

Gametófitos y esporófitos jóvenes de cuatro especies de helechos del género *Pteris* (Pteridaceae) naturalizadas en América

Olga G. Martínez

Herbario MCNS, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, 4400 Salta, Argentina; martinezog@gmail.com

Recibido 27-V-2009. Corregido 13-IX-2009. Aceptado 13-X-2009.

Abstract: Gametophytes and young sporophytes of four species of the fern genus *Pteris* (Pteridaceae) naturalized in the American continent. The pantropical fern genus *Pteris* L. has about 250 species of which 60 occur in the American continent. We studied the morphogenesis of the gametophyte, and the morphology of the young sporophytes of four species: *P. cretica*, *P. ensiformis*, *P. multifida* and *P. vittata*, together with a palynological analysis that includes the ability of spores to germinate. Gametophytes were obtained through in vitro culture techniques with agar-gellified Knudson medium. Young sporophytes were placed in earth-sand (3:1) sterile substrate. We used light and SEM microscopy. Trilete spores predominate, but monolete, tetralete, and other types of aperture are often found. The viability of spores is not affected by the variation, so the term spore polymorphism is applied to the condition occurring among these species. Spore polymorphism is similar in *P. cretica* and *P. multifida*. Germination occurs following the *Vittaria* type, 3-7 days after the sowing. Filamentous, 3-5 celled gametophytes were found in *P. cretica*, *P. multifida* and *P. vittata*, and 7-9 celled in *P. ensiformis*. Development of gametophytes takes place following *Adiantum* type and *Ceratopteris* type. The symmetry of the laminae differ in gametophytes, those of *P. ensiformis* and *P. multifida* are similar and differ from the other two species, *P. cretica* and *P. vittata*. Gametophytes of *P. ensiformis*, *P. multifida* and *P. vittata* are bisexual and protandric, while male gametophytes were found in *P. cretica*. Antheridia correspond to the common leptosporangiate type; they are cylindrical in *P. vittata* and ovoid in the other three species. Archegonia necks have 4 rows of 4 cells each. The sporophytes complete their development 3 months after sowing, and have indument close to the adult plants. *P. cretica* shows obligated apogamy. Rev. Biol. Trop. 58 (1): 89-102. Epub 2010 March 01.

Key words: *Pteris*, spores, gametophyte development, young sporophytes, apogamy.

El género *Pteris* L. es pantropical; reúne aproximadamente 250 especies, 60 de las cuales crecen en América. Smith *et al.* (2006) consideran que el origen de este género probablemente no sea monofilético.

Este trabajo tiene como objetivo brindar información sobre la morfogénesis de los gametófitos de cuatro especies de *Pteris* L. naturalizadas en el continente americano, *P. cretica* L., *P. ensiformis* Burm.f., *P. multifida* Poir. y *P. vittata* L. Se realizó además un análisis palinológico relacionado con la viabilidad de las esporas y una descripción de la estructura de los esporófitos jóvenes.

Algunos aspectos de la fase sexual de estos helechos han sido abordados por distintos autores. Laird & Sheffield (1986) analizaron la estructura de los gametangios y su relación con la apogamia en *P. cretica*; Kawakami *et al.* (1995) indujeron la formación de esporófitos apogámicos y estudiaron su morfología en *P. multifida*. La especie más estudiada es *P. vittata*. Ito (1962) determinó la capacidad de regeneración de los gametófitos de esta especie; Kato (1963, 1969) obtuvo callos sometiendo a los gametófitos a períodos de oscuridad y estudió, experimentalmente, el efecto de varios factores sobre ellos; Beri & Bir (1993) determinaron los

cambios bioquímicos producidos por el almacenamiento de las esporas; Prada *et al.* (2008) aportaron datos sobre la expresión sexual de *P. vittata* en relación con el medio de cultivo y Zhang *et al.* (2008) describieron el desarrollo de los gametófitos de *P. ensiformis* y *P. vittata*, entre otras especies prevenientes de China.

Los aportes a la palinología de especies aquí estudiadas fueron realizados por Nayar *et al.* (1964), Erdtman & Sorsa (1971), Huang (1981), Tryon & Tryon (1982), Michelena (1989), Tryon & Lugardon (1991) y Arreguín-Sánchez (1997). La variabilidad morfológica de las esporas en *Pteris* fue presentada por Sladkov (1957), Nayar & Devi (1966), Devi (1977) y Martínez & Morbelli (2009), aunque ninguno de ellos hace referencia a la viabilidad de estas esporas atípicas.

Algunos aspectos morfológicos de los esporófitos jóvenes de *Pteris* fueron descritos por Mendoza *et al.* (1997) para *P. berteroi* Agardh. Huang *et al.* (2006) compararon esporófitos jóvenes de ejemplares diploides y triploides de *P. fauriei* Hieron y Letelier & Peñailillo (2007) se refirieron a *P. chilensis* Desv.

Pteris presenta dificultades en la determinación de sus especímenes, por lo que el aporte de estudios de las primeras etapas de desarrollo del esporófito podría contribuir a un mejor conocimiento del grupo con datos que caractericen a sus taxones y permitan determinarlos desde etapas tempranas en su ambiente natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de gametófitos se realizó mediante cultivos *in vitro*. Los ejemplares de referencia se depositaron en el Herbario "Museo de Ciencias Naturales de Salta", Salta, Argentina (MCNS). Material estudiado: *P. cretica*: **ARGENTINA: Salta**, Quebrada Los Berros, Martínez 820. *P. ensiformis*: **EEUU: California**, Los Angeles, MCNS 1814. *P. multifida*: **EEUU: California**, Los Angeles, MCNS 1810. *P. vittata*: **ARGENTINA: Jujuy**, Libertador General San Martín, Martínez 1399.

Las esporas fueron separadas de restos vegetales con una malla con poros de 80µm, desinfectadas con hipoclorito de sodio 10% acuoso durante 10 minutos y sembradas durante las 2 primeras semanas desde su colección. Se utilizó solución nutritiva de Knudson (modificada por Steeves *et al.* 1955) gelificada con agar 10g/l, con pH ajustado a 6 con ClH, KOH o NaOH al 1%, y esterilizada en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

La siembra se realizó en cápsulas de Petri de 5cm de diámetro y los repiques de gametófitos en frascos de 5cm de diámetro por 7cm de alto. Los cultivos se mantuvieron estériles durante un año en cámara de cultivo a 25±2°C con fotoperiodo de 16 horas de intensidad luminosa de 10W.m⁻². Los esporófitos fueron trasladados a un sustrato estéril formado por 3 partes de tierra y 1 de arena donde se mantuvieron seis meses.

Para el análisis palinológico se consideraron el diámetro polar (DP) y el diámetro ecuatorial (DE) incluidas las ornamentaciones de la pared, salvo en *P. ensiformis*. Las medidas son el resultado del promedio de 20 mediciones por cada ejemplar. Para la descripción de la ornamentación se utilizaron las propuestas de Lellinger & Taylor (1997) y Punt *et al.* (2007). El contenido celular en las esporas se determinó con carmín acético. El estudio palinológico con microscopía de luz se realizó sobre esporas montadas en gelatina-glicerina y, para su estudio, con microscopía electrónica de barrido con esporas montadas sobre tacos de metal con cinta adhesiva doble faz.

Para la obtención de cortes histológicos el material fue fijado y deshidratado con alcohol etílico según D'Ambrogio de Argüeso (1986). La inclusión se realizó en paraplast y los cortes con un espesor de 10µm. Para la coloración se empleó Hematoxilina de Heidenhain y, para el montaje, Bálsamo de Canadá natural.

Para visualizar los gametangios se colocó el material en una solución de hidrato de cloral con unas gotas de fucsina básica (Rodríguez-Ríos 1973) o carmín acético (Klekowski 1969). La presencia de aceites durante la germinación fue determinada con Sudan IV. Para la

observación con microscopio electrónico, los gametófitos se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato y los esporófitos, en F.A.A. (formol, alcohol, ácido acético).

Las frondas juveniles se aclararon con hipoclorito de sodio comercial, diluido en agua en proporción 1:1, y se colorearon mediante la técnica de Foster (1934).

Las observaciones, ilustraciones y fotografías se realizaron con los microscopios Zeiss Standar 16, Zeiss SV 11 y un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM 6 480LL.

RESULTADOS

Esporas: En las cuatro especies estudiadas predominan las esporas triletes, triangulares, con cíngulo ecuatorial, perisporio translúcido y exosporio ornamentado con verrugas en la cara proximal y rugadas con procesos libres o unidos en la cara distal, excepto en *P. ensiformis* que tiene conos en ambas caras.

Además de las triletes, *P. cretica* (Fig. 1 A-C) y *P. multifida* (Fig. 1 D-F) presentan esporas atípicas, con varios tipos de aberturas y, por lo tanto, de formas variadas. Las esporas pueden ser monoletes, tetraletes e intermedias entre monoletes y triletes o entre triletes y tetraletes. Eventualmente se observaron esporas colapsadas. *P. ensiformis* (Fig. 1 G) y *P. vittata* (Fig. 1 H-I) tienen solo esporas triletes. En todos los taxones estudiados se presentan esporas translúcidas sin contenido celular y esporas pequeñas, generalmente colapsadas.

El estudio palinológico se resume en el Cuadro 1.

Desarrollo de los gametofitos: El desarrollo del gametófito comienza cuando la primera división ocurre en sentido paralelo al eje ecuatorial de la espora, originándose dos células desiguales: la más pequeña o proximal, en relación con las futuras divisiones, origina el primer rizoide y la distal o célula protálica origina al gametófito.

CUADRO 1
Estudio palinológico

TABLE 1
Palynological studies

Especie	(DP x DE) μ m	Ornamentación	Morfología (%)
<i>P. cretica</i>	50-65 x 35-50	Cara distal: rugada. Cara proximal: verrucosa.	triletes: 40 monoletes: 5 tetraletes: 5 intermedias: 33 esporas colapsadas o hialinas: 17
<i>P. ensiformis</i>	30-60 x 30-45	Conos en ambas caras.	triletes a globosas: 85 esporas hialinas: 15
<i>P. multifida</i>	40-70 x 30-40	Cara distal: rugada. Cara proximal: verrucosa.	triletes: 79 tetraletes: 2 monoletes: 2 intermedias: 6 esporas colapsadas o hialinas: 11
<i>P. vittata</i>	50-80 x 30-45	Cara distal: reticulada con areolas conteniendo procesos en su interior. Cara proximal: verrucosa con procesos unidos formando muros paralelos al cíngulo ecuatorial.	triletes: 97 esporas pequeñas colapsadas: 3

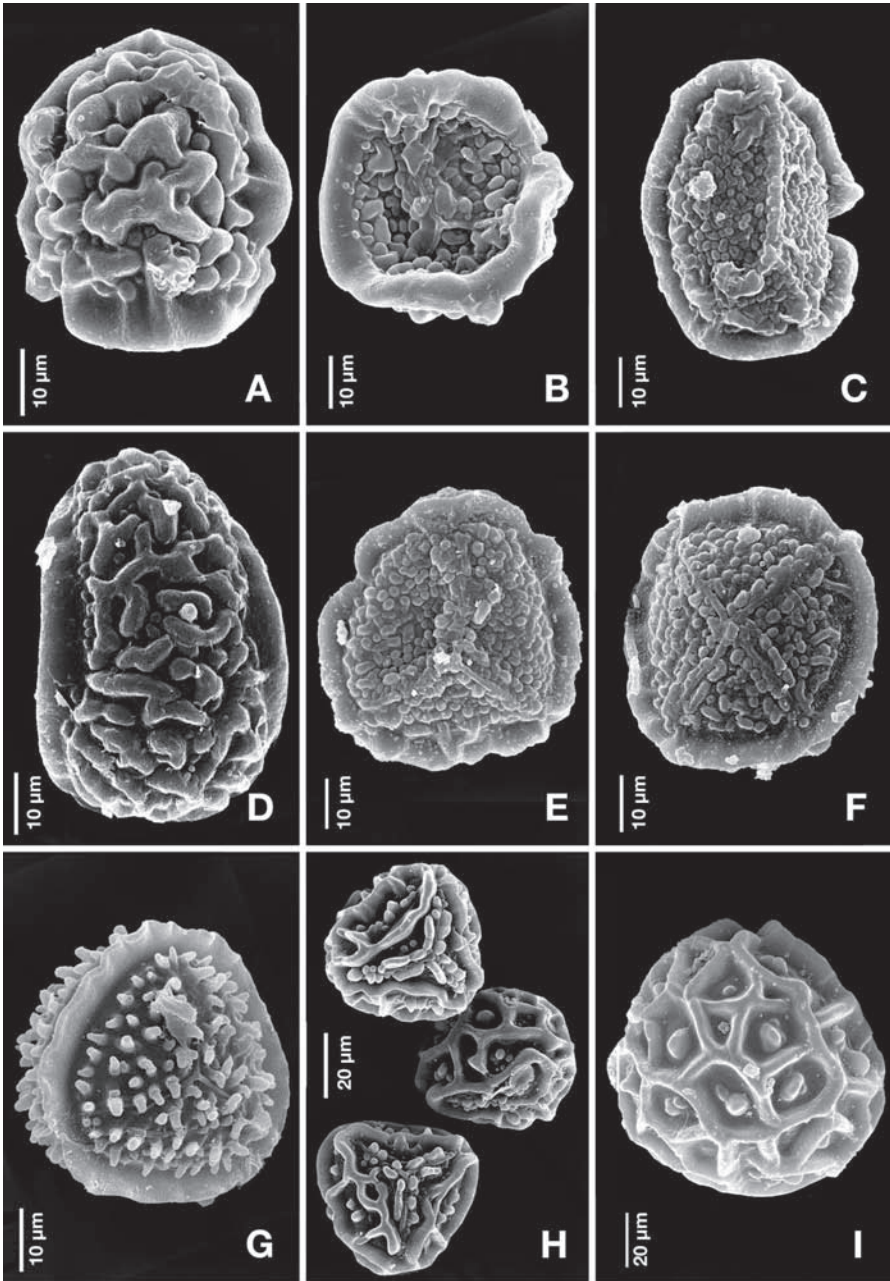


Fig. 1. Esporas de *Pteris*. A-C: *P. cretica*. A: Cara distal de espora trilete. B: Cara proximal de espora intermedia entre trilete y tetralete, colapsada. C: Cara proximal de espora intermedia entre trilete y monolete. D-F: *P. multifida*. D: Cara distal de espora intermedia. E: Cara proximal de esporas trilete. F: Cara proximal de espora tetralete. G: Cara proximal de *P. ensiformis*. H-I: *P. vittata*. H: Cara proximal de dos esporas y una cara distal en vista ecuatorial. I: Cara distal de espora trilete.

Fig. 1. *Pteris* spores. A-C: *P. cretica*. A: Trilete spores distal face. B: Proximal face of intermediate spore between trilete and tetralete, collapsed. C: Proximal face of intermediate spore between trilete and monolete. D-F: *P. multifida*. D: Intermediate spore distal face. E: Trilete spores proximal face of. F: Tetralete spore proximal face. G: *P. ensiformis* proximal face. H-I: *P. vittata*. H: Proximal face of two spores and a distal face in equatorial sight. I: Trilete spore distal face.

El primer rizoide contiene cloroplastos y elaioplastos durante las primeras horas de su crecimiento; luego, estos plástidos se reabsorben y el rizoide se torna incoloro.

La germinación comienza a los 3 días en *P. vittata* y a los 6-7 días en las otras especies (Fig. 2 A, 3 A). Después de 10 días de realizada la siembra, se observa que el porcentaje de germinación es del 97% para *P. vittata*, *P. multifida* (35%), *P. ensiformis* (30%) y *P. cretica* (25%).

El tiempo de germinación de las esporas monoletes, tetraletes e intermedias de *P. cretica* y *P. multifida* es semejante al requerido por las esporas triletes.

La germinación no es un proceso sincrónico; ocurre entre los 30-40 primeros días. Sólo las esporas hialinas y colapsadas permanecen sin cambios en el sustrato después de este tiempo.

El desarrollo de gametófitos filamentosos se origina inmediatamente después de la germinación y la dirección del crecimiento es paralela al eje polar de la espóra.

Los filamentos son cortos con 3-5 células, en *P. cretica*, *P. multifida* y *P. vittata* (Fig. 2 B) o largos, con 7-9 células, en *P. ensiformis* (Fig. 3 B-C). En esta última especie también se observan células protálicas que permanecen indivisas un par de días, alcanzan la longitud de los protalos filamentosos (Fig. 3 D), luego se tabica y continúa su crecimiento como los otros. Los gametófitos filamentosos desarrollan 1-4 rizoides en las células próximas a la espóra.

Este estado perdura 3-4 días; luego, en *P. cretica* y *P. multifida*, la célula distal y la anterior a ésta se dividen en sentido paralelo al eje del filamento y una división oblicua en la célula distal origina una célula meristemática central obcónica.

En *P. ensiformis* y *P. vittata*, la célula distal del filamento y las anteriores a ésta se dividen en sentido paralelo al eje del filamento sin diferenciación de una célula obcónica (Fig. 3 E).

Los gametófitos espatulados son cortos en *P. cretica*, *P. multifida* y *P. vittata* (Fig. 2 C-D) y largos en *P. ensiformis*.

La forma laminar se desarrolla a partir de los 10-14 días desde la siembra de las esporas (Fig. 2 E-F), salvo en *P. vittata* que comienza antes. *P. cretica* y *P. multifida* generan gametófitos laminares con una escotadura central donde la célula obcónica central origina un meristemo pluricelular (Fig. 2 G). *P. ensiformis* y *P. vittata* producen gametófitos laminares amerísticos, asimétricos (Fig. 2 H, 3 F-G) que desarrollan un meristemo pluricelular sobre un lado de la lámina; éste, paulatinamente, queda inserto en una escotadura. La asimetría de los gametófitos laminares de estas dos especies es diferente: *P. vittata* forma hemiláminas semejantes de distintas dimensiones (Fig. 2 J-K) y *P. ensiformis* origina formas irregulares con hemiláminas de morfología variable (Fig. 3 H-L).

Independientemente del tipo de desarrollo gametofítico, a partir de los 14 días se encontraron gametófitos cordiformes con una área central pluriestratificada en las cuatro especies (Fig. 2 L, 3 M).

Los gametófitos maduros, después de los 50 días, emiten en la base 1-3 filamentos, cada uno de los cuales crece y origina un nuevo gametófito laminar (Fig. 2 I). Los nuevos individuos alcanzan rápidamente la forma cordada y se disponen en forma centrípeta uno al lado del otro, sin superponerse. Este proceso se repite en todos los individuos, de manera que se generan colonias con 10 a 40 gametófitos (Fig. 2 M).

Gametangios: Los gametófitos de las cuatro especies son protándricos. *P. cretica* produce anteridios en la zona media de la lámina a partir de los 14 días; *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata* desarrollan anteridios después de los 30 días, cuando los gametófitos alcanzan la forma cordada.

Los anteridios se ubican entre los rizoides o en zonas próximas a éstos. Son del tipo común de los helechos leptosporangiados y están formados por una célula basal, una célula anular y una célula opercular. Tienen forma ovada en *P. cretica*, *P. ensiformis* y *P. multifida* y son más o menos cilíndricos en *P. vittata* (Figs. 5 A-B). El aspecto de los anteridios responde a la forma

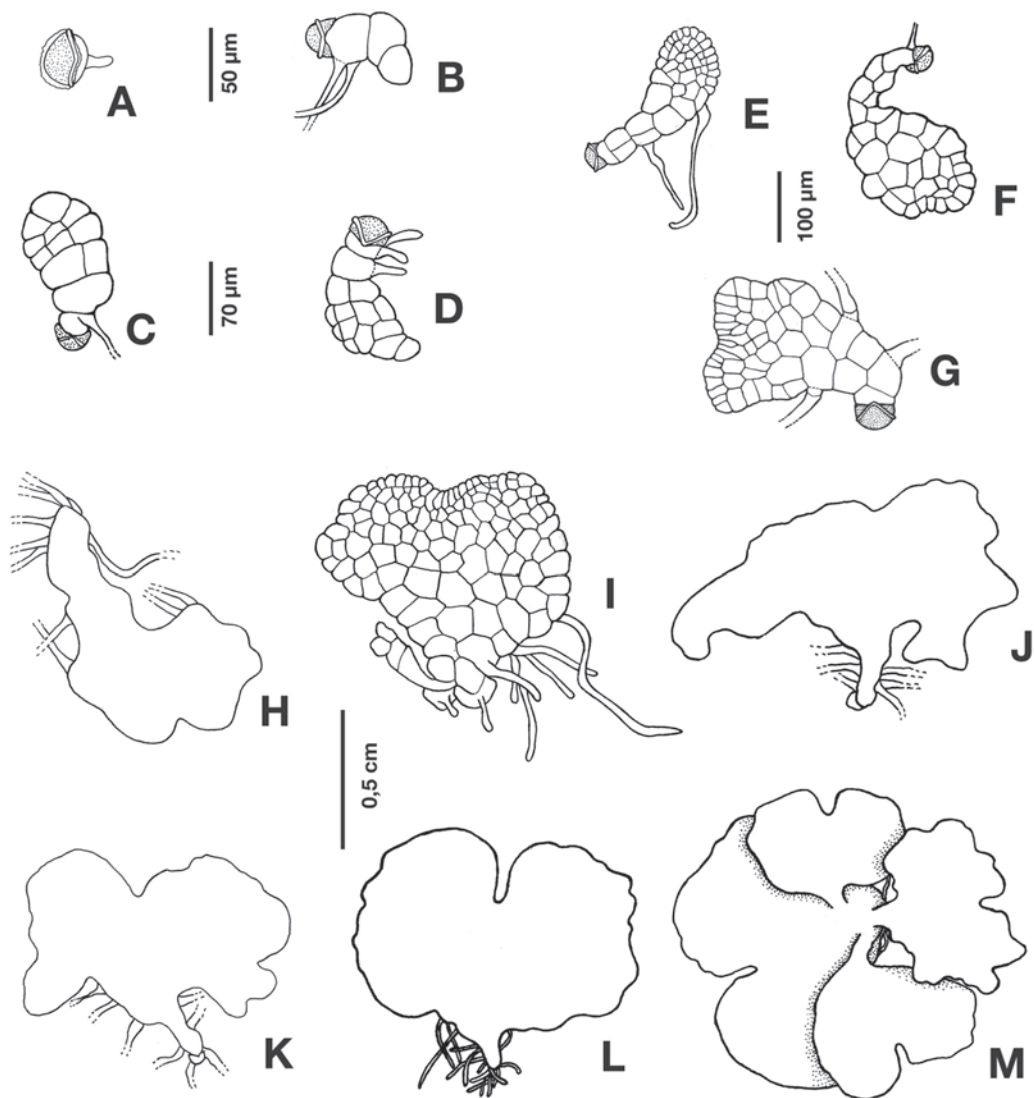


Fig. 2. Desarrollo gametofítico en *Pteris*. A: Germinación de la espora de *P. multifida* (6 días). B: Fase filamentososa de *P. cretica* (8 días). C: Gametófito espatulado de *P. vittata* (5 días). D: *P. vittata* (7 días). E-M: Gametófitos laminares. E: *P. cretica* (10 días). F: *P. multifida* (9 días). G: *P. multifida* (10 días). H: *P. vittata* (14 días). I: *P. cretica* (52 días). J: *P. vittata* (30 días). K: *P. vittata* (30 días). L: *P. cretica* (30 días). M: *P. multifida* (80 días).

Fig. 2. Gametophyte development in *Pteris*. A: *P. multifida* spore germination (6 days). B: *P. cretica* filament stage (8 days). C: *P. vittata* (spatulate gametophyte of 5 days). D: *P. vittata* (7 days). E-M: Laminae stage. E: *P. cretica* (10 days). F: *P. multifida* (9 days). G: *P. multifida* (10 days). H: *P. vittata* (14 days). I: *P. cretica* (52 days). J: *P. vittata* (30 days). K: *P. vittata* (30 days). L: *P. cretica* (30 days). M: *P. multifida* (80 days).

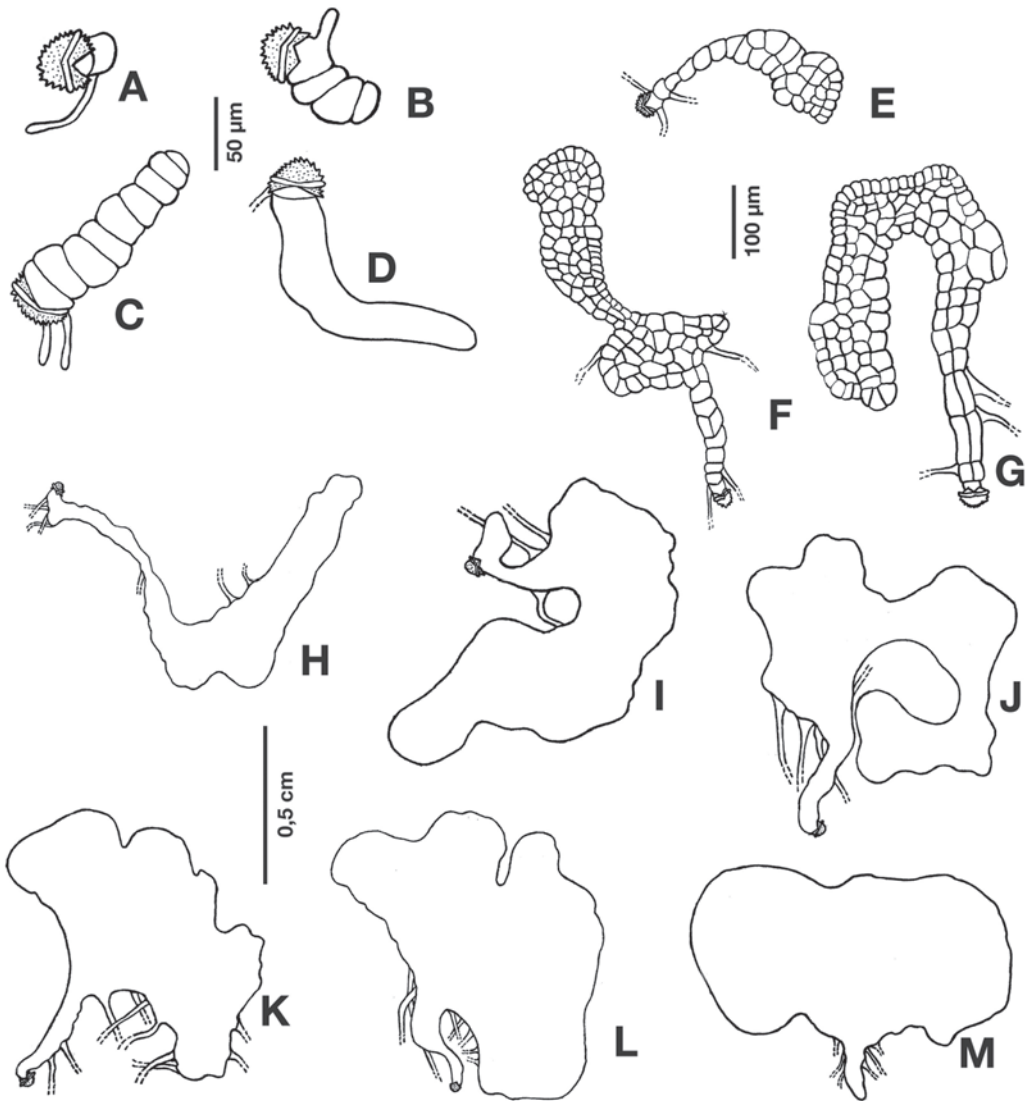


Fig. 3 Desarrollo gametofítico en *P. ensiformis*. A: Germinación de la espora (7 días). B-C: Fase filamentosa. B: Filamento joven (8 días). C: Filamento con nueve células (10 días). D: Célula protálica larga (10 días). E-M: Fase laminar. E: gametófito asimétrico (12 días). F-J: gametófitos irregulares: F-G: 20 días. H: 25 días. I: 27 días. J: 30 días. K-L: Gametófitos laminares asimétricos (30-35 días). M: Gametófito adulto (35 días).

Fig. 3. *P. ensiformis* gametophyte development. A: Spore germination (7 days). B-C: Filament stage. B: Young filament (8 days). C: Nine-cell filament (10 days). D: Long protallic cell (10 days). E-M: Laminar stage. E: Asymmetric gametophyte (12 days). F-J: Irregular gametophytes. F-G: 20 days. H: 25 days. I: 27 days. J: 30 days. K-L: Asymmetric laminar gametophyte (30-35 days). M: Adult gametophyte (35 days).

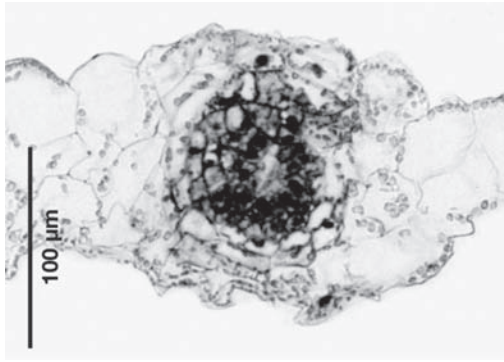


Fig. 4. Anteridios de *P. vittata*. A: Anteridios sobre el lado abaxial del gametófito adulto (50 días). B: Detalle de anteridio con célula anular cilíndrica (50 días).

Fig. 4. *P. vittata* antheridia. A: Adult gametophyte abaxial side antheridia (50 days). B: Detail of antheridium with cylindrical annular cell (50 days).

de la célula anular, que es la que predomina en este gametangio.

Los arquegonios se han encontrado a partir de los 40 días en *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata*. Estos gametangios se ubican sobre el lado abaxial del área central, próximos a

la escotadura de la lámina. Los cuellos de los arquegonios están formados por 4 hileras de 4 células cada una. *P. cretica* no desarrolló arquegonios.

Es frecuente que los gametófitos repicados durante un año formen costillas bifurcadas, gametangios en ambos lados del gametófito y sobre las hemiláminas. En *P. multifida* se han encontrado callos que se originan en el área central como masas blanquecinas que se extienden hasta reemplazar completamente al gametófito.

Esporófitos: Los esporófitos se evidencian a partir de los 3 meses. La primera evidencia de la formación de un embrión ocurre a partir de los 30 días con la aparición de un mamelón sobre la cara abaxial del área central, por debajo del cuello del gametófito (Fig. 4).

En *P. cretica*, esta protuberancia está cubierta por escamas clatradas y castañas, de la que emergen entre 2 y 5 circinos que se despliegan hacia el ápice (Fig. 6 E). Las restantes especies originan 1-2 esporófitos por cada gametófito (Fig. 6 A). En todos los casos, sólo uno de ellos se desarrolla.

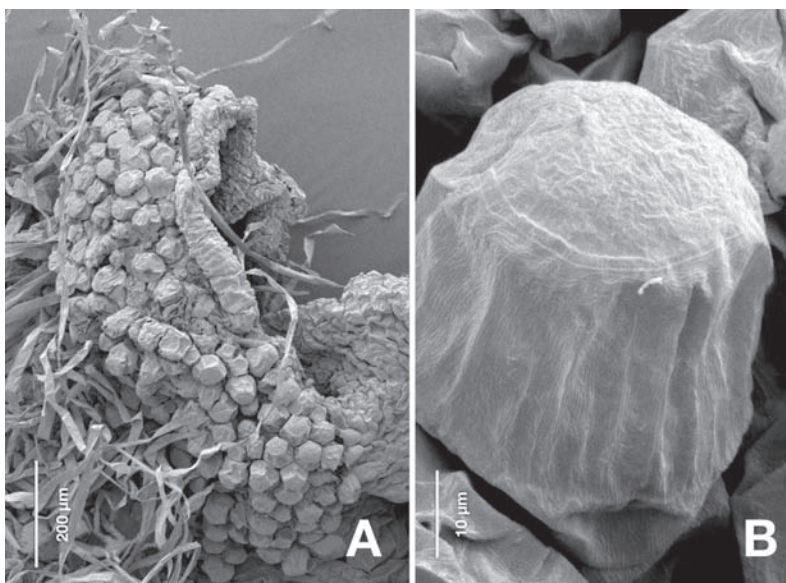


Fig. 5. Corte transversal del gametófito adulto de *P. cretica* mostrando meristemo en área central. (30 días).

Fig. 5. Cross section of *P. cretica*, the adult gametophyte showing a central area meristem (30 days).

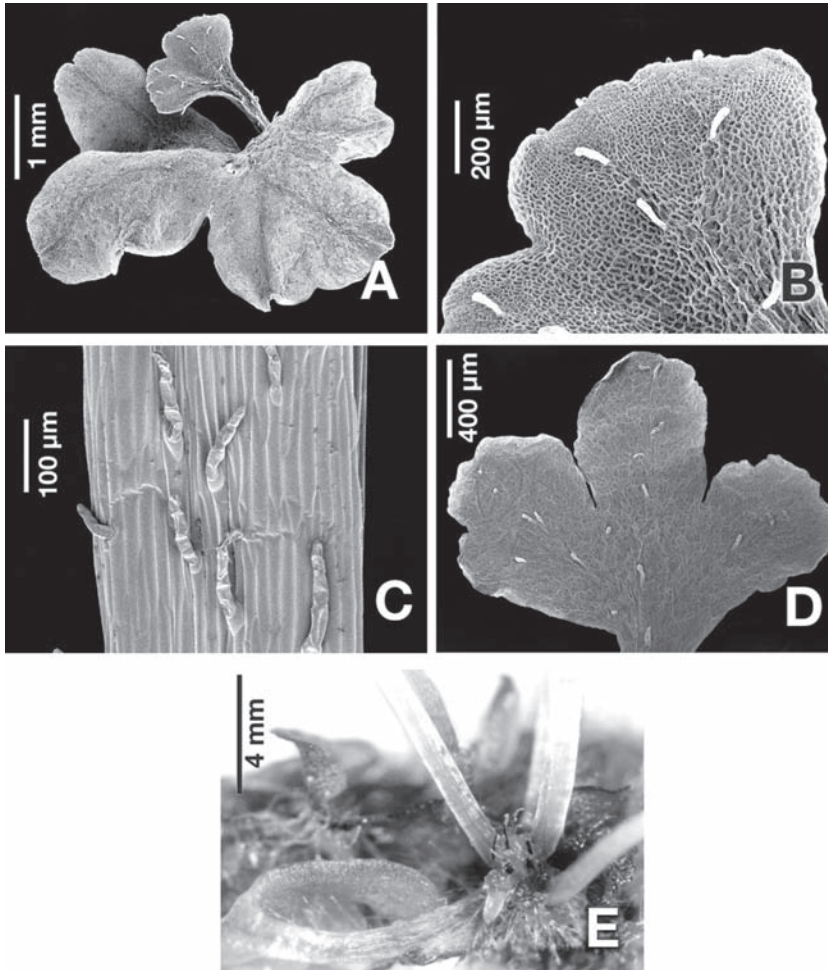


Fig. 6. Esporófitos de *Pteris*. A: Dos esporófitos de *P. vittata* en un gametófito (120 días). B: Lámina de *P. vittata* con tricomas 2-3 celulares (120 días). C: Esporófito de *P. multifida* con tricomas pluricelulares en pecíolo de esporófito joven (120 días). D: Lámina de *P. cretica* con tres lóbulos (140 días). E: Gametófito de *P. cretica* con cuatro esporófitos en desarrollo (120 días).

Fig. 6. *Pteris* sporophytes. A: Two *P. vittata* sporophytes in one gametophyte (120 days). B: *P. vittata* lamina with trichome 2-3 cellular (120 days). C: *P. multifida* sporophytes, with multicellular trichomes in petiole of young sporophyte (120 days). D: Laminae with *P. cretica* three lobes sporophyte (140 days) E: *P. cretica* gametophytes with four sporophytes in development (120 days).

La primera fronda que emerge tiene vernación circinada, lámina de contorno triangular, margen entero y venas libres; el pecíolo es translúcido, 6-8 veces más largo que la lámina y de sección circular. El indumento está representado por tricomas en toda la superficie de la lámina y el pecíolo. *P. multifida* tiene tricomas

4-6 celulares (Fig. 6 C) y las restantes especies 2-3 celulares (Fig. 6 B, D).

Aproximadamente a los 100 días, la lámina aumenta de tamaño y se forman dos o tres lóbulos con senos evidentes en las terminaciones de las venas; el margen se mantiene entero y la venación dicótoma, libre (Figs. 6 A, D; 7 A-B).

DISCUSIÓN

Cuando la lámina alcanza mayor tamaño, los segmentos se ensanchan y aumentan el número de lóbulos (Fig. 7 C); luego, el segmento apical se mantiene indiviso, su base es decurrente sobre el raquis y sus segmentos basales continúan dividiéndose (Figs. 7 G-H) hasta alcanzar la arquitectura de la lámina adulta. La venación dicótoma se mantiene, los tricomas se limitan al raquis y a las venas y el margen entero se transforma en aserrado (Figs. 7 D-F, 8). Las láminas son hipostomáticas con estomas polocíticos y las células epidérmicas de contorno sinuoso adquieren, paulatinamente, las ondulaciones del patrón adulto. A los 120 días, la fronda joven tiene la estructura de la planta adulta.

El estudio palinológico realizado en *P. cretica*, *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata* muestra que estas especies comparten el predominio de esporas triletes y tienen un bajo porcentaje (entre 3 y 17%) de esporas hialinas y colapsadas, coincidentes con la cantidad de esporas no germinadas en el medio de cultivo.

La morfología de las esporas atípicas (monoletes, tetraletes e intermedias) en *P. cretica* y *P. multifida* no influye en la viabilidad, por lo que estas esporas germinan en lapsos similares a las de *P. ensiformis* y otras especies de *Pteris* (Mendoza *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2008 y Prada *et al.* 2008).

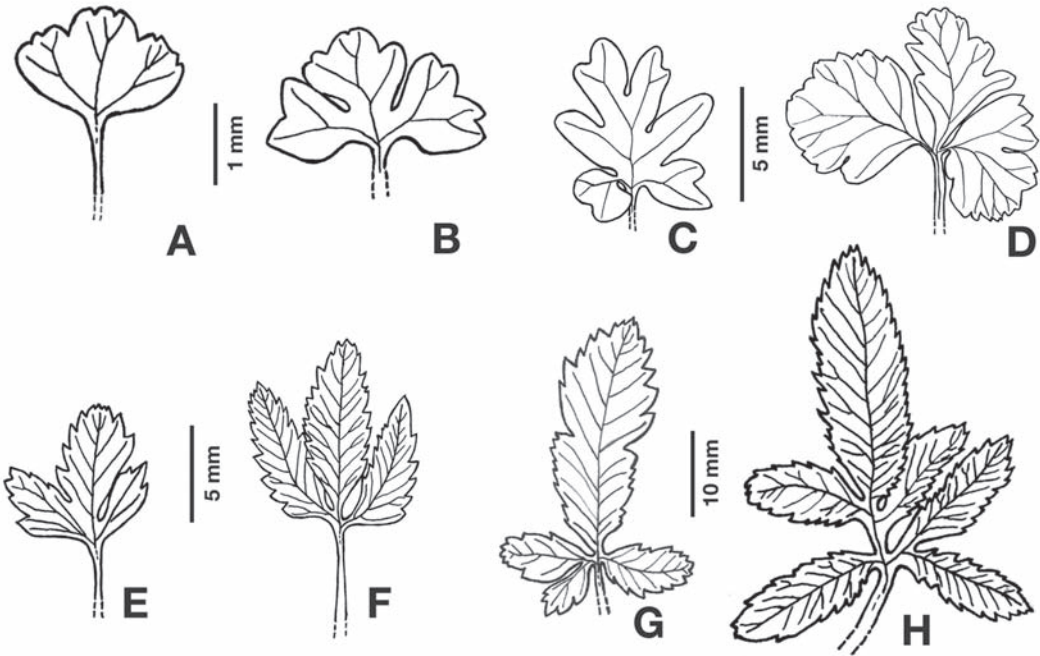


Fig. 7. Láminas de esporófitos jóvenes de *Pteris*. A: Lámina con tres lóbulos incipientes de *P. cretica* (100 días). B: Lámina con lóbulos marcados de *P. cretica* (110 días). C: Lámina lobulada de *P. ensiformis* (114 días). D: Lámina con tres lóbulos de margen dentado de *P. vittata* (120 días). E: Lámina con margen aserrado de *P. multifida* (110 días). F: Lámina con tres lóbulos separados de *P. multifida* (114 días). G: Lámina con lóbulo basal dividido de *P. multifida* (120 días). H: Lámina pinnada de *P. multifida* (130 días).

Fig. 7. *Pteris* young sporophyte laminae. A: *P. cretica* lamina with three incipient lobes (100 days). B: *P. cretica* lamina with marked lobes (110 days). K: Lobulate lamina of *P. ensiformis* (114 days). L: *P. vittata* lamina with three lobes of dentate margin (120 days). M: *P. multifida* lamina with serrulate margin (110 days). N: *P. multifida* lamina with three separated lobes (114 days). O: *P. multifida* lamina with divided basal lobe (120 days). P: *P. multifida* pinnate lamina (130 days).



Fig. 8. Esporófito de *P. vittata* mostrando lámina con 4 segmentos de margen aserrado (150 días).

Fig. 8. *P. vittata* sporophytes showing 4 segments with serrulate margin lamina (150 days).

El tipo de germinación, en las cuatro especies, corresponde al tipo *Vittaria* según el criterio propuesto por Nayar & Kaur (1968). Este patrón de germinación es muy frecuente (Nayar & Kaur 1971) y ha sido mencionado para otras especies tales como *P. berteroana* (Mendoza *et al.* (1997), *P. chilensis* (Letelier & Peñailillo 2007), *P. incompleta* (Prada *et al.* 2008), *P. finotti*, *P. fauriei*, *P. excelsa* Gaudich., *P. wallichiana* (Zhang *et al.* 2008).

La célula rizoidal que emerge en la germinación, contiene plástidos en los primeros momentos de su crecimiento; ésta característica ha sido descrita también para *P. fauriei* (Zhang *et al.* 2008).

Las esporas de las cuatro especies germinan entre los 3 y 7 días después de la siembra

mientras que otras especies del mismo género necesitan entre los 8 y 12 (Kawakami *et al.* 1995, Mendoza *et al.* 1997, Letelier & Peñailillo 2007). Esto ocurre, probablemente, porque las siembras se realizaron durante las dos primeras semanas desde su colecta, lo que evita cambios bioquímicos producidos por el almacenamiento (Beri & Bir 1993).

La capacidad de germinación se extiende hasta los 40 días, excepto en *P. vittata* donde se registra el 97% de germinación en los 10 primeros días de realizada la siembra, dato comparable al resultado logrado por Beri & Bir (1993) y Prada *et al.* (2008).

Los resultados de la morfogénesis indican que *P. cretica*, *P. multifida* y *P. vittata* tienen gametófitos filamentosos con 3-5 células, característica encontrada en *P. berteroana*, *P. fauriei* y *P. wallichiana* J. Agardh (Mendoza *et al.* 1997). Zhang *et al.* (2008) reportan gametófitos con 2 a 19 células para *P. vittata* y hasta 25 células para *P. ensiformis* en material proveniente de China. En el material de origen americano, esta última especie produce entre 7-9 células.

El desarrollo gametofítico de *P. cretica* y *P. multifida* corresponde al tipo *Adiantum* según la clasificación propuesta por Nayar & Kaur (1969). Dichos autores mencionan a este tipo como característico de *Adiantum* L., *Cheilanthes* Sw. y *Doryopteris* J. Sm., entre otros. Atkinson (1973) lo describe para *P. tremula* R. Br. y *P. multifida*.

Nayar & Kaur (1969) consideran que el tipo *Ceratopteris* es característico de *Pteris* y Atkinson (1973) lo encuentra en *P. longifolia* L., *P. grandifolia* L. y *P. comans* G. Forst. En este trabajo se encuentra que *P. ensiformis* y *P. vittata* responden a ese tipo de crecimiento. Las formas irregulares de los gametófitos laminares de *Pteris ensiformis* no se podrían asociar a la ploidía, por cuanto las cuatro especies estudiadas son poliploides (Walker 1962, Zhong-Ren 1989).

El desarrollo de gametófitos monoicos protándricos en *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata* favorece el cruzamiento en las especies con reproducción sexual, hecho considerado

por Klenkowski (1969) como la forma más frecuente entre los helechos homosporicos.

La estructura de los anteridios, en general, ha sido poco registrada mediante microscopía electrónica. Tanco *et al.* (2009) muestran anteridios de *P. inermis* donde se observan estos gametangios de aspecto ovoide semejantes a los encontrados en *P. cretica*, *P. ensiformis* y *P. multifida*. *P. vittata* tiene anteridios netamente cilindricos; similar forma se observa en una fotografía presentada por Zhang *et al.* (2008) para esta especie.

En *P. cretica* es curiosa la aparición de anteridios en etapas muy tempranas del desarrollo gametofítico, pues esto indicaría la existencia de anteridiógenos (Raghavan 1989) que, en este caso, son innecesarios al no originarse arquegonios.

Los cuellos de los arquegonios en *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata* tienen 16 células y son semejantes a los de *P. cretica* (Laird & Sheffield 1986) y *P. inermis* (Tanco *et al.* 2009). Zhang *et al.* (2008) menciona cuellos de arquegonios formados por 4 hileras con 3-5 células en cada anillo.

Previo al desarrollo de esporófitos se han registrado traqueidas en todas las especies estudiadas. Esta característica ha sido asociada inicialmente a la apogamia por Atkinson & Stokey (1964). En el material estudiado, *P. cretica* es apogámica debido a la formación únicamente de gametófitos anteridiados.

Según Walker (1962), *P. cretica* es una especie constantemente apogámica tanto en ejemplares diploides y triploides como en tetraploides ($n=58$ y $2n=c.120$) y señala que es frecuente que las especies apogámicas produzcan arquegonios no funcionales, característica demostrada por Laird & Sheffield (1986) al determinar que las células del canal del cuello de los arquegonios colapsan, evitándose de esta manera el desplazamiento de los anterozoides a la ovocélula.

La formación de esporófitos apogámicos en *P. cretica* podría explicar su distribución cosmopolita, pues no depende de las condiciones ambientales propicias para una reproducción sexual.

Los esporófitos, provenientes tanto de reproducción sexual como apogámica, tienen el mismo patrón de desarrollo y alcanzan la estructura de las plantas adultas después de los 120 días de realizada la siembra.

Estos aportes provenientes de la morfogénesis de los gametófitos y esporófitos de *P. cretica*, *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata* podrán ampliar las características taxonómicas del género *Pteris* y sus posibles relaciones con otros helechos, como lo sugieren Atkinson & Stokey (1964).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Cristina Bonomo por facilitar equipamiento para este estudio, a María del Carmen Otero por el delineado de los dibujos con tinta china, a Pedro Villagrán por las atenciones durante el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido, a Silvia Sastre por las correcciones del texto en inglés. A los revisores anónimos por las sugerencias brindadas para mejorar el manuscrito. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta (Argentina) - Proyecto N°1585.

RESUMEN

El género pantropical *Pteris* L. tiene 250 especies de las cuales 60 están en el continente Americano. Se estudió la morfogénesis de los gametófitos, y la morfología de los esporófitos jóvenes de cuatro especies: *P. cretica*, *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata*, junto con un análisis palinológico que incluye la capacidad de las esporas de germinar. Los gametófitos se obtuvieron mediante técnicas de cultivo in vitro. Los esporófitos jóvenes se trasladaron a sustrato estéril de tierra y arena (3:1). Se usó el microscopio de luz y el de barrido (SEM). Se encontraron esporas con diferentes tipos de aperturas. La germinación ocurre entre 3-7 días y corresponde al tipo *Vittaria*. Se encontraron gametófitos filamentosos formados por 3-5 células en *P. cretica*, *P. multifida* y *P. vittata* y por 7-9 células en *P. ensiformis*. El desarrollo gametofítico ocurre de dos formas: tipo *Adiantum* y tipo *Ceratopteris*. Los gametófitos de *P. ensiformis*, *P. multifida* y *P. vittata* son monoicos y protándricos. *P. cretica* desarrolla gametófitos anteridiados. Los anteridios corresponden al tipo común de los helechos leptosporangiados, son cilindricos en *P. vittata* y ovoides en las otras tres especies. Los cuellos de los arquegonios

tienen 4 hileras con 4 células cada una. Los esporófitos se desarrollan después de los 3 meses de su siembra y su indumento es semejante a las plantas adultas. *P. cretica* presenta apogamia obligada.

Palabras claves: *Pteris*, esporas, desarrollo gametofítico, esporófitos jóvenes, apogamia.

REFERENCIAS

- Arreguín-Sánchez, M. de la L., R. Palacios-Chaves & D.L. Quiróz-García. 1997. Morfología de las esporas del género *Pteris* para México. *Phytologia* 83: 67-78.
- Atkinson, L.R. 1973. The gametophyte and family relationships. *J. Linn. Soc. Bot.* 67: 73-90.
- Atkinson, L.R. & A.G. Stokey. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. *Phytomorphology* 14: 51-70.
- Beri, A. & S.S. Bir. 1993. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. *Amer. Fern J.* 83: 73-78.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Devi, S. 1977. Spores of Indian ferns. *Today & Tomorrow's*, New Delhi, India.
- Erdtman, G. & P. Sorsa. 1971. Pollen and spore morphology and plant taxonomy-Pteridophyta, text and additional illustrations. *Almqvist & Wiksell*, Estocolmo, Suecia.
- Foster, A.S. 1934. The use of tannic acid and iron chloride for staining cell walls in meristematic tissue. *Stain Technol.* 9: 91-92.
- Huang, T.C. 1981. Spore Flora of Taiwan. Botany Dept. Natl. Tah-Jinn, Taiwán.
- Huang, Y.M., H.M. Chou, T.H. Hsieh, J.C. Wang & W.L. Chiou. 2006. Cryptic characteristics distinguish diploid and triploid varieties of *Pteris fauriei* (Pteridaceae). *Can. J. Bot.* 84: 261-268.
- Ito, M. 1962. Studies on the differentiation of fern gametophytes. I. Regeneration of single cells isolated from cordate gametophytes of *Pteris vittata*. *Bot. Mag. Tokyo* 75: 19-27.
- Kato, Y. 1963. Physiological and morphogenetic studies of fern gametophytes in aseptic culture. I. callus tissues from dark-cultured *Pteris vittata*. *Bot. Gazette* 124: 413-416.
- Kato, Y. 1969. Physiological and morphogenetic studies of fern gametophytes and sporophytes in aseptic culture. VII. Experimental modifications of dimensional growth in gametophytes of *Pteris vittata*. *Phytomorphology* 19: 114-121.
- Kawakami, S.M., M. Ito & S. Kawakami. 1995. Apogamous sporophyte formation in a fern *P. multifida* and its characteristics. *J. Plant Res.* 108: 181-184.
- Klekowski, E.J. Jr. 1969. Reproductive biology of the Pteridophyta. II. Theoretical considerations. *Bot. J. Linn. Soc.* 62: 347-359.
- Laird, S. & E. Sheffield. 1986. Antheridia and archegonia of the apogamous fern *P. cretica*. *Ann. Bot.* 57: 139-143.
- Lellinger, D.B. & W.C. Taylor. 1997. A classification of spore ornamentation in the Pteridophyta, p. 33-42. *In* J.M. Camus, M. Gibby & R.J. Johns (eds.). *Pteridology in Perspective*. Royal Botanic Gardens, Kew, Reino Unido.
- Leterier, L. & P. Peñailillo. 2007. Desarrollo del gametofito y esporófito joven de *Pteris chilensis* Desv. (Pteridaceae-Pteridophyta). *Gayana Bot.* 64: 93-97.
- Martínez, O.G. & M.A. Morbelli. 2009. The spores of *Pteris cretica* complex (Pteridaceae-Pteridophyta) in America. *Grana.* 48(3): 193-214.
- Mendoza, A., B. Pérez-García, I. Reyes Jaramillo & M. Ricci. 1997. Desarrollo del gametofito de *Pteris berteriana* (Pteridaceae: Pterideae). *Rev. Biol. Trop.* 44/45:51-57.
- Michelena, I.G. 1989. Esporas de la Familia Adiantaceae (Pteridophyta) de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Bol. Asoc. Latinoam. Paleobot. Palinología* 12: 25-31.
- Nayar, B.K., P. Lata & L.P. Taiwari. 1964. Spore morphology of the ferns of west Tropical Africa. *Pollen Spores* 6: 545-582.
- Nayar, B.K. & S. Devi. 1966. Spore morphology of the Pteridaceae I. The Pteridoid ferns. *Grana Palynol.* 6: 476-503.
- Nayar, B.K. & S. Kaur. 1968. Spore germination in homosporous ferns. *J. Palynol.* 4: 1-14.
- Nayar, B.K. & S. Kaur. 1969. Types of prothallial development in homosporous ferns. *Phytomorphology* 19: 179-188.
- Nayar, B.K. & S. Kaur. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev.* 37: 295-396.

- Prada, C., V. Moreno & J.M. Gabriel y Galán. 2008. Gametophyte development, sex expression and antheridiogen system in *Pteris incompleta* Cav. Amer. Fern J. 98: 14-25.
- Punt, W., P.P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson (†) & A. Le Thomas. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. Paleobot. Palynol. 143:1-81. (también disponible en línea: www.sciencedirect.com)
- Raghavan, V. 1989. Developmental biology of fern gametophytes, p. 361. In P.W. Barlow, D. Bray, P.B. Green & J.M.W. Slack (eds.). Developmental and cell biology series. Cambridge University, Cambridge, Londres.
- Rodríguez Ríos, R. 1973. Morfología de los gametófitos y esporófitos jóvenes de algunas especies chilenas de *Blechnum* (Polypodiaceae s. l.). Gayana Bot. 22: 1-30.
- Sladkov, A.N. 1957. Spore polymorphism in *P. cretica*. U.S.S.R. Acad. Sci. 177: 900-903.
- Smith, A.R., K.M. Pryer, E. Schuettpfz, P. Korall, H. Schneider & P.G. Wolf. 2006. A classification for extant fern. Taxon 55: 705-731.
- Steeves, T.A., I.M. Sussex & C.R. Partanen. 1955. In vitro studies on abnormal growth of prothalli of the bracken fern. Amer. J. Bot. 42: 232-245.
- Tanco, M.E., O.G. Martínez, & M.C. Bonomo. 2009. Germinación y morfogénesis gametofítica de *Pteris inermis* (Rosenst.) de la Sota. Gayana Bot. 66: 10-17.
- Tryon, R.M. & A.F. Tryon. 1982. Ferns and allied plants with special reference to tropical America. Nueva York Springer, Nueva York, EEUU.
- Tryon, R.M. & B. Lugardon. 1991. Spores of the Pteridophyta: surface, wall structure and diversity based on electron microscope studies. Nueva York Springer, Nueva York, EEUU.
- Walker, T.G. 1962. Cytology and evolution in the fern genus *Pteris* L. Evolution 16: 27-43.
- Zhang, K.M., L. Shi, X.C. Zhang, C.D. Jiang & W.L. Tim-Chun. 2008. Gametophyte morphology and development of six Chinese species of *Pteris* (Pteridaceae). Amer. Fern J. 98: 33-41.
- Zhong-Ren, W. 1989. A preliminary study on cytology of Chinese *Pteris*. Acta Phytotaxonomica Sinica 27: 421-438.