

# Germinación de esporas y gametofitos de *Polystichum montevidense* (Spreng.) Rosenst. (*Dryopteridaceae*)

Cristina J. Chambi<sup>1</sup>, Rubén M. Cardozo<sup>1</sup> y Olga G. Martínez<sup>1,2</sup>

**Resumen:** Chambi, C. J.; Cardozo, R. M. & Martínez, O. G. 2013. Germinación de esporas y gametofitos de *Polystichum montevidense* (Spreng.) Rosenst. (*Dryopteridaceae*). *Bot. Complut.* 37: 47-52.

Se presentan características sobre la germinación de las esporas, el desarrollo gametofítico y la estructura de los gametofitos adultos de *Polystichum montevidense* (Spreng.) Rosenst. obtenidos mediante cultivos estériles. Se encuentra que los esporangios originan 32 esporas monoletes con perisporio crestado. La germinación es de tipo *Vittaria* y se produce a los tres días después de la siembra. El desarrollo de los gametofitos corresponde al tipo *Aspidium*. Los gametofitos laminares producen un solo tipo de tricomas glandulares con secreción de naturaleza lipídica, distribuidos sobre el margen de la lámina y unos pocos sobre la superficie. Se cita por primera vez la presencia de gotas de aceite en las células de los gametofitos adultos. La expresión sexual se manifiesta en gametofitos de más de 100 días de edad, originándose solamente gametofitos femeninos. Se ilustra con fotografías obtenidas con microscopios de luz y microscopio electrónico de barrido.

**Palabras clave:** esporas, arquegonios, lípidos, tricomas, *Dryopteridaceae*.

**Abstract:** Chambi, C. J.; Cardozo, R. M. & Martínez, O. G. 2013. Germination of spores and gametophytes of *Polystichum montevidense* (Spreng.) Rosenst. (*Dryopteridaceae*). *Bot. Complut.* 37: 47-52.

A description is made of characteristics of the germination of spores, gametophytic development and adult gametophyte structure of *Polystichum montevidense* (Spreng.) Rosenst. obtained by sterile culture. It was found that sporangia produce 32 monoete spores with crested perispore. The germination of *Vittaria*-type spores occurs three days after sowing. Gametophyte development is of the *Aspidium* type. The laminar gametophytes have only one type of glandular trichomes, with secretion of trichomes has a lipid nature, distributed on the edge of the lamina and a few on the surface. It is reported for the first time that adult gametophyte cells have oil droplets. Sexual expression is manifested in gametophytes of more than 100 days old, with only female gametophytes. All this is illustrated with pictures recorded with light microscopes and a scanning electron microscope.

**Key words:** spores, archegonia, lipids, trichomes, *Dryopteridaceae*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Polystichum* Roth (*Dryopteridaceae*) tiene su centro de origen en el sudeste de China, se caracteriza por su amplia diversidad en las regiones subtropicales del viejo y nuevo mundo; comprende unas 200 especies, la tercera parte se encuentra en las regiones montañosas de neotrópico y la restante en el paleotrópico (Barrington 2011, Little & Barrington 2003). Este género presenta variabilidad morfológica en sus esporofitos como producto de la frecuente hibridación y apogamia, lo que ocasiona dificultad en la identificación de los taxones (Barrington 1985, Mullenniex *et al.* 1999, Kessler *et al.* 2005).

*Polystichum montevidense* (Spreng.) Rosenst. crece en el continente americano, en Ecuador, Brasil, Uruguay y Argentina, habita en bosques húmedos o semihúmedos, entre los 1500-2500 m s.m. Sobre las características de los gametofitos de *Polystichum*, se menciona que el tipo de germinación de las esporas corresponde al tipo *Vittaria*, el desarrollo gametofítico al tipo *Aspidium* y *Adiantum*, y en los gametofitos laminares se describe la presencia de indumento formado por tricomas (Chandra & Nayar 1970, Gabriel y Galán & Prada 2010, Nayar & Kaur 1971, Nazario-Galindo & Arreguín-Sánchez 2007, Migliaro & Gabriel y Galán 2012). Además, se ha encontrado que los gametofitos de *P. acrostichoides* (Michx.) Schott producen anteridiógenos (Greer & McCarthy 1997), los de *Polysti-*

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, CP 4400 Salta, Argentina. janet.unsa8@gmail.com; cardozo\_rm@yahoo.com.ar

<sup>2</sup> IBIGEO – CONICET, Mendoza 2, CP 4400 Salta, Argentina. corresponding autor: martinezog@gmail.com

Recibido: 3 abril 2013. Aceptado: 15 abril 2013.

*chum setiferum* (Forssk.) Moore ex Woyn. forman paracrístales en sus células (Muccifora & Gori 1997) y los de *Polystichum retroso-paleaceum* (Kodama) Tagawa son capaces de resistir temperaturas por debajo del punto de congelación (Sato & Sakai 1980).

La finalidad de este trabajo es estudiar la germinación de las esporas, el desarrollo gametofítico y la estructura de los gametofitos adultos, de *P. montevidense*, mediante microscopía óptica y electrónica, con el objeto de aportar información al conocimiento de la biología reproductiva de los helechos o que pueda ser considerada entre los caracteres de *P. montevidense* cuando se realicen revisiones taxonómicas, pues según Barrington (2011) es necesario estudiar este taxón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El material para este estudio proviene del noroeste argentino, corresponde a los ejemplares Martínez & Chambi 2046, Chambi 287, depositados en el Herbario MCNS (Herbario del Museo de Ciencias Naturales de Salta).

La obtención de esporas se realizó colocando secciones de láminas con soros maduros en sobres de papel, al cabo de 48 hs. las esporas se recogieron y se conservaron en frascos de vidrios estériles. El tamaño de las esporas se registró a partir de preparaciones transitorias para microscopio de luz, se consideraron 100 esporas para obtener promedios. La determinación del número de esporas por esporangio, se realizó aislando cápsulas de 20 esporangios cerradas que se rompieron por presión entre porta y cubreobjeto. En la siembra de esporas se utilizaron esporas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10% v/v durante diez minutos; las siembras se realizaron en diez cápsulas de petri estériles, de 5 cm de diámetro con medio de cultivo de Dyer gelificado con 9 g/L de agar y se mantuvieron en cámara de crecimiento a  $25 \pm 2$  °C, con fotoperiodo de 10 horas de luz e intensidad luminosa de  $10 \text{ W.m}^{-2}$ .

Para evaluar la germinación, se realizaron observaciones en períodos regulares cada siete días, durante 63 días, en cada observación se evaluaron tres campos por cada cápsula, se determinaron cantidad de esporas germinadas y sin germinar (se consideró como espора germinada a la emisión del rizoides); para evaluar el progreso de la germinación en el transcurso del tiempo se realizó un análisis de regresión lineal, transformando los datos de los porcentajes de germinación en valores logarítmicos con base 10; los resultados se graficaron con Infostat (2008).

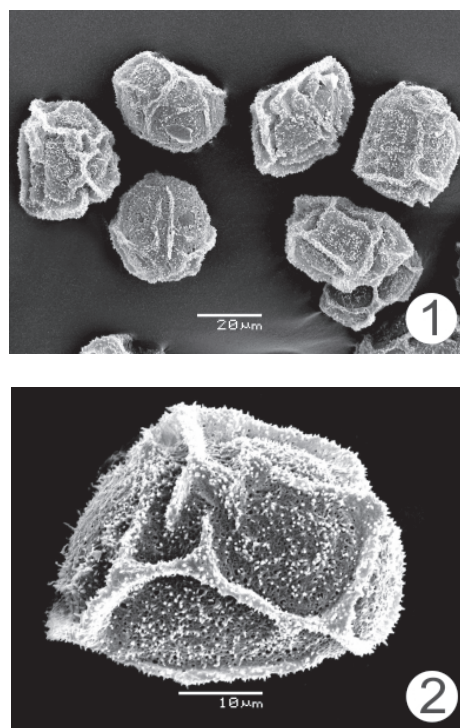
Para la descripción de las etapas del desarrollo gametofítico, se consideró como la edad del gametofito, al tiempo transcurrido desde la germinación de la espора. Para detectar lípidos en los gametofitos se utilizó Sudan IV (D'Ambrogio 1986). Para las observaciones con microscopía electrónica de barrido, las esporas se montaron directamente sobre platina metálica

con cinta de grafito y se cubrieron con una película de oro, y los gametofitos fueron fijados previamente con glutaraldehído al 2 %, secados con punto crítico y cubiertos con una película de oro. Las ilustraciones se lograron con microscopio óptico Zeiss modelo Stándar 16 y microscopía electrónica de barrido JEOL JSM 6480 LV, pertenecientes a la Universidad Nacional de Salta.

## RESULTADOS

Los esporangios de *Polystichum montevidense* tienen 32 esporas; las esporas son monoletes, elipsoidales en vista ecuatorial y esferoidales en vista polar, castañas, de  $34(40)44 \times 28(32)37 \mu\text{m}$ . Presentan perisporio plegado, formando crestas que se entrecruzan originando un retículo con areolas irregulares entre ellas (Fig. 1, 2). El 12 % de las esporas presentan tamaño reducido, sin contenido celular o esporas del tamaño de las normales pero con paredes colapsadas.

La germinación de las esporas comienza a los tres días después de la siembra. En cada control se registran cantidades semejantes de esporas germinadas y sin ger-



Figuras 1–2. Esporas de *Polystichum montevidense*. 1: esporas monoletes de contorno elipsoidal a esferoidal. 2: detalle del perisporio plegado.

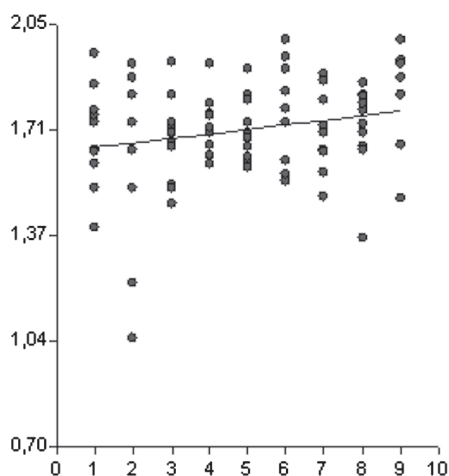


Figura 3. Relación entre porcentaje de germinación (escala Log10) y cantidad de semanas, la recta indica la relación entre estas variables ( $y_i = 1,64 + 0,01x_i$ ).

minar, excepto en la octava semana (56 días después de la siembra) donde se observa la mayor cantidad de esporas germinadas del período de observaciones. La germinación incrementa significativamente en el transcurso del tiempo, así lo indica el análisis de regresión ( $b = 0,01$ ;  $p = 0,0321$ ) (Fig. 3). Al finalizar el período del control de la germinación, a los 63 días, se tiene que sobre un total de 1538 esporas observadas germina el 50 %.

Inmediatamente después de emerger el rizoides se origina, en sentido perpendicular, la primera célula con clorofila llamada célula protálica, que dará origen al gametofito, este tipo de germinación se denomina tipo *Vittaria*. La célula protálica se divide para formar un filamento uniseriado con cinco a seis células, a los cinco días desde que germinan las esporas; la célula apical del filamento se divide en sentido transversal, luego le siguen divisiones celulares en diferentes direcciones en las células distales, transformándose el gametofito en una pequeña lámina de aspecto espatular a los 10-12 días, hasta que se origina un tricoma en el extremo distal, momento donde cesa el crecimiento en longitud y se desarrolla una lámina asimétrica, este tipo de desarrollo gametofítico corresponde al tipo *Aspidium*. Cuando la lámina aumenta de tamaño, continúan formándose tricomas sobre el margen. Los tricomas son bicelulares, con una célula basal larga o corta, que forma el pie, y una célula globosa secretora en el extremo, la secreción consiste en la producción de filamentos translúcidos, que forman una densa masa que rodea a la célula. Tanto la célula glandu-

lar como la secreción se tiñen de rojo con Sudan IV, indicando su naturaleza lipídica.

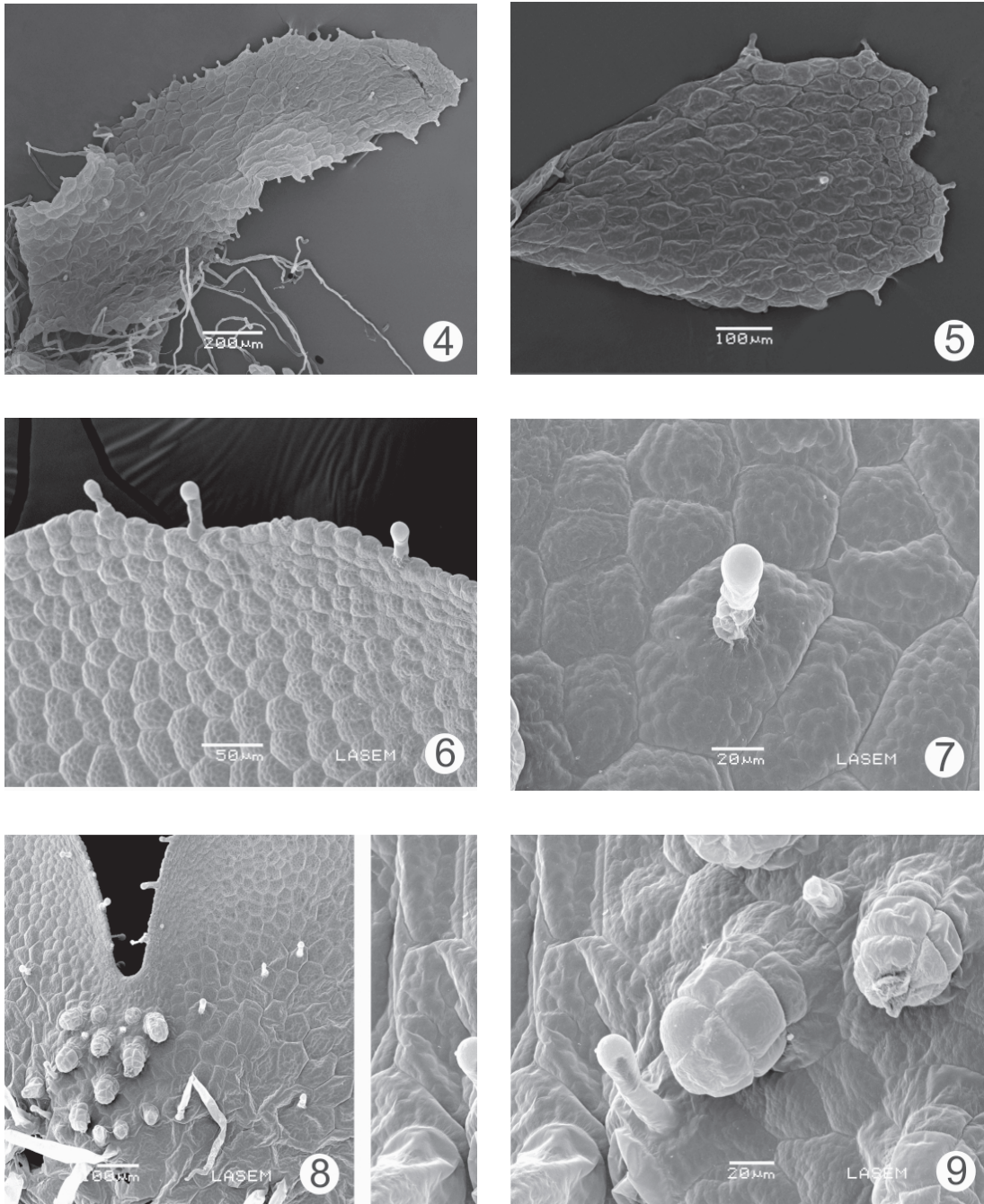
Los gametofitos laminares jóvenes son asimétricos, en la etapa adulta, 60 días después de la siembra, adoptan forma alargada a cordada (Fig. 4, 5), con tricomas glandulares marginales y unos pocos dispersos sobre la superficie adaxial y abaxial (Fig. 6, 7). Los gametofitos adultos son cordiformes alargados con abundantes tricomas (Fig. 10), las células de la lámina presentan pequeñas gotas de aceite, que se observan refringentes con microscopio de luz (Fig. 11).

La fase sexual se manifiesta a partir de los 100 días con el desarrollo de los arquegonios sobre la superficie ventral, por debajo de la escotadura (Fig. 8). La estructura de los arquegonios corresponde al tipo característico de los helechos leptosporangiados, con cuellos formados por cuatro hileras de células con cuatro células cada una (Fig. 9). Los gametofitos mantenidos durante 15 meses, no desarrollan anteridios, ni esporofitos apogámicos.

## DISCUSIÓN

El tamaño, color, forma y ornamentación de las esporas de *P. montevidense*, se encuentran entre los rangos citados para este género por Tryon & Lugardon (1990), no se registran datos de otros autores referidos a la especie en estudio, por lo que la información lograda se considera de interés para caracterizar a la especie. La cantidad de esporas, 32 por esporangio, es una característica que hace presumir que la reproducción podría ser apogámica (Knobloch 1966), tal como ocurre en *Polystichum tsussimense* J. Smith (Patterson 1942), sin embargo en la especie estudiada no se encontraron esporofitos durante los 15 meses que se mantuvieron los cultivos.

La germinación de las esporas, tipo *Vittaria*, la cantidad de células que componen los gametofitos filamentosos y el tipo de desarrollo gametofítico, tipo *Aspidium*, observados en *P. montevidense* son caracteres compartidos con otras especies de *Polystichum*, tales como *P. polyblepharum* C. Presl, *P. ordinatum* (Kunze) Liebm., *P. pycnolepis* (Kunze ex Klotzsch) T. Moore (Gabriel y Galán & Prada 2010, Nazario-Galindo & Arreguín-Sánchez 2007, Migliaro & Gabriel y Galán 2012). El desarrollo gametofítico, tipo *Aspidium*, evidentemente es el más frecuente en *Dryopteridaceae* ya que ha sido mencionado para otros géneros como, *Arachniodes*, *Dryopteris* y *Elaphoglossum* (Mendoza et al. 1999b, Pérez-García et al. 2001, Stokey & Atkinson 1957); además se ha encontrado el tipo *Adiantum* en *Ca-*



Figuras 4–9. Gametofitos laminares. **4:** gametofito laminar alargado. **5:** gametofito laminar cordado. **6:** detalle de tricomas sobre el margen de la lámina. **7:** detalle de tricoma sobre la superficie de la lámina. **8:** arquegonios ubicados por debajo de la escotadura. **9:** detalle del cuello del arquegonio mostrando las cuatro hileras de células con cuatro células cada una, obsérvese delante un tricoma superficial.

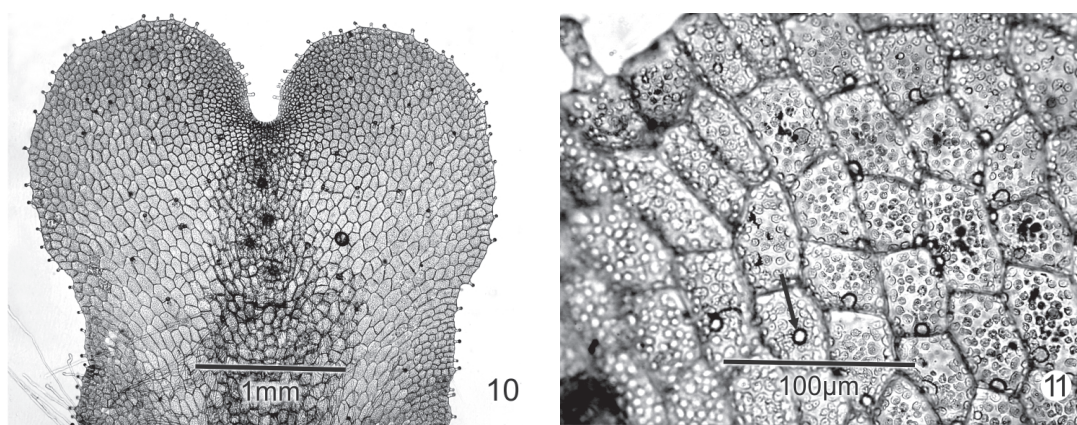


Figura 10–11. Gametofitos adultos. **10:** detalle del gametofito adulto, cordiforme alargado, mostrando tricomas y arquegonios por debajo de la escotadura. **11:** células del gametofito con gotas de aceite (flecha señala gotas de aceite).

*Ilipteris* y *Didymochlaena* (Mendoza *et al.* 1999, Pacheco & Riba 2003).

Los gametofitos laminares con tricomas son frecuentes en *Dryopteridaceae* según Nayar & Kaur (1971). Autores como Gabriel y Galán & Prada (2010), Nayar & Kaur (1971), Nazario-Galindo & Arreguín-Sánchez (2007) describen diferentes tipos de tricomas, unicelulares, septados, glandulares y no glandulares, sin referirse a la naturaleza de la secreción. En *P. montevidense* la forma de los tricomas es semejante a lo expuesto para *P. ordinatum* (Nazario-Galindo & Arreguín-Sánchez 2007) aunque la presencia de lípidos parece ser un carácter particular para *Polystichum*, pues tanto *P. montevidense* como *P. polyblepharum* (Migliaro & Gabriel y Galán 2012) presentan secreción lipídica. Otros helechos también producen lípidos, aunque diferentes, tales como los descritos para *Notholaena* y *Argyrochosma* (Johnson *et al.* 2012, Gabriel y Galán 2011), éstos helechos son de ambientes xerófilos, muy diferente al de *P. montevidense* que crece en el sotobosque de selvas húmedas.

Los lípidos en forma de gotas de aceites, se observan en la mayoría de los helechos desde la germinación de las esporas, hasta la formación del primer rizoides y las primeras células del gametofito (Raghavan 1989), pero no es habitual encontrar dichas gotas de aceite durante la fase laminar adulta, como se observa en *P. montevidense*, es probable que estos lípidos constituyan una fuente de reserva o eviten la deshidratación de los gametofitos expuestos en la superficie del sustrato.

La expresión sexual de los gametofitos en *Polystichum* es variada, se han encontrado gametofitos masculinos, femeninos y/o bisexuales en *P. aculeatum* (L.) Schott, *P. lonchitis* (L.) Roth, *P. ordinatum*, *P. pycnolepis* y *P. setiferum*

(Pangua *et al.* 2003, Nazario-Galindo & Arreguín 2007, Gabriel y Galán & Prada 2010, Muccifora & Gori 1997). En *P. montevidense* se desarrollan solamente gametofitos femeninos, con arquegonios de estructura típica a los helechos leptosporangiados, como lo descrito para otras especies de *Polystichum*.

Autores como Gabriel y Galán & Prada (2010), Nazario-Galindo & Arreguín (2007) y Pangua *et al.* (2003) han mencionado la formación de esporofitos de origen sexual o apogámico, entre 90–395 días desde la siembra de las esporas, sin embargo, en este trabajo no se desarrollaron durante los quince meses que se desarrolló la experiencia.

La cantidad de esporas, la falta de producción de esporofitos, la presencia de lípidos en los tricomas y en los gametofitos son caracteres encontrados en *P. montevidense* que podrían estar relacionados con factores ambientales y/o factores genéticos que merecen ser tenidos en cuenta para futuros estudios sobre *P. montevidense*, pues Barrington (2011) indica que *Polystichum* necesita una revisión y Kessler *et al.* (2005) se refieren a *P. montevidense* como un complejo de especies debido a la dificultad que presentan al momento de su determinación.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Silvia Blanco y a Carlos Gómez por el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del LASEM, al Laboratorio de Introducción a la Biología, Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Nacional de Salta por facilitar las instalaciones y los evaluadores anónimos por las sugerencias realizadas. Este proyecto fue financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta.

## BIBLIOGRAPHY

- BARRINGTON, D. S. 1985. Hybridization in Costa Rican *Polystichum*. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* 86B: 335–340.
- BARRINGTON, D. S. 2011. The fern genus *Polystichum* (Dryopteridaceae) in Costa Rica. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 98: 431–446.
- CHANDRA, P. & NAYAR, B. K. 1970. Morphology of some polystichoid ferns, part 1. The gametophytes of *Arachnoides*, *Cyrtomium* and *Polystichum*. *Bot. J. Linn. Soc.* 63: 265–276.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. *Manual de técnicas en histología vegetal*. Editorial Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires.
- GABRIEL Y GALÁN, J. M. & PRADA, C. 2010. Gametophyte of the Andean fern *Polystichum pycnolepis* (Kunze ex Klotzsch) T. Moore (Dryopteridaceae). *Amer. Fern J.* 100: 103–109.
- GABRIEL Y GALÁN, J. M. 2011. Gametophyte development and reproduction of *Argyrochosma nivea* (Pteridaceae). *Biología* 66(1): 50–54.
- GREER, G. K. & MCCARTHY, B. C. 1997. The antheridiogen neighborhood of *Polystichum acrostichoides* (Dryopteridaceae) on a native substrate. *J. Plant Sci.* 158(6): 764–768.
- INFOSTAT. 2008. *InfoStat versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- JOHNSON, A. K.; ROTHFELS, C. J.; WINDHAM, M. D. & PRYER, K. M. 2012. Unique expression of a sporophytic character on the gametophytes of notholaenid ferns (Pteridaceae). *Amer. J. Bot.* 99(6): 1118–1124.
- KESSLER, M.; SMITH, A. R. & SUNDUE, M. 2005. Notes on the genus *Polystichum* (Dryopteridaceae) in Bolivia, with descriptions of ten new species. *Brittonia* 57: 205–227.
- KNOBLOCH, I. W. 1966. A preliminary review of spore number and apogamy within the genus *Cheilanthes*. *Amer. Fern J.* 56: 163–167.
- LITTLE, D. P. & BARRINGTON, D. S. 2003. Major evolutionary events in the origin and diversification of the fern genus *Polystichum* (Dryopteridaceae). *Amer. J. Bot.* 90: 508–514.
- MENDOZA, A.; PÉREZ-GARCÍA, B. & RIBA, R. 1999a. Morfología y anatomía del gametofito de *Didymochlaena truncatula* (Dryopteridaceae). *Rev. Biol. Trop.* 47(1-2): 93–99.
- MENDOZA, A.; PÉREZ-GARCÍA, B. & RIBA, R. 1999b. Morfogénesis de la fase sexual del helecho *Arachniodes denticulata* (Dryopteridaceae). *Rev. Biol. Trop.* 47(4): 791–797.
- MIGLIARO, G. & GABRIEL Y GALÁN, J. M. 2012. Gametophyte development and reproduction of the Asian fern *Polystichum polyblepharum* (Roem. ex Kunze) C. Presl (Dryopteridaceae, Polypodiopsida). *Plant Biosystems* 146(2): 368–373.
- MUCCIFORA, S. & GORI, P. 1997. Nuclear paracrystals in the fern *Polystichum setiferum* gametophyte. *Amer. Fern J.* 87(1): 12–16.
- MULLENNIEX, A., HARDIG, T. M. & MESLER, M. 1999. Molecular confirmation of hybrid swarms in *Polystichum*. *Systematic Botany* 23: 421–426.
- NAYAR, B. K. & KAUR, S. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev.* 37: 295–396.
- NAZARIO-GALINDO, A. & ARREGUÍN-SÁNCHEZ, M. L. 2007. Descripción del desarrollo del gametofito y primeras fases del esporofito de *Polystichum ordinatum* (Kunze) Liebm. (Dryopteridaceae-Pteridophyta). *Polibotánica* 24: 139–152.
- PACHECO, L. & RIBA, R. 2003. Gametofitos de nueve especies de *Callipteris* y su comparación con otros géneros de la familia *Woodsiaceae*. *Rev. Biol. Trop.* 51(1): 49–58.
- PANGUA, E.; QUINTANILLA, L. G.; SANCHO, A. & PAJARÓN, S. 2003. A comparative study of the gametophytic generation in the *Polystichum aculeatum* group (Pteridophyta). *J. Plant Sci.* 164(2): 295–303.
- PATTERSON, M. T. 1942. Cytology of apogamy in *Polystichum tsussimense*. *Bot. Gaz.* 104: 107–114.
- PÉREZ-GARCÍA, B.; MENDOZA, A.; REYES-JARAMILLO, I. & RIBA, R. 2001. Morfogénesis de la fase sexual de seis especies mexicanas de helechos del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae). *Rev. Biol. Trop.* 49(1): 265–278.
- RAGHAVAN, V. 1989. *Developmental biology of fern gametophytes*. Cambridge, Londres.
- SATO, T. & SAKAI, A. 1980. Freezing resistance of gametophytes of the temperate fern, *Polystichum retroso-paleaceum*. *Can. J. Bot.* 58(10): 1144–1148.
- STOKEY, A. & ATKINSON, L. 1957. The gametophyte of some American species of *Elaphoglossum* and *Rhipidopteris*. *Phytomorphology* 7(3, 4): 275–292.
- TRYON, A. F. & LUGARDON, B. 1990. *Spores of the Pteridophyta*. New York Springer, New York, EEUU.