

## Gametofitos y esporofitos jóvenes de *Dryopteris wallichiana* (Spreng.) Hyl. (*Dryopteridaceae* - Pteridophyta)

Paula Liliana Narváez\*, Olga Gladys Martínez\*\* y Elías Ramón de la Sota\*\*\*

**Resumen:** Narváez, P. L.; Martínez, O. G. & de la Sota, E. R. 2008. Gametofitos y esporofitos jóvenes de *Dryopteris wallichiana* (Spreng.) Hyl. (*Dryopteridaceae* - Pteridophyta). *Bot. Complut.* 32: 85-90.

Se presenta la morfogénesis de los gametofitos y morfología de los esporofitos jóvenes de *Dryopteris wallichiana* (Spreng.) Hyl. sobre la base de cultivos *in vitro*. El patrón de germinación es tipo *Vittaria*, el desarrollo gametofítico corresponde al tipo *Aspidium*. Los protalos laminares son cordados y espatulados. Los protalos maduros originan solo anteridios del tipo común de helechos leptosporangiados. Los gametofitos espatulados producen mayor cantidad de anteridios. Se trata de una especie con apomixis obligada. Los esporofitos se desarrollan de protalos cordados. Las primeras láminas son trilobadas, luego se dividen en plan pinnado. Poseen pelos unicelulares a pluricelulares, en el margen y ambos lados de la lámina.

**Palabras clave:** morfogénesis, *Dryopteris wallichiana*, protalos, apomixis obligada.

**Abstract:** Narváez, P. L.; Martínez, O. G. & de la Sota, E. R. 2008. *Dryopteris wallichiana* (Spreng.) Hyl. (*Dryopteridaceae* - Pteridophyta) gametophytes and young sporophytes. *Bot. Complut.* 32: 85-90.

Morphogenesis of the *Dryopteris wallichiana* (Spreng.) Hyl. gametophytes and morphology of young sporophytes are presented on the basis of *in vitro* culture. The germination pattern is *Vittaria*-type, prothallial development corresponds to *Aspidium*-type. The laminar prothalli are cordated and spatulated. The mature prothalli only originate antheridia of the common type for leptosporangiate ferns. The spatulated gametophytes develop a larger quantity of antheridia. It is an obligated apomictic species. The sporophytes are originated from cordated prothalli. The first laminae are trilobate, then they divide into pinnated plan. They have unicellular and pluricellular trichomes on the margin and both sides of the lamina.

**Key words:** morphogenesis, *Dryopteris wallichiana*, prothalli, obligate apogamy.

### INTRODUCCIÓN

El género *Dryopteris* Adans. pertenece a la familia *Dryopteridaceae* y agrupa aproximadamente 100 especies; Ponce (1996) cita cuatro taxones para la Argentina. *Dryopteris wallichiana* (Spreng.) Hyl., crece en África, Asia continental e insular (Himalayas, India, China, Japón, Taiwán y Filipinas), en América insular (Hawai, Jamaica y La Española), en América continental desde México, Mesoamérica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Paraguay, Brasil y noroeste y centro de Argentina. Se encuentra en altitudes elevadas entre los 1000-4000 m. En el noroeste argentino es frecuente en

los bosques de *Alnus acuminata* Kunth (aliso), donde generalmente crece sobre barrancas húmedas. En Argentina esta especie se conoce comúnmente con el nombre de “doradilla”, “doradilla macho” o “cola de mono” debido a la presencia de escamas filiformes y castañas que cubren pecíolo y raquis. Debido a su elegancia esta planta es explotada como ornamental y, por lo tanto, casi erradicada de lugares próximos a la ciudad, razón por la cual se encara este trabajo con la finalidad de conocer la morfogénesis de la fase gametofítica de *Dryopteris wallichiana* y de sus esporofitos jóvenes, y así contribuir con la información necesaria para evaluar la posibilidad de su introducción al cultivo.

\* IANIGLA-CRICYT-CONICET. C.C. 330. 5500. Mendoza, Argentina.

\*\* Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta. Av. Bolivia 5150. 4400. Salta, Argentina. martinog@unsa.edu.ar.

\*\*\* Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Paseo del Bosque s/n. 1900. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Recibido: 29 agosto 2007. Aceptado 29 febrero 2008.

Ciertos aspectos sobre la biología reproductiva de *Dryopteris*, para especies asiáticas y europeas, han sido desarrollados por Duncan (1943), Manton & Walter (1954), Loyal (1960), Korpelainen (1994), entre otros. En América, Whittier & Wagner (1971) se refirieron a la variación del tamaño de las esporas y la germinación para especies de Norteamérica. Cousens & Horner (1970) y Pérez-García *et al.* (1999, 2001) estudiaron el desarrollo de los protalos de varias especies de *Dryopteris* que crecen en México, pero ninguno de ellos se refiere detalladamente a la especie en estudio.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de esporas se realizaron colecciones de frondes fértiles en los meses de marzo-abril en las Quebradas de San Lorenzo y Los Berros (Departamento Capital, Provincia de Salta, Argentina). Las localidades de muestreo se hallan ubicadas entre los 1200-1400 m. Los ejemplares colectados de referencia se depositaron en el herbario MCNS. Las pinnas fértiles fueron expuestas al calor de una lámpara entre 24-48 hs con la finalidad de provocar la dehiscencia de los esporangios. La separación de las esporas se realizó con una malla de 80  $\mu\text{m}$  de diámetro. Para la desinfección de las esporas se utilizó hipoclorito de sodio comercial diluido al 10% durante 2-3 minutos. Se utilizaron como medios de cultivo dos soluciones nutritivas: Knudson, modificado por Steeves *et al.* (1955) y Murashige & Skoog (1962), gelificadas con agar al 7% y enriquecidas, o no, con sacarosa al 10%. La siembra de las esporas se realizó en cápsulas de Petri con una densidad de siembra de 350 esporas por  $\text{cm}^2$ . Se utilizó una cámara de cultivo con control automático de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y luz con fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad, iluminados con tubos fluorescentes de 20 W. Los gametofitos fueron repicados frecuentemente para evitar la superposición. Cuando alcanzaron la forma cordada se dispusieron entre 3-4 protalos por cada frasco de 5 cm de diámetro. Se utiliza el criterio propuesto por Durán & Anton

(1995) para definir protalo filamentoso, laminar y cordiforme. Se considera como protalo maduro aquel que origina gametangios. Las plántulas fueron transferidas a macetas con tierra fértil y arena (3:1), cubiertas con plástico transparente y mantenidas en la misma cámara. Se regaron periódicamente con las mismas soluciones nutritivas en las que se desarrollaron. Para la observación de gotas de aceite se utilizó Sudán IV y para los anteridios carmín acético. Se realizaron cortes histológicos de protalos de 10-12  $\mu\text{m}$  de espesor con micrótopo rotatorio, coloreados con hematoxilina férrica de Heidenhain y safranina-fast green (D'Ambrogio de Argüeso 1986) y montados con "Canadax Biopur". Para el estudio palinológico con microscopio óptico se consideraron 20 muestras de 100 esporas cada una, montadas directamente en agua glicerinada al 50%. El análisis estructural se realizó con microscopía electrónica de barrido, para ello las esporas fueron acetolizadas de acuerdo a la técnica de Erdtman (1960), previo tratamiento con  $\text{CO}_2/\text{Na}$  al 3% en caliente durante 2 minutos y metalizadas con oro/paladio. Las observaciones, dibujos y obtención de fotografías se realizaron con un microscopio estereoscópico modelo SV11 Original Carl Zeiss, microscopio óptico Standard 16 Zeiss y/o microscopio electrónico de barrido, marca JEOL modelo JSM 6480 LV de la Universidad Nacional de Salta.

#### RESULTADOS

El análisis palinológico demuestra que las esporas son monoletas, castaño oscuras, ruguladas, con muros anchos y redondeados usualmente anastomosados formando areolas con muros cortos y redondeados, de 43-54 x 29-34  $\mu\text{m}$  (Fig. 1 A y B). También se observaron esporas hialinas sin contenido celular en un 20 %. La germinación de las esporas se produce gradualmente en un período de 6 a 10 días (Fig. 2 A), en un alto porcentaje, 80% en promedio. Las esporas que no germinan corresponden a las de menor tamaño. La primera divi-

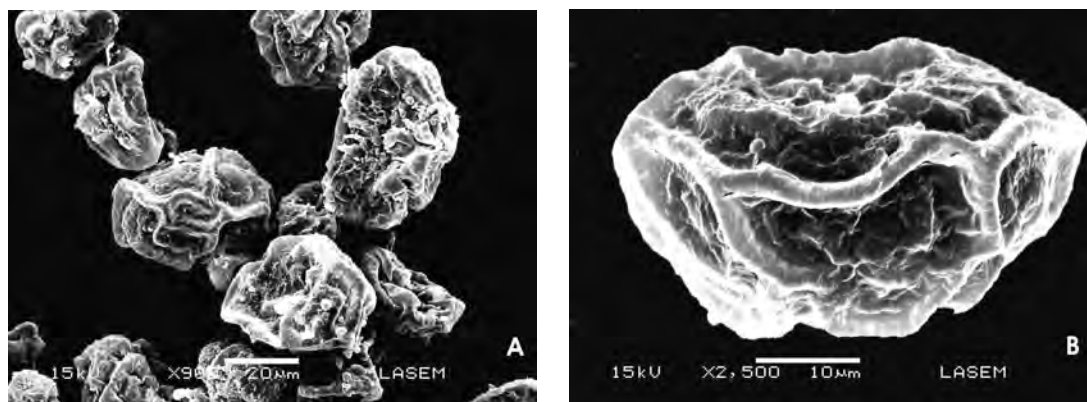


Figura 1— Esporas de *Dryopteris wallichiana*. A: esporas monoletas. B: detalle de la espóra mostrando ornamentación rugulada.

sión mitótica origina dos células, una de menor tamaño, incolora, que desarrolla el rizoide y otra con clorofila de mayor volumen que produce el filamento protálico.

La fase filamentosa ocurre entre los 9-15 días después de la siembra de las esporas. El filamento formado por 2-5 células con cloroplastos y gotas de aceite, pre-

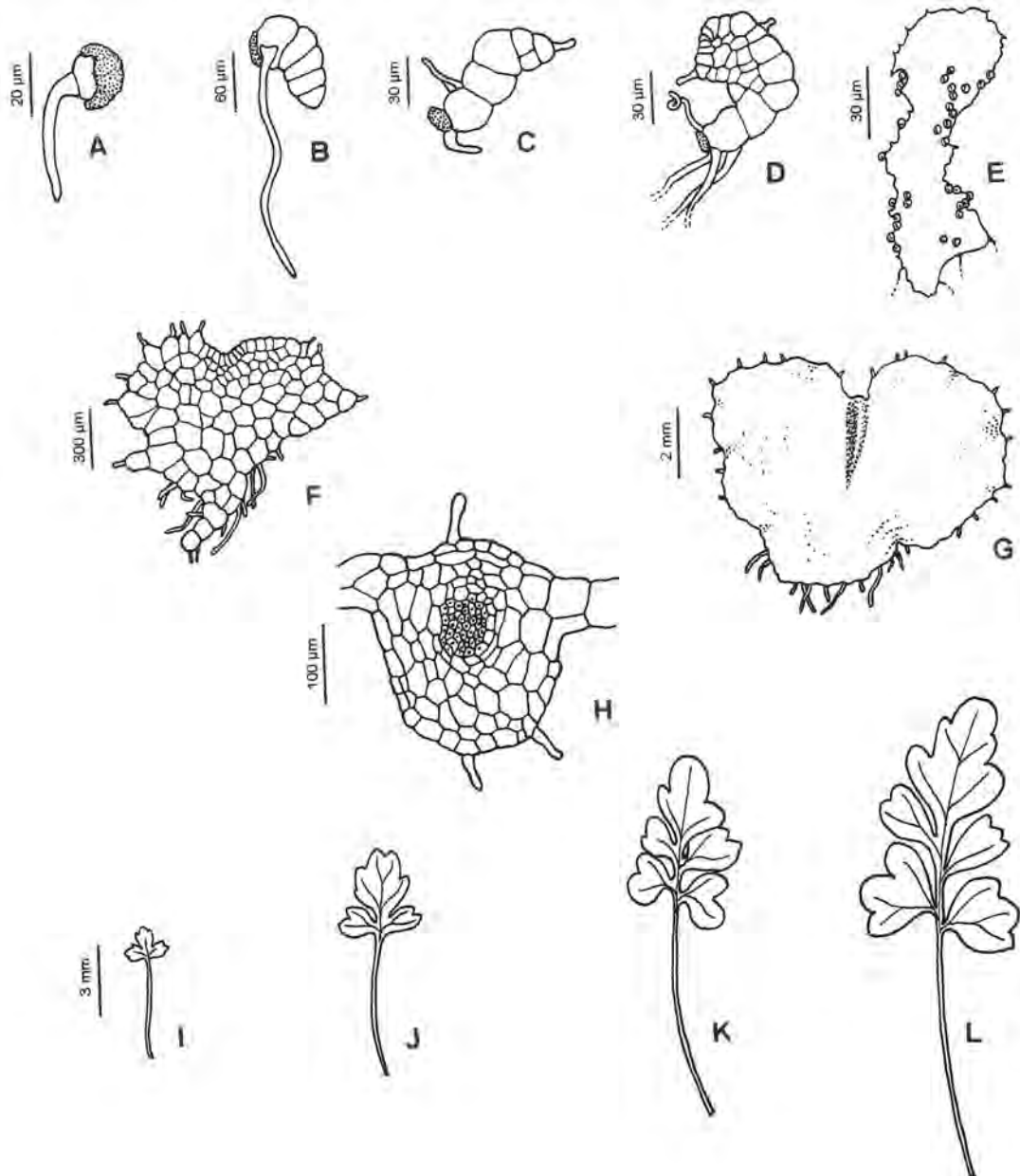


Figura 2— Desarrollo gametofítico. A: germinación de la espora (7 días después de la siembra). B: filamento protálico (10 días). C: protalo con tricoma en célula terminal (12 días). D: protalo laminar (20 días). E: protalo espatulado con anteridios en margen y superficie (35 días). F: protalo laminar cordiforme (30 días). G: protalo cordado maduro (60 días). H: corte transversal a nivel de cojinete central mostrando meristemo (100 días). Esporofitos jóvenes. I-J: lámina trilobada (120-125 días). K-L: lámina pinnada (127-130 días). P. Narváez y M. C. del Otero.

senta un rizoides hialino que supera hasta cinco veces la longitud del filamento (Fig. 2 B). Se observa que la división celular cesa cuando en la célula terminal del filamento se forma un pelo unicelular papilado (Fig. 2 C), luego las divisiones ocurren en las células anteriores originando una lámina.

La fase laminar se extiende entre los 16-50 días, se caracteriza por la presencia de tricomas unicelulares marginales y superficiales (Fig. 2 D). Durante este período se diferencia una célula meristemática que produce la escotadura y a partir de este momento ocurren divisiones celulares asimétricas en ambas hemiláminas hasta culminar con la formación de protalos cordados (Fig. 2 F) o espatulados (Fig. 2 E), en una proporción de 8:2. Ambas formas desarrollan rizoides largos y transparentes sobre el lado abaxial, en el extremo opuesto a la escotadura, lo que favorece la posición semierecta. Los protalos cordados maduros se observan a partir de los 50 días, crecen hasta alcanzar 1 cm de ancho en la zona de mayor desarrollo de las hemiláminas. En la región central se origina una costilla formada por 5-8 células de espesor, con mayor engrosamiento en proximidades a la escotadura (Fig. 2 G). Los gametofitos laminares espatulados se desarrollan entre 10 y 20 días antes que los cordados y contienen costillas escasamente estratificadas, formada por 3 a 5 células.

Entre los 100 y 120 días, la costilla central de los protalos cordados (Fig. 2 H) logra mayor estratificación y se produce la diferenciación de un meristemo central que origina el embrión sobre el lado abaxial (Fig. 3).

El desarrollo de gametangios fue observado desde los 20 días, después de la siembra, en las formas espatuladas y, a partir de los 30, en los tipos cordados. Todos los protalos resultaron masculinos. Los anteridios estructuralmente corresponden al tipo denominado por

Nayar & Kaur (1971) como leptosporangiados, se hallan constituidos por una célula basal en forma de embudo que une el anteridio al protalo, una célula media que rodea la masa central de androcitos y una célula apical que actúa a modo de opérculo. Los protalos espatulados presentan 50% más de anteridios que los cordiformes (Fig. 2 E). Estos gametangios se disponen sobre la superficie abaxial en la región central y en las hemiláminas, de ambos tipos de gametofitos. Los protalos cordiformes que alcanzaron el mayor tamaño originan en la base filamentos que producen nuevos gametofitos cordiformes. Los nuevos individuos se ubican en forma arrosada, forman colonias de aproximadamente 30 individuos. Esta multiplicación ocurre aún después de los repiques, pero no se han controlado los factores que lo originan.

El desarrollo del esporofito se produce entre los 120 y 150 días, momento en el aparece un mamelón cubierto con escamas filiformes y castañas. Las primofrondes contienen inicialmente láminas trilobadas que se dividen en plan pinnado, formándose pinnas trilobadas, luego éstas repiten el mismo patrón de división (Fig. 2 I-L). La venación es libre en los primeros estadios y posteriormente bifurcada. El pecíolo es largo y translúcido en un comienzo, después de unos días adquiere coloración castaña. El indumento del esporofito joven está formado por tricomas unicelulares en las láminas trilobadas, semejantes a los observados en los gametofitos. En las láminas pinnatifidas predominan los tricomas pluricelulares simples o ramificados sobre el margen y ambas superficies.

Los resultados logrados en el tiempo de germinación de las esporas, desarrollo, multiplicación de gametofitos y desarrollo de esporofitos, son independientes del medio de cultivo utilizado ya que no se observan diferencias significativas en los tratamientos con las diferentes soluciones nutritivas. Los gametofitos desarrollados y repicados en medios enriquecidos con sacarosa evidenciaron igual desarrollo que los tratados sin azúcar.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las características de las esporas, tales como morfología y dimensiones, responden a las citadas por Tryon & Lugardon (1991) para 54 especies de *Dryopteris*. La ornamentación encontrada corresponde al tipo regulado

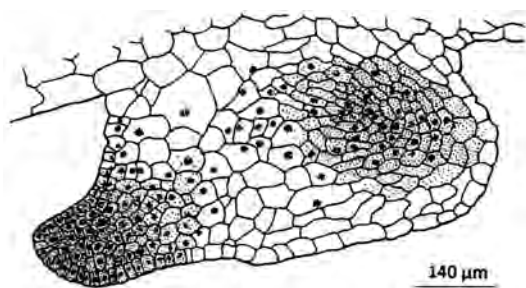


Figura 3— Corte transversal del gametofito mostrando el embrión sobre el lado abaxial (110 días). M. C. del Otero.

o "retate" según Lellinger & Taylor (1997). Otros autores como Tryon & Lugardon *l.c.* encuentran que son rugadas, Pérez García *et al.* (1999, 2001) las definen como rugosa de contorno tuberculado.

El alto porcentaje de germinación de las esporas de *Dryopteris wallichiana* es semejante al encontrado para otras especies del mismo género, citadas por Whittier & Wagner (1971). Según el criterio utilizado por Nayar & Kaur (1971) para distinguir los patrones de germinación, la especie estudiada responde al tipo *Vittaria* y el tipo de desarrollo de gametofitos corresponde al tipo *Aspidium*, debido a la formación de un tricoma apical que condiciona el proceso de desarrollo.

Los resultados de los estudios realizados para especies mexicanas de *Dryopteris* por Pérez-García *et al.* (1999, 2001) mencionan que los protalos, en este género, pueden ser: espatulados, cordiformes, cordiforme-espatulados y acintados. En el material estudiado no se registraron las formas acintadas. Tampoco no se encontraron formas con escotadura profunda y alas alargadas citadas y graficadas por Pérez-García *et al.* (1999: 76). Los protalos maduros o adultos con formas cordadas y espatuladas son anteridiados, con predominio de los cordiformes. Los esporofitos se originaron de la costilla central de los protalos cordados, mientras que los espatulados se limitaron al desarrollo de anteridios. La presencia de gametofitos proliferados y el tipo de anteridios corresponden con lo citado por Nayar & Kaur (1971) para *Dryopteridaceae*. Según Nayar & Kaur (*l.c.*) la apogamia es frecuente en esta familia. En este sentido, *Dryopteris wallichiana* es una especie con apomixis obligada debido a que los protalos son anteridiados. Fraser-Jenkins (1989) la cita como

una especie apomíctica diploide, aunque recientes estudios realizados por Xiang *et al.* (2006) aseveran que se trata de un taxón tetraploide.

La germinación de las esporas y el desarrollo protálico en medio de Murashige & Skoog (1962) resultó semejante con medio de Knudson, lo que demuestra que la cantidad de nutrientes necesarios para estos procesos biológicos no es exigente. Tampoco la incidencia de sacarosa registra cambios en el desarrollo apomíctico de los esporofitos, tal como lo plantearon Whittier & Steeves (1960). La presencia de esporas hialinas, sin contenido celular, es frecuente de encontrar tanto en las observaciones al microscopio óptico como en las siembras, posiblemente su presencia se encuentre asociada a la apogamia, tal como lo menciona Kanamori (1972).

Evidentemente el tiempo constituye un factor limitante en la obtención de plántulas jóvenes mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Debido a que aún en condiciones ideales, de laboratorio, este proceso resulta muy extenso en el tiempo porque se necesitan entre 120-150 días después de la siembra para la observación de esporofitos jóvenes.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Cristina Bonomo por facilitar las instalaciones del laboratorio de cultivos *in vitro*, a Blanca Pérez-García por las sugerencias aportadas, al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Salta, a María del Carmen Otero por la confección de las láminas y a los revisores por las sugerencias realizadas para mejorar el manuscrito. Este trabajo fue realizado con subsidio del Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta.

#### BIBLIOGRAFÍA

- COUSENS, M. I. & HORNER, H. JR. T. 1970. Gametophyte ontogeny and sex expression in *Dryopteris ludoviciana*. *Amer. Fern J.* 60: 13-17.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- DUNCAN, R. E. 1943. Origin and development of embryos in certain apogamous forms of *Dryopteris*. *Bot. Gaz.* 105: 202-211.
- DURÁN, M. & ANTÓN, A. M. 1995. Sobre la presencia de ramificaciones en gametofitos de *Blechnum* (*Blechnaceae*-Pteridophyta). *Darwiniana* 33(1-4): 27-34.
- ERDTMAN, G. 1960. The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54: 561-564.
- FRASER-JENKINS, C. R. 1989. A monograph of *Dryopteris* (Pteridophyta: Dryopteridaceae) in the Indian subcontinent. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Bot.* 18(5): 323-477.
- KANAMORI, K. 1972. Apogamy in ferns with special reference to the apogamous embryogenesis. *Sc. Rep. T. K.D. sect. B* 15(226):111-132.
- KORPELAINEN, H. 1994. Growth, sex determination and reproduction of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott gametophytes under varying nutritional conditions. *Bot. J. Linn. Soc.* 114: 357-366.
- LELLINGER, D. B. & TAYLOR, W. C. 1997. A classification in the Pteridophyta. En R. J. Hans (Ed.), *Holtum Memorial*: 33-42. Royal Bot. Gard. Kew.

- LOYAL, D. S. 1960. Some observations on the cytology and apogamy of Himalayan *Dryopteris paleacea* (Don.) Hand-Mazz. *J. Indian Bot. Soc.* 399: 608-613.
- MANTON, I. & WALKER, S. 1954. Induced apogamy in *Dryopteris dilatata* (Hoffm.) A. Gray and *D. filix-mas* (L.) Schott emend. and its significance for the interpretation of the two species. *Ann. Bot.* (London) 18: 377-383.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 15: 473-497.
- NAYAR, B. K. & KAUR, S. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *Bot. Rev.* 37(3): 295-396.
- PÉREZ-GARCÍA, B.; MENDOZA, A.; REYES JARAMILLO, I. & RIBA, R. 1999. Morfogénesis de la fase sexual de seis especies mexicanas de helechos del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae). *Rev. Biol. Trop.* 47 (1-2): 63-75.
- 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.
- PONCE, M. M. 1996. *Dryopteridaceae*. En F.O. Zuloaga y O. Morrone (Eds.), *Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina I*, Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 60: 13-20.
- STEEVES, T. A.; SUSSEX, I. M. & PARTANEN, C. R. 1955. In vitro studies on abnormal growth of prothalli of the bracken fern. *Amer. J. Bot.* 42: 232-245.
- TRYON, R. M. & LUGARDON, B. 1991. *Spores of the Pteridophyta: Surface, wall structure and diversity based on electron microscope studies: I-X*, 1-648. Springer-Verlag, New York.
- WHITTIER, D. P. & STEEVES, T. A. 1960. The induction of apogamy in the bracken fern. *Canad. J. Bot.* 38: 925-930.
- WHITTIER, D. P. & WAGNER, W. H. JR. 1971. The variation in spore size and germination in *Dryopteris* taxa. *Amer. Fern J.* 61: 123-127.
- XIANG, J. Y.; CHENG, X. & WU, S. G. 2006. Chromosome number of 13 species in the genus *Dryopteris* (Dryopteridaceae) from Yunnan, China. *Acta Phytotax. Sin.* 44 (3): 304-319.