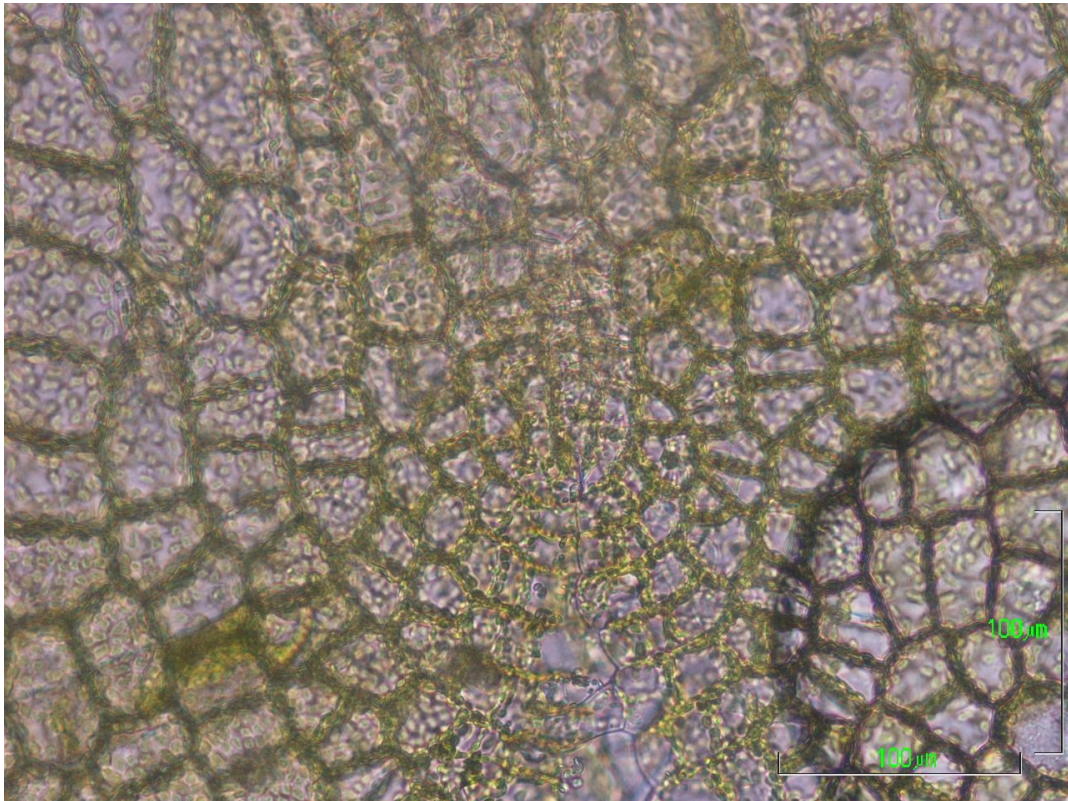




Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos
Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Control de la apogamia en el helecho *Dryopteris affinis* ssp. *affinis* a través del cultivo
in vitro



Alejandro Rivera Fernández
22 de Julio de 2015

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

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Control de la apogamia en el helecho *Dryopteris affinis* ssp *affinis* a través del cultivo *in vitro*

Apogamy control at fern *Dryopteris affinis* ssp *affinis* through *in vitro* culture

Alejandro Rivera Fernández

Firma

Elena María Fernández González

Firma

Mis agradecimientos:

A la Dra. Helena María Fernández González, me siento muy agradecido por toda su ayuda a lo largo del desarrollo del presente trabajo de fin de máster, sin ella no hubiese podido acabar.

A la Dra. María Asunción Lubiano Gómez, le agradezco su asesoramiento a la hora de realizar el apartado del análisis estadístico.

Al Dr. Mario Quevedo De Anta, le agradezco su ayuda a la hora de ayudarme con el uso de *software* y su apoyo en los “malos momentos”.

A la Dra. Alexandra Ritcher, también le doy las gracias por ayudarme a revisar fallos.

Mis agradecimientos a mis amigos y a mis compañeros de facultad, por estar ahí animándome y dándome fuerzas, haciendo esto posible.

También agradezco especialmente a Lino Menéndez de Trabanco su ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

Debo de agradecer a mis compañeros del Máster de Biotecnología Aplicada a la Gestión y Conservación de Recursos Vegetales, por todo el apoyo que me han mostrado durante el curso.

Por último, agradecimientos a mi familia, sin ellos yo no estaría hoy aquí para hacer esto posible.

Resumen

En el helecho *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*, tiene lugar un proceso denominado apogamia, por la cual se omite la fase de intercambio de gametos en el ciclo sexual típico, desarrollándose un embrión partenogénicamente, de manera espontánea. En el presente trabajo, se estudió el efecto de fitohormonas (AIA, GA3, IBA y BA), e inhibidores (Flurprimidol y TIBA), la fuente de carbono: sacarosa, y la intensidad lumínica, sobre dicho proceso. Asimismo, se ensayaron algunos protocolos de crioconservación con la espora y el gametófito.

A la hora de cuantificar la expresión apogámica, medimos al microscopio óptico los gametófitos y embriones de *D. affinis* tras 50 días. Con las medidas obtenidas se realizan análisis estadísticos ANOVA y χ^2 . Pudimos llegar a ver en *D. affinis* que la apogamia persistía en todos los tratamientos, solo había una cierta disminución en flurprimidol 3 mM, sacarosa 29 mM, mientras que en IBA llegó a desaparecer. Además, en este trabajo se vio que es posible crioconservar esporas de ésta especie sin problema.

Abstract

An alteration of normal fern life cycle, called apogamy, makes ferns able to avoid sexual reproduction, omitting the gamete exchange spontaneously. At this research work I study apogamy process into *Dryopteris affinis* ssp. *affinis* fern, through the use of phytohormones (IAA, GA3, Flurprimidol, IBA, TIBA y BA), sucrose and light intensifies at *in vitro* culture, we also tried gametophyte and spore crioconservation, just to look their effects over apogamic expression.

To quantify the apogamic expression, I measured the area of embryos and gametophytes from *D. affinis* on an optical microscope after 50 days on culture medium and optimum conditions and for a 5 days period. With the data measures I did an ANOVA and χ^2 statistical analysis.

We could see apogamy persistence in *D. affinis* with all treatments, but flurprimidol 3 mM and sucrose 29 mM treatments show a minus growth rate and IBA shows a disappear of embryos. In this work we could crioconservate spores from this specie without problems.

ABREVIATURAS:

AIA: Acido Indol-3-acético

BA: 6-bencilaminopurina

C: Criovial

CMM: Célula Madre de la Megáspora

E: Eppendorf

F: Flurprimidol

GA3: Ácido giberélico

IBA: Ácido Indol-3-butírico

NL: Nitrógeno Líquido

Ssp: Subespecie

TIBA: Ácido 2,3,5-triiodobenzoico

INDICE

1. Introducción.....	2
1.1. Antecedentes y objetivo del trabajo.....	4
2. Material y métodos.....	5
2.1. Recolección de esporas.....	5
2.2. Asepsia de material vegetal.....	5
2.3. Preparación del medio de cultivo.....	6
2.4. Cultivo de esporas.....	6
2.5. Crioconservación del material vegetal.....	6
2.6. Análisis microscópico de los gametófitos.....	7
2.7. Análisis estadístico.....	7
3. Resultados.....	8
3.1. Efecto del medio de cultivo sobre el morfotipo del gametófito.....	8
3.2. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario.....	8
3.3. Efecto del medio de cultivo sobre la tasa largo/ancho (L/A) del gametófito.....	9
3.4. Efecto del medio de cultivo sobre el tamaño del embrión apogámico.....	10
3.5. Crioconservación de esporas.....	11
4. Discusión.....	12
5. Conclusiones.....	15
6. Bibliografía.....	15

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción vegetal tiene una gran relevancia económica ya que muchos cultivos de angiospermas son clave para la alimentación humana (Tanurdzic y Banks, 2004). El ciclo de vida de estas plantas alterna entre dos generaciones: la esporofítica, diploide y dominante, y la gametofítica, haploide, en la que se lleva a cabo la formación de gametos masculinos y femeninos, que tras la fusión darán lugar a un nuevo esporofito, completando el ciclo. Si bien la mayoría de angiospermas se reproducen de forma sexual, abunda en determinadas familias el fenómeno de la apomixis (Okano *et al.* 2009), mediante el cual se desarrolla un embrión, sin fecundación, generando un individuo idéntico al progenitor (Fig. 1). Un conocimiento exhaustivo de las claves moleculares que lo controlan, permitiría fijar genotipos muy productivos de líneas comerciales, por lo que tiene un tremendo potencial de cara a la mejora de cultivos (Grossniklaus *et al.*, 1999).

Se distinguen dos tipos de apomixis: esporofítica y gametofítica (Koltunov *et al.* 1995; Talent, 2009; Schmidt *et al.*, 2015). En la apomixis esporofítica o embriogénesis adventicia, los tejidos esporofíticos del ovario, como los nucelares o los tegumentos, forman embriones directamente. Por su parte, la apomixis gametofítica puede darse mediante dos vías, denominadas aposporia y diplosporia, en función del origen del saco embrionario que se forma. En la diplosporia, el origen de éste está en la célula madre de la megáspora (CMM), que no sufre reducción meiótica o es incompleta, formándose un saco embrionario diploide, en el que se forma una célula huevo diploide. En la aposporia, el saco embrionario, diploide, se origina a partir de los tejidos del ovario anteriormente mencionados. En ambos casos se formará un embrión a partir de la célula huevo, sin fecundar, diploide, que se desarrolla partenogénicamente. Finalmente, se conoce como apogamia a la formación de un embrión a partir de células del gametofito distintas a la célula huevo, como las sinérgidas o las antípodas (Asker y Jerling, 1992). La apogamia no ocurre de forma natural en angiospermas, pero puede ser inducida *in vitro*, a través del cultivo de polen, o de sacos embrionarios (ginogénesis) (Seguí-Simarro, 2010). Por el contrario, es un fenómeno muy frecuente en helechos, donde aproximadamente un 10% de especies presentan apogamia obligada o facultativa (Sheffield and Bell, 1987).

Durante los últimos años se ha trabajado mucho en la apomixis, en varias especies de angiospermas, sin embargo, no se conocen a día de hoy las bases moleculares de la transición de células somáticas a células embriogénicas. En el laboratorio de Fisiología Vegetal, se trabaja en esta línea, en colaboración con el grupo de investigación del Profesor Ueli Grossniklaus, del Instituto de Biología Vegetal de la Universidad de Zurich, utilizando el gametofito del helecho *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins ssp. *affinis*, como sistema experimental, para llevar a cabo el proyecto “Unravelling the molecular clues of apogamy in the fern *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*”, que ha sido parcialmente financiado por 7º Programa Marco de la UE (Prime XS 000252).

El gametofito del helecho posee algunas ventajas a la hora de ser estudiado, frente a las angiospermas, como es la independencia del esporofito, al ser una estructura de vida libre, evitando así los efectos que éste pueda tener en el gametofito, son fáciles de observar al microscopio óptico, y es posible disponer de una gran cantidad de material vegetal *in vitro*, en un espacio reducido (Fernández y Revilla, 2003). Por el contrario, su elevado número de cromosomas ha sido siempre un lastre a la hora de ser tenidos en cuenta pero con las

técnicas de nueva generación las dificultades se han visto reducidas (Baker y Wolf, 2010). No obstante, a día de hoy, hay muy poco trabajo hecho en secuenciación del genoma de helechos, solamente hay datos parciales en algunas especies como *Pteridium aquilinum*, *Ceratopteris richardii* y *Anemia phyllitidis* (Salmi *et al.* 2005; Der *et al.* 2011; Cordle 2012).

Dryopteris affinis ssp. affinis un helecho diploide ($2n=82$), apomíctico obligado y de hábitos cosmopolitas, que se originó, presuntamente, por el cruce de un antepasado de *Dryopteris wallichiana* (Sprengel) Hyl y de *Dryopteris oreades* Fomin (ploidía de ambos helechos: $2n=82$) (Salvo, 1990), si bien existe una controversia en cuanto a *D. wallichiana* (Fraser-Jenkins, comunicación personal).

Según el criterio de Christenhusz *et al.* (2011) nuestra especie se clasificaría como sigue:

División: STREPTOPHYTA

Subdivisión: PTERIDOPHYTINA (Monilofitos)

Clase: POLYPODIOPSISIDA (Leptoesporangiados)

Orden: POLYPODIALES

Familia: DRYOPTERIDACEAE

Subfamilia: Dryopteridoideae

Género: *Dryopteris*

Especie: *affinis*.

Ssp. *affinis*

Todas las especies del género *Dryopteris* presentan un ciclo de vida digenético, heteromórfico, diplohaplofásico, con esporófito dominante. En estos helechos, la generación gametofítica es la encargada de la formación de gametos y de la reproducción sexual, mientras que la generación esporofítica se encarga de producir esporas llevando a cabo la reproducción asexual, cerrando el ciclo (Díaz *et al.*, 2004).

El gametófito de *D. affinis ssp. affinis* puede formar órganos sexuales masculinos (anteridios) pero nunca los femeninos (arquegonios), diferenciándose cerca de la escotadura apical, y en el lugar donde normalmente se forman los arquegonios, un grupo de células de color amarronado, pequeñas, redondeadas, que organizan un embrión, en cultivo *in vitro*, y una vez que el gametófito alcanza el estado acorazonado. (Salvo, 1990; Menéndez *et al.* 2006). (Figura 2). La formación del gametofito apogámico en *D. affinis ssp. affinis* se ajusta al esquema de Manton (1950), en el que una célula madre arqueosporial, sufre tres mitosis hasta formar 8 células, las cuales y tras una endomitosis o mitosis incompleta, originará 32 esporas por meiosis, dentro del esporangio.

La crioconservación o criopreservación, es una técnica o técnicas, mediante la/s cual/es los tejidos o células de un organismo son sometidos a muy bajas temperaturas (-196°C), con el objetivo de mantenerlos viables el mayor tiempo posible, con la ayuda o no de crioprotectores. Por norma general, las esporas pardas/marrones de helechos, y que son las más comunes, no suelen presentar problemas a la hora de ser criopreservadas pues se encuentran desecadas y con su metabolismo inactivo, ya que se trata de formas de resistencia. A la hora de llevar a cabo la criopreservación, se las trata de forma similar a las semillas ortodoxas (Agrawal *et al.* 1993; Pence a,b, 2000). Los gametófitos presentan una mayor complejidad para la crioconservación frente a las esporas, no obstante, existen algún

precedente, como en el caso de *Cyathea*, que hemos ensayado con nuestra especie (Goller y Rybczynski, 2007).

1.1. Antecedentes y objetivo del trabajo

El desarrollo del gametofito del helecho, y por ende el proceso apogámico, puede verse afectada, *in vitro*, por el ambiente de cultivo, que engloba a factores físicos como la luz, nutricionales/osmóticos como la fuente de carbono, y también a las fitohormonas (Whittier, 1966; Fernández *et al.* 1996; Menéndez *et al.*, 2006 a,b; 2009). Las fitohormonas son compuestos que poseen la capacidad de regular el crecimiento y desarrollo vegetal. Su composición es variada pudiendo ser gases como el etileno, derivados de aminoácidos, como las auxinas, de las bases nitrogenadas como las citoquininas o ser compuestos terpenoides, como las giberelinas, entre otros. Las auxinas son compuestos implicados en la elongación celular, promocionan el desarrollo radicular, favorecen la dominancia apical, y también inciden en la apogamia (Kwa *et al.*, 1995). No se conocen mutantes que carezcan de ellas, pues su ausencia es letal en plantas superiores, y su efecto depende de las concentraciones y del tipo de tejido. Por su parte el ácido 2, 3, 5-triidobenzoico (TIBA) es un inhibidor del transporte de auxinas, que se emplea para ver los efectos que produce la ausencia de éstas en los tejidos vegetales (Lee y Seo, 2015). El TIBA posee un efecto notable siempre y cuando exista algún tipo de transporte en los tejidos, y nos serviría para ver cómo reaccionan los helechos ante la privación del transporte de auxinas (Jacobson y Jacobson, 1981; Pires de Melo, 2004). Las giberelinas son otro de los grandes grupos de fitohormonas (Hedden y Proebstring, 1999), que inhiben la dormición en semillas y favorecen la floración, por lo que son claves en procesos relacionados con reproducción (Greer *et al.* 2009). Por su parte, el flurprimidol es un inhibidor de la síntesis de giberelinas, que bloquea la oxidación del ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico, y que se emplea como retardante del crecimiento vegetal (Rademacher, 2000). En helechos, las giberelinas se hallan relacionadas con los precursores de las feromonas denominadas anteridiógenos (Yamane, 1998) y también se ha visto su efecto sobre el desarrollo vegetativo del gametofito (Menéndez *et al.* 2006b, 2009). En cuanto a las citoquininas, son compuestos que promueven la división celular, entre otras funciones, de ahí el nombre. La 6-benciladenina (BA) es una citoquinina que ya ha sido empleada en cultivos de helechos, con un efecto sobre la expresión sexual del gametófito, induciendo la formación de anteridios y un menor desarrollo de los gametofitos (Menéndez *et al.* 2009) y también formando parte de balances adecuados para poner en marcha cadenas de micropropagación, al igual que las auxinas (Kuriyama y Maeda, 1969; Kuriyama *et al.* 1990).

Estudios recientes relacionan el incremento de embriogénesis en cultivo *in vitro*, con el aporte de azúcares exógenos mientras que otros, por el contrario, indican que los azúcares pueden influir negativamente en el desarrollo de los gametófitos de helecho (Fernández *et al.*, 1996; Cordle *et al.*, 2007). Por último, la luz es un factor físico clave en el desarrollo vegetal. Se conocen los efectos de la luz roja como inductora del desarrollo apogámico en *Pteridium aquilinum* (Whittier y Pratt, 1971), en el que se ha visto cómo las intensidades crecientes de luminosidad roja fomentaban el desarrollo de embriones apogámicos.

El **objetivo** de este trabajo será valorar el efecto de varios factores de cultivo como la concentración de las fitohormonas auxinas, citoquininas y giberelinas; de inhibidores del transporte o de la síntesis de las mismas, como TIBA y flurprimidol, la concentración de la fuente de carbono; y por último, la intensidad de luz, sobre el desarrollo vegetativo del gametofito y la formación de embriones apogámicos, en la especie *D. affinis* ssp. *affinis* para disponer de muestras de gametofitos, comparativas, de cara a abordar expresión génica diferencial. Asimismo, se pondrá a punto un protocolo para la crioconservación de esporas y gametófitos, en esta especie, analizando los efectos sobre la germinación y también sobre el desarrollo posterior del gametofito.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Recolección de las esporas

Para realizar el cultivo *in vitro* de los gametofitos de *D. affinis* ssp. *affinis*, se recolectaron esporas a partir de esporófitos maduros que crecen en el valle de Turón (Asturias, España), 43° 12' N y 5° 43' W, en el mes de julio de 2014. Las frondes se colocaron entre papel, y se dejaron en ambiente seco hasta que se desprendieron las esporas y esporangios, tamizando con filtros adecuados para separar las esporas de los restos de material vegetal. Una vez recogidas las esporas, se introdujeron en viales y se almacenaron en una cámara fría (Creax) a 4°C, hasta su uso.

2.2. Asepsia del material vegetal

Previo a su cultivo *in vitro*, las esporas de *D. affinis* ssp. *affinis* se sometieron a un proceso de asepsia para eliminar posibles contaminantes como bacterias y hongos. Para ello, se imbibieron 15 mg de esporas durante 30 minutos, en un tubo Falcon de 50 ml, centrifugando siempre a una velocidad de 2500-3000 rpm durante 4 minutos (Centaur 2 de MSE) para proceder a los cambios de solución. Posteriormente, siempre en una cámara de flujo (Telstar, BH-100), se decantó el agua y se resuspendió el *pellet* de esporas en una solución de lejía comercial, al 10%, durante 10 minutos, realizando a continuación tres lavados sucesivos con agua Mili-Q estéril, para asegurarnos de que toda la lejía es eliminada de la muestra. Después de esto, se inoculó 1 ml de la solución de esporas y otros 2 ml de agua, en cada tarro de vidrio con el medio de cultivo (Menéndez *et al.*, 2006). Se determinó la densidad de espора por cm² presente en el tarro de cultivo, usando una cámara Fusch-Rosenthal (Brand).

2.3. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue siempre el MS (Murashige y Skoog, 1962), al que se añadieron las siguientes concentraciones de fitohormonas e inhibidores, por separado: IBA (0,05 mM, 0,49 mM, 4,92 mM, 24,6 mM), AIA (0,06 mM, 0,57 mM, 5,71 mM, 28,54 mM), BA (0,04 mM, 0,44 mM, 4,44 mM, 22,2 mM), GA₃ (0,03 mM, 0,29 mM, 2,89 mM, 14,4 mM), TIBA (0,02 mM, 0,2 mM, 2 mM, 10 mM), F (0,03 mM, 0,32 mM, 3,2 mM, 16,01 mM). En todos los medio, excepto en el ensayo de la sacarosa, se añadió un concentración de la fuente de carbono 29 mM. A continuación, se ajustó el pH a 5.8 con NaOH o ClH 1N o.1 N y finalmente se añadió agar 8 g/L Duchefa Plant Agar P1001. El agar se disolvió en el autoclave a tiempo cero y 120 °C de temperatura y una presión 202,6 Pa, para poder ser dispensado en los tarros de cultivo. Tanto el medio como el instrumental de cultivo fueron esterilizados en el autoclave durante 20 min., en las condiciones de presión y temperatura mencionadas anteriormente.

Para valorar el efecto de la sacarosa, se añadieron al medio MS las siguientes concentraciones: 0,15 mM, 29 mM, 58 mM, 88 mM y 117 mM.

2.4. Cultivo de esporas

Posteriormente a la elaboración del medio, se procedió al cultivo de las esporas en los diferentes tratamientos, y se mantuvieron entre 50 y 70 días, en una cámara de crecimiento (Creax-Ibercex), con un fotoperiodo de 16 horas, a una intensidad lumínica estándar de $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, y una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. En el ensayo de luz, se cultivaron las esporas en el medio MS con una concentración de sacarosa 29 Mm y con las siguientes intensidades de luz: 0, 10, 20 y $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se cultivaron al menos 5 tarros de vidrio por cada tratamiento.

2.5. Crioconservación del material vegetal

A. Esporas. El protocolo empleado en este trabajo consistió en la inmersión en NL (nitrógeno líquido) de los recipientes con esporas de *D.affinis ssp. affinis*: crioviales (Nalgene), *Eppendorf*, y papel de aluminio. Antes de la inmersión en NL, se dejaron secar las esporas en la cámara de flujo durante 1 hora. Pasado el tiempo de secado, se sumergieron en NL, tras lo cual se realizó una asepsia como la descrita en el **punto 2.1** de Material y Métodos. Tras la asepsia, las esporas se sembraron en tarros de vidrio con medio MS, con 20 g/l de sacarosa, y se tuvieron en la cámara de cultivo, en las condiciones estándar de temperatura y fotoperiodo, durante 50-55 días, tras lo cual se tomaron los datos de los parámetros relativos al crecimiento y desarrollo de los gametofitos de la especie apogámica y sexual.

B. Gametofitos. Previo a la crioconservación de los gametófitos, éstos se sometieron a un proceso de aclimatación, en el cual fueron cultivados durante 2 semanas en medio MS con IBA $0,1 \text{ mM}$. Una vez aclimatados, se llevaron a la cámara de flujo, donde se bañaron en medio MS (sin Calcio) con una solución de sacarosa $0,75 \text{ M}$, pasando luego a otra de alginato al 3%. Con ayuda de una pipeta pasteur, se cogieron los gametofitos, y se vertieron en una solución de cloruro de calcio que hizo precipitar el alginato en forma de bola, las cuales fueron sumergidas en NL durante 1 h. Tras el paso por el nitrógeno, se cultivaron en medio MS, en la cámara de flujo, como hacemos de forma habitual, pero sin necesidad de asepsia, pues el material procede de un cultivo aséptico.

2.6. Análisis microscópico de los gametófitos

La toma de datos, se llevó a cabo mediante el uso de dos microscopios ópticos (Olympus SC-100 y Nikon Eclipse E-600) y una lupa (Nikon, SMZ-U). Se analizaron los siguientes parámetros relativos al desarrollo vegetativo y reproductivo del gametofito: estado de desarrollo (filamento, espátula o corazón), (y que nos hemos tomado la licencia de denominar morfotipo, en la memoria), tasa longitud/anchura del gametofito, presencia/ausencia de embrión, y tamaño y estado de desarrollo de éste: mancha/botón. La mancha indica un estadio inicial, en el que se observa un centro organizador bidimensional, y el botón es un estadio de desarrollo posterior, donde se aprecia el volumen o tridimensionalidad del embrión. Las observaciones sobre morfotipo y tamaño del gametofito se realizaron en fresco, tomando al azar un total de 100 individuos de cada tratamiento. Para valorar e tamaño y estado de desarrollo del embrión, se tomaron datos en, al menos, 50 gametófitos acorazonados, que es el estadio del gametofito en el que se forma el embrión (Fig. 3).

2.7. Análisis Estadístico

A la hora de realizar el análisis estadístico tenemos que distinguir dos tipos de parámetros: por un lado los caracteres paramétricos, que son aquellos que se pueden medir, y por otro lado caracteres no paramétricos, los que no se pueden medir, como estados de desarrollo. Para los caracteres no paramétricos, como la frecuencia de morfotipos o la frecuencia de embriones, se empleó el test no paramétrico Chi-cuadrado (χ^2), mientras que para los valores paramétricos: tasa longitud/anchura (l/a) y tamaño de gametofito y embriones se empleó, un análisis de la varianza ANOVA, junto con un análisis de la varianza *ad hoc*, obligado, con las pruebas de Levene y Bartlett para la homogeneidad de varianzas, y Shaphiro-Wilk para la normalidad. Si los datos no siguen una distribución normal, se transforman en logaritmos que se analizan mediante ANOVA y si no cumplen la hipótesis de homogeneidad de varianzas, se aplica la aproximación de Welch. En los casos en los que no exista igualdad entre los grupos de tratamientos y dentro de los propios tratamientos en un test ANOVA, empleamos las pruebas *post hoc* de Tukey, Bonferroni y Duncan, para conocer la agrupación de los datos y ver las similitudes que existen en los tratamientos. También empleamos un test ANOVA anidado (jerarquizado) en los valores paramétricos para ver las diferencias entre los tratamientos (IBA, TIBA, AIA, BA, GA₃ y F) en todos sus niveles antes de realizar el ANOVA unifactorial sobre cada tratamiento. Para todos los test fijamos un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Los análisis se llevan a cabo con los programas SPSS (IBM) y *R.Statistics* (R-Project).

3. RESULTADOS

3.1. Efecto del medio de cultivo sobre el morfotipo del gametofito

Auxinas e inhibidor. La presencia de IBA en el medio indujo un freno en el desarrollo de los gametofitos, predominando el estado filamento ($\chi^2=523$; $p<0,001$) (Fig. 4a), resultando inhibitorias las dos concentraciones más elevadas. El inhibidor del transporte de auxinas TIBA, arrojó también diferencias globales entre las concentraciones ensayadas ($\chi^2=18,5$; $p<0,01$), pero sólo hallamos diferencias entre la concentración 2 mM y el control ($\chi^2=14,5$, $p=0,007$), que también estanca el desarrollo en el estadio de filamento (Fig. 4b). La auxina AIA muestra un papel opuesto, favoreciendo un mayor desarrollo vegetativo del gametofito, dando diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas frente al control ($\chi^2=18,59$; $p<0,001$) (Fig. 4c), y concretamente la concentración de 5,71 mM ($\chi^2=18,59$; $p<0,001$), que provocó una disminución en el número de filamentos y un aumento de espátulas y corazones.

Citoquinina. Al analizar los datos obtenidos con la adición de la citoquinina BA al medio, se observan diferencias significativas en las proporciones de morfotipos para las diferentes concentraciones de esta fitohormona, frente al control ($\chi^2=44,5$, $p<0,01$). Estas diferencias se afianzan con los tratamientos 0,04 mM y 0,44 mM, que inducen hasta un 50% de la forma filamentososa (Fig. 4d).

Giberelina y Flurprimidol. La giberelina GA₃ también reflejó diferencias significativas entre las distintas concentraciones y el control ($\chi^2=49$, $p<0,001$), debido al efecto estimulador de la fitohormona sobre el desarrollo, favoreciendo la formación de corazones (Fig. 4 e). Por el contrario, la presencia de flurprimidol, inhibidor de la síntesis de giberelinas, ralentizó el desarrollo, aumentando la población de filamentos por encima del 50%, a medida que aumentaba la concentración (Fig. 4f).

Sacarosa y luz. La aplicación de sacarosa mostró una relación de dependencia entre el compuesto y el desarrollo del gametofito, de manera que con este compuesto se estimula la formación de corazones a medida que aumenta su concentración, invirtiéndose la tendencia con las concentraciones más elevadas, de 88 mM y 117 mM, que indujeron la proliferación de filamentos y el descenso de corazones ($\chi^2=316$; $p<0,001$) (Fig. 4g). Finalmente, el ensayo con las distintas intensidades de luz, dio diferencias significativas frente al control ($\chi^2=18,1$; $p<0,001$), habiendo mayor presencia de filamentos con las intensidades bajas de 10 y 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y no existiendo diferencias entre ellos ($\chi^2=1,98$; $p<0,37$) (Fig. 4h). En ausencia de luz el gametofito no se desarrolla.

3.2. Efecto del medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario en el gametofito de *D.affinis* ssp. *affinis*, se ha visto afectado por el ambiente de cultivo, como queda reflejado en la Fig. 5.

Auxinas e inhibidor. IBA presentó diferencias mínimas en el desarrollo de embriones apogámicos, entre las concentraciones 0,05 mM, 0,49 mM y el control ($\chi^2 = 11,2$; $p=0,04$). No se tiene en cuenta las dos concentraciones sin datos. Estas diferencias se deben al mayor número de botones en 0,05 mM ($\chi^2=8,06$; $p<0,008$) frente al control (Fig. 5a). Por su parte el inhibidor TIBA (Figura 5b) muestra diferencias significativas entre 10mM y el control ($\chi^2=13,3$; $p<0,001$) debido a una gran diferencia en el porcentaje de corazones sin manchas, más numerosos con la mayor concentración (Fig. 5b). La auxina AIA presentó diferencias significativas entre la concentración 5,7 mM y el control, favoreciendo el desarrollo del embrión. La fuerte inhibición de la máxima concentración de AIA, sobre el desarrollo del gametofito, conlleva la ausencia de datos (Fig. 5c).

Citoquinina. La adición de BA al medio de cultivo muestra una tendencia que frena también el desarrollo del embrión -al igual que ocurría con el del gametofito- al pasar de la menor concentración, 0,04 mM, a la de 4,44 mM, si bien se rompe la tendencia en la concentración intermedia (Fig. 5d). La tendencia aún se acentuó con la máxima concentración de BA añadida, claramente inhibitoria del desarrollo del gametofito ($\chi^2=16,9$; $p<0,001$).

Giberelina y Flurprimidol. GA₃ presentó diferencias significativas en cuanto al desarrollo del embrión, frente al control, debidas a la concentración 0,3 mM ($\chi^2=7,86$; $p=0,02$) (Fig. 5e) alcanzándose el valor máximo de botones (45%) con dicha concentración, mientras que con el resto de concentraciones nunca se superan el 25% del control. El efecto inhibitorio del flurprimidol sobre el desarrollo del gametofito ha sido manifiesto también con el desarrollo del embrión. En la concentración 3,2 mM se observó el mayor número de corazones sin mancha, y con la concentración 16 mM no hay datos debido a que los gametófitos no alcanzaron el estado corazón y no presentaban embriones (Fig. 5f).

Sacarosa y luz. La sacarosa muestra muchas diferencias entre todos sus tratamientos ($\chi^2=142$; $p<0,001$); sin embargo las diferencias entre los tratamientos y el control no son todas iguales, así entre la concentración 14 mM y el control la diferencia es pequeña ($\chi^2=6,27$; $p=0,04$), mientras que entre la concentración 116 mM y el control las diferencias son muy superiores ($\chi^2=100$; $p<0,001$) (Fig. 5g). En este ensayo se observa un aumento de gametofitos sin mancha a medida que aumenta la concentración, invirtiéndose la tendencia a partir de la concentración 29 mM. Por último, intensidades de luz incidente en el cultivo menores que el control, provocaron un incremento de la presencia de botones en los gametofitos acorazonados, ($\chi^2=8,5$; $p<0,01$) para $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y ($\chi^2=64,69$; $p<0,001$) para la de $20 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 5h).

3.3. Efecto del medio de cultivo sobre la tasa largo/ancho (L/A) del gametofito

Auxinas e inhibidor. En cuanto a IBA, el conjunto de datos fue obtenido tras 70 días, aun así, no existen diferencias entre los individuos medidos ($F=0,96$; $p=0,42$) (Fig. 6a). Para el tratamiento con TIBA, la prueba ANOVA ($F=7,6$; $p<0,001$) indica diferencias globales significativas entre los grupos; la media más alta la tenemos en el control y a medida que añadimos TIBA los gametófitos son más anchos que largos, invirtiéndose esta tendencia con la mayor dosis de TIBA (Fig. 6b). En los tratamiento con AIA, el resultado del ANOVA

($F=2,55$; $p=0,057$) indica que la tasa L/A del gametofito no se vio influenciado por la fitohormona (sin tener en cuenta la concentración 28mM) (Fig. 6c).

Citoquinina. Con la adición de BA al medio, no se apreciaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones, al realizar la prueba ANOVA univariante ($F=1,73$; $p=0,17$) (Fig. 6d).

Giberelina e inhibidor. Respecto a la giberelina GA₃ el valor de la prueba ANOVA ($F=0,59$; $p=0,6$) indica una igualdad de varianzas entre los niveles del tratamiento, lo que implica que las diferencias que podamos apreciar en la gráfica, no sean estadísticamente significativas y todos los tratamientos sean iguales (Fig. 6e). Respecto al flurprimidol, el ANOVA ($F=27,3$; $p<0,001$) reflejó diferencias considerables entre las concentraciones ensayadas y el control; de las pruebas *post hoc*, podemos deducir que las diferencias encontradas sean debidas a los tratamientos 3,2 mM y 16 mM ($F=1,98$; $p=0,01$) (Fig. 7f).

El análisis del efecto del conjunto de tratamientos con las fitohormonas e inhibidores (IBA, TIBA, AIA, BA, GA₃, y F) sobre la tasa L/A del gametofito, realizado mediante un ANOVA anidado, rechazó la hipótesis nula de igualdad ($F=48$; $p<0,001$). Tras aplicar las pruebas *post hoc* (Tukey, Bonferroni y Duncan), la agrupación de los datos resultó en: Flurprimidol y BA por un lado, y por otro: GA₃, TIBA y AIA. IBA fue excluido de todos estos análisis por el programa porque presentaba un número diferente de niveles y un menor número de individuos, así que no era comparable, por eso se le podría considerar en un tercer grupo (Fig. 7).

Respecto a la sacarosa y la luz, estos factores no fueron sometidos al test ANOVA jerarquizado, porque no eran comparables a los fitoreguladores, pero en ellos sí se valoró el área como parámetro. Los gametófitos tratados con diferentes concentraciones de sacarosa mostraron diferencias entre los tratamientos ($F=3$; $p<0,01$) y las pruebas *post hoc*, apoyan la existencia de dos grupos: uno con el control, 88 mM y 117 mM; y otro grupo con 0, 15, 29 mM, algo que se puede observar en la figura 6g. En los gametófitos sombreados para el tratamiento de luz, no dieron diferencias significativas en cuanto a la tasa analizada ($F=1,20$; $p=0,28$) (Fig. 6 h).

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

***Nota. Aunque se alude a los test estadísticos en embriones mancha o botón, ello no ha sido trasladado al gráfico 8.

Auxina e inhibidor. Las posibilidades de reunir una muestra significativa de gametofitos acorazonados con embriones, en presencia de IBA, se vieron mermadas, por el efecto retardante que tiene la fitohormonas sobre el desarrollo del gametofito. (Fig. 8a). En presencia de TIBA, ni los embriones en fase de mancha ni los botones, presentaron diferencias significativas en la prueba ANOVA, ($F=0,3$; $p=0,89$) y ($F=0,6$; $p=0,65$), respectivamente (Fig. 8b), por lo cual no se constata una inhibición por parte de este compuesto, en el desarrollo de los embriones. Respecto al AIA, el conjunto de datos de manchas y de botones no cumple la hipótesis de igualdad de varianzas, así que se realizó la

aproximación de Welch, (similar al ANOVA), que detectó diferencias entre los niveles del tratamiento 5,71 mM ($F=3,4$; $p=0,04$), y 0,57 mM ($F=4,8$; $p=0,01$) (Fig. 8c).

Citoquinina. Cuando analizamos la citoquinina BA en la prueba de ANOVA de un factor sobre el tamaño de los embriones con forma de mancha y botón, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 8d).

Giberelina e inhibidor. El análisis ANOVA de los tratamientos con GA₃ rechaza la igualdad de varianzas ($F=3,46$; $p=0,04$), no obstante, el test de Tukey indica que no hay diferencias significativas entre grupos. Respecto a los embriones en estado botón, también hay diferencias significativas en el ANOVA ($F=3,6$; $p=0,014$) y entre los tamaños de los embriones de las concentraciones 0,28 y 2,8 mM (Fig. 8e). En el ensayo del flurprimidol, tras realizar la prueba ANOVA y los contrastes *post hoc*, se aprecian diferencias significativas del tamaño embrionario, entre 0,32 y el resto de concentraciones ($F=28$; $p<0,001$), promoviendo un crecimiento en anchura y un mayor tamaño del embrión (Fig. 8f) pero no así respecto al control.

Sacarosa e intensidad de luz. No hay diferencias significativas respecto al tamaño de los embriones en fase de botón, entre las concentraciones 0, 14 y 29 mM de sacarosa ($F=0,87$; $p=0,19$) ni tampoco respecto a los embriones en fase de mancha ($F=2,6$; $p=0,09$) (Fig. 8 g). Los datos del ensayo de las intensidades de luz, no presentan diferencias significativas en el caso de los embriones en fase de botón sometidos a sombreado ANOVA ($F=0,83$; $p=0,44$), mientras que en los embriones en fase de mancha sí presentan diferencias estadísticas ($F=3,88$; $p=0,03$); la prueba de Tukey (*post hoc*) indica que existen diferencias entre el control y el sombreado con $20 \mu\text{molm}^{-1}\text{s}^{-1}$ de luz ($p<0,01$) (Fig. 8 h).

3.5. Crioconservación de esporas

En el conjunto de datos de los porcentajes de morfotipos de los gametofitos cultivados *in vitro* tras la crioconservación, no hay diferencias significativas entre E1 (*Eppendorf* 1, no secado) y E2 (*Eppendorf* 2, secado) ($\chi^2=6,5$; $p=0,09$) (Figura 9a), pero sí existen diferencias entre ambos crioviales y entre los viales y el tratamiento sin protección (papel de aluminio). En este caso, las esporas germinadas originan gametofitos que tienen un menor grado de desarrollo, predominando el morfotipo filamento.

Cuando evaluamos el grado de desarrollo de los embriones, no hay diferencias significativas entre usar crioviales o *Eppendorf* (χ^2 , $p=0,07$). Sí se vieron diferencias significativas entre el conjunto de envases (crioviales y *Eppendorf*) y el tratamiento de esporas sin protección frente al NL, aunque en este caso, las diferencias son mínimas (el p-valor en este caso se acerca al nivel de aceptación; χ^2 , $p=0,03$) (Fig. 9b).

El uso de diferentes viales o recipientes causó diferencias en el tamaño del gametofito entre los viales, al igual que la comparación de los viales con un control externo de esporas no tratadas, ($F=5,3$; $p<0,001$), (Fig. 10). En cuanto al tamaño de los embriones en estado mancha, no hay diferencias significativas en los tratamientos C1, C2, E1, E2 y sin protección, ($F=2,39$; $p=0,05$), pero sí para los botones ($F=6,48$; $p<0,001$); en este caso, el tratamiento sin protección presenta diferencias respecto a los crioviales pero no frente a los *Eppendorf*, que tienen valores intermedios.

***Nota. Aunque se alude a los test estadísticos en embriones mancha o botón, ello no ha sido trasladado al gráfico 10.

No obtuvimos resultados de las bolas de alginato, porque obtuvimos una densidad muy baja de bolas por tratamiento (4 gametófitos/cm²), lo que no las hacía comparable con el resto de tratamientos (aproximadamente 400 esporas/cm²).

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó el efecto del ambiente de cultivo sobre el desarrollo del gametofito de *D. affinis* ssp. *affinis*, prestando especial atención a su influencia sobre el proceso apogámico, único mecanismo reproductivo, del que dispone esta especie para perpetuarse. Para ello, se han seleccionado algunos factores con peso en el desarrollo vegetal, como las fitohormonas y sus inhibidores, la fuente de carbono o la intensidad de luz. El objetivo del estudio, en realidad, era encontrar individuos que vieran mermada la respuesta apogámica y así disponer de muestras comparativas para llevar a cabo análisis de expresión génica diferencial, frente a individuos control, en una especie en la que la apogamia es obligada y está muy fijada.

La adición de los reguladores NAA, GA₃ o BA al medio de cultivo favorece en ocasiones la respuesta apogámica, (Whittier 1966; Kuriyama *et al.* 1990; Kwa *et al.* 1995; Kuriyama y Maeda 1999). La aplicación de las fitohormonas ensayadas en este trabajo, medio de cultivo del gametofito apogámico de *D. affinis*, dio respuestas diversas y en ocasiones sorprendentes.

Las auxinas son uno de los grandes grupos de fitohormonas, con un papel destacado en la formación del eje bipolar embrionario, en todo el abanico evolutivo vegetal. Muy recientemente, se ha publicado en la hepática *Marchantia polymorpha*, la presencia de un sistema transcripcional de respuesta a auxina, implicado en múltiples procesos morfogénicos, en los que se atribuye a la auxina un papel ancestral modulador de la diferenciación celular (Flores-Sandoval *et al.*, 2015). Uno de los elementos de este sistema es la proteína TOPLESS, un correpresor transcripcional, que participa en la correcta diferenciación del polo apical durante la embriogénesis, y que hemos identificado recientemente en el gametofito de esta especie (Grossman *et al.*, *comunicación personal*). Con anterioridad, también se había descrito la acumulación de AIA durante el desarrollo del embrión apogámico, en *D. affinis* ssp. *affinis* mediante análisis espectrofotométricos (Menéndez *et al.*, 2006). En el presente estudio, se ha constatado un efecto distinto entre las dos auxinas ensayadas. Así, mientras IBA frenaba el desarrollo del gametofito, AIA lo estimula, aumentando la presencia del estado acorazonado. Sin embargo, esto puede deberse a un efecto de la densidad de esporas en el cultivo inicial, pues al revisar los volúmenes iniciales inoculados, se vio que con esta fitohormona (IBA) fueron de 1/2 a 1/3 más bajos que el número de esporas inoculadas en el resto de tratamientos, lo que ha podido repercutir en las respuestas observadas (Warne y Lloyd, 1986). Cabe decir también, que la enorme capacidad de multiplicación que tiene el gametofito, en general, en su parte basal, añadió una dificultad a la hora de hacer muestreos representativos de la diversidad de morfotipos del cultivo, ya que sobreestima la presencia de filamentos (estadio de apenas unas células) frente a corazones, cuyo desarrollo lleva un tiempo mayor. Asimismo, los numerosos incidentes en el estado de la cámara de crecimiento, también ha hecho muy complicado afrontar el cultivo de una estructura tan vulnerable a la desecación como es el gametofito de un helecho, que se desarrolla sin la protección del esporofito.

Por otra parte, se esperaba que TIBA tuviera un efecto claramente retardador del desarrollo, según la bibliografía (Pires de Melo *et al.* 2004), lo que se ha visto con la dosis más elevada, que propició un aumento de filamentos. Por otra parte, el mayor desarrollo en anchura frente a la longitud entre la zona meristemática y la basal, en presencia de este

inhibidor del transporte de auxinas, apunta veladamente hacia la existencia de un eje apical-basal en la estructura gametofítica, que podría estar regulado por auxinas. Apoyando la existencia de un sistema de transporte de auxina, decir que hemos identificado recientemente en el gametofito de esta especie, proteínas implicadas en el transporte de auxinas como ABCB19, (Grossman *et al.*, *comunicación personal*) que apoyarían la existencia de un sistema de transporte polar de auxinas en el protalo.

En cuanto al efecto de la citoquinina, se observa un retraso apreciable en el desarrollo, predominando los filamentos, si bien no correlaciona con la concentración. No obstante, el tamaño del gametofito no experimenta una drástica reducción, como ocurría con el gametofito de la especie *Blechnum spicant*, L., con una pauta reproductiva diferente, sexual, y en la que la fitohormona ejercía un fuerte efecto masculinizante, que iba en paralelo con un notable acortamiento del tamaño del gametofito (Menéndez *et al.* 2009). Sí resulta más evidente en nuestro estudio, un efecto ralentizador de la apogamia, por parte de la citoquinina, al favorecer, de algún modo, una mayor presencia de gametofitos sin mancha en el cultivo.

Las giberelinas han recibido una cierta atención en el mundo del helecho, dada su conexión, desde el punto de vista químico, con los anteridiógenos, feromonas que median en la formación de los órganos sexuales masculinos, o anteridios, en determinadas familias (Wen *et al.* 1999; Yamane, 1998). Aparte de esto, también se ha constatado un efecto en la elongación del gametofito, atribuible a la expansión celular (Kazmierczak 2010), influenciada por las giberelinas GA₃ y GA₄₊₇ (Menéndez *et al.*, 2006). En este trabajo, se ha visto que la aplicación de GA₃ favorece el desarrollo del gametofito apogámico, con una mayor presencia de corazones, con un efecto incierto sobre el desarrollo del embrión. En el trabajo de Menéndez *et al.* (2006) se observó una acumulación de GA₄ durante la formación del embrión apogámico y de GA₃ en estadios posteriores del desarrollo del esporofito apogámico. Probablemente hubiera sido más interesante, por lo tanto, haber analizado el efecto de este otro compuesto, y ver si el exceso en el gametofito reviste algún descenso en el nivel de respuesta. El flurprimidol cumple su función retardante del desarrollo, promoviendo muy significativamente el filamento y también el retraso de la formación de embriones, pero no ha mostrado aquí un efecto tan marcado sobre la dirección del crecimiento, preferentemente hacia lo ancho, observada con anterioridad en cultivos de gametofito de *B. spicant* L. (Menéndez *et al.* 2006).

Las concentraciones elevadas de sacarosa retrasan el desarrollo de los gametófitos en nuestra especie. Ello bien puede deberse a un estrés osmótico causado por la sacarosa, algo a lo que ya hizo referencia Whittier en 1975, en el helecho *Pteridium*. Por otra parte, en un trabajo similar con la especie *Ceratopteris richardii*, Cordle *et al.*, (2007) lograba aumentar la expresión apogámica mediante la adición de sacarosa al medio de cultivo. En nuestro trabajo, no se logra inhibir nunca la expresión apogámica. La ausencia de sacarosa no impide el desarrollo de gametófitos, y si bien el posible estrés osmótico por la adición de altas concentraciones de sacarosa daña a los gametófitos y retrasa su desarrollo, ello no impide la expresión apogámica. La concentración 29 mM de sacarosa es nuestro mejor resultado, pues muestra la mayor proporción de gametófitos sin mancha respecto al total, si bien no era lo esperado, pues en otro trabajo previo (Fernández *et al.* 1996) con la concentración 58mM o 20 g/L y aledañas, se estimulaba la respuesta. En realidad, ello ha sido debido a la forma de trabajar los resultados. En el segundo caso, se contabilizó el número de esporofitos por gramo de peso fresco de gametofito, que no tiene nada que ver

con las observaciones realizadas en este estudio, gametofito por gametofito. En un gramo de peso fresco de cultivo, aún con una baja frecuencia de corazones frente a filamentos, se puede acumular igualmente un número elevado de esporofitos.

Los tratamientos de sombreado demostraron no provocar cambios significativos en el desarrollo de las esporas de *D. affinis*, tras el tiempo de cultivo. Las diferencias entre gametófitos no eran significativas, la excepción se halló en las esporas cultivadas en oscuridad, que no suelen germinar en oscuridad (Ospina *et al.*, 2015). Según la autora, en helechos tropicales, el mecanismo de germinación de las esporas es relativamente similar a lo que acontece las plantas que germinan en función de la longitud de onda de la luz. *D. affinis* ssp. *affinis* es una especie más generalista, por lo que no es tan exigente ante la irradiancia lumínica y por eso germina con intensidades baja de luz.

En la crioconservación del material vegetal de *D. affinis* ssp. *affinis*, existe un incremento notable del desarrollo de embriones apogámicos en los tratamientos de crioconservación, frente al control. La exposición al NL parece incrementar la rapidez de expresión de la apogamia, no obstante, la densidad de esporas es superior al de las esporas inoculadas en los fitohormonas y ello puede haber tenido algún efecto positivo. Se observan los tres estados de desarrollo en cualquier nivel de tratamiento (que haya llegado a desarrollarlos). Observaciones con otras especies, como *B. spicant*, revelaron una mayor sincronía en el desarrollo del gametofito (Fernández, comunicación personal). No se pudieron obtener resultados del ensayo con bolas de alginato y gametófitos, ya que se obtuvo un número insuficiente para ser comparado con otro ensayo, pues sembramos unas 40 bolas de alginato/individuos, frente a las 5000 esporas, con las que se inocula el cultivo, normalmente. No obstante, una parte de los gametófitos germinaron y lo hicieron sin problema.

5. CONCLUSIONES

-El estudio con gametófitos del helecho *D. affinis ssp. affinis* muestra una gran persistencia de la formación de embriones apogámicos, los cuales se formaban bajo todas las condiciones de cultivo ensayadas, a pesar de las limitaciones de algunos medios. Esto nos puede indicar el alto grado de fijación genética de este fenómeno.

-La formación de embriones se vio influenciada por los tratamientos con IBA, llegando a estar completamente ausentes, sacarosa 29 mM, y flurprimidol 3,3 mM, en los cuales el número de embriones alcanzaron su número más bajo.

-A tenor de lo observado en este trabajo, es posible crioconservar esporas y gametofitos, de *D. affinis ssp. affinis*, comportándose aquellas como cualquier otra espora parda, si bien los gametofitos no pudieron ser suficientemente valorados.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal DC, Pawar SS y Mascarenhas AF (1993) Cryopreservation of spores of *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook. F. An endangered tree fern. *J Plant Physiol* 142: 124–126.
2. Asker SE y Jerling L (1992) Apomixis in plants. CRC Press, Boca Raton (FL) y London
3. Baker MS y Wolf PG (2010) Unfurling fern biology in the genomics age. *Bioscience* 60: 177-185
4. Christenhusz MJM, Zhang X C y Schneider H (2011) A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns. *Phytotaxa* 19:7-54
5. Cordle AR, Irish E Ey Cheng C L (2007) Apogamy Induction in *Ceratopteris richardii*. *J Plant Sci* 168: 361-369
6. Cordle A R, Ulrish E E y Cheng C-L (2012) gene expression associated with apogamy commitment in *Ceratopteris richardii*. *Sex Plant Reprod* 25: 293-304
7. Der, J.P.; Barker, M.S.; Norman, J.W.; dePamphilis, C.W.; and Wolf, P.G. *De novo* characterization of the gametophyte transcriptome in bracken fern, *Pteridium aquilinum*. *BMC Genomics* 2011, 12, 99.
8. Díaz T E, Fernández-Carvajal M C y Fernández-Prieto J A (2004) Curso de Botánica. Ed TreaCiencias (Gijón, Asturias) 1ª Ed. ISBN 84-9704-113-5
9. Fernández H, Bertrand A M y Sánchez-Tamés R (1999) Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell. Tiss Org Cult* 56: 211-214,
10. Fernández H, Bertrand A M y Sánchez-Tamés R (1996) Influence of tissue conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. *Plant Cell Tiss Org* 45: 93-97
11. Fernández H y Revilla M A (2003). *In vitro* culture of ornamental ferns. *Plant Cell Tiss Org Cult* 73:1-13.
12. Flores-Sandoval E, Magnus Eklund D, y Bowmann JL (2015) A simple auxin transcriptional response system regulates multiple morphogenetic processes in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLOS Genetics* DOI:10.1371/journal.pgen.1005207
13. Goller K y Rybczynski J J (2007) Gametophyte and sporophyte culture of tree ferns *in vitro* culture. *Act Soc Bot Pol.* 76: 193-199
14. Greer G K, Dietrich M A, Stewart S, Devol J y Rebert A (2009) Morphological functions of gibberellins in leptosporangiate fern gametophytes: insights into the evolution of form and gender expression. *Bot J Linn Soc* 159, 599-615
15. Grossniklaus, U.; Koltunow, y van Lookeren Campagne M (1999) A bright future for apomixis. *Trends Plant Sci* 3, 415.16.
16. Grossniklaus U, Nogler G A y Van Dijk P J (2001) How to Avoid Sex: The Genetic Control of Gametophytic Apomixis. *Plant Cell* 13:1491-1498
17. Hedden P y Proebsting W M (1999) Genetic Analysis of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Physiol.* vol. 119:365-370
18. IBM Corp. (2013). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.
19. Jacobson A yL (1981) Inhibitory Effects of 2, 3, 5-Triiodobenzoic Acid on Ion Absorption, Respiration, and Carbon Metabolism in Excised Barley Roots. *Plant Physiol* 67: 282–286.
20. Kázmierczak A (2010) Gibberelic acid and ethylene control male sex determination and development of *Anemia phyllitidis* gametophytes. In: Working with Ferns: Issues and applications. Fernández H, Kumar A y Revilla M A (Ed. Springer Nueva York-Dordrecht-Heidelberg-London pp 49-66

21. Koltunow A. M, Bicknell R. A. y Chaudhury A. M. (1995) Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiol* 108:1345-1352.
22. Kuriyama A, y Maeda M (1999) Direct production of sporophytic plants from spores of *Equisetum arvense*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58:77–79.
23. Kuriyama A, Sugawara Y, Matsushima H, Takeuchi M (1990) Production of sporophyte structures from gametophytes by cytokininin *Equisetumarvense*. *Naturwissenschaften*77:31–32.
24. Kwa SH, Wee YC, Lim TM, Kumar PP (1995) IAA-induced apogamy in *Platycerium coronarium* (Koenig) Desv. gametophytes cultured in vitro. *Plant Cell Rep* 14:598– 605.
25. Lee K y Seo, PJ (2015) The Arabidopsis E3 ubiquitin ligase HOS1 contributes to auxin biosynthesis in the control of hypocotyl elongation. *International Journal of Plant Sciences* 176: 433-445
26. Manton I (1950) Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. Cambridge University Press
27. Menéndez V, Revilla M A y Fernández H (2006) Growth and Gender in the gametophyte of *Bechnum spicant* L *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86:47-53
28. Menéndez V, Villacorta N F, Revilla M A, Gotor V, Bernard P y Fernández H (2006a) Exogenous and endogenous growth regulators on apogamy in *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins sp. *affinis* *Plant Cell Reports* 25: 85-91
29. Menéndez V, Revilla M A, Gotor V, Bernard P y Fernández (2006b) Gibberellins and antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Rep.* 5: 1104-1110.
30. Menéndez V, Revilla MA, Fal M A, Fernández H (2009) The effect of cytokinins on growth and sexual organ development in the gametophyte of *Blechnum spicant*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96: 245-250.
31. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
32. Okano, Y.; Aono, N.; Hiwatashi, Y.; Murata, T.; Nishiyama, T.; Ishikawa, T.; Kubo, M. and Hasebe, M. A (2009) *Polycomb* Repressive Complex 2 gene regulates apogamy and gives evolutionary insights into early land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16321-16326
33. Ospina K R, Briones O y Pérez-García B (2015) Spore Germination of Three Tree Fern Species in Response to Light, Water Potential, and Canopy Openness. *Am Fern J* 105: 59-72
34. Pence VC (2000a) Cryopreservation of *in vitro* grown fern gametophytes. *Am Fern J* 90: 16–23
35. Pence VC (2000b) Survival of chlorophyllous and non chlorophyllous fern spores through exposure to liquid nitrogen. *Am Fern J* 90: 119-125.
36. Pires de Meloa M, Martins de Lima T, Pithon-Curi T C y Curi R (2004) The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 148: 103–111
37. Rademacher, W (2000) Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:501-531.
38. R Core Team (2013). R: A language y environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
39. Salmi M L, Bushart T J y Roux S J (2005) Profile and analisis of gene expression changes during early development in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* 138: 1734-35

40. Salvo-Tierra E (1990) Guía de helechos de la península Ibérica y Baleares Ed. Pirámide (Móstoles, Madrid) ISBN 84-368-0548-8. pp 45-67
41. Schmidt A, Schmid M W y Grossniklaus U (2015) Plant Germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development* 142: 229-241
42. Seguí-Simarro J M (2010) Androgenesis revisited. *Bot Rev* 76: 377-404
43. Sheffield and Bell, (1987) Current studies of the pteridophyte life cycle. *Bot Rev* 53: 442-490
44. Talent N (2009) Evolution of gametophytic apomixis in flowering plants: an alternative model from Maloid *Rosaceae*. *Theory BioSci.* nº 128: 121-128
45. Tanurdzic M y Banks J A (2004) Sex determining mechanisms in land Plants. *Plant Cell.* 16: 61- 71
46. Warne T R y Lloyd R M (1986) Gametophytic density and sex expression in *Ceratopteris*. *Can J Bot* 65: 362-365.
47. Wen C K, Smith R y Banks J A (1999) ANI1: A sex pheromone-induced gene in *Ceratopteris* gametophytes and its possible role in sex determination. *Plant Cell* 11; 1307-1317
48. Whittier D P (1966) The Influence of growth substances on the Induction of Apogamy in *Pteridium* gametophytes. *Am J Bot* 53, 882–886
49. Whittier D P (1975) The Influence of osmotic conditions on induced apogamy in *Pteridium* gametophytes. *Phytomorphology* 25: 246-249.
50. Whittier D P y Pratt L (1971) The effect of light quality on the induction of apogamy in prothalli of *Pteridium aquilinum*. *Planta* 99, 174-178
51. Yamane H (1998) Fern antheridiogens. *Int Rev Cytol* 184:1-32

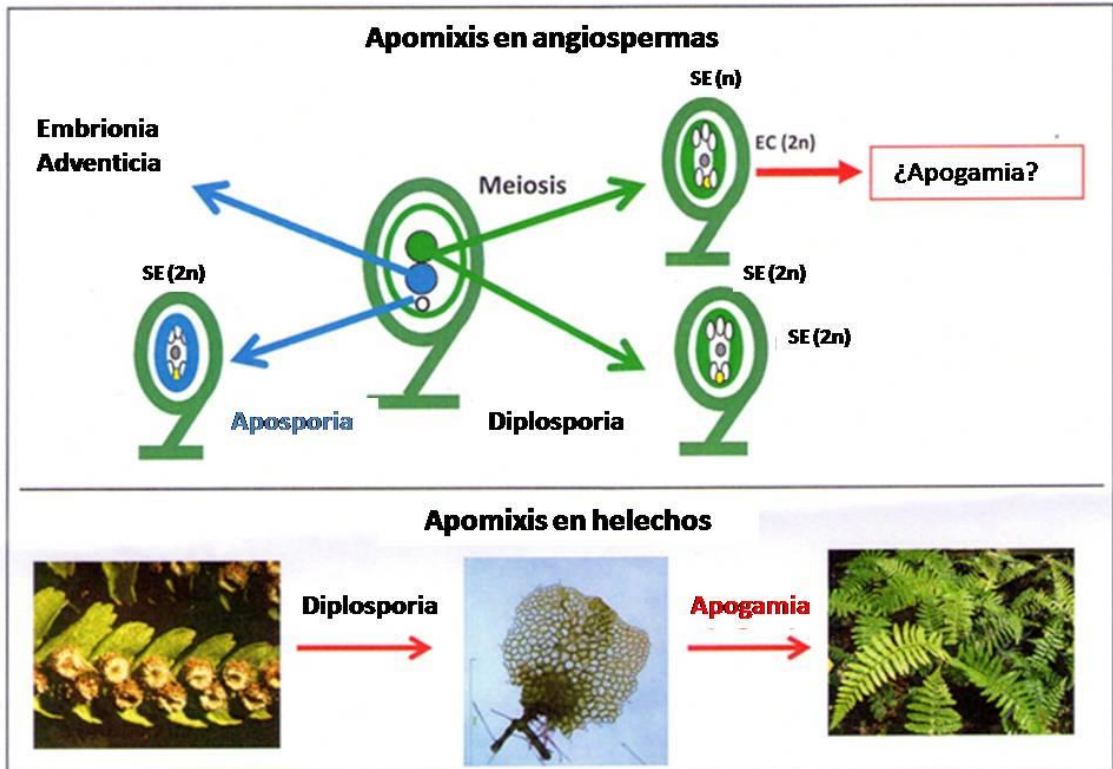


Figura 1: Apomixis en angiospermas (a) y en helechos (b).

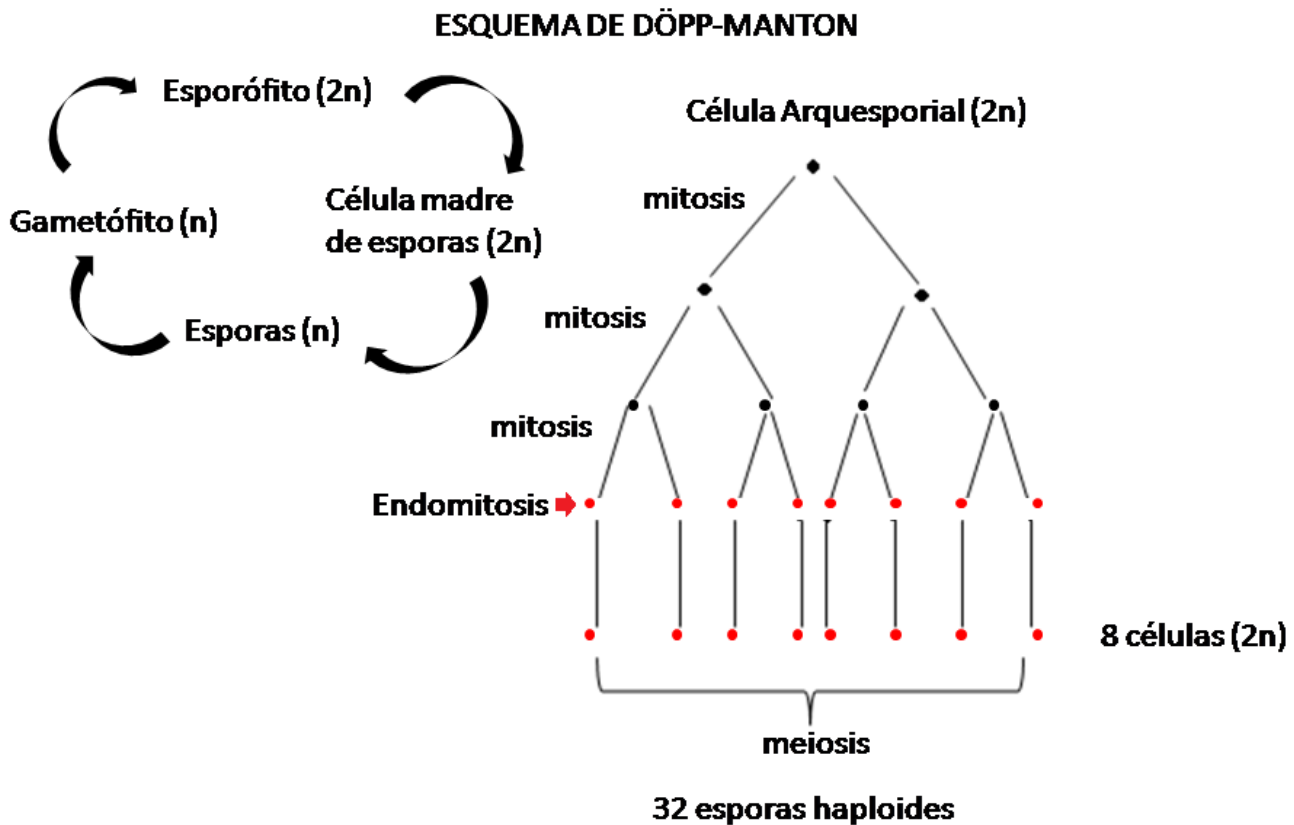


Figura 2. Reducción meiótica en *D. affinis* ssp. *affinis*, según esquema de Manton (1950)

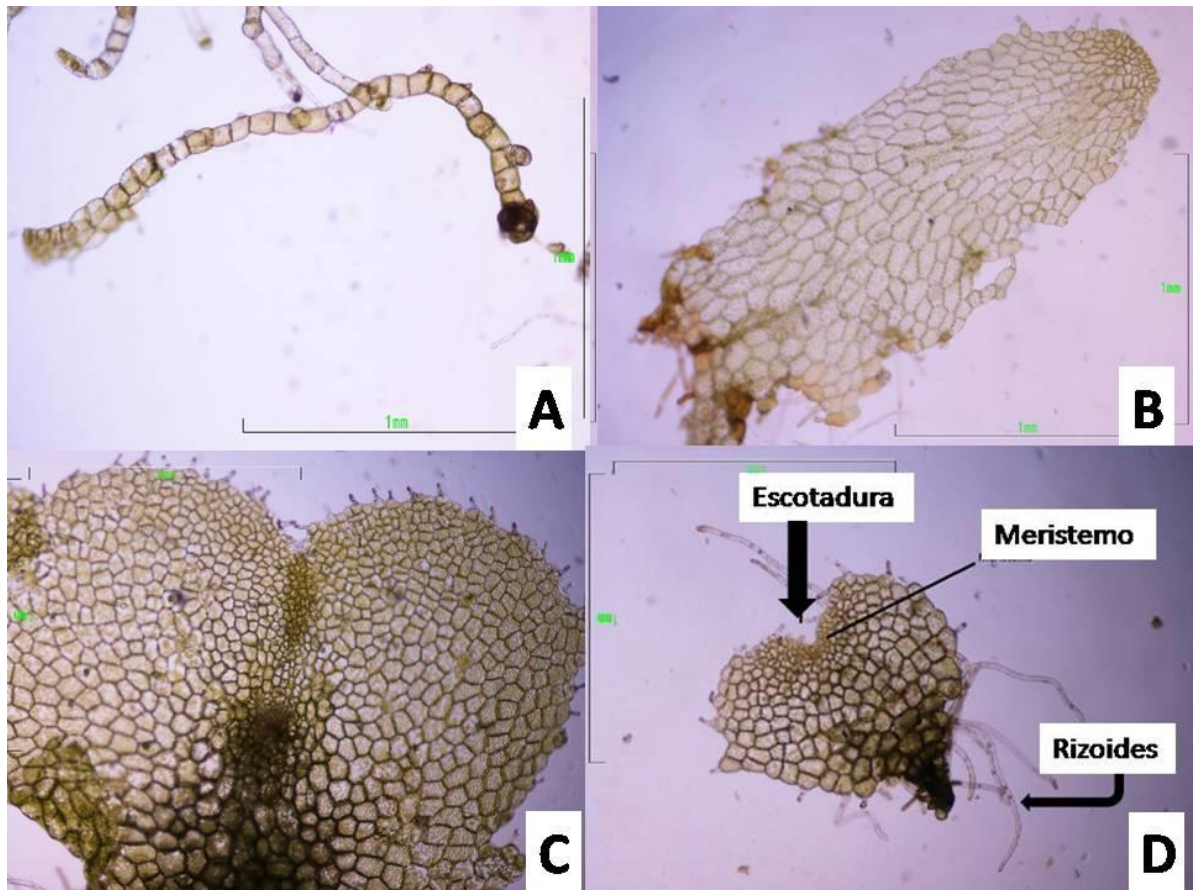


Figura 3: Estados de desarrollo del gametófito del helecho: filamento (a), espátula (b) y corazón (c). Se indica la zona en la que se forma el embrión (d).

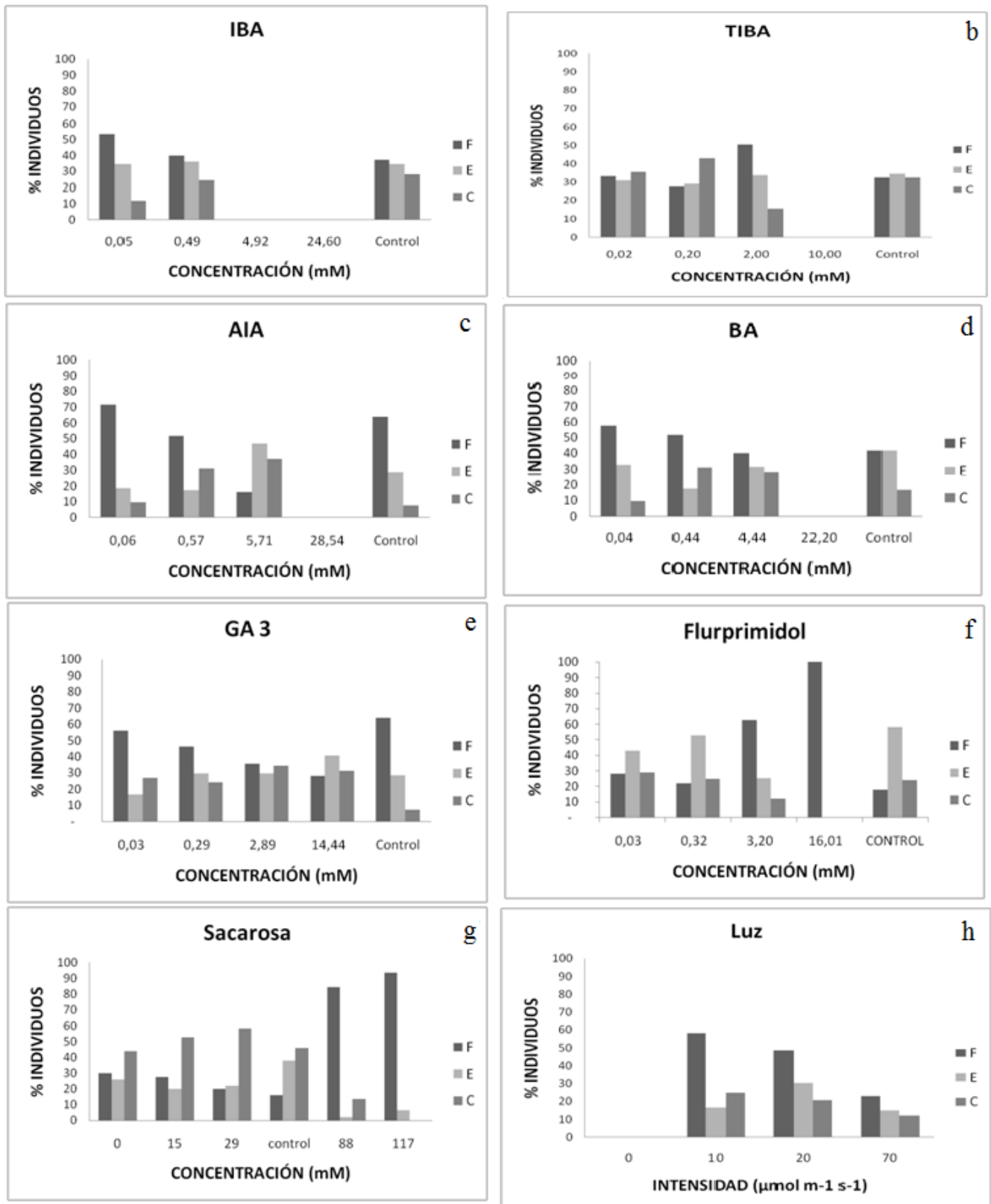


Figura 4. Frecuencia de morfotipos del gametófito de *D. affinis* ssp. *affinis*, cultivado en el medio MS, con distintas concentraciones de fitoreguladores y sacarosa, e intensidades de luz. Datos tomados al cabo de 50-55 días. F= filamento, E= espátula y C=corazón.

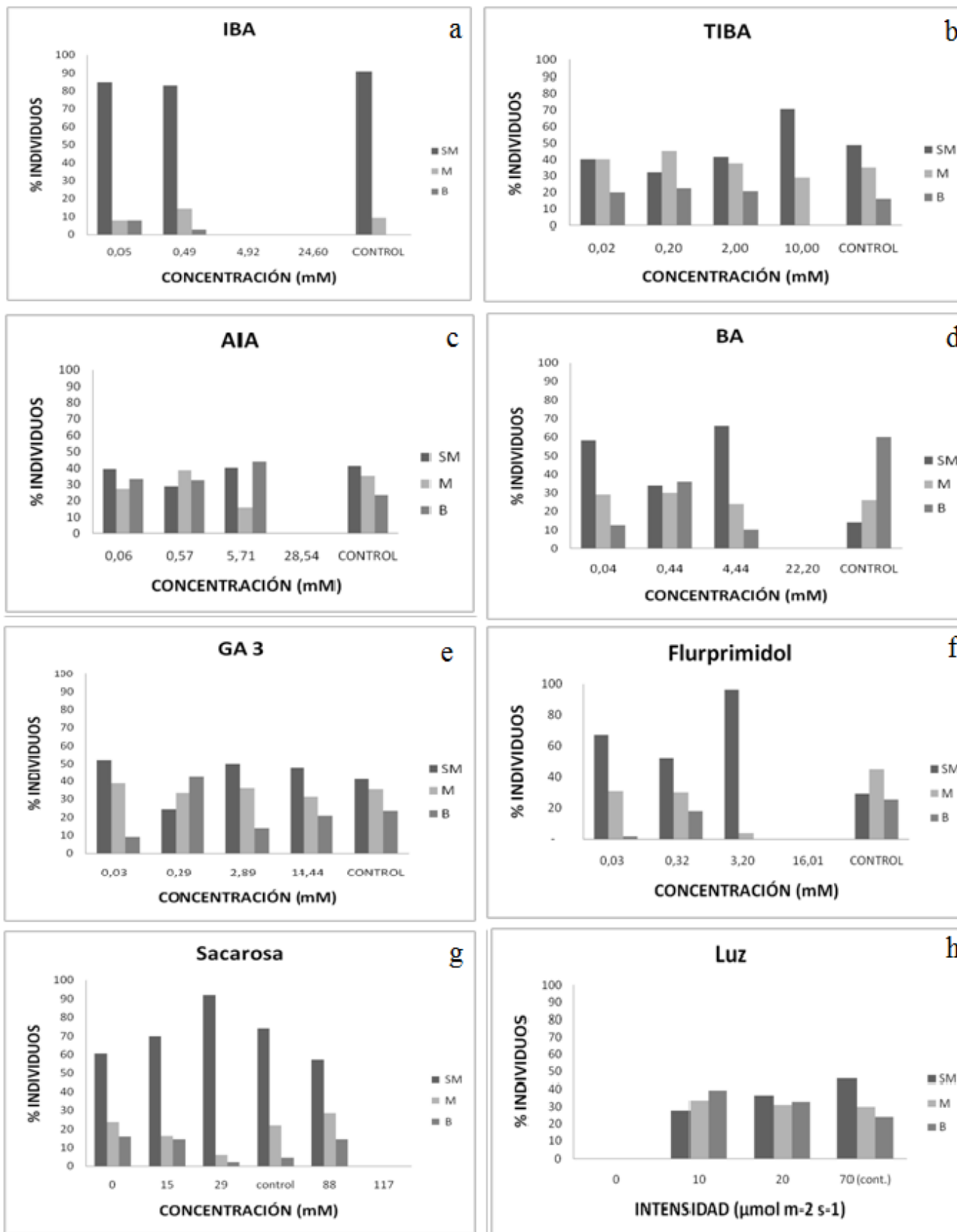


Figura 5. Frecuencia de embriones apogámicos en los gametófitos acorazonados de *D. affinis* ssp. *affinis* cultivados en el medio MS, con distintas concentraciones de fitoreguladores y sacarosa, e intensidades de luz. Datos tomados al cabo de 50-55 días. SM= sin mancha, M= mancha y B= botón.

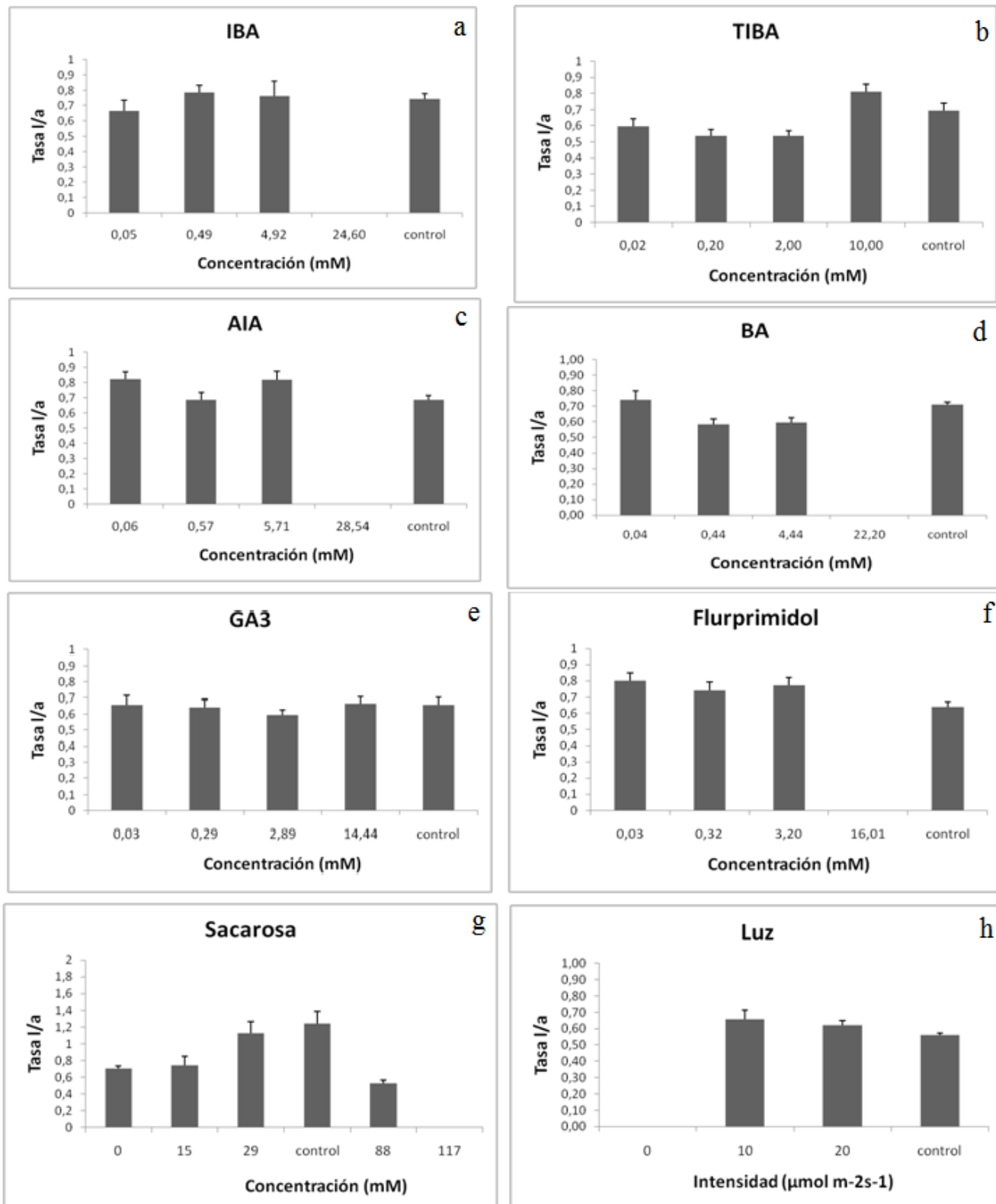
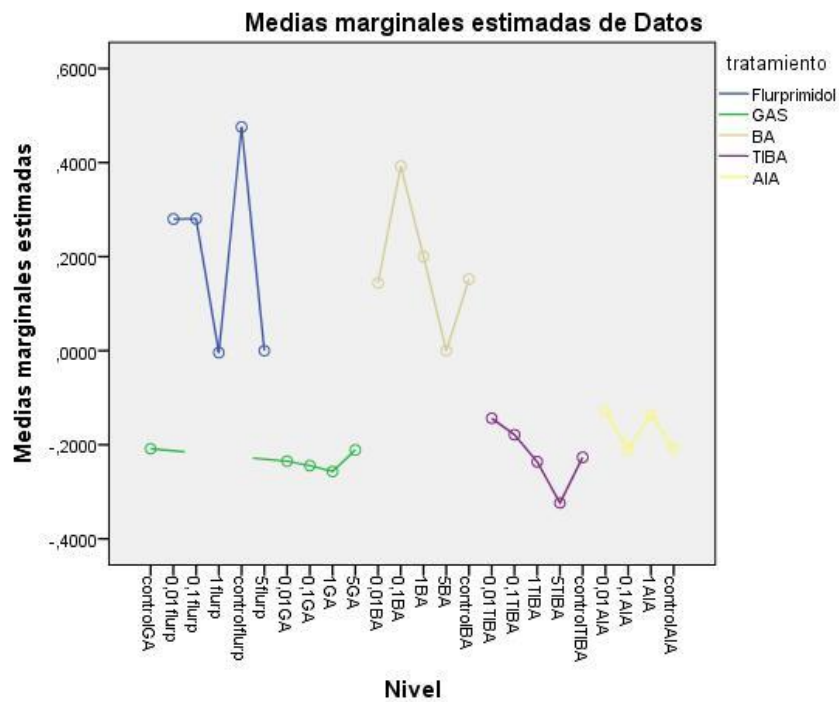


Figura 6. Efecto de los fitorreguladores, sacarosa e intensidades de luz sobre tasa longitud/anchura del gametofito de *D. affinis* ssp. *affinis*, cultivado en el medio MS. Datos tomados al cabo de 50-55 días. Las barras indican el error estándar.



Las medias no estimables no se trazan.

Figura 7: Agrupación de los datos del efecto de los fitorreguladores sobre la tasa longitud/anchura, en el gametofito de *Dryopteris affinis* ssp *affinis*, mediante el empleo de un ANOVA anidado.

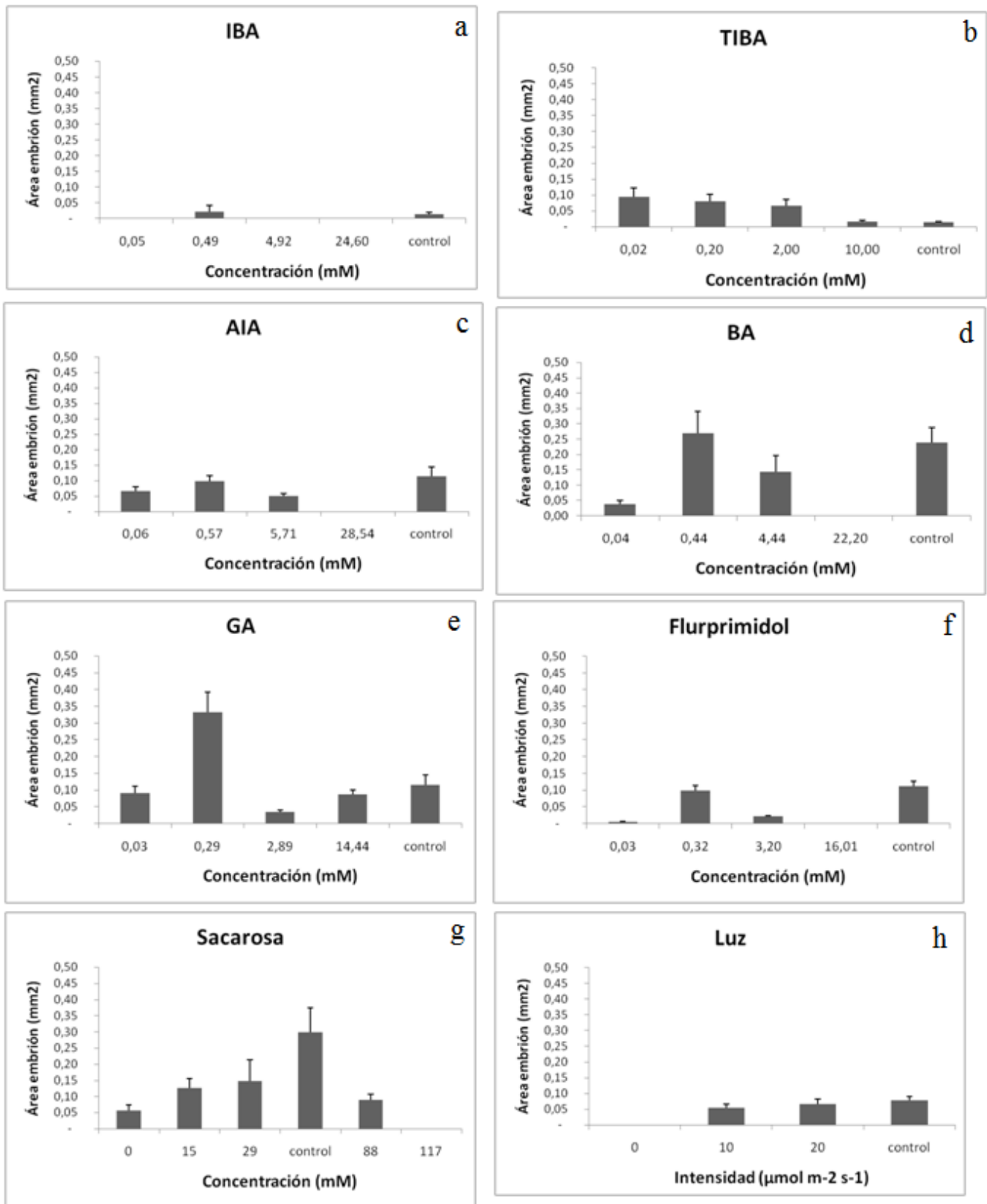


Figura 8. Efecto de la concentración de fitorreguladores y sacarosa, e intensidades de luz, sobre el tamaño del embrión apogámico, en gametofitos de *D. affinis* ssp. *affinis* cultivados en el medio MS. Datos tomados al cabo de 50-55 días. Las barras indican el error estándar.

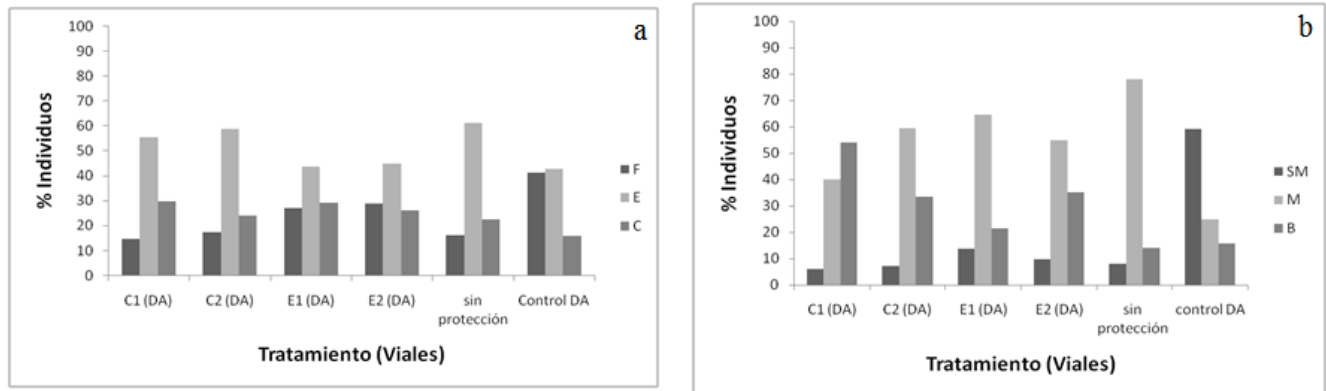


Figura 9. Efecto de los protocolos de crioconservación, sobre: a) el desarrollo vegetativo del gametofito cultivado en el medio MS, y b) la apogamia, en los gametofitos acorazonados, en *D. affinis* ssp. *affinis*. Datos tomados al cabo de 50-55 días. F= filamento, E= espátula y C=corazón; SM= sin mancha, M= mancha y B= botón. C1, criovial+secado; C2, criovial; E1, eppendorf+secado; E2, eppendorf; Sin protección, esporas envueltas en papel de aluminio.

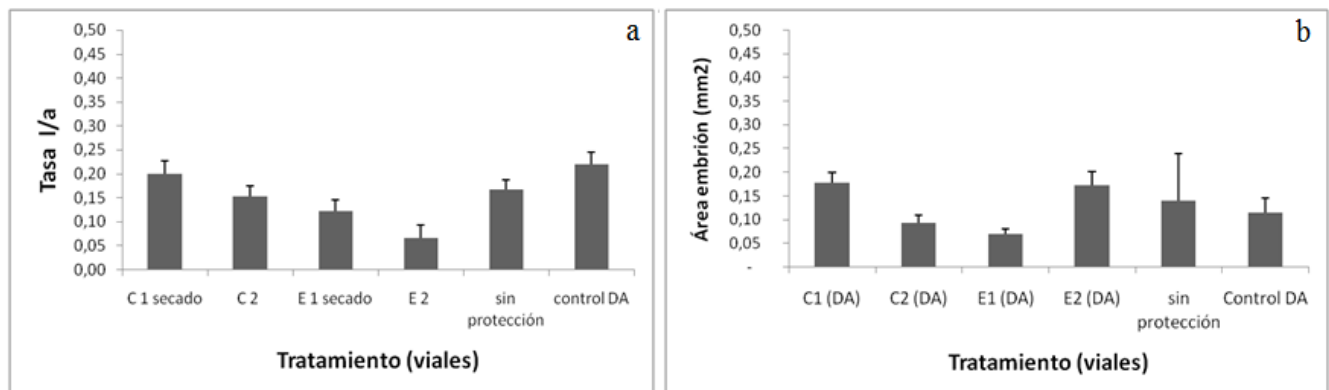


Figura 10: Efecto de los protocolos de crioconservación sobre: a) la tasa de longitud/anchura de los gametofitos acorazonados de *D. affinis*, y b) el área de los embriones apogámicos. Datos tomados al cabo de 50-55 días. Las barras representan el error estándar. C1, criovial+secado; C2, criovial; E1, eppendorf+secado; E2, eppendorf, Sin protección; esporas envueltas en papel de aluminio.