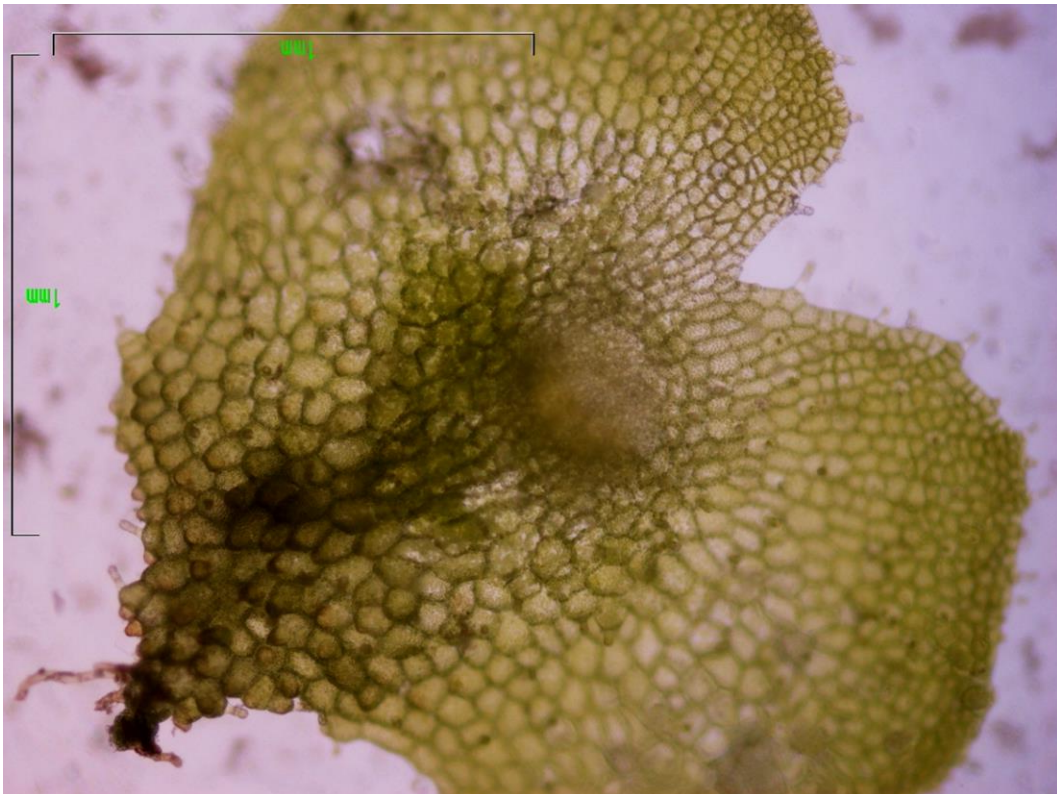




Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Morfogénesis en el helecho apogámico *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*



Paula Conde Silos
20 de Julio de 2017

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Morfogénesis en el helecho apogámico
Dryopteris affinis ssp. *affinis*

Morphogenesis in the apogamous fern
Dryopteris affinis ssp. *affinis*

Paula Conde Silos

Firma

Elena María Fernández González

Firma

Resumen

Dryopteris affinis spp. *affinis* es un helecho diploide con un ciclo de vida apomíctico que forma órganos reproductores masculinos pero no femeninos, sin que sea posible una reproducción sexual. La apogamia en helechos es fácil de observar y el estudio de los gametófitos de helechos apogámicos puede ser útil para profundizar en la embriogénesis asexual, proceso especialmente importante en la producción de especies de cultivo. Este estudio se centra en analizar el efecto de determinadas fitohormonas (ácido naftalenacético, ácido indolbutírico, 6-benciladenina, ácido giberélico y ácido abscísico) e inhibidores de fitohormonas (ácido 2,3,5-triidobenzoico y ciclohexilamina) sobre el desarrollo vegetativo y la respuesta apogámica, en cultivos homogeneizados de gametofito y esporofito de la especie *D. affinis* spp. *affinis*.

Abstrac

Dryopteris affinis spp. *affinis* is a diploid fern with an apomictic life cycle that forms male reproductive organs but not feminine, without a possible sexual reproduction. The apogamy in ferns is easy to observe and the study of gametophytes of apogamic ferns can be useful to deep in the asexual embryogenesis, process, especially important in the production of crop species. This study focuses on the effect of phytohormones (naphthaleneacetic acid, indolebutyric acid, 6-benzyladenine, acid-giberiberelic and abscisic acid) and inhibitors of phytohormones (2,3,5-triidobenzoic acid and cyclohexylamine) on vegetative development and apogamic response, in homogenized gametophytic and sporophytic cultures, of the species *D. affinis* spp. *affinis*.

ABREVIATURAS:

ABA: ácido abscísico

ANA: ácido naftalenacético

BA: 6-bencilaminopurina

CHA: ciclohexilamina

GA3: ácido giberélico

IBA: ácido Indol-3-butírico

MS: Murashige and Skoog médium (1962)

TIBA: ácido 2,3,5-triidobenzoico

Índice

1. INTRODUCCIÓN	6
Antecedentes y objetivo del trabajo.....	7
2. MATERIAL Y MÉTODOS	12
2.1. Recolección de esporas.....	12
2.2. Asepsia de esporas	13
2.3. Preparación del medio de cultivo.....	13
2.4. Cultivo de esporas	13
2.5. Cultivos homogeneizados	13
2.6. Análisis microscópico.....	14
2.7. Análisis Estadístico.....	15
3. RESULTADOS.....	16
3.1. Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de regeneración en los cultivos homogeneizados.....	16
3.2. Efecto del medio de cultivo sobre el morfotipo en los cultivos homogeneizados.....	17
3.3. Efecto del medio de cultivo sobre la tasa largo/ancho (L/A) del gametófito en los cultivos homogeneizados	18
3.4. Efecto del medio de cultivo sobre la formación de embriones apogámicos en los cultivos homogeneizados	18
3.5. Efecto del medio de cultivo sobre el tamaño del embrión apogámico.....	19
3.6. Efecto del medio de cultivo en esporófitos homogeneizados	19
4. DISCUSIÓN.....	23
5. CONCLUSIONES.....	26
Bibliografía.....	27

1. INTRODUCCIÓN

Los helechos constituyen el grupo más evolucionado de plantas vasculares sin flores y sin semillas. Surgieron hace más de 300 millones de años, desde entonces han alcanzado una gran diversificación y han ocupado un gran número de hábitats diferentes (Díaz TE *et al.* 2004). Su valor comercial se basa en las características ornamentales del esporófito, siendo cultivados tanto *ex vitro* como *in vitro*, con el fin, en este último caso, de mejorar su producción (Hartman y Zettler, 1986).

Durante su ciclo de vida, los helechos pasan por dos fases o generaciones distintas: el gametófito o productor de gametos y el esporófito o productor de esporas. La transición entre ambos coincide con la fertilización y la esporogénesis. La generación dominante es la esporofítica, representada por la planta provista de raíces, tallo y hojas (cormo); es una fase más compleja y de mayor tamaño. La generación gametofítica es fisiológicamente independiente de la esporofítica, más simple y de menor tamaño, y recibe el nombre de protalo. El protalo es un talo verdoso de apenas unos centímetros y de vida efímera, que se fija al sustrato por rizoides unicelulares presentes su cara ventral. Su desarrollo describe diferentes morfologías: filamento, espátula y finalmente corazón. El gametofito tiene como función principal la de formar los órganos sexuales, anteridios y arquegonios, productores de gametos. La reproducción sexual es primitiva, necesitando que el protalo se encuentre en un medio con agua para que los anterozoides puedan desplazarse y fecundar a la ovocélula, dando origen a un embrión que marcará el comienzo del desarrollo de un nuevo esporófito (Fig. 1) (Fernández y Revilla, 2003; Díaz *et al.*, 2004). Sin embargo, la formación del esporófito puede darse de forma asexual, a partir de células somáticas, sin intervención alguna de los órganos sexuales, mediante un proceso apogámico (Sheffield y Bell, 1987; Menéndez *et al.*, 2006a).

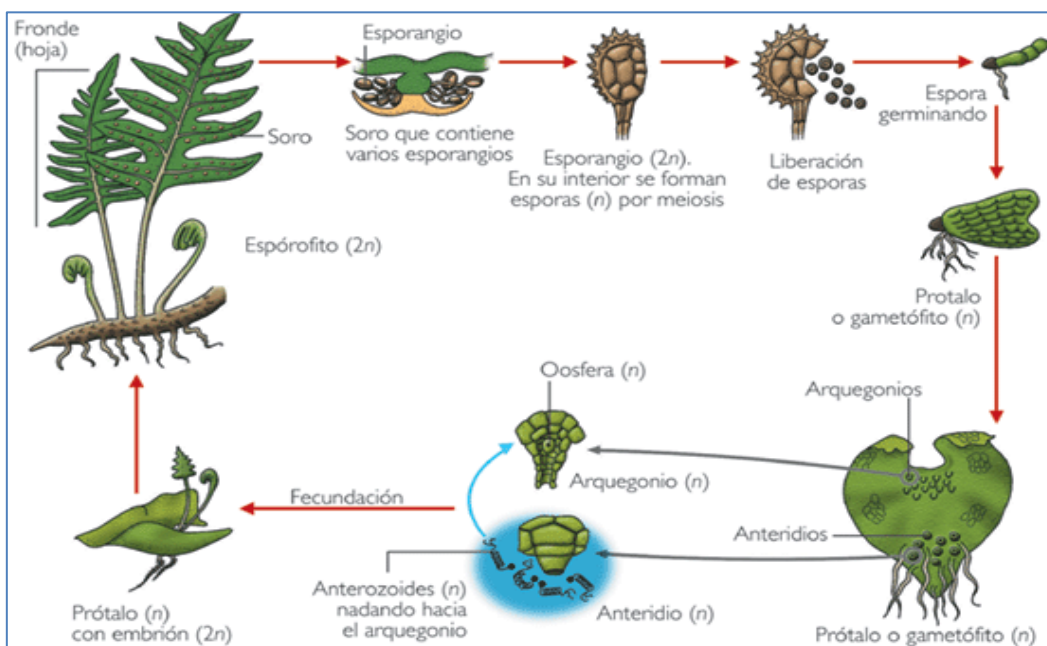


Figura 1. Ciclo de vida de los helechos

Antecedentes y objetivo del trabajo

La reproducción sexual genera una nueva identidad genética, combinando el material genético de dos individuos parentales. Por el contrario, la reproducción asexual se limita a mantener mayormente las características del progenitor. La mayoría de las angiospermas se reproducen sexualmente a través de semillas. Para ello, una sola célula generativa se convertirá en la célula madre de las megasporas, experimentando un proceso meiótico, tras el cual se formarán cuatro megasporas haploides. De éstas, solo una sobrevive, ya que el resto sufrirá una muerte celular programada. La megaspóra funcional elongará y el núcleo se dividirá mitóticamente tres veces, dando lugar a un gametofito compuesto de siete células: dos sinérgidas, la célula huevo, la célula central binucleada o núcleos polares, y tres antípodas (Rodríguez-Leal y Vielle-Calzada, 2012).

Aparte de la formación de semillas tras producirse la fecundación sexual, es posible que la formación de un embrión obedezca a mecanismos asexuales, denominándose apomixis. La apomixis puede ser esporofítica y gametofítica. En la apomixis esporofítica, se forman embriones directamente a partir de tejidos nucelares o de los integumentos internos, del óvulo no fecundado. En especies que desarrollan endospermo, éste proviene de fusión de la célula espermática del gametofito masculino con los núcleos polares. Las plantas apomícticas también pueden formar embriones a partir de gametofitos femeninos (apomeiosis) no reducidos cromosómicamente, en los que la célula huevo evoluciona hasta formar un embrión diploide por partenogénesis (apomixis gametofítica), puede ser de dos tipos: aposporia y diplosporia. En la aposporia, el embrión y el endospermo se desarrollan en el saco embrionario no reducido, en el interior del óvulo. En este caso, la célula madre de la megaspóra comienza a desarrollarse, pero en algún momento éste se detiene, y una o más células somáticas de los tejidos del óvulo (nucelares o de los integumentos) comienzan a formar un saco embrionario diploide. La aposporia es el mecanismo más común en plantas superiores y ha sido descrito en especies de los géneros *Beta*, *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Chloris*, *Compositae*, *Eriochloa*, *Heteropogon*, *Hieracium*, *Hyparrhenia*, *Hypericum*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Poaceae*, *Ranunculus*, *Sorghum*, *Themeda* y *Androchloa* (Barcaccia y Albertini, 2013). En la diplosporia, el embrión se desarrolla a partir de la célula madre de megaspóra, que tras sufrir una alteración bien en el proceso reduccional o en el mitótico, formará un saco embrionario diploide, cuya célula huevo acabará formando un embrión también diploide. La diplosporia ha sido observada en especies de los géneros *Tripsacum*, *Eragrostis*, y *Taraxacum* (Kandemir y Saygili, 2015). La formación del endospermo seguiría siendo dependiente de la fecundación de la célula central (pseudogamia) (Rodríguez-Leal y Vielle-Calzada, 2012; Kandemir y Saygili, 2015). La observación de la apomixis es difícil ya que generalmente se acompaña de reproducción sexual, llamándose por tanto apomixis facultativa (Kandemir y Saygili, 2015).

En los helechos, la apomixis es un modo importante de reproducción asexual (Döpp, 1939; Manton, 1950), que ha evolucionado varias veces independientemente (Ekt y Koutecký, 2016) produciéndose con una frecuencia de al menos un 3%, un valor mucho más alto que en el resto de grupos de plantas. Sin embargo, la mayoría de las especies de helechos apomícticos se concentran en sólo cuatro familias (Liu *et al.*, 2012). La apomixis en helechos incluye la apogamia, es decir, la formación de

esporofitos a partir de células somáticas del protalo o gametofito; y la agamosporia (o diplosporia), la producción de (diplo)esporas no reducidas. La apogamia no se da en angiospermas salvo *in vitro*, a través de los procesos de ginogénesis y androgénesis (Yang y Zhou, 1982). En cuanto al proceso de agamosporia o diplosporia, cabe decir que al contrario de los que ocurre en especies de helechos sexuales, en las que la célula madre de la megáspora sufre cuatro mitosis, dando lugar a 16 células madre de esporas, que tras sufrir meiosis, formarán 64 esporas haploides, distribuidas en 16 tétradas (Ekr y Koutecký, 2016), en el tipo predominante de agamosporia, la última mitosis premeiótica falla, dando lugar a ocho células madre de esporas que sufren meiosis regulares, produciendo 32 diplosporas en ocho tétradas (Manton, 1950). Algunas veces la primera división meiótica falla, lo que resulta en 32 diplosporas en 16 diadas (Braithwaite, 1964). Se ha documentado la variación genética entre progenitores apomícticos (Peredo et al., 2013).

La apogamia puede ser inducida *in vitro* por factores exógenos como carbohidratos, el potencial osmótico del medio y reguladores del crecimiento como etileno, auxinas (Whittier y Steeves 1960; Whittier y Steeves 1962; Whittier, 1966; Fernández *et al.*, 1996; Cordle *et al.*, 2007; Cordle *et al.*, 2010)

Los procesos anteriormente descritos de apomixis esporofítica y apomixis gametofítica, en su variante aposporea o diplosporea, conducen a la formación de semillas clonales, (si bien no siempre se forma el tejido de reserva), permitiendo la fijación de genotipos deseables, como el de híbridos, representando un enorme potencial en la mejora de plantas y tal vez grandes avances en la agricultura (Grossniklaus, 1998). Estudios realizados en angiospermas apuntan a que las vías sexuales y apomícticas compartan perfiles de expresión génica y características reguladoras moleculares comunes (Grossniklaus *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2003). Sin embargo, a día de hoy, aún se ignora cómo se induce la apomixis en plantas (Cordle et al., 2010).

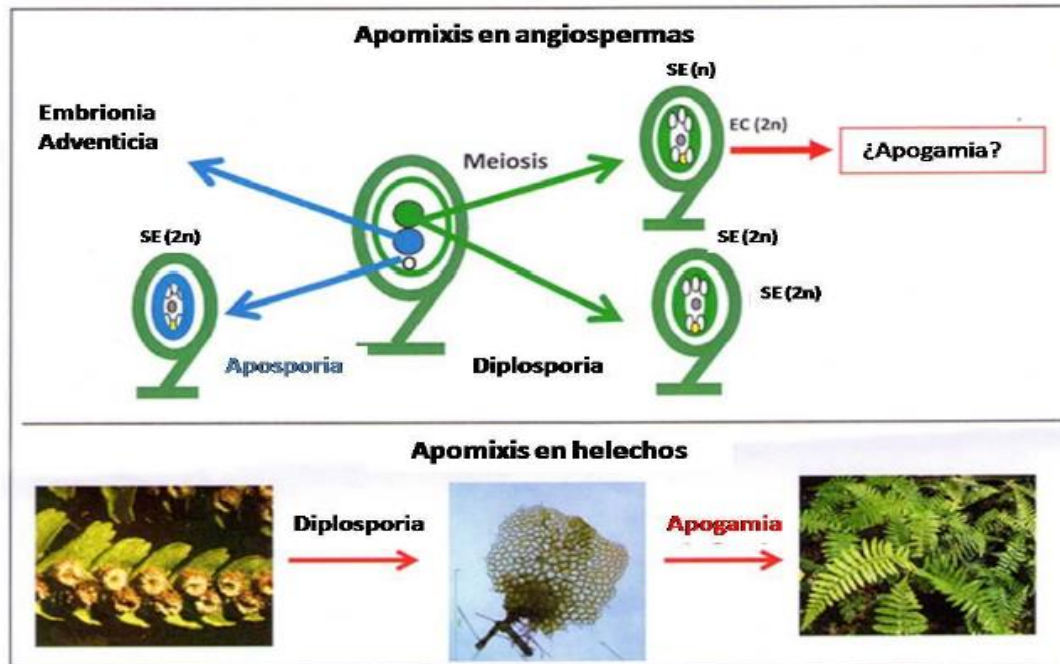


Figura 2. Apomixis en angiospermas y en helechos (Tomado de Grossmann et al., 2017)

Un ejemplo de apogamia obligada lo representa la especie *Dryopteris affinis* ssp. *affinis* (Fig. 3.). Es un helecho diploide con un ciclo de vida apomítico que se originó del cruce de *D. oreades* y algún antecesor sexual de las especies *D. walichianao*, *D. caucásica*. Está ampliamente distribuido en las regiones del Mediterráneo, Macaronesia y Oeste de Eurosiberia y su clasificación según Christenhusz *et al.*, 2011 es la siguiente:

División: STREPTOPHYTA

Subdivisión: PTERIDOPHYTINA (Monilofitos)

Clase: POLYPODIOPSIDA (Leptosporangiados)

Orden: POLYPODIALES

Familia: DRYOPTERIDACEAE

Subfamilia: Dryopteridoceae

Género: *Dryopteris*

Especie: *affinis*.

Subespecie: *affinis*

Debido a que el gametófito de esta subespecie forma órganos reproductores masculinos pero no femeninos, se produce la apogamia sin que sea posible la reproducción sexual. Cuando el gametofito alcanza el estado de desarrollo acorazonado, se observa, cerca de la escotadura apical, una zona meristemática, de células pequeñas e isodiamétricas, de color marrón oscuro, que originan un embrión (Fig. 4) (Menéndez *et al.*, 2006).



Figura 3. Ejemplar de *Dyopteris affinis ssp.affinis* obtenido mediante cultivo in vitro



Figura 4. Gametófito acorazonado con embrión

Otro aspecto a destacar en el gametofito de los helechos es su gran capacidad de regeneración (Miller, 1968; Knauss, 1976; Cooke, 1979; Finnie and van Staden, 1987; Fernández et al. 1993; Fernández y Revilla, 2003; Somer et al 2009). Las plantas exhiben un alto grado de plasticidad en su desarrollo y muestran diferentes tipos de regeneración de tejidos y órganos. La regeneración puede ir desde la reparación de una pequeña amputación hasta la formación de nuevos órganos o individuos (Birnbbaum y Sanchez Alvarado, 2008). Esta capacidad de regeneración puede mejorarse mediante el suministro exógeno en cultivo *in vitro* de hormonas vegetales, demostrando que las células vegetales diferenciadas contienen toda la información genética necesaria para el desarrollo de una planta completa (Skoog y Miller, 1956; Whittier, 1996). En el caso de los helechos, su capacidad de regeneración se hace especialmente visible en los cultivos homogeneizados del gametofito, obtenidos a partir de tejido triturado mecánicamente, reduciéndolos a pequeños grupos de células que son cultivados en medio sólido o líquido, y que son capaces de proliferar hasta regenerar un individuo completo (gametofito o esporofito)(Fernández y Revilla, 2003; Knauss, 1976)

Las hormonas vegetales son sustancias que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas en concentraciones muy bajas. Entre ellas encontramos sustancias promotoras del desarrollo como auxinas, citoquininas, giberelinas, etc. y otras que tienen un papel inhibitor como el ácido abscísico. Tanto auxinas como citoquininas, participan en procesos celulares como elongación y división celular, organogénesis, embriogénesis, etc. (Taiz y Zeiger, 2015; González-Santos *et al.*, 2009) habiendo sido relacionados también con el desarrollo del embrión y el desarrollo vegetativo, del gametófito del helecho (Menéndez et al.,2006b, Menéndez et al 2009; Grossmann, 2017).

Estudios genéticos y fisiológicos han revelado que las auxinas, controlan los aspectos centrales del desarrollo de las plantas. Desencadenan el crecimiento y la diferenciación de tejidos en los lugares donde se acumulan, actuando como un activador de la morfogénesis. Generalmente la auxina en concentraciones bajas aumenta el tamaño del talo, rompe la latencia de las yemas, produce la formación de meristemas adicionales y confiere dominancia apical. En concentraciones más altas, promueve la formación de rizoides y un aumento adicional en la concentración da lugar a la formación de un tejido de tipo callo con crecimiento limitado. Al estudiar la respuesta a auxina en *Marchantia polymorpha*, se observó que la auxina es facilitador más que un determinante del destino celular, siendo necesaria en las transiciones de desarrollo durante el desarrollo del gametofito (Flores-Sandoval *et al.* 2015). Existe una relación entre las auxinas y las citoquininas que se refleja en la interrelación de la señalización de la auxina con la vía de la citoquinina, también se ha demostrado que la señalización de la citoquinina desempeña un papel en el desarrollo de la línea germinal (Schmidt *et al.*, 2015).

Las citoquininas, como se dijo anteriormente, están relacionadas con el desarrollo vegetativo y embrionario en el gametofito. Algunos de los efectos de las citoquininas en helechos, son: inducir el crecimiento y desarrollo de los órganos sexuales (Menéndez *et al.* 2009), inducir la formación de esporófitos a partir de rizomas homogeneizados (Fernández *et al.* 1997) y provocar hinchazón en los rizomas de los esporófitos. El efecto de la citoquina BA en cultivos homogeneizados de esporofito, gametofito o agregados celulares desdiferenciados varía entre las especies. En *Adiantum capillus-veneris*, induce la formación de gametófitos y agregados celulares, y su ausencia favorece la regeneración de esporofitos. Por el contrario, en *Adiantum adiantum-nigrum*, BA promueve la regeneración tanto de gametófitos como de esporofitos (Sommer *et al.* 2009; Bertrand *et al.* 1999). Otros estudios indican que en una concentración 4,4 μM y 4,43 μM junto con ANA en concentración 0,53 μM , BA induce callo en gametófitos tanto triturados como en medio sólido (Menéndez *et al.*, 2006; Fernández, 1996). Gracias a sus efectos en morfogénesis, pueden ser útiles a la hora de lograr su multiplicación, como en el caso del helecho *Adiantum capillus-veneris*, donde se desarrolló un eficiente sistema de regeneración *in vitro* a través de embriogénesis somática utilizando bajas concentraciones de BA, en el que se obtuvieron brotes adventicios, cuerpos globulares y callos (Li *et al.* 2017).

El ácido abscísico actúa como antagonista de auxinas, citoquininas y giberelinas inhibiendo el desarrollo vegetativo, también tiene efecto sobre la embriogénesis (Taiz y Zeiger, 2015). BA está presente en los tejidos gametofíticos, tanto esporas como en filamentos (Cheng y Schraudolf, 1974; Bürcky, 1977). La adición exógena de ABA influye sobre el desarrollo del gametofito. En estudios realizados en la especie *Blechnum spicant* L. se demostró que un aporte exógeno de BA en una concentración 3,7 μM favorecía la formación de anteridios (Menéndez *et al.*, 2006). ABA también inhibe la elongación de los filamentos en *Mohria caffrorum* y la formación de gametofitos desde explantos no meristemáticos en *Anemia phyllitidis* (Chia y Raghavan, 1982; Hickok, 1983).

A las giberelinas se les atribuye un papel en la formación de órganos sexuales ya que se las ha asociado a los anteridiógenos, mensajeros químicos que controlan el inicio de la formación de los anteridios en gametófitos jóvenes, por tener una

naturaleza química similar. El ácido giberélico o GA₃, a diferencia de otras giberelinas, no tiene un efecto en el desarrollo de órganos sexuales por ejemplo en *Blechnum spicant*. (Fernández *et al.*, 1999; Menéndez, Revilla, *et al.*, 2006). Pero si se le atribuye un efecto de elongación en el gametófito relacionado con la expansión celular (Kumar *et al.*, 2011). GA₃ induce geminación en oscuridad y formación de anteridios en *Lygodium* (Sugay *et al.*, 1987).

TIBA es un inhibidor del transporte de las auxinas. Evita que las auxinas, las cuales se sintetizan principalmente en los meristemos apicales, se redistribuyan a lo largo de la planta. Los gradientes de auxina determinan la diferenciación de órganos y las tasas de elongación y su distribución es facilitada por un sistema polar de transporte de auxina en el caso de *Arabidopsis thaliana*, el cual conlleva un transporte de tipo uniporte de auxina-anión y que es inhibido eficientemente por TIBA (Lee and Seo 2014). En gametófitos de *D. affinis* spp. *affinis* se han identificado proteínas implicadas en el transporte de auxinas que señalan la existencia de un sistema de transporte en este estado de desarrollo (Grossmann *et al.* 2017).

Finalmente, CHA es un inhibidor de la poliamina espermidina. Las poliaminas se producen naturalmente y juegan un papel clave en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cetin *et al.* 2000). La síntesis de espermidina ha sido considerada esencial para el desarrollo embrionario en *Arabidopsis* y en embriogénesis somática (De-la-peña *et al.*, 2009; Dutra *et al.*, 2013). La espermidina desempeña un papel clave como determinante morfogénico durante el desarrollo de espermatidas en el helecho de agua *Marsilea vestita* (Deeb *et al.* 2010). En condiciones de estrés se observó un incremento notorio de los genes relacionados con la biosíntesis de la poliamina espermidina, y el catabolismo del precursor arginina, lo que demuestra el papel de las poliaminas en la protección de las plantas (Boucherau *et al.*, 2007; Kuznetsov y Shevyakova, 2007). La biosíntesis de poliamina y el metabolismo de la espermidina han sido identificados como eventos activados al inicio de la apomixis en *Boechera gunnisoniana* (Schmidt *et al.*, 2014).

El **objetivo** de este trabajo será analizar el efecto de determinados reguladores del desarrollo, como algunos balances auxina/citoquina, ácido giberélico (GA₃), ácido abscísico, y otros compuestos asociados como el inhibidor del transporte de auxinas TIBA y el inhibidor de la síntesis de poliaminas ciclohexilamina (CHA), sobre el desarrollo vegetativo y la respuesta apogámica, en gametofitos obtenidos a partir de explantos de tejido gametofítico, o esporofítico, (solo con algunos tratamientos), de la especie *D. affinis* spp. *affinis*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Recolección de esporas

En este trabajo se utilizaron esporas de *D. affinis* ssp. *affinis* que fueron recolectadas a partir de esporófitos maduros procedentes del Valle de Turón (Asturias, España), coordenadas 43° 12' N y 5° 43' W. Estas esporas fueron conservadas en viales y almacenadas en cámara fría (Creax) a 4°C hasta el momento de su uso.

Previamente, se eliminó la humedad de las frondes colocándolas entre hojas de papel y se dejaron en un ambiente seco. Una vez secas las frondes, esporas y esporangios fueron tamizados para separarlos del resto de materiales vegetales.

2.2. Asepsia de esporas

Estas esporas han de pasar por un proceso de asepsia antes de que pueda llevarse a cabo su cultivo *in vitro*, eliminando con ello posibles microorganismos que puedan estar presentes en su superficie y contaminar el cultivo. A continuación, se pesaron 10 mg de esporas, se embebieron en agua durante 30 minutos en un tubo Falcon de 50 ml., y posteriormente, se centrifugaron durante 3 minutos a 2300 rpm en una centrífuga Centaur 2 de MSE. A continuación, ya en la cámara de flujo (Telstar, BH-100), se decanta el agua y se realiza un primer lavado con lejía con una concentración de hipoclorito de sodio de 5 g/L, durante 10 minutos, y posteriormente se realizaron tres lavados con agua Mili-Q estéril para eliminar los restos de lejía, de 10 min. cada uno. Para proceder a los cambios de solución, se centrifugaban las esporas 3 minutos (Fernández y Revilla, 2003).

2.3. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), al que se añadió sacarosa 29 mM, como fuente de carbono. El pH se ajustó a un valor de 5,8 con NaOH o HCl 1N o 0,1 N. Para el cultivo de esporas y esporófitos se utilizó medio semisólido, añadiendo 8 g/L agar Duchefa Plant Agar P1001, y medio líquido para los cultivos homogeneizados. Para preparar el medio semisólido, se disolvió el agar en el autoclave a 120 °C de temperatura y una presión 202,6 Pa, dispensando posteriormente 20 mL. del medio en tarros de vidrio de 100 mL. Por su parte, 100 mL. de medio líquido fue distribuido en matraces de 500 mL. Tanto el medio de cultivo como el instrumental fueron esterilizados en el autoclave en las condiciones mencionadas anteriormente y durante 20 minutos. Una vez enfriado el medio, se procedió a realizar el cultivo *in vitro* de las esporas o de los homogeneizados de gametófito.

2.4. Cultivo de esporas

Tras realizar la asepsia de las esporas y una vez preparado el medio de cultivo, como ya se dijo anteriormente, se inocularon 2 mL de agua y 1 mL de la solución de esporas en tarros de vidrio que contenían medio MS. Se realizó un recuento de esporas, utilizando el microscopio óptico (Nikon Eclipse E-600) y una cámara Fusch-Rosenthal (Brand) para determinar la densidad de esporas por cm² inoculada en cada tarro de vidrio. Las esporas se cultivaron en una cámara de crecimiento (Creax-Ibercex), con un fotoperiodo de 16 horas, una intensidad lumínica estándar de 70 μ moles de fotones m⁻²s⁻¹, y una temperatura de 25 °C durante dos meses y una vez transcurrido este tiempo, los gametofitos desarrollados fueron utilizados para realizar los cultivos homogeneizados.

2.5. Cultivos homogeneizados

Se realizaron cultivos homogeneizados de gametófito y de esporófito por separado. Los homogeneizados de gametófito se realizaron con gametófitos de dos meses, los de esporófito con esporófitos juveniles de nueve meses.

En los cultivos de gametófito se pesaron entre 0,1 y 0,25 g de gametófitos y en los de esporófito entre 0,2 y ,04 g de esporófito, en función del volumen del medio de cultivo. Para ello, y siempre trabajando en una campana de flujo laminar, se introdujo el material vegetal en un tubo de vidrio de 50 mL. junto con 3 ml de agua, y se trituró con un homogeneizador (Ultra-Turrax T 25 Basic) durante 15 segundos a 9.500 rpm. Posteriormente, se introdujeron en el matraz con medio líquido, recogiendo asimismo el tejido remanente con 2 ml de agua que también se añadieron al medio. El medio líquido utilizado fue siempre el medio MS mencionado anteriormente, (Murashige y Skoog 1962) al que se añadieron determinadas fitohormonas e inhibidores, a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

	Tratamientos (μM)			
Balance auxina/citoquinina	0,53 ANA + 4,43 BA	2,69 ANA + 2,21 BA	5,37 ANA + 0,44 BA	
	0,49 IBA + 4,43 BA	2,46 IBA + 2,21 BA	0,49 IBA + 4,43 BA	
Otros fitorreguladores e Inhibidores	5,04 CHA	2,88 GA3	2 TIBA	3,78 ABA
	1 CHA	1,44 GA3	1 TIBA	1,89 ABA

Tabla 1. Concentraciones de promotores del desarrollo e inhibidores, añadidos al medio de cultivo de tejido homogeneizado de *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*.

Los homogeneizados de esporofito, se cultivaron en medio MS sólido al que se incorporó un balance auxina/citoquinina de ANA y BA, en las tres concentraciones indicadas en la tabla 1.

Una vez preparados los cultivos, estos se colocaron en un agitador orbital, y se mantuvieron en las mismas condiciones que los cultivos de esporas.

2.6. Análisis microscópico

Muestras de material vegetal tomadas de los cultivos homogeneizado fueron observadas en fresco al microscopio óptico (Nikon Eclipse E-600) y en el caso de que fueran de mayor tamaño, con una lupa (Nikon, SMZ-U) transcurridos entre 50 y 60 días. Los datos recogidos se basaron en parámetros relativos a regeneración, desarrollo vegetativo y al proceso apogámico, del gametofito de *D. affinis* ssp. *affinis*, como se indica a continuación:

- Frecuencia de explantos regenerados.
- Frecuencia de morfotipos (filamento, espátula o corazón).
- Tasa longitud/anchura del gametofito
- Frecuencia de apogamia.
- Tamaño y estado de desarrollo del embrión apogámico (mancha o botón).

En relación al estado de desarrollo del embrión, se distingue entre mancha, indicativo de que este se encuentra en un estadio inicial del desarrollo, es decir, se encuentra reducido a un centro organizador bidimensional, y botón, que es un estadio de desarrollo más avanzado, donde el embrión ya presenta un volumen y tridimensionalidad.

Para valorar el morfotipo se tomaron al azar 100 individuos de cada tratamiento mientras que para determinar el tamaño y estado de desarrollo del embrión, se tomaron datos en aproximadamente 50 gametófitos con forma de corazón (estadio en el que normalmente se forma el embrión), si bien en algunos casos se tomaron espátulas porque el tratamiento aceleraba la respuesta apogámica.

2.7. Análisis Estadístico

Una vez tomados los datos, se realizó un análisis estadístico de los mismos. Para los datos no paramétricos como la frecuencia de regeneración, morfotipo y el número de embriones apogámicos se utilizó el test Chi-cuadrado (χ^2). Para los paramétricos, es decir, la tasa longitud/anchura y el tamaño del embrión, se usó un análisis de la varianza ANOVA y unas pruebas *ad hoc*, mediante los test de Levene y Bartlett para la homogeneidad de varianzas, y Shaphiro-Wilk para la normalidad. Los datos se transformaron en logaritmos para evitar que pudieran no estar siguiendo una distribución normal. En los casos en los que no exista igualdad entre los tratamientos en un test ANOVA, utilizamos las pruebas *post hoc* de Tukey-Bonferroni y Duncan, para conocer la agrupación de los datos y ver las similitudes que existen en los tratamientos. Para todos los test se fijó un nivel de significación de $\alpha=0,05$ y para llevarlos a cabo se utilizaron los programas SPSS (IBM) y Microsoft Excel.

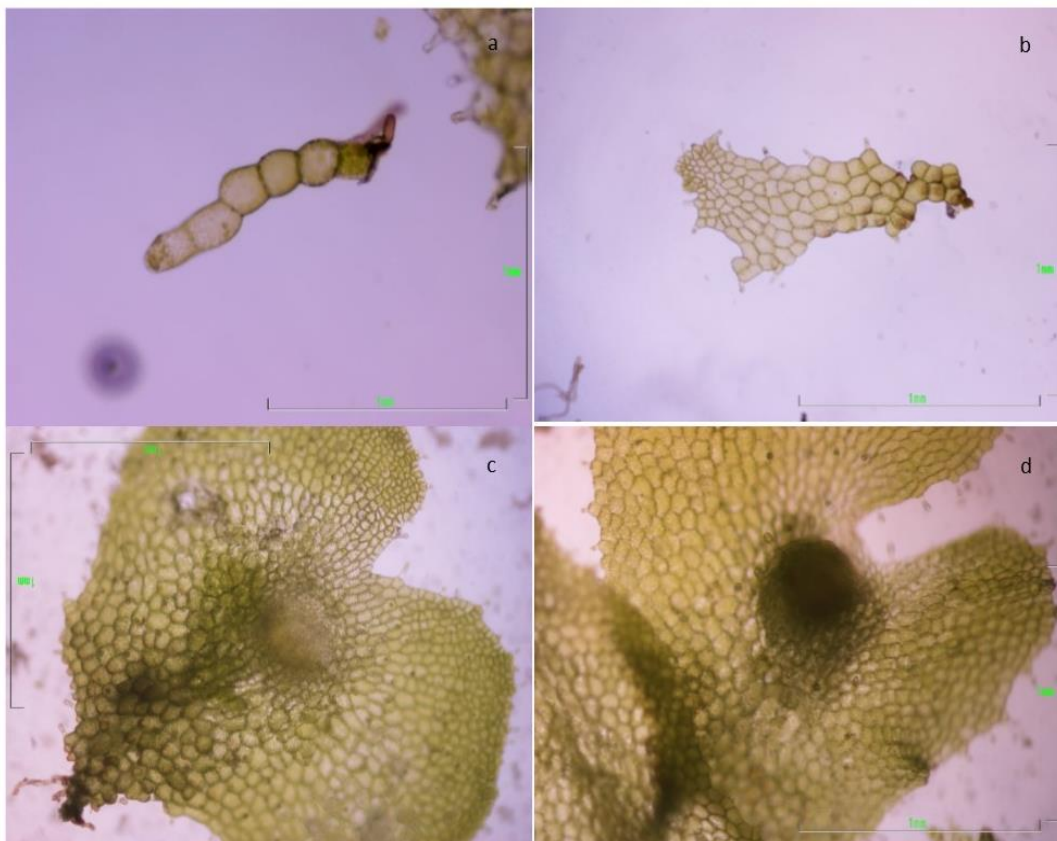


Figura 5. Estados de desarrollo del gametófito. a) Filamento, b) Espátula, c) Corazón con embrión en estado de mancha, d) Corazón con embrión en estado de botón.

3. RESULTADOS

3.1.Efecto del medio de cultivo sobre la capacidad de regeneración en los cultivos homogeneizados

Balance auxina/citoquinina:

-ANA + BA: Tras 50 días de cultivo se observó que el balance de ANA/BA con una concentración de ANA 5,37 μM era letal para los explantos ($\chi^2= 100$; $p<0,001$). No se tomaron datos en el resto de tratamientos pero si se observó regeneración (Fig.7a).

-IBA + BA: En este caso, la regeneración es favorecida por dosis equivalentes de IBA y BA (2,46 μM de IBA+ 2,21 μM de BA) ($\chi^2= 40,69$; $p<0,001$). Balances favorable a la citoquinina o a la auxina, disminuyeron significativamente la frecuencia de regeneración ($\chi^2= 100$; $p<0,001$) y ($\chi^2= 53$; $p<0,001$), respectivamente (Fig.7a).

Otras fitohormonas:

ABA: Esta hormona, respecto al control, dio un porcentaje de regeneración muy bajo en la concentración 1,89 μM ($\chi^2= 126$; $p<0,001$) e inhibió la respuesta a la concentración 3,78 μM ($\chi^2= 100$; $p<0,001$) (Fig. 7b).

GA3: La giberelina, en una concentración 1,44 μM , redujo la frecuencia de regeneración, que quedó en torno a un 10% ($\chi^2= 99,2$; $p<0,001$), mientras que a la concentración de 2,88 μM , dio una frecuencia de regeneración similar a la del control ($\chi^2= 3,7$; $p=0,054$) (Fig.7b).

Inhibidores de fitohormonas:

CHA: Este compuesto, a concentraciones de 1 μM incrementó el porcentaje de regeneración respecto al control ($\chi^2=3,04$; $p=0,08$), mientras que con una concentración 5,04 μM la regeneración era menor ($\chi^2= 32,43$; $p<0,001$) (Fig. 7b).

TIBA: A las concentraciones ensayadas de 1 y 2 μM , este compuesto indujo un porcentaje de regeneración similar y superior al control, respectivamente ($\chi^2= 3,01$; $p= 0,08$) ($\chi^2= 27,39$; $p< 0,001$) (Fig. 7b).

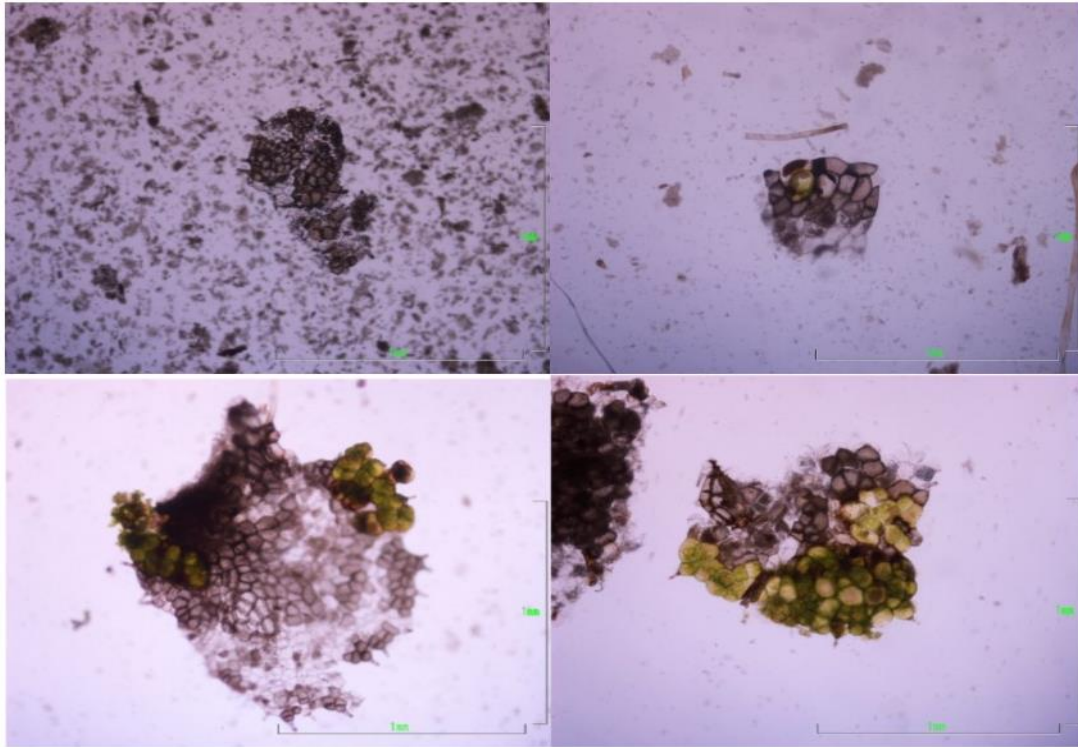


Figura 6. Regeneración celular en cultivos homogeneizados de gametofitos de *Dryopteris affinis ssp affinis*

3.2.Efecto del medio de cultivo sobre el morfotipo en los cultivos homogeneizados

Balance auxina/citoquinina:

ANA + BA: El balance favorable a BA induce un mayor desarrollo de los gametófitos, predominando los estados de espátula y corazón ($\chi^2=140$; $p<0,001$) mientras que el balance 2,69 μM de ANA + 2,21 μM de BA, presentó un mayor desarrollo frente al control, con un predominio de espátulas y corazones aunque menor que con el tratamiento favorable a la citoquinina, donde se observa un elevado porcentaje de filamentos ($\chi^2=77,29$; $p<0,001$) (Fig.7c).

IBA + BA: Al sustituir ANA por IBA, obtenemos resultados diferentes. En el caso de un balance favorable a la citoquinina, no se observa ningún crecimiento ($\chi^2=15,17$; $p<0,001$). Con el balance favorable a IBA aparecen los tres morfotipos en la misma proporción ($\chi^2=100$; $p<0,001$). Por último, el balance equilibrado entre ambos reguladores favorece únicamente la presencia de filamentos y por tanto un desarrollo similar al control ($\chi^2=0,42$; $p<0,51$) (Fig.7c). Tanto con este tratamiento como con el favorable a la citoquinina, se observaron agrupaciones celulares, duras, tipo callo (Fig. 9).

Otras fitohormonas:

ABA: En una concentración 1,89 μM y tras 60 días de cultivo, los gametófitos se encontraban únicamente en estado de filamento ($\chi^2=98,5$; $p<0,001$), mientras que

con una concentración 3,78 μM no se observó ningún desarrollo ($\chi^2= 100$; $p<0,001$) (Fig. 7d).

GA3: En na concentración de 1,44mM se observó que el cultivo presentaba a los 60 días una mayor presencia de espátulas y corazones que de filamentos, en proporciones similares al control ($\chi^2= 0,008$; $p= 0,92$), al contrario que la concentración de 2,88 μM , que indujo un mayor porcentaje de filamentos que de espátulas y corazones ($\chi^2= 69,07$; $p< 0,001$) (Fig. 7d).

Inhibidores de fitohormonas:

CHA: Tras 60 días de cultivo, la concentración de 1 μM presenta un bajo porcentaje de filamentos y alto de espátulas y corazones ($\chi^2= 0,78$; $p= 0,37$), por tanto un mayor desarrollo que con la concentración 5,04 μM , con la que solo se obtienen filamentos ($\chi^2= 91,48$; $p< 0,001$) (Fig. 7d).

TIBA: En concentraciones de 1 y 2 μM , se observó que los morfotipos presentes eran mayoritariamente filamentos ($\chi^2= 116$; $p<0,001$), y con la concentración 1 μM , los filamentos también se acompañaban de un bajo porcentaje de espátulas y corazones ($\chi^2= 52,98$; $p<0,001$) (Fig. 7d).

3.3. Efecto del medio de cultivo sobre la tasa largo/ancho (L/A) del gametófito en los cultivos homogeneizados

Debido a que tras los tiempos de cultivo no todos los tratamientos presentaban un desarrollo adecuado para evaluar este parámetro, solo se obtuvieron datos de los siguientes tratamientos, además del control: ANA 2,69 μM +BA 2,21mM; ANA 0,53 μM +BA 4,43 μM (Fig. 6a); GA3 2,88 μM y CHA 1 μM (Fig.8c).

Los tratamientos del balance equilibrado de BA+ANA y el balance favorable a BA dieron resultados de una tasa L/A similares entre ellos y al control, con valores en torno a 1. Mientras que los tratamientos con GA₃ y CHA mostraban un aumento de la tasa respecto al control, indicando que los gametófitos eran más largos que anchos.

3.4. Efecto del medio de cultivo sobre la formación de embriones apogámicos en los cultivos homogeneizados

Balance auxina/citoquinina:

Los únicos tratamientos que presentaron embriones apogámicos fueron los balances 2,69 μM ANA + 2,21 μM BA ($\chi^2= 19,04$; $p<0,001$) y 0,53 μM de ANA + 4,43 μM de BA ($\chi^2= 8,85$; $p=0,002$), y en porcentajes superiores a los del control, aunque en el caso del primer balance, el número de gametófitos observados fue menor. El resto de tratamientos no tenía un desarrollo suficientemente avanzado para poder realizar la toma de datos o simplemente no había sobrevivido (Fig. 7e).

Otras fitohormonas:

ABA: Con este regulador, los gametofitos no presentaban el desarrollo necesario para poder evaluar este parámetro: 1,79 μM ($\chi^2= 51$; $p<0,001$) y 3,78 μM ($\chi^2= 50$; $p<0,001$) (Fig.7f).

GA₃: Ambas concentraciones favorecieron la apogamia en un alto porcentaje ($\chi^2= 0,008$; $p= 0,92$) y ($\chi^2= 19,04$; $p<0,001$) para 1,44 y 2,88 μM respectivamente (Fig. 7f).

Inhibidores de fitohormonas:

CHA: El tratamiento con una concentración 1 μM de CHA, fue el que dió un mayor porcentaje de embriones apogámicos respecto al control y al resto de los tratamientos, habiéndose analizado al menos 50 gametófitos ($\chi^2= 13,27$; $p<0,001$). Con la concentración 5,04 μM también favorecieron la apogamia pero el número de gametófitos analizados fue menor ($\chi^2= 19,04$; $p<0,001$)(Fig. 7f).

TIBA: Con ninguna de las concentraciones ensayadas se observó desarrollo de embriones apogámicos (Fig.7f).

3.5. Efecto del medio de cultivo sobre el tamaño del embrión apogámico

Al igual que en el apartado anterior solo pudieron medirse las áreas de los embriones de los tratamientos ANA 2,69 μM + BA 2,21mM; ANA 0,53 μM + BA 4,43 μM (Fig. 6b); GA₃ 2,88 μM ; CHA 1 μM (Fig.8d).

Los resultados obtenidos en los tratamientos del balance equilibrado de ANA+BA y el balance favorable a BA resultaron ser menores al control en ambos casos y siendo similares entre ellos. En el tratamiento de GA₃ el área de los embriones fue menor que el control y que el tratamiento con CHA que obtuvo valores de área similares al control, aunque no pueden establecerse diferencias significativas entre ellos. El tratamiento CHA presentó el mayor tamaño de área de embrión de todos los tratamientos (Fig. 10).

3.6. Efecto del medio de cultivo en esporófitos homogeneizados

En los cultivos homogeneizados de esporofito, tras 60 días no se observó regeneración de los explantos, con ninguno de los tratamientos hormonales ensayados ni con el control.

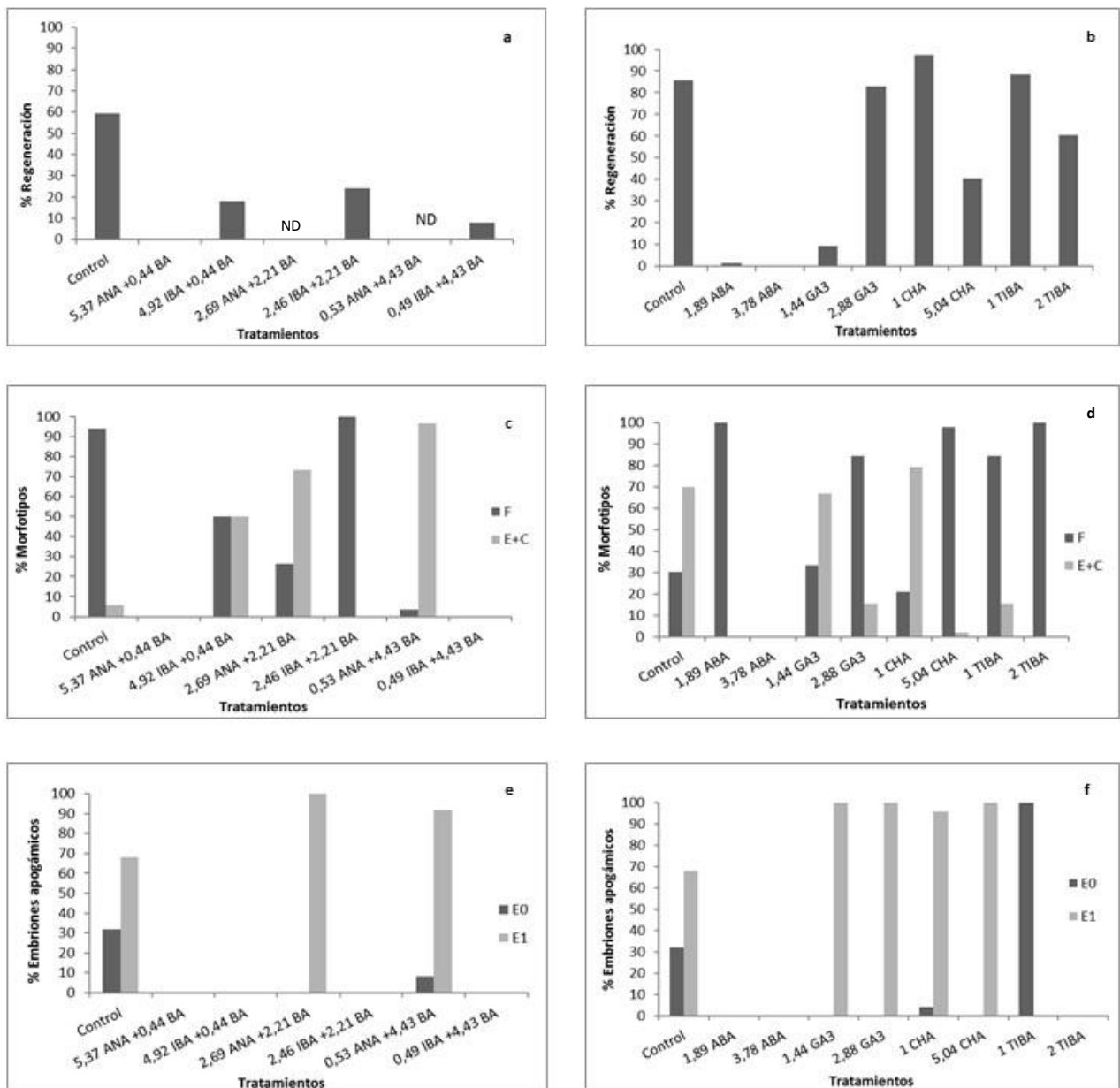


Figura 7. Efecto de las fitohormonas e inhibidores de fitohormonas sobre diferentes parámetros del desarrollo en cultivos homogeneizados de *Dryopteris affinis* spp. *affinis*. a) y b) Regeneración. c) y d) Morfotipo, F: filamentos, E+C: espátulas y corazones. e) y f) Formación de embriones apogámicos, E0: corazones sin embrión, E1: corazones o espátulas con embrión.

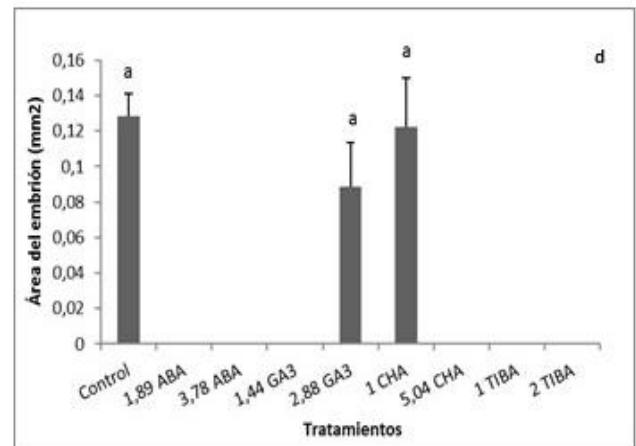
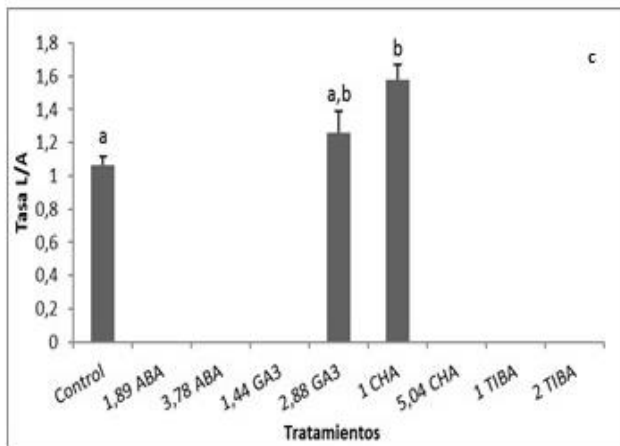
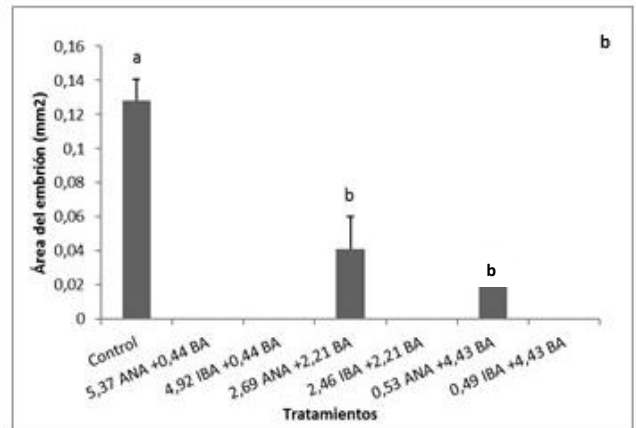
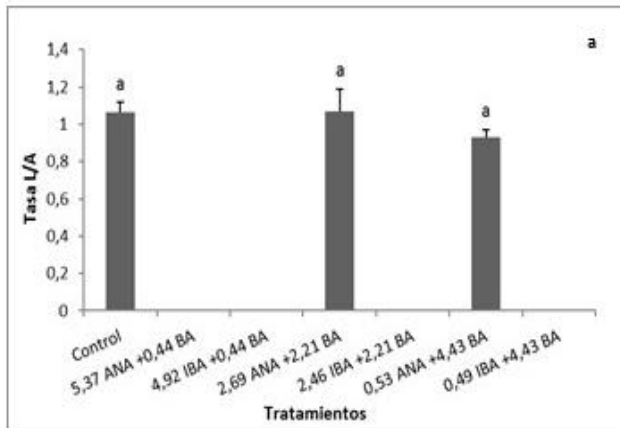


Figura 8. Efecto de las fitohormonas e inhibidores de fitohormonas sobre: a) y b) la tasa L/A y c) y d) el área del embrión, en cultivos homogeneizados de *Dryopteris affinis* spp. *affinis*.

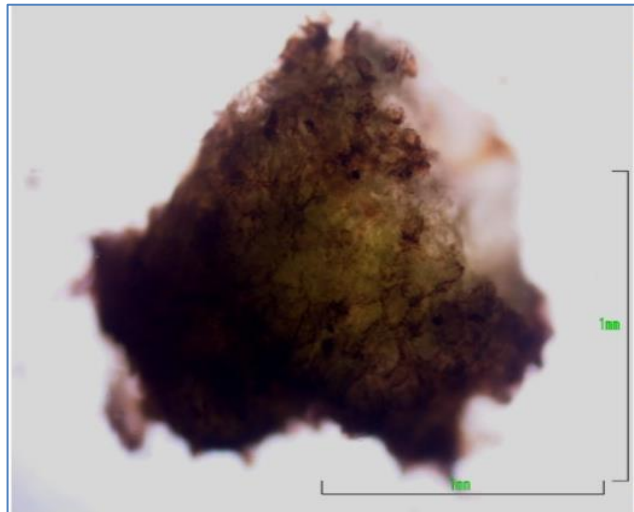


Figura 9. Agregado celular en cultivos homogeneizados de gametofitos de *Dryopteris affinis*, tratados con BA.

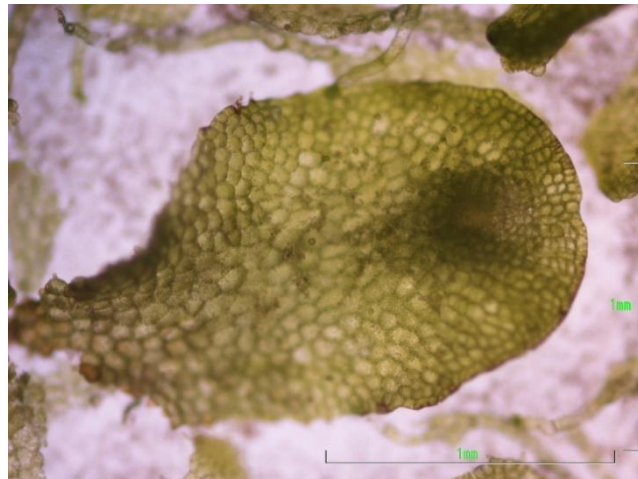


Figura 10. Espátula con embrión procedente de cultivos homogeneizados de gametofito de *Dryopteris affinis*, tratado con ciclohexilamina.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se cultivaron homogeneizado de gametofito y esporofito, del helecho *D. affinis* ssp. *affinis* en presencia de diferentes reguladores del desarrollo e inhibidores, en determinadas combinaciones y/o concentraciones, para determinar su efecto sobre: a) el desarrollo vegetativo y reproductivo del gametofito, b) la apogamia, y c) la regeneración del esporófito.

En los cultivos homogeneizados se aprovecha la capacidad de regeneración que, en principio, exhiben los gametofitos de los helechos, para poder estudiar su desarrollo, ofreciendo una alternativa al cultivo de esporas. Cuando se ponen en marcha estos cultivos, las primeras semanas se aprecia un deterioro del mismo, reflejado en una coloración negruzca, con un preocupante aspecto necrótico. Poco a poco, algunas células de los fragmentos de tejido gametofítico, van retomando contenidos y coloraciones celulares verdes, retomando asimismo la capacidad de división y de diferenciación de un nuevo organismo. El hecho de que se reconstruya un nuevo gametofito desde una o varias células que en principio no tienen un programa definido de desarrollo gametofítico, como el que pueda albergar la espora, aparte de ser fuente de una enorme cantidad de oportunidades de regeneración (casi tantas como explantos) ofrece la posibilidad de poder resetear las células y escudriñar en la plasticidad de las células y tejidos vegetales, y estudiar cómo pueden incidir en todo ello, factores externos tales como fitohormonas e inhibidores, en el caso que ahora nos ocupa. Por otra parte, los cultivos homogeneizados tanto de gametofito como de esporofito, han sido enfocados como métodos alternativos de propagación, de aquellas especies que tienen un mayor interés comercial (Knauss 1976; Cooke, 1979; Finnie y van Staden, 1987; Fernández et al. 1993; 1997; Fernández y Revilla, 2003; Somer *et al*, 2010).

Como es bien sabido, las fitohormonas son de vital importancia a la hora de regular e integrar el crecimiento y desarrollo general de las plantas. En este trabajo, se estudiaron tres balances auxina/citoquinina, con la auxina ANA y la citoquinina BA. En el balance favorable a la auxina ANA, la regeneración de los gametófitos tras el homogeneizado fue nula, resultando dicha concentración tóxica para las células gametofíticas, y siendo éste el motivo por el que se decidieron ensayar tres nuevos balances auxina/citoquinina, con la auxina IBA.

En los cultivos homogeneizados de gametofito de *D. affinis*, un balance favorable a la citoquinina fue el que indujo un mayor desarrollo vegetativo del gametofito regenerado, con mayor presencia de espátulas y corazones y una tasa longitud/anchura en torno a 1, así como también un mayor número de embriones apogámicos, si bien el tamaño de estos resultó ser menor que el del control. Asimismo, también se ha detectado que con el balance auxina/citoquinina favorable a la auxina IBA, a diferencia de ANA, sí se producía regeneración, resultando esta hormona menos letal que ANA, a la mayor concentración empleada. No obstante, ninguno de los balances ensayados con esta hormona mejoran los resultados obtenidos con la combinación óptima de ANA y BA. Podemos decir, por lo tanto, que las auxinas ANA e IBA tuvieron efectos muy diferentes en los explantos de los cultivos homogeneizados de gametofito de *D. affinis*.

En los cultivos homogeneizados de *D. affinis*, resultó llamativa la presencia de agregados celulares de color marrón, con aspecto de callo y textura dura, en presencia tanto de un balance favorable a BA como un balance equilibrado entre ambos reguladores. En estudios previos con esta misma especie (Fernández et al. 1996), gametofitos de *D. affinis* ssp. *affinis*, obtenidos de spora, que fueron cultivados en medio MS sólido con un balance ANA/BA favorable a la citoquinina BA, formaban tejido desdiferenciado o callo con una alta capacidad morfogénica, regenerando esporofitos masivamente, observándose por lo tanto un comportamiento diferente según se trate de un gametofito seccionado o entero. Por lo tanto, podemos decir que de nuevo encontramos respuestas diferentes, en este caso, en cuanto a la formación de callo, tras haber añadido al medio las mismas fitohormonas.

Los cultivos homogeneizados tratados con una concentración de GA₃ 1,44 μM presentaron una regeneración baja de los gametófitos, pero estos se encontraban en estados avanzados del desarrollo, es decir, en forma de corazones y espátulas. Los escasos corazones presentes en el cultivo poseían embriones apogámicos aunque no eran suficientes para llevar a cabo las medidas de la tasa longitud/anchura ni del área del embrión. Para una concentración 2,88 μM de GA₃ se observó una mayor regeneración que en la concentración anterior si bien en este caso predominaban los gametófitos en estado de filamento. En este tratamiento se observó un bajo porcentaje de corazones, aunque todos ellos tenían embrión y pudieron medirse individuos suficientes para obtener la tasa de longitud/anchura, la cual indicó un resultado mayor de 1, por tanto que los gametófitos eran más largos que anchos. El área de los embriones resultó ser menor que la del control. Por lo tanto, a la dosis más alta de las ensayadas aquí, se percibe el papel que las giberelinas tienen en elongación tanto en tallo, en angiospermas como en el gametofito del helecho, citado en trabajos anteriores y obtenidos en nuestro laboratorio (Menéndez et al. 2006b; Kumar et al., 2011).

En el caso del ácido abscísico o ABA, podemos decir que esta fitohormona se ha comportado como un claro inhibidor tanto del desarrollo vegetativo como de la apogamia, en la especie *D. affinis*. Ensayos de esta fitohormona en las concentraciones 0,037 μM 0,37μM y 3,7μM, en cultivos homogeneizados de gametofito de la especie sexual *Blechnum spicant* L. reflejaron una ausencia de inhibición tanto del desarrollo vegetativo de los gametofitos regenerados, como en la formación de los órganos sexuales masculinos, favorecida inicialmente por los cultivos homogeneizados en dicha especie (Menéndez et al., 2006b).

El inhibidor de la síntesis de poliaminas, ciclohexilamina, (CHA) a la dosis más baja, se mostró como un promotor de la regeneración de los explantos, dando la mayor tasa de todos los tratamientos realizados, del desarrollo vegetativo y de la respuesta apogámica, tanto en los referente a frecuencia como a la aceleración del proceso, al encontrar embriones en gametofitos con forma de espátula. La CHA es un inhibidor de la espermidina sintasa. Las poliaminas desempeñan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de plantas (Cetin et al. 2000). En concreto, se ha publicado que la síntesis de espermidina se considera esencial para el desarrollo embrionario en *Arabidopsis* y también en la embriogénesis somática (De-la-peña et al., 2009; Dutra et al, 2013). Sin embargo, el papel de las poliaminas en la apogamia podría ser muy diferente ya que la inhibición de la síntesis de la espermidina acelera el proceso. De hecho, se han detectado niveles transcripcionales de compuestos relacionados con la

biosíntesis de poliaminas en gametofitos en estados preapogámicos (filamentos) (Fernández, comunicación personal).

El inhibidor del transporte de auxinas, TIBA, a una concentración 1 μ M de TIBA induce una alta regeneración, si bien el estado de desarrollo de los gametófitos es principalmente en forma de filamentos, por lo que el desarrollo estaba ralentizado. En una concentración 2 μ M de TIBA se observó una regeneración menor y el cultivo solo presentaba filamentos. TIBA es un inhibidor del transporte de las auxinas, y su función es evitar que las auxinas se distribuyan desde los meristemos apicales al resto de la planta (Lee & Seo 2014). Este transporte de auxinas también se da en los gametófitos de *D. affinis* spp. *affinis*, donde se han identificado proteínas implicadas en el transporte de auxinas que señalan la existencia de un sistema de transporte en este estado de desarrollo (Grossmann et al. 2017). Por tanto, nuestros resultados concuerdan con el hecho de que las auxinas pudieran no acceder a todo el gametófito provocando con ello que su desarrollo se vea reducido.

Por último se estudió el efecto de los balances auxina/citoquinina en homogeneizados de esporófitos. En este caso no se obtuvo regeneración con ninguno de los tratamientos con y sin fitohormonas. Esto podría haberse debido al tamaño del explanto dado que en cultivos homogeneizados de fronde del helecho *Platyserium bifurcatum*, se describe un patrón de regeneración relacionado con el tamaño de los agregados celulares, sugiriendo que la coordinación e interacción entre células tiene un papel esencial en la regeneración (Teng y Teng, 1997)(Camloh, 2006). Por otra parte, en cultivos homogeneizados de esporófitos de helechos llevados a cabo en nuestro laboratorio, con otras especies, como *Adiantum capillus-veneris*, *Asplenium adiantum-nigrum*, *Dryopteris dilatata*, *Polypodium cambricum*, etc. sí se obtuvo regeneración y crecimiento tanto de esporofitos como de gametofitos apospóreos (Bertrand et al., 1999; Somer et al., 2010).

5. CONCLUSIONES

1. Los cultivos homogeneizados de gametofito de permiten aprovechar la capacidad de regeneración que, en principio, exhiben los gametofitos de los helechos, para poder estudiar su desarrollo, ofreciendo una alternativa al cultivo de esporas, también en la especie apogámica *Dryopteris affinis*.
2. Los inhibidores TIBA y CHA, a las dosis más elevadas, y la menor de GA₃, inhibieron la regeneración de los explantos de gametofito respecto al control.
3. La citoquinina BA favorece la formación de tejido desdiferenciado en los cultivos homogeneizados de gametofito y muestra un efecto inhibitor del tamaño del embrión.
4. Las auxinas ANA e IBA tuvieron efectos muy diferentes en los explantos de los cultivos homogeneizados de gametofito de *D. affinis*, resultado ANA letal a las dosis máxima e intermedia ensayadas. Por su parte, ABA se mostró como un inhibidor del desarrollo de los gametofitos regenerados.
5. De todos los tratamientos ensayados, la adición del inhibidor de la síntesis de poliaminas, mostró un claro efecto acelerador del proceso apogámico, abriendo el campo para profundizar en el papel de las poliaminas sobre la formación de embriones asexuales. Asimismo, dicho compuesto también manifestó un efecto elongador de los gametofitos.
6. Los cultivos homogeneizados de esporofito de *D. affinis* no regeneran ni esporofitos ni gametofito aposporeo con ningunos de los tratamientos ensayados.

Bibliografía

Barcaccia, G. y Albertini, E. (2013) «Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma», *Plant reproduction*, 26(3), pp. 159-79. doi: 10.1007/s00497-013-0222-y.

Bertrand, A. M., Albuerne, M. A., Fernández, H., González, A. y Sánchez-Tamés, R. (1999) «In vitro organogenesis of *Polypodium cambricum*», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57(1), pp. 65-69. doi: 10.1023/A:1006348628114.

Birnbaum, K. D. y Sánchez Alvarado, A. (2008). Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell* 132, 697-710.

Braithwaite, A.F. (1964). A new type of apogamy in ferns, *New Phytologist* Volume 63, pp: 293–305.

Bouchereau, A., Gagneul, D., Ainouche, A., Duhazé, C., Lugan, R. y Larher, F.R. (2007). A Reassessment of the Function of the So-Called Compatible Solutes in the Halophytic Plumbaginaceae *Limonium latifolium* *Plant Physiology* Jul, 144 (3) 1598-1611; DOI: 10.1104/pp.107.099820

Bürcky, K. (1977). Antheridiogene in *Anemia phyllitidis* L. Sw. (Schizaeaceae) 2. Gaschromatographischer nachweis des antheridiogens AAn 1 *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Volume 84, Issue 2, September 1977, Pages 173-178

Camloh, M. (2006) «In vitro culture of the fern *Platyserium bifurcatum* as a tool for various physiological and developmental studies», en *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Advances and Topical Issues*, pp. 163-170.

Cetin, E., Yildirim, C., Palavan Unsal, N. y Unal, M. (2000) «Effect of spermine and cyclohexylamine on *in vitro* pollen germination and tube growth in *Helianthus annuus*», *Canadian Journal of Plant Science*, 80(2), pp. 241-245.

Cheng, C. y Schraudolf, H., (1974). Nachweis von abscisinsäure in sporen und jungen prothallien von *Anemia phyllitidis* L. Sw. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* Volume 71, Issue 4, March 1974, Pages 366-369.

Chia, E. y Raghavan, V. (1982). Abscisic acid effects on spore germination and protonemal growth in the fern, *mohria caffrorum*

Christenhusz, M. J. M., Zhang, X. C. y Schneider, H. (2011) «A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns», *Phytotaxa*, 19, pp. 7-54. doi: 10.138/28042.

Cordle, A. R., Bui, L.T., Irish, E. E. and Cheng, C.L. (2010). Laboratory-induced apogamy and apospory in *Ceratopteris richardii*. In: *Working with ferns: Issues and Applications*. Fernández, H., Kumar, A., Revilla, M.A. (Eds.), Springer-New York-Dordrecht-Heidelberg-London, pp 25-36.

Cordle, A. R., Irish, E. E. and Cheng, C. L. (2007). Apogamy induction in *Ceratopteris richardii*. *Int. J. Plant Sci.* 168, 361-369. doi: 10.1086/511049.

Deeb, F., van der Weele, C. M. y Wolniak, S. M. (2010) «Spermidine Is a Morphogenetic Determinant for Cell Fate Specification in the Male Gametophyte of the Water Fern *Marsilea vestita*», the Plant Cell Online, 22(11), pp. 3678-3691. doi: 10.1105/tpc.109.073254.

Díaz González, T. E., Álvarez Fernández-Carvajal, M. y Fernández Prieto, J. A. (2004) Curso de botánica.

Döpp W. (1939) Cytologische und genetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Dryopteris*. *Planta* 29: 481–533.

Dutra, N., Silveira, V., Gonçalves I., Ribeiro Gomes-Neto J., Façanha, A., Steiner, N., y Santa-Catarina, C. (2013). Polyamines affect the cellular growth and structure of pro-embryogenic masses in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures through the modulation of proton pump activities and endogenous levels of polyamines

Ekrt, L. y Koutecký, P. (2016) «Between sexual and apomictic: Unexpectedly variable sporogenesis and production of viable polyhaploids in the pentaploid fern of the *Dryopteris affinis* agg. (Dryopteridaceae)», *Annals of Botany*, 117(1), pp. 97-106. doi: 10.1093/aob/mcv152.

Fernandez, H., Bertrand, A. M. y Sanchez-Tames, R. (1996) «Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 93-97.

Fernández, H., Bertrand, A. M., Sierra, M. I. y Sánchez-Tamés, R. (1999) «An apolar GA-like compound responsible for the antheridiogen activity in *Blechnum spicant*», *Plant Growth Regulation*, 28(2), pp. 143-144. doi: 10.1023/A:1006263326546.

Fernández, H., Bertrand, A. y Sánchez-Tamés, R. (1997) «Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of Ba treated rhizomes», *Scientia Horticulturae*, 68(1-4), pp. 243-247. doi: 10.1016/S0304-4238(96)00986-7.

Fernández, H. y Revilla, M. A. (2003) «In vitro culture of ornamental ferns», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(1), pp. 1-13. doi: 10.1023/A:1022650701341.

Flores-Sandoval, E., Eklund, D. M. y Bowman, J. L. (2015) «A Simple Auxin Transcriptional Response System Regulates Multiple Morphogenetic Processes in the Liverwort *Marchantia polymorpha*», *PLoS Genetics*, 11(5), pp. 1-26. doi: 10.1371/journal.pgen.1005207.

González-Santos, R., Delgado-Alvarado, A., Zavaleta-Mancera, H. A. y Herrera-Cabrera, B. E. (2009) «La citocinina BAP promueve la acumulación de hexosas e incrementa la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxinasa durante el retraso de la senescencia foliar de trigo», *Agrociencia*, 43(4), pp. 379-391.

Grossmann, J., Fernández, H., Chaube y, P. M., Valdés, A. E., Gagliardini, V., Cañal, M. J., Russo, G. y Grossniklaus, U. (2017) «Proteogenomic Analysis Greatly Expands the Identification of Proteins Related to Reproduction in the Apogamous Fern *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*», *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00336.

- Grossniklaus, U., Nogler, G. A. and Van Dijk, P. J. (2001). How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell* 13, 1491–1497. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.68013.7.1491>
- Hartman, R.D. y Zettler, F.W. (1986) Tissue culture as a plant production system for foliage plants. In: Zimmerman RH, Griesback RJ, Hamnerschlag FA, Lawson RH (eds) *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops* (pp 293-299). Martinus Nijhof Publishers, Dordrecht
- Hickok, L.G. (1983). Abscisic acid blocks antheridiogen-induced antheridium formation in gametophytes of the fern *Ceratopteris*, *Canadian Journal of Botany*, 1983, 61(3): 888-892.
- Kandemir, N. y Saygili, I. (2015) Apomixis: new horizons in plant breeding. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* <http://journals.tubitak.gov.tr/havuz/tar-1409-74.pdf>
- Knauss, J.F. (1976). A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. *Proc. Fla State Hort.*
- Fernández, H., Bertrand, A.M. y Sánchez Tamés, R. (1993). *In vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic sporophytic tissue. *Sci. Hort.* 56: 71–77
- Fernández, H., Bertrand, A.M. y Sánchez-Tamés, R. (1997). Gemmation in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*. *Plant Cell Reports* 16:358-362.
- Fernández, H. y Revilla, M. A. (2003) «*In vitro* culture of ornamental ferns», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(1), pp. 1-13. doi: 10.1023/A: 1022650701341.
- Finnie, J.F. y Van Staden, J. (1987). Multiplication of the tree fern *Cyathea degreii*. *HortSci.* 22: 665.
- Cooke, R.C. (1979). Homogenization as an aid in tissue cultura propagation of *Platyserium* and *Davallia*. *HortSci.* 14: 21–22
- Kumar A., Fernández, H. y Revilla, M. A. (2011) «Gibberellic Acid and Ethylene Control Male Sex Determination and Development of *Anemia phyllitidis* Gametophytes», en *Working with Ferns*.
- Lee, K. y Seo, P. J. (2014) «The Arabidopsis E3 ubiquitin ligase HOS1 contributes to auxin biosynthesis in the control of hypocotyl elongation», *Plant Growth Regulation*, 76(2), pp. 157-165. doi: 10.1007/s10725-014-9985-x.
- Li, X., Han, J.-D., Fang, Y.-H., Bai, S.-N. y Rao, G.-Y. (2017) «Expression Analyses of Embryogenesis-Associated Genes during Somatic Embryogenesis of *Adiantum capillus-veneris* L. *In vitro*: New Insights into the Evolution of Reproductive Organs in Land Plants», *Frontiers in Plant Science*, 8(April), pp. 1-12. doi: 10.3389/fpls.2017.00658.
- Liu, H.M., Dyer, R.J., Guo, Z.Y., Meng, Z., Li, J.H. y Schneider, H. (2012) The Evolutionary Dynamics of Apomixis in Ferns: A Case Study from Polystichoid Ferns, *Journal of Botany*, vol. 2012, Article ID 510478, 11 pages, 2012. doi:10.1155/2012/510478

Manton, I. (1950) Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. Cambridge: Cambridge University Press.

Menéndez, V., Revilla, M. A., Bernard, P., Gotor, V. y Fernández, H. (2006) «Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L.», *Plant Cell Reports*, 25(10), pp. 1104-10. doi: 10.1007/s00299-006-0149-y.

Menéndez, V., Revilla, M. A., Fal, M. A. y Fernández, H. (2009) «The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant* L.», *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(3), pp. 245-250. doi: 10.1007/s11240-008-9481-y.

Menéndez, V., Villacorta, N. F., Revilla, M. A., Gotor, V., Bernard, P. y Fernández, H. (2006) «Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins sp. affinis», *Plant Cell Reports*, 25(2), pp. 85-91. doi: 10.1007/s00299-005-0041-1.

Miller, J. (1968) Fern Gametophytes as Experimental Material. *Botanical Review*, 34(4), 361-440

Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Peredo, E. L., Méndez-Couz, M., Revilla, M. A. y Fernández, H. (2013) «Mating system in *Blechnum spicant* and *Dryopteris affinis* ssp. *affinis* correlates with genetic variability», *American Fern Journal*, 103(1). doi: 10.1640/0002-8444-103.1.27.

Rodriguez-Leal, D. y Vielle-Calzada, J.-P. (2012) «Regulation of apomixis: learning from sexual experience.», *Current opinion in plant biology*. Elsevier Ltd, 15(5), pp. 549-55. doi: 10.1016/j.pbi.2012.09.005.

Schmidt, A., Schmid, M. W. y Grossniklaus, U. (2015) «Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction», *Development*, 142(2), pp. 229-241. doi: 10.1242/dev.102103.

Sheffield, E. y Bell, P.R. (1987) Current studies of the pteridophyte life cycle. *Bot Rev.* 53:442-490.

Somer, M., Arbesú, R., Menéndez, V., Revilla, M. A. y Fernández, H. (2009) «Sporophyte induction studies in ferns in vitro», *Euphytica*, 171(2), pp. 203-210. doi: 10.1007/s10681-009-0018-1.

Sugai, M., Nakamura, K., Yamane, H.; Sato, Y. y Takahashi, N. (1987). Effects of Gibberellins and Their Methyl Esters on Dark Germination and Antheridium Formation in *Lygodium japonicum* and *Anemia phyllitidis*. *Plant Cell Physiol* 28 (1): 199-202. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077276

Taiz, L. y Zeiger, E. (2015) «Fisiología Vegetal», en *Fisiología Vegetal*. doi: 10.4995/WRS.2010.7744.

Tucker, M. R., Araujo, A. G., Paech, N. A., Hecht, V., Schmidt E. D. L., Rossell J. B., de Vries S. C., Koltunow, A. M. G. (2003). Sexual and apomictic reproduction in Hieracium subgenus Pilosella are closely interrelated developmental pathways. *Plant Cell* 15, 1524-37. doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.011742>

Whittier, D.P. (1966) The influence of growth substances on the induction of apogamy in *Pteridium* gametophytes. *Am. J. Bot.* 53: 882–886

Whittier, D.P. y Steeves, T.A. (1960) The induction of apogamy in the bracken fern. *Can. J. Bot.* 38: 925–930

Whittier, D.P. y Steeves, T.A. (1962) Further studies on induced apogamy in ferns. *Can. J. Bot.* 40: 1525–1531.

Yang, H.Y. y Zhou, C. (1982) In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules, *Theoretical and Applied Genetic*, Volume 63, Issue 2, pp 97–104.