1-21.*
- & J. J. Flynn. 1971. Migration of lanthanum through the pollen wall. *Cytobiologie 3: 1-12.*
- & J. J. Skvarla. 2006. Pollen development in *Epilobium* (Onagraceae): late microspore stages (a review). *Review of Palaeobotany and Palynology 140(1): 91-112.*
- , J.J. Skvarla & G. El-Ghazaly. 2003. Transfer of material through the microspore exine from the loculus into the cytoplasm. *Canadian Journal of Botany 81: 1070-1082.*
- & S. Nilsson. 1972. Structural stabilization for electron microscopy of pollen from herbarium specimens. *Grana 12(1): 23-30.*

- Sáenz Laín, C. 2004. Glosario de términos palinológicos. *Lazaroa* 25: 93-112.
- Sakagami, C. R. 2006. Pteridofitas do Parque Ecológico da Kablin, Telemâco Borba, Paraná, Brasil. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica pelo Curso de Pós-graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas. *Universidade Federal do Paraná*, Curitiba, Brasil. 197 p.
- Salino, A. & T. E. Almeida. 2008. Pteridófitas do Parque Estadual do Jacupiranga, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22(4): 983-991.
- Schuettpelz, E. & K. M. Pryer. 2007. Fern Phylogeny inferred from 400 leptosporangiate species and three plastid genes. *Taxon* 56: 1037-1050.
- & -----, 2008. Fern Phylogeny. Capítulo 15. En: Ranker, T.A. & C.H. Haufler (eds.). *The Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. Cambridge Univ. Press., Cambridge, p. 395-416.
- Schreiner, I., D. Nafus & D. Pimentel. 1984. Effects of cyanogenesis in bracken fern (*Pteridium aquilinum*) on associated insects. *Ecological entomology* 9(1): 69-79.
- Schwartsburd, P.B. 2010. Dennstaedtiaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB090915>)
- , 2012a. O gênero *Hypolepis* Bernh. (Dennstaedtiaceae) na América do Sul. Doctoral Thesis, Instituto de Biociências, University of São Paulo, São Paulo. Retrieved 2015-07-27, from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-17072012-102608/>
- , 2012b. Three new taxa of *Hypolepis* (Dennstaedtiaceae) from the Brazilian Atlantic Forest, and a key to the Brazilian taxa. *Kew Bulletin* 67: 1-11.
- & J. Prado. 2009. (1911) Proposal to conserve the name *Hypolepis nigrescens* Hook. (Dennstaedtiaceae) against *Hypolepis nigrescens* (Schrad.) Nees (Cyperaceae). *Taxon* 58 (4): 1369.
- & -----, 2011. Typification of *Polypodium rugosulum* Labill. (= *Hypolepis rugosula*, Dennstaedtiaceae), a new subspecies, and a new status for one variety. *Webbia* 66(2): 155-163.
- & -----, 2014. Subspecies of *Hypolepis rugosula* (Dennstaedtiaceae, Pteridophyta) around of the world: morphological and biogeographic perspectives. *Acta Botanica Brasilica* 28(2): 206-226.



- & ----- . A taxonomic revision of the South-American species of *Hypolepis* (Dennstaedtiaceae). *American Fern Journal*: en prensa.
- , M. Boudrie & G. Cremers. 2012. Two new species of *Hypolepis* (Dennstaedtiaceae: Pteridophyta) from Mount Roraima region (N South America) and a revised key for the Guianan species. *Fern Gazette* 19(1): 1–9.
- & P. H. Labiak. 2007. Pteridófitas do Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *Hoehnea* 34(2): 159-209.
- , P. L. De Moraes & K. L. Lopes-Mattos. 2014. Recognition of two morphotypes in eastern South American brackens (*Pteridium*—Dennstaedtiaceae—Polypodiopsida). *Phytotaxa* 170(2): 103-117.
- Sehnem, A. 1972. Pteridaceas. En: Reitz P.R. (Ed.): Flora Ilustrada Catarinense. *Herbario Barbosa Rodriguez*, Itajaí, p. 1-244.
- Selling, O. H. 1946. Studies in Hawaiian Pollen Statistics. Part I: The spores of the Hawaiian Pteridophytes. *Publisher by The Museum*, Honolulu, 87 p.
- Siqueira, C. R. & P. G. Windisch. 1999. Pteridófitas da região noroeste do Estado de São Paulo, Brasil: Dennstaedtiaceae. *Acta Botanica Brasilica* 12(3): 357-365.
- Silva Matos D. M. & T. A. Belinato. 2010. Interference of *Pteridium arachnoideum* (Kaulf.) Maxon. (Dennstaedtiaceae) on the establishment of rainforest trees. *Brazilian Journal of Biology* 70(2): 311-316.
- Simán S. E., A. C. Povey & E. Sheffield. 1999. Human health risks from fern spores? A review. *Fern Gazette* 15: 275–287.
- , A. C. Povey, T. H. Ward, G. P. Margison & E. Sheffield. 2000. Fern spore extracts can damage DNA. *British Journal of Cancer* 83 (1): 69.
- Skarby, A., M. A. Morbelli & J. R. Rowley. 2009. Structure of the Pollen Exine of *Rhoiptelea chiliantha*. *Taiwania* 54(2): 101-112.
- Smith, A. R. 1995. Non-molecular phylogenetic hypotheses for ferns. *American Fern Journal* 85: 104–122.
- , K. M. Pryer, E. Schuettpelz, P. Korall, H. Schneider & P. G. Wolf. 2006. A classification of extant ferns. *Taxon* 55 (3): 405-731.
- Smith, B. L. & A. A. Seawright. 1995. Bracken fern (*Pteridium* spp.) carcinogenicity and human health—a brief review. *Natural toxins* 3(1): 1-5.

- Smith, J. 1846. Additions to the “Hortus Kewensis” [ser. 3]. *Curtis' Botanical Magazine* 2: 1–9.
- Smith, J. 1875. *Historia Filicum*. Macmillan, London, 429 pp.
- Stolze, R.G. 1981. Ferns and fern allies of Guatemala, Part II. Polypodiaceae. *Fieldiana Botany* 6: 1–522.
- Soepadmo, E. & E. E. Khoo. 1977. Spore morphology of Malayan Dennstaedtiaceae sensu Holttum. *Gardens Bulletin Singapore* 30: 85-95.
- Soria, N., R. Degen, I. Basualdo, M. Ortiz, & E. Zardini. 2006. Catálogo de la Flora Vascular de Cordillera de Ybyturuzú, Dpto. Guaira, Paraguay. *Rojasiana* 7(2): 117-152.
- Souza Pereira de, J. B. 2009. Checklist das Samambaias e Licófitas das Florestas Alto-montanas do Parque Estadual Pico Paraná, Brasil. Monografia apresentada ao Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. *Universidade Federal do Paraná*, Curitiba, Brasil. 58 pp.
- Southworth, D. 1986. Substructural organization of pollen exines. En Blackmore S. & I. K. Ferguson (eds.) *Pollen and spores. Form and function*. Academic Press, London, p 61-70.
- Tardieu-Blot, M. L. 1963. Sur les spores de Lindsaeaceae et de Dennstaedtiaceae de Madagascar et des Mascareignes, étude de palynologie appliquée à la systématique. *Pollen Spores* 5(1): 69-86.
- 1966. Sur les spores de fougères malgaches: Filicales (Fin) Marattiales, Ophioglossales. *Polen et spores* 8(1): 75-122.
- Taylor, J. A. 1990. The bracken problem: a global perspective. *AIAS Occasional Publication* 40: 3-19.
- Taylor, W. C., N. T. Luebke & M. B. Smith. 1985. Speciation and hybridisation in North American quillworts. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B, Biological Sciences* 86: 259-263.
- Thomas, W.W., A.M. De Carvalho, A.M. Amorim, J. Garrison & A.L. Arbeláez. 1998. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 7: 311–322.

- Thomson, J. A. 2000. Morphological and genomic diversity in the genus *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). *Annals of Botany* 85(suppl 2): 77-99.
- , 2004. Towards a taxonomic revision of *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). *Telopea* 10(4): 793-803.
- , 2008. Morphotype and conflicting taxonomies in *Pteridium* (Dennstaedtiaceae: Pteridophyta). *Fern Gazette* 18(3): 101-109.
- , 2012. Taxonomic status of diploid southern hemisphere bracken (Pteridium: Dennstaedtiaceae). *Telopea* 14: 43-48.
- , & M. E. Alonso-Amelot. 2002. Clarification of the taxonomic status and relationships of *Pteridium caudatum* (Dennstaedtiaceae) in Central and South America. *Botanic Journal of Linnean Society* 140 (3): 237-248.
- , A. C. Chikuni & C. S. McMaster. 2005. The taxonomic status and relationships of bracken ferns (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) from sub-Saharan Africa. *Botanic Journal of Linnean Society* 148(3): 311-321.
- , J. T. Mickel & K. Mehlreter. 2008. Taxonomic status and relationships of bracken ferns (*Pteridium*: Dennstaedtiaceae) of Laurasian affinity in Central and North America. *Botanic Journal of Linnean Society* 157(1): 1-17.
- Triana-Moreno, L. A. 2012. Caracteres morfológicos en esporas de Polypodiaceae y su aplicación en la reconstrucción filogenética. *Boletín Científico, Centro de Museos, Museo de Historia Natural*, 16(2): 53-59.
- Tressens, S.G., H.A. Keller & V. Revilla. 2008. Las plantas vasculares de la reserva de uso múltiple Guaraní, Misiones (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 43: 273–293.
- Tryon, A. F. 1972. Spores, chromosomes and relations of the fern *Pellaea atropurpurea*. *Rhodora* 74(798): 220-241.
- , 1986. Stasis, diversity and function in spores based on electron microscope survey of the Pteridophyta. *En*: Blackmore S. & I. K. Ferguson (eds.): Pollen and spores: form and function. *Linnean Society Symposium Series* 12: 233-249.
- , 1990. Fern spores: evolutionary levels and ecological differentiation. *Plant Systematic and Evolution (Suppl.)* 5: 71-79.

- & B. Lugardon. 1991. Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies. *Springer-Verlag*, New York, 648 p.
- Tryon, R. M. 1941. A revision of the genus *Pteridium*. *Rhodora* 43: 1-37, 37-67.
- . 1960. A review of the genus *Dennstaedtia* in América. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* 187: 23–52.
- . 1962. Taxonomic fern notes III. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* 191: 91-107.
- . 1964. The ferns of Peru. Polypodiaceae (Dennstaedtiaceae to Oleandreae). *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* 194: 1–253.
- & A. F. Tryon. 1982. Ferns and ferns allies, with special reference to tropical America. *Springer-Verlag*, Berlin, 857 pp.
- & R.G. Stolze. 1989. Pteridophyta of Peru. II, 13. Pteridaceae – 15. Dennstaedtiaceae. *Fieldiana Botany New Series* 22: 1–128.
- Tschudy, R.H. & B. D. Tschudy. 1965. Modern fern spores of Rancho Grande, Venezuela. *Acta Botanica Venezuelica* 1: 9-71.
- Van Campo, M. & B. Lugardon. 1973. Structure grenue infratectale de l'ectexine des pollens de quelques Gymnospermes et Angiospermes. *Pollen et Spores* 15: 171–187.
- Van Cotthem, W. 1977. Comparative morphological study of the stomata in the Filicopsida. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique/Bulletin van de Nationale Plantentuin van Belgie* 40: 81-239.
- Vareschi, V. 1968. Flora de Venezuela. Vol.1. *Instituto Botánico*, Caracas, 1033 pp.
- Villalobos-Salazar, J., J. Mora, A. Meneses, & B. Pashov. 1995. The carcinogenic effects of bracken spores. *Bracken: an environmental issue*, 102-103.
- Wagner, W. H. 1968. Hybridization, taxonomy, and evolution. Chapt. 9. *En*: Heywood V. H. (ed.), *Modern methods in plant taxonomy*. *Academic Press*, Londres, p. 113-138.
- . 1974. Structure of spores in relation to fern phylogeny. *Annals of Missouri Botanical Garden* 61: 322-353.
- . 1980. A probable new hybrid grapefern, *Botrychium matricariifolium* x *simplex*, from central Michigan (Pteridophyta). *Michigan Botanist* 19(1): 31-36.

- , F. S. Wagner & W. C. Taylor. 1986. Detecting abortive spores in herbarium specimens of sterile hybrids. *American Fern Journal* 76(3): 129-140.
- & K. E. Boydston. 1958. A new hybrid Spleenwort from artificial cultures at fernwood and its relationships to a peculiar plant from West Virginia. *American Fern Journal* 48 (4): 146-159.
- & K. L. Chen. 1965. Abortion of spores and sporangia as a tool in the detection of *Dryopteris* hybrids. *American Fern Journal* 55: 9-29.
- Walker, T. G. 1973. Evidence from cytology in the classification of ferns. *En: Jermy, A. C., J. A. Crabbe & B. A. Thomas. The phylogeny and classification of the ferns. Botanical Journal of the Linnean Society of London (Suppl.)* 67: 91-110.
- Wang, A., Q. Xia, W. Xie, R. Datla, & G. Selvaraj. 2003. The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24): 14487-14492.
- Welman, W. G. 1970. The South African Fern Spores, Part VI. *En: Van Zinderen Bakker S. R. (ed.). South African Pollen Grains and Spores. A. A. Balkema, Cape Town, 110 p.*
- Willyams, D. & M. I. Daws. 2014. Mass propagation of Austral Bracken Fern (*Pteridium esculentum*) sporophytes from in vitro gametophyte cultures. *South African Journal of Botany* 91: 6-8.
- Wittborn, J., K. V. Rao, G. El-Ghazaly & J. R. Rowley. 1996. Substructure of spore and pollen grain exines in *Lycopodium*, *Alnus*, *Betula*, *Fagus* and *Rhododendron*: Investigation with Atomic Force and Scanning Tunnelling Microscopy. *Grana*, 35(4): 185-198.
- , -----, ----- & -----, 1998. Nanoscale Similarities in the Substructure of the Exines of *Fagus* Pollen Grains and *Lycopodium* Spores. *Annals of Botany* 82(2): 141-145.
- Wolf, P. G. 1995. Phylogenetic Analyses of *rbcL* and Nuclear Ribosomal RNA Gene Sequences in Dennstaedtiaceae. *American Fern Journal* 85(4): 306-327.

- , P. S. Soltis & D. S. Soltis. 1994. Phylogenetic relationships of dennstaedtioid ferns. Evidence from rbcL sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 83-392.
- Yuehong, Y., Q. Xinping, W. Liao, F. Xing, D. Mingyan, W. Faguo, Z. Xianchun, Z. Wu, S. Serizawa, J. Prado, M. Funston, M. G. Gilbert & P. N. Hans. 2004. Dennstaedtiaceae. *En: Flora of China*, vol 2. Disponible en [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=10262](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10262) (Acceso: 10/08/2014).
- Yañez, A., G.J. Marquez, M.A. Morbelli. 2012. Primer registro de *Dennstaedtia dissecta* (Dennstaedtiaceae) para la flora Argentina. *Darwiniana nueva serie* 50(2): 332-338.
- , C. C. Macluf, A. Mallo, G. E. Giudice, L. Pasarelli, G. J. Marquez, J. P. Ramos Giacosa, M. A. Morbelli, M. R. Piñeiro, M. Copello, D. Nitiu, S. Kelly, M. Quetglas & C. San Martín. 2014. La colección de preparados palinológicos de la Cátedra de Palinología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Buenos Aires, Argentina. *Boletín de la Asociación Latinoamericana de Paleobotánica y Palinología* 14: 55-69.
- Ybert, J. P., M. A. Carvalho & R. Scheel-Ybert. 2012. Dicionário temático de morfologia esporopólica. *Museu Nacional - Série Livros*, Rio de Janeiro, 47 pp.
- Zhang X., B. D. Liu & Y. Tan. 2008. Gametophyte Development of *Microlepia strigosa* and *M. platyphylla* (Dennstaedtiaceae). *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 16(3): 249-254.
- Zuloaga, F. O., O. Morrone & M. Belgrano. 2008. Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur. Vol 1. Pteridophyta, Gymnospermae y Monocotyledonae. *Monographs in Systematic from the Missouri Botanical Garden* 107.

### **Imágenes de portadas**

*Dennstaedtia cornuta* (vista general): [www.fernsoftheworld.com](http://www.fernsoftheworld.com) (Acceso: 05/10/2015)

*Microlepia speluncae* (vista general del esporofito y detalle de soros):

<http://www.natureloveyou.sg/> (Acceso: 28/09/2015)

*Blotiella lindeniana* (vista general del esporofito y detalle de lámina fértil):

<http://www.plantsystematics.org/> R. Moran (2012). (Acceso 09/05/2014)

*Paesia glandulosa* (vista general del esporofito y detalle de lámina fértil):

<http://www.plantsystematics.org/> R. Moran (2005). (Acceso 02/10/2015).

*Histiopteris incisa*: <http://www.plantsystematics.org/> J. E. Barcelona (2013) (vista general del esporofito), P. B. Pelsner (2011) (detalle de la lámina fértil).

*Hypolepis stolonifera* (vista general): Gentileza de Pedro Bond Schwartzburd.

*Hypolepis repens* (vista general): Gentileza de Marcelo Arana

*Hypolepis x paulistana* (vista general): foto extraida de Scwartzburd 2012.

*Hypolepis rugosula* (vista general del esporofito y detalle de lámina fértil): Gentileza de Pedro Bond Schwartzburd.