



**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Producción agrícola y Animal
Licenciatura en Agronomía**

**INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL
Propagación in vitro de helechos ornamentales**

Prestador de servicio social
Ethel Mercedes Ortiz Nuñez
Matricula: 2192029200

Asesor Interno
MC. Orea Coria Dorys Primavera
N° económico: 16435
Asesor Externo
Ing. Medrano Valverde Armando
N° económico: 13211

Lugar de realización: Laboratorio de Cultivo de tejidos del Departamento de Producción Agrícola y Animal dentro de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04960, CDMX.

Fecha de inicio y termino: 24 de agosto 2023 y 24 de febrero 2024

Introducción

El cultivo de tejidos es una técnica en la cual se pueden aislar una porción de cierta planta, otorgándole de manera artificial las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células puedan expresar de manera correcta su máximo potencial, es por lo que se necesita durante este proceso adoptar una estricta condición de asepsia para que los cultivos se mantengan libres de contaminación microbiana (SAGARPA, 2017).

Entonces estas técnicas representan una ayuda para ciertas especies donde su propagación usual lleva mucho tiempo o complicaciones, una de estas plantas son los helechos que pertenecen a uno de los grupos vasculares que se denominan pteridofitas, y estos se caracterizan por tener un ciclo de vida con alternancia de generaciones independientes y de vida libre, esto quiere decir que presentan una fase asexual o esporofítica (esporas) y la sexual o gametofítica (Pérez & Jaramillo, 1993).

Se tienen estimaciones de 10,000 especies de helechos a nivel mundial, siendo Brasil el país con mayor proporción con 1,200 especies registradas. En México se cuenta con un registro de 1,014 haciéndole acreedor del 10% de la biodiversidad mundial, siendo el Estado con mayor número de endemismos Oaxaca con 13 especies seguido de Chiapas con 8, Guerrero y Nuevo León con 7, Veracruz 5. (Martínez & Ramos, 2014).

Platyserium bifurcatum conocido como cacho de venado o cuerno de ciervo, que destaca una alta belleza, pero en cuestión de reproducción tiene un costo elevado en los viveros. Con todos los métodos convencionales por separación de los brotes solo se pueden conseguir tasas de multiplicación muy bajas, debido primordialmente a la necesidad de un periodo de recuperación usualmente largo entre los cortos, y a las pocas plantas por planta madre que se pueden obtener (Gómez & Páez, 2013).

Cyrtomium falcatum o conocido coloquialmente como helecho japonés, acebo o aureola pertenece a la clase Filicopsida, del orden Polypodiales y a la familia Dryopteridaceae (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2013).

Se trata de un helecho perenne que presenta un rizoma erecto color marrón claro que se encuentra cubierto de escamas lanceoladas, con ápice acuminado marrón oscuro. Formando un montículo redondeado con frondes de hasta 80 cm de alto por 1 metro de ancho (Fichas especies invasoras España, 2013).

Blechnum L. es un género con aproximadamente 150 especies que se encuentran distribuidas a nivel mundial. En el continente americano se cuentan aproximadamente 50, las cuales se localizan especialmente en selvas lluviosas, barrancas, bosques, páramos, lo largo de ríos o arroyos (Ramos, et al. 2006).

Platycerium bifurcatum, *Cyrtomium falcatum* y *Blechnum* son especies reconocidas y buscadas por su valor ornamental. Específicamente para *Platycerium b*, haciendo búsquedas en mercados y viveros estos oscilan entre los \$1,500.00 el más joven hasta \$15,000.00 el más grande de edad, así como de tamaño (Gómez, 2005), por su alta belleza dentro del mercado de plantas ornamentales debido a su características frondas (hojas) que son apreciadas para ya que son usadas para adornar el exterior, patios o jardines, pero presentan un problema para su reproducción, ya que este tiene un costo elevado para los viveros. *Cyrtomium falcatum* de igual manera de ha distribuido a lo largo del mundo por su gran potencial como ornamental, pero tiene ciertas limitantes y requiere cierto ambiente para su fácil reproducción (Fichas especies invasoras España, 2013). *Blechnum* también muestra una importancia basada en la ornamentación del perisporio en la caracterización de especies y grupos de afinidad intragenéricos y con otros géneros de *Blechnaceae* (Rolleri *et al*, 2012). Es así como con los métodos convencionales como la separación de brotes solo se consiguen tasas de multiplicación muy bajas y que pocas plantas se pueden obtener (Gómez & Páez, 2013). Es por lo que se pretende trabajar en la germinación de esporas de estos helechos debido a que se obtienen en cantidades muy grandes (más de 1000 esporas/mg) por lo que hay mayores posibilidades de tener mayor número de plantas ayudando en la parte de obtención de ejemplares y en la parte económica los viveristas que se encargan de distribuir esta especie, haciéndole más fácil su venta (Gómez & Páez, 2013).

Objetivo General

Germinar esporas de helechos ornamentales: *Platycerium bifurcatum*, *Cyrtomium falcatum* y *Blechnum.sp*.

Objetivos Particulares

- Establecer un cultivo aséptico de esporas.
- Germinar las esporas.
- Determinar las condiciones para la obtención de esporofitos.

Metodología:

Origen del material

Las esporas fueron obtenidas de frondas fértiles de plantas madre de *Platycerium bifurcatum*, obtenidas de dos fuentes principales; un jardín particular de la Ciudad de México (Pf1) y del Jardín Botánico del Bosque Chapultepec (Pf2), *Cyrtomium falcatum* y *Blechnum.sp* fueron donadas por un jardín particular de la Ciudad de México. Todo el

material vegetativo fueron recogidos al presentar un grado óptimo de maduración evidenciado por su coloración castaño oscuro.

Germinación y establecimiento de prótalos.

Antes del establecimiento de los helechos se realizó la preparación de los medios de cultivo: Se utilizó el medio Murashige y Skoog (MS), que contienen nitrato de amonio (NH_4NO_3), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de magnesio (MgSO_4), fosfato de potasio (K_2HPO_4), nitrato de potasio (KNO_3), reguladores de crecimiento agar y azúcar (Figs. 1 y 2)



Figura 1. Medio MS

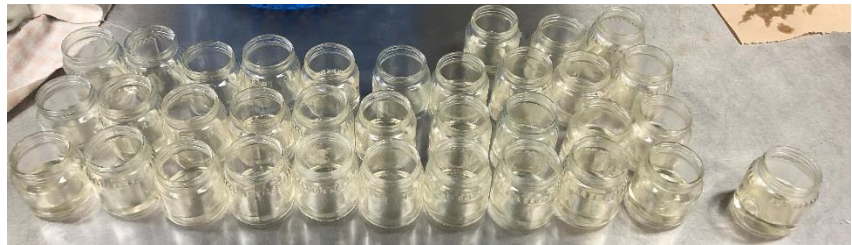


Figura 2. Medio MS en frascos de siembra

Para la siembra aséptica se seccionan los extremos de las frondas que contienen los esporangios y se lavan con agua y jabón, Luego se procede a enjuagar con agua corriente varias veces. Este procedimiento se realizó en distintas fechas debido a la obtención de el material vegetal; la primera siembra se hizo con *Platyserium bifurcatum* (Pf1) (Fig. 3) el 25 de septiembre de 2023, la segunda fue *Cyrtomium falcatum* el 1° de septiembre de 2023 (Fig. 3), el tercero fue *Platyserium bifurcatum* (Pf2) el 21 de septiembre de 2023 (Fig. 3) y una segunda siembra el 31 de octubre de 2023 (Fig. 3) y por último se sembró *Blechnum* el 17 de noviembre de 2023 (Fig. 3).

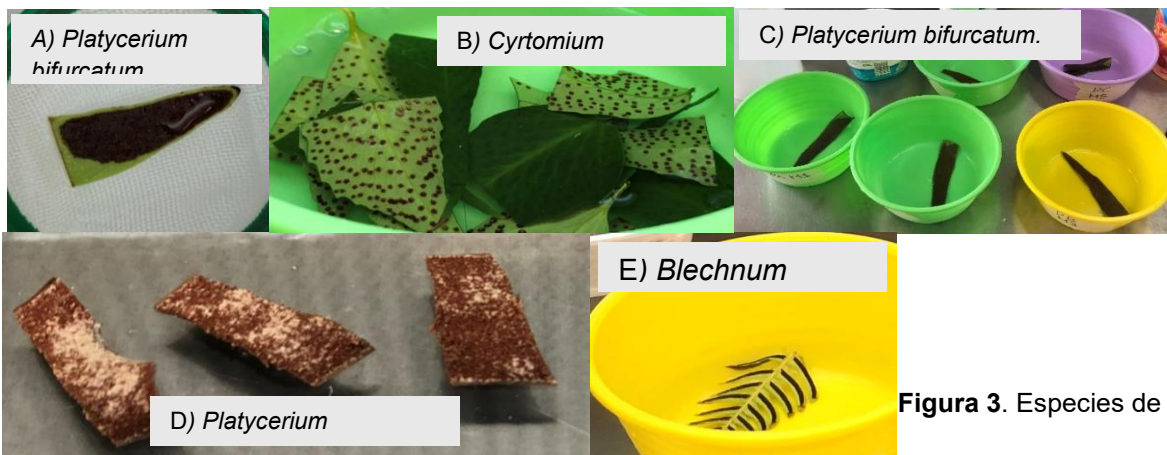


Figura 3. Especies de Helechos

Para la desinfección se realizó de la misma manera para cada vez en que se realizó las siembra (**Fig 4.**), dentro de la campana de flujo laminar, en la cual había frascos de precipitado (**Fig 5.**), en donde se sumergieron las frondas en alcohol al 70% durante 50 segundos después del tiempo se retiró el alcohol del material para proceder a sumergirlo en cloro al 30% por de 4 minutos. Después de esto se hicieron enjuagues con agua destilada (**Fig 6.**) para quitar todo rastro de Cloro para seguir con la siembra en el medio MS.



Figura 4.
Desinfección en
campana de flujo.

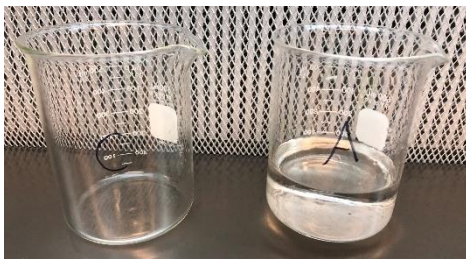


Figura 5. Vasos de precipitado
que contenían Cl y Alcohol.



Figura 6. Enjuague de las
frondas con agua destilada

En la siembra dentro del medio de cultivo, se hizo con la ayuda de la pinza y el bisturí de manera que la fronda quedaba de manera vertical para raspar con el bisturí el área donde se encontraban los soros y fueron depositados en el medio MS de manera homogénea. Después se sellaron los frascos que contenían el medio y se pasaron al cuarto de incubación con 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad a una temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$.



Figura 7. De las frondas se
extrajeron los soros.



Figura 8. Sellado e incubación

Para la siguiente fase de esporofitos se realizó de manera semejante a la propuesta por García (2013);

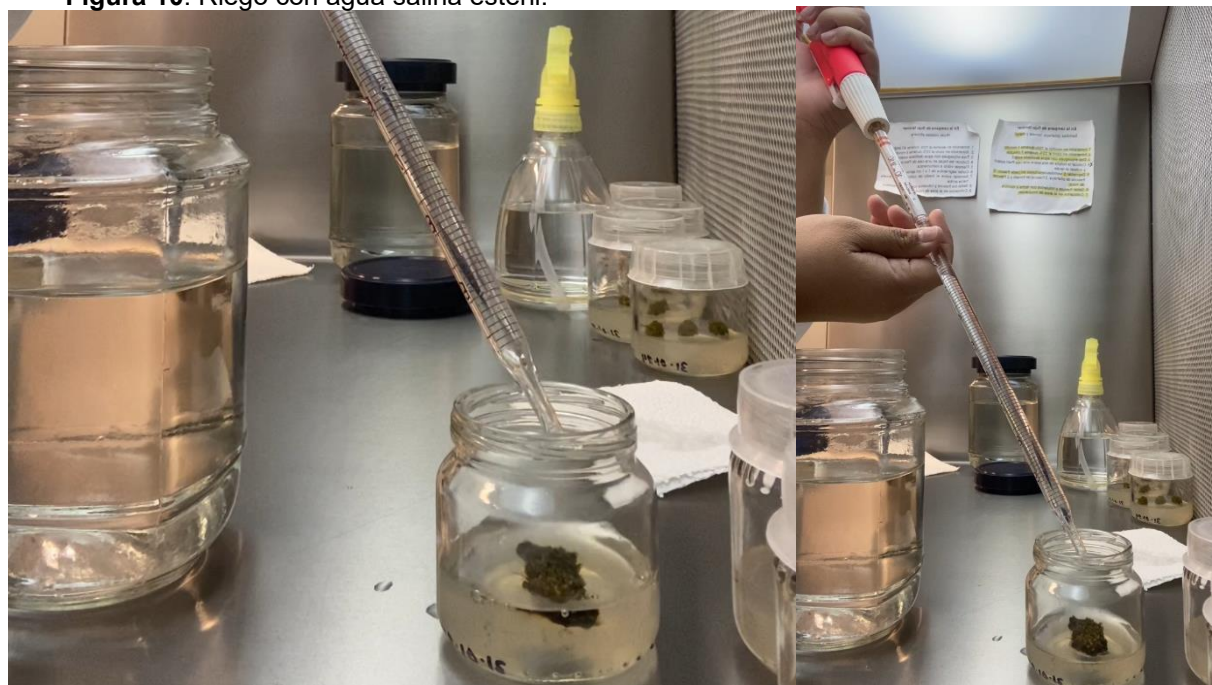
Obtención de esporofitos

De los gametofitos formados después la primera siembra de *Platyserium bifurcatum* estos se seccionaron en segmentos de aproximadamente 2 cm (**Fig 9**) y se colocaron en medios de cultivo MS, añadiéndole 10 ml de agua salina esterilizada previamente (**Figura 10**). Se volvieron a ubicar en el cuarto de incubación (**Fig 11**).



Figura 9. Segmentación para la siembra de gametofitos

Figura 10. Riego con agua salina estéril.



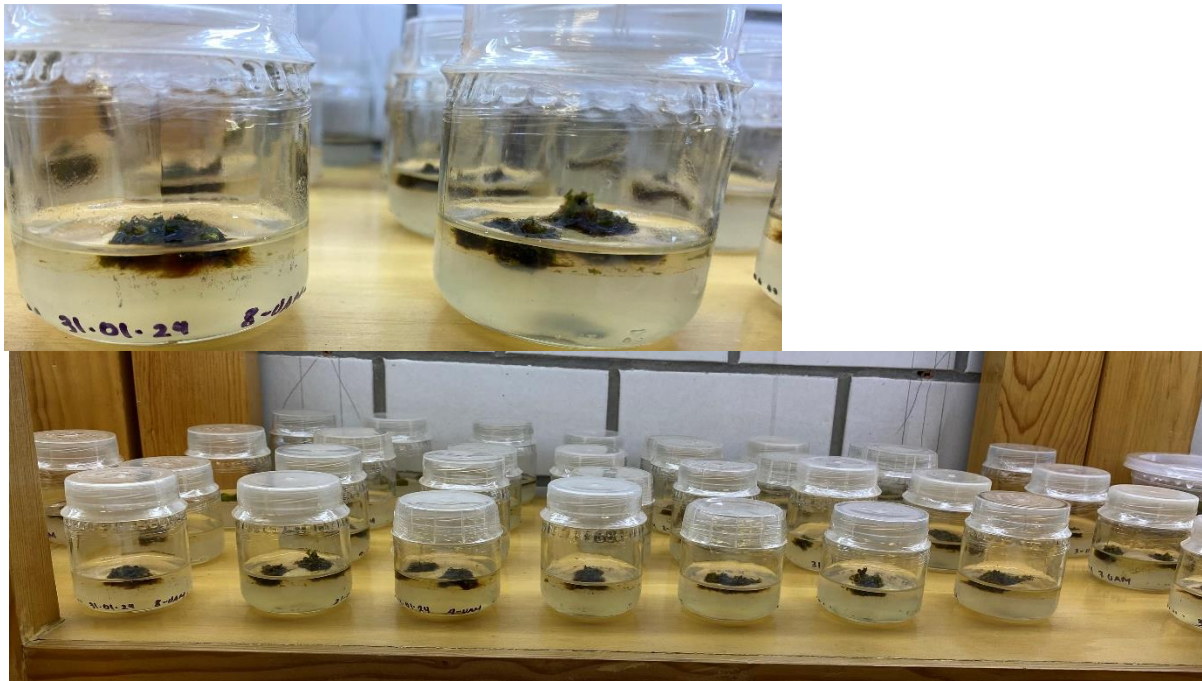


Figura 11. Incubación

Actividades realizadas

- Elaboración de medios de cultivos para los helechos trabajados (*Platyserium b.*, *Cyrtomiun f.* y *Blechnum*) y otras especies como Droseras, Bromelias, Cactus, Vid silvestre, Pitahaya, entre otros.
- Establecimiento de los helechos trabajados.
- Mantenimiento de las especies dentro del Laboratorio de Cultivo de tejidos.
- Limpieza y esterilización del material de laboratorio.
- Conocimiento de la utilización de los instrumentos dentro del laboratorio como Autoclave, campanas de flujo, instrumentaría, potenciómetro, etc.
- Toma de datos de las especies de helechos a trabajar.

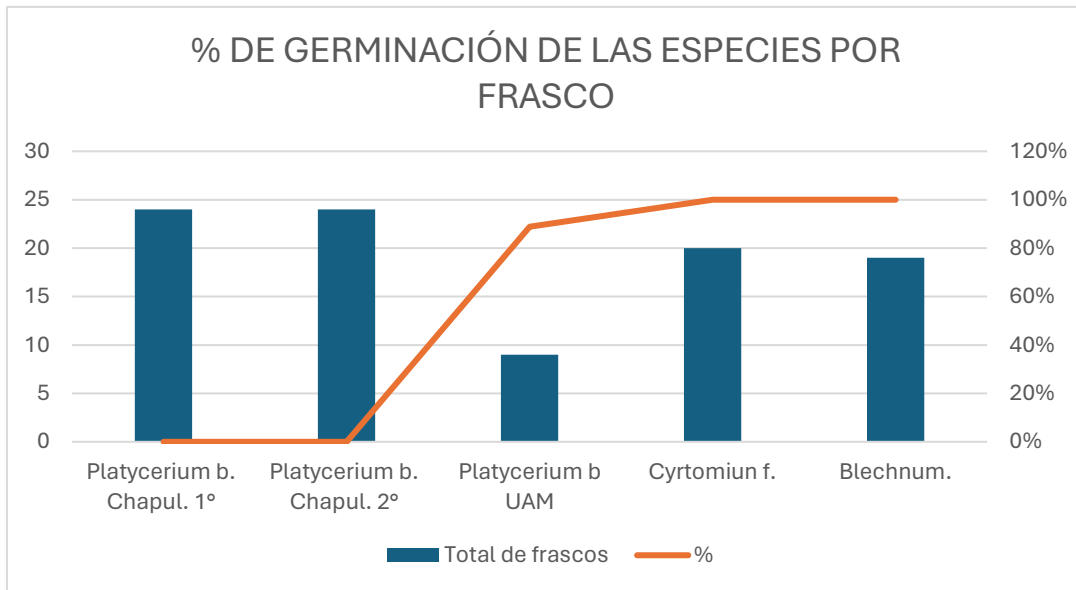
Metas alcanzadas

- Se establecieron los helechos con asepsia
- Germinación de la mayor parte de material vegetal

Resultados y Discusión

Aproximadamente entre los 19 a 25 días después de la siembra algunos de los soros empezaron a germinar en las especies *Platyserium b* (UAM) con un porcentaje del 88.8% (Fig 11.) (8/9 frascos) esto difiere un poco con lo obtenido por Gómez & Paez (2013) que obtuvieron un 100% de germinación, seguido con 100% de brotes en *Cyrtomiun f.* (20/20

frascos) y *Blechnum* (19/19 frascos) (**Fig 11.**) siendo igual a lo presentado por Vélez (2015) donde todas las esporas germinaron. Los que no obtuvieron germinación en ninguno de los frascos de cultivo fue *Platyserium b.* (**Imagen 12.**) proporcionados por el Jardín botánico de Chapultepec, siendo dos rondas de siembra en las cuales se contabilizaron 24 frascos en cada una (Ver **Grafica 1**).



Grafica 1. Porcentaje de germinación de *Platyserium b.* (UAM), *Platyserium b.* (Chapultepec), *Cyrtomiun f.*, y *Blechnum*.

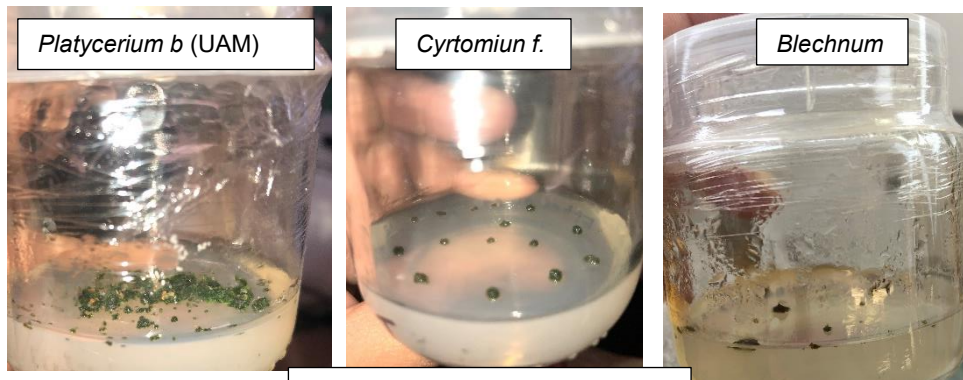


Figura 11. Soros germinando

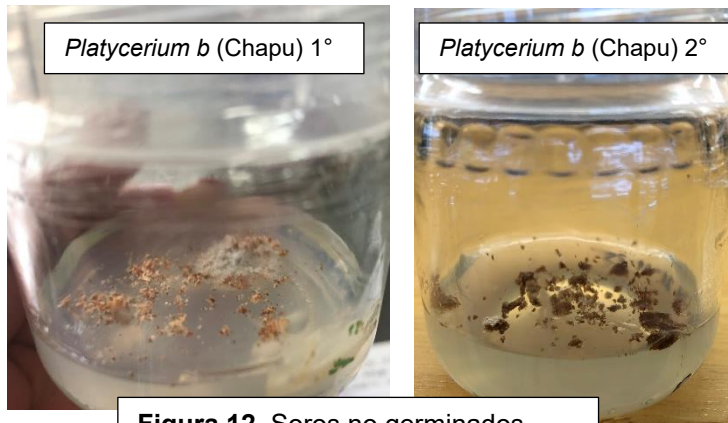
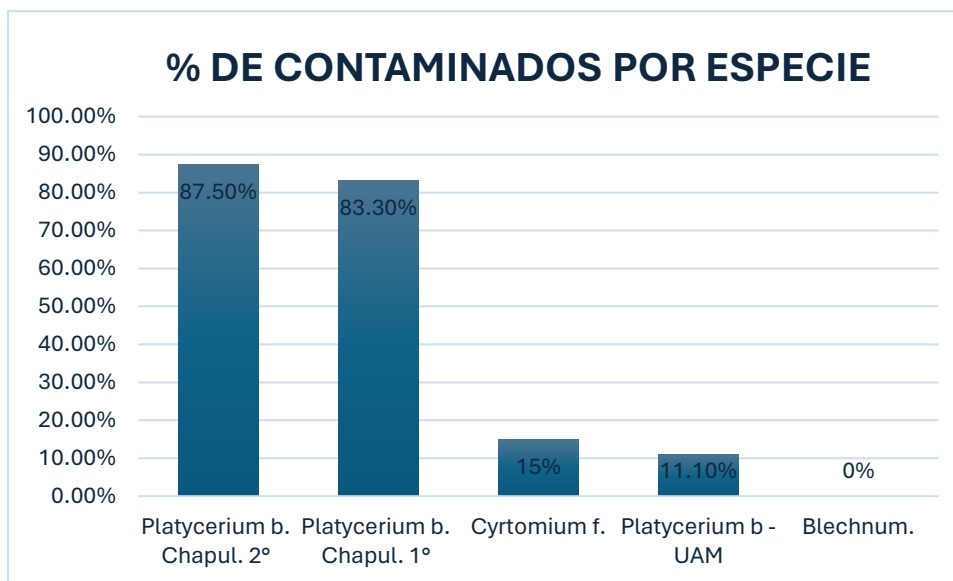


Figura 12. Soros no germinados

De los frascos que no germinaron algunos de ellos tuvieron contaminación (**Fig 13.**), del total de las especies el que tuvo una mayor incidencia fue *Platynerium bifurcatum* donado por el Jardín botánico de Chapultepec en la segunda ronda de siembra, este presentó un 87.5% de sus frascos (**Grafica 2**), también en esta mismo material vegetal en la primera ronda se tuvo un 83.3% de contaminados, de ahí pasamos con la especie *Cyrtomiun falcatum* con un 15%, el tercero fue *Platynerium b.* con un 11.1%, y el que no presentó ningún contaminado fue *Blechnum* en esto se difirió con la investigación realizada por Vélez (2015) donde no hubo ninguno contaminado, además que también comparado con lo obtenido en García (2013) y Gómez & Páez (2013) hay uan relevante diferencia ya que en estas no hubo contaminados mayores al 30%.



Grafica 2. Porcentaje de frascos contaminados en cada especie.



Imagen 13. Ejemplo de contaminados.

Teniendo la mayoría de los frascos contaminados se procedió a realizar la identificación de estos agentes, por lo cual se tomaron 9 frascos mayormente representativos de todos los que se tenían y se analizaron en el laboratorio de Fitopatología con ayuda del Doc. David Montiel que es el encargado, este se ubica en la misma Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

De estas pruebas se pudo reconocer tres tipos de hongos: *Cladosporium*, *Alternaria* y *Torula* (Fig 14); además también se pudo encontrar una bacteria de levadura (Fig 14).

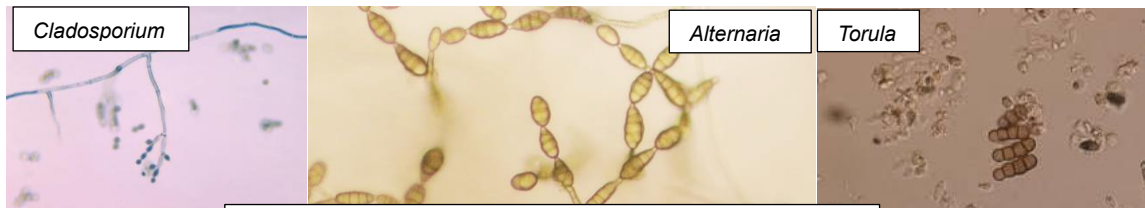


Figura 14. Hongos presentes en los contaminados



Figura 15. Levadura

De las especies que germinaron, solo los que empezaron a formar los gametofitos o prótalos a los 40 días después de la germinación *Platyserium b* (Fig 16) y a los 53 días después de la germinación *Cyrtomium f* (Fig 17). Este intervalo de formación de

gametofitos coincide con García (2013) y Gómez & Páez (2013) que tuvieron un rango de hasta 60 días en los cuales empezaron a brotar dichos prótalos.



Figura 16. Prótalos de *Platycerium b.*



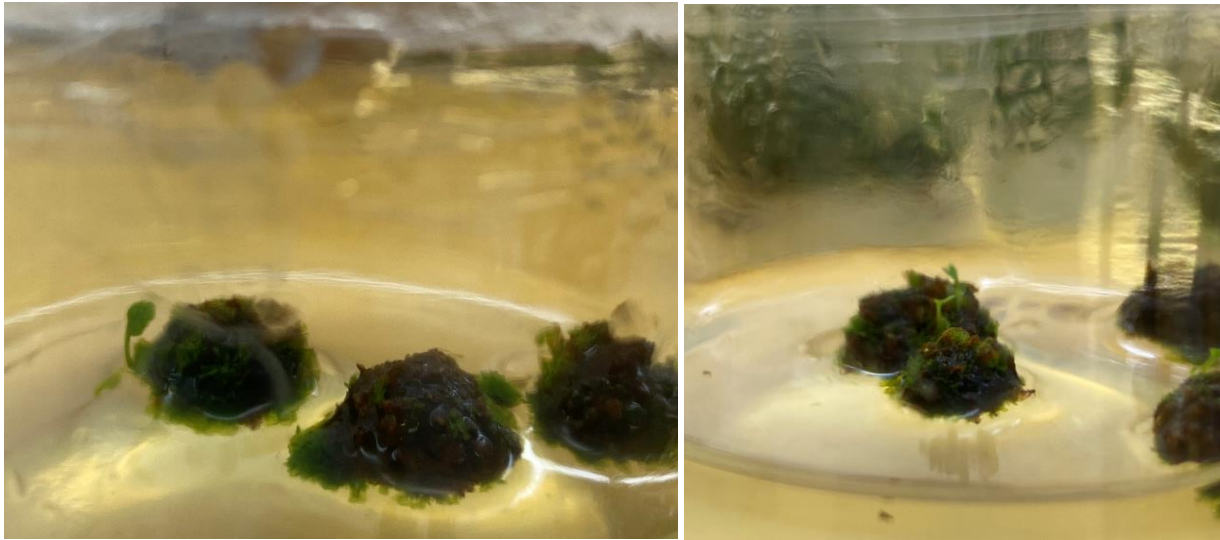
Figura 17. Prótalos de *Cyrtomium f.*

Y con respecto a la generación de esporofitos primero surgieron los de *Cyrtomium f* a los 24 días después de aparecer los gametofitos (**Fig 18**), y por el lado de *Platycerium b* se trasplantó a medio MS nuevo y se le aplicó 10 ml de agua destilada estéril, después de este trasplante empezaron a brotar los esporofitos a los 22 días después (**Fig 19**). Estos resultados se alejan a los reflejados en Vélez (2015) que los obtuvo a los 12 días después de tener a los esporofitos, pero también hay que mencionar que en el artículo de García (2013) se obtuvieron gametofitos a los 45 días, así que podríamos decir que en esta presente investigación se encuentra en un rango intermedio conforme a las demás investigaciones comparadas.



Figura 18. Esporofitos de *Cyrtomium f.*

Figura 19. Esporofitos de *Platycerium b.*



Conclusión

Del material vegetal utilizado y de las especies con que se trabajaron solo *Platycerium bifurcatum* (jardín particular), *Cyrtomium falcatum* y *Blechnum* lograron germinar en los medios de cultivo MS, teniendo brotes aproximadamente entre los 19 a 25 días después de la siembra en cada fecha en que se realizó. Los únicos soros de *Platycerium bifurcatum* que no presentaron ningún cambio y parecieron estar en letargo fue el material obtenido por el Jardín botánico de Chapultepec, siendo dos rondas de siembra en la cual ninguna dió resultados.

Todo el proceso de siembras, realizadas en distintas fechas, fueron hechas con la adecuada asepsia y en condiciones idóneas (luz y temperatura) proporcionadas por el cuarto de incubación. Pero se presentaron contaminados, siendo la segunda ronda de *Platycerium b* obtenido de Chapultepec y la primera ronda de este con 87.5% y 83.3% de contaminados, en cambio el que fue el más bajo en contaminación es de la misma especie *Platycerium b* (jardín particular) con un 11.1%, y el que no tuvo ningún percance fue *Blechnum* donde cada frasco germino sin contratiempos.

Con respecto a los gametofitos y esporofitos tenemos que solo dos especies lograron inducirlos, *Platycerium bifurcatum* (jardín particular) presento a los 40 días después de la siembra los prótalos, después de esto, fueron cambiados a medios nuevos de MS, además se les añadió 10 ml de agua esterilizada, entonces después de este trasplante a los 22 días empezó a generar sus esporofitos. En cambio, *Cyrtomium falcatum* presentó sus gametofitos a los 53 días después de la siembra, estos no se cambiaron de medio

por ningún motivo y tampoco se le hizo un riego con agua estéril si no que en el medio de un inicio a los 24 días después de la aparecieron los esporofitos.

Bibliografía:

- Fichas especies invasoras. (2013). *Cyrtomium falcatum* (L. f.) C. Presl. Canarias, España. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/cyrtomiumfalcatumlfcpresl_tcm30-439681.pdf
- García, L. Torres, D. & Romero, C. (2013). Regeneración de esporofitos de *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C.Chr. a partir de esporas germinadas in vitro. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Cuba. 7 p. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/102/83>
- Gómez, J. & Páez, J. (2013). Obtención de gametófitos y esporófitos del helecho cacho de venado (*Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr.) a partir de esporas. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Área de Propagación Controlada. Instituto de Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. 13 p. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/11674/1/5172-11377-1-SM.pdf>
- Gómez, J. (2005) Multiplicación del helecho cacho de venado (*Platyserium bifurcatum*) in vitro mediante la homogeneización de protalos e in vivo a partir de esporas. Universidad central de Venezuela. 115 p. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/11836/1/TESIS%20PREGRADO.pdf>
- Martínez, E. & Ramos, C. Biodiversidad de Pteridophyta en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S110-S113, 2014 DOI: 10.7550/rmb.31827. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmbiodiv/v85sene/v85senea13.pdf>
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2013). Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras. Disponible en: https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/cyrtomium_falcatum_2013_tcm30-69824.pdf
- Pérez, B. & Jaramillo, I. (1993) Helechos: propagación y conservación. Revista Ciencia. 7 p. Disponible en: https://cursa.ihmc.us/rid=1378732531792_1683791930_53023/Los%20Helechos.pdf
- Ramos, J., De la Sota, E., & Giudice, G. (2006). *Blechnum cordatum* (Blechnaceae): Nueva cita para la Flora del Noroeste de Argentina. ISSN 0373-580 X Bol. Soc.

Argent. Bot. 41 (1-2): 91 - 93. 2006. Disponible:
https://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2017/06/trabajo_8_Ramos.pdf

Rolleri, C., Prada, C., Galán, J., & Passarelli, L. (2013). Especies arborescentes del género *Blechnum* (Blechnaceae: Pteridophyta). *Revista de Biología Tropical*, 61(1), 377-408. Retrieved May 06, 2024, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442013000100032&lng=en&tlng=es.

SAGARPA. (2017) Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV): Implementación y puesta en marcha. Reporte de proyecto 2017. Ciudad de México. 11 p. Disponible en:
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/264918/Reporte_de_Proyecto_1_Laboratorio.pdf

Veléz, E. (2015). Micropropagación de Helechos Ornamentales. Informe Final. Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Producción Agrícola y Animal. 18p. Disponible en:
<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/24932/1/cbs1972580.pdf>