

MULTIPLICACIÓN *in vitro* DE *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott, A PARTIR DE ESPORAS

H. González-Rosas¹; J. A. Herrera-Meléndez²; A. C. Ramos-Villaseñor³

¹Programa de Fruticultura. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad.

Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

C. P. 56230. MÉXICO. Correo-e: hectorgr44@hotmail.com (*Autor responsable).

²Dirección General de Investigación y Posgrado. Universidad Autónoma Chapingo.

Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

³Programa de Fruticultura. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad.

Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo establecer los requerimientos hormonales y nutrimentales para inducir la germinación de esporas de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott *in vitro*, así como para la obtención de plántulas. En la fase de germinación, la desinfección de los soros fue efectiva en 96 %, con 100 % de supervivencia del inóculo. La germinación fue similar en los medios de cultivo empleados: 32 % de esporas germinaron entre 28 y 30 días después de la siembra. El desarrollo de prótalos sucedió en forma óptima en el medio IV, con crecimiento continuo en volumen, multiplicación y diámetro conjunto, alcanzando en promedio 4.6 cm a los 180 días de germinadas las esporas.

El crecimiento del prótalo, en medio MS al 50 %, fue en promedio de 2.5 cm de diámetro a los 125 días después de la siembra de las esporas, mientras que en el medio MS al 100 % el crecimiento fue en promedio de 1.2 cm de diámetro a los 120 días, sin desarrollo posterior. La adición de 0.01 mg·litro⁻¹ de ácido giberélico al medio V fue adecuada para lograr una producción de 26.6 plántulas en promedio. La generación de esporofitos (plántulas) se obtuvo en el medio MS con 100 % de sales y con concentraciones de 0.01 y 0.10 mg·litro⁻¹ de AG₃. El desarrollo de la raíz, ocurrió espontáneamente en el mismo medio utilizado para la formación de esporofitos o al establecer la plántula en el suelo a una humedad relativa alta.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: germinación, esporas, helecho, ácido giberélico.

In vitro MULTIPLICATION OF *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott, FROM SPORES

ABSTRACT

The objective of this research is to establish the hormone and nutrient requirements to induce the germination of the spores of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott *in vitro* and to obtain plantlets. In the germination phase, spore disinfection occurred in 96 %, with a 100 % survival inoculate rate. The germination was similar in the crop mediums used; 32 % of the spores germinated within 28-30 days after being planted. Prothallial development succeeded optimally in IV medium, with continued volume, multiplication and diameter growth jointly reaching an average of 4.6 cm at 180 days of spore germination. Prothallial growth, in MS medium at 50 %, was on the average 2.5 cm in diameter at 125 days after the planting of the spores. While in MS medium at 100 %, the growth was 1.2 cm in diameter on the average at 120 days, without further development. The addition of 0.01 mg·litro⁻¹ of gibberellic acid to medium V was sufficient to obtain a production average of 26.6 plantlets. The generation of sporophytes (plantlets) obtained in MS medium at 100 % of salts and with concentrations of 0.01 and 0.10 mg·litro⁻¹ of AG₃. The root development occurred spontaneously in the same medium used to form the sporophytes or when the plantlet was established in soil with relatively high humidity.

KEY WORDS: germination, spores, fern, gibberellic acid.

INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de helechos, que existe en México, no ha sido aprovechada racionalmente en la horticultura ornamental; tal es el caso de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott

que es muy utilizado como planta de interior y bien aceptado para decorar jardines y arreglos florales. El helecho espada (nombre común de *Nephrolepis exaltata*) se propaga, como la mayoría de los helechos comerciales, mediante el cultivo

de rizomas, zonas de crecimiento de frondas y por ápices de estolones, pero la propagación asexual es un método que, desde el punto de vista comercial, resulta difícil y muy lento (Cardoso *et al.*, 2004). Es necesario encontrar otro medio de propagación eficiente y el cultivo de esporas pudiere ser la opción. Si bien es cierto que puede existir una variación fenotípica en las plántulas que se obtienen por medio de la germinación de esporas, también lo es que esta forma de propagación representa algunas ventajas sobre la manera tradicional: la producción de plántulas se realiza en tiempos cortos y en mayor cantidad; representa una forma segura de intercambiar germoplasma y, finalmente, el implementar y mejorar la metodología para inducir la germinación de esporas podrá ser de utilidad para aquellas especies de helechos que su propagación sea muy difícil. En este sentido se han trabajado algunos helechos (Amoroso y Amoroso, 1998) con buenos resultados, pero todavía existe poca investigación y menos aún sobre la técnica de cultivo de esporas *in vitro* en helechos comerciales. Por lo anterior, es necesario generar investigación que permita saber si el cultivo *in vitro* de esporas pudiere acelerar la propagación intensiva para llevar a cabo, por un lado, la explotación racional de los helechos y por otro, hacer más eficientes las perspectivas de su explotación comercial y preservación biológica.

En la presente investigación se plantean como objetivos determinar el efecto de la concentración de sales inorgánicas (macro y micro), la utilización reguladores del crecimiento (ANA/BA) en la germinación de esporas, en producción de plántulas y conocer el efecto del ácido giberélico (AG_3) en la estimulación para la formación de anterozoides asegurando fecundación y formación del prótalo esporofito a partir del prótalo gametofito de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frondas fértiles de *Nephrolepis exaltata*, que se colectaron de plantas del jardín botánico de Jalapa, Veracruz, se cortaron en fragmentos y se depositaron en bolsas de papel por 24 h a temperatura ambiente. La investigación se realizó en dos fases: la inducción de la germinación de las esporas y establecimiento del prótalo y la formación de esporofitos.

Fase I. Germinación de esporas y establecimiento de prótalo

Para la siembra de las esporas se preparó el medio de cultivo empleando las sales inorgánicas del medio básico Murashige y Skoog (1962) (MS) en concentraciones de 100 y 50 % y suplementado con 1.0 mg·litro⁻¹ de ácido naftaleneacético (ANA) y 5.0 mg·litro⁻¹ de benciladenina (BA), 0.5 mg·litro⁻¹ de piridoxina-HCl, 0.5 mg·litro⁻¹ de ácido nicotínico, 0.2 mg·litro⁻¹ de glicina, 100 mg·litro⁻¹ de inositol, 30 g·litro⁻¹ de sacarosa y 8 g·litro⁻¹ de agar (Cuadro 1). El

pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.7 con soluciones 0.1 N de NaOH o 0.1 N de HCl. La esterilización del medio se efectuó en autoclave durante 15-20 min a 121 °C y 1.14 kg·cm⁻² de presión.

Para la germinación de las esporas se emplearon pinas con soros, desinfectadas mediante inmersión en etanol al 70 % durante 30 seg y en solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % y dos gotas de Tween 20 durante 10 min. Las pinas se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada; cada enjuague fue de 3 a 5 min.

Los soros fueron aislados de las pinas usando pinzas de disección y la liberación de las esporas se logró rompiendo los soros con una aguja de disección. El rompimiento se hizo en frascos tipo gerber que contenían 20 ml del medio básico de Murashige y Skoog (1962). Para lograr la germinación se establecieron los tratamientos I, II, III y IV (Cuadro 1).

CUADRO 1. Medios de cultivo basados en sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) y dos reguladores del crecimiento, utilizados en la germinación de esporas.

Componentes	Medio de Cultivo			
	I	II	III	IV
Sales (%)	100	100	50	50
Vitaminas (%)	100	100	-	-
Sacarosa (g·litro ⁻¹)	30	30	-	-
Agar (g·litro ⁻¹)	8	8	8	8
ANA ^a (mg·litro ⁻¹)	1	-	1	-
BA ^a (mg·litro ⁻¹)	5	-	5	-
pH	5.7	5.7	5.7	5.7

^aÁcido naftaleneacético.

^aBenciladenina

Las esporas sembradas en los frascos gerber se colocaron en iluminación continua de luz blanca y a temperatura de 25 ± 2 °C.

Fase II. Generación de esporofitos

Para obtener talo esporofito se sembró prótalo gametofito de esporas germinadas en medio básico MS con sales inorgánicas al 100 % adicionado con 0.01, 0.10 y 1.0 mg·litro⁻¹ de AG_3 (medio V) y sales inorgánicas al 50 % adicionadas con 0.01, 0.10 y 1.0 mg·litro⁻¹ de AG_3 (medio VI) (Cuadro 2). Las condiciones de incubación y transferencias fueron iguales a las utilizadas para la germinación de esporas.

Las variables registradas fueron las siguientes:

1. Tiempo y días a germinación. Se contó el número

CUADRO 2. Medios de cultivo utilizados para la generación de esporofitos.

Componentes	Medio de Cultivo	
	V	VI
Sales (%)	100	50
Vitaminas (%)	100	100
Sacarosa (%)	30	-
Agar (g·litro ⁻¹)	8.0	8.0
AG ₃ ^z (mg·litro ⁻¹)	0.01, 0.10, 1.00	0.01, 0.10, 1.00
pH	5.7	5.7

^zÁcido giberélico

de días a partir de la siembra de los soros y hasta la germinación y el porcentaje de germinación.

2. Crecimiento del prótalo. Cada treinta días a partir de la germinación y hasta la obtención del talo esporofito (180 días) se midió el diámetro (cm) del conjunto de prótalos generados.
3. Regeneración del talo esporofito. Se determinó el tiempo de regeneración y número de plántulas obtenidas.
4. Tiempo de formación de esporofitos. Se contó el número de días a partir de la siembra de los prótalos hasta la aparición de los primeros esporofitos.
5. Longitud de talo. Los jóvenes esporofitos se midieron de la parte basal hasta la parte apical de sus frondas (cm). Los datos se tomaron a los noventa días después de formado el esporofito, al momento de transferirlos a suelo.
6. Número de talos. La cuantificación del número de brotes se realizó al momento de transferirlos al suelo.

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar para los dos experimentos o fases, aplicando éste únicamente en la etapa de generación de esporofitos en el cual se realizaron dos experimentos con tres tratamientos de giberelinas (AG₃) con quince 15 repeticiones cada uno. Para la comparación de medias de los experimentos de esta fase se utilizó la prueba de Tukey con nivel de significancia de 0.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Germinación de esporas y establecimiento de prótalo

El procedimiento de desinfección de los soros fue efectiva en 96 % y el 100 % de supervivencia del inóculo. En los cuatro medios de cultivo se logró 92 % de soros con

esporas germinadas, entre 28 y 30 días después de la siembra; estos resultados son similares a los que se obtuvieron durante la germinación *in situ* de esporas (Cronquist, 1977), lo que indica la confiabilidad del método *in vitro* para este objetivo.

Con respecto a la concentración de las sales del medio MS, presencia de vitaminas y reguladores del crecimiento (ANA y BA) que se consideran necesarios para la estimulación de la germinación de las esporas, no hubo efecto significativo sobre la germinación de esporas, lo cual concuerda con resultados de otras investigaciones (Messayon, 1989; Ziv y Hadar, 1991).

Crecimiento del prótalo

El desarrollo de prótalos ocurrió en forma óptima en el medio IV, con crecimiento continuo en volumen y multiplicación y, por tanto, en diámetro conjunto, siendo éste, en promedio, de 4.6 cm a los 180 días de germinadas las esporas; además, los prótalos tuvieron color verde oscuro y forma lanceolada con ondulaciones en el margen (forma típica). En los medios I, II, III el diámetro promedio del crecimiento a los 180 días después de la germinación de esporas fue 2.5, 1.0 y 2.6 cm, respectivamente; sin embargo, después de ese tiempo, los prótalos detuvieron su crecimiento conservándose muy compactos, con coloración verde pálido y forma ovulolanceolada y sin ondulaciones en los márgenes. Estos resultados hacen suponer que el desarrollo del prótalo es limitado al adicionar reguladores de crecimiento al medio de cultivo, aunque se puede suponer que el prótalo los sintetice en niveles adecuados para realizar el proceso organogénico, es decir, la formación del talo esporofito y, por lo tanto, no requiere adición de reguladores de crecimiento y de vitaminas, pero si de baja concentración de sales inorgánicas (50 %).

Con relación a la baja concentración de sales, el crecimiento del prótalo en medio MS al 50 %, en promedio, fue de 2.5 cm en diámetro a los 125 días y en el medio con sales al 100 % fue apenas 0.9 cm de diámetro a los 120 días, sin presentar desarrollo posterior (Cuadro 3). Aunque se emplearon ANA y BA durante el crecimiento del prótalo, no hubo formación de callo en el medio MS al 50 %; este resultado contrasta con los de Breznovits y Mohay (1987), quienes consideran que para la formación del prótalo se requiere de la presencia de callo.

Fase II. Generación de esporofitos

La adición del AG₃ al medio V fue favorable para la formación de los talos esporofitos. La formación del mayor número de plántulas (26 en promedio) se obtuvo en la concentración de 0.01 mg·litro⁻¹ y con 0.10 mg·litro⁻¹ el promedio fue de 21 plántulas. Los esporofitos se tornaron de color verde oscuro entre los 40 y 60 días, con 3 cm de longitud promedio y dos frondas no pinnadas (Figura 1).

CUADRO 3. Tiempo (días) y diámetro promedio del crecimiento (cm) de protalo obtenido de la germinación de esporas de soros de *Nephrolepis exaltata* en cuatro medios de cultivo.

Medio I		Medio II		Medio III		Medio IV	
Días	Diámetro (cm)	Días	Diámetro (cm)	Días	Diámetro (cm)	Días	Diámetro (cm)
30	0.2	30	0.2	30	0.2	30	0.2
60	0.4	60	0.3	60	0.7	60	0.5
90	0.7	90	0.4	90	1.5	90	0.8
120	1.2	120	0.6	120	2.0	120	1.3
150	1.8	150	0.9	150	2.2	150	3.1
180	2.5	180	1.0	180	2.6	180	4.6

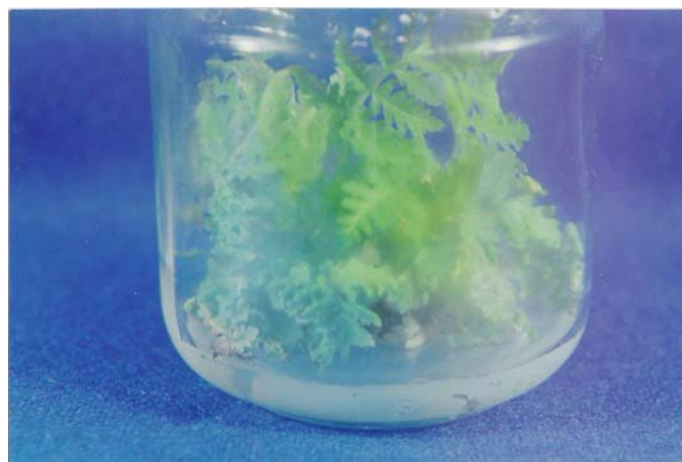


FIGURA 1. Plántulas de *N. exaltata* con frondas, cultivadas en medio MS con 0.1 y 0.01 mg-litro⁻¹ de AG₃.

La utilización de 1.0 mg-litro⁻¹ no indujo respuesta en la formación de esporofitos; tampoco se observaron cambios físicos en los prótalos, por lo que se puede inferir que el AG₃ en concentraciones de 1 mg-litro⁻¹ inhibe la regeneración de esporofitos.

Con base en los resultados obtenidos en los tratamientos de los medios IV y V se infiere que una concentración inferior a 1 mg-litro⁻¹ de AG₃ ejerce acción para la formación de esporofitos en combinación con un medio de cultivo con las sales al 100 % (Cuadro 4). Existe la posibilidad que estos resultados se deban al efecto directo del AG₃ en la formación de anterozoides y la fecundación para la generación de esporofitos (Finnie y Staden, 1987; Kagawa y Sugai, 1991; Ziv, y Hadar, 1991). Es posible que en prótalos de algunas especies de helechos, el desarrollo de esporofitos esté asociado con la producción de la hormona llamada anteridiogeno, la cual promueve la formación de anterozoides (Wen *et al.*, 1999) y que el número de éstos aumente con la aplicación de giberelinas; esto fue corroborado por De Maggio (1982), Foster (1964), Takeno *et al.* (1989), Warne y Hickok (1989), y Bosworth y Hudson (2000), quienes mencionan que hormonas como

las giberelinas, inducen al prótalo a formar anteridios y con ello garantizar la fecundación.

Tiempo de inicio de formación del esporofito

El tiempo requerido para la formación del esporofito fue entre 40 y 60 días a partir de la siembra del prótalo, durante este proceso, el volumen del prótalo tiende a aumentar y mostrar un ligero enrollamiento entre los 20 y 30 días y de 8 a 10 días, posteriores se forman pequeñas protuberancias; este proceso ocurrió solamente, en los tratamientos con 0.01 mg-litro⁻¹ y 0.10 mg-litro⁻¹ de AG₃ del medio V.

Longitud de los talos

Para esta variable no se realizó análisis estadístico, ya que las longitudes de los esporofitos, en los tratamientos 1 y 2 del medio V, fueron uniformes de 3 cm en promedio, además los esporofitos mostraron frondas vigorosas y de coloración verde oscuro. El esporofito joven tuvo, en promedio, dos frondas con folíolos redondeados.

Número de talos

El análisis estadístico se le aplicó al medio V (sales al 100 %), ya que el medio VI (al 50 %) no presentó respuesta. La comparación de medias de los tratamientos del medio V muestra que el uso de 0.01 mg-litro⁻¹ de AG₃ induce mejor acción para la generación de esporofitos (26.26 talos) seguido del tratamiento 2 (0.10 mg-litro⁻¹ de AG₃) con 20.93 talos; la diferencia entre ellos fue significativa, siendo el tratamiento 3 (1.0 mg-litro⁻¹ de AG₃) el menos adecuado, ya que los prótalos no presentan respuesta en la generación de esporofitos (Cuadro 5).

Enraizamiento

Se obtuvieron plántulas completas durante la multiplicación de los talos. La formación de raíz ocurrió sin necesidad de emplear hormonas en el medio de cultivo adicionado con 0.01 mg-litro⁻¹ o 0.1 mg-litro⁻¹ de AG₃ y cultivado en suelo (Figura 2a y b).

CUADRO 4. Regeneración del esporofitos a partir de prótalo de *Nephrolepis exaltata* cultivado en el medio V suplementado con AG₃.

Tratamiento		Número de talos por repetición															
Núm.	AG ₃ (mg·litro ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Prom
1	0.01	25	20	24	28	30	27	28	25	21	24	29	32	27	26	28	26.2
2	0.10	24	18	20	22	24	19	18	23	23	24	17	19	20	21	22	20.9

CUADRO 5. Análisis de varianza de diseño completamente al azar para número de talos de *Nephrolepis exaltata* cultivada en medio V.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas
Tratamientos	2	5782.9	2891.5	537.6	19.5
Error	42	225.9	5.4289		
Total	44	6008.8	6.8		

G.V. 0.01

FIGURA 2. a) Plántula completa de *Nephrolepis exaltata* obtenida en medio de cultivo sin hormonas enraizadoras; y b) Plántula cultivada en suelo.

CONCLUSIONES

1. La germinación de esporas y desarrollo de prótalos se obtuvo en el medio MS con las sales inorgánicas al 50 %.
2. La concentración de sales inorgánicas al 100 % tiene efecto significativo sobre la germinación de las esporas, pero no en el desarrollo del prótalo.
3. El desarrollo del prótalo mejoró al cultivar las esporas en medio III con las sales inorgánicas al 50 %.
4. La formación de esporofitos fue mejor cuando el medio de cultivo fue complementado con 0.01 y 0.1 mg·litro⁻¹ de ácido giberélico (AG₃).
5. La adición de los reguladores de crecimiento (ANA/BA) no ejerció estímulo para la germinación de las esporas y en los prótalos ocasionó crecimiento raquítrico y baja proliferación.

6. La adición de ácido giberélico (AG₃) en concentración de 0.01 y 0.1 mg·litro⁻¹ en el medio V, estimuló la formación de anterozoides, lo que favoreció la fertilización de los arquegonios y por consiguiente la producción de esporofitos.

LITERATURA CITADA

- AMOROSO, C. B.; AMOROSO, V. B. 1998. Spore culture studies on some economic ferns of Mindanao, Philippines. International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Part 2. Acta Horticulturae 461: 231-235.
- BREZNOVITS, A.; MOHAY, J., 1987. *In vitro* problems related to propagation of different fern species. Acta Hort. 221: 427-431.
- CARDOSO, C. P.; LOPES DA SILVA, A. L.; HENZ, E. T.; DILSON, F.; BISOGNIN, A. 2004. Propagação in vitro de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. Caderno de Pesquisa série Biologia 16(1): 43-49.
- CRONQUIST, A. 1977. Introducción a la Botánica. Ed. Continental, México. pp. 347-368.
- DE MAGGIO, A. E. 1982. Experimental embryology of Pteridophytes, pp. 7-14. In: Experimental Embryology of Vascular Plants.

- JOHR, B. M. (ed). Springer-Verlag, Berlin.
- BOSWORTH, S.; HUDSON J. E. N. 2000. Partial purification of an antheridiogen from the fern *Asplenium platyneuron*. Texas Academy of Sciences Annual Meeting 1999. Seguin, Texas pp. 172.
- FINNIE, J. F.; STADEN, J. 1987. Multiplication of the tree fern *Cyathea drege*. HortScience 22: 665.
- FOSTER, F. G. 1964. The microscopy of fern spores. Am. Fern J. 46: 7-14.
- KAGAWA, T.; SUGAI M. 1991. Involvement of gibberellic acid of phytochrome-mediated spore germination of the fern *Lygodium japonicum*. J. Plant Physiology 138: 299-303.
- MESSAYON, D. G. 1989. Plantas de Interior: Manual de Cultivo y Conservación. Editorial Blume, S.A. Madrid, España. pp. 34-36.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15: 473-497.
- TAKENO, K.; YAMANE, H.; YAMAUCHI, T.; TAKAHASHI, N.; FURBER, M.; MANDER, L. 1989. Biological activities of the methyl ester of gibberellin a novel and principal antheridiogen in *Lygodium japonicum*. Plant Cell Physiol. 30: 201-215.
- WARNE, T.; HICKOK, L. 1989. Evidence for a gibberellin biosynthetic origin of *Ceratopteris antheridiogen*. Plant Physiology 89: 535-538.
- WEN, C. K.; SMITH R.; BANKS, J. A. 1999. ANI1: A sex pheromone – induced gene in *Ceratopteris* gametophytes and its possible role in sex determination. Plant Cell 11: 1307-1318.
- ZIV, M.; HADAR, A. 1991. Morphogenetic pattern of *Nephrolepis exaltata* cv. bostoniensis in agar or liquid culture: Implications for micropropagation. Israel J. Bot. 40: 7-16.