

MORFOGÉNESIS DE GAMETOFITOS DE CUATRO ESPECIES MEXICANAS DE LA FAMILIA THELYPTERIDACEAE

MORPHOGENESIS OF GAMETOPHYTES OF FOUR MEXICAN SPECIES OF THE FAMILY THELYPTERIDACEAE

ALEJANDRA CASTREJÓN-VARELA¹, ANICETO MENDOZA-RUIZ¹, SILVIA ESPINOSA-MATÍAS², ALMA OROZCO-SEGOVIA³,
 FELIPE GÓMEZ-NOGUEZ⁴, BLANCA PÉREZ-GARCÍA^{1*}

¹Área de Botánica Estructural y Sistemática Vegetal, Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

²Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

³Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

⁴Herbario de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, México.

*Autor para correspondencia: bpg@xanum.uam.mx

Resumen

Antecedentes: Existen trabajos sobre la fase sexual para algunas especies de Thelypteridaceae, pero no hacen mención sobre tipos de germinación y desarrollo protálico.

Pregunta: ¿Existe variación en el tipo de germinación y desarrollo protálico en los gametofitos de cuatro especies de la familia Thelypteridaceae?

Especies de estudio: Cuatro especies de la familia Thelypteridaceae: *Meniscium falcatum*, *Goniopteris mollis*, *Goniopteris liebmanni* y *Goniopteris minor*, de los estados de Chiapas, Oaxaca y Tabasco.

Métodos: Se recolectaron esporas, se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Thompson, guardándose en bolsas de plástico transparentes y se colocaron en una cámara de crecimiento de plantas. Las fases de desarrollo de los gametofitos se fijaron en FAA con sacarosa al 0.8 %, se deshidrataron en alcoholes graduales, se desecaron en punto crítico, se montaron en porta-muestras y se recubrieron con oro. Las microfotografías se obtuvieron usando un microscopio electrónico de barrido (MEB) Modelo Jeol JSM5310-LV.

Resultados: Las esporas son monoletes y perinadas. La germinación es de tipo *Vittaria*, y el desarrollo protálico de tipo *Aspidium*. Los gametofitos adultos son cordiforme-espulados, con pelos-capitados glandulares, simples y unicelulares. Los anteridios y arquegonios son del tipo leptosporangios. La primera hoja del esporofito tiene forma lobada, bi o trilobada, con venación dicotómica abierta, con pelos-capitados glandulares, simples unicelulares y aciculares y estomas polocíticos hipostomáticos.

Conclusiones: Las diferencias observadas entre las especies estudiadas son: tamaño de las esporas, ornamentación del perisporio, periodos de germinación y emergencia del rizoide, tipo y tamaño de los pelos, tiempo de desarrollo de los gametangios y esporofitos.

Palabras clave: Ciclos de vida, fase sexual, *Goniopteris*, helechos, MEB, *Meniscium*, morfología, Thelypteridoideae.

Abstract

Background: Although there have been studies on the sexual phase of some species of Thelypteridaceae, none have included germination types and prothallial development.

Question: Is there variation in the type of germination and prothallial development in the gametophytes of four species in the family Thelypteridaceae?

Study species: Four species of the family Thelypteridaceae: *Meniscium falcatum*, *Goniopteris mollis*, *Goniopteris liebmanni*, and *Goniopteris minor* of the states of Chiapas, Oaxaca, and Tabasco.

Methods: Spores were collected, sown in Petri dishes with Thompson culture medium, stored in transparent plastic bags, and placed in a plant growth chamber. The various stages of gametophyte development were fixed in FAA with 0.8 % sucrose, dehydrated in gradual alcohols, critical point dried, mounted on stubs, and coated with gold. The photomicrographs were obtained using a scanning electron microscope (SEM) Model Jeol JSM5310-LV.

Results: The spores are monolete and perinate. Germination is of the *Vittaria* type, and prothallial development of the *Aspidium* type. Adult gametophytes are cordiform-spatulate, with numerous glandular, simple and single-celled hairs, antheridia and archegonia are of the leptosporangiate type. The first sporophyte leaf is bi or trilobate, with free dichotomous venation, with capitate-glandular hairs, simple, unicellular and acicular hairs, and hypostomatic polycytic stomata.

Conclusions: The differences observed among the studied species are: spore size, perispore ornamentation, germination and emergence timing of the rhizoids, type and size of hairs, and development time of gametangia and sporophytes.

Key words: Ferns, *Goniopteris*, life cycles, morphology, *Meniscium*, phase sexual, SEM, Thelypteridoideae.

Las Thelypteridaceae son plantas terrestres que se caracterizan por tener dos haces vasculares semicirculares en la base del peciolo que se unen en forma de media luna en la parte distal del peciolo; presencia de pelos aciculares en las hojas; soros redondos a oblongos; indusio presente o ausente; esporas monoletes no verdes con perisporio prominente; gametofitos epigeos, clorofilicos, cordiformes y un número cromosómico $n = 27$ a 36 (Mickel & Smith 2004).

La familia Thelypteridaceae se encuentra en el clado de eupolipodiales II y su filogenia ha sido ampliamente estudiada y discutida como lo indican los trabajos de Rothfels *et al.* (2012), Testo & Sundue (2016), Wei *et al.* (2017) y Wolf *et al.* (2018), siendo un grupo monofilético con 30 géneros reconocidos (PPG I 2016, Almeida *et al.* 2016). En este manuscrito el sistema de clasificación que adoptamos es el de PPG I (2016). Nuestros taxones en estudio se ubican dentro de la Clase Polypodiopsida Cronquist, orden Polypodiales Link, familia Thelypteridaceae Ching ex Pic. Serm., subfamilia Thelypteridoideae C. F. Reed. En este trabajo incluimos especies de los géneros *Goniopteris* C. Presl y *Meniscium* Schreb., los cuales son monofiléticos (Smith & Cranfill 2002, He & Zhang 2012, Almeida *et al.* 2016, Patel *et al.* 2019).

Con respecto a la literatura de la fase sexual de esta familia, Momose (1941), Chandra (1963), Kachroo (1963), describieron la morfogénesis de las especies Americanas y Asiáticas, pero en estos primeros estudios, no se mencionan los tipos de germinación, ni los tipos de desarrollo protálico, los cuales son criterios ontogenéticos de importancia taxonómica que surgieron a partir de los trabajos de Nayar & Kaur (1968, 1971), Atkinson (1971, 1973, 1975) y Atkinson & Stokey (1973). Por otro lado, Huckaby & Raghavan (1981a, b) estudiaron la germinación de esporas de *Thelypteris* s.l. (de acuerdo a PPG I 2016, actualmente se circunscriben dentro de los géneros *Amauropelta* Kunze, *Amblovenatum* J.P.Roux, *Chingia* Holttum, *Christella* H.Lév., *Glaphyopteridopsis* Ching, *Macrothelypteris* (H.Ito) Ching, *Phegopteris* (C. Presl) Fée, *Pneumatopteris* Nakai, *Pronephrium* C.Presl, *Sphaerostephanos* J. Sm., *Pseudophegopteris* Ching y *Thelypteris* s.s.) y establecieron que el patrón de germinación, es un carácter útil para propósitos taxonómicos. Otros autores se han enfocado al estudio de los gametangios y mecanismos de liberación de los anterozoides (Tigerschiöld 1989a, b, 1990). Reyes-Jaramillo & Pérez-García (1991), determinan que la cantidad y tamaño de tricomas, junto con el tipo de rizoides difieren entre los gametofitos de *T. patens* (Sw.) Small [= *Cyclosorus patens* (Sw.) Holttum] y *T. puberula* (Baker) C. V. Morton var. *puberula* [= *Christella puberula* (Baker) A. Löve & D. Löve].

Dentro de las especies de la familia Thelypteridaceae, también se han observado diferencias palinológicas, pues la ornamentación de las esporas es variable, desde equinada, reticulada, crestada, con o sin perforaciones (Patel *et al.* 2019). El tipo de germinación es *Vittaria*, el cual se ha reportado como consistente en la familia. Además, el desarrollo protálico es de tipo *Aspidium* (Pérez-García *et al.* 1994, Pérez-García & Mendoza-Ruiz 2004, Muñiz-Díaz de León *et al.* 2008, Ramos-Giacosa *et al.* 2014); sin embargo, existen algunas excepciones, como en *T. rhachiflexuosa* Riba (*Goniopteris rhachiflexuosa* (Riba) Salino & T. E. Almeida), donde se menciona que el desarrollo protálico es de tipo *Drynaria* (Pérez-García *et al.* 1994). Debido a estas diferencias, el objetivo de este trabajo es aportar datos morfológicos nuevos sobre el desarrollo de los gametofitos de cuatro especies de la familia Thelypteridaceae: *Meniscium falcatum* Liebm. [= *T. falcata*], *Goniopteris mollis* Fée [= *T. ghiesbreghtii*], *G. liebmannii* (Maxon & C.V. Morton) Salino & T. E. Almeida [= *T. meniscioides*] y *G. minor* (C. Chr.) Salino & T.E. Almeida [= *T. minor*], así como caracteres palinológicos de las esporas que contribuyan a la delimitación genérica de las Thelypteridaceae de acuerdo a las nuevas evidencias filogenéticas (Rothfels *et al.* 2012, Almeida *et al.* 2016, PPG I 2016).

Materiales y métodos

Trabajo de campo. Las plantas fértiles de *Goniopteris* y *Meniscium* fueron recolectadas en las siguientes localidades: *M. falcatum* (A. Mendoza R. 1777, UAMIZ), Chiapas, municipio de Maravilla Tenejapa, a 201 m snm; *G. mollis* (B. Pérez García 1239, UAMIZ), Chiapas, municipio de Ocozacoautla, desviación a Ocuilapa, a 707 m snm; *G. liebmannii* (A. Mendoza R. 1725, UAMIZ), Oaxaca, municipio Valle Nacional, 6 km después de Valle Nacional rumbo a la Esperanza, a 200 m snm y *G. minor* (A. Mendoza R. 1812, UAMIZ), Tabasco, municipio Macuspana, en el Balneario Agua Blanca, a 227 m snm.

Trabajo de laboratorio. Las esporas obtenidas de hojas fértiles, fueron secadas de forma natural dentro de sobres de papel. El contenido de los sobres se tamizó con una malla metálica Mont Inox con poros de 0.074 mm de diámetro para eliminar residuos de esporangios y detritus. Las esporas obtenidas se guardaron en viales de vidrio a temperatura ambiente (25 °C) con el fin de reducir su metabolismo y por ende mantener su viabilidad y su integridad genética.

Siembra. Sin recibir ningún tratamiento de esterilización, las esporas se sembraron en cajas de Petri de 5 cm de

diámetro con medio de cultivo Thompson ([Klekowski 1969](#)). Éstas se espolvorearon sobre la superficie del medio con un pincel de unas cuantas cerdas; las cajas se almacenaron en bolsas de plástico transparente en condiciones de laboratorio y se colocaron en una cámara de crecimiento de plantas Lumistell MR Modelo ICP-19, con un fotoperíodo de 12 horas luz/obscuridad y una temperatura promedio de 20-25 °C. Se realizaron cinco réplicas para cada especie. Para determinar el fotoblastismo, una caja sembrada de cada especie se mantuvo en la oscuridad durante 100 días.

Fijación y procesamiento de muestras. Para determinar las características micromorfológicas de las esporas, éstas se montaron, sin ningún tratamiento previo, en porta-muestras de aluminio usando cinta conductiva de carbón de doble cara y posteriormente se metalizaron con oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Las observaciones y toma de imágenes se realizaron con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) Jeol JSM5310-LV.

Para describir con detalle las características morfológicas de las diferentes etapas de desarrollo del gametofito y el esporofito joven, se fijaron gametofitos en distintos estados de desarrollo en FAA con sacarosa al 0.8 %; posteriormente fueron deshidratadas en alcoholes graduales. Una vez deshidratados, se desecaron a punto crítico (Leica EM CPD030), se montaron en portamuestras de aluminio con cinta conductiva de carbón de doble cara y se metalizaron con oro, en el equipo previamente descrito. Las observaciones y toma de imágenes se llevaron a cabo usando un MEB (Jeol JSM5310-LV).

Resultados

Esporas. Las esporas de las cuatro especies incluidas en este estudio son homospóricas, monoletes, perinadas, con forma ecuatorial irregular a elipsoidal; no clorofilicas, desde pardo-amarillento a pardo-oscuro y son fotoblásticas positivas.

Las esporas más pequeñas corresponden a las de *G. minor*; miden en el eje polar (EP): 10(21)25 $\mu\text{m} \pm 3.5 \mu\text{m}$, eje ecuatorial (EE): 17(30)35 $\mu\text{m} \pm 3.63 \mu\text{m}$, son perinadas, con pliegues equinulados, con algunas equinulas y proyecciones en la superficie y entre los pliegues ([Figura 1A](#)); en *M. falcatum*, miden en EP: 24(28)34 $\mu\text{m} \pm 3.2 \mu\text{m}$, EE: 34(40)49 $\mu\text{m} \pm 3.8 \mu\text{m}$, son perinadas, irregulares a elipsoidales, con pliegues equinulados de 10-17 μm de ancho, con fimbrias y foliolos dispersos, alas micropapiladas-equinuladas, papilas dispersas ([Figura 1B](#)). *G. liebmannii*, miden en EP: 24(28)33 $\mu\text{m} \pm 2.36 \mu\text{m}$, EE: 36(42)54 $\mu\text{m} \pm 3.57 \mu\text{m}$ ([Figura 1D](#)), son aladas, con pliegues, a veces reticulado con lumen mayor a 10 μm y

con escasas equinas, estas dos últimas especies tienen tamaños intermedios. Mientras que las esporas más grandes corresponden a *G. mollis*, miden en EP: 27(31)40 $\mu\text{m} \pm 2.5 \mu\text{m}$, EE: 39(43)50 $\mu\text{m} \pm 3.3 \mu\text{m}$, son perinadas, con pliegues vermiculados, alados, con crestas y con equinas en la superficie entre los pliegues ([Figura 1C](#); [Tabla 1](#)).

Inicios de germinación. Se siguió el criterio universal de germinación de esporas, la emergencia de la primera célula rizoidal y protálica o ambas. En las cuatro especies de este estudio se obtuvo una tasa de germinación del 90 % la cual inició entre los 10-17 días. Se observó una germinación tipo *Vittaria* ([Nayar & Kaur 1971](#)), que se caracteriza por la formación del rizoides inicial en sentido perpendicular al eje polar de la spora gracias a la primera división mitótica, posteriormente la célula protálica inicial experimenta una segunda división mitótica perpendicular a la primera, dando origen al filamento inicial que se mantiene en el mismo plano que el rizoides pero con orientación en sentido opuesto ([Figuras 1E-G](#); [Tabla 2](#)).

Después de 100 días, ninguna de las esporas de las cuatro especies sembradas en la oscuridad germinó, por lo que se consideran fotoblásticas positivas.

Fase filamentosa. Las continuas divisiones mitóticas transversales de la célula protálica inicial, resultan en la formación de un filamento uniseriado de 2-10 células, cilíndricas y con abundantes cloroplastos discoidales, en su base se desarrollan 1-2 rizoides hialinos de mayor longitud que el filamento, como lo observado en *G. liebmannii* ([Figura 2A](#)) y *G. minor* ([Figura 2B](#)).

Gametofito laminar. Las cuatro especies presentan un desarrollo protálico de tipo *Aspidium* ([Nayar & Kaur 1969, 1971](#)), que se caracteriza por las secuencias de divisiones celulares variables, además de que en etapas tempranas de su desarrollo protálico (gametofitos jóvenes), desarrollan pelos capitados-glandulares, simples y unicelulares, marginales y superficiales. Las divisiones mitóticas que experimentan las células intercalares del filamento germinativo dan origen a la formación de la fase laminar del gametofito y entre los 20-35 días se observan formas vegetativas cordiformes y/o espatuladas.

En los gametofitos bidimensionales de *M. falcatum* ([Figura 2E](#)), *G. mollis* ([Figura 2C](#)), *G. liebmannii* ([Figura 2D](#)) y *G. minor* ([Figura 2F](#)) tienen formas cordiformes, con meristemo apical, alas isodiamétricas cortas o amplias, con pelos capitados-glandulares, simples, unicelulares, en el margen y ambas caras dorsal y ventral del gametofito ([Figuras 2G, 3A-B](#)).

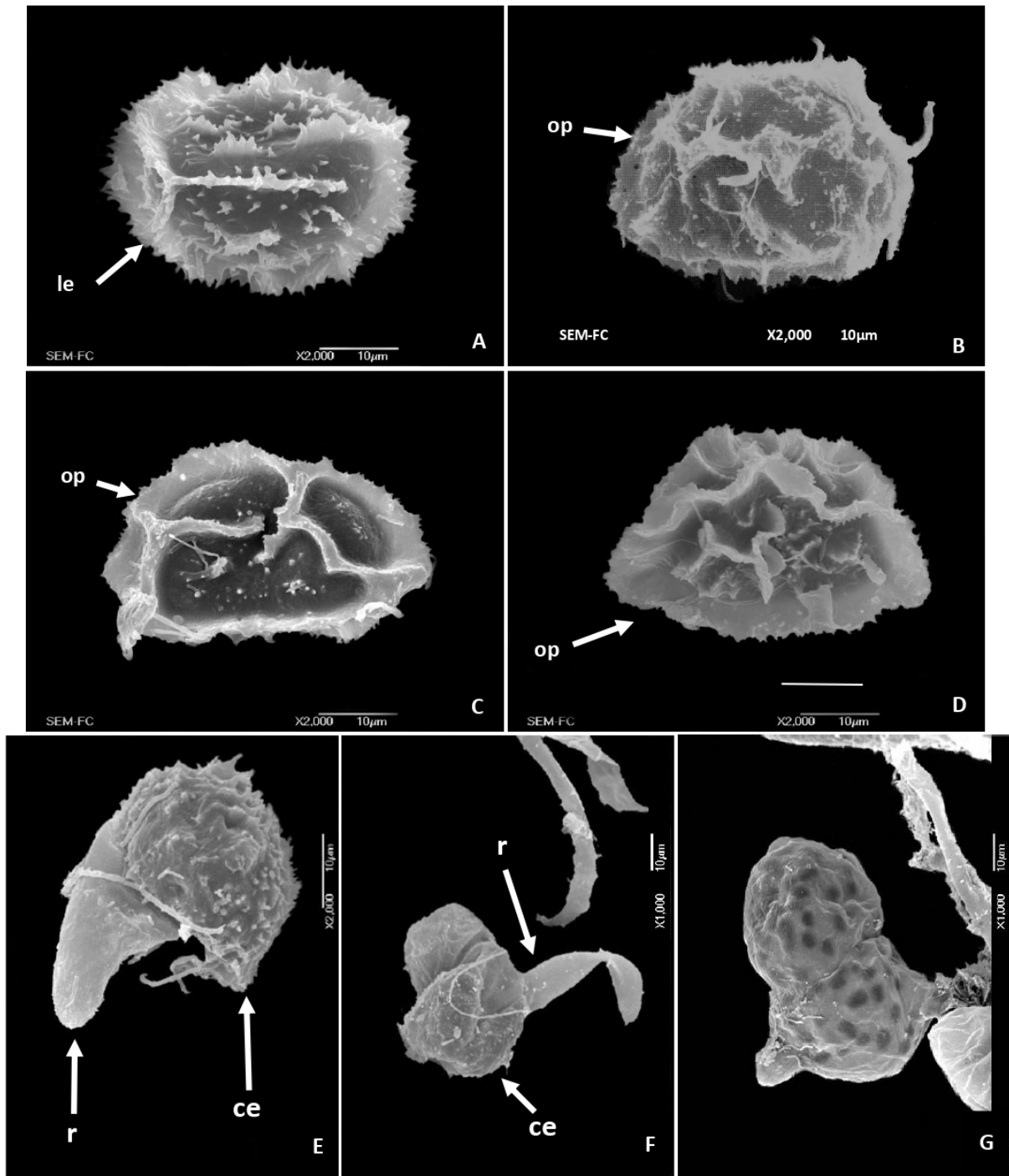


Figura 1. Morfología y germinación de esporas e inicios de germinación. A. Espora de *Goniopteris minor*. B. Espora de *Meniscium falcatum*. C. Espora *Goniopteris mollis*. D. Espora de *Goniopteris liebmannii*. E. Inicios de germinación de *Goniopteris liebmannii*. F. Inicios de germinación de *Goniopteris liebmannii*. G. Inicios de germinación de *Goniopteris mollis*. ce = cubierta de la espóra, le = lesura, op = ornamentación del perisporio, r = rizoide.

Tabla 1. Diferencias en las esporas de las cuatro especies en estudio: Tamaño Eje Polar (EP), Eje Ecuatorial (EE)

Taxón	<i>M. falcatum</i>	<i>G. liebmannii</i>	<i>G. minor</i>	<i>G. mollis</i>
Esporas	Monolete	Monolete	Monolete	Monolete
Color	Parda	Amarilla a pardo claro	Hialina a amarilla	Amarilla a pardo claro
EP (μm)	24(28)34 ± 3.2	24(28)33 ± 2.36	10(21)25 ± 3.5	27(31)40 ± 2.5
EE (μm)	34(40)49 ± 3.8	36(42)54 ± 3.57	17(30)35 ± 3.63	39(43)50 ± 3.3
Perisporio	Plegado	Plegado-Crestado	Crestado	Crestado
Altura de pliegues (μm)	2-4	2-7	2-4	5-7
Macroestructura (patrón)	Reticulado	Reticulado	Reticulo incompleto	Reticulado
Lumen	Equinulado y perforado	Equinulado	Crestado y equinulado	Crestado y equinulado

Gametofito adulto. Entre los 60 y 90 días después de la germinación de las esporas, se observan gametofitos adultos con estructuras reproductoras, así como gametofitos inmaduros, pero estructuralmente bien conformados. Estos son de forma cordiforme a espatulada; con alas isodiamétricas bien desarrolladas y un cojinete poco conspicuo en donde se diferencian los gametangios. En *M. falcatum* (Figura 2G), *G. liebmannii* (Figura 3B) y *G. minor*, los gametofitos desarrollan pelos capitados glandulares, simples, unicelulares, tanto en el margen, como en la cara dorsal y ventral entre los arquegonios, mientras que en *G. mollis* (Figura 3A), los pelos son similares a las otras especies, pero se encuentran localizados entre los anteridios.

Anteridios. En los gametofitos protándricos, los anteridios se desarrollan entre los 50-70 días, en la parte media basal entremezclados con abundantes rizoides. La morfología y

estructura de los anteridios es muy homogénea; son globosos, con una célula basal, una anular y una opercular, como se observa en *G. liebmannii* (Figura 3C) y *G. minor* (Figura 3D). El mecanismo de liberación de los anterozoides se lleva a cabo por desprendimiento de la célula opercular (Figura 3C).

Arquegonios. Los arquegonios presentan una morfología estandarizada, estos se desarrollan sobre el cojinete y cerca de la zona meristemática, sus cuellos están orientados hacia la región basal del gametofito, sugiriendo autofecundación. Los cuellos tienen de 4 a 10 células de largo, son cortos a largos, la boca está compuesta por las típicas cuatro células triangulares (Figura 3E-G).

A los 90 días de germinación se observan gametofitos bisexuales en los cuales las estructuras reproductivas corresponden a las típicas presentes en la mayoría de los helechos leptosporangiados.

Tabla 2. Características observadas en las diferentes fases de desarrollo (gametofito y esporofito joven) en las especies estudiadas.

Taxón	<i>M. falcatum</i>	<i>G. liebmannii</i>	<i>G. minor</i>	<i>G. mollis</i>
Tipo de germinación	<i>Vittaria</i>	<i>Vittaria</i>	<i>Vittaria</i>	<i>Vittaria</i>
Fotoblastismo	+	+	+	+
Gametofito				
Fase filamentosa	Uniseriado (2-10 días)	Uniseriado (2-10 días)	Uniseriado (2-10 días)	Uniseriado (2-10 días)
Tipo de desarrollo protálico	<i>Aspidium</i>	<i>Aspidium</i>	<i>Aspidium</i>	<i>Aspidium</i>
Gametofito maduro	Cordiforme a espatulado	Cordiforme a espatulado	Cordiforme a espatulado	Cordiforme a espatulado
Pelos	Glandulares	Glandulares	Glandulares	Glandulares
Ubicación de los pelos	Margen, dorsal y ventral entre arquegonios	Margen, dorsal y ventral entre arquegonios	Margen, dorsal y ventral entre arquegonios	Entre los anteridios
Esporofito	No se desarrolló esporofito	110-120 días, lámina bi-trilobulada con venación dicotómica abierta	110-120 días, lámina bi-trilobulada con venación dicotómica abierta	110-120 días, lámina bi-trilobulada con venación dicotómica abierta
Pecíolo de esporofito de la primera hoja	No se desarrolló esporofito	Pelos capitados y aciculares	Pelos capitados y aciculares	Pelos capitados
Estomas	No se observan	Polocíticos	Polocíticos	Polocíticos

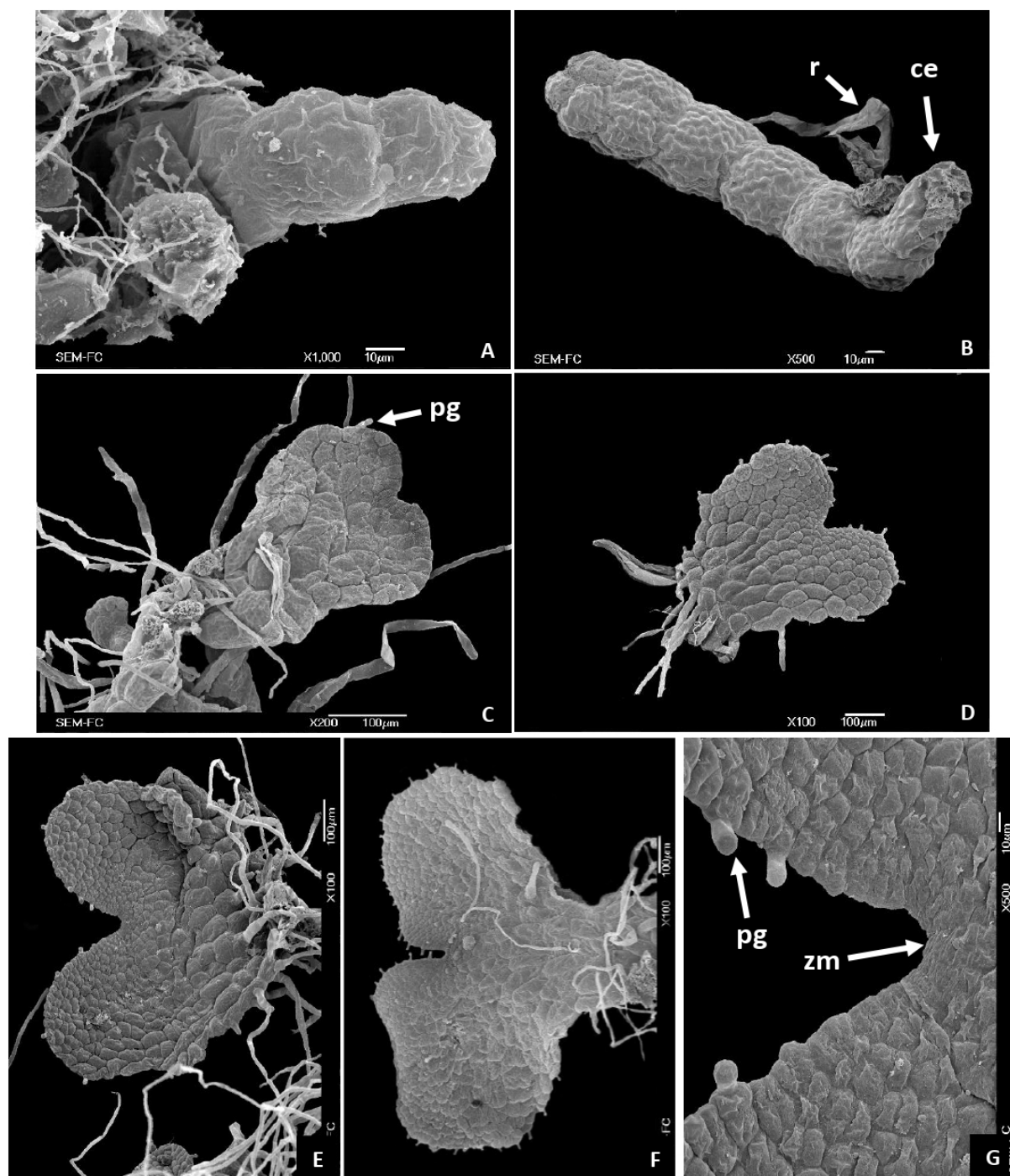


Figura 2. Fase filamentosa y laminar de gametofitos. A. Fase filamentosa de *Goniopteris liebmanni*. B. Filamento de *Goniopteris minor*. C. Gametofito laminar de *Goniopteris mollis*. D. Gametofito laminar de *Goniopteris liebmanni*. E. Gametofito laminar de *Meniscium falcatum*. F. Gametofito laminar de *Goniopteris minor*. G. Acercamiento a la zona meristémica del gametofito de *Meniscium falcatum*. ce = cubierta de la espora, pg = pelo glandular, r = rizoides, zm = zona meristémica.

Esporofitos jóvenes. El desarrollo del esporofito se observó entre los 110-125 días en *G. mollis* (Figura 4B), *G. liebmannii* (Figura 4C), *G. minor* (Figura 4A). Las primeras hojas embrionarias (1-3) son lobuladas con una pequeña muesca, y con venación dicotómica abierta (Figura 4A). Presentan dos tipos de pelos capitados-glandulares simples, unicelulares y pelos unicelulares, aciculares tanto en el pecíolo como en la lámina en su cara dorsal y ventral (Figura 4A-D).

Los estomas son hipostomáticos del tipo polocítico, caracterizados por la unión del estoma al lado distal (marginopolar) de la célula subsidiaria única, por lo tanto esta célula tiene forma de U o de herradura como en *G. mollis* (Figuras 4D, 4F), *G. liebmannii* (Figura 4E) y *G. minor* (Figura 4G), en estas especies las paredes anticlinales de la célula subsidiaria presenta los márgenes ligeramente rectos a ondulados. Por otro lado, las células epidérmicas tienen las paredes anticlinales onduladas. No observamos el desarrollo del esporofito en *M. falcatum*.

Los resultados tanto de las esporas como de las diversas fases de desarrollo de las especies en estudio se muestran resumidos en las Tablas 1 y 2.

Discusión

Existe una variación morfológica en las esporas de las Thelypteridaceae y este carácter puede ser útil para determinar el género y sus especies (Wood 1973), como lo ejemplifica el estudio reciente de Patel *et al.* (2019) sobre morfología y evolución de la perina. Este último estudio demuestra que la macroestructura reticular y perforada es característica de *Goniopteris* y establece que la presencia de microestructuras es un carácter diagnóstico para *Meniscium*. La morfología de las esporas de las cuatro especies estudiadas, concuerda con las descripciones previamente señaladas para *G. mollis* por Wood (1973) y para *M. falcatum* por Tryon & Tryon (1982).

Patel *et al.* (2019) mencionan que la perina de las esporas del género *Goniopteris* se caracteriza por crestas alargadas, reticuladas y delgadas, las cuales podrían estar relacionadas con características ancestrales del género, mientras que el género *Meniscium* no presenta ninguna característica en común que lo distinga y para *M. falcatum* no observaron perforaciones. Nuestro estudio encontró que las esporas de *M. falcatum* presentan perforaciones (Figura 1B); por lo que consideramos que esta característica apoya la monofilia del grupo *M. longifolium* y *M. hostmannii* (Klotzsch) R. S. Fernandes & Salino [= *M. salzmanii*, = *M. arborescens*] mencionado por Patel *et al.* (2019). En las especies de la presente investigación, se observaron diferencias morfológicas en el tamaño de las esporas, tipo de reticulado, altura de los pliegues alados y el tamaño de las espinas de los márgenes de las alas.

M. falcatum difiere por la presencia de perforaciones y el perisporio plegado, mientras *Goniopteris* presenta perisporio plegado a crestado, sin perforaciones.

El tiempo de germinación para *G. liebmannii* y *G. minor* fue de 10 días, para *G. mollis* 13 días y para *M. falcatum* 17 días, lo que concuerda con las observaciones de las Thelypteridaceae estudiadas por Huckaby & Raghavan (1981a) para (*T. acuminata* (Houtt.) C. V. Morton [= *Christella acuminata* (Houtt.) H. Lévl., *T. atropinosa* C.F. Reed, *T. cruciata* (Willd.) Tardieu, *T. decursive-pinnata* (H. C. Hall) Ching [= *Phegopteris decursive-pinnata*], *T. dentata* (Forssk.) E. P. St. John [= *Christella dentata* (Forssk.) Brownsey & Jermy], *T. erubescens* (Wall. ex Hook.) Ching, *T. kunthii* (Desv.) C. V. Morton, *T. noveboracensis* (L.) Nieuwl [= *Parathelypteris noveboracensis*], *T. opulenta* (Kaulf.) Fosberg [= *Amblovenatum opulentum*], *T. palustris* Schott, *T. resinifera* (Dev.) Proctor, *T. rubrinervis* K. Iwats, *T. serra* (Sw.) R. P. St. John y *T. torresiana* (Gaudich.) Alston) [= *Macrothelypteris torresiana* (Gaudich.) Ching].

El patrón de germinación observado en las cuatro especies fue de tipo *Vittaria*, lo cual coincide con las descripciones para *T. ciliata* (Wall. ex. Benth) [= *Cyclosorus ciliatus*], *T. biolleyi* (Christ) Proctor [= *Goniopteris biolleyi*] realizadas por Nayar & Kaur (1971), Reyes-Jaramillo & Pérez-García, (1991) para *T. patens* (Sw.) Small [= *Christella patens* (Sw.) Holtum] y *T. puberula* (Baker) C. V. Morton var. *puberula* [= *Christella puberula* (Baker) A. Löve & D. Löve] y Pérez-García & Mendoza-Ruiz (2004) para *T. dissimulans* (Maxon & C. Chr. ex C. Chr.) C. F. Reed [= *Goniopteris dissimulans*], *T. piedrensis* (C. Chr.) Morton [= *Amauropelta piedrensis* (C. Chr.) Salino & T.E. Almeida] *T. reptans* (J. F. Gmel) Morton var. *reptans* [= *Goniopteris reptans*], *T. tetragona* (Sw.) Small [= *Goniopteris tetragona*] y *T. oviedoae* C. Sánchez & Zavaro [= *Amauropelta oviedoae* (C. Sánchez & Zavaro) Salino & T.E. Almeida].

En las cuatro especies estudiadas, la fase filamentosa es corta de 1-8 células cilíndricas con numerosos cloroplastos discoidales y es muy similar a la ya citada para otras especies (Ramos-Giacosa *et al.* 2014, Pérez-García & Mendoza-Ruiz 2004, Muñiz-Díaz de León *et al.* 2008). Se observó que el desarrollo protálico es de tipo *Aspidium* lo cual concuerda con lo señalado por Nayar & Kaur (1969, 1971) donde describen el desarrollo de gametofitos para helechos homosporicos. Nuestros datos coinciden con los resultados de Pérez-García & Mendoza-Ruiz (2004) que trabajaron con *T. dissimulans* [= *Goniopteris dissimulans*], *T. piedrensis* [= *Amauropelta piedrensis* (C. Chr.) Salino & T.E. Almeida], *T. reptans* var. *reptans* [= *Goniopteris reptans*], *T. tetragona* [= *Goniopteris tetragona*] y *T. oviedoae* [= *Amauropelta oviedoae* (C. Sánchez & Zavaro) Salino & T.E. Almeida], y con los de Muñiz-Díaz

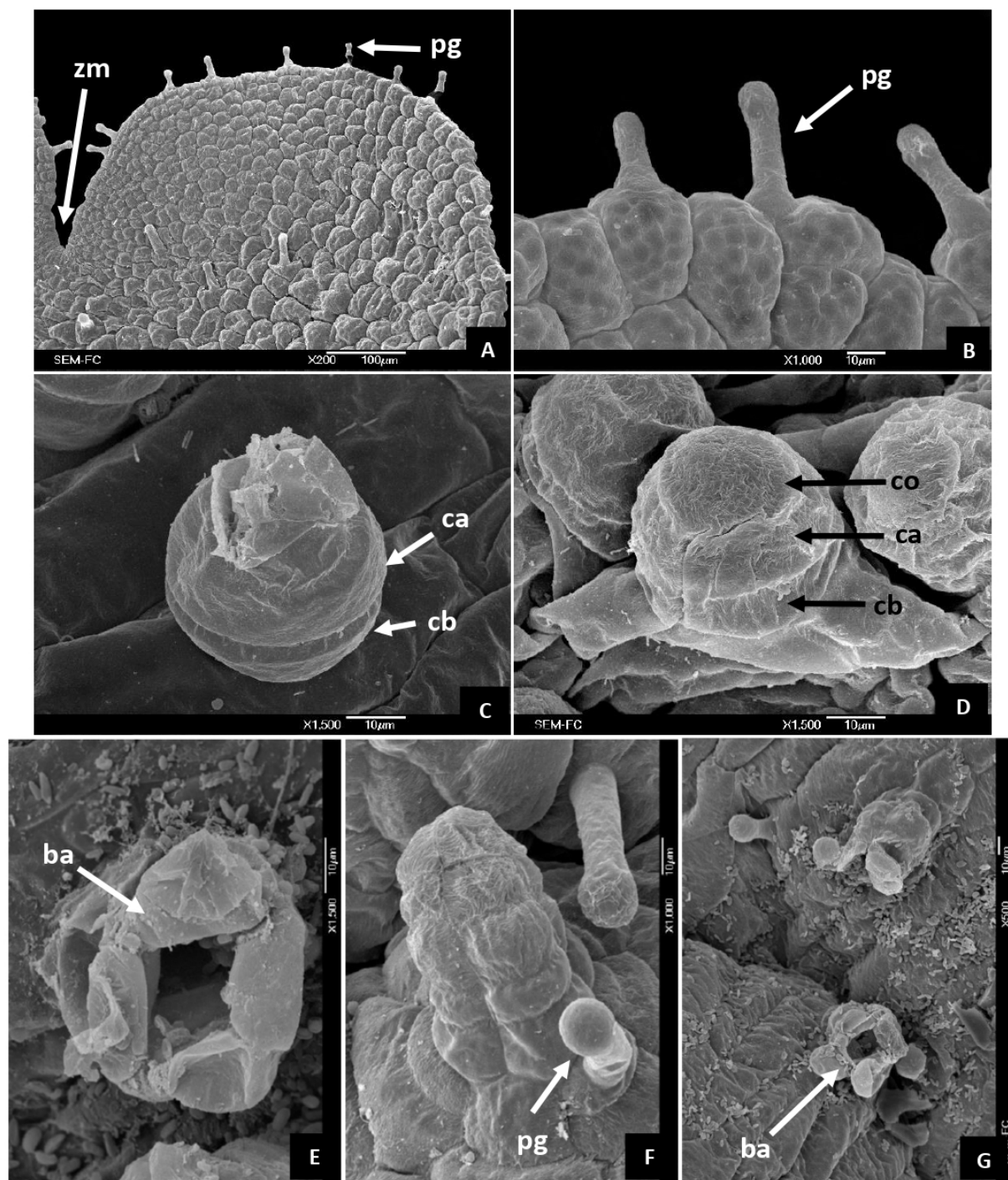


Figura 3. Meristemo, pelos y gametangios en gametofitos. A. Acercamiento de la zona meristemática de *Goniopteris mollis*. B. Pelos glandulares del gametofito de *Goniopteris liebmannii*. C. Anteridio de *Goniopteris liebmannii*. D. Anteridio de *Goniopteris minor*. E. Acercamiento de la boca del arquegonio de *Goniopteris liebmannii*. F. Acercamiento al cuello del arquegonio de *Goniopteris liebmannii*. G. Acercamiento a los arquegonios de *Meniscium falcatum*. ba = boca de arquegonio, ca = célula anular, cb = célula basal, co = célula opercular, pg = pelo glandular, zm = zona meristemática.

de León *et al.* (2008) quienes trabajaron con siete especies de Thelypteridaceae del género *Cyclosorus*, en estos trabajos se menciona que el desarrollo protálico es de tipo *Aspidium* que se caracteriza porque en etapas tempranas del desarrollo protálico se produce la formación de pelos, sin embargo nuestros datos no coinciden con los de Pérez-García *et al.* (1994) para *T. rhachiflexuosa* [= *Goniopteris rhachiflexuosa*] que mencionan que corresponde al tipo *Drynaria*, que se caracteriza porque el establecimiento de la célula meristemática es muy retardado y los gametofitos generalmente en la etapa adulta desarrollan pelos marginales y superficiales escasos. Sería interesante estudiar otras especies del género para confirmar estas observaciones.

Se ha señalado que los gametofitos de los helechos thelypteridáceos se caracterizan por presentar en el margen y en ambas caras un solo tipo de pelos, los capitados-glandulares, simples, unicelulares que persisten hasta la madurez, mientras que en el peciolo y la lámina del joven esporofito se presentan dos tipos de pelos capitados-glandulares, simples, unicelulares y pelos aciculares, citados por Iwatsuki (1962), Atkinson & Stokey (1964), Reyes-Jaramillo & Pérez-García (1991) y Pérez-García & Mendoza-Ruiz (2004).

Una característica del género *Goniopteris* es la presencia de pelos estrellados en los esporofitos adultos, los cuales pueden o no estar presentes en los gametofitos (Smith 1981, Stolze 1981, Tryon & Tryon 1982, Mickel & Beitel 1988, Moran & Riba 1995). Tanto en los estados de desarrollo de los gametofitos, así como en los esporofitos jóvenes de las especies en estudio, estos pelos estrellados no fueron observados, siendo *G. mollis* la única especie mexicana que carece por completo de estos tricomas en ambas fases (característica que comparte con *G. macrostis* (Hook.) Pic. Serm., *G. semihastata* (Kunze) Salino & T.E. Almeida, *G. holodictya* (K.U. Kramer) Salino & T.E. Almeida, y *G. clypeata* [Salino *et al.* 2015]). Otros autores han reportado que *G. minor* presenta escasos pelos estrellados en el esporofito (Mickel & Smith 2004). La ausencia de pelos estrellados en gametofitos y esporofitos jóvenes se ha reportado previamente en *G. abbiattii* (Ramos-Giacosa *et al.* 2014).

Atkinson (1975) menciona que los gametofitos en las Thelypteridaceae son espatulados a cordiformes con alas amplias y un meristemo apical, caracteres observados en este estudio y que son consistentes con lo señalado por Atkinson & Stokey (1964, 1973), Atkinson (1971), Nayar & Kaur (1971), Reyes-Jaramillo & Pérez-García (1991) y Pérez-García & Mendoza-Ruiz (2004).

Los caracteres morfológicos observados de los anteridios en las cuatro especies son propios de los helechos leptosporangiados. Ellos se desarrollan sobre el cojinete en los gametofitos adultos. Atkinson & Stokey (1964)

mencionan que los anteridios siempre aparecen antes que los arquegonios, es decir son protándricos, este hecho coincide con los resultados aquí presentados. Los anteridios observados tienen una célula opercular, una célula anular y una célula apical, lo cual concuerda con Tigerschiöld (1990) quien trabajó con 12 especies de *Thelypteris* de Sri Lanka en las cuales destaca *T. confluens* (Thunb.) Morton.

De acuerdo con los mecanismos de apertura de los anteridios y en consecuencia la liberación de los anterozoides, las cuatro especies comparten el mecanismo de liberación de los anterozoides por desprendimiento total de la célula opercular, coincidiendo con lo reportado para *T. confluens* (Tigerschiöld 1989a).

Los arquegonios tienen la forma típica de los helechos leptosporangiados, éstos se desarrollan muy cerca del meristemo apical. El cuello es corto de 2 a 10 células concordando con las descripciones de Atkinson (1975) para cinco especies de *Thelypteris*. En las cuatro especies aquí estudiadas los cuellos de los arquegonios están conformados por cuatro hileras de células, marcadamente curvados y orientados hacia la parte basal de los gametofitos, debido a que los anteridios se desarrollan en la región media basal de los gametofitos, podría ocurrir autofecundación intragametofítica (Testo *et al.* 2015, Haufler *et al.* 2016).

Los caracteres morfológicos y de desarrollo de los rizoides observados y descritos en este estudio son consistentes con las descripciones presentadas por Atkinson & Stokey (1964), Reyes-Jaramillo & Pérez-García (1991), en todos los casos, los rizoides se diferencian en la parte ventral del cojinete del gametofito, en las primeras etapas son hialinos y con escasos cloroplastos, con la madurez comienzan a tornarse pardos. Son de longitud variable, aunque generalmente son más largos que el cuerpo del gametofito.

La primera hoja del esporofito se desarrolla entre 100-120 días después de la germinación de la espóra. Iwatsuki (1962) menciona que el peciolo y lámina de los esporofitos de las Thelypteridaceae tienen pelos unicelulares aciculares y pelos capitados-glandulares, simples. Estos caracteres diagnósticos de tipo morfológico se observaron en esta investigación. Los estomas observados corresponden al tipo polocítico que ya han sido reportados en estudios previos (Van Cotthem 1970, Sen & De 1992). Este tipo de estomas son de amplia distribución en algunas familias de helechos.

Las características morfológicas observadas durante el desarrollo del gametofito y esporofito y descritas en detalle en las cuatro especies, son típicas de la familia Thelypteridaceae. Estas características son esporas monoletes, perisporio prominente, germinación tipo *Vittaria*, desarrollo protálico tipo *Aspidium*, presencia de pelos capitados-glandulares, simples, unicelulares en el gametofito, gametofitos adultos cordiformes a espatulados,

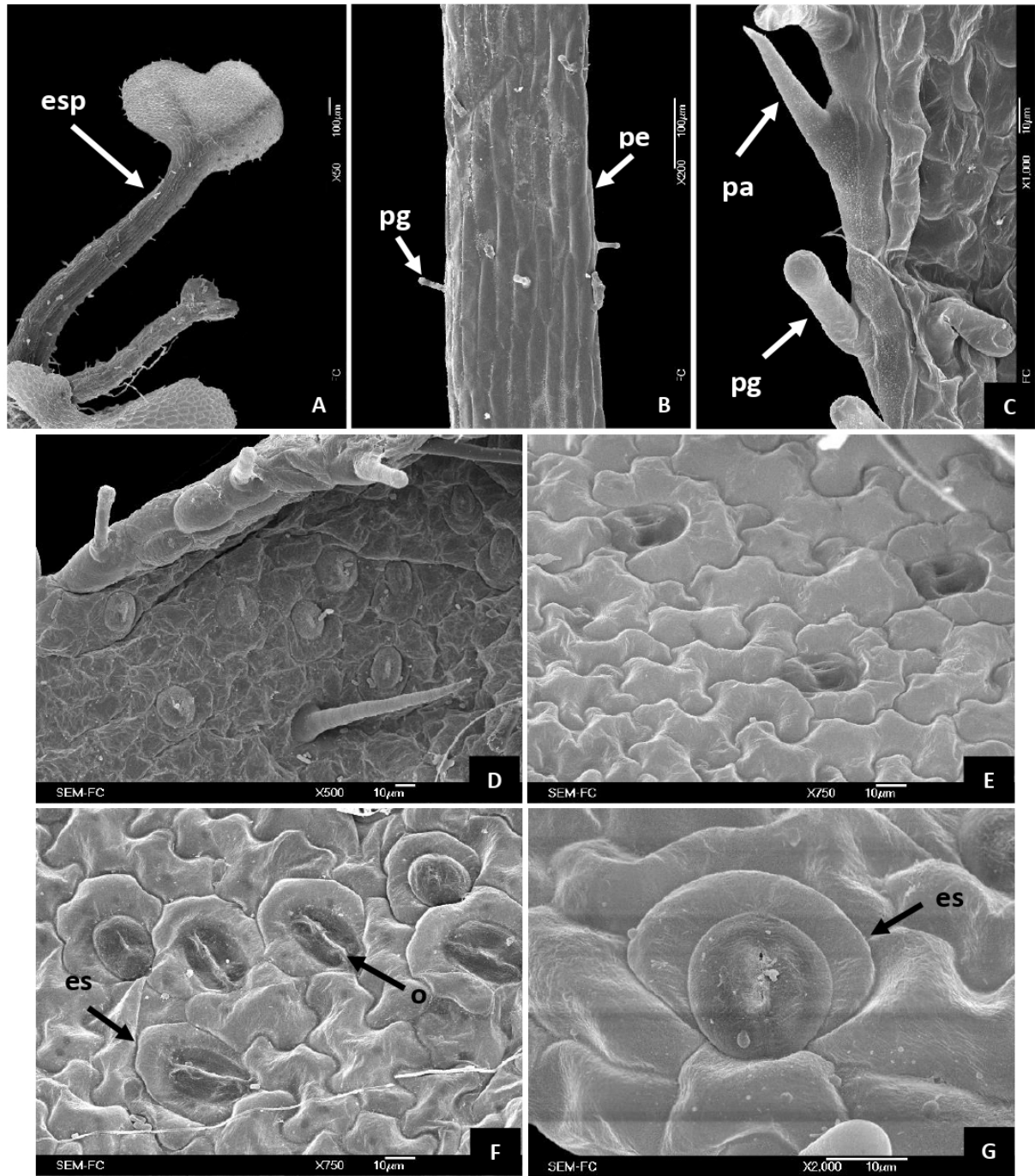


Figura 4. Hoja, pelos y estomas de esporofitos. A. Hojas de esporofito joven de *Goniopteris minor*. B. Pecíolo de la hoja del esporofito de *Goniopteris mollis*. C. Acercamiento del margen de la lámina de *Goniopteris liebmannii*. D. Acercamiento de la lámina con estomas de *Goniopteris mollis*. E. Estomas de la lámina de *Goniopteris liebmannii*. F. Estomas de la lámina de *Goniopteris mollis*. G. Acercamiento al estoma de la lámina de *Goniopteris minor*: es = estoma, esp = esporofito, o = ostíolo, pa = pelo acicular, pe = pecíolo, pg = pelo glandular.

gametangios típicos de helechos leptosporangiados, liberación de los anterozoides por desprendimiento del opérculo y la presencia de pelos glandulares-capitados unicelulares y aciculares en los esporofitos jóvenes. Este estudio demuestra que con imágenes de buena calidad tomadas con el MEB, se aportan datos morfológicos que pueden ser útiles para entender mejor los géneros reconocidos dentro de la familia Thelypteridaceae de acuerdo a las nuevas evidencias filogenéticas moleculares.

Agradecimientos

Agradecemos a los editores y revisores anónimos sus invaluable comentarios que ayudaron a mejorar el manuscrito. Al Proyecto PAPIIT IN-205715 (UNAM) y CONACyT 221015 a cargo de la Dra. Alma Orozco-Segovia, a Robbin Moran por facilitar literatura.

Literatura citada

- Almeida TE, Hennequin S, Schneider H, Smith AR, Batista JAN, Ramalho AJ, Proite K, Salino A. 2016. Towards a phylogenetic generic classification of Thelypteridaceae: Additional sampling suggests alterations of neotropical taxa and further study of paleotropical genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **94**: 688-700. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.009>
- Atkinson LR, Stokey AG. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. *Phytomorphology* **14**: 51-70.
- Atkinson LR, Stokey AG. 1973. The gametophytes of some Jamaican thelypteroid ferns. *Journal of the Linnean Society Botany* **66**: 23-36. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1973.tb02158.x>
- Atkinson LR. 1971. The gametophyte of *Thelypteris erubescens*. *American Fern Journal* **61**: 183-186. DOI: <https://doi.org/10.2307/1546299>
- Atkinson LR. 1973. The gametophyte and family relationships. In: Smith AR, Jermy AC, Crabbe JA, Thomas BA, eds. *The Phylogeny and Classification of the Ferns*. pp.73-90. London: Academic Press Inc. ISBN: 0123850509, 9780123850508
- Atkinson LR. 1975. The gametophyte of five Old World thelypteroid ferns. *Phytomorphology* **25**: 38-54.
- Chandra P. 1963. The gametophyte of *Lygodium circinnatum* (Burm.) Sw. and *L. flexuosum* (L.) Sw. *Current Science* **32**: 34-35.
- Hauffer CH, Pryer KM, Schuettpelz E, Sessa EB, Farrar DR, Moran R, Schneller J, Watkins Jr. JE, Windham MD. 2016. Sex and the Single Gametophyte: Revising the Homosporous Vascular Plant Life Cycle in Light of Contemporary Research. *BioScience* **66**: 928-937. DOI: <https://doi.org/10.1093/biosci/biw108>
- He L-J, Zhang X-C. 2012. Exploring generic delimitation within the fern family Thelypteridaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **65**: 757-764. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.07.021>
- Huckaby CS, Raghavan V. 1981a. The spore-germination pattern of thelypteroid ferns. *American Journal of Botany* **68**: 517-523. DOI: <https://doi.org/10.2307/2443027>
- Huckaby CS, Raghavan V. 1981b. Photocontrol of spore germination in the fern *Thelypteris kunthii*. *Physiologia Plantarum* **51**: 19-22. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb00872.x>
- Iwatsuki K. 1962. The trichomes of the thelypteroid ferns. *Memoirs of Botanical Institute the College of Science, University of Kyoto, Series B*. **29**: 103-111.
- Kachroo P. 1963. Observations on certain aspects of the development of the gametophyte of *Cyclosorus molliusculus* (Wall.) Ching. *Journal of the Indian Botany Society* **42**: 190-194.
- Klekowski EJr. 1969. Reproductive biology of the Pteridophyte III. A study of the Blechnaceae. *Journal of the Linnean Society Botany* **62**: 360-377. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1969.tb01973.x>
- Mickel JT, Beitel JM. 1988. Pteridophyte flora of Oaxaca, Mexico. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **46**: 1-568. ISBN: 0-89327-323-6
- Mickel JT, Smith AR. 2004. The pteridophytes of Mexico. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **88**: 1-1054. ISBN: 0-89327-458-5
- Momose S. 1941. Studies on the gametophytes of ferns XVI: On the prothallium of thelypteroid ferns. *Journal of Japanese Botany* **17**: 35-51.
- Moran RC, Riba R eds. 1995. *Flora Mesoamericana vol. 1 (Psilotaceae a Salviniaceae)*. México: Universidad Nacional Autónoma de México-Missouri Botanical Garden, Natural History Museum. ISBN: 968-36-4700-6.
- Muñiz-Díaz de León ME, Pérez-García B, Márquez-Guzmán J, Mendoza-Ruiz A. 2008. Developmental gametophyte morphology of seven species of *Thelypteris* subg. *Cyclosorus* (Thelypteridaceae). *Micron* **39**: 1351-1362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.02.001>
- Nayar BK, Kaur S. 1968. Spore germination in homosporous ferns. *Journal Palynology* **4**: 1-14.
- Nayar BK, Kaur S. 1969. Types of prothallial development in homosporous ferns. *Phytomorphology* **19**: 179-188.
- Nayar BK, Kaur S. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *Botanical Review* **37**: 295-396. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02859157>
- Patel N, Fawcett S, Sundue M, Budket JM. 2019. Evolution of perine morphology in the Thelypteridaceae. *International Journal of Plant Sciences* **180**: 1016-1035. DOI: <https://doi.org/10.1086/705588>

- 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. DOI: [https://doi.org/10.1640/0002-8444\(2004\)094\[0143:ACTTGM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1640/0002-8444(2004)094[0143:ACTTGM]2.0.CO;2)
- Pérez-García B, Riba R, Mendoza-Ruiz A. 1994. Observaciones del gametofito de *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba (Thelypteridaceae). *Acta Botanica Mexicana* **28**: 63-69. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm28.1994.718>
- PPG I [Pteridophyte Phylogeny Group]. 2016. A community-derived classification for extant lycophytes and ferns. *Journal Systematic Evolution* **54**: 563-603. DOI: <https://doi.org/10.1111/jse.12229>
- Ramos-Giacosa JP, Giudice GE, Pipo L, Luján-Luna M. 2014. Morfología de las esporas, desarrollo gametofítico y conservación de *Thelypteris abbiatti* y *T. hispidula* (Thelypteridaceae) de la Reserva Natural Punta Lara, Buenos Aires. *Boletín de la Sociedad Botánica Argentina* **49**: 217-226.
- Reyes-Jaramillo I, Pérez-García B. 1991. Desarrollo de los gametofitos de *Thelypteris patens* (Sw.) Small y de *T. puberula* (Bak.) Morton var. *puberula*. *Acta Botanica Mexicana* **16**: 7-13. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm16.1991.623>
- Rothfels CJ, Larsoo A, Kuo L-Y, Korall P, Chiou W-L, Pryer KM. 2012. Overcoming deep roots, fast rates, and short internodes to resolve the ancient rapid radiation of eupolypod II ferns. *Systematic Biology* **61**: 490-509. DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys001>
- Salino A, Almeida TE, Smith A. 2015. New combination in Neotropical Thelypteridaceae. *PhytoKeys* **57**: 11-50. DOI: <https://doi.org/10.3897/phytokeys.57.5641>
- Sen U, De B. 1992. Structure and ontogeny of stomata in ferns. *Blumea* **37**: 239-261.
- Smith AR. 1981. *Flora of Chiapas*. California. USA: California Academy of Sciences.
- Smith AR, Cranfill RB. 2002. Intrafamilial relationships of the thelypteroid ferns (Thelypteridaceae). *American Fern Journal* **92**: 131-149. DOI: <https://doi.org/10.1640/0002-8444>
- Stolze RG. 1981. *Ferns and Fern Allies of Guatemala*. California. USA: Field Museum of Natural History. ISBN: 978-1295542611
- Testo W, Sundue M. 2016. A 400-species dataset provides new insight into the evolution of ferns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **105**: 200-211. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.09.003>
- Testo W, Watkins JE, Barrington DS. 2015. Dynamics of asymmetrical hybridization in North American wood ferns: reconciling patterns of inheritance with gametophyte reproductive biology. *New Phytologist* **206**: 785-795. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13213>
- Tigerschiöld E. 1989a. Scanning electron microscopy of gametophyte characters and antheridial opening in some Ceylonese species of Thelypteridaceae. *Nordic Journal of Botany* **8**: 639-648. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1989.tb01740.x>
- Tigerschiöld E. 1989b. Dehiscence of antheridia in Thelypteroid ferns. *Nordic Journal of Botany* **9**: 407-412. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1989.tb01019.x>
- Tigerschiöld E. 1990. Gametophytes of some Ceylonese species of Thelypteridaceae. *Nordic Journal of Botany* **9**: 657-664. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1990.tb00558.x>
- Tryon AF, Tryon AF. 1982. *Ferns and Allied Plants, with Special Reference to Tropical America*. New York: Springer Verlag. ISBN: 978-1-4613-8162-4
- Van Cotthem WRJ. 1970. A classification of stomatal types. *Botanical Journal of the Linnean Society* **63**: 235-246. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1970.tb02321.x>
- Wei R, Yan YH, Harris AJ, Kang JS, Shen H, Xiang QP, Zhang C. 2017. Plastid phylogenomics resolve deep relationships among Eupolypod II ferns with rapid radiation and rate heterogeneity. *Genome Biology and evolution* **9**: 1646-1657. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evx107>
- Wolf, PG, Robison TA, Johnson MG, Sundue MA, Testo W L, Rothfels CJ. 2018. Target sequence capture of nuclear-encoded genes for phylogenetic analysis in ferns. *Applications in Plant Sciences* **6**: e1148. DOI: 10.1002/aps.3.1148
- Wood CC. 1973. Spore variation in the Thelypteridaceae. In: Smith, AR, Jermy AC, Crabbe JA, Thomas BA, eds. *The Phylogeny and Classification of the Ferns*. pp. 191-202. London: Academic Press Inc. ISBN: 0-12-385050-9.

Editor de sección: Alejandra Vasco

Contribución de cada autor: ACV, hizo el trabajo experimental de cultivos, fotografía y escribió el manuscrito; AMR, realizó trabajo de campo, identificó las especies, escribió y editó la versión final; SEM, tomo fotos con el MEB, revisó y editó la versión final; AOS, apoyo de infraestructura y revisión crítica y detallada; FGN, hizo la descripción de las esporas y aportó ideas al manuscrito, revisó y editó la versión final; BPG, idea original de la investigación, análisis de los datos experimentales, escribió el manuscrito, participó en toma de fotos MEB, revisó y editó la versión final.