

Morfogénesis de la fase sexual de *Blechnum chilense* y *Blechnum cycadifolium* (Pterophyta: Blechnaceae)

Blanca Pérez-García¹, Aniceto Mendoza¹ y Marcia Ricci²

¹ Depto. de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, A. P. 55-535, México, D. F.

² Corporación Nacional Forestal (CONAF), Viña del Mar, Chile.

(Rec. 15-XII-1994. Rev. 14-VI-1995. Acep. 21-VI-1995)

Abstract: The results of morphogenetic studies of the sexual phase of *Blechnum chilense* and *B. cycadifolium* are presented in this paper. In both species the spores are monoete, ellipsoidal, non-chlorophyllous, and the germination is of the *Vittaria*-type. The development pattern of the prothallia is of the *Aspidium*-type in *B. cycadifolium* for the unicellular, papillated and secretory trichomes, and the *Adiantum*-type in *B. chilense*, whose prothallia are naked. The adult gametophyte of *B. cycadifolium* is cordate-spatulate and with trichomes and in *B. chilense*, it is cordate-reniform and naked. The gametangia of *B. chilense* are of the common type of the leptosporangiate ferns. The first leaves appeared after 4½ months in *B. chilense* and in *B. cycadifolium* after 7 months of culture.

Key words: Blechnaceae, *Blechnum*, Chile, gametophytes, morphogenesis, sexual phase, South-America, Pteridophyta.

El Archipiélago Juan Fernández se ubica a 667 km al oeste de Chile Central en el Océano Pacífico. Comprende 3 islas: Robinson Crusoe (I. Más a Tierra), Santa Clara y Alejandro Selkirk (I. Más Afuera), separadas de las otras islas por 182 km en un eje este-oeste. El clima es oceánico, comparable al clima continental a la latitud de 33° 5', los vientos corren predominantemente del S y del SO, las lluvias son de tipo mediterráneo, ya que las precipitaciones ocurren principalmente en otoño e invierno (1100-1200 mm anuales), con déficit hídrico durante el verano.

Estas islas son de origen volcánico del Terciario, emergiendo diferencialmente hace 1 a 4 millones de años, tienen una topografía muy abrupta, con fuertes pendientes, quebradas y cañones que producen variados microclimas (Skottsberg 1956).

La flora pteridológica del archipiélago tiene un gran interés por el alto grado de endemismo y la gran cantidad de especies que se encuentran en una área tan reducida. En las islas hay

53 especies de helechos distribuidas en 26 géneros y 12 familias. De ellos, 23 son endémicos a nivel de especie o subespecie, con un género monotípico, *Thyrsopteris elegans* Kze.

Los helechos juegan un papel importante en los bosques y matorrales de las islas Robinson Crusoe y Alejandro Selkirk. En ésta última isla, los de porte arbóreo forman extensos bosques. De ellos podemos decir que *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett., especie también encontrada en el continente, crece en toda la zona de bosque de ambas islas y en zonas altamente erosionadas, cerca de cursos de agua, en este último caso, junto a *Adiantum chilense* Kaulf. e *Hypolepis rugulosa* (Labill.) J. Sm., además de hierbas introducidas (entre 10-1400 m snm). *Blechnum cycadifolium* (Colla) Sturm., endémico de las islas, se encuentra en todos los tipos de vegetación incluso es muy abundante en matorrales y pastizales. En zonas muy erosionadas forma, junto con *Dicksonia externa* (Skottb.), extensos bosques en la zona alpina.

La morfogénesis de la fase sexual de unas cuantas especies de *Blechnum* es conocida en detalle (Stubner 1882, Lampa 1901, Döpp 1927, Karpowicz 1927, Stokey 1951, Stokey y Atkinson 1952a, 1952b, Kachroo 1955, Stone 1961, Nayar 1962 y Nayar *et al.* 1966).

Los estudios sobre el protalo de las especies sudamericanas de *Blechnum* son escasos. Rodríguez Ríos (1973), estudió gametofitos y esporofitos de seis especies chilenas excluida una de las descritas aquí (*B. cycadifolium*). En este trabajo se presentan los avances en los estudios morfogenéticos de la fase sexual de *B. chilense* y *B. cycadifolium*.

MATERIAL Y METODOS

Para la observación del desarrollo de los protalos de *Blechnum chilense* (Ricci 0723, VINAD) y *B. cycadifolium* (Ricci 0738, VINAD), se obtuvieron las esporas de ejemplares con hojas fértiles, recolectadas en la localidad de Vaquería, Isla Robinson Crusoe (Archipiélago Juan Fernández), guardando pinas con esporangios maduros en sobres de papel y dejándolos secar en condiciones naturales para propiciar la apertura de los esporangios. El material así obtenido se tamizó para eliminar los fragmentos de esporangios y otras impurezas (Pérez-García *et al.* 1994).

Las esporas de estas especies fueron sembradas en medio de Thompson con agar (Pérez-García 1988), previamente esterilizado, en cajas de Petri, una de las cuales fue cubierta con papel de estaño para probar el fotoblastismo. Los cultivos se mantuvieron dentro de bolsas de polietileno transparente durante todo el proceso, para evitar evaporación y contaminación, manteniéndolos en un régimen lumínico de 12/hr luz con lámparas Solar 75 w/t 38/A1-D, Slimline 75 v luz de día, colocadas a 35 cm de altura y a una temperatura de 25-28°C. Las cajas se abrieron inicialmente cada 3 días para definir el inicio de la germinación y luego cada 10 días, para revisar el desarrollo de los protalos y para humedecer el medio con agua destilada esterilizada, con el objeto de evitar la desecación y propiciar el desplazamiento de los anterozoides cuando los gametofitos alcanzaran la madurez sexual. Las cajas mantenidas en la oscuridad se abrieron 100 días después de la siembra.

Todas las fotomicrografías fueron tomadas de material vivo con un fotomicroscopio Carl Zeiss y un microscopio esteroscópico con cámara integrada, utilizando película b/n Plus x Pan de 35 mm.

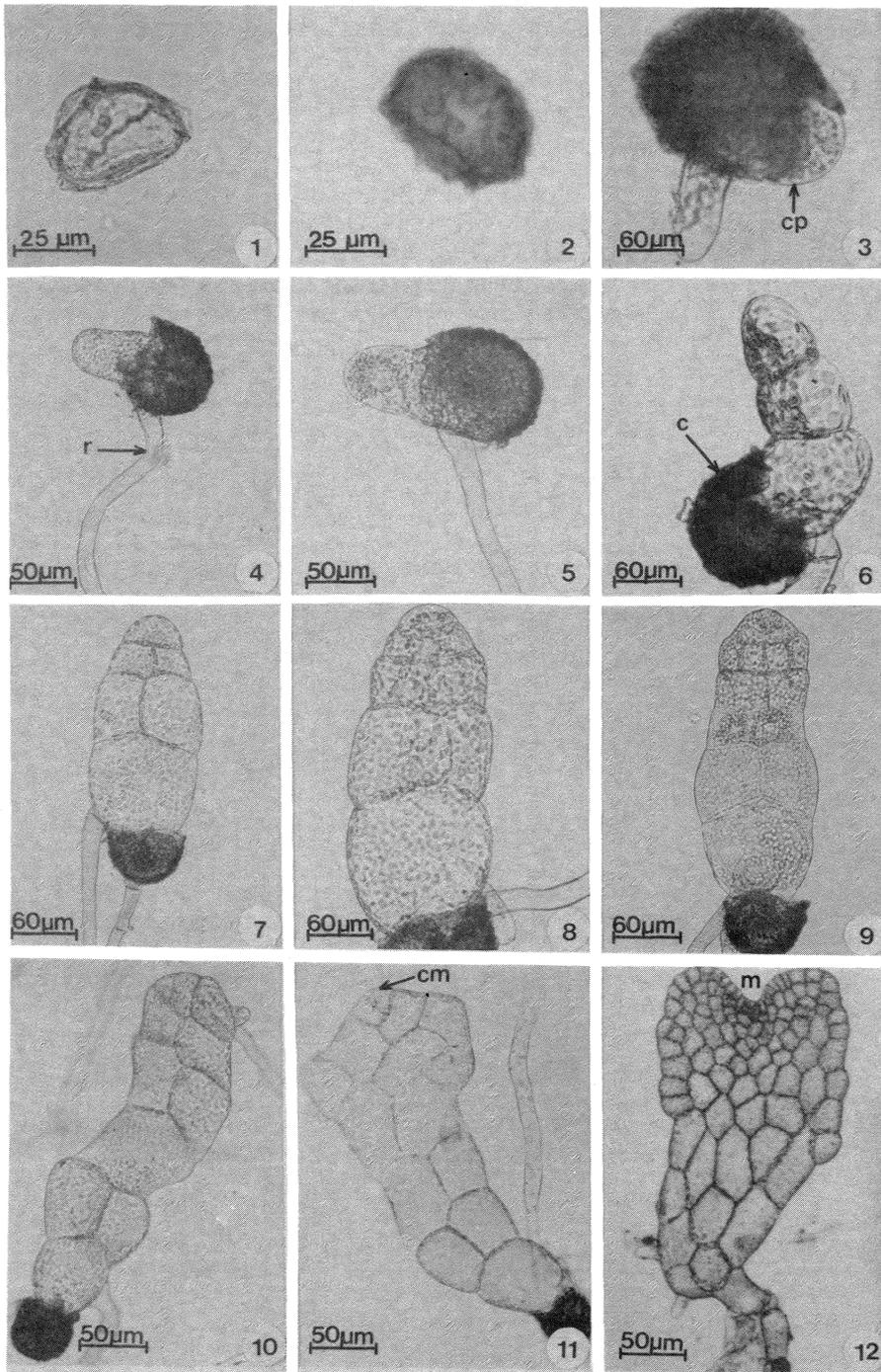
RESULTADOS

Esporas: Las esporas de *Blechnum chilense* (Fig. 1) y *B. cycadifolium* (Fig. 2), son monoletas, elipsoidales, algunas veces esféricas, amarillentas, no clorofílicas, superficialmente granuladas irregularmente, papiladas, ruguladas, verrucadas, a menudo con perina (Tryon y Lugardon 1991). Las esporas de *B. chilense* miden 60 x 44 μ m y las de *B. cycadifolium* 60 x 50 μ m.

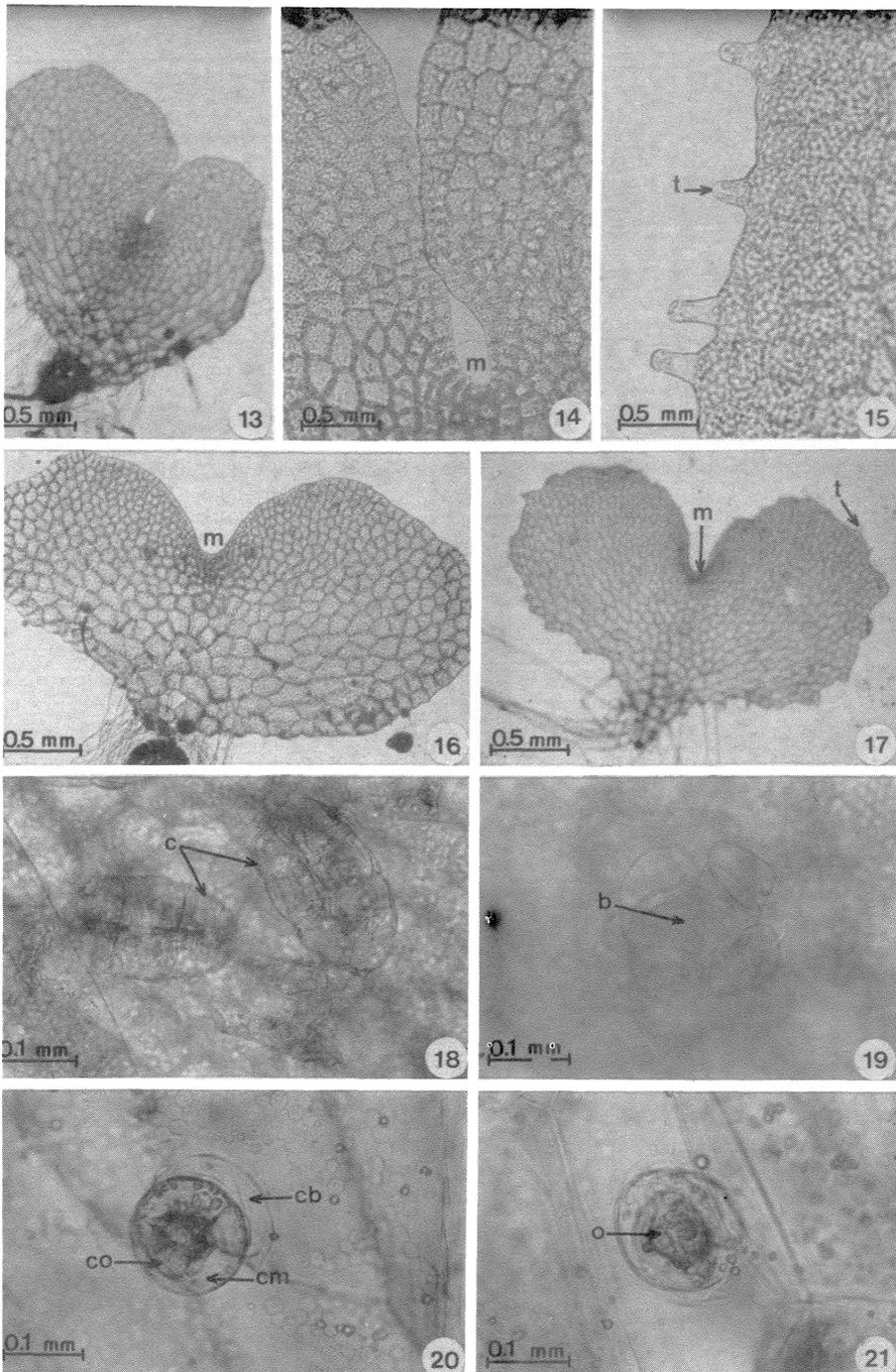
Germinación: La germinación de las esporas en ambas especies se inicia entre los 6-10 días después de la siembra, apareciendo primero la célula rizoidal lateral que emerge como una protuberancia transparente con escasos cloroplastos. Más tarde, aparece la célula protálica que es corta y con abundantes cloroplastos, conservando todavía la cubierta de la espora (Figs. 3 y 4). Esta germinación corresponde al tipo *Vittaria* (Nayar y Kaur 1971). Las esporas mantenidas en la oscuridad, no germinaron en 100 días, por lo que se les considera fotoblásticas positivas.

Fase filamentosas: A los 14 días la célula inicial sufre divisiones transversales formando gametofitos filamentosos de 2-4 células en ambas especies (Figs. 5 y 6). En *B. chilense* la célula apical se divide en sentido oblicuo a los 16 días dando origen a dos células desiguales. Así el protalo queda constituido por 4 células, una basal que es el rizoide corto rodeado por la cubierta de la espora, una célula media y dos células apicales que le dan un aumento en ancho al corto filamento. En *B. cycadifolium* (Figs. 7, 8 y 9), se observa la misma división inicial que en *B. chilense*. A los 16 días ocurren divisiones longitudinales y transversales, formando así un gametofito de 7-13 células, una célula basal rodeada por la cubierta de la espora y con un largo rizoide, 4-8 células medias y una célula apical. En las dos especies el rizoide es lateral y no presenta ningún tipo de tricomas.

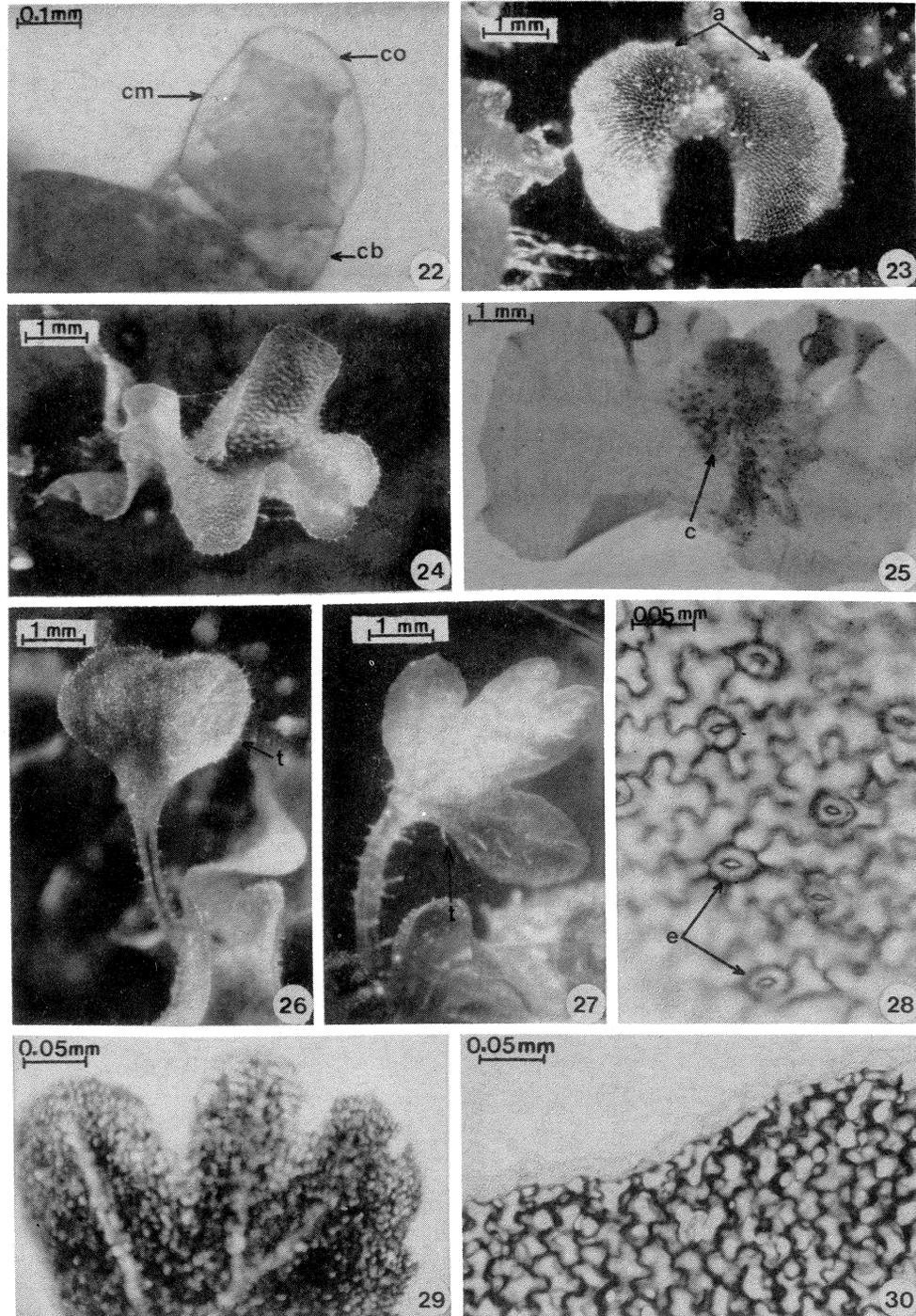
Entre los 18-46 días se pueden observar protalos con 9-15 células, distinguiéndose la célula



Figs. 1-12. Esporas, fases filamentosas y bidimensionales de *B. chilense* (Kaulf.) Mett, y *B. cycadifolium* (Colla) Sturm. 1. Espora de *B. chilense*; 2. Espora de *B. cycadifolium*; 3-4. Inicios de la germinación en *B. cycadifolium* (8 días) y *B. chilense* (16 días); 5-6. Fases filamentosas de *B. cycadifolium* (16 días) y *B. chilense* (18 días); 7-9. Fases bidimensionales de *B. cycadifolium* (16 días); 10-11. Fases bidimensionales de *B. cycadifolium* (46 días), nótese la célula meristemática en forma de cuña; 12. Fase bidimensional de *B. chilense* (61 días), nótese la zona meristemática. c: cubierta de la espóra; cm: célula meristemática inicial; cp: célula protálica; m: zona meristemática; r: rizoide.



Figs. 13-21. Fases adultas y gametangios de *B. chilense* (Kaulf.) Mett. y *B. cycadifolium* (Colla) Sturm. 13. Gametofito adulto de *B. chilense* (50 días); 14. Zona meristemática de *B. chilense* (53 días); 15. Tricomas marginales de *B. cycadifolium* (53 días); 16. Gametofito adulto de *B. chilense* glabro (56 días); 17. Gametofito adulto de *B. cycadifolium* con tricomas marginales y superficiales (53 días); 18-19. Cuellos y boca de arquegonios en *B. chilense* (53 días); 20-21. Anteridios de ambas especies (132 días). **b:** boca; **c:** cuello; **cb:** célula basal; **cm:** célula media; **co:** célula opercular; **m:** meristemo; **o:** opérculo; **t:** tricoma.



Figs. 22-30. Fases adultas y esporofitos de *B. chilense* (Kaulf.) Mett. y *B. cycadifolium* (Colla) Sturm. 22. Anteridio marginal de *B. chilense* (132 días); 23-24. Gametofito adulto de *B. cycadifolium* (4-7 meses); 25. Gametofito de *B. chilense* (4 1/2 meses); 26-27. Esporofitos de *B. cycadifolium* (7 meses) y *B. chilense* (4 1/2 meses); 28. Estomas de *B. chilense* (4 1/2 meses); 29-30. Lámina y margen del esporofito de *B. chilense* (4 1/2 meses). a: alas; c: cojinete; cb: célula basal; cm: célula media; co: célula opercular; e: estomas; t: tricomas.

meristemática en forma de cuña en la región apical (Figs. 10 y 11). Esta va formando a ambos lados nuevas células hijas de menor tamaño, lo que hace que el protalo sea más ancho en ambas especies. La célula meristemática es central (Fig. 12); en *B. Chilense* es, a veces, lateral.

Fase laminar: Hay alguna variación en el patrón de desarrollo protálico entre las dos especies estudiadas. En *B. cycadifolium*, la formación del protalo laminar se inicia a los 53 días, con el cambio de orientación del plano de división de la célula apical y forman un gametofito espatulado a cordiforme de 75-85 células, con escotadura y con escasos tricomas unicelulares marginales, papilados y secretores. Este desarrollo protálico, corresponde al tipo *Aspidium* (Figs. 15 y 17) (Nayar y Kaur 1971), a esta edad el gametofito es vegetativo y los rizoides son escasos, de color pardo claro y más largos que el gametofito; en *B. chilense* la fase laminar se inicia a los 45-50 días, formando un gametofito cordiforme-reniforme de 70-80 células, con escotadura y sin tricomas, por lo que el desarrollo protálico corresponde al tipo *Adiantum* (Figs. 13, 14 y 16) (Nayar y Kaur 1971). A esta edad el gametofito presenta los primeros arquegonios, de aparición precoz (45 días) (Fig. 16). Los rizoides son numerosos, de color pardo claro y más cortos que el gametofito.

Gametofito adulto: En *B. cycadifolium* a los 53-132 días, el gametofito es cordiforme-espatulado (Figs. 17, 23 y 24) con varios pliegues, debido al gran desarrollo de las alas, localizadas al lado de la zona meristemática, con una pequeña escotadura, lo que hace que el cojinete sea alargado y central. El gametofito presenta numerosos tricomas marginales y algunos superficiales (Fig. 15), sin arquegonios (56 días).

A los 65-85 días en *B. chilense* los gametofitos son cordiforme-reniformes (Figs. 16 y 25), glabros, con una profunda escotadura y alas muy grandes y plegadas, enrosándose en forma de cono; el cojinete es corto, central y en él se encuentran los arquegonios.

En esta fase, en ambas especies los rizoides son largos y de color pardo rojizo.

Gametangios: Los arquegonios (Figs. 18 y 19) se diferenciaron a temprana edad en *B.*

chilense (45-53 días), con cuello alargado (4-5 células) (Fig. 18) y con boca de cuatro células (Fig. 19); en *B. cycadifolium* (121 días), aparecen como pequeñas protuberancias sobre el cojinete, en la cara inferior del protalo, muy cerca de la escotadura. El cuello es alargado (4-5 células) y curvado hacia el ápice del protalo; la boca tiene 4 células, como el típico arquegonio de los helechos leptosporangiados.

Los anteridios aparecen a los 85-132 días en *B. chilense* (Figs. 21 y 22) y a los 132 días en *B. cycadifolium* (Fig. 20), después de la siembra, son oblongos, algunas veces con la base ligeramente estrechada constituidos por una célula basal, 2 anulares y una célula opercular muy conspicua (Fig. 22). Se encuentran distribuidos cerca del cojinete y en las alas de los protalos, en la cara inferior del gametofito. La dehiscencia es por un poro que se abre en la célula opercular (Fig. 20), por el que se liberan los anterozoides.

Esporofito: Las primeras hojas del esporofito de *B. chilense* (Fig. 27) aparecieron en los cultivos después de cuatro meses y medio de iniciada la germinación. Son simétricas (Fig. 29), subcordiformes y con ápice obtuso. El peciolo es largo y terete, con tricomas más largos; las células de la epidermis de las caras adaxial y abaxial son de contorno sinuoso (Fig. 30). Los estomas están solamente en la cara abaxial de la lámina y tienen 2 células estomáticas y el poro, carecen de células subsidiarias. En *B. cycadifolium* (Fig. 26) los esporofitos son similares a los de *B. chilense* solamente que aparecen 7 meses después de la siembra y el peciolo tiene tricomas cortos y papilados.

DISCUSION

Las diferencias morfológicas de los protalos de ambas especies no son muy apreciables, a excepción del patrón de desarrollo protálico, que es del tipo *Aspidium* en *B. cycadifolium* por los tricomas unicelulares marginales y superficiales y del tipo *Adiantum* en *B. chilense*, por carecer de tricomas. Es importante mencionar que la presencia de tricomas unicelulares en especies de *Blechnum* es un carácter constante, excepto en algunas especies australianas (Nayar 1962, Nayar y Kaur 1971, Rodríguez-Ríos 1973). La abundancia de tricomas en los

gametofitos varía mucho entre las especies de *Blechnum* y también depende del estado de desarrollo protálico en el cual los tricomas se forman inicialmente. En algunas especies como *B. orientale* L. y *B. gibbum* (Lab.) Mett. el protalo joven es glabro y los tricomas se forman sólo en la madurez como ocurre en *B. cycadifolium*; en otras especies como *B. buchtienii* Rosenst. y *B. brasiliense* Desv., los gametofitos son profusamente pilosos desde estados tempranos de desarrollo. Por el contrario, los gametofitos de varias especies australianas como *B. nudum* Mett. y *B. penna-marina* (Poir.) Kuhn son completamente glabros (Stokey y Atkinson 1952a y 1952b, Stone 1961) como ocurre en *B. chilense*. En términos generales, se podría decir que los gametofitos de ambas especies tienen un plan de desarrollo básico común con las especies estudiadas de *Blechnum*, existen pequeñas diferencias no significativas en cuanto a tiempo de germinación, tipo de desarrollo protálico, tiempo de formación de gametangios, forma del talo adulto y tiempo de aparición del esporofito.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ramón Riba sus valiosas sugerencias y a los revisores anónimos sus comentarios. Esta investigación fue financiada parcialmente por el CONACYT (Clave: 3903-N9401).

RESUMEN

Se presentan los estudios morfogénéticos de la fase sexual de *Blechnum chilense* y *B. cycadifolium*. Las esporas de ambas especies son monoletas, elipsoidales, no cloroflicas y su germinación es del tipo *Vittaria*. El patrón de desarrollo protálico de *B. cycadifolium* es del tipo *Aspidium* por presentar tricomas unicelulares, papilados y secretores y el de *B. chilense* es del tipo *Adiantum* por carecer de tricomas. El gametofito adulto de *B. cycadifolium* es cordiforme-espatulado y piloso y el de *B. chilense* es cordiforme-reniforme y glabro. En *B. chilense* los gametangios son del tipo común presente en los helechos leptosporangiados y las primeras hojas se formaron a los 4 meses y medio en *B. chilense* y a los 7 meses en *B. cycadifolium*.

REFERENCIAS

- Döpp, W. 1927. Untersuchungen über die Entwicklung von Prothallien einheimischer Polypodiaceen. Pflanzenforschung 8: 1-58.
- Kachroo, P. 1955. Gametophytes of *Blechnum orientale* L. and *Blechnum* spp. Sci. & Cult. 20: 402-403
- Karpowicz, W. 1927. Studien über die Entwicklung der Prothallien und der ersten Sporophyllblätter der Einheimische Farnkräuter (Polypodiaceae). Bull. Int. Acad. Polon. Sci. Lettr. Sér. B 1: 1-26.
- Lampa, E. 1901. Über die Entwicklung einiger Farnprothallien. S. B. Akad. Wiss. Wien. 110: 95-111.
- Nayar, B.K. 1962. The gametophyte of some species of *Blechnum*. J. Indian Bot. Soc. 41: 33-44.
- Nayar, B.K., N. Bajpai & F. Raza. 1966. Morphological studies on some species of *Blechnum*, *Doodia*, *Woodwardia* and *Stenochlaena*-I: The gametophytes and juvenile sporophytes. J. Linn. Soc., Bot. 59: 405-423.
- Nayar, B.K. & S. Kaur. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. Bot. Rev. (Lancaster). 37: 295-396.
- Pérez-García, B. 1988. Morfogénesis de gametofitos de Cyatheaceae (Pterophyta: Filicales). Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Pérez-García, B., R. Riba & A. Mendoza. 1994. Observaciones del gametofito de *Thelypteris rhachiflexuosa* Riba (Thelypteridaceae). Acta Bot. Mex. 28: 63-69.
- Rodríguez-Ríos, R. 1973. Morfología de los protalos y esporofitos jóvenes de algunas especies chilenas de *Blechnum* (Polypodiaceae s.l.). Gayana, Bot. 22: 1-30.
- Skottsberg, C. 1956. Derivation of the flora and fauna of Juan Fernandez and Easter Island. Nat. Hist. Juan Fernández 1: 196-439.
- Stokey, A.G. 1951. The contribution by the gametophyte to the classification of the homosporous ferns. Phytomorphology 1: 39-58.
- Stokey, A. & L. Atkinson. 1952a. The gametophyte of *Stenochlaena palustris* (Burm.) Bedd. Phytomorphology 2: 1-9.
- Stokey, A. & L. Atkinson. 1952b. The gametophyte of *Blechnum spicant* (L.) Wither and *B. buchtienii* Rosenst. Phytomorphology 2: 9-15
- Stone, I. 1961. The gametophytes of the Victorian Blechnaceae I. *Blechnum nudum* (Labill.) Luerss. Austral. J. Bot. 9: 120-136.
- Stubner, G. 1882. Beitrag zur entwicklungsgeschichte des vorkeims der Polypodiaceen. 30th Ber. K. Realsch. und Landwirtsch Dobeln, Dublin.
- Tryon, A.F. & B. Lugardon. 1991. Spores of the Pteridophytes: Surface, wall structure, and diversity based on electron microscope studies. Springer-Verlag, Nueva York. 648 p.