

## MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DEL HELECHO CACHO DE VENADO (*Platyserium bifurcatum* (CAV.) C. CHR.) MEDIANTE HOMOGENEIZACIÓN DE GAMETOFITOS

José Gómez<sup>1</sup>, Josefina Páez de Casares<sup>1</sup>, Judith García Bolívar<sup>2</sup> y Angélica Chávez Rojas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Área de Propagación Controlada. Facultad de Agronomía, Instituto de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua, Venezuela. joseangelgomezllaca@gmail.com.

<sup>2</sup>Instituto de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua. Venezuela.

### COMPENDIO

Partiendo de esporas, varios ensayos fueron realizadas para mejorar la propagación *in vitro* de *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. En este estudio las esporas fueron desinfectadas y sembradas en los medios modificados de Murashige y Skoog (1962) o Miller y Miller (1961), solidificados con 0,6% de agar y 4% de sacarosa. Al formarse los gametofitos se homogeneizaron en una licuadora en los mismos medios en que estaban pero en estado sólido o líquido; ambos medios se incubaron en un cuarto climático con condiciones ambientales controladas a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y 16 h de iluminación a  $2 \mu\text{Ms}^{-1} \text{m}^{-2}$ . Murashige y Skoog (1962) fue significativamente mejor para la germinación de esporas de *P. bifurcatum* que Miller y Miller (1961). Solo los gametofitos homogeneizados en el medio líquido de Murashige y Skoog (1962) se regeneraron. No se observó aparición de la fase esporofítica ocho meses más tarde. Se realizó una prueba complementaria con gametofitos desarrollados *in vitro*, tratando de inducir la fase esporofítica exponiéndolos por 24 h a la luz de una lámpara incandescente y plantándolos luego en sustrato esterilizado bajo cámara húmeda; y fue posible constatar formación de esporofitos luego de transcurrido un mes. La multiplicación de gametofitos *in vitro* mediante homogeneización en medio líquido de Murashige y Skoog (1962) fue efectiva y presentó pocos problemas sanitarios.

### PALABRAS CLAVE

*Platyserium bifurcatum*, *in vitro*, homogeneización, gametofitos, esporofitos.

Recibido: 24/05/15

Aceptado: 11/04/16

## IN VITRO MULTIPLICATION OF THE STAGHORN FERN (*Platycerium bifurcatum* (CAV.) C. CHR.) BY GAMETOPHYTES HOMOGENEIZATION

### ABSTRACT

Several trials starting from spores were made to improve the *in vitro* propagation of *Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. Spores were disinfected and sown in modified media of Murashige and Skoog or Miller and Miller, solidified with 0.6% agar and 4% sucrose. When formed the gametophytes were homogenized in a blender in the same media in which they were, but in solid or liquid state, both media were incubated in a climate room with environmental conditions controlled at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  and 16 h light at  $2 \mu\text{Ms}^{-1} \text{m}^{-2}$  Murashige y Skoog (1962) medium was significantly better for the germination of spores of *P. bifurcatum* than Miller y Miller (1961). There was a tendency to regenerate the gametophytes after homogenization in Murashige and Skoog (1962) liquid medium. There was no occurrence of the sporophytic phase eight months later. An additional test was performed with *in vitro* developed gametophytes, trying to induce sporophytic phase by exposing them to a light of an incandescent lamp for 24 h, and then planting on sterilized substrate in a humid chamber. In this case it was possible to detect formation of sporophytes after one month. The *in vitro* gametophyte multiplication by homogenization in liquid medium was effective with few sanitary problems.

### KEY WORDS

*Platycerium bifurcatum*, *in vitro*, homogenization, gametophytes, sporophytes.

### INTRODUCCIÓN

La vida vegetal terrestre primitiva está relacionada a la aparición de los helechos, los cuales tienen un ciclo de vida haplo-diplonte; esto implica la producción de esporas microscópicas y resistentes a condiciones adversas, que al germinar en un medio adecuado generan un gametofito haploide, del cual surgen gametas masculinas y femeninas que al unirse originan el esporofito o forma conspicua de los helechos (Camloh y Gogala 1992, Cooke 1979, Fernández y Revilla 2003). Las esporas son muy pequeñas (30-80  $\mu\text{m}$ ), a la vez que son producidas en cantidades muy grandes, por lo que constituyen un material de propagación muy abundante, sin que su obtención afecte en forma negativa al material parental

(Chin 1998, Martínez 2010). Por otro lado, las variaciones genéticas respecto a la planta que le dio origen cuando se propagan helechos a través de esporas son escasas, por lo que la propagación a través de estas estructuras permite la obtención de grandes cantidades de plantas de buena calidad para los viveros. Sin embargo, este tipo de propagación es más lento que el método tradicional por separación de hijos (Hartman y Kester 1994).

La homogeneización de gametofitos es una técnica que consiste en realizarles cortes finos a estos mediante el uso de una licuadora esterilizada u otro dispositivo similar. Los gametofitos cortados se regeneran, ya que cada fracción del mismo tiene la capacidad eventualmente de volver a formarse con todas sus estructuras, siendo completamente funcional (Fernández y Revilla 2003). De esta forma, pueden multiplicarse plantas de helecho partiendo de unos pocos gametofitos y de una manera muy económica (Cooke 1979).

Numerosos experimentos han sido realizados con la finalidad de emplear y mejorar la técnica de homogenización para diversos helechos, entre los que pueden mencionarse *Blenchum* spp., *Pelaea rotundifolia* (Forst.), *Asplenium nidus*, *Pteris ensiformis* y *Osmunda regalis*, entre otros (Janssen y Sepelie 1989, Fernández *et al.* 1993, Fernández *et al.* 1997, Fernández *et al.* 1999).

El helecho cacho de venado (*Platycterium bifurcatum* (Cav.) C. Chr.), es la especie más conocida y difundida del género, la cual es comúnmente usada como planta ornamental. Posee una excepcional belleza y elevado costo en los mercados nacionales e internacionales. Con los métodos convencionales de separación de brotes se consiguen tasas de multiplicación bajas. Algunos estudios se han llevado a cabo con esta planta para mejorar su multiplicación mediante técnicas de cultivo *in vitro*, empleando homogeneización de gametofitos (Cooke 1979, Alzuru 2002, Fernández y Revilla 2003, Márquez 2003).

El objetivo de este trabajo fue mejorar la propagación masiva de *P. bifurcatum* mediante la germinación *in vitro* de esporas y el desarrollo de gametofitos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Al presentar los esporangios un grado de madurez adecuado, denotado por un cambio de coloración a castaño oscuro, se recolectaron las esporas de plantas madres de *P. bifurcatum* cultivadas en el Área de Propagación Controlada del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Agronomía de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Núcleo Maracay. El exceso de material vegetal fue eliminado y las esporas aún adheridas a las frondas, se

lavaron con agua y jabón por 10 min, se expusieron a luz ultravioleta (5 min) y desinfectaron (etanol por 30 seg, Vitavax® por 3 min e hipoclorito de sodio al 5,25% por 5 min). Una vez realizada esta primera desinfección, las esporas fueron separadas de la fronda mediante raspado con bisturí. Se desinfectaron por segunda ocasión, pero en cámara de flujo laminar dentro de un tubo de ensayo con hipoclorito de sodio al 2,62% por 5 min y enjuagaron con agua destilada, desionizada y estéril (ADDE). El experimento se llevó a cabo en dos fases, una primera fase de germinación de esporas y una segunda fase de homogeneización de gametofitos.

### GERMINACIÓN DE ESPORAS

Una vez desinfectadas las esporas, se colocaron 0,06 g de éstas (cantidad aproximada de esporas que se toman con una espátula de laboratorio y que son suficientes para cubrir un frasco de cultivo) para su germinación en frascos con 30 ml de uno de los medios de cultivo que constituían los tratamientos para la primera fase (Tabla I). Luego de esto se llevaron a un cuarto climático bajo condiciones controladas ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y 16 horas de iluminación a  $2 \mu\text{Ms}^{-1}\text{m}^{-1}$ ), se observaron por 16 semanas para evidenciar la germinación y formación de los gametofitos que debían someterse a homogeneización. El diseño estadístico usado fue completamente aleatorizado con dos tratamientos, veintiocho repeticiones y un frasco como unidad experimental.

Tabla I. Medios de cultivo utilizados en la fase de germinación *in vitro* de esporas de *P. bifurcatum*.

Componentes	Medio de Murashige y Skoog (1962)	Medio de Miller y Miller (1961)
<b>Macro nutrientes (mg/l)</b>		
KNO <sub>3</sub>	1900	200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	200
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	200
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	-
(CaNo <sub>3</sub> )4H <sub>2</sub> O	-	800
<b>Micro nutrientes (mg/l)</b>		
KI	0,83	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	-

Tabla I. Continuación.

Componentes	Medio de Murashige y Skoog (1962)	Medio de Miller y Miller (1961)
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	-
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,03	-
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	-
CoCL <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,03	-
Sacarosa (%)	4	4
Agar (%)	0,6	0,6
pH	5,5	5,5

#### HOMOGENEIZACIÓN DE GAMETOFITOS

Se seleccionaron los frascos con gametofitos en mejores condiciones de desarrollo, removiéndoles el agar adherido. Fue utilizada una licuadora estándar de uso doméstico (esterilizada) para homogeneizar los gametofitos, repartiéndolos en cuatro lotes en función del tratamiento; éste consistió en un nuevo subcultivo en medio nutritivo igual al de la fase precedente, pero en la mitad de los casos, los medios no estaban solidificados con agar (medios líquidos en agitación) y en la otra mitad sí estaban solidificados. Al momento de la homogeneización, todos los medios de cultivo en esta segunda fase se calentaron a 40°C, ya que el agar se mantiene líquido a esa temperatura, y esta condición es indispensable para poder homogeneizarlos. Los medios de cultivo para este subcultivo fueron los mismos que los usados en la fase de germinación de las esporas, pero con la adición de vitaminas y un antibiótico. Se homogeneizaron por 5 seg tomándose alícuotas de 10 ml para implantarse en cada frasco, luego fueron colocados en el cuarto climático con las mismas condiciones bajo las que habían venido desarrollándose en la primera fase. El diseño estadístico usado fue completamente aleatorizado con cuatro tratamientos (Tabla II) y veinte repeticiones siendo un frasco la unidad experimental.

En la primera fase se observaron durante 16 semanas las variables: tiempo de germinación y sobrevivencia de las esporas por frasco. Para la segunda fase fueron observadas durante 13 semanas las variables: regeneración y

sobrevivencia del gametofito. Se empleó la prueba de Fisher para determinar la significación de la diferencia entre los tratamientos evaluados. El software estadístico empleado fue el Statistix, versión 8.

Tabla II. Tratamientos empleados para la homogeneización de gametofitos de *P. bifurcatum* cultivados in vitro.

Componentes	Tratamiento			
	T1	T2	T3	T4
Medio de cultivo <sup>1</sup>	MS	MS	MM	MM
Tiamina-HCl (mg/l)	0,4	0,4	0,4	0,4
Inositol (mg/l)	100	100	100	100
Sacarosa (%)	4	4	4	4
Agar (%)	0,6	0	0,6	0
Oxitetraciclina (mg/l)	2,5	2,5	2,5	2,5
pH	5,5	5,5	5,5	5,5

**Leyenda:** <sup>1</sup>Medio de cultivo empleado en la fase previa de germinación de las esporas; *MM*: Miller y Miller (1961); *MS*: Murashige y Skoog (1962).

#### PRUEBA COMPLEMENTARIA DE INDUCCIÓN DE LA FASE ESPOROFÍTICA EN GAMETOFITOS CULTIVADOS *IN VITRO*.

Al finalizar los ensayos anteriores se dejaron los frascos por 8 meses. Con tres de estos frascos fue realizado un experimento complementario para inducir la fase esporofítica con gametofitos que habían estado creciendo *in vitro* y que presentaban un grado de desarrollo óptimo. Una vez eliminado el agar, se colocaron en una cápsula de Petri y se cubrieron con ADDE, luego fueron expuestos a luz bajo una lámpara incandescente de 40 W (distancia de 30 cm) durante 24 h para estimular la liberación de células anterzoidales y una posterior fecundación de las células arquegoniales. Luego se tomaron porciones de 5 g para plantarlos en envases plásticos de 100 ml que contenían turba desinfectada, colocándose bajo cámara húmeda. Así mismo, se mantuvo una película de agua debajo de los envases para que la misma ascendiera a los gametofitos por capilaridad. Semanalmente se les asperjó agua para fomentar la fertilización que no tuvo oportunidad de ocurrir bajo la lámpara. Las cámaras húmedas con los gametofitos estuvieron colocadas en un sombreadero bajo tela de sarán ( $100-200 \mu\text{M s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). Se observó el tiempo y aparición de la fase esporofítica por envase plástico en vivero.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### SIEMBRA DE ESPORAS

La germinación ocurrió en proporción mayor para el medio Murashige y Skoog (1962), siendo la diferencia entre los dos medios estadísticamente significativa a las siete semanas después de la siembra ( $p = 0,0141$ ) utilizando la prueba de Fisher, lo que demuestra que Murashige y Skoog es un medio de cultivo mejor para la germinación de esporas de *P. bifurcatum*. En cuanto al tiempo de germinación hubo una tendencia a iniciarse a las cinco semanas en forma simultánea para los dos medios (Tabla III). Cualitativamente pudo evidenciarse que en Murashige y Skoog hubo tendencia a presentar mayor densidad de gametofitos, distribuidos sobre el medio de forma más homogénea, así como una coloración verde más oscura (Fig 1).

Los niveles de sobrevivencia fueron mayores para Murashige y Skoog, siendo esto estadísticamente significativo a las 16 semanas ( $p = 0,00069$  para la prueba de Fisher), por consiguiente los mayores niveles de contaminación se presentaron para Miller y Miller (1961) en el tiempo de evaluación de la germinación. Aplicando la prueba de diferencia de proporciones efectuada a la séptima semana, se encontró que la proporción de germinación fue mayor para Murashige y Skoog ( $p = 0,0158$ ) y la de sobrevivencia también fue mayor en ese medio, aunque  $p = 0,0550$  es ligeramente mayor que el nivel de significación escogido. En las semanas posteriores no se observó cambio en estas proporciones (Tabla III).

Luego de siete semanas de cultivo se había alcanzado el máximo de germinación de las esporas en ambos medios; esto coincide con los resultados expresados por Camloh y Gogala (1992), quienes obtuvieron gametofitos listos para ser plantados en suelo estéril tras dos meses de cultivo en medio Miller y Miller líquido. Por otro lado, Khan y Kayani (2008) lograron germinar y desarrollar esporas de *Asplenium nidus* en un medio modificado de Murashige y Skoog.

Tabla III. Germinación y sobrevivencia de gametofitos de *Platyserium bifurcatum* cultivados *in vitro* a partir de esporas en diferentes medios de cultivo durante 16 semanas.

Semana	Germinación						Sobrevivencia					
	MS		MM		MS		MS		MM		MS	
	NG	PG	NG	PG	NS	PS	NS	PS	NS	PS	NS	PS
1	0	-	0	-	26	93,00	27	96,00				
2	0	-	0	-	26	93,00	21	75,00				
3	0	-	0	-	26	93,00	21	75,00				
4	0	-	0	-	26	93,00	21	75,00				
5	3	11,00	2	7,00	25	89,00	18	64,00				
6	15	54,00	12	43,00	25	89,00	18	64,00				
7	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
8	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
9	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
10	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
11	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
12	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
13	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
14	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
15	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				
16	25	89,00	16	57,00	25	89,00	18	64,00				

**Leyenda:** MS: Medio de Musahigue y Skoog (1962); MM: Medio de Miller y Miller (1961); NG: Número de frascos que presentaron germinación de gametofitos; PG: Porcentaje de frascos que presentaron germinación de gametofitos; NS: Número de frascos en los que se evidenció sobrevivencia; PS: Porcentaje de sobrevivencia.





Fig 1. Gametofitos de *Platycerium bifurcatum* obtenidos por germinación *in vitro* de esporas en dos medios de cultivo (izquierda: Miller y Miller (1961); derecha: Murashige y Skoog(1962), a las 16 semanas después de sembradas.

#### HOMOGENEIZACIÓN DE GAMETOFITOS

Transcurridas seis semanas de cultivo se comenzó a evidenciar la regeneración de los gametofitos en T2, formándose agregados esféricos de color verde oscuro similares a los vistos por Somer *et al.* (2009) o Liao y Wu (2011); en el resto de los tratamientos no se observó regeneración de los tejidos. Se apreció una tendencia a que los gametofitos sobrevivieran en todos los tratamientos, aunque menor en los medios líquidos (T2 y T4) que los sólidos (T1 y T3) (Tabla IV). Quizás esto fue debido a que en fase líquida los medios en constante agitación poseen mayores niveles de oxigenación, lo cual podría resultar adverso al desarrollo de patógenos anaerobios. Resultados semejantes pero en *Musa* spp. fueron obtenidos por Colmenares y Giménez (2003), quienes lograron mayores tasas de multiplicación y peso fresco al cultivar en medios líquidos en contraposición a lo obtenido al cultivar en medio sólido.

En esta fase no se observó formación de esporofitos ni oxidación del material homogeneizado, tal y como lo describieron Hennen y Sheehan (1978). Sin embargo, pudo constatar 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).

Tabla IV. Regeneración y sobrevivencia de gametofitos de *Platyserium bifurcatum* cultivados *in vitro* durante 13 semanas después de ser homogeneizados.

Semana	Regeneración*				Sobrevivencia**			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	0	0	0	0	100	81,81	86,36	86,36
2	0	0	0	0	100	81,81	86,36	86,36
3	0	0	0	0	100	81,81	86,36	86,36
4	0	0	0	0	100	63,63	81,81	86,36
5	0	0	0	0	100	63,63	81,81	86,36
6	0	22,72	0	0	100	63,63	81,81	81,81
7	0	36,36	0	0	100	63,63	81,81	81,81
8	0	50,00	0	0	100	63,63	81,81	77,27
9	0	50,00	0	0	100	63,63	81,81	77,27
10	0	63,63	0	0	100	63,63	81,81	77,27
11	0	63,63	0	0	100	63,63	81,81	72,72
12	0	63,63	0	0	100	63,63	81,81	72,72
13	0	63,63	0	0	100	63,63	81,81	72,72

**Leyenda:** \* Porcentaje de frascos que presentaron regeneración de gametofitos; \*\* Porcentaje de frascos con gametofitos que sobrevivieron al proceso de homogeneización; *T1* Germinación en Murashige y Skoog (1962) y subcultivo luego de homogeneización en medio sólido; *T2* Germinación en Murashige y Skoog (1962) y subcultivo luego de homogeneización en medio líquido; *T3* Germinación en Miller y Miller (1961) y subcultivo luego de homogeneización en medio sólido; *T4* Germinación en Miller y Miller (1961) y subcultivo luego de homogeneización en medio líquido.

## PRUEBA COMPLEMENTARIA DE INDUCCIÓN DE LA FASE ESPOROFÍTICA EN GAMETOFITOS CULTIVADOS *IN VITRO*

Fue posible observar una tendencia a formar esporofitos luego de transcurrido un mes de haber sido estimulada la formación de los mismos mediante la exposición a una lámpara incandescente antes de su aclimatación. No se observó contaminación. No fue posible contabilizar el número de esporofitos debido a la alta densidad en que se encontraban y lo compacto de los mismos, lo que impidió individualizar cada esporofito y en consecuencia su conteo. Su número superó los 20 en cada envase (Fig 2).

Lo anterior coincide plenamente con lo evidenciado por Camloh y Gogala (1992), Somer *et al.* (2009) y Liao y Wu (2011), quienes partieron de gametofitos desarrollados *in vitro*, y lograron la aparición de esporofitos pasado un mes de ser plantados en suelo esterilizado. Esto evidencia la posibilidad de regeneración de los gametofitos cultivados *in vitro*.



Fig 2. Esporofitos de *Platyserium bifurcatum* en vivero, obtenidos luego de transcurrido un mes de la exposición de gametofitos cultivados *in vitro* a una lámpara incandescente.

## CONCLUSIONES

En la primera fase del cultivo *in vitro* de *P. bifurcatum*, el medio de Murashige y Skoog fue significativamente mejor para la germinación y sobrevivencia de las esporas que el medio de Miller y Miller. No hubo diferencias en cuanto al tiempo de germinación de las esporas entre los dos medios de cultivo. Los gametofitos tendieron a crecer más densamente y con una coloración verde más intensa y mayor sobrevivencia en el medio Murashige y Skoog.

En la segunda fase, sólo hubo regeneración en el medio líquido (formación de callos globulares) con sales Murashige y Skoog; los gametofitos sobrevivieron menos en el medio líquido que en el sólido y mas en Murashige y Skoog que en Miller y Miller.

La técnica utilizada para inducir la fase esporofítica en *P. bifurcatum* mediante exposición a lámpara incandescente y posterior plantación sobre sustrato esterilizado puede ser utilizada para la propagación masiva de esta especie porque permite la obtención de gran cantidad de esporofitos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH), por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación. A los tres revisores anónimos por la lectura y sugerencias realizadas al manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 (*Platyserium bifurcatum* C. Chr.). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 88 p.
- Camloh, M. y N. Gogala 1992. *In vitro* culture of *Platyserium bifurcatum* gametophytes. Scientia Horticulturae 51: 343-346.
- Chin, W. 1998. Ferns of the tropics. Timberpress. Portland, Oregon, USA. 190 p.
- Colmenares, M. y C. Giménez. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 20: 468-477.

- Cooke, R. C. 1979. Homogenization as an aid in tissue culture propagation of *Platynerium* and *Davallia* [Pteridophyta]. HortScience 14: 21-22.
- Fernández, H., A. Bertrand y R. Sanchez-Tames. 1993. *In vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. Scientia Horticulturae 56(1): 71-77.
- Fernández, H., A. Bertrand y R. Sánchez-Tamés. 1997. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes. Scientia Horticulturae 68(1-4): 243-247.
- Fernández, H., A. Bertrand y R. Sánchez-Tamés 1999. Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 211-214.
- Fernández, H. y M. A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 1-13.
- Hartman, H. y D. Kester. 1994. Propagación de plantas, principios y prácticas. Compañía Editorial Continental, S.A. México (México). 760 p.
- Hennen, G. R. y T. Sheehan. 1978. *In vitro* propagation of *Platynerium stemaria* (Beauvois) Desv. HortScience 13: 245.
- Janssens, J. y M. Sepelie. 1989. *In vitro* multiplication of *Blenchnum* spp. and *Pellaea rotundifolia* (Forst.) Hook by homogenization. Scientia Horticulturae 38: 161-164.
- Khan, S. y H. Kayani. 2008. *In vitro* propagation of bird's nest fern (*Asplenium nidus*) from spores. Pakistan Journal of Botany 40(1): 91-97.
- Liao, Y. y Y. Wu. 2011. *In vitro* propagation of *Platynerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. via green globular body initiation. Botanical Studies 52: 455-463.
- Márquez, B. C. 2003. Propagación *in vitro* e *in vivo* del helecho Cacho de Venado (*Platynerium bifurcatum*). Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 70 p.
- Martínez, O. 2010. gametofitos y esporófitos jóvenes de cuatro especies de helechos del género *Pteris* (Pteridaceae) naturalizadas en América. Revista de Biología Tropical 58: 89-102.

- Miller, J. H. y P. M. Miller. 1961. The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of the gametophyte of the fern *Onoclea sensibilis*. Am. J. Bot. 48: 154-159.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15(3): 473-497.
- Somer, M., R. Arbesú, V. Menéndez, M. Revilla y H. Fernández. 2009. Sporophyte induction studies in ferns *in vitro*. Euphytica 171(2): 203-210.