

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Departamento de Biología de Organismos y Sistemas**

**POTENCIACION DE LA CAPACIDAD  
REPRODUCTIVA Y MORFOGENICA DE  
HELECHOS PARA SU MICROPROPAGACION**

**TESIS DOCTORAL**

**POR**

**HELENA FERNANDEZ GONZALEZ**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**Departamento de Biología de Organismos y Sistemas**

**POTENCIACION DE LA CAPACIDAD  
REPRODUCTIVA Y MORFOGENICA DE  
HELECHOS PARA SU MICROPROPAGACION**

***HELENA FERNANDEZ GONZALEZ***



A Jos





UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Biología  
de Organismos y Sistemas

c/. Jesús Arias de Velasco, s/n.  
33005 - Oviedo, España.  
Telf. (98) 510 31 94  
Fax (98) 510 31 94

Dr. RICARDO SANCHEZ TAMES, Director del Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada "**Potenciación de la capacidad reproductiva y morfogénica en helechos para su micropropagación**" de la que es autora Helena Fernández González, Licenciada en Biología, reúne las condiciones requeridas para que su autor pueda optar al Grado de Doctor en Biología.

Y para que conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Oviedo a 30 de Abril de 1993.

Fdo. Dr. Ricardo Sánchez Tamés





UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Biología  
de Organismos y Sistemas

c/. Jesús Arias de Velasco, s/n.  
33005 . Oviedo, España.  
Telf. (98) 510 31 94  
Fax (98) 510 31 94

**RICARDO SANCHEZ TAMES, CATEDRATICO DE  
BIOLOGIA VEGETAL Y ANA MARIA BERTRAND  
BASCHWITZ, COLABORADORA DE HONOR DEL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE ORGANISMOS Y  
SISTEMAS**

**CERTIFICAN:** Que la memoria presentada por la Licenciada Dña. Helena Fernández González titulada: **"Potenciación de la capacidad reproductiva y morfogénica de helechos para su micropropagación"** ha sido realizada bajo su dirección en la Unidad de Fisiología Vegetal del Departamento B.O.S. de la Universidad de Oviedo. Y considerando que representa trabajo de Tesis, autorizan su presentación.

Y para que conste expiden el presente certificado en Oviedo a veinte de abril de mil novecientos noventa y tres.

*Rd* Dr. Ricardo Sánchez Tamés

Fdo: Dra. Ana Bertrand Baschwitz



# INDICE

Capítulo 1.	Introducción.	1
Capítulo 2.	Experimental.	25
Capítulo 3.	Cultivo "in vitro" del gametófito: factores nutricionales, ambientales y capacidad de regeneración.	39
Capítulo 4.	Gemación en <u>Osmunda regalis</u> L.	57
Capítulo 5.	Efecto de la homogeneización y del stress nutricional sobre la formación de esporófitos en el gametófito.	63
Capítulo 6.	Anteridiógeno y Giberelinas en <u>B.spicant</u> .	79
Capítulo 7.	Efecto de los reguladores del crecimiento en la propagación de helechos.	91
Capítulo 8.	Procesos de regeneración en cultivos homogeneizados de fronde en <u>Asplenium nidus</u> .	105
Capítulo 9.	Discusión general	113
Conclusiones		121
Curriculum vitae		123
Congresos, Publicaciones y Conferencias		124
Agradecimientos		127



## ABREVIATURAS

AC	Medio de cultivo que consta de agua, sacarosa 87,4 mM y 0,7% agar
AS	Medio de cultivo que consta de agua y agar al 0,7%
ANA	Acido naftalenacético
BAP	6-Benzilaminopurina
2,4D	Acido 2,4 diclorofenoxiacético
GA	Giberelina
KD	Medio de cultivo de Knudson (1946)
Kn	Kinetina
KP	Medio de cultivo de Knop (1865)
MK	Medio de cultivo, modificación de Klekowski (1969)
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)



# 1. INTRODUCCION

## 1.1. CLASIFICACION BOTANICA DE LOS HELECHOS

Los pteridófitos constituyen una de las divisiones del reino vegetal, representada por más de diez mil especies y en la que los helechos son el grupo mayoritario. Estas plantas presentan una gran diversidad; son tanto plantas herbáceas, que van desde formas enanas, de pocos milímetros de tamaño (como las especies del género *Didymoglossum*, perteneciente a la familia de las himenofiláceas) hasta plantas que alcanzan más de un metro de altura, e incluso pueden llegar a ser vegetales arborescentes como los grandes helechos que se desarrollan en la selva virgen tropical, cuyo porte majestuoso, de varios metros de envergadura e inmensas hojas es de auténticos árboles. A continuación se da la clasificación botánica de estas plantas, siguiendo el criterio de dos autores:

A. Según Pichi-Sermoli (1977).

División: PTERIDOPHYTA  
 Subdivisión: FILICOPHYTINA  
 Clase: OPHYOGLOSSOPSIDA Y MARATTIOPSIDA (Eusporangiados)  
 FILICOPSIDA (Leptosporangiados)

B. Según Strasburger y col. (1974).

División: PTERIDOPHYTA  
 Clase: FILICATAE  
 Nivel de desarrollo: Eusporangiatae  
 Orden 1: Ophyoglossales  
 Orden 2: Marattiales  
 Nivel de desarrollo: Leptosporangiatae  
 Orden: Filicales

En ambas clasificaciones se tiene en cuenta la agrupación no sistemática de los

helechos en dos categorías atendiendo al origen y estructura del esporangio: "helechos leptosporangiados, cuyos esporangios se forman a expensas de una sola célula epidérmica y cuyas paredes son delgadas, constituidas por una sola capa de células y los helechos eusporangiados en los que cada esporangio se origina a partir de un grupo de células y cuyas paredes son gruesas, formadas por varias capas de células" (Díaz, 1981).

## 1.2. ORIGEN Y EVOLUCION

Los psilofitales, representados por los grupos: Rhyniophytina, Zosterophyllophytina y Trimerophytina, son las plantas terrestres más antiguas provistas de haces conductores y de estomas de que se tienen referencias. Aparecieron en el tránsito del Silúrico al Devónico (hace unos 420 millones de años), alcanzaron rápidamente una gran riqueza de formas y se extinguieron al comienzo del Devónico superior. Esta etapa marcó el nacimiento de toda la flora vascular que existe actualmente, derivando a partir de aquí todos los cormobiontes, incluidos los helechos, pudiéndose afirmar que ha sido la más importante que el mundo vegetal haya conocido desde sus orígenes. A finales del Devónico todas las potencialidades morfológicas esenciales estaban ya inventadas. Estas continúan desarrollándose durante el Carbonífero y el Pérmico, que presentaron un ambiente ideal para que los pteridófitos se extendieran por toda la tierra, viviéndolo su época de mayor esplendor. Durante los últimos 30 millones de años de este período y durante todo el Triásico (hace 225 millones de años) la superficie del globo sufre profundos cambios que provocan una gran crisis, considerada la mayor en la historia de la vida sobre el planeta. Se produce la desaparición de numerosos representantes de pteridófitos y gimnospermas que se vieron reemplazados por otros que respondían mejor a las condiciones reinantes. Durante el Jurásico, período iniciado hace unos 180 millones de años y predecesor del estado final que alcanzará la biosfera en el Cretácico, continúa la dinámica evolutiva de los cormófitos declinando progresivamente los pteridófitos (a excepción de los helechos leptosporangiados que mantienen su diversificación), aumentando las gimnospermas (generando en ellas los precursores de las angiospermas). Finalmente, en el Cretácico superior, se va a producir la aparición de las angiospermas, las cuales tienen un éxito inmediato que va a coincidir con un importante retroceso tanto de pteridófitos como de gimnospermas debido a las ventajas evolutivas en el sistema reproductor y vegetativo (Fig. 1.1).

"Las relaciones filogenéticas entre los pteridófitos y los vegetales más primitivos

DIVISION ESTRATIGRAFICA CLASICA		ERAS FLORISTICAS
ERAS	SISTEMAS	
Neozoica (1) (Cuaternaria)  HOMBRE	Holoceno Pleistoceno	Neofítica (ANGIOSPERMAS)
Cenozoica (62) (Terciaria)  MAMIFEROS	Neógeno (38) Paleógeno (24)	
Mesozoica (167) (Secundaria)  REPTILES	Cretácico (72)	
Paleozoica (370) (Primaria)  ANFIBIOS PECES INVERTEBRADOS	Jurásico (46) Triásico (49)	Mesofítica (GIMNOSPERMAS Y PTERIDOFITOS)
	Pérmico (50) Carbonífero (65)	Paleofítica (PSILOFITALES)
	Devónico (60)	
	Si lú ri co	
	Ordovi- cense (75)	Arqueofítica (BACTERIAS, ALGAS)
	Cámbrico (100)	
Arcaica (3000)	Precámbrico (1500)	

Fig. 1.1. Cuadro comparativo entre las divisiones estratigráficas clásicas y las eras florísticas. Los números entre paréntesis indican tiempo en millones de años. (Tomado de Salvo Tierra, 1990).

(talófitos) no están totalmente aclaradas; los pteridófitos de tipo más arcaico, por sus esporangios terminales y la simplicidad de su aparato vegetativo enteramente desprovisto de hojas, tienen un aspecto que recuerdan mucho a las algas; por consiguiente, estos vegetales vasculares debieran originarse como una rama paralela a la de los briófitos, a partir de un grupo de algas aún desconocidas pero próximas, quizás, a las clorofíceas, ya que tanto los pteridófitos, los briófitos como las algas verdes presentan caracteres comunes como son la posesión de clorofilas a y b, los mismos carotenoides y flagelos sin bárbulas en los gametos masculinos" (Díaz, 1981).

### 1.3. DISTRIBUCION

"Los helechos prefieren los ambientes húmedos y sombríos, al igual que los briófitos, si bien algunos pueden vivir en zonas más secas, quedando asegurado el abastecimiento de agua mediante una serie de adaptaciones comparables a las de los espermatófitos" (Díaz, 1981). Se hallan presentes en casi todas las regiones climáticas. Sin embargo, es en los trópicos donde alcanzan mayor representación (Strasburger y col., 1974).

### 1.4. CICLO VITAL

Todas las especies pertenecientes a la División Pteridophyta se caracterizan por presentar un ciclo vital complejo con alternancia de generaciones heteromorfa y heterofásica donde la generación diploide (esporófito) predomina sobre la generación haploide (gametófito). El ciclo vital de estas plantas ha sido descrito por diversos autores (Gola y col., 1965; Strasburger y col., 1974; Font Quer, 1977; Díaz, 1981). A partir de una espora se origina un gametófito de forma laminar, más raramente tuberiforme o filiforme que se denomina protalo. Este protalo suele vivir unas pocas semanas y alcanza a lo sumo algunos centímetros de diámetro. Se compone de un talo verde, sencillo, fijo en el suelo por medio de rizoides unicelulares y tubulosos que nacen de su cara inferior. En dicho protalo se originan los anteridios (gametangios masculinos) y arquegonios (gametangios femeninos). En los anteridios se producen los anterozoides (gametos masculinos) bi o pluriciliados. En los arquegonios se forma la ovocélula (gameto femenino). La fecundación, muy primitiva, sólo es posible en el agua. Tras la fecundación se origina un cigoto que da lugar al embrión precursor del esporófito. El protalo desaparece pronto en la mayoría de las especies y únicamente puede continuar viviendo durante años en el caso de que no se produzca la fecundación.

El esporófito, que generalmente es perenne, tiene una estructura compleja con raíces, tallo y hojas verdaderas. El tallo del esporófito, por lo general, tiene una ramificación nula o escasa y no presenta entrenudos manifiestos. Este tallo en muchos casos se hace rastrero, denominándose entonces "rizoma". Las hojas, denominadas frondes, tienen peciolo, están provistas de nervadura abundante y tienen crecimiento circinado (excepto en Ofioglosales). Estas frondes están muy desarrolladas en comparación con el tallo y tienen formas variadas. En la parte inferior de la fronde se forman los esporangios que se distribuyen de manera diversa sobre la superficie o en los bordes de la misma. Los esporangios pueden aparecer aislados o agrupados en soros, que pueden, a su vez, estar o no protegidos por una membrana denominada indusio de forma e inserción variables. En algunas especies todas las frondes pueden formar esporangios (esporotrofilos) pero en otras los esporangios sólo se originan sobre frondes especializadas (esporofilos), diferentes de las frondes no formadoras de esporangios (trofilos). Los esporangios por meiosis producen las esporas que germinarán fuera del esporangio dando lugar a nuevos gametófitos, cerrándose así el ciclo (Fig. 1.2).

### 1.5. ALTERACIONES DEL CICLO BIOLÓGICO

En el ciclo biológico de un helecho parece obvio que se establece una relación entre la alternancia de individuos y la alternancia de dos fases cromosómicas, de modo que la meiosis y la fecundación determinarían el carácter gametofítico y esporofítico de las generaciones. Sin embargo, esto no siempre es así pudiendo darse casos en los que la meiosis o la fecundación se ven suprimidos como ocurre en los fenómenos de aposporia y apogamia.

La aposporia entraña un proceso por el cual tiene lugar la formación de un gametófito sin que se hayan producido esporas, a partir de otras células vegetativas del esporófito. Un caso notable de aposporia espontánea la ofrece *Phyllitis scolopendrium* (Anderson-Köto, 1932). La ausencia de meiosis provoca que los protalos posean la misma dotación cromosómica diploide que el esporófito sobre el que se desarrollan.

La apogamia supone la formación de un esporófito a partir de un gametófito sin que exista producción de gametos funcionales y por tanto, sin fecundación. Se reconocen en la actualidad un gran número de géneros de pteridófitos, considerados como evolucionados, en los cuales la apogamia es un fenómeno natural y obligado (*Dryopteris*, *Asplenium*, etc.). En las especies con ciclo sexual normal, el arqueosporio o tejido fértil del esporangio, se divide

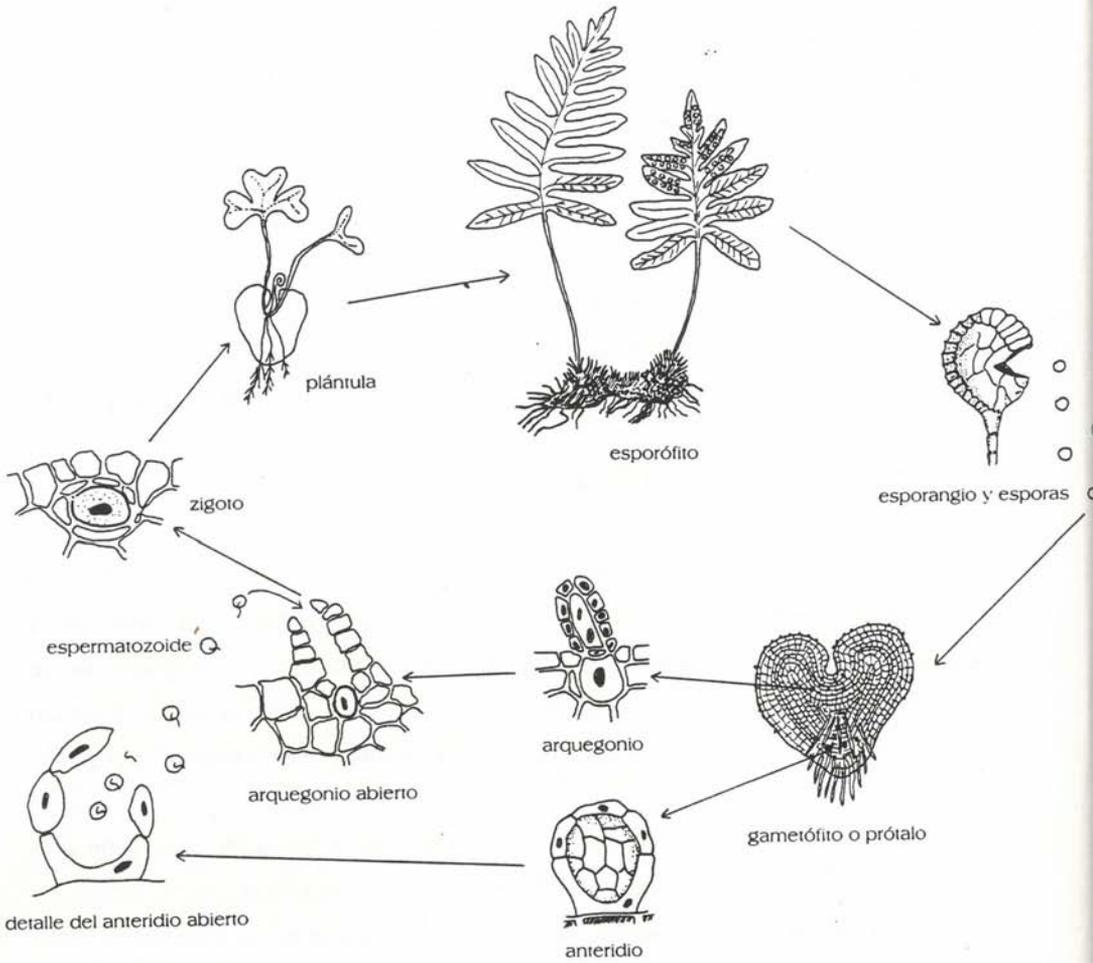


Fig. 1.2. Ciclo vital de un helecho (Polypodium sp.)

cuatro veces para dar lugar a 16 células madres de las esporas que, por meiosis, originarán 64 esporas con  $n$  cromosomas. En las especies apógamas el arqueosporio se divide cuatro veces, según el esquema clásico, pero la cuarta división no tiene lugar de forma normal, ya que los núcleos entran en profase y luego en metafase, con la consiguiente duplicación de cromosomas, pero esta mitosis, hasta ahora normal, detiene el proceso manteniéndose estos núcleos con el número de cromosomas duplicado, por lo que tan sólo se formarán ocho células madres de las esporas, teniendo un número cromosómico doble al del esporófito. La meiosis que sigue es normal, dando lugar a 32 diplosporas, teniendo el mismo número cromosómico que el esporófito (Manton, 1950; Sheffield y col., 1983). Estas esporas no reducidas germinarán formando un protalo. A partir de la proliferación de una o varias células vegetativas situadas en la escotadura del protalo se formará un nuevo esporófito.

## 1.6. FLORA PTERIDOFITA ASTURIANA

"Un aspecto esencial de la flora y vegetación de la Cornisa Cantábrica es su extraordinaria riqueza en pteridófitos, fundamentalmente helechos, en comparación con el resto de la Península Ibérica. Este hecho ya había llamado la atención a los antiguos botánicos. Así M. Willkomm en su obra sobre la Península Ibérica "Grundzüge der Pflanzenverbreitung auf der iberischem halbinsel" (Leipzig, 1896) consideró la abundancia de helechos como uno de los caracteres diferenciales para el conjunto de lo que llamó distrito nord-atlántico (que en líneas generales corresponde al actual Sector Iberoatlántico o Provincia corológica Atlántica en su tramo Ibérico). H. Crist, en su "Die Geographie der Farne" (Iéna, 1910), reiteró este criterio insistiendo en la riqueza de helechos del Noroeste de España" (Díaz, 1981).

"Las investigaciones sobre la flora pteridológica regional se remontan a siglos pasados y son numerosos los botánicos que se ocuparon de ella, si bien no en exclusiva, aportando nuevos datos al catálogo regional, aún no concluído, que en la actualidad consta de sesenta y dos especies y subespecies (cincuenta helechos, ocho equisetos y cuatro licopodiatas) que representan el sesenta por ciento del total de la flora pteridológica de la Península Ibérica" (Díaz, 1981).

## 1.7. INTERES DEL CULTIVO DEL HELECHO

### 1.7.1. Ornamental

Los helechos son plantas conocidas desde tiempos muy antiguos, aunque en la mayoría de los casos sólo por sus propiedades medicinales. Una excepción ha sido Adiantum capillus-veneris, que ya se cultivaba en los jardines romanos por sus características ornamentales. En la jardinería árabe y en otras posteriores, no se hace ninguna referencia a ellos y así llegamos al siglo pasado. Con los descubrimientos geográficos y la exploración de nuevas tierras, se introdujeron nuevas especies procedentes de regiones tropicales y subtropicales. Estas especies, por su exotismo, llamaron poderosamente la atención, comenzándose su cultivo ornamental. Como requerían condiciones ambientales (temperatura, humedad, luz y ventilación) distintas a las existentes en las viviendas, se produjeron fracasos iniciales de cultivo, hasta que se impuso la utilización de invernaderos, que antiguamente, como en Francia y en España en sus zonas más frías, se empleaban ya para el cultivo del naranjo. A mediados del siglo XIX ya se conocía perfectamente su cultivo y las necesidades de cada especie. En la actualidad la utilización de este grupo de plantas adquiere cada vez más auge, gracias sobre todo a que los hogares están dotados de sistemas de climatización y huecos de iluminación que permiten su desarrollo en condiciones óptimas.

### 1.7.2. Obtención de productos derivados del metabolismo secundario

En las plantas encontramos una gran cantidad de compuestos que pueden tener aplicaciones en numerosos campos. Generalmente, se trata de sustancias producidas en la serie de reacciones que tienen lugar en el llamado metabolismo secundario. En algunas ocasiones estos compuestos pueden curar o remediar muchas enfermedades. De ahí que actualmente se tienda a combinar la quimioterapia, basada principalmente en el uso de productos sintéticos o hemisintéticos, con la fitoterapia que emplea básicamente plantas medicinales. Entre los helechos se pueden encontrar algunos ejemplos de aplicaciones en este sentido, así tenemos el culantrillo (Adiantum capillus-veneris) usado en afecciones respiratorias o el helecho macho (Dryopteris filix-mas) que tiene la filicina, una de las pocas drogas vegetales efectivas para tratar la teniasis, cuya actividad se debe a varios derivados del floriglucinol: aspidina, ácido flavaspídico y desaspidina (Luck, 1845).

Un grupo de compuestos especialmente interesante desde el punto de vista de la fitoecología son las fitoecdisonas, pertenecientes al grupo de los esteroides. En insectos y crustáceos las ecdisonas participan en los fenómenos responsables de la metamorfosis, estando presentes en muy baja cantidad en dichos animales (Hikino y Hikino, 1970; Nakanishi, 1971). Sin embargo, estos compuestos han sido encontrados en plantas, en cantidades elevadas, y concretamente el 30% de las fitoecdisonas analizadas se hallan en helechos (Hikino y col., 1973; Yen y col., 1974; Russell y Fenemore, 1971).

Otro compuesto de interés, también esteroideo, es la osladina. Se trata de un potente edulcorante, aislado del rizoma de la especie Polypodium vulgare (Jizba y col., 1971) que es 3000 veces más potente que la sacarosa.

### 1.7.3. Conservacionista

Los pteridófitos son un grupo vegetal muy arcaico que ha ido en regresión a lo largo de la historia siendo en la actualidad la división del Reino Vegetal menos numerosa, en la que la gran mayoría de sus especies se distribuyen en las zonas intertropicales, abundando los endemismos y los relictos. Asimismo, los pteridófitos aparecen generalmente asociados a ecosistemas frágiles. Todo ello hace que exista actualmente una necesidad urgente de proteger a las especies más amenazadas (Lucas y Synge, 1978). Para ello, se puede proceder al almacenamiento de material vegetal en bancos de esporas, de protalos o de explantos del esporófito, eliminando los problemas de espacio que presentan las colecciones naturales de los Jardines Botánicos. Asimismo, la aplicación de técnicas más sofisticadas que actualmente vienen siendo empleadas con tejidos animales y vegetales como la crioconservación debe ser tenido en cuenta para el mantenimiento de la reserva actual de genotipos tan primitivos.

## 1.8. METODOS CONVENCIONALES DE PROPAGACION

Los métodos de propagación de los helechos que tradicionalmente se han empleado son distintos en cada género pero, en general, se pueden agrupar en tres categorías: propagación por esporas, por estolones y por división de mata.

### 1.8.1. Propagación por esporas

Este método se lleva a cabo siguiendo el ciclo vital de estas plantas y comienza con la siembra de las esporas. El método es el siguiente. Cuando los esporangios maduran, es decir, cuando adquieren un color marrón o negro es el momento de recoger las esporas. Esta recogida se puede realizar por diversos procedimientos. Uno de ellos consiste en recubrir la fronde con un cucurucho de papel en el que caen las esporas que salen de los esporangios. Otro consiste en envolver la fronde que tiene esporangios maduros con papel y dejarla secar a una temperatura de unos 21°C durante una semana, pasada la cual se criba todo para separar las esporas de los restos de la fronde. Una vez obtenidas las esporas se siembran, sin enterrarlas, en macetas que contengan tierra estéril, húmeda y perfectamente drenada. Las macetas se tapan con un cristal y se sitúan en una zona sombreada con temperaturas entre 18 y 24°C. Las esporas al germinar producen protalos en los cuales se forman anteridios y arquegonios. Al cabo de 3-6 meses se produce la fecundación y se origina el cigoto que da lugar al embrión y éste al esporófito que, tras varios meses, cuando alcanza un cierto desarrollo, está ya listo para la venta. En general, suelen transcurrir de 14 a 18 meses entre la siembra de las esporas y la obtención de un esporófito idóneo para el mercado (Hartman y Kester, 1968; Miranda de Larra, 1975).

### 1.8.2. Propagación por estolones

Este método se basa en la capacidad de los estolones para dar lugar a nuevas plantas. Los estolones son tallos modificados producidos espontáneamente por la planta y que ésta utiliza para su multiplicación asexual. El método consiste básicamente en tomar los estolones producidos por la planta en primavera u otoño y enterrarlos en macetas sin separarlos de la planta madre. Una vez que se forma una nueva planta se separa ésta y se obtiene así una planta esporofítica independiente. Por este método se obtienen plantas listas para la venta al cabo de un año (Miranda de Larra, 1975).

### 1.8.3. Propagación por división de mata

Este método es el más sencillo y consiste, básicamente, en que una vez que la planta ha alcanzado el tamaño apropiado se separa la mata cortando el rizoma en trozos pequeños con unas pocas frondes cada uno. Cada una de las pequeñas matas así obtenidas se pone en una

maceta y dará lugar a una nueva planta esporofítica. La mejor época para realizar esta operación es, en general, al inicio de la primavera, en los meses de Marzo-Abril, ya que éste es el momento de mayor crecimiento en estas plantas.

## 1.9. CULTIVO IN VITRO

El cultivo "in vitro" de órganos o tejidos vegetales consiste en el crecimiento del material vegetal, previamente desinfectado, en un ambiente estéril, controlado y sobre un sustrato nutritivo definido o semidefinido. El trabajo pionero en este campo se debe a Haberland, quien en 1902 con su intento de cultivar células foliares de varias angiospermas marcó el nacimiento de estos métodos basados en el hecho de la totipotencia celular vegetal. Actualmente, los descubrimientos anteriores están facilitando los estudios en campos muy diferentes llevando a cabo investigaciones de procesos fisiológicos, morfogenéticos, estructurales, genéticos y patológicos (Ingram, 1980; Nickell, 1980; Chaleff, 1981; Tran Than Van, 1981).

### 1.9.1. Aplicaciones

Estos desarrollos científicos han tenido como consecuencia numerosas aplicaciones prácticas con una interesante incidencia económica (Murashige, 1977).

#### A. Producción de sustancias de interés industrial

Muchas sustancias utilizadas en la industria farmacéutica, alimentaria y de perfumería se originan en los vegetales y aunque desde hace unos veinte años se recurre a la síntesis química para satisfacer las necesidades, los vegetales siguen siendo la fuente más importante para la obtención de estos compuestos (Yeoman y col., 1980). También los cultivos de células vegetales son capaces de llevar a cabo reacciones de biotransformación de compuestos orgánicos añadidos al medio, esto hace posible transformar sustancias de escaso interés en otras de elevado valor científico y comercial (Reinhard y Alfermann, 1980). Así se han obtenido numerosos compuestos de los grupos de los fenilpropanoides, mevalonatos, alcaloides, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, nucleótidos y proteínas (Staba, 1980).

## B. Mejora vegetal

Las microsporas en cultivo "in vitro" pueden dividirse y dar lugar a callos o embrioides a partir de los cuales se pueden regenerar plantas. Estas plantas obtenidas son haploides y su interés está centrado fundamentalmente en la obtención de líneas isogénicas u homocigóticas con las que se pueden llevar a cabo cruzamientos cuyos descendientes manifestarán el llamado "vigor híbrido" o heterosis. En la producción de cereales tales como el maíz, el primer paso es la obtención de material homocigótico que se usará como líneas parentales (Chase, 1969). Con el uso de haploides se producen líneas puras con un considerable ahorro de tiempo.

## C. Ingeniería genética

Uno de los más significativos desarrollos en el campo del cultivo de tejidos vegetales durante los últimos años ha sido el aislamiento, cultivo y fusión de protoplastos (Cocking, 1972). Los protoplastos tienen la propiedad de ser capaces de tomar macromoléculas y partículas tales como la ferritina, poliestireno, látex, proteínas, DNA, virus, bacterias e incluso un núcleo entero o un cloroplasto aislado. Esta propiedad de los protoplastos puede ser utilizada para incorporar información deseable en la planta (Heyn y col., 1974).

## D. Establecimiento de bancos de germoplasma

Es otra de las aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura, que va asociada al almacenamiento a bajas temperaturas del material vegetal, en los bancos de genes. El almacenamiento de semillas a temperaturas ultrabajas tiene el inconveniente de que siempre se presenta una pérdida notable de fertilidad. El mantenimiento de células somáticas indiferenciadas o de meristemos mediante crioconservación ofrece una alternativa eficaz en este campo (Whithers, 1980).

## E. Propagación "in vitro"

La micropropagación persigue uno o más de los siguientes objetivos (De Fossard, 1976):

- eliminación de virus de stocks infectados; estas técnicas se basan en el hecho de que las células meristemáticas de los ápices de las plantas enfermas no se contaminan debido, posiblemente, a su falta de conexión vascular, vía de invasión del virus
- multiplicación clonal rápida de ejemplares o variedades interesantes
- propagación vegetativa de especies difíciles
- propagación de clones durante todo el año

Es interesante considerar asimismo las elevadas tasas de multiplicación que se obtienen, el corto ciclo de generación, el poco espacio necesario para mantener un elevado stock de plantas, la posibilidad de propagar clonalmente material juvenil y el rápido crecimiento del material seleccionado (Abbott, 1977, 1978).

Con cierta frecuencia se producen, bien espontáneamente o bien por manipulaciones en los explantos, plantas con características que difieren del cultivar. Generalmente, las plantas aberrantes son inferiores al cultivar, pero ocasionalmente, pueden originarse nuevas variedades con mejores cualidades y más ventajosas lo que es muy interesante en el caso de los helechos. Así, en el género *Nephrolepis*, cuando se propaga por el procedimiento convencional de multiplicación por estolones, de cada estolón se obtiene una única planta con un centro de crecimiento simple y sólo unas pocas frondes. En contraste, las plantas obtenidas mediante cultivo de tejidos "in vitro" pueden ser manipuladas para tener varios centros de crecimiento y muchas frondes, adquiriendo así un aspecto más atractivo (Murashige, 1974).

### 1.9.2. Factores que afectan al cultivo "in vitro"

El éxito de la aplicación de las técnicas de cultivo "in vitro" a las plantas está afectado por varios factores entre los que se pueden destacar por su importancia los siguientes (George y Sherrington, 1984):

- Genotipo del material de cultivo.
- Sustrato, que incluye los componentes del medio y reguladores

-Ambiente, es decir, las condiciones físicas bajo las cuales se produce el crecimiento.

-Factores intrínsecos del tejido.

De todos estos factores, son el sustrato y el ambiente los más fácilmente modificables por el investigador, con el fin de conseguir unas condiciones de cultivo idóneas para la obtención de plantas más interesantes desde el punto de vista comercial, tanto por su aspecto como por su bajo costo.

### 1.9.3. Cultivo "in vitro" de helechos

El cultivo "in vitro" de helechos ha planteado dos campos de actuación con diferentes repercusiones. En primer lugar, ha permitido el desarrollo de estudios relacionados con la biología básica de este grupo vegetal. En segundo lugar, ha supuesto una alternativa para la producción de especies con interés económico.

#### 1.9.3.1. Aspectos básicos del cultivo "in vitro" de helechos.

Según DeMaggio (1968), es posible completar el ciclo vital de un helecho partiendo de la espóra, en ambientes controlados, en cultivos asépticos y sobre medios nutritivos definidos. Con ello es posible aumentar nuestros conocimientos sobre todos aquellos procesos biológicos que tienen lugar a lo largo de las distintas etapas del ciclo biológico de un helecho. Así se han llevado a cabo estudios en diferentes campos:

#### A. Diferenciación y Desarrollo

El ciclo biológico de los helechos ha atraído la atención de numerosos investigadores por lo apasionante que resulta el estudio de la ontogenia de la alternancia de generaciones que en él tiene lugar, es decir cómo a partir de la misma constitución genética puede producirse tal disimilaridad morfológica y funcional (Whittier, 1971). Las desviaciones que en el ciclo han tenido lugar y que constituyen los fenómenos naturales de apogamia y aposporia, han descartado la variación en el nivel de ploidía como un posible mecanismo de control.

El gametófito de helechos homospóreos proporciona excepcionales oportunidades para

llevar a cabo estudios de fisiología y desarrollo. Miller (1968), establece que el pequeño tamaño y la simplicidad morfológica del joven gametófito permiten una medida fácil y directa de varios aspectos del crecimiento y diferenciación. La posibilidad de crecer un gran número de gametófitos en cultivos estériles sobre medios definidos permitió la realización de numerosos estudios experimentales. Dado que los gametófitos son multicelulares y autotróficos, exhiben algunas de las características fisiológicas y de desarrollo que puedan tener organismos más complejos. La diferenciación celular es evidente por la formación de rizoides y la transición del desarrollo filamentoso al bi-dimensional. La diferenciación organogénica implica la formación de anteridios y arquegonios. Aspectos fisiológicos incluyen respuestas fotomorfogénicas asociadas con la germinación de la espora y el crecimiento bidimensional del gametófito, respuestas a los reguladores del desarrollo y muchos aspectos metabólicos básicos de las plantas autótrofas.

Hirsch (1975, 1976), observa cómo la variación en la concentración de sacarosa administrada a segmentos foliares juveniles provoca respuestas morfogénicas diferentes hacia gametófito o esporófito. En callo de rizoma en *Pteris vittata* (Kshirsagar y Mehta, 1978) se aprecia cómo la presencia de azúcar en el medio favorece la diferenciación hacia esporófitos completos o bien órganos aislados (frondes, raíces), mientras que la ausencia de ésta sólo permite la regeneración de gametófitos.

## B. Comportamiento reproductivo

La conducta sexual del gametófito de los helechos es un aspecto especialmente importante y conocido en parte gracias al cultivo "in vitro". La formación de un esporófito a partir del gametófito en la naturaleza es difícil de estudiar dada la vulnerabilidad de dicha estructura ante condiciones ambientales que puedan favorecer su desecación (Peck y col., 1990) así como la falta de espacio existente en el seno de una población para permitir el asentamiento y desarrollo de un nuevo esporófito (Díaz, Comunicación Personal). Las nuevas frondes se limitan a crecer sobre rizomas preexistentes que así se perpetúan. Algunos autores (Wetmore y col., 1963) han sugerido que la reproducción vegetativa es más importante que la reproducción sexual para la existencia continuada de las plantas criptógamas vasculares.

La sincronía o asincronía en la formación y maduración de los gametangios desemboca en dos tipos de apareamiento: intra e intergametofítico, según tenga lugar entre gametos del

mismo protalo o pertenecientes a protalos diferentes (originados a partir del mismo esporófito o de esporófitos diferentes). El comportamiento ecológico de las especies, su capacidad de invasión y colonización de nuevos hábitats será una consecuencia de ello.

Si bien la mayoría de los helechos presentan una secuencia en la cual en primer lugar se forman los anteridios y poco después se producen arquegonios a la vez permitiendo así el apareamiento intragametofítico, otros, por el contrario, mantienen una separación temporal en cuanto a la formación de anteridios y arquegonios, forzando el cruzamiento intergametofítico y el intercambio genético, lo que les concederá menos poder de colonización. Existen mecanismos que favorecen esta situación como el sistema anteridiógeno, que controla la formación de anteridios (Döpp, 1950; Näf, 1956) cuya naturaleza es conocida en algún helecho, presentando una estructura química que se relaciona con el grupo de las giberelinas.

La densidad gametofítica repercute directamente en la expresión sexual, es decir, en la formación de gametófitos machos, hembras o hermafroditas. Así, Klekowski (1970) trabajando con *Ceratopteris* (especie ampliamente utilizada en trabajos relacionados con la biología básica por poseer un ciclo vital muy corto) encuentra una expresión sexual variable con bajas densidades de esporas y una relativamente constante expresión sexual con altas densidades de esporas. Warne y Lloyd (1987) en estudios hechos con la misma especie han observado que la frecuencia de gametófitos hermafroditas disminuye conforme aumenta la densidad. Densidades elevadas favorecerían la expresión masculina por acumular concentraciones elevadas de anteridiógeno, en aquellas especies reguladas por este mecanismo. La densidad puede influir en el sistema de reproducción.

### C. Expresión y Regulación génica

Además de la utilidad del gametófito en experimentación fisiológica y del desarrollo también presenta muchas ventajas en estudios genéticos. Las características de simplicidad morfológica, tamaño pequeño, cultivo estéril y disponibilidad de gran número de gametófitos son de gran valor. Por otra parte, la capacidad de autofecundación del gametófito permite obtener fácilmente individuos enteramente homocigóticos, proporcionando uno de los mejores diseños experimentales. A causa de la independencia de las generaciones gametofítica y esporofítica, también es posible estudiar expresión génica y regulación tanto en la generación

haploide, no vascular, como en la compleja generación vascular diploide (Hickok, 1985).

### 1.9.3.2. Aspecto práctico del cultivo "in vitro" de helechos: Micropropagación

La aplicación de este tipo de cultivos a la propagación de los helechos comenzó con los trabajos de Wetmore y Morel en 1949, quienes regeneran plantas cultivando el meristemo apical de Adiantum pedatum. Posteriormente, se han propagado otras especies de helechos utilizando como fuente de explantos otras partes de la planta. Así ha sido aprovechada la capacidad de formar estolones en el género Nephrolepis para inducir la proliferación de brotes y conseguir elevadas tasas en la formación de nuevos ejemplares (Loescher y Albrecht, 1979; Padhya, 1987; Padhya y Mehta, 1982) siendo en la actualidad una de las especies de helechos más comercializadas.

## 1.10. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Queda pues justificado el interés en la micropropagación "in vitro" de los helechos, ya que se trata de un grupo vegetal con implicaciones en numerosos campos de importancia económica y social.

El objetivo de este trabajo es lograr la multiplicación de helechos mediante la aplicación de las técnicas del cultivo "in vitro".

El planteamiento general del trabajo comienza con el cultivo de esporas, en un intento de combatir los grandes problemas de contaminación que plantean los explantos obtenidos de material adulto, al tiempo que permite trabajar con material juvenil, que presenta siempre mayor potencialidad morfogénica.

Iniciar los cultivos con esporas obliga a conseguir el desarrollo tanto de las esporas como de los gametófitos formados tras la germinación de aquellas, por tanto y en primer lugar se determinarán las condiciones de cultivo más adecuadas en cada caso.

Se realizarán estudios en los cultivos de gametófitos encaminados a conseguir un mayor conocimiento de los mecanismos reproductivos por los cuales tiene lugar la formación de esporófitos, valorando las tasas de producción y analizando las posibilidades de incidir

sobre dicha capacidad reproductiva, aumentando los niveles de producción.

Por último, una vez obtenidos los esporófitos, se ensayará la capacidad morfogénica de estos, así como de los gametófitos, en base al establecimiento de otros sistemas de multiplicación.

Se exponen a continuación las etapas generales del trabajo.

#### ETAPA I. CULTIVO IN VITRO DE ESPORAS

- Asepsia
- Condiciones de cultivo
- Tasa de germinación
- Tasa de contaminación

#### ETAPA II. CULTIVO IN VITRO DE GAMETOFITOS

- Condiciones de cultivo
- Crecimiento y desarrollo

#### ETAPA III. FORMACION DE ESPOROFITOS

- Mecanismos reproductivos
- Tasa reproductiva

#### ETAPA IV. SISTEMAS DE MULTIPLICACION

- Inciendo sobre la capacidad reproductora del gametófito
- Inciendo sobre la capacidad morfogénica del gametófito y del esporófito

#### ETAPA V. ACLIMATACION Y PASO A TIERRA

## BIBLIOGRAFIA

- Abbott, A.J., 1977. Propagating temperate woody species in tissue culture. *Scient. Hort.* 28:155-162.
- Abbott, A.J., 1978. Practice and promise of micropropagation of woody species. *Acta Hort.* 79:113-127.
- Anderson-Köto, J., 1932. Observations on the inheritance of apospory and alternation of generations. *Svensk Bot. Tidskr.* 26:99-106.
- Chaleff, R.S., 1981. Genetics of higher plants: Applications of cell culture. Newth, D.R. y Torrey, J.G., eds. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Chase, S.S., 1969. Monoploids and monoploid-derivates of maize (*Zea mays* L.). *Bot. Rev.* 35:117-167.
- Cocking, E.C., 1972. Plant cell protoplast, isolation and development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23:29-50.
- De Fossard, R.A., 1976. Tissue culture for plant propagators. University of New England Printery, Armindale.
- DeMaggio, A.E., 1968. Meiosis "in vitro": sporogenesis in cultured fern plants. *Amer. J. Bot.* 55:915-922.
- Díaz Gonzalez, T.E., 1981. Los Helechos, Licopodios y Colas de caballo (Pteridofitos). *Enciclopedia Temática de Asturias*, 1:178-207. Ed. Silverio Cañada. Gijón. Asturias.
- Döpp, W., 1950. Eine die Antheridienbildung bei farnen fördernde substanz in den prothallien von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, 63:139.
- Font Quer, P. 1977. *Diccionario de Botánica*. Ed.Labor, Barcelona.

George, E.F. y Sherrington, P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Eversley, Basingstoke. Hants.

Gola, G., Negri, G., Cappelletti, C., 1965. Tratado de Botánica. Labor S.A., Barcelona.

Haberland, G., 1902. Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sit. Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111:69-92.

Hartman, H.T. y Kester, D.E., 1968. Plant propagation. Principles and practices. Prentice-Hall Inc.Engelwood Cliffs, New Jersey.

Heyn, R.F., Rösch, A., Schilderoort, R.A., 1974. Prospects in genetic engineering of plants. Quart. Rev. Biophys. 7:35-73.

Hickok, L.G., 1985. Abscisic acid resistant mutants in the fern *Ceratopteris*: characterization and genetic analysis. Can.J.Bot. 63:1582-1585.

Hikino, H. y Hikino, Y., 1970. Arthropod molting hormones. In: Fortschr. Chem. Organ.Naturstoffe (Herz, W., Grisebach, H., Scott, A.I. eds.). 28:256. Springer. New York. Springer.

Hikino, H., Okuyama, T., Jin, H., Takemoto, T., 1973. Screening of Japanese ferns for phytoecdysones. I. Chem. Pharm. Bull. (Japan). 21:2292.

Hirsch, A.M., 1975. The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes. Plant Physiol. 56:390-393.

Hirsch, A.M., 1976. The development of aposporous gametophytes and regenerated sporophytes from epidermal cells of excised fern leaves: an anatomical study. Amer.J.Bot. 63(3):263-271.

Ingram, D.S., 1980. Tissue culture methods in plant pathology. En: Tissue Culture Methods for Plant Pathologist. Ingram, D.S. y Helgeson, E., eds. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Jizba, J., Dolejs, L., Herout, V., Sorm, F., 1971. The structure of Osladin- The sweet principle of the rhizomes of Polypodium vulgare L. Tetrah. Lett. 1329.

Klekowski, E.J., 1970. Reproductive biology of the Pteridophyta IV. An experimental study of mating systems in Ceratopteris thalictroides (L.) Brongn. Bot. J. Linn. Soc. 63:153-169.

Kshirsagar, M.K. y Mehta, A.R., 1978. In vitro studies in ferns: growth and differentiation in rhizome callus of Pteris vittata. Phytomorphology, pp:50-58.

Loescher, W.H. y Albrecht, C.N., 1979. Development in vitro of Nephrolepis exaltata cv. Bostoniensis runner tissues. Physiol.Plant. 47: 250-254

Lucas, G. y Synge, H., 1978. The I.U.C.N. plant red data book. I.U.C.N.

Luck, E., 1845. Isolation of Filixic acid from Dryopteris filix-mas. Liebigs Ann. Chem. 54: 119.

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

Miller, J.H., 1968. Fern gametophytes as experimental material. Bot. Rev. 34:361-440.

Miranda de Larra, J., 1975. Cultivos ornamentales. Ed.Aedos, Barcelona.

Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.

Murashige, T., 1977. Current status of plant cell and organ culture. Hort. Sci. 12:3-6.

Näf, U., 1956. The demonstration of a factor concerned with the initiation of antheridia in Polypodiaceous ferns. Growth, 20:91-105.

Nakanishi, K., 1971. The ecdysones. Pure Appl. Chem. 25:167.

- Nickell, L.G., 1980. Products. En: Plant Tissue Culture as a source of Biochemicals. Staba, J., ed. CRC Press. Boca Ratón. Florida.
- Padhya, M.A. 1987. Mass propagation of ferns through tissue culture. Acta Horticulturae 212:645-649
- Padhya, M.A. y Mehta, A.R., 1982. Propagation of fern Nephrolepis through tissue culture. Plant Cell Reports 1:261-263
- Peck, J.H., Peck, C.J., Farrar, D.R., 1990. Influences of life history attributes on formation of local and distant fern populations. Amer. Fern J. 80(4):126-142.
- Pichi-Sermoli, R.E.G., 1977. Tentamen pteridophytorum genera in taxonomicum ordinem redigendi. Webbia, 31:313-512.
- Reinhard, E. y Alfermann, A.W., 1980. Biotransformation for plant cell. Adv. Bioch. Engeniering, 16:50-81.
- Russell, G.B. y Fenemore, P.G., 1971. Insect molting hormone activity in some New Zealand ferns. N.Z.J. Sci. 14:31.
- Sheffield, E.; Laird, S.; Bell, P.R., 1983. Ultrastructural aspects of sporogenesis in the apogamous fern Dryopteris borreeri. J. Cell. Sci. 63:125-134.
- Staba, E.J., 1980. Secondary metabolism and biotransformation. En: Plant Tissue Culture as a source of biochemicals. CRC Press Inc. Boca Ratón. Florida:55-99.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A.F.W., 1974 Tratado de Botánica. Ed. Marin, Barcelona.
- Tran Than Van, K.M., 1981. Control of morphogenesis "in vitro" culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 32:291-407.
- Warne, T.R. y Lloyd, R.M., 1987. Gametophytic density and sex expression in Ceratopteris.

Can.J.Bot. 65:362-365.

Wetmore, R.H. y Morel, G., 1949. Growth and development of Adiantum pedatum L. on nutrient agar. Amer. J. Bot. 36:805-806.

Wetmore, R.H.; De Maggio, A.E.; Morel, G., 1963. A morphogenetic look at the alternation of generations. Maheshwari Comm. Vol., J. Indian Bot. Soc. 42A:306-320.

Whithers, L.A., 1980. Low temperature storage of plant tissue culture. Ad. Bioch. Engeniering. 18, Plant Cell Cultures II (ed. Fiechter, A.). Springer, Berlín. pp:102-150.

Whittier, D.P., 1971. The value of ferns in an understanding of the alternation of generations. BioScience 21:225-227.

Yen, K.Y., Yang, L.L., Okuyama, T., Hikino, H., Takemoto, T., 1974. Screening of Formosan ferns for phytoecdysones. I. Chem. Pharm. Bull. (Japan). 22:805.

Yeoman, M.M., Miedzybrodzka, M.B., Lindsey, K., McLauchlan, W.R., 1980. The synthetic potential of cultured plant cell. En: Plant cell Culture: Results and Perspectives. Elsevier-North Holland, Amsterdam.



## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. INTRODUCCION

En este capítulo se describen los materiales y métodos que han sido empleados durante la realización de la Tesis Doctoral. Aquellos que se hayan utilizado de forma puntual se incluyen en el correspondiente capítulo.

### 2.2. MATERIAL VEGETAL

Para llevar a cabo el trabajo se utilizaron esporas procedentes tanto de especies autóctonas de la Comunidad Asturiana como foráneas.

#### Especies autóctonas

- Osmunda regalis L.
- Blechnum spicant L.
- Dryopteris affinis sp. affinis (Lowe) Fraser-Jenkins

#### Especies foráneas

- Asplenium nidus L.
- Pteris ensiformis L.
- Woodwardia virginica Sm.

A continuación se citan las características botánicas generales de los helechos con los que se ha trabajado.

Blechnum spicant L. Pertenece al Orden Blechnales que es bastante diferente del resto de los helechos, por lo que se cree que tiene un origen muy remoto, probablemente a partir del mismo grupo del que derivaran las Dryopteridales, divergiendo como una línea filogenética independiente. Sólo tiene un familia: Blechnaceae. Presenta rizoma grueso, oblícuo, corto, densamente revestido en el ápice de páleas linear-lanceoladas, castaño-oscuro. Frondes 8-70 x 3-7 cm, fasciculadas, heteromorfas excepto en la variedad homophyllum, con 25-60 pares de pinnas; las estériles más o menos persistentes en invierno, cortamente

pecioladas, de lámina oblongo-lanceolada, atenuada en la base y pinnas de 3-5 mm de anchura; las frondes fértiles, marcescentes, poco numerosas, naciendo en la parte central del fascículo, largamente pecioladas, de lámina lanceolada y pinnas más espaciadas de 1-2 mm de anchura. Esporas ovoideas, de color castaño, con perisporio ligeramente rugoso.  $2n=68$ . Ocupa zonas húmedas y umbrosas, en suelos ácidos; 0-2200m. Esporulación desde Abril hasta Septiembre. Se distribuye por Europa, Islandia, N. de Africa, Macaronesia (excepto Cabo Verde) Asia Menor y Cáucaso (Tomado de Flora Ibérica, 1986).

En la Península Ibérica aparece distribuída por las regiones occidentales, de clima húmedo. Forma parte del sustrato ácido y húmico. Es frecuente encontrarlo en hayedos, alisedas, melojares. Contiene leucoantocianos que actúan sobre la permeabilidad capilar. Se emplean sus frondes en infusión como antihemorroidal. La lustrosidad de sus frondes y la escasa luz que necesitan para vivir hacen que las especies del género Blechnum resulten ideales para decorar interiores.

Dryopteris affinis (Lowe) Fraser-Jenkis sp.affinis. Pertenece al Orden Aspleniales. Fam. Dryopteridaceae. Tiene una lámina coriácea y brillante. Pínnulas distanciadas, truncado-redondeadas, con pocos dientes prominentes en el ápice. Esta subespecie es un diploide apomíctico originado probablemente por el cruzamiento de D.wallichiana y D.oreades. Es la subespecie más frecuente en nuestra Península, estando tan solo ausente en las regiones surorientales.  $2n=82$ . Se halla presente en taludes y laderas de bosques o roquedos; indiferente al sustrato; 0-2000 m. Esporulación de Mayo a Noviembre. Se distribuye por el W de Europa, NW de Africa, Macaronesia, N. de Turquía y Cáucaso (Tomado de Flora Ibérica, 1986).

Osmunda regalis L. Orden Osmundales. Fam. Osmundaceae. Se conocen una gran cantidad de especies fósiles, siendo notable la constancia de caracteres entre las de épocas remotas y las actuales. Esto hace pensar que las pocas especies existentes en la actualidad son los últimos supervivientes de una línea conservada y primitiva, la cual tenía frustrado su potencial evolutivo muy tempranamente (Salvo Tierra, 1990).

La especie O.regalis tiene rizoma horizontal, leñoso, grueso y negro. Frondes 0,5-2,5m, erectas; raquis canaliculado; lámina 2 pinnada, ovado-lanceolada; pínnulas oblongo-lanceoladas, asimétricas, con peciolo nulo o corto y borde entero o aserrado. Frondes

fasciculadas, de desarrollo anual, heteromorfas; las interiores fértiles. Esporangios dispuestos en forma de panícula en la parte superior de las frondes, subglobosos, cortamente pediculados, provistos de un grupo lateral de células poligonales con paredes engrosadas, que determinan su dehiscencia en 2 valvas por medio de una hendidura apical. Esporas verdes, con clorofila.  $2n=44$ . Se encuentra en alisedas, bordes de ríos y riachuelos y otras zonas húmedas, en suelos preferentemente acidófilos, entre 0-900 m. Esporulación desde marzo hasta septiembre. Amplia distribución en las zonas templadas y tropicales, faltando en Australia e islas del Pacífico (Tomado de Flora Ibérica, 1986)

Asplenium nidus L. Se conoce vulgarmente como Nido de Ave. Pertenece a la familia Aspleniaceae. Procede de la India y algunas islas del océano Pacífico. Es el helecho más cultivado de esta familia por la belleza de sus frondes simples, de color verde brillante, de hasta 180 cm. de longitud, que se elevan formando una corona que deja en su centro un profundo hueco.

Woodwardia virginica Sm. Pertenece a la familia Blechnaceae. Originaria de EE.UU. Sus frondes bipinnadas, de color verde muy suave, con largos peciolo purpúreos alcanzan hasta 0,9 m. de longitud, partiendo de un rizoma robusto del que surgen de forma aislada o en pequeños grupos, pero siempre apretados. Los soros aparecen en la cara inferior de las frondes en forma de dos hileras a lo largo de la línea media de cada pinnula.

Pteris ensiformis L. Pertenece a la familia Pteridaceae. Es originaria de la India y Polinesia. Se reconoce por presentar frondes dimorfas, las estériles con segmentos elípticos a elíptico-lanceolados, las fértiles más grandes y con las divisiones de mayor longitud y estrechas.

## 2.3. CULTIVO DE ESPORAS

### 2.3.1. Recolección

Fronde con los esporangios a medio madurar fueron colocadas entre hojas de papel, en una habitación a 25°C. Tras la apertura de los esporangios, las esporas se depositaron sobre el papel recogiendo con un pincel y almacenándolas en un frasco seco, a 4°C, hasta el momento de su cultivo.

### 2.3.2. Asepsia

Las esporas estuvieron imbibiendo en agua destilada estéril durante 24h. A continuación se eliminó el agua y se añadió una solución de NaClO ( $5 \text{ gl}^{-1}$ ) que se dejó actuar durante 10 min. Dicha solución incluía el detergente Tween 20 (0.1%), (Hughes, 1981), el cual administrado en dosis adecuadas no afecta la viabilidad de la spora (George y Sherrington, 1984). A continuación se realizaron lavados sucesivos con agua destilada estéril para eliminar el exceso de solución desinfectante. Todos los cambios de soluciones empleados durante el proceso de desinfección se realizaron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 3 min.

### 2.3.3. Siembra

Una vez desinfectadas las esporas, éstas permanecieron inmersas en agua hasta su cultivo. Llegado este momento, se tomaron alícuotas de la suspensión de esporas con una pipeta Pasteur y se vertieron en el medio nutritivo descrito por Knudson (1946). Las condiciones de cultivo fueron  $25^{\circ}\text{C}$  de temperatura, fotoperíodo de 16h luz e intensidad de  $40\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

## 2.4. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

### 2.4.1. Nutrientes

El medio de Murashige y Skoog (1962), (Tabla 2.1) ha sido ampliamente utilizado para realizar cultivos "in vitro" con especies vegetales. Para su más fácil manejo, los componentes del medio se agruparon en soluciones madre: A (macronutrientes), B (micronutrientes), C (quelante), y D (compuestos orgánicos). Estas se prepararon 10, 1000, 100 y 100 veces concentradas, respectivamente. Para la preparación de 1l de medio se tomaron los volúmenes siguientes:

Solución A	100 ml
Solución B	1 ml
Solución C	10 ml
Solución D	10 ml

Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo (mM). \*= $\mu$ M. Soluciones nutritivas de: Knop=KP (1865), Knudson=KD (1946); Klekowski=MK (1969) y Murashige y Skoog=MS (1962). Se añade la letra de la solución madre en la que se almacena el compuesto.

MEDIO DE CULTIVO — — NUTRIENTES —	KP	KD	MK	MS
NO <sub>3</sub> K	2,47		1 A	18,8 A
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>				20,6 A
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4,23	4,23 K		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76	1,76 K		1,2 A
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O			0,5 A	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O			0,3 A	3,0 A
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,01	1,01 L	0,1 A	1,5 A
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		1,93 L		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0,08 L	0,08 C	0,1 C
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O		0,33 L		100* B
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O				0,1* B
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O				1,0* B
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O			0,14* B	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O			1,0* B	29,9* B
HBO <sub>3</sub>			30,0* B	100* B
KI				5,0* B
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O			0,96* B	0,1* B
(NH <sub>4</sub> )Cl			0,25 A	
Na <sub>2</sub> EDTA			0,09 C	0,1 C
MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O			13,8* B	
Ac. Nicotínico				4,06 D
Piridoxina HCl				2,43 D
Tiamina HCl				0,30 D
Inositol				555,1 D
Glicina				26,60 D

Se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml.

Otro medio utilizado (Tabla 2.1) fue el descrito por Knudson (1946) ampliamente referido en la bibliografía para el cultivo de esporas y gametófitos de helechos. Las sales minerales se almacenaron en dos soluciones madre 10 veces concentradas y para la elaboración de 1 l de medio se tomaron 100 ml de cada solución y se completó el volumen hasta 1000 ml con agua destilada.

El tercer medio utilizado fue el descrito por Knop (1865). Se trata de una solución mineral muy sencilla (Tabla 2.1) que incluye sólo macronutrientes. Para su preparación se elaboró una solución madre 10 veces concentrada y para la elaboración de 1 l de medio se tomaron 100 ml de la solución y se completó el volumen hasta 1000 ml con agua destilada.

Se utilizó un cuarto medio para el cultivo del gametófito de Blechnum spicant, descrito por Klekowski (1969) que consta de los macronutrientes de Parker y los micronutrientes de Thompson (Tabla 2.1). Para su preparación se elaboraron tres soluciones madre: A (macronutrientes), B (micronutrientes) y C (quelante). Estas se prepararon 10, 1000 y 100 veces concentradas, respectivamente) y se tomaron las siguientes cantidades para preparar 1 l de medio:

Solución A	100 ml
Solución B	1 ml
Solución C	10 ml

Se añada agua hasta 1000 ml de volumen final.

En todos los medios empleados se añadía sacarosa 87,4 mM, a no ser que la variación en la concentración de este compuesto fuese objeto de estudio.

#### 2.4.2. Reguladores del crecimiento

Para influir sobre ciertos procesos morfogénicos se utilizaron reguladores del crecimiento. Para ello, se prepararon y almacenaron en soluciones madre como sigue:

## AUXINAS

-ácido indol-3-butírico (AIB): 1 mg/ml de NaOH 0.05N

-ácido naftalenacético (ANA): 1 mg/ml de NaOH 0.05N

-ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D): 1 mg/ ml(0,3 ml 100% Etanol+0,7 ml H<sub>2</sub>O)

## CITOQUININAS

-6-furfurilaminopurina (Kn): 1 mg/ml 0.2N HCl (0.2 ml 1N HCl + 0.8 ml H<sub>2</sub>O)+calor

-6-benzilaminopurina (BAP): 1 mg/ml de HCL 0.2N (0.2 ml 1N HCl+ 0.8 ml H<sub>2</sub>O)+calor

## GIBERELINAS

-ácido giberélico (GA<sub>3</sub>): 1 mg/ml agua destilada

### 2.4.3. pH

El medio de cultivo debe tener unos valores de pH que resulten tolerables por los tejidos vegetales. Para ello, se ajustó este parámetro a 5.7 con NaOH (1N y/o 0.1N) y HCl (1N y/o 0.1N) siempre que no fuese objeto de estudio ensayar otros valores.

### 2.4.4. Estado físico del medio de cultivo

Se usó medio de cultivo en estado sólido y líquido. La solidificación del medio se realizó utilizando Bacto-agar (Difco) al 0.7%.

Una vez preparado el medio nutritivo, si éste iba a ser sólido, se procedía a disolver el agar, en el autoclave a tiempo 0, 0.85 atm. de sobrepresión y 120°C de temperatura o bien se utilizaba un microondas. Una vez disuelto el agar se dosificaba el medio en tubos de vidrio para cultivo de 2.5 x 16 cm o bien en tarros de vidrio de 150 ml mediante un dosificador de medio PETRIMAT (Struers).

#### 2.4.5. Esterilización

Los tubos o los tarros de cultivo que contienen el medio nutritivo eran introducidos en el autoclave para proceder a su desinfección, manteniéndolos durante 17 min en las condiciones de presión y temperatura anteriores.

El material de vidrio y utensilios se esterilizaron en autoclave a la presión ya citada, durante 30 min o bien se mantuvieron en una estufa a 120°C durante, al menos, 2h.

#### 2.5. CONDICIONES AMBIENTALES

Los cultivos se mantuvieron en cámara de crecimiento a 25°C y con un fotoperíodo de 16h luz cuando la duración del régimen de luz no era objeto de estudio. La fuente de iluminación la constituían tubos fluorescentes de luz fría (GTE International) que proporcionaban una intensidad de luz de  $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### 2.6. MICROSCOPIA OPTICA

Las técnicas empleadas para la observación al microscopio de los tejidos vegetales fueron dos:

-observación en fresco

-inclusión en parafina

##### 2.6.1. Observación en fresco

En este caso, los gametófitos eran colocados sobre un porta, efectuando cortes a mano alzada si el material presentaba varias capas celulares (zona de la almohadilla). Una vez colocados los trozos de gametófito sobre el porta se añadía agua para evitar su desecación.

## 2.6.2. Inclusión en parafina

Cuando se empleó esta técnica los explantos fueron fijados, lavados, deshidratados e impregnados en un solvente de la parafina, incluidos y seccionados al microtomo (Johansen, 1940). Los cortes obtenidos se fijaron sobre portaobjetos, se tiñeron y se montaron en bálsamo.

### 2.6.2.1. Fijación

Mediante este proceso se consiguió la permanencia de todos los elementos estructurales y celulares sin que se ocasionaran cambios en la morfología ni se modificaran las propiedades físicas de las sustancias que los constituyen.

En este trabajo se utilizó el fijador FAA. Las piezas se mantuvieron en él de 24 a 48h y se lavaron posteriormente en agua corriente durante 2-4h, eliminando así el exceso de fijador.

#### Preparación del fijador FAA:

-Alcohol etílico 96°	17 ml
-Formol al 40%	2 ml
-Acido acético	1 ml

### 2.6.2.2. Deshidratación de los tejidos e impregnación por un solvente de la parafina

La eliminación del agua presente en las diferentes porciones del tejido se consiguió mediante el paso de éstos a través de una serie de soluciones alcohólicas, durante los tiempos que se indican a continuación (Jensen, 1962):

SERIE	AGUA	ETANOL 96%	BUTANOL	TIEMPO
50	50	40	10	2h
70	30	50	20	"
85	15	50	35	"
95		45	55	"
100		25	75	"
BP1			100	12h
BP2			100	"
BP3			100	"

### 2.6.2.3. Inclusión

Se colocan las muestras en cápsulas de porcelana que contienen parafina previamente fundida, y se llevan a cabo los siguientes pasos:

Tolueno+Parafina	45 min-4h
Parafina 1	"
Parafina 2	"
Parafina 3	Inclusión definitiva

Este último paso tiene como fin dejar el material vegetal incrustado en un bloque sólido que permita un manejo fácil a la hora de realizar los cortes. Mediante las piezas de Leucart y sobre una placa metálica bien limpia se construyeron los bloques, en cuyo interior se colocaron las piezas de tejido a estudiar. Todas las operaciones se realizaron lo más rápidamente posible para evitar la solidificación de la parafina.

### 2.6.2.4. Corte del material

Primeramente, dado que suelen colocarse varias piezas por bloque de parafina, se tallaron éstas en forma de pirámide, que permite realizar los cortes de forma continuada. Una vez talladas las piezas, se pegaron sobre el soporte del microtomo y se procedió al seccionado, para lo que se utilizó un microtomo rotatorio JUNG, modelo 1130, que permitió

obtener secciones entre 6 y 8 $\mu$ m.

#### 2.6.2.5. Preparación de los cortes

Se utilizaron portaobjetos sobre los cuales se extendió una solución de albúmina de huevo. Se colocaron las tiras de los cortes y a continuación se añadió agua cuidadosamente, dejándolos secar sobre una placa caliente hasta que las secciones de tejido quedaron totalmente estiradas.

#### 2.6.2.6. Tinción

Una vez secas, las secciones de tejidos pegadas sobre el portaobjetos fueron sometidas al proceso de tinción. En este caso el colorante utilizado fue el azul de Toluidina. Este colorante se emplea para detectar la presencia de sustancias fenólicas que se colorean de azul verdoso o azul oscuro. A su vez colorea de verde las paredes lignificadas, de rosa fuerte los parénquimas y de rojo el floema. Diferencia, asimismo, muy claramente, el núcleo. La solución de Toluidina fue preparada en tampón acetato 0.1M, pH=4.4, al 0.1% (Feder y O'Brien, 1968; Ling-Lee y col. 1977).

Antes de realizar la tinción, los cortes se desparafinaron en dos baños de xilol de 5 min cada uno y se hidrataron, pasándolos a través de una serie de alcoholes de gradación decreciente: absoluto, 96%, 70%, 40%, permaneciendo 2-3 min en cada solución. Posteriormente, se introdujeron en un baño de agua, durante 5 min. A continuación, se mantuvieron 1 min en el colorante y se lavaron dos veces en agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, se secaron en la estufa a 30°C durante 12h. Si hay exceso de colorante en el tejido se diferencia éste introduciendo los cortes durante unos segundos en un baño de alcohol al 95% y en otro de alcohol absoluto.

#### 2.6.2.7. Montaje de las preparaciones

Este proceso se inicia con la inmersión de los portas en un baño de xilol durante unos segundos. Después de eliminar de los portaobjetos el exceso de xilol se añade una o dos gotas

de Bálsamo de Canadá y se coloca encima un cubreobjetos procurando que no queden burbujas atrapadas. Se dejan secar en la estufa a 35°C durante 1h.

#### 2.6.2.8. Observación y fotografiado

Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio Nikon, modelo Optiphot-XUWR-L-Plano, dotado de un equipo de epifluorescencia con lámpara de vapor de mercurio de alta presión de 50W, filtro de excitación B-IF 410-485, espejo dicroico DM 505 y filtro de absorción 515W. Las fotografías se tomaron con un equipo automatico de la misma marca, modelo HFMA y se utilizó película TX Kodak, sensibilidad 100 ASA.

### 2.7. ACLIMATACION Y PASO A TIERRA

Para proceder al trasvase de la planta desde el tarro de cultivo hasta la maceta con sustrato natural y condiciones ambientales de luz, humedad y temperatura, se sigue un proceso gradual. Primeramente se retira cuidadosamente del sistema radicular todo el agar que haya podido quedar retenido entre las raíces y se introduce la planta en una maceta que se mantiene en el interior de una bolsa de plástico. Al tiempo que el sistema radicular se adapta al nuevo sustrato, se va disminuyendo el tiempo en el interior de la bolsa para que la planta no acuse negativamente la diferencia de humedad existente entre el interior del tarro y el exterior.

### 2.8. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

Para valorar estadísticamente la diferencia entre tratamientos se procedio al contraste de las medias según el test de Student, utilizando un nivel de significacion del 0.05, (Parker, 1973).

## 2.9. BIBLIOGRAFIA

Castroviejo, S., Laínz, M., López González, G., Monserrat, P., Muñoz Garmendia, F., Paiva, J. y Villar, L. 1986. Flora Ibérica. Servicio de publicaciones del C.S.I.C. Madrid.

Feder, N. y O'Brien, T.P., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. Am. J. Bot. 55:123-127.

George, E.F. y Sherrington, P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture. Eastern Press, Reading, Berks.

Hughes, K.W., 1981. Vegetable Crops. En: Cloning Agricultural Plants via "in vitro" Techniques. (B.V. Conger, ed.) CRC Press. Boca Ratón. Florida.

Jenhsen, W.A., 1962. Botanical Histochemistry. W.H. Freeman eds. London.

Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. Edmund W. Sinnott ed. New York.

Klekowski, E.J., Jr., 1969. Reproductive biology of the pteridophyta. III. A study of the Blechnaceae. Bot. J. Linn. Soc. 62:361-377.

Knop, W., 1865. Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der Pflanzen. Landwirtsch Vers. Stn. 7:93-107

Knudson, L., 1946. A nutrient solution for the germination of orchid seed. Bull. Am. Orchid. Soc. 15:214-217

Ling-Lee, M., Chilvers, G., Asuforo, A., 1977. A histochemical study of phenolic materials in mycorrhizal and uninfected roots of Eucalyptus fastigata L. New Phytol. 78:313-328.

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

---

Parker, R.E., 1973. Introductory statistics for biology. Studies in Biology, 43. Edward Arnold, Londres.

Salvo Tierra, E., 1990. Guía de helechos de la Península Ibérica y Baleares. Ed. Pirámide, S.A. Madrid.

### 3. CULTIVO IN VITRO DEL GAMETOFITO: FACTORES NUTRICIONALES, AMBIENTALES Y CAPACIDAD DE REGENERACION

#### 3.1. INTRODUCCION

El gametófito del helecho representa una generación independiente, capaz de llevar a cabo las funciones más elementales que aseguren su supervivencia. Formado tras la germinación de la espora, se erige como una estructura vegetal sencilla, encargada básicamente de las tareas reproductivas.

El gametófito de los pteridófitos puede ser cultivado "in vitro" sobre un medio definido y en un ambiente controlado (Brandes, 1973) para llevar a cabo estudios variados, sobre crecimiento, desarrollo y diferenciación (Bopp, 1968; Miller, 1968; Sheffield y Bell, 1987). Asimismo, el cultivo del gametófito representa una fase en el ciclo del helecho a medio camino entre el cultivo de la espora y el cultivo del esporófito, que interesa producir.

Los nutrientes (orgánicos e inorgánicos), así como determinados factores físicos y químicos (luz, pH, estado físico del medio), influyen sobre el desarrollo unidimensional o bidimensional del protalo (Hotta y Osawa, 1958; Mohr, 1962; Kato, 1964; Swami y Raghavan, 1980) así como en los procesos relacionados con la diferenciación y maduración de los órganos sexuales.

Planteada la multiplicación del helecho utilizando la espora como material vegetal, surge la necesidad de cultivar la fase gametofítica y determinar las necesidades nutricionales y ambientales que plantea su cultivo en cada especie, así como determinar la capacidad de regeneración para no tener que volver a la espora y poder disponer de una reserva de gametófitos capaces de iniciar los cultivos.

En este trabajo se realiza un estudio del efecto de determinados factores nutricionales y ambientales sobre el crecimiento y el desarrollo del gametófito, así como de la capacidad de regeneración de éste a través de los cultivos homogeneizados de gametófito, en varias

especies de helechos.

### 3.2. MATERIAL Y METODOS

Para iniciar los cultivos se utilizaron esporas de Osmunda regalis L., Blechnum spicant L., Pteris ensiformis L., Asplenium nidus L., Dryopteris affinis (Lowe) Fraser-Jenkins y Woodwardia virginica Sm.

Las esporas se sometieron a un proceso de desinfección con NaClO (5 gl<sup>-1</sup>) y Tween 20 (0.1%) durante 10 min y se lavaron con agua destilada estéril, tratando de eliminar completamente el agente esterilizante. Los cambios de solución se realizaron mediante centrifugación. Las esporas, una vez desinfectadas se sembraron en el medio nutritivo sólido descrito por Knudson (1946) con la ayuda de una pipeta Pasteur y se añadió agua para favorecer la germinación.

Para estudiar el efecto de la luz sobre la germinación en B.spicant se aplicaron dos tratamientos a los cultivos de esporas: a) 16 h luz de fotoperíodo, b) oscuridad total. Se sembraron 300 esporas cm<sup>-2</sup> en placas Petri de 9 cm de diámetro y se hicieron tres réplicas por tratamiento. Se determinaron los porcentajes de germinación durante los quince primeros días.

Los gametófitos de las especies O.regalis, D.affinis, B.spicant, A.nidus y P.ensifomis, formados tras la germinación de las esporas, fueron cultivados en los siguientes medios nutritivos (Tabla 2.1): Solución de Murashige y Skoog, 1962 (MS), en las diluciones 1 MS, 1/2 MS y 1/4 MS; Solución de Knudson, 1946 (KD); Solución de Knop, 1865 (KP). Todos ellos tienen sacarosa 87,4 mM y Bacto-Agar Difco 0,7%.

Entre las soluciones minerales formuladas por Knop y Knudson, existen diferencias en tres elementos químicos: manganeso, hierro y nitrógeno en forma reducida, presentes en el medio de Knudson y ausentes en el de Knop. Para saber la contribución que dichos elementos tienen sobre el desarrollo del gametófito, se cultivaron colonias de este material vegetal de las especies B.spicant y P.ensifomis en el medio de Knop que incluye sacarosa 87,4 mM y 0,7% de Bacto-Agar Difco, añadiendo:

- a) 500 mg/l de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (=KP+ $\text{NH}_4$ )
- b) 25 mg/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (=KP+ $\text{Fe}^{2+}$ )
- c) 7,5 mg/l de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (=KP+ $\text{Mn}^{2+}$ )

A los medios nutritivos óptimos para el desarrollo del gametófito de las especies O.regalis, B.spicant, D.affinis y A.nidus, que son el de Knop para la primera y el de Murashige y Skoog para el resto, se añadieron las siguientes dosis de sacarosa: 0; 29,13; 58,26; 87,4; 116,53; 145,65 mM. Se analizaron también los efectos de distintos valores de pH (4.2, 5.7, 7.2, 8.7) y diferentes concentraciones de agar (0,35, 0,7 y 1,5 %) sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos "in vitro" de los gametófitos de dichas especies.

Asimismo, se cultivaron gametófitos de las especies O.regalis, B.spicant y D.affinis bajo los siguientes fotoperíodos: luz continua, 16h luz/8h oscuridad y oscuridad continua.

Las condiciones de cultivo fueron 25°C de temperatura y  $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad de luz. Los cultivos fueron cambiados a medio fresco mensualmente. Se hicieron diez réplicas por tratamiento.

Para analizar la capacidad de regeneración se realizaron cultivos homogeneizados del gametófito de las especies O.regalis, B.spicant, D.affinis sp. affinis, A.nidus, P.ensiformis y W.virginica. Para ello se trituraron en cada especie 0,5 gramos de material vegetal (gametófito), contenido en un tubo de ensayo, con un Omni-Mixer. De esta manera se consiguió seccionar el gametófito en una serie de porciones de 1-2mm<sup>2</sup>. Los trocitos de tejido se suspendieron en 150 ml de solución mineral, contenida en un matraz de 500 ml (Knop para la especie O.regalis o Murashige y Skoog para el resto de especies). El cultivo se realizó vertiendo alícuotas de dicha suspensión en frascos de cultivo de 150 ml que llevaron el medio mineral y sacarosa 87,4 mM, solidificado o no con Bacto-agar Difco al 0,7%.

Puesto que alguna respuesta podría estar mediada por la concentración osmótica de los medios de cultivo empleados, fue necesario medir dicho parámetro. Para ello, alícuotas de 5 ml, extraídas de los medios de cultivo seleccionados, se procesaron en un osmómetro OSMOMETTE. Los gametófitos fueron observados y fotografiados en fresco.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Cultivo de esporas y formación de protalos

La germinación de las esporas comenzó a ser notable al cuarto día de cultivo en presencia de luz y al cabo de quince días en estas condiciones el porcentaje de germinación era del 58% siendo del 0% en oscuridad. Tras la germinación de la spora se forma el protalo (Fig. 3.1). Estos se componen de células parenquimáticas, provistas de abundantes cloroplastos (Fig. 3.2) y de células rizoidales, unicelulares, de coloración marrón.

Los gametófitos cultivados "in vitro" se multiplicaron activamente por la zona basal, preferentemente, formando agregados de un elevado número de individuos (Fig. 3.2).

#### 3.3.2. Solución nutritiva

Al cabo de 4 meses se observa que el crecimiento de los agregados de gametófitos de las especies B.spicant, D.affinis, A.nidus y P.ensifomis, (valorado como peso fresco) es mayor en el medio 1 MS, por el contrario, la especie O.regalis, tiene un comportamiento opuesto al de las otras especies, creciendo mejor en la solución nutritiva de Knop. El gametófito de esta especie necrosa en soluciones nutritivas de elevada concentración osmótica, (Fig. 3.3).

#### 3.3.3. Efecto del $\text{NH}_4$ , $\text{Mn}^{2+}$ y $\text{Fe}^{2+}$ sobre el desarrollo del gametófito

La presencia de nitrógeno en forma reducida en el medio nutritivo es imprescindible para asegurar el crecimiento del gametófito en las especies P.ensifomis y B. spicant, provocando su ausencia la necrosis del cultivo (Fig. 3.4).

#### 3.3.4. Efecto de la concentración de sacarosa

O.regalis y B.spicant no manifiestan diferencias significativas en el peso fresco de los agregados gametofíticos respecto a la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo. El gametófito de B.spicant manifestó un incremento significativo en el crecimiento conforme aumentaba la concentración de sacarosa y el gametófito de D.affinis experimentó

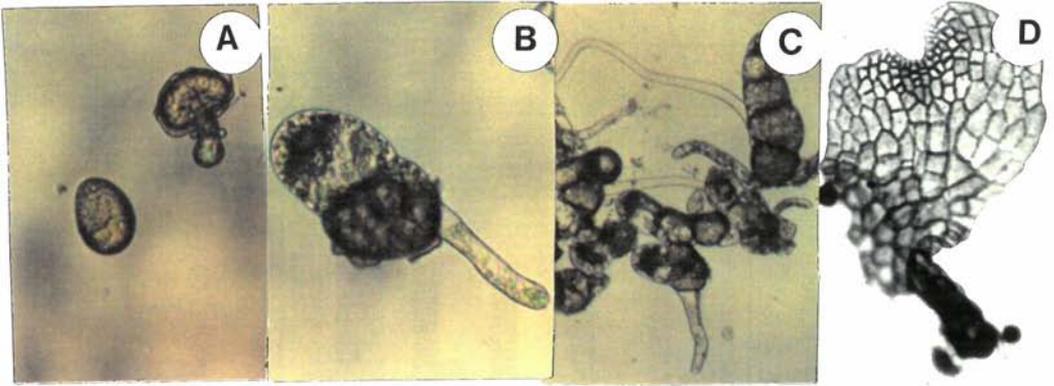


Fig. 3.1. Germinación de la espora y formación del gametófito cordiforme. a) Ruptura del exosporio y emisión de la primera célula rizoidal (x60). b) División de la célula protálica (x60). c) Gametófitos filamentosos (x24). d) Gametófito cordiforme (x24).

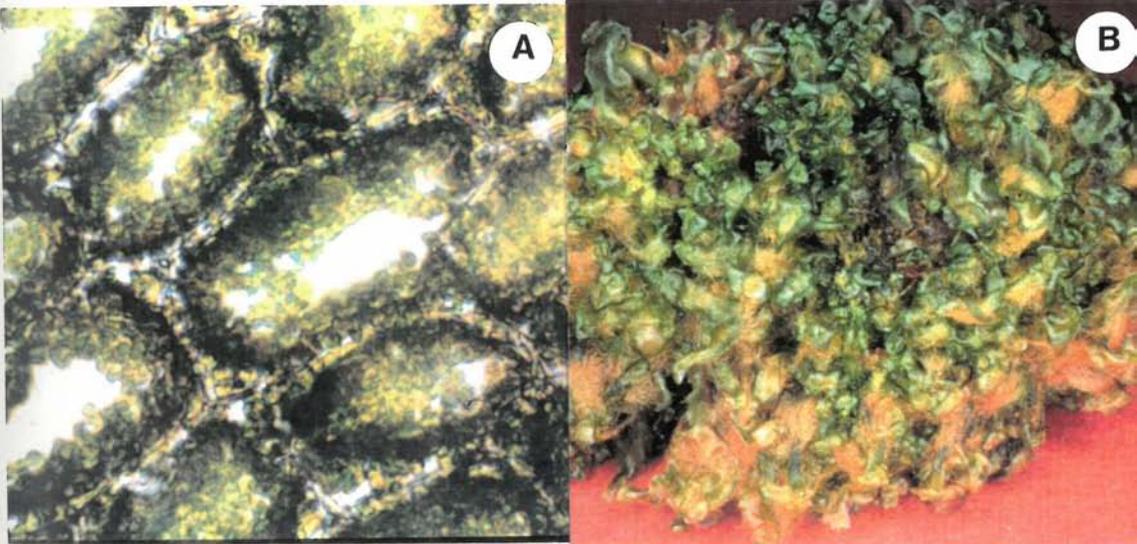


Fig. 3.2. Cultivo "in vitro" de gametófitos. a) Células del protalo con gran número de cloroplastos (x240). b) Agragados gametofíticos en *B. spicant* L.

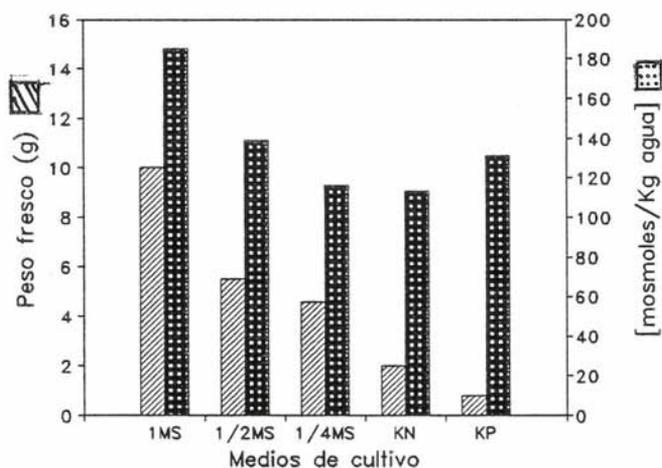
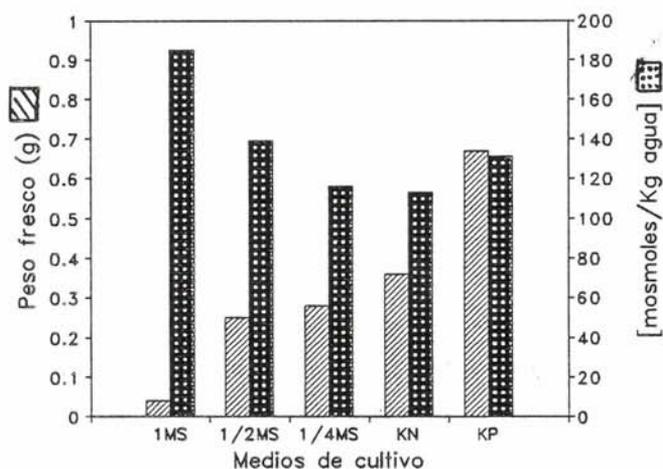


Fig. 3.3. Relación entre crecimiento del gametófito y concentración osmótica del medio de cultivo en las especies a) *O. regalis* b) *B. spicant*. Datos obtenidos a los 4 meses. MS=Medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962); KN= Medio nutritivo de Knudson (1946); KP=Medio nutritivo de Knop (1865).

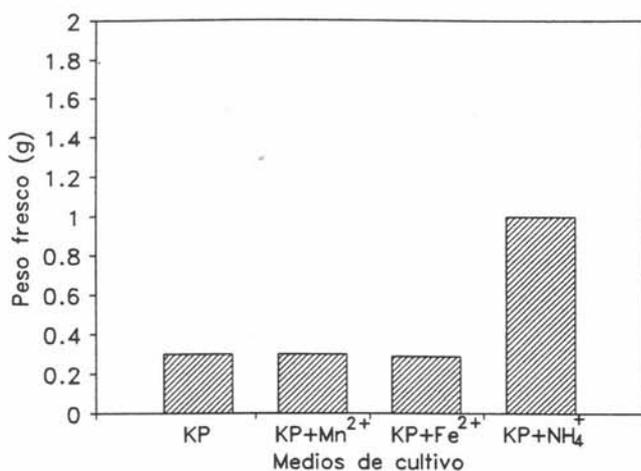


Fig. 3.4. Efecto del NH<sub>4</sub>, Mn<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup> sobre el crecimiento del gametófito en *P. ensiformis*. Datos a los 30 días.

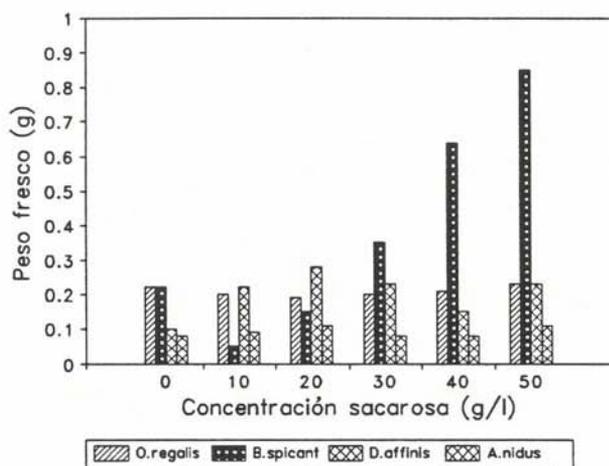


Fig. 3.5. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento del gametófito. Datos a los dos meses de cultivo.

un mayor crecimiento en presencia de sacarosa, no habiendo diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas de este compuesto (Fig. 3.5).

La formación de los órganos sexuales femeninos se vió influenciada en B.spicant por la sacarosa, de forma que conforme aumentaba la concentración de este compuesto era mayor la presencia de arquegonios (Fig. 3.6).

### 3.3.5. Efecto del fotoperíodo

Todas las especies estudiadas mostraron un crecimiento óptimo con el fotoperíodo de 16h luz y una intensidad de  $40\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Fig. 3.7). A.nidus necesitó ser cultivado en zona de penumbra.

La oscuridad inhibió el desarrollo bidimensional del gametófito de D.affinis y B.spicant, predominando el desarrollo filiforme, llegando prácticamente a desaparecer el agragado gametofítico, resultando inhibida asimismo la capacidad de formar órganos sexuales. Por el contrario, el gametófito de O.regalis fue capaz de mantener el crecimiento bidimensional en oscuridad, pudiendo desarrollarse los órganos sexuales.

### 3.3.6. Efecto del pH y del agar

Los gametófitos de O.regalis mostraron un crecimiento óptimo a pH 5.8. Los gametófitos de B.spicant y A.nidus toleraron márgenes amplios de pH. Los gametófitos de D.affinis no desarrollaron en medios nutritivos con pH alcalino (Fig. 3.8).

Los gametófitos de O.regalis y D.affinis crecieron mejor en medio de cultivo solidificado con Bacto-Agar Difco al 0.35 % mientras que los de B.spicant y A.nidus no manifestaron diferencias significativas entre dicho medio y el solidificado con Bacto-Agar Difco al 0.7%. En todas las especies disminuía la producción de gametófitos cuando la concentración de agar en el medio era del 1,5% (Fig. 3.8).

### 3.3.7. Regeneración del gametófito

En los primeros días de cultivos de gametófitos homogeneizados se produjo el

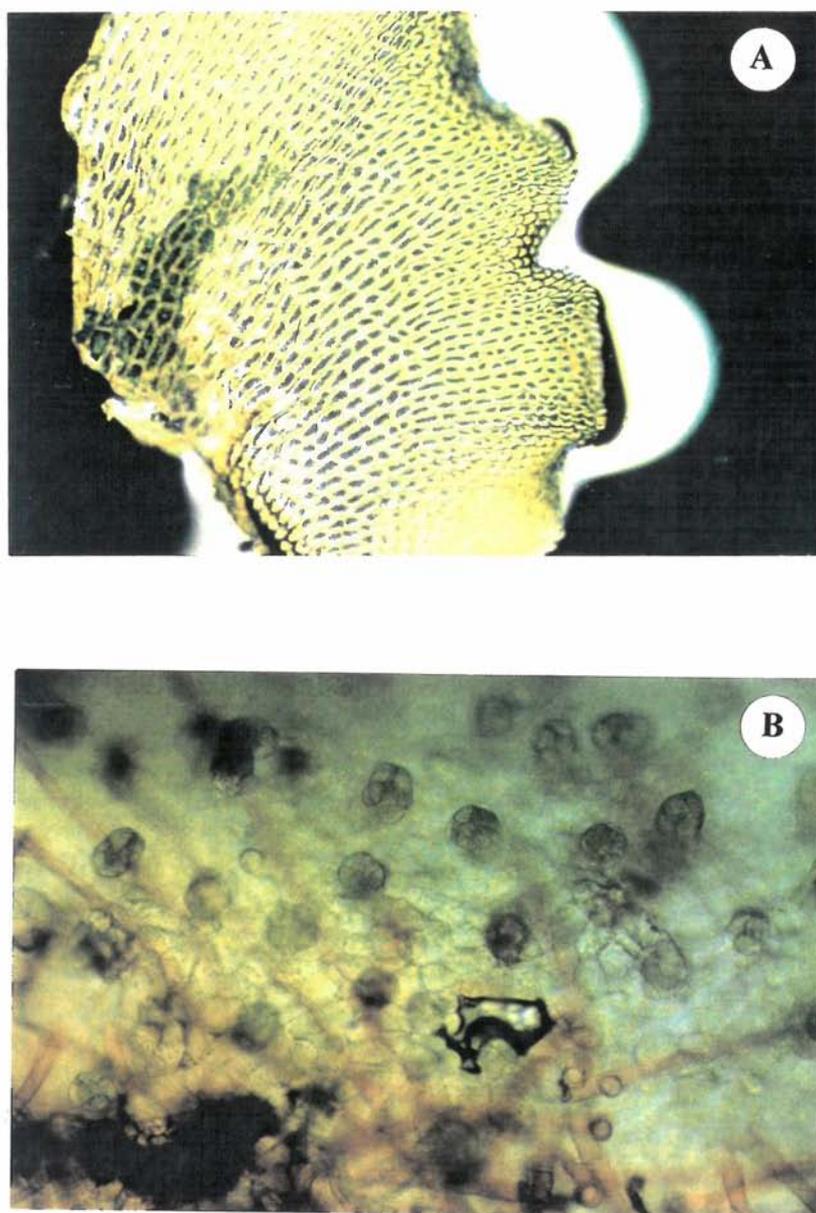


Fig. 3.6. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la formación de arquegonios en el gametófito de *Blechnum spicant*. a) ausencia de sacarosa (x24). b) 30 g l<sup>-1</sup> sacarosa (x60).

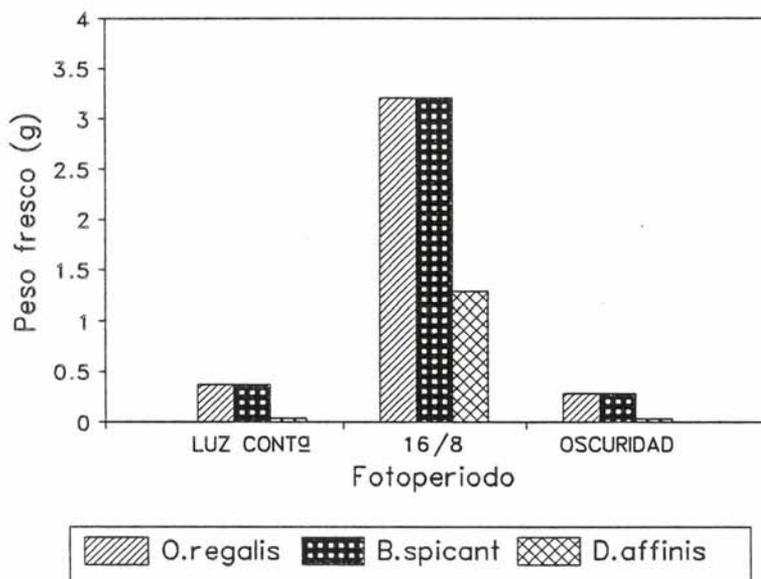


Fig. 3.7. Efecto del fotoperíodo sobre el crecimiento del gametófito en varias especies de helechos. Datos obtenidos a los dos meses de cultivo.

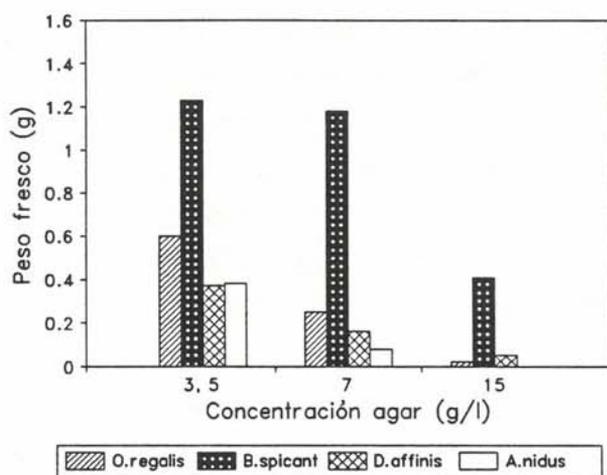
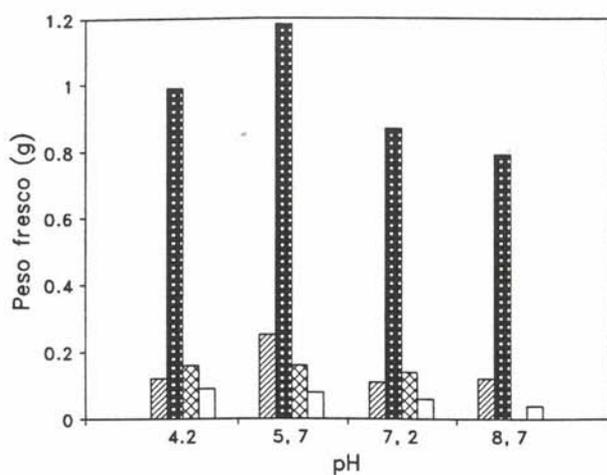


Fig. 3.8. Efecto a) del pH y b) del agar, respectivamente, sobre el crecimiento del gametófito. Datos obtenidos a los dos meses de cultivo.

oscurecimiento de los explantos, pero algunas células conservaron la capacidad de división y regeneraron nuevos gametófitos.

En cultivo de gametófitos enteros sólo la parte basal o zona más alejada de la hendidura apical es capaz de multiplicarse y originar nuevos protalos. Con la trituración del gametófito se consiguió que todas las células del protalo, independientemente de la ubicación inicial, fueran capaces de regenerar la estructura gametofítica (Fig. 3.9). La tasa de multiplicación del gametófito a través de este sistema se puede incrementar tantas veces como secciones de la lámina protálica hayan sido realizadas.

Un caso particular ha sido el presentado por la especie D.affinis. Tras la trituración y cultivo del gametófito, las células sufrieron dos procesos diferentes: a) crecimiento celular desorganizado, que dió lugar a la formación de callo (Fig. 3.10) y b) crecimiento celular organizado hacia la formación de gametófitos, si bien este último suceso fue en esta especie donde se dió en menor grado.

### 3.4. DISCUSION

El comportamiento nutricional "in vitro" del gametófito de O.regalis fué diferente al del resto de helechos Leptosporangiados utilizados en este trabajo, mostrando un mejor crecimiento en el medio de Knop, mientras los agregados gametofíticos de B.spicant, D.affinis, P.ensifomis y A.nidus crecían mejor en el medio MS sin diluir. Una explicación a estas diferencias puede estar en la concentración osmótica del medio de cultivo. O.regalis no tolera medios de alto contenido en nutrientes que incrementan la presión osmótica y rebajan el potencial hídrico, inhibiéndose el desarrollo del gametófito. Se descarta un efecto negativo sobre el crecimiento provocado por la presencia de algún componente del medio ya que las diluciones del medio MS permiten un crecimiento significativamente mayor del gametófito. En experimentos no contemplados en este trabajo, se utilizaron diferentes medios de cultivo para crecer el gametófito de O.regalis (medios de Heller y White) y lo que tenían en común todos ellos era la baja concentración de nutrientes.

La sacarosa aporta generalmente un crecimiento aceptable o comparable al de otros azúcares, siendo la fuente de carbono más utilizada en cultivos "in vitro" (Hurel-Py, 1955; Street, 1969). La concentración óptima de azúcar viene dada por un balance equilibrado entre



Fig. 3.9. Regeneración del gametófito de *A. nidus* en cultivo de homogeneizados.



Fig. 3.10. Formación de callo en cultivos homogeneizados de gametófito de *Dryopteris affinis*.

el efecto promotor como nutriente y el efecto inhibitorio como agente osmótico. En líneas generales, un incremento en la concentración de azúcar favorece el desarrollo de los gametófitos, como ocurre en B.spicant. Sin embargo, esto no siempre ha sido así. La presencia de sacarosa en el medio de cultivo de gametófitos de la especie O.regalis, en las concentraciones ensayadas, no afecta al crecimiento, resultando igual en presencia o en ausencia de este compuesto. Las especies D.affinis y A.nidus necesitan dosis de sacarosa inferiores a  $20 \text{ g l}^{-1}$ , pudiendo también desarrollarse en ausencia de este compuesto. Tal vez otros compuestos puedan tener mejores efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los gametófitos cultivados "in vitro" de esta especie. El glicerol, compuesto poco utilizado como fuente de carbono ha tenido un efecto favorable sobre el desarrollo de algunos cultivos de callo (Gautheret, 1948; Hildebrandt y Riker, 1953) y sobre el gametófito de la especie O.regalis (Stephan, 1929).

El desarrollo experimentado por los gametófitos de algunas especies en ausencia de sacarosa nos obliga a pensar que la autotrofia de este organismo vegetal se mantiene "in vitro".

Estudiando el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la germinación de la espora y el crecimiento del gametófito en Botrychium dissectum, Melan y Whittier (1990) concluyen que una fuente de nitrógeno en forma reducida es necesaria tanto para la germinación de la espora como para el desarrollo del gametófito en las etapas iniciales de su desarrollo ya que los gametófitos viejos pueden crecer sólo con fuentes de nitrógeno en formas oxidadas (nitratos). La capacidad de los gametófitos para utilizar nitratos varía con la edad. Hay plantas que utilizan amonio con preferencia a nitratos, como fuente de nitrógeno (Haynes y Goh, 1978). En algunas de estas plantas el nitrato puede tener efectos tóxicos. En Vaccinium la toxicidad parece estar relacionada con la actividad reductora de la nitrato reductasa en sus tejidos (Foy y col., 1978). Es posible que el efecto inhibitor que tienen los nitratos sobre la germinación de la espora y los estadíos iniciales del desarrollo del gametófito en Botrychium se relacionen con deficiencias en los niveles de nitrato reductasa. Según refiere Miller, (1968), los gametófitos fotosintéticos muestran anomalías cuando el amonio es la fuente de nitrógeno (Whittier, 1989). Nuestro experimento se ha llevado a cabo con gametófitos fotosintéticos y hemos comprobado que la presencia del nitrógeno en forma reducida es determinante para las etapas iniciales del desarrollo del gametófito, salvo en Osmunda regalis.

Los gametófitos de los helechos analizados muestran una gran tolerancia, en algunas especies, al pH del sustrato, pudiendo crecer el gametófito de una misma especie tanto en pH ácidos como básicos.

Elevadas concentraciones de agar ( $15 \text{ g l}^{-1}$ ) añadidas al medio de cultivo inhiben el crecimiento del gametófito, tal vez por un aumento del potencial matricial y osmótico que trae como consecuencia un descenso del potencial hídrico y una menor capacidad de difusión de metabolitos y nutrientes.

A partir de estudios realizados "in vivo" (Ludwigs, 1911; Walker, 1931), se sabe que en la maduración de los órganos sexuales existen exigencias nutricionales diferentes. Los anteridios pueden formarse sobre sustratos pobres pero los arquegonios necesitan medios nutritivos más ricos para desarrollarse. El gametófito de O. regalis puede madurar sexualmente en ausencia de sacarosa y ha supuesto una excepción entre las especies estudiadas.

La luz es muy importante tanto para la germinación como para el desarrollo bidimensional o cordado del gametófito, habiendo quedado claro hace tiempo la tendencia al desarrollo filiforme del gametófito crecido en ausencia de luz o con luz de baja intensidad, (Mohr, 1962). Sin embargo, se debe comentar que con las especies seleccionadas esto no se ha cumplido siempre, así O. regalis es capaz de mantener el crecimiento bidimensional en oscuridad, al menos durante los dos meses que duró el experimento. Sin embargo, dado que se trata de un gametófito que alcanza el mayor tamaño de todos los analizados, podría ser que períodos más largos de oscuridad diesen una respuesta diferente. El gametófito de A. nidus ha debido ser cultivado con muy baja intensidad de luz, en zona de penumbra, para que pudiera desarrollarse, no tolerando exposiciones directas a la luz. De nuevo las apreciaciones generales son susceptibles de experimentar variaciones entre especies.

El protalo de los pteridófitos posee un considerable poder de regeneración. Experimentos de finales del siglo pasado ya indicaban que, virtualmente, cada célula del protalo tiene capacidad de regeneración. Esta capacidad parece estar correlacionada con una posible influencia ejercida por el ápice (zona de síntesis de auxinas), así mientras el protalo permanece intacto sólo las regiones basales, alejadas del punto de crecimiento, son capaces de dar origen a nuevos protalos. La trituración del gametófito devuelve a todas las células la capacidad de regenerar, tal vez por la accesibilidad a éstas de sustancias promotoras del

desarrollo, por la dispersión de sustancias de carácter inhibitorio o por ambas cuestiones.

Los explantos procedentes de gametófito de Dryopteris affinis fueron los que menos capacidad de regeneración mostraron. Ello ha podido ser debido a su menor tamaño que hizo difícil su seccionamiento.

## 3.5. BIBLIOGRAFIA

- Bopp, M., 1968. Control of differentiation in fern allies and bryophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19:361-380.
- Brandes, H., 1973. Gametophyte development in ferns and bryophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:115-128.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29:511-566.
- Gautheret, R.J., 1948. Sur l'utilisation du glycérol par les cultures de tissus végétaux. *C. R. Soc. Biol.* 142:808-810.
- Haynes, R.J. y Goh, K.M., 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev.* 53:465-510.
- Hildebrandt, A.C. y Riker, A.J., 1953. Influence of concentrations of sugars and polysaccharides on callus tissue growth in vitro. *Amer. J. Bot.* 40:66-76.
- Hotta, Y. y Osawa, S., 1958. Control of differentiation in the fern gametophyte by amino acid analogs and 8-azaguanine. *Exptl. Cell Res.* 15:85-94.
- Hurel-Py, G., 1955. Action de quelques sucres sur la croissance des prothalles de fougères. *C. R. Acad. Sci.* 240:1119-1121.
- Kato, Y., 1964. Physiological and morphogenetic studies of fern gametophytes in aseptical culture. II. One and two-dimensional growth in sugar media. *Bot. Gaz.* 125:33-37.
- Knudson, L., 1946. A nutrient solution for the germination of orchid seed. *Bull. Am. Orchid. Soc.* 15:214-217.
- Knop, W., 1865. Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der pflanzen. *Landwirtsch Vers. Stn.* 7:93-107.

Ludwigs, K., 1911. In: Manual of Pteridology. Fr. Verdoorn ed. A. Asher and Co. Amsterdam. 1967.

Melan, M.A. y Whittier, D.P., 1990. Effects of inorganic nitrogen sources on spore germination and gametophyte growth in Botrychium dissectum. Plant Cell Env. 13:477-482.

Miller, J. H., 1968. Fern gametophytes as experimental material. Bot. Rev. 34:361-440.

Mohr, H., 1962. The influence of visible radiation on the germination of archegoniate spores and the growth of the fern protonema. J. Linn. Soc. Bot. 58:287-296.

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

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

Stephan, J., 1929. Entwicklungsphysiologische untersuchungen an einigen farnen. I. Jahrb. Wissen. Botanik 70:707-742.

Street, H.E., 1969. Growth in organized and unorganized systems. In F.C. Steward, ed. Plant Physiology, vol. VB. pp:3-224. Academic Press, New York.

Swami, P. y Raghavan, V., 1980. Control of morphogenesis in the gametophyte of a fern by light and growth hormones. Can. J. Bot. 58:1464-1473.

Walker, E.R., 1931. The gametophytes of three species of Equisetum. Bot. Gaz. 92.

## 4. GEMACION EN O.regalis L.

### 4.1. INTRODUCCION

La reproducción vegetativa, permite a una especie vegetal la colonización rápida de nuevos territorios de asiento, perpetuar y extender genotipos favorables en una forma inalterada así como facilitar la persistencia de combinaciones híbridas estériles, hasta que la duplicación de cromosomas produzca un derivado fértil o pueda operar la selección para mejorar la fertilidad (Walker, 1966).

En muchas especies de pteridófitos el gametófito tiene una vida corta en relación al esporófito, generalmente perenne. Sin embargo, en algunos casos puede llegar a constituir por sí mismo la fase esencial o incluso única del ciclo de desarrollo, utilizando la reproducción asexual para ello, como ocurre en las familias de helechos homosporos: Vittariaceae, Hymenophyllaceae y Grammitidaceae (Farrar, 1990).

La gemación es un proceso mediante el cual tiene lugar la formación de yemas o propágulos vegetativos, constituidos por varias células parenquimatosas que organizan una estructura globular en el ápice del protalo y que pueden formar agregados en roseta (Garrison, 1991).

En este trabajo, se pone de manifiesto por vez primera la reproducción asexual a través de la gemación en la especie Osmunda regalis L., influida por la sacarosa y el fotoperíodo.

### 4.2. MATERIAL Y METODOS

Esporas de O.regalis fueron desinfectadas con NaClO (5gl<sup>-1</sup>) y Tween 20 (0.1%) durante 10 min y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Los cambios de solución se realizaron mediante centrifugación, a 2000 rpm durante 3 min. Posteriormente, las esporas fueron cultivadas en la solución nutritiva de Knop (1865), con sacarosa 87,4 mM y solidificada con 0,7 de Bacto-agar Difco.

Al cabo de tres meses, colonias de gametófitos fueron cultivados en el mismo medio mineral, al que se añadieron las concentraciones de sacarosa 29,13; 58,26; 87,4; 116,53; 145,65 mM. En otro experimento, colonias de este mismo material se cultivaron en la solución nutritiva de Knop con sacarosa 87.4 mM y solidificada con 0,7% de Bacto-Agar Difco, ensayando distintos regímenes de iluminación: luz continua, fotoperíodo de 16h luz u oscuridad continua.

Los gametófitos fueron cultivados a 25°C y una intensidad de  $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Se hicieron diez réplicas por tratamiento.

Los gametófitos fueron observados y fotografiados en fresco.

### 4.3. RESULTADOS

En *O.regalis* ha sido notable la formación y desarrollo de numerosos propágulos de gametófito mediante un proceso de gemación (Fig. 4.1), con todas las concentraciones ensayadas de sacarosa, no produciéndose este fenómeno en ausencia de este compuesto. Estos propágulos se hallan localizados en el ápice. Las yemas inicialmente presentan una organización en capas, pudiendo observar una zona interna, meristemática, recubierta por una capa de células que tiene divisiones anticlinales. El desarrollo de estas yemas conduce a la formación de un gametófito que queda ligado al gametófito progenitor o bien se desprenden desarrollándose de forma independiente. Resulta aparente la afluencia vascular a lo largo de la almohadilla hacia los propágulos (Fig. 4.1).

La luz continua favoreció esta forma de reproducción asexual en *O.regalis* siendo frecuente con este régimen de iluminación la presencia de numerosos propágulos en el ápice del gametófito, cuya coloración interna amarronada, revela un cierto deterioro de la yema en estas condiciones de cultivo (Fig. 4.1). Por el contrario, en ausencia de luz no había gemación.

Cuando en el gametófito tenía lugar la gemación no se observaba la presencia de arquegonios, sin embargo, la formación de anteridios no se veía influida por dicho proceso.

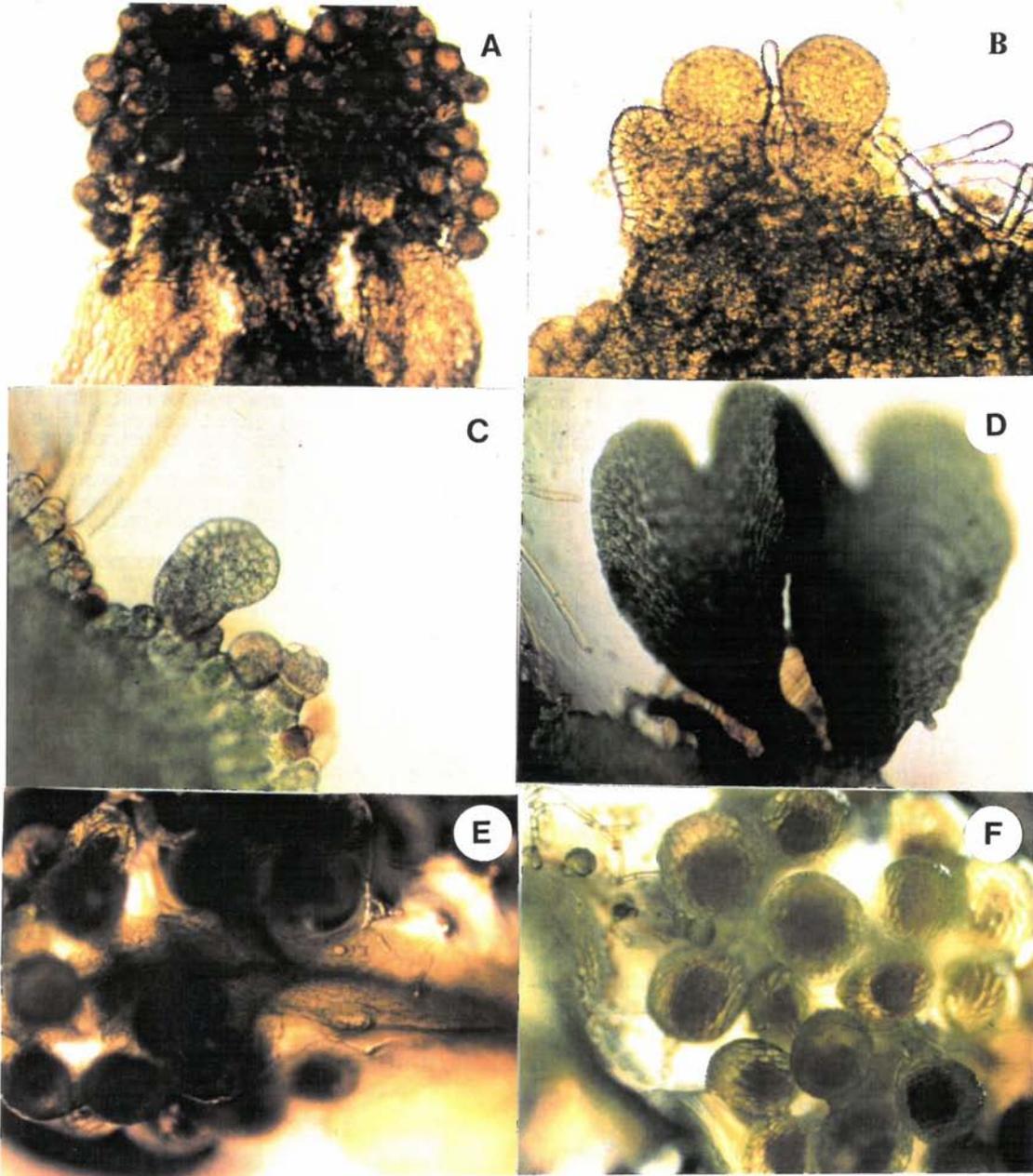


Fig. 4.1. Gemación en *O.regalis*. a) Localización apical (x24). b) Propágulos recién formados que presentan una organización celular en capas (x120). c) Propágulo en desarrollo (x120). d) Gametófitos formados a partir de yemas, aún ligados al gametófito progenitor (x24). e) Vascularización (líneas oscuras) dirigida hacia la zona de gemación (x60). f) Necrosis interna en los progángulos formados en el gametófito de *O.regalis* cultivado en luz continua (x60).

#### 4.4. DISCUSION

O. regalis presenta un sistema de reproducción asexual "in vitro" que consiste en la formación de yemas en el ápice. Cuando esto ocurre en la naturaleza es posible que la especie se haya instalado en un determinado lugar mediante la espóra, la cual germina, dando lugar a un protalo que podrá perpetuarse a través de la reproducción asexual o multiplicación vegetativa si las condiciones para el desarrollo del esporófito o generación responsable de la dispersión de la especie no son buenas.

Klekowski (1973) pone de manifiesto en sus trabajos una incapacidad para la multiplicación vegetativa del esporófito en esta especie, siendo su difusión dependiente, básicamente, de la reproducción sexual del gametófito. El mismo autor describe la existencia de una carga genética elevada en esta especie. La gemación puede incrementar la probabilidad de producir apareamientos intergametofíticos (Klekowski, 1969). Por tanto este modelo de reproducción podría ser muy efectivo en la multiplicación y expansión de esta especie en la naturaleza.

En cultivos "in vitro" orientados a la propagación de una especie, este sistema de multiplicación vegetativa aumenta la producción de gametófitos y por tanto la posibilidad de conseguir más esporófitos.

Ante la falta de datos referentes a la gemación en cultivos "in vivo" podríamos suponer que ha sido la gemación una respuesta a las condiciones en que se han desarrollado los cultivos. Farrar y Johson-Groh (1990) trabajando con Botrychium en condiciones naturales indican la posibilidad de que el hábitat pueda inducir este fenómeno. Sin embargo, pese a esta consideración, lo que queda claro es la capacidad de esta especie para desarrollar este sistema de reproducción vegetativa.

La incorporación al medio de cultivo de la sacarosa, en todas las concentraciones ensayadas, favoreció la formación de propágulos siempre y cuando se cultivasen los gametófitos en presencia de luz, dado que los cultivos de gametófitos realizados en oscuridad, si bien llevaban sacarosa al 3%, esto no era suficiente para que se produjese la gemación.

Como mera especulación diré, que podría ser tenido en consideración una regulación

influida por la luz y la sacarosa en la dirección seguida por los nutrientes. Dicha regulación podría estar localizada en la zona de vascularización del gametófito o zona de la almohadilla. La afluencia de metabolitos (nutrientes, reguladores) podría seguir dos caminos: hacia el ápice (en la formación de propágulos) o bien distribuirse radialmente abasteciendo los puntos de diferenciación de arquegonios.

En los cultivos "in vitro" se produce un cambio de diferenciación en el gametófito de O.regalis resultando procesos excluyentes la formación de arquegonios y la formación de propágulos, que en definitiva conduce al establecimiento de una competencia entre la reproducción sexual y la asexual. La formación constante de anteridios quedaría al margen de esta cuestión. Farrar (1992) trabajando con Tricomanes intricatum, especie que en muchos territorios tiene el ciclo vital reducido a la fase gametofítica, observa una ausencia de gametangios en los gametófitos que desarrollan gemación.

## 4.5. BIBLIOGRAFIA

Farrar, D.R., 1990. Species and evolution in asexually reproducing independent fern gametophytes. *Syst. Bot.* 15:98-111.

Farrar, D.R., 1992. Tricomanes intricatum: The independent tricomanes gametophyte in the Eastern United States. *Amer. Fern J.* 82:68-74.

Farrar, D.R. y Johson-Groh, C.L., 1990. Subterranean sporophytic gemmae in moowort ferns, Botrychium subgenus Botrichium. *Amer. J. Bot.* 77:1168-1175.

Garrison, J., 1991. Unusual growth patterns in Lygodium gametophytes. *Fiddlehead Forum* 18:6.

Klekowski, E.J. Jr., 1969. Reproductive biology of the Pteridophyta. II. Theoretical considerations. *J. Linn. Soc. (Bot.)*. 62:347-359.

Klekowski, E.J. Jr., 1973. Genetic load in Osmunda regalis populations. *Amer. J. Bot.* 60:146-154.

Knop, W., 1865. Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der pflanzen. *Landwirtsch Vers. Stn.* 7:93-107.

Walker, T.G., 1966. Apomixis and vegetative reproduction in ferns. In: *Reproductive Biology and Taxonomy of Vascular Plants* (ed. J.A. Hawkes). *Bot. Soc. Br. Isles, Conf. Rep.* 9:152-161.

## 5. EFECTO DE LA HOMOGENEIZACION Y DEL STRESS NUTRICIONAL SOBRE LA FORMACION DE ESPOROFITOS EN EL GAMETOFITO

### 5.1. INTRODUCCION

El gametófito representa la fase del ciclo del helecho encargada de la formación de los esporófitos de forma sexual o asexual.

Cuando se aborda la multiplicación de helechos a partir de esporas, se debe analizar, primeramente, el comportamiento reproductivo del gametófito y así disponer de un mayor conocimiento de la productividad de esporófitos dependiente exclusivamente del proceso biológico de la reproducción. Al mismo tiempo, la información acumulada sobre esta cuestión nos sugerirá las posibilidades de manipulación que dicho proceso pueda tener en pro de conseguir una mayor producción de helechos.

La homogeneización del gametófito y su cultivo ya sea en suelo o bien en medio sintético, ha dado buenos resultados con algunas especies (Knauss, 1976; Finnie y Van Staden, 1987). Se plantea en este trabajo la repercusión que las propias características biológicas de una especie puede tener al considerar estos sistemas de cultivo como sistemas válidos y generales de producción de helechos.

El gametófito y el esporófito, formado generalmente mediante la reproducción sexual, pueden entrar en un estado de competencia si las condiciones del medio son muy favorables para el desarrollo del gametófito. En el cultivo "in vitro" del gametófito se consiguen tasas de multiplicación que sobrepasan ampliamente las respuestas apreciadas en el campo. Ello nos lleva a considerar si el cultivo del gametófito en condiciones nutricionales deficitarias podría favorecer el desarrollo del esporófito.

El objetivo de este trabajo es conocer el comportamiento reproductivo de las especies seleccionadas y analizar su relación con algunos sistemas de propagación.

## 5.2. MATERIAL Y METODOS

Se cultivaron gametófitos de las especies Osunda regalis L., Blechnum spicant L., Dryopteris affinis sp. affinis (Lowe) Fraser-Jenkins, Asplenium nidus L., Pteris ensiformis L. y Woodwardia virginica Sm. procedentes directamente de spora, en las soluciones minerales de Knop (1865) para la especie O.regalis y de Murashige y Skoog (1962) para el resto de especies, en presencia de sacarosa 87,4 mM y solidificadas con 0,7% de Bacto-Agar Difco.

Para la obtención de homogeneizados, 0,5 gramos de gametófito de cada especie, contenidos en un tubo de ensayo, se trituraron con un Omni-Mixer. Los trocitos de tejido, de 1 a 2 mm<sup>2</sup> se suspendieron en 125 ml de solución mineral, contenida en un matraz de 500 ml, que será la de Knop para la especie O.regalis o la de Murashige y Skoog para el resto de especies. Se tomaron alícuotas de dicha suspensión para cultivar el tejido seccionado en frascos de cultivo de 150 ml que contienen la misma solución mineral que la suspensión, a la que se añade sacarosa 87,4 mM y solidificada con 0,7% de Bacto-agar Difco.

Para estudiar el efecto del stress nutricional sobre la formación de esporófitos, protalos de O.regalis que habían estado creciendo en el medio mineral de Knop con sacarosa 87,4 mM, se cultivaron en las siguientes condiciones nutricionales:

1. Agua destilada + 0,7% Bacto-agar Difco (=AS)
2. Agua destilada + sacarosa 87,4 mM + Bacto-agar Difco 0.7% (=AC)
3. Solución mineral de Knop + sacarosa 87,4 mM + Bacto-agar Difco 0.7% (=Control)

Asimismo, colonias de gametófitos de P.ensiformis que habían sido cultivadas en el medio MS, se pasaron a los siguientes medios:

1. Solución mineral MS + sacarosa 87,4 mM + Bacto-agar Difco 0,7% (=Control)
2. Solución mineral MS + Bacto-agar Difco 0,7% (=MS S)

3. Agua destilada + sacarosa 87,4 mM+ Bacto-agar Difco 0,7% (=AC)

4. Agua destilada + Bacto-agar Difco 0,7% (=AS)

Las condiciones de cultivo fueron: 16h.luz de fotoperíodo, intensidad de luz de 40  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 25°C de temperatura. Se hicieron diez réplicas por tratamiento.

Los gametófitos fueron observados y fotografiados en fresco.

### 5.3. RESULTADOS

En el gametófito de las especies con reproducción sexual tiene lugar la formación y maduración de los gametangios masculinos y femeninos, anteridios y arquegonios, encargados de formar los gametos o células responsables de la formación del futuro esporófito.

En B.spicant, P.ensifomis, W.virginica y A.nidus los anteridios (Fig. 5.1) constan de tres células estériles: basal, anular y opercular, rodeando a las células espermatógenas, siendo esta la tipología anteridial más frecuente en helechos Leptosporangiados. En B.spicant la célula basal del anteridio se halla notablemente elongada, siendo un aspecto característico de esta especie. En O.regalis los anteridios están formados por numerosas células estériles, y se hallan localizados preferentemente en los márgenes de los lóbulos del gametófito. En medio acuoso los anteridios se hidratan y ello provoca su ruptura, permitiendo la salida a los anterozoides, que nadan activamente hacia los gametangios femeninos.

Los arquegonios (Fig. 5.2) se forman en las proximidades de la hendidura apical, sobre la almohadilla. Resultan fácilmente identificables dado que se componen, externamente, de cuatro columnas formadas por 4-7 células cada una, hallándose curvado hacia la zona basal en su madurez.

Los gametófitos de D. affinis sp. affinis formaron numerosos anteridios funcionales pero nunca se observaron arquegonios. Es muy característica la abundante presencia de tricomas por toda la superficie del gametófito, en esta subespecie. El protalo, que inicialmente se halla constituido por células exclusivamente parenquimáticas, puede organizar, a lo largo del cultivo, en las inmediaciones de la hendidura apical, un centro de desarrollo

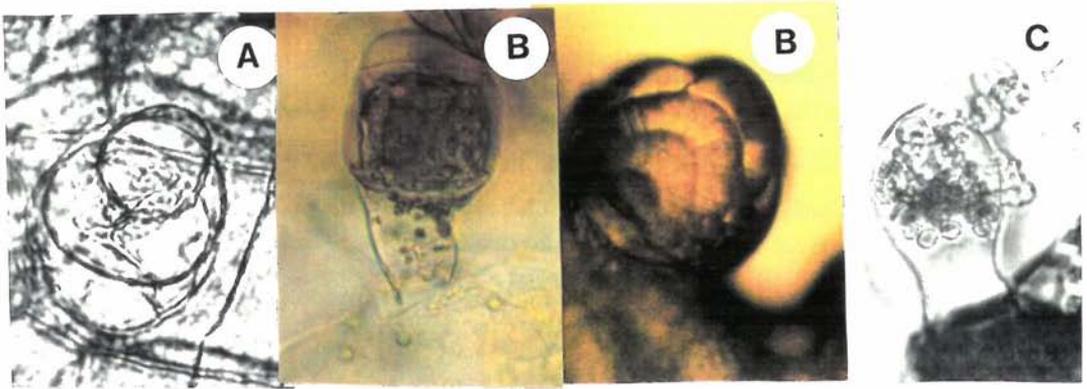


Fig. 5.1. Estructura anteridial en varias especies de helechos Leptosporangiados. a) P.ensifomis (x400). b) B.spicant (x240). c) Osmunda regalis x500). d) Anteridio liberando anterozoides (x240).

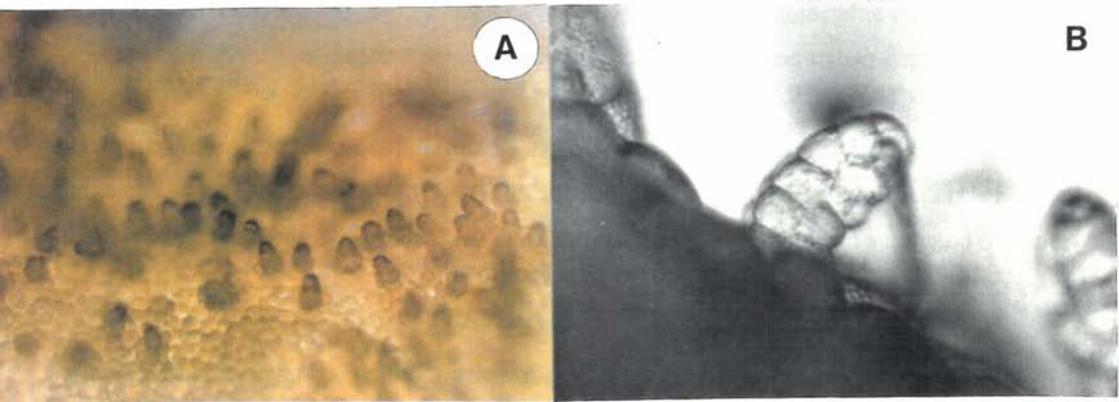


Fig. 5.2. Organos sexuales femeninos en gametófitos de helechos. a) Aspecto de la zona de la almohadilla en Asplenium nidus (x60). b) Arquegonio de B.spicant curvado, orientado hacia la zona basal del protalo (x240).

meristemático, que evoluciona hasta formar un nuevo esporófito (Fig. 5.3). En cada protalo se origina un solo esporófito mediante este proceso apogámico.

La formación de los esporófitos en las especies cultivadas fue cronológicamente diferente (Tabla 5.1). Se necesitó, en términos generales un período de tiempo de unos seis meses para obtener esporófitos, siendo el ciclo vital de estas especies relativamente lento. No ocurrió así con la especie W.virginica, la cual pasa de la fase gametofítica a la esporofítica en un mes.

La tasa de formación de esporófitos también presentó variaciones entre las especies analizadas. Así tenemos especies más y menos prolíficas (Tabla 5.1). En términos generales, la formación de esporófitos no ha sido tan elevada como la formación de gametófitos.

Entre el crecimiento de los agregados gametofíticos y la formación de esporófitos se han observado situaciones diferentes (Fig. 5.4). Las especies que han mostrado las mayores producciones de esporófitos han sido A.nidus y W.virginica (Tabla 5.1). A.nidus es una especie lenta en completar el ciclo vital y cuando esto ocurre y tiene lugar la aparición de numerosos esporófitos, los gametófitos detienen su desarrollo y acaban necrosando, abasteciendo nutricionalmente a los nuevos esporófitos. W. virginica, especie que completó en un mes el ciclo, produciendo una elevada cantidad de esporófitos, mostró un estancamiento en el crecimiento de los gametófitos al comenzar el proceso reproductivo, sin embargo, rebasado el momento de mayor producción de esporófitos, los gametófitos reanudan su desarrollo, aumentando considerablemente su tamaño. La subespecie apogámica D.affinis sp. affinis también experimentó un estancamiento en el crecimiento de los gametófitos al formarse los esporófitos. El resto de especies, O.regalis, B.spicant y P.ensififormis fueron menos prolíficas y el crecimiento de los agregados gametofíticos no se veía interrumpido ante la formación de esporófitos.

El gametófito regenerado tiene un desarrollo comparable al que tiene el originado a partir de espora, y la formación de esporófitos repite el modelo singámico o apogámico planteado por aquél.

El gametófito de D. affinis sp. affinis presentó el menor tamaño en todas las especies cultivadas y mostró una baja capacidad de regeneración. Pese a ello, los gametófitos

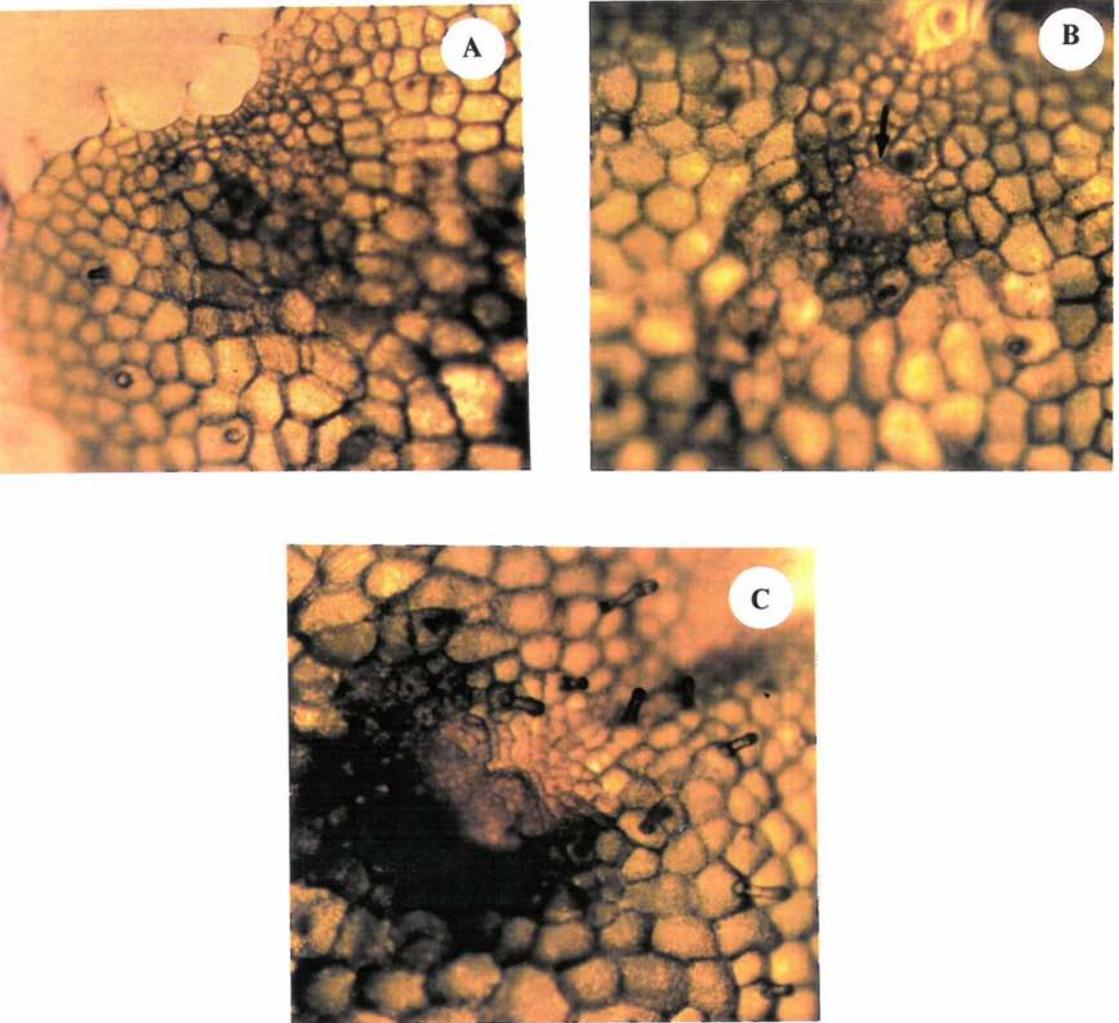


Fig. 5.3. Formación apogámica de esporófitos de *D.affinis*. a) Gametófito antes del proceso apogámico. b) Centro de desarrollo en las inmediaciones de la hendidura apical. Ausencia de arquegonios. c) Evolución de los primordios foliares. (x60).

ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO (meses)	NºESPOROFITOS/ g. GAMETOFITO
<u>Osmunda regalis</u>	K	4-6	2.5
<u>Blechnum spicant</u>	MS	3	3
<u>Asplenium nidus</u>	MS	8	NC
<u>Pteris ensiformis</u>	MS	4-6	9.2
<u>Woodwardia virginica</u>	MS	1	NC
<u>Dryopteris affinis sp. affinis</u>	MS	4-5	41.7

Tabla 5.1. Formación de esporófitos a partir de gametófitos en varias especies de helechos. NC=No Contable.

A. A.nidus y D.affinis

CRECIMIENTO DEL GAMETOFITO	FORMACION DE ESPOROFITOS
----------------------------	--------------------------

B. W.virginica

CRECIMIENTO DEL GAMETOFITO	FORMACION DE ESPOROFITOS	CRECIMIENTO DEL GAMETOFITO
----------------------------	--------------------------	----------------------------

C. B.spicant, O.regalis y P.ensifomis

CRECIMIENTO DEL GAMETOFITO	CRECIMIENTO DEL GAMETOFITO
	FORMACION DE ESPOROFITOS

Fig.5.4. Secuencia de los períodos de crecimiento y formación de esporófitos en gametófitos cultivados "in vitro".

regenerados formaron numerosos esporófitos apogámicamente (Fig. 5.5).

La especie W.virginica, que mostró el ciclo vital más rápido y dió la mayor tasa de formación de esporófitos, produjo a través del cultivo homogeneizado de gametófito, el siguiente rendimiento: a partir de 0.5 gramos se formaron, aproximadamente, 2000 esporófitos (Fig. 5.6) en un período de cultivo de dos meses.

La repetición del proceso de homogeneización en el gametófito regenerado dió diferentes resultados en cuanto a la formación de esporófitos, así O.regalis dejó de formar esporófitos mientras que W.virginica, por el contrario, siguió formando esporófitos con el rendimiento obtenido en el primer cultivo homogeneizado.

Cuando los gametófitos de las especies O.regalis y P.ensifomis se sometieron a un stress nutricional durante dos meses, provocado por la privación de nutrientes, creciendo en presencia de agua y agar exclusivamente (AS) tuvo lugar un aumento significativo de la formación de esporófitos (Fig. 5.7). La presencia de azúcar en un medio carente de sales minerales (AC) tuvo un efecto tóxico sobre el crecimiento del gametófito, produciéndose la necrosis de éste en ambas especies. Otro efecto observado en P.ensifomis fue que la presencia de sales minerales del medio MS no acompañada de sacarosa (MS S) producía una mayor expansión foliar en los esporófitos (Fig. 5.8).

#### 5.4. DISCUSION

La formación de esporófitos ha presentado dos modelos diferentes. D. affinis sp. affinis, que no forma arquegonios, utiliza la apogamia para formar esporófitos, formándose en las proximidades de la hendidura apical un centro de desarrollo que se diferencia del resto del gametófito, que ha sido descrito por Duncan (1943) en especies de Dryopteris y por Whittier (1964) en Cyrtomium falcatum. Por el contrario, los gametófitos del resto de las especies los forman a través de la reproducción sexual. La ausencia de arquegonios no es una condición indispensable para que ocurra la apogamia. Muchas especies apogámicas desarrollan arquegonios, (Aspidium chrysolobum y Pellaea viridis, Steil, 1918; Phegopteris connectilis y Cheilantes castanea, Whittier, 1970; Bommeria pedata, Gastony y Haufler, 1976; Dryopteris affinis, Duncan, 1943), pero tales arquegonios han sido descritos no funcionales, al igual que en la especie Pteris cretica (Laird y Sheffield, 1985).



Fig. 5.5. Formación de esporófitos apogámicamente en cultivos homogeneizados de gametófitos de D.affinis, en el medio MS.



Fig. 5.6. Formación de esporófitos en cultivos homogeneizados de gametófitos de W.virginica, en el medio MS.

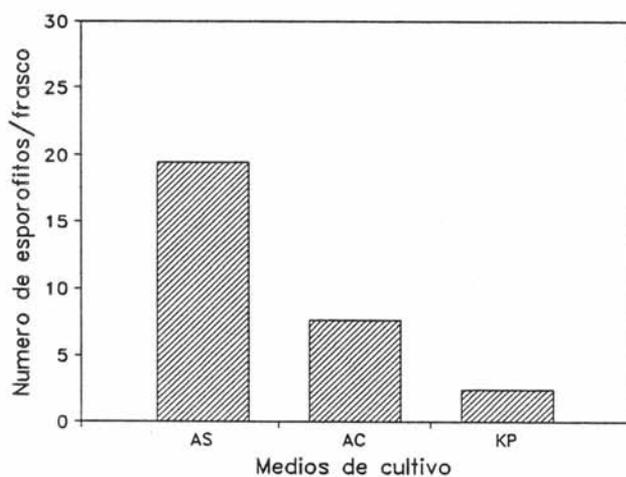
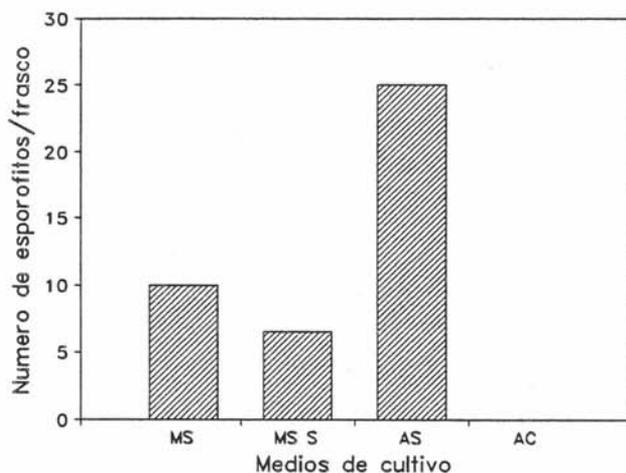


Fig. 5.7. Efecto del stress nutricional sobre la formación de esporófitos en cultivos de gametófitos. a) *P.ensiformis* b) *O.regalis*. Datos a los dos meses de cultivo.

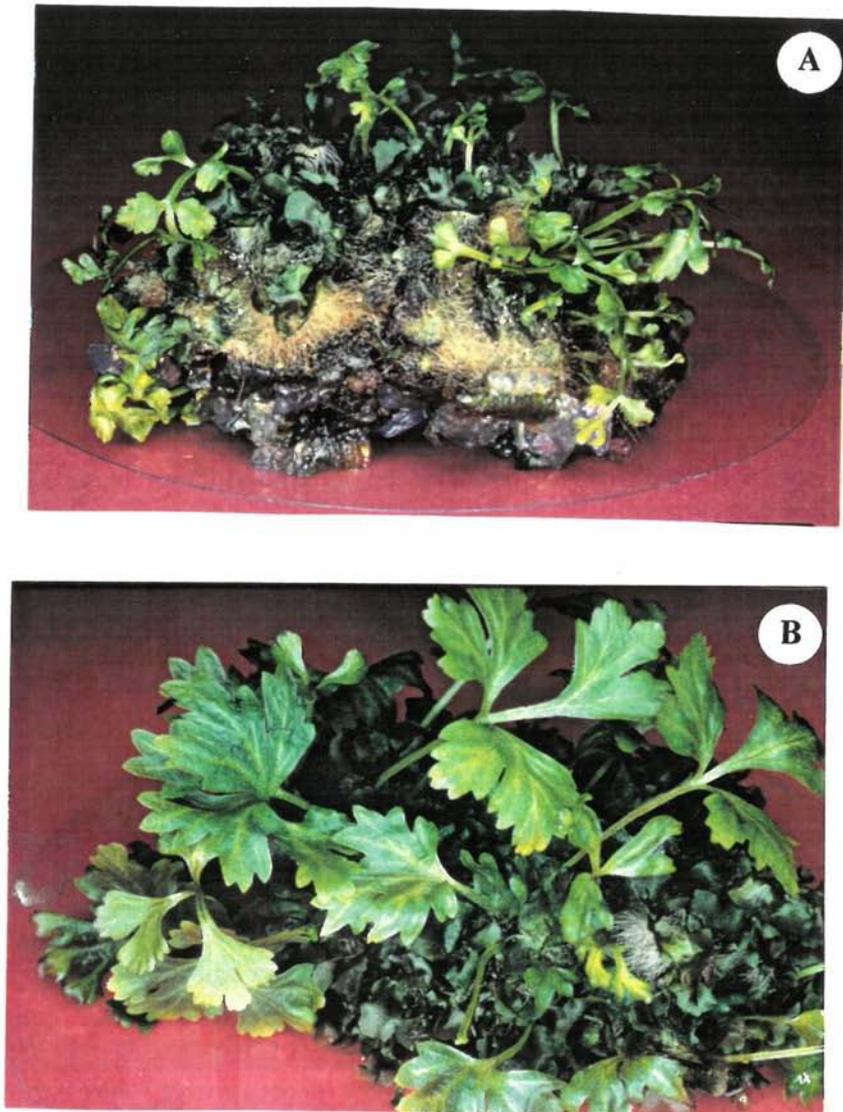


Fig. 5.8. Efecto del stress nutricional sobre la expansión foliar en *Pteris ensiformis*. a) Gametófitos cultivados en MS. b) Gametófitos cultivados en MS sin sacarosa.

Los órganos sexuales manifiestan diferencias entre las especies estudiadas. Concretamente, los anteridios de O.regalis están constituídos por numerosas células estériles rodeando a las células espermatógenas, siendo una característica típica de los helechos primitivos, (Atkinson y Stokey, 1964; Nayar y Kaur, 1971).

La diferenciación del gametófito procedente del cultivo homogeneizado ocurre de modo similar al procedente de spora. Cuando el ciclo vital tiene lugar en un corto período de tiempo, como ocurre en la especie W.virginica, la homogeneización del gametófito proporciona un buen sistema de multiplicación.

El gametófito de la especie apogámica D.affinis presentaba el menor tamaño y esto ha sido apuntado por Whittier, (1970) quien tras estudiar varias especies de helechos observa que el tamaño que presenta en la madurez el gametófito es mayor en las especies que se reproducen sexualmente que en las apogámicas.

El mismo autor considera que el tiempo en alcanzar la madurez es menor en las especies apogámicas que en las sexuales, sin embargo, la especie W.virginica no admite esta consideración de carácter general.

Los trabajos publicados por Knauss (1976) y por Finnie y Van Staden (1987), donde se persigue la obtención de sistemas más simples de propagación vegetativa que los ordinarios, no tienen en cuenta el ciclo vital natural de la planta, lo que hace difícilmente extrapolable los resultados obtenidos al global de especies. Por tanto, la trituración del gametófito y su cultivo directo en suelo o medio con agar, como único paso en la multiplicación vegetativa, debe contemplar el tiempo que transcurre entre la formación del gametófito y la formación del esporófito así como la tasa natural de formación de esporófitos, para poder valorar realmente la productividad de esporófitos mediante el empleo de este sistema.

Otra cuestión que se deduce de los resultados obtenidos es el diferente comportamiento del gametófito de las especies ante un segundo cultivo homogeneizado. Aquí los factores biológicos intrínsecos, como la acumulación de genes recesivos letales, referidos en O.regalis (Klekowski, 1973) pueden afectar el comportamiento reproductivo de las especies, de forma que según la tolerancia que éstas muestren a la homocigosis o al apareamiento

intragametofítico así será el rendimiento en la formación de esporófitos mediante este tipo de cultivos.

En algunos casos, la formación de esporófitos a partir de gametófitos cultivados "in vitro" no ha dado un rendimiento satisfactorio. Detrás de esta cuestión puede haber varias explicaciones.

Por un lado, la gran capacidad de multiplicación del gametófito en los medios óptimos para su desarrollo conlleva la acumulación de genotipos idénticos, dando lugar a agregados gametofíticos que poseen la misma dotación genética. Los cruzamientos intergametofíticos en estos agregados conducirán a la formación de individuos homocigóticos y esto será más o menos tolerado por las especies, repercutiendo finalmente en la formación de esporófitos.

Una segunda explicación podría venir dada por un posible estado de competencia nutricional entre crecimiento y multiplicación del gametófito, y el desarrollo de los esporófitos. La formación del embrión tiene lugar en las inmediaciones de la zona apical y la multiplicación en la zona basal. El aporte de nutrientes es tomado por los rizoides situados en la zona basal, debiendo acceder hasta la zona apical, donde puede estar en vías de desarrollo un embrión. Si los nutrientes se utilizan en la multiplicación del gametófito, pueden no abastecer al embrión viéndose relegada la formación de esporófitos. Cuando se crea una situación artificial (stress nutricional) que detiene el crecimiento del gametófito, en *O. regalis* y *P. ensiformis*, tiene lugar una mayor formación de esporófitos. Por tanto, la multiplicación del gametófito y el desarrollo de los esporófitos pueden ser procesos susceptibles de entrar en competencia.

La toxicidad mostrada por la sacarosa en cultivos vegetales "in vitro" ha sido puesta de manifiesto por varios autores (Moore y col., 1972; Hirsch, 1975). Este efecto sobre el tejido en cultivos "in vitro" no se atribuye a un fenómeno osmótico ya que ensayando diferentes concentraciones de sacarosa manteniendo el mismo potencial osmótico al añadir concentraciones adecuadas de otros agentes osmóticos como el manitol, la respuesta variaba.

Se ha observado un efecto enmascarador de la toxicidad de la sacarosa por parte de la concentración de las sales minerales presentes en el medio de cultivo, de modo que cuando éstas disminuyen su concentración se deja sentir dicho efecto negativo sobre la viabilidad del

explanto, poniendo en marcha procesos degradativos que conducen a la necrosis del explanto. Hay autores (Hannay y Butcher, 1961; Moore y Lovell, 1972) que encuentran en la sacarosa un factor correlacionable con fenómenos de envejecimiento en tejidos vegetales, en los cuales se producen acúmulos de almidón y azúcares reductores al tiempo que se produce una degradación de las clorofilas.

La expansión foliar experimentada por la fronde en Pteris cuando el esporófito crece en un medio carente de azúcar, podría ser una respuesta "refleja" sobre una estimulación del sistema fotosintético ante la falta de azúcar en el medio, dado que no se contempla un funcionamiento normal de la fotosíntesis "in vitro". Sin embargo, puede hacerse una segunda consideración a tenor de los trabajos publicados por Goebel (1908) y corroborados por Wetmore (1953) quienes estudiando el desarrollo de la hoja heteroblástica del helecho, observan en sus experimentos una influencia del estado nutricional (aporte de carbohidratos) sobre el incremento en tamaño y complejidad de la hoja. En Adiantum, Wetmore observa que esporófitos juveniles creciendo en un medio que contiene sacarosa al 0.5% o más realizan rápidamente la transición heteroblastica; por otra parte, las plantas adultas creciendo con sacarosa al 0.1% producen hojas bilobadas, interpretando que una morfología simple estaría asociada con un déficit energético que restringiría la división celular. Allsopp (1963) trabajando con Marsilea encuentra los mismos resultados. En nuestro caso, la falta de sacarosa en el medio durante un período de dos meses acelera el desarrollo de la hoja en P.ensifomis, produciéndose un efecto contrario al descrito con anterioridad.

## 5.5. BIBLIOGRAFIA

- Allsopp, A., 1963. Morphogenesis in Marsilea. J. Linn. Soc. London (Bot.). 58:417-427.
- Atkinson, L.R. y Stokey, G., 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. Phytomorphology. 14:51-70.
- Duncan, R.E., 1943. Origin and development of embryos in certain apogamous forms of Dryopteris. Botanical Gazette. 105:202-211.
- Finnie, J.F. y Van Staden, J., 1987. Multiplication of the tree fern Cyathea dregei. Hort Science. 22:665.
- Gastony, G.J. y Haufler, C.H., 1976. Chromosome numbers and apomixis in the fern genus Bommeria. Biotropica. 8:1-11.
- Goebel, K., 1908. Einleitung in die experimentelle morphologie der pflanzen. Leipzig y Berlín: Teubner.
- Hannay, J.W. y Butcher, D.N., 1961. An ageing process in excised roots of Groundsel (Senecio vulgaris L.). New Phytol. 60:9-20.
- Hirsch, A.M., 1975. The effects of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes. Plant Physiol. 56:390-393.
- Klekowski, E.J., 1973. Genetic load in Osmunda regalis populations. Amer. J. Bot. 60:146-154.
- Knauss, J.F., 1976. A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. Proc.Fla.State Hort.Soc. 89:363-365.
- Knop, W., 1865. Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der Pflanzen. Landwirtsch Vers. Stn. 7:93-107

Laird, S. y Sheffield, E., 1985. Antheridia and Archegonia of the apogamous fern Pteris cretica L. Ann. Bot. 57:139-143.

Moore, K.G., Cobb, A., Lovell, P.H., 1972. Effects of sucrose on rooting and senescence in detached Raphanus sativus L. cotyledons. J. Exp. Bot. 23:65-74.

Moore, K.G. y Lovell, P.H., 1972. Rhizogenesis in detached cotyledons,. Physiol. Vèg. 10:223-235.

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

Nayar, B.K. y Kaur, S., 1971. Gametophytes of homosporous ferns. Bot. Rev. 37:295-396.

Steil, W.N., 1918. Studies of some new cases of apogamy in ferns. Bull. Torrey Bot. Club, 45:93-111.

Wetmore, R.H., 1953. Carbohydrate supply and leaf development in sporeling ferns. Science. 118:578.

Whittier, D.P., 1964. The effect of sucrose on apogamy in Cyrtomium falcatum. Prel. Am. Fern J. 54:20-25.

Whittier, D.P., 1970. The rate of gametophyte maturation in sexual and apogamous species of ferns. Phytomorphology. 20:30-35.

## 6. ANTERIDIOGENO Y GIBERELINAS EN Blechnum spicant

### 6.1. INTRODUCCION

En Pteridophyta, el método más frecuente por el que tiene lugar la formación de un nuevo esporófito consiste en la fusión de las células sexuales o gametos. Según éstos pertenezcan al mismo protalo o bien a protalos diferentes, distinguimos dos tipos de cruzamientos: intragametofíticos e intergametofíticos (Klekowski y Lloyd, 1968). Se han descrito sistemas naturales favoreciendo el apareamiento intergametofítico y promoviendo el intercambio genético que actúan a nivel morfológico, poblacional o genético sobre el gametófito (Klekowski, 1969). Entre ellos nos encontramos con el denominado sistema anteridiógeno. A través de él, los gametófitos adultos vierten al medio de cultivo alguna sustancia inductora de la formación de anteridios en los gametófitos juveniles (Döp, 1950; Näf, 1956) lo que ha sido asociado también con una morfología masculina diferente (Näf, 1979). Aunque menos del 1% de los helechos han sido probados para valorar la actividad anteridiógena, aproximadamente el 50% de los analizados exhiben una respuesta favorable (Voeller, 1964; Schedlbauer y Klekowski, 1972; Näf y col., 1975.). Hasta la fecha han sido identificados cuatro sistemas anteridiógeno distintos en cuatro familias de helechos: Polypodiaceae (Pteridium aquilinum), Schizeaceae (Anemia phyllitidis y Lygodium japonicum), Parkeriaceae (Ceratopteris), Onocleaceae (Onoclea sensibilis (Näf y col., 1969; Näf, 1979).

La información de las características químicas del anteridiógeno es limitada. No se trata de un sólo compuesto sino que son distintos en los cuatro sistemas descritos. Se han encontrado similitudes entre los anteridiógenos analizados y las giberelinas. Esta vasta familia de compuestos químicos ha sido asociada a fenómenos relacionados en vegetales superiores con la floración, transición del estado juvenil al adulto y con el desarrollo de los órganos sexuales (Krishnamoorthy, 1975). En su relación con la actividad anteridiógena desarrollada en algunos gametófitos se ha descrito que uno de los compuestos anteridiógenos de Lygodium japonicum es un metil éster de la GA<sub>9</sub> (Yamane y col., 1979); asimismo, el anteridiógeno de Anemia phyllitidis ha sido identificado (Nakanishi y col., 1971; Corey y Myers, 1985; Corey y col., 1986) siendo un compuesto derivado del ent-Kaureno, precursor de las giberelinas.

Kraft-Klaunzer y col., (1990) logran sintetizar un metil éster de la GA<sub>7</sub> que es un potente anteridiógeno. Warne y Hickok (1989) encuentran una correlación entre la inhibición de la biosíntesis de las giberelinas y la expresión sexual de tres líneas de Ceratopteris.

Blechnum spicant pertenece al Orden Blechnales que es un orden monotípico, bastante diferente del resto de los helechos, por lo que se cree que tiene un origen muy remoto, probablemente a partir del mismo grupo del que derivaran las Dryopteridales, divergiendo como una línea filogenética independiente. Sólo tiene un familia: Blechnaceae (Salvo Tierra, 1990).

Según Cousens (1979) en esta especie actúa un sistema anteridiógeno semejante al descrito en otras especies. Estudios electroforéticos han demostrado altos niveles de heterocigosidad en poblaciones naturales de esporófitos de muchos pteridófitos homospóreos, entre ellos B.spicant (Soltis y Soltis, 1987) sugiriendo cruzamientos intergametofíticos entre las poblaciones de gametófitos, lo que es compatible con la presencia de un sistema anteridiógeno operando en esta especie.

El objetivo de este trabajo será estudiar la sexualidad del gametófito de B.spicant, en los ejemplares de nuestra región así como analizar la relación del sistema anteridiógeno con el grupo de las giberelinas.

## 6.2. MATERIAL Y METODOS

Esporas de B.spicant fueron sometidas a un proceso de asepsia y puesta en cultivo. Las esporas fueron desinfectadas con una solución de NaClO (5 g/l) que lleva TWEEN 20 (0.1%) durante 10 min, lavando tres veces con agua destilada estéril para eliminar el agente esterilizante. Los cambios de solución se efectuaron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 3 min. Las esporas, una vez desinfectadas se sembraron en el medio nutritivo sólido descrito por Klekowski (1969) que consta de los macroelementos de Parker, los microelementos de Thompson, sacarosa 87,4 mM y Bacto-Agar Difco al 7%, pH 5.8. Se utilizan tubos de ensayo de 2,5x16 cm para los cultivos de espора y frascos de vidrio de 150 ml para cultivar gametófitos adultos.

Las condiciones ambientales fueron son 16h de fotoperíodo, 40  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad

de luz y 25°C de temperatura.

#### Obtención del extracto crudo del medio de cultivo

El medio de cultivo donde habían estado creciendo gametófitos de Blechnum spicant durante tres meses se procesó de la siguiente manera:

- Licuación del medio sólido (100 ml) en el microondas.
- Se añade metanol 80% + BHT(Butirilhidroxitolueno) en proporción 2:1.
- Agitación durante 2-3 horas a 4°C.
- Centrifugación durante 1h a 15.000 rpm y a 4°C.
- Evaporación del metanol con un concentrador de muestras Savant.
- El concentrado es resuspendido en agua e incorporado al medio de cultivo, en una proporción 1:10.

Se sembraron esporas para valorar el posible efecto anteridiógeno del extracto acuoso añadido al medio de cultivo.

#### Extracción de Giberelinas libres y ligadas

Con el concentrado del medio de cultivo donde previamente habían estado creciendo gametófitos de B.spicant durante al menos tres meses, se hicieron fraccionamientos para la separación de giberelinas libres y ligadas (Fig. 6.1), (Russell, 1975).

Cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de extracción de giberelinas se incorporaron al medio de cultivo en solución acuosa, en proporción 1:10 y se sembraron esporas para evaluar la capacidad anteridiógena de cada fracción.

Se sembraron 300 esporas cm<sup>-2</sup> y se hicieron siempre diez réplicas por tratamiento.

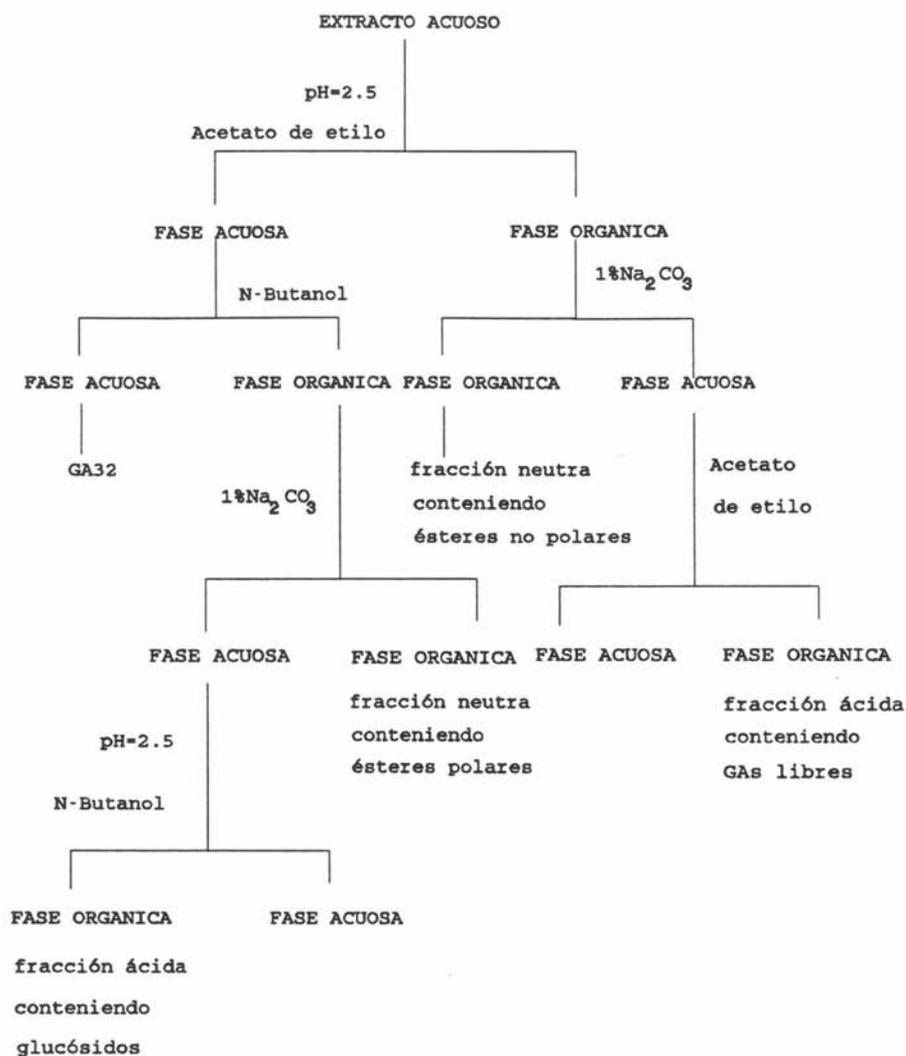


Fig. 6.1. Extracción de Giberelinas libres y ligadas.

Para estudiar el efecto de los reguladores del desarrollo sobre la actividad anteridiógena se añadieron al medio de cultivo los reguladores del crecimiento: IBA (0,49; 4,9; 49  $\mu\text{M}$ ), BAP (0,43; 4,3; 43  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{GA}_3$  (0,28; 2,8; 28  $\mu\text{M}$ ).

Los gametófitos fueron observados y fotografiados al microscopio óptico, en fresco.

### 6.3. RESULTADOS

Gametófitos de *B. spicant* que habían sido subcultivados mensualmente durante 2 años, presentaban una abundante formación de arquegonios que no se acompañaba de la formación de anteridios en ningún momento. Sin embargo, al extender el tiempo de permanencia en el mismo tarro de cultivo a tres meses se observó la formación de numerosos anteridios, que presentaban una célula basal notablemente elongada, típica de esta especie.

Al cultivar esporas en un medio al que se añadió extracto de medio de cultivo en el cual habían estado creciendo gametófitos durante tres meses, se observó, al cabo de 35 días, la formación de anteridios en todos los estados del desarrollo de los gametófitos (Fig. 6.2) y no se observaba la formación de arquegonios. Por el contrario, en el cultivo control, al cabo del mismo tiempo comenzaban a formarse arquegonios pero no se observaban anteridios. La proporción de gametófitos con meristemo (merísticos) y sin él (amerísticos) no se veía influenciada por la presencia del extracto (Tabla 6.1). Al cabo de 60 días en el cultivo control se formaron abundantes anteridios y a los tres meses resultaban evidentes los esporófitos (Fig. 6.2) que fueron pasados a suelo cuando alcanzaron un mayor desarrollo.

En los bioensayos realizados con cada una de las siete fracciones obtenidas del extracto crudo se observa que la fracción correspondiente a giberelinas libres añadida al medio de cultivo, al cabo de 35 días favorece la formación de anteridios de modo semejante a la producida en presencia del extracto crudo. Se observó cierta actividad anteridiógena en la fracción correspondiente a ésteres no polares de giberelinas. Del resto de fracciones resulta interesante comentar la inhibición del desarrollo inducida por la fracción correspondiente a los ésteres polares de giberelinas (Fig. 6.3) no superando el gametófito el estado filamentososo.

En cuanto al efecto que podrían tener los reguladores del desarrollo sobre la actividad anteridiógena (Tabla 6.2) añadidos junto con el extracto al medio de cultivo, se observa lo

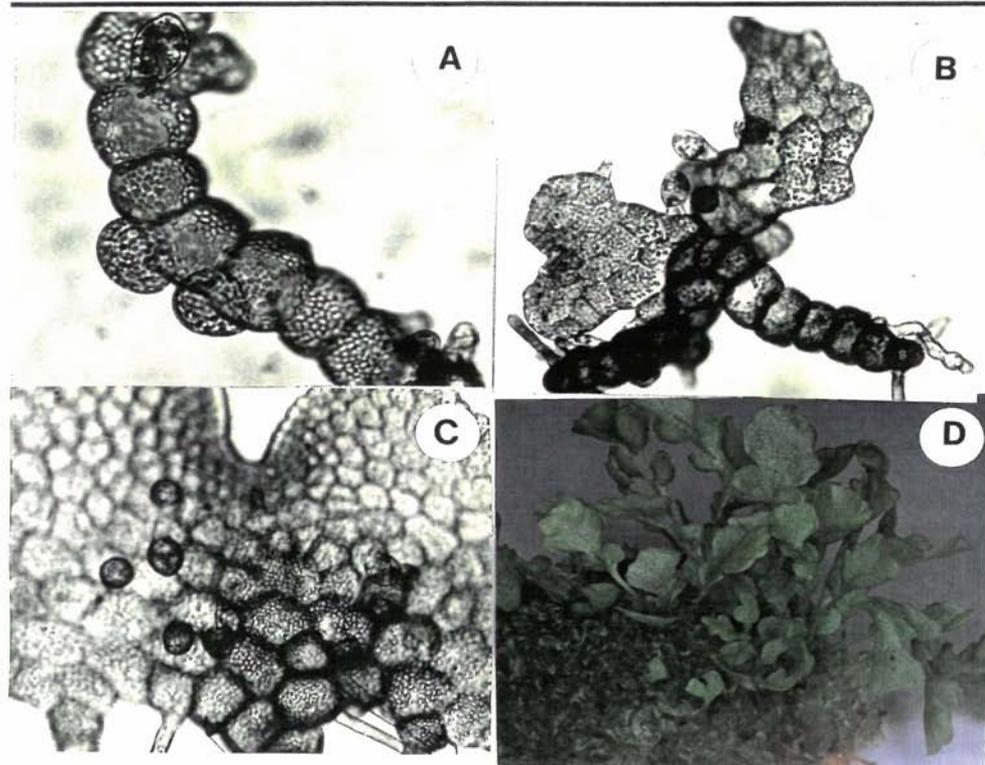


Fig. 6.2. Formación de anteridios en gametófitos de *B.spicant* en distintos estados de desarrollo: a) Filamentoso (x120), b) Espatulado (x60), c) Cordado (x60). Datos a los 35 días de cultivo. d) Formación de esporófitos de *B.spicant* en gametófitos que no fueron pasados a medio fresco.



Fig. 6.3. Inhibición del desarrollo de los gametófitos de *B.spicant* cultivados en el medio MK que incluye la fracción de ésteres polares de giberelinas (x24).

Tabla 6.1. Efecto de la presencia del extracto de medio donde habían estado creciendo gametófitos durante tres meses, añadido al medio MK, en B.spicant. Datos obtenidos a los 35 días.

MEDIO DE CULTIVO	%GAMETOFITOS AMERISTICOS	% GAMETOFITOS MERISTICOS	ANTERIDIOS	ARQUEGONIOS
MK	57	43	NO	SI
MK+ EXTRACTO	60	40	SI	NO

Tabla. 6.2. Efecto de los reguladores del desarrollo sobre la morfología y la actividad anteridiógena en gametófitos de B.spicant cultivados en el medio MK con extracto. Datos obtenidos a los 35 días.

REGULADOR ( $\mu$ M)	%GAMETOFITOS AMERISTICOS	%GAMETOFITOS MERISTICOS	ANTERIDIOS	ARQUEGONIOS	RIZOIDES
0	60	40	SI	NO	SI
0,49IBA	75	25	SI	NO	SI
4,9IBA	75	25	NO	NO	SI
49IBA	100	0	NO	NO	SI
0,28GA <sub>3</sub>	100	0	NO	NO	SI
2,8GA <sub>3</sub>	100	0	NO	NO	SI
28GA <sub>3</sub>	100	0	NO	NO	SI
0,44BAP	100	0	SI	NO	SI
4,4BAP	75	25	SI	NO	SI
44BAP	100	0	NO	NO	SI

siguiente.  $GA_3$  provocó una inhibición del desarrollo del gametófito, el cual tras producirse la germinación de la espora quedó estancado en los primeros estadios de su desarrollo. Todas las concentraciones ensayadas de reguladores salvo 0,44 y 4,43  $\mu M$  de BAP y 0,49  $\mu M$  de IBA inhibieron la actividad anteridiógena del extracto y todas las concentraciones de reguladores, sin excepción, promovieron la tipología amerística en los gametófitos. La formación de rizoides no se vio influenciada por ninguno de los tratamientos aplicados.

#### 6.4. DISCUSION

Klekowski (1969) describe la siguiente secuencia ontogénica en la formación de los gametangios en la mayoría de las especies pertenecientes a la familia Blechnaceae. En un primer momento los gametófitos son femeninos, formándose exclusivamente arquegonios, más adelante se forman anteridios y arquegonios, adquiriendo la condición de hermafroditas. Esta secuencia está considerada como la que confiere las mayores posibilidades al apareamiento intergametofítico. En este trabajo se observa que puede ser indefinida la presencia exclusiva de arquegonios sobre el gametófito siempre y cuando no se permita la acumulación en el medio de cultivo de alguna sustancia, aún por determinar químicamente, que induce la formación de anteridios. Por otra parte, parece claro que este sistema permite tener órganos sexuales masculinos y femeninos en gametófitos separados promoviéndose el intercambio genético, que sería una segunda implicación de este sistema. Sin embargo, no entraremos en esta cuestión.

Cousens en 1979 establece que un sistema anteridiógeno parece mediar en la formación de anteridios en *B. spicant*, observando que los gametófitos crecidos en medio de cultivo con extracto de medio donde previamente habían crecido gametófitos viejos, se han vuelto exclusivamente masculinos (amerísticos). El hecho de encontrar anteridios inducidos por la presencia del extracto en gametófitos merísticos (aquellos que presentan el máximo grado de desarrollo o estructura cordada, con una zona meristemática bien definida en la hendidura apical) y amerísticos, sugiere que no tiene un efecto directo sobre el desarrollo del gametófito, relegándolo a una tipología masculina amerística, sino estrictamente sobre la inducción de la formación de anteridios en el gametófito.

La extracción de giberelinas realizada a partir del extracto concentrado del medio de cultivo revela una actividad anteridiógena en la fracción correspondiente a las giberelinas

libres, así como también se produce una cierta actividad en la fracción correspondiente a ésteres no polares. El acetato de etilo arrastra la mayor actividad anteridiógena del compuesto/s presente en el extracto efectuado, siendo soluble en dicho solvente orgánico. Entre las giberelinas libres y algunos derivados podría estar incluido el compuesto anteridiógeno, pudiendo ser un camino a seguir en su aislamiento en la especie B.spicant. La inhibición del desarrollo provocada por la fracción correspondiente a ésteres polares revela una clara influencia de este tipo de compuestos sobre el crecimiento del gametófito.

La aplicación de los reguladores del crecimiento no aumenta la respuesta inductora de anteridios por parte del extracto pero sí afecta al desarrollo del gametófito, prevaleciendo el estado amerístico. IBA aplicada en la concentración  $0,49\mu\text{M}$  no bloquea el efecto anteridiógeno del extracto y esta observación coincide con los datos publicados por Hickok y Kiriluk (1984) en la especie Ceratopteris. Las dosis aplicadas de BAP de  $0.44$  y  $4.4\mu\text{M}$  tampoco ejercen un efecto inhibitorio sobre la inducción de anteridios por el extracto. El resto de tratamientos inhiben tanto el desarrollo del gametófito que no permiten que se manifieste la actividad anteridiógena del extracto. La Giberelina  $\text{GA}_3$  ha tenido un efecto anteridiógeno en Anemia (Schraudolf, 1962; Voeller, 1964) pero los ensayos realizados con este compuesto en Polypodiaceae no han dado ninguna respuesta inductora de anteridios. En Blechnum, la aplicación exógena de este regulador ha tenido un efecto claramente inhibitorio del desarrollo del gametófito en todas las dosis aplicadas.

## 6.5. BIBLIOGRAFIA

Corey, E.J. y Myers, A.G., 1985. Total synthesis of ( $\pm$ )antheridium-inducing factor ( $A_{An}$ ) of the fern Anemia phyllitidis. J. Amer. Chem. Soc. 107:5574-5576.

Corey, E.J., Myers, A.G., Takahashi, N., Yamane, H., Schraudolf, H., 1986. Constitution of antheridium-inducing factor of Anemia phyllitidis. Tetrah. Lett. 27:5083-5084.

Cousens, M.I., 1979. Gametophytic ontogeny, sex expression and genetic load as measures of population divergence in Blechnum spicant. Amer. J. Bot. 66:116-132.

Döpp, W., 1950. Eine die Antheridienbildung bei farnen fördernde substanz in den prothallien von Pteridium aquilinum (L.) Kuhn. Ber. Deut. Bot. Ges. 63:139.

Hickok, L.C. y Kiriluk, R., 1984. Effects of auxins on gametophyte development and sexual differentiation in the fern Ceratopteris thalictroides (L.) Brongn. Bot. Gaz. 145:37-42.

Klekowski, E.J., Jr, 1969. Reproductive biology of the pteridophyta. III. A study of the Blechnaceae. Bot. J. Linn. Soc. 62:361-377.

Klekowski, E.J. Jr. y Lloyd, R.M., 1968. Reproductive biology of the Pteridophyta I. General considerations and a study of Onoclea sensibilis L., J. Linn. Soc. (Bot.). 60:315-324.

Kraft-Klaunzer, P.; Furber, M.; Mander, L.N.; Twitchin, B., 1990. Synthesis of  $GA_7$  methyl ester, a potent gibberellin-derived antheridiogen from gametophytes of the fern Lygodium japonicum. Tetrah. Lett. 31:6235-6238.

Krishnamoorthy, H.N., 1975. Role of gibberellins in juvenility, flowering and sex expression, pp:115-143. En: H.N. Krishnamoorthy ed. Gibberellins and Plant Growth. Wiley Eastern Limited. New Delhi.

Näf, U., 1956. The demonstration of a factor concerned with the initiation of antheridia in Polypodiaceous ferns. Growth. 20:91-105.

Näf, U., 1979. Antheridiogens and antheridial development. In A.F. Dyer (Ed.), *Experimental Biology of Ferns*. London. Academic Press.

Näf, U., Sullivan, J., Cummins, M., 1969. New antheridiogen from the fern *Onoclea sensibilis*. *Science*. 163:1357.

Näf, U., Nakanishi, K., Endo, M., 1975. On the physiology and chemistry of fern antheridiogens. *Bot. Rev.* 41:315-359.

Nakanishi, K., Endo, M., Näf, U., Johnson, L.F., 1971. Structure of the antheridium-inducing factor of the fern *Anemia phyllitidis*. *J. Amer. Chem. Soc.* 93:5579-5581.

Russell, S., 1975. Extraction, purification and chemistry of gibberellins. En: H.N. Krishnamoorthy ed. *Gibberellins and Plant Growth*. Wiley Eastern Limited. New Delhi. India.

Salvo Tierra, E., 1990. *Guía de helechos de la Península Ibérica y Baleares*. Ed. Pirámide S.A. Madrid.

Schedlbauer, M.D. y Klekowski, E.J. Jr., 1972. Antheridiogen activity in the fern *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. *Bot. J. Linn. Soc.* 65:399-413.

Schraudolf, H., 1962. Die wirkung von phytohormonen auf keimung und entwicklung von farnprotallien. I. Auslösung der antheridienbildung und dunkelkeimung bei Schizaeaceen durch gibberellinnsaure. *Biol. Zbl.* 81:731-840.

Soltis, D.E. y Soltis, P.S., 1987. Polyploidy and breeding systems in homosporous Pteridophyta: A reevaluation. *Amer. Nat.* 130:219-232.

Voeller, B.R., 1964. Antheridiogens in ferns. Régulateurs naturels de la croissance végétale. In: *Colloq. Int. Cent. Natl. Resch. Sci.* 123:665-684.

Warne, T.R. y Hickok, L.G., 1989. Evidence for a Gibberellin biosynthetic origin of *Ceratopteris* antheridiogen. *Plant Physiol.* 89:535-538.

---

Yamane, H., Takahashi, N., Takeno, K. y Furuya, M., 1979. Identification of giberellin A<sub>9</sub> methyl ester as a natural substance regulating formation of reproductive organs in Lygodium japonicum. *Planta*. 147:251-256.

## 7. EFECTO DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA PROPAGACION DE HELECHOS

### 7.1. INTRODUCCION

El efecto de los reguladores del crecimiento sobre la capacidad morfogénica de un explanto dando como respuestas procesos de organogénesis directa o indirecta, ha sido ampliamente comentado y puesto de manifiesto por numerosos autores (Skoog y Miller, 1957; Danckwardt-Lillieström, 1957; Plummer y Leopold, 1957; Torrey, 1958; Schraudolf y Reinert, 1959; Paulet y Nitsch, 1959, Gunderson, 1959; Murashige, 1961,1964).

En helechos, los reguladores del crecimiento han sido usados en la multiplicación de las plantas en numerosas ocasiones (Higuchi y Amaki, 1989; Loescher y Albrecht, 1979; Hicks y von Aderkas, 1986; de García y Furelli, 1987; Padhya, 1987). Su empleo en la propagación de los helechos ha hecho posible la inducción de la formación de varios centros de desarrollo, a partir de los cuales tiene lugar la formación de numerosas frondes que harán más atractiva la planta (Murashige, 1974).

En la micropropagación de helechos se han utilizado diferentes partes de la planta para iniciar la cadena de multiplicación clonal. En ocasiones han sido aprovechados los sistemas naturales de multiplicación vegetativa de la planta, así se ha propagado con éxito el género Nephrolepis a partir del estolón, siendo uno de los helechos más comercializados.

El rizoma del esporófito ha mostrado una alta capacidad morfogénica "in vitro" lo que ha sido utilizado tanto para llevar a cabo estudios sobre la alternancia generacional (Mehra y Sulklyan, 1969; Kshirsagar y Mehta, 1978) como para conseguir un sistema efectivo de multiplicación (Higuchi y Amaki, 1988).

Otro punto de partida en la propagación clonal de helechos puede ser el gametófito de una especie apogámica. La apogamia, descrita en un 10% de helechos, es un proceso natural a través del cual los esporófitos se originan a partir de células asexuales, adquiriendo ambas generaciones el mismo nivel de ploidía. Este fenómeno se interpreta como un proceso

organogénico que tiene lugar en el gametófito. Al igual que ocurre en otros tejidos y órganos vegetales, podría ser controlado mediante los reguladores del crecimiento (Whittier, 1966).

El objetivo que se persigue es probar la capacidad morfogénica del rizoma de Osmunda regalis L., Blechnum spicant L., Dryopteris affinis sp. affinis (Lowe) Fraser-Jenkins, Pteris ensiformis L., Asplenium nidus L. y Woodwardia virginica Sm. así como del gametófito apogámico de D. affinis, en respuesta a un aporte exógeno al medio de cultivo de los reguladores del crecimiento, a fin de conseguir una propagación efectiva de estos helechos.

## 7.2. MATERIAL Y METODOS

Esporófitos juveniles de O. regalis, D. affinis, B. spicant L., A. nidus, P. ensiformis y W. virginica fueron cultivados en el medio mineral de Murashige y Skoog (1962) al que se añadió sacarosa 87,4 mM y Bacto-agar Difco al 0,7%, y que incluía también las siguientes dosis de reguladores del crecimiento: 4,4  $\mu$ M BAP; 4,4  $\mu$ M BAP + 0,53  $\mu$ M ANA; 0,44  $\mu$ M BAP; 0,44  $\mu$ M BAP + 0,053  $\mu$ M ANA.

Con esporófitos juveniles de O. regalis se realizaron más ensayos. Se añadieron dosis de Kinetina 0; 0,046; 0,46; 4,64; 9,28; 23,2  $\mu$ M, al medio mineral de Knudson (1946) y se estudió también el efecto de diferentes concentraciones salinas en el medio de cultivo: 1MS, 1/2 MS, 1/4 MS y Kd, a los que se añadió sacarosa 87,4 mM y Kinetina 0,46  $\mu$ M, solidificados en todos los casos con Bacto-agar Difco al 0,7%

Cultivos de rizoma de P. ensiformis que fueron cultivados inicialmente en presencia de los reguladores del desarrollo BAP y ANA durante un mes, se pasaron al mismo medio base al que se añadieron los siguientes balances auxina-citoquinina: 0 BAP + 0 ANA; 0,44  $\mu$ M BAP + 0,053  $\mu$ M ANA; 0,44 BAP; 0,53 ANA; 5,3 ANA.

Gametófitos de D. affinis que habían estado creciendo en el medio mineral MS, que incluía sacarosa 87,4 mM y Bacto-agar Difco al 0,7% fueron cultivados en el mismo medio con 4,43  $\mu$ M BAP solo o en combinación de 0,53  $\mu$ M ANA.

El callo formado a partir del gametófito de D. affinis fue subcultivado, al cabo de un

mes, en el mismo medio suplementado con las siguientes combinaciones de auxinas y citoquininas: 4,43  $\mu\text{M}$  BAP; 4,43  $\mu\text{M}$  BAP + 0,53  $\mu\text{M}$  ANA; 4,52  $\mu\text{M}$  2,4D; 4,52  $\mu\text{M}$  2,4D + 0,46  $\mu\text{M}$  Kn. También se llevó a cabo el cultivo en ausencia de reguladores.

Todos los cultivos se mantuvieron a 25°C, 40  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad y un fotoperíodo de 16 h luz. El callo fue cultivado con este régimen de iluminación y en oscuridad continua.

Para realizar estudios histológicos se utilizó la inclusión en parafina, (Johansen, 1940).

### 7.3. RESULTADOS

7.3.1. Proliferación de yemas en el rizoma. En O.regalis se observó que dosis de kinetina superiores a 4,64  $\mu\text{M}$  añadidas al medio de cultivo de Knudson resultaban nocivas para el explanto, que se necrosaba. Por otra parte, diferentes concentraciones de nutrientes con la adición de 0,46  $\mu\text{M}$  de kinetina no favorecieron en ningún caso la proliferación del rizoma.

El rizoma de A.nidus, W.virginica, P.ensifomis, B.spicant y D.affinis, en presencia de citoquinina o citoquinina y auxina en el medio de cultivo, experimentó en todos los casos un hinchamiento (Fig. 7.1). Al cambiar los cultivos de rizoma al mismo medio base pero sin reguladores del crecimiento, se desarrollaron numerosas frondes a partir del rizoma (Fig. 7.2). El estudio histológico del rizoma demostró que la proliferación de yemas inducida por los reguladores del desarrollo presentó variaciones en cuanto a la localización en el explanto, encontrando estados iniciales de proliferación celular en la zona más superficial del rizoma y también en zonas más internas, abriéndose paso la yema entre las células del parénquima (Fig. 7.3).

El rizoma de W.virginica cultivado con 0,44  $\mu\text{M}$  BAP sólo o con 0,053  $\mu\text{M}$  ANA permite la proliferación de yemas y la elongación de los primordios foliares, por el contrario, el cultivo de rizoma con 4,43  $\mu\text{M}$  BAP sólo o en combinación con ANA no permite la elongación de los primordios foliares.

El rizoma de P.ensifomis que había sido cultivado con BAP y ANA durante un mes, al ser retirados del medio de cultivo los reguladores regeneró frondes masivamente. Por el

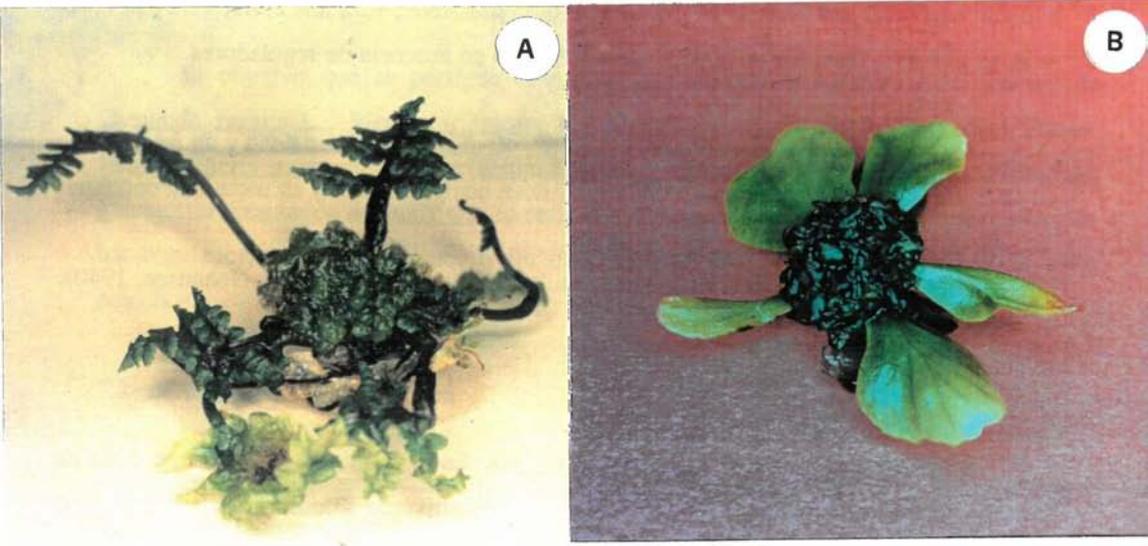


Fig. 7.1. Proliferación de yemas en el rizoma de esporófitos juveniles de a) *W. virginica* y b) *A. nidus*, cultivados en el medio MS con  $4,43 \mu\text{M}$  BAP y  $0,53 \mu\text{M}$  ANA.



Fig. 7.2. Regeneración de frondes en el rizoma de *W. virginica* cultivado en el medio MS en ausencia de reguladores del crecimiento.

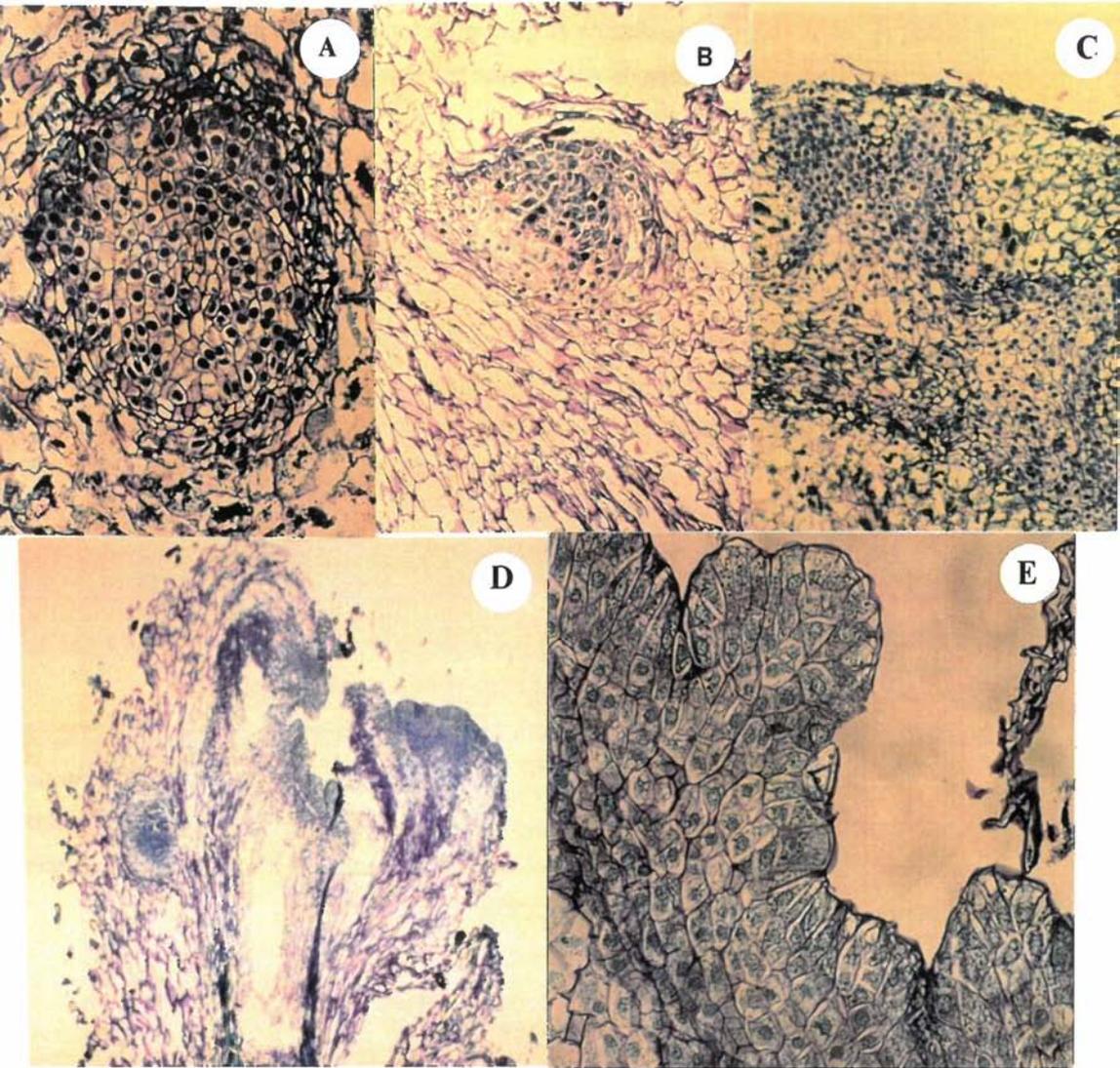


Fig. 7.3. Proliferaciones celulares asociadas con la formación de yemas en cultivos de rizoma. a) Centro meristemático intercalado en el parénquima en *P. ensiformis*. b) Organización celular en capas en dicho centro, abriéndose paso entre las células parenquimáticas. c) Yema totalmente desarrollada. d) Formación endógena de yemas en *W. virginica*. e) Proliferaciones celulares organizadas en la superficie del rizoma en *P. ensiformis*.

contrario, un cultivo prolongado con BAP o BAP y ANA no permite la regeneración de frondes, teniendo lugar la regeneración de gametófito apospóreo. La presencia exclusiva de la mayor concentración utilizada de ANA induce la formación de callo (Fig. 7.4).

7.3.2. Organogénesis indirecta en el gametófito de *D. affinis*. Cuando el gametófito se cultivó en presencia de BAP (4,43  $\mu\text{M}$ ) con o sin ANA (0,53  $\mu\text{M}$ ), las células se dividieron formando un callo (Fig. 7.5) inicialmente verde y friable. Al cultivar el callo que había sido inducido con 4,43  $\mu\text{M}$  BAP y 0.53  $\mu\text{M}$  ANA, en el medio MS sin reguladores tuvo lugar una masiva regeneración de esporófitos produciendo, al cabo de cuatro meses, 10.000 esporófitos a partir de 1 g de callo. Las observaciones histológicas del callo cultivado en ausencia de reguladores revelaron la presencia casi exclusiva de células meristemáticas, que organizaron numerosos centros de desarrollo. El cultivo del callo en presencia de diferentes balances auxina-citoquinina provoca su necrosis, excepto la utilización de 4,52  $\mu\text{M}$  2,4D con o sin 0,46  $\mu\text{M}$  Kn, en oscuridad (Tabla 7.1).

Al cabo de seis meses decrece la regeneración de esporófitos y tiene lugar la regeneración de gametófito a partir de callo.

7.3.3. Cultivo de esporófitos. Tanto los esporófitos obtenidos por proliferación de yemas en el rizoma como los obtenidos a partir de callo procedente de gametófito apogámico fueron aislados y subcultivados periódicamente, formando nuevas frondes y raíces, hasta que estuvieron listos para ser transplantados a tierra (Fig. 7.6).

## 7.4. DISCUSION

La respuesta observada en el rizoma de la mayoría de las especies de helechos ensayadas, refleja un comportamiento uniforme que consiste siempre en la estimulación de numerosos brotes. La ausencia de los reguladores facilita su posterior desarrollo. En todos los casos supone un sistema válido para propagar estas especies, salvo en *O. regalis*, que no responde al estímulo de las citoquininas ni al de ninguno de los balances auxina-citoquinina ensayados para lograr la proliferación de yemas. El rizoma de esta especie es corto, presenta una extremada dureza, hallándose fuertemente anclado al sustrato por numerosas raíces. La ausencia de clones rizómicos en estudios de campo, revela una nula actividad expansiva por parte de este órgano. Todo ello ha inducido a pensar que esta especie no tiene un rizoma

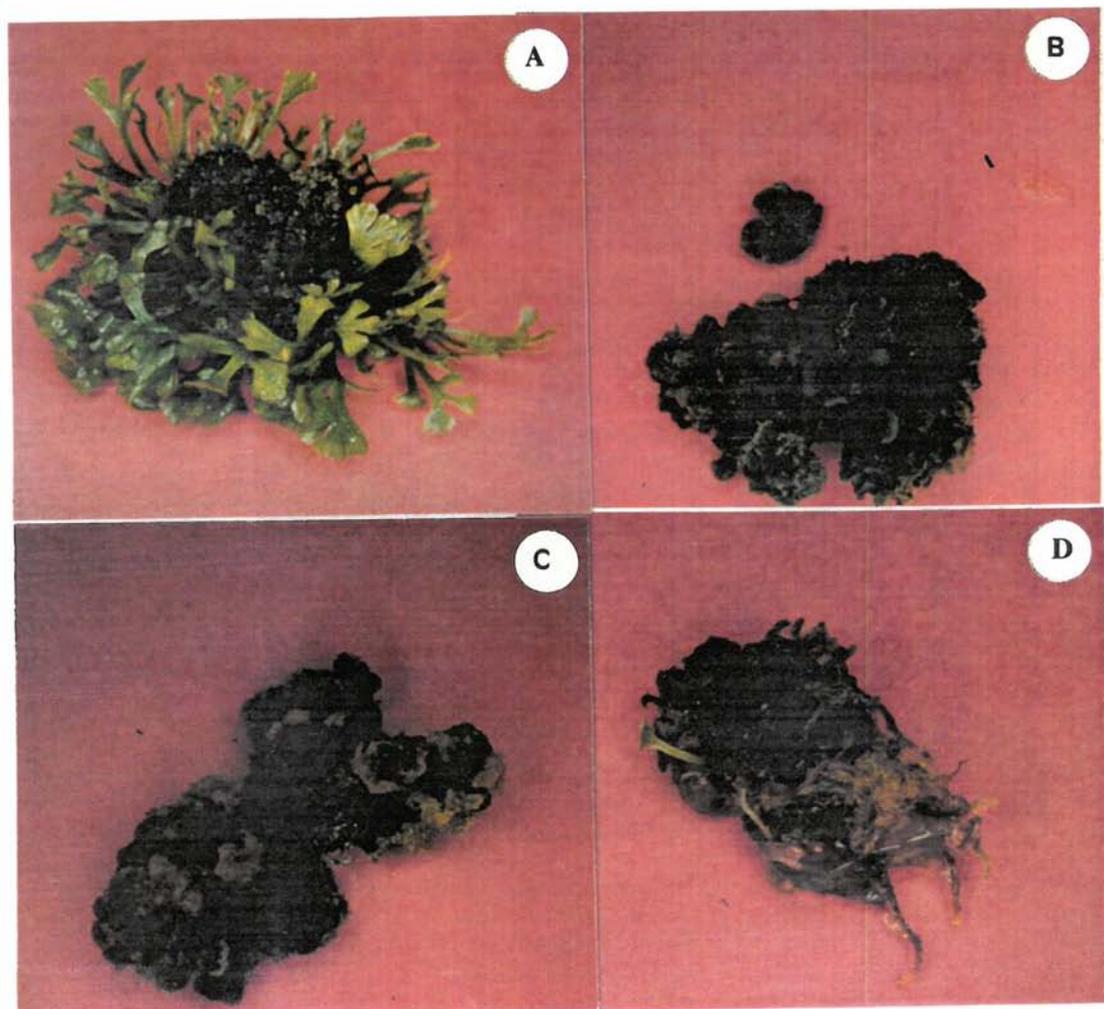


Fig. 7.4. Cultivos de rizoma en *P.ensiformis*. a) Regeneración de fronde en el medio base MS. b) Regeneración de gametófito en presencia de BAP  $0.44 \mu\text{M}$  y ANA  $0.053 \mu\text{M}$ . c) Formación de callo en presencia de ANA  $5.3 \mu\text{M}$ . d) Formación de raíces en presencia de ANA  $5.3 \mu\text{M}$ .

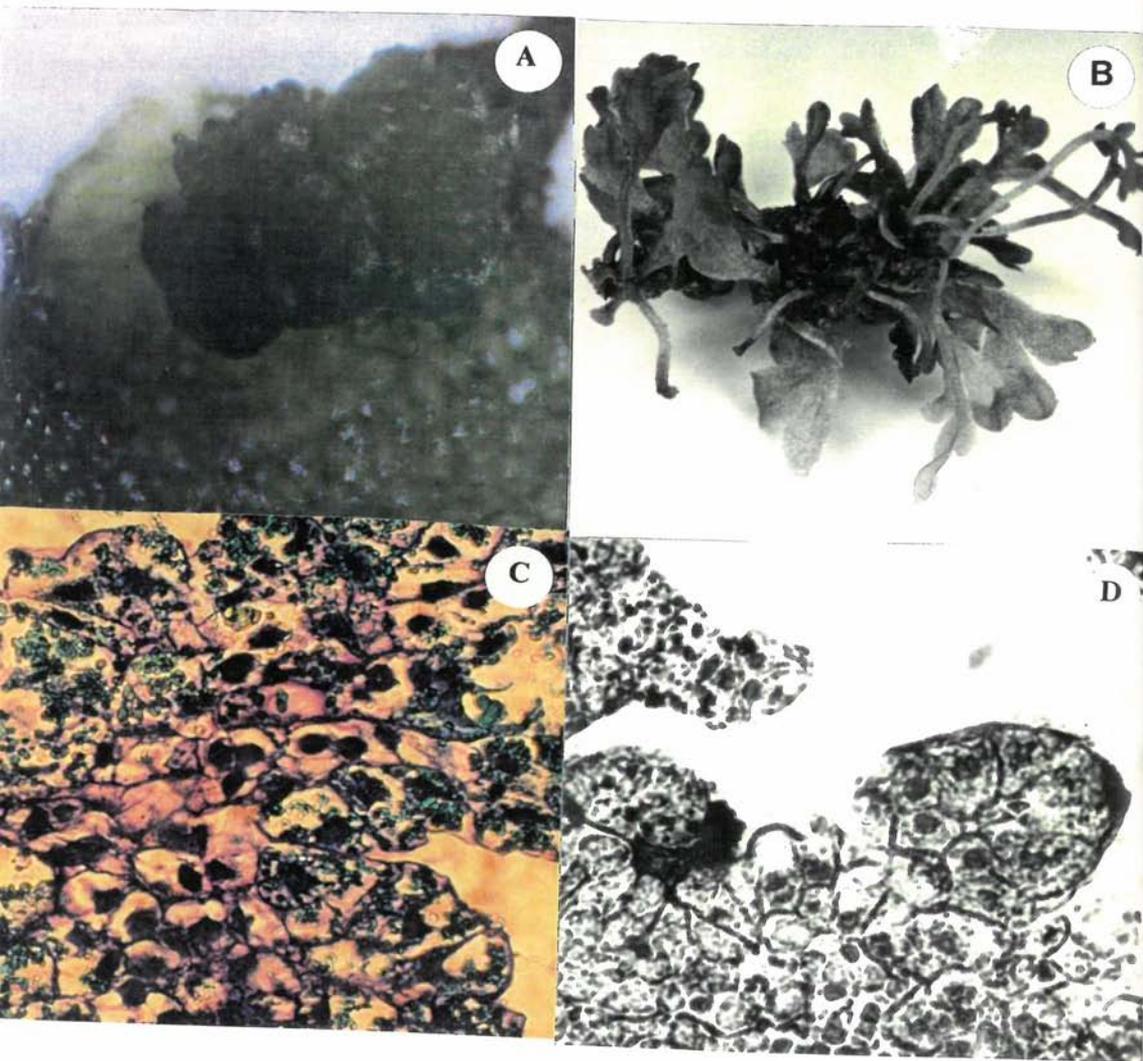


Fig. 7.5. Formación de callo en el gametófito de *D.affinis* en el medio nutritivo MS con  $4,43 \mu\text{M}$  BAP y  $0,53 \mu\text{M}$  ANA (x22). b) Callo de *D.affinis* regenerando esporófitos en el medio MS, en ausencia de reguladores. c) Constitución celular del callo de *D.affinis*: células más grandes, vacuoladas y células pequeñas, de características meristemáticas. d) Organizaciones celulares en el callo (x120).

Tabla 7.1. Efecto de los reguladores del desarrollo sobre el cultivo del callo de *D.affinis*.  
 +=mínimo, ++=medio, +++=máximo. L= Fotoperíodo de 16h luz;  
 O=Oscuridad continua. NR= No realizado el ensayo.

REGULADOR $\mu\text{M}$	FOTOPER.	NECROSIS	CRECIMIENTO	REGENER.
4,43BAP	L	+++	+	Gametófito
	O	+++	+	Gametófito
4,43BAP +0,53ANA	L	+++	+	Gametófito
	O	+++	+	Gametófito
4,52 2,4D	L	+++	+	No
	O	+	+++	No
4,52 2,4D + 0,46Kn	L	+++	+	No
	O	+	+++	No
0	L	No	+	Esporófito
	O	NR	NR	NR



Fig. 7.8. Paso a tierra de esporófitos obtenidos a partir de: a) rizoma de W.virginica, b) callo de gametófito de la especie apogámica D.affinis, c) rizoma de B.spicant, d) cultivo de gametófitos de O.regalis sin reguladores del desarrollo.

capacitado para la reproducción vegetativa natural (Klekowski, 1973) quedando supeditada su expansión a la reproducción por esporas. Sin renunciar a la posibilidad de encontrar condiciones de cultivo "in vitro" que puedan favorecer en un futuro la propagación a partir del rizoma en esta especie, consideramos que presenta una mayor dificultad que en el resto de las especies analizadas.

El cultivo de rizoma de P.ensiformis en presencia de los reguladores del crecimiento representa un sistema interesante para estudiar los procesos de regeneración hacia tejidos más organizados (fronde y gametófito) o menos organizados (callo). En trabajos publicados anteriormente por Mehra y Sulklyan (1969) cultivando segmentos de rizoma en Amelopteris prolifera; Mehra y Palta (1971) cultivando callo de raíz en Cyclosorus dentatus; Sulklyan y Mehra (1977) cultivando callo de hojas, raíces y estolones en Nephrolepis cordifolia; Kshirsagar y Mehra (1978) cultivando también callo de rizoma en Pteris vittata, observaron cómo la sacarosa influye en el patrón de diferenciación que tiene lugar en dichos cultivos. La plasticidad del helecho se pone nuevamente de manifiesto en este trabajo, esta vez a través de los reguladores del desarrollo en P.ensiformis.

El gametófito de D. affinis sp. affinis forma esporófitos en la naturaleza mediante un proceso de apogamia. Cuando se cultiva "in vitro" en presencia de los reguladores del crecimiento, las células parenquimáticas que lo constituyen se desorganizan y a partir de ellas tiene lugar la proliferación de un callo altamente morfogénico, que organiza brotes esporófitos activamente, amplificando la respuesta apogámica natural en esta subespecie. La aplicación conjunta de auxina y citoquinina es necesaria para que se produzca la regeneración del esporófito, no siendo indispensable para la formación de callo.

La apogamia ha sido inducida en gametófitos sexuales mediante la incorporación al medio de cultivo de los reguladores del desarrollo, (Whittier, 1966). Concretamente, el ácido naftalenacético añadido en una concentración 10,72  $\mu\text{M}$  favorece la respuesta apogámica. Por otra parte, Kuriyama y col. (1990), encontraron un efecto promotor de la apogamia en Equisetum arvense por medio de la incorporación al medio de cultivo de la citoquinina BAP en las concentraciones 0,5 y 1  $\mu\text{M}$ . En este trabajo ha sido puesto de manifiesto por vez primera la influencia que también tienen los reguladores del desarrollo en la formación de esporófitos en especies con apogamia obligada.

Si las células del callo se exponen un período de tiempo mayor a los reguladores BAP y ANA se produce una pérdida de la capacidad de regeneración de esporófitos. Por tanto, una exposición limitada en el tiempo, a dichos reguladores es suficiente para activar los genes responsables de la organización esporofítica, sin dañarse el tejido del callo y sin alterar el patrón de organización seguido por sus células.

Sería necesario realizar una valoración del contenido endógeno de los reguladores del desarrollo en el gametófito de D.affinis para contrastar los resultados derivados de su aplicación exógena y poder comprender en profundidad los mecanismos de regulación hormonal implicados en el fenómeno de la alternancia de generaciones en una especie apogámica.

## 7.5. REFERENCIAS

- De García, E. y Furelli, L., 1987. Clonal mass propagation of the fern Cyrtomium falcatum. *Acta Horticulturae* 212:655-661.
- George, E.F. y Sherrington, P.D., 1984. Plant propagation by tissue culture. Eastern Press, Reading, Berks.
- Gundersen, K., 1959. Some experiments with gibberellic acid. *Acta Horti. Gotob.* 22:87-110.
- Hicks, G. y von Aderkas, P., 1986. A tissue culture of the Ostrich fern Matteuccia struthiopteris (L.) Todaro. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 5:199-204.
- Higuchi, H. y Amaki, W.(1989). Effects of 6-benzylaminopurine on the organogenesis of Asplenium nidus-avis L. through in vitro propagation. *Scientia Horticulturae*, 37:351-359.
- Johansen, D.A., 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Knudson, L., 1946. A nutrient solution for the germination of orchid seed. *Am. Orchid. Soc. Bull.* 15:214-217.
- Klekowski, E.J. Jr., 1973. Genetic load in Osmunda regalis populations. *Amer. J. Bot.* 60:146-154.
- Kshirsagar, M.K. y Mehta, A.R., 1978. In vitro studies in ferns: Growth and differentiation in rhizome callus of Pteris vittata. *Phytomorphology*, pp:51-58.
- Kuriyama, A., Sugawara, Y., Matsushima, H., Takeuchi, M., 1990. Production of sporophytic structures from gametophytes by cytokinin in Equisetum arvense. *Naturwissenschaften.* 77:31-32.
- Loescher, W.H. y Albrecht, C.N., 1979. Development in vitro of Nephrolepis exaltata cv. *Bostoniensis* runner tissues. *Physiol. Plant.* 15:250-254.

Mehra, P.N. y Palta, H.K., 1971. "In vitro" controlled differentiation of the root callus of Cyclosorus dentatus. *Phytomorphology* 21:367-375.

Mehra, P.N. y Sulklyan, D.S., 1969. In vitro studies on apogamy, apospory and controlled differentiation of rhizome segments of the fern Amelopteris prolifera (Retz.) Copel. *Bot. J. Linn. Soc.* 62:431-443.

Murashige, T., 1961. Suppression of shoot formation in cultured tobacco cells by gibberellic acid. *Science*. 134:280.

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

Murashige, T., 1964. Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin. *Physiol. Plant.* 17:636-643.

Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.

Padhya, M.A., 1987. Mass propagation of ferns through tissue culture. *Acta Horticulturae* 212:645-649.

Skoog, F. y Miller, C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured "in vitro". *Proc. Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-131.

Sulklyan, D.S. y Mehra, P.N., 1977. "In vitro" morphogenetic studies in Nephrolepis cordifolia. *Phytomorphology*. pp:396-406.

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

## 8. PROCESOS DE REGENERACION EN CULTIVOS HOMOGENEIZADOS DE FRONDE EN Asplenium nidus

### 8.1. INTRODUCCION

La aplicación de la técnica del cultivo "in vitro" a la multiplicación de las plantas, aunque exitosa en muchas ocasiones, puede resultar laboriosa (Murashige, 1974). El trabajo intensivo en el subcultivo y la utilización de pequeños recipientes pueden disminuir la rentabilidad del sistema.

El desarrollo de cultivos automatizados a gran escala en bioreactores reducen las tareas manuales mejorando la producción (Sluis and Walker, 1985; Levin y col., 1988). Este tipo de cultivos ha sido utilizado con éxito en especies con procesos de embriogénesis somática (Ammirato y Styer, 1985; Styer, 1985; Preil y col., 1988) u organogénesis de yemas, como ocurre con Begonia y Lilium (Takayama y Misawa, 1981, 1983).

La fronde juvenil de helechos ha mostrado una gran plasticidad en cultivos "in vitro" (Von Aderkas y Hicks, 1985). Así se ha visto en Osmunda cinnamomea L. y Dryopteris aristata Druce que dichos órganos aislados regeneran tanto tallo como hojas (Cutter, 1965; Steeves, 1962; Halperin, 1978).

La homogeneización del gametófito y del esporófito ha sido un sistema satisfactorio en determinadas ocasiones para estimular la capacidad de regeneración de las células del material vegetal cultivado (Knauss, 1976; Finnie y van Staden, 1987; Cooke, 1979).

Asplenium nidus L. es un helecho epífita con un gran valor ornamental, que se propaga generalmente mediante espora, germinada en suelo (Briggs y Calvin, 1987). El objetivo de este trabajo es analizar la capacidad de regeneración de la fronde de A.nidus en cultivos homogeneizados, en medio líquido, para conseguir finalmente la automatización del cultivo en esta especie.

## 8.2. MATERIAL Y METODOS

Esporas de *A.nidus* fueron desinfectadas con NaClO (5  $\text{gl}^{-1}$ ) y Tween 20 (0.1%) durante 10 min y luego sometidas a tres lavados con agua destilada estéril de diez minutos de duración cada uno. Para hacer los cambios de solución las esporas se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 min. Las esporas se sembraron en el medio nutritivo de Knudson (1946) solidificado con 0,7% de Bacto-Agar Difco.

Los cultivos de gametófitos se realizaron en el medio MS, en presencia de sacarosa 87,4 mM y solidificado con 0,7% Bacto-Agar Difco y fueron regados periódicamente para favorecer la formación de esporófitos.

La homogeneización de la fronde se realizó con un Omni-Mixer. Para ello 0.5 gramos de material vegetal fue triturado en un tubo de ensayo y cultivado en 150 ml de medio MS líquido, contenido en un matraz. Paralelamente, alícuotas de triturado de fronde fueron cultivadas en frascos de vidrio con medio MS sólido.

Los cultivos en medio líquido se colocaron en un agitador orbital a 75 rpm, a 25° C y una intensidad de luz de 40  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  con un fotoperíodo de 16h luz.

Los gametófitos apospóreos fueron separados de los esporófitos regenerados y cultivados sobre medio sólido, regando periódicamente para favorecer la fertilización.

Los gametófitos fueron observados y fotografiados en fresco.

## 8.3. RESULTADOS

Tras la germinación de las esporas, proceso que ocurre durante la primera semana de su cultivo, se formó un gametófito filamentososo que evolucionó hasta alcanzar el estado cordado. Al cabo de ocho meses la formación de esporófitos ya resultaba aparente (Fig. 8.1).

Los explantos procedentes de la fronde triturada, al cabo de unos días adquirieron un aspecto necrótico, sin embargo, algunas células conservaron la capacidad de división y regeneraron activamente cuando fueron cultivados los explantos en medio líquido (Fig. 8.1)



Fig. 8.1. Cultivos "in vitro" de *A.nidus* L. a) Agregados de gametófitos de *A.nidus* formando esporófitos, ocho meses después de la germinación de las esporas. b) Regeneración en cultivos homogeneizados de fronde en medio líquido.

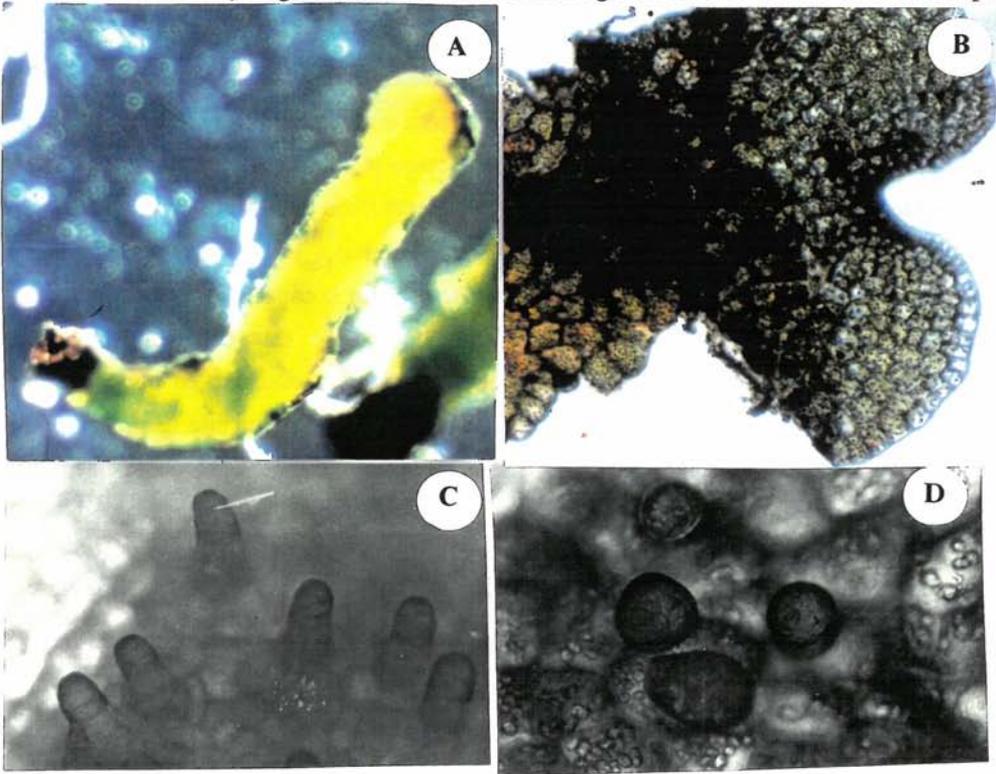


Fig. 8.2. Regeneración en cultivos homogeneizados de fronde en medio líquido. a) Esporófito, e=explanto inicial. (x24). b) Gametófito apospóreo. Las células más oscuras corresponden al explanto inicial (x60). c) Formación de arquegonios en el gametófito apospóreo. d) Formación de anteridios en el gametófito apospóreo (x150).

en medio sólido el número de explantos que regeneraron fue mínimo. El patrón de diferenciación seguido por los explantos fue de dos tipos (Fig. 8.2). Algunos explantos regeneraron esporófitos. Por el contrario, otros explantos regeneraron gametófitos (aposporia) que al igual que los originado directamente de espora, formaron anteridios y arquegonios funcionales.

#### 8.4. DISCUSION

Los homogeneizados de fronde de A.nidus cultivados en medio líquido, al contrario de lo ocurrido en cultivos en medio sólido, llevan a cabo procesos de regeneración, probablemente por una mayor permisibilidad del medio sobre la difusión de nutrientes y reguladores del desarrollo, que pueden influir sobre la capacidad morfogénica del explanto.

Durante el cultivo de homogeneizados de fronde, algunas células de los explantos se dividen y organizan según dos patrones diferentes: gametófito (aposporia) y esporófito. La inducción de la aposporia normalmente requiere la discontinuidad vascular del explanto (Sheffield y Bell, 1981b, Sheffield y col., 1982), así como el contacto del explanto con una superficie húmeda que permita la difusión de posibles metabolitos implicados en los procesos de diferenciación (Sheffield y Bell, 1981a; Von Aderkas, 1986). Las condiciones experimentales que se han aplicado en este trabajo para analizar la capacidad de regeneración en cultivos homogeneizados de fronde en medio líquido en esta especie provocan, paralelamente, el desarrollo de la aposporia. Por tanto, debería buscarse en un posterior trabajo un equilibrio entre ambas situaciones, a fin de conseguir una buena tasa de producción al propagar esta especie mediante el empleo de este tipo de cultivos. Esta doble línea de actuación de las células de esporófitos juveniles ha sido relacionada en Adiantum pedatum (Morel, 1963) con la edad del material. Según este autor el material juvenil regenera principalmente gametófito y el material adulto, esporófito. Hirsch (1975), encuentra en la concentración de sacarosa un modulador de la respuesta, de forma que concentraciones bajas promueven la regeneración de gametófitos y concentraciones más elevadas inducen la regeneración de esporófitos.

El proceso de regeneración mayoritario aquí ha sido el gametofítico y ello ha podido estar condicionado por los factores anteriormente comentados. En posteriores trabajos se deberá insistir en esta cuestión con el objetivo de controlar la regulación de ambos procesos

de regeneración.

El empleo del medio líquido se ha mostrado efectivo en la propagación de la especie por la formación de centros de desarrollo múltiples o meristemoides en el explanto. Este suceso ha sido comentado por Ziv and Hadar (1981) cultivando Nephrolepis exaltata, quienes observan una respuesta mayoritaria en cuanto a la proliferación de meristemoides bajo estas condiciones de cultivo.

La aposporia, fenómeno por el cual tiene lugar la formación de gametófito a partir de tejido esporofítico, muestra claramente la capacidad de las células del esporófito juvenil de variar el patrón de organización y diferenciación sin variar el nivel de ploidía (Whittier, 1971). El gametófito apospóreo forma órganos sexuales funcionales pudiendo dar lugar a la formación de esporófitos tetraploides. A través de este sistema experimental se pueden conseguir gametófitos y esporófitos con niveles de ploidía crecientes, lo que representa un sistema experimental interesante para llevar a cabo estudios de biología básica así como una ruta para la obtención de nuevas variedades en esta especie.

## 8.5. BIBLIOGRAFIA

Ammirato, P.V. y Styer, D.J., 1985. Strategies for large-scale manipulation of somatic embryos in suspension cultures. In: M. Zaitlin et al., eds. *Biotechnology in Plants Science*. Academic Press, New York, pp. 161-178.

Briggs, G.B. y Calvin, C.L., 1987. *Indoor Plants*, Wiley, New York, pp. 343-349.

Cooke R.C., 1979. Homogenization as an aid in tissue culture propagation of Platyserium and Davallia. *HortScience*. 14:21-22.

Cutter, E.G., 1965. Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. *Bot. Rev.* 31:7-113.

Finnie J.F. y van Staden J., 1987. Multiplication of the tree fern Cyathea dregei. *HortScience* 22:665.

Halperin, W., 1978. Organogenesis at the shoot apex. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29:239-262.

Hirsch, A.M., 1975. The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes. *Plant Physiol.* 56:390-393.

Knauss, J.F., 1976. A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 89:363-365.

Levin R., Gaba V., Tal B., Hirsch S., Denola D., Vasil I.K., 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. *BioTechnology* 6:1035-1040.

Morel, G., 1963. Leaf regeneration in Adiantum pedatum. *J. Linn. Soc. Bot.* 58:381-384.

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

Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.*

25:135-166.

Preil, W., Florek, P., Wix, U., Beck, A., 1988. Towards mass propagation by use of bioreactors. *Acta Hort.* 226:99-106.

Sheffield, E. y Bell, P.R., 1981a. Experimental studies of apospory in ferns. *Ann. Bot. (London)* 47:187-195.

Sheffield, E. y Bell, P.R., 1981b. Cessation of vascular activity correlated with aposporous development in *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *New Phytol.* 88:533-538.

Sheffield, E., Bell, P.R., Laird, S., 1982. Tracheary occlusion in fronds of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn showing apospory. *New Phytol.* 90:321-325.

Sluis E.F. y Walker K.A., 1985. Commercialization of plant tissue culture propagation. *I.A.T.P.C. Newsletter* 47:2-12.

Steeves, T.A., 1962. Morphogenesis in isolated fern leaves. In: *Regeneration, 20th Growth Symposium*. Ed. D. Rudnick. Ronald Press, New York. pp:117-151.

Styer, D.J., 1985. Bioreactor technology for plant propagation. In: R.R. Henke et al., eds. *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Plenum, New York, pp.:117-130.

Takayama, S. y Misawa, M., 1981. Mass-propagation of *Begonia* × *hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol.* 22:461-467.

Takayama, S. y Misawa, M., 1983. The mass-propagation of *Lilium* "in vitro" by stimulation of multiple adventitious bulb-scale formation and by shake culture. *Can. J. Bot.* 61:224-228.

Von Aderkas P., 1986. Enhancement of apospory in liquid culture of *Matteuccia struthiopteris*. *Ann. Bot. (London)* 57:505-510.

Von Aderkas, P. y Hicks, L.G., 1985. In vitro development of isolated leaf primordia of *Matteuccia struthiopteris*. *Can.J.Bot.* 63:916-919.



## 9. DISCUSION GENERAL

Los helechos tienen un considerable potencial económico debido a sus buenas cualidades ornamentales. La aplicación de la técnica del cultivo "in vitro" para incrementar la producción de especies viene siendo práctica habitual en las últimas décadas y es por ello que el objetivo perseguido en este trabajo ha sido analizar los sistemas de propagación "in vitro" que presentan los helechos durante el período de cultivo comprendido entre la siembra de esporas hasta la formación del esporófito. Las plantas elegidas para ello han sido las siguientes: *Osmunda regalis* L., *Blechnum spicant* L., *Dryopteris affinis* sp.affinis (Lowe) Fraser-Jenkins, *Asplenium nidus* L., *Pteris ensiformis* L. y *Woodwardia virginica* Sm., perteneciendo las tres primeras a la flora pteridofítica autóctona de la Comunidad asturiana. El empleo de un elevado número de especies, si bien ha resultado laborioso y en ocasiones difícil de coordinar, ha permitido pasar revisión a la práctica totalidad de aspectos relacionados con el cultivo y multiplicación "in vitro" de helechos.

Otra consecuencia derivada de la aplicación de las técnicas de cultivo "in vitro" de tejidos vegetales a la propagación de helechos ha sido el contribuir con esto a un mejor conocimiento de la biología de estas plantas, que también repercutirá en la producción de especie deseables.

Al elegir la espora como material vegetal para iniciar los cultivos se han tenido que determinar las condiciones adecuadas para lograr el desarrollo de todas las fases implicadas del ciclo: espora, gametófito y esporófito.

La utilización de las esporas resuelve favorablemente los problemas de contaminación que se plantean al iniciar los cultivos con material de campo. Someter las esporas a centrifugación, permite realizar los cambios de solución sin sufrir pérdidas de material vegetal. La germinación se produce de forma rápida en soluciones minerales de bajo contenido en nutrientes, proporcionando siempre cantidades elevadas de gametófitos.

El cultivo "in vitro" del gametófito de las especies analizadas presentó particularidades en cuanto a las exigencias de factores nutricionales y ambientales. Salvo en el caso de

O.regalis, fue necesario cultivar el gametófito en el medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962), rico en compuestos inorgánicos y orgánicos, produciéndose una mayor multiplicación y desarrollo de los gametófitos. Por el contrario, el gametófito de O.regalis experimentó una inhibición del desarrollo en dicho medio. El cultivo del gametófito de esta especie no tolera soluciones nutritivas con concentraciones osmóticas superiores a 130 mosmoles/Kg de agua, resultando más favorable la solución de Knop (1865).

La forma en que se aplica la fuente de nitrógeno al medio de cultivo afecta de modo diferente al desarrollo del gametófito, así mientras en O.regalis es suficiente la presencia de nitrógeno en forma oxidada, el gametófito del resto de las especies necesitan nitrógeno en forma reducida, administrado como nitrato amónico, para poder crecer.

La concentración de sacarosa en el medio de cultivo influyó sobre el desarrollo del gametófito en todas las especies, si bien de forma diferente. El gametófito de O.regalis y A.nidus crece lo mismo en presencia o en ausencia de sacarosa y ello pone de manifiesto una fuerte autotrofia "in vitro". Otras especies como B.spicant y D.affinis crecen más con la incorporación de sacarosa al el medio de cultivo y en el caso de B.spicant se produce un aumento en el crecimiento conforme aumenta la concentración de sacarosa. En esta especie, se observó asimismo un efecto favorable de la sacarosa en la formación de los órganos sexuales femeninos.

El fotoperíodo a que se somete el gametófito durante el período de cultivo resulta determinante tanto en su desarrollo como en su multiplicación. El fotoperíodo de 16h luz favoreció un mayor crecimiento del gametófito en todas las especies, por el contrario la oscuridad continua inhibe el desarrollo acorazonado, salvo en O.regalis, promoviendo el desarrollo filiforme.

El gametófito de las especies cultivadas "in vitro" ha mostrado en general una gran tolerancia a los valores de pH ensayados, pudiendo ser cultivados tanto a pH ligeramente ácido como el de 4.2 (antes de autoclavar) o ligeramente básico como el de 8.7. Ello es especialmente notable en B.spicant y O.regalis, especies que ocupan sustratos preferentemente ácidos en el campo. La situación contraria la plantea D.affinis, especie definida como tolerante al pH del suelo en el campo y cuyo gametófito muestra una gran sensibilidad al pH alcalino de 8.7 cuando es cultivado "in vitro".

La concentración de agar del 0.35% (medio semisólido) permite casi siempre un mayor desarrollo del gametófito, por el contrario, un aumento de la concentración de agar por encima del 0.7% lo dificulta.

Trabajar con el gametófito en el campo es muy difícil. A través del cultivo "in vitro" es posible disponer de una gran cantidad de material y conseguir un acercamiento a esta generación del ciclo, pudiendo ser analizada de forma exhaustiva. De ello se pueden obtener nuevos datos que, aparte de consideraciones estrictamente biológicas, pueden ser importantes desde un punto de vista evolutivo y taxonómico. Las osmundides han sido tratadas en algunas clasificaciones como un grupo intermedio entre las ofioglosópsidas y las filicópsidas, de difícil posición sistemática, basándose para ello en la ontogenia del esporangio. En las clasificaciones actuales se incluyen con categoría de orden dentro de las filicópsidas. Comportamientos "in vitro" del gametófito en relación a aspectos fisiológicos tales como la nutrición o bien morfológicos podrían ser tomados en consideración en el establecimiento de las relaciones filogenéticas de las especies, como tradicionalmente se viene haciendo con aspectos morfológicos o citogenéticos, siempre relacionados con el esporófito. La utilización de las características del gametófito en la determinación de relaciones filogenéticas ha sido planteado por Tigerschiöl (1989) quien ha trabajado con numerosas especies de la familia Thelypteridaceae, encontrando en la morfología del gametófito un criterio de clasificación. Las características del gametófito junto con las del esporófito pueden usarse conjuntamente para dilucidar problemas taxonómicos y evolutivos.

La capacidad de regeneración del gametófito evita volver a la espora para iniciar los cultivos, siendo una fuente casi ilimitada de material vegetal para la obtención de esporófitos. La multiplicación del gametófito en cultivos homogeneizados es una consecuencia de la capacidad de regeneración que adquieren las células de aquél cuando se procede a la desconexión de las relaciones intercelulares. La zona de multiplicación o zona basal y la zona de crecimiento del gametófito o zona apical ocupan las posiciones más extremas en el gametófito. Ha sido sugerido un efecto negativo del ápice (posible zona de síntesis de auxinas) sobre la base del gametófito, siendo éste el único lugar donde se puede llevar a cabo su multiplicación. En la especie apogámica D.affinis, la trituración del gametófito induce la formación de callo y este hecho no tiene lugar en el resto de especies.

O.regalis presenta un sistema de multiplicación vegetativa que consiste en la producción de yemas o gemación, proceso que se ha visto influenciado por la sacarosa y por la luz, enfrentando la reproducción sexual a la asexual. Este sistema de propagación asexual puede llevar incluso a la reducción del ciclo vital a una única fase, prescindiendo del esporófito, como ha ocurrido en algunas familias de helechos. Mediante la gemación del gametófito, una especie puede disponer de un sistema de colonización y de supervivencia en habitats inadecuados para el esporófito. Asimismo, proporciona una fuente de gametófito adicional para obtener más esporófitos, en cultivos "in vitro".

La misión por excelencia del gametófito es llevar a cabo la formación de esporófitos. Ello puede ocurrir de dos modos diferentes: apogámico y singámico. Cuando uno de estos fenómenos tiene lugar en el gametófito se aprecia un estancamiento en el crecimiento del gametófito, que ya no se multiplica activamente, y ello es notable en W.virginica, A.nidus y D. affinis sp. affinis, que son las que han mantenido una mayor producción de esporófitos. El cultivo del gametófito en un medio que potencia la multiplicación de éste puede no resultar satisfactorio para la formación del esporófito, entrando en competencia los procesos de división y diferenciación celular de la zona basal de multiplicación del gametófito y aquellos que tienen lugar en la zona apical donde evolucionará el futuro esporófito. El cultivo del gametófito, después de haber alcanzado la madurez sexual, en un medio privado de nutrientes estimula el desarrollo de esporófitos en O.regalis y P.ensifomis. Se puede por tanto actuar sobre la capacidad reproductiva incrementando la producción de esporófitos.

La formación de esporófitos mediante el apareamiento de los gametos puede admitir en mayor o menor grado la fusión sexual de células procedentes del mismo gametófito o bien exigir la combinación de material genético diferente. Por tanto, la utilización de gametófito para obtener una cantidad elevada de plantas, como ha sido publicado en algunas ocasiones, está totalmente condicionado por las características biológicas de la especie y puede ser un buen sistema de producción cuando la especie tolera la autofecundación, es decir cuando no acumula genes recesivos letales (carga genética) y su ciclo vital es corto, como ocurre en la especie W.virginica.

Otro aspecto importante, relacionado con la formación de esporófitos es lo ocurrido en B.spicant, donde actúa un sistema natural promoviendo el intercambio genético. Una vez comprobada la existencia de alguna sustancia producida por el gametófito de B.spicant y

excretada al medio de cultivo, responsable de la formación de anteridios, debe tenerse en cuenta su acumulación en el medio si queremos obtener esporófitos. La posibilidad de que se trate realmente de una giberelina queda abierta a futuras investigaciones.

Una vez conseguido el esporófito a partir del gametófito, en un tiempo que varía entre uno y ocho meses en las especies ensayadas, obteniendo una producción bruta de hasta 100 esporófitos por gramo de gametófito, según la especie, y siendo ilimitada la disponibilidad del gametófito por su capacidad de regeneración, se pueden aumentar los rendimientos estimulando la capacidad morfo genética del gametófito y del esporófito mediante el empleo de los reguladores del desarrollo. Las auxinas y las citoquininas son efectivos inductores de brotes que elongan cuando éstos son retirados del cultivo, redundando en una mayor potencialidad ornamental de la planta así como en un reconocido sistema de propagación.

La subespecie D. affinis sp. affinis responde satisfactoriamente a la inducción de brotes mediante citoquininas y auxinas cuando se cultiva el gametófito en presencia de dichos reguladores. La capacidad de organizar nuevos esporófitos que tienen algunas células asexuales del gametófito próximas a la hendidura apical, se extiende a un número mayor de células, que tras sufrir una desorganización adquieren una alta competencia morfo genética, multiplicándose y organizándose como nuevos esporófitos, con un rendimiento tan elevado que resulta difícil de calcular, pero que produce miles de esporófitos.

El último sistema de propagación ensayado es un intento de aprovechar la capacidad morfo genética del esporófito juvenil para diseñar sistemas de cultivo más simples, susceptibles de ser automatizados. La fronde de A. nidus responde favorablemente a la regeneración mediante la simple disgregación mecánica del tejido y cultivo en medio líquido, si bien la tasa de formación de esporófitos debe ser mejorada variando factores nutricionales, ambientales, utilizando reguladores del desarrollo o teniendo en consideración aspectos tales como la edad del material. Al margen de la propagación, se deriva de este tipo de cultivo la posibilidad de disponer de un sistema experimental interesante para obtener series de ploidía tanto en el esporófito como en el gametófito, utilizables en estudios de biología básica y también para conseguir nuevas variedades en esta especie.

En la Fig. 9.1 se ofrece un esquema donde pueden observarse los sistemas de propagación obtenidos con el cultivo "in vitro" en las especies de helechos cultivadas y su

---

relación con procesos biológicos y morfogénicos descritos.

Con el trabajo desarrollado en esta Tesis se han determinado las condiciones de cultivo de todas las fases del ciclo de varias especies de helechos así como los problemas y posibles soluciones de los sistemas de propagación más efectivos en cada caso, dejando abierta una línea de investigación a futuros planteamientos de trabajo de carácter básico y aplicado.

---

**BIBLIOGRAFIA**

Knop, W., 1865. Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der Pflanzen. Landwirtsch Vers. Stn. 7:93-107

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

Tigerschiöld, E., 1989. Micromorphology of gametophytes and antheridial dehiscence in Thelypteridaceae. Doctoral Dissertation in Morphological Botany. Akademitryck Ab, Edsbruk.

**CICLO VITAL SISTEMAS DE MULTIPLICACION**

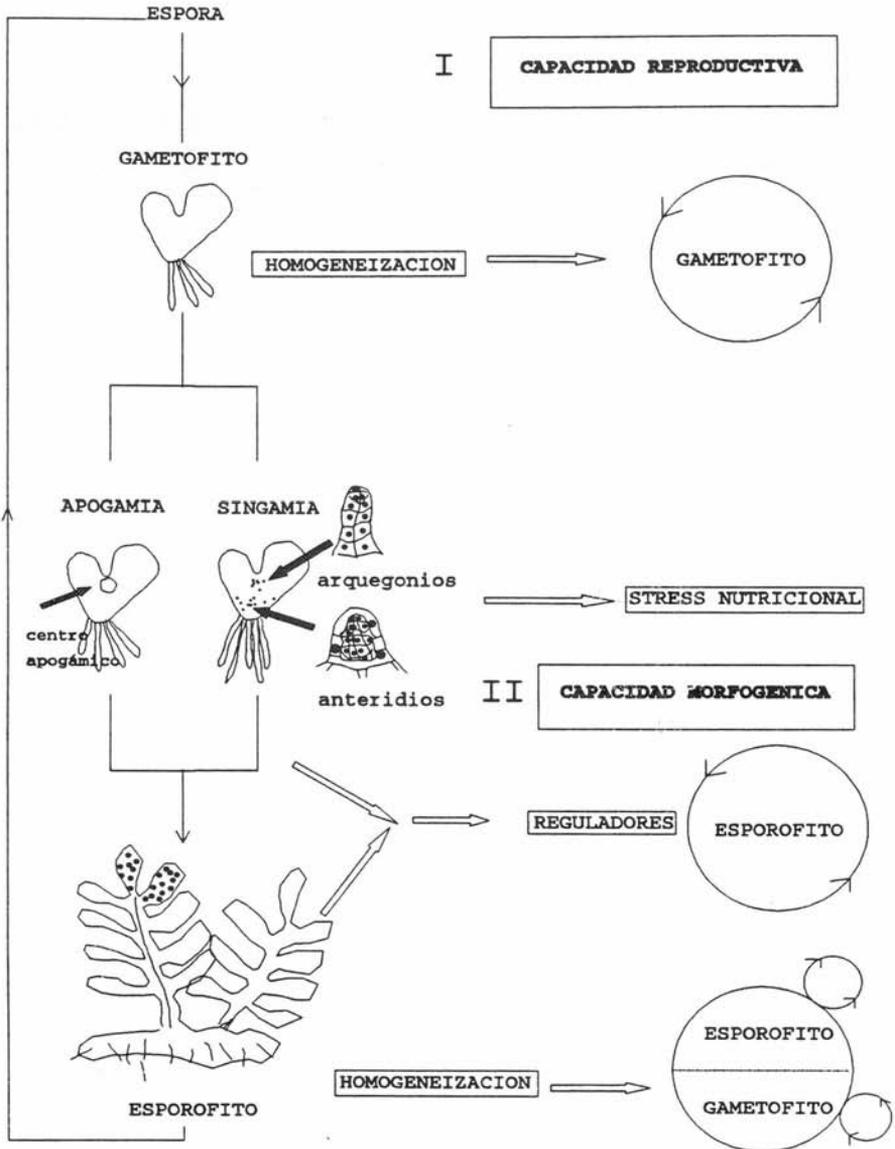


Fig. 9.1. Sistemas de multiplicación en helechos cultivados a partir de espora.

## CONCLUSIONES

- 1.- El cultivo "in vitro" se presta como una técnica interesante tanto para abordar la propagación de los helechos como para ahondar en aquellos aspectos relacionados con la biología básica de dicho grupo vegetal, que puedan repercutir en su producción.
- 2.- La utilización de la espora para iniciar los cultivos de helechos garantiza la ausencia de contaminación y, dada la elevada tasa de germinación, proporciona una abundante cantidad de gametófitos o fase sexuada del ciclo de estas plantas.
- 3.- El cultivo "in vitro" del gametófito en helechos plantea diferencias entre las especies en cuanto a las exigencias nutricionales. Todos los helechos estudiados excepto O.regalis necesitan medios de cultivo ricos para su crecimiento, por el contrario esta especie crece mejor en medios de cultivo con una concentración osmótica no superior a 130 mosmoles Kg<sup>-1</sup> agua. Un aporte de nitrógeno en forma reducida al medio de cultivo es esencial para la supervivencia del gametófito de todas las especies ensayadas, salvo en O.regalis. El cultivo del gametófito fue mejor, en líneas generales, con fotoperíodo de 16 h. luz, pH=5.8 y una concentración de agar de 0.35 o 0.7%.
- 4.- La gran capacidad de regeneración del gametófito en cultivos homogeneizados evita volver a la espora para iniciar los cultivos y proporciona una elevada cantidad de gametófitos.
- 5.- O.regalis lleva a cabo en cultivos "in vitro" la gemación. Este proceso se localiza en el ápice del gametófito y conlleva una inhibición de la reproducción sexual. Está regulado por la luz y la fuente de carbono, entre otros posibles factores. A través de la gemación, O.regalis dispone de un sistema de propagación del gametófito que puede contribuir últimamente en la producción del esporófito.
- 6.- A través de los cultivos homogeneizados de gametófitos y del cultivo de éstos en condiciones de stress se puede incidir sobre la reproducción sexual, aumentando la producción de esporófitos.

7.- La expresión sexual del gametófito en B.spicant está influenciada por una o varias sustancias, tal vez pertenecientes al grupo de las giberelinas, producidas por el propio gametófito que regulan la formación de los gametangios y por tanto la producción de esporófitos.

8.- La incorporación de los reguladores del desarrollo al medio de cultivo así como la homogeneización del material vegetal permite influir sobre la capacidad morfogénica tanto del gametófito como del esporófito, aumentando la producción de helechos.

---

## *CURRICULUM VITAE*

Helena Fernández González nació en Murias (Mieres) el 12-Julio-1961. Realizó los estudios de Enseñanza Primaria y Secundaria en Centros de Enseñanza Pública de Turón, donde reside habitualmente. Licenciada en Biología por la Universidad de Oviedo en 1985, lleva a cabo la Tesis de Licenciatura con el trabajo: Cultivo "in vitro" de ejes embrionarios de Juglans regia L., dirigida por el Prof. Dr. César Pérez Ruíz, obteniendo la calificación de Sobresaliente. En 1989 le es concedida una beca de tres años para desarrollar el Proyecto: Micropropagación de Helechos, cuyos resultados configuran la Memoria de la Tesis Doctoral.

## CONGRESOS NACIONALES

1991. H.Fernández; A.Bertrand; R. Sánchez-Tamés.  
Cultivo "in vitro" de gametófito de Pteris ensiformis IX Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. II Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Madrid.
1991. H.Fernández; A.Bertrand; R.Sánchez-Tamés.  
Micropropagación de helechos autóctonos. II Encuentros sobre propagación de plantas autóctonas y recuperación del paisaje. Madrid.

## CONGRESOS INTERNACIONALES

1990. Fernández, H.; Bertrand, A.; Sánchez Tamés, R.  
" Regeneration of Asplenium nidus-avis, Pteris ensiforme and Osmunda regalis gametophyte's tissue". 7th Congress of FESPP. UMEA. SWEDEN.
1991. Fernández, H.; Bertrand, A.; Sánchez-Tamés, R.  
Micropropagation of Asplenium nidus-avis. International Symposium on Plant Biotechnology and its contribution to Plant Development, Multiplication and Improvement. Expoflore. Palexpo. GINEBRA. SUIZA.
1992. Fernández, H.; Bertrand, A.; Sánchez-Tamés, R.  
Indirect organogenesis in apogamic gametophyte of D.affinis sp.affinis.NATO. Heraklio. CRETA. GRECIA.

## PUBLICACIONES

1990. Fernández, H., Bertrand, A. y Sánchez-Tamés, R.  
Micropropagation of Asplenium nidus-avis. Acta Horticulturae N°289, pp.113-114.
1990. Fernández, H.; Bertrand, A.; Sánchez-Tamés, R.  
Regeneration of Asplenium nidus-avis, Pteris ensiformis and Osmunda regalis gametophyte's tissue. Physiologia Plantarum. Vol.79. Part 2. p.13.
1993. Fernández, H.; Bertrand, A.; Sánchez-Tamés, R.  
In vitro regeneration of Asplenium nidus-avis from gametophytic and sporophytic tissue. Scientia Horticulturae. En prensa.
1993. Fernández, H. y Sánchez-Tamés, R.  
Propagation from morphogenic callus derived of apogamous gametophytes in D.affinis sp.affinis. Enviada.
1993. Fernández, H.; Bertrand, A.; Sánchez-Tamés, R.  
Gemation in Osmunda regalis L. Enviada.
1993. Fernández, H.; Feito, I.; Sánchez-Tamés, R.  
Antheridiogen and gibberelins in B.spicant L. Enviada.

## CONFERENCIAS

### 1989. XIII FESTIVAL REGIONAL DE LA HUERTA. PRAVIA. ASTURIAS.

#### Propagación de helechos ornamentales

### 1992. IX CICLO DE CONFERENCIAS DE LA CAJA RURAL DE GIJÓN.

#### GIJÓN. ASTURIAS.

#### El cultivo comercial de plantas autóctonas

El cultivo comercial de plantas autóctonas es un sector que ha experimentado un crecimiento importante en los últimos años. Este sector se caracteriza por la explotación de plantas que son nativas de la zona y que tienen un alto valor comercial. En este sentido, es importante destacar que el cultivo de plantas autóctonas puede ser una actividad muy rentable y sostenible.

En este sentido, es importante destacar que el cultivo de plantas autóctonas puede ser una actividad muy rentable y sostenible.

En este sentido, es importante destacar que el cultivo de plantas autóctonas puede ser una actividad muy rentable y sostenible.

En este sentido, es importante destacar que el cultivo de plantas autóctonas puede ser una actividad muy rentable y sostenible.

En este sentido, es importante destacar que el cultivo de plantas autóctonas puede ser una actividad muy rentable y sostenible.

En este sentido, es importante destacar que el cultivo de plantas autóctonas puede ser una actividad muy rentable y sostenible.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no lo he realizado sólo, sino que ha estado respaldado por la colaboración de mucha gente a quienes brevemente voy a mencionar.

Doy las gracias a los directores de la Tesis Dr. Ricardo Sánchez-Tamés y Dra. Ana Bertrand por los comentarios y supervisiones que han hecho al trabajo.

Al Doctorando Felipe González por haberme enseñado todo lo que sé sobre la Fotografía.

Al Doctorando Juan Majada por su infinita paciencia para introducirme en la Informática y su gran disposición para ayudar al compañero, en cualquier momento.

Como caída del cielo (aunque en realidad volvía de Holanda), doy las gracias a la Dra. Marta Sierra por su honradez personal y profesional y porque trabajar cerca de ella ha sido un gran estímulo para mí.

A la Dra. Carmen Díaz-Sala Galeano le doy las gracias porque a pesar de la distancia (actualmente desarrolla estudios de Post-Doctorado en la Universidad de Maine -E.E.U.U-) ha seguido siempre, con interés, mi trabajo.

A la Dra. Isabel Feito por su asesoría en el capítulo de la actividad anteridiógena.

A los Prof. Dr. Miguel Albuérne Pascual y Dra. Aida González por su ayuda con la histología.

Extiendo mi gratitud a toda la plantilla del Lab. de Fisiología Vegetal, que me ha ofrecido un ambiente agradable para trabajar. Gracias a todos.

Por último (aunque todo empezó con ella) quiero hacer una mención muy especial a mi madre, que ha sido quien ha hecho el mayor esfuerzo para que yo pudiera acabar la Tesis Doctoral.





