

GERMINACION Y MORFOGENESIS GAMETOFITICA DE *PTERIS INERMIS*
(ROSENST.) DE LA SOTA

GERMINATION AND GAMETOFITIC MORPHOGENESIS OF *PTERIS INERMIS*
(ROSENST.) DE LA SOTA

María Elena Tanco, Olga Gladys Martínez & María Luisa Cristina Bonomo

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta
Av. Bolivia 5150, 4400 Salta, Argentina

RESUMEN

Se presenta el desarrollo protálico de *Pteris inermis* (Rosenst.) de la Sota, estudiado mediante técnicas de cultivo *in vitro*. La germinación de esporas recientemente recolectadas comienza a los 6 días, y a los 27 días las que fueron almacenadas durante un año. La germinación es de tipo *Vittaria*. El tratamiento con reguladores de crecimiento, Giberelina y Benziladenina (BA), reduce el tiempo de germinación, especialmente con 0,5 ppm/L de Giberelina. Durante la fase filamentosa se forman ramificaciones que originan colonias en la etapa adulta. El desarrollo protálico es tipo *Ceratopteris*. Se han encontrado protalos anteridiados, arquegoniados, bisexuales y neutros. Los arquegonios se originan sobre el lado abaxial de la costilla central o hacia ambos lados, adaxial y abaxial. Contienen cuellos formados por 4 anillos con 4 células cada uno.

PALABRAS CLAVE: *Pteris*, germinación, desarrollo protálico, reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

The prothallial development of the *Pteris inermis* (Rosenst.) de la Sota is presented, studied by *in vitro* culture techniques. The germination of the spores recently collected occurred at the 6th day and at the 27th day those that were stored for a year. The pattern of germination is the *Vittaria*-type. The treatment with growth regulators, Gibberellin and Benzyladenine (BA), reduces the time of germination, specially with 0.5 ppm/L of Gibberellin. During the phase were formed ramifications that originate colonies in the adult stage. The prothallial development is the *Ceratopteris*-type. There were found antheridiate, archegoniate, bisexual and neutral gametophytes. Archegonia were formed in the abaxial side of the central cushion or in both sides, adaxial and abaxial. They contained necks formed by 4 rings with 4 cells each.

KEYWORDS: *Pteris*, germination, prothallial development, growth regulators.

INTRODUCCION

El género *Pteris* L. es preferentemente pantropical y de áreas templado-frías, presenta alrededor de 280 especies (Copeland 1947) de las cuales 55 se encuentran en América Tropical (Mendoza *et al.* 1997). Para Argentina se han citado 11 especies (Sota *et al.* 2001), entre ellas *Pteris inermis* (Rosenst.) de la Sota, conocida como “yuyo garrapata” o “garrapata yuyo”. Esta especie crece en el noroeste argentino, en selvas montanas, sitios abiertos, orillas

de caminos, sotobosques y bosques en galería, hasta los 2.000 m s.n.m.

Entre los estudios realizados sobre la fase sexual de *Pteris*, para el continente americano, se encuentran los trabajos de Beri & Bir (1993) en *Pteris vittata* L., Mendoza *et al.* (1997) en *P. berteriana* Agardh, y Letelier & Peñailillo (2007) en *P. chilensis* Desv. Prada *et al.* (2008) reportan información sobre *P. incompleta* Cav. para España y Zhang *et al.* (2008) se refieren a 6 especies de China. En cuanto a la palinología del género *Pteris* existen antecedentes

publicados por Sladkov (1962), Nayar *et al.* (1964), Erdtman & Sorsa (1971), Huang (1981), Michelena (1989), Tryon & Lugardon (1991), Large & Braggins (1991), Devi (1977), Arreguín-Sánchez *et al.* (1997), Prado & Windisch (2000) y Martínez (2003). Ninguno de ellos caracteriza las esporas de *Pteris inermis*.

El propósito de este trabajo es brindar información sobre la morfogénesis de *Pteris inermis* desde la morfología de las esporas hasta la formación de protalos adultos y el efecto de reguladores de crecimiento sobre la germinación de esporas almacenadas durante un año.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se realizó sobre la base de material recolectado en la Quebrada de San Lorenzo, a 10 km de la ciudad de Salta (Argentina), todos ellos registrados en el Herbario del Museo de Ciencias Naturales de Salta (MCNS).

MATERIAL ESTUDIADO: ARGENTINA: Salta, Depto. Capital, Quebrada de San Lorenzo, 1.600 m, 12-III-2006. Tanco 120 (MCNS); mismo lugar, 1.500 m, 20-V-2006. Tanco 121 (MCNS); mismo lugar, 1.400 m, 14-IV-2007. Tanco 122 (MCNS).

Las esporas se obtuvieron de cada ejemplar recolectado a partir de segmentos fértiles colocados en sobres de papel blanco bajo el calor de una lámpara de 40 W durante 48 horas para favorecer la dehiscencia de los esporangios. La separación de las esporas del resto del material se llevó a cabo con un tamiz con poros de 80 μm de diámetro.

Para el estudio palinológico con microscopía electrónica de barrido, las esporas se montaron directamente sobre platina, y para microscopía óptica sobre gelatina glicerizada. Se registraron valores mínimo, máximo y la media de los diámetros polar y ecuatorial.

Antes de la siembra de las esporas, se realizó la desinfección del material con hipoclorito de sodio comercial al 5% v/v durante 8 minutos. Se emplearon dos medios de cultivo: de Knudson (modificado por Steeves *et al.* 1955) y de Murashige & Skoog (1962), sin aportes de sacarosa, gelificados con agar (7 g/L), se ajustó el pH a 6,5 con KOH 1 N. Para las siembras se utilizaron frascos de 3,5 cm de diámetro x 5,0 cm de alto, llenados hasta 1/2 de su volumen con el medio nutritivo, y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión y 120 °C.

Se sembraron 5 frascos por cada tratamiento. La siembra se realizó en cámara de flujo laminar y los frascos fueron cubiertos con parafilm para evitar la contaminación. Se empleó una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C y con fotoperíodo de 12 horas luz e intensidad luminosa de 10 Wm^{-2} .

Para el estudio de morfogénesis de los protalos, las esporas fueron sembradas 7 días después de su recolección. La presencia de lípidos durante la germinación se determinó con Sudan IV. Los protalos se repicaron en varias oportunidades para evitar la sobrepoblación de gametófitos. Para describir el desarrollo protálico se consideraron las siguientes fases: filamentosa, espatulada, laminar y adulta. La obtención de cortes histológicos de protalos maduros de 10-12 μm de espesor, se realizó según D'Ambrogio de Argüeso (1986). La tinción se efectuó con safranina.

Para evaluar el efecto de reguladores de crecimiento sobre la germinación, se conservaron pínulas en sobres de papel durante un año. Se aplicaron 5 tratamientos: medio de cultivo Knudson, como control y otros suplementados con 2 reguladores de crecimiento, Giberelina y Benziladenina regulados en dos concentraciones: 0,1 y 0,5 ppm/L. Se llevó a cabo un diseño experimental completamente aleatorio y los resultados fueron registrados y analizados mediante el programa Infostat 2007.

Los dibujos y fotografías fueron realizados con cámaras incorporadas al microscopio óptico Zeiss modelo Standard 16, microscopio estereoscópico Zeiss modelo SV 11 y el servicio de Microscopía Electrónica de Barrido JEOL Modelo JSM 6480 LV, perteneciente a la Universidad Nacional de Salta.

RESULTADOS

Las esporas son triletes, tetraédricas, con cingulo ecuatorial, de contorno polar triangular con los lados rectos y ángulos redondeados, de coloración castaño-oscura (Fig. 1). Presentan exosporio rugoso en cara distal y verrucoso en cara proximal, con procesos unidos formando cordones alrededor de las lesuras, su diámetro ecuatorial es de 33(36)39 μm y su diámetro polar es de 20(26)30 μm .

La germinación, considerada como la emisión de la célula radical, comienza a los 6 días después de la siembra. Dos días más tarde se encuentra el 60 % de esporas germinadas sobre un total de 400 unidades.

Este resultado es semejante tanto para cultivos realizados en medio de Knudson como en Murashige & Skoog. La raíz surge como una estructura transparente con glóbulos de aceite. Durante los primeros días se evidencian cloroplastos, que luego desaparecen.

Entre las esporas no germinadas el 15% corresponde a esporas triletes, pequeñas, menores de 25 μm y esporas carentes de contenido celular. El 25% restante germina durante los días sucesivos hasta 30 días después de realizada la siembra.

Las esporas con un año de estacionamiento sembradas en medio de Knudson, sin reguladores de crecimiento, empiezan a germinar 27 días después de la siembra, mientras que las cultivadas en medio con 0,5 ppm/L de Giberelina lo logran a los 8 días.

Los medios suplementados con Giberelina y BA a 0,1 ppm/L no mostraron diferencias estadísticas significativas, en tanto que a la concentración de 0,5 ppm/L de ambos reguladores, se observa que el efecto de la Giberelina es superior al BA (Fig. 2).

La fase filamentosa se desarrolla entre los 7 y 10 días, desde la germinación. La primera célula protálica contiene numerosos glóbulos de aceites y abundantes cloroplastos. Se forman filamentos con 8 a 10 células (Fig. 3A), estos filamentos desarrollan raíces en toda su longitud. Durante esta fase se observa en algunos casos entre 1 y 3 ramificaciones en las primeras células del filamento, cada una de éstas mantuvo su desarrollo independiente, formándose ramas isotómicas o anisotómicas (Fig. 3B).



FIGURA 1. Fotomicrografía de esporas de *Pteris inermis*. Cuatro esporas, dos mostrando polo proximal (superiores) y dos en vista distal (inferiores).

FIGURE 1. Photomicrography of *Pteris inermis* spores. Four spores, two showing proximal pole (upper) and two in distal view (lower).

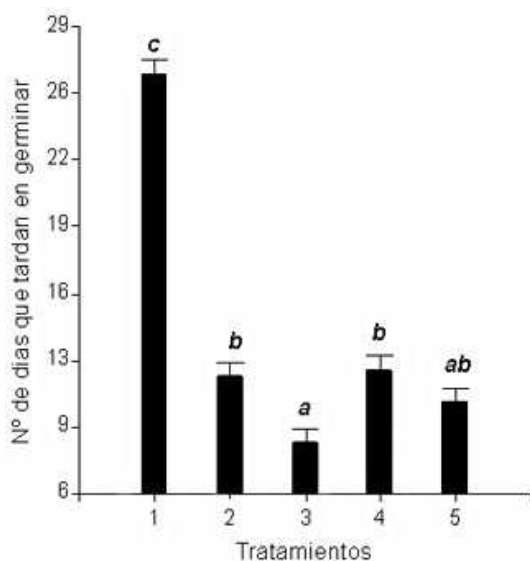


FIGURA 2. Resultados de tratamientos con reguladores de crecimiento sobre germinación de esporas de *Pteris inermis*. Número de días que las esporas demoran en germinar en función de los distintos tratamientos evaluados. Tratamientos: 1= control (Knudson), 2= Knudson + 0,1 ppm/L Giberelina, 3= Knudson+ 0,5 ppm/L Giberelina, 4= Knudson + 0,1 ppm/L Benziladenina, 5= Knudson + 0,5 ppm/ Benziladenina. Media: a= 8,5; b(2)= 11,75; b(4)= 12,00; ab= 10,50; c=26,75 (Con $p < 0,05$, $F = 116,77$ y 15 GL).

FIGURE 2. Results of treatments with growth regulators on spores germination of *Pteris inermis*. Number of days that the spores last in germinating according to the different evaluated treatments. Treatments: 1 = control (Knudson), 2 = Knudson 0.1 ppm/L Gibberellin, 3 = Knudson 0.5 ppm/L Gibberellin, 4 = Knudson 0.1 ppm/L Benzyladenine, 5 = Knudson 0.5 ppm / Benzyladenine. Median: a= 8.5; b(2)= 11.75; b(4)= 12.00; ab= 10.50; c=26.75 (With $p < 0.05$, $F = 116.77$ and 15 GL).

La fase espatulada se manifestó como una lámina protálica, pluricelular, uniestratificada, clorofílica, simétrica o asimétrica, con rizoides sobre el lado abaxial en las proximidades de las paredes de la espora (Fig. 3C).

La fase laminar comienza con la diferenciación del tejido meristemático en el margen de la lámina, siempre desplazado hacia uno de los lados, otorgando asimetría al protalo (Fig. 3D), característico del desarrollo protálico tipo *Ceratopteris*.

Esta etapa ocurre a partir de los 20 días después de la germinación de las esporas, las láminas se ubican de manera semierecta, debido al anclaje que le permiten los rizoides ubicados en el extremo más antiguo del protalo.

A partir de este momento se observan proliferaciones, los nuevos individuos se desarrollan de cada ramificación generada durante la etapa filamentosas. Cada lámina se dispone alternadamente con la siguiente, evitando de esta manera la superposición. Los nuevos individuos se ubican hacia el centro de manera helicoidal.

El gametófito adulto es cordiforme, simétrico, diferenciado en cuello, alas y costilla central. Las alas son uniestratificadas en la zona marginal, mientras que en la región próxima a la costilla contienen de 4 a 6 estratos celulares, el margen tiende a ondularse y la costilla se extiende a medida que aumenta su longevidad en el medio de cultivo. La costilla central es plana a ligeramente cóncava, cuando los protalos adultos son jóvenes, luego dicha concavidad se profundiza en los gametófitos maduros. Los protalos adultos alcanzaron entre 0,7-10 mm en la zona de mayor desarrollo de las hemiláminas.

A partir de los 20 días, después de la germinación, se observan protalos anteridiados, con 30-60 unidades entre las raíces. Los anteridios son globosos, al microscopio óptico, formados por tres células: basal, anular y opercular. Al microscopio electrónico de barrido la célula opercular se observa circular (Fig. 4C).

Entre los 30-50 días se desarrollan protalos arquegoniados, con 20-50 arquegonios sobre la costilla central, en proximidades a la escotadura (Fig. 4A). En gametófitos con costillas planas los arquegonios se ubican sobre el lado abaxial (Fig. 3E), en los de costillas cóncavas éstos se encuentran en ambos lados (Fig. 3F). Los cuellos de los arquegonios frecuentemente se observan abiertos, constituidos por cuatro columnas de células con 4 células en su longitud (Fig. 4B).

Cuatro meses después de la siembra se encuentran protalos bisexuales que alcanzan los 15 mm en la zona de mayor desarrollo y algunos protalos se mantienen estériles. Hasta 6 meses después de la siembra no se registran esporófitos que surjan de los protalos, aunque los mismos lograron mayor tamaño y coloración.

Durante la morfogénesis no se evidencian diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los medios de cultivo, Knudson y Murashige & Skoog.

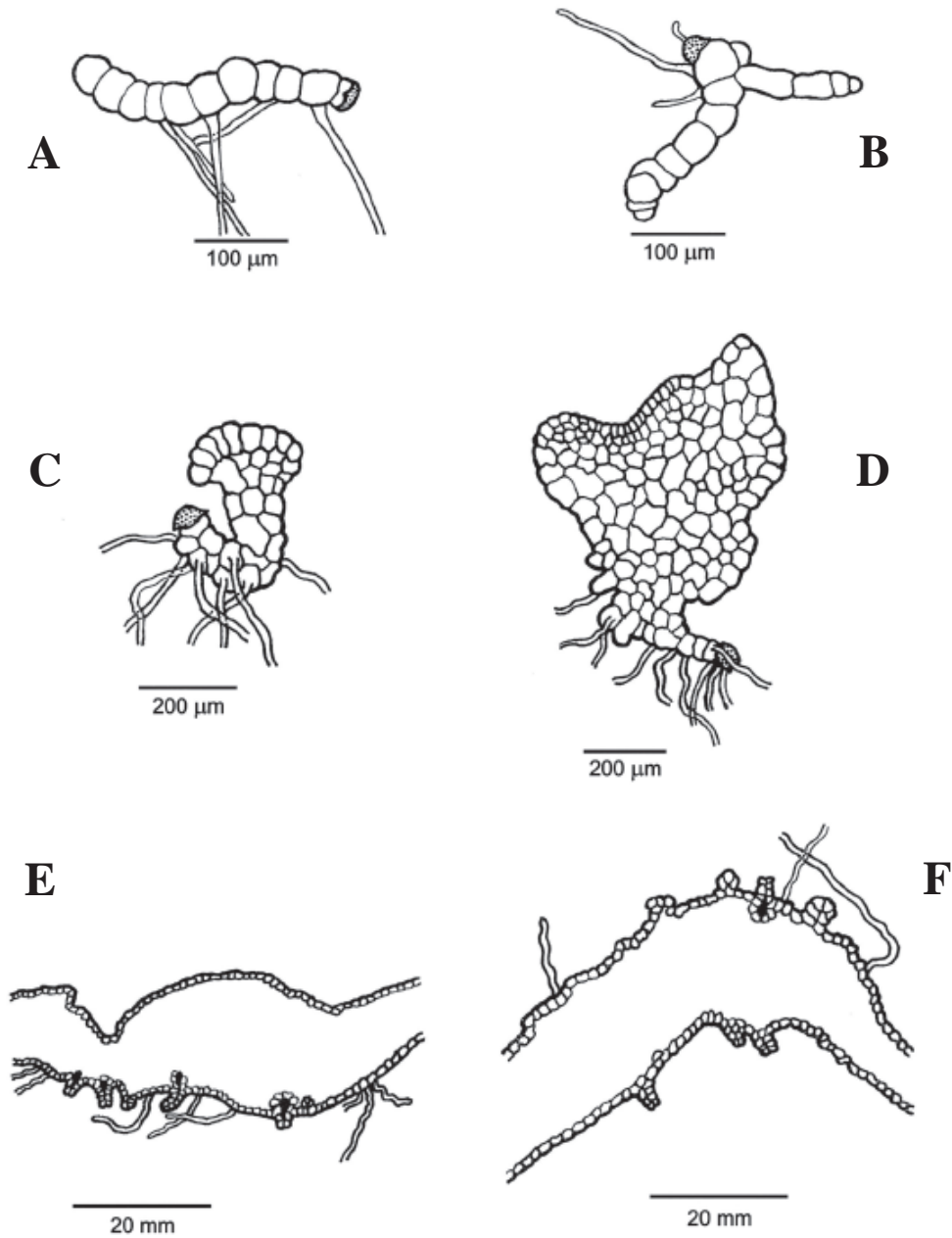


FIGURA 3: Etapas de la morfogénesis de *Pteris inermis*, indicando entre paréntesis el tiempo desde la germinación de las esporas. A) filamento con 10 células (3-5 días). B) filamento con dos ramificaciones (2-5 días). C) protalo en etapa espatulada avanzada (10 días). D) protalo laminar asimétrico (25 días). E) corte transversal de costilla central de protalo maduro, mostrando arquegonios hacia lado abaxial (35 días). F) corte transversal de costilla cóncava, mostrando arquegonios sobre ambos lados (45 días).

FIGURE 3: Stages of the morphogenesis of *Pteris inermis*, indicating between parentheses the time since the spores germination. A) filament with 10 cells (3-5 days). B) filament with two ramifications (2-5 days). C) prothallus in advanced spatulated stage (10 days). D) asymmetric laminate prothallus (25 days). E) cross section of central cushion of mature prothallus, showing archegonia towards abaxial side (35 days). F) transversal section of concave cushion, showing archegonia above on sides (45 days).

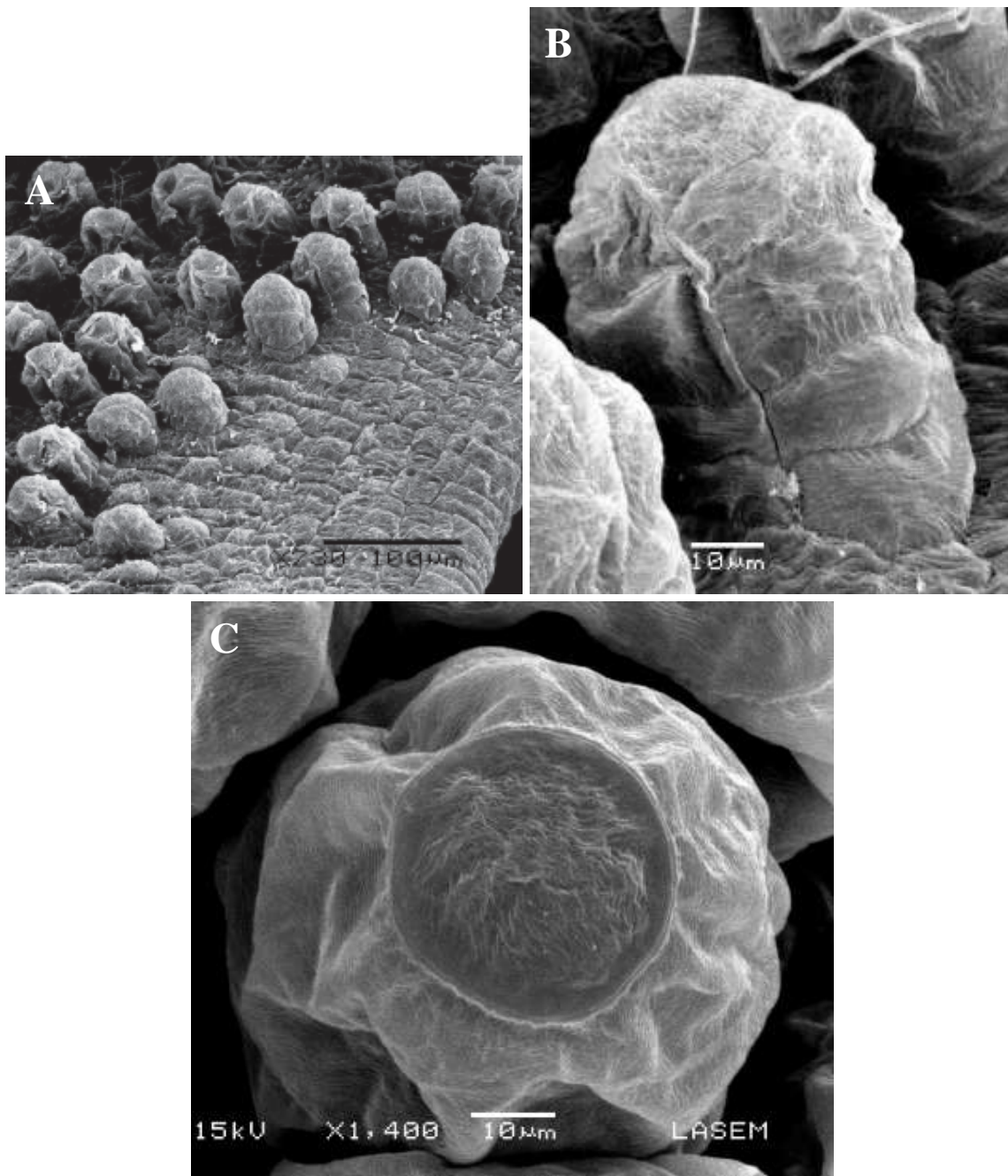


FIGURA 4. Fotomicrografía de gametangios. A) gametófito maduro mostrando arquegonios. B) arquegonio con cuatro células a lo largo del cuello. C) anteridio mostrando célula opercular y célula del anillo.

FIGURE 4. Photomicrography of gametangia. A) mature gametophyte showing archegonia. B) archegonia with four cells along the neck. C) antheridium showing opercular cell and ring cell.

DISCUSION

Las esporas triletas con cíngulo ecuatorial, rugadas en cara distal y verrucosas en cara proximal, son semejantes a las descritas para otras especies de *Pteris* del continente americano, tales como *P. berteriana* (Letelier & Peñailillo 2007), *P. multifida* y *P. mutilata* Poir. (Martínez 2003).

La morfología y dimensiones se encuentran dentro de los valores citados por Tryon & Lugardon (1991) para el género *Pteris* y algunas especies estudiadas para China por Zhang *et al.* (2008).

El patrón de germinación, de *Pteris inermis* corresponde al tipo *Vittaria* (Nayar & Kaur 1971), encontrado también en otros estudios realizados sobre morfogénesis para el género, tales como Mendoza *et al.* (1997), Letelier & Peñailillo (2007), Prada *et al.* (2008) y Zhang *et al.* (2008).

El tiempo de germinación después de 7 días de recolectadas las esporas, es comparable al de otras especies de *Pteris*, como *Pteris finotii* Christ., *P. fauriei* Hieron., *P. excelsa* Gaudich. y *P. ensiformis* Burm.f. citadas por Zhang *et al.* (2008), estos autores explicitan que la siembra fue realizada una semana después de su recolecta.

La disminución de la capacidad de germinación de las esporas almacenadas y los cambios bioquímicos que se producen en este proceso fueron comprobados por Beri & Bir (1993) en *Pteris vittata*. En *Pteris inermis* el tiempo de germinación de esporas almacenadas durante un año se reduce notablemente, al ser tratadas con Giberelina o BA, resultando 0,5 ppm/L de Giberelina más eficiente.

El número de células que componen los filamentos protálicos en *Pteris* es variable, pueden contener hasta 25 células (Zhang *et al.* 2008). En las especies americanas se han reportado entre 3-5 células (Mendoza *et al.* 1997, Letelier & Peñailillo 2007), en *Pteris inermis* se han encontrado filamentos formados hasta por 8-10 células, con ramificaciones en las primeras células que contribuyen a la formación de colonias.

Sota (1966) opina que la ramificación de los protalos de *Polypodium* puede ocurrir por ausencia de nutrientes.

Se descarta dicha hipótesis, en este trabajo, por cuanto se utilizaron dos medios de cultivos de composición química diferente, siendo el medio de Murashige & Skoog más completo que el medio de Knudson y en ambos se registraron protalos ramificados. Pray (1971) relaciona las ramificaciones

con la hibridación, pero Durán & Anton (1995) las encuentran tanto en híbridos como en los padres al estudiar gametófitos de *Blechnum*.

El modelo de desarrollo protálico corresponde al tipo *Ceratopteris*, señalado por Nayar & Kaur (1969) como característico para el género. La asimetría del protalo laminar en los primeros estadios es superada durante la fase adulta, resultando protalos adultos cordados, simétricos.

La formación de anteridios seguida por la producción de arquegonios, generando un gametófito hermafrodita, es considerada por Klekowski (1969) como la forma más frecuente entre los helechos homosporicos. En este caso, si bien los anteridios surgen antes que los arquegonios, éstos se encuentran en individuos diferentes. La formación de arquegonios anterior a los anteridios, en protalos bisexuales, ha sido mencionada para *Pteris berteriana* (Mendoza *et al.* 1997) y *P. chilensis* (Letelier & Peñailillo 2007).

Prada *et al.* (2008) comprueban que el medio de cultivo condiciona la sexualidad de los protalos en *Pteris incompleta* y *P. vittata*, donde observan protalos femeninos, masculinos, bisexuales y neutros entre las 10 y 18 semanas después de la siembra e indican la formación de arquegonios en primera instancia, estos protalos femeninos más tarde se transforman en bisexuales. En *Pteris inermis* los protalos arquegoniados permanecen como unisexuales en cultivos mantenidos durante 5 meses, luego de este tiempo se generan anteridios que originan protalos bisexuales.

Los arquegonios presentan el cuello formado por 4 columnas de 4 células cada una. Para *Pteris berteriana* se citan 3 células de longitud en el cuello y en las especies de China estudiadas por Zhang *et al.* (2008) se han encontrado entre 3-5 células.

Es probable que la falta de fecundación en *Pteris inermis* ocurra por incompatibilidad entre los gametangios originados por gametófitos de una misma planta. Este factor no ha sido comprobado en este trabajo debido a que las esporas, obtenidas de plantas distintas, se sembraron en diferentes momentos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta (Argentina), Proyecto N° 1585. Agradecemos la

colaboración de la M.Sc. Maritza Vacca Molina por sus aportes en las técnicas de cultivo *in vitro* y a los revisores anónimos por las sugerencias oportunas.

BIBLIOGRAFIA

- ARREGUÍN-SÁNCHEZ, M. DE LA L., R. PALACIOS-CHAVES & D.L. QUIRÓZ-GARCÍA. 1997. Morfología de las esporas del género *Pteris* para México. *Phytologia* 83(1): 67-78.
- BERI, A. & S.S. BIR. 1993. Germination of stored spores of *Pteris vittata* L. *American Fern Journal*: 83(3): 73-78.
- COPELAND, E.B. 1947. *Genera Filicum*. The genera of ferns. Waltham. xiv, 247 pp., 10 lám.
- D'AMBROGIO DE ARGÜESO, A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 83 pp.
- DEVI, S. 1977. Spores of Indian ferns. Today & Tomorrow's Printers and Publishers. New Delhi. 228 pp.
- DURÁN, M. & A.M. ANTON. 1995. Sobre la presencia de ramificaciones en gametófitos de *Blechnum* (Blechnaceae-Pteridophyta). *Darwiniana* 33(1-4): 27-34.
- ERDTMAN, G. & P. SORSA. 1971. Pollen and spore morphology. Plant taxonomy. Pteridophyta. Almqvist & Wiksell. Stockholm. 302 pp.
- HUANG, T. C. 1981. Spore Flora of Taiwan. Department of Botany. National Taiwan University. Tah-Jinn Press. 111 pp.
- KLEKOWSKI, E.J. JR. 1969. Reproductive biology of the Pteridophyta. II Theoretical considerations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 62: 347-359.
- LARGE, M.F. & J.E. BRAGGINS. 1991. Spore atlas of New Zealand ferns and fern allies. Supp. *New Zealand Journal of Botany*. Wellington, New Zealand. 167 pp.
- LETÉLIER, L. & P. PEÑAILILLO. 2007. Desarrollo del gametofito y esporofito joven de *Pteris chilensis* Desv. (Pteridaceae-Pteridophyta). *Gayana Botánica* 64(1): 93-97.
- MARTÍNEZ, O. G. 2003. Morfología esporofítica y revisión sistemática del complejo *Pteris cretica* (Pteridaceae-Pteridophyta) en América. Tesis Doctoral. i-xii, 1-172. Universidad Nacional de Salta. Argentina.
- MENDOZA, A., B. PÉREZ-GARCÍA, I. REYES JARAMILLO & M. RICCI. 1997. Desarrollo del gametofito de *Pteris berteriana* C.Agardh (Pteridaceae: Pterideae). *Revista de Biología Tropical* 45:51-57.
- MICHELENA, I.G. 1989. Esporas de Adiantaceae (Pteridophyta) de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Boletín de la Asociación Latinoamericana de Paleobotánica y Palinología* 12: 25-31.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- NAYAR, B.K. & S. KAUR. 1969. Types of prothallial development in homosporous ferns. *Phytomorphology* 19(2): 179-188.
- NAYAR, B.K. & S. KAUR. 1971. Gametophytes of homosporous ferns. *The Botanical Review* 37: 295-497.
- NAYAR, B.K., P. LATA & L.P. TAIWARI. 1964. Spore morphology of the ferns of west Tropical Africa. *Pollen et Spores* 6(2): 545-582.
- PRADA, C., V. MORENO & J.M. GABRIEL Y GALÁN. 2008. Gametophyte development, sex expression and antheridiogen system in *Pteris incompleta* Cav. *American Fern Journal* 98(1): 14-25.
- PRADO, J. & P.G. WINDISCH. 2000. The genus *Pteris* L. (Pteridaceae) in Brazil. *Boletim do Instituto de Botânica* 13: 103-199.
- PRAY, T.R. 1971. Gametophytes of natural hybrids in the fern genus *Pellaea*. *American Fern Journal* 61: 128-136.
- SLADKOV, A.N. 1962. Spores of true ferns of subfamily Pterideae Diels in the flora of USSR. *Vestnik Moskovskogo Universiteta, Seriya* 6(4): 48-59.
- SOTA, E.R. DE LA. 1966. Revisión de especies americanas del grupo *Polypodium squamatum* L. Polypodiaceae (s. str.) *Revista Mus. La Plata (N. S.) Sección Botánica* 10: 69-186.
- SOTA, E.R. DE LA, M. PONCE, O.G. MARTÍNEZ, G. GIUDICE & G. MICHELENA. 2001. *Pteridaceae* Rchb., En: L.J. Novara (ed.), *Flora del Valle de Lerma*, Aportes Botánicos de Salta. Serie Flora 6(9): 1-48.
- STEEVES, T.A., I.M. SUSSEX & C.R. PARTANEN. 1955. In vitro studies on abnormal growth of prothalli of the bracken fern. *American Journal of Botany* 42: 232-245.
- TRYON R.M. & B. LUGARDON. 1991. Spores of the Pteridophyta: Surface, wall structure and diversity based on electron microscope studies. Springer-Verlag. New York. 646 pp.
- ZHANG, K.M., L.SHI, X.C. ZHANG, C.D. JIANG & W.L. TIM-CHUN. 2008. Gametophyte morphology and development of six Chinese species of *Pteris*. *American Fern Journal* 98(1): 33-41.

Recibido: 13.11.08
Aceptado: 05.01.09