

APOGAMIA EN *DRYOPTERIS MUNCHII* (DRYOPTERIDACEAE)

Irma Reyes Jaramillo
Aniceto Mendoza

Depto. de Biología, Área de Botánica Estructural y Sistemática, División de CBS.,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, 09340
México, DF, Fax 5 804 46 88, irj@xanum.uam.mx

RESUMEN

Se sembraron esporas de *D. munchii* en macetas con tres suelos diferentes en propiedades físicas y químicas, con el objetivo de conocer si la formación de esporofitos apogámicos depende del suelo donde crece. Los cultivos se mantuvieron en el laboratorio con humedad y luz artificial durante siete meses. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se separaron los gametofitos en cuatro grupos: asexuados, anteridiados, con esporofito apogámico sin anteridios, y con anteridios. El porcentaje más alto se obtuvo en los gametofitos que formaron esporofitos (51%), seguido por los asexuados (45%). En los análisis de varianza (ANDEVA) no se encontró diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre la formación de esporofitos apogámicos y el tipo de suelo. En el andosol se obtuvo mejor crecimiento, vigor, color y número de hojas formadas. Se concluye que *D. munchii* en condiciones de laboratorio, presenta apogamia obligada en su ciclo de vida, independientemente del suelo donde crece, lo cual parece ser una característica inherente a la especie y un sistema de propagación bastante exitoso.

Palabras clave: *Dryopteris*, *Dryopteridaceae*, apogamia, gametofitos, México, suelo, helecho

ABSTRACT

Spores of *Dryopteris munchii* were sown in pots with three types of soil, which had differences in physical and chemical properties. The objective was to investigate the effect soil type in the formation of apogamous sporophytes. Laboratory controlled moisture and artificial light conditions were provided for seven months. The number of gametophytes was determined with a stereoscope and the individuals were classified in four reproductive groups: asexual, unisexual male, apogamous sporophytes without antheridia, and protalli bearing both antheridia and sporophytes. The highest percentage of gametophytes observed was apogamous sporophyte type (51%) followed by the asexual type (45%). ANOVA analysis showed no significant difference ($\alpha = 0.05$) between the formation of apogamous sporophytes and type of soil in which they grew. The andosol type seems to be the best soils as they provided better growing conditions, more vigorous, colorful, and numerous leaves than arenosols and luvisols. We conclude that the life cycle of *D. munchii* is obligate apogamous and develops independently of the soil where it grows, which in turn, indicates the inherent characteristic and successful propagation system of this species.

Key words: *Dryopteris*, *Dryopteridaceae*, apogamy, gametophyte, Mexico, soil, fern.

INTRODUCCIÓN

Dryopteris munchii A. R. Sm., es un helecho homospórico, endémico del estado de Chiapas, México, que en condiciones de laboratorio cultivado en agar nutritivo, inicia su germinación a los 7-15 días después de la siembra; su protalo es cordiforme con márgenes lacerados, no forma arquegonios y sólo un bajo porcentaje son anteridiados, los esporofitos que produce son de origen apogámico (Pérez-García *et al.*, 1999 a, b).

El término apogamia se usa para designar el desarrollo de un esporofito a partir de células vegetativas del talo gametofito, sin que tenga lugar la fusión de gametos. En los helechos homospóricos se desarrollan dos tipos de apogamia, la obligada, donde uno o ambos gametangios pueden estar ausentes y los esporofitos se forman a partir de la diferenciación de alguna célula del gametofito (Raghavan, 1989). El segundo tipo se conoce como apogamia inducida o facultativa y experimentalmente se puede manipular; en helechos que tienen gametangios funcionales, en estos casos la apogamia sólo es una alternativa para completar el ciclo de vida de estas plantas.

La formación de esporofitos apogámicos es común en muchas especies de helechos como lo señala DeBary (1878) y en *Dryopteris* se han citado en los trabajos de Heilbronn (1910), Duncan (1943), Manton y Walker (1954), Loyal (1960), Kanamori (1967, 1972), Korpelainen (1994) y Pérez-García *et al.* (1999b).

Los factores ambientales que intervienen en la formación de esporofitos apogámicos son: pérdida de humedad en su hábitat, insuficiencia de nutrimentos en el suelo, cambios en la intensidad de luz y experimentalmente *in vitro* se ha inducido adicionando una fuente de carbono, como sacarosa o glucosa al medio de cultivo (Whittier, 1964 y Raghavan, 1989).

En el presente estudio se hizo una evaluación de las poblaciones de gametofitos que crecieron bajo condiciones de laboratorio en tres muestras diferentes de suelo, con el objetivo de comprobar si las diferencias edáficas determinan la formación de esporofitos apogámicos.

METODOLOGÍA

Los ejemplares *D. munchii* se recolectaron en el Paraje Bonabil, situado a 5 km sobre la desviación a Matzab, a partir de la carretera San Cristóbal de las Casas - Tenejapa, Chiapas. Se depositaron en el Herbario Metropolitano, UAMIZ (A. Mendoza, R-244).

Las esporas se obtuvieron de hojas fértiles con esporangios maduros y cerrados que se guardaron en sobres de papel y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente para propiciar la liberación de las esporas, las cuales se aislaron posteriormente de otros residuos vegetales, usando una malla de 0.074 mm.

Se seleccionaron tres suelos diferentes en sus propiedades fisicoquímicas (cuadro 1), de los cuales se tomaron muestras superficialmente (0-30 cm). Se secaron al aire libre y se tamizaron con una malla de 2 mm. Como unidades experimentales se

emplearon nueve macetas de plástico de 5 cm de diámetro, con capacidad de 30 cm³, con tres repeticiones.

Las esporas se sembraron sin previa esterilización, espolvoreándolas con un pincel de pocas cerdas, sobre el suelo húmedo (a capacidad de campo) contenido en las macetas. El número de gametofitos por unidad experimental fue de 340.

Los cultivos se metieron en bolsas de polietileno transparente para evitar la deshidratación y se incubaron durante siete meses en el laboratorio a 18-25°C, con un fotoperiodo de 12 horas luz-oscuridad, empleando luz artificial (75 watts, luz de día). Durante este tiempo semanalmente se humedecieron los cultivos con agua destilada estéril, usando una pipeta Pasteur.

A los suelos empleados se les realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos: color por medio de la tablas de Munsell; pH, porcentaje de materia orgánica por el método de Walkley y Black (Jackson, 1976), bases extraíbles: calcio, magnesio, sodio y potasio, por extracción con acetato de amonio 1N, las dos primeras se determinaron

por el método de Versenato (EDTA), sodio y potasio por flamometría de emisión. Por medio del análisis cualitativo de Morgan, se analizaron nitratos, amonio, fósforo y fierro (Lunt *et al.*, 1958).

Al final del experimento, con ayuda de microscopio estereoscópico y agujas de disección se separaron y contaron los gametofitos asexuados, los anteridiados, con esporofito y aquellos que tenían tanto esporofito como anteridios.

De todos los cultivos se hicieron observaciones sobre su crecimiento, color, vigor y número de hojas de los esporofitos.

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, para ver el efecto de los suelos con respecto a los tipos de protalos; el comportamiento de los datos se mejoró (simetría y homeoscedasticidad) con una transformación logarítmica de las frecuencias. Con respecto a los tipos de protalos se aplicó la prueba de Bonferroni. También se hizo ANDEVA de dos vías (probando interacción: tipo de suelo y protalo) usando la raíz cuadrada (Salgado-Ugarte, 1992).

Cuadro 1. Sitios de recolección los suelos empleados.

Clasificación de los suelos	Localidad
Andosol húmico	Bosque de coníferas en Río Frío, México.
Arenosol dístico	Parcela, con suelo derivado de toba volcánica, salida de Apizaco, Tlaxcala.
Luvisol crómico	Vegetación de pastizal y magueyes, entre el Oro de Hidalgo, México y Tlalpujahua de Rayón, Michoacán.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de los suelos se presentan en el cuadro 2. Entre las muestras de andosol, arenosol y luvisol hay diferencias en cuanto al color, textura, porcentaje de materia orgánica, pH y en menor proporción en los contenidos de calcio, magnesio, fósforo, amonio y fierro.

En las nueve macetas empleadas crecieron alrededor de 3 000 gametofitos de *D. munchii*. En el andosol se contaron 1 014, en el arenosol 1 072 y en el Luvisol 694.

Los gametofitos se clasificaron en cuatro grupos: asexuados, anteridiados, con esporofitos apogámicos y con esporofitos además de anteridios. No se observaron gametofitos bisexuales ni arquegoniados.

Los resultados del conteo de las poblaciones de gametofitos y/o esporofitos se encuentran en el cuadro 3. Los gametofitos asexuados y los que formaron esporofitos apogámicos presentaron los más altos porcentajes en los tres diferentes suelos, como se aprecia en la Fig. 11. Los gametofitos anteridiados con o sin esporofito fueron los más escasos en todas las poblaciones y en todos los suelos.

Con base en el análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, no se encontró diferencia significativa de los cuatro grupos de gametofitos con respecto al tipo de suelo, obteniendo una $F(3,26) = 42.06$ con una probabilidad ($P < 0.05$).

Al aplicar la prueba de Bonferroni, se obtuvieron diferencias significativas entre los cuatro grupos de gametofitos con una $P < 0.05$. Los gametofitos asexuados y con esporofito apogámico, también mostraron

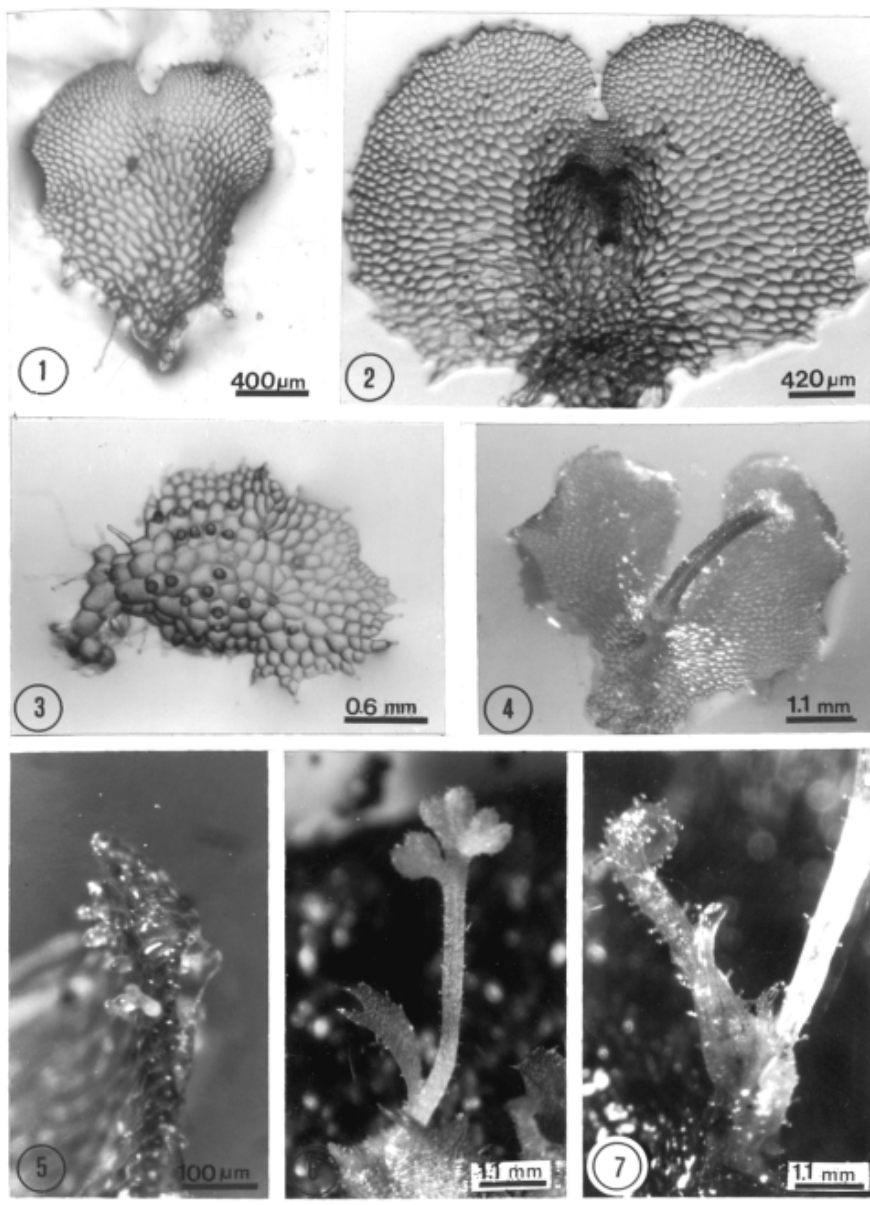
diferencia significativa con respecto a los gametofitos anteridiados con o sin esporofito.

No se encontró diferencia significativa entre el número de gametofitos asexuados (Fig. 1) y los que formaron esporofitos apogámicos (Figs. 2, 4, 6, 7); lo mismo que entre los anteridiados (Figs. 3 y 5).

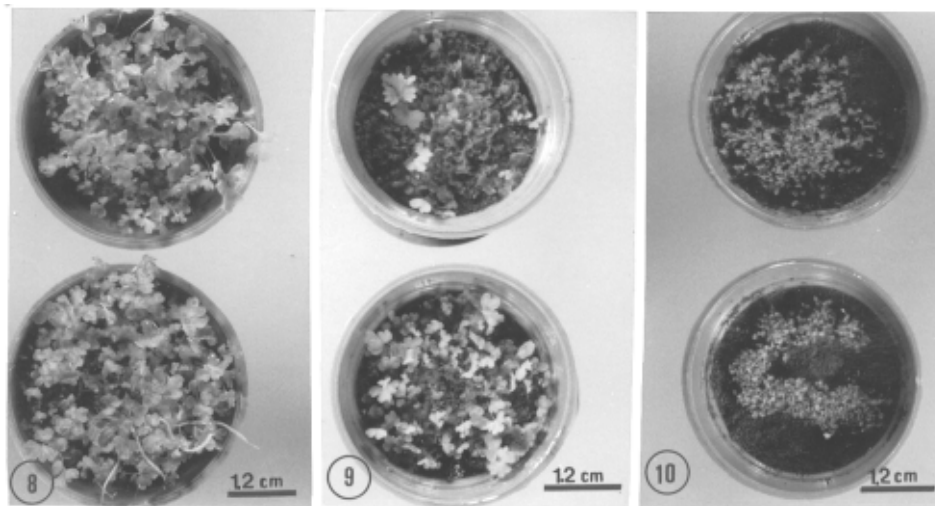
El análisis de frecuencias con relación a los tipos de suelo mostró una $F(2,32) = 0.40$ y una $P > 0.05 = 0.6729$, señalando que no existen diferencias por el tipo de suelo.

El resultado del ANDEVA de dos vías (donde se consideró tipo de suelo, grupo de gametofitos e interacción entre ellos) con respecto al tipo de suelo fue $F(2,18) = 1.11$ y $Prob. = 0.3515$; grupo de gametofitos $F(3,18) = 31.45$ y una $P < 0.05$ y en la interacción (tipo de suelo/grupo de gametofitos) $ts/gg = F(6,18) = 0.29$ con una $Prob. = 0.9352$. De esta manera se confirmaron los resultados parciales del ANDEVA de una sola vía, es decir, existen diferencias significativas entre los grupos de plantas, pero no por el tipo de suelo.

Los resultados de las observaciones del crecimiento de los esporofitos de *D. munchii* en los tres suelos se resumen en el cuadro 4 y Figs. 8-10. Los datos cuantitativos (altura y número de hojas) se midieron al final del experimento y los cualitativos (crecimiento, vigor y color) fueron constantes todo el tiempo. El suelo más fértil fue el andosol húmico, en donde las plantas crecieron tres centímetros de altura y formaron de dos a tres hojas. En el arenosol dístrico, el crecimiento y desarrollo fue menor. En el luvisol crómico, los esporofitos crecieron menos de un centímetro, con aspecto clorótico y una prefoliación.



Figs. 1-7. Gametofitos y desarrollo de esporofitos de *D. munchii* cultivados en suelo. 1) Gametofito asexualado (68 días, luvisol). 2) Gametofito cordiforme iniciando la formación del esporofito (161 días, andosol). 3) Gametofito anteridiado (72 días, andosol). 4) Primera hoja del esporofito apogámico (74 días, arenosol). 5) Anteridios en el ala del gametofito con esporofito (arenosol). 6) Esporofito (142 días, andosol). 7) Prefoliación de la segunda hoja del esporofito apogámico (200 días, andosol).



Figs. 8-10. Aspecto de los cultivos de *D. munchii* en maceta, después de siete meses de sembrados. 8) Andosol. 9) Arenosol. 10) Luvisol.

Cuadro 2. Análisis fisicoquímico de las muestras de suelo.

	Andosol	Luvisol	Arenosol
Seco	10YR 3/2 pardo	5YR 4/4 pardo rojizo	2.5 Y 3/2 pardo olivo
Color	grisáceo muy oscuro		
Húmedo	5YR 2.5/1 negro	5YR 2.5/2 pardo rojizo oscuro	10YR 2/2 pardo muy oscuro.
Textura	media	fina	gruesa
Materia orgánica %	18.0	0.67	0.81
pH 1:2.5 (agua)	5.30	5.5	6.4
Bases extraíbles ($\text{cmol}_{(+)}$ kg^{-1})			
Ca ⁺⁺	4.8	4.8	2.4
Mg ⁺⁺	4.0	10.0	3.2
Na ⁺	0.86	0.59	0.65
K ⁺	0.19	0.51	0.12
P ₂ O ₅ (ppm)	12 (bajo)	35 (medio)	35 (medio)
NH ₄ ⁺ (ppm)	80 (medio alto)	35 (medio)	35 (medio)
NO ₃ ⁻ (ppm)	5 (bajo)	<5	5
Fe ⁺⁺ + Fe ⁺⁺⁺	medio	muy bajo	bajo

Cuadro 3. Resultados del conteo obtenido de los gametofitos que crecieron en los tres suelos: Σ =suma de los gametofitos de las tres macetas, x = media, % = porcentaje en relación a la población de gametofitos crecidos en las tres réplicas.

Tipo de gametofito		Andosol	Luvisol	Arenosol
Asexuado	Σ	359	388	475
	x	119.6	129.3	158.3
	%	35.4	56	44.30
Con esporofitos apogámico	Σ	601	295	566
	x	200.3	98.3	188.6
	%	59.27	42.50	52.7
Anteridiado B&	Σ	36	7	46
	x	12	2.3	15.3
	%	3.5	0.69	4.29
Con esporofito apogámico y con anteridios	Σ	18	4	4
	x	6	1.33	1.3
	%	1.7	0.57	0.37

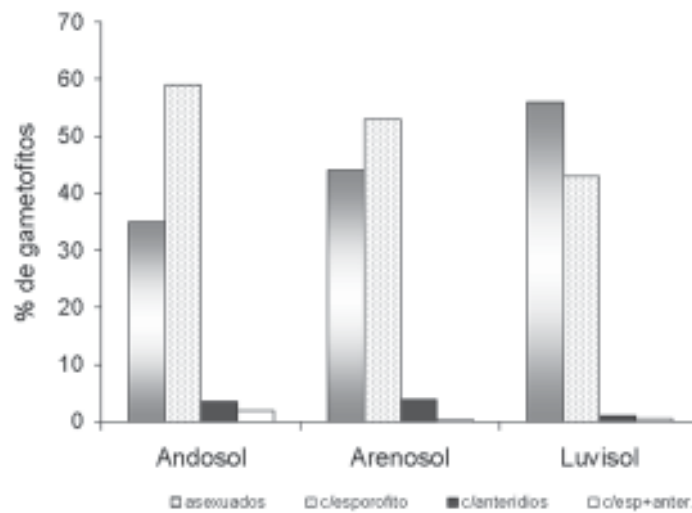


Fig. 11. Proporción de los gametofitos que crecieron en los tres suelos.

Cuadro 4. Descripción cualitativa de los esporofitos de *D. munchii* al final del experimento.

Suelo	Altura (cm)	Crecimiento	Vigor	Color	Núm. hojas
Andosol	3	rápido	alto	verde	2-3
Arenosol	0.8-1.5	moderado	medio	verde	1-2
Luvisol	<1	lento	bajo	cloróticos	1(prefoliación)

DISCUSIÓN

De los resultados, atrae la atención el alto porcentaje de gametofitos que formaron esporofitos apogámicos y que es casi equivalente al número de gametofitos asexuados, la suma de ambos es más del 90% de la población en todos los suelos. Los gametofitos anteridiados en ningún suelo rebasaron más del 5%, a menos que se sumen los gametofitos con esporofitos que formaron anteridios, como sería el caso del andosol y del arenosol.

Como lo muestran los cuadros de resultados y el análisis estadístico, la formación de esporofitos apogámicos en *D. munchii* es independiente del sustrato en donde crecen, la apogamia obligada parece ser una característica inherente a la especie, ya que por lo menos en condiciones de laboratorio no formaron arquegonios y aunque hay formación de anteridios viables, no se puede dar la fecundación ni tampoco el intercambio genético.

Sin embargo, la apogamia en *D. munchii* parece ser un mecanismo de propagación bastante exitoso (59% en andosol, 42% en el luvisol y 52% en el arenosol), sería

interesante conocer si en su hábitat natural se reproduce de igual forma, ya que se trata de una especie endémica, con una distribución muy restringida.

Con relación a la composición química de los suelos, el mayor crecimiento y desarrollo de *D. munchii* fue en el andosol, lo que de cierta manera se esperaba debido a que es un suelo muy rico en materia orgánica, lo cual incrementa su fertilidad, además de su naturaleza mineral de origen volcánico (Wada, 1985).

Por otra parte los análisis practicados a los tres suelos, muestran diferencias importantes en cuanto al contenido de materia orgánica, siendo el andosol extremadamente rico (18%) a diferencia del luvisol (0.67%) y el arenosol (0.81%) que son pobres. La clase textural también es diferente en los tres suelos, en el andosol es migajosa o limosa, en el arenosol predominan las arenas sobre los limos y en el luvisol hay mayor porcentaje de arcillas.

La reacción de los suelos varió de fuertemente ácida (pH= 5.3 y 5.5) a ligeramente ácida (6.4); en menor proporción se encontraron diferencias en los

contenidos de bases, fósforo, amonio, nitratos y hierro.

De acuerdo con los resultados obtenidos (figuras 8-10), el tamaño de los helechos en los tres suelos fue muy diferente durante todo el experimento. Los esporofitos del luvisol siempre fueron de menor talla y de aspecto clorótico, lo cual se relaciona con la deficiencia de nitrógeno, que en los helechos como en otras plantas les permite un mejor crecimiento y vigor.

Indudablemente que muchas manifestaciones morfológicas, de expresión sexual y de desarrollo de las plantas, tienen estrecha relación con el medio en donde crecen como lo señala Korpelainen (1994), quien trabajó con *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, variando la concentración de nutrimentos de 0 a 200%, encontró que los gametofitos crecidos en dosis de 50 y 100% se formaron más esporofitos y gametofitos hermafroditas, mientras que en condiciones nutricionales del 200% habían menos esporofitos, así como con 0% se formaron más gametofitos masculinos, menos hermafroditas y escasos gametofitos femeninos.

Por otra parte Hamilton (1994) al variar los niveles de nutrimentos en los medios de cultivo, trabajando con *Diplazium pynocarpon* y *Deparia acrosticooides*, encontró que el tamaño y la expresión genética de los gametofitos variaba. En medios con bajo nivel de nutrimentos obtuvieron gametofitos anteridiados pequeños, y con altos niveles nutricionales, los gametofitos fueron de mayor tamaño y formaron arquegonios.

A diferencia de los trabajos mencionados, en el estudio que realizamos, aunque hay variación en las propiedades físicas y químicas del suelo, los tipos de gametofitos formados en los tres suelos se mantiene constante, así como la proporción de esporofitos apogámicos, gametofitos asexuados y anteridiados.

En Pérez-García *et al.* (1999) se describió la morfogénesis de *D. munchii* al ser cultivado en medio de Thompson-Agar (Klekowski, 1969), el cual se compone de macro y micronutrientes con una fuente de nitrógeno de nitrato de amonio. En los resultados se observó una expresión sexual con las mismas características que la encontrada en los tres diferentes suelos. No hubo formación de gametofitos femeninos, hay escasos gametofitos anteridiados y un gran equilibrio entre gametofitos asexuados y los que forman esporofitos apogámicos.

La apariencia de los gametofitos cultivados en medio de Thompson es comparable a los obtenidos en el suelo de andosol. Lo cual pone de manifiesto que la talla y color de los gametofitos crecidos en el luvisol es debe a la fertilidad del suelo.

Finalmente, debido a que estudios sistemáticos han demostrado que las especies responden en forma distinta al mismo medio (Miller, 1968; Hamilton, 1994), es necesario llevar a cabo más estudios utilizando sustratos naturales como el suelo y sobre todo en el sitio donde se establecen de manera natural las plantas.

CONCLUSIONES

En condiciones de laboratorio creciendo en tres suelos diferentes, *D. munchii* formó esporofitos apogámicos en 51% de la población. Como resultado de las diferencias físicoquímicas de los tres suelos, el crecimiento y desarrollo de los gametofitos y esporofitos fue contrastante; sin embargo, no determinaron la formación de esporofitos apogámicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al fotógrafo Jorge Lodigiani, y a Isaías Hazarmabeth Salgado Ugarte por su apoyo en el análisis estadístico, así como a los revisores por sus valiosas sugerencias para mejorar el manuscrito.

LITERATURA CITADA

- DeBary, A., 1878. "Über apogame Farne und die Erscheinung der Apogamie im Allgemeinen". *Bot. Zeitung* (Berling), **36**:449-487.
- Duncan, R.E., 1943. "Origin and development of embryos in certain apogamous forms of *Dryopteris*". *Bot. Gaz.* (Crawfordsville), **105**:202-211.
- Hamilton, R.G., 1994. "The effects of pH, nutrient level, density and temperature on size and gender expression of fern gametophytes". *Amer. J. Bot.*, 81(6) suppl.: 129.
- Salgado-Ugarte, I. H., 1992. "El análisis exploratorio de datos biológicos". *Fundamentos y aplicaciones*. Marc Ediciones. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México, 243 pp.
- Heilbronn, A., 1910. "Apogamie, Bastardierung und Erblinckheitsverhältnisse bei einigen Farnen". *Flora*, **101**:1-42.
- Jackson, M.L., 1976. *Análisis químico de suelos*. Ed. Omega. Barcelona, 300-304 pp.
- Kanamori, K., 1967. "Origin and early development of apogamous embryos in the protallia of *Dryopteris chinensis*". *J. Jap. Bot.*, **42**:111-118.
- , 1972. "Apogamy in ferns with special reference to the apogamous embryogenesis". *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku Sec.*, B15:111-131.
- Klekowski, E.J. Jr., 1969. "Reproductive biology of the Pteridophyta". III. A study of the Blechnaceae. *J. Linn. Soc.*, **62**:347-359.
- Korpelainen, H., 1994. "Growth, sex determination and reproduction of *Dryopteris filix-mas* (L.). Schott gametophytes under varying nutritional conditions". *Bot. J. Linn. Soc.*, **114**:357-366.
- Loyal, D.S., 1960. "Some observations on the cytology and apogamy of Himalayan *Dryopteris paleacea* (Don.) Hand. Mazz". *J. Indian. Bot. Soc.*, **39**:608-613.

- Lunt, H.A., H.G.M. Jacobson y W.L.C. Swanson, 1958. "The Morgan Soil Testing System". *Bulletin 541*. The Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, 59 pp.
- Manton, I. y S. Walker, 1954. "Induced apogamy in *Dryopteris dilatata* (Hoffm.) A. Gray and *D. filix-mas* (L.) Schott emend. And its significance for the interpretation of the two species". *Ann. Bot. Köning & Sims*, **18**:377-383.
- Miller, J.H., 1968. "Fern gametophytes as experimental material". *Bot. Rev. (Lancaster)*, **34**:361-440.
- Pérez-García, B., A. Mendoza, J. I. Reyes y R. Riba, 1999a. "Morfogénesis de la fase sexual de seis especies mexicanas de helechos del género *Dryopteris* (Dryopteridaceae)". *Rev. Biol. Trop.*, 47(1-2):69-81.
- Pérez-García, B., A. Mendoza, J. I. Reyes y R. Riba, 1999b. *Apogamy in Dryopteris munchii (Dryopteridaceae), endemic species of Chiapas, México*. XVI International Botanical Congress, in the Missouri Botanical Garden, USA. Abstract No. 5063.
- Raghavan, V., 1989. *Developmental biology of fern gametophytes*. 361 pp. Cambridge University Press, Cambridge, 361 pp.
- Wada, K., 1985. "The distinctive properties of andosols. Advances in Soil", *Science*, **2**:173-229.
- Whittier, D.P., 1964. "The influence of cultural conditions on the induction of apogamy in *Pteridium* gametophytes". *Amer. J. Bot.*, **51**:730-736.

Recibido: 1 mayo 2004. Aceptado: 2 octubre 2004.