

Propagación In Vitro de *Platycerium andinum* Baker a partir de esporas

In vitro propagation of *Platycerium andinum* Baker from spores

Ruiz Rios Astriht¹✉, Díaz Montes Geyden² y Gutiérrez Ruiz Astrid Domy²

¹Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, Jr. Maynas N° 177–Tarapoto. ²Corporación G y G E.I.R.L., Jr. 02 de Mayo N° 340 – Moyobamba.

✉ Autor para correspondencia: thirtsa@hotmail.com

Recibido: 15/07/2020

Aceptado: 25/10/2020

RESUMEN

Los bosques del departamento de San Martín, hábitat de *Platycerium andinum* B. viene siendo destruido de manera desmesurada, ocasionado por actividades antropogénicas, lo que ha conducido a la pérdida de la especie en su hábitat natural, sumándose a ello la extracción por su exuberante belleza para su comercialización como planta ornamental, asimismo sus esporas son difíciles de germinar en condiciones naturales, además, no se cuenta con una metodología para la propagación in vitro de esta especie. La presente investigación tiene como objetivo determinar la concentración adecuada de hipoclorito de sodio para la obtención de esporas de *P. andinum* libre de patógenos y evaluar tres medios de cultivo para determinar el medio más adecuado para la propagación de gametofitos. Las esporas fueron obtenidas de frondas fértiles de plantas adultas haciendo un raspado de estas. La germinación de las esporas fue evaluada a partir de los 10 días, tiempo en el cual comenzaron a germinar y a los 30 días ya se tenía abundante tejido gametofítico; se evaluó a través del Índice de Germinación de las esporas (IG) utilizando la escala de abundancia-cobertura de Braun-Blanquet llegando a los 60 días a la escala 5 (cualquier número de gametofitos con cobertura mayor de 75%). En cuanto a la determinación del mejor medio de cultivo para la propagación in vitro de gametofitos se trabajó con tres medios MSB (T1, T2 y T3) con aditivos de 0.4 ml. de tiamina, 0.5 de ácido nicotínico, 2 gramos de carbón activado y 20 gramos de sacarosa; con 100 ml de agua de coco en T2, y 200 ml en T3, obteniéndose como mejor resultado al tratamiento T1: (M y S Basal, con adición de 0.4 ml. de tiamina, 0.5 de ácido nicotínico, 2 gramos de carbón activado y 20 gramos de sacarosa).

Palabras clave: Gametofito, haploide, esporas, cultivo in vitro.

ABSTRACT

The forests of San Martín Region, habitat of *Platycerium andinum* B. have been destroyed in an excessive way, caused by anthropogenic activities, which has led to the loss of the species in its natural habitat, adding to it the extraction for its exuberant beauty to be market as an ornamental plant, its spores are also difficult to germinate under natural conditions, in addition, there is no methodology for the in vitro propagation of this species. The objective of this research is to

determine the adequate concentration of sodium hypochlorite to obtain pathogen-free *P. andinum* spores and to evaluate three farming media to determine the most suitable medium for the propagation of gametophytes. The spores were obtained from the fertile fronds of adult plants by scraping them off. The germination of the spores was evaluated after 10 days, time in which they began to germinate and after 30 days there was already abundant gametophyte tissue; it was evaluated through the spore germination rate (GI) using the Braun-Blanquet abundance-coverage scale, reaching scale 5 after 60 days (any number of gametophytes with coverage greater than 75%). Regarding the determination of the best farming method for the in vitro propagation of gametophytes, three MSB media (T1, T2 and T3) were used with additives of 0.4 ml. of thiamine, 0.5 of nicotinic acid, 2 grams of activated carbon and 20 grams of sucrose; with 100 ml of coconut water in T2, and 200 ml in T3, obtaining the best result for treatment T1: (M and S Basal, with the addition of 0.4 ml. of thiamine, 0.5 of nicotinic acid, 2 grams of activated carbon and 20 grams of sucrose).

Keywords: Gametophyte, haploid spores, in vitro culture.

INTRODUCCIÓN

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; sin embargo poseen un gran atractivo visual que los colocan en un sitio de honor entre las plantas ornamentales.

Al no producir semillas su reproducción sexual depende de la producción de esporas (haploides) microscópicas, resistentes y que al germinar en un medio adecuado desarrollan una planta libre haploide denominada gametófito, generadora de gametos masculinos (móviles) y femeninas (sésiles), las cuales al unirse producen la forma conocida del helecho, el esporófito.

Platyserium es uno de los pocos géneros de helechos pantropical. Hay seis Especies en África y Madagascar, 8 a 11 en Australia y Asia, y sólo uno en América del Sur tropical, este es *Platyserium andinum* B (Schneider HP). *P. andinum* es el helecho epífita más grande de las Américas. Este se encuentra en el Perú en localidades aisladas de San Martín

a Puno, con poblaciones asociadas a los boques estacionalmente secos y en rangos de altitud de los 100 a 1100 m. Según Vail (1984) esta especie es una planta epífita que vive sobre otras plantas pero no es un parásito, no dispone de flores y se reproduce por esporas que son sopladas de un árbol a otro por el viento, una nueva planta comienza a crecer a partir de una espora que se adhiere a una rama o tronco de un árbol; estas se encuentran amenazadas dado a la pérdida de su hábitat ocasionado principalmente por las actividades antropogénicas, asimismo a que sus esporas son difíciles de germinar en su hábitat natural y por su extracción para la comercialización por su exuberante belleza. Por otro lado, no se cuenta con estudios sobre propagación por cultivo in vitro de esta especie lo que es una alternativa productiva que nos permitirá una producción masiva de *P. andinum*. El objetivo del presente estudio es determinar la concentración adecuada de hipoclorito de sodio para la obtención de esporas libre de patógenos para su óptima germinación y obtener el medio de cultivo adecuado para la propagación de los gametofitos a través de cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizó las frondas

fértiles de *P. andinum*, en cuyo envés se localizan los esporangios conteniendo las esporas, de reciente colecta presentando color madera formida (#DEB887); según el código hexadecimal de colores (Figura 1).



Figura 1. Frondas fértiles de *P. andinum* conteniendo esporangios.

Metodología para la desinfección y germinación *in vitro* de esporas. Se cortaron las frondas que contenían los esporangios, del cual se hizo un raspado muy suavemente con un bisturí sobre un papel blanco. Las esporas fueron expuestas por un periodo de 12 horas a 30 °C en estufa para favorecer la dehiscencia de los esporangios. Un gramo de esporas fueron colocadas en una jeringa de 20 ml conteniendo un tapón de algodón hasta 5 centímetros, enseguida se succionó 10 ml de hipoclorito de sodio (NaClO) en tres concentraciones (0.5, 1 y 1.5 %) por un tiempo de desinfección de 20 minutos. Se hizo 4 enjuagues con agua destilada estéril. Todo este procedimiento se desarrolló en cámara de flujo laminar.

Enseguida se procedió con la siembra colocando cantidades similares de esporas de manera homogénea en un medio de cultivo

Básico de Murashige y Skoog (1962) B_{MS}, con adición de 0.4 ml de tiamina, 0.5 de ácido nicotínico, 2 gramos de carbón activado y 20 gramos de sacarosa, previa esterilización por autoclavado a 15 libras de presión por 15 minutos, a 121 °C. La condición de desarrollo en cámara fue a fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), temperatura de 25 ± 1 °C y humedad relativa de 90 a 100%.

Metodología para la propagación *in vitro* de gametofitos. Los gametofitos obtenidos fueron introducidos en medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con adición de otros reactivos (Cuadro 1) previa esterilización por autoclavado a 15 libras de presión por 20 minutos, a 121 °C. Su desarrollo en cámara fue a fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), temperatura de 24 ± 1 °C y humedad relativa de 90 a 100%.

Cuadro 1. Medio para el desarrollo de los gametofitos.

Reactivos	Medios de Multiplicación		
	T ₁	T ₂	T ₃
Macro y micronutriente MS (Murashige and Skoog)	C	C	C
Acido nicotínico (mg/L)	0.5	0.5	0.5
Thiamina HCl (mg/L)	0.4	0.4	0.4
Agua de coco (ml/L)		100	200
Sacarosa g/L	20	20	20
Carbón activado g/L	2	2	2
Agar	9.5	9.5	9.5
pH	5,4 – 5,6		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección y Germinación in vitro de esporas. La mejor concentración de hipoclorito de sodio para la desinfección de esporas fue del 1.5% ya que influencio significativamente sobre el porcentaje de frascos libres de contaminación por patógenos

(Figura 2) y se pudo comprobar que no afecto la germinación de las esporas (Figura 3A), a los 10 días se pudo observar que estas comenzaron a germinar y a los 30 días ya se tenía abundante tejido gametofítico con un color verde oscuro y con la presencia de gotas de aceite de color amarillo (Figura 3 B). El índice de germinación fue de 75 %.

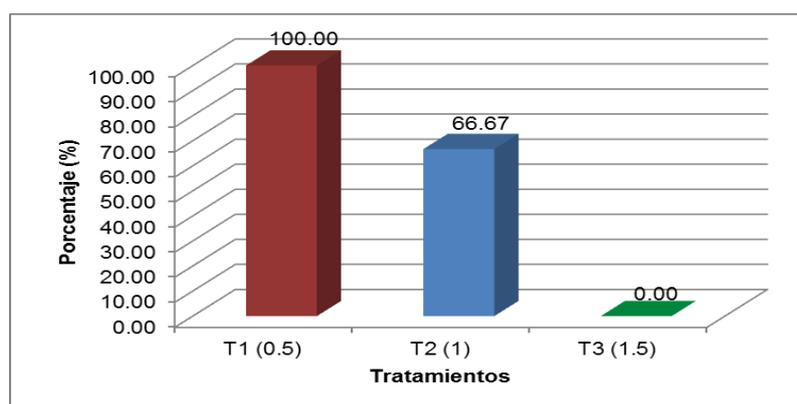


Figura 2. Frondas fértiles de *P. andinum* conteniendo esporangios.



Figura 3. Formación de gametofitos de *P. andinum* B. (A). Tejido gametofítico joven de *P. andinum* B. (B).

Vásquez *et al.*, (2012), manifiesta que en siete taxas epífitos de *Polypodium* (Polypodiaceae) las esporas germinaron entre los 6 y los 8 días posteriores a la siembra; en este proceso se observan grandes glóbulos de aceite (gotas lipídicas) de color amarillo en la primera célula protálica y que seguramente participan en la división celular y el crecimiento del gametofito, característica que comparte con muchas otras *Polypodiaceae s. str.*

Según Parra (2013), en el helecho arborescente *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH) DOMIN, la germinación de esporas se presentó entre los 18 y 22 días después de la siembra con un porcentaje del 69% (IG: 3,75), García, *et al.*, (2013), manifiesta que con los resultados obtenidos en su investigación definió que con el 2 % de hipoclorito de sodio y 15 minutos de exposición se logró disminuir la contaminación microbiana y no se afectó la germinación de las esporas de *C. bifurcatum*, asimismo indica que a los 60 días de estar las esporas dispersas en el medio de cultivo se comenzó a observar su germinación y ya a los 90 días existía abundante tejido gametofítico. La concentración de desinfectante empleada tuvo influencia en la variable de germinación de las esporas.

Con 3% disminuyó el índice de germinación lo que se asemeja a los resultados obtenidos por Evangelista *et al.* (2001), de similar forma Morales, (2003), manifiesta que en el tratamiento de esporas de *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae) con 2% NaClO se observó un mayor porcentaje de gametofitos cordiformes a los 130 días.

En el caso de *Pteris inermis* (Rosenst.) de la Sota, estudiado mediante técnicas de cultivo *in vitro*, antes de la siembra de las esporas, se realizó la desinfección del material con hipoclorito de sodio comercial al 5% v/v durante 8 minutos, la germinación de esporas recientemente recolectadas comienza a los 6 días, y a los 27 días las que fueron almacenadas durante un año.

Gómez, *et al.*, (2005), manifiesta que para la desinfección de esporas de *Platyserium bifurcatum* 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. Estas últimas fueron desinfectadas nuevamente en un tubo de ensayo con

Hipoclorito de Sodio al 2,62% por 5 minutos. De acuerdo al trabajo desarrollado la desinfección de esporas de *P. andinum* no requiere de métodos complejos para lograr una desinfección óptima.

Propagación in vitro de gametofitos. Los gametofitos obtuvieron un mejor desarrollo con el medio de cultivo M y S Basal (B_{MS}), con adición de 0.4 ml. de tiamina, 0.5 de ácido nicotínico, 2 gramos de carbón

activado, 20 gramos de sacarosa, a los 60 días ya se diferencian perfectamente los gametocitos y entre los 80 y 90 se tiene un prótalo maduro en forma espatulada, con pelos tanto en los bordes como en la superficie, con la presencia de raicillas en forma de barbilla de color marrón (Figura 4 A), a partir de los 120 días se percibe la formación de esporofitos jóvenes (Figura 4 B).

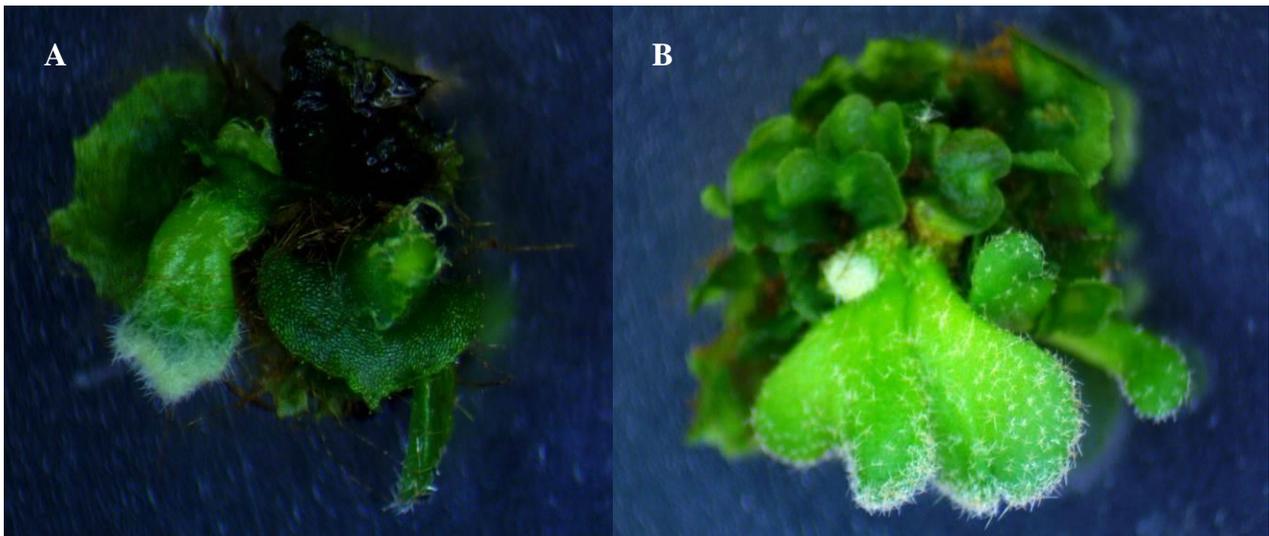


Figura 4. Formación de raicillas de *P. andinum* B. (A). Formación esporofitos jóvenes *P. andinum* B. (B).

Los gametofitos de *P. fraternum* (70-75 días), *P. plebeium* (42-46 días), *P. polypodioides* var. *aciculare* (40-45 días) y *P. rhodopleuron* (60-90 días), son espatulado-cordiformes y ocasionalmente cordiforme, muestran pelos unicelulares secretores y bicelulares no secretores, que se distribuyen tanto en el borde como en la superficie de la lámina (30-37 días). En la parte posterior del gametofito se localizan abundantes rizoides, hialinos o de color pardo claro y sin cloroplastos, resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

García, *et al.*, (2013), indica que la mayor multiplicación de los gametofitos se logró con el medio de cultivo que contenía 50% de las sales M y S, 1 mg l⁻¹ de tiamina, 2% de sacarosa en esporas de *Platyserium bifurcatum*, de igual manera Parra, (2013) manifiesta que la germinación *in vitro* de esporas de *Cyathea aff. caracasana* se presentó en el tratamiento con el medio de cultivo MS al 50% sin carbón activado y sacarosa, con el antibiótico rifampicina (0,02 mg/L).

Según Gómez, (2005), en 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 e indistintamente en la literatura científica se ha utilizado para la multiplicación *in vitro* de plantas de helechos de diferentes géneros el medio de cultivo MS con el 100% de sales o menos, lo que nos indica es que las sales de B_{MS} tienen influencia positiva en la propagación del tejido gametofítico.

CONCLUSIONES

La mejor concentración de hipoclorito de sodio para la desinfección de esporas de *P. andinum* fue T₃ (1,5%).

La germinación de las esporas fue evaluada a través del Índice de Germinación de las esporas (IG) utilizando la escala de abundancia-cobertura de Braun-Blanquet llegando a los 60 días a la escala 5 (Cualquier número de gametofitos con cobertura mayor de 75%).

El mejor medio de cultivo para la propagación *in vitro* de gametofitos fue el medio basal M y S (B_{MS}), con adición de 0.4 ml. de tiamina, 0.5 de ácido nicotínico, 2 gramos de carbón activado y 20 gramos de sacarosa, lográndose formar esporofitos.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, y a la Empresa Corporación G y G E.I.R.L., a este último en especial por permitirnos ser parte de su proceso de investigación, el mismo que se está desarrollando en marco al Proyecto “Validación del sistema de inmersión temporal para la propagación *in vitro* de orquídeas, en menor tiempo, con mejor crecimiento y bajo costo, en comparación con los medios de cultivo sólido”.

LITERATURA CITADA

- J. Á. Gómez Ll. & J. Páez. (2005). Tesis: Multiplicación del helecho cacho de venado (*Platyserium bifurcatum*) *in vitro* mediante homogeneización de prótalos e *in vivo* a partir de esporas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía, p. 96.
- H. Hartman, & D. Kester. (1994). Propagación de plantas, principios y prácticas. Tercera reimpresión de la segunda edición. Editorial Continental. México, p. 759.

- B. Pérez., A. Mendoza., S. Espinosa & L. D. Gómez. (2010). Gametophyte morphology of *Platyserium andinum* Baker and *Platyserium wandae* Racif, *Micron* 41, pp 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.05.005>
- B. León., E. Huamán., J. Roque., M. La Torre., & A. Cano. (2012). *Los Helechos Ornamentales en el Perú*. Museo de Historia Natural. Primera Edición. Perú, p 50.
- R. Vail. *Platyserium. Hobbyist's handbook*. Library of Congress Cataloging in Publication Data. 1ra. Edición, pp. 171.
- N. Vázquez., A. Mendoza & B. Pérez. (2012). Morfogénesis de la fase sexual de siete taxa epífitos de *Polypodium* (Polypodiaceae) de México, *Acta Botánica Mexicana*, 98, pp 5-21.
- M. R. Ramírez & B. Pérez. (1998). Fase gametofítica del helecho *Microgramma nítida* (Polypodiaceae). *Rev. Biol. Trop.* 46(3): pp 587-593. <https://doi.org/10.15517/rbt.v46i3.20120>
- B. Pérez–García., A. Mendoza., R. Riba & L. D. Gómez. (2001). Development of the sexual phase of *Pseudocolysis bradeorum* (Polypodiaceae). *Amer. Fern J.* 91 pp 214 –226. [https://doi.org/10.1640/0002-8444\(2001\)091\[0214:DOTSPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1640/0002-8444(2001)091[0214:DOTSPO]2.0.CO;2)
- I. Reyes., B. Pérez & A. Mendoza. (2003). Morfogénesis de los gametofitos de especies mexicanas de *Pleopeltis* (Polypodiaceae, subfamilia *Pleopeltoideae*). *Rev. Biol. Trop.* 51(2): pp 321–332.
- E. X. Narváez-Parra., J. H. Jerez & J. E. Mantilla. (2013). Etapas de desarrollo in vitro del gametofito del helecho arborescente *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH). 120, pp 74-84.
- L. R. García., D. Torres & C. Romero. (2013). Regeneración de esporofitos de *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C.Chr. a partir de esporas germinadas in vitro, *Biotecnología Vegetal* 13, pp 99 – 105.
- S. Evangelista., S. Escobar., G. Trejo & A. Jiménez. (2001). Propagación in vitro de *Platyserium bifurcatum*. *Memorias del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica*. Veracruz. México.
- C. Morales., S. Montes., V. Paneque & Corbera J. (2003). Aclimatación de vitroplantas de helechos a través del cultivo in vitro de esporas utilizando diferentes sustratos formados a partir de distintos abonos orgánicos. *Cultivos Tropicales* 24, pp 29-31.
- M. E. Tanco., O. G. Martínez & M. L. Bonomo. (2009), Germinación y morfogénesis gametofítica de *Pteris inermis* (rosenst.) de la Sota. *Gayana Bot.* 66(1): pp 10-17. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432009000100002>
- S. Juntadach. (1996). Studies on spore culture of fern (*Platyserium coronarium* and *Asplenium nidus*) in agar medium.

Sonklana Karin Journal of Science and Technology 18(3), pp 275-286.

J. Cox., P. Bhatia & N. Ashwath. (2003). In vitro spore germination of the fern *Schizaea dichotoma*. *Scientia Horticulturae* 97, pp 369-378.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00152-8)

H. Fernández & M. A. Revilla. (2003). In vitro culture of ornamental ferns. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73, pp 1-13.
<https://doi.org/10.1023/A:1022650701341>

M. R. Ramírez., G. B. Pérez & R. Riba. (2000). El suelo, un banco natural de esporas y helechos. *Contacto S* 36, pp 15-18.

Schneider HP. Phylogeny and biogeography of the staghorn fern genus *Platyserium* (Polypodiaceae, Polypodiidae). *Am J Bot.* 2006; 93(2): 217-225.
<https://doi.org/10.3732/ajb.93.2.217>

Copyright (c) 2020 Astriht Ruíz Ríos, Geyden Díaz Montes y Astrid Domy Gutiérrez Ruíz



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumendelicencia](#) - [Textocompletodelalicencia](#)