

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA



MULTIPLICACION DEL HELECHO CACHO DE VENADO (*Platyserium bifurcatum*) *in vitro* MEDIANTE HOMOGENEIZACION DE PROTALOS E *in vivo* A PARTIR DE ESPORAS

José Ángel Gomez LI.
Josefina Páez de Cásares (tutora)

Maracay, Enero de 2005

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

MULTIPLICACION DEL HELECHO CACHO DE VENADO (*Platyserium
bifurcatum*) *in vitro* MEDIANTE HOMOGENEIZACION DE PROTALOS E *in
vivo* A PARTIR DE ESPORAS

José Ángel Gomez LI.
Josefina Páez de Cásares (tutora)

Trabajo presentado como parte de los requisitos para optar
al título de Ingeniero Agrónomo mención Fitotecnia que otorga la
Universidad Central de Venezuela.

Maracay, Enero de 2005

Nosotros los abajo firmantes, miembros del Jurado Examinador del Trabajo de Grado titulado MULTIPLICACION DEL HELECHO CACHO DE VENADO (*Platyserium bifurcatum*) *in vitro* MEDIANTE HOMOGENEIZACION DE PROTALOS E *in vivo* A PARTIR DE ESPORAS, cuyo autor es el bachiller José Ángel Gomez, cédula de identidad 13 308 399, certificamos que lo hemos leído y que en nuestra opinión reúne las condiciones necesarias de adecuada presentación y es enteramente satisfactorio en alcance y calidad como Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo Mención Fitotecnia.

Josefina Páez de Cásares
Tutor-coordinador

Efraín Salazar
Jurado Principal

Claret Michelangeli
Jurado Principal

Dinaba Perdomo
Jurado Suplente

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, fuente de conocimiento e inspiración

A mis padres, Angel y Marijose por haberme dado la vida

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien siempre me guió e iluminó a lo largo de estos años.

A mi madre Marijose, pilar fundamental y ejemplo a seguir sin quien no hubiese logrado esta meta.

A Juan Pablo, mi hermano.

A la profesora Josefina Páez, guía inestimable en la elaboración de este trabajo.

A Angélica Chávez, cuya ayuda fue imprescindible en todo momento.

A la profesora Judit García, por su colaboración desinteresada en el análisis estadístico para este trabajo.

Al profesor Orlando Guenni y Julio Tang, por su ayuda en las mediciones de luz.

A mis amigos Gianna, Maximiliano, Oscar, Elizabet, Melchor y Nick.

A Maria Martiradonna, quien ha estado a mi lado en los momentos buenos y malos.

A la UCV mi segunda casa durante todo este tiempo.

A todos aquellos que de una u otra forma colaboraron conmigo e hicieron posible que hoy se cumpla esta nueva meta.

Gracias

RESUMEN

Para mejorar la propagación *in vivo* e *in vitro* del helecho cacho de venado (*Platyserium bifurcatum*) se iniciaron varias investigaciones partiendo de esporas. En los ensayos *in vivo*, las esporas con la fronda fueron lavadas y desinfectadas y enjuagadas con agua destilada, desionizada y estéril, para luego separarse de la hoja mecánicamente. Posteriormente se les sembró en diferentes medios y mezclas en frascos herméticos o en envases (bolsas plásticas) bajo cámara húmeda en diferentes ambientes. Evidenciándose una tendencia a la germinación *in vivo* de las esporas en envases bajo cámara húmeda en todos los sustratos menos el de humus de lombriz y arena 1:1 bajo sombreadero con tela de sarán. Se observó así mismo una tendencia inicial a la germinación de esporas en frascos herméticos con todos los sustratos bajo ambos ambientes (sombra de tela de sarán y arbórea), observándose luego una rápida muerte y desaparición de los gametófitos. No se observaron esporófitos. También se realizaron tres ensayos complementarios preliminares, en el primero, se sembraron esporas en envases sin drenaje y frascos de vidrio con tres tipos de tapa. La tendencia fue a observar germinación de esporas en dos sustratos pero con una densidad muy pobre, llegándose a obtener esporófitos luego de 6 meses de la siembra. En el segundo, se realizaron tratamientos previos a la siembra de las esporas por remojo en agua o escarificación en ácido sulfúrico y luego se sembraron en frascos herméticos o en envases sin drenaje. En este caso, no se observó germinación de esporas en ninguno de los frascos. En el tercero, se sembraron las esporas en envases con drenaje y tapa de vidrio utilizando sustratos previamente desinfectados con agua caliente colocándose estos sobre una bandeja con agua. En esta oportunidad, la tendencia fue a que una gran cantidad de esporas formara un buen número de esporófitos luego de 4 meses. En los ensayos *in vitro*, las esporas con la fronda se lavaron y desinfectaron previamente y luego estas fueron separadas de la hoja mecánicamente, desinfectadas nuevamente y enjuagadas con agua

destilada, desionizada y estéril, luego fueron implantadas para la germinación en un medio sólido de Murashige y Skoog (1962) (M1) o Miller y Miller (1961) (M2) con 0,6% de agar y 4% de sacarosa, al formarse los protalos se homogeneizaron en una licuadora estéril, en cuatro lotes, la mitad de los protalos germinados en cada medio se les licuó en su mismo medio pero en estado sólido o líquido. En la homogeneización en medio sólido se empleó el mismo medio usado para la germinación y en todos los casos se adicionó inositol, tiamina y 2,5 mg de oxitetraciclina a una temperatura de 40°C, los medios líquidos fueron colocados en agitación, ambos medios los líquidos y sólidos se incubaron en un cuarto climático ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ y 16 horas de iluminación a $2 \mu\text{M}/\text{sm}^2$). Se constató, que M1 fue significativamente mejor para la germinación y sobrevivencia de *Platycerium bifurcatum* cultivado *in vitro* que M2. Fue evidenciada una tendencia a regenerarse los gametófitos luego de la homogeneización en el medio M1 líquido en agitación. No se observó aparición de la fase esporofítica. Se realizó un ensayo complementario preliminar con gametófitos germinados *in vitro*, tratando de inducir la fase esporofítica bajo una lámpara incandescente y plantándolos luego en sustrato esterilizado bajo cámara húmeda. Fue posible constatar una tendencia a formarse esporófitos luego de un mes en grandes cantidades. En conclusión en esta planta se observó una tendencia a poder ser propagada *in vivo* en grandes cantidades en pocos meses. La multiplicación *in vitro* mediante homogeneización y otros tratamientos tendió a ser más demorada pero efectiva y con menos problemas sanitarios. En ambas formas de propagación también la tendencia fue a formar finalmente esporófitos.

Palabras clave: *Platycerium bifurcatum*, esporas, germinación *in vivo* e *in vitro*, sustratos, ambientes, homogeneización, gametófitos, esporófitos.

SUMMARY

To improve the propagation *in vivo* and *in vitro* of the staghorn fern (*Platycerium bifurcatum*) several investigations were done from spores. In the *in vivo* trials, the spores with fronds were washed, disinfected and rinsed with distilled, deionized and sterile water, then they were mechanically separate from the leaf. Later on, they were implanted in different media and mixtures in hermetic flasks or in containers (plastic bags) under humid chamber in different environments. It was evidenced a tendency to germination of spores *in vivo* in containers under humid chamber in all the substratums, but less in worm humus and sand 1:1 under saran fabric shadow. It was observed also an initial tendency to germination of spores in hermetic flasks with all the substratums under both environments (shade of saran fabric and arboreal), it was observed a quick death and disappearance of the gametophyte. Sporophytes was not observed. They were also carried out three preliminary and complementary trials, in the first one spores were planted in containers without drainage and glass flasks with three types of covers, spores tended to germinate in two substratums but with a very poor density, it ended up sporophytes after 6 months from planting date. In the second treatment, spores previously were soaked in water or sulfuric acid and then planted in hermetic flasks or in containers without drainage. In this case, no germination of spores occurred. In a third trial, spores were planted in containers with drainage and covers of glass using substratums previously disinfected with boiling water, and then placed on a tray with water. In this opportunity was a great quantity of spores formed a good sporophytes number after four months. In the *in vitro* trials, the spores with frond were washed and disinfected previously and then mechanically separated from the leaf, disinfected again and rinsed with distilled deionized and sterile water, then they were implanted for germination in a Murashige and Skoog (1962) (M1) or Miller and Miller (1961) (M2) solid media with 0,6% agar and 4% sucrose, when prothallus were formed they were homogenized in a sterile

blender, in four lots, half of the germinated protallus in each medium were liquefied in their same medium but in solid or liquid state. In the homogenization in solid medium, it was used the same one used for germination and in all the cases were added inositol, tiamina and 2,5 mg oxytetracycline at 40°C temperature, the liquid media were placed in agitation, both liquid and solid media were incubated in a climatic room ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ and 16 hours of illumination to $2 \mu\text{M}/\text{sm}^2$). It was verified, that M1 was significantly better for germination and survival of *Platycerium bifurcatum* cultivated *in vitro* than M2. A tendency was evidenced to be regenerated the gametophytes after the homogenization in the agitated liquid M1 medium. It was not observed a sporophytic phase. It was carried out a preliminary complementary trial with gametophytes germinated *in vitro*, trying to induce the sporophytic phase under an incandescent lamp and planting they later in sterilized soil under humid chamber. It was possible to verify a tendency to form sporophytes in great quantities after one month. In conclusion in this plant it was observed a tendency to be propagated *in vivo* in great quantities in few months. The *in vitro* multiplication by means of homogenization and other treatments tended to be more delayed but effective with less sanitary problems. In both propagation ways also was finally observed a tendency to form sporophytes.

Key word: *Platycerium bifurcatum*, spores, germination *in vivo* and *in vitro*, soil, environments, homogenization, gametophytes, sporophytes.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	V
SUMMARY	VII
TABLA DE CONTENIDO	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XVII
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS.....	4
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	4
<i>OBJETIVOS ESPECIFICOS</i>	4
CAPITULO II.....	5
REVISION DE LITERATURA	5
1. GENERALIDADES DEL HELECHO CACHO DE VENADO (<i>Platyserium bifurcatum</i>).....	5
1.1. Origen.....	5
1.2. Taxonomía y características botánicas.	6
2. REQUERIMIENTOS AGROECOLÓGICOS DEL HELECHO CACHO DE VENADO (<i>Platyserium bifurcatum</i>).....	7
2.1. Temperatura	7
2.2. Humedad.....	7
2.3. Radiación	8
2.4. Suelos	8
2.5. Plantación.....	9

2.6. Riego	10
2.7. Fertilización	10
2.8. Plagas y enfermedades	11
3. PROPAGACIÓN DE <i>P. bifurcatum</i> Y OTROS HELECHOS	12
3.1. Aspectos relacionados con la propagación de los helechos. Ciclo de vida	12
3.2. Propagación <i>in vivo</i>	13
3.2.1. Propagación sexual.....	13
3.2.2. Propagación asexual.....	17
3.2.2.1. Multiplicación mediante varias estructuras de propagación. ..	17
3.2.2.2. Multiplicación por separación de rizomas.	18
3.3. Propagación <i>in vitro</i>	19
3.3.1. Consideraciones generales.....	19
3.3.2. Multiplicación de helechos <i>in vitro</i> en medios sólidos o líquidos a través de estructuras asexuales y sexuales o esporas.	22
3.3.2.1. Estructuras de propagación asexual.	22
3.3.2.2. Estructuras de propagación sexual o esporas.	26
3.3.3. Otras formas de multiplicación <i>in vitro</i> de helechos mediante Aereadores y Homogeneización.	29
3.3.3.1. Aereadores.....	29
3.3.3.2. Homogeneización	30
4. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA	34
4.1. Medicinal	34
4.2. Alimenticio	34
4.3. Bebidas	35
4.4. Fertilizantes orgánicos.....	35
4.5. Control de erosión	35
4.6. Ornamental.....	36
4.7. Importancia económica	36

CAPITULO III.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. UBICACION.....	38
2. MATERIAL VEGETAL	38
3. PROPAGACIÓN <i>in vivo</i>	38
3.1. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES (BOLSAS PLÁSTICAS) EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES BAJO CÁMARA HÚMEDA.....	38
3.1.1. Extracción y desinfección de las esporas.....	38
3.1.2. Siembra de las Esporas.	39
3.1.3. Diseño Experimental.	41
3.2. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN FRASCOS HERMÉTICOS.....	42
3.2.1. Siembra de las esporas.	42
3.2.2. Diseño experimental.	42
3.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES SIN DRENAJE Y FRASCOS DE VIDRIO CON TRES TIPOS DE TAPA.....	44
3.4. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS TRATADAS PREVIAMENTE MEDIANTE REMOJO EN AGUA O ESCARIFICACION CON ÁCIDO SULFURICO EN FRASCOS HERMÉTICOS Y ENVASES SIN DRENAJE.....	45
3.5. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES CON DRENAJE Y TAPA DE VIDRIO COLOCADOS SOBRE BANDEJA CON AGUA.....	46
4. PROPAGACIÓN <i>in vitro</i>	46
4.1. PRIMERA FASE.....	46
4.1.1. Extracción y desinfección de las esporas.....	46
4.1.2. Siembra de las esporas.....	47
4.2. SEGUNDA FASE	47

4.2.1. Homogeneización (Anexo 10).....	47
4.2.2. Diseño experimental	50
4.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE INDUCCIÓN DE FASE ESPOROFÍTICA MEDIANTE UTILIZACION DE LÁMPARA INCANDESCENTE EN GAMETÓFITOS CULTIVADOS <i>in vitro</i>	51
CAPITULO IV	52
RESULTADOS Y DISCUSION.....	52
1. PROPAGACION <i>in vivo</i>	52
1.1. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES (BOLSAS PLASTICAS) EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES BAJO CÁMARA HÚMEDA.....	52
1.2. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN FRASCOS HERMÉTICOS.....	58
1.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES DE PLÁSTICO SIN DRENAJE Y FRASCOS DE VIDRIO CON TRES TIPOS DE TAPA.....	62
1.4. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS, TRATADAS PREVIAMENTE MEDIANTE REMOJO EN AGUA O ESCARIFICACION CON ÁCIDO SULFURICO, EN FRASCOS HERMÉTICOS Y ENVASES PLASTICOS SIN DRENAJE.....	63
1.5. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES PLÁSTICOS CON DRENAJE Y TAPA DE VIDRIO COLOCADOS SOBRE BANDEJA CON AGUA.	64
2. PROPAGACIÓN <i>in vitro</i>	66
2.1. PRIMERA FASE.....	66
2.2. SEGUNDA FASE.	69
2.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE INDUCCIÓN DE LA FASE ESPOROFÍTICA MEDIANTE UTILIZACION DE UNA LÁMPARA INCANDESCENTE EN GAMETÓFITOS CULTIVADOS <i>in vitro</i>	72

CAPITULO V	73
CONCLUSION	73
RECOMENDACIONES.....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78
ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: CULTIVO <i>in vivo</i> DE ESPORAS Y FORMACIÓN DE GAMETÓFITOS DE <i>Platycerium bifurcatum</i> EN ENVASES (BOLSAS PLASTICAS) EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN BANDEJAS BAJO CÁMARA HÚMEDA DURANTE 37 SEMANAS	55
CUADRO 2: CULTIVO <i>in vivo</i> DE ESPORAS DE <i>Platycerium bifurcatum</i> EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN FRASCOS HERMÉTICOS Y LA FORMACIÓN DE GAMETÓFITOS DURANTE 37 SEMANAS	60
CUADRO 3: GERMINACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE GAMETÓFITOS DE <i>Platycerium bifurcatum</i> CULTIVADOS <i>in vitro</i> EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO DURANTE 16 SEMANAS	67
CUADRO 4: REGENERACION Y SOBREVIVENCIA DE GAMETÓFITOS DE <i>Platycerium bifurcatum</i> CULTIVADOS <i>in vitro</i> DURANTE 13 SEMANAS DESPUES DE SER HOMOGENEIZADOS.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Extracción, desinfección y siembra de esporas de <i>Platyserium bifurcatum in vivo</i> en diferentes sustratos y ambientes bajo cámara húmeda.....	40
FIGURA 2: Extracción, desinfección y siembra de esporas de <i>Platyserium bifurcatum in vivo</i> en frascos herméticos en diferentes sustratos y ambientes.	43
FIGURA 3: Extracción, desinfección y cultivo <i>in vitro</i> de esporas de <i>Platyserium bifurcatum</i> y homogenización de gametófitos o protalos	49
FIGURA 4: Gametófitos de <i>Platyserium bifurcatum</i> observados en experimento con envases (bolsas plásticas) y diferentes sustratos bajo cámara húmeda, en ambiente de sombra artificial, 5 semanas después de sembradas las esporas <i>in vivo</i>	56
FIGURA 5: Detalle de gametófitos de <i>Platyserium bifurcatum</i> observados en envases (bolsa plástica) y una mezcla de arena y mantillo de hojas 1:1, bajo cámara húmeda en ambiente de sombra artificial, 5 semanas después de sembradas las esporas <i>in vivo</i>	56
FIGURA 6: Esporófito de helecho contaminante en envase (bolsa plástica), bajo cámara húmeda en ambiente de sombra artificial, 12 semanas luego de sembradas las esporas <i>in vivo</i>	57
FIGURA 7: Gametófitos de <i>Platyserium bifurcatum</i> presentando contaminación por hongos y algas al ser cultivado <i>in vivo</i> en el sustrato arena y mantillo de hojas (1:1), en frascos herméticos, bajo un árbol, 4 semanas después de sembradas las esporas.....	61
FIGURA 8: Esporófitos de otros helechos diferentes a <i>Platyserium bifurcatum</i> cultivado <i>in vivo</i> en el sustrato mantillo de hojas y arena (1:1), en frascos herméticos, 7 semanas después de la siembra de las esporas.....	61
FIGURA 9: Aparición de esporófitos de <i>Platyserium bifurcatum</i> en envase plástico sin drenaje cubierto con vidrio.	63

- FIGURA 10: Esporófitos y gametófitos de *Platyserium bifurcatum* observados al cultivar *in vivo* esporas en envases plásticos con drenaje y tapa de vidrio, 16 semanas luego de la siembra 65
- FIGURA 11: Germinación de esporas de *Platyserium bifurcatum* cultivadas *in vitro* en dos medios de cultivo (M1 y M2) a las 16 semanas después de sembradas..... 68
- FIGURA 12: Esporas germinadas *in vitro* mostrando gametófitos de *Platyserium bifurcatum* en dos medios de cultivo (M1 y M2), a las 16 semanas después de sembradas..... 68
- FIGURA 13: Supervivencia de gametófitos de *Platyserium bifurcatum* cultivados *in vitro* bajo diferentes tratamientos, después de 13 semanas de someterse a homogeneización..... 71
- FIGURA 14: Formación de esporófitos de *Platyserium bifurcatum* al cultivar *in vitro* esporas y la posterior inducción de la fase esporofítica, mediante uso de lámpara incandescente, utilizando envases plásticos bajo cámara húmeda..... 72

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Ciclo de vida típico de los helechos.....	86
ANEXO 2: Cultivo de esporas <i>in vivo</i> sobre recipiente de barro invertido, colocado dentro de frasco hermetico de vidrio.	87
ANEXO 3: Cultivo de esporas de <i>Platycterium bifurcatum in vivo</i> en recipiente de barro con drenaje, colocado sobre bandeja con agua y cubierto con vidrio.	88
ANEXO 4: Plántulas de <i>Asplenium tenerum</i> desarrolladas en el extremo de las frondas.....	89
ANEXO 5: Plantulas de <i>Nephrolepis cordifolia</i> mostrando Tuberculos subterrneos.....	89
ANEXO 6: Detalle de la aposporia en <i>Polystichum setiferum</i>	90
ANEXO 7: Rango de incidencia luminica (curva par) a lo largo del día (14/12/2004) en los dos ambientes (malla de sarán y sombra natural de árboles) utilizados en la propagación <i>in vivo</i> de <i>Platycterium bifurcatum</i> , así como a pleno sol en el Área de Propagación Controlada de la Facultad de Agronomía, U.C.V.....	91
ANEXO 8: Extracción de las esporas de la fronda de <i>Platycterium bifurcatum</i> para ser implantados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	92
ANEXO 9: Composición de las sales básicas usadas en el experimento de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Platycterium bifurcatum</i>	93
ANEXO 10: Equipos y técnica usados en la homogeneización de protalos de <i>Platycterium bifurcatum</i>	94
ANEXO 11: Aparición de esporófitos de <i>Platycterium bifurcatum</i> en envase plástico sin drenaje, donde las esporas habían sido tratadas previamente a la siembra por remojo en agua.	95
ANEXO 12: Prueba de Fisher utilizada al analizar la germinación de esporas de <i>Platycterium bifurcatum</i> 7 semanas después de sembradas.....	96

ANEXO 13: Prueba de Fisher utilizada al analizar la sobrevivencia de esporas
de *Platyserium bifurcatum* 16 semanas despues de sembradas..... 96

CAPITULO I

INTRODUCCION

Los helechos son plantas muy antiguas, ligadas al principio de la vida sobre la tierra. No producen flores, frutos ni semillas; por lo que su reproducción, fisiología y características intrínsecas los hacen muy diferentes al resto de las plantas y sin embargo poseen un gran atractivo visual que los colocan en un sitio de honor entre las plantas ornamentales. Aun cuando los helechos son plantas frecuentemente asociadas al trópico, se las puede encontrar en casi todas partes del mundo, a diferentes alturas y condiciones climáticas.

Se conocen entre 6,000 y 12,000 especies de helechos en el mundo entero. La clase Filicopsida solamente incluye unos 400 géneros y alrededor de 10,000 especies; en ella están incluidos los helechos comúnmente usados como ornamentales. Y entre ellos esta el género *Platycerium*, el cual cuenta con unas 18 especies, todas usadas como plantas ornamentales con un gran valor económico.

El helecho Cacho de Venado (*Platycerium bifurcatum*) es la especie más conocida y difundida del genero, usada como planta ornamental. Es originario de Australia, aunque se le puede encontrar en otras islas del Océano Pacifico. El resto de las especies de ese genero poseen diversos orígenes: Filipinas, Sudeste Asiático, Indonesia, Australia, Madagascar, África e incluso Sur América; donde se encuentra el *Platycerium andinum*, actualmente en peligro de extinción dada la deforestación de los bosques donde habita.

Los usos de los helechos son extraordinariamente variados. En muchos países se usan en diversas formas como alimento, en otros como material de

construcción o como materia prima para la elaboración de artesanías. La industria y la medicina también han usado los helechos como material de investigación o materia prima para la elaboración de bienes o medicinas. Poseen gran importancia para el control de la erosión, e incluso se les ha usado como plantas mágicas en rituales religiosos diversos. Sin embargo es el ornamental el uso más difundido y generalizado que se ha dado a los helechos.

La reproducción sexual de los helechos no depende como ya se dijo de flores, frutos o semillas, en vez de ello recurren a un mecanismo propio que consta de dos fases perfectamente definidas y que comienza con la germinación de una estructura similar a una semilla denominada espora; la cual da lugar a una lámina de células planas o gametófito, el cual a su vez contiene células sexuales femeninas y masculinas que al unirse dan lugar a la fase conocida como esporófito, que es la que normalmente se observa.

La reproducción asexual de los helechos esta relacionada con la capacidad que tiene la mayoría de estos, de producir brotes o hijuelos del rizoma. Su propagación asexual consiste en la separación de esos brotes y su posterior plantación sobre algún tipo de sustrato.

Los helechos pueden propagarse de dos modos, a saber: *in vivo* e *in vitro*. Al propagarse *in vivo* se pueden usar esporas o estructuras de reproducción asexual o brotes. En el segundo caso se separan o cortan los brotes y se plantan en cestas de alambre o en envases con algún sustrato adecuado. Cuando se les reproduce mediante esporas, se colocan estas sobre suelo previamente esterilizado, situándose luego en un ambiente con alta humedad.

Por otro lado, al propagarse los helechos mediante cultivo *in vitro* se usa algún medio de cultivo que garantice los nutrientes mínimos requeridos, al tiempo que se trabaja bajo condiciones de esterilidad. De esta forma se pueden

germinar esporas o realizar divisiones e incluso multiplicar las plantas usando tejidos tales como hojas, raíces, rizomas, etc. Varias técnicas de cultivo *in vitro* han sido usadas, entre las que destacan: la homogenización, aereación, agitación en medios líquidos, etc. Cada una de ellas posee ventajas y particularidades, que pueden ofrecer solas o en combinación una masificación de la propagación, obteniéndose así una gran cantidad de plantas en forma rápida y económica, en las mejores condiciones sanitarias. Todas las anteriores pueden ser aplicadas al helecho Cacho de Venado con éxito.

Las técnicas avanzadas de propagación de helechos; así como algunas más tradicionales han sido muy poco usadas en nuestro país. Por otro lado, la gran cantidad de usos que poseen los helechos, su importancia y fragilidad reproductiva motivaron la realización de este trabajo, con el fin de investigar algunos aspectos sobre las técnicas que permitan beneficiarse del helecho Cacho de Venado, y posteriormente de otros helechos en sus diversas formas y usos, tal y como se ha venido realizando en muchas otras partes del mundo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Germinar esporas intactas del helecho Cacho de Venado (*Platyserium bifurcatum*) *in vivo* en diferentes sustratos, ambientes y tipo de envase e *in vitro* en medios sólidos y líquidos. Además homogeneizar los protalos desarrollados en el laboratorio al germinar las esporas hasta observar el desarrollo de la fase esporofítica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Germinación y desarrollo *in vivo* de esporas intactas del helecho Cacho de Venado en diferentes sustratos y ambientes en envases herméticos de vidrio.

Germinación y desarrollo *in vivo* de esporas intactas del helecho Cacho de Venado en bandejas plásticas con diferentes sustratos y ambientes bajo cámara húmeda.

Multiplicación *in vitro* a partir de esporas intactas del helecho Cacho de Venado en diferentes medios de cultivo, además de homogenizar los protalos desarrollados *in vitro* hasta observar el desarrollo de la fase esporofítica.

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

1. GENERALIDADES DEL HELECHO CACHO DE VENADO (*Platycerium bifurcatum*).

Platycerium bifurcatum, conocido comúnmente como Helecho Cacho de Venado o Cuerno de Ciervo es una planta de excepcional belleza, encontrada con frecuencia en la decoración exterior de las casas. Posee hábitos de crecimiento epifitos, con raíces y rizomas poco visibles y dos tipos de hojas muy diferentes que le confieren su especial conformación. Es uno de los helechos más comercializados y buscados. Sin embargo la información sobre el mismo es escasa y de poco alcance (Floridata, 2003).

1.1. Origen.

El genero *Platycerium* es originario de las islas del océano pacifico en su mayoría, sin embargo se le puede encontrar en otras partes del mundo. En el caso concreto de *Platycerium bifurcatum* su origen se ubica en Australia y Nueva Guinea. A su vez, se conocen alrededor de 10 especies ubicadas en Filipinas, sudeste Asiático, Indonesia, Australia, Madagascar, África y Sur América (Universidad de Florida, 2003).

La distribución de la única especie del genero *Platycerium* presente en América, el *Platycerium andinum*, esta restringida al bosque seco tropical de Perú y Bolivia y en la actualidad se esta llevando a cabo un gran esfuerzo en la protección de estas zonas, ya que la tala de árboles para la obtención de madera esta tornando en peligro la sobrevivencia de esta especie (Protejamos

el bosque seco tropical del huallaga, Hábitat del helecho *Platyceium andinum*, 2004).

1.2. Taxonomía y características botánicas.

El helecho Cacho de Venado pertenece a la división *Pteridofita* subdivisión *Filicophytina*, clase *Filicopsida*, orden *Filicales*, Familia *Polypodiaceae*, Genero *Platyceium*, Especie *Platyceium bifurcatum* (Lindorf et al, 1991).

El nombre del genero *Platyceium* proviene del griego y significa “cuerno plano” (Staghorn Fern, 2003).

El helecho Cacho de Venado (*P. bifurcatum*) posee un rizoma grueso, escamoso y corto el cual esta cubierto por la masa de hojas, permaneciendo invisible. Las raíces son abundantes y forman una red de gran eficiencia en la recolección de agua y nutrimentos, estas poseen, distribuidas en forma irregular, yemas capaces de desarrollar nuevas plantas. Las hojas que confieren el aspecto extraño y belleza particular a esta planta, son de dos tipos: las fértiles o foliares y las básales o infértiles. Las hojas infértiles son planas, redondas y están ubicadas en la base de la planta, crecen en capas bastante densas con la mitad basal agarrándose al sustrato. La parte superior de las frondas básales pueden ser lobadas o divididas y permanecer erectas, formándose así un eficiente método de recolección de agua, restos de hojas y cualquier otro material útil para la producción de humus, el cual al descomponerse libera nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta. Inicialmente las frondas básales son de color verde, pero una vez alcanzado su máximo crecimiento mueren tomando un color marrón y una apariencia parecida al papel (Universidad de Florida, 2003).

Las hojas fértiles o foliares pueden estar erguidas o colgar, poseen una longitud de 45 a 91 cm., son planas, y angostas en la base, ensanchándose y dividiéndose en sus extremos, confiriéndole el aspecto de un cuerno, de donde deriva su nombre común (Botany, 2004).

Las frondas fértiles tienen una función reproductiva, ya que en la parte inferior de sus extremos se forman parches de esporangios de color rojizo, los cuales contienen las esporas. Ambos tipos de hojas (foliares y básales) están cubiertas en diversos grados por pequeños pelos de forma de estrella que le confieren a la hoja un color plateado, estos proveen de protección contra ataque de insectos, así como de conservación de la humedad (Universidad de Florida, 2003).

2. REQUERIMIENTOS AGROECOLÓGICOS DEL HELECHO CACHO DE VENADO (*Platyserium bifurcatum*).

2.1. Temperatura.

La mayoría de los helechos del genero *Platyserium* son considerados delicados o semi-delicados a las temperaturas muy bajas y no toleran temperaturas por debajo de 12,8°C. Sin embargo existen excepciones notables como *P. bifurcatum* el cual puede llegar a tolerar temperaturas tan bajas como 1,1°C. No obstante el rango optimo de temperatura ideal para *P. bifurcatum* se ubica por encima de 21°C (Floridata, 2003).

2.2. Humedad.

Se requiere de alta humedad pero con un buen drenaje ya que *P. bifurcatum* es altamente sensible al exceso de agua, para esto es necesaria una

escogencia adecuada del sustrato a usarse prefiriéndose aquellos ricos en materia orgánica con abundante espacio poroso, asimismo el ambiente debe ser de alta humedad relativa. En épocas secas se recomienda asperjar el follaje de la planta al momento del riego (Floridata, 2003).

2.3. Radiación.

La iluminación es de gran importancia para el cultivo de *P. bifurcatum* ya que en gran medida el aspecto visual de la planta depende de ello. Requieren abundante cantidad de luz filtrada, sin embargo no toleran la incidencia de sol directo el cual genera rápidamente quemaduras en las hojas. La iluminación ideal se obtiene al colocar la planta bajo la sombra de árboles o sombreadero de tela plástica, donde se logre una iluminación entre 10 700 a 21 400 lux, aunque se les puede hacer crecer con un mínimo de iluminación de 6 400 lux. Cuando la iluminación es muy baja el crecimiento se hace muy lento y la planta se torna muy susceptible al ataque de enfermedades e insectos (Marie Selby Botanical Gardens, 2003).

2.4. Suelos.

En general los helechos pueden ser cultivados exitosamente en suelos con buen drenaje y alta retención de humedad. Para lograr esto es necesario saber que los suelos con alto contenido de arcilla poseen una altísima retención de humedad y nutrientes, sin embargo su capacidad de drenaje se ve disminuida. Al usar suelos arcillosos como sustrato se deben mezclar con materiales que incrementen su capacidad de drenaje como la arena mezclada con materia orgánica. De ser necesario se deben emplear acondicionadores de suelo. En el caso de suelos muy ácidos se debe aplicar cal para disminuir la misma (Chin, 1998).

Por otra, parte la arena posee excelentes cualidades de drenaje pero aporta muy pocos nutrientes, por lo que debe ser mezclada con suelos arcillosos y materia orgánica. Existen en el mercado una gama de polímeros acondicionadores de suelo que ayudan de manera significativa a incrementar la retención de humedad del suelo con lo que los riegos se hacen más espaciados (Chin, 1998).

En el caso concreto de *P. bifurcatum* el sustrato a usar debe poseer un excelente drenaje ya que esta planta es altamente susceptible al exceso de humedad en el suelo, pudiéndose generar pudriciones y aparición de enfermedades como *Rhizoctonia* sp. trayendo como resultado la pérdida total de la planta. Al mismo tiempo el sustrato a emplear debe poseer una buena retención de humedad que evite su desecación y el consiguiente estrés hídrico a la planta. Se recomienda que la superficie del suelo sea esponjosa y porosa. También puede cultivarse esta planta imitando su ambiente natural utilizando corteza de árboles, fibra de raíz de helecho, trozos de ladrillos o incluso colocando la planta directamente sobre la rama de un árbol (Universidad de Florida, 2003).

2.5. Plantación.

Existen diversas formas de cultivar *P. bifurcatum*, entre ellas la más común consiste en su colocación en una cesta de alambre, la cual se ha llenado previamente con algún sustrato adecuado, esto permite a la planta colonizar dicha cesta por los lados atravesando el material que forra internamente la cesta que usualmente consiste en fibra de coco, obteniéndose con el tiempo una planta de gran tamaño y de forma redonda muy estética. Algunos cultivadores prefieren atar la planta con alambre a una lamina de raíz de helecho o una tabla de madera cubierta con un poco de sustrato, la planta crece entonces en un solo plano, pudiéndose colocar contra una pared. También muy

común resulta el colocar la planta directamente sobre el tronco de un árbol (Universidad de Florida, 2003).

2.6. Riego.

Los mayores problemas del cultivo de *P. bifurcatum* y otras plantas del mismo género se derivan del riego incorrecto, ya que como se mencionó anteriormente estas plantas son muy sensibles al exceso de agua, requiriendo sin embargo niveles altos de humedad constantemente. Las frondas basales actúan como un reservorio de agua, dado que adquieren una textura esponjosa que ayuda a mantener la humedad. A medida que pasa el tiempo y la planta se hace cada vez mas grande, reserva y mantiene mayor cantidad de agua por periodos mas largos al tiempo que puede tolerar mejor las condiciones de estrés hídrico. Puede observarse entonces que el riego depende en gran medida de la edad y grado de desarrollo de la planta siendo más abundante y frecuente cuando la planta es más joven y/o pequeña. En líneas generales puede decirse que en épocas calurosas y secas se debe regar una o dos veces a la semana mientras que en épocas lluviosas con un riego a la semana o menos es suficiente para satisfacer la demanda hídrica de estas plantas, siempre y cuando el sustrato posea buenas características de drenaje (The platycerium site, 2004).

2.7. Fertilización.

La velocidad de crecimiento de *P. bifurcatum* como en la mayoría de los helechos es bastante lenta, por lo que se prefieren los fertilizantes que liberen lentamente los nutrientes en la medida en que la planta los va requiriendo. En muchos casos se recomiendan abonos orgánicos de origen vegetal como el compost o humus de lombriz, etc. y también de origen animal como harina de hueso, harina de sangre o emulsión de pescado, no es conveniente utilizar cáscara de cambur, ya que por su alto grado de humedad puede generar

podriciones en *P. bifurcatum*. Los fertilizantes inorgánicos también pueden ser usados siempre y cuando se usen formulas de proporción 1:1:1 tales como 15-15-15 o 16-16-16, entre otros; aplicados mensualmente. Estas plantas responden muy bien a la aplicación de fertilizantes foliares en forma frecuente (Chin, 1998).

2.8. Plagas y enfermedades.

Son muy pocas las plagas que atacan a *P. bifurcatum*, sin embargo, si estas aparecen se multiplican rápidamente ocasionando daños considerables a la planta. Una buena nutrición de las plantas asegura una mayor resistencia al ataque de todo tipo de plagas y enfermedades ya que las mismas se encuentran en un mejor estado nutricional y están por ende, en mejor capacidad de hacer frente por si mismas al ataque. Lo mismo ocurre cuando las condiciones de cultivo son inapropiadas, un ejemplo es el ataque de *Rhizoctonia* sp el cual ocurre cuando el sustrato esta saturado de agua por condiciones de mal drenaje. Incluso las plantas saludables y bien mantenidas pueden sufrir algún ataque de plagas o enfermedades (Chin, 1998).

Entre los insectos que pueden atacar a *P. bifurcatum* se pueden citar: escamas, chinches harinosas, áfidos, ácaros, fácilmente de encontrar en brotes jóvenes y que son frecuentemente acompañados por hormigas las que se alimentan de sus excreciones azucaradas, además, las hormigas transportan estos insectos de una planta a otra por lo que es necesario controlarlas para evitar la diseminación del ataque a plantas vecinas. Una forma de control de estos insectos consiste en la aspersion de soluciones jabonosas (Chin, 1998).

Existen casos en que un control manual o mediante el uso de sustancias no toxicas es imposible o inefectivo por lo que conviene recurrir al uso de insecticidas comerciales, sin embargo se debe ser cuidadoso en extremo en el uso de este tipo de sustancias dada su toxicidad tanto para las personas, medio

ambiente como para las mismas plantas que deseamos tratar ya que algunas de estas sustancias pueden resultar fitotóxicas. Es por esto que son preferibles los insecticidas no basados en aceite ya que otros tipos pueden producir quemados y deformaciones de las hojas (Universidad de Florida, 2003).

3. PROPAGACIÓN DE *P. bifurcatum* Y OTROS HELECHOS.

3.1. Aspectos relacionados con la propagación de los helechos. Ciclo de vida.

Los helechos son plantas muy antiguas que no poseen las mismas características que las plantas superiores, entre esas características podemos encontrar el hecho de que no producen flores ni frutos, en lugar de ello recurren a otro mecanismo para poder llevar a efecto su reproducción sexual (Anexo 1). Para esto producen esporas que son altamente resistentes y similares a una semilla, las cuales, en condiciones de alta humedad germinan, dando lugar a una estructura haploide, independiente y libre denominada gametófito o protalo. Esta estructura tiene como única función la de producir las células sexuales denominadas células anterozoidales (flageladas y móviles) y arquegoniales (sésiles), para que las primeras fecunden a las segundas cuando una película de agua sobre el gametófito les permite nadar hasta allí y de esa forma se genere un embrión que al desarrollarse forme el esporófito, que no es más que la planta diploide de helecho que normalmente observamos, este en un principio depende del gametófito para su supervivencia, pero luego se hace independiente y fotosintéticamente activo, se establece como una planta autótrofa al tiempo que el gametófito muere (Hartmann y Kester, 1994).

3.2. Propagación *in vivo*.

3.2.1. Propagación sexual.

Muchos helechos se propagan sexualmente a partir de esporas. En este sentido, la clave para la propagación de los helechos viene dada en evitar la contaminación del proceso de germinación de las esporas con algas, hongos, musgo, bacterias, etc. Para esto es necesario desinfectar meticulosamente todo el material a usar como envases, bandejas, vidrios, etc., para lo cual se les puede sumergir en soluciones concentradas de cloro al 10% por 45 minutos a una hora o hirviéndolos en agua de ser posible. De la misma forma, las esporas deben ser esterilizadas en una solución de cloro al 5,25% por 5 a 10 minutos (Emmons, 1997).

Existen varias metodologías para lograr la humedad adecuada para la germinación de las esporas *in vivo*, una de ellas consiste en el uso de bandejas de germinación de 6 cubículos colocadas dentro de recipientes plásticos de comida, los cuales son llenadas con sustratos constituidos por turba y arena en proporción de 50:50, luego se esteriliza este medio aplicándole agua hirviendo, se tapa y se deja enfriar a la sombra para luego sembrar las esporas (Propagating ferns from spores, 2004).

Por otro lado, Chin (1998) describe otros métodos muy parecidos a los anteriores, pero donde el sustrato es sustituido por pedazos de ladrillo en un recipiente de barro cocido y colocado esto sobre un delgado disco de agua. También funciona muy bien el sembrar las esporas directamente sobre la superficie exterior de un recipiente de barro e invertir éste, introduciéndose luego en un recipiente de cierre hermético (Anexo 2). Otro método descrito (Anexo 3) consiste en utilizar un sustrato escogido en un recipiente de barro con drenaje, no llenando sino unas $\frac{3}{4}$ partes del mismo, luego se siembran las esporas sobre la superficie del sustrato y se tapa con un vidrio el recipiente para

evitar la desecación, y todo el conjunto se coloca sobre un plato que siempre debe estar lleno de agua, para que esta ascienda hasta las esporas por capilaridad y mantenga una alta humedad relativa entre la superficie del sustrato y el vidrio (Plumbridge, 1976).

Inicialmente los gametófitos son en extremo sensibles a la falta de agua, por lo que siempre hay que estar atento a reponer el agua que se halla podido perder por evaporación, sin embargo es de vital importancia para el éxito el no perturbar la superficie del sustrato mediante la aplicación directa de agua, tampoco se debe destapar o exponer las esporas mientras germinan y tienen cierto tamaño (Propagating ferns from spores, 2004).

Si todo sale correctamente, en unas pocas semanas se comenzará apreciar un color verde sobre la superficie del sustrato, no obstante como se ha sembrado una enorme cantidad de esporas juntas, los gametófitos comenzarán a competir entre si por luz, agua y nutrientes, deformándose y adquiriendo una forma alargada en vez de la forma típica acorazonada del gametófito. Deberá entonces realizarse un primer repique, el cual consiste en dividir la masa de gametófitos y replantarla bajo las mismas condiciones en que estaban (Propagating ferns from spores, 2004).

Normalmente no es necesario asperjar agua sobre los gametófitos si las condiciones de humedad son las apropiadas, sin embargo cuando estos han alcanzado buen tamaño puede realizarse para ayudar a la fertilización y obtener así los esporófitos. Una vez obtenidos los esporófitos y las plantitas tengan un tamaño suficiente pueden transplantarse a recipientes individuales, pero manteniéndolas bajo cámara húmeda para gradualmente climatizarlas (Emmons, 1997).

En un ensayo realizado con dos especies de helechos arborescentes, *Dicksonia sellowiana* y *Cyathea schanschin*, se desinfectaron las esporas en

una solución de hipoclorito de calcio o de sodio en diferentes concentraciones por 10-20 minutos, comparándose sus eficacias. Luego se sembraron en medios con fibras de raíz de helecho, tierra, turba o ladrillo fragmentado, obteniéndose que la desinfección con hipoclorito de calcio al 2% fué más eficiente, de la misma manera una mayor germinación pudo evidenciarse en el medio de raíz de helecho. La germinación fue constatada luego de 4 a 8 semanas y los protalos comenzaron a formarse luego de 30 a 40 días (Borelli et al, 1990).

Para propagar exitosamente al *P. bifurcatum* a través de esporas *in vivo* es necesario cumplir con un par de requisitos indispensables, lograr una humedad adecuada y un sustrato aceptablemente estéril. Además de lo anterior, es necesario detectar bien el grado de madurez de las esporas ya que estas deben estar en su punto de óptimo de maduración. Esto se conoce por la coloración que es verde claro cuando los soros (lugares donde se producen las esporas bajo las hojas) están jóvenes y pardo oscuro al madurar, ahora bien, los soros están recubiertos por una película cerosa blanquecina antes de que las esporas comiencen a liberarse por si mismas. El momento oportuno para recolectar las esporas resulta al observar que la coloración de las mismas se ha tornado oscura pero aún estando protegidas por la película, entonces se procede a cortar la sección de hoja con los soros, para luego raspar las esporas de la superficie (Emmons, 1997).

Otra forma de recolectar esporas en especial cuando se trata de otras especies de helechos consiste en cortar las frondas y colocarlas en un sobre de papel, el cual se mantendrá bajo una lámpara incandescente, luego de unos 30 minutos las esporas comienzan a liberarse (Emmons, 1997).

Es importante considerar que *P. bifurcatum* posee dos tipos de frondas, unas planas y redondeadas pero infértiles, y otras alargadas y divididas en

forma de cuerno fértiles, por lo que son estas últimas las que deben observarse al investigar por presencia de esporas (Universidad de Florida, 2003).

Para esta misma planta (*P. bifurcatum*) y en *Rumohra adiantiformis* se realizaron ensayos para lograr su germinación *in vivo* en la facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela probándose sustratos constituidos por mezclas en diversas proporciones de hidrogel, arena, y turba en la germinación. Para esto recolectaron las esporas y las sometieron a desinfección con etanol al 70% por 30", seguido por hipoclorito de sodio al 5,25% por 5' y lavándose una vez con agua destilada desionizada y estéril; luego colocaron las esporas así desinfectadas en recipientes plásticos con tapa hermética que contenía alguno de los siguientes sustratos previamente desinfectados: hidrogel, hidrogel y arena 1:1, hidrogel y arena 2:1, turba, turba y arena 1:1, turba y arena 2:1 y arena colocándose bajo un cobertizo (sarán y plástico) bajo condiciones climáticas controladas (17-28°C y 50-60%HR). Evidenciándose una tendencia a la germinación sólo para *Rumohra adiantiformis* en los sustratos de turba y arena 1:1 y 2:1; no así para *P. bifurcatum*, el cual no evidenció germinación alguna (Alzuru, 2002).

En esa misma institución, Márquez (2003) trabajo con esporas de *P. bifurcatum*, las que desinfectó con etanol al 70% por 30", seguido por hipoclorito de sodio al 5,25% por 5' y lavándose tres veces con agua destilada desionizada y estéril. luego fueron sembradas en sustratos de turba y arena, en proporciones 1:1 y 2:1 y colocadas bajo dos ambientes: plástico sobre sarán y plástico sobre doble sarán. Encontrándose evidencias pequeñas de germinación en ambos sustratos pero sólo cuando fue cultivado bajo el ambiente de plástico sobre sarán (Márquez, 2003).

3.2.2. Propagación asexual.

3.2.2.1. Multiplicación mediante varias estructuras de propagación.

Los helechos poseen infinidad de formas y de estructuras de propagación. Los géneros *Angiopteris* y *Marattia* crecen en un compacto y fuerte grupo, cada uno de los pedúnculos de las frondas largas tienen un par de estructuras carnosas de aspecto semejante a orejas o aurículas en su base, estas aurículas en los grupos más viejos forman plántulas, las cuales al tener un tamaño adecuado pueden ser separadas y plantadas individualmente (Chin, 1998).

Otros helechos, como algunas especies de los géneros *Nephrolepis* y *Asplenium* forman plántulas miniatura o bulbillos en la superficie de la fronda o en el extremo de las mismas (Anexo 4), una vez estas plántulas tienen raíces pueden ser separadas y plantadas individualmente (Chin, 1998).

Nephrolepis produce estolones delgados en todas direcciones formando nuevas plantas cada cierto intervalo, lo cual le permite a esta planta extenderse rápidamente, además posee la particularidad de producir tubérculos subterráneos (Anexo 5), que al plantarse generan a su vez nuevas plantas (Chin, 1998).

Es posible para ciertas especies de helechos, como en el caso de los géneros *Pteris*, *Cyrtomium* y *Dryopteris*, que se forme el esporófito por gemación del tejido gametofítico sin intervención de la fecundación, dando lugar a plantas haploides con un porte menor que las plantas diploides, conociéndose este fenómeno como apogamia (Lindorf et al, 1991).

Otro fenómeno relacionado con la multiplicación de los helechos lo constituye la denominada aposporia, encontrada en géneros como *Osmunda*, y

Polystichum, que consiste en el desarrollo de gametófitos a partir de tejidos esporófitos, sin la intervención de las esporas, y no involucrando meiosis (Anexo 6). Estos gametófitos suelen presentar características propias de los esporófitos tales como las traqueidas y pueden formarse en el ápice y márgenes de las hojas así como en los esporangios en los soros. La fecundación de un gametófito aposporico produce una planta tetraploide (Lindorf et al, 1991).

En este orden de ideas Nakamura y Maeda (1995) realizaron un experimento con *Lygodium japonicum* para desarrollar gametófitos aposporicos de fragmentos de hoja que habían sido subcultivados previamente *in vitro*. Obtuvieron formación de gametófitos, los que continuaron bajo cultivo hasta que formaron anteridios y arquegonios, y finalmente produjeron esporófitos.

3.2.2.2. Multiplicación por separación de rizomas.

Esta es la forma más común y conocida de propagar helechos, y es la usada en la mayoría de los viveros comerciales. Algunos helechos, la mayoría de especies del genero *Adiantum*, poseen rizomas rastreros cortos que forman grupos ramificados que pueden ser separados y plantados. Otros, entre ellos especies del genero *Nephrolepis*, poseen rizomas largos siendo mucho más sencilla su propagación que consiste simplemente en cortar dicho rizoma en secciones, dejando en cada sección algunas yemas, evidenciándose estas por la presencia de hojas (Chin, 1998).

Ciertos helechos, como algunas especies del genero *Asplenium*, simplemente pueden ser cortados en dos a través del punto de crecimiento, la mitad donde quedó la yema apical continuará desarrollándose a través de esta, mientras que la otra mitad, posee algunas yemas latentes que se desarrollan y crecen (Chin, 1998).

Es necesario extremar las medidas de sanidad en el momento de realizar estos cortes, ya que los mismos constituyen una puerta de entrada a patógenos pudiéndose generar daños o pérdidas a las plantas (Atehortua et al, 1999).

En el caso de *P. bifurcatum*, este desarrolla hijuelos o brotes provenientes de la ramificación del rizoma y de yemas en las raíces, basta con cortar o separar estas plantitas cuando tengan un tamaño apropiado para luego plantarlas en algún sustrato adecuado y así multiplicar la planta. Hay que acotar que este método es bastante limitado y lento, ya que hay que esperar entre un corte y otro a que la planta madre se recupere, además, la cantidad de plantas obtenibles así son muy pocas. Esto conlleva a mantener una gran cantidad de plantas madres a disposición, generándose costos por el espacio y mantenimiento de las mismas (Chin, 1998).

3.3. Propagación *in vitro*.

3.3.1. Consideraciones generales.

Las técnicas de cultivo *in vitro* han venido siendo usadas como una herramienta de investigación del desarrollo de las plantas desde principios de los años 50, sin embargo, su potencial como técnica para la propagación masiva de helechos no se hizo evidente sino hasta finales de los años 70. Actualmente esta técnica esta siendo usada en muchos países, tanto para satisfacer la demanda de helechos localmente, como para la exportación (Chin, 1998).

Las ventajas evidentes del uso de técnicas de cultivo de tejidos vienen dadas principalmente por la enorme cantidad de plantas idénticas que pueden obtenerse partiendo de una sola planta, en un espacio bastante reducido, tomando un tiempo aceptablemente corto y con unas condiciones sanitarias optimas. Los virus pueden llegar a propagarse por vía del cultivo de tejidos, si

las técnicas no son bien aplicadas. Los hongos, bacterias y otros patógenos no están presentes, ya que son eliminados en el proceso de desinfección previa a la implantación del tejido (Roca y Mroginski, 1991).

Otras ventajas del empleo de técnicas de cultivo de tejido vienen dadas en el mejoramiento vegetal ya que permiten obtener híbridos de plantas incompatibles, así como obtener plantas haploides a través de cultivos de anteras. Las técnicas que buscan generar variabilidad genética artificial como las mutaciones (con radiaciones o químicos), cultivo de callos o en la modificación genética es indispensable el uso de cultivo de tejidos (Roca y Mroginski, 1991).

Murashige (1974) ha descrito una serie de pasos usados comúnmente en los laboratorios de cultivo de tejidos. El primero es la implantación, es decir, la preparación y desinfección del explante, y su colocación aséptica en un medio nutritivo que soporte el crecimiento y la vitalidad del tejido. El segundo es la multiplicación, donde se busca la inducción de múltiples brotes o plántulas mediante transferencias o repiques del material en medios donde se han ajustado los reguladores de crecimiento, iluminación y otros factores. El tercero es el establecimiento final de las plantas que conlleva el enraizamiento, crecimiento y endurecimiento o climatización de las mismas como preparación para su establecimiento en el lugar definitivo.

Los medios de cultivo han sido ampliamente estudiados y modificados, tratando de adaptarlos a diversos requisitos y/o cultivos. Probablemente el medio más usado y popular sea el de Murashige y Skoog (1962), el cual es altamente concentrado en sales y que ha sido modificado y adaptado a gran cantidad de plantas. Además de las sales minerales, las plantas cultivadas *in vitro* requieren de una fuente de carbono, suministrada esta por algún tipo de azúcar, siendo la sacarosa la preferida. Las vitaminas, en especial las del complejo B (entre ellas la más importante es el inositol), son de vital importancia

debido a la incapacidad de las plantas en sintetizarla, por lo que deben tomarla siempre de su entorno, y en consecuencia deben estar presentes en el medio de cultivo (Roca y Mroginski, 1991).

Cuando se realiza una propagación mediante cultivo de tejidos puede obtenerse en muchas especies directamente una planta (organogénesis directa) o en primer lugar una masa de células poco diferenciadas denominada callo, que luego da lugar a una planta (organogénesis indirecta). La inclusión en el medio de cultivo de reguladores de crecimiento, (principalmente citocininas y auxinas), los niveles de estos reguladores o la presencia de uno u otro (ambos inclusive), promueven la formación del callo o su diferenciación. Lo anterior va a depender de la especie con que se este trabajando así como de los resultados que se deseen obtener (Roca y Mroginski, 1991).

Así mismo pueden multiplicarse plantas por embriogénesis directa o indirecta, en este último caso, los explantes deben pasar también a través de la formación de un callo, para lo cual es necesario suministrar en el medio de cultivo auxinas como el 2,4-D (Roca y Mroginski, 1991).

Existen una gama de sustancias complejas adicionales que se han usado exitosamente en el cultivo de tejidos para suplementar el medio, entre ellos la caseína hidrolizada, el carbón activado, el agua de coco, entre otros que pueden tener efectos benéficos en el crecimiento del explante (Roca y Mroginski, 1991).

Gran cantidad de estudios relacionan el estado nutricional o fitosanitario de las plantas madres o donantes con el éxito o fracaso en la implantación aséptica de tejidos, dado que plantas mal nutridas o enfermas están asociadas con contaminación y fallas en la implantación de algunas plantas. En un ensayo llevado a cabo con *Nephrolepis exaltata* y *Cordyline fruticosa* pudo determinarse que el aumento de la fertilización nitrogenada en las plantas

madres incrementó significativamente el número de brotes producidos *in vitro* de *N. exaltata* no ocurriendo así con *C. fruticosa* (Hvoslef-Eide, 1992).

3.3.2. Multiplicación de helechos *in vitro* en medios sólidos o líquidos a través de estructuras asexuales y sexuales o esporas.

3.3.2.1. Estructuras de propagación asexual.

La recolección de las yemas se lleva a cabo seleccionando aquellas que presenten aspecto saludable, prefiriendo aquellas que no hallan estado en contacto con el suelo, el tamaño no debe ser mayor a 1 cm. y los restos de fronda, raíz, rizoma o cualquier otro diferente a la propia yema debe ser removido en su totalidad. De la misma manera, cuando el material a propagar sea de otro tipo, como rizomas, secciones de hoja o raíz se procederá a seleccionar aquel que se vea más saludable, removiendo todos aquellos restos vegetales innecesarios. Luego de escoger el explante se procede a su desinfección e implantación en un medio de cultivo (C-fern, 2004).

Hirsch (1975) evaluó el efecto de la sacarosa en secciones juveniles de hojas del helecho *Microgramma vacciniifolia* cultivadas para evidenciar la formación de gametófitos o esporófitos. Encontrando, que al cultivar los callos formados en un medio de cultivo sin sacarosa se formaron regenerantes gametófiticos y esporófiticos, mientras que al aumentar los niveles de sacarosa, fue disminuyendo la cantidad de gametófiticos y aumentando la cantidad de los esporófiticos.

En otro ensayo, en la Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela se realizó un análisis del efecto de sustancias de crecimiento sobre la morfogénesis del callo del helecho *Pteris cretica* logrado a partir de hojas jóvenes. Encontrándose una iniciación del callo a los 20 días, la inducción del callo se apreció en medios sólidos y líquidos al subir o bajar los niveles de

auxina (2,4D) en presencia de citocininas; la regeneración del brote se logró en un medio sólido suplementado con cinetina (Fureli y García, 1986).

En el helecho *Nephrolepis biserrata* se realizó un estudio donde se utilizaron estolones, que crecieron produciendo plantas enraizadas a los 63 días en un medio de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad, 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de bacto-agar. De la misma manera, se formaron callos que luego generaron plantas al colocarse los estolones en el mismo medio anterior pero con 125 mg/L NaH_2PO_4 , 5 mg/L tiamina, 500 mg/L Mioinositol, 20 mg/L sacarosa, 1 mg/L BAP y 0,1 mg/L NAA, las plántulas con raíz se observaron luego de transcurridos 94 días (Micropropagation of ferns, 2004).

Para el caso concreto de *P. bifurcatum* también se ha realizado una gran cantidad de ensayos con el objeto de mejorar su propagación. Uno de estos fue el realizado por Camloh et al (1994) donde lograron desarrollar yemas adventicias de las hojas juveniles cultivadas *in vitro*, para esto tomaron hojas enteras de menos de 12 mm de longitud y las cultivaron en el medio de Murashige y Skoog modificado por Hennen y Sheehan (1978), suplementado con 0,5 μM de 6-benzylaminopurina (BA). Las yemas adventicias se desarrollaron directamente del tejido foliar sin pasar por la fase de callo. El desarrollo de las yemas fue más lento en los medios que contenían BA. También fue observada la aposporia espontánea. Finalmente las plantas fueron transferidas a suelo y resultaron idénticas a la planta donadora.

Al colocar carbón activado al medio de cultivo donde se colocó una suspensión celular de *P. bifurcatum* pudo observarse un incremento en el número de esporófitos regenerados, incluso cuando fueron eliminados los reguladores de crecimiento. Las mejoras cualitativas del carbón activado incluyeron: regeneración de esporófitos simples, prevención de formación de grupos de gametófitos anteriores a la regeneración de los esporófitos, prevención de la formación de grupos de yemas así como esporófitos con

múltiples primordios de yemas y por último prevención de ocurrencia de hiperhidricidad de los esporófitos regenerados (Teng, 1997).

El efecto de las concentraciones de etileno también se ha estudiado en la producción de esporófitos de *Platyserium coronarium*, en ese sentido fueron cultivados *in vitro* fragmentos de hojas y rizomas, observándose que con el tiempo acumulaban en el interior de los frascos etileno en forma espontánea, pudiendo constatar que ello disminuía el porcentaje de esporófitos producidos. Al agregar al medio de cultivo el inhibidor de acción del etileno tiosulfato de plata, pudo observarse un incremento en el porcentaje de plantas regeneradas, evidenciándose la acción inhibitoria del etileno (Kwa et al, 1995).

Pueden regenerarse tejidos gametófiticos aposporicos y esporófiticos al cultivarse escamas foliares de *P. bifurcatum*, para ello, esporas son sembradas según metodología de Camloh y Gogala (1992) hasta desarrollar la fase esporofítica *in vitro*. Una vez obtenidos los esporófitos se procede a separar y cultivar las escamas juveniles en un medio de Murashige y Skoog (1962), 0,8% de Difco-Bacto agar y diferentes niveles de sacarosa. Comprobándose que el azúcar incrementa la viabilidad y regeneración de las escamas y promueve el desarrollo de rizoides, pero concentraciones mayores al 0,1% de sacarosa inhiben la aposporia (Dolinsek y Camloh, 1997).

Así mismo se desarrolló un nuevo método de regeneración de brotes a partir de las escamas foliares de *P. bifurcatum* utilizando un medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) y 1, 2 y 3% de sacarosa. Las escamas fueron separadas de plantas de 3 a 5 meses de vida cultivadas *in vitro* en un medio carente de reguladores de crecimiento. Luego de 60 días de cultivo, de 90 a 100% de las escamas desarrollaron brotes adventicios con hojas y algunas incluso raíces. La sacarosa no afectó el número de brotes formados en las escamas. La regeneración de las escamas es un buen sistema para estudios de la morfogénesis temprana (Dolinsek et al, 1999).

En otro experimento se propagaron plantas de *P. bifurcatum* usando secciones de hoja, que fueron colocadas sobre medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con Kinetina y/o Ácido Naftalen Acético. Luego de 12 semanas se constató la presencia de cuerpos globulares verdes en la superficie de la hoja que estaba en contacto con el medio. Se regeneraron plantas al cultivar los cuerpos globulares en medios como el señalado anteriormente con y sin carbón activado, alcanzando un tamaño adecuado a los 6 meses, luego estas enraizaron a las 8 semanas en el mismo medio pero con carbón activado y 2 mg/L de ANA (Benczur et al, 1995).

En *Platyserium stemaria* se realizó un estudio de propagación *in vitro* donde tomaron brotes asexuales de plantas que estaban siendo cultivadas en invernadero para luego extraerles los ápices caulinares. Luego de una rigurosa desinfección de los mismos, estos fueron implantados en medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con tiamina, Piridoxina, ácido nicotínico, sulfato de adenina, IAA, sacarosa (30g/L) y Difco Bacto agar (8g/L). En un principio se observó oxidación de la superficie del explanta, sin embargo luego de 35 días los explantas mostraron desarrollo de frondas. Después de 3 meses los explantas fueron separados y transferidos a medio fresco, y por último fueron subdivididos cada 2-4 semanas para evitar superpoblación. Cuando las plantas desarrollaron hojas de 2-3 cm de longitud fueron removidas de los frascos y colocadas en recipientes comunitarios con un sustrato 1:1 de raíz de fibra de helecho y musgo. Lográndose producir más de 300 plantas en 16 meses (Hennen y Sheehan, 1978).

3.3.2.2. Estructuras de propagación sexual o esporas.

Cuando se utilizan yemas vegetativas en la propagación *in vitro*, las plantas obtenidas resultan idénticas entre sí, debido a que las mismas no son el resultado directo de la unión de dos gametas. Sin embargo, en *P. bifurcatum*, a pesar de que la fertilización del gametófito implica la unión de dos gametas, no se ha señalado variaciones importantes cuando son cultivadas a través de esporas, por el contrario, se obtienen plantas fieles al tipo, con lo que la propagación de esta especie es viable por métodos sexuales y asexuales obteniéndose resultados satisfactorios en ambos casos (Chin, 1998).

Al cultivar helechos por esporas existe la posibilidad de que presenten cambios genéticos o mutaciones que conlleven cambios en la apariencia de las plantas, esto no es deseable cuando queremos propagar masivamente plantas con fines comerciales, ya que lo ideal es que el material propagado sea lo más fiel posible entre si y con respecto a la planta donadora o planta madre. Lo observado hasta ahora es que los cambios o mutaciones son extraordinariamente poco frecuentes, de hecho muy raros, y generalmente son señalados para géneros particulares, por lo que se habla casi como si se tratara de una propagación clonal. En el caso de *P. bifurcatum*, propagar a través de esporas produce plantas fieles al tipo. Por otro lado, las pequeñas variaciones que pudieran presentarse al propagarse mediante esporas algunos helechos, pudieran dar lugar a cultivares de importancia económica. A pesar de no ser muy difundida, la practica de la hibridización ha sido realizada con éxito en muchos géneros de helechos, pero para lograrlo es indispensable cultivar esporas *in vitro*, pues es la única manera de tener el control suficiente que asegure el cruce (Chin, 1998).

En muchos casos la obtención de las esporas constituye el mayor problema a superar, debido al hecho de que las mismas están ubicadas en la

fronda de una manera tal que se dificulta grandemente su extracción. En este sentido es recomendable cortar la fronda con las esporas e introducirlas en un sobre de papel, para luego situarla bajo el calor de una lámpara incandescente, los soros comenzarán a liberar las esporas pasados unos 30 minutos, las que se observan como un fino polvillo en el sobre. Una vez recolectadas las esporas, estas pueden secarse y almacenarse a temperatura ambiente por años, sin embargo es recomendable la siembra inmediata (C-fern, 2004).

Otra fuente de esporas lo constituyen las sociedades de cultivadores de helechos que se dedican a recolectar y enviar previo pedido, esporas de las especies solicitadas (Emmons, 1997).

En el caso de *P. bifurcatum*, la recolección de esporas es posible, ya que los soros forman parches densos en las puntas de las hojas con lo que basta con rasparlas de la superficie de la fronda con un cuchillo o navaja para que una enorme masa de esporas se desprenda (Botany, 2004).

Tres especies de *Asplenium* han sido propagadas exitosamente en el laboratorio mediante el empleo de técnicas de propagación avanzada. Para ello fue evaluada la temperatura ideal de germinación, determinada en 10°C, aunque también hubo germinación a 15, 20 y 25°C, al final se obtuvieron gametófitos masculinos, femeninos y hermafroditas (Pangua et al, 1994).

De manera similar Morini (2000) desarrolló una metodología *in vitro* para la propagación de *Osmunda regalis*, partiendo de esporas. Tomó esporas maduras de una planta adulta y las hizo germinar asépticamente en el medio sólido de Hoagland y Arnon (1950), el cual fue suplementado con 30 g/L de agar; produciéndose gametófitos y esporófitos normales. Los esporófitos fueron susceptibles a vitrificación aún cuando usaron citocininas para intentar evitarlo. Los esporófitos llegaron a producir esporangios que contenían esporas capaces de germinar en gran porcentaje dentro del mismo medio de cultivo.

En un experimento con *Dicksonia sellowiana* y *Cyathea schanschin*, ambos helechos en peligro de extinción, desinfectaron las esporas en soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio en diferentes concentraciones para evaluar su eficacia, luego realizaron la siembra en los medios de Murashige y Skoog modificado, Jones (1987) o la solución de Knop modificada por Dyer (1979). La solución de hipoclorito de calcio al 2% demostró ser más eficiente en el control de la contaminación, los protalos se formaron entre 30 a 40 días, apreciándose una mayor germinación en los medios de Jones y Knop (Borelli et al, 1990).

Camloh y Gogala (1992) implantaron esporas de *P. bifurcatum* en el medio modificado de Miller y Miller (1961), tomaron grupos de gametófitos de unas 6 a 7 semanas y los subcultivaron en el mismo medio de cultivo pero con modificaciones de pH, sacarosa y agar con el objeto de determinar los mejores niveles de los mismos para el cultivo de estos gametófitos. Llegaron a la conclusión de que los mejores niveles de sacarosa estaban alrededor de 4%, el pH a 5,5 y los medios de cultivo sin agar.

Bourne (1994) desarrolló un programa de producción comercial de *Platyserium superbum* partiendo del cultivo aséptico de esporas. Esterilizó esporas recolectadas y las cultivó sobre el medio modificado de Fossards. Luego de 3 meses las esporas habían germinado para luego ser subcultivadas a intervalos de 2-3 meses. Un gran número de esporófitos se produjeron espontáneamente y al alcanzar unos 2-3 cm. de diámetro fueron transplantadas para su climatización.

De la misma manera, Constantino (1995) describe la propagación *in vitro* de *P. alcicorne* comenzando con esporas, las cuales sembró en medio de cultivo con agar, azúcar, vitaminas y nutrientes, pero sin reguladores de crecimiento; obteniendo una tasa de multiplicación de 17,16 plantas y una climatización del 80%.

En un estudio realizado por Camloh et al (1996) determinaron el efecto del ácido jasmonico como promotor de la división de los protoplastos de los helechos, elongación de las rizoides y desarrollo temprano de los gametófitos. Para ello, cultivaron esporas de *P. bifurcatum* sobre el medio de Knop, el cual fue suplementado con ácido jasmonico, al tiempo que preparaba otro medio idéntico pero sin ácido jasmonico para usarse como testigo. Concluyendo que el ácido jasmonico no tuvo influencia sobre la germinación e iniciación primaria de rizoides, pero promovió significativamente el desarrollo temprano del gametófito.

Alzuru (2002) intentando mejorar la propagación *in vitro* de *P. bifurcatum* y *Rumohra adiantiformis*, realizó varios ensayos partiendo de esporas. Las esporas fueron desinfectadas y sembradas en medios sólidos con 0,7% de agar o líquidos en agitación, con las sales básicas de Murashige y Skoog (1962) y 1,5% de sacarosa o sin sacarosa. Concluyendo que la germinación se ve significativamente acortada en los medios sin sacarosa para ambos helechos.

3.3.3. Otras formas de multiplicación *in vitro* de helechos mediante Aereadores y Homogenización.

3.3.3.1. Aereadores.

Los aereadores son dispositivos que mantienen un flujo constante de burbujas o de movimiento dentro de un medio de cultivo liquido lo que permite una fractura deseable de los tejidos vegetales, además, debido a que el medio está en estado liquido se evitan los efectos negativos generados por la adición de agar. En este sentido Sheffield et al (1997) llevaron adelante un ensayo con los helechos *Pteridium aquilinun* y *Anemia phyllitidis*, los cuales fueron exitosamente cultivados partiendo de esporas en un aereador construido de la misma manera que el descrito por Boyd et al (1988), que contenía el medio de cultivo constituido por las sales de Moore (1903). Ambas especies produjeron

una mayor biomasa que la señalada para ningún otro medio líquido o sólido. La morfología presentada por los gametófitos así cultivados fue similar a la observada en los desarrollados sobre el suelo.

De manera similar Alzuru (2004) realizó un experimento donde sembró esporas de *Rumohra adiantiformis* en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con 1,5% de sacarosa y sin sacarosa, en un aereador construido en el laboratorio, no siendo posible obtener germinación de las esporas, pero si logró controlar la contaminación inicialmente presentada.

3.3.3.2. Homogeneización.

La homogeneización es una técnica que consiste en realizar cortes finos al material vegetal, en este caso gametófitos, mediante el uso de una licuadora esterilizada u otro dispositivo similar. Los gametófitos así cortados son regenerados, dando lugar a una gran cantidad de gametófitos, ya que cada fracción del mismo tiene la capacidad eventualmente de volver a formarse con todas sus estructuras, siendo completamente funcional. De esta forma, pueden multiplicarse enormemente los gametófitos partiendo de unos pocos, de una manera por demás muy económica, ya que no se requiere la extracción de cada uno individualmente para luego ser colocado uno a uno en medio de cultivo nuevo. Esto último demandaría mayor número de horas trabajadas, incrementándose así los costos (Cooke, 1979).

Numerosos experimentos han sido realizados con la finalidad de emplear y mejorar la técnica de homogeneización para diversos helechos, en ese sentido Janssens y Sepelie (1989) tomaron unos pocos gramos de protalos previamente cultivados *in vitro* de *Blenchum* spp. y *Pelaea rotundifolia*, homogeneizándolos luego por 5-10 segundos en una licuadora (esterilizada) junto con medio de cultivo de Knudson o agua destilada, luego el material homogeneizado fue cultivado sobre el mismo medio pero sólido, donde

solamente hubo regeneración del tejido, no detectándose el cambio de fase a esporófito sino hasta que se cultivó sobre una mezcla desinfectada de turba y arena.

Fernández et al (1993) por su lado, homogeneizaron gametófitos y tejido esporófitico de *Asplenium nidus* que había estado siendo cultivado partiendo de esporas *in vitro*, con la finalidad de observar su capacidad de regeneración en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con 3% de sacarosa. Los gametófitos homogeneizados sólo regeneraron gametófitos, mientras que los tejidos esporófiticos regeneraron esporófitos y gametófitos aposporicos.

En otro ensayo, se trató de regenerar plantas homogeneizando rizomas que fueron cultivados con BA. Para esto tomaron esporófitos de *Asplenium nidus* y *Pteris ensiformis* y los cultivaron durante 1 mes en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con benzylaminopurina (BA). Los rizomas se multiplicaron debido a la acción de las citocininas. Estos rizomas fueron aislados, homogeneizados y plantados en el mismo medio pero sin la adición de hormonas. Los explantas de *Pteris ensiformis* desarrollaron esporófitos, pero en *Asplenium nidus*, tuvo lugar regeneración esporofítica y gametofítica. Lográndose obtener aproximadamente 500 esporófitos de 0,5 g de material homogeneizado (Fernández et al, 1997).

En otras investigaciones, estos mismos autores con el fin de estudiar aspectos biológicos y nutricionales involucrados en la multiplicación de los helechos homogeneizaron gametófitos de varias especies, el homogenado resultante fue cultivado *in vitro*. Ellos apreciaron diferencias resaltantes en el periodo de tiempo transcurrido entre el cultivo de esporas hasta el desarrollo del esporófito entre las especies. Para especies con ciclo de vida rápido y alta producción de esporófitos, la homogenización resultó ser un excelente método de propagación. En otras especies, la producción de esporófito fue inhibida por el proceso de homogeneización. También estudiaron el efecto del medio de

cultivo, encontrándose que para *Osmunda regalis* y *Pteris ensiformis* la formación del esporófito se incrementó cuando agregaron agua y 0,7% de agar. La adición de sacarosa inhibió el desarrollo del gametófito e indujo necrosis del tejido (Fernández et al, 1999).

En este sentido Cooke (1979) realizó un experimento con la finalidad de implementar la homogenización como una técnica eficiente de ayuda en cultivo de tejidos, con fines de propagación de *Platyserium* y *Davallia*. Para ello inició y multiplicó plantas de ambos géneros en un medio con las sales de Murashige y Skoog (1962), removiéndolas, diseccionándolas y transfiriéndolas a frascos individuales. Unas 40 plántulas de *Platyserium* y 10 de *Davallia* fueron asépticamente removidas y colocadas en una licuadora esterilizada con 50 ml de medio de cultivo. Estas fueron licuadas por 5 segundos y transferidas alícuotas a contenedores plásticos, agregándose luego medio de cultivo hasta completar 100 ml. Se evidenció crecimiento en todos los estratos del agar a unas 2-3 semanas y una excelente producción de plantas fue observada a los 2 meses para ambos géneros. En los envases de *Platyserium* observaron unas 200 plántulas fácilmente separables, mientras que en *Davallia* contaron unas 80. Luego de la climatización fuera del laboratorio logran una tasa de supervivencia del 80%.

Cuando se realiza homogenización, con frecuencia hay una alta incidencia de contaminación que constituye el punto débil de la técnica. Por otro lado, con frecuencia incluyen antibióticos a los medios de cultivo para minimizar la acción bacteriana, sin embargo aparte de los efectos bactericidas, los antibióticos afectan los procesos metabólicos y el crecimiento y desarrollo *in vitro* de las plantas. Es por ello, que Teng y Teng (2000) estudiaron el efecto de tratamientos de remojo (“pulso”) de penicilina-G y sulfato de estreptomina en la regeneración de esporófitos homogeneizados de *P. bifurcatum*. Partiendo de una suspensión celular preparada mediante la homogenización de esporófitos de 1-2 cm de longitud por 30 segundos en una licuadora

previamente esterilizada con agua destilada, se procedió a sumergir el homogenado, así como esporófitos enteros (de los que luego plantarían explantas de hoja y brotes basales) en una solución antibiótica constituida por penicilina-G y sulfato de estreptomicina a 1000 mg/L cada uno por 0, 20, 40, 60, 120 y 180 minutos. Luego el homogenado fue colocado en medio Murashige y Skoog (1962) con y sin NAA. La regeneración de los explantas de hoja y brotes basales no presentó diferencias significativas. El tratamiento de remojo causó daños al mesófilo, división de la hoja e hiperhidricidad en algunos esporófitos. Los esporófitos continuaron su crecimiento en suelo sin evidenciar ningún efecto, a excepción de los que presentaron hiperhidricidad.

Márquez (2003), por su parte, homogeneizó protalos de *P. bifurcatum* en busca de una metodología que permitiera obtener gran cantidad de plantas en corto tiempo. En primer lugar, sembró esporas del helecho previa desinfección (etanol al 70% por 30 segundos, Vitavax[®] al 4% por 5 minutos e hipoclorito de sodio al 5,25% y además Tween 20 por 10 minutos), en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) solidificado con 0,7% de agar y 1,5% de sacarosa (M1). Una vez presentes los protalos y teniendo un tamaño adecuado una parte fue licuada con un medio constituido por las mismas sales de Murashige y Skoog (1962), 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar, 100 mg/L de inositol y 0,4 mg/L de Tiamina-HCl (M2), por 5 segundos en una licuadora previamente esterilizada. Posteriormente implantó alícuotas de 10 ml del material licuado en el medio usado para la homogenización o en el medio usado para la germinación (M1). En ambos casos añadió 1,5 ml de oxitetraciclina. La otra parte de los protalos fue subcultivada sin homogeneizar en los dos medios antes descritos. Observando que para los gametófitos homogeneizados en el medio dos (M2) hubo una tendencia a la regeneración, no sucedió esto para el otro medio. Tampoco se observó aparición de esporófito.

4. USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA.

Existe una extensa gama de usos para los helechos, aun cuando generalmente se piense que su función básica es la de plantas ornamentales, siempre han estado muy ligadas al hombre y por consiguiente este le ha ido atribuyendo propiedades y usos relacionados con sus costumbres.

4.1. Medicinal.

Gran cantidad de propiedades curativas les han sido adjudicadas a los helechos desde tiempo inmemorial. El reumatismo, trastornos del intestino, quemaduras, torceduras, úlceras y mordeduras de insectos o serpientes han sido tratadas en forma tradicional en todas partes del mundo con medicinas preparadas con helechos como ingrediente principal. Principalmente se usan los rizomas o las hojas maceradas y colocadas externamente o hechas en una decocción y luego tomadas. Universalmente reconocen las propiedades del aceite extraído a los helechos en el tratamiento de parásitos gastrointestinales. Algunos helechos han sido usados para curar la disentería, mientras que a otros les adjudican propiedades laxantes, e incluso existen pruebas clínicas con la finalidad de evidenciar las propiedades encontradas en el tratamiento de hepatitis. La lista de propiedades medicinales de los helechos es muy larga, sin embargo deben realizarse pruebas y ensayos serios con la finalidad de comprobar la veracidad de dichas afirmaciones y ofrecer tratamientos seguros a los pacientes (Chin, 1998).

4.2. Alimenticio.

Aunque no sean considerados una fuente importante de alimento, los helechos han aportado nutrientes a una importante fracción de personas en todo el mundo. La extracción de almidón del rizoma ha constituido buena parte

de la alimentación aportando carbohidratos, minerales y vitaminas en India, Nueva Zelanda, Filipinas, Madagascar, Nueva Guinea, Nueva Caledonia, Hawai y Australia; contribuyéndose así a mitigar el hambre en tiempos de escasez, aunque dicho almidón sea de sabor poco agradable y sólo obtengan pequeñas cantidades. Hasta mediados del siglo XX se usó el almidón de la médula de ciertos helechos para ser usado en las lavanderías. Los retoños jóvenes de muchos helechos son consumidos frescos como hortalizas y en algunos países como Japón constituyen verdaderas delicias culinarias cotizando precios bastante elevados (Chin, 1998).

4.3. Bebidas.

Muchos helechos son preparados en infinidad de bebidas. En algunos países el rizoma de ciertos helechos es usado para sustituir al lúpulo en la elaboración de cerveza, otros se usan para preparar té, mientras que algunos son fermentados para elaborar bebidas alcohólicas (Chin, 1998).

4.4. Fertilizantes orgánicos.

En Asia es frecuente el uso de algunos helechos acuáticos flotantes como abono verde con gran éxito. Estos helechos son cultivados en el agua del arroz inundado y cuando se acerca la madurez, al secarse el campo, el helecho funciona como abono (Chin, 1998).

4.5. Control de erosión.

En las selvas tropicales húmedas, donde las condiciones de sombra natural, alta humedad y altas precipitaciones impiden el uso de otras plantas en el control de la erosión, los helechos pueden ser usados con gran éxito para este fin, ya que algunos forman masas muy densas que protegen y cubren muy bien el suelo. Aunque algunos pueden ser susceptibles al fuego y desaparecer

dejando el suelo desprotegido, otros poseen rizomas subterráneos que los protegen del mismo. En Australia y Nueva Zelanda se han usado para estabilizar áreas costeras y carreteras (Chin, 1998).

4.6. Ornamental.

Sin duda es el ornamental el uso más popular de los helechos. Su gran versatilidad y aire tropical son usados frecuentemente para crear ambientes soberbios e inspiradores tanto en el interior como en el exterior, en patios y jardines. El helecho Cacho de Venado (*P. bifurcatum*) con sus dos tipos de frondas, gran tamaño, hábitos epífitos de crecimiento y belleza particular, le hacen del agrado y preferencia de cuantos desean crear un ambiente diferente y relajado en el exterior de las casas. Se le cultiva en cestas de alambre donde adquiere forma esférica de inigualable estética o sobre una tabla de madera plana pudiéndose colocar varios ejemplares juntos contra una pared; de igual forma puede plantarse directamente sobre un árbol donde adquiere dimensiones inmensas y un aspecto natural e inigualable de evocación del bosque tropical (Staghorn Fern, 2003). Otro uso importante de esta planta deriva del que se le da a sus hojas como follaje en arreglos florales bien sea en fresco o secas y luego pintadas de dorado o plateado (Chin, 1998).

Los helechos también son utilizados para la elaboración de terrariums, que no son más que plantas que se hacen crecer en frascos cerrados herméticamente y que son muy estéticos como decoración interior en las casas (C-fern, 2004).

4.7. Importancia económica.

La industria de producción de follajes para arreglos florales señala ganancias extraordinarias desde el punto de vista económico, solo en estados

unidos, el cultivo del helecho cuero *Rumohra adiantiformis* genera alrededor de \$ 150 000 000,00 anuales (Atehortua et al., 1999).

El *Platyserium bifurcatum* es uno de los helechos más buscados y mejor pagados en el mercado, puede ser comercializado muy pequeño en recipientes con precios para 2003 que superan los Bs 3 000,00 o de tamaño mayor en cestas de alambre y alcanzar precios que sobrepasen holgadamente los Bs 50 000,00 por lo que el cultivo de esta especie puede considerarse un negocio muy rentable (Márquez, 2003).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

1. UBICACION.

Estas investigaciones fueron realizadas en la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Unidad de Apoyo Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Área de Propagación Controlada, situados en la ciudad de Maracay, Estado Aragua a 436 m.s.n.m, con una temperatura promedio anual de 24,6°C y una humedad relativa de 75-80%.

2. MATERIAL VEGETAL.

Las esporas usadas tanto para el ensayo *in vivo* como *in vitro*, fueron obtenidas de las frondas fértiles de plantas madres de helecho Cacho de Venado (*Platyserium bifurcatum*) localizadas en el área de propagación controlada del Instituto de Agronomía de la UCV núcleo Maracay.

3. PROPAGACIÓN *in vivo*.

3.1. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES (BOLSAS PLÁSTICAS) EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES BAJO CÁMARA HÚMEDA.

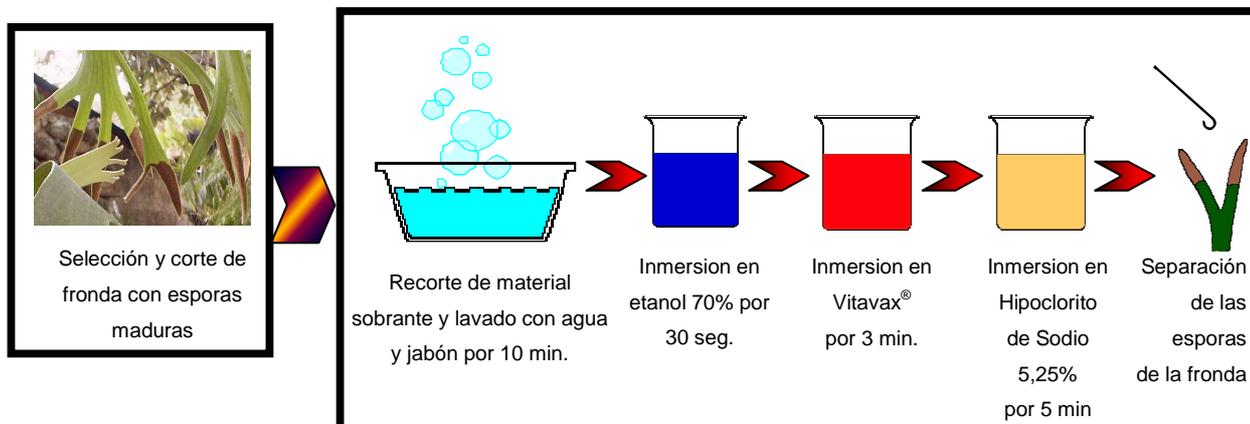
3.1.1. Extracción y desinfección de las esporas.

Se seleccionaron las frondas que presentaron el grado óptimo de maduración de las esporas, conociéndose esto por la coloración castaño oscuro

que presentaban las mismas, así como la presencia de una película blanquecina muy fina que las recubría externamente. El material vegetal fue llevado al laboratorio seccionándose con un bisturí el exceso de hojas, dejándose solo el esporangio. Luego se lavó, con agua y jabón durante 10 minutos; enjuagándose con agua limpia. La desinfección fue realizada en primer lugar con una exposición por 5 minutos a luz Ultra Violeta, y luego inmersiones de 30 segundos en Etanol, seguido de Vitavax[®] por 3 minutos y en Hipoclorito de Sodio por 5 minutos, lavándose posteriormente con agua destilada. Finalmente las esporas fueron separadas de la fronda mediante el uso de un bisturí.

3.1.2. Siembra de las Esporas.

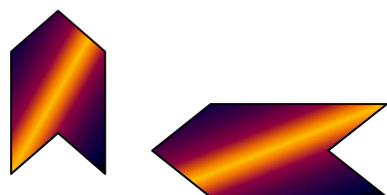
Se tomó una ansada de esporas que equivale a aproximadamente 0,06 g (aproximadamente unas 75 000 esporas) y estas se colocaron en envases (bolsas plásticas) de polietileno negro de 250 ml que contenían los sustratos previamente desinfectados con vapor de agua y húmedos. Las bolsas fueron ubicadas sobre cestas plásticas de 19 x 60 x 40 cm. selladas en el fondo con polietileno para evitar escape de humedad, manteniendo una película constante de agua, sobre esa película se colocó anime. Las cestas estuvieron selladas con polietileno transparente sostenido mediante alambres gruesos doblados y cuidando de crear hermeticidad presionando firmemente el borde del polietileno con la cesta creándose de esta forma una cámara húmeda (Figura 1). La humedad relativa estuvo ubicada así, por encima del 80%. Las cestas preparadas fueron colocadas bajo dos ambientes. Semanalmente se revisó el nivel de la película de agua, reponiéndose de ser necesario suministrando esta por los bordes internos de la bandeja para evitar perturbar las esporas. Aspersiones de agua semanales sobre los gametófitos ya desarrollados fueron realizadas con el fin de estimular la germinación del esporófito.



Desinfección y extracción de las esporas



Siembra de las esporas en envases (bolsas plasticas) con diferentes sustratos bajo cámara húmeda



Colocación de la cámara húmeda en los dos (2) ambientes a evaluar



FIGURA 1: Extracción, desinfección y siembra de esporas de *Platyserium bifurcatum* in vivo en diferentes sustratos y ambientes bajo cámara húmeda.

3.1.3. Diseño Experimental.

El diseño experimental usado fue completamente aleatorizado con ocho (8) tratamientos y diez (10) replicas, cada envase (bolsa plástica) constituía una unidad experimental.

Los tratamientos producto de la combinación de cuatro (4) sustratos, constituidos por arena lavada sola y mezclas de arena y turba 1:1; arena y mantillo de hojas 1:1 y arena y humus de lombriz 1:1 y la de los dos (2) ambientes suministrados por la sombra artificial creada bajo una tela de sarán (incidencia lumínica de 100-200 $\mu\text{M}/\text{sm}^2$) y una sombra natural proporcionada por un árbol (50-250 $\mu\text{M}/\text{sm}^2$) (Anexo 7), quedando estos de la siguiente manera:

- T1. Turba y arena 1:1; bajo sarán
- T2. Mantillo y arena 1:1; bajo sarán
- T3. Humus y arena 1:1; bajo sarán
- T4. Arena sola; bajo sarán
- T5. Turba y arena 1:1; bajo árbol
- T6. Mantillo y arena 1:1; bajo árbol
- T7. Humus y arena 1:1; bajo árbol
- T8. Arena sola; bajo árbol.

Las observaciones se realizaron semanalmente durante nueve (9) meses y medio. Las variables observadas fueron: germinación o formación del gametófito, tiempo de germinación, formación del esporófito y sobrevivencia del material vegetal.

3.2. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN FRASCOS HERMÉTICOS.

3.2.1. Siembra de las esporas.

Las esporas extraídas como en el experimento anterior fueron sembradas tomando una ansada de esporas que equivale a aproximadamente 0,06 g (aproximadamente unas 75 000 esporas) y luego se colocaron en frascos de vidrio de 20 ml que contenían los sustratos previamente desinfectados con vapor de agua y húmedos. Los frascos estuvieron cerrados con tapas plásticas para que mantuvieran las condiciones de hermeticidad requeridas y así evitar perturbar el desarrollo de los gametófitos (Figura 2). La humedad relativa se mantuvo de esta forma por encima del 80%. Los frascos así preparados fueron colocados bajo dos ambientes. No hubo necesidad de riego dadas las condiciones herméticas del frasco.

3.2.2. Diseño experimental.

Este experimento se realizó al igual que el anterior (3.1) en cuanto a todo lo considerado en el diseño experimental (tratamientos, replicas, unidad experimental y observaciones).

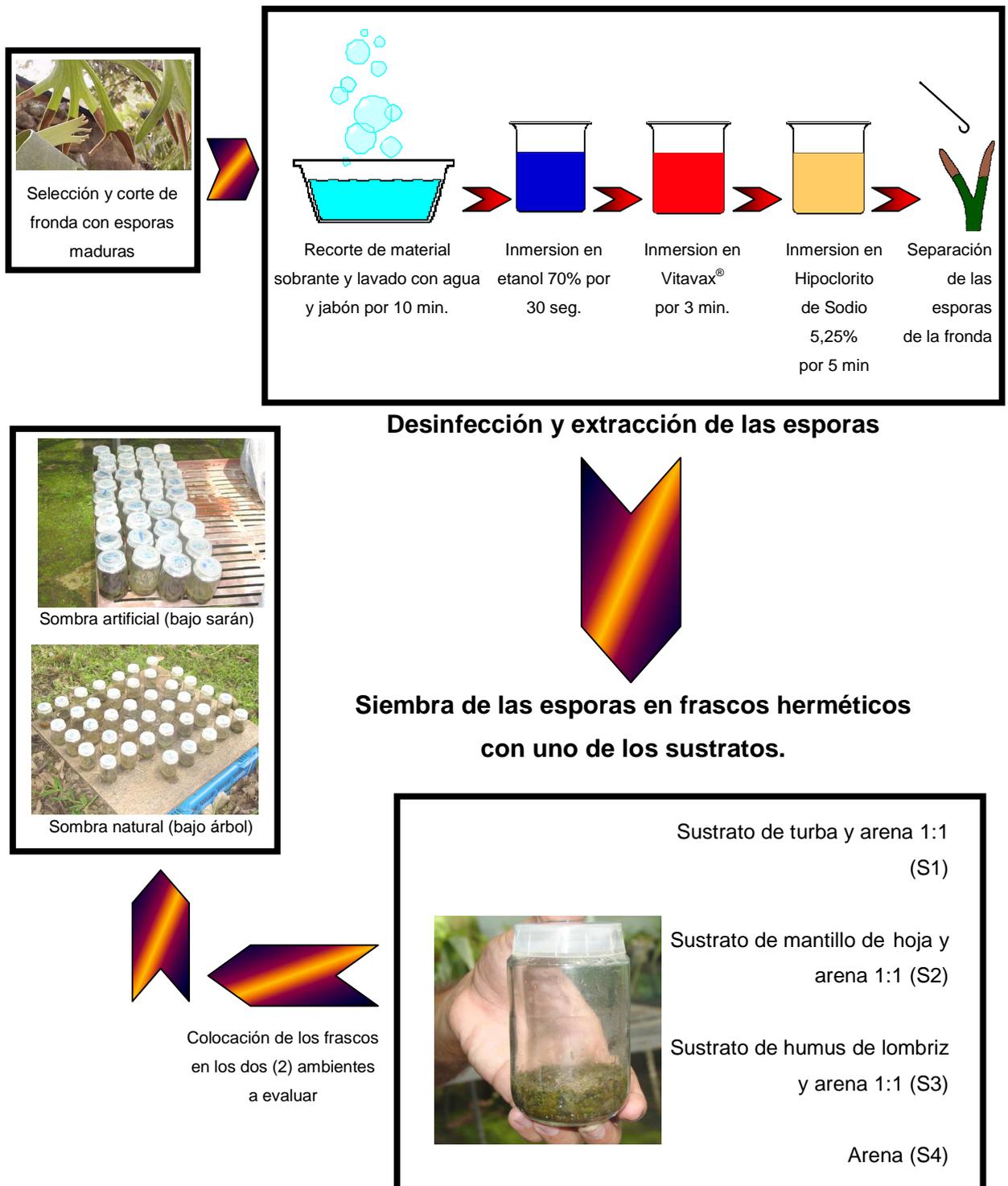


FIGURA 2: Extracción, desinfección y siembra de esporas de *Platycerium bifurcatum in vivo* en frascos herméticos en diferentes sustratos y ambientes.

3.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES SIN DRENAJE Y FRASCOS DE VIDRIO CON TRES TIPOS DE TAPA.

Las esporas extraídas como en las oportunidades anteriores fueron sembradas tomando una ansada de las mismas que equivale a aproximadamente 0,06 g (aproximadamente unas 75 000 esporas) y luego fueron colocadas en envases plásticos de 3,78 L que contenía uno de los siguientes sustratos: arena lavada y mantillo de hojas 1:1; arena lavada, mantillo de hojas e hidrogel 1:1:1; hidrogel solo y raíz de helecho triturada sola. De la misma manera fueron preparados sólo nueve (9) frascos de vidrio de 500 ml los que se llenaron con los sustratos, pero tres fueron cerrados con tapas plásticas, tres con tapas de metal y tres con envoltura plástica transparente (Envoplast[®]). Los sustratos fueron previamente desinfectados con vapor de agua y humedecidos. Los envases plásticos estuvieron cubiertos con vidrios de 30 x 30 cm para que mantuvieran las condiciones de hermeticidad requeridas y así evitar perturbar el desarrollo de los gametófitos. La humedad relativa se mantuvo de esta forma por encima del 80%. Los envases plásticos y frascos así preparados fueron colocados bajo sarán, no hubo necesidad de riego dadas las condiciones herméticas de ambos tipos de envases.

Esta investigación, así como las señaladas en 3.4, 3.5 y 4.4 fueron ejecutadas con poco material vegetal (esporas) y debido a que se quería explorar a fin de lograr alguna respuesta, fueron diseñados varios experimentos con diferentes tratamientos. Las observaciones realizadas fueron similares a las realizadas para los experimentos principales tanto en la propagación *in vivo* como *in vitro*.

3.4. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS TRATADAS PREVIAMENTE MEDIANTE REMOJO EN AGUA O ESCARIFICACION CON ÁCIDO SULFURICO EN FRASCOS HERMÉTICOS Y ENVASES SIN DRENAJE.

Las esporas extraídas como en el experimento anterior fueron sometidas a alguno de los siguientes tratamientos de escaificación: inmersión por 5 minutos en ácido sulfúrico concentrado, el cual fue neutralizado posteriormente con agua con cal; otras esporas fueron remojadas por 24 horas en agua destilada, desionizada y estéril (ADDE). Las esporas tratadas fueron sembradas tomando una ansada de esporas que equivale a aproximadamente 0,06 g (aproximadamente unas 75 000 esporas) y luego se colocaron en 6 frascos de vidrio (3 con esporas remojadas en agua y 3 con esporas escaificadas en ácido sulfúrico) de 500 ml que contenían los sustratos previamente desinfectados con vapor de agua y humedecidos. Por lo que dos frascos contenían el mismo sustrato, estos últimos consistían de mezclas de arena lavada y mantillo de hojas 1:1; arena lavada, mantillo de hojas e hidrogel 1:1:1; hidrogel solo. Los frascos estuvieron cerrados con tapas metálicas para que mantuvieran las condiciones de hermeticidad requeridas y así evitar perturbar el desarrollo de los gametófitos. La humedad relativa se mantuvo de esta forma por encima del 80%. Los frascos así preparados fueron colocados bajo tela de sarán ($100\text{-}200\ \mu\text{M}/\text{sm}^2$). No hubo necesidad de riego dadas las condiciones herméticas del mismo.

También fue empleado un envase plástico de 3,78 L sin drenaje, que contenía el sustrato arena lavada y mantillo de hojas 1:1 y cubierto con una tapa de vidrio. Para la siembra de este se usaron sólo las esporas remojadas por 24 horas en agua.

3.5. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES CON DRENAJE Y TAPA DE VIDRIO COLOCADOS SOBRE BANDEJA CON AGUA.

Las esporas extraídas como en el experimento anterior fueron sembradas tomando una ansada de esporas que equivale a aproximadamente 0,06 g (aproximadamente unas 75 000 esporas) y colocadas en un envase de barro cocido de un galón de capacidad que contenía una mezcla de arena lavada y tierra 2:1. El sustrato fue desinfectado una vez colocado en el envase aplicándole agua hirviendo tres veces sobre su superficie y procediendo a taparse de inmediato. Sobre el anterior, fue colocado un vidrio de 30 x 30 cm para que mantuvieran las condiciones de hermeticidad requeridas y así evitar perturbar el desarrollo de los gametófitos, este envase fue ubicado sobre una bandeja plástica para lograr mantener una película de agua que ascendiera hasta las esporas por capilaridad, la humedad relativa en este ambiente se mantuvo por encima del 80%. El envase así preparado fue colocado bajo sombra de árbol ($50\text{-}250 \mu\text{M}/\text{sm}^2$) en ambiente muy fresco. El riego diario fue indirecto (llenado de la bandeja). Una vez germinados los gametófitos se procedió a asperjar agua sobre los mismos para estimular la fertilización.

4. PROPAGACIÓN *in vitro*.

4.1. PRIMERA FASE.

4.1.1. Extracción y desinfección de las esporas.

La extracción y desinfección de las esporas fue similar a los experimentos de propagación *in vivo*. Las secciones de frondas con esporas fueron llevadas al laboratorio y el exceso de hojas fue recortado mediante el uso de un bisturi, dejándose sólo el esporangio, luego lavadas con agua y jabón

durante 10 minutos; enjuagándose con agua limpia. La desinfección fue realizada bajo cámara de flujo laminar, en primer lugar se realizó una exposición a luz ultravioleta por 5 minutos, y posteriormente inmersiones de 30 segundos en Etanol, seguido de Vitavax[®] por 3 minutos y a continuación en Hipoclorito de Sodio al 5,25% por 5 minutos, posteriormente las esporas fueron separadas de la fronda mediante el uso de una espátula por raspado (anexo 8). Estas últimas fueron desinfectadas nuevamente en un tubo de ensayo con Hipoclorito de Sodio al 2,62% por 5 minutos, luego se eliminó este mediante el uso de pipetas. Por último las esporas fueron lavadas 3 veces con ADDE.

4.1.2. Siembra de las esporas.

Una vez desinfectadas las esporas se realizaron los dos primeros tratamientos colocándose una ansada de esporas con un peso aproximado de 0,06g (unas 75 000 esporas), en cada uno de los dos medios de cultivo elegidos para su germinación. Los anteriores estaban compuestos por las sales básicas (SB) de Miller y Miller (1961) o las sales básicas de Murashige y Skoog (1962), ambos contenían: 0,6% de agar y 4% de sacarosa ajustando el pH a 5,5 (Anexo 9). Así, 30 ml de medio fueron colocados en frascos de vidrio de 200 ml. Luego de esto se llevaron a un cuarto climático bajo condiciones controladas ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 16 horas de iluminación a $2 \mu\text{M}/\text{sm}^2$). En esta fase las esporas pasaron 5 meses hasta lograr la germinación y la formación adecuada de los gametófitos o protalos que debían someterse a la homogeneización (Figura 3).

4.2. SEGUNDA FASE.

4.2.1. Homogeneización (Anexo 10).

Se seleccionaron los frascos en mejor estado y con mejor desarrollo de los que habían sido sembrados 5 meses atrás, extrayéndose los protalos y

removiendo la mayor cantidad posible del agar adherido a los mismos. Fueron colocados luego en licuadora previamente esterilizada en cuatro lotes (la mitad de los protalos de M1 y la mitad de M2), cada uno en función del tratamiento al que fuese a someterse, un subcultivo se hizo en medio sólido o líquido en los dos medios de germinación. Debido a que es necesario homogeneizar junto con medio de cultivo y en tanto que existían medios sólidos, la temperatura de trabajo fue de unos 40 °C con el objeto de que el agar mantuviese aún su fase líquida, los medios líquidos también fueron licuados a la misma temperatura. El medio de cultivo para este subcultivo fue el mismo que el usado para la germinación en cada caso, pero con la adición de inositol, tiamina y 2,5 mg de Oxitetraciclina. La cantidad usada de medio de cultivo en la licuadora fue de 220 ml para el M1 y 200 ml para el M2 (la cantidad de M2 fue menor debido a que había menor cantidad de frascos germinados y de menor densidad). Procedió entonces a licuarse por 5 seg tomándose de este homogenado alícuotas de 10 ml para cada frasco y vertiéndoseles rápidamente los restantes 20 ml de medio de cultivo también a 40 °C para posteriormente taparse y sellarse con envoltura plástica transparente (envoplast[®]), luego fueron colocados en el cuarto climático con las mismas condiciones bajo las que habían venido desarrollándose (Figura 3).

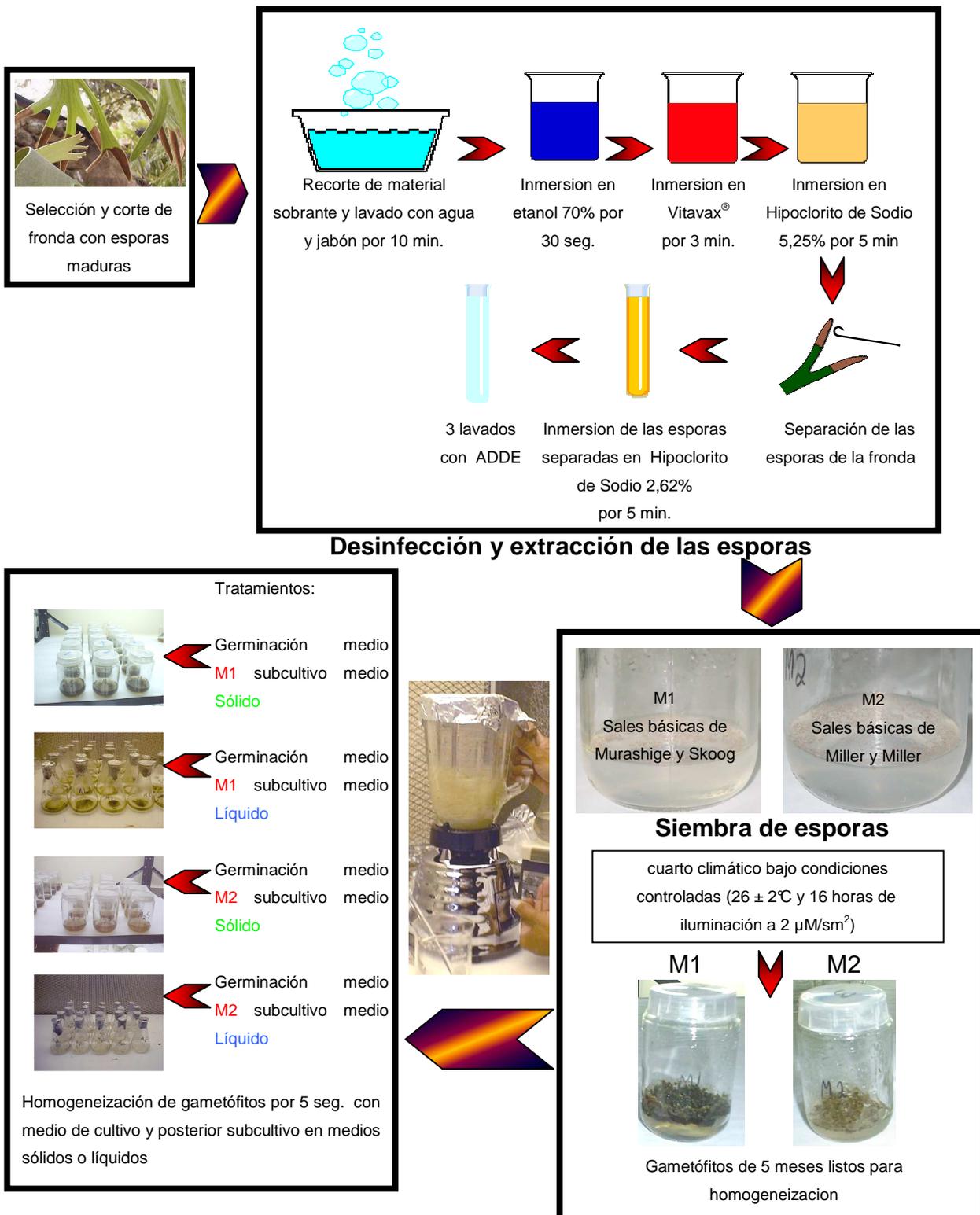


FIGURA 3: Extracción, desinfección y cultivo *in vitro* de esporas de *Platycerium bifurcatum* y homogeneización de gametófitos o protalos.

4.2.2. Diseño experimental.

El diseño a usar fué completamente aleatorizado con cuatro (4) tratamientos, veinte (20) repeticiones siendo la unidad experimental de un frasco.

Los tratamientos resultaron de implantar los gametófitos o protalos homogeneizados en los mismos medios de cultivo de donde provenian al germinar las esporas (primera fase) pero utilizando en este caso medio sólido y líquido para finalmente constituir cuatro tratamientos como sigue:

- T1. Germinación SB Murashige y Skoog (M1); subcultivo luego de homogeneización en medio sólido.
- T2. Germinación SB Murashige y Skoog (M1); subcultivo luego de homogeneización en medio líquido.
- T3. Germinación SB Miller y Miller (M2); subcultivo luego de homogeneización en medio sólido.
- T4. Germinación SB Miller y Miller (M2); subcultivo luego de homogeneización en medio líquido.

En la primera fase se observaron semanalmente durante cinco (5) meses las variables: tiempo de germinación y porcentaje de sobrevivencia de las esporas.

Para la segunda fase fueron observadas semanalmente durante tres (3) meses las variables: regeneración y sobrevivencia del gametófito, así como ocurrencia y tiempo de aparición de la fase esporofítica.

La prueba empleada fue la de Fisher, la cual es no paramétrica para las variables germinación y sobrevivencia, por cuyas características no es apropiado un análisis de varianza.

4.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE INDUCCIÓN DE FASE ESPOROFÍTICA MEDIANTE UTILIZACIÓN DE LÁMPARA INCANDESCENTE EN GAMETÓFITOS CULTIVADOS *in vitro*.

Fue realizado un experimento preliminar para inducir la fase esporofítica con gametófitos que habían estado creciendo *in vitro* y que presentaban un grado de madurez óptimo. Fueron extraídos de tres (3) frascos que tenían 8 meses de sembrados y eliminado el exceso de agar. Se colocaron en una cápsula de petri y cubrieron con ADDE, luego estos fueron expuestos bajo una lámpara incandescente de 40 W (distancia de 30 cm) durante 24 h para estimular la liberación de células anterozoidales y una posterior fecundación de las células arquegoniales. Luego fueron plantados en treinta y cinco (35) envases plásticos de 100 ml que contenían turba, la que había sido desinfectada previamente con agua hirviendo. Estos envases fueron colocados en una bandeja cubierta con plástico sosteniendo este último con alambres, formándose de esta manera una cámara húmeda. Así mismo, se mantuvo una película de agua debajo de los envases para que la misma ascendiera a los gametófitos por capilaridad. El riego fue semanal, aplicándose agua por los bordes de la bandeja y arperjándose por encima para fomentar la fertilización que no tuvo oportunidad de ocurrir bajo la lámpara. Las cámaras húmedas con los gametófitos estuvieron colocadas bajo tela de sarán ($100\text{-}200\ \mu\text{M}/\text{sm}^2$).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

1. PROPAGACION *in vivo*.

Debido a que los experimentos de propagación *in vivo*, tienen características especiales que no permitieron el uso del análisis de varianza, tales como la imposibilidad de realizar conteos del número de gametofitos y/o esporófitos, teniendo que contarse por frasco o bolsa que presentaba evidencia de germinación, se presentan en forma descriptiva.

1.1. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES (BOLSAS PLÁSTICAS) EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES BAJO CÁMARA HÚMEDA.

Se observó una tendencia a lograr la germinación de gran cantidad de esporas en los tratamientos T1, T2 y T4, que corresponden a turba y arena 1:1; mantillo de hojas y arena 1:1; y arena sola respectivamente y bajo el ambiente de sombra artificial creada con tela de sarán (Figuras 4 y 5). El tiempo de aparición de los primeros gametófitos fue de tres (3) semanas luego de la siembra para todos los casos. A la tercera semana el T4 evidenció un mayor número de envases (bolsas plasticas) con esporas germinadas, seguido por el T1 y el T2 (Cuadro 1). El T4 alcanzó germinación en el 100% de los envases (bolsas plasticas) antes que los Tratamientos T1 y T2. Los envases (bolsas plasticas) con los tratamientos T1 y T2 alcanzaron un 100% de germinación de las esporas a las 9 semanas.

Los tratamientos T5, T6 y T8 también tendieron a manifestar germinación de esporas, pero con una densidad mucho menor que la observada para los

tratamientos sembrados bajo sarán (Cuadro 1). De igual forma pudo constatarse que en este caso la arena obtuvo mayor número de envases (bolsas plásticas) germinadas que los otros tratamientos en menor tiempo.

La germinación de las esporas fue mejor en todos los casos que las encontradas por Alzuru (2002) o Márquez (2003), debido a que la metodología empleada en esta investigación mantiene niveles de humedad más altos y constantes, ya que la película de agua bajo los envases (bolsas plásticas) provee a las esporas de humedad continuamente, ascendiendo a estas por capilaridad, sin que se vean perturbadas.

En todos los casos pudo constatarse la tendencia a que paralelamente a la germinación de las esporas de *P. bifurcatum* comenzaron a aparecer junto a estas musgos, algas y gametófitos de otros helechos, que compitieron fuertemente por luz, nutrientes y espacio. Por lo que luego de una exitosa germinación inicial los gametófitos del helecho en estudio comenzaron a inhibirse o desaparecer, especialmente en el ambiente bajo sombra natural bajo árbol (Cuadro 1). Se observó la aparición de esporófitos de helechos contaminantes en la semana 12 (Figura 6), en el ambiente de sombra artificial bajo tela de sarán, lo que indica que la desinfección de las mezclas y medios con vapor de agua no fue suficiente para eliminar la totalidad de esporas de otros helechos. En el ambiente de sombra natural no se evidenció la aparición de helechos contaminantes, pero si una tendencia a desarrollar musgo, algas y hongos.

Lo anterior coincide plenamente con lo mencionado por Borelli et al (1990), quienes señalan una alta contaminación de los sustratos pese a realizar una desinfección mediante el uso de autoclave o en un horno de microondas por 15 a 20 minutos y una temperatura de unos 120°C.

Los tratamientos T3 y T7 no evidenciaron germinación de esporas en ningún momento, y se observó en ellos una fuerte tendencia a presentar alta contaminación por hongos y algas.

No se observó la aparición de esporófitos de *P. bifurcatum* en ninguno de los tratamientos bajo observación.

CUADRO 1: CULTIVO *in vivo* DE ESPORAS Y FORMACIÓN DE GAMETÓFITOS DE *Platyserium bifurcatum* EN ENVASES (BOLSAS PLASTICAS) EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN BANDEJAS BAJO CÁMARA HÚMEDA DURANTE 37 SEMANAS.

Tiempo (Semanas)	Tratamientos ^x							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	Siembra							
1	0 ^y	0	0	0	0	0	0	0
3	5	3	0	6	1	1	0	1
5	9	7	0	10	2	2	0	2
7	9	9	0	10	3	2	0	6
9	10	10	0	10	4	3	0	6
11	10	10	0	10	4	3	0	6
13	10	10	0	10	6	3	0	8
15	10	9	0	10	6	5	0	7
17	10	9	0	10	2	5	0	7
19	10	9	0	10	2	3	0	6
21	10	9	0	10	2	3	0	6
23	10	9	0	10	2	2	0	5
25	10	9	0	10	2	2	0	4
27	10	9	0	10	2	2	0	4
29	10	9	0	10	2	1	0	2
31	10	9	0	10	2	1	0	2
33	10	8	0	10	2	1	0	2
35	10	8	0	10	2	1	0	2
37	10	8	0	10	2	1	0	2

- ^x **T1:** turba y arena 1:1, bajo sarán; **T5:** turba y arena 1:1, bajo árbol
T2: mantillo de hojas y arena, bajo sarán **T6:** mantillo de hojas y arena, bajo árbol
T3: humus y arena 1:1, bajo sarán **T7:** humus y arena 1:1, bajo árbol
T4: arena sola bajo sarán **T8:** arena sola bajo árbol

^y Envases (bolsas plasticas) que presentaron formación de gametófito por semana

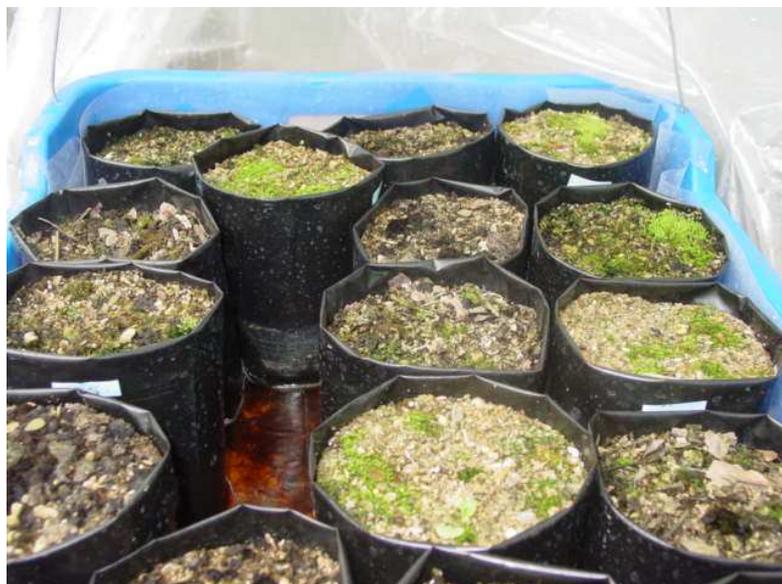


FIGURA 4: Gametófitos de *Platycerium bifurcatum* observados en experimento con envases (bolsas plásticas) y diferentes sustratos bajo cámara húmeda, en ambiente de sombra artificial, 5 semanas después de sembradas las esporas *in vivo*.



FIGURA 5: Detalle de gametófitos de *Platycerium bifurcatum* observados en envases (bolsa plástica) y una mezcla de arena y mantillo de hojas 1:1, bajo cámara húmeda en ambiente de sombra artificial, 5 semanas después de sembradas las esporas *in vivo*.



FIGURA 6: Esporófito de helecho contaminante en envase (bolsa plástica), bajo cámara húmeda en ambiente de sombra artificial, 12 semanas luego de sembradas las esporas *in vivo*.

1.2. EXPERIMENTO DE SIEMBRA DE ESPORAS EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN FRASCOS HERMÉTICOS.

Se observó una tendencia clara de germinación de las esporas para los tratamientos T1, T3 y T4 (bajo tela de sarán) y T5, T7 Y T8 (bajo sombra natural) para la semana 3. Los tratamientos T2 y T6 también manifestaron una tendencia de germinación pero luego de la semana 7 (Cuadro 2). La germinación de los gametófitos tendió a no diferir mucho entre los sustratos o los ambientes y a excepción del sustrato de turba y arena 1:1 que tuvo un número de frascos germinados en ambos ambientes ligeramente superior al resto, la germinación fue bastante similar y uniforme.

Luego de manifestarse una germinación inicial elevada en todos los tratamientos, a excepción del T2 y T6, hubo una tendencia general a la muerte y desaparición de los gametófitos en las semanas subsiguientes. La desinfección del sustrato no fue suficiente, ya que a partir de la cuarta semana se presentó una tendencia a aparecer hongos y algas (Figura 7). El control de humedad fue deficiente debido a la hermeticidad del frasco, ya que la evaporación y posterior condensación de agua formaba una película sobre el sustrato contribuyendo de esa forma a la muerte de los gametófitos. Al destapar los frascos se constató olor a amoníaco lo que también pudo ser parte de las causas de la muerte de los gametófitos.

Al igual que en el cultivo bajo cámara húmeda, en este caso también se tendió a constatar la presencia y desarrollo de otros helechos diferentes a *Platyserium bifurcatum*, los que fueron evidentes en la semana 7 (Figura 8), pero con un número mucho menor que en la anterior oportunidad. En esta ocasión pudieron cuantificarse los esporófitos de otros helechos, llegando apenas a un número de cinco (5) en total, de los cuales cuatro (4) estaban en

un solo frasco con sustrato de mantillo de hojas y arena bajo tela de sarán y uno (1) en un frasco con mantillo de hojas y arena bajo sombra natural de árbol.

Con la excepción del hecho de la aparición de otros helechos se observó gran similitud con lo evidenciado por Borelli et al (1990), quienes sembraron esporas en recipientes plásticos herméticos, llenos previamente con diferentes sustratos, obteniendo gran cantidad de contaminación por patógenos diversos y llegando a la conclusión de que el sustrato de raíz de helecho fue mucho mejor, en tanto que mostró mayor germinación de protalos que el resto de los sustratos. Sin embargo, Alzuru (2002), no evidenció germinación de esporas tras la siembra de las mismas en diversos sustratos colocados en bandejas plásticas herméticas.

CUADRO 2: CULTIVO *in vivo* DE ESPORAS DE *Platyserium bifurcatum* EN DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES EN FRASCOS HERMÉTICOS Y LA FORMACIÓN DE GAMETÓFITOS DURANTE 37 SEMANAS.

Tiempo (Semanas)	Tratamientos ^x							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
0	Siembra							
1	0 ^y	0	0	0	0	0	0	0
3	10	3	6	4	9	0	5	6
5	9	3	2	3	5	1	0	0
7	6	4	0	2	4	1	0	0
9	4	3	0	3	0	2	0	0
11	3	3	0	1	0	2	0	0
13	2	3	0	0	0	2	0	0
15	0	3	0	0	0	1	0	0
17	0	2	0	0	0	1	0	0
19	0	2	0	0	0	1	0	0
21	0	1	0	0	0	1	0	0
23	0	1	0	0	0	1	0	0
25	0	1	0	0	0	1	0	0
27	0	1	0	0	0	1	0	0
29	0	1	0	0	0	1	0	0
31	0	1	0	0	0	1	0	0
33	0	1	0	0	0	1	0	0
35	0	1	0	0	0	1	0	0
37	0	1	0	0	0	1	0	0

^x T1: turba y arena 1:1, bajo sarán;

T5: turba y arena 1:1, bajo árbol

T2: mantillo de hojas y arena, bajo sarán

T6: mantillo de hojas y arena, bajo árbol

T3: humus y arena 1:1, bajo sarán

T7: humus y arena 1:1, bajo árbol

T4: arena sola bajo sarán

T8: arena sola bajo árbol

^y Frascos que presentaron formación de gametófito por semana



FIGURA 7: Gametófitos de *Platycerium bifurcatum* presentando contaminación por hongos y algas al ser cultivado *in vivo* en el sustrato arena y mantillo de hojas (1:1), en frascos herméticos, bajo un árbol, 4 semanas después de sembradas las esporas.



FIGURA 8: Esporófitos de otros helechos diferentes a *Platycerium bifurcatum* cultivado *in vivo* en el sustrato mantillo de hojas y arena (1:1), en frascos herméticos, 7 semanas después de la siembra de las esporas.

1.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES DE PLÁSTICO SIN DRENAJE Y FRASCOS DE VIDRIO CON TRES TIPOS DE TAPA.

En los frascos de vidrio con diferentes tipos de tapa no hubo ninguna evidencia de germinación, más si de contaminación con hongos y algas. Así mismo se pudo constatar olor desagradable a descomposición y amoníaco al destapar los frascos.

Hubo evidencias de germinación en los envases plásticos sin drenaje, pero sólo en el sustrato de arena mantillo de hojas 1:1 y en hidrogel solo. El sustrato de hidrogel sólo manifestó escasa germinación y una tendencia marcada al desarrollo de algas. Se evidenció una tendencia a que el sustrato de arena y mantillo de hojas presentara germinación de gametófitos, que llegaron a cubrir densamente la superficie del sustrato pero sin manifestar sobrepoblación, ya que los mismos mantuvieron en todo momento su forma acorazonada. Después de unos 6 meses de sembradas las esporas comenzaron a aparecer esporófitos en gran cantidad (Figura 9).

Estos resultados contradicen lo obtenido por Borelli et al (1990) quienes no lograron propagar helechos de diferentes especies en gran cantidad al usar envases sin drenaje y diferentes sustratos. Ellos concluyeron que el mejor sustrato era uno constituido por raíz de helecho triturada, sin embargo esto no coincide con lo evidenciado por Propagating Ferns From Spores (2004) quien asegura que la mezcla de suelo usada para propagar helechos no es condición crítica para tener éxito en la misma.

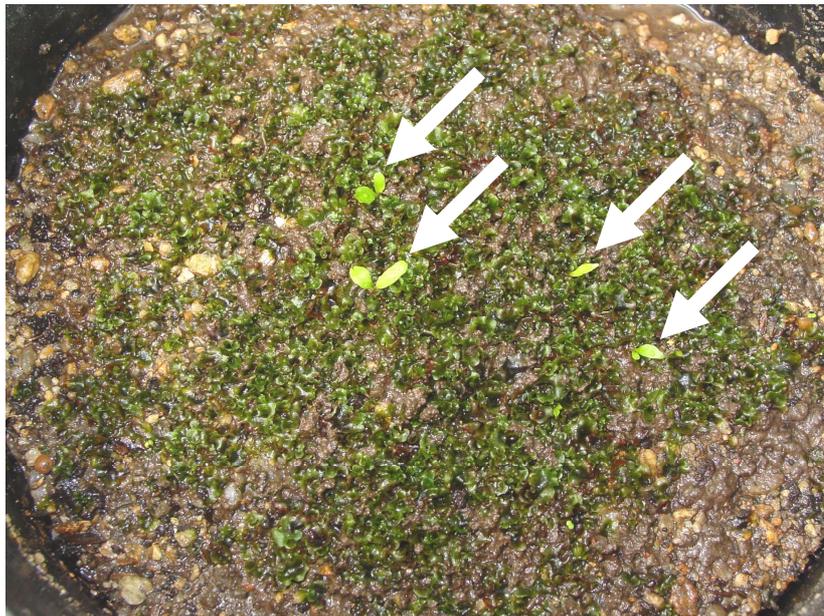


FIGURA 9: Aparición de esporófitos de *Platycerium bifurcatum* en envase plástico sin drenaje cubierto con vidrio.

1.4. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS, TRATADAS PREVIAMENTE MEDIANTE REMOJO EN AGUA O ESCARIFICACION CON ÁCIDO SULFURICO, EN FRASCOS HERMÉTICOS Y ENVASES PLASTICOS SIN DRENAJE.

No hubo evidencias de germinación de esporas en los frascos de vidrio para ninguno de los tratamientos previos realizados.

Se observó una tendencia a lograr la germinación de esporas en envases sin drenaje, para el tratamiento previo de remojo con el sustrato de mantillo de hojas y arena 1:1. Sin embargo hubo también una incidencia de contaminación muy elevada que tendió a ser reconocida como hongos, musgos y algas. Luego de 6 meses de cultivo hicieron aparición cuatro (4) esporófitos (Anexo 11).

La contaminación presentada deja ver la necesidad de emplear una forma de desinfección más eficiente, como la realizada por Propagating Ferns From Spores (2004), quien recomienda aplicar agua hirviendo sobre el sustrato colocado en el envase a usar. Por otro lado, lo anterior luce más acertado que lo expuesto por Borelli et al (1990) quien esterilizó un sustrato en un horno de microondas o un autoclave, y no logró controlar la contaminación con estos métodos.

1.5. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE SIEMBRA DE ESPORAS EN ENVASES PLÁSTICOS CON DRENAJE Y TAPA DE VIDRIO COLOCADOS SOBRE BANDEJA CON AGUA.

Hubo una tendencia marcada a observar una cuantiosa germinación de esporas en este caso. Los gametófitos germinaron en número tan grande que cubrieron completamente el sustrato llegando incluso a alargarse ligeramente manifestando sobrepoblación de los mismos (Figura 10). No hubo contaminación alguna. La coloración de la masa gametófitica tendió a ser de un verde oscuro muy intenso. A los cuatro (4) meses aproximadamente, comenzaron a aparecer los esporófitos en un número tan grande que se hizo imposible su contabilización. No hubo contaminación alguna con otros helechos.

Estos resultados coinciden plenamente con los evidenciados por Chin (1998), quien pudo propagar helechos fácilmente utilizando una metodología similar. De la misma forma Propagating Ferns From Spores (2004), concluye que al utilizar una bandeja con agua en el fondo de los envases plásticos, el agua asciende a las esporas por capilaridad de abajo hacia arriba, por lo que el control de la humedad es mucho más eficiente, las esporas se encuentran en un ambiente de 100% de humedad constantemente, y en el caso de que se condense agua en la cubierta, si esta cae, puede drenar hacia abajo sin problema no acumulándose agua sobre las esporas.

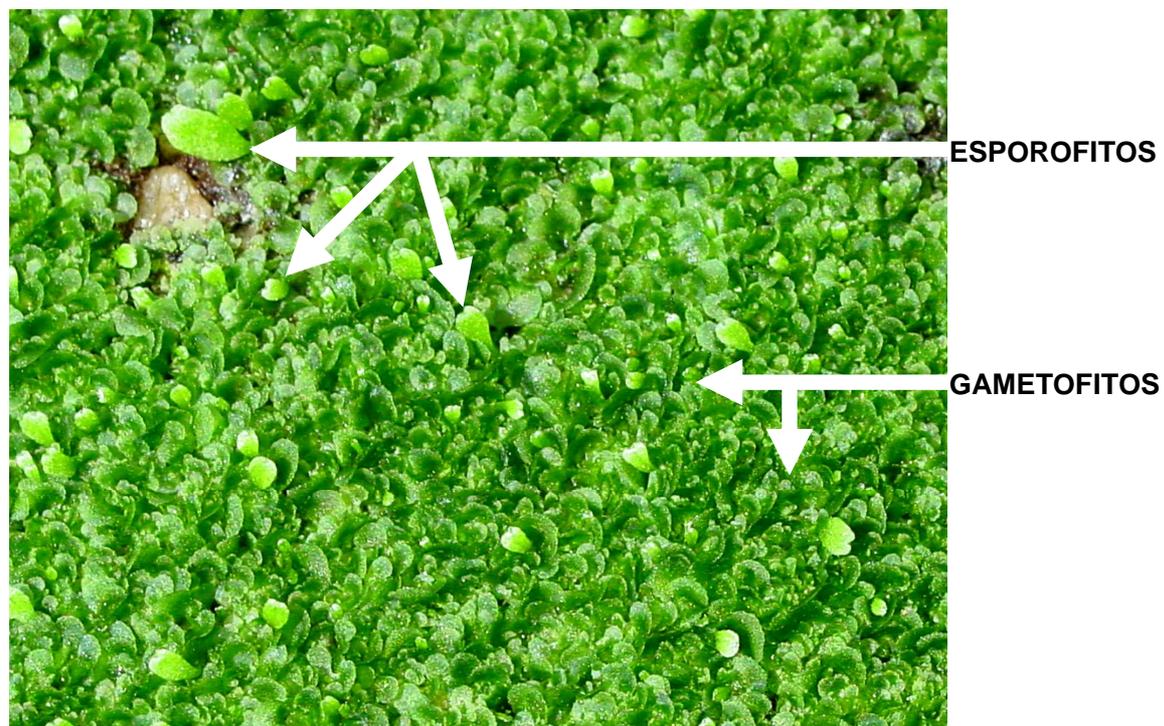


FIGURA 10: Esporófitos y gametófitos de *Platycerium bifurcatum* observados al cultivar *in vivo* esporas en envases plásticos con drenaje y tapa de vidrio, 16 semanas luego de la siembra.

2. PROPAGACIÓN *in vitro*.

2.1. PRIMERA FASE.

La germinación ocurrió en mayor proporción para el medio 1 (Murashige y Skoog) que para el medio 2 (Miller y Miller), y esto fue significativo estadísticamente (Anexo 12) a las 7 semanas después de sembradas y se mantiene hasta las 16 semanas, lo que demuestra que este es mejor para la germinación de gametófitos de *P. bifurcatum*. En cuanto al tiempo de germinación hubo una tendencia a ocurrir a las cinco semanas en forma simultánea para los dos medios. En forma cualitativa pudo evidenciarse que el medio 1 tendió a presentar una mayor densidad de gametófitos, distribuidos sobre el medio de forma más homogénea, así como un color verde mucho más oscuro (Cuadro 3, Figuras 11 y 12).

Los niveles de sobrevivencia fueron mayores para el medio 1, y esto fue significativo estadísticamente (Anexo 13) por consiguiente los mayores niveles de contaminación se presentaron para el medio 2, en el tiempo de evaluación de la germinación (Cuadro 3).

Puede observarse que a las 7 semanas de cultivo se había alcanzado el máximo de germinación de los gametófitos, esto coincide con los resultados expresados por Camloh y Gogala (1992) quienes obtuvieron gametófitos listos para ser homogeneizados luego de 8 semanas de cultivo en medio líquido.

CUADRO 3: GERMINACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE GAMETÓFITOS DE *Platyserium bifurcatum* CULTIVADOS *in vitro* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO DURANTE 16 SEMANAS.

Tiempo (Semanas)	Germinación		Sobrevivencia	
	M1 ^W	M2 ^X	M1	M2
0	Siembra			
1	0 ^Y	0	26 ^Z	27
2	0	0	26	21
3	0	0	26	21
4	0	0	26	21
5	3	2	25	18
6	15	12	25	18
7	25	16	25	18
8	25	16	25	18
9	25	16	25	18
10	25	16	25	18
11	25	16	25	18
12	25	16	25	18
13	25	16	25	18
14	25	16	25	18
15	25	16	25	18
16	25	16	25	18

^W M1: Murashige y Skoog (1962), 0,6% agar, 4% sacarosa y pH 5,5

^X M2: Miller y Miller (1961), 0,6% agar, 4% sacarosa y pH 5,5

^Y Frascos que presentaron germinación de las esporas

^Z Frascos que presentaron sobrevivencia de gametófitos

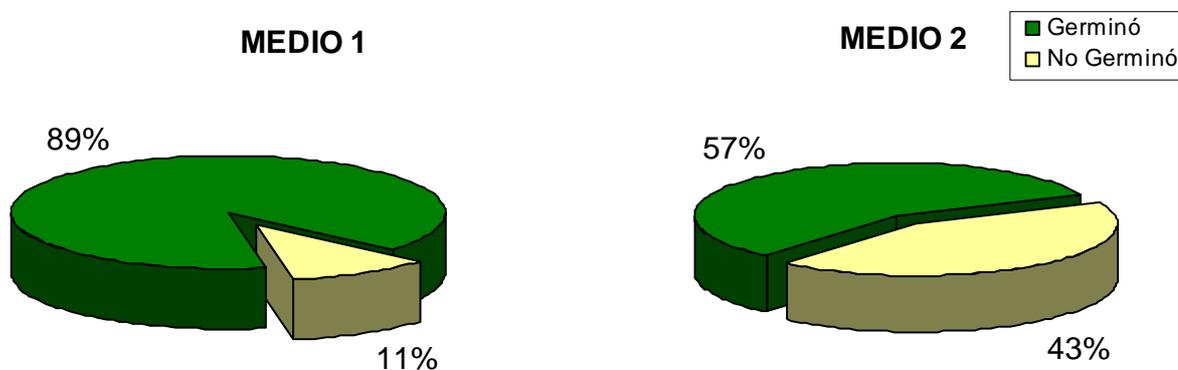


FIGURA 11: Germinación de esporas de *Platycerium bifurcatum* cultivadas *in vitro* en dos medios de cultivo (M1 y M2) a las 16 semanas después de sembradas.



FIGURA 12: Esporas germinadas *in vitro* mostrando gametófitos de *Platycerium bifurcatum* en dos medios de cultivo (M1 y M2), a las 16 semanas después de sembradas.

2.2. SEGUNDA FASE.

Debido a que la segunda fase de propagación *in vitro* no cumplió con los supuestos para el análisis de la varianza, los resultados se presentan en forma descriptiva.

Luego de 6 semanas se comenzó a evidenciar la regeneración de los gametófitos, presentando una forma esférica de color verde oscuro solamente para el tratamiento 2. En el resto de los tratamientos no se observó regeneración de los tejidos (Cuadro 4).

Se observó una alta tendencia a sobrevivir los gametófitos en todos los tratamientos (Figura 13). En el tratamiento 1 se evidenció la sobrevivencia en todos los frascos, tendiendo a sobrevivir menos en los medios líquidos que los sólidos, quizás debido a que en este medio existía una mejor oxigenación del material vegetal. De la misma forma se aprecia una tendencia a una mayor sobrevivencia en el medio 1 (Murashige y Skoog).

En esta fase no se observó formación de esporófitos, tampoco se observó oxidación del material homogeneizado, tal y como lo describió Hennen y Sheehan (1978). Sin embargo, se constató que en los medios sólidos se depositaba gran cantidad del material vegetal en el fondo de los frascos mientras se endurecía el agar, de la misma manera que lo afirmó Cooke (1979).

CUADRO 4: REGENERACION Y SOBREVIVENCIA DE GAMETÓFITOS DE *Platycerium bifurcatum* CULTIVADOS *in vitro* DURANTE 13 SEMANAS DESPUES DE SER HOMOGENEIZADOS.

Tiempo (Semanas)	Regeneración				Sobrevivencia			
	^x T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
0	Siembra							
1	^y 0	0	0	0	22 ^z	18	19	19
2	0	0	0	0	22	18	19	19
3	0	0	0	0	22	18	19	19
4	0	0	0	0	22	14	18	19
5	0	0	0	0	22	14	18	19
6	0	5	0	0	22	14	18	18
7	0	8	0	0	22	14	18	18
8	0	11	0	0	22	14	18	17
9	0	11	0	0	22	14	18	17
10	0	14	0	0	22	14	18	17
11	0	14	0	0	22	14	18	16
12	0	14	0	0	22	14	18	16
13	0	14	0	0	22	14	18	16

^x T1: Germinación medio M1 (Murashige y Skoog) subcultivo luego de homogeneización en medio Sólido

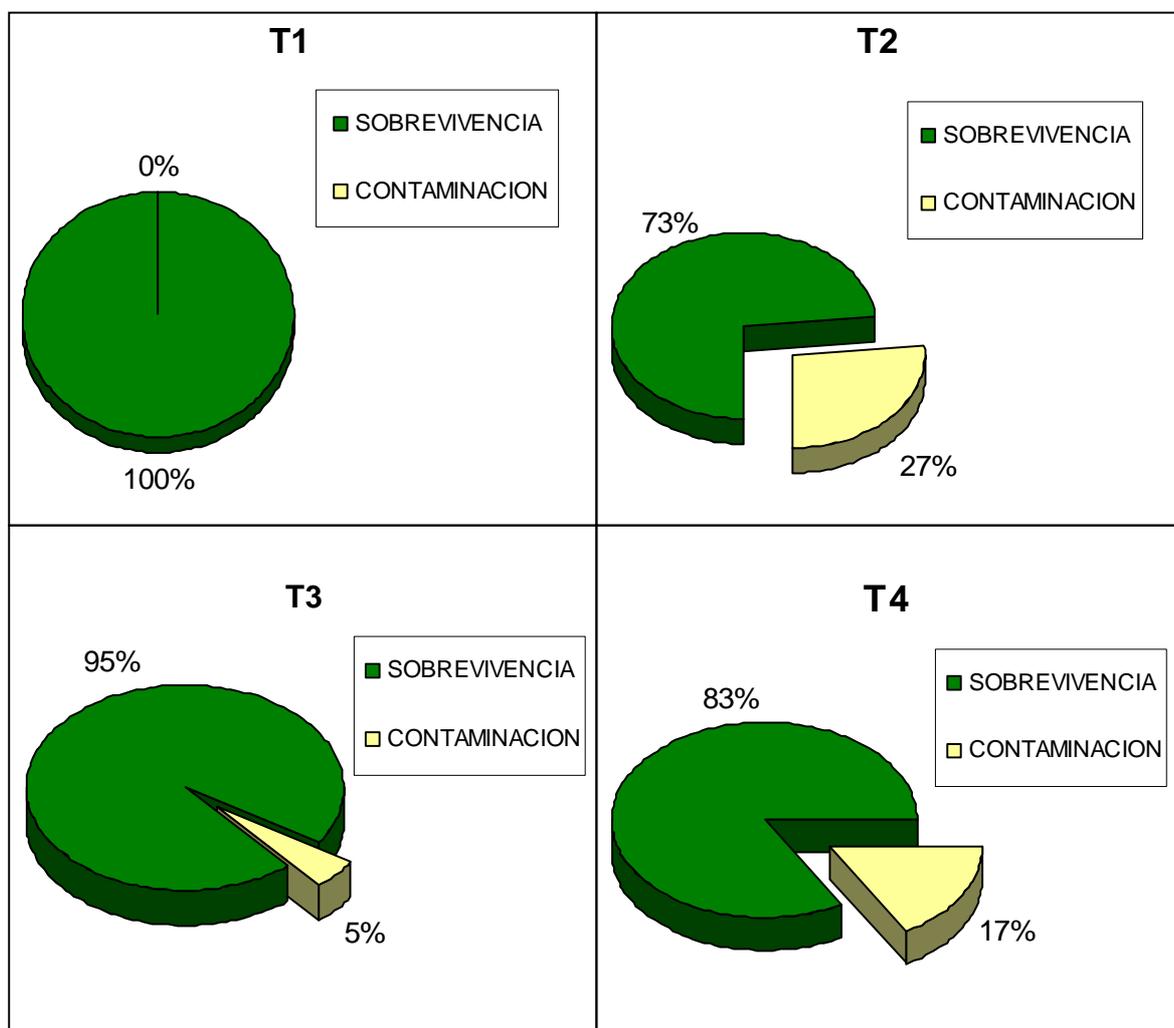
T2: Germinación medio M1 subcultivo luego de homogeneización en medio Líquido

T3: Germinación medio M2 (Miller y Miller) subcultivo luego de homogeneización en medio Sólido

T4: Germinación medio M2 subcultivo luego de homogeneización en medio Líquido

^y Frascos que presentaron regeneración de gametófitos

^z Frascos con gametófitos que sobrevivieron



T1: Germinación medio M1 (Murashige y Skoog) subcultivo luego de homogeneización en medio Sólido

T2: Germinación medio M1 subcultivo luego de homogeneización en medio Líquido

T3: Germinación medio M2 (Miller y Miller) subcultivo luego de homogeneización en medio Sólido

T4: Germinación medio M2 subcultivo luego de homogeneización en medio Líquido

FIGURA 13: Supervivencia de gametófitos de *Platycerium bifurcatum* cultivados *in vitro* bajo diferentes tratamientos, después de 13 semanas de someterse a homogeneización.

2.3. EXPERIMENTO COMPLEMENTARIO PRELIMINAR DE INDUCCIÓN DE LA FASE ESPOROFÍTICA MEDIANTE UTILIZACIÓN DE UNA LÁMPARA INCANDESCENTE EN GAMETÓFITOS CULTIVADOS *in vitro*.

Al utilizar la lámpara incandescente para lograr fertilización de los gametófitos antes de la climatización hubo una tendencia a formar esporófitos en aproximadamente un mes en grandes cantidades. No se tendió a observar contaminación por hongos, algas o musgos ni por otros helechos contaminantes, por lo que se puede deducir que la desinfección del sustrato con agua hirviente tendió a ser bastante eficiente. Aunque no fue posible contabilizar el número de esporófitos su número superó en cada envase los 20 (Figura 14).

Lo anterior coincide plenamente con lo evidenciado por Camloh y Gogala (1992), quienes de igual forma partieron de gametófitos desarrollados *in vitro*, y lograron la aparición de esporófitos luego de un mes de ser plantados en suelo esterilizado.



FIGURA 14: Formación de esporófitos de *Platycerium bifurcatum* al cultivar *in vitro* esporas y la posterior inducción de la fase esporofítica, mediante uso de lámpara incandescente, utilizando envases plásticos bajo cámara húmeda.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En el experimento de germinación de esporas *in vivo* bajo cámara húmeda hubo una tendencia general a la germinación de las esporas ya que el mantener una película de agua bajo las envases (bolsas plasticas) crea condiciones humedad optimas para el desarrollo de los gametófitos al proveerlos de ella por capilaridad. La mejor respuesta tendió a lograrse en los sustratos de turba y arena 1:1; mantillo de hojas y arena 1:1 y arena sola; mientras que el sustrato de humus de lombriz y arena 1:1 no permitió la germinación de las esporas especialmente en el ambiente con sombra de tela de sarán.

La desinfección de los sustratos mediante el uso de vapor de agua no fue suficiente para controlar los patógenos y eliminar las esporas de otros helechos diferentes a *Platyserium bifurcatum*, ya que los esporófitos de los mismos tendieron a aparecer a partir de la semana 12.

La técnica de cultivo *in vivo* de esporas de *Platyserium bifurcatum* en frascos herméticos, aun cuando manifestó una importante germinación inicial, demostró ser poco efectiva debido al escaso control de la humedad del sustrato.

En los frascos de vidrio con diferentes tipos de tapa no fue evidente ninguna tendencia a germinación de esporas de *Platyserium bifurcatum*. En este mismo experimento en los envases sin drenaje se manifestó una tendencia a lograr germinación en los sustratos de mantillo de hojas y arena 1:1 e hidrogel sólo. Hubo una mayor cantidad de esporas germinadas en el sustrato de mantillo de hojas y arena 1:1, el sustrato de hidrogel solo no es aconsejable

dada una baja germinación de las esporas y una marcada tendencia a contaminación con algas.

Los tratamientos previos de escarificación no evidenciaron germinación de las esporas. El tratamiento de remojo en agua evidenció una tendencia baja de germinación cuando las esporas fueron sembradas en envase sin drenaje con sustrato de mantillo de hojas y arena 1:1, pero esto estuvo acompañado de una mayor contaminación de hongos, algas y musgos.

Se manifestó una tendencia a observar alta germinación de esporas al sembrarse estas en envase con drenaje y tapa de vidrio colocado sobre bandeja con agua. En este caso hubo un buen control de la humedad. La desinfección empleada mediante la aplicación de agua caliente demostró ser suficientemente efectiva para la propagación de helechos a partir de esporas. Con esta metodología se lograron obtener esporófitos en 4 meses.

En la primera fase del cultivo *in vitro* de *Platyserium bifurcatum*, el medio de cultivo constituido por las sales básicas de Murashige y Skoog fue significativamente mejor para la germinación y sobrevivencia de las esporas que el medio con las sales básicas de Miller y Miller.

No hubo diferencias muy grandes en cuanto al tiempo de germinación de las esporas entre los dos medios de cultivo a probar.

Los gametófitos tendieron a crecer más densamente y con una coloración más verde en el medio de Murashige y Skoog, así mismo la sobrevivencia fue mayor al usar este último.

En la segunda fase, sólo hubo regeneración en el medio líquido con las sales básicas de Murashige y Skoog, además se observó una alta tendencia a la sobrevivencia de los gametófitos en general. Siendo esta menor en los

medios líquidos que en los sólidos y ligeramente mayor en conjunto en el medio de Murashige y Skoog que el de Miller y Miller.

En el experimento complementario preliminar de este helecho se observó una tendencia a lograr gran cantidad de esporófitos al germinar las esporas asépticamente en el laboratorio durante 8 meses y estimulando la fecundación colocándolos bajo lámpara incandescente y plantándolos en suelo previamente desinfectado con agua hirviente.

Finalmente se concluye que en estas investigaciones pudo obtenerse gran cantidad de plantas de *Platyserium bifurcatum* al cultivarse esporas *in vivo* lográndose obtener esporófitos en 4 meses, mientras que al cultivárseles *in vitro*, al ser necesaria la fertilización con lámpara incandescente, se tendió a alargar el periodo de aparición de los esporófitos. Las esporas cultivadas *in vitro* presentaron mejores condiciones sanitarias y aunque la tendencia fue a lograr buena germinación de esporas y aceptable formación de esporófitos esta cantidad no fue cuantificada en esta investigación.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos de propagación *in vivo* de esporas evaluando el efecto de sustratos y ambientes empleando la técnica del envase con drenaje y tapa de vidrio o la cámara húmeda, desinfectando el sustrato con agua hirviendo o probando con alguna forma más fuerte de desinfección como el autoclave, la estufa o mediante el uso de desinfectantes químicos como el basamid y realizar comparación con el cultivo *in vitro* de esporas.

Es recomendable realizar ensayos en diferentes zonas para verificar el efecto de la temperatura y altura sobre la germinación *in vivo* de las esporas de *Platyserium bifurcatum*.

Debido a la alta contaminación presentada en la siembra *in vitro* de esporas de *Platyserium bifurcatum* es aconsejable revisar la metodología de desinfección de las mismas, así como emprender un plan de tratamiento sanitario preventivo de las plantas madres. Es recomendable emplear medios líquidos para disminuir la contaminación en esta fase.

Es importante evaluar el efecto de la época del año en el estado sanitario de las plantas madres a ser utilizadas tanto en la multiplicación *in vivo* como *in vitro* de esta planta.

La evaluación de otros medios de cultivo citados en la literatura para este helecho además de los utilizados en estos experimentos tales como Knudson y Knop's deberían ser incluidos en futuras investigaciones dentro del laboratorio.

Luego de la homogeneización de los protalos se manifestó poca o ninguna contaminación, debido en parte a la inclusión de antibióticos en el

medio de cultivo por lo que deberían probarse diferentes concentraciones de este y otros antibióticos sólo o en combinación y su posible efecto sobre el desarrollo y morfología del gametófito y además la aparición del esporófito.

Es conveniente también investigar en otros tipos de material vegetal diferente a las esporas para la propagación *in vitro* de esta planta y compararla con la multiplicación *in vivo* por esporas.

Otros aspectos como el crecimiento, desarrollo e identidad genética de las nuevas plantas obtenidas a partir de las diferentes vías de multiplicación tanto *in vivo* como *in vitro* deben ser estudiadas para lograr la mejor forma de propagar esta planta.

Los resultados que sólo son aplicables a *Platyserium bifurcatum* deberían también ser investigados para otros helechos comerciales de difícil multiplicación como el helecho de cuero (*Rumohra adiantiformis*).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alzuru, B. J. 2002. Utilización de diferentes sustratos *in vivo* y de medios sólidos y líquidos *in vitro* para la germinación de esporas del helecho de cuero (*Rumora adiantiformis* G. Forst ching) y del helecho Cacho de Venado (*Platynerium bifurcatum* C. Chr.). Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Departamento de Agronomía. 88 p.

Atehortúa, L.; López, M. L. y Pizano de M., M. 1999. Follajes. Colombia. Santa Fe de Bogotá. Ediciones Hortitecna Ltda. pp.3-6.

Benczur, J.; Csillag, A.; Riffer, M. y Csizmadia, G. 1995. *In vitro* regeneration and propagation of *Platynerium bifurcatum*. *Acta Agronomica Hungarica*. 43 (1/2): 59-66.

Borelli, F.; Castro, C.; Mathes, L. y Tambolato, A. 1990. Propagacao de Pteridofitas *in vitro* e *in vivo* a través de esporos. *Bragantia*. Brasil. 4 (2): 205-209.

Botany.com [en línea]. Dirección url: <http://www.botany.com/rumohra.html> [Consulta: May 2004].

Bourne, R. 1994. The development of a program of commercial production of staghorns from plant tissue culture. *International Plant Propagators Society: Combined Proceedings*. 44: 90-93.

Boyd, P. J.; Hall, J. y Cove, D. J. 1988. An airlift fermenter for the culture of the moss *Physcomitrella patens*. In: Glime, J. M (ed). Method in bryology. Proc. Bryol Methods. Workshop. Mainz. pp. 41-45.

Camloh M. y Gogala N. 1992. *in vitro* culture of *Platycerium bifurcatum* gametophytes. *Scientia Horticulturae*. 51: 343-346.

Camloh M.; Gogala N. y Rode, J. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platycerium bifurcatum in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 56(3): 257-266.

Camloh, M.; Ravnkar, M. y Zel, J. 1996. Jasmonic acid promotes division of fern protoplasts, elongation of rhizoids and early development of gametophytes. *Physiologia Plantarum*. 97: 659-664.

C-fern web manual. [en línea]. Dirección URL: <http://Cfern.bio.utk.edu/manual> [consulta: Junio 2004].

Chin, W.Y. 1998. Ferns of the tropics. Portland, Oregon USA. Timber press. 190 p.

Constantino, C. 1995. Micropropagation from *Platycerium alcicorne* spores. *Colture Protette*. 24 (1): 79-81.

Cooke, R.C. 1979. Homogenization as an aid in tissue culture propagation of *Platycerium* and *Davallia*. *HortScience*. 14(1):21-22.

Dolinsek, J.A. y Camloh M. 1997. Gametophytic and sporophytic regeneration from bud scales of the fern *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. *In vitro*. *Annals of Botany*. 80: 23-28.

Dolinsek, J.A.; Camloh M. y Zel, J. 1999. Plant regeneration from scales of the Fern *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. *Phyton*. 39: 297-300.

Dyer, A. 1979. The culture of Fern gametophytes for experimental investigation. Londres, Academic press. pp 253-305.

Emmons, H. 1997. Propagating ferns from spores. *Horticulture*. 94: 34-35.

Fernandez, H.; Bertrand, A.M. y Sánchez-Tamés, R., 1993. *in vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. *Scientia Horticulturae*. 56:71-77.

Fernandez, H.; Bertrand, A.M. y Sánchez-Tamés, R., 1997. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes. *Scientia Horticulturae*. 68: 243-247.

Fernandez, H.; Bertrand, A.M. y Sánchez-Tamés, R. 1999. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56:211-214.

Floridata. [en línea]. Dirección url: <http://www.floridata.com> [Consulta: Septiembre 2003].

Furelli, L. y García, E. 1986. Regeneración de plantas a partir de explantes foliares del helecho *Pteris cretica* "Winsettii". *Agronomía Tropical*. 37(1-3): 19-30.

Hartman, H.T. y Kester, D.E. 1994. Propagación de plantas, principios y prácticas. 3^{ra} reimpresión de la segunda edición. México, Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. p. 94.

Hennen G.R. y Sheehan T.J. 1978. *In vitro* propagation of *Platyserium stemaria* (Beauvois) Desv. *Hort Science*. 13: 245.

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

Hoagland, H. y Arnon, D. 1950. The water culture method of growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, circular 347.

Hvoslef-Eide, A. 1992. Influence of nitrogen fertilization to mother plants and the subsequent growth of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott and *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. *in vitro* explants. *Gartenbauwissenschaft* (Noruega). 57 (6): 292-297.

Janssen, J. y Sepelie, M. 1989. *in vitro* multiplication of *Blenchnum* spp. and *Pellaea rotundifolia* (Forst.) Hook by homogenization. *Scientia Horticulturae*. 38:161-164.

Jones, D. 1987. *Encyclopaedia of ferns*. Portland. Editorial Timber press. 433 p.

Kwa, S.; Wee, Y. y Kumar, P. 1995. Role of ethylene in the production of sporophytes from *Platyserium coronarium* (Koenig) Desv. frond and rhizome pieces cultured *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation*. 14(4) 183-189.

Lindorf, H.; Parisca, L. y Rodríguez, P. 1991. *Botánica: clasificación, estructura, reproducción*. 2 ed. Venezuela. Caracas. Ediciones de la biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. 584 p.

Marie Selby Botanical Gardens. [en línea]. Dirección url: <http://www.selby.org/index.htm> [Consulta: Junio 2003].

Márquez, B. C. 2003. Propagación *in vitro* e *in vivo* del helecho Cacho de Venado (*Platycerium bifurcatum*). Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Departamento de Agronomía. 70 p.

Micropropagation of ferns. [en línea]. Dirección url: http://www.geocities.com/sagey_ph/figure1to2.html [Consulta: Marzo 2004].

Miller, J.H. y Miller, P.M., 1961. The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of the gametophyte of the fern *Onoclea sensibilis*. American Journal of Botany. 48:154-159.

Moore G. T. 1903. Methods for growing pure cultures of algae. J. Appl. Microsc. 6:2309-2314.

Morini, S. 2000. *in vitro* culture of *Osmunda regalis* fern. Journal Of Horticultural Science and Biotechnology. 75(1): 31-34.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annu. Rev. Plant physiol. pp. 25-135.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

Nakamura, M. y Maeda, M. 1995. Gametophytes derived from sporophytic tissue in a fern, *Lygodium japonicum* L. Induction of the gametophytes and their protoplast isolation. Journal of Plant Physiology. 145(1-2): 185-188.

Pangua, E.; Lindsay, S. y Dyer, A. 1994. Spore germination and gametophyte development in three species of *Asplenium*. *Annals of botany*. 73(6):587-593.

Plumbridge, J. 1976. How to propagate plants. Melbourne, Australia. Lothian Publishing Company Pty. Ltd. pp. 144-147.

Propagating ferns from spores. [en línea]. Dirección url: <http://www.users.bigpond.com/glenyakimoff/index.html> [Consulta: Marzo 2004].

Protejamos el bosque seco tropical del huallaga, Hábitat del helecho *Platycerium andinum* [en línea]. Dirección url: http://www.geocities.com/platycerium_andinum/index.html [consulta: Marzo 2004].

Roca, M. y Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 969 p.

Sheffield, E.; Douglas, G.E. y Cove, D.J. 1997. Growth and development of fern gametophytes in an airlift fermenter. *Plant Cell Reports*. 16(8): 561-564.

Staghorn fern. [en línea]. Dirección url: <http://hort.ifas.ufl.edu/gt/index.htm> [Consulta: Octubre 2003].

Teng, W. 1997. Activated charcoal affects morphogenesis and enlaces sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platycerium bifurcatum*. *Plant Cell Reports*. 17: 77-83.

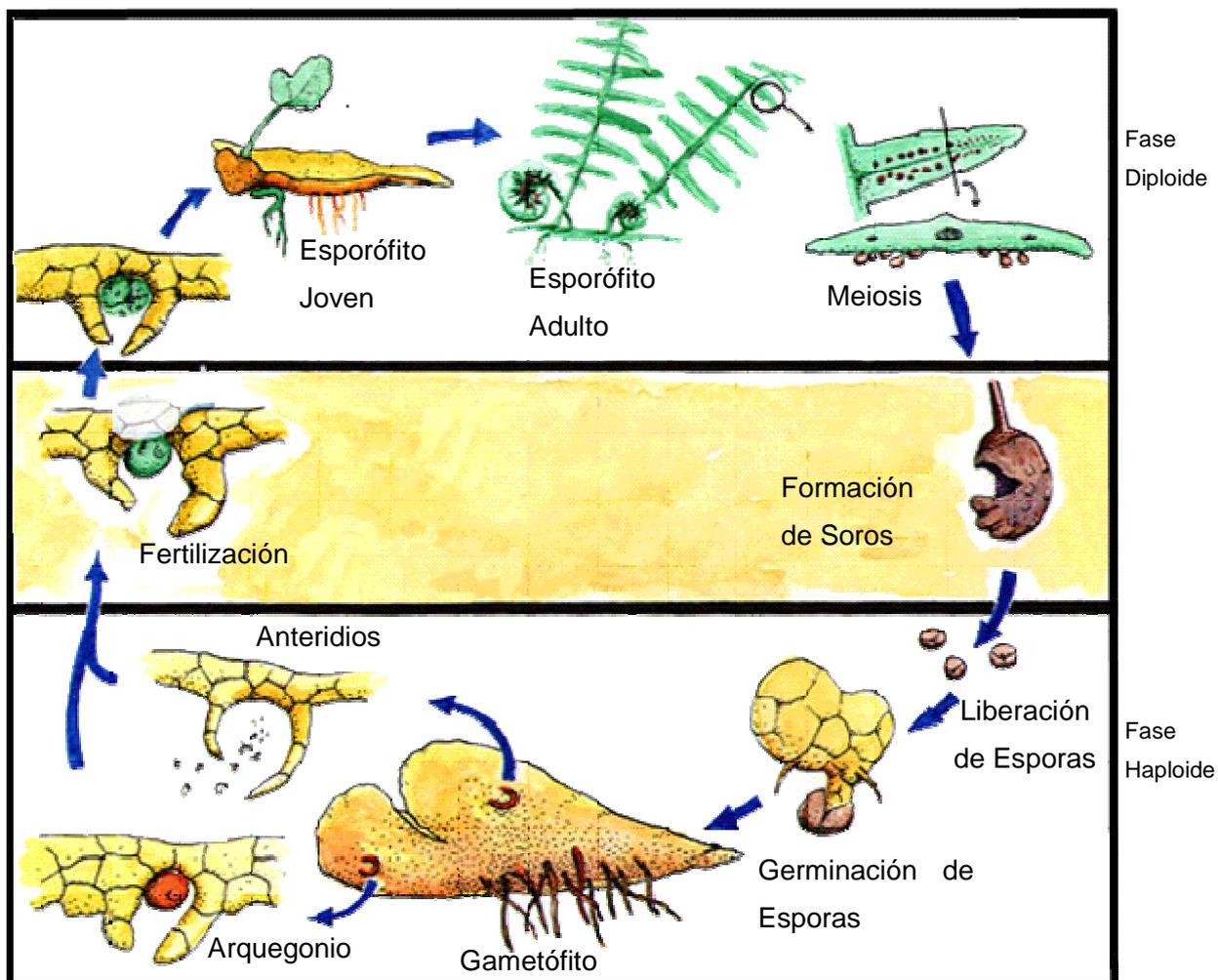
Teng, W. y Teng, M. 2000. The impact of a pulse treatment of penicillin-G and streptomycin sulfate on sporophyte regeneration of *Platyserium bifurcatum*. Plant Cell Reports. 19: 345-350.

The Platyserium site. [en línea]. Dirección url: <http://www.platyserium.co.za/> [Consulta: Marzo 2004].

Universidad de Florida. [en línea]. Dirección url: <http://www.edis.ifas.ufl.edu/> [Consulta: Marzo 2003].

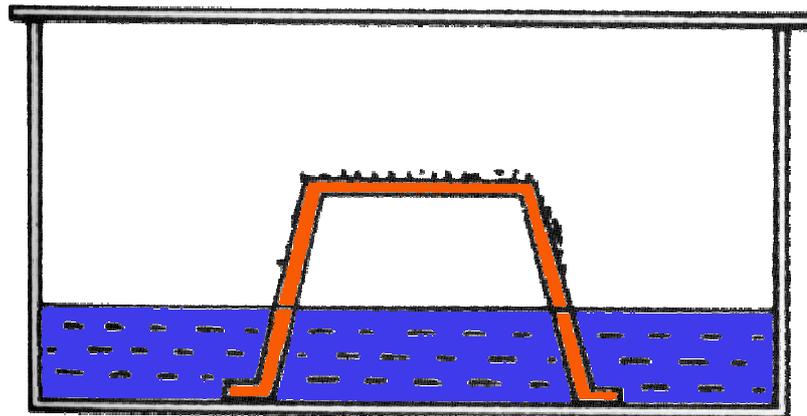
ANEXOS

ANEXO 1: Ciclo de vida típico de los helechos.



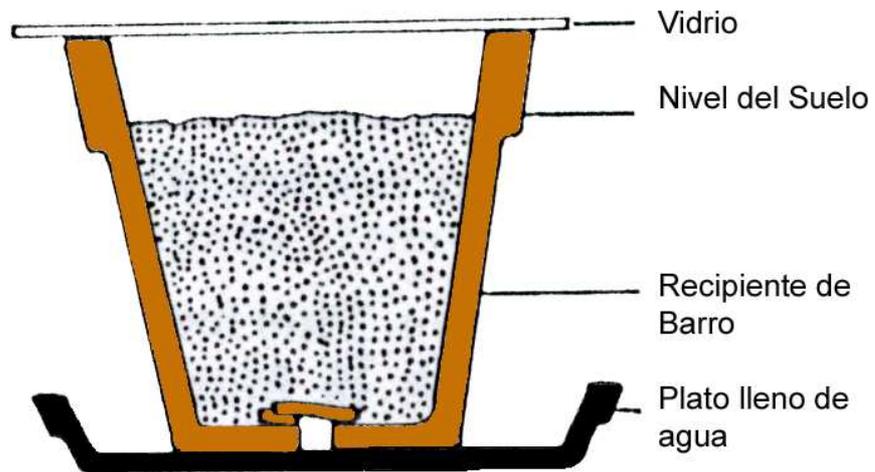
Fuente: Botany.com, 2004.

ANEXO 2: Cultivo de esporas *in vivo* sobre recipiente de barro invertido, colocado dentro de frasco hermético de vidrio.



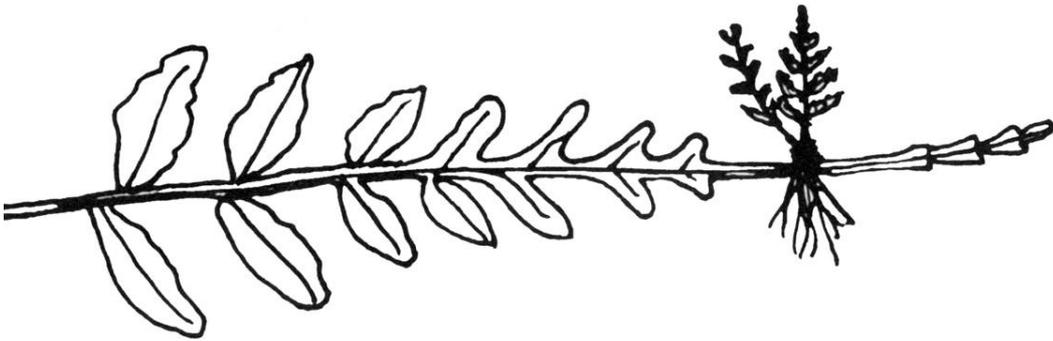
Fuente: Chin, 1998.

ANEXO 3: Cultivo de esporas de *Platycerium bifurcatum* in vivo en recipiente de barro con drenaje, colocado sobre bandeja con agua y cubierto con vidrio.



Fuente: Chin, 1998.

ANEXO 4: Plántulas de *Asplenium tenerum* desarrolladas en el extremo de las frondas.



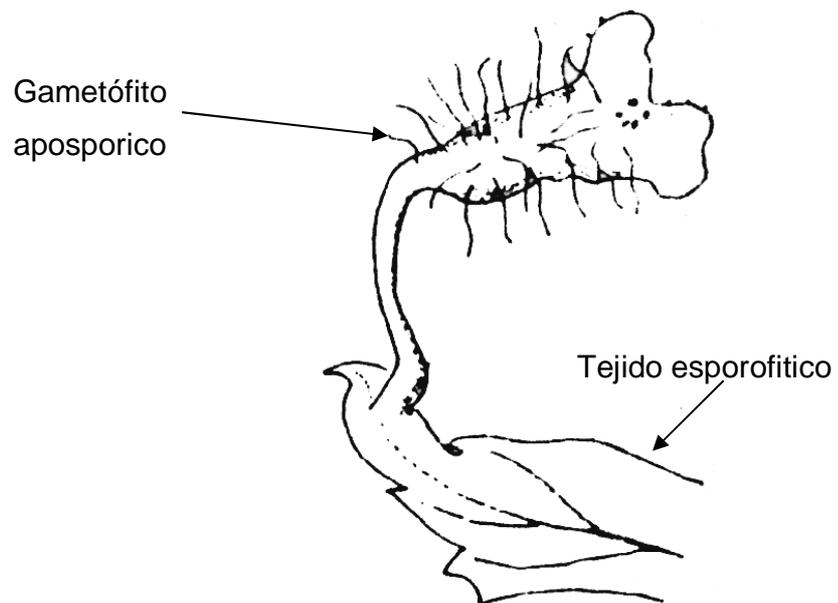
Fuente: Chin, 1998.

ANEXO 5: Plántulas de *Nephrolepis cordifolia* mostrando tubérculos subterráneos.



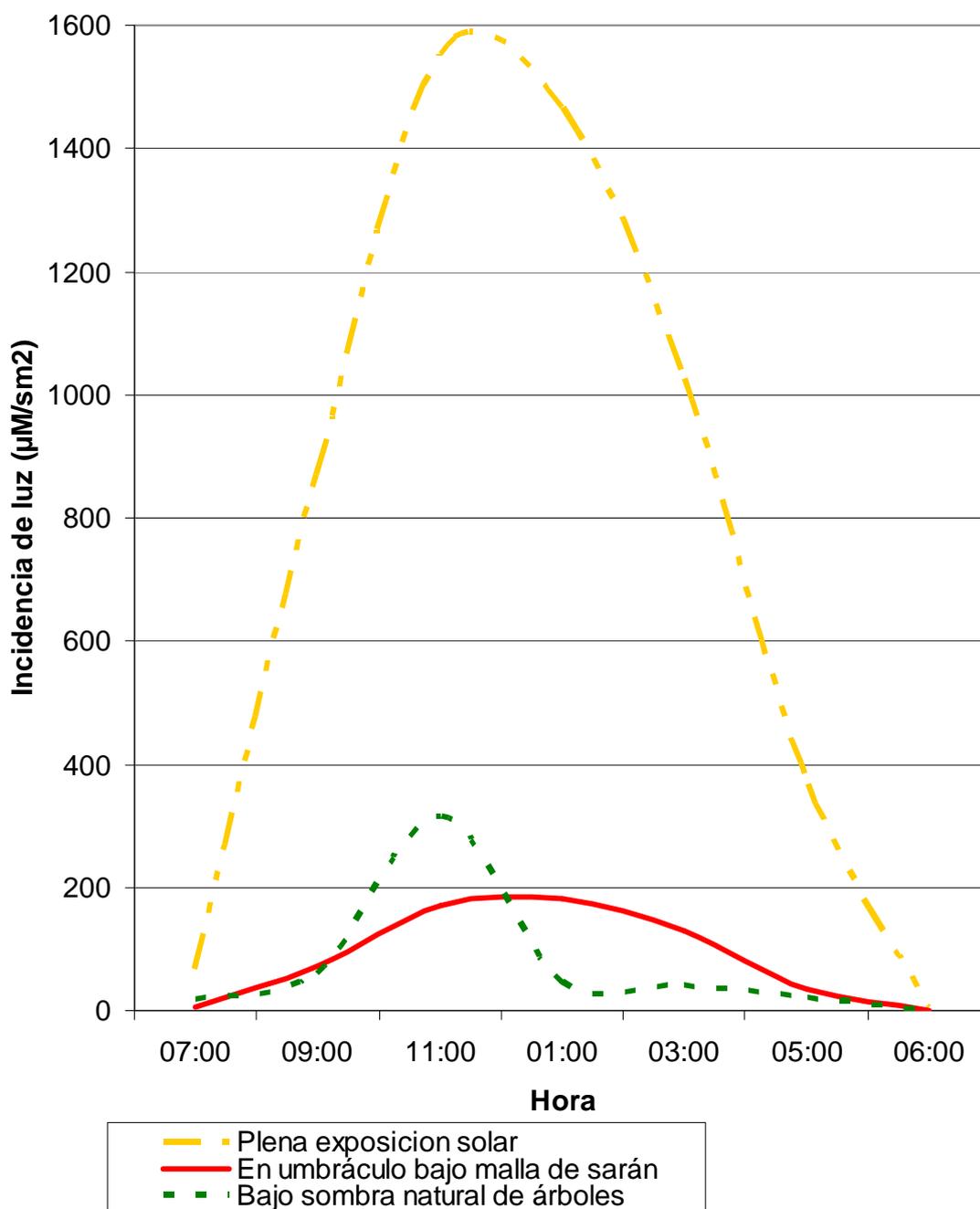
Fuente: Chin, 1998.

ANEXO 6: Detalle de la aposporia en *Polystichum setiferum*.

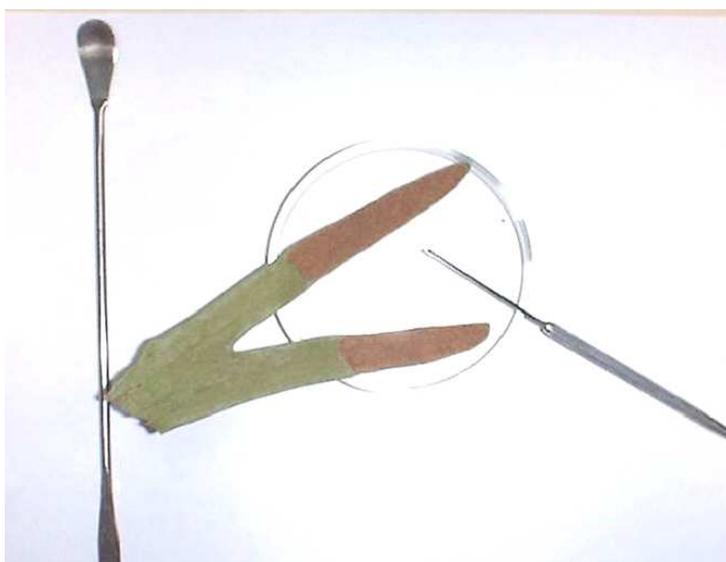


Fuente: Jones, 1987.

ANEXO 7: Rango de incidencia lumínica (curva par) a lo largo del día (14/12/2004) en los dos ambientes (malla de sarán y sombra natural de árboles) utilizados en la propagación *in vivo* de *Platyserium bifurcatum*, así como a pleno sol en el Área de Propagación Controlada de la Facultad de Agronomía, U.C.V.



ANEXO 8: Extracción de las esporas de la fronda de *Platycerium bifurcatum* para ser implantados *in vivo* e *in vitro*.



ANEXO 9: Composición de las sales básicas usadas en experimentos de multiplicación *in vitro* de *Platyserium bifurcatum*.

	Murashige y Skoog*	Miller y Miller*
KNO ₃	1900	200
KH ₂ PO ₄	170	200
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	200
NH ₄ NO ₃	1650	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	-
(CaNO ₃)4H ₂ O	-	800
KL	0,83	-
H ₃ BO ₃	6,20	-
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,30	-
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,60	-
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	-
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	-
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,80	-
Na ₂ EDTA	37,30	-
CoCL ₂ . 6H ₂ O	0,025	-

*Mg/L

Fuente: Murashige y Skoog (1962); Miller y Miller (1961)

ANEXO 10: Equipos y detalles técnicos usados en la homogeneización de protalos de *Platyserium bifurcatum*.



ANEXO 11: Aparición de esporófitos de *Platyserium bifurcatum* en envase plástico sin drenaje, donde las esporas habían sido tratadas previamente a la siembra por remojo en agua.



ANEXO 12: Prueba de Fisher utilizada al analizar la germinación de esporas de *Platyserium bifurcatum* 7 semanas después de sembradas.

	NO GERMINÓ	GERMINÓ	TOTAL
M1	3	25	28
M2	12	16	28
TOTAL	15	41	56

Ho: Son iguales los niveles de germinación para los dos medios evaluados.

Ha: No son iguales los niveles de germinación.

Si $p > 0,05$ no se rechaza la Ho.

$p = 0,0141$

Para la prueba de Fisher el valor p fue de 0,0141, por lo tanto se rechaza la Ho, lo cual significa que los niveles de germinación en los dos medios son diferentes.

ANEXO 13: Prueba de Fisher utilizada al analizar la sobrevivencia de esporas de *Platyserium bifurcatum* 16 semanas despues de sembradas.

	SOBREVIVIÓ	NO SOBREVIVIÓ	TOTAL
M1	20	8	28
M2	9	19	28
TOTAL	29	27	56

Ho: Son iguales los niveles de germinación para los dos medios evaluados.

Ha: No son iguales los niveles de germinación.

Si $p > 0,05$ no se rechaza la Ho.

$p = 0,00069$

Para la prueba de Fisher el valor p fue de 0,00069, por lo tanto se rechaza la Ho, lo cual significa que los niveles de sobrevivencia en los dos medios son diferentes