






**DESCRIPCIÓN MORFOMÉTRICA DE DOS POBLACIONES
DE *Leiosporoceros dussii* (STEPHANI) HÄSSEL
(LEIOSPOROCEROTACEAE) DE PANAMÁ.**

¹Guadalupe, Y.  ; ¹Flores, N.  & ^{2,3}Villarreal, J. C. 

¹Universidad de Panamá, Escuela de Biología, Departamento de Botánica. ²Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales. ³Universidad Laval, Departamento de Biología. E-mail: yessenia27agb@gmail.com; naydaf@gmail.com; juan-carlos.villarreal-aguilar@bio.ulaval.ca

RESUMEN

Leiosporoceros dussii es un antocerote neotropical que comprende colonias de cianobacterias alojadas en canales esquizógenos ramificados dicotómicamente a lo largo del talo, esta particularidad representa un carácter diagnóstico utilizado para diferenciar esta especie de otros antocerotes. Este trabajo tiene como objetivo estudiar la variación morfológica de *L. dussii*, por medio de análisis morfométricos de dos poblaciones, ubicadas en El Valle de Antón, provincia de Coclé, Panamá. Se realizó una descripción completa de la especie y se encontraron variaciones morfométricas entre las dos poblaciones. Se compararon características morfométricas de las poblaciones estudiadas, las cuales mostraron variaciones morfométricas significativas, evidenciadas tanto en el análisis de datos multivariante como univariante. Este estudio proporciona descripciones morfométricas detalladas del gametófito y esporófito de *L. dussii*, las cuales pueden ser utilizadas para la identificación de especímenes sin estructuras reproductivas.

PALABRAS CLAVES

Plantas no vasculares, Antocerote, gametófito, esporófito, morfometría, característica morfológica.

MORPHOMETRIC DESCRIPTION OF TWO POPULATIONS OF *Leiosporoceros dussii* (STEPHANI) HÄSSEL (LEIOSPOROCEROTACEAE) IN PANAMA.

ABSTRACT

Leiosporoceros dussii (Stephani) Hässel is a neotropical genus of hornwort with little exiting morphological information. This is the only hornwort reported with cyanobacterial colonies present in longitudinally oriented schizogenous canals through the thallus, which is a diagnostic feature for its identification. The aim of this study was to describe the morphology of *L. dussii* using morphometrical analysis of two populations from El Valle de Anton, in the Coclé Province of Panama. Our analysis showed significant variations in both the gametophyte and the sporophyte when the two populations were compared using multivariate and univariate statistical analysis. This description is a valuable source for the identification of sterile plants of the species *Leiosporoceros dussii* and expand our knowledge of this phylogenetically important species.

KEY WORDS

Non-Vascular Plants, hornwort, gametophyte, sporophyte, morphometric, morphological characteristic.

INTRODUCCIÓN

Las briofitas en sentido amplio, comprende tres líneas monofiléticas de plantas no vasculares: Marchantiophyta (hepáticas), Anthocerotophyta (antocerotes) y Bryophyta (musgos), lo cual se evidenció en estudios del origen y evolución de los estomas, estructuras presentes tanto en plantas no vasculares como en plantas vasculares (One Thousand Plant Transcriptomes Initiative 2019). Representan el segundo grupo de plantas más diverso, después de las plantas con flores (Konrat *et al.* 2010). Los antocerotes constituyen el grupo menos abundante entre las plantas no vasculares y actualmente comprende unas 200-250 especies (Villarreal *et al.* 2010), lo que corresponde a un número pequeño en comparación con los musgos (Magill 2010) y hepáticas (Von Konrat *et al.* 2014).

Los antocerotes poseen una morfología interesante, muchas de las especies de este grupo presentan unas estructuras singulares semejantes a los pirenoides de las algas verdes, las cuales son consideradas como estructuras análogas, debido a la similitud en la cantidad y ubicación de la enzima RuBisCO en forma activa (Vaughn *et al.* 1990). Además, los antocerotes presentan estomas en la superficie del esporofito, los cuales a pesar de ser idénticos a los estomas encontrados en las angiospermas, se consideran estructuras análogas, debido a que no poseen el mismo patrón de división celular (Evert 2016), ni las mismas funciones (Pressel *et al.* 2014). Por otro lado, la presencia de un meristema basal en el esporofito, con meiosis asincrónica, es una característica exclusiva de los antocerotes (Villarreal & Renzaglia 2015). Los antocerotes además de poseer una compleja morfología, posiblemente, representan el linaje de plantas más antiguo de la tierra, con una amplia capacidad de desarrollar simbiosis con cianobacterias (Villarreal & Renzaglia 2015).

Leiosporoceros dussii (Stephani) Hässel es una especie neotropical, fue descrita originalmente como *Anthoceros dussii* Stephani. por Stephani en 1893. Luego en 1916 éste la describe como múltiples especies del género *Aspiromitus* Stephani. En 1986, Gabriela G. Hässel de Menéndez propone el género monotípico *Leiosporoceros* Hässel, en el cual incluye a *Leiosporoceros dussii* (Stephani) Hässel. Este taxón se distingue de los demás miembros de la división Anthocerotophyta por el arreglo bilateral alterno-opuesto de sus esporas. Esta característica fue importante para establecer la familia Leiosporocerotaceae. La presencia de las hebras de *Nostoc* en los canales esquizógenos es otra característica única que separa a *Leiosporoceros* de otros antocerotes y representa un arreglo simbiótico nuevo en plantas terrestres (Villarreal & Renzaglia 2006) Todas estas descripciones antes mencionadas están basadas en las características del esporofito (esporas y eláteres), con una breve descripción del gametófito.

Sorprendentemente, los canales de *Nostoc* en *Leiosporoceros* han sido desapercibidos o reportados como grandes colonias globosas en estudios previos (Stephani 1893; de Menéndez 1986); por lo tanto, existe una necesidad de realizar estudios adicionales sobre el gametófito de antocerotes con material fresco, ya sea a partir de cultivos axénicos de laboratorio o recolectados de campo. El estudio del gametófito de estas

plantas podría ampliar las características útiles para la identificación de estos organismos, las cuales están actualmente casi restringidas a las características de la morfología del esporófito. Villarreal & Renzaglia (2006), realizaron un estudio sobre el desarrollo de las colonias de cianobacterias dentro del talo de *Leiosporoceros*, en donde aportan información relacionada a la morfología del gametófito. Sin embargo, no se ha estudiado la variación morfológica de *L. dussii* en diferentes poblaciones. El objetivo de este estudio es realizar una descripción morfológica de la especie *Leiosporoceros dussii* (Stephani) Hässel y determinar sus variaciones, tanto del gametófito como del esporófito, mediante análisis morfométricos de dos poblaciones.

METODOLOGÍA

Recolección y preparación de las muestras:

Las plantas utilizadas en este estudio se tomaron de dos poblaciones pequeñas ubicadas en El Valle de Antón, en Río Indio y en Río Guayabo. De cada población se utilizaron dos colonias, una femenina y una masculina; de cada colonia se utilizaron cinco talos para realizar las mediciones correspondientes al análisis morfométrico (Cuadro 1). Las colonias de plantas fueron recolectadas del suelo con una navaja de bolsillo y colocadas en bolsas con cierre hermético debidamente rotuladas. Luego de ser extraídas del suelo, las plantas recolectadas se guardaron en un recipiente refrigerado con hielo para mantenerlas frescas hasta ser procesadas en el laboratorio. Para tomar las medidas macroscópicas y hacer cortes del talo, se utilizó un estereomicroscopio modelo Leica: ZOOM 2000 y una regla milimetrada. Las fotografías de estructuras microscópicas fueron tomadas utilizando un microscopio de luz modelo OLYMPUS: BX50 con cámara fotográfica OLYMPUS: DP25. Posteriormente, las estructuras captadas en las fotografías fueron analizadas y medidas con el software DP2-BSW OLYMPUS.

Especímenes examinados:

Panamá. Provincia de Coclé: El Valle de Antón, Río Guayabo, dentro del Monumento Natural Cerro Gaital, sobre ladera con suelo de roca volcánica, 8°37'34.6"N, 80°08'13.7"O, 624 m. *Guadalupe 240* y *Guadalupe 241* (PMA); Río Indio, dentro del Monumento Natural Cerro Gaital, sobre ladera con suelo de roca volcánica, 8°38'25.5"N, 80°06'49.2"O, *Guadalupe 247* y *Guadalupe 248* (PMA).

Análisis morfométrico:

Se consideraron 13 variables del gametófito y 9 variables del esporófito (Cuadro 1). Se compararon las variables en cuatro grupos con cantidad de medidas similares con una prueba multivariante MANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre las dos poblaciones estudiadas dentro de cada grupo (Cuadro 2). De igual manera se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de cada grupo, los cuales fueron representados en gráficas biplot. Además, se analizaron los datos de las variables de manera independiente con la prueba paramétrica *t-student* y la prueba no paramétrica Mann-Whitney, según su normalidad de varianza, para comparar las dos poblaciones y así determinar qué variables muestran significancia en las diferencias entre las dos poblaciones de manera independiente. Se hizo una gráfica boxplot para mostrar la comparación de la cantidad de anteridios entre las dos poblaciones. Todos los análisis morfométricos fueron realizados con el programa PAST, a excepción de los cálculos de la prueba MANOVA, los cuales fueron realizados con el programa de análisis estadístico R 3.5.1. (R Core Team, 2018).

Cuadro 1. Variables Morfométricas. Se detallan las mediadas realizadas para el análisis morfométrico por una población estudiada según el género de las plantas.

VARIABLE MORFOMÉTRICA	MEDIDAS POR POBLACIÓN		
	Tipo De Planta	Medidas Por Talo	Medidas Por Población
GAMETÓFITO			
Ancho del talo	♂ / ♀	una por talo	10
Largo del talo	♂ / ♀	una por talo	10
Ancho de células interiores	♂ / ♀	cinco células por talo	25
Largo de células interiores	♂ / ♀	cinco células por talo	25
Ancho de células epidermales	♂ / ♀	cinco células por talo	25
Largo de células epidermales	♂ / ♀	cinco células por talo	25
Ancho de cloroplastos	♂ / ♀	cinco cloroplastos por talo	25
Largo de cloroplastos	♂ / ♀	cinco cloroplastos por talo	25
Cantidad de anteridios por cámara Anteridial	♂	tres cámaras por talo	15
Ancho del anteridio	♂ / ♀	cinco por cámara anteridial	75
Largo del anteridio	♂ / ♀	cinco por cámara anteridial	75
Ancho del pedicelo del anteridio	♂ / ♀	cinco por cámara anteridial	75
Largo del pedicelo del anteridio	♂ / ♀	cinco por cámara anteridial	75
ESPORÓFITO			
Largo del esporófito	♀	una por talo	10
Diámetro del esporófito	♀	una por talo	10
Largo del involucre	♀	una por talo	10
Grosor de tejido asimilativo	♀	una por esporófito	10
Ancho de las esporas	♀	diez por talo	50

Ancho del estoma	♀	diez por talo	50
Ancho del ostiolo	♀	diez por talo	50
ancho de células de los estomas	♀	diez por talo	50
largo de células de los estomas.	♀	diez por talo	50

Cuadro 2. Lista de Abreviaciones. Se detallan el nombre de cada tipo de variable morfométrica realizada con su correspondiente abreviatura utilizadas en las gráficas biplot del Análisis de Componentes Principales (PCA). Los colores representan los grupos de variables utilizados en las pruebas de análisis multivariantes. Azul: Grupo A, Rojo: Grupo B, Verde: Grupo C y Naranja: Grupo D.

Ancho del talo ♂ TAM	Largo de células epidermales ♀ CELF
Ancho del talo ♀ TAF	Ancho de Cloroplastos ♂ CAM
Largo del talo ♂ TLM	Ancho de Cloroplastos ♀ CAF
Largo del talo ♀ TLF	Largo de Cloroplastos ♂ CLM
Largo del esporófito EL	Largo de Cloroplastos ♀ CLF
Diámetro del esporófito EN	Ancho del anteridio AA
Largo del involucre IN	Largo del anteridio AL
Grosor de tejido asimilativo TA	Ancho del pedicelo del anteridio PA
Ancho de células interiores ♂ CIAM	Largo del pedicelo del anteridio PL
Ancho de células interiores ♀ CIAF	Ancho de las esporas EA
Largo de células interiores ♂ CILM	ancho del estoma ESA
Largo de células interiores ♀ CILF	ancho del ostiolo OA
Ancho de células epidermales ♂ CEAM	ancho de células del estoma CEA
Ancho de células epidermales ♀ CEAF	largo de células del estoma CEL
Largo de células epidermales ♂ CELM	Cantidad de anteridios por cámara anteridial CA

RESULTADOS

Descripción morfológica de *Leiosporoceros dussi*.

Gametófito: Plantas dioicas de hábito taloso que crecen usualmente en colonias circulares que alcanzan los 11–17 cm de diámetro. Tomando en cuenta ambas poblaciones, el talo presenta una coloración que varía de verde claro, al estar adheridas al sustrato, a verde oscuro al ser desprendidas, hasta negro cuando secas; cuando las plantas se secan adheridas al sustrato en campo, el talo es rojizo (Fig. 1a). La forma del talo es alargada con ápice dicotómico, (1-) 2–3 (-4) cm de largo y (0.5) 1 cm de ancho, con margen entero a lobulado, lobos de 0.4–0.5 cm de ancho. Células del interior del talo en corte longitudinal alargadas, (57-) 60–138 (-223) μm de largo y (20-) 45–52 (-75) μm de ancho, con forma rectangular a hexagonal. Células de la epidermis compuesta por células de (16-) 27–30 (-55) μm de ancho y (22-) 41–47 (-80) μm de largo, papiloides, formando proyecciones superficiales en la epidermis (Fig. 1c-d). Cloroplastos en células epidermales, uno por célula, (8-) 15–16 (-27) μm de ancho y (11-) 20 (-34) μm de largo, sin pirenoide. Los talos masculinos poseen cámaras anteridiales esféricas, de color amarillentas cuando maduras, irregularmente distribuidas desde la parte media, hasta el ápice del talo. Anteridios (21-) 51 (-105) por cámara, con un ancho de (71-) 96 (-124) μm y (90-) 156 (-190) μm de largo; cubierta del anteridio con cuatro hileras de células. Pedúnculo de los anteridios de (16-) 24 (-34) μm x (37-) 134 (-220) μm con dos a tres células de ancho (Fig. 11a-d). Colonias de cianobacterias del género *Nostoc* dispuestas en la parte ventral del talo en canales ramificados, observándose como líneas verdes azuladas a chocolateas a lo largo de todo el talo (Fig. 2d).

Esporófito: Los talos femeninos presentan de 1 – 3 esporófitos por individuo, desarrollándose hacia el ápice del talo (Fig. 10b). Cápsulas dehiscentes, de color verde a amarillo hasta chocolate cuando abiertas de (1.0-) 1.6 (-2.5) cm. Involucro de la cápsula erecto y cilíndrico de (0.2-) 0.3 (-0.4) cm de largo (Cuadro 1). Valvas de la cápsula de (445-) 576 (-861) μm de ancho (Fig. 10b). El tejido asimilativo presenta de 6-8 células en grosor (139 – 187 μm de ancho). Estomas de la cápsula con (24-) 51 (-104) μm de ancho, con poro de (4-) 11 (-20) μm de ancho y células protectoras de (12-) 21 (-48) μm de ancho y (48-) 75 (-93) μm

de largo. Esporas amarillas, lisas sin ornamentación, con un diámetro ecuatorial de (19-) 26 (-31) μm (Fig. 1f).

Fig. 1. Morfología del talo de *L. dussii*. A. Talo de *L. dussii* en descomposición. B. Colonia con plantas masculinas con cámaras anteridiales y plantas femeninas con esporofitos. C. Vista superficial del talo mostrando cloroplastos. D. Células papiloides (corte longitudinal del talo).

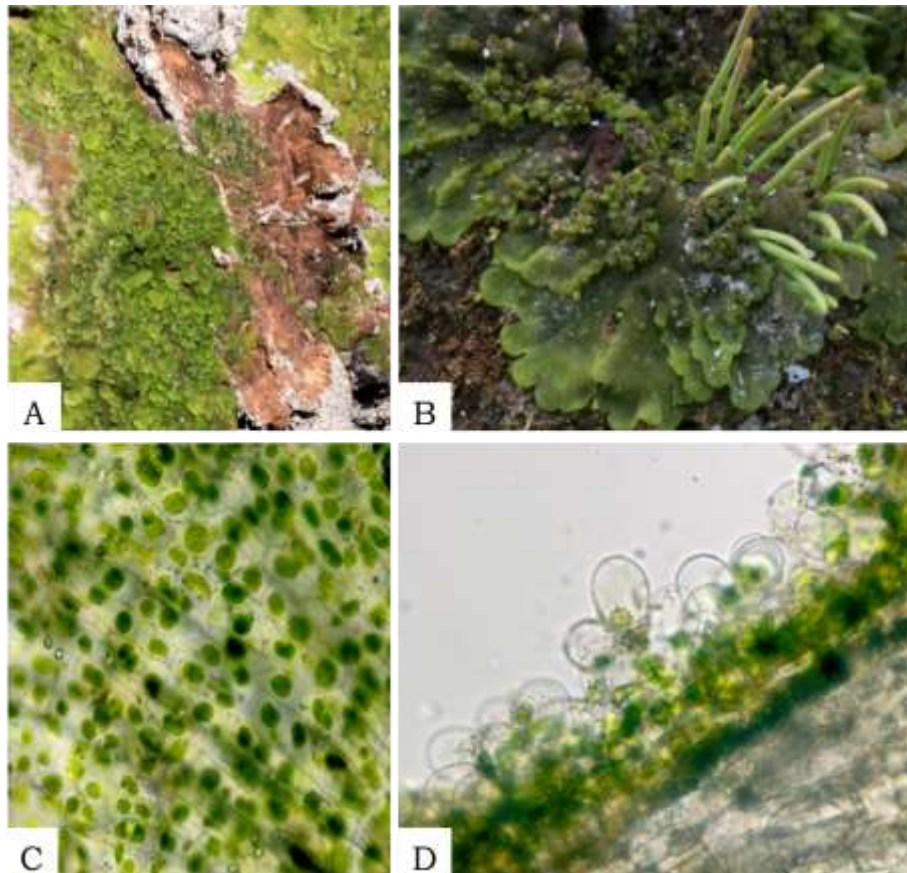
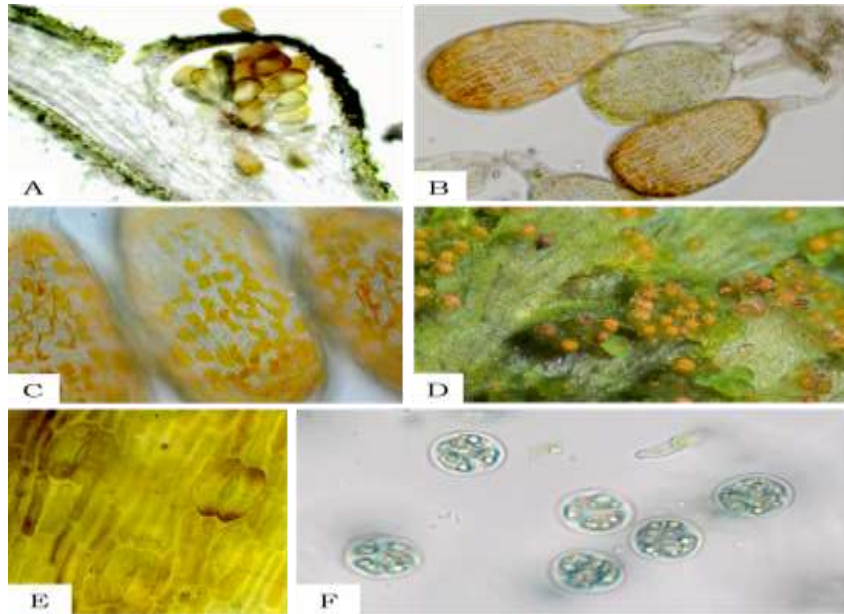


Fig. 2. Morfología del talo de *L. dussii*. A. Corte longitudinal de cámara anteridial mostrando anteridios en su interior. B. y C. Anteridios. D. Talo de planta masculina con cámaras anteridiales amarillas. E. Estomas presentes en el esporofito. F. Esporas



Comparación morfométrica de las poblaciones estudiadas

Los resultados obtenidos con la prueba multivariante MANOVA presentaron diferencias significativas en todos los grupos de variables entre las dos poblaciones estudiadas (Cuadro 3). La prueba univariante t-student mostró diferencias significativas individualmente entre cada variable estudiada solo en 15 de 22 tipos de medidas realizadas. Dentro de las 13 variables contempladas para la descripción del gametófito de *L. dussii* entre las dos poblaciones se obtuvieron diferencias morfométricas en 10 de estas variables. En cuanto a las nueve variables utilizadas para la descripción del esporófito se obtuvieron diferencias morfométricas en cinco de éstas. Las variables que presentaron diferencias significativas entre las dos poblaciones con la prueba *t-student* se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Análisis multivariante de datos. Esta tabla muestra los resultados con la prueba MANOVA obtenidos por cada grupo de variables. $\alpha = 0.05$. Ver detalle de variables de cada grupo en el Cuadro 2.

GRUPO	MANOVA				
	Pillai	approx F	num Df	den Df	Pr(>F)
A	0.9999	1278	8	1	0.02163
B	0.54437	3.6839	12	37	0.001097
C	0.24082	11.499	4	145	3.90E-08
D	0.39268	12.155	5	94	4.31E-09

Cuadro 4. Análisis univariante de datos. Se muestran los resultados de las variables morfométricas que presentaron diferencias significativas con las pruebas *t=student* y Mann-Whitney, comparando las poblaciones por cada variable de manera independiente.

ESTRUCTURA	POBLACIONES μm		PRUEBA	p ($\alpha=0.05$)
	RÍO GUAYABO			
GAMETÓFITO				
Largo del talo ♀	(0.7-) 1 (-1.3) cm	<	(1-) 1.6 (-2.0) cm	t=-2.86 0.021
Ancho de células epidermales ♀	(22-) 30 (-39)	>	(17-) 25 (-38)	t= 2.81 0.0069
Ancho de células epidermales ♂	(21-) 34 (-55)	>	(17-) 27 (-43)	t= 3.2 0.0018
Ancho de cloroplastos ♀	(13-) 19 (-28)	<	(9-) 25 (-15)	t= 2.91 0.005
Ancho de cloroplastos ♂	(13-) 18 (-25)	>	(8-) 14 (-19)	t= 2.089 0.041
Largo de cloroplastos ♀	(14-) 22 (-29)	>	(11-) 19 (-28)	t= 4.37 6.50E-05
Largo de cloroplastos ♂	(14-) 22 (-35)	>	(13-) 20 (-28)	t= 2.178 0.0343

Ancho del pedúnculo del anteridio	(17-) 23(-30)	<	(15-) 26 (-34)	U= 1418	1.61E-07
Largo del pedúnculo del anteridio	(36-) 155 (-248)	>	(35-) 116 (-189)	t= 4.70	5.77E-06
Cantidad de anteridios por cámara anteridial	(31-) 58 (-105)	>	(21-) 44 (-74)	t= 2.22	0.03
EPORÓFITO					
Ancho de las esporas	(19-) 24 (-30)	<	(22-) 27 (-31)	t= -4.866	4.35E-06
Ancho de los estomas	(37-) 58 (-104)	>	(24-) 44 (-57)	t= 5.525	2.71E-07
Ancho del ostiolo del estoma	(-8) 13 (-21)	>	(4-) 10 (-18)	t= 4.668	9.64E-06
Ancho de células protectoras de los estomas	(14-) 24 (-48)	>	(12-) 18 (-24)	t= 3.45	8.19E-04
Largo de células protectoras de los estomas	(65-) 78 (-93)	>	(48-) 72 (-90)	U= 574	3.20E-06

DISCUSIÓN

Gametófito: *Leiosporoceros dussii* es dioico y forma colonias circulares de varios individuos que mueren desde la base, con diferentes etapas de desarrollo en la misma colonia (Villarreal & Renzaglia 2006). Estas colonias a menudo están conformadas sólo por individuos masculinos o mezclados individuos masculinos y femeninos. La morfología del talo es variable en tamaño y forma, cuando jóvenes los talos muestran una forma alargada con ápice dicotómico con dimensiones de (1.8-) 2.7 (-3.5) cm de largo en plantas femeninas y (1.7-) 2.2 (-3.2) cm de largo en plantas masculinas. A medida que la planta crece, la parte basal de ésta se desintegra quedando pequeñas rosetas que pueden medir de 0.8 - 1.7 cm de largo en plantas femeninas, en las que se desarrolla el esporófito, y 0.7 - 1.0 cm de largo en plantas masculinas. Estos resultados concuerdan con la descripción de Hässel de Menéndez (1986), quien describe el talo de *Leiosporoceros* como un talo en forma de roseta de

11-12 mm de ancho y borde lobado. Los talos jóvenes de las colonias de *Leiosporoceros* se encuentran en la periferia de la colonia. Otras especies de antocerotes como *Anthoceros agrestis* Paton y *Phaeoceros coralinianus* (Michx.) Prosk. muestran un crecimiento parecido, con fragmentación del talo en etapas avanzadas de desarrollo (Bissang 2003).

En la superficie del talo de *Leiosporoceros* se observaron múltiples células papiloides en la epidermis de ambos tipos de plantas. Estas son células papiloides, ya que no son proyecciones de las células, más bien es un grupo de células que se proyectan hacia el exterior del talo sobresaliendo de la capa de células epidermales. Estas células papiloides en la epidermis se observaron, tanto en plantas femeninas como en plantas masculinas. Este crecimiento irregular de células epidermales se ha reportado como excrecencias del talo (Hasegawa 1988) o crecimientos externos epidermales solo en plantas femeninas (Villarreal & Renzaglia 2006). Las células papiloides, observadas en *L. dussii*, en vista superficial son de forma cuadrada a hexagonal, algunas veces rectangulares (Fig. 1c).

Los anteridios de *L. dussii* tienen forma ovalada, de color amarillento a naranja cuando maduros con un ancho de (71-) 96 (-124) μm y (90-) 156 (-190) μm de largo. Otros géneros de baja productividad de anteridios (1-6), como *Phaeomegaceros* R.J. Duff, J.C. Villarreal, Cargill & Renzaglia, *Dendroceros* Nees, *Megaceros* Campb. y *Nothoceros* (R.M. Schust.) J. Haseg, presentan anteridios con dimensiones más grandes (García et al. 2012; Villarreal et al. 2007). Los anteridios de la población de Río Guayabo mostraron pedicelos más largos que la población de Río Indio, sin embargo, en la variable de ancho del pedicelo la población de Río Guayabo presentó pedicelos menos anchos que los de la población de Río Indio (**Fig. 3**). Los anteridios de *L. dussii* estudiados constan de un pedicelo de (16-) 24 (-34) μm de ancho y (37-) 134 (-220) μm de largo, pero en otros géneros de antocerotes de anteridios más grandes y con menos cantidad por cámara anteridial presentan pedicelos más cortos, por ejemplo, *Notothylas* (Cargill 2016) y *Nothoceros* (R.M. Schust.) J. Haseg. (Villarreal et al. 2007).

Esporófito: Las plantas de *L. dussii* estudiadas presentaron de 1 a 3 esporófitos por planta. Las cápsulas de las plantas de *L. dussii* poseen un diámetro de (257-) 498 (-590) μm lo cual concuerda con la descripción de Hässel de Menéndez (1986), quien señala que estas pueden tener hasta 0.5 mm de diámetro. Las valvas de las cápsulas abiertas midieron de (445-) 576 (-861) μm de ancho. El involucro de *L. dussii* está cubierto de células papiloides al igual que la epidermis y midió hasta 3 mm de largo, un poco más largo de lo mencionado en la descripción de Hässel de Menéndez (1986) con involucros de hasta 2.5 mm de largo. El tejido asimilativo de los esporófitos de las plantas estudiadas midió 139 – 187 μm de grosor, presentando de 6 – 8 capas de células.

Las esporas de las poblaciones de *Leiosporoceros* examinadas son de coloración amarilla y de forma ovaladas, pequeñas de unos (19-) 26 (-31) μm y poseen una cubierta lisa sin ninguna clase de ornamentación, lo cual concuerda con lo mencionado descrito por Hässel de Menéndez (1986). En los antocerotes se han reportado tamaños de esporas desde 18 μm en el género *Leiosporoceros* hasta más de 100 μm en las esporas del género *Dendroceros* (Villarreal & Renner 2013), siendo así uno de los antocerotes con esporas más pequeñas. La población de Río Indio posee esporas con dimensiones más grandes que las esporas de la población de Río Guayabo. Villarreal y Renner (2013), sugieren que el tamaño de las esporas podría estar ligado a la cantidad de esporas producidas, ya que producir esporas pequeñas implica un menor gasto energético y estas pueden ser producidas en un mayor número que las esporas grandes. De igual manera, es importante mencionar que, a pesar de presentar diferencias en el tamaño de las esporas y la cantidad de anteridios, Villarreal y Renner (2013) demostraron que no existe relación entre estas dos características en el grupo de los antocerotes.

Todas las medidas realizadas en los estomas mostraron diferencias al comparar las dos poblaciones. La población de río Guayabo mostró estomas más grandes que la población de Río Indio. Esta diferencia en las dimensiones de los estomas puede ser debido a variaciones en las condiciones ambientales de los dos sitios de estudios, ya que la población de Río Guayabo crece en áreas boscosas y en la población de Río Indio ocurre en un área abierta, expuesta al sol, lo que provoca un microclima más seco. El ancho de los estomas en *Leiosporoceros* fue de (-24) 51 (-104) μm y las células estomáticas son de 75 (-93) μm x 21 (-48) μm . De acuerdo con algunos estudios, *L. dussii* es uno de los

antocerotes con células estomáticas más grandes junto con *Phymatoceros bulbiculosus* (Brot.) Stotler, W.T. Doyle & Crand. -Stotl. (66.8 μm) y *Phaeoceros engelii* Cargill & Fuhrer (81.3 μm) (Renzaglia et al. 2017).

Comparación morfométrica de las poblaciones estudiadas: A pesar de que en el grupo A de variables morfométricas solo se obtuvo diferencias en la variable de largo del talo de plantas femeninas comparando entre las dos poblaciones en las pruebas de análisis independiente, el PCA de este grupo muestra una marcada diferencia de las dos poblaciones, especialmente en las variables de largo y ancho del talo separando de igual manera a las plantas por género (Fig. 4). Las variables contempladas en el Grupo B, correspondientes a las células del talo y los cloroplastos presentaron diferencias entre ellas, las cuales se muestran en la una marcada separación en la gráfica de biplot entre plantas femeninas y masculinas (Fig. 5). En las pruebas variables independientes se obtuvo diferencia específicamente en la variable ancho de células epidermales, en donde las plantas de la población de río Guayabo tuvieron células epidermales más anchas que las plantas de la población de Río Indio, tanto en plantas masculinas como femeninas. Los cloroplastos de *L. dussii* ocupan al menos la mitad del volumen celular. El tamaño de los cloroplastos de ambos tipos de plantas, masculinas y femeninas, estuvo entre un promedio de 20 – 21 μm . Según los resultados obtenidos, las plantas de la población de río Guayabo poseen cloroplastos más grandes que los de la población de Río Indio. Esta diferencia en el tamaño de los cloroplastos podría deberse, probablemente, a diferencias en la disponibilidad de luz solar en las dos poblaciones. El grupo C solo mostró diferencias en la cantidad de anteridios (Fig., 3 y 6). El PCA del grupo D muestra a la población de río Guayabo dividido en dos grupos, uno relacionado con la población de Río Indio y otro totalmente separado, mostrando una marcada diferencia entre las dimensiones de los estomas dentro de la población de Río Guayabo (Fig. 7).

Fig. 3. Comparación de la cantidad de anteridios entre las dos poblaciones. RG: Río Guayabo. RI: Río Indio. ($p= 0.03, \alpha = 0.05$)

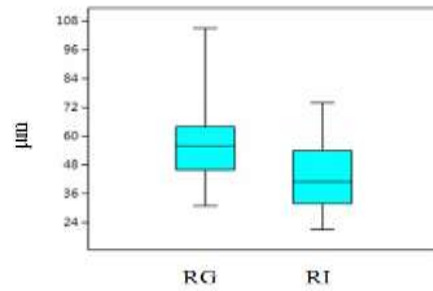


Fig. 4. Biplot de Análisis de Componentes Principales del Grupo A de Variables Morfométricas Comparando Las Dos Poblaciones Y Los Tipos De Plantas. Puntos: Población de Río Indio. Triángulos: Población de Río Guayabo. En rojo se agrupan las poblaciones estudiadas y el amarillo el género de las plantas. Ver detalle de variables en el Cuadro 2

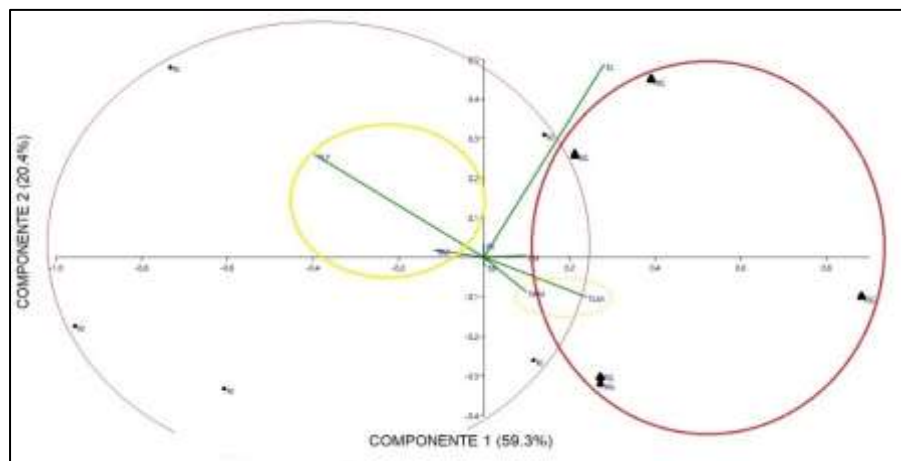


Fig. 5. Biplot de Análisis de Componentes Principales del Grupo B de Variables Morfométricas Comparando Las Dos Poblaciones Y Los Tipos De Plantas. Puntos: Población de Río Indio. Triángulos: Población de Río Guayabo. En rojo se agrupan las poblaciones estudiadas y el amarillo el género de las plantas. Ver detalle de variables en el Cuadro 2

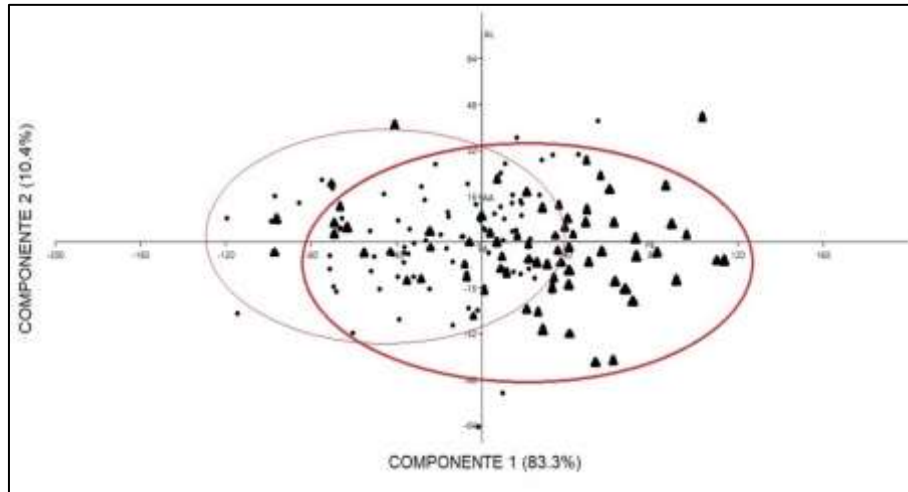


Fig. 6. Biplot de Análisis de Componentes Principales del Grupo C de Variables Morfométricas Comparando Las Poblaciones Estudiadas. Puntos: Población de Río Indio. Triángulos: Población de Río Guayabo. Se agrupan las poblaciones en rojo. Ver detalle de variables en el Cuadro 2

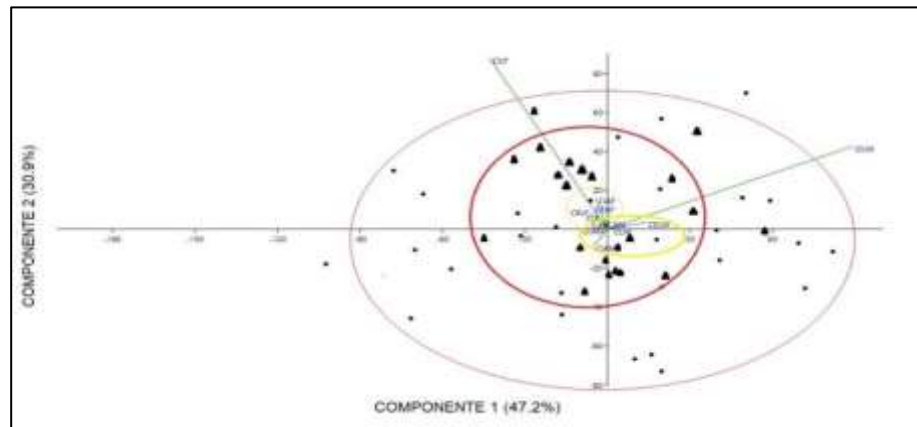
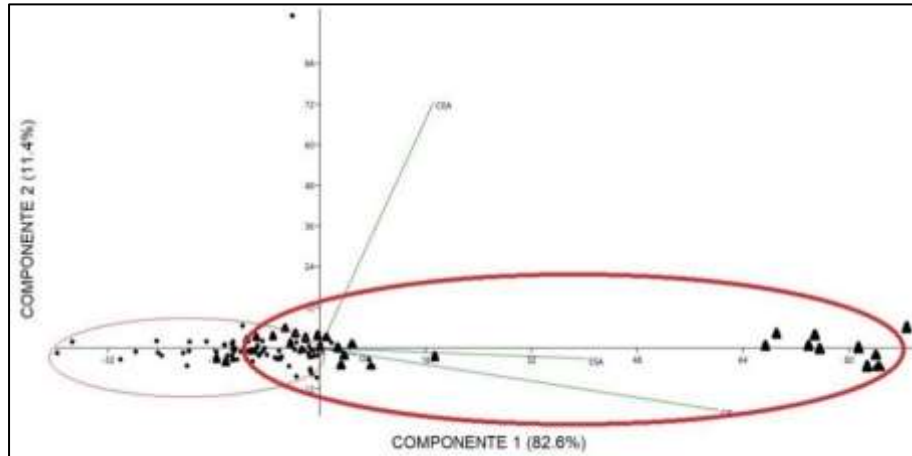


Fig. 7. Biplot de Análisis de Componentes Principales del Grupo D de Variables Morfométricas Comparando Las Poblaciones Estudiadas. Puntos: Población de Río Indio. Triángulos: Población de Río Guayabo. Se agrupan las poblaciones en rojo. Ver detalle de variables en el Cuadro 2



CONCLUSIÓN

Las dos poblaciones de *L. dussii* estudiadas presentaron diferencias comparando las variables morfométricas según las poblaciones y entre plantas masculinas y femeninas. No se presentaron suficientes evidencias para sugerir que estas diferencias sean debido a variaciones climáticas presentes en las poblaciones, por lo que se recomienda realizar estudios más extensos que incluyan otras poblaciones e integrar múltiples variables ambientales.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado por la Secretaría Nacional de Tecnología y Ciencias (SENACYT) y el Instituto de Investigaciones Tropicales Smithsonian (STRI). Se agradece a la Dra. Noris Salazar y al Lic. José Gudiño por su apoyo en el desarrollo de este proyecto. A Maycol Madrid, Keri Greig y Zarluis Mijango por su ayuda con los análisis estadísticos.

REFERENCIAS

Bissang, I. (2003). Population development, demographic structure, and life cycle aspects of two hornwort in Switzerland. *Lindbergia* 28:105-112. <http://www.jstor.org/stable/20150137> .

de Menéndez, G. G. H. (1986). Leiosporoceros Hässel n. gen. and Leiosporocerotaceae Hässel n. fam. of Anthocerotopsida. *Journal of bryology* 14: 255-259. <https://doi.org/10.1179/jbr.1986.14.2.255>

Evert, RF (2006). Anatomía vegetal de Esaú: meristemos, células y tejidos del cuerpo vegetal: su estructura, función y desarrollo. John Wiley & Sons.

Garcia, C., Sérgio, C., Villarreal, J. C., Sim-Sim, M., & Lara, F. (2012). The hornworts *Dendroceros* Nees and *Megaceros* Campb. in São Tomé e Príncipe (Africa, Gulf of Guinea) with the description of *Dendroceros paivae* sp. nov. *Cryptogamie, Bryologie*, 33: 3-21. <https://doi.org/10.7872/cryb.v33.iss1.2012.003>

Hasegawa, J. (1988). A proposal for a new system of the Anthocerotae, with a revision of the genera. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 64: 87-95.

Kenrick, P. & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389: 33-39. <https://ci.nii.ac.jp/naid/40005331350>

Konrat, M., Shaw, J. & Renzaglia, K. S. (2010). A special issue of *Phytotaxa* dedicated to Bryophytes: The closest living. *Phytotaxa* 9: 5-10. <https://www.biotaxa.org/Phytotaxa/article/viewFile/phytotaxa.9.1.3/8692>

Magill, R. (2010). Moss Diversity: new look at old numbers. *Phytotaxa* 9: 167–174. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.9.1.9>

One Thousand Plant Transcriptomes Initiative. (2019). One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. *Nature*, 574(7780), 679. <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1693-2>

- Pressel, S., Goral, T. & Duckett, J. G. (2014). Stomatal differentiation and abnormal stomata in hornworts. *Journal of Bryology*, 36: 87-103. <https://doi.org/10.1179/1743282014Y.0000000103>
- Renzaglia, K. S., Villarreal, J. C., Piatkowski, B. T., Lucas, J. R., & Merced, A. (2017). Hornwort stomata: architecture and fate shared with 400-million-year-old fossil plants without leaves. *Plant Physiology*, 174(2), 788-797. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00156>
- Stephani, F. (1893). *Hepaticarum Species novae. II. Hedwigia* 32, 137-147.
- Stephani, F. (1912-1917). *Species Hepaticarum*, 5, Geneve et Bale.
- Team, R. C. (2018). R v3. 5.1 R: a language and environment for statistical computing. R Core Team, Vienna, Austria.
- Vaughn, K. C., Campbell, E. O., Hasegawa, J., Owen, H. A. & Renzaglia, K. S. (1990). The pyrenoid is the site of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase accumulation in the hornwort (Bryophyta: Anthocerotae) chloroplast. *Protoplasma*. 156, 117. <https://doi.org/10.1007/BF01560650>
- Villarreal, J.C. & Renzaglia, K.S. (2006). Structure and development of *Nostoc* strands in *Leiosporoceros dussii* (Anthocerotophyta): A novel symbiosis in land plants. *American Journal of Botany*. 93, 693–705. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.5.693>
- Villarreal, J. C., Menéndez, G. H. D., & Allen, N. S. (2007). *Nothoceros superbus* (Dendrocerotaceae), a new hornwort from Costa Rica. *The Bryologist*. 110, 279-285. <https://www.jstor.org/stable/20110857>
- Villarreal, J. C., Cargill, C., Hagborg, A., Söderström, L. & Renzaglia, K. (2010). A synthesis of hornwort diversity: Patterns, causes and future work. *Phytotaxa*. 9, 150–166. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.9.1.8>
- Villarreal, JC, Renner, SS Correlación de monoicidad y dióicidad en hornworts, el grupo hermano aparente de las plantas vasculares. *BMC Evol Biol* 13, 239 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-239>

Villarreal, J.C. & Renzaglia, K. S. (2015). The hornworts: important advancements in early land plant evolution. *Journal of Bryology*. 37: 3, 157-170. <https://doi.org/10.1179/1743282015Y.0000000016>

Von Konrat, M., Soderstrom, L., Renner, M. A., Hagborg, A., Briscoe, L. & Engel, J. J. (2014). Early Land Plants Today (ELPT): How many liverwort species are there? *Phytotaxa*. 9, 22-40. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.9.1.5>