

## Desarrollo de los gametofitos de especies mexicanas de helechos de la familia Gleicheniaceae

Norberto Farfán-Santillán<sup>1</sup>, Aniceto Mendoza-Ruiz<sup>1</sup>, Blanca Pérez-García<sup>1</sup>  
& Ernesto Velázquez-Montes<sup>2</sup>

1. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biología, Área de Botánica Estructural y Sistemática Vegetal, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina, 09340 Iztapalapa, Ciudad de México, México; norfarfan@gmail.com, amr@xanum.uam.mx, bpg@xanum.uam.mx
2. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Plantas Vasculares, Av. Universidad 3000, C. P. 04510, Ciudad de México, México; vme@unam.mx

Recibido 04-X-2016. Corregido 20-III-2017. Aceptado 18-IV-2017.

**Abstract: Gametophyte development in Mexican species of Gleicheniaceae ferns.** In Mexico, the Gleicheniaceae family is represented by different species such as *Dicranopteris flexuosa*, *Diplopterygium bancroftii*, *Gleichenella pectinata*, *Sticherus bifidus*, *S. brevipubis*, *S. palmatus* and *S. underwoodianus*. Currently, few studies have described the gametophytes of some species in this family, and our objective was to contribute to the knowledge, and to describe and compare different aspects of their germination, gametophyte development, and to determine if the prothallus characters are useful for taxonomic delimitations in the group. For this purpose, specimens and spores of each taxon were collected in the field, spores were sown in Petri dishes containing agar and Thompson nutrient medium, and grown in a plant growing chamber under controlled conditions of light (12 hr light/darkness), (50 %) humidity, and temperature (18 °C night, 25 °C day). Additionally, observations of fresh materials were made and photomicrographs were taken using both optical and scanning electron microscopes. Our observations allowed distinguishing two types of germination *Gleichenia* and *Cyathea*; and three types of prothallial development *Marattia*, *Osmunda* and *Drynaria*. Gametangia presented more than three cells, and this is considered a primitive feature by other authors. As some variations in the germination type were observed and have not previously been reported in the literature for this family, and because of the heterogeneity in the patterns of the prothallial cell development, and gametangia of more than four cells, it is important to broaden the study to other species, in order to determine the taxonomic value of the morphological characters of the gametophyte, as well as to determine if these variations are present in other species of the family. *Rev. Biol. Trop.* 65 (3): 939-952. Epub 2017 September 01.

**Key words:** *Dicranopteris*, *Diplopterygium*, germination, *Gleichenella*, Mexico, Polypodiophyta, *Sticherus*.

La familia Gleicheniaceae agrupa entre 125 y 165 especies a nivel mundial (Smith et al., 2006; Christenhusz & Chase, 2014). En México está representada por cuatro géneros y siete especies: *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw., *Diplopterygium bancroftii* (Hook.) A. R. Sm., *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching, *Sticherus bifidus* (Willd.) Ching, *S. brevipubis* (Christ.) A. R. Sm., *S. palmatus* (W. Schaffn. ex E. Fourn.) Copel. y

*S. underwoodianus* (Maxon) Nakei; crecen en un intervalo altitudinal de 100 hasta los 3 000 msnm (Mickel & Smith, 2004). Los esporofitos de esta familia son de hábito terrestre-trepador, se encuentran en taludes de carreteras o en sitios abiertos y expuestos a la luz solar (Smith et al., 2006; Mehltreter, Walker, & Sharp, 2010); tienen rizomas superficiales largamente rastreros, hojas monomorfas y láminas divididas pseudodicotómicamente; yemas en la axila

de las bifurcaciones y esporas monoletes o triletes (Tryon & Lugardon, 1991; Smith et al., 2006; Velázquez-Montes, 2012).

En trabajos previos sobre el estudio de los gametofitos, se reporta una germinación de tipo *Gleichenia* para *Gleichenia pectinata* y *G. rupestris* (Nayar & Kaur, 1971) y de tipo *Marattia* (amorfo) en *Sticherus bifidus* (Stokey, 1950; Haufler & Adams, 1982). Respecto al desarrollo protálico, Stokey (1950) reporta un desarrollo heterogéneo en los gametofitos de la familia; sin embargo, Nayar y Kaur (1969) mencionan el tipo *Drynaria* como patrón general. Debido a la escasa información sobre los prótalos de Gleicheniaceae y en especial para las especies mexicanas, se considera importante describir, comparar y aportar información detallada del desarrollo protálico de las especies de México para complementar la información y determinar si los caracteres de los gametofitos obtenidos, junto con las características del esporofito, puedan ser utilizados en la taxonomía para apoyar la posición basal de la familia dentro del grupo de los helechos leptosporangiados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención del material fértil y de respaldo:** El estudio se realizó a partir del material recolectado en localidades de los estados de Oaxaca, Puebla y Veracruz México, entre diciembre 2011 y diciembre 2012. Durante este período se obtuvieron un total de 16 números de recolecta de los cuales dos o tres números correspondieron a cada una de las especies mexicanas de Gleicheniaceae (Cuadro 1). Para cada ejemplar (número de recolecta), se separaron pinnas con soros maduros que fueron colocadas dentro de 15 a 20 sobres que se dejaron secar a temperatura ambiente durante una semana para propiciar la apertura de los esporangio y la liberación de las esporas (Farfán-Santillán, 2014). Una vez transcurrido este tiempo, el contenido de los sobres se pasó por un tamiz de malla metálica de 0.074 mm para eliminar restos de esporangios y fragmentos de pinnas; las esporas obtenidas se depositaron en frascos

plásticos de 3.5 cm de diámetro por 4 cm de altura, que fueron tapados y preservados en refrigeración (8 - 10 °C) durante dos semanas, antes de ser sembradas en las cajas con agar. Los ejemplares de respaldo fueron determinados hasta especie, con la ayuda de claves de identificación de Mickel y Smith (2004). Una vez procesados, fueron depositados en la colección del Herbario UAMIZ (Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa).

**Evaluación del tipo de germinación y desarrollo protálico:** Para determinar el tiempo, el tipo de germinación y dar seguimiento a los distintos estados de desarrollo protálico, para cada una de las especies, se sembraron esporas en cinco cajas de Petri de 5 cm de diámetro, que contenían agar y medio nutritivo de Thompson (Klekowski, 1969), para ello se utilizaron pinceles de pocas cerdas para asegurar una densidad de 100 a 150 esporas por cm<sup>2</sup>. Las cajas se rotularon con el nombre de la especie, número de recolecta y fecha de siembra, se colocaron en bolsas de plástico transparentes, fueron cerradas y colocadas dentro de una germinadora de plantas (Lumistell ICP 19), con un fotoperíodo de 12 hr luz/oscuridad, a una temperatura de 18 °C (noche) y 25 °C (día), con una humedad controlada de 50 %.

Los cultivos se revisaron cada tercer día para determinar el tiempo transcurrido desde la siembra hasta la aparición del primer rizoiide, lo cual marca el inicio de la germinación de la espora. Una vez que se observó la germinación de las primeras esporas (Stokey, 1950), se realizaron observaciones diarias y se registró durante dos semanas el número de esporas germinadas. Se hicieron preparaciones en fresco de esta primera etapa de germinación, se tomaron fotomicrografías con una cámara digital Olympus modelo C-5060 adaptada a un microscopio óptico Olympus BX-41. A partir de las fotomicrografías tomadas y según los criterios propuestos por Nayar y Kaur (1971), se definieron los tipos de germinación para las especies mexicanas de Gleicheniaceae.

Para determinar el patrón de desarrollo protálico, semanalmente se abrieron los cultivos

CUADRO 1  
Géneros y especies de la familia Gleicheniaceae recolectadas en el campo

TABLE 1  
Genera and species of the Gleicheniaceae family collected in the field

Especie	No. de recolecta	Localidad	Coordenadas geográficas	Tipo de vegetación y altitud en msnm	Mes de recolecta
<i>Dicranopteris flexuosa</i>	N. Farfán S. 30	• 9 km después de Putla, rumbo a Pinotepa Nacional, Mpio. Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	16° 58' 45" N, 97° 53' 50" W	BPE, 752 m	Diciembre 2012
	N. Farfán S. 31	• 7 km después de San Marcos Coyulito, carretera Pinotepa Nacional-Putla, Mpio. Putla Villa de Guerrero, Oaxaca.	16° 56' 30" N, 97° 55' 46" W	BTC, 963 m	Diciembre 2012
<i>Diplopterygium bancroftii</i>	N. Farfán S. 14	• 5 km después de Atotocoyan, carretera Tlatlauquitepec-Mazatepec, Mpio. Tlatlauquitepec, Puebla.	19° 56' 31" N, 97° 25' 37" W	BPE, 1 253 m	Diciembre 2011
	N. Farfán S. 16	• Puente el Tablazo, 9 km después de Atzalán sobre la carretera Altotonga-Tlapacoyan, Mpio. Atzalan, Veracruz.	19° 50' 26" N, 97° 13' 26" W	BMM, 1 140 m	Abril 2012
<i>Gleichenella pectinata</i>	N. Farfán S. 7	• 1 km después de Cruz Verde, hacia Hueytamalco, Mpio. Hueytamalco, Puebla.	19° 54' 10" N, 97° 27' 21" W	BMM, 1 113 m	Diciembre 2012
	N. Farfán S. 21	• Rancho San Bartolo, 7 km después de Ohuapan, Mpio. Tlaltetela, Veracruz.	19° 12' 42" N, 96° 59' 54" W	BMM, 1 438 m	Abril 2012
	N. Farfán S. 28	• 3 km después de San Felipe Usila, rumbo a San Juan Bautista, Mpio. San Felipe Usila, Oaxaca.	17° 52' 11" N, 96° 31' 59" W	BPE, 198 m	Diciembre 2012
<i>Sticherus bifidus</i>	N. Farfán S. 9	• 3 km antes de llegar a Cuetzalan, Mpio. Cuetzalan del Progreso, Puebla.	20° 02' 51" N, 97° 30' 19" W	BMM, 980 m	Diciembre 2011
	N. Farfán S. 22	• 3 km antes de llegar a Huatusco sobre la carretera Totutla-Huatusco, Mpio. Huatusco, Veracruz.	19° 10' 42" N, 96° 57' 43" W	BMM, 1 310 m	Abril 2012
	N. Farfán S. 25	• 7.5 km después de San Juan Coatzóspam sobre la carretera Huahutla-San Felipe Jalapa de Díaz, Mpio. San Juan Coatzóspam, Oaxaca.	18° 02' 41" N, 96° 42' 48" W	BE, 1 390 m	Diciembre 2012
<i>S. brevipubis</i>	N. Farfán S. 17	• Puente el Tablazo, 9 km después de Atzalán sobre la carretera Altotonga-Tlapacoyan, Mpio. Atzalan, Veracruz.	19° 50' 26" N, 97° 13' 26" W	BMM, 1 140 m	Abril 2012
	N. Farfán S. 23	• 1.2 km después de Plan de Guadalupe, sobre la carretera Teotitlán-Huautla, Mpio, Santa María Teopoxco, Oaxaca.	18° 09' 06" N, 96° 56' 59" W	BE, 1 239 m	Diciembre 2012

CUADRO 1 (Continuación) / TABLE 1 (Continued)

Especie	No. de recolecta	Localidad	Coordenadas geográficas	Tipo de vegetación y altitud en msnm	Mes de recolecta
<i>S. palmatus</i>	N. Farfán S. 10	• Entre Cascada las Brisas y Cascada Velo de Novia, Mpio. Cuetzalan del Progreso, Puebla.	20° 00' 22" N, 97° 30' 31" W	BMM, 928 m	Diciembre 2011
	N. Farfán S. 2	• Entronque a San José Chagchalzin, carretera Tlatlauquitepec-Mazatepec, Mpio. Tlatlauquitepec, Puebla.	19° 54' 06" N, 97° 28' 07" W	BMM, 1 627 m	Diciembre 2011
<i>S. underwoodianus</i>	N. Farfán S. 3	• Vereda Xucayucan - cascada de Puxtla, carretera Tlatlauquitepec-Mazatepec, Mpio. Tlatlauquitepec, Puebla.	19° 53' 52" N, 97° 28' 44" W	BMM, 1 627 m	Diciembre 2011
	N. Farfán S. 4	• La legua, km 5 de la carretera Teziutlán- Tlapacoyan, Mpio. Teziutlán, Puebla.	19° 50' 42" N, 97° 28' 18" W	BMM, 1 678 m	Diciembre 2011

\* BE= Bosque de encino, BPE= Bosque de pino-encino, BMM= Bosque mesófilo de montaña, BTC= Bosque tropical caducifolio.

\*BE= Oak forest, BPE= Pine-Oak forest, BMM= Cloud forest, BTC= Tropical deciduous forest.

y de los gametofitos vivos se hicieron preparaciones en fresco, se tomaron fotomicrografías de la fase filamentosa, laminar y adulta de todas las especies, siguiendo la metodología descrita para los tipos de germinación. En el caso de que los gametofitos tuvieran tamaños considerablemente grandes (3 a 4 cm), se utilizó un Estereoscopio American Optical modelo AO 580 para realizar las observaciones y tomar las fotomicrografías utilizando la misma cámara digital.

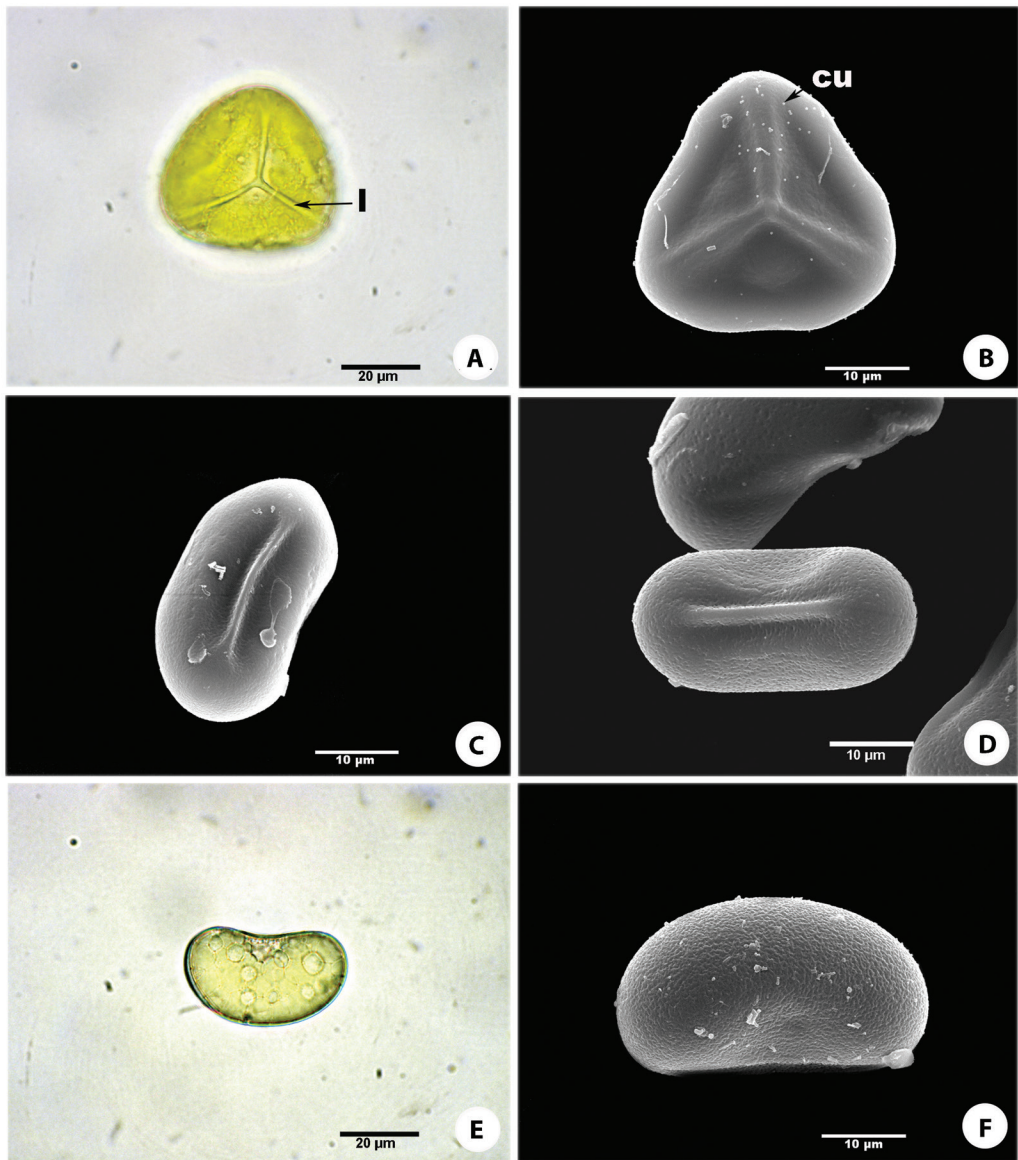
Las imágenes tomadas se analizaron y se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS5, se seleccionaron las más representativas para armar las láminas correspondientes a los tipos de germinación y patrón de desarrollo protálico de las especies con base al trabajo de Nayar y Kaur (1969).

Para la obtención de fotomicrografías con la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB), las esporas de las distintas especies fueron espolvoreadas directamente sobre los portamuestras para MEB con el uso de pinceles de pocas cerdas y los gametofitos maduros se fijaron con FAA + sacarosa al 0.8 %, se deshidrataron en series de alcoholes graduales (10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 %), se llevaron a punto

crítico, se colocaron sobre los portamuestras. Las esporas y los gametofitos fueron cubiertos con una capa de oro-paladio utilizando un equipo Denton Vacuum Desk II y las imágenes se obtuvieron utilizando el sistema Orion-Jeol a través del MEB JSM-5310LV; todas las láminas imágenes fueron elaboradas con el programa Photoshop CS5 (Chambi, Cardozo, & Martínez, 2013).

## RESULTADOS

**Esporas:** Las siete especies estudiadas fueron homospóricas, no clorofílicas, con coloraciones blanquecinas, amarillas o pardo claro; con lesura trilete en *Dicranopteris flexuosa* y *Diplopterygium bancroftii* (Fig. 1A y Fig. 1B), monoletes en *Gleichenella pectinata*, *Sticherus bifidus*, *S. brevipubis*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus* (Fig. 1C, Fig. 1D, Fig. 1E y Fig. 1F). Las esporas más pequeñas se presentaron en *D. bancroftii*, con 25 µm de diámetro ecuatorial; las más grandes fueron las de *S. brevipubis* con 48 µm de diámetro ecuatorial. Se observó una superficie escábrida en las esporas de *D. flexuosa*; psilada en *D. bancroftii*, nanofoveolada en *G. pectinata*, nanofoveolada



**Fig. 1.** Esporas triletes y monoletes de Gleicheniaceae. **(A)** Espora trilete de *Dicranopteris flexuosa* (MO). **(B)** Espora trilete de *Diplopterygium bancroftii* (MEB). **(C)** Espora monolete de *Gleichenella pectinata* (MEB). **(D)** Espora monolete de *Sticherus bifidus* (MEB). **(E)** Espora monolete de *S. brevipubis* (MO). **(F)** Espora monolete de *S. underwoodianus* (MEB). cu= cuerpos de Ubisch, l= lesura.

**Fig. 1.** Trilete and monolete spores of Gleicheniaceae. **(A)** Trilete spores of *Dicranopteris flexuosa* (OM). **(B)** Trilete spores of *Diplopterygium bancroftii* (SEM). **(C)** Monolete spores of *Gleichenella pectinata* (SEM). **(D)** Monolete spores of *Sticherus bifidus* (SEM). **(E)** Monolete spores of *S. brevipubis* (OM). **(F)** Monolete spores of *S. underwoodianus* (SEM). cu= Ubich bodies, l= laesura.

a perforada en *S. bifidus*, microfoveolada a perforada en *S. brevipubis*, nanofoveolada en *S. palmatus* y hamulada a nanofoveolada en *S. underwoodianus*.

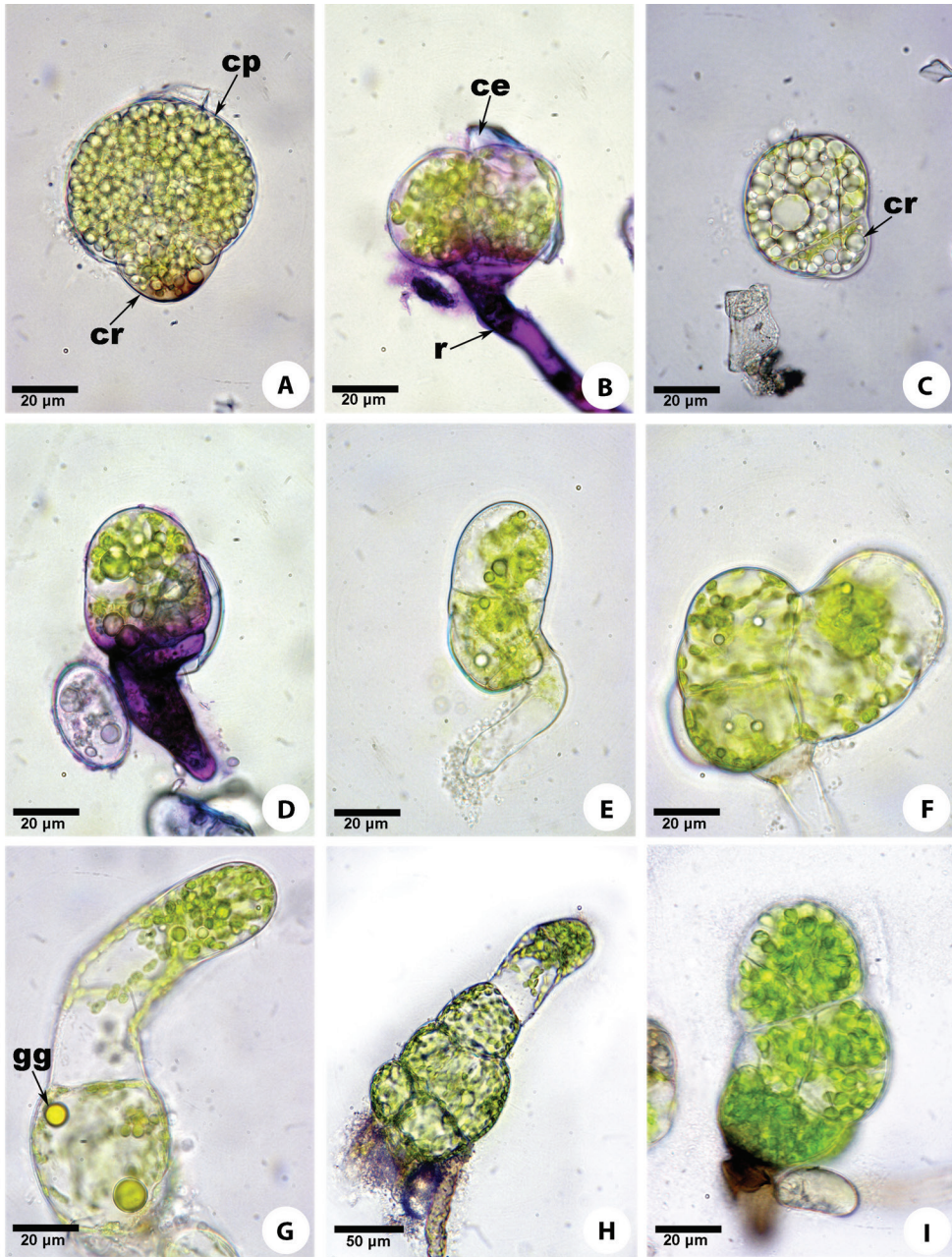
**Germinación:** La germinación de las esporas de las Gleicheniaceae mexicanas fue asincrónica, inicia entre los 11 y los 20 días posteriores a la siembra, y por ello fue posible encontrar esporas en proceso de germinación y filamentos en un mismo medio de cultivo. En este grupo de plantas se observaron dos tipos de germinación: *Cyathea* en *Dicranopteris flexuosa* y *Diplazium bancroftii*, caracterizado por que la primera división celular es paralela al eje polar de la espora, la segunda división es perpendicular a la primera división, por lo cual el rizoides y filamento germinal crecen de manera perpendicular uno del otro (Fig. 2A y Fig. 2B). También se observó el tipo *Gleichenia* en *Gleichenella pectinata*, *Sticherus bifidus*, *S. brevipubis*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus*, donde las primeras dos o tres divisiones se dan de manera paralela al eje polar de la espora, como resultado el primer rizoides y filamento germinal crecen en sentidos opuestos a lo largo del eje ecuatorial (Fig. 2C y Fig. 2D).

**Fase filamentosa:** La formación de filamentos se presentó entre los 15 y 30 días posteriores a la siembra. En *D. flexuosa* y *G. pectinata* se observaron de dos a tres células; una célula basal esférica con numerosas gotas lipídicas y una o dos células apicales alargadas con gran cantidad de cloroplastos (Fig. 2E, Fig. 3F y Fig. 3G); en *S. underwoodianus* el filamento inicial, conformado por tres células, se dividió rápidamente para formar una base ancha de cuatro a seis células de grosor, a partir de la cual, se podía formar nuevamente un filamento uniseriado (Fig. 2H); en *D. bancroftii*, *S. bifidus*, *S. brevipubis* y *S. palmatus* los filamentos constaron de dos a cinco células de largo; son cortos y se dividen rápidamente para iniciar la formación de la lámina (Fig. 2I).

**Fase laminar:** La aparición de láminas se dio entre los 22 y los 74 días posteriores a la siembra. Con base en los patrones de desarrollo protálico se observaron tres grupos; en el primero se presentó el tipo *Drynaria* observado en *D. flexuosa*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus*, diferenciado por el establecimiento retardado de la célula meristemática apical, los gametofitos generalmente producen pelos marginales y superficiales en etapas adultas (Fig. 3A y Fig. 3B); el segundo correspondió al tipo *Marattia* (amorfo) presente en *D. bancroftii*, *G. pectinata* y *S. bifidus*; caracterizado por la formación de una lámina circular u ovada de varias capas de células originadas a partir de una zona meristemática difusa, y que posteriormente, es remplazado por un meristemo pluricelular (Fig. 3D y Fig. 3E) y el tercero fue el tipo *Osmunda* observado en *G. pectinata* y *S. brevipubis*, identificado por la formación de un filamento de dos células que se dividen para dar origen a una lámina de cuatro células a partir de la cual se genera el gametofito laminar (Fig. 3C, Fig. 3D, Fig. 3E, Fig. 3F).

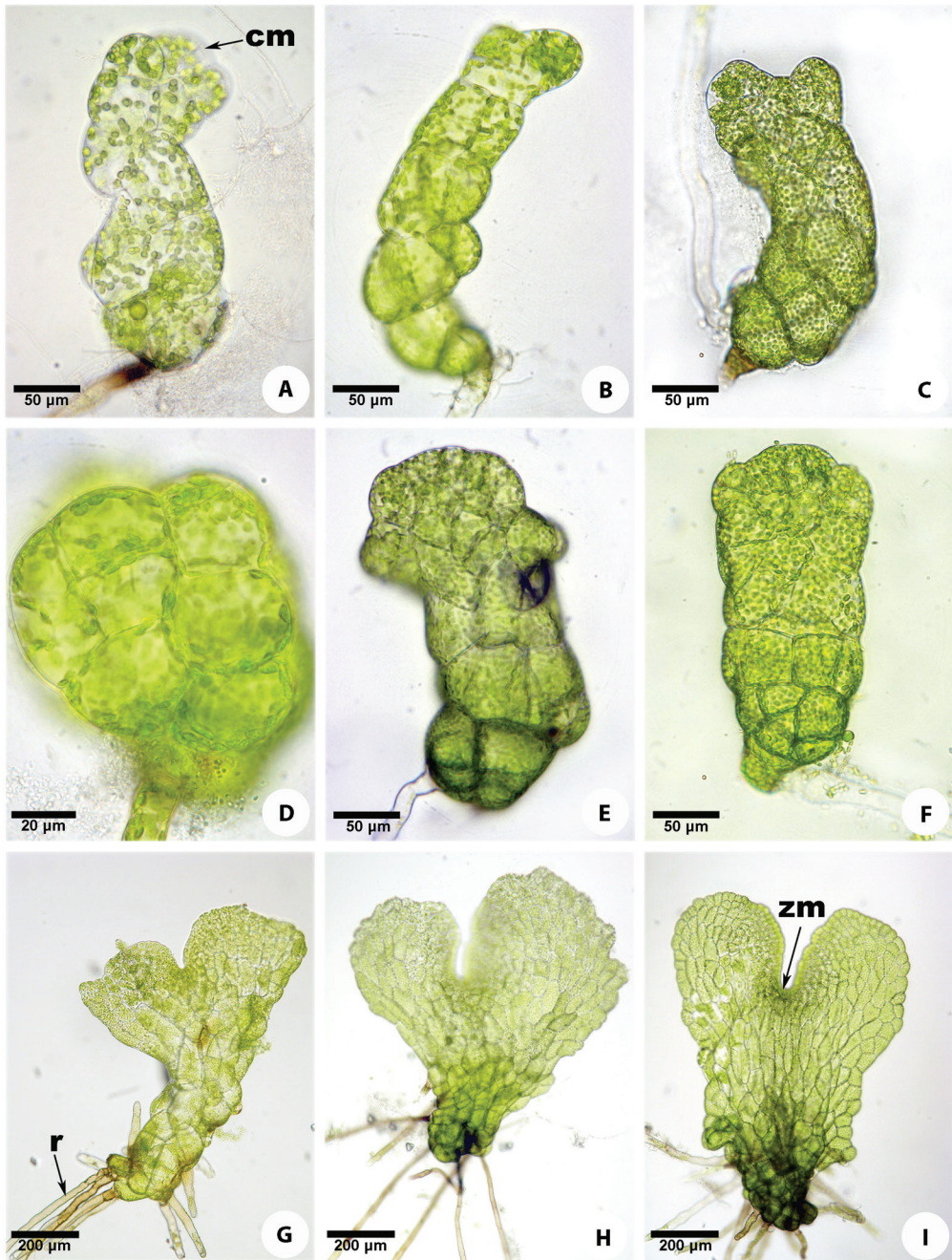
La diferencia en el tiempo de formación de la fase laminar en las diferentes especies puede relacionarse con el tipo de desarrollo protálico que presentan. Por ejemplo, aquellas con el tipo *Osmunda* presentaron láminas entre los 22 y 29 días después de haber sido sembradas; las que presentan el tipo *Marattia*, formaron láminas entre los 32 y los 40 días, y las que tienen un desarrollo tipo *Drynaria* entre los 47 y los 74 días.

**Gametofito adulto:** Los gametofitos de *D. flexuosa*, *D. bancroftii*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus* fueron cordiformes con un cojinete grueso, amplias alas de márgenes plegados (Fig. 3G, Fig. 3H, Fig. 3I, Fig. 4A, Fig. 4B, Fig. 4C); los de *G. pectinata*, *S. bifidus* y *S. brevipubis* fueron espatulado-cordiformes, con un cojinete grueso y alas con margen plegado; desarrollaron numerosos rizoides sobre la región basal y ventral del cojinete (Fig. 4D, Fig. 5A); en la parte distal y cerca de la zona meristemática de los gametofitos adultos



**Fig. 2.** Germinación y filamentos de los gametofitos de Gleicheniaceae. **(A)** Espora de *Dicranopteris flexuosa* germinando. **(B)** Gametofito de *Diplopterygium bancroftii*. **(C)** Espora de *Sticherus bifidus* germinando. **(D)** Filamento de *S. brevipubis*. **(E-F)** Filamentos de *Gleichenella pectinata*. **(G)** Filamento de *D. flexuosa*. **(H)** Gametofito de *S. underwoodianus*. **(I)** Gametofito de *S. palmatus*. ce= cubierta de la espóra, cp= célula protálica, cr= célula rizoidal, gg=glóbulos de grasa, r= rizoides.

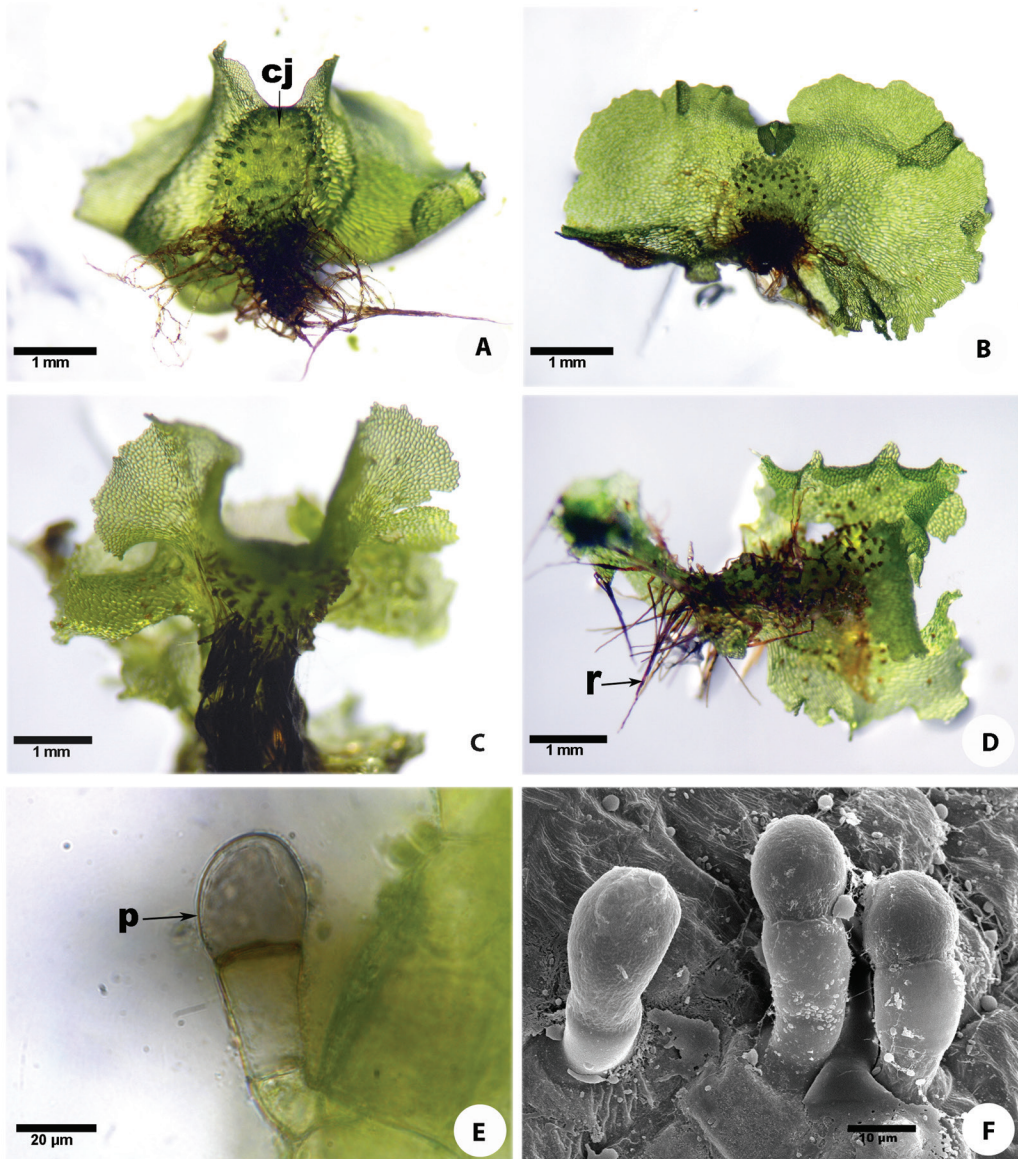
**Fig. 2.** Germination and filaments of the gametophyte of Gleicheniaceae. **(A)** Germinating spore of *Dicranopteris flexuosa*. **(B)** Gametophyte of *Diplopterygium bancroftii*. **(C)** Germinating spore of *Sticherus bifidus*. **(D)** Filamentous phase of *S. brevipubis*. **(E-F)** filamentous phase of *Gleichenella pectinata*. **(G)** Filamentous phase of *D. flexuosa*. **(H)** Gametophyte of *Sticherus underwoodianus*. **(I)** Gametophyte of *S. palmatus*. ce= spore coat, cp= prothallial cell, cr= rhizoidal cell, gg= oil bodies, r= rhizoid.



**Fig. 3.** Gametofitos laminares de Gleicheniaceae. (A) *Dicranopteris flexuosa*. (B) *Sticherus palmatus*. (C) *Gleichenella pectinata*. (D) *Diplopterygium bancroftii*. (E) *S. bifidus*. (F) *S. brevipubis*. (G) Gametofito de *D. flexuosa*. (H) Gametofito de *D. bancroftii*. (I) *S. palmatus*. cm= célula meristemática, r= rizoide, zm= zona meristemática.

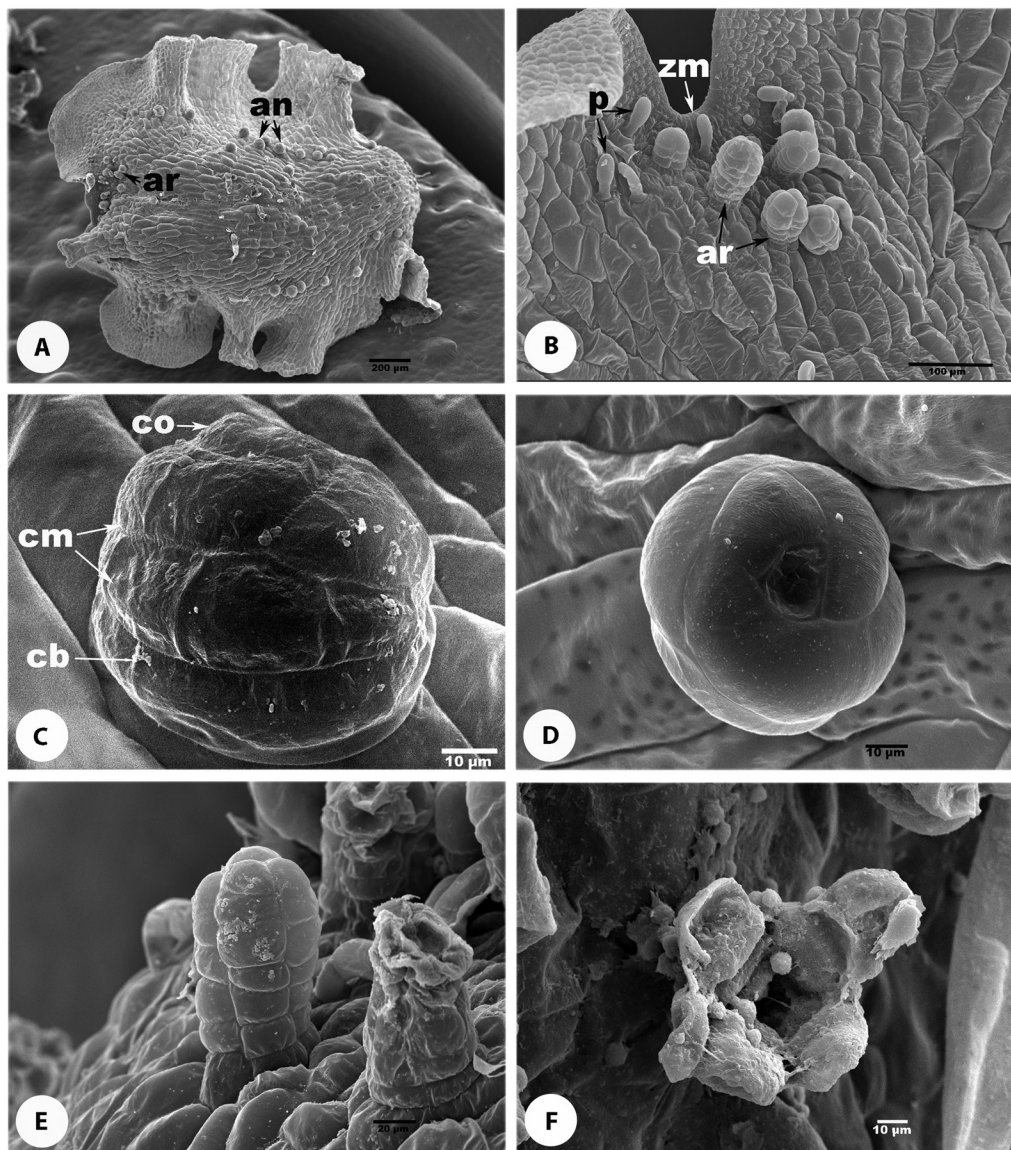
**Fig. 3.** Laminar phase of the gametophytes of Gleicheniaceae. (A) *Dicranopteris flexuosa*. (B) *Sticherus palmatus*. (C) *Gleichenella pectinata*. (D) *Diplopterygium bancroftii*. (E) *S. palmatus*. (F) *S. brevipubis*. (G) Gametophyte of *D. flexuosa*. (H) Gametophyte of *D. bancroftii*. (I) *S. palmatus*. cm= meristematic cell, r= rhizoid, zm= meristematic zone.





**Fig. 4.** Gametofitos adultos y pelos de Gleicheniaceae. (A) *Dicranopteris flexuosa*, (B) *Diplopterygium bancroftii*, (C) *Sticherus underwoodianus*. (D) *S. bifidus*. (E) Pelo tricelular de *D. flexuosa*. (F) Pelos bi-tricelulares de *S. palmatus*. cj= cojinete, p= pelo, r= rizoides.

**Fig. 4.** Adult gametophytes and hairs of the Gleicheniaceae. (A) *Dicranopteris flexuosa*, (B) *Diplopterygium bancroftii*. (C) *Sticherus underwoodianus*. (D) *S. bifidus*. (E) tricellular hair of *D. flexuosa*. (F) Bicellular and tricellular hairs of *S. palmatus*. cj= cushion, p= hair, r=rhizoids.



**Fig. 5.** Gametangios de Gleicheniaceae. **(A)** Gametofito maduro de *Gleichenella pectinata*. **(B)** Acercamiento de la zona meristemática de un gametofito de *G. pectinata*. **(C)** Anteridio de *Diplopterygium bancroftii*. **(D)** Anteridio de *Sticherus bifidus*. **(E)** Cuellos de arquegonios *D. bancroftii*. **(F)** cuello abierto de arquegonio de *S. palmatus*. an= anteridios, ar= arquegonios, cb= célula basal, cm= células medias, co= célula opercular, p= pelos, zm= zona meristemática.

**Fig. 5.** Gametangia of the Gleicheniaceae. **(A)** Mature gametophyte of *Gleichenella pectinata*. **(B)** Close up of the meristematic zone of a gametophyte of *G. pectinata*. **(C)** Antheridium of *Diplopterygium bancroftii*. **(D)** Antheridium of *Sticherus bifidus*. **(E)** Archaegonium necks of *D. bancroftii*. **(F)** Open neck of an Archaegonium of *S. palmatus*. an= antheridium, ar= archaegonium, cb= basal cell, cm= medial cell, co= opercular cell, p= hairs, zm= meristematic zone.

de todas las especies se formaron pelos bicelulares o tricelulares, glandulares y característicos de la familia (Fig. 4E y Fig. 4F). Los gametofitos viejos adquirieron formas acintadas con cojinetes gruesos y alas que se contraían y marchitaban con el tiempo.

**Gametangios:** Los gametofitos de *S. brevipubis* no presentaron anteridios después de 730 días de cultivo, tiempo que duró el estudio; sin embargo, para el resto de las especies mexicanas de Gleicheniaceae, se encontraron anteridios desde los 50 y hasta los 185 días posteriores a la siembra. En talos viejos fue posible observarlos entremezclados con los rizoides y sobre la superficie de las alas. Presentaron un número variable de células, desde seis como en *Sticherus bifidus* (Fig. 5D) a ocho como en *Diplopterygium bancroftii* (Fig. 5C), en ambos casos, las paredes de los anteridios fueron semiglobosas y la liberación de los anterozoides se dio por el desprendimiento de una pequeña célula opercular (Fig. 5C y Fig. 5D).

Los arquegonios se formaron entre los 75 y 110 días en *D. flexuosa*, *G. pectinata* y *S. brevipubis*; en *D. bancroftii*, *S. bifidus*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus* entre los 180 y los 273 días. En cuanto a su morfología, fueron muy similares en todas las especies, poseían cuellos gruesos con cuatro hileras formadas por cuatro a siete células de longitud. Son rectos o ligeramente curvados y dirigidos hacia la zona meristemática, la boca se encontraba conformada por cuatro células, que se abrían como cuatro valvas cuando los arquegonios maduraban (Fig. 5A, Fig. 5B, Fig. 5E y Fig. 5F).

**Esporofitos:** De las siete especies estudiadas se observó fecundación en *Diplopterygium bancroftii* con la consecuente formación de esporofitos a los 291 días; en *Gleichenella pectinata* los esporofitos se formaron a los 180 días, y en *Sticherus bifidus* a los 325 días posteriores a la siembra. Las primeras hojas de los esporofitos fueron espatulado-bilobadas, sin embargo, gradualmente adquirieron la forma bifurcadas pseudodicotómicamente de las hojas de las Gleicheniaceae. Los primordios

foliares no presentaron vernación circinada, y esta sólo se presentó posteriormente, cuando las hojas con las láminas adquirieron una forma pinnatífida.

## DISCUSIÓN

Las esporas de Gleicheniaceae son aclo-rofilicas, homospóricas, fotoblásticas positivas y de germinación relativamente lenta como se ha reportado en otros trabajos (Tryon & Tryon, 1982; Kramer, 1990; Tryon & Lugardon, 1991); en cuanto a la forma de las esporas se encontraron dos grupos; con esporas triletes en *Dicranopteris flexuosa* y *Diplopterygium bancroftii*, y con esporas monoletes en *Gleichenella pectinata*, *Sticherus bifidus*, *S. brevipubis*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus*, lo que coincide con lo reportado en la literatura (Erdtman & Sorsa, 1971; Tryon & Tryon, 1982; Tryon & Lugardon, 1991; Velázquez-Montes, 2012). Así mismo, coincidimos con Punt, Hone, Blackmore, Nilsson y Le (2007), en la ornamentación escábrida en *Dicranopteris flexuosa* y psilada con escasos cuerpos de Ubisch en *Diplopterygium bancroftii* como se ha reportado anteriormente por Lugardon (1974), Tryon y Lugardon (1991) y Velázquez-Montes (2012). En *Gleichenella pectinata* se observó que la superficie de las esporas es nanofoveolada a ligeramente psilada con cuerpos de Ubisch, ya que examinando cuidadosamente se pueden apreciar depresiones redondas u ovaladas cuyo diámetro es menor a 0.5 µm, similar a lo reportado por Tryon y Tryon (1982), y no lisas a ligeramente granuladas como reportan Stokey (1950) y Velázquez-Montes (2012). De igual manera y tomando en cuenta la terminología propuesta por Punt et al. (2007) y lo reportado por Farfán-Santillán, Mendoza-Ruiz, Pérez-García y Velázquez-Montes (2016), se encontró que la ornamentación de las esporas de *Sticherus bifidus*, *S. brevipubis*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus* presenta nanofoveolos o microfoveolos en todos los casos, pudiendo ser además hamulada y con cuerpos de Ubisch en *S. underwoodianus*, lo cual difiere de lo reportado por Stokey (1950) y Velázquez-Montes (2012).

cuyas observaciones se realizaron utilizando un microscopio óptico.

En cuanto a la germinación, Nayar y Kaur (1971) reportaron que las especies de la familia presentan el tipo *Gleichenia*, mientras que Haufler y Adams (1982) observaron una germinación de tipo amorfo para *Sticherus bifidus*, lo que podría proporcionar ventajas adaptativas a los gametofitos, ya que la germinación en forma de una masa de células (amorfa) perdería agua más lentamente, sobre todo si los gametofitos crecen en taludes expuestos a la luz solar, por lo que tendrían una mayor oportunidad de sobrevivir a períodos de desecación prolongados, que los gametofitos con una germinación en forma de un filamento y una lámina uniestratificada. De acuerdo a los patrones de germinación propuestos por Nayar y Kaur (1971) y basándonos en las observaciones realizadas en el presente estudio, las especies mexicanas de la familia Gleicheniaceae con esporas monoletes presentaron una germinación de tipo *Gleichenia*, mientras que las especies con esporas triletes presentaron el tipo *Cyathea*. Stokey (1945) y Nayar y Kaur (1971) reportaron una relación similar en *Dipteris conjugata* Reinw. y *D. wallichii* (R.Br.) T. Moore, ya que, para estos taxa, cuyas esporas son monoletes, encontraron una germinación tipo *Gleichenia*. La relación entre el tipo de espora y tipo de germinación descrita en este trabajo no se ha reportado para otras especies de helechos (Pérez-García & Mendoza-Ruiz, 2004).

Respecto a la fase laminar, Stokey (1950) reportó una heterogeneidad en el patrón de desarrollo protálico de las Gleicheniaceae, mientras que Nayar y Kaur (1971) mencionaron que corresponde al tipo *Drynaria*. Los resultados obtenidos coinciden parcialmente con lo propuesto por Nayar y Kaur (1969), ya que, en las especies aquí estudiadas, además del tipo *Drynaria* presente en *Dicranopteris flexuosa*, *Sticherus palmatus* y *Sticherus underwoodianus*, se registraron también los tipos *Osmunda* en *Gleichenella pectinata* y *Sticherus brevipubis*, y el tipo *Marattia* en *Diplopteridium bancroftii* y *Sticherus bifidus*. La variación en los patrones de desarrollo

protálico, y en especial, la presencia de aquellos en los que se forman láminas muy poco tiempo después de la germinación, como es el caso de los tipos *Osmunda* y *Marattia*, han sido considerados como caracteres primitivos (Stokey, 1945, 1950, 1951), lo cual, en conjunto con las características del esporofito, apoyaría la inclusión de la familia dentro de los helechos leptosporangiados primitivos.

Las características de los gametofitos adultos, así como de los gametangios fueron predominantemente primitivas, como lo reportó previamente Stokey (1950) para otras especies de Gleicheniaceae; algunas de estas son las siguientes: gametofitos espatulado-cordiformes a cordiformes con cojinetes gruesos, alas amplias con márgenes plegados (ondulados); Anteridios con seis a ocho células; arquegonios morfológicamente muy semejantes con cuello recto a ligeramente curvado y cuatro hileras de células, con cinco a siete células de largo cada una.

En cinco de las siete especies estudiadas se presentó una marcada diferencia en el tiempo de formación de los anteridios con respecto a los arquegonios, siendo estos últimos abundantes en gametofitos viejos (más de 100 días de cultivo), mientras que los anteridios se formaron de manera escasa o no se formaron en estos mismos gametofitos. Este fenómeno fue observado en poblaciones de gametofitos que crecen y se desarrollan a la sombra de los esporofitos parentales (Campbell, 1908), e indica la presencia de una estrategia reproductiva en la que, al retrasar el tiempo de formación de los gametangios y mediante la producción de yemas, se promueve la formación de nuevos gametofitos, que al llegar al estado adulto y contar con condiciones favorables, se fecundan entre ellos (Mehltreter et al., 2010) para propiciar la variabilidad genética en los esporofitos resultantes, confiriéndoles una mayor capacidad de adaptarse a los cambios ambientales presentes en los taludes donde habitan las diversas especies de Gleicheniaceae.

Finalmente, las características de los gametofitos observados fueron predominantemente plesiomórficos y se han tomado en cuenta

para incluir a la familia Gleicheniaceae junto con *Dipteris conjugata* Reinw. y *Matonia pectinata* R. Br. dentro del orden Gleicheniales y en el grupo de los helechos leptosporangiados basales (Stokey, 1945; Stokey & Atkinson, 1952; Atkinson, 1973; Atkinson & Stokey, 1973; Smith et al., 2006). Por lo anterior, es importante seguir estudiando el desarrollo de los gametofitos de otras especies de la familia Gleicheniaceae de los trópicos americanos, que no han sido incluidos en trabajos previos, para verificar si la morfología de las esporas, el tipo de germinación y los patrones de desarrollo protálico son similares, con lo cual se podría determinar que los caracteres de los gametofitos son útiles en la delimitación de la familia.

### AGRADECIMIENTOS

A Silvia Espinoza por el apoyo en el procesamiento de muestras en el Microscopio Electrónico de Barrido, así como a los revisores anónimos por sus valiosos comentarios para enriquecer el manuscrito.

### RESUMEN

En México, la familia Gleicheniaceae está representada por *Dicranopteris flexuosa*, *Diplopterygium bancroftii*, *Gleichenella pectinata*, *Sticherus bifidus*, *S. brevipubis*, *S. palmatus* y *S. underwoodianus*; existen pocos trabajos sobre el estudio de los gametofitos de algunas especies de esta familia, por lo que el objetivo es describir, comparar y aportar información sobre su germinación, desarrollo de los gametofitos y finalmente determinar si los caracteres de los prótalos son útiles en la delimitación taxonómica del grupo. Para ello se recolectaron ejemplares y esporas de cada taxón en el campo, las esporas se sembraron en cajas de Petri que contenían agar y medio nutritivo de Thompson, se cultivaron en germinadoras bajo condiciones controladas de luz (12hrs luz/oscuridad), humedad (50 %) y temperatura (18 °C noche y 25 °C día); se realizaron observaciones de material fresco y se tomaron fotomicrografías utilizando un microscopio óptico y un microscopio electrónico de barrido. Como resultado se distinguieron dos tipos de germinación *Gleichenia* y *Cyathea*. En cuanto al desarrollo protálico, se observaron tres tipos, *Marattia*, *Osmunda* y *Drynaria*. Debido a las variaciones en el tipo de germinación que no habían sido reportadas para la familia en la literatura, así como por la heterogeneidad presente en el patrón de desarrollo protálico y la presencia de más de cuatro células en los gametangios, es importante ampliar el

estudio de otras especies para determinar el valor taxonómico de las características morfológicas de los gametofitos, así como para determinar si estas variaciones se presentan en otras especies de la familia.

**Palabras clave:** *Dicranopteris*, *Diplopterygium*, germinación, *Gleichenella*, México, Polypodiophyta, *Sticherus*.

### REFERENCIAS

- Atkinson, L. R. (1973). The gametophyte and family relationships. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 67 (Suppl. 1), 73-90.
- Atkinson, L. R., & Stokey, A. G. (1973). The gametophyte of some Jamaican thelypteroid ferns. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 66, 23-36.
- Campbell, D. H. (1908). The prothallium of *Kaulfussia* and *Gleichenia*. *Annales do Jardin Botanique de Buitenzorg*, 7, 69-102.
- Chambi, J. C., Cardozo, R. M., & Martínez, O. G. (2013). Germinación de esporas y gametofitos de *Polystichum montevidense* (Spreng.) Rosenst. (Dyopteridaceae). *Botanica Complutense*, 37, 47-52.
- Christenhusz, M. J. M., & Chase, M. W. (2014). Trends concepts in fern classification. *Annals of Botany*, 113, 1-24.
- Erdtman, G., & Sorsa, P. (1971). *Pollen and Spore Morphology*, *Plant Taxonomy: Pteridophyta* (pp. 66, 69, 84, 92, 176). Estocolmo: Almqvist & Wiksell.
- Farfán-Santillán, N. (2014). *Viabilidad de esporas y desarrollo protálico de las especies mexicanas de la familia Gleicheniaceae* (Tesis inédita de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.
- Farfán-Santillán, N., Mendoza-Ruiz, A., Pérez-García, B., & Velázquez-Montes, E. (2016). Palinología de las especies mexicanas de Gleicheniaceae. *Botanical Sciences*, 94(2), 281-289.
- Haufler, C. H., & Adams, W. W. (1982). Early gametophyte ontogeny of *Gleichenia bifida* (Willd.) Spreng. Phylogenetic and Ecological Implications. *American Journal of Botany*, 69, 1560-1565.
- Klekowski, E. J. Jr. (1969). Reproductive Biology of the pteridophyta III. A study of Blechnaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 62, 360-377.
- Kramer, K. U. (1990). Gleicheniaceae. En K. Kubitzky, K. U. Kramer, & P. S. Green (Eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Volume I: Pteridophytes and Gymnosperms* (pp. 145-152). Germany: Springer-Verlag.

- Lugardon, B. (1974). La structure fine de l'exospore et de la périspore des filicinaées II. Filicales. Commentaires. *Pollen et Spores*, 16, 161-226.
- Mehlreter, K., Walker, R. L., & Sharp, J. M. (2010). *Fern Ecology*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Mickel, J. T., & Smith, A. R. (2004). The pteridophytes of Mexico. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 88, 1-1054.
- Nayar, B. K., & Kaur, S. (1969). Types of prothallial development in homosporous ferns. *Phytomorphology*, 19, 179-188.
- Nayar, B. K., & Kaur, S. (1971). Gametophytes of homosporous ferns. *The Botanical Review*, 37, 295-396.
- Pérez-García, B., & Mendoza-Ruiz, A. (2004). A contribution to the gametophyte morphology and development in several species of *Thelypteris*, Thelypteridaceae. *American Fern Journal*, 94, 143-154.
- Punt, W., Hone, P. P., Blackmore, S., Nilsson, S., & Le, T. A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Paleobotany and Palynology*, 143, 1-81.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2006). A Classification for Extant Ferns. *Taxon*, 55, 705-731.
- Stokey, A. G. (1945). The gametophytes of *Dipteris conjugatum*. *Botanical Gazette (Crawfordsville)*, 106, 402-411.
- Stokey, A. G. (1950). The gametophyte of the Gleicheniaceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 77, 323-339.
- Stokey, A. G. (1951). The contribution by the gametophyte to classification of homosporous ferns. *Phytomorphology*, 1, 39-58.
- Stokey, A. G., & Atkinson, R. L. (1952). The gametophyte and young sporophyte of *Matonia pectinata* R. Br. *Phytomorphology*, 2, 138-150.
- Tryon, A. F., & Lugardon, B. (1991). *Spores of the pteridophyta surface, wall structure and diversity based on electron microscope studies*. New York: Springer-Verlag.
- Tryon, R. M., & Tryon, A. F. (1982). *Fern and Fern Allied Plants with Special Reference to Tropical America*. Nueva York: Springer-Verlag.
- Velázquez-Montes, E. (2012). Gleicheniaceae. En N. Diego & R. M. Fonseca (Eds.), *Flora de Guerrero* (No. 53, pp. 1-30). México: Facultad de Ciencias, UNAM.